T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ŞAPERON PLAZMİTLERİ KULLANILARAK *ESCHERICHIA COLI*' DE REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİN EKSPRESYONUNUN OPTİMİZASYONU

Kübra TRABZONLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Şubat, 2020

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ŞAPERON PLAZMİTLERİ KULLANILARAK *ESCHERICHIA COLI*' DE REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİN EKSPRESYONUNUN OPTİMİZASYONU

Kübra TRABZONLU tarafından hazırlanan tez çalışması 21.02.20 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ebru Şebnem YILMAZ, Üye
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Farklı Şaperon Plazmitleri Kullanılarak *Escherichia coli* 'de Rekombinant Omp25 Proteinin Ekspresyonunun Optimizasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve kaynaklarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Kübra TRABZONLU

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenimim boyumca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, fikir ve yönlendirmeleriyle çalışmama ışık tutan değerli danışmanım Doç. Dr.Tülin ARASOĞLU'na minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Her güzel maceranın bir sonu vardır. Ben de bu müthiş serüvenin sonuna gelmişken teşekkür etmek istediklerim var. Öncelikle sabır ve özveri gerektiren bu zorlu yolda aynı laboratuvarı paylaşmaktan onur duyduğum, birlikte öğrendiğimiz, birlikte yanıldığımız ama her zaman birbirimize destek olduğumuz ve omuzlarımızdaki yükü paylaştığımız mükemmel partnerlerim Tuğba ATABEY ve İlkgül AKMAYAN' a varlıkları, bana öğrettikleri her şey ve yardımları için şükranlarımı sunuyorum.

Zorlu çalışma temposunda yeri geldi ailemden çok onları gördüm. Arkama dönüp baktığımda her anımızı gülümseyerek hatırlıyorum ve onlara kısaca ikinci ailem diyorum. Pek sevgili Gülşah AKBAŞ, Sefanur ERDÖL, Emrah BERTAN, Şayan POYRAZ; yaşadığımız her an için teşekkür ediyorum, iyiki varsınız. Canım yan labdakiler ekibi sevgili Dilsu ÇOLPAN, Sinem KURT, Cansel KAYA, İrem METEOĞLU, Hatice Nur AYDIN, Kübra AVCI, Akın SUNULU, Caner ERTÜRK sizi tanıdığım ve birlikte çalışma arkadaşlığı yapma şansına sahip olduğum için çok mutluyum.

Tez çalışmamda canla başla bana yardımcı olan hepsini ayrı ayrı çok sevdiğim ve tanımaktan mutluluk duyduğum şu an lisanüstü öğrencisi olan Evrim KAPUCU'ya ve lisans öğrencisi stajyerlerim Aycan KAYRAV, Hayrunisa DERE, Hacer KARABULUT, Burcu KARAASLAN, Senanur ACET'e emekleri için teşekkür ederim, çok iyi yerlere geleceğinize inanıyorum.

Beni bu yaşa kadar fedakarlıklar ile büyüten, maddi ve madevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili annem İlknur TRABZONLU ve babam Saim TRABZONLU'ya, ablam Betül TRABZONLU ve kardeşim Selim TRABZONLU'ya minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Hayatta gördüğüm en mücadeleci ve sevgi dolu insan olan rahmetli anneannem Meryem BATTAL'a bu tezi ithaf ediyorum.

Son olarak bu tez çalışmasını 2210-C öncelikli alanlar bursu ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Kübra TRABZONLU

Ocak,2020

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viiii

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiiii

ABSTRACT xv

1 Giriş 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3

2 Genel Bilgiler 4

2.1 Rekombinant Protein Üretimi 4
2.2 Konakçı Olarak *E.coli* 5
2.3 Ekspresyon Vektörlerinin Temel Bileşenleri 7
2.3.1 Promotörler 7
2.3.2 Transkripsiyon Sonlandırıcılar 12
2.3.3 Translasyon Başlangıcını Etkileyen Unsurlar 13
2.3.4 Translasyonel Güçlendiriciler (Enhancerlar) 13
2.3.5 Translasyonel Terminatörler 14
2.3.6 mRNA Stabile Ediciler 14
2.4 Kodon Kullanımı 15
2.5 Protein Ekspresyonu İçin Hücresel Bölme Seçimi 16
2.5.1 Sitoplazmik Ekspresyon 16
2.5.2 Periplazmik Ekspresyon 16
2.5.3 Hücre Dışı Ortama Salgılama 17
2.6. Proteoliz 18
2.7 Füzyon proteinleri 19
2.8 *In vitro* Protein Katlanması 19
2.9 *In vivo* Protein Katlanması 20
2.10 Protein Agregasyonu ve İnklüzyon Cisimciklerinin Biyolojik Rolü 21

2.10.1 İnklüzyon Cisimciklerinin Bileşimi ve Fizikokimyasal Özellikleri 23
2.10.2 *In vitro*' da İnklüzyon Cisimciklerinin Geri Kazanımı 23
2.10.3 İnklüzyon Cisimcikleri ve Proteazlar 25
2.11 Moleküler Şaperonlar 26
2.11.1 Moleküler Şaperonlarda Bulunan İşlevsel Özellikler 27
2.11.2 Moleküler Şaperon Çeşitleri 27
2.12 Bruselloz Hastalığı 38
2.13 Hastalık Faktörü: *Brucella* 39
2.14 *Brucella abortus* 40
2.15 Omp25 proteini 41
3 Materyal ve Metot **43**
3.1 Materyal 43
3.1.1 Kullanılan Cihazlar 43
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmit Suşları 43
3.1.3 Plazmit DNA İzolasyonu 44
3.1.4 Elektroforez Reaktifleri 44
3.1.5 Ekspresyon 44
3.1.6 Proteinlerin Hazırlanması, SDS-PAGE ile Analizi ve Boyama 44
3.1.7 Western Blot Reaktifleri 44
3.1.8 Protein Saflaştırılması 45
3.2 Metot 46
3.2.1 Takara Şaperon Plazmitleri 47
3.2.2 Şaperon Plazmitlerinin Transformasyonu 48
3.2.3 Kompetan Hücre Hazırlama 48
3.2.4 Omp25 Gen Bölgesi İçeren Rekombinant Plazmit DNA'sı İzolasyonu 49
3.2.5 Agaroz Jelde Yürütme 50
3.2.6 Rekombinant Plazmit DNA'sının Transformasyonu 50
3.2.7 Ekspresyon 50
3.2.8 Örnek Hazırlama ve SDS-PAGE 51
3.2.9 Jellerin Coomassie Boyaması 52
3.2.10 Western Blot 52
3.2.11 Affinite Kromotografi ile Saflaştırma 53
4 Sonuç ve Öneriler 55
4.1 Deneysel Bulgular 55
4.1.1 Omp25 Gen Bölgesi İçeren Rekombinant Plazmit DNA İzolasyonu 55

