



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KÜÇÜK ORGANİK MOLEKÜLLERİN
BİYOTRANSFORMASYONUNU KATALİZLEYEN
ENZİMLERİN MÜHENDİSLİĞİ İÇİN YENİ BİR
STRATEJİ: RİBOSWITCH-EŞLENMİŞ TARAMA
PLATFORMU**

Doktora Tezi

Burhan BORA

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KÜÇÜK ORGANİK MOLEKÜLLERİN
BİYOTRANSFORMASYONUNUNU KATALİZLEYEN
ENZİMLERİN MÜHENDİSLİĞİ İÇİN YENİ BİR
STRATEJİ: RİBOSWITCH-EŞLENMİŞ TARAMA
PLATFORMU**

Burhan BORA

Danışman: Prof. Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Dereceli Doktora Programı

İzmir

2023



Burhan BORA tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Küçük Organik Moleküllerin Biyotransformasyonunu Katalizleyen Enzimlerin Mühendisliği İçin Yeni Bir Strateji: Riboswitch-Eşlenmiş Tarama Platformu**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14/09/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Serap EVRAN	
Üye	: Prof. Dr. Cenk SELÇUKİ	
Üye	: Prof. Dr. Zeki TOPÇU	
Üye	: Dr. Öğr Üyesi Caner GEYİK	
Üye	: Dr. Öğr Üyesi Canan ÖZYURT	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“Küçük Organik Moleküllerin Biyotransformasyonunu Katalizleyen Enzimlerin Mühendisliği İçin Yeni Bir Strateji: Riboswitch-Eşlenmiş Tarama Platformu”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14 / 09 / 2023

Burhan BORA

ÖZET**KÜÇÜK ORGANİK MOLEKÜLLERİN
BİYOTRANSFORMASYONUNU KATALİZLEYEN ENZİMLERİN
MÜHENDİSLİĞİ İÇİN YENİ BİR STRATEJİ: RIBOSWITCH-
EŞLENMİŞ TARAMA PLATFORMU**

BORA, Burhan

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap EVRAN

Eylül 2023, 76 sayfa

Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi, toksik moleküllerin uzaklaştırılması, ilaç moleküllerinin sentezlenmesi, terapötik araştırmalarda yeni fonksiyonelliklerin keşfi gibi biyoteknolojinin çeşitli alanlarında yeni enzim katalizlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yönlendirilmiş evrim uygulamalarında, özellikle küçük moleküllerin biyotransformasyonunu katalizleyen enzim mühendisliği alanında yeni enzim katalizlerinin geliştirilebilmesi için yenilikçi bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır. Genotip-fenotip bağlantısının kurulmasına dayalı güncel protein mühendisliği teknikleri oldukça hızlı bir gelişim kaydetmektedir. Ancak, söz konusu küçük moleküllerin biyotransformasyonunu katalizleyen enzimlerin evrimi olduğunda pahalı ve yüksek verimli robotik sistemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda yeni enzimlerin evrimi için farklı bir yaklaşım sergilenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Riboswitchler genetik ekspresyonu hedef analit derişimine yanıt olarak kontrol edebilen nükleik asit yapısında elementlerdir. Bu nedenle bu tez çalışmasının araştırma konusu protein mühendisliğinde riboswitchlerin kullanım potansiyelinin ortaya konmasıdır. Çalışma kapsamında emülsifiye edilmiş *in vitro* protein ekspresyon reaksiyonlarında riboswitch mühendisliği ve enzim mühendisliği protokolleri optimize edildi. Elde edilen bulgular, riboswitch eşlenmiş tarama platformunun enzim mühendisliği çalışmalarına katkı sunabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: protein mühendisliği, aptamer, riboswitch, riboswitch mühendisliği, *in vitro* seleksiyon



ABSTRACT
A NOVEL STRATEGY FOR ENGINEERING OF ENZYMES FOR
THE CATALYSIS OF SMALL ORGANIC MOLECULE
BIOTRANSFORMATION: RIBOSWITCH-COUPLED SCREENING
PLATFORM

BORA, Burhan

PhD in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Serap EVRAN

September 2023, 76 pages

There is an urgent need for novel enzymatic biocatalysis in order to meet demand for the development of novel antibiotics, bioremediation of toxic molecules and enzyme catalysis in therapeutic research area. When it comes to directed evolution of enzymes acting on small organic molecules, a novel approach is required in the area in order to accelerate novel enzyme discovery. Already available protein engineering approaches rely on highly expensive high-throughput robotic systems, or to study self-reporting enzymes like DNA polymerases. Riboswitches are genetic control elements that can respond to the target molecule concentration. Furthermore, aptamer domain that exists in riboswitch structure makes it easier to develop a new riboswitch sequence against almost any available target. For this reason, the main objective of this work is to evaluate the potential of riboswitches, relatedly aptamers, to be used in the area of protein engineering. With this study, we aimed to optimize riboswitch engineering and enzyme engineering protocols within the emulsified *in vitro* protein expression reactions. The findings show that the riboswitch coupled screening platform can contribute to enzyme engineering studies.

Keywords: protein engineering, aptamers, riboswitches, riboswitch engineering, *in vitro* selection

ÖNSÖZ

Lisans tezimde protein mühendisliği ile ilgili çalışma yapma fırsatım oldu. Bu süreçte moleküler klonlama, rekombinant protein üretimi ve enzim karakterizasyonuna ilişkin deneyim edinme fırsatım oldu. Yüksek lisans tezim kapsamında DNA aptamerlerinin geliştirilmesine yönelik SELEX tekniğini öğrendim. Bu kapsamda DNA aptamerlerinin geliştirilmesi ve *in vitro* karakterizasyonuna ilişkin deneyim kazandım. DNA aptamerlerinin protein mühendisliğinde kullanılabilmesi potansiyelinin araştırılması fikri danışman hocamın bir önerisi üzerine aklımda yer etti. Nihayetinde riboswitchlerin aptamer alt birimi sayesinde bu soruya bir cevap sunabileceğini farketdiğimde, tez çalışmamın konusu şekillenmiş oldu.

Bu tez çalışması kapsamında riboswitchlerin protein mühendisliğinde kullanım potansiyelini araştırdım. Ancak, protein mühendisliğinin oldukça geniş kapsamı, aptamerlerin esnek doğası ve riboswitchlerin fonksiyonel özellikleri söz konusu olduğunda tez çalışması kendi sınırlarının ötesinde öğretici bir mahiyete büründü. Bu tez çalışması ile birlikte yepyeni bir araştırma alanının içinde olmanın farkındalığını yaşıyorum.

Burhan BORA

İZMİR, 2023



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	vii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xii
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Protein Mühendisliği.....	2
1.2 SELEX	3
1.3 Riboswitchler.....	4
1.4 <i>In vitro</i> Kompartmanlar.....	5
2. MATERYAL ve METOD	9
2.1 Materyal	9
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar	9
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	10
2.2 METOD.....	11
2.2.1 Riboswitch Kütüphanesinin Tasarlanması	11
2.2.2. SNAP-Tag Enziminin Klonlanması	16

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.3. <i>In vitro</i> Protein Ekspresyon Koşullarının optimize Edilmesi	19
2.2.4. T7 Promotor terminatör bölgelerinden PCR amplifikasyonu	20
2.2.5. <i>In vitro</i> protein sentez kitinin test edilmesi.....	20
2.2.6. <i>In vitro</i> Emülsiyon Prosedürünün Optimize Edilmesi.....	21
2.2.7. <i>In vitro</i> kompartmanlarda Riboswitch seleksiyonu.....	25
2.2.8 Riboswitch Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizileme Analizi	29
2.2.9. Tiamin Pirofosfokinaz Enzim Kütüphanesinin Tasarımı ve Eldesi	31
2.2.10. Tiamin Pirofosfokinaz Enziminin <i>in vitro</i> Kompartmanlarda Seleksiyonu	34
2.2.11. Tiamin Pirofosfokinaz Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizi Analizi..	36
3. SONUÇ VE TARTIŞMA	37
3.1. Riboswitch Kütüphanesinin Tasarlanması.....	37
3.2. SNAP-Tag Enziminin Klonlanması	39
3.3. SNAP Enziminin EMSA analizleri ile aktivite tayini	43
3.4. <i>In vitro</i> Protein Ekspresyon Koşullarının optimize Edilmesi	46
3.5. <i>In vitro</i> Emülsiyon Prosedürünün Optimize Edilmesi.....	52
3.6. <i>In vitro</i> kompartmanlarda Riboswitch seleksiyonu.....	58
3.7. Riboswitch Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizileme Analizi	59
3.8. Tiamin Pirofosfokinaz Enziminin <i>in vitro</i> Kompartmanlarda Seleksiyonu ...	62
4. ÖNERİLER.....	70
5. KAYNAKLAR.....	71
TEŞEKKÜR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

Şekil 1.1 SELEX tekniğinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 1.2 Riboswitch yapısının şematik gösterimi ve hedef ligand varlığında translasyon.....	5
Şekil 1.3 SNAP Display tekniğinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.4 hTPK1 enziminin TPP ile birlikte üç boyutlu yapısı	8
Şekil 2.1 RSTPP kütüphanesinin final ekspresyon kasedi.....	11
Şekil 2.2 TPP Riboswitch sekonder yapısı.....	12
Şekil 2.3 RSTPP Kütüphanesinin olası sekonder yapısı.....	13
Şekil 2.4 pSNAP-tagT72 vektörünün haritası.....	17
Şekil 2.5 RSTTP kütüphanesinden yola çıkılarak yapılacak <i>in vitro</i> riboswitch seleksiyonunun şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.6 hTPK1 üzerinde yapılan mutasyon analizleri.....	32
Şekil 2.7 hTPK1 kodlayan sentetik gen dizisi.....	33
Şekil 2.8 <i>In vitro</i> kompartmanlarda riboswitch-eşlenmiş enzim tarama platformunun şematik gösterimi.....	37
Şekil 3.1 RSTPP-2-Fw ve T7 term primerleri ile 8 nolu plazmitten elde edilen PCR ürünü.	37
Şekil 3.2 RSTPP-1-rv ve 5'-SH ile yapılan PCR reaskiyon ürünü.	38
Şekil 3.3 F-1 ve F-2 fragmentlerinin fusion PCR görüntüsü..	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
Şekil 3.4 SNAP-pET-28a koloni PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	40
Şekil 3.5 İzole edilen plazmidler ile yapılan PCR reaksiyonlarına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	40
Şekil 3.6 Kalıp DNA 1ng/100 µl ve reaksiyon karışımı %5 DMSO içerecek şekilde hazırlandığında elde edilen SNAP PCR görüntüsü.....	41
Şekil 3.7 SNAP-pET-28a klonlarının <i>E. coli</i> T7 Express Iq RP ile yapılan test ekspresyonu	42
Şekil 3.8 Numaralı koloni ile yapılan büyük ölçekli üretim ve saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizi.	43
Şekil 3.9 BG-maleimide modifiye DNA fragmentlerinin SNAP enzimi ile inkübasyonu sonrası elde edilen EMSA analiz görüntüsü	45
Şekil 3.10 F1+F2 füzyon ürünü olan riboswitch kütüphanesinin (BG-maleimide modifiye) SNAP enzimi ile inkübasyonunu ardından EMSA analizi.	45
Şekil 3.11 Final RSTPP kütüphanesinin BG-Maleimid konjugasyonu sonrası SNAP enzim aktivitesinin EMSA Analizi.....	46
Şekil 3.12 Ara h 1 kodlayan pET28a_Ah1 klonundan lineer DNA eldesi için PCR amplifikasyon ürünü.	47
Şekil 3.13 GFP ve DHFR kodlayan gen bölgelerinin PCR ürünü.....	47
Şekil 3.14 pET28a_Ah1 klonunun kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon ürününün SDS-PAGE görüntüsü.	48
Şekil 3.15 pET28a_Ah1 klonunun kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon ürününün SDS-PAGE görüntüsü.	48
Şekil 3.16 DHFR ve GFP kodlayan plazmidler ile yapılan reaksiyonun SDS-PAGE görüntüsü.	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
Şekil 3.17 DHFR ve GFP plazmid DNA ve lineer DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı reksiyonların SDS PAGE görüntüsü.	50
Şekil 3.18 <i>In vitro</i> protein ekspresyon kiti kullanılarak DHFR ve Ara h 1 proteinlerinin sentezine ilişkin SDS-PAGE analizi	50
Şekil 3.19 Omni Tip kullanılarak yapılan homojenizasyon işlemi sonucu elde edilen emülsiyonların ışık mikroskobu altında görüntüsü	52
Şekil 3.20 Manyetik karıştırıcıda elde edilen w/o emülsiyonlarının ışık mikroskobu altında 100X büyütme ile alınan görüntüsü.	52
Şekil 3.21 Manyetik karıştırıcıda 1500 rpm hızında elde edilen emülsiyonların 1000X ışık mikroskop görüntüsü.	53
Şekil 3.22 Manyetik karıştırma ile hazırlanan emülsiyonların stabilitesi.	53
Şekil 3.23 DNA geri kazanımına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	55
Şekil 3.24 Emülsiyon PCR sonucu ekstrakte edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	56
Şekil 3.25 <i>E. coli</i> Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	57
Şekil 3.26 RSTPP Seleksiyon: Lib Fusion.....	59
Şekil 3.27 RSTPP Seleksiyon	59
Şekil 3.28 RSTPP kütüphanesinin seleksiyon sonrası geri kazanımı	59
Şekil 3.29 Sanger DNA dizileme analizi sonucu elde edilen dizilerin Clustal w ile analiz edilen dizi benzerlikleri.	60
Şekil 3.30 Clustal w programı ile belirlenen filogenetik benzerlik.	61
Şekil 3.31 En iyi zenginleşen dizinin mfold programı ile beirlenen sekonder yapısı	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.32 hTPK1 kodlayan genin PCR amplifikasyon ürünü.	63
Şekil 3.33 pET-28a vektörünün ve hTPK1 kodlayan genin restriksiyon enzim kesimi.	63
Şekil 3.34 T4 DNA ligaz enziminin katalizlediği ligasyon reaksiyonunun concatamer oluşumu.	64
Şekil 3.35 hTPK1 proteininin test ekspresyonuna ilişkin %12 Tricine-SDS-PAGE analizi	65
Şekil 3.36 İnaktif enzim ve hTPK1 kütüphane kodlayan N-terminal ve C-terminal fragmentlerin PCR amplifikasyon ürünleri..	66
Şekil 3.37 İnaktif enzim ve hTPK1 kütüphane kodlayan fragmentlerin füzyon PCR ürünleri.	68
Şekil 3.38 Kodlamayan 5' ve 3' bölgelerin eklenmesi ile elde edilen final hTPK1 varyant kütüphanesi.	68
Şekil 3.39 In vitro seleksiyon turları boyunca elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri	70

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 RSTPP Kütüphanesi için tasarlanan DNA dizileri.....	14
Tablo 2.2 RSTPP Kütüphanesinin eldesi için kullanılan primer dizileri	15
Tablo 2.3 Restriksiyon kesim reaksiyon bileşenleri	15
Tablo 2.4 Ligasyon reaksiyon bileşenleri	15
Tablo 2.5 Koloni PCR reaksiyon karışımı bileşenleri	15
Tablo 2.6 Lineer DNA eldesi için PCR reaksiyon karışımı bileşenleri	20
Tablo 2.7 <i>In vitro</i> protein sentez reaksiyonunun bileşenleri.	21
Tablo 2.8 Emülsiyon içinde <i>in vitro</i> protein ekspresyon testinin reaksiyon bileşenleri	25
Tablo 2.9 DHFR aktivitesi reaksiyon bileşenleri	25
Tablo 2.10 <i>In vitro</i> protein ekspresyonunun reaksiyon bileşenleri.....	27
Tablo 2.11 Pozitif seleksiyon turlarında <i>in vitro</i> protein ekspresyon karışımı.....	29
Tablo 2.12 Final riboswitch kütüphanesinin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımı.....	31
Tablo 2.13 PCR ürünü final riboswitch kütüphanesinin vektöre klonlanması reaksiyon bileşenleri	31
Tablo 2.14 Final riboswitch kütüphanesinin koloni PCR reaksiyonu bileşenleri .	31
Tablo 2.15 hTPK1 fonksiyonel, mutant ve NNK kütüphanesinin eldesinde kullanılan primer dizileri.....	34
Tablo 2.16 <i>in vitro</i> enzim seleksiyonunda kullanılan protein sentez reaksiyon karışımı.....	36
Tablo 3.1 <i>In vitro</i> emülsiyonlardan HRP geri kazanım denemesi	54
Tablo 3.2 DNA geri kazanımına ilişkin elde edilen derişim verileri	55

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.3 Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA derişimleri.....	55
Tablo 3.4 <i>E. coli</i> Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA derişimleri.....	56



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltmalar***E. coli*

EMSA

PAGE

RSTPP

TPP

Açıklama*Escherichia coli*

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TPP Riboswitch

Tiamin pirofosfat





1. GİRİŞ

Doğada benzeri bulunmayan enzim katalizinin geliştirilmesine yönelik çabalar son yıllarda dikkat çekici ölçüde artış göstermektedir. Enzimlerin “promiscuous” aktivitesinden yola çıkılarak substrat seçimliliğinin değiştirilmesi, belirli bir substratın katalizine ilişkin aktivitenin iyileştirilmesi ve kataliz koşullarının modifiye edilmesi gibi uğraşlar çeşitli enzim katalizlerinin aydınlatılması ile sonuçlanmıştır (Arnold, 2015). Ancak, her bir hedef molekülün seçimli katalizine yönelik protein mühendisliği çalışması, çalışılan enzimin ve hedef substratın çeşitli özelliklerine göre yeniden tasarlanmalıdır. Küçük organik moleküllerin enzim katalizine ilişkin evrensel bir yöntem literatürde bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, küçük organik moleküllerin enzimatik biyotransformasyonuna yönelik protein mühendisliği çalışmalarında evrensel olarak kullanılabilecek yeni bir tarama yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, küçük moleküllerden protein ve hücre gibi kompleks hedeflere varıncaya kadar geniş yelpazede hedef moleküle karşı geliştirilmiş nükleik asit aptamerlerinden yararlanılmıştır. Nükleik asit aptamerleri, riboswitchler ve mRNA/ribozom gösterim tekniklerinin *in vitro* kompartmanlama yöntemi ile kombine edilmesi sayesinde küçük organik moleküllerin dönüşümünü katalizleyen yeni enzimlerin geliştirilmesine yönelik yeni bir yöntemin uygulanabilirliği araştırıldı. mRNA ve ribozom gösterim teknikleri son yıllarda çok sayıda antikor, ligand bağlayıcı protein ve az sayıda enzimin geliştirilmesinde kullanılmış güçlü tekniklerdir. (S. S. Chen, Yang, ve Barankiewicz 2008; Cong vd. 2016; Galán vd. 2016; Lee vd. 2013; Zoller vd. 2013). Bu tekniklerin en önemli avantajı transformasyondan kaynaklanan dezavantajları barındırmaması ve çok daha fazla sayıda gen varyantının eşzamanlı olarak taranabilmesidir. Bu tez projesinde model bir seleksiyon yöntemi olarak TPP spesifik riboswitchlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. TPP spesifik riboswitch dizisi üzerinde bölge satürasyon mutageniz tekniği kullanılarak rasgele mutasyonlar içeren dejenere riboswitch kütüphanesi elde edildi. Riboswitch kütüphanesinden yola çıkılarak *in vitro* emülsiyonlar içinde

TPP varlığında aktive olan riboswitch varyantları tarandı. Tez projesinin amacına uygun olarak, TPP riboswitch kontrolünde *in vitro* emülsiyonlarda TPP sentezini katalizleyen hTPK1 (insan tiamin pirofosfokinaz) enziminin dejenere kütüphanesi tarandı. hTPK1 kütüphanesi içinde aktif varyantların zenginleşmesi yoluyla tez çalışması kapsamında geliştirilen *in vitro* tarama platformunun başarısı doğrulandı.

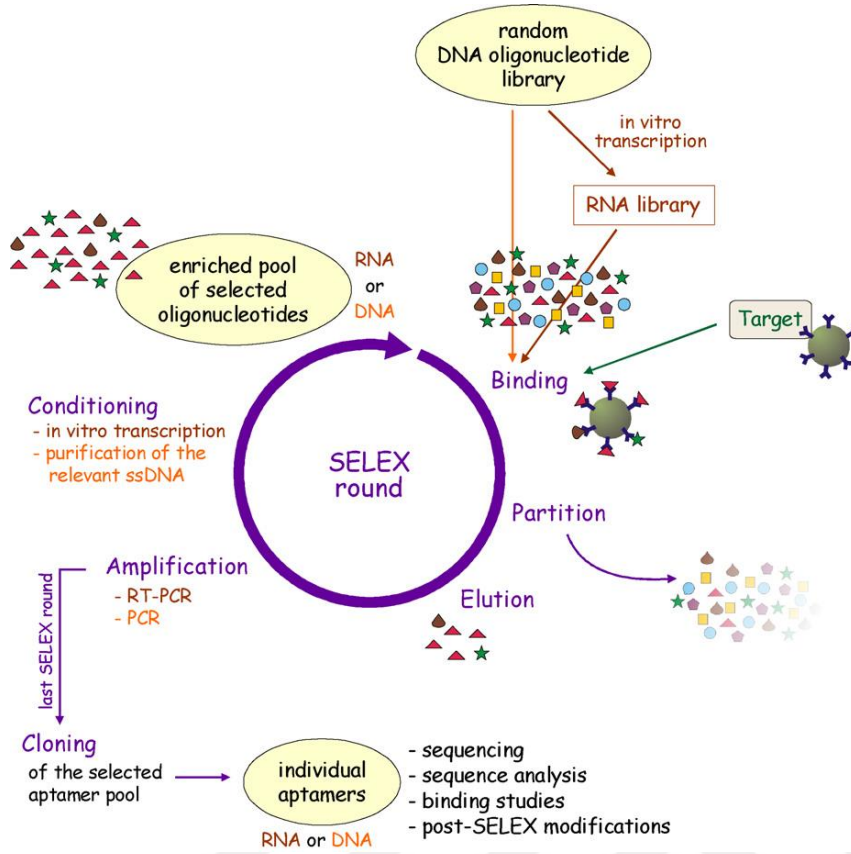
1.1 Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, doğal proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin aydınlatılmasının yanı sıra endüstriyel veya terapötik amaçlı kullanım potansiyeli olan proteinlerin çeşitli özelliklerinin kullanım amacına göre iyileştirilmesini amaçlayan bir alandır (Tobin vd. 2014). Günümüze değin protein mühendisliğinde kullanılan teknik ve yöntemler oldukça geniş bir yelpazede çeşitlilik kazanmıştır. Faj gösterim, maya ikili gösterim, mRNA gösterim, ribozom gösterim, *in vitro* kompartmanlama ve floresans temelli yöntemler gibi modern tarama teknikleri kullanılmaktadır. Söz konusu yöntemler kullanılarak terapötik ve endüstriyel kullanım ihtiyacına cevap veren birçok protein geliştirilmiştir. Protein mühendisliğinde kullanılmakta olan yöntemlerin çeşitliliğine karşın, hedeflenebilecek protein çeşitliliği aynı ölçüde yüksek değildir. Bunun nedeni, söz konusu yöntemlerde kullanılan tarama ya da seleksiyon stratejilerinin birbirini takip eden benzer stratejilerden ibaret olmasıdır. Faj gösterim, mRNA gösterim, ribozom gösterim, maya ikili gösterim ve *E. coli* gösterim gibi teknikler birbirine alternatif olarak geliştirilmiş, ancak birbirine benzer yöntemlerdir. Çeşitli antikorların, peptid aptamerlerinin ve substrat seçimliliği iyileştirilmiş proteazların geliştirilmesine ilişkin çalışmalarda söz konusu teknikler kullanılmaktadır. Ancak, küçük organik moleküllerin dönüşümünü katalizleyen eşsiz enzimlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda söz konusu yöntemlerden yararlanma olanağı oldukça sınırlıdır. Ayrıca, bu tür çalışmalarda hedef substrat molekülünün, reaksiyon ürününün ve başlangıç enzim varyant kütüphanesinin çeşitli özelliklerine göre çalışma planının yeniden tasarlanması gerekmektedir. Küçük organik moleküllerin dönüşümünü katalizleyen yeni ve eşsiz enzimlerin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek evrensel bir yöntem literatürde mevcut değildir.

1.2 SELEX

Nükleik asit aptamerleri metal iyonları, küçük organik moleküller, protein ve hücre gibi kompleks hedeflere varıncaya değin geniş yelpazede hedef moleküle karşı geliştirilmiştir. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) tekniğinin etkinliği ve hedef molekülün doğasına uyarlanabilen esnekliği sayesinde hemen hemen her türlü hedefe karşı nükleik asit aptamerinin geliştirilmesi mümkündür. Günümüze değin 50'den fazla SELEX tekniği geliştirilmiştir (Darmostuk et al., 2014). SELEX tekniğinin şematik bir gösterimi Şekil 1.1'de görülmektedir (Stoltenburg et al., 2007). SELEX Tekniği doğası gereği oldukça esnek bir teknik olduğundan günümüze değin metal iyonları, proteinler, toksinler, küçük organik moleküller ve çeşitli hücre hatlarına karşı DNA ve RNA aptamerleri geliştirilmiştir (Zhuo et al., 2017).

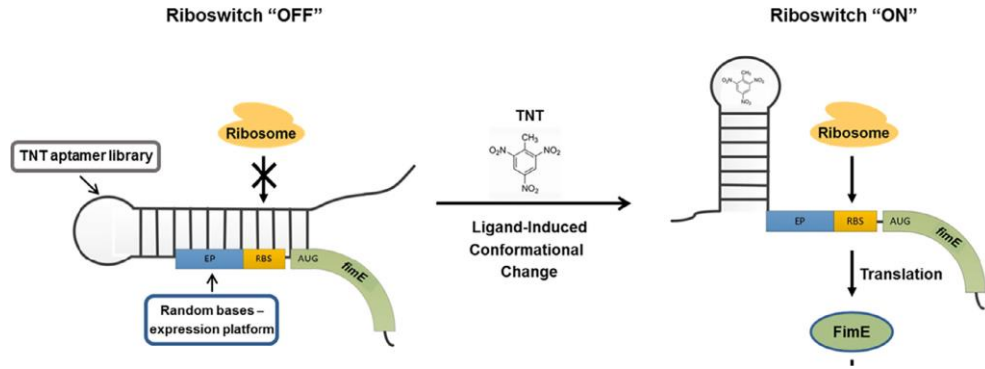
Bu tez çalışmasının araştırma sorusu, doğada benzeri bulunmayan yeni ve eşsiz enzim katalizlerinin keşfedilmesi amacı ile nükleik asit aptamerlerinin potansiyelinin değerlendirilmesidir. Nükleik asit aptamerlerinin bu potansiyelini değerlendirmek amacıyla riboswitchlerin kullanılması planlanmıştır. 2002 yılında keşfedilen riboswitch yapıları aptamer ve katalitik bölge olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Riboswitch mühendisliği çalışmaları ile doğada bulunmayan yeni riboswitchler çeşitli hedeflere karşı geliştirilmiştir. Riboswitchlerin aptamer bölgesinin değiştirilmesi ve iki bölgeyi birbirine bağlayan dizinin optimize edilmesi yoluyla yeni riboswitchlerin geliştirilmesi mümkündür. Oldukça geniş bir yelpazede hedefe karşı geliştirilme olanağı bulunan nükleik asit aptamerlerinin ve riboswitchlerin protein mühendisliği çalışmalarında bir araç olarak kullanım potansiyelinin araştırılması, protein mühendisliği çalışmalarına büyük katkı sunabilir. Böylelikle, küçük organik moleküllerin dönüşümünü katalizleyen yeni ve eşsiz enzimlerin geliştirilmesi mümkün olabileceği gibi, terapötik ve endüstriyel öneme sahip yeni proteinlerin ve enzimlerin geliştirilmesi de mümkün olabilecektir.



