



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ
BAĞLAYICI PROTEİNLERİN (IGFBP)
REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

ZEYNEP ERİM

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burcu OKUTUCU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 29.11.2018

Bornova-İZMİR

2018

Zeynep ERİM tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinlerin (IGFBP) Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu” 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 29/11/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Doç. Dr. Burcu OKUTUCU

.....

Raportör Üye

: Doç. Dr. Serap EVRAN

.....

Üye

: Dr. Öğretim Üyesi Halil KOYU

.....

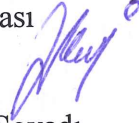
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinlerin(IGFBP) Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu” 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.

29/11/2018

İmzası



Adı-Soyadı

Zeynep ERİM

ÖZET
İNSÜLİN BENZERİ BAĞLAYICI PROTEİNLERİN(IGFBP)
REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ERİM, Zeynep

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burcu OKUTUCU

Ekim 2018, 60 sayfa

Diyabet genetik veya beslenme kaynaklı, pankreas salgı bezinin yeterli miktarda insülin hormonu üretmemesi ya da ürettiği insülin hormonunun etkili bir şekilde kullanılamamasıdır. Bunun sonucunda kan glukoz düzeyinde anormal farklanmaların gelişmesi sonucu oluşan ve ömür boyu süren bir hastalıktır. Diyabetin giderek artan bir sağlık sorunu olması nedeniyle şu an hali hazırda bulunan tedavi yöntemlerine alternatif, etkili, kolay kullanımlı terapötik tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF'lerin) potansiyel terapötik uygulamaları geniştir. IGF ailesinin, diyabet başta olmak üzere, kanser, büyüme geriliği, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanım alanları mevcuttur. IGF'ler yapısal olarak insüline benzerdirler ve biyolojik sıvıda, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP)'lere bağlanmış halde bulunur. Şu ana kadar karakterize edilmiş altı memeli IGFBP'i bulunur ve IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6 olarak adlandırılır. IGFBP'ler, IGF'lere Tip-1 IGF reseptörlerinden daha yüksek afiniteye bağlanırlar. Böylece reseptörlerine bağlanmalarını kontrol ederek IGF aktivitelerini düzenlerler. IGFBP'ler, IGF bağımlı ve IGF bağımsız etkileri ile son derece önemli proteinlerdir.

Bu çalışmada dolaşımdaki IGFBP'lerin %60'dan fazlası olan ve IGFBP'lerin en önemlisi olarak kabul edilen, IGFBP-3 rekombinant olarak üretiminin optimizasyonu *E.coli* BL21 ve *E.coli* Shuffle T7 Ekspres olmak üzere iki farklı *E.coli* suşunda, pET21a ve pET22b olmak üzere iki farklı pET ekspresyon sisteminde, farklı sıcaklıklarda ve farklı indüksiyon konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Anahtar sözcükler:

Diyabet, IGF-1,IGF-2, IGFBP-3, Biyoterapötik



ABSTRACT**RECOMBINANT PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS(IGFBP)**

ERİM, Zeynep

MSc in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burcu OKUTUCU

October 2018, 60 pages

Diabetes is a genetic or nutritionally caused by the fact that the pancreatic gland does not produce enough insulin hormone or the insulin hormone it produces cannot be used effectively. As a result of this, it is a life-long disease caused by the development of abnormal differences in blood glucose level. Since diabetes is an increasing health problem, it is tried to develop alternative, effective, easy to use therapeutic treatment methods.

Potential therapeutic applications of insulin-like growth factors (IGFs) are extensive. The IGF family has been used in the treatment of cancer, growth retardation, musculoskeletal diseases and neurodegenerative diseases, especially diabetes. IGFs are structurally similar to insulin and are present in the biological fluid bound to insulin-like growth factors-binding protein (IGFBP). Up to present, there are six mammalian IGFBPs characterized and named as IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6. IGFBPs bind to IGFs higher affinity than Type-1 IGF receptors. Thus, they control their binding to their receptors and regulate IGFs activity. IGFBPs are extremely important proteins with IGF dependent and IGF independent effects

In this study, optimization of IGFBP-3 recombinant production, which is more than 60% of circulating IGFBPs and considered to be the most important of IGFBP. Two different *E.coli* strains, *E.coli* BL21 and *E.coli* Shuffle T7 Express, were studied in two different pET expression systems, pET21a and pET22b, at different temperatures and different induction concentrations.

Keywords: Diabetes, IGF-1,IGF-2, IGFBP-3, Biotherapeutic

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezi boyunca bilgisini, deneyimlerini ve desteğini benden esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Burcu OKUTUCU ve sevgili hocam Doç. Dr. Serap EVRAN' a, bilgileri ve deneyimleri ile çok fazla katkısı bulunan başta Dr. Canan ÖZYURT olmak üzere, Özge Uğurlu, Burhan Bora, Ezgi Man, Merve Gültan, Merve Bilici'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bu süreçte desteğini benden esirgemeyen ve benim için bu süreci kolaylaştıran değerli ailem, Gülbahar Erim, Osman Erim, Kübra Erim ve Erhan Erim'e teşekkür ederim .

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 16-FBE-015



İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet.....	1
1.1.2.1. Diyabette moleküler biyobelirteçler	8
1.1.2.2. Diyabet tedavisinde kök hücre.....	8
1.2. Biyoteknolojik Üretim Prosesi	10
1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü(IGF) Sistemi ve Diyabet İlişkisi	11
1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri	13
1.4.2.1. Tip-1 IGF reseptörleri.....	18
1.4.2.2. Tip-2 IGF reseptörleri.....	18
1.4.3.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3.....	21
2. MATERYAL	25
2.1. Kimyasallar	25
2.2. Tamponlar ve Çözeltiler	25
2.3. PCR Karışımı.....	26
2.4. Enzimler.....	27
2.5. Kitler	27
2.6. Cihazlar.....	27
2.7. Diğer Sarf Malzemeler	27
2.8. Bakteriler	27
2.9. Vektörler	30
3. METOD	33
3.1. Büyüme Ortamları	33
3.2. Sterilizasyon	33
3.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim ve Agaroza Jelden İzolasyon.....	33
3.4. Ligasyon	33
3.5. Kompetent Hücre Hazırlanması	34
3.6. Transformasyon	34
3.7. Koloni PCR.....	34

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.8.Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.9.Ekspresyon Suşlarına Transformasyon	35
3.10. Protein Üretimi.....	35
3.11. Çözünür Proteinin Elde Edilmesi İçin Uygulanan Yöntemler	36
3.12. HisPur Ni-NTA Manyetik Boncuklar ile Protein Saflaştırılması	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1.Koloni PCR.....	40
4.2. IGFBP-3 Üretimi.....	41
4.3. Çözünür Proteinin Elde Edilmesi İçin Uygulanan Yöntemler	46
5. SONUÇ	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	52
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Diyabet tipleri.....	2
1.2. İnsülin sinyal yolağı.....	6
1.3. IGF-1 ve IGF-2'nin yapısal olarak insüline benzerliği.....	14
1.4. İnsülin benzeri büyüme faktörü sistemi.....	15
1.5. IGF-1 sentezi.....	16
1.6. İnsülin, IGF-1, İnsulin/IGF-1 hibrid ve IGF-2 reseptörlerinin yapısı.....	17
1.7. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin yapısı ve bağlama bölgeleri.....	20
1.8. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 yapısı ve bağlama bölgeleri.....	22
1.9. IGF'lerin IGFBP-3 ile plazmada taşınması.....	23
2.1. pET-22b vektörü klonlama ve ekspresyon bölgeleri.....	31
2.2. pET-21a vektörü plazmid haritası.....	32
4.1. pET21a/IGFBP-3 için yapılan koloni PCR görüntüsü.....	40
4.2. <i>E.coli</i> Shuffle T7 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. <i>E.coli</i> BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu.....	41
4.3. <i>E.coli</i> BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. <i>E.coli</i> Shuffle T7 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu.....	42
4.4. <i>E.coli</i> Shuffle T7 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. <i>E.coli</i> BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu.....	43
4.5. <i>E.coli</i> BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. <i>E.coli</i> Shuffle T7 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu.....	44
4.6. <i>E.coli</i> BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu.....	45
4.7. Sarkozil ile çözünür formda protein eldesi.....	46
4.8. Üre ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması.....	47
4.9. SDS ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması.....	48
4.10. NaOH ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
IGFBP	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
M6P	Mannoz-6-fosfat
DM	Diyabet
T2DM	Tip 2 Diyabet
Tyr	Tirozin
IRS	İnsülin Reseptör Substratı
PI	Fosfatidilinositol
pY	Fosforillenmiş tirozin
IR	İnsülin reseptörü
PI3-k	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PDK1	Fosfoinositid bağımlı kinaz 1
PKB	Protein kinaz B
FOXO-1	Çatallı kutu protein O
PEPCK	Fosfoenolpürivat karboksik kinaz
G6Pase	Glukoz-6-fosfataz
FFA	Serbest yağ asitleri
PIP2	Fosfotidil-inositol-3,4-bisfosfat
PIP3	Fosfotidil-inositol-3,4,5-trifosfat
GLUT4	Glukoz transporter 4
NO	Nitrik oksit
EDHF	Endotelden türetilmiş hiperpolarize edici faktör
HBD	Heparin bağlanma alanı
NLS	Nükleer lokalizasyon dizisi
RAR α	Retinoik asit reseptörü
MBD	Metal bağlama alanı

1. GİRİŞ

Diyabet multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın oluşum mekanizmasında görev alan birçok protein, protein ailesi ve reseptör aileleleri mevcuttur. Bu çalışmada diyabette ve metabolik hastalıklarda biyobelirteç olarak tedavi sürecinin izlenmesini sağlayan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3'ün biyoteknolojik olarak üretilmesi çalışıldı.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri ve ailesi diyabet başta olmak üzere kanser, büyüme geriliği, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde biyoterapötik uygulamaları geniş olan bir ailedir. 1987'de insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) geninin ilk defa klonlanması ile rekombinant IGF-1'in klinik kullanımı için geliştirilmesine olanak sağlandı. Daha sonra bağlayıcı proteinlerinin etkileri belirlenmeye başlandı. Geniş kapsamlı bir araştırma potansiyeli bulunan bu protein ailesinin etkileri ve sonuçları tam olarak aydınlatılamadı.

1.1. Diyabet

Diyabetes Mellitus (DM) tüm dünya için önemli bir sağlık sorunudur. 2030 yılına kadar yaklaşık 366 milyon kişi bu hastalığa sahip olacaktır. (Wild.S vd.,2004) Beslenme bozukluğu, yetersiz fiziksel aktivite ve yaşam süresinin uzamasıyla prevelansı artan bir metabolik hastalıktır.

Diyabet pankreatik β hücrelerinin insülin salgılanmasında hasara bağlı olarak insülin eksikliği veya salgılanan insülinin etkisini gösterememesi nedeniyle glukozun hatalı kontrolü sonucu oluşan bir hastalıktır.

Diyabet, karbohidrat mekanizmasına etki eder. Diyabetin en karakteristik semptomu, kanda glukoz konsantrasyonunun 5mM'dan 9mM ve üstüne yükselmesidir. İnsülin karbohidrat metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Bunun yanında protein ve yağ metabolizmaları üzerinde de önemli etkileri vardır. Böylece kanda insülin derişimi değişmesi, tüm vücutta etkiye neden olur.

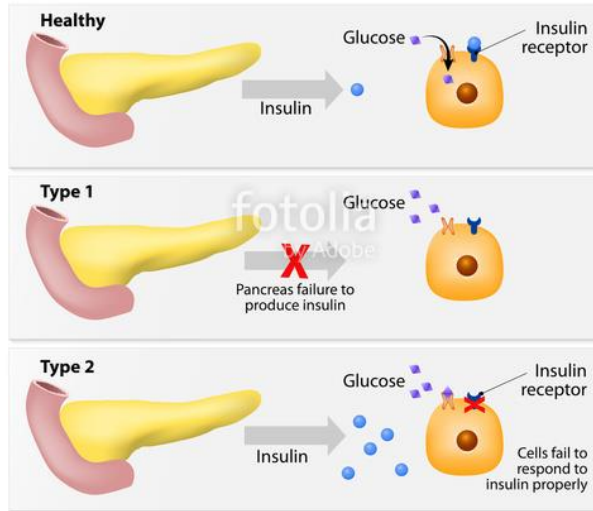
Adipoz dokunun lipid metabolizması da insülin tarafından etkilenir. Bu hücrelerde, insülin glukozdan yağ asidi sentezini stimüle eder ve yağ yıkımını inhibe eder. Kas proteinin yıkımı da insülin ile inhibe edilir. İnsülin yetersizliği durumunda, bu etkiler zayıflar ve buna bağlı olarak komplikasyonlar açığa çıkar.

Kas ve adipoz dokuda, en önemli iki glukoz kullanımı hasara uğrar. Karaciğerde glukoz kullanımı azalır. Aynı zamanda diğer olayların yanında, kaslarda artan proteolizden dolayı glukoneogenez de stimule edilir. Bu, kan şekeri seviyesini daha da yükseltir. Glukozun tekrar emilimi için böbreklerin kapasitesi aşıldığında, glukoz idrara salınır. (Glukozüri).

Yağların yıkımında insülin yetersizliğinin bir sonucu olarak meydana gelen artışın da ciddi sonuçları vardır. Fazla miktarda biriken yağ asitleri karaciğer tarafından alınır ve lipoprotein sentezi için kullanılır. Bu hiperlipidemiye yol açar ve kısmen asetil-CoA 'ya yıkılırlar. Sitrik asit döngüsü asetil CoA'nın hepsini alamayacağı için, çoğu kana salınarak uygun anyon ve protonlarına ayrılan keton cisimciklerine dönüştürülür. Keton cisimciklerinin fazla üretiminden dolayı, diyabetikler genelde şiddetli bir metabolik asidozis(diyabetik ketoasidozis) geliştirir.(Koolman ve Röhm,2002).

Tanımlanan 4 tip diyabet mevcuttur. En yaygın olan ve tedavi alanı araştırmaları ile ilgi çekenler Tip 1 ve Tip 2 diyabettir. Tip 1 diyabet, otoimmün aracılı pankreatik beta hücrelerinin olmamasıyla, mutlak insülin eksikliğine neden olurken, Tip 2 diyabet insülin direncini telafi etmek için yetersiz olan insülin sekresyonundan kaynaklanır.

DIABETES MELLITUS



Şekil.1.1. Diyabet tipleri (Designua,2018)

Tip 1 diyabet gelişimdeki risk faktörleri; genetik faktörler, alerji ve çevresel etkenlerdir.

Tip 2 diyabet gelişimindeki risk faktörleri ise daha fazladır. Bunlar; birinci derece yakınlarında diyabet hastalığı görülenlerde genetik yatkınlık, aşırı kilo, yüksek tansiyon ve kalp damar hastalığı geçmişi olanlar, gebelikte diyabet tanısı konulan hamileler, dört kilo ve üzerinde doğum yapan anneler, fiziksel olarak aktif olmayanlar, prediabeti bulunanlar, kırkbeş yaş ve üstünde olanlar, polikistik over sendromu bulunan kadınlar, sağlıklı olarak beslenenler ve trigliserid miktarı 250mg/dl ve üzerinde ya da yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol 35mg/dl ve altında olanlardır.

Tip 2 diyabet hastalığı olanlar tüm diyabet hastalarının %90'ından fazlasını oluşturur. Tip 1 diyabet hastalarından farklı olarak Tip 2 diyabet hastaları genellikle obez veya aşırı kiloludurlar. Tip 1 diyabet hastaları çoğunlukla çocuk ve ergenlerdir. Tip 2 diyabet hastaları ise genellikle ergin bireylerdir ama son zamanlarda obez olan çocuk ve ergenlerde teşhis edilmiştir. Tip-1 diyabette insülin üretimi olmadığı için insülin kullanımı zorunlu iken Tip-2 diyabetlerde farklı ilaçlar da kullanılabilir.

Karbohidrat metabolizmasındaki bu bozukluğun erken teşhis edilip, tedavi sürecinin erken başlaması, diyabet nedeniyle oluşacak olan diğer sorunları azaltır. Bu nedenle diyabette erken teşhis ve etkili tedavi yöntemi önemlidir.

1.1.1. Diyabet tedavisi

Tip 1 diyabet hastalarının tedavisinde insülin uygulanması tek tedavi yöntemidir. İnsülin etki sürelerine göre adlandırılırlar. Bunlar; uzun etkili, kısa etkili, orta etkili, hızlı etkili ve karışım insülinlerdir. Tip-1 diyabet hastalarının tedavisinde, günde üç veya fazla insülin verilen veya insülin pompasıyla düzenli olarak insülin verilen yoğun bir insülin tedavisi uygulanır.

İnsülin, diyabet tedavisindeki etkinliği en güçlü ilaçtır. Ancak kullanımında deri altına verilmesi ve oral yoldan alınamaması zorluğu hastalar için acılı bir tedavi sürecine yol açar. Tedavi sürecin kolaylaştırılması için oral yoldan alındığında etki gösteren antidiyabetik ilaçların bulunması için birçok çalışma yapıldı. 1920'lerde ilk olarak dekametilendiguanid maddesi bulundu. Bu madde bitkisel kaynaklı bir alkaloittir. Dekametilenguanid maddesi, kan glukoz

konsantrasyonu düşürdü ancak yüksek düzeyde hepatoksik etkisi gösterdiği bulundu. Bu nedenle bu madde tedavi için uygun bir ilaç olarak kullanılamadı. Daha sonra çalışmaları yapılan hipolisin A maddesi hipoglisemiye neden oldu ve toksik etkileri olduğu bulundu. Sülfonilüre türevi olan karbutamid adlı madde 1955 yılında tedavide kullanılmaya başlandı. Daha sonra yine sülfonil türevi olan ve çok daha az toksik etki gösteren ilaçlar tedaviye imkân sağladı.

Oral antidiyabetik ilaçlar, insülin salgılanmasını arttırarak, insüline duyarlılığı arttırarak ve karbohidrat emilimini azaltarak kan şekerini kontrol altında tutarlar. Bir antidiyabetik ilacın, tedavide kullanılabilir olması için, kan şekerini kontrol altında tutmasının yanı sıra, yan etkilerinin çok fazla görülmemesi ve komplikasyon oluşumuna neden olmamalıdır. Tüm bu özellikleri bir arada bulunduran bir ajan henüz bulunamamıştır ancak kan glukoz düzeyinin kontrol altında tutulmasını sağlayan birçok antidiyabetik ajan vardır. Bu ilaçlar etkinlikleri ve istenmeyen yan etkileri göz önünde bulundurularak, farklı karışımlar olarak kullanılır. Bu sayede kan glukoz değerleri kontrol edilebilmektedir.

Tip 2 diyabet hastalarının tedavisinde oral yolla alınan ve kan şekerini düşüren ilaçlar başlıca 4 gruptur.

- İnsülin direncini azaltan ilaçlar (insülin duyarlılığını arttıranlar)
- İnsülin salgılatıcılar
- Alfa glikozidaz inhibitörleri
- İnsülinomimetik İlaçlar (Dinççağ, 2011)

Diyabet tedavisinde temel amaç, diyabet hastalarının yaşam kalitesini yükseltmektir. Bu da, gün içerisinde glisemik kontrolün gerçekleştirilmesi, akut komplikasyon oluşma riskinin azaltılması, mikro ve makrovasküler kronik komplikasyonların önüne geçilmesi ve bunlar ile birlikte oluşan diğer sorunların düzeltilmesi ile mümkün olur.

Erken teşhis edilemeyen veya tedavi edilemeyen diyabet hastalarında zaman geçtikçe birçok ikincil komplikasyonlar oluşur. Bunlar arasında kan damarlarının duvarlarında değişiklikler (diyabetik anjiyopati) ve böbreklerde (nefropati) ve sinir sistemi(nöropati)ve gözlerde(retinopati) hasar sayılabilir. (Gordon vd.,1977; Kannel ve McGee, 1979; Knowler vd., 1980; Palmberg vd., 1981; Jarrett vd., 1982; Nathan, 1988).

Tip 1 diyabet hastalarında ise hayatın devam edebilmesi insülin tedavisiyle mümkün hale geldi. Ancak tedavide kullanılan insülinin en önemli yan etkisi ani kan şekeri düşmesidir. Kan şekeri 50 ml/dl'nin altına düştüğünde hipoglisemiye neden olur. Diğer olası yan etkileri kaşıntı ve döküntü, lipodistrofisi, ödem ve kilo artışı da dahil olmak üzere enjeksiyon yeri reaksiyonları ve alerjik reaksiyonlardır.