4.1.2 Transformasyon....56
4.1.3 rOmp25 proteinin ekspresyonunun optimizasyonu....57
4.1.4 Western Blot Analizi....66
4.1.5 Saflaştırma....67
4.2. Sonuç ve Öneriler....69
KAYNAKÇA **75**

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
bç	Baz çifti
bp	Baz çifti
dk	Dakika
g	Gram
kbp	Kilo baz çifti
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
RPM	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
µg	Mikrogram

KISALTMA LİSTESİ

CTAB	N-asetiltrimetilamonyum bromür
Gdn-HCl	Guanidinyum klorür
LPS	Lipopolisakkarit
LPS	Lipopolisakkarit
OMP	Dış zar proteini
Ori	Replikasyon Orijini
RBS	Ribozom bağlanma sekansı
R-LPS	Pürüzlü polisakkarit
RNaz A	Ribonükleaz A
ROP	Primer represörü
S-LPS	Pürüzsüz polisakkarit
SRP	Sinyal tanıma parçacığı
TF	Trigger faktörü
trxB	Thioredoksin redüktaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Prokaryotik ekspresyon vektörünün belirgin özelliklerinin şematik gösterimi. 7
Şekil 2.2 Lac Operonu.....8
Şekil 2.3 Lambda faj represörü 9
Şekil 2.4 Tetrasiklin indüklenebilir promotörün şematik gösterimi 10
Şekil 2.5 Tetrasiklin indüklenebilir promotörün şematik gösterimi 10
Şekil 2.6 L-Ramnoz ile indüklenebilir rhaPBAD promotörü. 11
Şekil 2.7 E.coli T7 RNA polimeraz sisteminin çalışma mekanizması.....12
Şekil 2.8 Gram negatif bakterilerde protein sekresyon sistemleri 17
Şekil 2.9 1: 1 Oranında manyetik parçacıklarla karıştırılmış GFP inklüzyon cisimcikleri.....23
Şekil 2.10 E. coli'de yeni sentezlenen sitozolik proteinlerin katlanmasında şaperon etkisinin modeli. 28
Şekil 2.11 TF'nin yapısı ve üç alanlı organizasyonu. 29
Şekil 2.12 TF'nin yüzey özellikleri. 31
Şekil 2.13 TF içindeki esneklik ve konformasyonel düzenlemelerin modeli. 31
Şekil 2.14 DnaK'ya ait nükleotit bağlama bölgesinin kristal yapısı (ADP bağlı) 33
Şekil 2.15 DnaK'ya ait peptit bağlama bölgesinin kristal yapı görüntüsü (Heptamerik peptit bağlı).....34
Şekil 2.16 X-Ray ışını kristalografisi ile belirlenen, E. coli'de GroE şaperonunun yapısı. 35
Şekil 2.17 GroES'in bağlanması üzerine GroEL yapısındaki değişiklikler. 37
Şekil 2.18 Omp25 proteinin 3 boyutlu yapı modellemesi.....42
Şekil 3.1 Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması 46
Şekil 3.2 Şaperon plazmitleri vektör haritaları.....47
Şekil 4.1 Plazmit DNA agaroz jel görüntüsü. 55
Şekil 4.2 Şaperon plazmidi transformasyonu sonucu transformant koloniler.....56
Şekil 4.3 Omp25 plazmidi transformasyonu sonucu transformant koloniler.....57
Şekil 4.4 30 °C'de indüklenen sadece Omp25 gen bölgesi içeren rekombinant plazmit DNA'sını içeren hücrenin ekspresyon profili.....58
Şekil 4.5 30 °C'de indüklenen pgro7 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. 59
Şekil 4.6 30 °C'de indüklenen pKJE7şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. 59

Şekil 4.7 30 °C'de indüklenen pgtf16 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. 60
Şekil 4.8 30 °C'de indüklenen pGTf2 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili 60
Şekil 4.9 30 °C'de indüklenen pgKJE8 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. 61
Şekil 4.10 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf2 ve rOmp25/pgtf16 şaperon plazmitlerinin ekspresyon profilleri..... 62
Şekil 4.11 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf16 ve rOmp25/pgro7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profilleri. 62
Şekil 4.12 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE7 şaperon plazmidi ile indüklenen ekspresyon profili. 63
Şekil 4.13 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE8 şaperon plazmidi ile indüklenen ekspresyon profili. 63
Şekil 4.14 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf16 ve rOmp25/pgro7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili. 64
Şekil 4.15 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgro7 ve rOmp25/pgKJE7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili. 65
Şekil 4.16 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE7 ve rOmp25/pgKJE8 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili..... 65
Şekil 4.17 Sadece Omp25 şaperon plazmidinin 25°C'de 0.5mM ve 1 Mm IPTG ile 21 saat boyunca indüklenen ekspresyon profili. 66
Şekil 4.18 25°C'de moleküler şaperonlar ile indüklenen ekspresyon sonrası western blot analizi 67
Şekil 4.19 Bütün şaperon plazmitlerini ve Omp25 gen bölgesini içeren hücrenin 25°C'de indüklenen ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal şartlarda saflaştırma görüntüsü 68
Şekil 4.20 Sadece Omp25 gen bölgesini içeren hücrenin 25°C'de indüklenen ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal şartlarda saflaştırma görüntüsü..... 68

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Füzyon partnerleri ve ligandları 19
Tablo 3.1 Şaperon plazmitleri ve özellikleri.....47

ÖZET

Farklı Şaperon Plazmitleri Kullanılarak *Escherichia coli*' de Rekombinant Omp25 Proteinin Ekspresyonunun Optimizasyonu