Şekil 1.1 SELEX tekniğinin şematik gösterimi (Stoltenburg et al., 2007).

1.3 Riboswitchler

Riboswitchler bir aptamer domaini içeren RNA yapısında işlevsel moleküllerdir. Şekil 1.2’de riboswitch yapısı ve hedef ligand olan TNT varlığında translasyonun aktivasyonu şematize edilmektedir (Harbaugh et al., 2018). Riboswitchler hedef ligand varlığında translasyonu aktive edecek ya da inhibe edecek şekilde geliştirilebilirler. Riboswitchlerin hedef ligand varlığındaki bu davranışlarına göre geliştirilmelerine ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur (Cui et al., 2016; Davidson et al., 2013; Weigand et al., 2008). Riboswitch mühendisliği yaklaşımı kullanılarak doğada var olan riboswitchlerin hedef ligandları değiştirilebilmekte ve *E. coli*’de ekspresyonun konsantrasyon bağımlı olarak kontrol edilmesinde kullanılabilmektedir (Dixon et al., 2012). SELEX tekniğinin esnek doğası ve riboswitch mühendisliğinin özgün başarısı sayesinde yeni enzimlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek riboswitch tasarımları mümkündür. Bu nedenle, bu tez çalışmasında riboswitch temelli yeni bir tarama platformunun geliştirilmesi hedeflenmiştir.



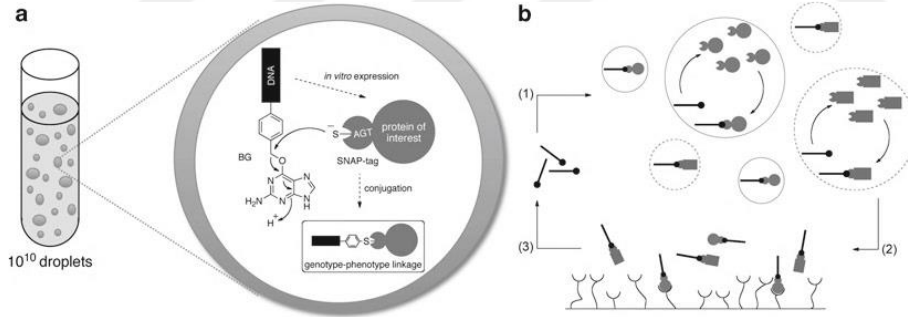
Şekil 1.2 Riboswitch yapısının şematik gösterimi ve hedef ligand varlığında translasyon (Harbaugh et al., 2018).

Riboswitchlerin protein mühendisliğinde kullanımı için güncel protein mühendisliği teknikleri modifiye edilebilir. Ancak, yukarıda da belirtildiği gibi güncel protein mühendisliği tekniklerinden bakteri yüzey gösterim ve maya yüzey gösterim teknikleri transformasyon etkinliği bariyerinden ötürü düşük sayıda varyantın taranabileceği tekniklerdir (Packer & Liu, 2015). Buna karşın mRNA display ve ribozom display teknikleri *in vitro* tekniklerdir ve transformasyon etkinliği bariyeri bu iki teknik için söz konusu değildir (He & Taussig, 2002; Kamalinia et al., 2021). Yüksek düzeyde varyant tarama kapasiteleri ve günümüze değin kanıtlanmış etkinliklerine karşın mRNA gösterim ve ribozom gösterim teknikleri riboswitch kontrolü altındaki varyantların taranması için uygun değildir. Zira, her iki teknik de günümüze değin peptid aptamerler, antikorlar ve yeni protein ligandlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bu nedenle mRNA gösterim ve Ribozom gösterim teknikleri bu tez konusunun hedefine ulaşması için uygulanabilecek teknikler değildir. Çünkü, riboswitch kontrolü altında ifade edilen fenotip ile genotip bağlantısının *in vitro* kompartmanlarda gerçekleşmesi gerekmektedir.

1.4 *In vitro* Kompartmanlar

In vitro kompartmanlarda protein mühendisliği tekniği ile günümüze değin çok sayıda enzim geliştirilmiştir. Özellikle water in oil (w/o) olarak adlandırılan yağ

emülsiyonlarının kullanımını basit olmaları ve düşük hacimde yüksek sayıda *in vitro* kompartıman barındırmaları nedeniyle oldukça popülerdir (Abil et al., 2017; Sumida et al., 2012). Yağ emülsiyonlarını emülsiyon PCR adı verilen teknikle kullanımı da oldukça yaygındır (Shao et al., 2011). Ancak, söz konusu problem riboswitch kontrolü altındaki raportör gen ekspresyonunun enzim varyantının aktivitesi ile ilişkilendirilmesi olduğunda yukarıda adı geçen teknikler yeterli değildir. Buna karşın, yakın zamanda geliştirilen ve SNAP Display adı verilen teknik tam olarak bu amaca hizmet edebilecek bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Şekil 1.3'te SNAP Display tekniğinin şematik gösterimi yer almaktadır (Kaltenbach and Hollfelder, 2012). Söz konusu teknik protein-protein etkileşiminin mikroemülsiyonlar içinde gösterimi şeklinde geliştirilmiş bir tekniktir. Bu tez konusu söz konusu tekniğin riboswitch kontrolü altındaki gen ifadesinin yeni enzim varyantlarının taranmasında kullanımı potansiyelinin araştırılması üzerine kurgulanmıştır.

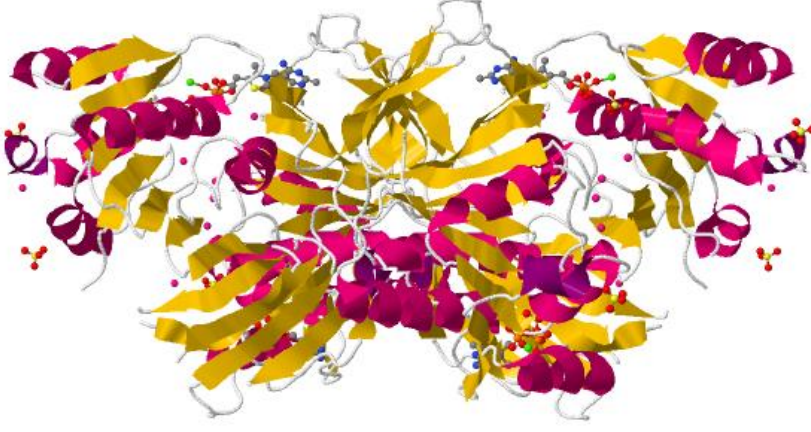


Şekil 1.3 SNAP Display tekniğinin şematik gösterimi (Kaltenbach adn Hollfelder,2012).

Protein mühendisliğinde riboswitch temelli yeni bir tarama platformu geliştirmek söz konusu olduğunda olası risklerin sayısını tahmin etmek oldukça güçtür. Bu nedenle, bu tez çalışmasında yeni bir riboswitch geliştirmek yerine var olan bir riboswitchin modifiye edilmesi ve ilgili enzimin aktif varyantlarının taranması stratejisi tercih edilmiştir. TPP riboswitch ile yapılan mühendislik çalışması genetik ekspresyonun TPP derişimine bağlı olarak sıkı bir şekilde kontrol edilmesini olası kılmaktadır (Nomura & Yokobayashi, 2007a). TPP riboswitchinin

mühendisliği çalışması genetik kontrol elementlerinin hangi pozisyonda yer alabileceğine dair bir fikir vermesi bakımından önemlidir. Yapılan çalışmada her ne kadar TPP bağımlı sıkı bir kontrolden söz etmek mümkün olsa da, temel problem riboswitch kontrolü altında aktif enzim varyantlarının taranması olduğunda çok düşük arka plan aktiviteleri dahi *in vitro* tarama platformunun etkinliğini sınırlayabilir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında ilk olarak TPP riboswitch varyantlarının (RSTPP) *in vitro* kompartımanlar içinde taranması ve yüksek düzeyde seçici olan adayların belirlenmesi çalışmasının yapılmasına karar verildi. Bu sayede, hem riboswitch tarama platformuna dayalı olarak *in vitro* enzim gösterimi protokolünün ön koşullarının optimize edilmesi hedeflendi. Hem de gen ekspresyonunu daha sıkı bir şekilde kontrol edebilen riboswitch varyantlarının belirlenmesi amaçlandı.

İnsan tiamin pirofosfokinaz enzimi *E. coli*'de rekombinant olarak üretilip karakterize edilmiş bir enzimdir (Banka et al., 2014). Katalitikçe aktif merkezi ve substrat bağlanmasından sorumlu amino asit artıkları bilinmektedir (Onozuka and Nasaka; 2003). Ayrıca çeşitli hastalıklarla ilişkili nokta mutasyonların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri de detaylı bir biçimde araştırılmıştır (Mayr et al., 2011; Nyhan et al., 2019). Bu nedenle bu tez çalışmasında insan tiamin pirofosfokinaz enziminin (hTPK1) bölge satürasyon mutagenез tekniği ile dejenere kütüphanesinin elde edilmesinde karar kılındı. Şekil 1.4'te hTPK1 enziminin üç boyutlu yapısı gösterilmektedir. Enzim doğal formunda dimer yapısındadır. Katalitikçe aktif merkezde substrat ile doğrudan etkileşim halinde 96QDHTD100 bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında enzimin 96QDHTD100 bölgesi üzerinde bölge satürasyon mutagenезi yapılarak dejenere enzim kütüphanesi elde edildi ve enzim varyantları arasından aktif varyantların zenginleştirilebileceğinin gösterilmesi amaçlandı.



Şekil 1.4 hTPK1 enziminin TPP ile birlikte üç boyutlu yapısı (pdb: 3S4Y).

2. MATERYAL ve METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Kimyasalın Markası
KH_2PO_4 (monobazik potasyum fosfat)	Sigma-Aldrich
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dibazik sodyum fosfat dihidrat)	Sigma-Aldrich
NaCl (Sodyum klorür)	Merck
KCl (Potasyum klorür)	Merck
Dietil Eter	Tekkim
Triton X-100	Merck
BG-Maleimid	NEB
Mineral yağı	Sigma
Tween-20	Merck
Tween-80	Merck
SDS	Merck
Etanol	Merck
Trizma Base	Sigma
Glisin	Sigma
Ni-NTA Manyetik Boncuk	Jena Bioscience
Anti-FLAG Manyetik Boncuk	Invitrogen
dNTPs	Ampliqon
Gene Ruler Express	Thermo
Gene Ruler Express ULR	Thermo
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo
CH_3COOH (Asetik Asit)	Merck
Taq DNA Polimeraz	Thermo

Agaroz	Biomax
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Thiamin	Sigma
Thiamin Pirofosfat	Sigma
Dynabeads M270	Invitrogen
PCR clean-up kit	M&N
NTC buffer	M&N

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Otoklav	HMC HIRAYAMA
Isıticılı çalkalayıcı inkübatör	Innova 42
Statik inkübatör	Sanyo
Otomatik mikropipet	Eppendorf ResearchPlus
Steril kabin	ESCO Class II BSC;AC2-4E8 Model
Spektrofotometre	Cary Eclipse
Santrifüj	Hettich
Hassas terazi	Precisa
Thermomixer	Eppendorf
pH metre	Mettler Toledo
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
Vorteks	Scilogex
Buzdolabı	Bosch, Arçelik
Homojenizatör	Omni
AKTA Prime	GE
Thermal Cycler	Applied Biosystems
Mikroplaka Okuyucu	Biotek EPOCH 2
LED Transilluminatör	Nippon Genetics
Yatay/Dikey Elektroforez	Hoefer
Jel Görüntüleme Sistemi	Gen-Box

2.2 METOD

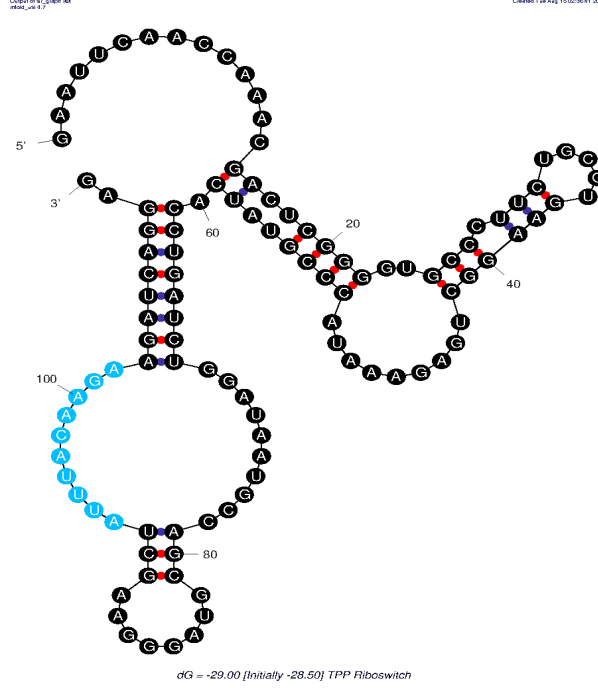
Tez çalışmasının amacı küçük moleküllerin biyotransformasyonunu katalizleyen enzimlerin protein mühendisliğinde kullanılabilecek yeni bir tarama platformunun geliştirilmesidir. Geliştirilmesi hedeflenen tarama platformu ribozim aktivitesine dayalı olarak enzim aktivitesinin taranması esasına dayanmaktadır. Tarama platformunda kullanılacak ekspresyon kasetinin bir şeması Şekil 2.1’de verilmiştir. Tarama platformu *in vitro* kompartmanlarda iki farklı ekspresyon kasedi ve bu ekspresyon kasetlerinde yer alan genlerin ifadenmesi için gerekli *in vitro* transkripsiyon elemanlarından oluşmaktadır. Önerilen sistemin çalışma prensibi, ekspresyonu T7 promotorunun kontrolü altında olan enzim varyantının aktivite göstermesi halinde substrat molekülünün dönüşüme uğraması, substratı algılayan riboswitchin ise ikinci bir enzimin ekspresyonunu kontrol etmesine dayanmaktadır. Bu ikinci ekspresyon kasedinde yer alan genin ifadenmesi ise enzim varyantını kodlayan gen bölgesinin modifiye edilmesini sağlayacaktır. Şekil 2.1’de görüldüğü üzere ekspresyonu riboswitch kontrolü altında olan SNAP-tag sayesinde enzim varyantını kodlayan gen benzil guanin modifikasyonu sayesinde SNAP-tag’e bağlanabilmektedir. Böylece enzim varyantının aktivitesi, enzim varyantını kodlayan gen bölgesinin modifikasyonu ile eşlenebilmektedir. Bu sayede aktif enzim varyantlarının *in vitro* kompartmanlarda seleksiyonu hedeflenmiştir.



Şekil 2.1 RSTPP kütüphanesinin final ekspresyon kasedi

2.2.1 Riboswitch Kütüphanesinin Tasarlanması

Riboswitch kütüphanesinin tasarımında literatürde mevcut TPP riboswitch yapısı dikkate alınmıştır (Nomura and Yokobayashi, 2007b). TPP riboswitch sekonder katlanmasına ilişkin görsel Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2 TPP Riboswitch sekonder yapısı

Şekil 2.1’de şematik olarak verilen riboswitch seleksiyon kasetinin elemanlarını kodlayan DNA dizileri aşağıda verilmektedir.

RSTPP:

GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGAATTCAACCAAACGACTCG
GGGTGCCCTTCTGCGTGAAGGCTGAGAAATACCCGTATCACCTGATCTG
GATAATGCCAGCGTAGGGANGCNNNNACANNAGATCAGGAGCAAAC
TATGGACAAAGATTGCGAAATGAAAC

Riboswitch kütüphanesinin tasarımında yer alan elementler renk kodları ile birlikte şu şekildedir;

T7 promotor: T7 RNA polimeraz enziminin transkripsiyonu başlatmak üzere bağlandığı bölge

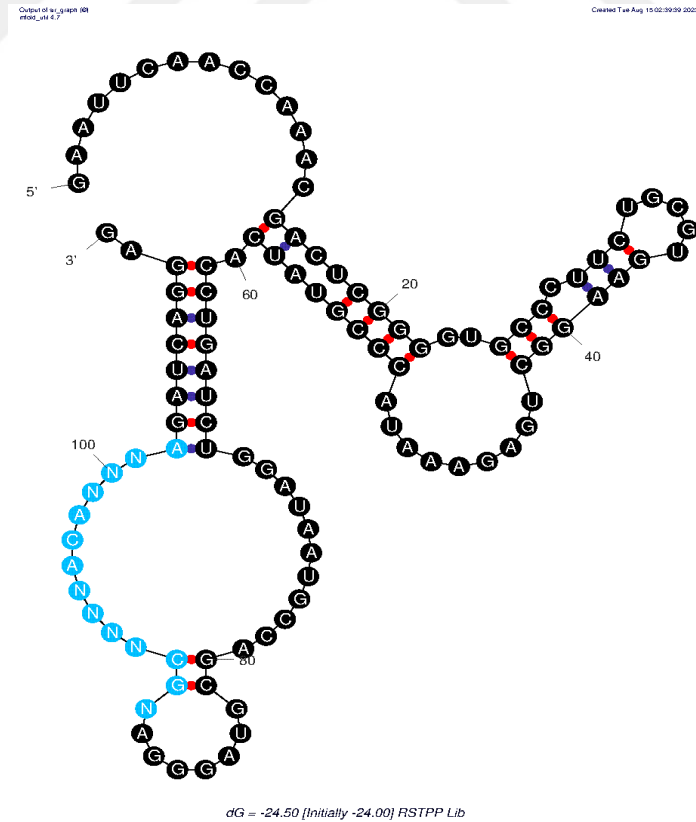
TPP Riboswitch: TPP derişimine yanıt olarak protein translasyonunu kontrol eden TPP riboswitch dizisi

NGCNNNNACANN: TPP riboswitch dizisi içinde rasgele mutasyon pozisyonları

RBS: Ribozom bağlanma bölgesi

SNAP Comp: *in vitro* protein seleksiyonunda ve *in vitro* riboswitch seleksiyonunda raportör olarak kullanılan SNAP enzimine komplementer DNA dizisi.

Yukarıda belirtildiği şekilde tasarlanan kütüphane için mfold programı ile belirlenen sekonder yapısı Şekil 2.3'te verilmektedir. Buna göre, riboswitch yapısında yer alan temel sekonder elementlerin korunduğu görülmektedir.



Şekil 2.3 RSTPP Kütüphanesinin olası sekonder yapısı

Dizi ve sekonder yapı bilgileri verilen riboswitch kütüphanesinin eldesi için kütüphane iki parça şeklinde sentezlendi. ELLA firması tarafından sentezlenen DNA dizileri Tablo 2.1’de verilmektedir.

Tablo 2.1 RSTPP Kütüphanesi için tasarlanan DNA dizileri

Dizi Adı	DNA Dizisi	Kullanım Amacı
RSTPP-2-Fw	CACCTGATCTGGATAATGCCAGCGTA GGGANGCNNNNACANNNAGATCAGG AGCAAACCTATGGGTAGCAGCGACTAT AAAGATGACGATGATAAAAGCAGCGGT	Mutant riboswitch kütüphanesi-2
RSTPP-1-Rv	GGCATTATCCAGATCAGGTGATACG GGTATTTCTCAGCCTTCACGCAGAAGG GCACCCCGAGTCGTTTGGTTGAATTCA ATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATA GTGAGTCGTATTACGCGCGCTC	Mutant kütüphaneye komplementer riboswitch dizisi
RSTPP-Fw-SH	5’SH-GAG CGC GCG TAA TAC GAC TCA C	5’-SH işaretli primer

RSTPP-2-Fw dizisi üzerinde gösterilen altı çizili ve kalın puntolu pozisyonlarda toplam sekiz baz üzerinde rasgele mutasyon olacak şekilde sentezlendi ve HPLC saflıkta temin edildi. Aynı dizi üzerinde kırmızı ile işaretli 3’ bölgesi ise SNAP-Tag enzimini kodlayan gen dizisinin 5’ bölgesine komplementer dizidir. Bu sayede, riboswitch kütüphanesi ile SNAP-Tag kodlayan gen dizisinin OE-PCR tekniği ile füzyonu hedeflenmiştir. RSTPP-1-Rv olarak belirtilen dizinin 5’- bölgesinde açık mavi ile işaretlenen bölge ve RSTPP-2-Fw olarak belirtilen dizinin komplementasyonu sayesinde final riboswitch kütüphanesinin eldesi hedeflenmiştir. RSTPP kütüphanesinin SNAP-Tag füzyonunda kullanılan primer dizileri Tablo 2.2’de verilmektedir. RSTPP-Fw-SH olarak belirtilmiş olan PCR primerinin 5’-SH modifikasyonu yapılarak sentezlenmiş ve HPLC saflıkta temin edilmiştir. 5’-SH modifikasyonu sayesinde BG-Maleimid modifikasyonunun

yapılması mümkün olabilmektedir. Riboswitch ve SNAP-Tag kodlayan DNA dizisinin 5'-BG modifikasyonu sayesinde aktif SNAP-Tag enziminin DNA'ya kovalent olarak bağlanması hedeflenmiştir. Böylece Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilen nihai ekspresyon kasedinin eldesi hedeflenmiştir.

Tablo 2.2 RSTTP kütüphanesinin eldesi için kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Kullanım Amacı	Primer Dizisi
T7 Pro	Ekspresyon kasetinin PCR amplifikasyonu	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Term	Ekspresyon kasetinin PCR amplifikasyonu	CTAGCATAACCCCTTGGGGCC
RSTTP OEPCR	RSTTP kütüphanesinin SNAP füzyonu	RSTTP+SNAP-FLAG-T7Term
FLAG Rv	SNAP kütüphanesinin FLAG Füzyonu	CTGATATTTCTACTGCTACTATT TTGGGTCTGGGCCAAATGGG
Fw-SH	Kütüphanenin BG konjugasyonu	5'SH-GAG CGC GCG TAA TAC GAC TCA C

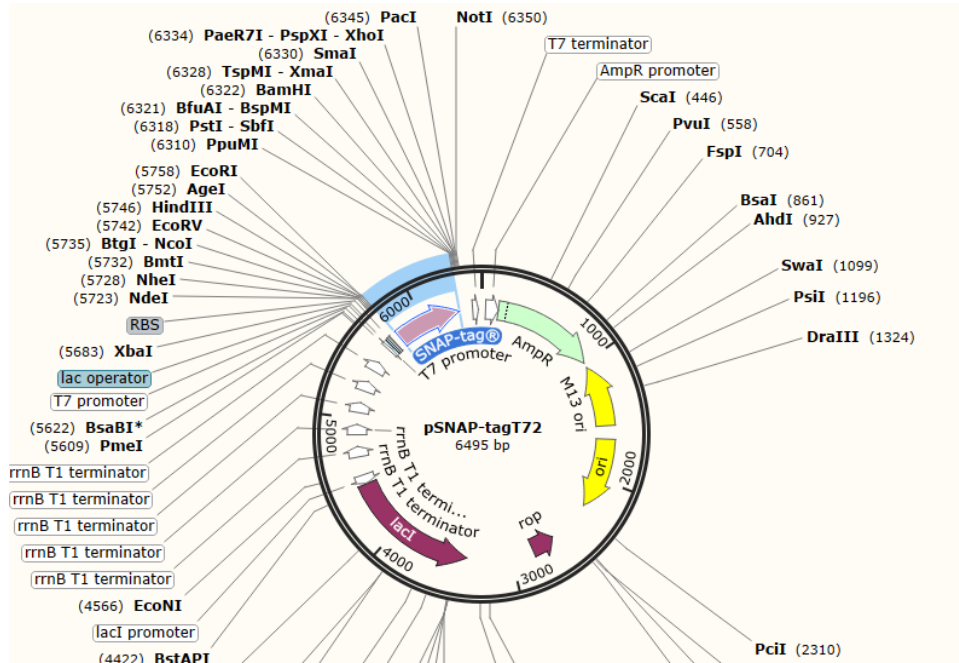
BG-Maleimid reaksiyonunun etkinliğinin test edilmesi için rekombinat olarak üretilip safaştırılan SNAP-Tag enzimi ile *in vitro* test yapıldı. Riboswitch kütüphanesinin BG-maleimid konjuge RSTPP-Fw-SH primeri ile amplifikasyonu birincil strateji olarak test edildi. Bununla birlikte, RSTPP-Fw-SH primeri ile amplifiye edilen riboswitch kütüphanesinin BG-maleimid konjugasyonu stratejisi de test edildi. Her iki stratejide de aynı BG-maleimide modifikasyon protokolü uygulandı. Protokol olarak BG-maleimid kimyasalının temin edildiği NEB firmasının web sitesinde yer alan protokolden yararlanıldı (<https://international.neb.com/protocols/2012/10/12/reaction-conditions-for-chemical-coupling-s9153> , erişim tarihi 12.08.23). Temin edilen BG-Maleimid final derişimi 4 mM olacak şekilde DMSO içinde çözündü ve tekrar tekrar dondur-çöz

yapmaktan kaçınmak adına porsiyonlanarak -20 °C’de muhafaza edildi. 100 µM derişiminde RSTPP-Fw-SH primeri (suda) final derişimi 10 µM olacak şekilde Tris-HCl pH:8.5 tamponunda seyreltildi. 10 mM derişiminde TCEP çözeltisinden final derişimi 1 mM olacak şekilde reaksiyon karışımına ilave edildi ve disülfid bağlarının kırılması amacıyla 40 °C’de 1 saat inkübe edildi. Amicon Ultra 3K ultrafiltrasyon santrifüj üniteleri (Merck Millipore) kullanılarak tampon değişimi yapıldı ve PBS tamponu içinde BG-maleimid reaksiyonu kuruldu. Stok BG-maleimid çözeltisinden final derişimi 100 µM olacak şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında iki saat inkübasyona bırakıldı. Ultrafiltrasyon santrifüj üniteleri ile tampon değişiminin ardından BG-modifiye oligo ultra saf suda elde edildi. Elde edilen modifiye oligonun derişimi ve saflığı Biotek EPOCH2 mikropilaya okuyucuya adapte TAKE-3 adaptörü kullanılarak 260 ve 280 nm’de spektrofotometrik olarak tayin edildi. BG-modifiye DNA’nın SNAP-Tag enzimi ile reaksiyonu için bir sonraki kısımda belirtildiği şekilde rekombinant olarak üretilip saflaştırılan SNAP-Tag enzimi kullanıldı. SNAP-Tag enzimi ile BG-modifiye DNA PBS tamponu içinde bir saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra agaroz jel elektroforezi ve SDS-PAGE tekniklerine dayalı EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) analizleri yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde BG-modifiye DNA’nın göçündeki yavaşlama tayin edildi. SDS-PAGE analizinde ise serbest SNAP-Tag enziminin, BG-modifiye DNA ile reaksiyonu sonucu göçünde meydana gelen yavaşlama tayin edildi.