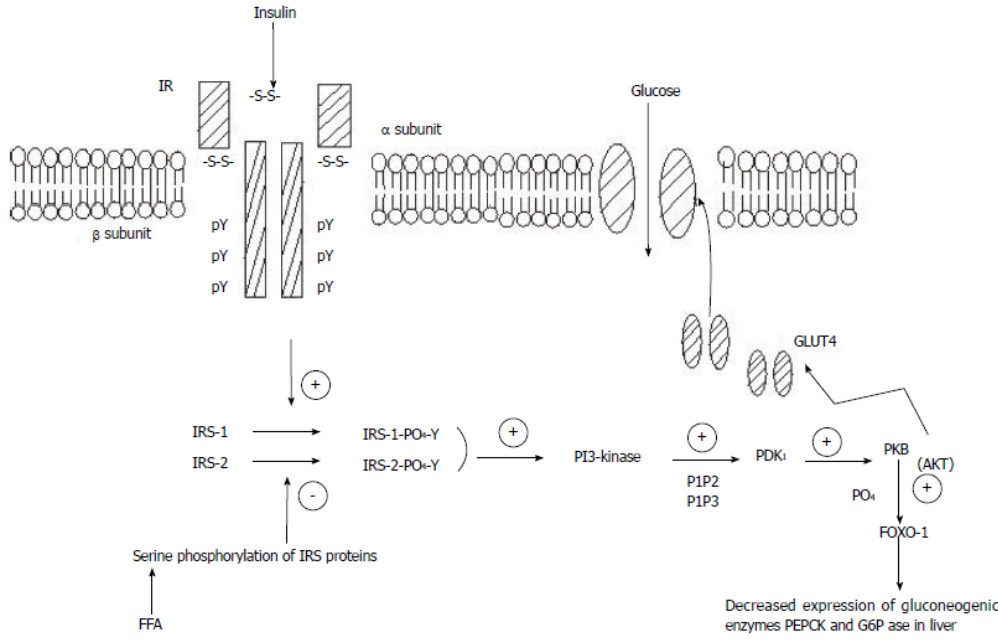
İnsülin, Sağlık Kuruluşları Akreditasyonu Birleşik Komisyonu tarafından tespit edilen “yüksek alarm” olan 5 ilaçtan biridir. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan diğer ilaçların da yan etkileri yukarıda belirtildi. Bu nedenle diyabet alternatif tedavilerinin geliştirilmesi, oldukça önemli ve üzerinde çalışmaların yapılması gerektiği bir alandır.

1.1.2. Diyabetin moleküler mekanizması ve tedavide alternatif yaklaşımlar

Tip 2 diyabetin patogenezi hem insülin etkinliğinde hem de sekresyonda anormallikleri içerir. İnsülin direncine yol açan patofizyolojik gen dizisi hala büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, son çalışmalar altta yatan moleküler mekanizmaların daha derin bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.

İnsülin reseptörü, disülfid bağları ile bağlanan iki α alt birimi ve iki β alt birimi içeren bir heterotetramindir. İnsülin, insülin reseptörünün α alt birimine bağlanır ve β alt biriminde tirozin kinazı aktive eder. İnsülin reseptörünün tirozin kinazı, aktive edilmesi, β alt biriminin otofosforilasyonunu teşvik eder, burada kinaz aktivitesinin amplifikasyonu için üç tirozin kalıntısının (Tyr-1158, Tyr-1162 ve Tyr-1163) fosforilasyonu gereklidir. İnsülinin metabolik ve antiapoptotik etkilerinin çoğuna, insülin reseptör substratı (IRS) proteinlerinin fosforilasyonunu ve fosfatidilinositol (PI) 3-kinaz, Akt'in (protein kinaz B olarak da bilinir) aktivasyonunu içeren sinyal yoluna aracılık eder. Akt, rapamisin (mTOR) ve p70 S6 kinazın moleküler hedefidir. İnsülin reseptörü tirozin kinaz, IRS proteinlerini fosforile eder ve IRS proteinleri üzerindeki fosfotirozin kalıntıları, PI3-kinazın p85 düzenleyici alt birimi için iyi hedefler haline gelir. Aktive edilen PI3-kinaz, fosfosinosidifiye edilen kinaz 1'e (PDK1) bağlanan 3'-fosfoinositidler [fosfatidilinositol-3,4-bisfosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP3)] üretir. PDK'ların bilinen substratları, protein kinaz B (PKB) ve protein kinaz C'nin (PKC) atipik formlarıdır. PI3-kinazdan sonra, serin / treonin kinaz Akt (PKB olarak da adlandırılır), glikojen sentezi ve hepatik glukoz üretimini baskılama gibi

karaciğer üzerindeki insülin etkilerini tetikler. Akt, glukoz transporter(GLUT4)'e bağlanarak insulin sinyal yolağında önemli bir rol oynar. Glikozu hücreye taşımak için hücre yüzeyine hareket eden GLUT4'ü aktive eder. (Saini, 2010)



Şekil.1.2. İnsülin sinyal yolağı. İnsülinin, reseptörüne bağlanması ile başlar ve glukozu hücre içine alan GLUT4'ün aktivasyonu ile biter. pY:Fosforillenmiş tirozin; IR:İnsülin reseptörü; IRS:İnsülin reseptör proteinini; PI3-k:fosfatidilinositol 3-kinaz; PDK1:fosfoinositid bağımlı kinaz 1; PKB:protein kinaz B; FOXO-1:çatalı kutu protein O; PEPC:fosfoenolpürivat karboksikinas; G6Pase:glukoz-6-fosfat; FFA:serbest yağ asitleri; PIP2:fosfotidil-inositol-3,4-bisfosfat; PIP3:fosfotidil-inositol-3,4,5-trifosfat; GLUT4:glukoz transporter 4. (Saini, 2010)

İnsan genom projesinin tamamlanmasından bu yana, birçok bilim insanı T2DM'nin moleküler mekanizmasını bulmaya odaklandı. DM hastalarında hatalı insülin stimüle glukoz transport aktivitesinde rol oynayan başlıca mekanizmaları araştırdılar. DM hastalarında yağ açıl CoA ve diasilgliserol gibi intramosellüler lipid metabolitlerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Bu moleküller serin / treonin kinaz kaskadını aktive eder ve bu hastalarda insülin reseptör substratının (IRS) -1 fosforilasyonuna yol açar ve dolayısıyla bu hastalarda insulin sinyallemede defekte neden olur.

Akt insülin aktivasyonunda insülin sinyalleme yolağında insüline bağlı glukoz taşıyıcı protein GLUT-4 çok önemli bir rol oynar. GLUT4'ün

adipositlerdeki hücre yüzeyine insüline bağımlı hareket ettiklerini gösterilmiştir. Bu veriler, GLUT4'ün adipositlerde bir vesikular bölgeye seçici olarak organize edildiğini göstermektedir ve daha sonra insülin uyarımı üzerine plazma membranına aktarılır.

Son yapılan hayvan deneyleri, PKB (Akt2) izoformu nakavt farelerinin insülin direnci gösterdiklerini ve fenotipinin insanlarda T2DM'ye çok benzediğini göstermiştir. Bu, Akt2'nin insanlarda normal glukoz homeostazının korunmasında önemli bir faktör olduğunu açıklar.

Yapılan çalışmalar ile sinyal yollarındaki kalıtsal kusurların insan T2DM'de insülin direncine katkıda bulunabileceğini ileri sürülmüştür. Çalışmalar, bir ailede ciddi insülin direncinin ve DM'nin otozomal dominant kalıtımının kinaz AKT2 / PKB β alanındaki mutasyonlarla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

İnsülin reseptör substratı IRS-1, insülin sinyal iletim yolunun ana bileşenidir ve insülinin hem metabolik hem de mitojenik tepkilere aracılık eder. Birçok araştırmacı, insüline dirençli T2DM hastalarında IRS-1 genini incelemiş ve 11'den fazla amino asit polimorfizminin tanımlandığını ve IRS-1 proteinindeki mutasyonların insan kas ve yağda insülin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir. IRS-1 ve IRS-2'nin, β hücre yetmezliği nedeniyle farelerde geliştirilen özel β hücrelerinin ve insülin direncinin düzenlenmesinde ve işlevlerinde önemli rol oynadıklarını göstermişlerdir. Çalışmalar, IRS proteinlerinin serin fosforilasyonunun, IRS proteinlerinin PI3-kinazı çekme kabiliyetini azalttığını ve bunun da IRS-1 proteininin aktivasyonunda ve ardından bozunmasında azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

İnsülin direnci ve pankreatik β hücre disfonksiyonu T2DM sebebi için başlıca faktörlerdir. Son zamanlarda, Foxo1'in β hücre disfonksiyonu ve DM'deki rolü gözden geçirilmiştir. Ciddi DM'de β hücre kütlelerinde azalma olduğu da gösterilmiştir. Foxo 1 geninin karaciğer, adipositler ve pankreatik β hücrelerde insülin duyarlılığının negatif bir regülatörü olduğunu gösterilmiştir.(Potdar ve Chaudhari, 2016).

T2DM'nin oluşumu, bir dizi genin ekspresyonunda değişiklik ile ilişkilidir. Gen ekspresyonunda bu değişikliklerin saptanması, hastalardaki hastalığın evresini ortaya çıkarmada yararlıdır ve tedavisi için daha iyi bir anlayış sağlar.

1.1.2.1. Diyabette moleküler biyobelirteçler

Biyobelirteçler sağlık ve hastalığı temsil eden biyolojik moleküller olarak tanımlanır. Yeni teknolojiler (metabolomik, proteomik, genomik gibi) yeni biyobelirteçler geliştirmek için çok fazla fırsat sunmaktadır. Diyabet, hemen her doku ve organı etkileyen kompleks bir hastalıktır. Biyobelirteçler, hipergliseminin varlığını ve ciddiyetini veya diyabetin vasküler komplikasyonlarının varlığını ve şiddetini yansıtır.

T2DM'nin neden olduğu başlıca komplikasyonlardan biri insanda kardiyovasküler hastalık gelişmesidir. Endotel, nitrik oksit (NO), prostasiklin, endotelden türetilmiş hiperpolarize edici faktör(EDHF) gibi vazodilatatör moleküllerin üretiminin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Endotel disfonksiyonu T2DM'de insülin direnci, inflamasyon, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkilidir. Bu nedenle, endotelyal hücreler tarafından salınan moleküler belirteçlerin ekspresyonu, bu hastalarda endotelyal disfonksiyon hakkında bir tahmin sağlar.

Sitokinler otokrin ve parakrin aktivitesine sahip düşük moleküler ağırlıklı polipeptidlerdir. İnterlökinler, tümör nekrozu faktörü, interferonlar, koloni uyarıcı faktörler, transforme edici büyüme faktörleri ve kemokinler gibi farklı tiplerde sınıflandırılırlar. Sitokinler vücuttaki çok çeşitli hücreler tarafından üretilir ve ayrıca büyük terapötik potansiyele sahiptir. Sitokinler DM ve mikrovasküler komplikasyonlarının patogenezinde rol oynarlar.

Son zamanlarda yapılan bir keşif, obezite, metabolik sendrom ve T2DM'de irisin'i moleküler bir belirteç olarak ortaya koymuştur. T2DM hasta serumunda, irisin düzeyi diyabetik olmayan kişilerdekine göre daha düşüktür. İrisin, beyaz yağ dokusunun esmerleşmesini indükleyerek enerji metabolizmasını kontrol eden ve böylece kimyasal enerjiyi ısı enerjisine dönüştüren bir egzersiz aracılı miyokindir. (Potdar ve Chaudhari, 2016).

1.1.2.2.Diyabet tedavisinde kök hücre

Kök hücrelerin bölünmesi ve vücudun çeşitli farklı tipteki özel hücrelerine ayrılması için muazzam bir potansiyeli vardır. Bu nedenle, kök hücre terapisi, sadece T2DM'nin tedavisi için değil, aynı zamanda tam kürün henüz mevcut olmadığı başka birçok hastalık ve hastalık için de ümit verici bir anahtardır. Kök

hücreler T2DM hastalarında dejenerasyona uğramış β hücrelerin yeni bir kaynağı olabilir. Yeni β hücreleri kök hücrelerden üretilebilir ve diyabetik hastalarda transplantasyon için daha fazla kullanılabilir. Farklı kök hücrelerden fonksiyonel hücre kitlesi geliştirmek ve kurmak için araştırmalar devam etmektedir. (Potdar ve Chaudhari, 2016).

1.1.3. Diyabet ve biyoterapötik ilaçlar

Biyoterapötik ilaçlar, bakteriler, memeli hücreleri, virüsler gibi canlı organizmalar kullanılarak üretilen proteinler ve diğer doğal bileşiklerden oluşan ilaçlardır. Bu ilaçlarla, birçok farklı hastalığa sahip geniş bir hasta kitlesi için yeni ve nitelikli ilaç geliştirilmesinde yeni kapılar açılmaktadır. Biyoterapötik ilaçlar, genelde küçük molekül olan ilaçların sentezinde kullanılan kimyasal sentez yöntemine göre molekül yapısında yapılan küçük değişikliklere bile daha etkili sonuç veren canlı materyaller kullanılarak elde edilir. Bu nedenle son ürün elde edilirken, üretim sürecinde çok çeşitli faktörler göz önünde bulundurulur. Bu çok çeşitli faktörlerden herhangi birindeki küçük değişiklik elde edilen son üründe değişikliğe yol açar. Bu nedenle biyoterapötik ilaçlar karakterizasyonu zor ve daha karışık moleküllerden oluşur.

Doğal olarak, insan vücudunda sentezlenen moleküllere yapısal olarak benzer olarak üretildikleri için, bu ilaçlar birçok hastalıkta tedavi edici ve teşhis amaçlı kullanılabilir. Ayrıca biyoterapötik ilaçlar, kimyasal yoldan sentezlenen ilaçlar ile tedavisi denenilen hastalıklarda olumlu sonuç alınamayınca kullanılmış ve tedavide daha etkili oldukları ispat edilmiştir. Geçtiğimiz 30 yılda, biyoterapötik ilaçlar alanındaki tıbbi gelişmeler birçok kronik hastalığın - kanser, diyabet, hepatit C ve kronik renal yetmezlik, hemofili yanında Fabry hastalığı, büyüme yetmezliği, multipl skleroz ve Crohn hastalığı gibi daha az yaygın olanların tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır.

Diyabette biyoteröpatiklerin kullanımı ilk olarak rekombinant insülin üretimi ve bunun tedavide kullanılmasıyla başlanmıştır. Daha sonra diyabeti etkileyen diğer biyomoleküllerin araştırılmasıyla diyabette biyoteröpatiklerin kullanımı artmıştır. İncretin bazlı tedaviler, glukagon bazlı tedaviler bunlara örnektir. Diyabette, IGF'lerin terapötik uygulamaları konusu potansiyel olarak çok geniştir ve üzerinde çalışılmaktadır.

Örnek olarak, IGF-1'in IGFBP-3 ile kombinasyonu, doğal IGF-1 koruma mekanizmasını terapötik müdahaleye uzatan ilginç bir terapötik stratejidir. Daha önce belirtildiği gibi, IGF-1'in plazma yarılanma ömrü, serbest IGF-1 için ilet birkaç saat arasında IGFBP'ye bağlandığında plazma yarılanma ömrünün 10-12 dakika gibi kısa olduğu bildirilen birkaç parametrenin bir fonksiyonudur. Kompleks, kan içindeki IGF-1 kararlılığını önemli ölçüde artırır ve böylece yarılanma ömrünü artırır. *In vivo* olarak, dolaşımdaki IGF-1, IGFBP-3 ve başka bir protein, asit labil altbirim (ALS) ile üçlü bir kompleks oluşturur.

Eşit molar miktarlarda IGF-1 ve IGFBP-3 (Mekasermin rinfabat, IPLEX TM) kompleksi, 2005 yılında ABD pazarında çocuklarda büyüme yetmezliği nedeniyle onaylanmıştır. Günümüzde kompleks amiotrofik lateral skleroz / Lou-Gehrig sendromu için İtalya'da piyasaya sürülmekte ve subkütanöz enjeksiyonla günde bir kez uygulanmaktadır. Bu kompleksin diyabet, osteoporoz, yanıklar, büyüme hormonu insensitivite sendromu veya düşük doğum ağırlıklı çocuklar gibi hastalıklarda potansiyelini değerlendirmek için çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır.

1.2. Biyoteknolojik Üretim Prosesi

Biyoteknoloji; biyokimya, genetik, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji gibi doğa bilimlerinden yararlanarak, hayvan, bitki veya mikroorganizmaları geliştirerek, rekombinant DNA teknolojisi ile doğada var olmayan ürünleri veya doğada var olan ürünleri değiştirerek üretmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür.

Gen klonlamanın biyoteknolojiye uygulanması ile önemli bir hayvan veya bitki proteini için bir genin normal konağından alınması, bir klonlama vektörüne yerleştirilmesi ve bakteriye sokulabilmesi mümkün hale geldi. Daha sonra gen ifade edilerek rekombinant protein bakteri hücresi tarafından sentezlenir. Bu işlem için gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* (*E.coli*), laboratuvar ortamında kolayca ve ucuz bir şekilde yetiştirilebildiği için sıklıkla kullanılır. *E.coli* genom haritası ilk olarak 1997'de yayınlandı. Bakteriyel konjugasyon, genetik rekombinasyon, operon kavramları ilk olarak *E. coli* 'de keşfedildi, DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi, moleküler biyolojinin pek çok önemli alanı, metabolizmanın çoğu detayı bu organizmada yapılan

araştırmalarla anlaşıldı. Doğal ve protein mühendisliği ile geliştirilen birçok farklı suşu bulunur. Bu suşların herbiri farklı özellikteki proteinlerin ekspresyonunu kolaylaştırmak için geliştirildi. Bu yüzden bu çalışmada iki farklı *E.coli* suşu ile protein ekspresyonu çalışması yapıldı. IGFBP'lerin *E.coli* hücrelerinde, çözünür formda ve yüksek verimde rekombinant üretilme çalışmaları yapıldı.

IGFBP-3'ün rekombinant olarak *E.coli* hücrelerinde üretimini, saflaştırılmasını, bağlanma etkinliklerinin ölçülmesi çalışılmıştır. Daha sonra IGFBP-3'ün hücre çoğalması üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek için kullanılmıştır. (Chen vd., 2007) Ayrıca IGFBP ailesinden, IGFBP-2'nin *E.coli* hücrelerinde üretimi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir ve yeni kanser terapötiklerini geliştirme amacıyla kullanılmıştır.(Swain vd.,2010). Bunlar gibi bir çok çalışma mevcuttur.

Biyoteknoloji, insan sağlığı için ilaç endüstrisinde yeni ilaçların geliştirilmesi için çok önemli bir alandır. Biyoteknolojik yöntemler yeni ilaçların geliştirilmesinde gitgide kimyasal ve bitkisel formülasyonlardan daha fazla kullanılmaktadır. Yıllar geçtikçe onaylanan yeni ilaçlar arasında biyoteknolojik ilaçların miktarı artmaktadır. Diyabet, kanser, alzheimer, kalp hastalıkları gibi önemli hastalıkların tedavisi için yeni geliştirilen ilaçların çok büyük bir miktarı biyoteknolojik üretim prosesi ile üretilmektedir.

1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü(IGF) Sistemi ve Diyabet İlişkisi

İnsülin benzeri büyüme faktörü sistemindeki proteinler ve diyabet ile ilgili birçok çalışma literatürde mevcuttur.

Tip 1 diyabet hastalarında, özellikle çeşitli komplikasyonların varlığında IGF-1 seviyelerinin azaldığı raporlanmıştır. (Thrailkill, 2000). Ayrıca IGF-1 seviyelerinin artması da, diyabetin komplikasyonlarını artırır. IGF-1/2, IGF-1 reseptörü ve IGFBP'ler arasındaki dengenin bozulması, IGF-1 duyarlılığının yükselmesine yol açar. Bu nedenle bu son derece karışık olan sistemin etkilerinin net olarak belirlenmesi çok önemlidir.

IGFBP'ler, diyabetik hastalarda glukoz homeostazında çok önemli rol oynamaktadır. Örneğin IGFBP-1 sentezi insüline tepki olarak baskılanır. Bu nedenle normal, prediyabetik ve diyabetik kişilerde insulin sekresyonunun belirteci olarak hizmet eder. (Jones ve Clemmons, 1995).