Kübra TRABZONLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

E.coli, kısa sürede hızlı bir şekilde kültüre alınabilmesi ve yüksek verimli protein üretimi gibi sahip olduğu avantajlar nedeniyle rekombinant protein üretimi için en yaygın kullanılan konakçı organizmadır. *E.coli* sitoplazma, birçok avantajı nedeniyle yüksek düzeyde protein üretimi için en çok tercih edilen hücresel bölmedir. Ancak bu kompartmanda protein üretimi sıklıkla inklüzyon cisimcikleri oluşumu ile sonuçlanır. *E.coli*' de inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen rekombinant proteinler; inaktif, agregat oluşturan, çözünmeyen, genellikle doğal olmayan moleküler disülfit bağlara ve olağandışı serbest sisteinlere sahip yapılardır. Aktif proteinin inklüzyon cisimlerinden *in vitro* olarak geri kazanımı büyük ölçekli üretim için çok pahalı olabildiğinden bu proteinlerin doğal üç boyutlu yapı oluşumunu sağlamaya yönelik stratejiler günümüzde önemi korumaktadır.

Sunulan çalışmada sitoplazmada inklüzyon cisimciği oluşturduğu bilinen ve bruselloza hastalığına karşı majör antijenlerden olan rekombinant Omp25 proteininin; farklı moleküler şaperonlar kullanılarak sıcaklık ve indükleyici konsantrasyonu açısından ekpresyonun indüklenmesi stratejileri ile protein çözünürlüğü ve doğru katlanmanın arttırılması hedeflenmektedir. Çalışmada DnaK/DnaJ/GrpE/GroES/GroEL ve trigger faktör sitoplazmik şaperonlarını farklı kombinasyonlarda içeren pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16 şaperon plazmitleri kullanılmış, iki ayrı sıcaklık ve iki ayrı IPTG konsantrasyonu çözünürlüğün artırılması için optimizasyon parametreleri olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar,

25 °C'de indüklenen ekspresyonun 30°C'de ekspresyona kıyasla supernatanttaki toplam protein miktarını artırdığı ancak Omp25 proteininin çözünürlüğüne etkisinin olmadığını göstermiştir. Aynı şekilde indükleyici konsantrasyonu yarıya düşürülerek yapılan çalışmada, rekombinant Omp25 proteininin çözünürlüğüne anlamlı bir etkisi gözlemlenmemiştir. Yapılan çalışmalar SDS-PAGE ve Western Blot analizleriyle doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Omp25, inklüzyon cisimcikleri, agregasyon, moleküler şaperonlar, rekombinant protein

ABSTRACT

Optimization of Rekombinant Omp25 Protein Expression in *Escherichia coli* by Using Different Chaperone Plazmids

Kübra TRABZONLU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Tülin ARASOĞLU

E.coli is the most commonly used host organism for recombinant protein production because of the advantages such as rapid culture and high yield protein production in a short time. *E.coli* cytoplasm is the most preferred cellular compartment for high level protein production due to many advantages. However, protein production frequently results in the formation of inclusion bodies. Recombinant proteins, produced as the inclusion bodies in *E. coli, are* inactive, aggregate-forming, insoluble structures which have generally unnatural intra and molecular disulfide bonds and extraordinary free cysteines. In-vitro recovery of the active protein from inclusion bodies can be very expensive for large scale productions. Therefore, in order to provide the formation of natural 3-dimensional structure of proteins, increasing the protein solubility and correct folding is aimed by using different strategies.

The main purpose of this study was to increase soluble expression by changing parameters such as the temperature and inducer concentrations of recombinant Omp25 outer membrane protein, one of the major antigens against brucellosis disease, which are also known to form inclusion bodies in the cytoplasm, with the help of chaperone plasmids (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) containing different cytoplasmic chaperones (DnaK/DnaJ/GrpE/GroES/GroEL and Trigger factor). Two separate temperatures (25 °C and 30°C) and two separate IPTG concentrations (1 mM and 0.5mM) were evaluated as optimization parameters to increase solubility. The results of this study claimed that the expression induced at 25 °C increased the total amount of protein of the supernatant compared to the expression at 30 °C while had no effect on the solubility of Omp25 protein. In the same context, any significant effect on the solubility of recombinant Omp25 protein was not

observed although the inducer concentration was reduced by half. The studies were verified by SDS-PAGE and Western Blot analyzes.

Keywords: Omp25, inclusion bodies, aggregation, molecular chaperones, recombinant protein

1

Giriş

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler, biyofarmasötik araştırmalarda ve yüksek seviyede protein üretilmesinde rekombinant DNA teknolojisinin kullanımını ana itici güç haline getirmiştir. Özellikle biyofarmasötik endüstri ile; antisens molekülleri, monoklonal antikorlar, genomik, proteomik, metabolomik, farmakogenomik, nanobiyoteknoloji, gen tedavisi, doku mühendisliği ve daha birçok alanı kapsayan çok yönlü teknolojilere hizmet verme potansiyeli doğmuştur [1]. Ayrıca önümüzdeki 50 yıl süresince yeni ilaç ve aşıların üretilmesiyle kronik ve karmaşık akut hastalıkların çözülmesi, çevre kirliliğinin etkilerini belirgin bir şekilde azaltılması ve dünyanın karşı karşıya olduğu enerji probleminin çözülmesi amacıyla rekombinant DNA teknolojisinde çok daha önemli gelişmelerin kaydedilmesi beklenmektedir [2]. Bir rekombinant DNA tarafından kodlanan rekombinant proteinin üretilmesinde *Escherichia coli* sıklıkla tercih edilen konakçıdır. *Escherichia coli;* hızlı kültüre alınabilmesi, hızlı ekspresyon ve yüksek verimde protein üretimi sağlayabilmesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle rekombinant protein üretiminde en çok tercih edilen konakçıdır [3]. Aynı zamanda konakçının sahip olduğu iyi tasarlanmış bir ekspresyon vektörü tüm bileşenleri ile rekombinant protein üretiminde gen ekspresyon seviyesini etkilemesi bakımından önemlidir. Konakçı seçiminin yanında, proteinin hangi hücresel bölmeye hedefleneceği (sitoplazma, periplazma, hücre dışı) ilerideki aşamalarda proteinin aktif bir biçimde elde edilebilmesi ve saflaştırma kolaylığı sağlaması açısından göz önünde bulundurulmalıdır [4]. *E.coli* sitoplazması, yüksek seviyede protein üretiminde en çok tercih edilen kompartmandır fakat protein üretimi sıkça inklüzyon cisimcikleri oluşumu ile sonuçlanır. *E.coli*' de inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen rekombinant proteinler; inaktif, agregat oluşturan, çözünmeyen, genellikle doğal olmayan intra ve moleküler disülfit bağlara ve olağandışı serbest sisteinlere sahip yapılardır [5]. Bu cisimciklerin oluşumu aktif protein eldesinde sıklıkla karşılaşılan problemlerdendir ve bu cisimcikler

nedeniyle rekombinant protein pazarında pek çok protein istenilen verimlerde elde edilememektedir.