2.2.2. SNAP-Tag Enziminin Klonlanması

pSNAP-Tag(T7)2 vektörü NEB firmasından temin edildi. Temin edilen vektörün haritası Şekil 2.4’te verilmektedir. Vektör haritasından anlaşıldığı üzere SNAP-Tag enziminin N veya C terminal bölgesinde herhangi bir modifikasyon yer almamaktadır. SNAP-Tag enziminin rekombinant üretiminin ve saflaştırmasının yapılması amacıyla enzim kodlayan gen bölgesi *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Ekspresyon vektörü olarak belirlenen pET-28a vektörü de aynı şekilde enzim çifti ile kesildi ve agaroz jelden izole edildi. Restriksiyon enzimleri ile kurulan reaksiyon bileşenleri Tablo 2.3’te verilmektedir. SNAP-Tag kodlayan

gen dizisi ile pET-28a vektörünün kesim ürünlerinin jelden izole edilmiş fragmentleri T4 DNA Ligaz enzimi ile gece boyu gradient ligasyonu reaksiyonuna bırakıldı. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri Tablo 2.4'te verilmektedir. Ligasyon ürünleri kimyasal kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi. Transformantların LB ortamında 45 dakika inkübasyonunun ardından 50 μ g/mL derişiminde kanamisin içeren LB-Agar petrilere farklı miktarlarda yayma yapıldı ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. Petrilere beliren kolonilerden belirgin olanlar seçildi ve koloni PCR reaksiyonu kuruldu. Koloni PCR reaksiyon karışımının bileşenleri Tablo 2.5'te verilmektedir. Koloni PCR reaksiyonunda T7-pro/T7-term primer çifti kullanıldı. Hibridizasyon sıcaklığı 56 °C ve uzama süresi 1 dakika olacak şekilde 30 döngü koloni PCR reaksiyonu yürüdüktan sonra reaksiyon ürünleri %1 agaroz jelde görüntülendi. Pozitif kolonilerden daha sağlıklı sonuç alabilmek için LB ortama inokülasyon yapıldı ve gece kültüründen plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Plazmid DNA izolasyonunda GeneJet Plazmid DNA Isolation Kit (Thermo) kullanıldı ve kit protokolüne sadık kalındı. İzole edilen plazmid DNA'lar kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu ve pozitif koloniler doğrulandı.



Şekil 2.4 pSNAP-tagT72 vektörünün haritası. SNAP tag kodlayan gen dizisi *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzim tanıma bölgelerinden kesilerek pET-28a vektörüne klonlandı.

Tablo 2.3 Restriksiyon kesim reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon	<i>NdeI</i> (μ L)	<i>XhoI</i> (μ L)	Tampon (μ L)	H ₂ O (μ L)	pET28a (μ L)	pSNAPTag (μ L)
pET28a	1	1	5	38	5	0
pSNAP	1	1	5	38	0	5

Tablo 2.4 Ligasyon reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon	Tampon (μ L)	pET28a (μ L)	SNAPTag (μ L)	T4 DNA Ligaz (μ L)	H ₂ O (μ L)
1:3	2	1	1,5	1	14,5
1:5	2	1	2,5	1	13,5

Tablo 2.5 Koloni PCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Bileşen	Miktar (μ L)
Taq Buffer (10X)	10
MgCl ₂ (25 mM)	6
dNTPs (10 mM)	2
Template (10 ng/ μ l)	1
T7 promotor	1
T7 terminatör	1
Taq DNA Polimeraz (5 U/ μ l)	0.5
ddH ₂ O (steril)	78.5

pET-28a_SNAPTag klonlarının eldesinin ardından ekspresyon suşuna transformasyon yapıldı. Ekspresyon suşu olarak *E. coli* T7 Express Iq RP suşu kullanıldı. Kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyonun ardından belirgin kolonilerden üçü seçildi ve test ekspresyonuna geçildi. Her bir koloninin gece kültüründen taze LB ortamına (50 mL) 1 mL inoküle edildi ve OD₆₀₀:0.5 anına kadar 37 °C’de inkübe edildi. Ardından final IPTG derişimi 0.5 mM olacak şekilde protein ekspresyonu indüklendi ve 25 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Gece kültürü +4 °C, 3.000 rpm hızında 15 dakika santrifüjlendi ve pellet homojenizasyon tamponunda resüspanse edildi. Resüspanse edilen hücreler ultrasonikatör ile parçalandıktan sonra 15.000 rpm hızında soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi ve

çözünür protein fraksiyonunun Tricine-SDS-PAGE analizi yapıldı (Schägger, 2006).

SNAP-Tag enziminin test ekspresyon ölçeğinde üretiminin doğrulanmasının ardından büyük ölçekli üretim yapıldı. Yukarıda belirtilen koşullarda üretim 500 mL LB ortamında tekrar edildi. Hücre lizati santrifüjlendi ve çözünür protein fraksiyonunu içeren süpernatant AKTA Prime FPLC sistemine bağlı His-Pure Nikel-NTA kolona enjekte edildi. 20 mM imidazol içeren homojenizasyon tamponu ile yıkama adımının ardından 500 mM imidazol içeren elusyon tamponu ile gradient elusyonuna geçildi ve protein fraksiyonları otomatik olarak toplandı. Protein fraksiyonlarının protein derişimi Bradford metodu ile tayin edildi (Bradford, M., 1976). Protein fraksiyonlarının saflık derecesi ise Tricine-SDS-PAGE analizi ile tayin edildi (Schager, H., 2006). En saf fraksiyonlar birleştirildi ve BG-modifiye DNA kütüphanesinin enzimatik modifikasyonunun test edilmesi için kullanıldı.

2.2.3. *In vitro* Protein Ekspresyon Koşullarının optimize Edilmesi

“NEB Purexpress *in vitro* protein synthesis kit” kullanılarak *in vitro* protein sentezinin optimizasyonu çalışmaları yapıldı. *In vitro* protein sentezleme kiti plazmid DNA ya da PCR ürünü lineer DNA’dan yola çıkarak tek adımda protein sentezi için kullanılan bir kittir. Transkripsiyon ve translasyon adımlarında görev alan enzimlerin *E. coli*’de rekombinant olarak üretilip Nikel-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılmasının ardından bir araya getirilmesiyle formüle edilen bir kittir. *In vitro* sentezi yapılacak olan proteini kodlayan gen kasetinin;

1. T7 promotor bölgesi,
2. Shine Dalgarno sekansı,
3. T7 terminatör bölgesi olarak adlandırılan temel unsurları içermesi yeterlidir.

T7 promotor bölgesi içeren bir ekspresyon vektörünün kullanılması ya da ilgili vektörün T7 promotor-terminatör bölgelerine spesifik primerler ile yapılan PCR ürünü teoride kitin çalışması için uygundur. Bu bağlamda *in vitro* protein sentez kitinin çalışma koşullarının optimize edilmesi amacıyla;

1. Ara h 1 proteinini kodlayan pET-28a vektörü,
2. GFP kodlayan pET-11a vektörü ve
3. Kit ile birlikte kontrol plazmidi olarak sunulan DHFR (Dihidrofolat redüktaz) kodlayan kontrol plazmidi ile,
4. Son olarak her bir vektörün T7 promotor terminatör bölgelerine spesifik primerler ile yapılan PCR ürünü kalıp DNA olarak kullanıldı ve *in vitro* protein sentezi test edildi.

PCR ürününün kalıp olarak test edilmesi ilerleyen çalışmalarda klonlamaya gerek duymaksızın PCR ürünü şeklindeki kütüphanenin *in vitro* seleksiyona dahil edilmesi imkanı doğurması bakımından önemlidir.

2.2.4. T7 Promotor terminatör bölgelerinden PCR amplifikasyonu

In vitro protein sentez kitinin lineer DNA ile çalıştığını doğrulamak amacıyla plazmid DNA'dan PCR amplifikasyonu yapıldı. PCR amplifikasyonu için T7 promotor terminatör bölgelerine spesifik primerler kullanıldı. PCR ürünü %1 agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve PCR Clean-up kiti kullanılarak izole edildi. İzole edilen lineer DNA fragmentinin derişimi 260 nm'de absorbans okuması ile tayin edildi.

Tablo 2.6 Lineer DNA eldesi için PCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Bileşen	Miktar
Taq Buffer (10X)	10
MgCl ₂ (25 mM)	6
dNTPs (10 mM)	2
Template (5 ng/μl)	2
T7 promotor	1
T7 terminatör	1
Taq DNA Polimeraz (5 U/μl)	0.5
ddH ₂ O (steril)	77.5

100 μl PCR master mix için tabloda belirtilen değerler pipetlendi ve 56 °C hibridizasyon sıcaklığında PCR yapıldı. Kalıp DNA olarak pET28a_Ah1 klonu, pET11a_GFP klonu ve kit ile birlikte gelen DHFR klonu kullanıldı. Ara h 1 kodlayan klondan lineer DNA eldesi için PCR'da uzama adımı 90 saniye, GFP ve DHFR için 60 saniye olarak belirlendi.

2.2.5. *In vitro* protein sentez kitinin test edilmesi

In vitro protein sentez kitinin test edilmesi için kit manüelinde belirtilen prosedür uygulandı (<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/protein-synthesis-reaction-using-purexpress-e6800>). Kit bileşenleri -80 °C’de depolandı. Tekrar tekrar dondur çöz yapmamak için kit bileşenleri tek reaksiyonluk porsiyonlar şeklinde depolandı. Tek bir *in vitro* protein sentez reaksiyonu için bileşenlerin miktarları Tablo 2.7’de görülmektedir.

Tablo 2.7 *In vitro* protein sentez reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Solution A	5
Solution B	3.75
DNA (Linear/Plasmid)	120 ng
ddH₂O (Steril)	12 µl’ye kadar
Reaksiyon hacmi	12 µl

Reaksiyon bileşenleri buz üstünde pipetlendikten hemen sonra termal döngü cihazında 37 °C’de 2-4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örnekler SDS sample buffer ile muamele edilerek %16-18 Tricine SDS-PAGE’e yüklendi.

Tricine SDS-PAGE

Daha iyi bir çözünürlük ve küçük molekül ağırlıklı proteinlerin daha iyi görüntülenebilmesi için glisin-Tris SDS-PAGE yerine Tricine-Tris SDS-PAGE metodu kullanıldı. pET-28a_Ah1 klonunun reaksiyon ürünü jele yüklenmeden önce 100 kDa MWCO PES ultrafiltrasyon membranı ile santrifüjlendi. Ara h 1 proteini trimer yapıda yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu için filtreden geçmeyen üst kısım alındı ve 500 mM NaCl ile 20 mM imidazol içeren pH:8.0 bağlanma tamponunda Co-NTA manyetik boncuklar ile inkübe edildi. pET-28a ekspresyon vektörünün N terminal His tag kodlaması sayesinde Ara h 1 proteininin manyetik boncuklara bağlanması hedeflendi.

2.2.6. *In vitro* Emülsiyon Prosedürünün Optimize Edilmesi

Bu kısımda water in oil (w/o) yağ emülsiyonları ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapıldı. Çeşitli yağ karışımlarının, karıştırma hızı ve süresinin, emülsiyon hazırlama yöntemlerinin protein ve DNA enkapsülasyonu ile emülsiyon-PCR verimine etkisi incelendi. Elde edilen w/o emülsiyonlarının *in vitro* seleksiyon için uygunluğunu test edebilmek için yapılan denemeler sırası ile şunlardır;

1. Farklı yağ formülasyonları ve hazırlama protokollerinin emülsiyon boyutu ve boyut dağılımına etkisinin incelenmesi,
2. Oluşturulan emülsiyonların içine protein enkapsülasyonu ve geri kazanımının doğrulanması,
3. Emülsiyonların içine DNA enkapsülasyonu ve geri kazanımının doğrulanması,
4. Emülsiyon PCR prosedürünün test edilmesi ve reaksiyonun çalıştığı doğrulanması,
5. *E. coli* hücrelerinin emülsiyon içine hapsedilmesi ve taşıdıkları plazmide spesifik primerler ile emülsiyon PCR reaksiyonunun test edilmesi ve doğrulanması,
6. NEB PurExpress kitinde yer alan DHFR kontrol plazmidi kullanılarak sentezlenen DHFR aktivitesi üzerinden protein ekspresyonunun test edilmesi çalışmaları yapıldı.

Denenen yağ formülasyonları şu şekildedir,

1. Mineral yağı+Span 80 +Tween 80
2. Mineral yağı+ Span 80 + Triton X-100
3. Mineral yağı+ Span 80+ Tween 80 + Triton X-100

şeklindeki yağ formülasyonları denendi. *In vitro* emülsiyonların hazırlanmasında literatürdeki protokoller modifiye edildi (Colucci et al., 2020; Kaltenbach & Hollfelder, 2012; Sumida et al., 2012). Her bir yağ karışımının hazırlanması için 450 µL Span 80 ve 50 µL Triton X-100 veya Tween-80 9500 µL mineral yağı içinde çözünmek üzere 40 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yağ karışımları her bir deneme öncesinde taze olarak hazırlandı. Farklı yağ karışımları içerisinde farklı hacimde su fazı ve karıştırma hızı gibi parametreler test edildi. *In vitro* emülsiyonların hazırlanması için iki farklı fiziksel yöntem kullanıldı. Bunlardan ilki Omni Tissue Homogenizer ile farklı hızlarda homojenizasyon işlemi uygulanarak *in vitro* emülsiyonların hazırlanması esasına dayanır. Diğer bir yöntem ise manyetik karıştırıcıda 1500 rpm karıştırma hızında karıştırarak *in vitro* emülsiyonların hazırlanması yöntemidir. 950 µL yağ karışımı üzerine su fazı beş porsiyon halinde birer dakika ara ile ilave edildi. Karıştırma işlemi yedi dakika boyunca devam etti ve mutlaka buz üzerinde gerçekleştirildi. *In vitro* emülsiyonlar içinde *in vitro* protein ekspresyonu reaksiyonunun test edilmesi adımlarında, *in vitro* protein ekspresyon karışımı buz üzerinde hazırlandı ve emülsiyon oluşumuna kadar buz üzerinde inkübe edildi.

HRP ve Ara h 1 proteinleri emülsiyonların içine enkapsüle edildi ve geri kazanımı doğrulandı. HRP enzimi 10.000 kat seyreltildi ve PBS içinde seyreltilen HRP enziminin 50 µl’si 450 µl yağ karışımı ile emülsifiye edildi. Oluşan emülsiyonlar santrifüj ile çöktürüldü ve iki kez mineral yağı ile yıkanan emülsiyonlardan protein geri kazanımı için organik faz ekstraksiyonu gerçekleştirildi. 2 kez 1 mL suya doymun dietil eter, 1 kez 1 mL suya doymun etil asetat ve ardından tekrar 2 kez 1 mL suya doymun dietil eter ile yapılan ekstraksiyonun ardından tüplerdeki eterin aşırısı oda sıcaklığında yarım saat inkübe edilerek uçuruldu. Geri kazanılan HRP aktivitesi ile kontrol grubunun aktivitesi karşılaştırıldı. Enzimin geri kazanımı aktivite tayini üzerinden doğrulandı. Benzer şekilde emülsiyon içine enkapsüle edilen Ara h 1 proteininin geri kazanımı da Tricine-SDS-PAGE analizi ile doğrulandı.

Daha önceden saflaştırılmış PCR ürünü DNA’nın derişimi belirlendi ve her bir reaksiyon başına 1 µg olacak şekilde yağ emülsiyonlarının içine enkapsüle edildi. Kontrol grubu olarak yağ karışımı+1 µg DNA (emülsifiye edilmeden) ve 50

µl hacim içinde 1 µg DNA doğrudan organik faz ile muamele edildi ve aynı şekilde geri kazanım prosedürü uygulandı. Ekstraksiyon adımı sonrasında her üç örnek için elde edilen DNA miktarı tayin edildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Emülsiyon içine hapsedilen DNA'nın başarılı bir şekilde ekstrakte edildiği ve elde edilen DNA miktarının kontrol grubu ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu tespit edildi.

In vitro seleksiyon adımının önemli ön koşullarından biri emülsiyonlar içinde reaksiyon yürütebilmenin doğrulanmasıdır. Bu amaçla emülsiyon PCR denemesi yapıldı. Klasik PCR koşullarından farkı olarak ayrıca kalıp DNA miktarı ve Taq DNA polimeraz miktarı optimize edilmiş ve BSA ilave edilmiş formülasyon da denendi. Optimize edilen formülasyonun ürün verdiği böylece emülsiyon PCR'ın çalıştığı doğrulandı. Elde edilen ürünler kontrol grubu ile kıyaslamak üzere agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

W/O Emülsiyonlarının etkinliğinin test edilmesi için *E. coli* enkapsülasyonu denemesi yapıldı. Emülsiyon PCR'da kalıp olarak kullanılan saflaştırılmış plazmid DNA yerine bu denemede ilgili plazmidi taşıyan *E. coli* hücreleri kullanıldı. Emülsiyon PCR için optimize edilmiş yağ karışımı ve PCR karışımı içinde 10^9 adet *E. coli* olacak şekilde deneme gerçekleştirildi. Kontrol olarak aynı miktarda *E. coli* ve 1:10 oranında seyreltilmiş *E. coli* içeren klasik PCR karışımı ile birlikte saflaştırılmış plazmidin kalıp olarak kullanıldığı klasik PCR reaksiyonu kontrol olarak kullanıldı. Tüm örneklerde ekstraksiyon işleminin ardından agaroz jel elektroforezi yapılarak *E. coli* hücreleri ile de emülsiyon PCR reaksiyonunun çalıştığı doğrulandı.

In vitro protein ekspresyon reaksiyonunun *in vitro* kompartmanlarda çalıştığını doğrulanması amacıyla DHFR kodlayan pDHFR plazmidi kalıp DNA olarak kullanıldı. Enkapsüle edilecek protein ekspresyon karışımı bileşenleri Tablo 2.8'de verilmiştir. Hazırlanan *in vitro* protein ekspresyon karışımı buz üzerindeki yağ karışımı üzerine 5 µL porsiyonlar halinde ve birer dakika arayla ilave edildi. 1500 rpm hızında 7 dakika boyunca karıştırıldı ve böylece stabil w/o emülsiyonlarının oluşumu gözlemlendi. Emülsifiye edilmiş *in vitro* protein sentez reaksiyonu ve kontrol grubu olarak test edilen emülsifiye edilmemiş protein sentez

karişımı 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 10.000 g kuvvetinde 5 dakika santrifüjlendi ve yağ fazı dekante edildi. Emülsiyon üzerine 1 mL suya doygun dietileter ilave edildi ve vortekslenerek emülsiyonlar parçalandı. Faz ayırımının ardından organik faz pipet yardımı ile atıldı ve işlem bir kez daha tekrar ettikten sonra dietil eterin uçurulması için yarım saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen reaksiyon ürünü DHFR enzim aktivitesinin tayininde kullanıldı.

Tablo 2.8 Emülsiyon içinde *in vitro* protein ekspresyon testinin reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
A	10
B	7,5
RNasin RNase inhibitor	0,5
DNA (pDHFR, 80 ng/μL)	3
Ultra saf su	4

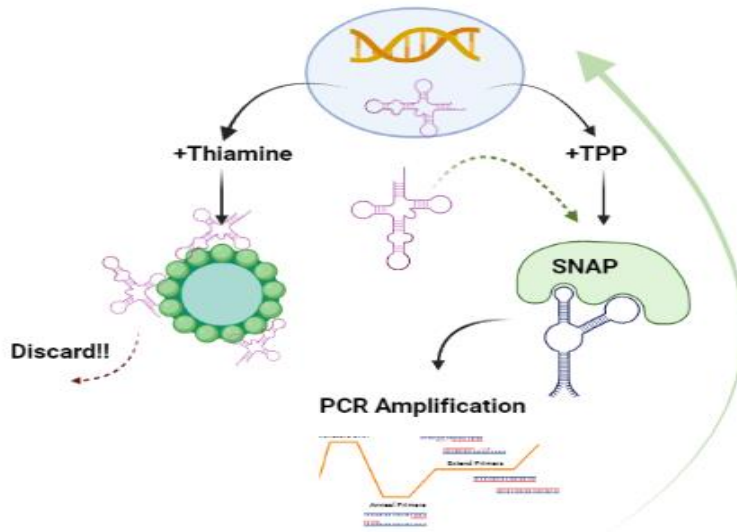
DHFR enzim aktivitesinin tayini için 2 mM DTT içeren Tris-HCl pH:7,5 tamponu reaksiyon tamponu olarak kullanıldı. 2 mL enzim reaksiyon tamponu içerisinde reaksiyonun hemen öncesinde final deirşimi 0,1 mM olacak şekilde NADPH ve DHF ilave edildi. 340 nm’de kinetik ölçüm başlatıldı ve absorbansın değişmediği ilk iki dakikalık ölçümün ardından *in vitro* protein ekspresyon karişımından 5 μL ilave edildi ve kinetik ölçüme devam edildi. NADPH’ın 340 nm’deki absorbansındaki zamana bağlı azalma enzim aktivitesinin hesaplanmasına kullanıldı.

Tablo 2.9 DHFR aktivitesi reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
Tris-HCl pH:7,5 tamponu	2 mL
DHF (10 mM,DMSO’da)	50 μL
NADPH (10 mM, suda)	50 μL
DTT (10 mM,suda)	50 μL
Protein ekspresyon örneği	5 μL

2.2.7. *In vitro* kompartmanlarda Riboswitch seleksiyonu

In vitro kompartmanlarda riboswitch seleksiyonunun temel prensibi Şekil 2.5'te şematize edilmiştir. SNAP-Tag enzimine dayalı *in vitro* display tekniği literatürde yer almaktadır (Kaltenbach & Hollfelder, 2012). Buna göre, *in vitro* protein ekspresyonu yağ emülsiyonlarının içinde gerçekleştirilir. SNAP-Tag enziminin ekspresyonu sayesinde BG-modifiye DNA SNAP-Tag enzimi tarafından kovalent olarak bağlanır. Fenotip ve genotip arasındaki bu bağ aktif protein varyantlarının *in vitro* seleksiyonunun temel prensibini oluşturur. SNAP-Tag modifiye DNA dizisi SNAP-Tag proteini üzerinde yer alan FLAG-Tag veya benzer afinite epitopu sayesinde *in vitro* protein ekspresyon karışımından saflaştırılır. Böylece aktif protein kodlayan DNA varyantı ortamdan izole edilmiş olur. Sözü edilen teknik bu tez çalışmasında aktif riboswitch varyantlarının zenginleştirilmesi için kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında tasarlanan ve sentezlenen riboswitch kütüphanesi SNAP-Tag kodlayan gen dizisinin ekspresyonunu kontrol etmektedir. SNAP-Tag ekspresyonu *in vitro* emülsiyonlar içinde yer alan TPP derişimine yanıt olarak riboswitchin aktive edilmesinin bir ifadesi olarak gerçekleşir. Böylece, TPP derişimine yanıt olarak aktive olan riboswitch varyantlarını kodlayan DNA dizisi SNAP-Tag tarafından kovalent olarak modifiye edilir. *In vitro* emülsiyonların organik faz ekstraksiyonu ile kırılmasının ardından SNAP-Tag ile kovalent bağlanmış aktif riboswitch varyantları anti-FLAG-Tag manyetik boncuklar ile izole edilebilirler.



Şekil 2.5 *In vitro* riboswitch seleksiyonunun şematik gösterimi

Bu tez çalışmasında tiamin varlığında aktive olmayan fakat TPP varlığında aktive olarak SNAP-Tag ekspresyonunu indükleyen riboswitch varyantlarının zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, Şekil 2.5'te de gösterildiği gibi her bir *in vitro* seleksiyon turundan önce tiamin varlığında aktive olan riboswitch varyantlarının elimine edilmesi için bir negatif seleksiyon adımı uygulanmıştır. Böylece, TPP yokluğunda fakat tiamin varlığında aktive olan riboswitch varyantlarının *in vitro* seleksiyon turları boyunca elimine edilmesi hedeflenmiştir. Tiamin varlığında yapılan negatif seleksiyon adımı *in vitro* protein ekspresyon reaksiyon karışımları Tablo 2.10'da verilmiştir. Tabloda RSTPP Lib-BG olarak ifade edilen DNA SNAP-Tag ile füzyon halinde riboswitch kütüphanesidir. Ayrıca, SNAP-Tag enzimi tarafından kovalent olarak modifiye edilmesini sağlayan 5'-BG modifikasyonu yapılmıştır. Buna ilave olarak, negatif seleksiyon turunda aktive olan non-spesifik kütüphane varyantlarının elimine edilmesi için 5'-His-Tag ve FLAG-Tag dizileri içermektedir. Tabloda belirtildiği üzere 140 ng/ μL derişiminde DNA kütüphanesinden 3 μL kullanılmıştır. Bu miktar DNA'nın uzunluğu (yaklaşık 800 bp) dikkate alındığında yaklaşık 1 pmol olarak hesaplanmıştır. Bu mol sayısı yaklaşık olarak 6×10^{11} tekil DNA dizisinin reaksiyon karışımına ilave edildiğini ifade etmektedir. Riboswitch kütüphanesi tasarlanırken 8 nükleotid pozisyonunda rasgele mutasyon yapıldı. Bu durumda riboswitch kütüphanesinin yaklaşık 64.000 varyant içerdiği hesaplandı. 1 pmol riboswitch kütüphanesinin *in vitro* protein ekspresyon karışımına dahil edilmesi durumunda, her bir eşsiz riboswitch varyantını kodlayan DNA yaklaşık olarak 10^6 kez tekrar etmektedir.