Diyabetik hastalarda, IGFBP-3 miktarı, sentez hızına, diyabette artan proteoliz derecesine ve IGFBP-3'ün temizlenmesini yavaşlatan diyabetik nefropati şiddetine bağlıdır. (Clemmons vd.,2005). Artan IGFBP-3 proteolizi, insüline bağımlı olmayan diyabet hastalarında rol oynamıştır ve bu IGFBP-3'ün metabolik hastalıkta anahtar bir modülatör olabileceğini gösterir. Tip 1 diyabet hastalarında IGFBP-3 seviyelerinde anlamlı azalmalar vardır. Bu değişiklik kısmen IGFBP-3'ün proteolizinin artması nedeniyle oluşur bu da toplam serum bağlama kapasitesinin azalmasını neden olur. (Raipathak, 2012). Ayrıca insanlarda yüksek IGFBP-3 konsantrasyonları Tip-2 diyabet gelişme riskinde artışa neden olur. (Zandbergen,2006)

IGF-1 ve IGFBP-3 kompleksinin Tip-1 diyabet hastalarında insüline gerekliliği azaltıp, insulin duyarlılığını arttırdığı belirtilmiştir. (Clemmons vd.,2000).

Tedavi edici bir madde olarak rhIGF-I / rhIGFBP-3'ün gelişimi, IGF-I'in etkilerini artırma ve akut insülin benzeri yan etkiler için potansiyelin ortadan kaldırılması ihtiyacına dayanır. Bu kompleksin etkinliği şiddetli yanmış çocuklarda azalmış katabolizma ile (Levetown,2002) ve kalça kırıkları olan yaşlı hastalarda artmış kas-iskelet anabolizması ile gösterilmiştir. (Boonen vd., 2002).İnsülin gereksiniminde %49'luk bir azalma, Tip 1 (Clemmons vd.,2000) ve Tip 2 diyabetli erişkinlerde de görülmüştür. (Rogol vd.,2002) .

IGF-I, IGFBP-3 ile birlikte uygulandığında, kandaki üçlü komplekse bağlanan materyalin, vasküler alan içindeki ve ekstrasvasküler dokular içindeki diğer bağlayıcı proteinlerle dengeye girdiğini ve böylece IGF-I reseptörlerine bağlandığı ortaya konmuştur. (Clemmons vd.,2000).

IGFBP-3, 1993'te Okajimana ve arkadaşları tarafından IGF-I'in glikoz düşürücü etkilerinin bir önleyicisi olarak önerilmiştir. (Okajimina vd.,1993) .Ancak, daha sonra, *in vivo* yapılan herhangi bir çalışma, IGFBP-3 infüzyonundan veya aşırı ekspresyonundan sonra glikoz toleransında zayıflama olduğunu göstermemiştir.(Murphy vd., 1995)(Savage vd.,2004)

Diyabette glisemik kontrolün iyileştirilmesinde IGF-I / IGFBP-3 etkinliğini belirlemek ve IGF-I'in insülin duyarlılığını arttırdığı mekanizmanın belirlenmesi için uzun vadeli çalışmaların yapılması gerekir.

IGF ailesinin ve özellikle IGFBP-3 gibi güçlü ajanlar için en uygun terapötik kullanımların bulunması çalışmaları son derece önemlidir.

1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

Büyüme hormonu, büyüme, kıkırdak ve protein metabolizmasına etki eder ve bu etkilerini somatomedinler ile gösterirler. Somatomedinler polipeptid yapısına sahiptirler ve büyüme hormonu etkisiyle, karaciğer ve diğer dokulardan sentezlenen büyüme faktörleridir. Salmon ve arkadaşları 1957'de yaptıkları çalışmaların sonucunda dört farklı somatomedin tespit etmiştir. Bu somatomedinlerin bazıları yapısal olarak insüline çok benzemesi ve büyüme üzerindeki etkileri ile insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) olarak tanımlanmıştır. (Salmon ve Daugday,1957).

IGF'ler normal ve zararlı hücrelerin büyümesi ve farklılaşması üzerine etkileri tanımlanmış, yapısal olarak, birçok dokuda geniş ölçüde eksprese olan, insan serumunda nanomolar konsantrasyonlarda bulunan, endokrin, otokrin ve parakrin aktivitelere sahip, molekül ağırlığı yaklaşık 7kDa olan, küçük peptid hormonlardır.(Rinderknecht ve Humbel;1978a; 1978b).Yapısal olarak insüline benzerler. İnsülin 1922'de Frederick ve arkadaşları tarafından bir peptid hormon olarak keşfedilmiştir. İnsülin pankreatik hücreler tarafından salgılanır ve öncelikle yüksek organizmalarda glukoz homeostazından sorumludur.(Harish, 2015).

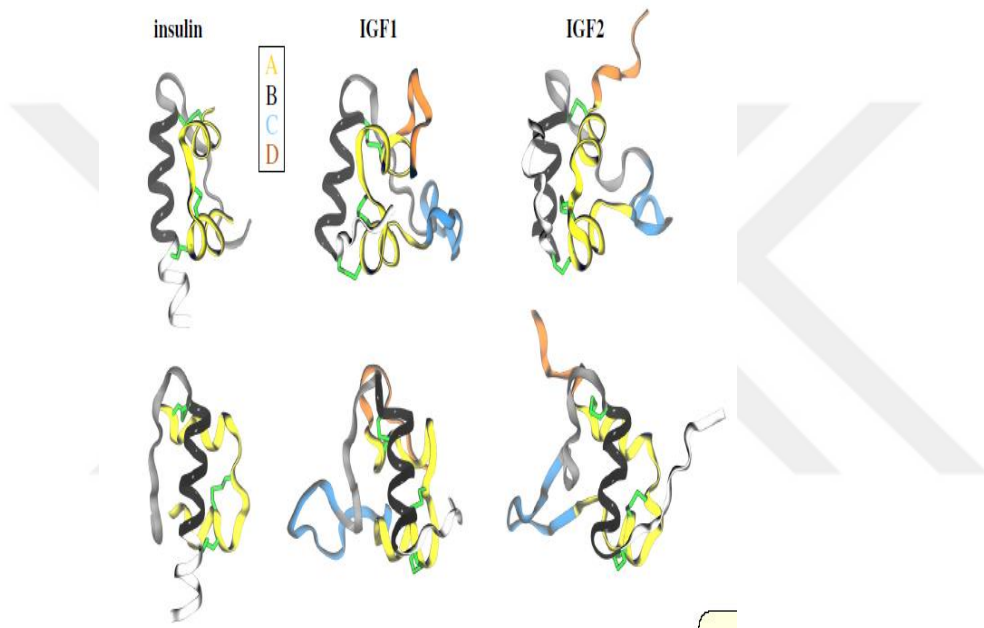
İnsülin, sinyal dizisinin çıkarılması ile proinsülin haline gelir ve daha sonra enzimlerle bağlantı peptidinin yarılması ile olgun insülin haline gelerek, preproinsülin olarak da bilinen, -110 kalıntısının tek zincirli bir molekülü olarak sentezlenir. Bu nedenle, son insülin monomeri, iki zincirden, 21 kalıntı içeren bir A zincirinden ve 30 kalıntı içeren bir B zincirinden oluşur.

Bununla birlikte, homolog büyüme faktörleri IGF-1 (70 kalıntı) ve IGF-2 (67 kalıntı), her biri sırasıyla B, C, A ve D (N-terminalinden C-terminaline) olarak adlandırılan dört alanla, tek zincirli polipeptitlerdir. .

IGF'lerin A ve B zincirleri, insülinin A ve B zincirlerine benzerken, insülin, IGF'lerden farklı olarak C ve D zincirlerinden yoksundur. Bununla birlikte, her bir ligand üç disülfid bağına sahiptir ve IGF'ler ek alanlardan dolayı insülinde biraz daha büyüktür.

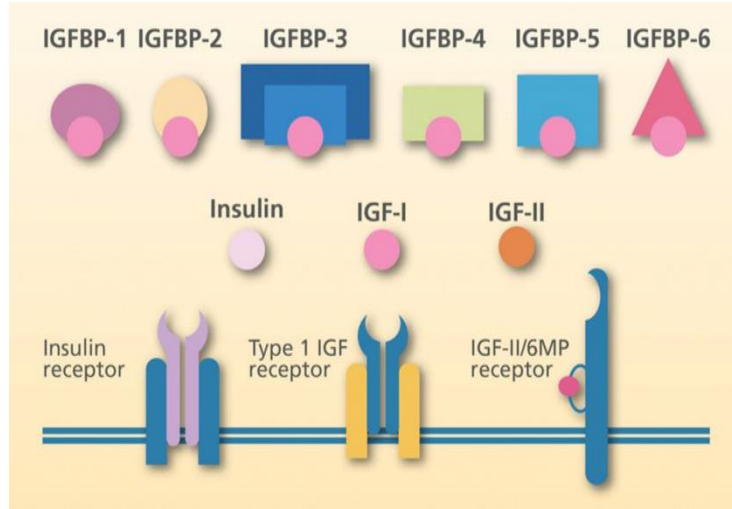
Tüm zincirlerin üç boyutlu kıvrımları Şekil 1.3'de gösterilmektedir. Ligandlar arasında benzer yapısal elemanlar A zincirlerinde iki sarmal (sarı) ve B zincirlerinde merkezi bir sarmal (siyah) içerir.

Anahtar farklar N ve C terminal B zincirlerinde bulunur: insülin B zincirinin N terminali, uzatılmış veya sarmal olabilirken, C-terminali insülin B-zinciri, IGF'ler için görülen yapısal olmayan konformasyonun aksine bir tabaka oluşturabilir. Olgun insülinde bulunmayan IGF'lerin C ve D zincirleri iyi tanımlanmış ikincil yapı elemanlarından yoksundur.



Şekil.1.3. IGF-1 ve IGF-2'nin yapısal olarak insüline benzerliği. A zincirler sarı, B zincirler gri, C zincirler mavi, D bölgesi turuncu olarak gösterilmiştir.(Harish, 2015).

İnsülin benzeri büyüme faktörü ailesi aşağıdaki gibi sınıflanmıştır.

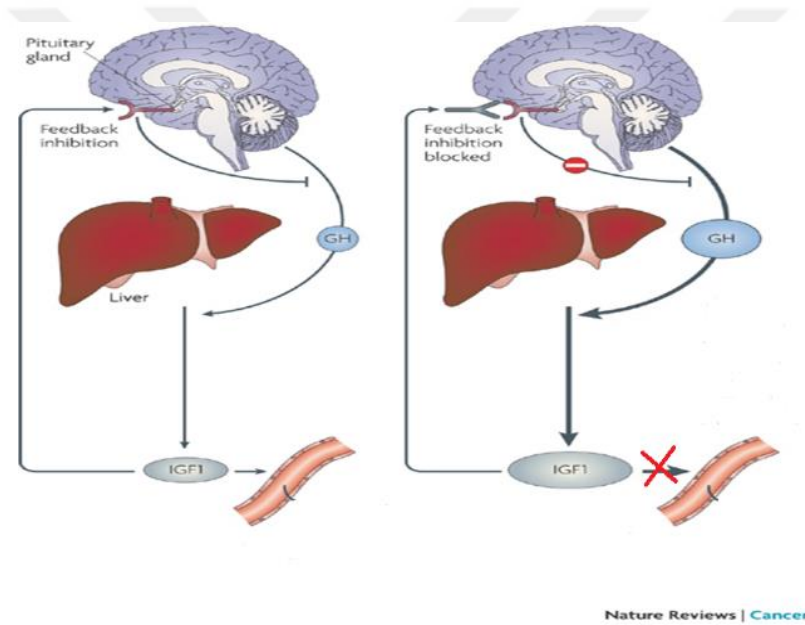


Şekil.1.4. İnsülin benzeri büyüme faktörü sistemi [İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2, İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler(1,2,3,4,5 ve 6), Tip 1- ve Tip 2 İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri) yapıları ve Tip-1 IGF reseptörü ile insülin] (Livingstone, 2013).

- **İnsülin benzeri büyüme faktörleri(IGF)**
 - IGF-1
 - IGF-2
- **İnsülin benzeri büyüme faktörleri reseptörleri**
 - Tip-1 IGF reseptörü
 - Tip-2 IGF reseptörü
- **İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler(IGFBP)**
 - IGFBP-1
 - IGFBP-2
 - IGFBP-3**
 - IGFBP-4
 - IGFBP-5
 - IGFBP-6

1.4.1. İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin sentezi ve görevleri

Büyüme hormonu, ön hipofiz bezinde sentezlenir. Büyüme hormonu farklı dokularda büyüme hormonu reseptörlerine bağlanır. Ayrıca büyüme hormonlarının çoğunun diğer bir görevi IGF-1'in karaciğerde üretimini sağlamaktır. Karaciğerde üretilen ve dolaşımda bulunan IGF-1 karaciğerden diğer dokulara taşınır ve endokrin hormon olarak görev yapar. Karaciğer dışında diğer dokularda da üretilen IGF-1'ler parakrin ve otokrin hormone olarak görev yapar. (Wang vd.,2006). IGF-1 üretimini sağlayan büyüme hormonu azaldığında IGF-1 üretimi durdurulur.



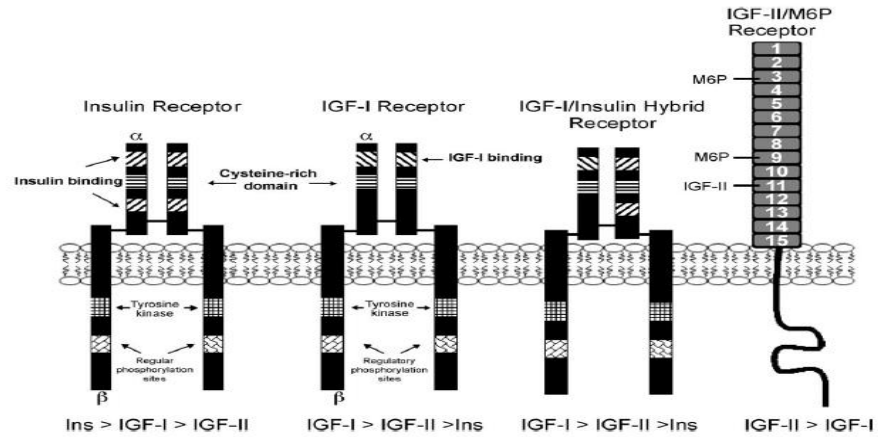
Şekil.1.5.IGF-1 sentezi.(Pollak, 2009).

IGF-1'in metabolizma üzerinde mitojenik ve insülin benzeri etkileri bulunur. IGF-1 insülin seviyesini düşürür ve karbohidrat metabolizmasını düzenler. IGF-1'in insülin seviyesini düşürme etkinliğinin yanısıra insülin duyarlılığını arttırma etkisi de vardır. Karbohidrat alımı ile insülin seviyelerinde ani değişimler gözlenir, IGF-1'de böyle bir değişim yoktur. IGF-1'in diğer görevleri; proteoglikan ve kollajen sentezini arttırması, potasyum kanalları aktive etmesi, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ homeostasisında olumlu etki yapması yanısıra, kalp kası ve diyaframa aminoasit ve glukoz transportunu uyarmasıdır. IGF-2 ise embriyonun gelişmesinde görev sahibidir. Doğumdan sonra dolaşımdaki miktarı azalır. (Gederet vd. ,2004).

1.4.2. İnsülin benzeri büyüme faktörleri reseptörleri

IGF'ler protein yapıdadırlar. Protein yapıları nedeniyle hücre membranından geçmek için reseptörlere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etkin olurlar. IGF'ler, Tip-1 ve Tip-2 IGF reseptörleri olarak adlandırılan, spesifik hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girerler. İnsülin reseptörüne de bağlanabilirler. IGF'lerin fizyolojik fonksiyonlarına, Tip-1 IGF reseptörleri, Tip-2 IGF reseptörleri ve insülin reseptörleri tarafından aracılık edilir. (Hawkes ve Kar, 2004)

IGF-1 ve insulin reseptörleri, birbirlerine yapısal olarak çok benzeyen tirozin kinaz reseptör ailesinin üyeleridir. Bir insülin reseptör α - β hemimolekül ve bir IGF-1 reseptör α - β hemimolekül içeren bir moleküler hibrid reseptörünün saptanması IGF sistemine başka bir komplekslik eklemiştir. IGF-2/M6P reseptörü, bir amino terminal sinyal sekansı, geniş bir ekstra sitoplazmik alan, tek bir transmembran bölge ve bir karboksi terminali sitoplazmik kuyruğu da dahil olmak üzere dört yapısal alandan oluşan bir tip I transmembran glikoproteindir. Belirtildiği gibi dört reseptörün her birine IGF-1, IGF-2 ve insülinin bağlanma afinitesi birbirinden farklıdır. (Hawkes ve Kar, 2004)



Şekil.1.6. İnsülin, IGF-1, İnsülin/IGF-1 hibrid ve IGF-2 reseptörlerinin yapısı.(Hawkes ve Kar, 2004)

1.4.2.1. Tip-1 IGF reseptörleri

Tip-1 IGF reseptörleri; iki transmembran beta ünitesi ve hücre dışında iki alfa ünitesi içerir. Glikopeptid yapıdadır. Tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. (LeRoith vd., 1995). Yapı ve fonksiyon olarak insülin reseptörlerine benzeyen Tip-1 IGF-1 reseptörlerinin α ve β üniteleri disülfid bağları ile birbirine bağlıdır. IGF-1'i, insülin ile kıyaslandığında yüz kat daha fazla affinite ile bağlarlar.

IGF-1, IGF-1 reseptörünün α ünitesine bağlanır. Daha sonra β ünitesinde otofosforilasyon olur. Otofosforilasyonun gerçekleşmesi, tirozin kinaz aktivitesinin oluşmasına neden olur. Tirozin kinaz aktivasyonu ile endojen substratlarda olduğu gibi reseptör üzerindeki diğer önemli tirozinlerin fosforilasyonu gerçekleşir. (Amoui vd.,2001)

1.4.2.2. Tip-2 IGF reseptörleri

Tip-2 IGF reseptörlerinin hücre dışında yerleşen uzunlamasına bir konum alan zincirin devamında kısa bir transmembran zinciri vardır. Polipeptid yapıdadır ve tek zincirlidir. Tirozin kinaz aktivitesinden yoksundur. (Hjortebjerg ve Frystyk, 2013).

Kasyon bağımsız mannoz 6- fosfat reseptörü lizozomal enzim trafiğini düzenler. Tip-2 IGF reseptörü bu reseptör ile çok benzerdir. Bu nedenle IGF mannoz 6-fosfat (M6P) olarak da adlandırılır. Hücre yüzeyinden IGF-2'ye bağlanır böylece IGF-2'yi hücre içine alınmasına aracı olur. Hücre içine alınan IGF-2 lizozomlarda yıkılır. (Nissley ve Kiess, 1991).

1.4.3. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler, IGF'lerin bağlayıcı proteinleridir ve dolaşımda birlikte bulunurlar. IGFBP'ler 24 ila 40 kDa arasında değişen boyutlardadırlar. N- ve C- terminalleri yüksek oranda benzerdir ve iç disülfid bağları vardır. IGF bağlanmasında N- ve C- terminal bölgelerinin her ikisinde yüksek duyarlılıkla etkinlik gösterir. IGFBP'ler, IGF'lere Tip-1 IGF reseptörlerinden daha yüksek affiniteye bağlanırlar. (Shimasaki ve Ling,1991). Böylece Tip-1 IGF reseptör bağlarını engellerler ve IGF'lerin etkilerini düzenlerler.

Dolaşımdaki bağlayıcı proteinlerine bağlı olmayan IGF'lerinin yarı ömrü 30 dakikadır. Dolaşımda IGFBP'ler ile bağlı olanların yarı ömrü ise 12-15 saate kadar uzar. IGF'lerin akut etkilerinin ortaya çıkışını önlerler. Kapiller bariyerlerde transport proteini olarak görev yaparlar. (Guler vd.,1989)

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin iki anahtar özelliği bulunur.

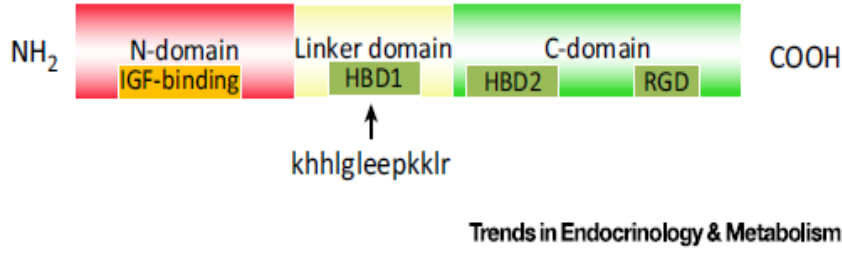
- Sisteince zengin polipeptidlerdir.

Pre-peptidlerinde (16-20 sistein) ve primer aminoasit dizilimlerinde yüksek benzerlik gösterirler.Yapısal olarak korunmuş N terminal bölgelerinde IGFBP-1,2,3,4 ve 5'te; 12 sistein, IGFBP-6'da; 10 sistein, C terminal bölgelerinde ise 6'şar sistein toplanmıştır. N ve C terminal bölgeleri aralarından bulunan orta bölgenin küçük benzerlikleriyle ayrılırlar.