İnklüzyon cisimcikleri olarak rekombinant protein üretiminin birkaç avantajı olmasının yanında biyolojik olarak aktif proteinin inklüzyon cisimlerinden *in vitro* olarak geri kazanımı; inklüzyon cisimciklerinin izolasyonu ve yıkanması, agregatlatmış proteinin çözünürlüğünün sağlanması ve çözündürülmüş proteinin yeniden katlanması adı altında üç aşama içermektedir. Ancak bu aşamalar büyük ölçekli üretim için çok pahalı olabilmektedir [6]. Bu nedenle proteinlerin doğal üç boyutlu yapı oluşumunu sağlamaya yönelik; moleküler şaperonlar ile birlikte hedef genin ekspresyonunun sağlanması, düşük sıcaklıklarda bakteriyel kültürlerin büyütülmesi, uygun redoks potansiyelini sağlamaya yönelik thioredoksin-eksik konakçı suşların kullanılması, protein sentezi oranının düşürülmesi ve füzyon partneri kullanılması gibi stratejiler kullanılarak protein çözünürlüğü ve doğru katlanmanın sağlanması hedeflenmektedir [7], [8]. İnklüzyon cisimcikleri oluşumu, hücre şaperonlarının aracılık ettiği bir işlemle *in vivo* olarak geri döndürülebilir [9]. Bakteriyel şaperonlar, doğru katlanmayı sağlayıp, agregatlaşmayı önleyerek hücre polipeptitlerinin konformasyonel olarak işlemesinde rol oynarlar [10]. Bununla birlikte, şaperonlar bakteri hücrelerinde sınırlayıcı olduklarından [14,15] ısı şoku tepkisi uyarılsa bile, biyolojik ürünlerin uygun bir şekilde yapılandırılmasını garanti edemez. Bu sınırlama nedeniyle, seçilen şaperon kodlayan genin hedef rekombinant genle birlikte ekspresyonu, gelişmiş katlanma düzeyi ve arttırılmış çözünürlük ile sonuçlanamayabilmektedir [6,16]. Öte yandan, farklı şaperon grupları katlama girişimleri sırasında işbirliği içinde hareket edebilirler [17].

Protein katlanmasına katılan sitoplazmik şaperonlardan trigger faktör (TF), bakterilerdeki tek ribozomla ilişkili şaperon olmasının yanında yeni sentezlenen polipeptit zinciriyle ilk etkileşim kuran şaperondur [18,19]. TF, doğrudan büyüyen polipeptit zincirlerinin ribozomdan çıktığı ve kalabalık sitozole girdiği ribozomal çıkış bölgesine yerleşmiştir. Yaklaşık 48 kDa büyüklüğünde olan TF; PPIaz domaini, N terminal domaini ve C terminal domaini olmak üzere 3 bölmeden oluşur. Trigger faktörden salındıktan sonra hala etkili bir şekilde katlanmamış proteinlerin bir kısmı; Hsp70 şaperonu olan DnaK, onun birlikte şaperonu olan DnaJ ve nükleotit değişim faktörü GrpE (KJE sistemi) veya Hsp60 şaperou olan GroEL ve onun birlikte şaperonu GroES (ELS sistemi) ile etkileşime girerek doğru katlanabilmektedirler [20]. KJE sistemi ve ELS sistemi ATP bağımlı şaperonin sistemleridir [21]. DnaK, zayıf bir ATPaz aktivitesine sahipken, hem DnaJ hem de GrpE, ilk olarak nükleotit hidrolizini

destekleyerek DnaK'nın ATPaz döngüsünü hızlandırır ve ikinci olarak nükleotit salımını teşvik ederler[21]. GroEL ve onun birlikte şaperonu olan GroES *E.coli*'de iyi karakterize edilmiş şaperonin sistemleridir. GroES şaperonu; nükleotit bağlanmasından sorumlu olan ekvatoryal domain, GroES'in bağlandığı apikal domain ve iki domain arasındaki etkileşimi sağlayan ara domainden oluşmaktadır [22].

Bruselloz; *Brucella spp.* grubu bakterilerinin oluşturduğu ve farklı türde *Brucella* suşlarının özellikle sığır, koyun, keçi ve domuz gibi evcil hayvanlarda yavru atımına yol açtığı, aynı zamanda insanlara da bulaşabilen endemik, bulaşıcı ve enfeksiyöz bir hastalıktır [23]. *Brucella* dış zar proteinleri (OMP'ler), dikkate değer bir immünojeniklik özelliğe sahip hücreye özgü yüzey antijenleridir. *B.abortus*'ta bulunan Omp25 proteini, brusellozis hastalığı açısından önemli virülans faktörü ve majör antijenden biridir ve bruselloza karşı rekombinant aşı üretiminde mükemmel bir adaydır [24].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında bruselloza karşı koruyucu özelliği olduğu düşünülen ve sitoplazmada inküzyon cisimciği oluşturan Omp25 proteininin moleküler şaperonlar ile çözünürlüğünün arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik belirlenen hedefler şunlardır:

- ✓ Hedef genin ve moleküler şaperonların *E.coli* BL21(DE3) suşuna iki aşamalı transformasyonunun yapılması ve seçilimin sağlanması
- ✓ En etkili çözünebilir protein ekspresyonu için optimizasyonun sağlanması
- ✓ Rekombinant Omp25 proteininin doğal koşullarda saflaştırılması ve doğrulanması

1.3 Hipotez

Şaperonlar, çeşitli amaçlar için prokaryotik, maya ve yüksek ökaryotik hücreler tarafından üretilmektedirler. Her şaperonun veya bunların kümelerinin aşırı ekspresyonu, hücrede bir rekombinant proteinin üretim seviyesini etkilemektedir. Moleküler şaperonların hedef gen ile birlikte ekspresyonunun protein çözünürlüğünü arttırarak agregasyonu düşürdüğü literatürde yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında bruselloza karşı aşı adayı dış membran proteini rekombinant Omp25'in moleküler şaperonlar ile ekspresyonu yapılarak çözünürlüğünün arttırılması ve doğal koşullarda elde edilmesi öngörülmüştür.