Tablo 2.10 *In vitro* protein ekspresyonunun reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim (μL)
A	20
B	15
RNasin RNase inhibitor	1
RSTPP_Lib_BG (140 ng/μL)	3
TPP (40 mM)	0
Tiamin (40 mM)	1
Ultra saf su	10

Negatif seleksiyon turlarının son adımında tiamin varlığında aktive olmayan, yani TPP molekülüne spesifik olması olasılığı yüksek olan riboswitch varyantları *in vitro* karışımdan izole edilmiştir. Bunun için ilk olarak *in vitro* emülsiyonlar dietil eter ile kırılmış ve su fazı ayrılmıştır. DMSO içinde çözünmüş BG-maleimid reaktifinden 1 μ L alındı ve steril mikrosantrifüj tüpünün dibine pipetlendi. Organik faz ayrımından gelen ve aktif/inaktif riboswitch varyantlarının bir karışımını içeren su fazı bu tüpe hızlıca aktarıldı. Böylece, reaksiyona girmemiş SNAP-Tag enziminin BG-maleimid reaktifinin aşırısı ile sönümlenmesi hedeflendi. Bu sayede, inaktif riboswitch varyantlarının non-spesifik zenginleşmesinin önüne geçildi. Suyu doygun dietil eter ile ekstraksiyon tekrar edildi ve su fazı alınarak daha önce 3 kez PBS-T ile yıkanmış anti-DYKDDDDK manyetik boncuklar ile oda sıcaklığında yarım saat çalkalamalı olarak inkübe edildi. Bu adımda manyetik boncuklara bağlanan riboswitch varyantları tiamin varlığında aktive olan varyantlardır ve non-spesifik olarak kabul edildiğinden uzaklaştırılmıştır. Bağlanmanın ardından manyetik ayırma yoluyla manyetik boncuğa bağlanmayan riboswitch varyantlarını içeren çözelti ayrı bir tüpe aktarıldı. Pozitif seleksiyon adımına geçmeden önce M&N PCR Clean-Up kit kullanılarak riboswitch varyantlarını kodlayan DNA dizileri izole edildi ve 15 μ L hacimde su ile elue edilerek konsantre edildi. Bu adımda üretici firmanın önerdiği protokole sadık kalındı. Elde edilen DNA bir sonraki seleksiyon turuna girmeden önce BG-modifiye primer kullanılarak amplifiye edildi ve aynı kit kullanılarak saflaştırıldı.

TPP molekülüne spesifik riboswitch varyantlarının zenginleştirilmesi için pozitif seleksiyon turları yapıldı. Negatif seleksiyon turundan farklı olarak bu turlarda SNAP-Tag modifiye DNA dizileri elimine edilmek yerine izole edildi ve PCR amplifikasyonu yoluyla zenginleştirildi. Pozitif seleksiyon turlarından kullanılan reaksiyon karışımı Tablo 2.11'de verilmektedir. Pozitif seleksiyon turlarında negatif seleksiyon turlarından farklı olarak tiamin yerine riboswitch varyantlarının ligandı olarak TPP molekülü kullanıldı. İlk pozitif seleksiyon turunda final derişimi 2 mM olacak şekilde seleksiyon yapıldı. *In vitro* emülsiyonların hazırlanmasına ilişkin yukarıda belirtilen protokole sadık kalınarak emülsifiye edilmiş olan *in vitro* protein ekspresyon reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi. *In vitro* emülsiyonların kırılmasının ardından ve serbest SNAP-Tag enziminin BG-maleimid ile sönümlenmesinin ardından su fazı

PBS-T tamponu içinde anti-DYKDDDDK manyetik boncuklar ile yarım saat inkübe edildi. Non-spesifik bağlanmaların elimine edilmesi için üç kez PBS-T tamponu ile yıkama yapıldıktan sonra bir kez ultra saf su ile manyetik boncuklar yıkandı. Bu adımdan sonra elusyon adımına geçildi. Elusyon adımında manyetik boncukların üzerine 20 mM pH:2,5 Glisin-HCl tamponundan 50 µL ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Manyetik ayırmanın ardından nötralizasyon için 100 mM Tris-HCl tamponundan 10 µL ilave edildi. non-spesifik bağlanmanın elimine edilmesi amacıyla DNA varyantlarını içeren çözelti Ni-NTA manyetik boncuklar ile yarım saat inkübe edildi ve üç kez yıkama adımının ardından 500 mM imidazol içeren elusyon tamponu ile DNA dizileri elue edildi. Elue edilen DNA dizilerinin PCR amplifikasyonu adımına geçmeden önce kit yardımı ile DNA saflaştırıldı. PCR amplifikasyonunun ardından elde edilen DNA bir sonraki negatif seleksiyon adımında riboswitch varyantlarını içeren kütüphane olarak kullanıldı. Negatif ve pozitif seleksiyon adımlarının ardından PCR amplifikasyonu yapılan DNA'nın boyut analizi %1 TAE agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Elde edilen DNA'nın saflık ve miktar tayini yukarıda belirtildiği şekilde spektrofotometrik olarak yapıldı.

Tablo 2.11 Pozitif seleksiyon turlarında in vitro protein ekspresyon karışımı

Bileşen	Hacim (µL)
A	20
B	15
RNasin RNase inhibitor	1
RSTPP_Lib_BG (140 ng/µL)	3
TPP (40 mM)	2,5
Tiamin (40 mM)	0
Ultra saf su	8,5

In vitro riboswitch seleksiyonunun negatif ve pozitif seleksiyon adımlarından oluşan bir turu yukarıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Bu tez çalışmasında tiamin varlığında inaktif, fakat TPP varlığında aktif riboswitch varyantlarının zenginleştirilmesi hedeflendi. Bu nedenle, ilerleyen ikinci, üçüncü ve dördüncü turlarda tiamin derişimi 0,8 mM derişiminden sırasıyla 1,6; 3,2 ve 6,4 mM olacak şekilde kademeli olarak artırıldı. Buna karşın, ilk turda 2 mM olan TPP derişimi kademeli olarak 1; 0,4; ve 0,1 mM olacak şekilde düşürüldü. Bu sayede turlar

ilerledikçe yüksek tiamin derişiminde dahi aktive olmayan, fakat düşük TPP deirşiminde aktive olan seçimli riboswitch dizilerinin zenginleştirilmesi hedeflendi.

2.2.8 Riboswitch Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizileme Analizi

In vitro riboswitch seleksiyonunun final turundan elde edilen DNA'nın PCR amplifikasyonu modifiye edilmemiş primer kullanılarak gerçekleştirildi. PCR reaksiyon içeriğı Tablo 2.12'de verilmiştir. 57 °C'de hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dakika uzama koşullarında 25 döngü PCR reaksiyonunun ardından M&N PCR Clean Up kiti kullanılarak final riboswitch kütüphanesi saflaştırıldı. Elde edilen DNA %1 TAE agaroz jel elekttoforezi ile görüntülendi. Saflık ve derişim tayini spektrofotometrik olarak yapıldı. Final kütüphaneyi temsil eden DNA'nın vektöre klonlanması için pJET2.1/blunt vektörü kullanıldı. Vektör, PCR ürünlerinin restriksiyon kesimi olmadan doğrudan vektöre klonlanması için tasarlanmış ticari vektördür ve CloneJet PCR Cloning Kit adıyla ticarileşmiştir (Thermo, K1231). Klonlama prosedüründe kit manüeline sadık kalınmıştır. Öncelikle blunt enzim reaksiyonu kurularak DNA'nın 3'-ucunda yer alan ekstra adenin kalıntısı uzaklaştırıldı. Kurulan reaksiyonun içeriğı Tablo 2.13'te verilmiştir. Reaksiyon karışımı 70 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından buz üzerine alındı ve üzerine 1 µL pJET2.1/Blunt vektörü ile 1 µL T4 DNA Ligaz enzimi eklendikten sonra 22 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımından 10 µL alınarak önceden hazırlanmış kimyasal kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine (200 µL) ilave edildi ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. 42 °C'de 30 saniye inkübasyonun ardından tekrar buza alındı ve ilave iki dakikalık bu üzerinde inkübasyona bırakıldı. Transformasyon karışımının üzerine 800 µL steril LB ortam ilave edildi ve 45 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonundan 100 µL alındı ve 100 µg/mL amfisilin içeren steril LB agar petrilere yayma yapıldı. 37 °C'de gece boyu inkübasyonun ardından petride beliren belirgin ve tek düşen kolonilerden 47 adet seçildi ve steril kürdan yardımı ile steril PCR tüplerinin dibine sürüntü şeklinde bırakıldı. Hazırlanan PCR karışımından her bir PCR tüpüne 50 µL ilave edildi ve 56 °C hibridizasyon sıcaklığı, 72 °C'de 1 dakika uzama koşullarında 30 döngü PCR reaksiyonu yürüdü. PCR karışımının içeriğı Tablo 2.14'te verilmiştir. PCR ürünü %1 TAE agaroz jelde görüntülendi ve pozitif kolonileri

içeren PCR karışımı Sanger DNA dizileme analizi için MacroGen Europe firmasına kargo yoluyla gönderildi. DNA dizileme analizi T7 promotor spesifik primer ile yapıldı. DNA dizi analizi sonuçlarına ilişkin kromotogramlar SnapGene Viewer programı ile incelendi. Dizi zenginleşmesinin tayini için online ClustalW programı kullanıldı (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> , erişim tarihi 10.08.2023).

Tablo 2.12 Final riboswitch kütüphanesinin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımı

Bileşen	Hacim (µL)
Tampon (10X)	10
MgCl ₂	6
dNTPs (10 mM her biri)	2
DTT (100 mM)	2
RSTPP_Fw (100 µM)	0,5
SNAP_Rv2 (100 µM)	0,5
Kalıp DNA (1,2 ng/µL)	1
Taq DNA Polimeraz (5U/µL)	0,5
DMSO	10
Ultra saf su	68
Toplam Hacim	100

Tablo 2.13 PCR ürünü final riboswitch kütüphanesinin vektöre klonlanması reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim (µL)
Reaksiyon Tamponu (2X)	10
Saflaştırılmış PCR Ürünü (80 ng/µL)	1
DNA Blunting Enzyme	1
Ultra saf su 1	6
İnkübasyon (70 °C, 5 dakika)	
pJET2.1/Blunt (50 ng/µL)	1
T4 DNA Ligaz (5U/ µL)	1

Tablo 2.14 Final riboswitch kütüphanesinin koloni PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim (µL)
Tampon (10X)	250
MgCl ₂	150
dNTPs (10 mM her biri)	50
DTT (100 mM)	50
T7_Pro (100 µM)	12,5
pJET2.1_Rv (100 µM)	12,5
Kalıp DNA (koloni)	0
Taq DNA Polimeraz (5U/µL)	12,5
DMSO	250
Ultra saf su	1660
Toplam Hacim	2500

2.2.9. Tiamin Pirofosfokinaz Enzim Kütüphanesinin Tasarımı ve Eldesi

İnsan tiamin pirofosfokinaz enziminin katalitik merkezde yer alan 5 amino asitlik bölgesinde NNK bölge satürasyon mutagenezi yapıldı. İnsan TPK1 enziminin (Uniprot: Q9H3S4, PDB:3S4Y) üç boyutlu yapısı ve katalitikçe aktif merkezi bilinmektedir. Ayrıca, hastalıklarla ilişkili nokta mutasyonlardan kaynaklanan enzim defekti hastalıkları literatürde yer almaktadır (Banka et al., 2014; Mayr et al., 2011; Nyhan et al., 2019). hTPK1 enzimi daha önce *E. coli*'de ekspresyonu yapılmış bir enzimdir (Banka et al., 2014; Onozuka and Osaka; 2002). hTPK1 enziminin katalitik aktiviteden sorumlu bölgelerinde yapılan mutasyon çalışmaları, bu çalışmada bölge satürasyon mutagenezi yapılacak bölgeyi ortaya koymaktadır. Şekil 2.6'da görüldüğü üzere Q96E ve T99A mutasyonları enzim aktivitesinde ciddi bir düşüş, D100N mutasyonu ise aktivitede kesin bir kayıp ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, protein veri bankasında (PDB) 3S4Y kodlu protein üç boyutlu yapısı 96QDHTD100 bölgesinin substrat ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* TPK1 enziminin üç boyutlu yapısı dikkate alınarak yapılan üç boyutlu yapı homoloji karşılaştırmasında da 122QYSTD126 bölgesi hTPK1 enziminin 96QDHTD100 bölgesi ile çakışmaktadır. Maya TPK1 enziminde 123Y ve 124S amino asit artıklarının katalitikçe aktif oldukları ortaya konmuştur (Baker et al., 2001). Bu nedenle rasgele mutagenez için hTPK1 enziminin 96QDHTD100 bölgesi hedeflendi.

Şekil 2.6 hTPK1 üzerinde yapılan mutasyon analizleri (Onozuka and Osaka; 2002)

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_m^{ATP} (mM)	$K_m^{thiamin}$ (μM)	k_{cat}/K_m^{ATP} ($s^{-1} M^{-1}$)	$k_{cat}/K_m^{thiamin}$ ($s^{-1} M^{-1}$)
Wild-type	0.069	1.2	0.21	5.9×10	3.3×10^5
D71N	0.0005	ND	ND	—	—
D73N	0.0003	ND	ND	—	—
S74A	0.094	2.4	0.23	4.0×10	4.1×10^5
Q96E	0.045	1.0	0.039	4.4×10	1.2×10^6
T99A	0.026	3.5	0.16	7.4	1.6×10^5
D100N	0.0002	ND	ND	—	—
R131G	0.028	2.0	0.076	1.4×10	3.7×10^5
D133N	0.034	0.65	0.82	5.2×10	4.1×10^4

İnsan TPK1 enziminin *in vitro* protein ekspresyon reaksiyonunda sentezlenebilmesi için gen sentezi yapıldı. Kodon optimizasyonu yapılan sentetik gen DNA dizisi Şekil 2.7'de verilmektedir. Sentetik gen dizisi Sentebiolab (Ankara)

firması tarafından sentezlendi, dizinin doğruluğu Sanger DNA dizi analizi ile doğrulandı ve liyofilize formda temin edildi.

```

CCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA
CATATG

GAT TAT AAA GAC GAT GAC GAC GAC AAA GGC AGT GGA CAC CAC CAT CAC CAC
CAC GGC TCG GGA ATG GAA CAT GCG TTT ACC CCG CTG GAG CCT TTA TTG AGC
ACC GGT AAC TTA AAA TAC TGT TTA GTC ATC TTG AAT CAA CCT CTG GAC AAT
TAC TTT CGT CAC CTG TGG AAT AAG GCT TTG CTT CGT GCC TGT GCC GAC GGA
GGG GCA AAC CGT TTA TAT GAT ATT ACG GAA GGA GAA CGT GAG TCC TTC CTT
CCA GAA TTT ATT AAT GGC GAT TTC GAT TCA ATT CGT CCG GAA GTG CGT GAA
TAC TAT GCG ACG AAA GGC TGT GAA CTT ATC TCG ACC CCG GAC CAA GAT CAT
ACA GAT TTT ACG AAG TGT CTT AAG ATG TTG CAG AAA AAA ATC GAA GAG AAA
GAC TTG AAA GTC GAT GTG ATT GTA ACA TTA GGC GGA TTA GCA GGC CGT TTC
GAT CAG ATC ATG GCA TCC GTT AAC ACG TTG TTT CAG GCT ACC CAC ATT ACT
CCG TTT CCA ATC ATC ATT ATC CAG GAG GAA AGT TTA ATC TAT CTT TTA CAG
CCT GGT AAG CAC CGC TTG CAT GTT GAC ACG GGC ATG GAA GGC GAT TGG TGT
GGT CTT ATT CCG GTC GGG CAA CCT TGT ATG CAA GTG ACT ACT ACG GGA TTG
AAG TGG AAC CTG ACA AAT GAC GTT CTG GCA TTC GGG ACA CTG GTT AGC ACC
AGT AAC ACG TAT GAC GGT AGC GGT GTC GTG ACG GTG GAA ACA GAC CAC CCA
TTA CTT TGG ACT ATG GCG ATC AAG TCT TAA

CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT

```

Şekil 2.7 hTPK1 kodlayan sentetik gen dizisi. 5' kodlamayan bölge mavi, 3' kodlamayan bölge kırmızı, bölge satürasyon mutagenesinde ileri ve geri yönlü primer bölgeleri yeşil ve NNK mutasyonunun yapılacağı bölge sarı ile işaretlenmiştir.

hTPK1 sentetik geninin fonsiyonel olduğunun doğrulanması için pET-28a vektörüne klonlanarak *E. coli* T7 Express Iq RP kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Tasarlanan primerler Tablo 2.15'te hTPK1_*NdeI* ve hTPK1_*XhoI* olarak gösterilmektedir. Primerler üzerinde altı çizili palindromik diziler sırasıyla *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgeleridir. Elde edilen sentetik gen üzerinde inaktif mutantın elde edilebilmesi için OE-PCR tekniği kullanıldı (Peng et al., 2006). D100N mutasyonunun yapılabilmesi için hTPK1_in_Fw ve hTPK1_in_Rv primerleri tasarlandı. Kırmızı ile gösterilen bölge aspartat yerine asparajin kodlayan kodonu temsil etmektedir. İlk olarak NNK_Fw_5' ile hTPK1_in_Rv primerleri kullanılarak fragment A elde edildi. Ardından NNK_Rv_3' primeri ile hTPK1_in_Fw primeri kullanılarak fragment B elde edildi. Clean up kiti kullanılarak saflaştırılan fragmentlerin füzyonu için her iki fragment kalıp DNA olarak kullanıldı ve NNK_Fw_5' ile NNK_Rv_3'

primerleri ile füzyon PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünü son olarak hTPK1_*NdeI* ve hTPK1_*XhoI* primerleri ile amplifiye edildi, PCR ürününün restriksiyon kesimi yapıldı ve doğal enzim ile benzer şekilde *E. coli* T7 express Iq RP kimyasal kompetent hücrelerine transforme edilerek ekspresyon profilleri test edildi. hTPK1 NNK kütüphanesinin eldesi için öncelikle NNK_Fw_5' ve hTPK1_NNK_Lib kullanıldı. Sentetik hTPK1'in kalıp DNA olarak kullanıldığı bu ilk reaksiyonda öncelikle NNK mutasyonları sentetik DNA'ya eklendi. Daha sonra, tam uzunlukta kütüphane eldesi için NNK_Fw ve NNK_Rv primerleri kullanılarak bir önceki reaksiyon ürününün kalıp DNA olarak kullanıldığı ikinci bir PCR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon ürünü son olarak, riboswitch kütüphanesi için uygulanan protokole benzer şekilde BG-Maleimid modifiye hTPK1_Fw_SH primeri kullanılarak amplifiye edildi ve elde edilen saf DNA *in vitro* seleksiyon için kullanıldı.

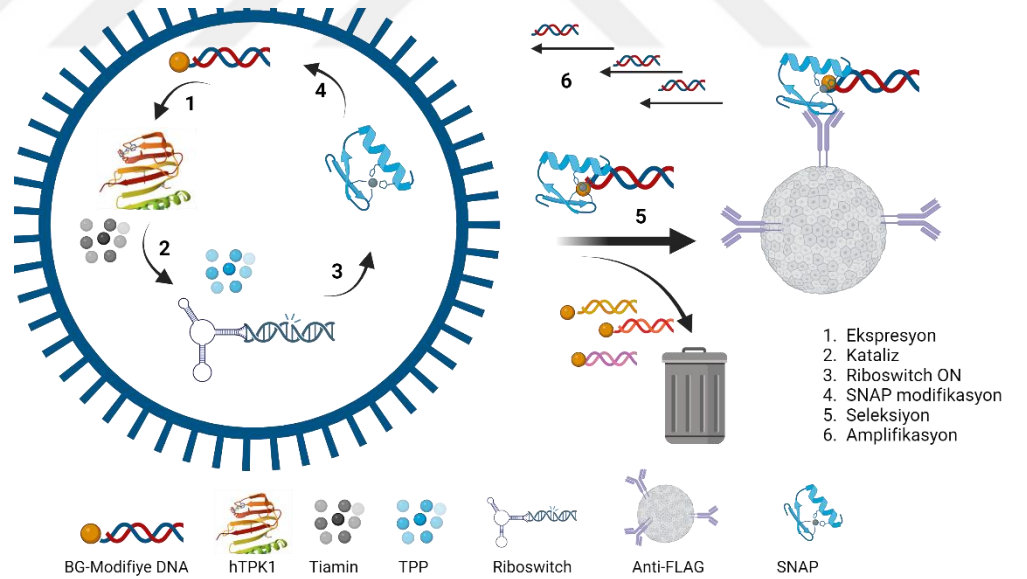
Tablo 2.15 hTPK1 fonksiyonel, mutant ve NNK kütüphanesinin eldesinde kullanılan primer dizileri

hTPK1_in_Fw	CAA GAT CAT ACA AAT TTT ACG AAG TGT CTT AAG AT G TTG CAG
hTPK1_in_Rv	ACA CTT CGT AAA ATT TGT ATG ATC TTG GTC CGG GGT CGA
NNKFw5'	TGT GAA CTT ATC TCG ACC CCG GAC
NNKRv	TTT ACG AAG TGT CTT AAG ATG TTG C
hTPK1_NNK_Lib	TGT GAA CTT ATC TCG ACC CCG GAC NNK NNK NNK NNK NNK TTT ACG AAG TGT CTT AAG ATG TTG C
hTPK1_Fw_S H	5'-SH-CCG CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG
hTPK1_ <i>NdeI</i>	TATACATATG GAT TAT AAA GAC GAT GAC GAC
hTPK1_ <i>XhoI</i>	GATACTCGAG AGA CTT GAT CGC CAT AGT CCA AAG

2.2.10. Tiamin Pirofosfokinaz Enziminin *in vitro* Kompartmanlarda Seleksiyonu

hTPK1_NNK kütüphanesi yukarıda belirtildiği şekilde 5'-BG modifiye olarak hazırlandı ve saflaştırıldı. Elde edilen kütüphane *in vitro* seleksiyonlarda kalıp DNA olarak kullanıldı. Ayrıca, riboswitch raportör kasedi *in vitro*

emülsiyonlarda hTPK1 enziminin aktivitesi sonucu emülsiyon içinde artan TPP derişiminin raportörü olarak kullanıldı. *In vitro* seleksiyon için kurulan protein ekspresyon reaksiyon içeriği Tablo 2.16’da verilmiştir. Tabloda belirtildiği şekilde buz üzerinde hazırlanan reaksiyon karışımı 950 µL yağ karışımının üzerine 10 µL porsiyonlar halinde 1 dakika aralıklı olarak ilave edildi ve 1500 rpm hızında sürekli olarak karıştırıldı. *In vitro* emülsiyonlar 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha önce belirtildiği şekilde dietil eter ile ekstraksiyon yapıldı. Anti-DYKDDD manyetik boncuklar ile yarım saat inkübasyonun ardından üç kez yıkama yapıldı ve ardından Glisin-HCl tamponu ile elusyon yapıldı. Tris-HCl tamponu ile nötralize edilen eluat Ni-NTA manyetik boncuklar ile bağlanmak üzere yarım saat inkübasyona bırakıldı. 30 Dakikalık inkübasyonun ardından üç kez yıkama yapıldı ve 500 mM imidazol içeren elüsyon tamponu ile DNA elue edildi. Elue edilen DNA bir sonraki enzim seleksiyon turunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere BG modifiye hTPK1_Fw-SH primeri ile amplifiye edildi.



Şekil 2.8: *In vitro* kompartmanlarda riboswitch-eşlenmiş enzim tarama platformunun şematik gösterimi. Enzim tarama platformu 6 adımdan oluşan reaksiyonlar serisinin *in vitro* koşullarda tekrarına dayanır. Bu reaksiyonlar serisi sırasıyla enzim kodlayan gen varyantının ekspresyonu, enzim katalizi, riboswitch aktivasyonu ve SNAP ekspresyonu, aktif enzim varyantını kodlayan gen varyantının SNAP-modifikasyonu, *in vitro* seleksiyon ve aktif enzim varyantlarını kodlayan gen dizilerinin PCR amplifikasyonu adımlarından oluşmaktadır.

Tablo 2.16 *in vitro* enzim seleksiyonunda kullanılan protein sentez reaksiyon karışımı.