- IGF'lere yüksek affinitede bağlanırlar.

Bu etkinlikleri, N ve C terminal bölgelerinin IGF'lere yüksek afinitede bağlanabilmeleri için doğru katlanmalarının bir sonucudur. Birkaç farklı proteaz bu proteinleri parçalamaktadır. Proteolitik yıkım bu proteinleri çoğunlukla inaktive eder veya IGF-1 ve IGF-2'ye bağlanma yeteneğini azaltır. Birçok hücre tipinde bu proteazların salgılandığı gözlenmiştir ve bu nedenle proteaz aktivitesinin regülasyonu, IGFBP'lerin aktivitesinin kontrolüne de etki eder. (Vivilan vd. ,1999)

IGFBP ailesinin altı üyesinin tümünün hem N- hem de C-terminalinde yer alan spesifik sekanslar, yüksek afiniteli bir IGF bağlanma bölgesi oluşturmak için çok önemli bölgeleri içerir. Bununla birlikte, bu proteinlerin çok sayıda eylemi açıklayan birden fazla yapısal motifi vardır.



Şekil.1.7. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin yapısı ve bağlama bölgeleri. (Clemmons,2016).

Bağlayıcı bölge(linker domain) olarak adlandırılan her bir IGFBP'in orta bölgesi, protein aile üyeleri arasında yapısal değişikliklerin oluşmasını sağlar. Bu bölgede glikozilasyon, proteolitik bölünme ve fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır. IGFBP afinitesini değiştiren bu translasyon sonrası modifikasyonlar IGFBP'lere karşı hücrel yanıtları da değiştirir.(Clemmons,2016).

Nükleer lokalizasyon ve hücre yüzeyi protein etkileşimi için önemli olan benzersiz sekans bölgeleri de vardır. Genel olarak bu etkileşimlerin, bağlama proteinine IGF-1 veya -2 bağlanmasından bağımsız olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bazı çalışmalar, IGFBP'lerin hücrelere girebileceğini ve çeşitli hücre içi hedeflere bağlanabileceğini, böylece çeşitli hücrel işlevleri değiştirdiğini göstermiştir. Jones ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hem IGFBP-1 hem de -2, $\alpha 5\beta 1$ integrine bağlanmaya aracılık eden RGD sekansları içerir ve bu bağlanma etkileşimi, hücre göçünün uyarılması ile ilişkilendirilmiştir.(Jones, 1993).Benzer şekilde, Feng ve arkadaşları bu integrine bağlanan IGFBP-2'nin, hücre adezyonunu değiştirdiği göstermiştir.(Feng,2015). Russo ve arkadaşları, IGFBP-2'nin heparin bağlanma alanı (HBD) yoluyla hücre yüzeyi ve hücre dışı matriks üzerindeki glikozaminoglikanlara bağlandığı ve bu etkileşimin hücre göçünü değiştirdiği göstermiştir.(Russo vd.,2005).

Hücre yüzey proteinleri ve hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşimler yağ karbonhidrat protein ve kemik metabolizması ile ilgilidir. Bu etkileşimler hücrel fonksiyonları değiştirir ve bazı durumlarda IGF-1 ve 2 etkilerini kontrol etmek için reseptörlerinin aktivasyonundan sonra aktive edilen sinyalleme elemanları ile koordineli olarak çalışırlar.(Clemmons, 2016)

1.4.3.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3

Bu çalışmada, kanser, diyabet ve birçok metabolik hastalığın oluşum ve gelişiminde hem biyobelirteç hem de alternatif bir tedavi için bir biyoteröpatik ajan olarak görülen IGFBP-3'ün, *E. coli* hücrelerinde üretimi denenmiştir.

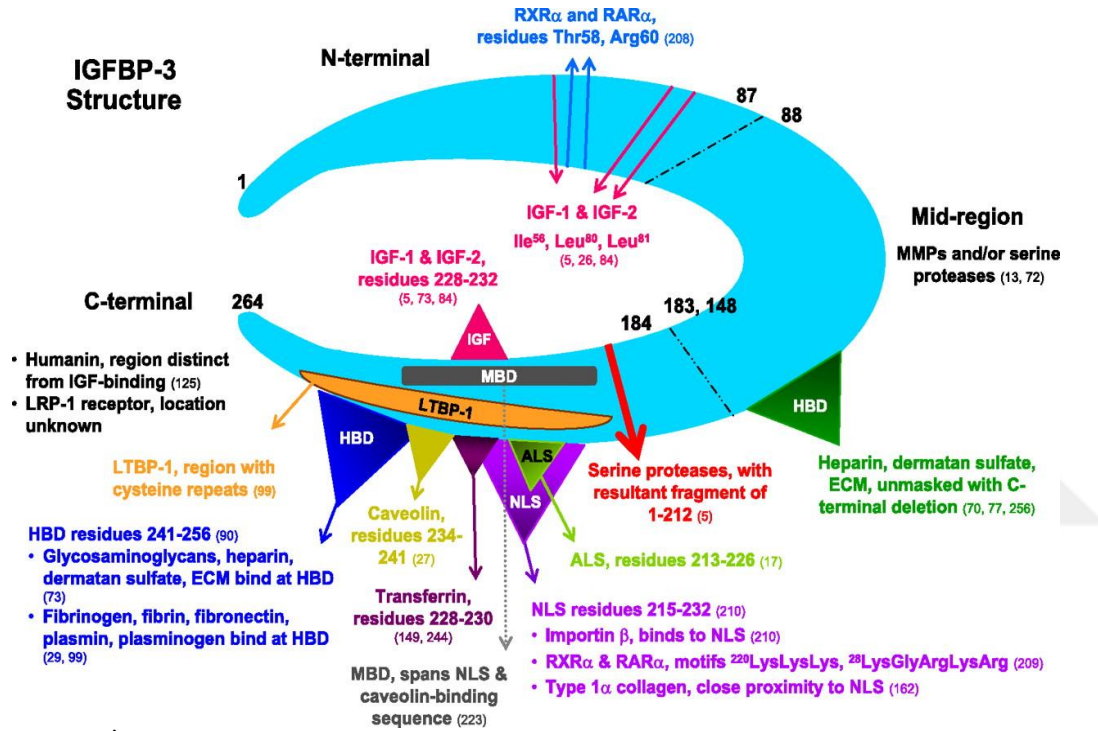
İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3, IGFBP ailesinin diğer beş üyesine güçlü bir bağlantıya sahip olan çok işlevli bir proteindir. (Daza vd.,2011). IGFBP-3'ün molekül ağırlığı, 35 kDa 'dur. (Wood vd.,1988) IGFBP-3, tek bir bağlanma yeri için rekabet eden IGF-I ve IGF-II için ana dolaşım taşıma proteinidir. (Martin ve Baxter, 1986).Yapısında oniki sistein aminosidi ve altı disülfid bağı içerir.

Dolaşımdaki IGFBP'lerin %60'dan fazlası IGFBP-3'tür. IGFBP-3 IGFBP'lerin en önemli olanıdır. IGFBP-3 diğer IGFBP'ler gibi bir çok hücre tipi tarafından salgılanır ve dolaşımda yetişkinlerde 3-5mg/L konsantrasyonlarında bulunur. (Friedrich vd., 2014). Ancak diğer bağlayıcı proteinlerin aksine, IGFBP-3 üretiminin birincil alanları sadece karaciğerin epitel hücreleri değil, aynı zamanda IGF üretiminin birincil bölgeleri olan hepatositlerdir. Bu nedenle IGFBP-3, böbrek, bağırsak, rahim ve plasenta gibi çeşitli diğer dokularda da üretilir. İnsanlarda IGFBP-3 üretiminin başlıca regülatörleri büyüme hormonu ve beslenme faktörleridir.

IGFBP-3 potansiyel bir hücre büyüme inhibitörüdür. Farklı hücre kültürlerinde IGFBP-3'ün IGF ile bağlı olmadığında DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. (Ranke ve Emeritus, 2015). Ayrıca Firth ve Baxter tarafından IGFBP-3'ün, IGF-1 ve IGF-2'nin anabolik ve mitojenik peptidlerini yüksek afinite ile bağlayıp ve ortak reseptörlerine erişimlerini kısıtlayarak, *in vitro* ve *in vivo* birçok sistemde büyüme önleyici etkisi olduğundan bahsedilmiştir. (Firth ve Baxter,2002). İzole IGFBP-3 fragmanlarının IGF-bağlanma afinitesi önemli ölçüde azalmış olmasına rağmen, çeşitli hücre sistemlerinde büyüme-engelleyici aktiviteyi muhafaza ettiği yönünde raporlar bulunmaktadır.(Lalou vd.,1997).

Ortak bağlayıcı bölgede, heparin bağlanma alanları (HBD) bulunur. Başka bir HBD bağlama alanı C- terminal bölgede bulunur. IGF bağlanması, hem N- hem de C- terminallerinde meydana gelir ve Ile56, Leu80, Leu81 içeren N-terminal bölgesi, IGF-1 bağlanması için önemli olan bir hidrofobik cebe katkıda bulunur. Birçok moleküler etkileşim C- terminal dizisinde bulunmaktadır.

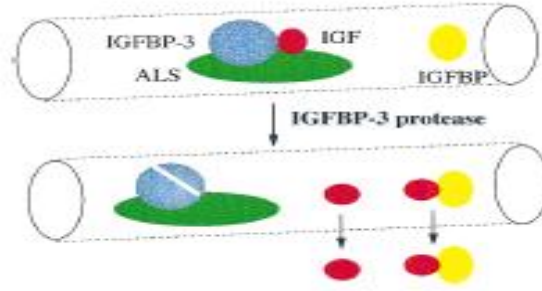
Örneğin, C- terminalinde 228-232 kalıntıları, ALS, IGF-1 ve heparin bağlanması için gereklidir. C-terminalde 215-232 arasındaki önemli kalıntılarda, nükleer transport faktörü importin- β yoluyla çekirdeğe translokasyona neden olan bir nükleer lokalizasyon dizisi (NLS) bulunmaktadır. N-terminalindeki kalıntılar ve C- terminalindeki motifler, nükleer partnerler RXR α ve retinoik asit reseptörü (RAR α) ile etkileşime girmektedir. NLS'yi ve bir kaveolin bağlama dizisini kapsayan bir metal bağlama alanı (MBD), C- terminalinde bulunur. (Yamada ve Lee, 2009).



Şekil.1.8. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 yapısı ve bağlama bölgeleri. (Yamada ve Lee, 2009).

IGF-1, IGFBP-3, ALS Üçlü Kompleksi:

Dolaşımdaki IGFBP-3'lerin %90'ından fazlası IGF-1 veya IGFBP-3 ve ALS (acid labile subunit) olarak yüksek moleküler kütleli üçlü bir kompleks halinde bulunur. (Baxter vd., 1989) IGF'ler 150-kDa kompleksler halinde taşınırlar. Bu durum, IGF'lerin plazmada yarılanma ömrünü uzatır ve hedef dokular için bir IGF rezervuarı sağlar. 150-kDa'lık üçlü kompleksin oluşumu, dolaşımdaki IGF'lerin dokulardaki biyoaktivitesini belirler. (Rechler, 1993).



Şekil.1.9. IGF'lerin IGFBP-3 ile plazmada taşınması. IGFBP-3 (mavi) 'ün proteolizinin sınırlandırılması, IGFBP-3'ün ALS(yeşil) ile birlikte 150-kDa'luk kompleksin bir parçası olması ile olur. 30-kDa'luk IGFBP-3 fragmenti IGF'ler(kırmızı) ile bağlanır ancak küçük fragment IGF'ler ile bağlanmaz. İki fragment de 150-kDa kompleksle bağlı kalır ancak IGF'nin ayrılması kolaylaşır. Serbest bırakılan IGF, endotel bariyer tek başına veya diğer düşük molekül ağırlıklı IGFBP'lerle (sarı) aşar. (Rechler ve Clemmons, 1998)

Lassarre ve Binoux, 30kDa'luk IGFBP-3 fragmentinin IGF-1 için 50 kat daha az affiniteye sahip olduğunu (ayrıca IGF-II için de 20 kat daha az affiniteye sahip olduğunu) böylece proteolizin kısıtlandığını ve IGF-1'in 150kDa'luk kompleksten salınımını kontrol ettiğini belirlemiştir.(Lassarre ve Binoux, 1994).

Blat ve arkadaşları IGFBP-3'ün proteolitik aktivitesini arttırmanın serumdaki IGF-1'leri serbest bıraktığını ve *in vitro*'da yüksek mitojenik aktivitesi belirlemiştir. (Blat vd.,1994).

150 kDa kompleks ile birlikte IGFBP-3'ün sınırlı proteolizinden sorumlu proteaz belirlenememiştir. Matriks metaloproteaz 1 ve 3 'ün ikisi de ve serin proteaz, hamile tavşan serumunda IGFBP-3 proteaz aktivitesine katkıda bulunur, ama IGFBP-3'ün direkt proteolizi veya proteaz aktivitesindeki önemleri henüz net değildir. Katyon bağımlı serin proteaz hamile insan serumunda IGFBP-3'ün proteolitik aktivitesine plazmi ve thrombin ile birlikte katkıda bulunur. (Rechler ve Clemmons, 1998)

IGFBP-3 ile yapılan klinik çalışmalardan özetlenirse;

IGFBP-3 proteaz aktivitesi cerrahi, akut tıbbi hastalık ve kronik hastalıklar (HIV enfeksiyonu, çocuklarda protein yoksunluğu ve yetersiz kontrollü diyabet) sırasında artar ve tedavi veya iyileşme sonrasında azalır, bu durum metabolik hastalıklara genel tepkiye katkıda bulunduğunu düşündürür. (Davenport vd.,1992).

IGFBP-3'ün 29 kDa'lık bir N terminal proteolitik parçası, kronik böbrek yetmezliği olan hastaların serumunda birikir (Durham vd.,1997).

IGF'lere ait olan biyolojik etkinin büyük bir kısmı bir otokrin veya parakrin seviyesinde gerçekleşmesine rağmen, plazmada 150-kDa kompleksinden IGF'lerin salınımı, dolaşımdaki IGF'lerin önemini tartıştırmaktadır.

IGFBP-3, IGF-1 varlığından daha düşük etkileşimde olsa da, IGF-1 yokluğunda *in vitro*'da ALS ile etkileşime girebilir. (Lee ve Rechler ,1995).

150 kDa'luk kompleksin, endotel hücre bariyerini geçememesi, hipoglisemi riski olmadan IGF'lerin yüksek konsantrasyon plazmada bulunmasına olanak verir. Bu homeostatik mekanizmanın bozulması, IGF-II mRNA aşırı üreten ve kısmen işlenmiş olarak salınan mezenkimal tümörler bulunan insülinin yokluğunda hipogliseminin görüldüğü ,non-reseptör hücre tümörü hipoglisemi sendromuna (NICTH) neden olur. (Zapf ,1995).

Hipoglisemideki kritik faktör, hipoglisemi hastalarının plazmalarındaki IGF-II'nin 150-kDa komplekslerinden kılcal bariyeri geçebilecek 50- kDa komplekslerine yeniden dağıtılmasıdır. (Daughaday ve Kapadia,1989).

150-kDa kompleks oluşumunun azaltılması, kısmen IGF-II öncüsü tarafından pituitar büyüme hormonu (GH) sentezinin bastırılmasıyla sonuçlanır ve bu da GH'ye bağımlı ALS'in sentezini azaltır. Yaşlı bir NICHT hastasının GH tedavisi, 150 kDa komplekslerini restore etmiş ve bir yıldan fazla bir sürede hipoglisemi başarılı bir şekilde tersine çevrilmiştir. (Baxter vd.,1995).

Twigg ve Baxter'ın çalışmasında belirtildiği üzere diğer IGFBP'ler arasında yalnızca IGFBP-5, ALS ile benzer kompleksler oluşturur. (Twigg ve Baxter,1998).

2.MATERYAL

2.1.Kimyasallar

Maya ekstraktı, Sodyum Klorür (NaCl), Tripton, Agar, Ampicillin, Agaroz SafeView boya, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Sodyum Hidroksit (NaOH), Sarkosyl, Üre, Tris, Hidroklorik asit(HCl), Potasyum Asetat(KAc), Potasyum Klorür(KCl), Kalsiyum Klorür(CaCl₂), Mangan(II) Klorür(MnCl₂), Gliserol, Asetikasit, 3-(N-morpholino)propansülfonik asit(MOPS), Potasyum Hidroksit (KOH), Etilendiamin tetraasetik asit(EDTA), Potasyum Fosfat Monobazik(KH₂PO₄), Potasyum Fosfat Dibazik(K₂HPO₄), 2-merkaptotanol, %30 Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi, Amonyum Persülfat(APS), N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin(TEMED) Bromfenol Blue, İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid(IPTG), Coomassie Brilliant Blue. Sigma ve Carl Roth firmalarından temin edildi.

2.2. Tamponlar ve Çözeltiler

Ampisillin Stok Çözeltisi:

150mg/μl ampisilin distile suda çözüldü. Steril filtreden geçirildi ve alikodlandı.

TBF-1 Tamponu:

30mM KAc, 100mM KCl, 2mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, %15 gliserol çözeltisi hazırlandı. pH:5.8 2M asetik asit ile ayarlandı. Steril filtreden geçirildi.

TBF-2 Tamponu:

10mM MOPs, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, %15 gliserol pH:6.8 2M KOH ile ayarlandı. Steril filtreden geçirildi.

TAE Tamponu(10X):

48,4 g Tris, 10 mL asetik asit, 2,92 g EDTA 1litre saf suda çözülerek hazırlandı.

%1 (w/v) Agaroz Jel:

Agaroz jel ihtiyaç olan hacimde 1X TAE tamponunda ısıtılıp çözülerek hazırlandı.

IPTG:

0,5M IPTG stok çözeltisi hazırlandı.

Homojenizasyon Tamponu:

50mM KH_2PO_4 , 300mM NaCl hazırlandı. 2 M K_2HPO_4 ile pH:7.4'e ayarlandı.

Lizis Tamponu:

50mM Tris, 200mM NaCl, 20mM 2-merkaptoetanol hazırlandı. HCl ile pH:7.8'e ayarlandı.

SDS-PAGE Ayırma Jeli Tamponu:

0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8 hazırlandı.

SDS-PAGE Ayırma Jeli:

İki jel kapasiteli, jel dökme tankı için; 3,37mL distile su; 2,6mL ayırma jeli tamponu; 4mL %30 akrilamid bisakrilamid çözeltisi; 0,05mL %10 APS; 0,01mL TEMED hazırlanıp jelleşmeden döküldü.

SDS-PAGE Üst Jel Tamponu:

0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH: 6,8 hazırlandı.

SDS-PAGE Üst Jel:

3,05mL distile su; 1,5mL üst jel tamponu; 0,67mL %30 akrilamid bisakrilamid çözeltisi; 0,025mL %10 APS; 0,005mL TEMED ayırma jeli donduktan sonra hazırlanıp döküldü.

SDS- PAGE Yürütme Tamponu(10X):

%1 SDS, 2M Glisin, 0,25M Tris-HCl pH:8,5 hazırlandı.

SDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu:

0,25M Tris-HCl, %20 gliserin, %4 SDS, %0,04 Bromfenol Blue, %5 2-merkaptoetanol hazırlandı.

Coomassie Boyama Çözeltisi:

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 50 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) asetik asit hazırlandı.

2.3. PCR Karışımı

MgCl_2 , pET vektörü için 5'T7 Promotor, 3'T7 Terminatör primerleri, Green GoTaq reaksiyon tamponu, DNA polimeraz, dNTP karışımı, kalıp DNA

2.4.Enzimler

DNA polimeraz, HindIII ve XhoI fast digest restriksiyon enzimleri, DNA ligaz enzimleri kullanıldı. İlgili enzimler NEB ve ThermoScientific firmalarından temin edildi.

2.5.Kitler

Thermo Sci. GeneJET Jel Ekstrasyon Kiti ve Thermo Sci. GeneJET Genomic DNA Saflaştırma Kiti kullanılmıştır.

2.6.Cihazlar

Termal cyclers, sonikatör, soğutmalı santrifüjler, tartı, -80 ve -20 °C dondurucu, UV lamba, agaroz jel elektroforezi yürütme sistemi, SDS-PAGE yürütme sistemi, spektrometre, çalkalayıcı inkübatörler, mikrodalga, manyetik karıştırıcı, pH metre, buz makinesi, vorteks, termal blok, orbital karıştırıcı, otoklav.

2.7.Diğer Sarf Malzemeler

PCR tüpleri (0,2 ml), ependorf tüpler(1,5 ve 2ml), falkon tüpler(15 ve 50ml) steril petri kapları, steril filtreler 0,2 µm,erlenler, pipet uçları, HisPur Ni-NTA manyetik boncuklar, GeneRuler Express DNA Ladder, Pierce™ Unstained Protein Marker.Thermo Scientific firmalasından temin edildi.