2

Genel Bilgiler

2.1 Rekombinant Protein Üretimi

Proteinler, yaşamın yapı taşlarıdır, tüm canlılar tarafından doğal metabolizmalarının bir parçası olarak sentezlenir. Proteinler; canlı hücrelerin yapı, işlev ve düzenlenmesinde gerekli olan büyük moleküllerdir. Metabolizma reaksiyonlarını katalizleme, DNA replikasyonu, uyaranlara yanıt verme, hücrelere ve organizmalara yapısal bütünlük sağlama ve molekülleri bir konumdan diğerine taşıma dahil olmak üzere organizmalar içinde çok çeşitli fonksiyonlar gerçekleştirirler [1]. Proteinler organizmalar tarafından doğal olarak sentezlendiği gibi aynı zamanda biyoteknolojik yöntemler kullanılarak da rekombinant olarak sentezlenebilmektedir. Hem doğal hem de rekombinant proteinler biyofarmasötik olarak sağlıkta, enzim olarak kağıt, deterjan ve tarım sektörlerine fayda sağladığından ticari olarak endüstride son derece önemli bir yer tutmaktadır [3]. Özellikle protein mühendisliği sayesinde, istenen proteinler endüstrinin zorlu taleplerini karşılamak için kitlesel olarak üretilmektedir. Nitekim, günümüzde üretilen çoğu biyofarmasötik ürün rekombinanttır [2]. Rekombinant protein, bir rekombinant DNA tarafından kodlanan modifiye bir protein türüdür. Temel olarak, bir rekombinant DNA, bir plazmitte (genellikle bakterilerde bulunur) bir araya getirilen iki DNA segmentinden oluşur. Bakteri plazmidine istenilen proteini kodlayacak gen dizisini taşıyan DNA segmenti eklendiğinde oluşan rekombinant DNA, istenilen proteini üretir. 2002 yılına kadar 155'in üzerinde onaylı protein ve peptid bazlı ilaç ve aşı, biyofarmasötik şirketler tarafından geliştirilmiştir. Bugün ise, 300'den fazla onaylı peptid ve protein ilacı FDA listesindedir [1]. Üretilen ve biyofarmasötik amaçlı kullanılan rekombinant protein ilaçlarının bazıları; eritropoietin, alfa-galakdosidaz A, N-asetilglikozamin-4-sülfotaz , dornaz alfa doku plasminojen aktivator , interferon (IF), interferon-beta-1a, rasburikaz'dır [25]. Bu nedenle rekombinant proteinler ile hastalıkların tedavi edilmesine yönelik yaklaşımlar giderek artmaya devam etmektedir [1].

Rekombinant proteinlerin etkin, saf ve iyi karakterize edilmiş biçimde üretimi, farmasötik endüstride protein kimyası için en önemli amaç haline gelmiştir [26]. İlgilenilen spesifik protein için uygun bir promotör sistemi ve konakçının rasyonel seçimi en çok dikkat edilmesi gereken konular arasındadır [27]. Rekombinant protein

üretimine yönelik ilk aşama istenen DNA parçasının klonlanması, sonrasındaki aşama proteinin seçilen ekspresyon sisteminde amplifiye edilmesinin sağlanmasıdır. İyi bilinen ve düzenlenmiş bir promotörün arkasına ilgili geni yerleştirmek, büyük verimde protein üretimi için önemli bir parametredir.

Rekombinant protein üretimi için bakteriyel ekspresyon sistemleri; ucuz substratlarda hızlı ve yüksek yoğunlukta büyüyebilme kabiliyetleri, düşük maliyetleri, yüksek verimlilik göstermesi, sıklıkla iyi karakterize edilmiş genetikleri, gittikçe artan sayıda klonlama vektörü ve mutant konakçı suşunun bulunabilmesi nedeniyle dikkat çekicidir [27]. İlgilenilen proteine uygun konakçı ve promotör sisteminin seçimi, rekombinant protein üretiminde elde edilecek verim açısından önemlidir. Bu karar genellikle hedef proteinin kendisine bağlıdır. Çok çeşitli protein ekspresyon sistemleri mevcuttur. Proteinler bakteri, maya, küf, memeli, bitki veya böceklerin hücre kültürlerinde veya transgenik bitki ve hayvanlarda eksprese edilebilir. Protein kalitesi, işlevselliği, üretim hızı ve verimi, rekombinant protein üretimi için doğru ekspresyon sistemini seçerken göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktörlerdir [28]. Genel olarak, 100 kDa' dan daha büyük olan proteinler ökaryotik sistemlerde eksprese edilirken, 30 kDa' dan küçük olanlar prokaryotik sistemlerde eksprese edilmektedir [1].

2.2 Konakçı Olarak *E.coli*

Son yıllarda, rekombinant protein üretimi için optimize edilmiş birçok bakteri konakçısı bulunmaktadır [1]. Teorik olarak tüm bakteri türleri rekombinant protein üretimi için uygundur. Genomik çağ, sıkça ve nadiren kullanılan bakteri konakçıları hakkında yeni bilgiler sunmaktadır. *E.coli,* rekombinant ve farmasötik proteinlerin endüstriyel üretiminde en yaygın kullanılan konakçıdır [3].

E.coli'deki transkripsiyon, translasyon ve protein katlanma mekanizmalarının moleküler temelindeki son gelişmeler; genetik araçların gelişmişliği ile birlikte, bu bakteriyi prokaryotik ve kompleks ökaryotik proteinlerin ekspresyonu için her zamankinden daha değerli kılmakta ve yaygın şekilde endüstriyel ve farmasötik protein üretiminde kullanılmasını sağlamaktadır. Bunun sonucu olarak da büyük ölçekli üretim sistemleri kurularak pek çok ticari proteinin kitlesel üretimi gerçekleştirilmektedir [25]. Protein ekspresyonunda *E. coli* BL21 ve K12 suşları sık bir şekilde kullanılmaktadır. (K12 suşlarının aksine BL türevleri OmpT ve Ion proteaz kusuruna sahiptir).