Bileşen	Hacim (µL)
A	20
B	15
RNasin RNase inhibitor	1
Tiamin (4 mM)	1
RSTPP (120 ng/µL)	1
BG-hTPK1 (80 ng/µL)	2
Ultra saf su	10

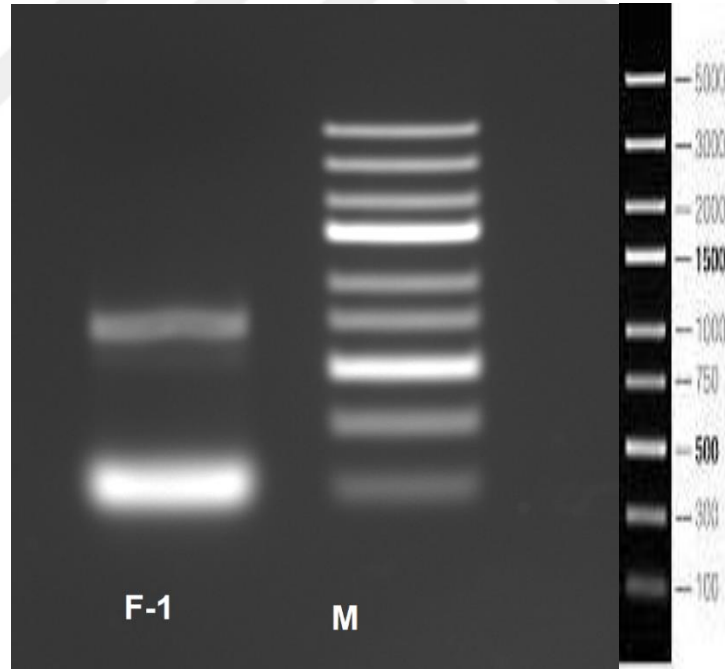
2.2.11. Tiamin Pirofosfokinaz Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizi Analizi

Enzim seleksiyonun final turunda elde edilen kütüphane *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerini içeren hTPK1_*NdeI* ve hTPK1_*XhoI* primerleri ile amplifiye edildi ve PCR ürünü kit yardımıyla saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA her iki enzim kullanılarak kesildi ve kesim ürünü jelden izole edildi. Aynı şekilde pET-28a vektörünün de kesimi aynı enzimler ile yapıldıktan sonra jelden izole edildi. Kesim ürünleri kullanılarak T4 DNA Ligaz enzimi ile ligasyon reaksiyonu kuruldu ve gece boyu sıcaklık gradienti ile reaksiyon yürüdü. Ligasyon ürünleri kimyasal kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edildi ve 100 µg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayma yapıldı. Gece boyu inkübasyonun ardından tek düşen koloniler seçildi ve hTPK1 enzimi içeren klonların belirlenmesi için koloni PCR yapıldı. Koloni PCR ürünü %1 TAE agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve pozitif kolonilere ait reaksiyon karışımı MacroGen Europe firmasına gönderilerek Sanger sekans analizi yapıldı.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

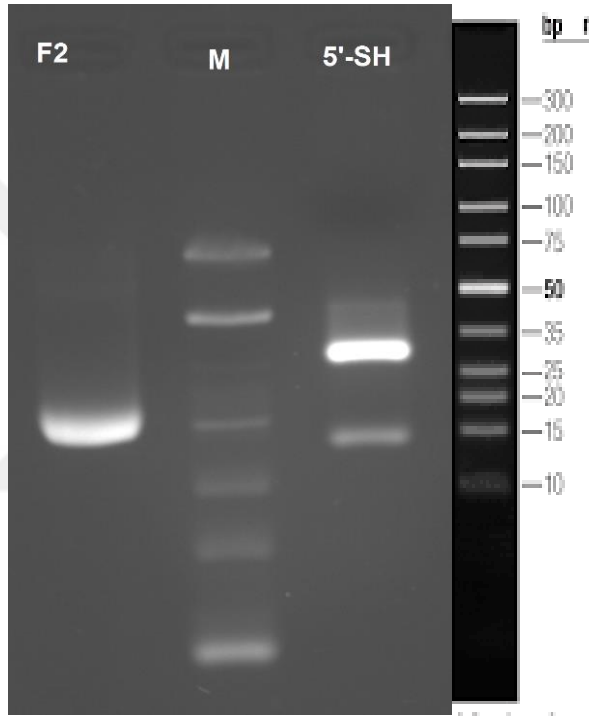
3.1. Riboswitch Kütüphanesinin Tasarlanması

RSTPP dejenere kütüphanesi iki fragment olacak şekilde sipariş edildi. Birbirine komplementer olan fragmentlerden RSTPP_2_Fw fragmenti raportör enzim olan SNAP-Tag kodlayan gen bölgesinin 5' bölgesine komplementer olarak tasarlanmıştır. Bu nedenle ilk olarak RSTPP2_Fw ve SNAP_Rv2 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Kalıp DNA olarak SNAP-Tag klonlanmış pET-28a vektörü kullanıldı. Böylece elde edilen fragment N-terminal bölgesinde His-tag ve FLAG-tag içerecek şekilde elde edildi. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.1'de görülmektedir. Gene Ruler Express DNA Ladder ile karşılaştırıldığında PCR ürününün beklendiği şekilde yaklaşık 750 bp uzunluğunda olduğu görülmektedir.

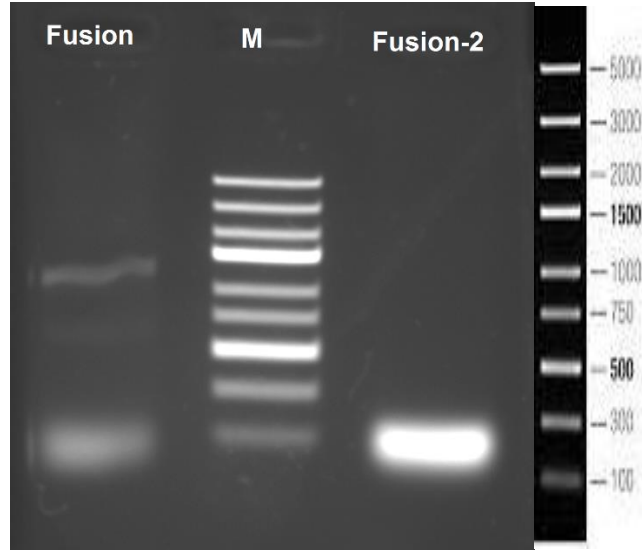


Şekil 3.1 RSTPP-2-Fw ve T7 term primerleri ile 8 nolu plazmitten elde edilen PCR ürünü. Elde edilen ürün Riboswitch kütüphanesinin ilk fragmentinin SNAP enzimine füzyonu ürünüdür.

RSTPP kütüphanesinin 5' fragmenti olan F-2'nin eldesi için RSTPP_1_Rv ve RSTPP_Fw_SH oligolarını kullanılarak füzyon PCR yapıldı. Elde edilen fragmente (F-2) ilişkin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.2'de görülmektedir. GeneRuler ULR Ladder ile kıyaslandığında elde edilen PCR ürünü yaklaşık 200 bp'lık bir bant vermektedir. Fragment 1 ve Fragment 2'nin füzyon PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürün Şekil 3.3.'te görülmektedir. Yaklaşık 1 kb boyutunda beklenen füzyon ürünü ilk kuyucukta görülmektedir.



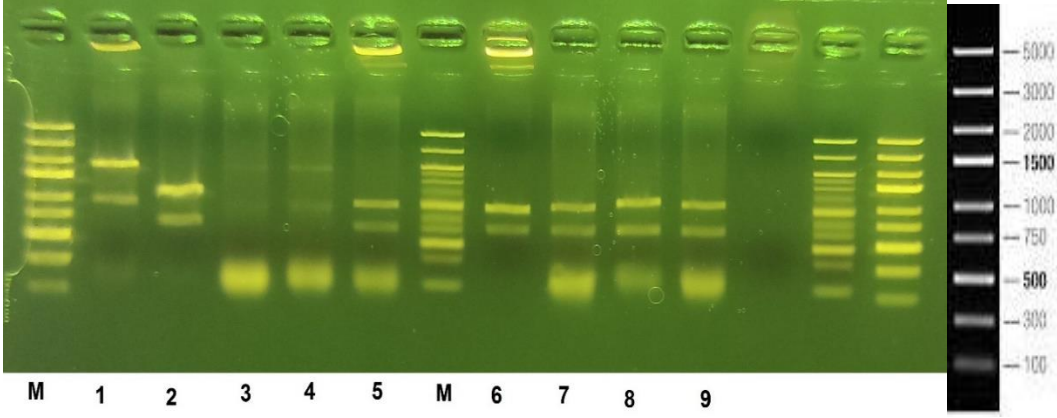
Şekil 3.2 RSTPP-1-rv ve 5'-SH ile yapılan PCR reaksiyon ürünü. Elde edilen fragment kütüphanenin promotor bağlanma bölgesini de içeren 5'-ucunda yer alan fragmentidir



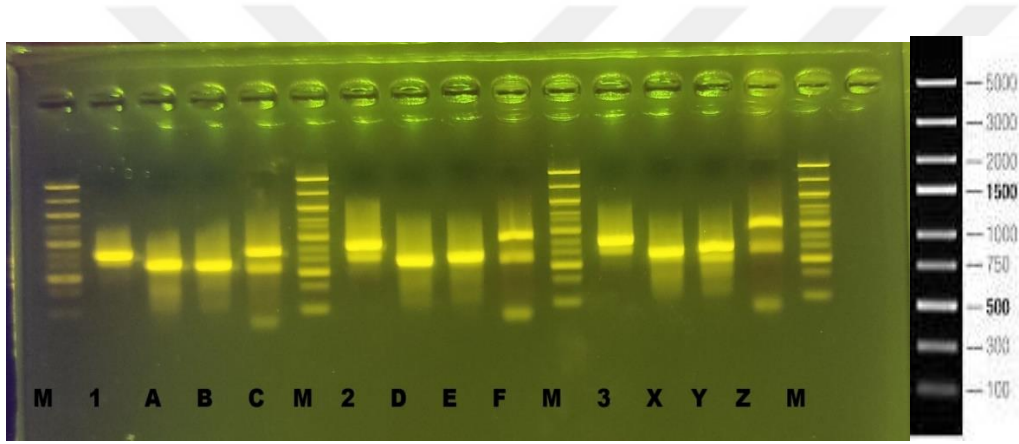
Şekil 3.3 F-1 ve F-2 fragmentlerinin füzyon PCR görüntüsü. F-1 4 ng ve F-2 0.8 ng kullanılarak 5'-SH ve T7-term primerlerin ile yapılan PCR reaksiyonu sonucunda hedef bölgenin doğru yerde bant verdiği görülmektedir.

3.2. SNAP-Tag Enziminin Klonlanması

SNAP-Tag enziminin rekombinant olarak üretilmesi ve RSTPP kütüphanesi ile füzyonu için enzim kodlayan gen dizisi pSNAP-Tag-T7(2) vektöründen *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzim tanıma bölgeleri ile kesilerek pET-28a vektörüne klonlandı. Transformasyonun ardından koloni PCR yapıldı ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Koloni PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.4'te verilmiştir. T7 promotor/terminatör spesifik primerler ile yapılan koloni PCR ürününün yaklaşık 1 kb bant vermesi beklenmektedir. Koloni PCR reaksiyonunun kirliliğinden ötürü non-spesifik bantlar oluşabilmektedir. Bu nedenle pozitif olarak kabul edilen 2, 6 ve 8 numaralı plazmidler izole edilerek yeniden PCR yapıldı. Saflaştırılmış plazmidler ile yapılan PCR ürünlerine ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.5'te görülmektedir. Gradient PCR ürünleri incelendiğinde 56 ve 59 °C'de PCR ürünlerinin tek bant oldukları görülmektedir.

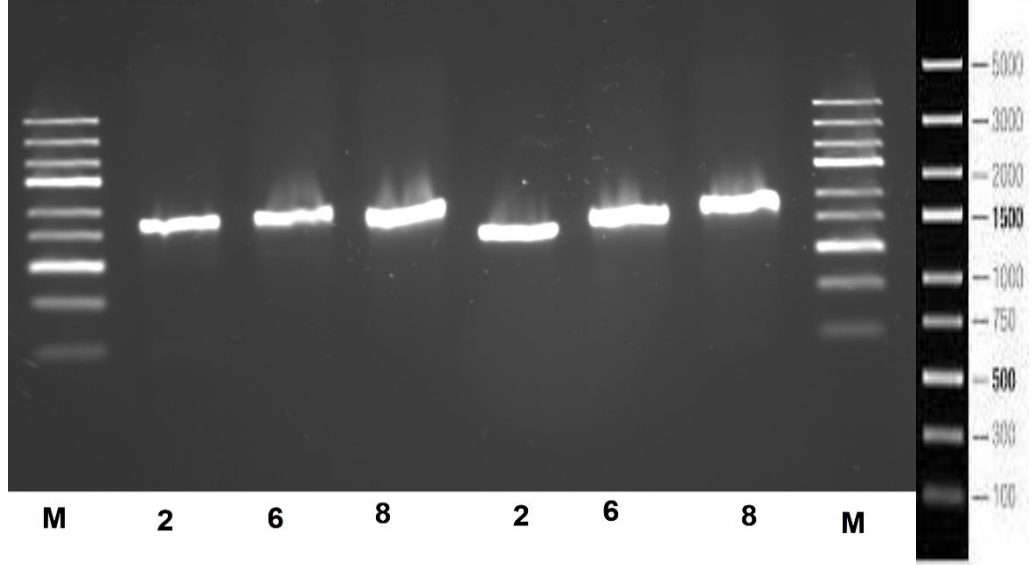


Şekil 3.4 SNAP-pET-28a koloni PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. T7-pro ve T7 term primerleri ile yapılan amplifikasyonu sonucunda ürün yaklaşık 1 kb olarak görünmektedir.



Şekil 3.5 İzole edilen plazmidler (2, 6 ve 8) ile yapılan A, B ve C (56, 59 ve 62 °C’de) T7-pro/T7-term PCR reaksiyonlarına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

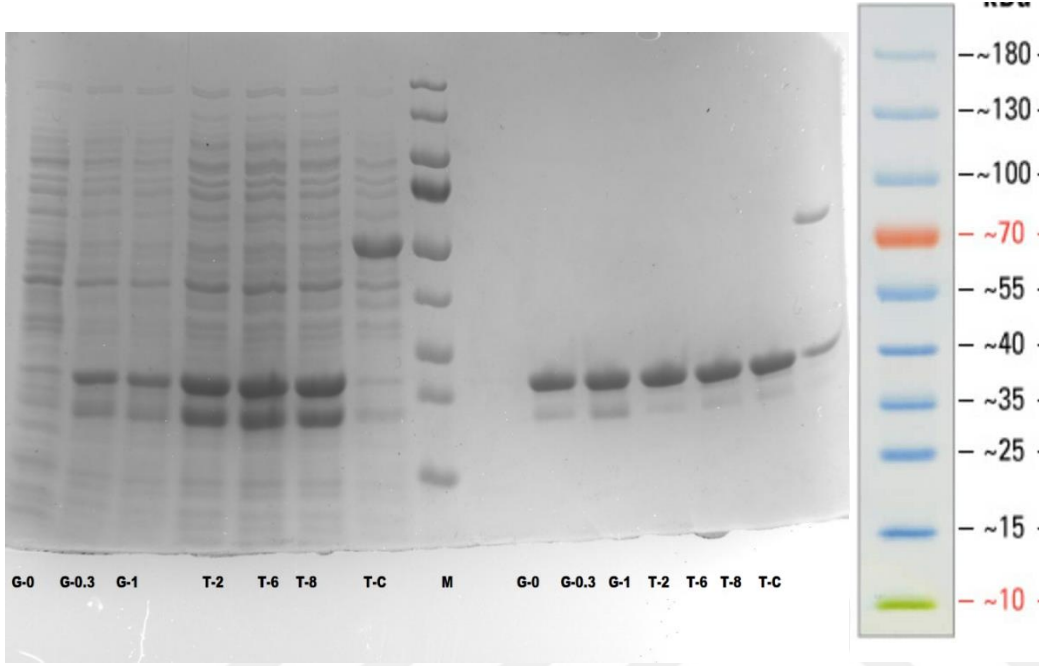
Koloni PCR sonucunda elde edilen görüntünün temiz olmaması nedeniyle izole edilen plazmidler ile yapılan PCR reaksiyonu %5 DMSO içerecek şekilde insert spesifik primerler ile tekrar edildi. %5 DMSO içeren reaksiyon karışımının seçimliliği artırdığı ve net bir şekilde tek bant PCR ürünlerinin olduğu Şekil 3.6’da görülmektedir.



Şekil 3.6 Kalıp DNA 1ng/100 µl ve reaksiyon karışımı %5 DMSO içerecek şekilde hazırlandığında elde edilen koloni PCR görüntüsü. Koloni PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kolonilerden izole edilen plazmid DNA kullanılmıştır.

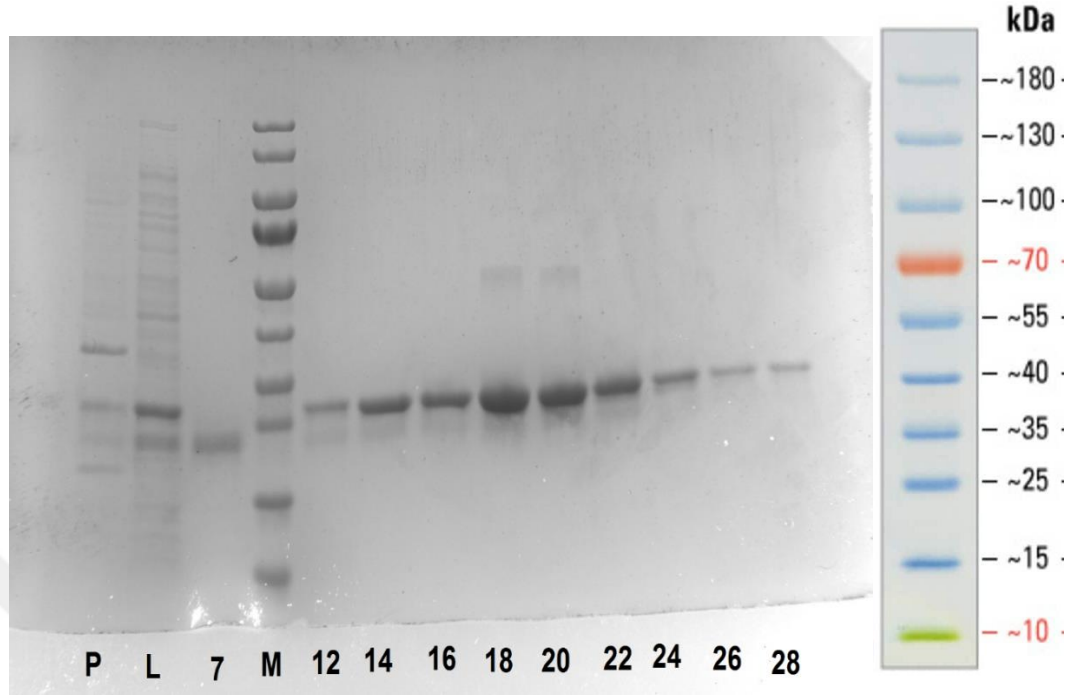
SNAP-Tag enziminin pET-28a vektörüne klonlanması sonucu elde edilen ve pozitif oldukları doğrulanan 2, 6 ve 8 numaralı plazmidler *E. coli* T7 Express Iq RP ekspresyon suşuna transforme edildi ve test ekspresyonu yapıldı. Ayrıca suş bağımlı ekspresyon farkını test edebilmek için 8 numaralı plazmid *E. coli* GOLD suşuna transforme edildi. Test ekspresyonunun analizi Tricine-SDS-PAGE ile yapıldı. Ultrasonikasyon sonrası elde edilen lizat santrifüjlendi ve çözünür protein fraksiyonu içeren süpernatant jele yüklendi. Ayrıca, Ni-NTA manyetik boncuklar kullanılarak küçük ölçekli manyetik ayırma yapıldı ve eluatlar jele yüklendi. Şekil 3.7’de hem süpernatant fraksiyonlarının hem de manyetik ayırma sonucu elde edilen eluatların jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre G-0, G-0,3 ve G-0,1 kuyucukları karşılaştırıldığında 0,3 mM IPTG indüksiyonunun yeterli olduğu, IPTG yokluğunda protein ekspresyonunun gerçekleşmediği görülmektedir. Ekspresyon bandı yaklaşık 25 kDa olarak belirlendi. Yine T-2, T-6 ve T-8 kuyucukları T-C kuyucuğu ile karşılaştırıldığında IPTG indüksiyonu sonucu belirgin şekilde protein ekspresyonunun indüklendiği görülmektedir. PageRuler Express protein markörünün sol tarafında yer alan kuyucuklara yüklenen manyetik ayırma örnekleri tek aşamalı saflaştırmanın hedef proteini ayırmakta yeterli olduğunu ortaya koymaktadır. Hedef proteinin hemen altında görülen ikinci bant

restriksiyon endonükleaz kesimi esnasında gelen ve tam uzunlukta olmayan SNAP-Tag ürününe aittir ve kromatografik ayırım ile non-spesifik bantın uzaklaştırılması mümkündür.



Şekil 3.7 SNAP-pET-28a klonlarının *E. coli* T7 Express Iq RP ile yapılan test ekspresyonları. SNAP enziminin yaklaşık 25 kDa'luk bant verdiği görülmektedir. T-C olarak ifade edilen negatif kontrol.

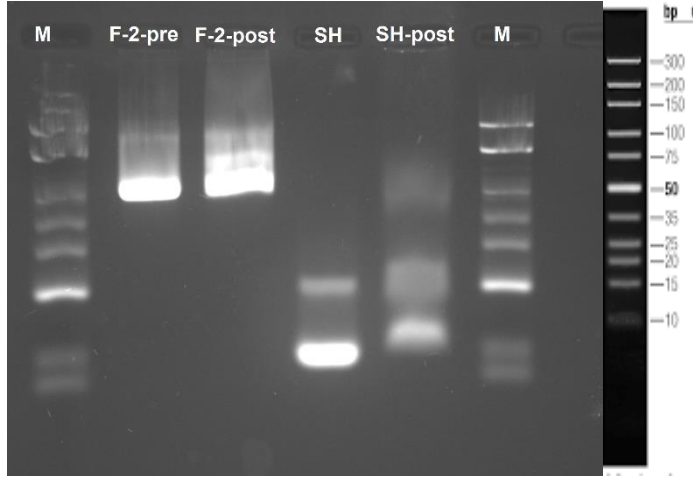
Test ekspresyonun ardından büyük ölçekli üretime geçildi. 500 mL LB ortamına gece kültürü inokülasyonunun ardından OD_{600} :0,5 anında 0,3 mM IPTG indüksiyonu yapıldı ve gece boyu 25 °C'de protein ekspresyonu gerçekleştirildi. Ultrasonikasyon ve santrifüj adımlarının ardından elde edilen homojenat 0,45 µm enjektör filtreden geçirilerek kolona yüklemeye hazır hale getirildi. His-Trap Ni-NTA (5mL) IMAC kolonu AKTA-Prime FPLC sistemine bağlandı ve bağlanma tamponu olan A tamponu ile dengelendi. 280 nm absorbans ve iletkenlik değerinin sabitlenmesinin ardından protein örneği 1 mL/dak akış hızında kolona yüklendi ve ardından A tamponu ile bağlanmayan safsızlıklar uzaklaştırıldı. 500 mM imidazol içeren B tamponu ile gradient elusyonu yapıldı ve elde edilen fraksiyonlar ile SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 3.8'de SDS_PAGE analizi görüntüsü verilmektedir. SNAP-Tag enzimi saf bir şekilde elde edildi. Elde edilen enzim fraksiyonları birleştirildi ve protein tayini yapıldı (Bradford, 1976).



Şekil 3.8 8 Numaralı koloni ile yapılan büyük ölçekli üretim ve saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE analizi. 25 kDa hemen üstünde saf proteinin elde edildiği görülmektedir.

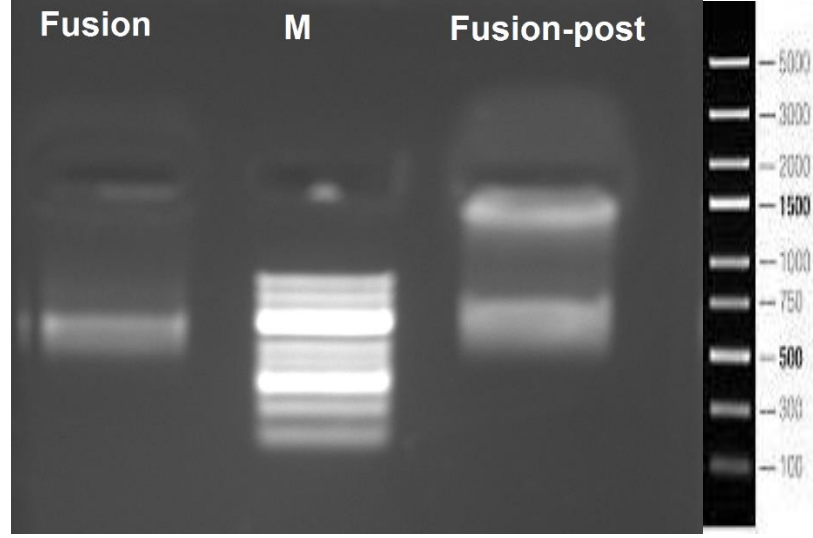
3.3. SNAP Enziminin EMSA analizleri ile aktivite tayini

SNAP-Tag enzimi saf bir şekilde elde edildikten sonra aktivite tayini için EMSA analizleri yapıldı. Öncelikle SNAP enzimi ile BG modifiye SH-Primer inkübe edildi ve %3 agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. SH-post ile ifade edilen kuyucukta bir kayma görülmektedir. Ancak, modifiye edilmemiş F-2 DNA'nın göç profilinde beklendiği şekilde bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 3.9).



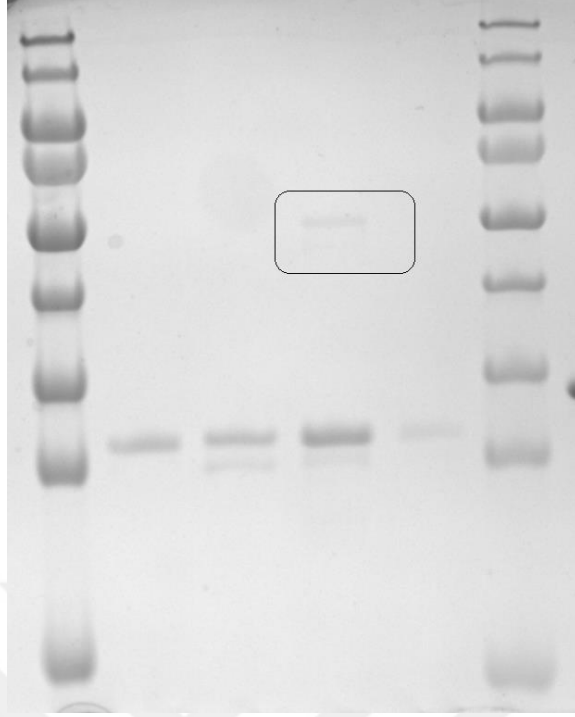
Şekil 3.9 BG-maleimide modifiye DNA fragmentlerinin SNAP enzimi ile inkübasyonu sonrası elde edilen EMSA analiz görüntüsü. SH probunda göç profilinin net bir şekilde değiştiği görülmektedir. F-2 fragmentinde göç profilinde belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte, bu beklenen bir durumdur.

In vitro seleksiyon adımıyla kullanılacak füzyon kütüphanenin SNAP-Tag enzimi tarafından modifiye edildiğinin doğrulanması gerekmektedir. Bu amaca uygun olarak tam uzunluktaki ve 5'-SH ucundan BG modifiye RSTPP kütüphanesi SNAP-Tag enzimi ile PBS tamponu içinde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. EMSA analizi sonucunda Fusion-POST olarak isimlendirilen kuyucukta belirgin bir şekilde SNAP-Tag RSTPP kütüphanesinin göç profili görülebilmektedir (Şekil 3.10)



Şekil 3.10 F1+F2 füzyon ürünü olan riboswitch kütüphanesinin (BG-maleimide modifiye) SNAP enzimi ile inkübasyonunu ardından EMSA analizi. Göç profilinde belirgin bir farklanma görülmektedir. SDS-PAGE analizi, protein-DNA etkileşiminin non-spesifik olmadığı ve BG modifikasyonu üzerinden kovalent bir bağlanmanın gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 3.11).