2.8.Bakteriler

Bu çalışmada, moleküler biyoloji çalışmalarında birçok suşu rutin olarak kullanılan gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* (*E.coli*) 'nin üç farklı suşu kullanılmıştır.

2.8.1. *E.coli* Turbo

Bu suş klonlama çalışmalarında kullanılmıştır. Suş özellikleri aşağıda açıklanmıştır. Bu özelliklerin nedeni olan genotipler parantez içinde verilmiştir.

Mavi/Beyaz Görüntü (F' Δ(lacZ)M15): β-gal'in ω-fragmentini yapar; Δ(lacproAB) kromozomdaki β-gal genini siler. pUC19 ve benzer plazmidler β-galaktosidazın α-peptidini kodlar. (lacZ). α-peptid, ω-fragment ile F' üzerinden taşınarak birleşir. β-galaktosidaz bu şekilde yeniden oluşarak X-gali parçalayabilir ve platete mavi koloniler oluşturabilir.

Rekombinasyon (recA+): Homolog dizileri rekombine eden bir tamir sistemine sahiptir.

Endonukleaz I (endA1): Wild tip *E.coli* hücreleri periplazmik boşluklarında nonspesifik endonukleazlar bulunur. Bu hücrelerden hazırlanan plazmidlerin degradasyonuna neden olabilir. Bu mutasyon endonukleazları kaldırır bu nedenle daha güvenlidir.

Δ(hsdS-mcrB)5: Wild tip *E. coli* K12 suşlarının DNA'yı AAC(N6)GTGC ve GCAC(N6)GTT bölgelerinden parçalayan EcoK Tip I restriksiyon endonukleazları vardır. *E. coli* DNA'ları metil –transferaz ile bu degradasyondan korunur ancak yabancı DNA bu bölgelerden kesilebilir. hsdS silme hem endonukleazı hem de EcoK metiltransferaz aktivitesini ortadan kaldırır.

E.coli mcrA, mcrB ve mrr tarafından kodlanan, ökaryotik hücrelerde tipik metilasyon kalıpları ile DNA'yı parçalayan enzim sistemine sahiptir.

M13 faj duyarlılığı (F'): M13 ve diğer benzer fajlar tarafından enfeksiyon bazı *E.coli* suşları tarafından taşınan F plazmidinin sağladığı *E.coli* yüzey özelliklerini gerektirir. F plazmid genellikle diğer yararlı DNA'ları yaşımak için modifiye edilir. Modifiye edildiği zaman F' olarak adlandırılır.

T1 Faj Direnci (fhuA2): T1, aşırı derecede virülant bir fajdır ve infektivitesi için *E.coli* ferrik hidtoksamat alım reseptörü gereklidir. Bu genin silinmesi hücrenin transformasyon etkinliğini veya büyüme karakteristiğini etkilemeden bu faja dirençlilik sağlar.

Lac Promotor Kontrolü (lacIq): Lac represörü, ekspresyon plazmidleri tarafından sıklıkla taşınan lac tac ve trc promotorlarından ekspresyonu bloke eder. Lac represörü seviyesi, transformasyon veya hücre büyümesi sırasında bu promotorlar yoluyla ekspresyonu inhibe etmek için yeterli değilse, düşük ekspresyon seviyeleri bile transformasyon verimliliğini azaltır ve istenmeyen transformantlara karşı seçilebilir. lacIq suşlarındaki Lac represörlerinin ekstra molekülleri, IPTG

eklenene kadar promotor aktivitesini en aza indirmeye yardımcı olur.(NEB, a, 2018)

2.8.2. *E.coli* BL21

Bu suş protein üretimi çalışmalarında kullanılmıştır. Suş özellikleri aşağıda açıklanmıştır. Bu özelliklerin nedeni olan genotipler parantez içinde verilmiştir.

T7 RNA Polimeraz(T7 gene1): Kromozom içinde bulunan λ DE3 profajı ile kodlanır. T7 RNA polimeraz lacUV5 promotöründen eksprese edilir.bu katabolit baskılanmasına wt lac promotöründen daha az duyarlıdır. Böylece DE3 suşları indüklenmemiş hedef protein ekspresyonu gösterir. λ DE3 normalde ev sahibi kromozomda uykuda olsa da, SOS kaskadının indüksiyonu *E.coli* kromozomuna doğrudan ya da dolaylı olarak zarar veren proteinlerin sentezlenmesi sonucu ortaya çıkar. Bu hücre lizisine neden olur. T7 Express suşları DE3 profajı taşımaz ve SOS yanıtını daha iyi tolare eder.

Proteaz Eksikliği ([lon] ompT): *E.coli* B suşlarının, K-12 suşlarında yanlış katlanmış proteinleri bozmaya ve bazı hücre döngüsüne özgü proteinlerin birikmesini önlemeye yarayan lon proteazları yoktur. OmpT proteazı, hem K-12 hem de B suşlarında wild tip *E.coli*'nin yüzeyinde bulunur ve muhtemelen hücrelerin dış ortamlarından amino asitleri türetmesine yardımcı olur. Bu iki proteazı olmayan hücreler, klonlanmış genlerden elde edilen proteinlerin üretimine daha uygundur.

T1 Faj Direnci(fhuA2): T1, aşırı derecede virülant bir fajdır ve infektivitesi için *E.coli* ferrik hidtoksamat alım reseptörü gereklidir. Bu genin silinmesi hücrenin transformasyon etkinliğini veya büyüme karakteristiğini etkilemeden bu faja dirençlilik sağlar.(NEB, b, 2018)

2.8.3. *E.coli* Shuffle T7 Express

Bu suş protein üretimi çalışmalarında kullanılmıştır. Suş özellikleri aşağıda açıklanmıştır. Bu özelliklerin nedeni olan genotipler parantez içinde verilmiştir.

Sitoplazmada disülfid bağları oluşumu: Normalde *E.coli* sitoplazmasındaki redüktaz, sisteinleri redüklenmiş formda tutar böylece burda oluşabilecek herhangi bir disülfid bağı azaltır. Shuffle, glutaredoksin redüktaz ve tioredoksin

redüktaz için silinen genlere sahiptir(Δ gor Δ trxB), bunlar sitoplazmada disülfid bağı oluşumuna izin verir. Mutasyonların bu kombinasyonu normalde öldürücüdür, ancak bu durum peroksietoksin enzimindeki bir mutasyonla bastırılır(ahpC *).Ek olarak Shuffle Express, periplazmik disülfid bağı izomeraz DsbC'nin sinyal sekansı olmayan ve onu sitoplazmada tutan bir versiyonudur. Bu enzimin, yanlış oksitlenmiş bağları düzeltmek ve uygun katlanmayı desteklemek için çoklu disülfid bağları olan proteinler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Sitoplazmik DsbC için gen, kromozom üzerinde bulunur.

Endonükleaz I Eksikliği (endA1): Wild tip *E.coli* hücreleri periplazmik boşluklarında nonspesifik endonükleazlar bulunur. Bu hücrelerden hazırlanan plazmidlerin degradasyonuna neden olabilir. Bu mutasyon endonükleazları kaldırır bu nedenle daha güvenlidir.

Proteaz Eksikliği ([lon] ompT): *E.coli* B suşlarının, K-12 suşlarında yanlış katlanmış proteinleri bozmaya ve bazı hücre döngüsüne özgü proteinlerin birikmesini önlemeye yarayan lon proteazları yoktur. OmpT proteazı, hem K-12 hem de B suşlarında wild tip *E.coli*'nin yüzeyinde bulunur ve muhtemelen hücrelerin dış ortamlarından amino asitleri türetmesine yardımcı olur. Bu iki proteazı olmayan hücreler, klonlanmış genlerden elde edilen proteinlerin üretimine daha uygundur.

T1 Faj Direnci(fhuA2): T1, aşırı derecede virülan bir fajdır ve infektivitesi için *E.coli* ferrik hidrotoksamat alım reseptörü gereklidir. Bu genin silinmesi hücrenin transformasyon etkinliğini veya büyüme karakteristiğini etkilemeden bu faja dirençlilik sağlar.(NEB,c,2018)

2.9.Vektörler

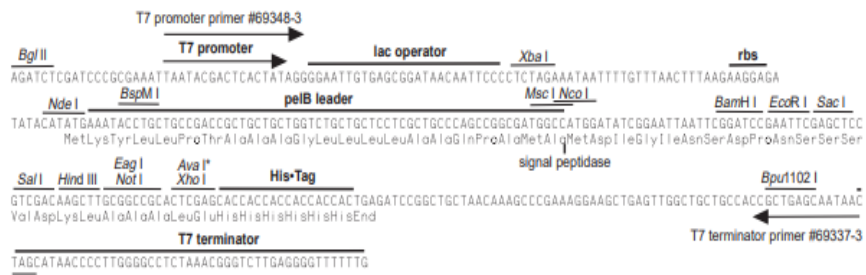
pET sistemi, *E.coli*'de rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilmiş en güçlü sistemdir. Hedef genler, güçlü bakteriyofaj T7 transkripsiyonu ve (isteğe bağlı olarak) translasyon sinyallerinin kontrolü altında pET plazmidlerinde klonlanır, ekspresyon, konakçı hücrede bir T7 RNA polimeraz kaynağı sağlanarak indüklenir.T7 RNA polimerazı, hücrenin kaynaklarının hemen hemen hepsinin hedef gen ifadesine dönüştürüldüğü çok seçici ve aktiftir; İstenen ürün, birkaç saatlik indüksiyondan sonra toplam hücre proteininin% 50'sinden fazlasını içerebilir. Bu sistemin bir başka önemli yararı,

indüklenmemiş durumda hedef genlerin korunma kabiliyetidir. Hedef genler başlangıçta T7 RNA polimeraz genini içermeyen konakçı kullanılarak klonlanır, böylece konakçı hücreye potansiyel olarak toksik olan proteinlerin üretiminin neden olduğu plazmid kararsızlığı ortadan kaldırılır. Bir nonexpression konakçıda oluşturulduktan sonra, plazmidler daha sonra lacUV5 kontrolü altında T7 RNA polimeraz geninin bir kromozomal kopyasını içeren ekspresyon konakçılarına aktarılır ve ekspresyon IPTG ilavesiyle indüklenir. İki tip T7 promoteri ve bazal ekspresyon seviyelerini baskılamak için farklılıklar gösteren çeşitli konaklar mevcuttur, bu da büyük esneklik sağlar ve çok çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu optimize eder.

Bu çalışmada pET 21a ve pET 22b olmak üzere iki farklı pET vektörü kullanıldı.

2.9.1. pET22b

pET-22b vektörü; potansiyel periplazmik lokalizasyon için bir N-terminal pelB sinyal dizisini ve C-terminali His - Tag dizisini taşır. Plazmid haritası aşağıda verildi. *E.coli* periplazmasında bulunan disülfid oksidoredüktazlar ve izomerazlar, periplazmayı belirli terapötik proteinlerin ekspresyonu için ideal bir bölüm haline getirerek, disülfid bağlarının oluşumunu katalize ederek uygun şekilde katlanmış, çözünebilir proteini sağlar.



pET-22b(+) cloning/expression region

Şekil.2.1. pET-22b vektörü klonlama ve ekspresyon bölgeleri. (Novagen, a, 2018)

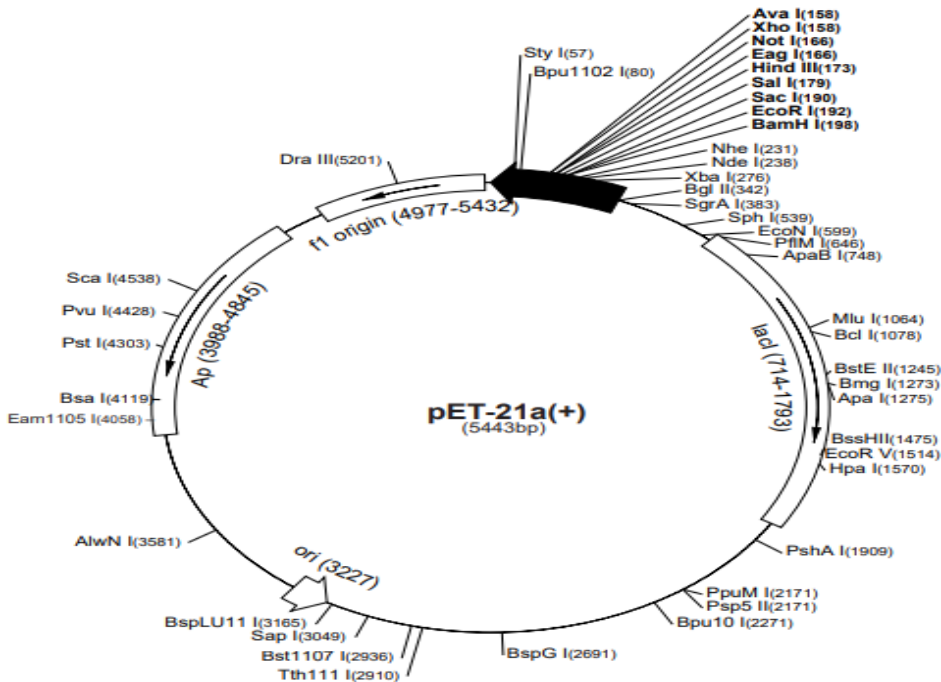
GenScript firmasından IGFBP-3 gen bölgesi klonlanmış olarak sipariş edilen pET22b/IGFBP-3 gen dizisi aşağıdaki gibidir. Periplazmik lokasyon için pelB sinyal dizisini içeren bu vektör protein ekspresyonu için *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edildi.

AGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATT
 TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCG
 AGCTCCGTCGAC**AAGCTT**ATGGGCGCGAGCAGCGCGGGCCTGGGCCCGGTGGTGCCTTGCGAACCGTGCATGCGCG
 TGCCTGGCGCAGTGCAGCGCCGCCGCGGCGGTGTGCGCGGAACCTGGTGCCTGAACCGGGCTGCGGCTGCTGCCTGA
 CCTGCGCGCTGAGCGAAGGCCAGCCGTGCGGCATTATACCGAACGTTGCGGCAGCGCCTGCGTTGCCAGCCGAGC
 CCGGATGAAGCGCTCCGCTGCAGGCGCTGCTGGATGGCCGTGGCCTGTGCGTGAACGCGAGCGCGGTGAGCCGTCT
 GCGTGCCTATCTGCTGCCGCGCGCCGCCGCGCGGGCAACGCGAGCGAAAGCGAAGAAGATCGTAGCGCGGGCAGC
 GTGAAAGCCCGAGCGTGAGCAGCACCCATCGTGTGAGCGATCCGAAATTCATCCGCTGCATAGCAAAATTATTATT
 ATTAAGGATGCGAAAGATAGCCAGCGTTATAAAGTGGATTATGAAAGCCAGAGCACCGATACCCAGAATTT
 AGCAGCGAAAGCAAACGTGAAACCGAATATGGCCCGTCCGTCGTGAAATGGAAGATACCTGAACCATCTGAAATTT
 CTGAACGTGCTGAGCCCGCTGGCGTGCATATCCGAATGCGATAAAAAAGGCTTTTATAAAAAAACAGTGCCGT
 CCGAGCAAAGGCCGTAAACGTGGCTTTTGTGGTGCCTGGATAAATATGGCCAGCCGCTGCCGGGCTATACCACAAA
 GGCAAAGAAGATGTGCATTGCTATAGCATGCAGAGCAAA**CTCGAG****CACCACCACCACCACCACT**GAGATCCGGCTGCT
 AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAA
 CGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

IGFBP-3 gen dizisi sarı ile gösterilen Hind III ve XhoI restiriksiyon bölgelerinden kesilerek pET21a vektörüne klonlandı.

2.9.2. pET 21a

pET-21a vektörü; plazmid haritası aşağıdaki gibidir. IGFBP-3 gen dizisi sarı ile gösterilen Hind III ve XhoI restiriksiyon bölgelerinden kesilerek pET21a vektörüne klonlandı. pET21a/ IGFBP-3, protein ekspresyonu için *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edildi.



Şekil.2.2.pET-21a vektörü plazmid haritası.(Novagen, b, 2018)

3.METOD

3.1.Büyüme Ortamları

Kullanılan *E.coli* hücreleri için büyüme ortamları hazırlandı.

Kullanılan büyüme ortamları;

Luria -Bertani (LB): %0,5(w/v) Maya ekstraktı, % 1(w/v) NaCl, %1 (w/v) Tripton

LB Agar: %0,5(w/v) Maya ekstraktı, % 1(w/v) NaCl, %1 (w/v) Tripton,%1,5(w/v) Agar

Seçici büyüme ortamı için kullanılan Ampisillin çözeltisi 150µg/ml stok çözeltisi olarak hazırlandı ve büyüme ortamlarına eklendi.

3.2.Sterilizasyon

Sıcaklığa dayanıklı çözeltiler, büyüme ortamları ve kullanılan sarf malzemeler(pipet uçları, ependorf tüpler) kullanılmadan önce otoklavlandı (25 dakika, 121 °C ve 2 bar).. Sıcaklığa dayanıklı olmayan çözeltiler(antibiyotik çözeltileri) stok çözelti olarak hazırlandı ve 0.2 µm membran filtreden geçirildi.

3.3.Restriksiyon Enzimleri ile Kesim ve Agaroz Jelden İzolasyon

Gen Script firmasından sipariş edilen kodon optimize pET22b/IGFBP-3 geni liyofilize olarak -20°C'de saklandı. 6000g'de 1dk +4°C santrifüjlendi. Son konsantrasyon 0,1µg/µl olacak şekilde steril su ile çözüldü.

Thermo Scientific markalı Fast Digest HindIII ve XhoI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve insert bölge alındı. Ayrıca pET21a vektörü aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim için firma prosedürü kullanıldı. +65°C'de enzim aktivitesi durduruldu. Agaroz jelle yüklendi ve elektroforez yürütüldü. UV ışık altında görülen fragmentler Thermo markalı agaroz jel izolasyon kiti ile firma prosedürüne göre alındı.

3.4.Ligasyon

Kesim sonrası jelden izole edilen insert ve vektör DNA konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyon ve boyut değişkenleri ile NEB Calculator ile hesaplanan oranlarda, insert DNA, vektör DNA, ligaz enzimi ve ligasyon tamponu

kullanılarak ligasyon karışımı hazırlandı. 16°C’de gece boyu inkübe edildi. Ligaz aktivitesi 65°C’de 10dakika inkübasyon ile durduruldu. Ligasyon karışımı, kompetent *E.coli* Turbo hücrelerine transformasyon için kullanıldı.

3.5.Kompetent Hücre Hazırlanması

Kimyasal kompetent hücre hazırlanması için -80°C’deki *E.coli* Turbo hücre stoğundan gece kültürü LB ortama ekildi. Gece kültüründen 50mL LB ortamına %1’lik inokülasyon yapıldı. OD₆₀₀ 0,4-0,5 oluncaya kadar 37°C’de 200rpm de inkübe edildi. Hücreler inkübatörden alınarak 15 dakika buzda bekletildi. Daha sonra kültür 3600rpm, +4°C’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, pellet 15mL TBF-1 tamponu ile süspanse edildi. 15dakika buzda bekletildi. 3600rpm,+4°C’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, pellet 2,5mL TBF-2 tamponunda süspanse edildi, 5 dakika buzda bekletildi. Porsiyonlandı ve -80°C’de saklandı.

3.6.Transformasyon

-80°C’de saklanan kompetent *E.coli* Turbo hücreleri 15 dakika buzda bekletildi. 50µl transformasyon tüpüne alındı. 5µl ligasyon karışımı eklendi. 30 dakika buzda inkübe edildi. 42°C’de 45 saniye ısı şoku uygulandı. 5 dakika buzda bekletildi. 950µl LB besiyeri eklendi ve 1 saat, 200rpm, 37°C’de inkübe edildi. pET21a vektörünün dirençli olduğu antibiyotik olan ampisilin içeren LB agara ekim yapıldı. 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

3.7.Koloni PCR

Ampisilin içeren seçici ortama ekilip inkübasyona bırakılan ilgili vektör taşıyan hücrelerin taraması için koloni PCR yapıldı. Her bir koloniden pipet ucu ile alınarak PCR tüpüne aktarıldı. 15µl PCR karışımı eklendi. Amplifikasyon için PCR programı: 95 °C, 5 dak; 95 °C, 45 s; 55°C, 45s ;72 °C, 2 dak (30 döngü); 72 °C, 10 dak ; 4°C, ∞. olarak ayarlandı.