E.coli' nin kullanım avantajları arasında:

- ✓ Hızlı ekspresyon ve yüksek verim,

- ✓ Kolay kültüre alınabilme,
- ✓ Genom modifikasyonlarının kolay ve hızlı gerçekleşebilmesi,
- ✓ Seri üretimi sağlanabilmesi,
- ✓ Maliyetinin ucuz olması,
- ✓ Glikozile edilmemiş proteinlerin fonksiyonel ekspresyonu sağlayabilmesi,
- ✓ Genom ve plazmid kopya numarasının kolaylıkla ve hızla değiştirilebilir olması,
- ✓ Promotor kontrolünün kolay olması,
- ✓ Kuru ağırlığının %80'ine kadar rekombinant proteinleri biriktirebilmesi yer almaktadır.

E. coli sistemi, bununla birlikte bazı dezavantajlara da sahiptir:

- ✓ Aşırı eksprese edilen rekombinant proteinlerin, sitoplazmada veya periplazmik alanda birikmesi,
- ✓ Yüksek hücre yoğunluklarının asetat oluşumundan dolayı toksisiteye neden olması,
- ✓ Disülfit bağına sahip proteinleri üretememe ve yeniden katlanma zorluğu [1],
- ✓ Genellikle insanlarda ve diğer memelilerde pirojenik olan endotoksinler olarak adlandırılan lipopolisakarit (LPS) birikimini nedeniyle terapötik kullanımının azlığı,
- ✓ Glikozilasyon yokluğu nedeniyle modifiye edilmemiş rekombinant protein üretimi, antikorların bu proteinlerine bağlanamaması nedeniyle tanı güçlüğüne sebep olması.

Bu dezavantajların ortadan kaldırılabilmesi amacıyla bazı gelişmeler kaydedilmiştir:

- ✓ *E.coli*' de üretilen rekombinant proteinlerin LPS varlığı dolayısıyla endotoksin özellik göstermesi (endoktoksin varlığı tespiti=LAL testi) ikinci aşama saflaştırılma ile giderilmektedir [29].
- ✓ Toksisite, bioreaktörlerde oksijenin seviyesinin sürekli kontrolü ile önlenebilmektedir.
- ✓ Protein katlanma sorununu iyileştirmek için [30]; ekspresyonun regülasyonu için farklı promotorler ve konakçı suşlarının kullanılması, şaperonların ve/veya foldazların birlikte ekspresyonu, sıcaklığın düşürülmesi, proteinlerin periplazmik boşluğa veya ortama salınması, protein sentez oranını azaltmak, büyüme ortamını değiştirmek, bir füzyon ortağının eklenmesi, proteinin bir fragmanının ekspresyonu ve *in vitro* denatürasyonun beraberinde proteinin yeniden katlanması [31,32,33,34,35,36,37] çözümleri üretilmiştir.

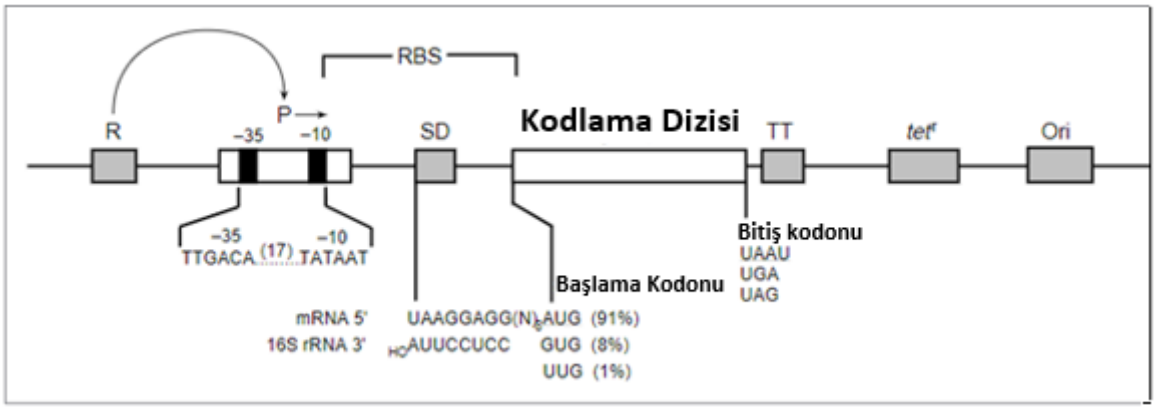
Ancak *E.coli* ekspresyon sistemlerinde glikozilasyon ve posttranslasyonel modifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilemediği için;

- ✓ glikozilasyon gerektiren proteinler; memeli hücreleri, mantarlar veya bakulovirüs sistemleri ile üretilmeye çalışılırken,
- ✓ posttranslasyonel modifikasyon gerekli uygulamalar için mayalar, filamentli mantarlar, böcek ve memeli hücre kültürleri gibi alternatif konaklar tercih edilmelidir [26].

Glikosile olmayan proteinler genellikle *E. coli* veya mayalarda yapılmakta ve terapötik protein pazarının %40'ını oluşturmaktayken; N-glikosile edilmiş proteinler genellikle insan glikosilasyonunu taklit eden memeli hücrelerinde yapılmaktadırlar. Ayrıca FDA onaylı farmasötik proteinlerin başka bakteri konakçıları ile üretilmesi, özellikle nadir kullanılan kodonlar veya endotoksinlerin varlığı nedeniyle olabilmektedir [4]. Ayrıca ticari kar amaçlı patent olgusu da ilaç endüstrisinin başka konakçı ile çalışmasının bir diğer nedenidir.

2.3 Ekspresyon Vektörlerinin Temel Bileşenleri

İyi tasarlanmış bir prokaryotik ekspresyon vektörü, protein üretiminin hem transkripsiyonel hem de translasyonal yönlerini etkileyen bir dizi optimal olarak konfigüre edilmiş genetik eleman içerir (Şekil 2.1). Ek olarak, bir antibiyotik dirençli genin bu vektöre eklenmesi, vektörün fenotipik seçimini kolaylaştırır ve replikasyon orjini (Ori), vektör kopya sayısını belirler[4].