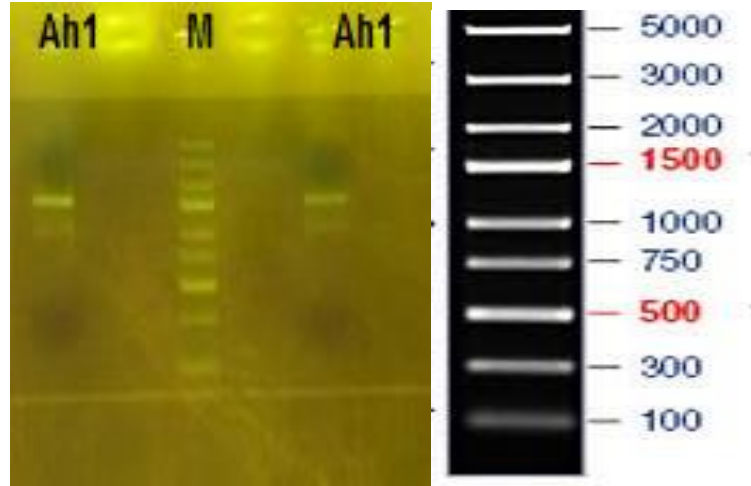
Şekil 3.10’da görülen EMSA analizi benzer şekilde SDS-PAGE analizi ile tekrar edildi. RSTPP kütüphanesi ile SNAP-Tag enziminin reaksiyon ürününün yaklaşık 55 kDa’luk bir bant vererek göç profilinde yaklaşık 20 kDa bir farklanmaya neden olduğu görülmektedir. SDS-PAGE analizi ile protein-DNA etkileşiminin non-spesifik olmadığı ve BG modifikasyonu üzerinden kovalent bir bağlanma gerçekleştiği yorumu yapılabilir (Şekil 3.11).



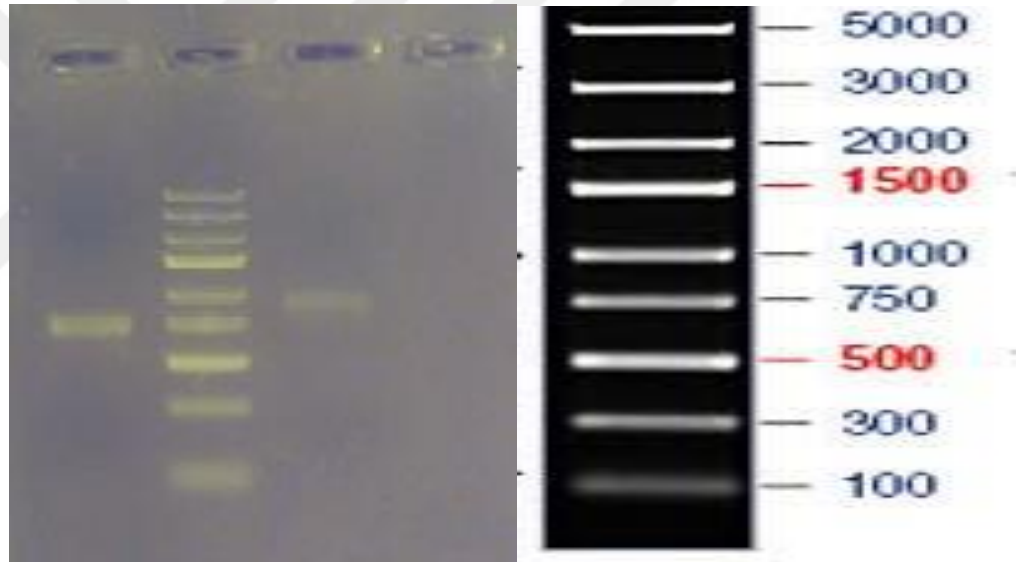
Şekil 3.11 Final RSTPP kütüphanesinin BG-Maleimid konjugasyonu sonrası SNAP enzim aktivitesinin EMSA Analizi. SNAP enziminin DNA füzyon ürününün jel üzerindeki pozisyonu kutucuk içinde görülmektedir. Reaksiyona girmemiş serbest enzim ise altta görülmektedir.

3.4. *In vitro* Protein Ekspresyon Koşullarının optimize Edilmesi

In vitro protein ekspresyon kitinin test edilmesi için plazmid DNA ve lineer DNA kalıp DNA olarak kullanıldı. Ara h 1, GFP ve DHFR proteinlerinin vektörden PCR amplifikasyonu yapıldı. PCR amplifikasyonu T7 promotor/terminatör bölgelerini içerecek şekilde yapıldı. Lineer DNA ürünleri Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te görülmektedir.

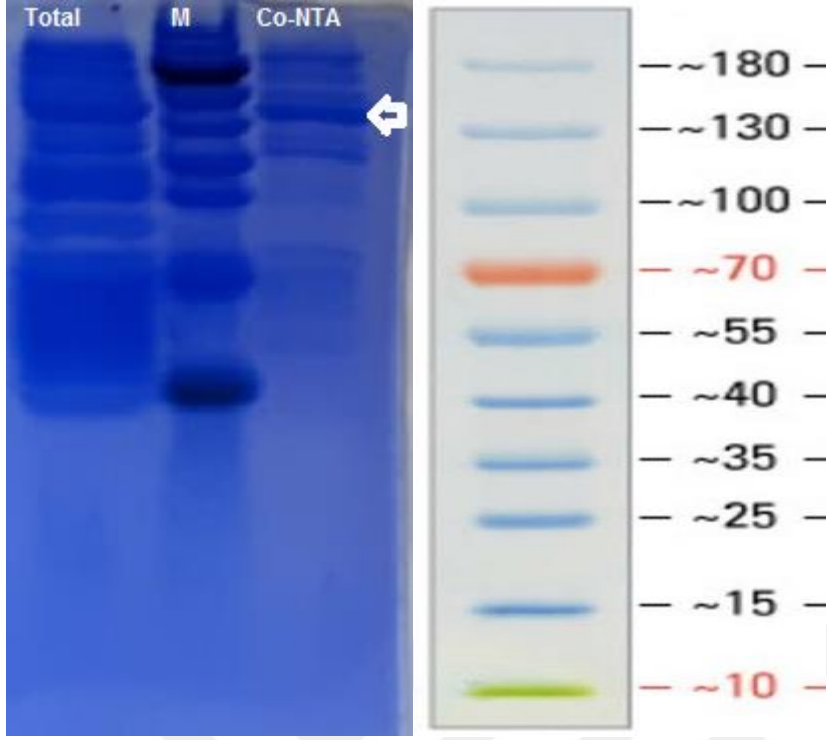


Şekil 3.12 Ara h 1 kodlayan pET28a_Ah1 klonundan lineer DNA eldesi için PCR amplifikasyon ürünü. PCR ürünü yaklaşık 1.5 kbp olarak görünmektedir.

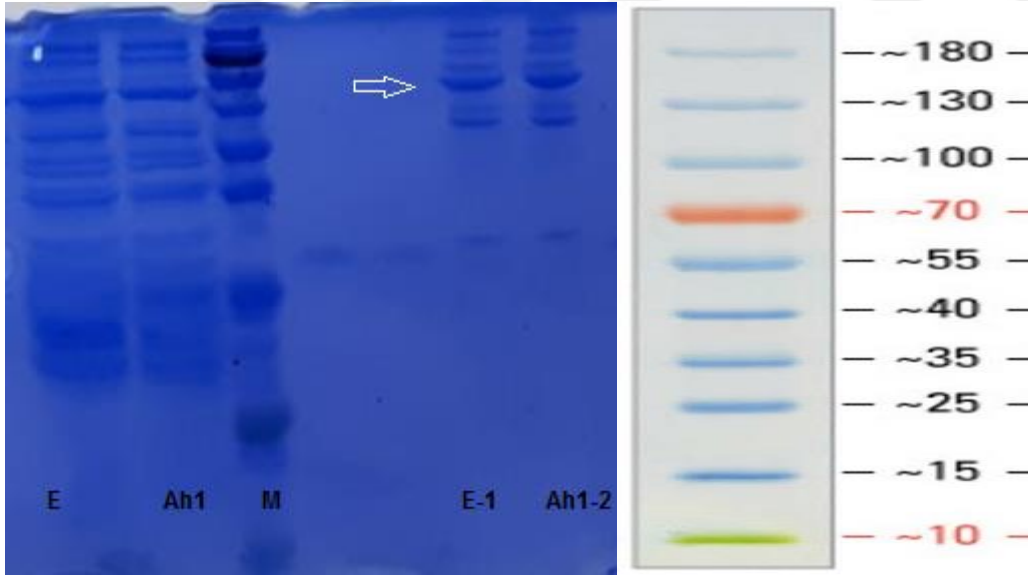


Şekil 3.13 GFP ve DHFR kodlayan gen bölgelerinin PCR ürünü. DHFR kodlayan gen ürünü yaklaşık 750 bp ve GFP kodlayan gen ürünü ise yaklaşık 1000 bp olarak görülmektedir.

pET-28a_Ah1 vektörü kullanılarak yapılan ilk denemde Ara h 1 proteini ile *in vitro* protein ekspresyon kitinde yer alan bantların üst üste binmesi nedeniyle net bir sonuca ulaşamadı. *In vitro* protein ekspresyon kitinde yer alan bileşenlerin His-Tag iöermesi nedeniyle Co-NTA manyetik ayırma tekniği hedef proteinin saflaştırılması açısından olumlu sonuçlanmadı (Şekil 3.14).



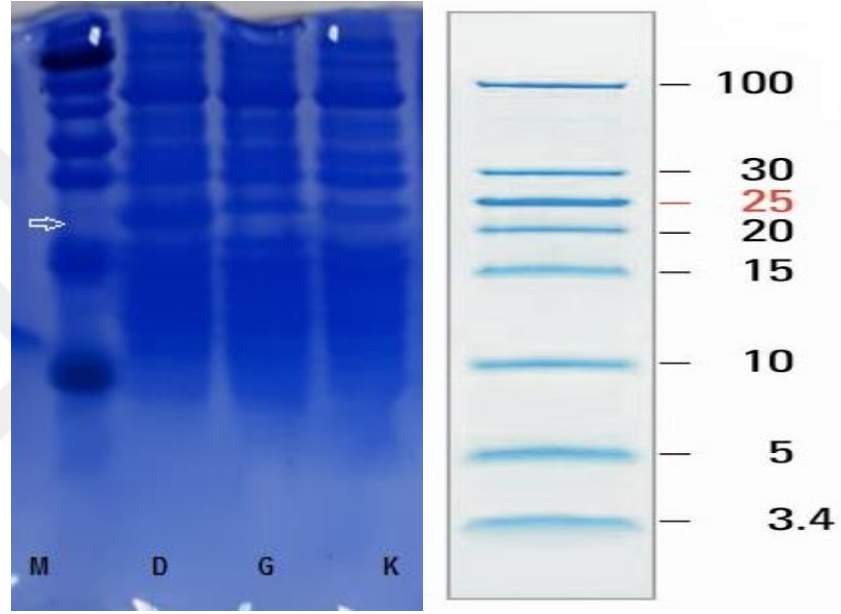
Şekil 3.14 pET28a_Ah1 klonunun kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon ürününün SDS-PAGE görüntüsü. Ara h 1 proteininin beklendiği bölge okla belirtilmiştir.



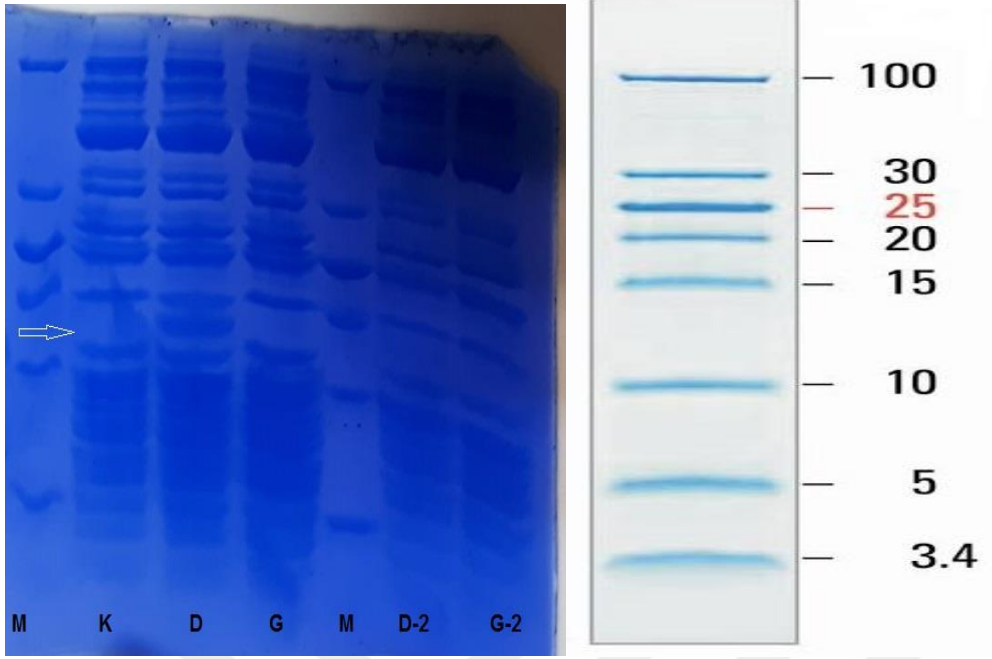
Şekil 3.15 pET28a_Ah1 klonunun kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon ürününün SDS-PAGE görüntüsü. E: kalıp DNA içermeyen reaksiyon ürünü; Ah1: kalıp DNA olarak pET28a-Ah1 klonunun kullanıldığı reaksiyon ürünü; E-1: ilgili Co-NTA bağlanan fraksiyon; Ah1-2: Ara h 1 Co-NTA fraksiyonu.

Kalıp DNA olarak DHFR enzimini kodlayan pDHFR2 plazmidinin kullanıldığı *in vitro* protein ekspresyon denemesine ilişkin SDS-PAGE görüntüsü

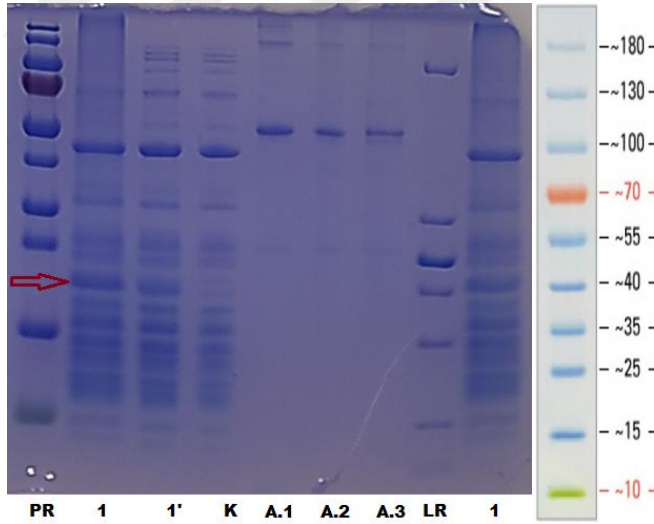
Şekilde görülmektedir. DHFR proteini yaklaşık 20 kDa olarak görülmektedir. Ancak, GFP kodlayan plazmid ile yapılan *in vitro* ekspresyon denemesi başarısız olmuştur. Bunun nedeni kalıp olarak kullanılan pET28a_Ah1 ve pET_GFP plazmidlerinin Genjet Plazmid Mini prep kiti kullanılarak izole edilmiş olmalarıdır. RNase A kalıntıları *in vitro* protein ekspresyon kitinde yer alan RNA bileşenlerini degrade ettiğinden takip eden çalışmalarda RNasin RNase inhibitörü kullanıldı.



Şekil 3.16 DHFR ve GFP kodlayan plazmidler ile yapılan reaksiyonun SDS-PAGE görüntüsü. DHFR için bir bant gözlenmesine karşın GFP'ye karşılık gelen bir bant tespit edilemedi. D: DHFR; G: GFP; K: Kalıp DNA içermeyen kontrol.



Şekil 3.17 DHFR ve GFP plazmid DNA ve lineer DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonların SDS PAGE görüntüsü. D: DHFR; G: GFP; K: Kontrol; D-2: lineer DNA DHFR; G-2: Lineer DNA GFP. DHFR için beklenen bölge ok ile gösterilmiştir.



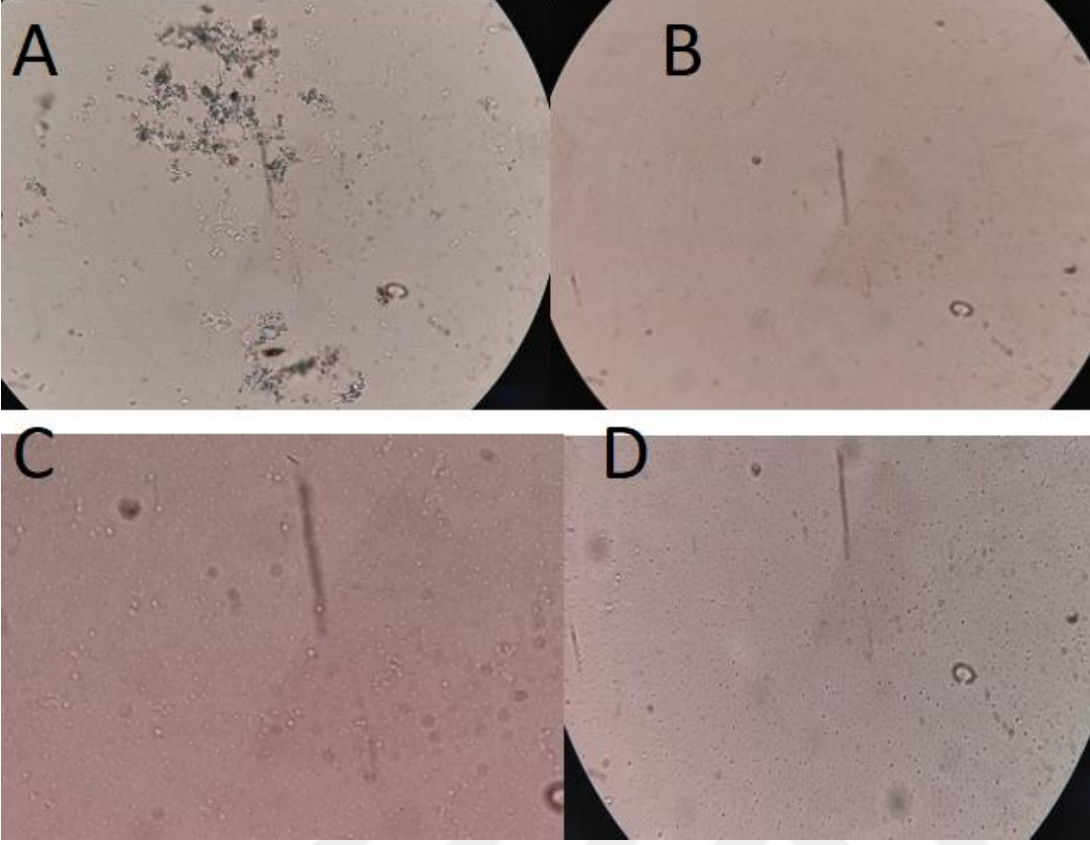
Şekil 3.18 *In vitro* protein ekspresyon kiti kullanılarak DHFR ve Ara h 1 proteinlerinin sentezine ilişkin SDS-PAGE analizi. DHFR ürünü ok ile işaretlenmiştir. Ara h 1 proteini yüksek saflıkta görülmektedir.

In vitro protein ekspresyon kitinin test edilmesi ve ekspresyon koşullarının optimize edilmesi için DHFR enzim aktivitesinden yararlanıldı. pDHFR2 vektörü *E. coli* DH5 α klonlama suşuna transforme edildi ve gece kültüründen plazmid

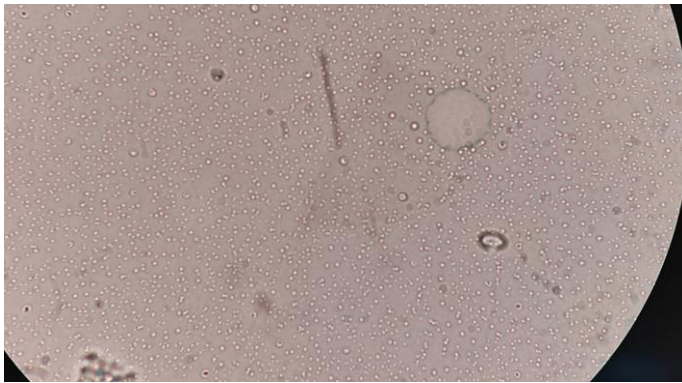
izolasyonu Genejet Plasmid MiniPrep kullanılarak yapıldı. Böylece RNasin ilavesinin kitten gelen RNase enziminin inhibisyonunun test edilmesi de hedeflendi. İzole edilen pDHFR2 vektöründen yaklaşık 150 ng alınarak 25 μ L *in vitro* protein ekspresyon reaksiyonu kuruldu ve 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. 30, 60 ve 120 dakika sonunda 5 μ L alınarak DHFR aktivitesinin kinetik ölçümü spektrofotometrede alındı. Kinetik okuma sonucunda elde edilen aktivite grafiği şekilde görülmektedir.

3.5. *In vitro* Emülsiyon Prosedürünün Optimize Edilmesi

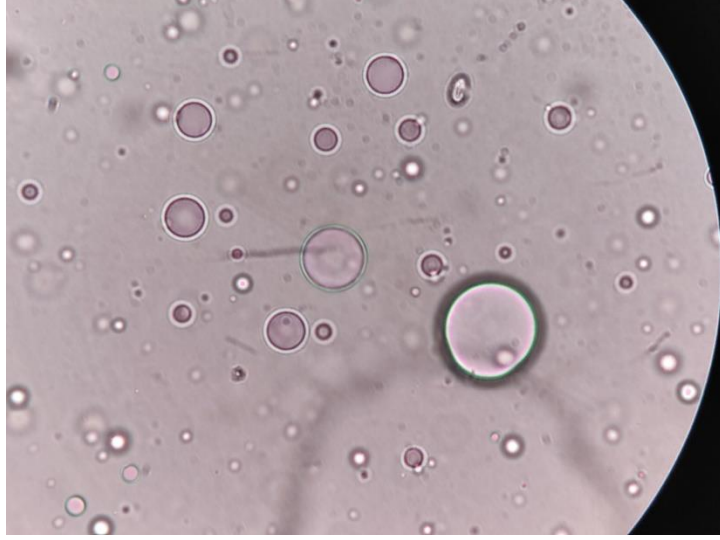
In vitro emülsiyon prosedürünün optimize edilmesi için ilk olarak emülsiyon hazırlama yöntemi test edildi. Steril Omni Tip kullanılarak homojenizatör ve manyetik karıştırma şeklindeki iki teknik test edildi. Her iki teknikte de 950 μ L yağ karışımı alındı ve porsiyonlar halinde üzerine 50 μ L su eklendi. Elde edilen emülsiyonlar ışık mikroskobu altında görüntülendi. Emülsiyonların ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 3.19-21’de verilmektedir. Manyetik karıştırma yoluyla elde edilen emülsiyonların boyut olarak ve daha uygun oldukları sonucuna ulaşıldı. Ayrıca 1000X büyütmede elde edilen görüntü w/o emülsiyonların polidisperse karakteri ve boyutları ile daha uyumludur (Hu et al., 2017). Manyetik karıştırma ile hazırlanan emülsiyonların gece boyu +4 °C’de stabil oldukları, santrifüj ile çöktürme işleminin ardından emülsiyonların parçalanmadıkları, mineral yağı ile yeniden homojen resüspansiyonların elde edilebildiği doğrulandı (Şekil 3.22). Böylece, manyetik karıştırma ile elde edilen w/o emülsiyonlarının protein ve DNA enkapsülasyon ve geri kazanımı, emülsiyon PCR ve *E. coli* e-PCR gibi performans parametrelerinin test edilmesi adımına geçildi.



Şekil 3.19 Omni Tip kullanılarak yapılan homojenizasyon işlemi sonucu elde edilen emülsiyonların ışık mikroskobu altında görüntüsü. A, B, C ve D sırasıyla 5, 4, 3, ve 2. kademe hızda elde edilen emülsiyonlar.



Şekil 3.20 Manyetik karıştırıcıda elde edilen w/o emülsiyonlarının ışık mikroskobu altında 100X büyütme ile alınan görüntüsü.



Şekil 3.21 Manyetik karıştırıcıda 1500 rpm hızında elde edilen emülsiyonların 1000X ışık mikroskop görüntüsü.



Şekil 3.22 Manyetik karıştırma ile hazırlanan emülsiyonların stabilitesi.

In vitro emülsiyonların riboswitch ve enzim seleksiyonunda kullanılabilmeleri için DNA ve protein geri kazanımının, emülsiyon içinde enzimatik reaksiyonların başarılı bir şekilde gerçekleştirilebildiğinin kanıtı olarak emülsiyon PCR reaksiyonunun test edilmesi ve doğrulanması gerekmektedir. İlk olarak HRP enziminin emülsiyon içinde hapsedilmesi ve geri kazanımı denemeleri yapıldı. Bunun için Tween-20, Triton X-100 ve Tween-20+Triton X-100 içeren üç farklı yağ karışımı içine HRP enzimi enkapsüle edildi. Ardından ekstraksiyon

prosedürüne geçildi ve elde edilen protein ekstraktı aktivite analizinde kullanıldı. HRP enziminin aktivitesinin tayini için 100 mM pH:5.0 fosfat-sitrat tamponu hazırlandı. Reaksiyon tamponunun içinde final derişimi 0,1 mg/mL olacak şekilde TMB ve 1 μ M H₂O₂ olacak şekilde substrat bileşenleri ilave edildi. 200 μ L substrat çözelti üzerine 5 μ L protein ekstraktı veya pozitif kontrol olarak 500.000 kat seyreltilmiş 1 mg/mL HRP çözeltisinden 5 μ L ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından 2 M sülfürik asit ilave edildi ve 450 nm’de absorbans okuması alındı. *In vitro* emülsiyonlardan HRP geri kazanımına ilişkin veriler Tablo 3.1’de verilmektedir. Buna göre, Tween-20 ve Triton X-100 içeren yağ karışımının en iyi performansı gösterdiği görülmektedir.