3.8.Agaroz Jel Elektroforezi

Koloni PCR ürünleri Agaroz jel Elektroforezi ile kontrol edildi.%1 (w/v) agaroz 1X TAE tamponu ile çözülerek hazırlandı. Görüntüleme için SafeView

boyası eklendi. Jel ünitesine döküldü, sertleştikten sonra taraklar çıkarıldı ve 1XTAE tamponu üzerini geçecek kadar eklendi. 6X yükleme tamponu ile karıştırılan tüm PCR ürünleri jel kuyucuklarına yüklendi. 100volt, 30 dakika yürütüldü. DNA fragmentleri UV ışık altında görüntülendi.

3.9.Ekspresyon Suşlarına Transformasyon

E.coli Turbo hücrelerinden izole edilen pET21a/IGFBP-3 ve pET22b/IGFBP-3, materyal bölümünde bahsedilen plazmid ve suş özellikleri nedeni ile pET21a/IGFBP-3 *E.coli* Shuffle T7 Express suşuna ve pET22b/IGFBP-3 *E.coli* BL21 suşuna olmak üzere iki farklı ekspresyon suşuna transforme edildi.

-80°C'den alınan *E.coli* BL21 ve *E.coli* Shuffle T7 Express hücreleri buz üzerinde çözülmesi için 15 dakika bekletildi. Her ikisinden 50'µl alınarak iki farklı transformasyon tüplerine eklendi. Yaklaşık 1ng plazmid eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi. 42°C'de 45 saniye ısı şoku uygulandı. 5 dakika buzda bekletildi. 950µl LB besiyeri eklendi ve 1 saat, 200rpm, 37°C'de inkübe edildi. pET21a ve pET 22b vektörlerinin dirençli olduğu antibiyotik olan ampisilin içeren LB agara ekim yapıldı. *E.coli* BL21 suşu 37°C'de, *E.coli* Shuffle T7 Express suşu 30°C'de gece boyu inkübe edildi.

Test ekspresyonunda kontrol olarak kullanmak için IGFBP-3 gen dizisini içermeyen boş pET21a ve pET22b vektörleri de *E.coli* suşlarına transforme edildi.

3.10. Protein Üretimi

pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express ve pET22b/IGFBP-3 *E.coli* BL21 'in ampisilin içeren LB agardaki kolonilerinden alınan hücreler 150mg/ml stok ampisilin çözeltisinden 50µl eklenen 50ml LB sıvı ortamına ekildi. *E.coli* BL21 hücreleri 200rpm 37°C'de, *E.coli* Shuffle T7 Express hücreleri 200rpm 30°C'de gece boyu inkübe edildi. Gece kültürlerinden, ampisilin içeren 50ml'lik LB ortamlarına %2lik inokülasyon yapıldı. *E.coli* BL21 hücreleri 37°C'de, *E.coli* Shuffle T7 Express hücreleri 30°C'de 200rpm'de, OD₆₀₀ 0,4-0,6 olana kadar inkübe edildi.

Ekspresyonun testi için farklı 0,5mM, 0,3mM, 0,2mM IPTG konsantrasyonlarında indüklendi ve farklı sıcaklık ve saatlerde (*E.coli* Shuffle T7

Express 30°C 4 saat, 16°C 18 saat; *E.coli* BL21 25°C 18saat, 16°C 48 saat) 200rpm’de inkübasyona bırakıldı.

Her bir deneme için erlenler inkübatörden alındıktan sonra falkon tüplerde +4°C’de 4000rpm’de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Süspansiyon sonikasyon işlemine maruz bırakılarak hücreler parçalandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan homojenat +4°C’de 13000rpm’de 30 dakika santrifüjlendi. Pellet 1ml homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Supernatant ve pellet SDS-PAGE için jel kuyucuklarına yüklendi.

SDS-PAGE için ayırma jeli, üst jel, yürütme tamponu ve örnek yükleme tamponu materyal bölümünde bahsedildiği gibi hazırlandı. Jel hazırlandı. Örnekler 1:1 oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. 95°C’de 10 dakika inkübe edildi. Her bir örnekten 5’er µl kuyucuklara yüklendi. Jel yürütme tankına konuldu. Tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. 25 mA, 100 V ‘ta yaklaşık 1,5 saat jelde yürütüldü. Jel yürütme tankından çıkarıldı ve boyandı. 10 dakika fazla boyadan arındırılması için kaynatıldı ve görüntülendi.

3.11. Çözünür Proteinin Elde Edilmesi İçin Uygulanan Yöntemler

Protein çözünür formda üretilemediği için, pelletten çözünür forma alınması için dört farklı yöntem uygulandı.

3.11.1. Sarkozil

Erlenler protein üretiminden sonra inkübatörden alındıktan sonra falkon tüplerde +4°C’de 4000rpm’de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler referans makalede önerilen oranda, %2 sarkozil içeren lizis tamponu ile süspanse edildi. (Massiah vd., 2016) 2 saat orbital karıştırıcıda karıştırıldı. Süspansiyon sonikasyon ile parçalandı. Örneklerin bir kısmı alınarak gece boyu +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Parçalanmış hücrelerden oluşan homojenatlar +4°C’de 13000rpm’de 30 dakika santrifüjlendi. Pellet 1ml homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Supernatant ve pellet SDS-PAGE için jel kuyucuklarına yüklendi.

3.11.2.Üre

Erlenler protein üretiminden sonra inkübatörden alındıktan sonra falkon tüplerde +4°C'de 4000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Süspansiyon sonikasyon ile parçalandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan homojenat +4°C'de 13000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Pellet referans makalede önerilen oranda, 2M üre içeren 3ml homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Homojenize edilen pellet tekrar santrifüjlendi.(Patra vd, 2000) Yeni elde edilen supernatant, supernatant ve pellet SDS-PAGE için jel kuyucuklarına yüklendi.

3.11.3.Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

Erlenler protein üretiminden sonra inkübatörden alındıktan sonra falkon tüplerde +4°C'de 4000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Süspansiyon sonikasyon ile parçalandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan homojenat +4°C'de 13000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Protein agregatlarının çözünür hale getirilmesinde deterjan olan SDS kullanılan yöntemlerden biridir.(Singh ve Panda, 2005) Pellet %1 SDS içeren 1ml homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Homojenize edilen pellet tekrar santrifüjlendi. Yeni elde edilen supernatant, supernatant ve pellet SDS-PAGE için jel kuyucuklarına yüklendi.

3.11.4. Sodyum Hidroksit

Erlenler protein üretiminden sonra inkübatörden alındıktan sonra falkon tüplerde +4°C'de 4000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Süspansiyon sonikasyon ile parçalandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan homojenat +4°C'de 13000rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Pellet 0,1M NaOH içeren 1ml homojenizasyon tamponu ile süspanse edildi. Homojenize edilen pellet tekrar santrifüjlendi. Yeni elde edilen supernatant, supernatant ve pellet SDS-PAGE için jel kuyucuklarına yüklendi.

3.12. HisPur Ni-NTA Manyetik Boncuklar ile Protein Saflaştırılması

His-tag kuyruklu IGFBP-3'ün saflaştırılması için, HisPur Ni-NTA manyetik boncuklar kullanıldı. Örneklerin manyetik boncuklar ile bağlanarak protein saflaştırması yöntemi, çözünür forma alınması için denenen üre, NaOH ve SDS yöntemlerinde ayrı ayrı uygulandı. His-Tag Nikel Affinite manyetik boncuklardan 40µl alındı. 300µl pH:8 Tris-HCl tamponu ile iki kez yıkandı. 400 µl örnek eklendi 45 dakika inkübe edildi. 400µl tampon ile iki kez yıkandı. Boncuklar, SDS-PAGE ile görüntülenmesi için jel kuyucuklarına yüklendi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

IGFBP-3 yapısında 12 sistein ve 6 adet disülfidbağı içerir. Disülfid bağlarının çok olması *E.coli*'de doğru katlanmış ve çözünebilir formda protein üretimini zorlaştırdığı için farklı sistemler denenmiştir.

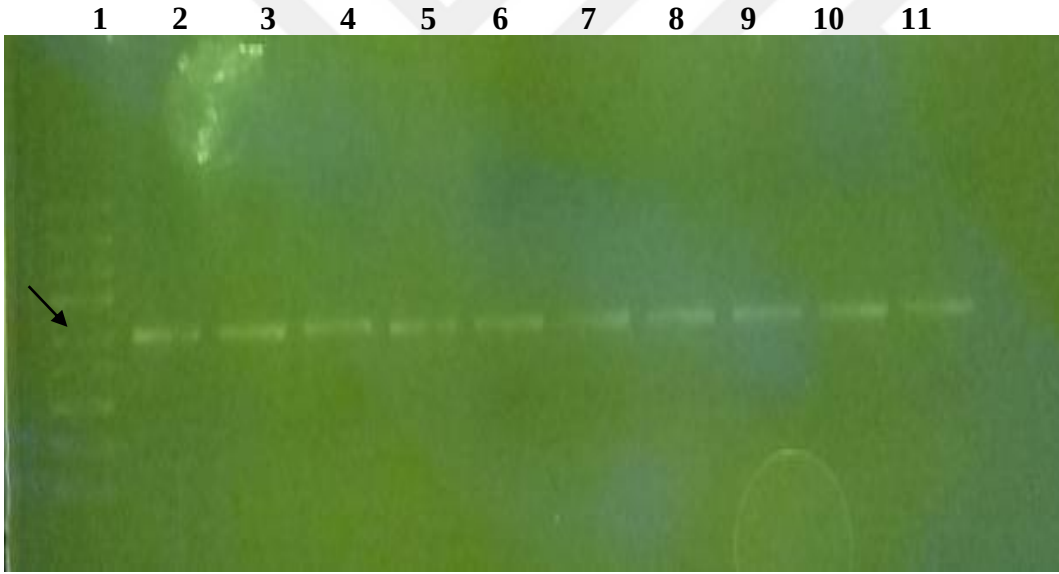
Bunlardan biri disülfid ile bağlanmış proteinlerin ekspresyonu için sentezlenmiş polipeptidleri *E.coli* periplazmasına yönlendiren N-terminal pelB salgılama sinyalinin içeren bir pET vektörleri ailesinden pET22b vektörüdür. *E.coli* periplazmasında bulunan disülfid oksidoredüktazlar ve izomerazlar, periplazmayı belirli terapötik proteinlerin ekspresyonu için ideal bir bölüm haline getirerek, disülfid bağlarının oluşumunu katalize ederek uygun şekilde katlanmış, çözünebilir proteini sağlar.

Disülfid bağlarının oluşumu ile doğru katlanmış çözünür formda protein üretimini sağlayan sistemlerden bir diğeri *E.coli* Shuffle T7 Ekspres hücrelerinin kullanılmasıdır. Normalde *E.coli* sitoplazmasındaki redüktaz, sisteinleri redüklenmiş formda tutar böylece burda oluşabilecek herhangi bir disülfid bağı azalır. Shuffle, glutaredoksin redüktaz ve tioredoksin redüktaz için silinen genlere sahiptir(Δ gor Δ trxB), bunlar sitoplazmada disülfid bağı oluşumuna izin verir. Mutasyonların bu kombinasyonu normalde öldürücüdür, ancak bu durum peroksietoksin enzimindeki bir mutasyonla bastırılır(ahpC *).Ek olarak Shuffle Express, periplazmik disülfid bağı izomeraz DsbC'nin sinyal sekansı olmayan ve onu sitoplazmada tutan bir versiyonudur. Bu enzimin, yanlış oksitlenmiş bağları düzeltmek ve uygun katlanmayı desteklemek için çoklu disülfid bağları olan proteinler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir.

4.1.Koloni PCR

Periplazmik sinyal içeren pET22b vektörüne klonlanmış olarak alınan IGFBP-3, (pET22b/IGFBP-3) *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edilip çalışmaları yapıldı. IGFBP-3 gen bölgesinin pET21a vektörüne klonlanması için yapılan kesim, ligasyon ve *E.coli* Turbo hücrelerine transformasyon aşamalarından sonra kontrol için koloni PCR yapıldı.

Materyal metod bölümünde detaylı olarak anlatıldığı üzere; kodon optimize pET22b/IGFBP-3 geni ve pET21a vektörü restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonrası jelden izole edilen insert ve vektör DNA ile hazırlanan ligasyon karışımı kompetent *E.coli* Turbo hücrelerine transforme edildi, inkübasyondan sonra görülen kolonilerden yapılan koloni PCR jel görüntüsü Şekil.4.1'deki gibidir.



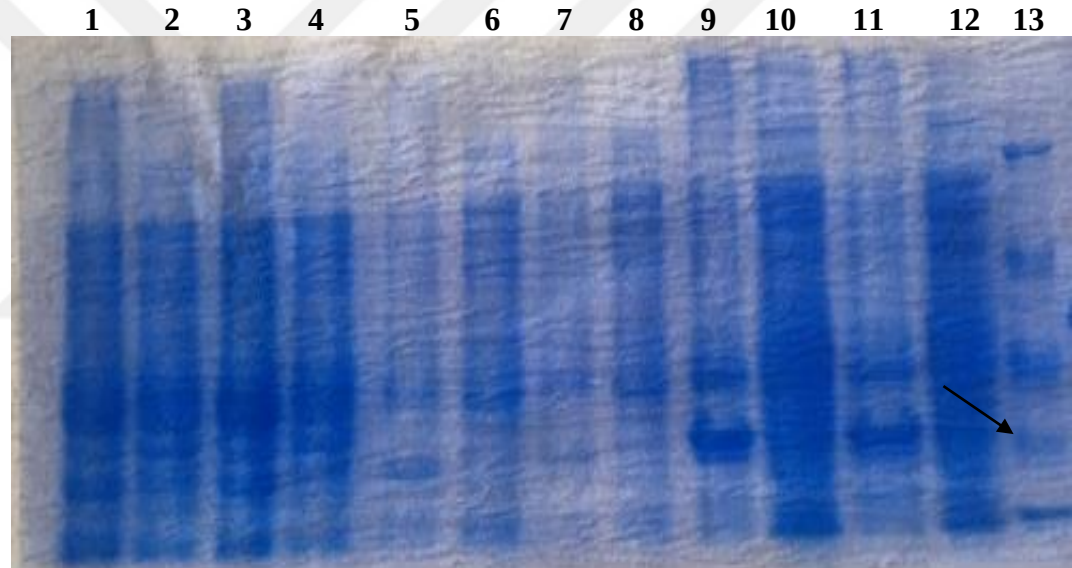
Şekil 4.1. pET21a/IGFBP-3 için yapılan koloni PCR görüntüsü.1 GeneRuler Express DNA Ladder.(Bantlar;5000bp, 3000bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 300bp, 100bp) 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11. Transformasyondan sonra farklı kolonilerden alınan sürüntüler ile yapılan PCR ürünleri.

Şekil 4.1'de DNA markerlarında ok ile gösterilen bant 1000bp büyüklüğündedir gösterilen koloni PCR yapıldıktan sonra agaroz jel görüntüsünden de anlaşılaçağı üzere, 1000bp bant hizasında görülen bantlar, 800bp içeren protein gen bölgesinin pET21a vektörüne klonlamasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görüldü. (200bp vektör) Başarılı bir şekilde klonlanan plazmid *E.coli* Turbo hücrelerinden izole edilerek *E.coli* Shuffle T7 Ekspres hücrelerine transforme edildi ve çalışmaları yapıldı.

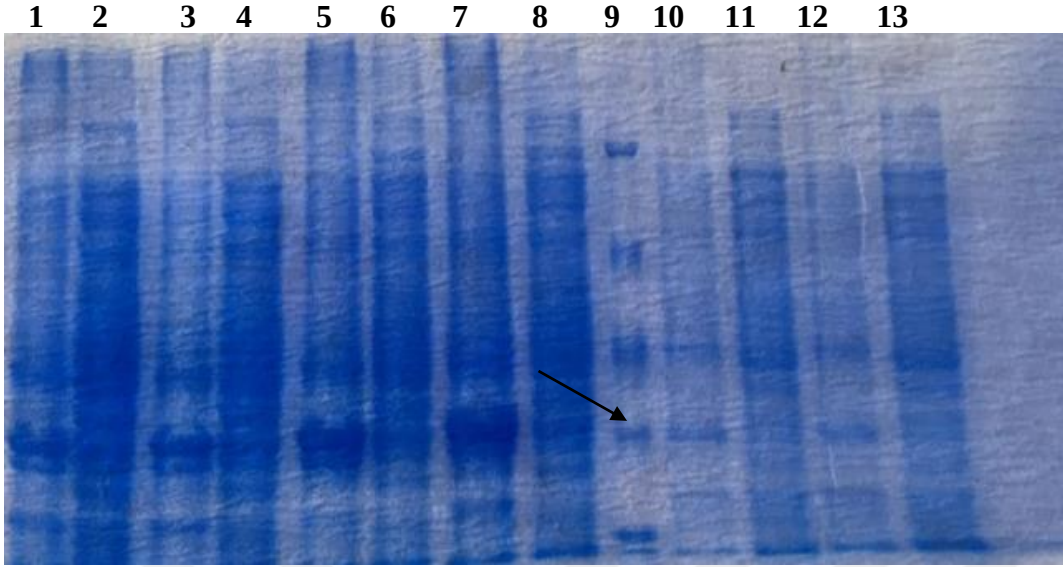
4.2. IGFBP-3 Üretimi

pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express hücrelerinin ve pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücreleri, farklı konstrasyonlarda IPTG ile indüklenerek ve farklı koşullarda inkübe edilerek en uygun yöntem bulunması çalışıldı.

pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express hücrelerinin 0,3mM ve 0,5mM IPTG ile indüklendikten sonra 30°C’de 4saat protein üretimi ve pET22b/IGFBP-3 *E.coli* BL21 hücrelerinin, 0,3mM ve 0,5mM IPTG ile indüklendikten sonra 25°C’de 18 saat protein ekspresyonundan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil.4.2 ve Şekil 4.3 ‘deki gibidir.



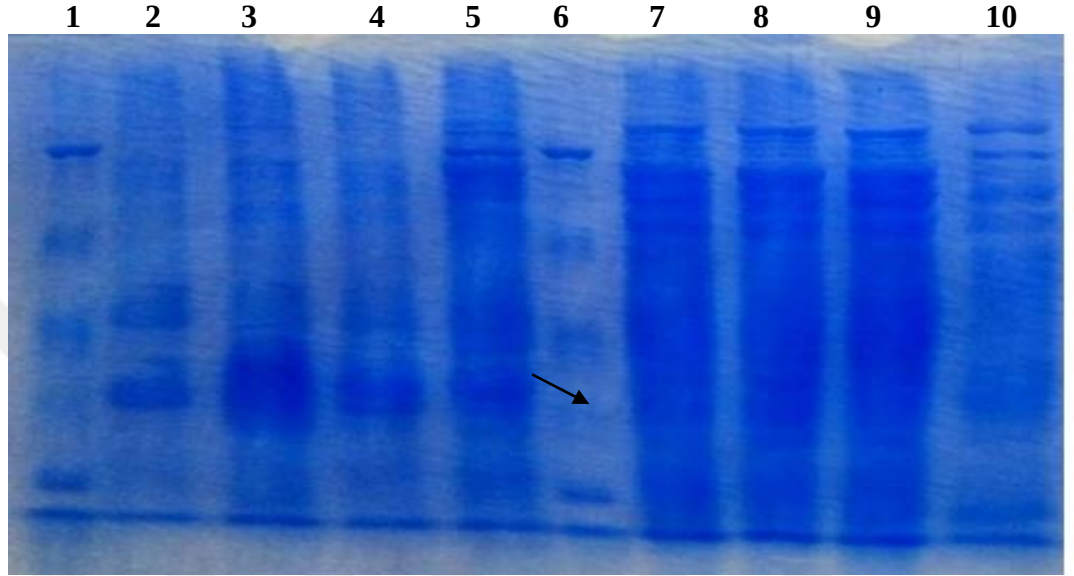
Şekil 4.2. (1,2,3,4,5,6,7,8) *E.coli* Shuffle T7 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. (9,10,11,12) *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. 1.Boş plazmid kontrol pellet, 2. Boş plazmid kontrol supernatant, 3.İndüklenmemiş kontrol pellet, 4.İndüklenmemiş kontrol supernatant, 5.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 6.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 7.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 8.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant. 9.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 10. İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 11.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 12.İndüklenmiş(0,5mM IPTG) supernatant. 13.Marker(Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa)



Şekil.4.3. (1,2,3,4,5,6,7,8) *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. (10,11,12,13) *E.coli* Shuffle T7 Ekspres hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. 1.Boş plazmid kontrol pellet, 2. Boş plazmid kontrol supernatant, 3.İndüklenmemiş kontrol pellet, 4.İndüklenmemiş kontrol supernatant, 5.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 6.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 7.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 8.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant. (9) Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa)10.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 11. İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 12.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 13.İndüklenmiş(0,5mM IPTG) supernatant.