Şekil 2.1 Prokaryotik ekspresyon vektörünün belirgin özelliklerinin şematik gösterimi.

2.3.1 Promotörler

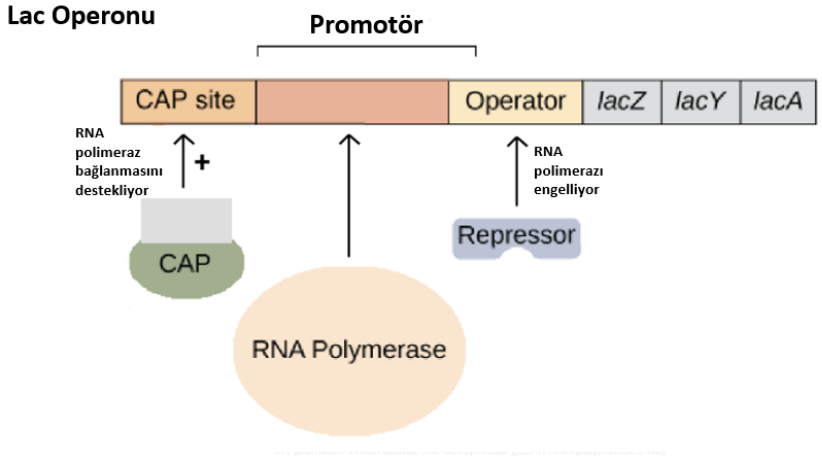
Birçok farklı tipte promotör, *E.coli*'deki gen ekspresyonu seviyesini etkileyebilmektedir. Promotörlerin yüksek seviye gen ekspresyonu için uygunluğu, birkaç kriter ile belirlenmektedir. Bunlar:

- ✓ Güçlü olmalı, toplam hücresel proteinin %10-30' undan fazla protein üretebilme kapasitesine sahip olmalı,
- ✓ Minimum seviyede bir bazal transkripsiyon sergilemeli (Yüksek oranda baskılanabilir bir promotör; ilgilenilen proteinin, konakçı hücrenin büyümesine zararlı veya toksik olduğu durumlar için özellikle önemlidir).
- ✓ Promotorlerin indüksiyonu basit ve uygun maliyetli bir şekilde yapılabilmelidir.

Termal ve kimyasal indüksiyon, büyük ölçekli protein üretiminde yaygın olarak kullanılan tekniklerdir [4].

2.3.1.1 lac, tac ve trc Promotor Sistemleri

Lac promotor sistemi, düşük ve orta seviye ekspresyon seviyesine sahiptir. Zayıf, çok düşük hücre içi seviyede gen ürünlerine uygun olarak düzenlenmiştir [38]. Trc ve tac promotor sistemleri ise orta derecede yüksek ekspresyon seviyesine sahiptir. Yüksek seviye gen ürünlerine uygun olarak düzenlenmiştir ancak T7 sisteminden daha düşük ekspresyon seviyesine sahiptir. Lac, lac ve trc promotör sistemleri, katabolit represyon ve cAMP düzeyine bağlı düzenlenmektedir (Şekil 2.2). T7 RNA polimeraz sistemi geliştirilerek bu promotör sistemlerinin sahip olduğu sorunlar azaltılmıştır. Lac, trc ve tac promotor sistemi inducer olarak IPTG kullanır. Bu da nispeten pahalı indüksiyon sağladığından dezevantajlı bir durumdur.

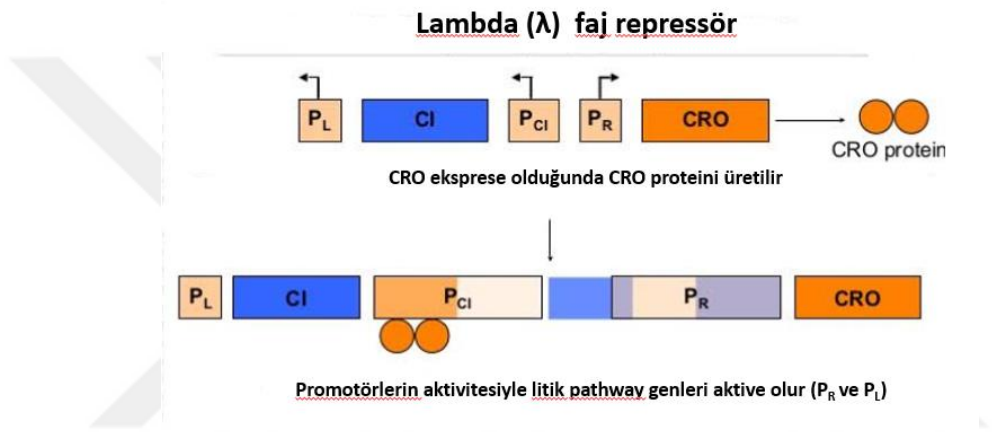


Şekil 2.2 Lac Operonu

2.3.1.2 Faj Promotörü pl

Proteinlerin aşırı ekspresyonunu sağlamak için yaygın olarak kullanılan bir başka yaklaşım, orta derecede yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan düzenlenmiş faj promotörü pL'nin kontrolü altına bir gen yerleştirmektir. İlgili gen bölgesinin, cI

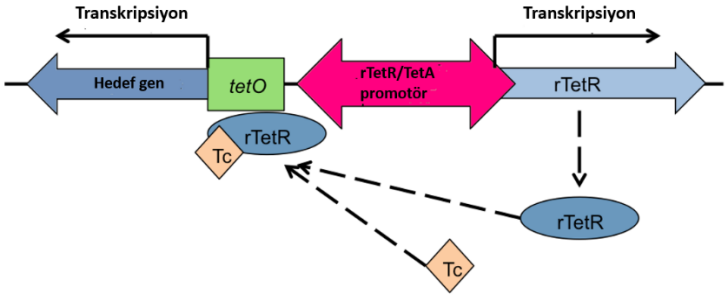
baskılayıcı tarafından düzenlenen sıkıca düzenlenmiş bir faj promotörünün (pL) aşağı yönünde klonlanması gerekir (Şekil 2.3). cI857 represörü sıcaklıkla uyarılmaktadır yani bir kimyasal indükleyiciye ihtiyaç duymaz. İndüksiyon sıcaklığını değiştirilerek gen ekspresyonunun kontrol edilmektedir. 30°C'de, cI857 represörü işlevselken 42°C'de, represör sıcaklığın etkisiyle etkisiz hale gelir ve böylece gen ekspresyonu uyarılır [39,40] Faj promotörü pL'nin represör proteinin etkisiz olduğu düşük sıcaklıklarda konstitüf özellik göstermesi de oldukça ilgi çekicidir (çünkü cI857 baskılayıcı 29°C ve daha yüksek sıcaklıklarda tamamen aktif hale gelir). Çünkü bu konstitüf sistem, proteolitik olarak duyarlı proteinlerin düşük sıcaklıklarda üretilmesinde kullanılabilmektedir [41, 42].