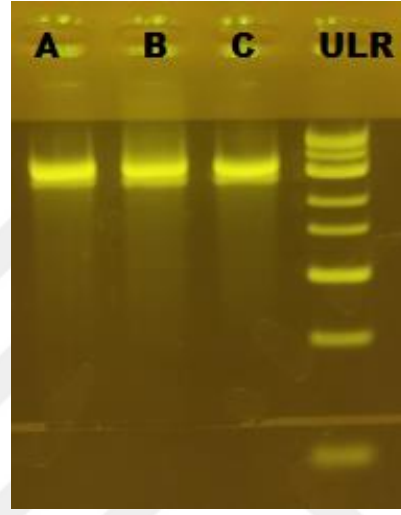
Tablo 3.1 *In vitro* emülsiyonlardan HRP geri kazanım denemesi. Değerler HRP renk reaksiyonunun sülfürik asit ile durdurulmasının ardından 450 nm’de absorbans değerleridir. Mix-1: Tween-20; Mix-2: Triton X-100; Mix-3: Tween-20+Triton X-100.

	Kör	Mix-1	Mix-2	Mix-3	Pozitif	Boş
A	0,056	0,901	0,367	1,955	2,936	0,052
B	0,051	0,958	0,353	1,792	2,669	0,052
C	0,05	0,921	0,359	1,864	2,647	0,053

In vitro emülsiyonlardan DNA geri kazanımının test edilmesi için her bir yağ karışımına (950 μ L) 1 μ g PCR ürünü DNA ilave edildikten sonra emülsifiye edildi. Emülsiyonların dietil eter ile ekstraksiyonu sonrası elde edilen sulu faz M&N Gel and PCR Clean Up kit yardımı ile saflaştırıldı. DNA örnekleri agaroz jelde boyut ve mikropilaka okuyucuda derişim ve saflık bakımından analiz edildi. Tablo 3.2’de verilen derişim değerleri ile Şekil 3.23’te verilen agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre Tween-20 içeren yağ karışımı ile Tween-20 ve Triton X-100 içeren yağ karışımlarının benzer performans gösterdikleri görülmektedir. C olarak ifade edilen örnekleri emülsifiye edilmemiş kontrol DNA olarak ekstraksiyon prosedürüne tabi tutuldu.

Tablo 3.2 DNA geri kazanımına ilişkin elde edilen derişim verileri. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol geri kazanım.

Örnek	A	B	C
Derişim (ng/ μ L)	45	58,5	69,5

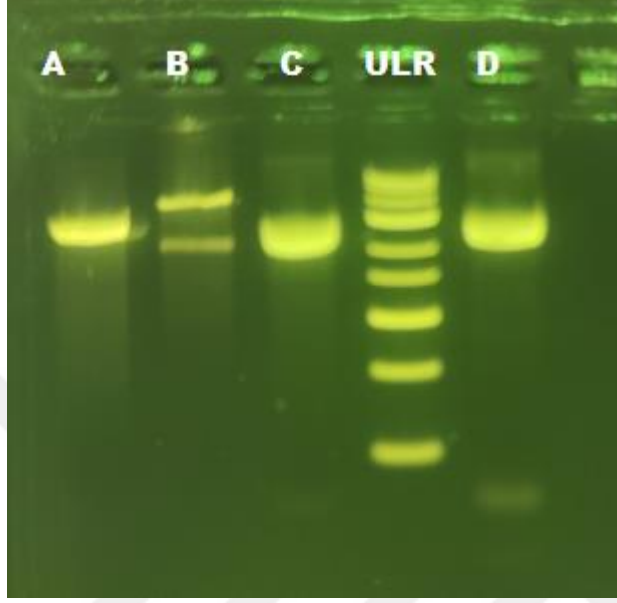


Şekil 3.23 DNA geri kazanımına ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol geri kazanım.

In vitro emülsiyonlarda enzimatik reaksiyon analizi için emülsiyon PCR testi yapıldı. Hazırlanan PCR karışımları yağ karışımı içinde emülsifiye edildi ve PCR reaksiyonu *in vitro* emülsiyonlar içinde yürüdü. Elde Ekstraksiyon prosedürünün ardından DNA derişimi Tablo 3.3'te ve DNA'nın boyut analizi Şekil 3.24'te görülmektedir. Her ne kadar kontrol grubuna kıyasla DNA verimi düşük olsa da, iki yağ karışımında emülsifiye edilen reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezindeki görüntülerine göre kıyaslandığında Triton X-100 içeren yağ karışımının reaksiyonu inhibe ettiği ve non-spesifik ürün oluşumuna neden olduğu görüldü. Bu nedenle devam eden denemelerde sadece Tween-20 içeren yağ karışımı kullanıldı.

Tablo 3.3 Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA derişimleri. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol (klasik) PCR.

Örnek	A	B	C
Derişim (ng/μL)	35	19	81

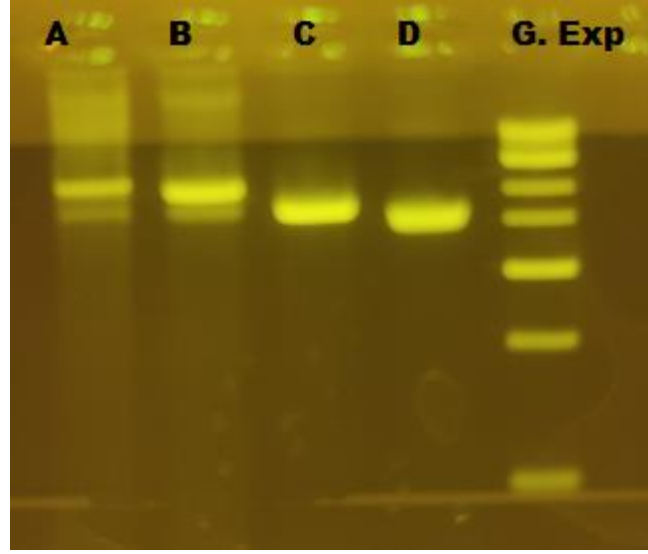


Şekil 3.24 Emülsiyon PCR sonucu ekstrakte edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol (klasik) PCR.

Emülsiyon PCR denemesine benzer şekilde kalıp DNA örneği olarak *E. coli* hücrelerinin emülsifiye edildiği *E. coli* emülsiyon PCR denemesi yapıldı. *E. coli* emülsiyon PCR denemesi ile bir numaralı yağ karışımının (Tween-20 içeren) en iyi sonucu verdiği sonucuna ulaşıldı (Tablo 3.4 ve Şekil 3.25).

Tablo 3.4 *E. coli* Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA derişimleri. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol (klasik) PCR.

Örnek	A	B	C
Derişim (ng/μL)	85	70	115

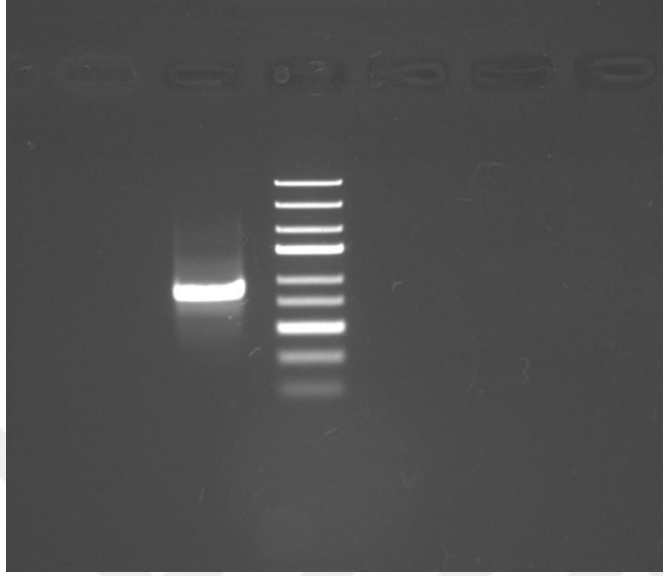


Şekil 3.25 *E. coli* Emülsiyon PCR sonucu elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. A: Tween-20; B: Tween-20 +Triton X-100; C: Kontrol (klasik) PCR.

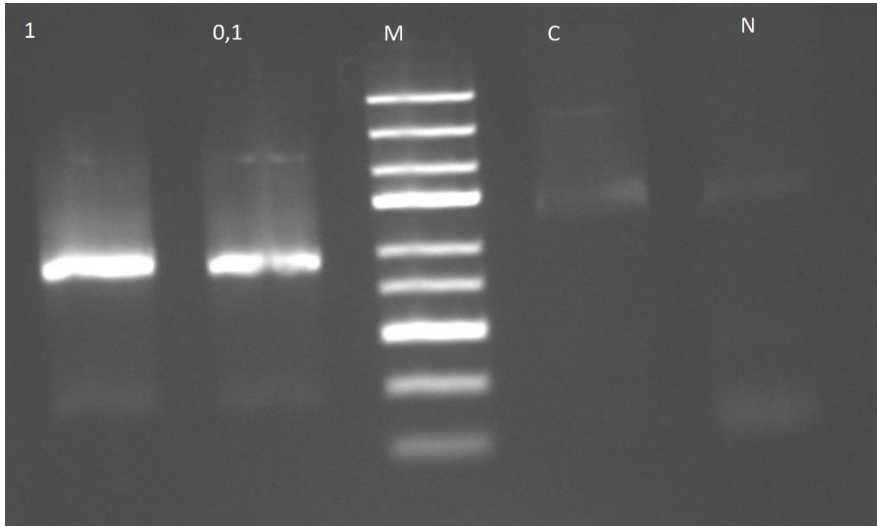
3.6. *In vitro* kompartmanlarda Riboswitch seleksiyonu

In vitro emülsiyonlarda kullanılmak üzere BG-modifiye RSTPP kütüphanesi tek bant olarak elde edildi ve kit yardımıyla izole edildi. Elde edilen kütüphanenin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil. 3.26’da görülmektedir. *In vitro* protein ekspresyon karışımı elde edilen RSTPP kütüphanesi ile hazırlandı. TPP derişimine yanıt olarak RSTPP geri kazanımının derişim bağımlı testi gerçekleştirildi. 0,1 mM ve 1 mM TPP varlığında reaksiyon karışımı hazırlandı ve emülsifiye edildi. Kontrol olarak 1 mM tiamin içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. TPP içeren reaksiyon karışımı ve tiamin içeren reaksiyon karışımı ürünü ekstraktlar sırasıyla anti-DYKDDD manyetik boncuk ve Ni-NTA manyetik boncuk ile yakalandı. Yıkama adımlarının ardından elde edilen eluat PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.27’de verilmektedir. Buna göre TPP içeren reaksiyonlarda riboswitchin raportör gen trasnlasyonunu aktive ettiği, buna karşın tiamin içeren reaksiyon karışımında riboswitch aktivasyonunun gerçekleşmediği yorumu yapılabilir. N olarak gösterilen kuyucukta PCR NTC testi yapıldı ve non-spesifik bir amplifikasyonun gerçekleşmediği doğrulandı. Böylece 2 mM TPP derişiminden başlayarak kademeli bir şekilde TPP derişiminin düşürüldüğü 4 turluk *in vitro* seleksiyonun ardından

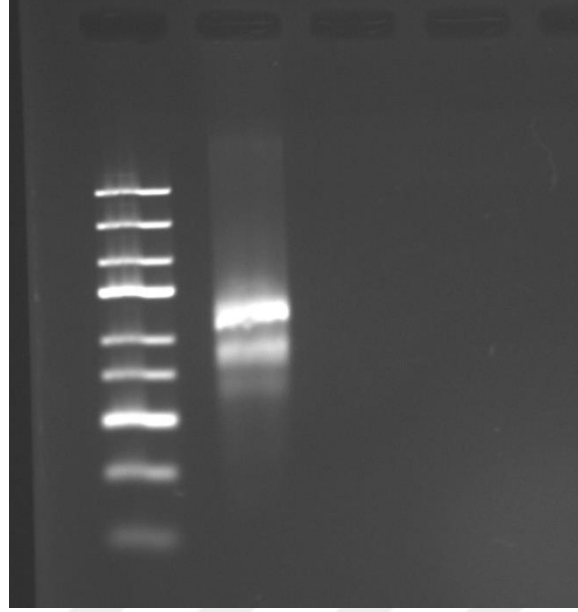
final RSTPP kütüphanesinin PCR amplifikasyonu yapıldı. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.28’de görülmektedir. Final kütüphane pJET2.1/blunt vektörüne klonlandı ve Sanger DNA dizi analizi yapıldı.



Şekil 3.26 RSTPP Seleksiyon: Lib Fusion. In vitro kompartmanlarda riboswitch seleksiyonunda kullanılan final kütüphanenin %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 3.27 RSTPP Seleksiyon turlarında DNA geri kazanımına ilişkin %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1: 1 mM TPP ve 0,1: 0,1 mM TPP içeren emülsiyonlardan geri kazanılmış DNA’nın PCR amplifikasyon ürünü. C: TPP içermeyen koşullarda *in vitro* emülsiyonlardan DNA geri kazanımı, spesifik bir amplifikasyon olmadığı görülmektedir. N: manyetik boncuklara non-spesifik bağlanan DNA’nın PCR amplifikasyonunun test edilmesi sonucunda non-spesifik amplifikasyon olmadığı görülmektedir.



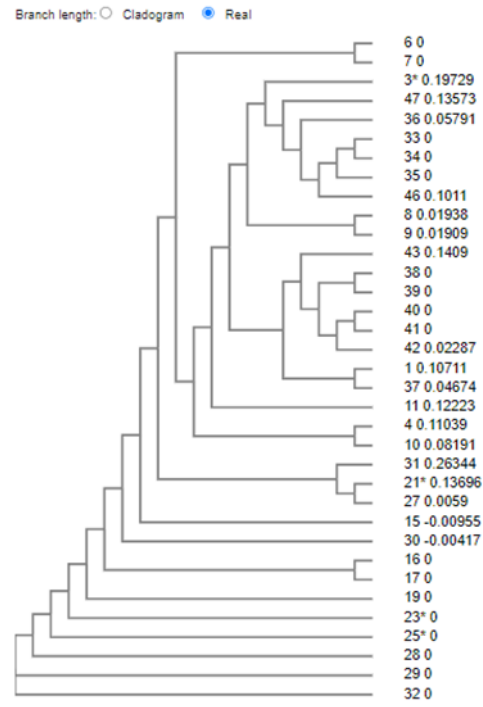
Şekil 3.28 RSTPP kütüphanesinin seleksiyon sonrası geri kazanımı. Her bir seleksiyon turunda Riboswitch kütüphanesinin *in vitro* emülsiyonlardan geri kazanımı sonrası yapılan PCR ampifikasyon ürününün %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

3.7. Riboswitch Final Kütüphanesinin Sanger DNA Dizileme Analizi

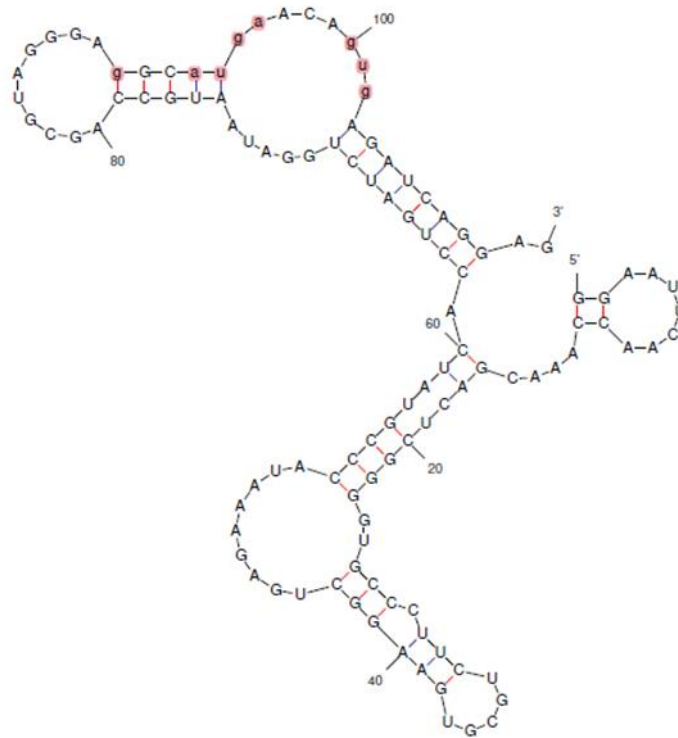
pJET2.1/blunt vektörüne klonlanan final RSTPP kütüphanesinden alınan örnekler Sanger DNA dizileme analizi yapıldı. DNA dizileme analizi sonucu elde edilen diziler Şekil 3.31’de görülmektedir. Filogenetik analizleri gösteren Şekil 3.30’da 23 numaralı dizinin en çok zenginleşen dizi olduğu görülmektedir. 23 Numaralı dizinin mfold programı ile yapılan sekonder yapı analizi sonucu Şekil 3.31’de görülmektedir.

6	CGCTTCAAC---AGTAGAUCAGGACGTCT-----	26
7	CGCTTCAAC---AGTAGAUCAGGACGTCT-----	26
3*	AGCGGCCACA--GTCAGAUCAGGAGACC-----	26
4	CGCGTCGACA--GCAAGAUCAGGACCTA-----	26
10	GGCGTGGACA--GAAAGAUCAGGAACTC-----	26
8	CGCTAGAACA--GTTAGAUCAGGATGCT-----	26
9	CGCAAGAACA--GTTAGAUCAGGATGCT-----	26
47	GGCTCATACA--ACTAGAUCAGGAGAGTCGTTTCAG	33
43	GGCTTCAACA--ACAAGAUCAGGAATGAGT-----	28
16	GGCGTGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
17	GGCGTGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
19	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
23*	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
25*	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
28	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
29	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGG-----	28
30	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGT-----	26
32	GGCATGAACAG-TGGAGAUCAGGACGTGGA-----	29
15	GGCATGAACA--TGGAGAUCAGGACG-----	24
11	TGCATGAACA--GCGAGAUCAGGAACGT-----	26
1	AGCTTGTACA--AGTAGAUCAGGAGCGC-----	26
38	AGCTTGAACA--GCAAGAUCAGGAGCGGGT-----	28
39	AGCTTGAACA--GCAAGAUCAGGAGCGGGT-----	28
40	AGCTTGAACA--GCTAGAUCAGGAGTTGGT-----	28
41	AGCTTGAACA--GCTAGAUCAGGAGTTGGT-----	28
42	AGCCTGAACA--GCTAGAUCAGGAGTTGGT-----	28
36	GGCTTCAACACACCCAGAUCAGGAGAATT-----	29
33	GGCTTCAACACACCAGAUCAGGACGAATT-----	29
34	GGCTTCAACACACCAGAUCAGGACGAATT-----	29
35	GGCTTCAACACACCAGAUCAGGACGAATT-----	29
46	GGCTTCAACAAAATAGAUCAGGATGAGTCGTTTCAG	35
31	GGCATGAACAGTGGCGTGGAAACCA-----	24
37	AGCTTGAACAGCAGCAGAUCAGGAGGGTG-----	29
21*	GGCATGAGACATGGCAGAUCAGGAGTGG-----	28
27	GGCATGAACAGTGGCAGAUCAGGAGTGG-----	28

Şekil 3.29 Sanger DNA dizileme analizi sonucu elde edilen dizilerin Clustal w ile analiz edilen dizi benzerlikleri.



Şekil 3.30 Clustal w programı ile belirlenen filogenetik benzerlik.



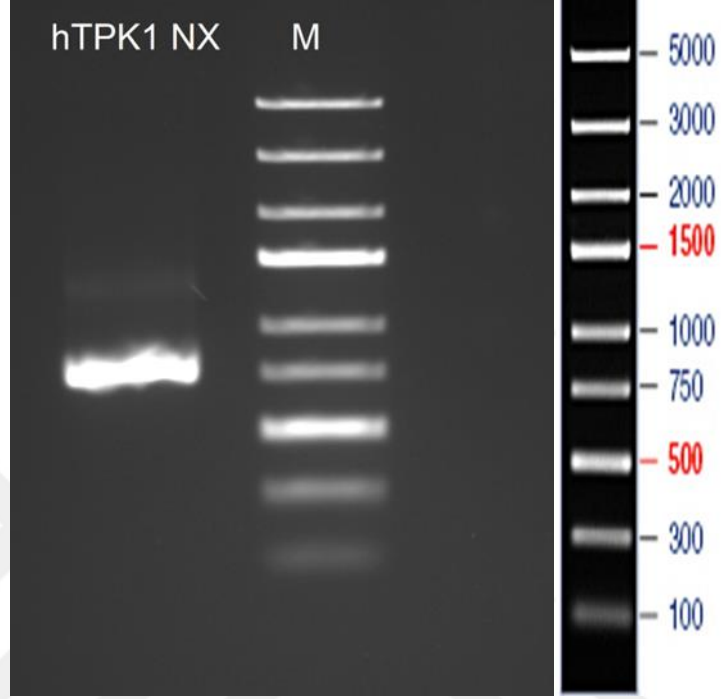
Şekil 3.31 En iyi zenginleşen dizinin mfold programı ile belirlenen sekonder yapısı.

3.8. Tiamin Pirofosfokinaz Enziminin *in vitro* Kompartmanlarda Seleksiyonu

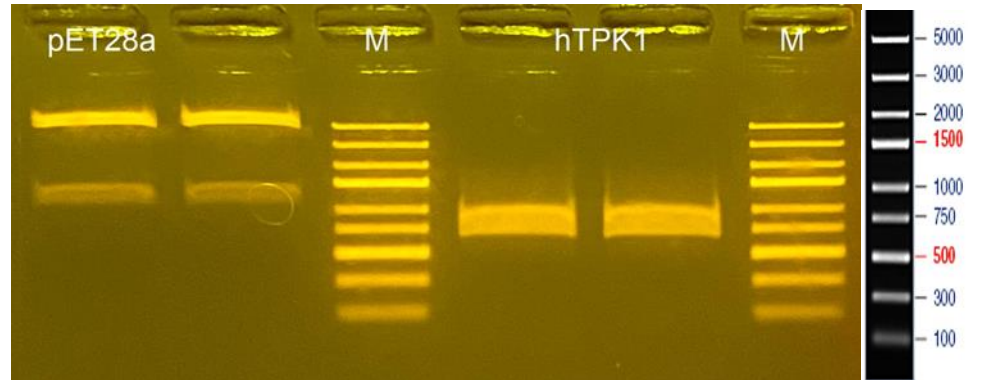
hTPK1 enzimini kodlayan genin klonlanması

Tiamin pirofosfokinaz enzimini (hTPK1) kodlayan gen dizisinin sentezi Sentebiolab (Ankara) tarafından yapıldı. hTPK1_Lib_NNK kütüphanesi ELLA Biotech (Fürstfeldbruck, Almanya) tarafından sentezlendi. İlk olarak hTPK1 enziminin rekombinant üretimi yapıldı. hTPK1 kodlayan gen dizisinin hTPK1_*NdeI* ve hTPK1_*XhoI* primerleri ile gradient PCR amplifikasyonu yapıldı. Gradient PCR amplifikasyonunda 62, 66 ve 70 °C sıcaklık koşulları denendi. En temiz amplifikasyon bantının 66 °C’de gözlenmesinin ardından gen dizisinin PCR amplifikasyonu yapıldı ve M&N PCR Clean-Up kiti kullanılarak DNA saf bir şekilde elde edildi. Elde edilen DNA’nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.32’de görülmektedir. Elde edilen DNA bandının yaklaşık olarak 750 baz çiftinin biraz üzerinde olduğu görülmektedir. Bu durum PCR ürününün beklenen uzunluğu (yaklaşık 800 bp) ile uyumludur. hTPK1 kodlayan gen dizisinin pET-28a vektörüne klonlanması için restriksiyon enzimleri (*NdeI* ve *XhoI*) ile kesim reaksiyonu kuruldu. 3 Saat inkübasyonun ardından kesimin gerçekleştiği agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı (Şekil 3.33). Şekil 3.33’te görüldüğü üzere pET-28a kesimi sonucu yaklaşık 1400 bp’e karşılık gelen ikinci bir bant görülmektedir. pET-28 a vektörüne daha önceden *NdeI* ve *XhoI* kesim bölgelerinden başka bir gen klonlandığından, ortaya çıkan bu bant kesimin gerçekleştiğini gösterir. Her iki enzimin de başarılı bir şekilde çalıştığının kanıtı olarak elde edilen jel görüntüsü sonrası kesim ürünleri M&N Gel and PCR Clean Up kit yardımıyla jelden izole edildi. İzole edilen DNA’nın saflık ve derişimi TAKE3 aparatı kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. DNA mol sayısı dikkate alınarak ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyonun kontrolü için “concatamer” oluşumuna dayalı test reaksiyonu kuruldu. Test reaksiyonunda plazmid dahil edilmedi ve bunun yerine gen fragmentinin aşırısı reaksiyona dahil edildi. Böylece kesim reaksiyonunun ve T4 DNA Ligaz enziminin katalizlediği ligasyon reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin kanıtı niteliğinde uç uca eklenmiş fragmentler agaroz jel

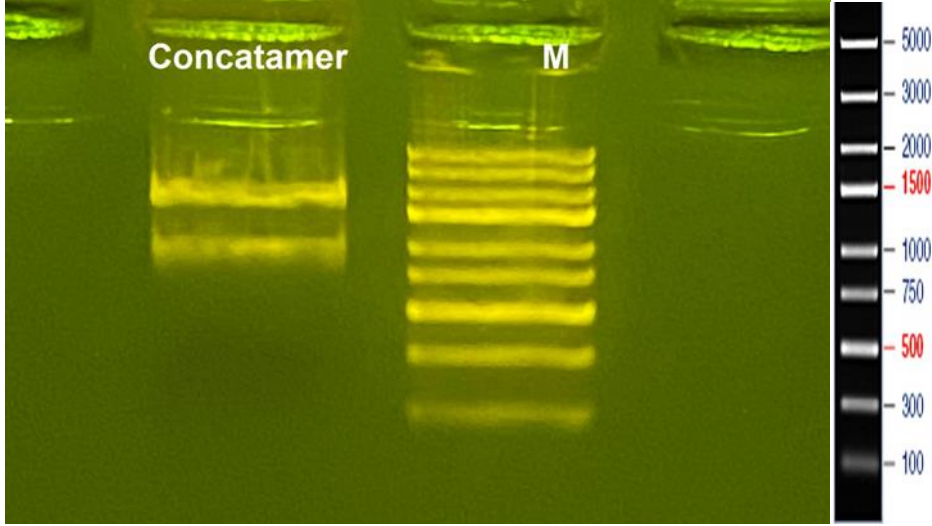
elektroforezi ile görüntülendi. Concatamer oluşumuna ilişkin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.34'te görülmektedir.