Şekil.4.2 ve Şekil 4.3 ‘de pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express hücrelerinin ve pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücrelerinin iki hücrenin protein ekspresyonu için optimum sıcaklık ve koşullardaki inkübasyonu ve 0,3mM ve 0,5mM IPTG ile indüklenmesinden sonraki protein üretimi kıyaslandı. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir. Her iki *E.coli* suşundaki çözünür formdaki protein üretiminin yeterli miktarda olmadığı görüldü. Ancak özellikle Şekil 4.3’de görüldüğü üzere *E.coli* BL21- pET22b/IGFBP-3 protein üretimi çalışması, proteinin çözünmez formda oluşmasına rağmen *E.coli* Shuffle T7 Ekspres-pET21a/IGFBP-3 protein üretimi çalışmasına göre daha protein ekspresyonu miktarı daha fazla gözlemlendi.

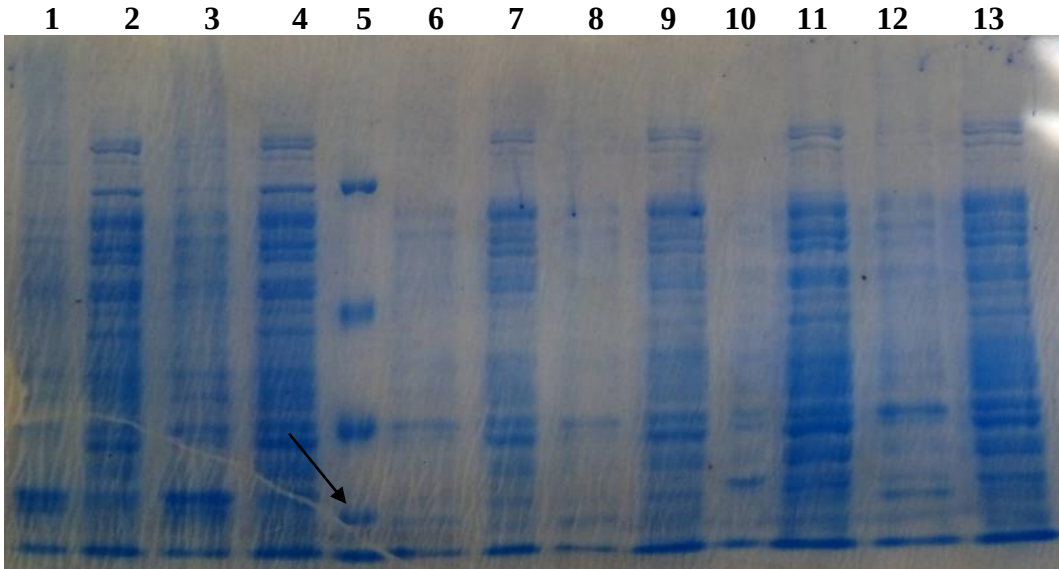
pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express hücrelerinin 0,2mM IPTG ile indüklendikten sonra 30°C’de 4saat protein üretimi ve pET22b/IGFBP-3 *E.coli* BL21 hücrelerinin, 0,2mM IPTG ile indüklendikten sonra 25°C’de 18saat protein ekspresyonundan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil.4.4’deki gibidir.



Şekil.4.4. (2,3,7,8) *E.coli* Shuffle T7 Ekspres hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. (4,5,9,10) *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. 1.Marker, 2. İndüklenmemiş kontrol pellet, 3. İndüklenmiş (0,2mM IPTG) pellet, 6.Marker(Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa), 7.İndüklenmemiş kontrol supernatant, 8. İndüklenmiş (0,2mM IPTG) supernatant, 4. İndüklenmemiş kontrol pellet, 5. İndüklenmiş (0,2mM IPTG) pellet, 9.İndüklenmemiş kontrol supernatant, 10. İndüklenmiş (0,2mM IPTG) supernatant

Çözünür formda protein üretimini arttırmak amacıyla proteinin daha yavaş ve daha doğru eksprese olabilmesi için indüksiyon ajanı olarak kullanılan IPTG konsantrasyonu azaltıldı. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir. Şekil 4.4’de görüldüğü gibi IPTG miktarı azaldığında *E.coli* Shuffle T7 Ekspres-pET21a/IGFBP-3 çözünmez formda protein üretimini arttırdı. Ancak beklenen çözünür formdaki protein üretimini sağlanadı.

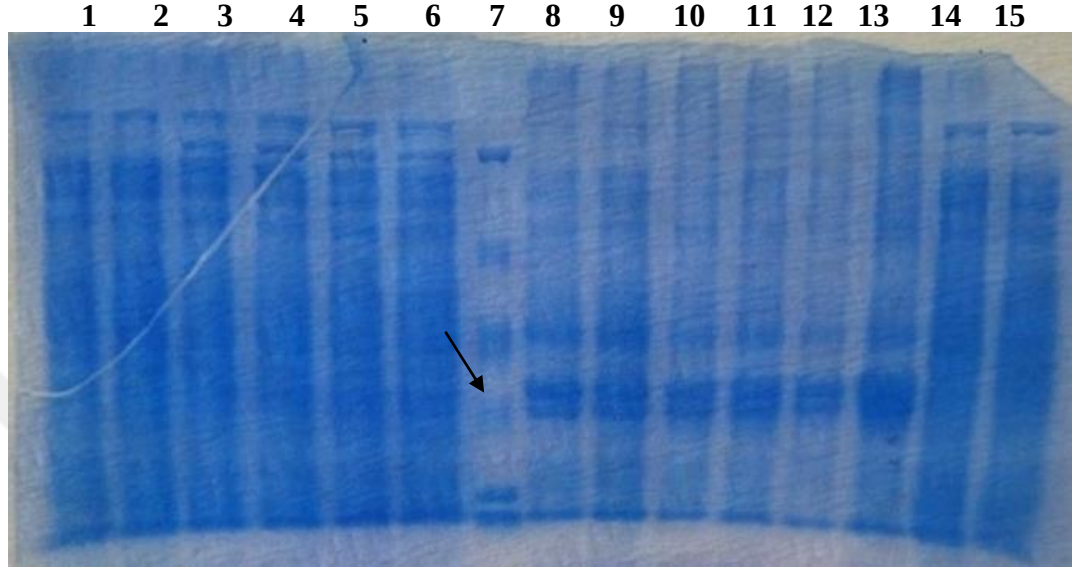
pET21a/IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 Express hücrelerinin 0,3mM ve 0,5mM IPTG ile indüklendikten sonra 16°C’de 18 saat protein üretimi ve pET22b/IGFBP-3 *E.coli* BL21 hücrelerinin, 0,3mM ve 0,5mM IPTG ile indüklendikten sonra 16°C’de 48saat protein ekspresyonundan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil.4.5’deki gibidir.



Şekil.4.5. (1,2,3,4,10,11) *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. (6,7,8,9,12,13) *E.coli* Shuffle T7 Ekspres hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. 1. İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 2. İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 3. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 4. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant, 10. İndüklenmemiş kontrol pellet, 11.İndüklenmemiş kontrol supernatant. 5.Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 6.İndüklenmiş (0,3mM IPTG) pellet, 7. İndüklenmiş (0,3mM IPTG) supernatant, 8.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 9.İndüklenmiş(0,5mM IPTG) supernatant, 12.İndüklenmemiş kontrol pellet, 13.İndüklenmemiş kontrol supernatant.

Proteinin daha yavaş ve daha doğru eksprese olabilmesi için, her iki hücrede üretim koşullarında, sıcaklık azaltıldı ve ekspresyon için gereken süre arttırıldı. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir. Bu denemede Şekil 4.5’de görüldüğü üzere çözünür formda protein üretimi sağlanamadı. *E.coli* Shuffle T7 Ekspres-pET21a/IGFBP-3 protein ekspresyonu gerçekleşmedi. *E.coli* BL21-pET22b/IGFBP-3 protein üretimi çözünmez formda, yüksek sıcaklıktaki çözünmez formda protein üretimine göre daha az gözlemlendi.

pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücrelerinin, 0,2mM ve 0,5mM IPTG ile indüklendikten sonra 25°C ve 30°C’de 18 saat protein ekspresyonundan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil.4.6’deki gibidir.



Şekil.4.6. *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 ekspresyonu. 1. 30°C’de indüklenmemiş kontrol supernatant, 2. 30°C’de boş plazmid kontrol supernatant, 3. 30°C’de indüklenmiş (0,2mM IPTG) supernatant, 4. 30°C’de indüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant, 5. 25°C’de indüklenmiş (0,2mM IPTG) supernatant, 6. 25°C’de indüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant, 7.Marker, (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 8. 30°C’de indüklenmemiş kontrol pellet, 9. 30°C’de boş plazmid kontrol pellet, 10. 30°C’de indüklenmiş (0,2mM IPTG) pellet, 11. 30°C’de indüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 12. 25°C’de indüklenmiş (0,2mM IPTG) pellet, 13. 25°C’de indüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet, 14. 25°C’de indüklenmemiş kontrol supernatant, 15. 25°C’de boş plazmid kontrol supernatant.

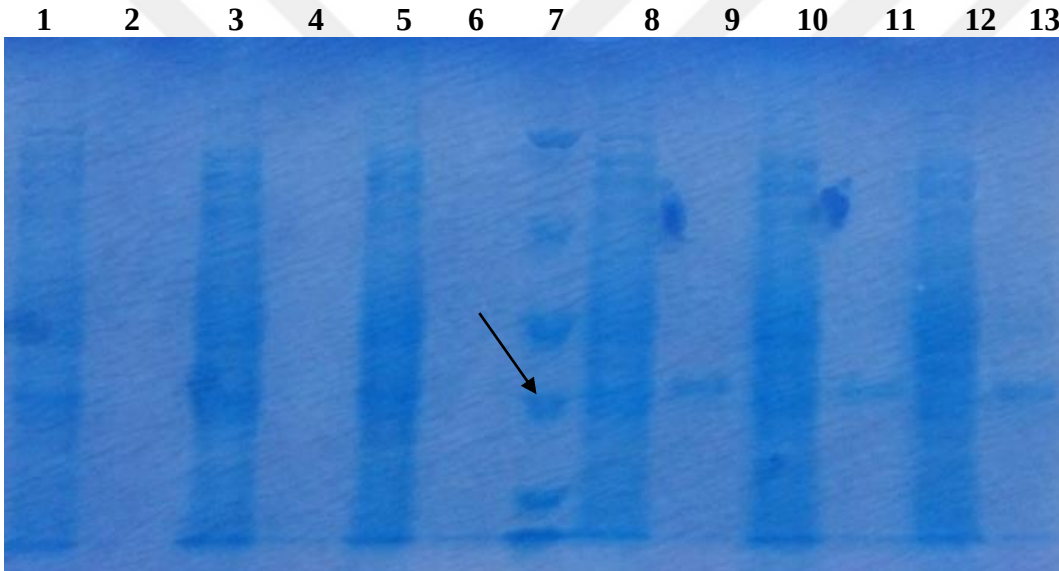
Son olarak yalnızca *E.coli* BL21- pET22b/IGFBP-3 protein üretimi 25°C ve 30°C’de 18saat ve 0,2 ve 0,5mM IPTG konsantrasyonları ile indüklenerek yapılan çalışmada, çözünmez formdaki protein ekspresyonu miktarının Şekil 4.6’da görüldüğü üzere 25°C’de, 0,5mM IPTG konsantrasyonunda gerçekleştiği görüldü. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir.

4.3. Çözünür Proteinin Elde Edilmesi İçin Uygulanan Yöntemler

Proteinin üretimdeni, IGFBP-3'ün çözünür hale getirilebilmesi için dört yöntem denendi. 25°C'de, 0,5mM IPTG konsantasyonunda *E.coli* BL21-pET22b/IGFBP-3 ile protein üretimi gerçekleştirildi.

4.3.1. Sarkozil

pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücreleri ile, IGFBP-3 üretiminden sonra, çözünür formda olmayan proteinlerin kazanımı amacı ile sarkozil ile gece boyu ve iki saat muamele edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.7'deki gibidir.



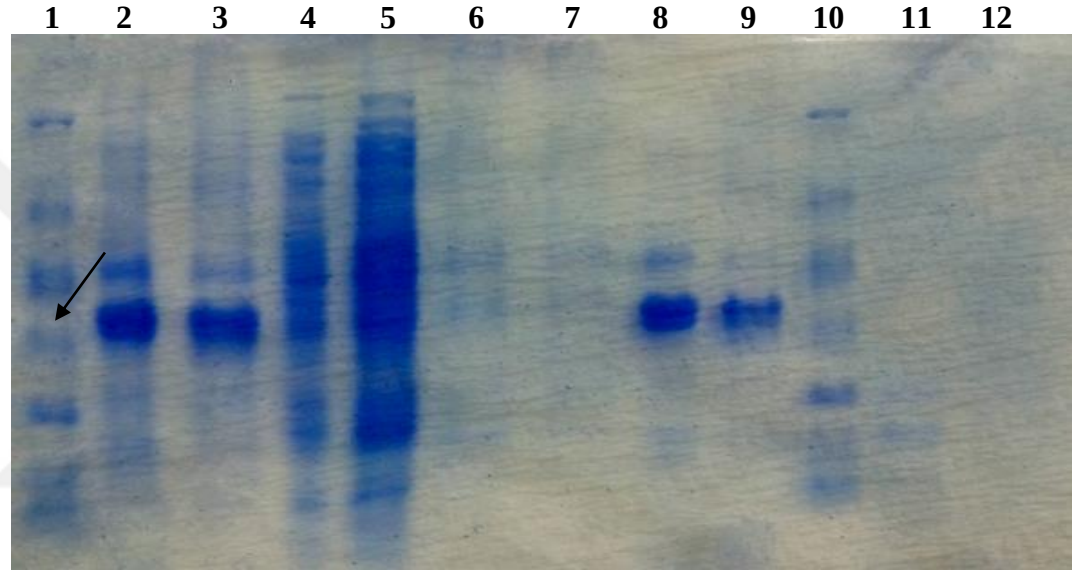
Şekil.4.7. Sarkozil ile çözünür formda protein eldesi. 1. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant. 3.İndüklenmemiş kontrol süpernatant. 5. Boş plazmid kontrol supernatant. (2,4,6) Sarkozil ile bir gece inkübe edilen pelletler. 2.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/Sarkozil. 4. İndüklenmemiş kontrol pellet/Sarkozil. 6. Boş plazmid kontrol /Sarkozil. 7.Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 8. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) supernatant. 10. İndüklenmemiş kontrol süpernatant. 12. Boş plazmid kontrol supernatant. (9,11,13) Sarkozil ile iki saat inkübe edilen pelletler. 9.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/Sarkozil. 11. İndüklenmemiş kontrol pellet/Sarkozil. 13. Boş plazmid kontrol /Sarkozil.

Şekil 4.7'de görüldüğü üzere sarkozil ile gece boyu ve iki saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında gece boyu inkübasyon sonrası jelde bant gözlenmedi. İki saat inkübasyon sonrasında oluşan bantlar ise hem boş plazmid kontrol hem de indüklenmemiş kontrolde gözlemlendiği

için anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir.

4.3.2.Üre

pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 üretiminden sonra, çözünür formda olmayan proteinlerin kazanımı amacı ile üre ile muamele edilen örneklerin ve bu örneklerin protein saflaştırması için manyetik boncuklar ile bağlandıktan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.8'deki gibidir.



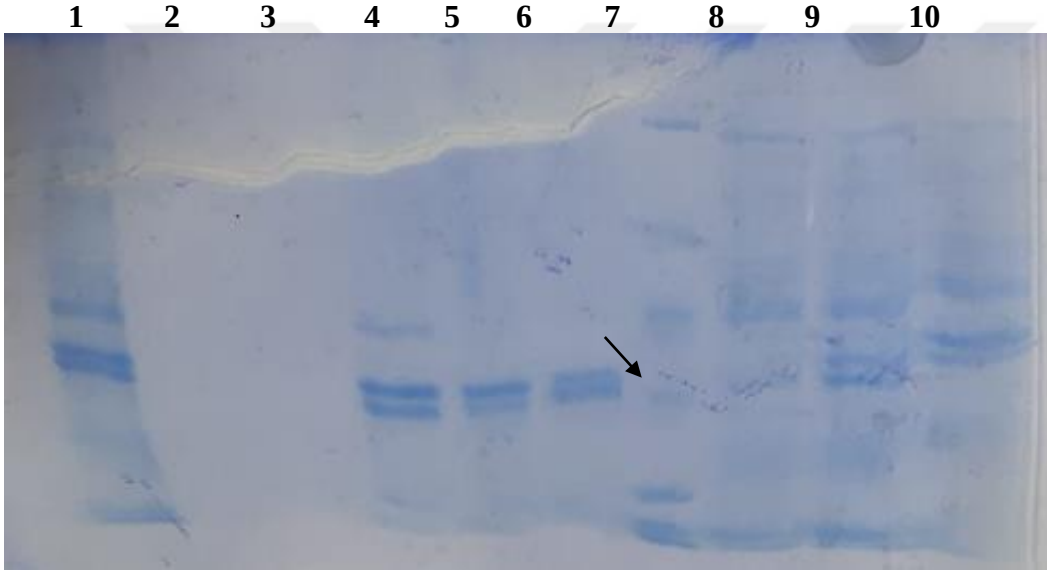
Şekil.4.8. Üre ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması.1.Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 2.İndüklenmiş (0,2mM) pellet 3.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet. 4.İndüklenmiş (0,2mM) süpernatant. 5.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) süpernatant. 6.İndüklenmiş (0,2mM) pellet /Üre üst faz 7.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/Üre üst faz 8. İndüklenmiş (0,2mM) pellet /Üre pellet. 9. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/Üre pellet. 10.Marker. 11. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) süpernatant/Manyetik boncuk. 12. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/Üre üst faz/Manyetik boncuk.

Şekil 4.8'de görüldüğü üzere üre ile muamele edilen örnekler ve bu örneklerin protein saflaştırması için manyetik boncuklar ile bağlandıktan sonraki jel görüntüsünde, üre ile pelletten alınmaya çalışan protein çözünür forma geçirilemedi. Ayrıca süpernatanttan ve üre ile muamele sonrası örnekten IGFBP-3'ün saflaştırılması amacıyla yapılan, HisPur Ni-NTA manyetik boncuklar ile saflaştırma çalışmasında yüklenen jel kuyucuklarında bantlar gözlenmedi. Bu çözünür formda boncuklara bağlanacak miktarda ekprese edilen proteinin bulunmadığını ve üre ile muamele edilen çözünmez formdaki proteinlerin çözünür

forma alınamadığını gösterdi. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir.

4.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat

pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 üretiminden sonra, çözünür formda olmayan proteinlerin kazanımı amacı ile SDS ile muamele edilen örneklerin ve bu örneklerin protein saflaştırması için manyetik boncuklar ile bağlandıktan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.9'deki gibidir.

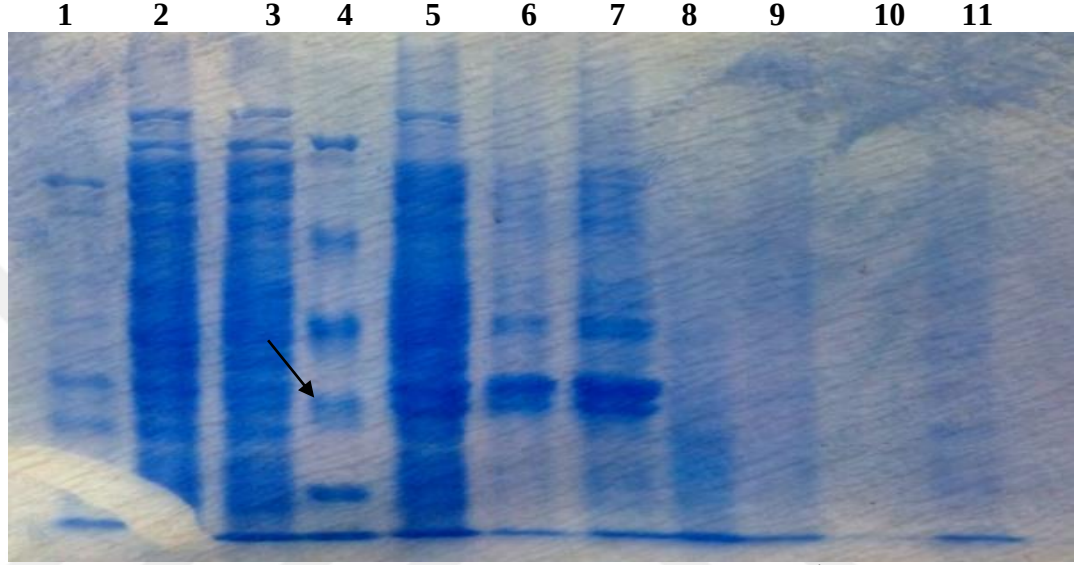


Şekil.4.9. SDS ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması.1.SDS pellet 2. İndüklenmiş(0,5mM IPTG) supernatant/Manyetik boncuk. 3.İndüklenmiş(0,5mM IPTG) pellet/SDS üst faz/Manyetik boncuk. 4.İndüklenmiş(0,5mM IPTG) pellet. 5. İndüklenmemiş kontrol pellet. 6.Boş plazmid kontrol pellet.7.Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 8. İndüklenmiş(0,5mM IPTG) supernatant 9.İndüklenmemiş kontrol supernatant.10. Boş plazmid kontrol supernatant.

Şekil 4.9'da görüldüğü üzere SDS ile muamele edilen örneklerin protein saflaştırması için manyetik boncuklar ile bağlandıktan sonraki jel görüntüsünde, SDS ile pelletten alınmaya çalışan protein manyetik boncuklara bağlanmadı. SDS ile saflaştırma için yeterli protein çözünmez formdan çözünür forma geçirilemedi. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir.

4.3.4. Sodyum Hidroksit

pET22b/IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 hücreleri ile IGFBP-3 üretiminden sonra, çözünür formda olmayan proteinlerin kazanımı amacı ile NaOH ile muamele edilen örneklerin ve bu örneklerin protein saflaştırması için manyetik boncuklar ile bağlandıktan sonra SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.10'deki gibidir.



Şekil.4.10. NaOH ile çözünür formda protein eldesi ve saflaştırılması. 1.İndüklenmemiş kontrol süpernatant. 2.İndüklenmiş (0,2mM IPTG) süpernatant. 3.İndüklenmiş (0,5mM IPTG) süpernatant. 4.Marker. (Bantlar; 116kDa, 66,2kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 5.İndüklenmemiş kontrol pellet. 6.İndüklenmiş (0,2mM IPTG) pellet. 7. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet.8. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/NaOH üst faz.9. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/NaOH pellet.10. İndüklenmiş (0,5mM IPTG) pellet/NaOH üst faz/Manyetik boncuk.11. İndüklenmiş(0,2mM IPTG) süpernatant/Manyetik boncuk.

4.10'da görüldüğü üzere NaOH ile muamele edilen pellet, yeni elde edilen süpernatant(çözünür formda protein içermesi gerekir.)ve yeni edilen süpernatant ile yapılan manyetik boncuklarla saflaştırma sonra elde edilen jel görüntüsünde herhangi bir bant görülmedi. Bu NaOH'in tüm proteinleri parçaladığını gösterir. Şekilde ok ile gösterilen protein markerı 35kDa büyüklüğündedir ve protein bu bant hizasında beklenmektedir.

5. SONUÇ

Diyabet hastalığının oluşum mekanizmasında görev alan birçok protein, protein ailesi ve reseptör aileleleri mevcuttur. İnsülin benzeri büyüme faktörü ailesi buna örnektir. IGF-1, insülin seviyesini düşürür, karbohidrat metabolizmasını düzenler ve insülin duyarlılığını artırır. Diyabet hastalarında, özellikle çeşitli komplikasyonların varlığında IGF-1 seviyelerinin azaldığı raporlanmıştır. IGF'lerin yüksek konsantrasyonlarda plazmada bulunması hipoglisemiye neden olur. Biyolojik sıvıda, IGF'ler, IGFBP'lere bağlanmış halde bulunur. Bu tez kapsamında çalışılan IGFBP-3, IGF-I ve IGF-II için ana dolaşım taşıma proteini. IGF 'lerin etkilerini düzenlerler, akut etkilerinin ortaya çıkışını engellerler. Birkaç farklı proteaz bu proteinleri parçalamaktadır. Proteolitik yıkım bu proteinleri inaktive eder veya IGF-1 ve IGF-2'ye bağlanma yeteneğini azaltır. Dolaşımdaki IGFBP-3'lerin çoğu proteolizin kısıtlanmasını sağlayan IGF-1 veya IGFBP-3 ve ALS (acid labile subunit) olarak yüksek moleküler kütleli üçlü bir kompleks halinde bulunur. IGFBP-3'ün direkt proteolizi veya proteaz aktivitesindeki önemleri henüz net değildir. Bu nedenle çalışılması gereken konulardan biridir. Diyabette glisemik kontrolün iyileştirilmesinde IGF-I / IGFBP-3 etkinliğini belirlemek ve IGF-I'in insülin duyarlılığını arttırdığı mekanizmanın belirlenmesi için uzun vadeli çalışmaların yapılması gerekir. IGF ailesinin ve özellikle IGFBP-3 gibi güçlü ajanlar için en uygun terapötik kullanımların bulunması çalışmaları son derece önemlidir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin en önemlisi olarak kabul edilen ve kanser, diyabet, büyüme bozuklukları gibi birçok hastalıkta çalışma alanı bulunan IGFBP-3'ün rekombinant üretimi denendi. IGFBP-3'ün içerdiği altı disülfid bağı nedeniyle *E.coli* hücrelerinde çözünür formda ve doğru katlanmış olarak üretilip elde edilmesi oldukça zordur. pET22b-IGFBP-3 içeren *E.coli* BL21 ve pET21a-IGFBP-3 içeren *E.coli* Shuffle T7 ekspres hücrelerinde disülfid bağlarının oluşumu için özelleşmiş sistemler kullanılarak üretilme çalışmaları yapıldı. Periplazmik boşluğa yönlendirme sekansı içeren pET22b vektörü kullanılarak *E.coli* BL21 hücrelerinde yapılan protein ekspresyonu, *E.coli* Shuffle T7 ekspres disülfid bağları oluşumu için özelleştirilmiş hücrelerinde göre daha verimli bir şekilde gerçekleşti. Ancak *E.coli* BL21 hücrelerinde pET 22b ile yapılan protein üretiminde, değiştirilen sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarına

rağmen IGFBP-3 çözünür formda elde edilemedi. Çözünür formda elde edilemeyen IGFBP-3'ün hücre pelletinden alınarak çözünür forma geçirilmesi için sarkozil, üre, SDS ve NaOH yöntemleri kullanıldı. Sarkozil ile anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Üre ile yapılan denemede, hücre pelleti muamele edildikten sonra IGFBP-3, hücre pelletinden uzaklaştırılıp çözünür forma geçirilemedi. NaOH ile yapılan denemede ise, NaOH ile muamele edilen örneklerin parçalanması nedeniyle SDS-PAGE jel görüntüsünde herhangi bir bant görülemedi. SDS ile yapılan çalışmada, IGFBP-3 çözünür forma çok düşük miktarda geçirildi. Ancak saflaştırma için HisPur Ni-NTA manyetik boncuklar ile bağlanamadı.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Amoui, M. Craddock B.P. and Miller W. T., 2001, Differential phosphorylation of IRS-1 by insulin and insulin-like growth factor I receptors in Chinese hamster ovary cells, *Journal of Endocrinology*, 171, New York, 153–162.

Baxter R.C., Holman S.R., Corbould A., 1995, Regulation of the insulin-like growth factors and their binding proteins by glucocorticoid and growth hormone in nonislet cell tumor hypoglycemia, *J Clin. Endocrinol. Metab.*, Australia, 80, 2700–2708.

Baxter, R.C., Martin, J.L., Beniac, V.A., 1989 ,High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum, *J Biol Chem*, 264, Australia, 11843-11848.

Blat C. , Villaudy J. , Binoux M., 1994, In vivo proteolysis of serum insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 results in increased availability of IGF to target cells., *J Clin Invest.*, 93, 2286–2290.

Boonen, S., Rosen, C., Bouillon, R., 2002, Muskuloskeletal effects of the recombinant human IGF-I/IGF binding protein-3 complex in osteoporotic patients with proximal femoral fracture: a double blind, placebo-controlled pilot study.,*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87 (4),1593–1599.

Clemmons, D.R., Moses A.C., Mckay, M.J., Sommer, A., Rosen, D.M. and Ruckle J., 2000, The Combination of Insulin-Like Growth Factor I and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Reduces Insulin Requirements in Insulin-Dependent Type 1Diabetes: Evidence for in Vivo Biological Activity, *The Journal of Clinical Endocrinology*,85(4), USA, 1518-1524.

Clemmons, D.R., Sleevi M., Busby W.H., 2005, Recombinant, Nonglycosylated Human Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) Is Degraded Preferentially after Administration to Type II Diabetics, Resulting in Increased Endogenous Glycosylated IGFBP-3, *Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (12), USA, 6561-6568.

Clemmons, D.R., 2016, Role of IGF Binding Proteins in Regulating Metabolism., *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(6),USA, 375-391.

Chen, W., Guang-Yin,Y. , Min-Ji,Z., Guang-Yu,C., Min W., Jia-Xi,W.,Dong-Gang,X., 2007, High-efficient and Soluble Expression, Purification and Bioassay of IGFBP-3, *Chin. J. Biotech.*, 23(3), 398–402.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Daughaday W.H., Kapadia M., 1989, Significance of abnormal serum binding of insulin-like growth factor II in the development of hypoglycemia in patients with non-islet-cell tumors, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, USA, 6778–6782.

Davenport M.L., Isley W.L., Pucilowska J.B., 1992, Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery, J Clin Endocrinol Metab. , 75, 590–595.

Daza, D.O., Sundstrom, G., Bergqvist, C.A., Duan, C., Larhammar, D., 2011, Evolution of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family, Endocrinology, 152, 2278–2289.

Designua, <https://tr.fotolia.com/id/82461844> (Erişim tarihi:11.09.2018)

Dinççağ, N., 2011, Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisinde Güncel Durum, İÇ HASTALIKLARI Dergisi,20(18),181-223.

Durham, S.K., Mohan, S., Liu, F., 1997, Bioactivity of a 29-kilodalton insulin-like growth factor binding protein-3 fragment present in excess in chronic renal failure serum, Pediatr Res. , 42, 335–341.

Feng, N., 2015, Insulin-like growth factor binding protein-2 promotes adhesion of endothelial progenitor cells to endothelial cells via integrin $\alpha 5\beta 1$, J. Mol. Neurosci., 57, 426–434.

Firth, S.M. , Baxter, R.C., 2002, Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins, Endocr. Rev., 23, 824–854.

Friedrich, N., Wolthers, O.D., Arafat, A.M., Emeny, R.T., Spranger, J., Roswall, J., Kratzsch, J., Grabe, H.J., Hubener, C., Pfeiffer, A.F., Doring, A., Bielohuby, M., Dahlgren, J., Frystyk, J., Wallaschofski, H., Bidlingmaier, M., 2014, Age- and sex-specific reference intervals across life span for insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) and the IGF-I to IGFBP-3 ratio measured by new automated chemiluminescence assays, J. Clin. Endocrinol. Metab. , 99, 1675–1686

Gederet, Y.T., Öztürk, B. , Karagözoğlu, E. , Gök, M. , Tiftik, A.M., 2004, Malign-Nonmalign plevral efüzyon ayırıcı tanısında IGF ve IGFBP'lerin rolü, Genel Tıp Derg, 14(4), Konya, 139-143

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gordon, T., Castelli, W., Marthana, C., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. and Dawber, T. R., 1977, Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary artery disease risk in women, *Ann. Intern. Med.*, 87, 393-397.

Guler, H.P. , Zapf, J., Schmid, C., 1989, Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates, *Acta Endocrinol*, 121, Copenh., 753–758.

Harish V., 2015, Theoretical and Computational Studies of Peptides and Receptors of the Insulin Family. , *Membranes*, 5, Durham, 48-83.

Hawkes, C. , Kar, S., 2004, The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system, *Brain Research Reviews*, 44, Canada, 117– 140.

Hjortebjerg, R., Frystyk, J., 2013, Determination of IGFs and their binding proteins, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27, Denmark, 771–781.

Jarrett, R., McCartney, P. and Keen, H., 1982, The Bedford Survey: Ten year mortality rates in newly diagnosed diabetics, borderline diabetics and normoglycemic controls and risk indices for coronary artery disease in borderline diabetics, *Diabetologia*, 22, 79-84.

Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995, Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocr Res.*, 16, 3–34.

Jones, J.I., 1993, Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, USA, 10553–10557.

Kannel, W. and McGee, D., 1979, The Framingham Study. Diabetes and cardiovascular disease, *JAMA*, 241, 2035-2038.

Knowler, W. , Bennett, P. and Ballantine, E., 1980, Increased incidence of retinopathy in diabetics with elevated blood pressure, *N. Eng. J. Med.* , 302, 645-650.

Koolman,J. ,Röhm, K.H., 2002, Renkli biyokimya atlası, İstanbul,Tavashi,164

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lalou, C., Sawamura, S., Segovia, B., Ogawa, Y., Binoux, M., 1997, Proteolytic fragments of insulin-like growth factor binding protein-3: N-terminal sequences and relationships between structure and biological activity, C. R. Acad. Sci. III, 320, 621–628.

Lassarre, C., Binoux M., 1994, Insulin-like growth factor binding protein-3 is functionally altered in pregnancy plasma, Endocrinology, 134, 1254–1262.

Lee C.Y., Rechler M.M., 1995, A major portion of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) complex in adult rat serum contains unoccupied, proteolytically nicked IGFBP-3 that binds IGF-II preferentially, Endocrinology, 136, 668–678.

LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., 1995, Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor, Endocr Rev., 16, 143-146.

Levetown, M., 2002, Modulation of types I and II acute phase reactants with insulin-like growth factor-I/binding protein 3 complex in severely burned children, Crit. Care Med., 30 (1), 255–257.

Livingstone, C., 2013, Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition, Clinical Science, 125, Guildford, 265-280.

Massiah, M.A., Wright, K.M. ve Du H., 2016, Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, TritonX-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media, Current Protocols in Protein Science, 84, Washington, 1-24.

Martin, J.L., Baxter, R.C., 1986, Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization, J. Biol. Chem., 261, 8754–8760.

Murphy L.J., Molnar P., Lu X., Huang H., 1995, Expression of human insulin-like growth factor-binding protein-3 in transgenic mice, J. Mol. Endocrinol., 15, 293–303.

Nathan, D., 1988, Modern management of insulin-dependent diabetes mellitus, Med. Clin. North Am., 72, 1365-1378.

NEB,a, <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/c2984datasheet-lot98.pdf> NEB Turbo Competent E.coli (Erişim tarihi: 10.09.2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

NEB,b, <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/c2527datasheet-lot25.pdf> BL21(DE3) Competent E. Coli (Erişim tarihi: 10.09.2018)

NEB,c, <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/c3029datasheet-lot6.pdf> SHuffle® T7 Express Competent E. Coli (Erişim tarihi: 10.09.2018)

Nissley, P. , Kiess, W., 1991, Reciprocal modulation of binding of lysosomal enzymes and insulin-like growth factor-II (IGF-II) to the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 293, 311-324.

Novagen,a, https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf (Erişim tarihi: 10.09.2018)

Novagen,b, <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-21-map.pdf> (Erişim tarihi: 10.09.2018)

Okajimina T., Iwashita M., Takeda Y., 1993, Inhibitory effects insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 on IGF activated glucose consumption in mouse Balb/c3T3 fibroblasts, *J Endocrinol.*, 133,457– 470.

Palmberg, P., Smith, M., Waltman, S., Krupin, T., Singer, P., Burgess, D., Wendtland, T., Achtenberg, J., Cryer, P., Santiago, J., White, N., Kilo, C. and Daughaday, W., 1981, The natural history of retinopathy in insulin-dependent juvenile onset diabetes, *Ophthalmology*, 88, 613-618

Patra, A.K., Mukhopadhyay, R. Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C. ve Panda, A.K., 2000, Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 18, New Delhi, 182–192.

Pollak, M., 2009, Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia, *Nature Reviews/Cancer*, 8, Canada,915-928

Potdar P.D. ve Chaudhari M.B., 2016, Cellular, Molecular and Therapeutic Advances in Type 2 Diabetes Mellitus *Diabetes Management*,6(2), Maharashtra, 030–044.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Raipathak, S.N., 2012, Insulin-like growth factor axis and risk of type 2 diabetes in women, *Diabetes*, 61, 2248–2254

Ranke, M.B., Emeritus, 2015, Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3), *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29, Germany, 701-711.

Rechler, M.M. and Clemmons D.R., 1998, Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins, *TEM Vol. 9(5)*, USA, 176-183

Rechler, M.M., 1993, Insulin-like Growth Factor Binding Proteins, *Vitamins & Hormones*, 47, USA, 1-114

Rinderknecht, E. , Humbel, R.E., 1978a, Primary structure of human insulin-like growth factor II., *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett*, 89, 283-286.

Rinderknecht, E., Humbel, R.E., 1978b, The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin, *J Biol Chem*, 253, 2769-2776.

Rogol, A.D., Jacobson W., Smith, A., 2002, A double-blind, randomized, placebo-controlled, study to determine the dose response profile of rhIGF-I/rhIGFBP-3 in subjects with Type 2 Diabetes Mellitus requiring insulin therapy, *Poster American Diabetes Association*, 61, San Francisco

Russo, V.C. et al., 2005, Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a, critical role in neuroblastomacell proliferation, migration, and invasion, *Endocrinology*, 146, 4445–4455.

Saini V., 2010, Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *World J Diabetes*1(3),İndia, 68-75.

Salmon, W.D. , Daughaday, W.H., 1957, A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro, *J. Lab. Clin. Med.*, 49, 825-836.

Savage,M.O., Camacho-Hübner, C.,Dunger,D.B., 2004, Therapeutic applications of the insulin-like growth factors, *Growth Hormone & IGF Research*, 14, 301–308.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Shimasaki S., Ling, N., 1991, Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2, -3, -4, -5 and -6), *Prog Growth Factor Res*, 3, 243-266.

Singh, S.M., Panda A.K., 2005, Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, India, 303-310.

Swain, M. ,Slomianyc, M.G.,Rosenzweigc S.A., and Atreyaa,H.S., 2010, High-yield bacterial expression and structural characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding protein-2, *Arch. Biochem. Biophys.*, 501(2), India, 195–200.

Thraillkill, K.M., 2000, Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility, *Diabetes Technol. Ther.* , 2, 69–80.

Twigg, S.M., Baxter, R.C., 1998, Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit, *J. Biol. Chem.*, 273, 6074–6079.

Vivilan, H., Youngman, O.H., and Rosenfeld, R.G., 1999, The Insulin-Like Growth Factor- Binding Protein(IGFBP) Superfamily, *The Endocrine Society*, 20(6), Portland, 761–787.

Wang, Y. , Nishida, S. , Sakata, T. , Elalieh,H.Z., Chang W., Halloran, B.P. , Doty, S.B.and Bikle D.D., 2006, Insulin-Like Growth Factor-I Is Essential for Embryonic Bone Development, *The Endocrine Society*, 47(10), New York, 4753–4761.

Wild, S., Roglic, G., Green A., Sicree R., King H., 2004, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care*, 27(5), Caulfield, 1047-1053.

Wood, W.I., Cachianes, G., Henzel, W.J., Winslow, G.A., Spencer, S.A., Hellmiss, R., Martin, J.L., Baxter, R.C., 1988, Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein, *Mol Endocrinol*, 2, Yeni Güney Galley, 1176–1185.

Yamada, P.M. ve Lee K., 2009, Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296, Los Angeles, 954–976.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zandbergen, A.A., 2006, The IGF-I system and the renal and haemodynamic effects of losartan in normotensive patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized clinical trial, Clin. Endocrinol., 64, Rotterdam, 203–208.

Zapf J., 1995, Insulin like growth factor binding proteins and tumor hypoglycemia, Trends Endocrinol Metab., 6, Zürich, 37–42.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Zeynep ERİM

Doğum Tarihi: 25.08.1991

Doğum Yeri: Samsun

Akademik Unvanı: -

İş Telefonu: -

Cep Telefonu: 05557564825

İş Adresi:-

E-postası: erimzeynep@hotmail.com

Bildiği Yabancı Diller (Puan ve Yıl): İngilizce 68/2017

Aldığı Sertifikalar:

Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
MeristemEGE Girişimcilik Programı

Uzmanlık Alanı:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya/Biyoteknoloji	Ege Üniversitesi	2009-2014
Y. Lisans	Biyoteknoloji	Ege Üniversitesi	2015-

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

İnsulin Benzeri Buyume Faktoru Bağlayıcı Protein-3 (IGFBP-3) ‘ün Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu Doç.Dr. Burcu OKUTUCU

Projelerde Yaptığı Görevler:

TÜBİTAK 2209/A Üniversite öğrencileri için yurtiçi araştırma projeleri, ‘Yeşil Floresans Protein Bağlı Metilen Blue Modifiye β -Siklodekstrin Magnetitlerin İlaç Taşıma Sistemi Olarak Kullanılması’
BAP ‘İnsulin Benzeri Buyume Faktoru Bağlayıcı Proteinlerin (IGFBP) Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu’

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu Üyesi