Şekil 2.32: hTPK1 kodlayan genin PCR amplifikasyon ürünü



Şekil 3.33 pET-28a vektörünün ve hTPK1 kodlayan genin restriksiyon enzim kesimi

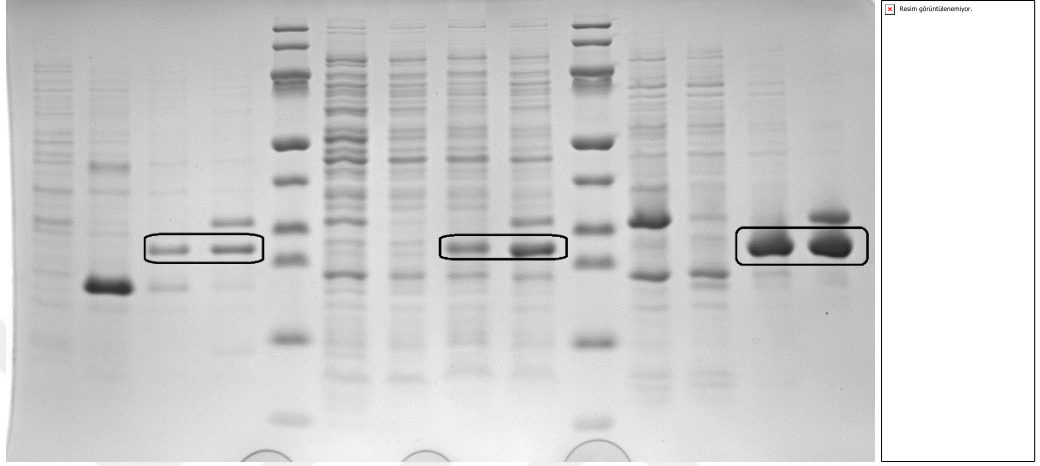


Şekil 3.34 T4 DNA ligaz enziminin katalizlediği ligasyon reaksiyonunun concatamer oluşumu üzerinden agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.

hTPK1 enziminin rekombinant üretimi

hTPK1 kodlayan gen dizisinin pET-28a vektörüne klonlanmasının ardından *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Koloni PCR ile transformant doğrulaması yapıldıktan sonra GeneJet Plasmid Isolation Mini Prep kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmid DNA kimyasal kompetent *E. coli* T7 Express Iq RP ekspresyon suşuna transforme edildi ve üç adet koloni seçilerek test ekspresyonu yapıldı. Gece kültüründen taze LB ortamına %2'lik inokülasyonunun ardından hücrelerin OD₆₀₀:0,5 yoğunluğuna erişmeleri için 37 °C'de inkübe edildi. Protein ekspresyonunun indüksiyonu için sıcaklık 30 °C'ye düşürüldü ve final derişimi 0,5 mM olacak şekilde IPTG ilave edildi. Kontrol grubu olarak hücrelerden birine IPTG ilave edilmedi. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler santrifürlenerek çöktürüldü ve hücre pelleti homojenizasyon tamponu ile resüspanse edildi. Ultrasonikasyonun ardından 15.000 rpm'de santrifüjleme ile çözünür protein fraksiyonu hücre pelletinden ayrıldı. Çözünür protein fraksiyonundan 200 μ L alınarak daha önceden üç kez homojenizasyon tamponu ile yıkanmış 10 μ L Ni-NTA manyetik boncuklar ile inkübe edildi. 10 Dakikalık inkübasyonun ardından manyetik boncuklar üç kez yıkandı ve elusyon yapılmadan manyetik boncuklar doğrudan Tricine-SDS-PAGE analizinde kullanıldı. Çözünür protein fraksiyonları, hücre pelleti ve manyetik ayırma örnekleri %12'lik Tricine-SDS-PAGE kuyucuklarına yüklendi. Protein

ekspresyonuna ilişkin görüntü Şekil 3.35'te verilmektedir. hTPK1 enziminin *E. coli*'de rekombinant üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Böylece hTPK1 kütüphanesinin *in vitro* seleksiyonunda enzim varyantlarının başarılı bir şekilde ifade edilebileceği anlaşıldı.

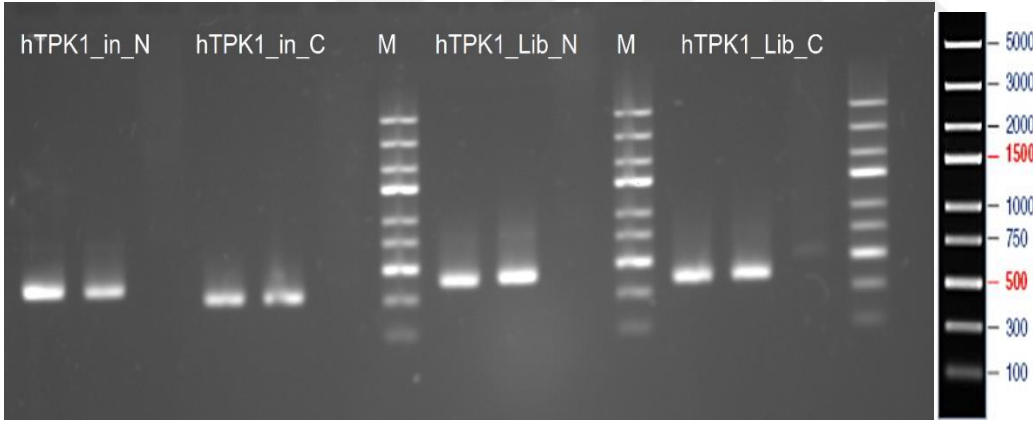


Şekil 3.35: hTPK1 proteininin test ekspresyonuna ilişkin %12 Tricine-SDS-PAGE analizi. Hücre pelleti, çözünür fraksiyon ve manyetik ayırma örneklerinde hTPK1 enzime karşılık gelen yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığındaki protein bandı kutucuk içine alındı.

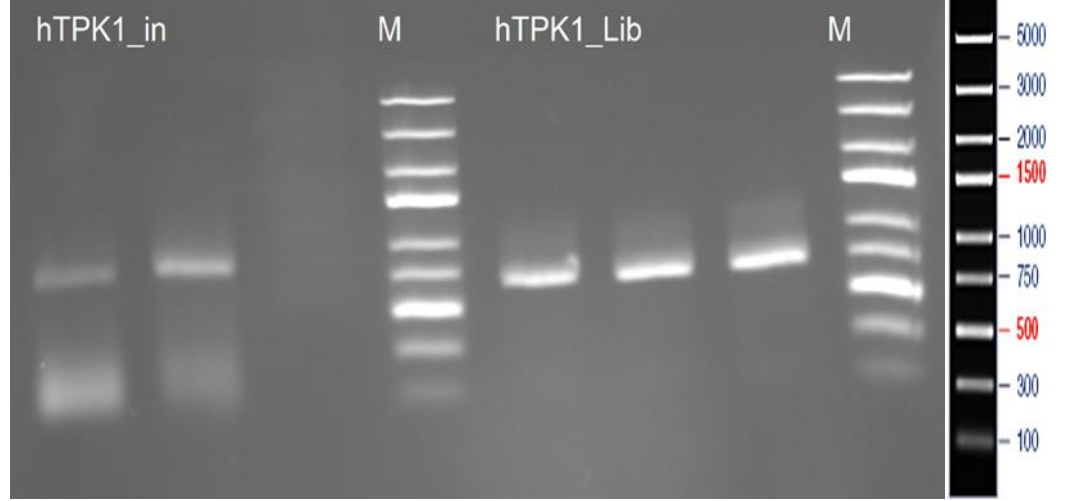
hTPK1 enzim kütüphanesi ve inaktif enzimi kodlayan gen dizisinin eldesi

hTPK1 enzim kütüphanesinin seleksiyonu için hTPK1 enzim kütüphanesinin eldesi “overlap extension PCR (OE-PCR)” tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Enzimin 96QDHTD100 bölgesine karşılık gelen NNK kütüphanesi temin edildi. hTPK1_Lib_NNK olarak isimlendirilen kütüphane primer olarak kullanıldı ve enzimin C-terminal bölgesini kodlayan fragment hTPK1_Lib_NNK ve hTPK1_Rev primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Gradient PCR (62, 66 ve 70 °C) ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.36'da verilmektedir. Buna göre yaklaşık 450 bp uzunluğundaki PCR ürünü 62 ve 66 °C'de temiz bant vermiştir. Benzer şekilde N-terminal kodlayan fragmentin PCR amplifikasyonu hTPK1_Fw ve hTPK1_Lib_Rev primerleri kullanılarak amplifiye edildi. İnaktif hTPK1 enziminin nokta mutasyonu için tasarlanan hTPK1_in_fw ve hTPK1_in_Rv primerleri de sırasıyla hTPK1_Rv ve hTPK1_Fw primerleri ile eşleştirilerek inaktif hTPK1 enziminin C ve N-terminal bölgelerini kodlayan fragmentlerin gradient

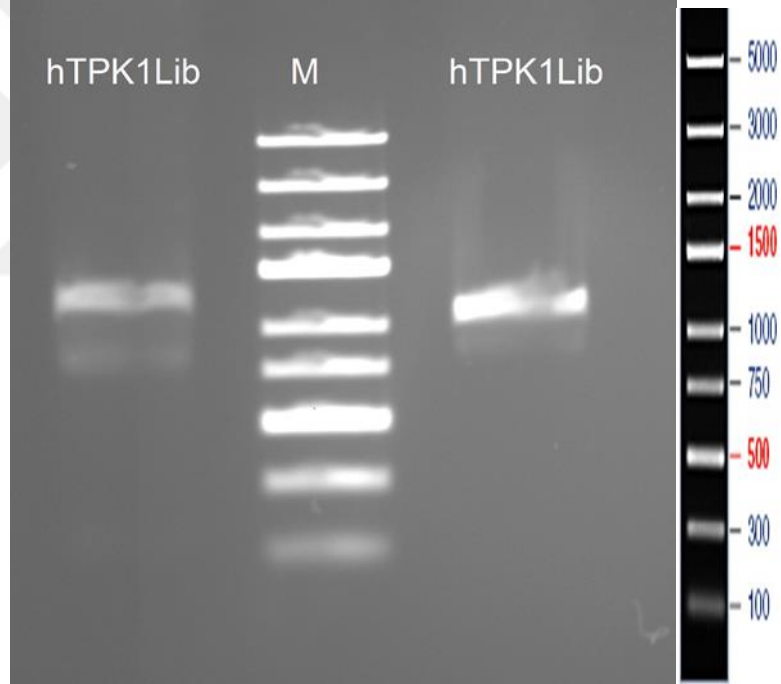
PCR amplifikasyonu yapıldı. Şekil 3.38’de görüldüğü üzere N ve C terminal fragmentleri temiz bir şekilde elde edildi. İnaktif enzim ve enzim kütüphanesinin N ve C-terminal bölgelerini kodlayan PCR fragmentlerinin eldesinin ardından fragmentlerin füzyonu için OE-PCR reaksiyonu kuruldu. 62, 66 ve 70 °C’de gerçekleştirilen gradient PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.37’de verilmiştir. Böylece inaktif enzimi kodlayan DNA fragmentlerinin 62 ve 66 °C’de başarılı bir şekilde tek bant verdiği görüldü. hTPK1 enzim kütüphanesini kodlayan fragmentlerin füzyonunda ise her üç sıcaklıkta temiz bir füzyon bandı elde edildi. hTPK1 kodlayan enzim kütüphanesinin kodlamayan 5’-T7 promotor ve 3’-T7 terminatör dizilerinin de son bir PCR adımında ilave edilmesi ile final kütüphane elde edildi. 5’SH grubu üzerinden BG-maleimid modifiye primer ile yapılan bu final reaksiyonunun ürünü SNAP-Display turlarında kullanıldı. SNAP-display turlarında kullanılan kütüphanenin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.38’de verilmektedir.



Şekil 3.36: İnaktif enzim ve hTPK1 kütüphane kodlayan N-terminal ve C-terminal fragmentlerin PCR amplifikasyon ürünleri.



Şekil 3.37: İnaktif enzim ve hTPK1 kütüphane kodlayan fragmentlerin füzyon PCR ürünleri.



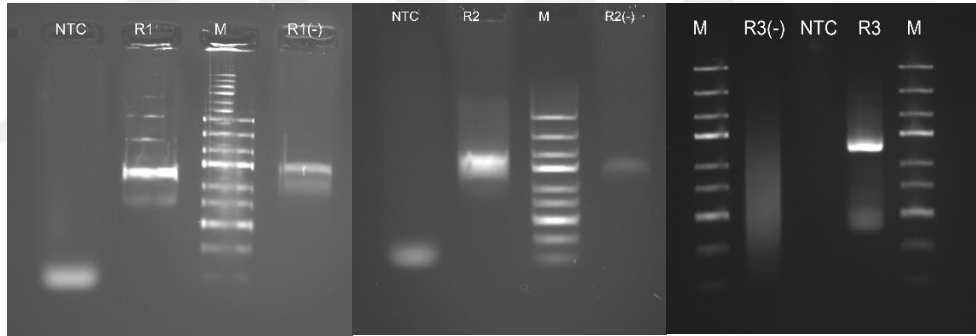
Şekil 3.38: Kodlamayan 5' ve 3' bölgelerin eklenmesi ile elde edilen final hTPK1 varyant kütüphanesi.

hTPK1 kodlayan kütüphanenin *in vitro* seleksiyonu

hTPK1 enzim kütüphanesinin BG-modifiye olarak elde edilmesinin ardından SNAP-Display tekniğine dayalı *in vitro* seleksiyon adımına geçildi. Riboswitch seleksiyonuna benzer şekilde ilerleyen enzim seleksiyon turlarında BG-modifiye enzim kodlayan gen kütüphanesi kullanıldı. Böylece başarılı enzim varyantlarını kodlayan gen dizileri SNAP enzimi ile modifiye edildi ve her bir seleksiyon turunun finalinde anti-FLAG tag manyetik boncukları ile izole edildi. W/O emülsiyonlarının kapasitesi göz önünde bulundurulduğundan her bir seleksiyon turunda 300 ng enzim kodlayan gen kütüphanesi ile seleksiyona başlandı. 300 ng DNA (0,5 pmol), her bir seleksiyon turuna yaklaşık olarak 10^{11} adet gen varyantını temsil etmektedir. 1 mL içinde W/O emülsiyon sayısının yaklaşık 10^{12} - 10^{13} mertebesinde olduğu göz önünde bulundurulduğunda, emülsiyon başına en fazla bir adet varyant kodlayan gen dizisi kompartmanlanmış olduğu sonucuna varıldı. Her bir seleksiyon turunda kontrol olarak inaktif enzim varyantını kodlayan gen dizisi seleksiyona dahil edildi. Enzim kütüphanesi ile paralel yürüyen bu seleksiyon negatif seleksiyon olarak adlandırıldı.

0,5 pmol değerine karşılık gelen 300 ng enzim kodlayan gen kütüphanesi kullanılarak *in vitro* protein ekspresyon karışımı oluşturuldu ve her bir seleksiyon turunda enzimin substratı olarak 4 mM tiamin reaksiyon karışımına dahil edildi. Tablo 2.15'te belirtildiği şekilde buz üzerinde hazırlanan reaksiyon karışımı 950 μ L yağ karışımının üzerine 10 μ L porsiyonlar halinde 1 dakika aralıklı olarak ilave edildi ve 1500 rpm hızında sürekli olarak karıştırıldı. *In vitro* emülsiyonlar 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha önce belirtildiği şekilde dietil eter ile ekstraksiyon yapıldı. Anti-DYKDDD manyetik boncuklar ile yarım saat inkübasyonun ardından üç kez yıkama yapıldı ve ardından Glisin-HCl tamponu ile elüsyon yapıldı. Tris-HCl tamponu ile nötralize edilen eluat Ni-NTA manyetik boncuklar ile bağlanmak üzere yarım saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üç kez yıkama yapıldı ve 500 mM imidazol içeren elüsyon tamponu ile DNA elue edildi. Elue edilen DNA bir sonraki enzim seleksiyon turunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere BG modifiye hTPK1_Fw-SH primeri ile amplifiye edildi.

Elde edilen BG-modifiye DNA bir sonraki seleksiyon turunda kalıp olarak kullanıldı. Enzim varyantı kodlayan gen kütüphanesi ve inaktif enzim kodlayan gen dizisinin kullanıldığı iki ayrı seleksiyon paralel olarak yürütüldü. Böylece enzim varyant kütüphanesinin içinde başarılı varyantların turlar ilerledikçe zenginleşmesi hedeflendi. Buna karşın inaktif enzim kodlayan gen dizisi ile yapılan seleksiyon turları boyunca inaktif enzimi kodlayan gen dizisinde zenginleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Şekil 3.39’da turlar ilerledikçe enzim varyant kütüphanesini kodlayan gen dizisinde zenginleşmenin gerçekleştiği görülmektedir. Buna karşın inaktif enzimi kodlayan gen dizisi ile yapılan seleksiyon turlarında, özellikle 3. seleksiyon turunun ardından inaktif enzim kodlayan dizinin PCR amplifikasyonu sonucu ürün alınamadı. Bu sonuç, riboswitch temelli *in vitro* enzim seleksiyon stratejisinin başarılı varyantların zenginleşmesini sağladığını göstermektedir.



Şekil 3.39: *In vitro* seleksiyon turları boyunca elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri. NTC: Non-template control; R1, R2 ve R3 hTPK1 varyant kütüphanesi kullanılarak sırasıyla 1, 2 ve 3. Seleksiyon turunda elde edilen PCR ürünü; M:Marker; R1(-), R2(-) ve R3(-) ise inaktif enzim kodlayan gen kullanılarak sırasıyla 1,2 ve 3. Seleksiyon turlarında elde edilen PCR ürünleri.

4. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında yeni enzim katalizlerinin keşfedilmesinde kullanılabilir riboswitch temelli tarama platformu geliştirildi. Elde edilen nihai riboswitch dizilerinin dihidrofolat redüktaz enzimi ile füzyonu ve enzimatik tarama yöntemi ile riboswitchlerin ileri düzeyde *in vitro* karakterizasyonu çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir. Böylece geliştirilen riboswitch dizilerinin farklı TPP derişimine yanıtları tayin edilebilecektir. Bunun yanında, DNA dizi analizi sonuçlarının riboswitch-eşlenmiş tarama platformunun başarısının değerlendirilmesine ve yeni riboswitchlerin tasarımına katkı yapabileceği öngörülmektedir. Geliştirilmiş olan tarama platformu *in vitro* gösterim tekniğine dayalı yeni bir yöntemdir. Bu bakımdan, geliştirilmiş olan yöntem terapötik moleküllerin biyosentezi, doğal olmayan amino asit ve nükleotidlerin biyosentezi, toksik moleküllerin giderimi, enzim seçimliliğinin artırılması ve enzim aktivitesinin iyileştirilmesi vb. alanlarda kullanım potansiyeli sunmaktadır. Küçük organik moleküllere seçici yeni DNA/RNA aptamerlerinin geliştirilmesi, yeni riboswitchlerin geliştirilmesi, *in vitro* tarama platformunda raportör enzim/protein olarak kullanılabilir yeni enzim ve proteinlerin geliştirilmesi gibi çalışmalar mevcut tez çıktılarının yaygın etkisini artırmaya katkı sunabilir. Bu tez çalışması kapsamında tanıtılmış olan *in vitro* tarama platformu hem yeni riboswitchlerin hem de yeni enzimlerin geliştirilmesi için kullanılabilir esnek bir tarama platformudur.

5. KAYNAKLAR

- Abil, Z., Ellefson, J. W., Gollihar, J. D., Watkins, E., & Ellington, A. D.**, 2017, Compartmentalized partnered replication for the directed evolution of genetic parts and circuits. *Nature Protocols*, 12(12), 2493–2512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.119>
- Arnold, F. H.**, 2015, The nature of chemical innovation: New enzymes by evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 48(4), 404–410. <https://doi.org/10.1017/S003358351500013X>
- Banka, S., de Goede, C., Yue, W. W., Morris, A. A. M., von Bremen, B., Chandler, K. E., Feichtinger, R. G., Hart, C., Khan, N., Lunzer, V., Mataković, L., Marquardt, T., Makowski, C., Prokisch, H., Debus, O., Nosaka, K., Sonwalkar, H., Zimmermann, F. A., Sperl, W., & Mayr, J. A.**, 2014, Expanding the clinical and molecular spectrum of thiamine pyrophosphokinase deficiency: A treatable neurological disorder caused by TPK1 mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 113(4), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.09.010>
- Bradford, M. M.**, 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248–254.
- Chen, S. S., Yang, Y. M., and Barankiewicz, T. J.**, 2008, Selection of IgE-binding aptameric green fluorescent protein (Ap-GFP) by the ribosome display (RD) platform. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.123>
- Colucci, G., Santamaria-Echart, A., Silva, S. C., Fernandes, I. P. M., Sipoli, C. C., and Barreiro, M. F.**, 2020, Development of water-in-oil emulsions as delivery vehicles and testing with a natural antimicrobial extract. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092105>
- Cong, C., Yu, X., He, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Wang, M., & He, M.**, 2016, Cell-free ribosome display and selection of antibodies on arrayed antigens. *Proteomics*, 16(8), 1291–1296. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500412>
- Cui, W., Han, L., Cheng, J., Liu, Z., Zhou, L., Guo, J., & Zhou, Z.**, 2016, Engineering an inducible gene expression system for *Bacillus subtilis* from a strong constitutive promoter and a theophylline-activated synthetic riboswitch. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0599-z>
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., & Ruml, T.**, 2014, Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology.

Biotechnology Advances, 33(6), 1141–1161.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>

Davidson, M. E., Harbaugh, S. V., Chushak, Y. G., Stone, M. O., and Kelley-Loughnane, N., 2013, Development of a 2,4-dinitrotoluene-responsive synthetic riboswitch in *E. coli* Cells. *ACS Chemical Biology*, 8(1), 234–241.
<https://doi.org/10.1021/cb300274g>

Dixon, N., Robinson, C. J., Geerlings, T., Duncan, J. N., Drummond, S. P., & Micklefield, J., 2012, Orthogonal riboswitches for tuneable coexpression in bacteria. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(15), 3620–3624.
<https://doi.org/10.1002/anie.201109106>

Galán, A., Comor, L., Horvatić, A., Kuleš, J., Guillemin, N., Mrljak, V., and Bhide, M., 2016 Library-based display technologies: Where do we stand? *Molecular BioSystems*, 12(8), 2342–2358.
<https://doi.org/10.1039/c6mb00219f>

Harbaugh, S. V., Martin, J. A., Weinstein, J., Ingram, G., and Kelley-Loughnane, N., 2018, Screening and selection of artificial riboswitches. *Methods*, 143, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.012>

He, M., and Taussig, M. J., 2002, Ribosome display: Cell-free protein display technology. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1(2), 204–212. <https://doi.org/10.1093/bfpg/1.2.204>

Hu, Y. T., Ting, Y., Hu, J. Y., and Hsieh, S. C., 2017, Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 25, Issue 1, pp. 16–26). Elsevier Taiwan LLC.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.021>

Kaltenbach, M., and Hollfelder, F., 2012, SNAP display: *In vitro* protein evolution in microdroplets. *Methods in Molecular Biology*, 805, 101–111.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-379-0_7

Kamalinia, G., Grindel, B. J., Takahashi, T. T., Millward, S. W., and Roberts, R. W., 2021, Directing evolution of novel ligands by mRNA display. *Chemical Society Reviews*, 50(16), 9055–9103.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00160d>

Lee, J. H., Song, C., Kim, D. H., Park, I. H., Lee, S. G., Lee, Y. S., and Kim, B. G., 2013, Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 353–362.
<https://doi.org/10.1002/bit.24622>

Mayr, J. A., Freisinger, P., Schlachter, K., Rolinski, B., Zimmermann, F. A., Scheffner, T., Haack, T. B., Koch, J., Ahting, U., Prokisch, H., and Sperl, W., 2011, Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *American Journal of Human Genetics*, 89(6), 806–812.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.007>

- Nomura, Y., and Yokobayashi, Y.,** 2007a, Reengineering a natural riboswitch by dual genetic selection. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45), 13814–13815. <https://doi.org/10.1021/ja076298b>
- Nomura, Y., and Yokobayashi, Y.,** 2007b, Reengineering a natural riboswitch by dual genetic selection. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45), 13814–13815. <https://doi.org/10.1021/ja076298b>
- Nyhan, W. L., McGowan, K., and Barshop, B. A.,** 2019, Thiamine phosphokinase deficiency and mutation in TPK1 presenting as biotin responsive basal ganglia disease. *Clinica Chimica Acta*, 499, 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.034>
- Packer, M. S., and Liu, D. R.,** 2015, Methods for the directed evolution of proteins. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 7, pp. 379–394). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3927>
- Peng, R. H., Xiong, A. S., and Yao, Q. H.,** 2006, A direct and efficient PAGE-mediated overlap extension PCR method for gene multiple-site mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), 234–240. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0583-3>
- Schägger, H.,** 2006, Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.4>
- Shao, K., Ding, W., Wang, F., Li, H., Ma, D., and Wang, H.,** 2011, Emulsion PCR: A high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024910>
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B.,** 2007, SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381–403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
- Sumida, T., Yanagawa, H., and Doi, N.,** 2012, *In vitro* selection of fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR. *Journal of Nucleic Acids*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/371379>
- Tobin, P. H., Richards, D. H., Callender, R. A., and Wilson, C. J.,** 2014, Protein engineering: a new frontier for biological therapeutics. *Current Drug Metabolism*, 15(7), 743–756. <https://doi.org/10.2174/1389200216666141208151524>
- Weigand, J. E., Sanchez, M., Gunnesch, E. B., Zeiher, S., Schroeder, R., and Suess, B.,** 2008, Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, 14(1), 89–97. <https://doi.org/10.1261/rna.772408>
- Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., and Zhang, B.,** 2017, Recent advances in SELEX technology and

aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>

Zoller, F., Markert, A., Barthe, P., Hebling, U., Altmann, A., Lindner, T., Mier, W., and Haberkorn, U., 2013, A disulfide-constrained miniprotein with striking tumor-binding specificity developed by ribosome display. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(45), 11760–11764. <https://doi.org/10.1002/anie.201304603>



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca her zaman yanımda olan aileme,
Moleküler Biyokimya Laboratuvarının üyeleri olan çalışma arkadaşlarıma,
Beni her zaman destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Serap EVRAN'a
Teşekkür ederim...

14/09/2023

Burhan BORA

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı lisans öğrenimini Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünden lisans öğrenimini protein mühendisliği konusunda lisans tezini vererek mezun olmuştur. DNA aptamerleri ile tanıştığı yüksek lisans öğreniminde SELEX tekniğini öğrenmek üzere TÜBİTAK desteği ile yurtdışında üç aylık süre ile araştırma yapma olanağı bulmuştur. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD doktora programında riboswitch temelli yönlendirilmiş evrim uygulamaları üzerine çalışmıştır.