Şekil 2.3 Lambda faj represörü

2.3.1.3 tetA Promotörü / Operatör Sistemi

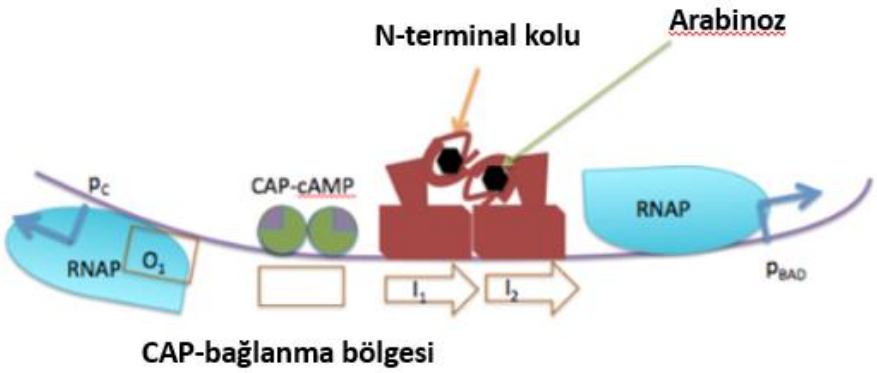
E. coli' de yabancı gen ürününün sıkı bir şekilde düzenlenmesi, yüksek düzeyde sentezi için yararlıdır [43]. *E.coli* geni tarafından kodlanmayan tetR baskılayıcı tarafından düzenlenir (Şekil 2.4). Sistem, kullanılan *E.coli* suşundan, örneğin B veya K12 türevlerinden bağımsızdır. Hücrelerin indükleyicisi az miktardaki konsantrasyonda kullanılan anhidrotetrasiklindir. Diğer sistemlerin aksine, bazal seviye *E. coli* suşunda ve metabolik durumda çok düşük ve bağımsızdır.



Şekil 2.4 Tetrasiklin indüklenebilir promotörün şematik gösterimi

2.3.1.4 L-arabinoz ile İndüklenebilir PBAD Promotörü

Arabinoz operonunun promotörü araBAD (PBAD), *E coli*'de rekombinant protein üretimi için faydalı bir alternatiftir. AraC aktivatörü ile ekspresyon kontrolü, ilgili genin PBAD promotörünün aşağı bölgesine yerleştirilmesi ile elde edilmektedir (Şekil 2.5). Ekspresyon, arabinoz içeren ortamlarda yüksek seviyelerde gerçekleşir. Dahası, ekspresyon glikoz içeren ancak arabinoz içermeyen ortamlarda sıkıca kapatılır. araC-PBAD promoter sistemi kullanılarak ilgili gen bölgesinin ekspresyonu istenilen oranda artırılabilir veya azaltılabilir. Ancak PBAD promotör sistemi kullanılarak ilgili genin ekspresyonu tamamen baskılanamamaktadır [44]. Bununla birlikte bu promotör sisteminin avantajı yüksek seviyeli ekspresyona, nispeten denetlenebilir protein ekspresyonuna ve L-arabinoz gibi maliyeti düşük bir indükleyiciye sahip olmasıdır. Ara genleri çıkarılmış bakteri suşlarında, %0.001 L-arabinoz indüksiyonu ile klonlanan gen en fazla düzeyde eksprese edilmektedir [45]. Arabinoz regülonunun pozitif kontrolünde aktifleştirici AraC ile indükleyici olarak L-arabinoz, işlev göstermektedir[46]. Bu promotör sistemi, yüksek seviyelerde protein üretiminde verimli sonuçlar göstermektedir[47].

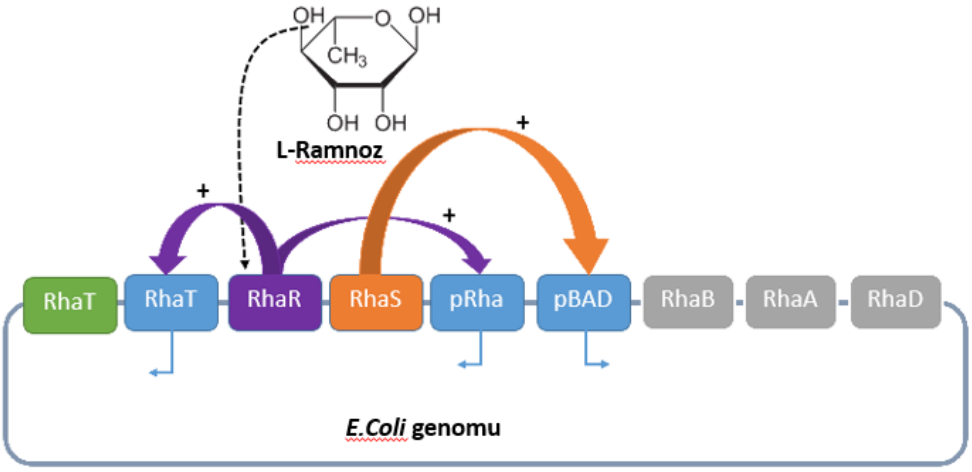


Şekil2.5 L-arabinoz ile indüklenebilir promotörün şematik gösterimi

2.3.1.5. L-Ramnoz ile İndüklenebilir rhaPBAD Promotörü

Ramnoz-indüklenebilir rhaPBAD promotörü, *E coli'*de sıkı bir şekilde düzenlenen rekombinant protein üretimi için ilginç bir araçtır. Prensip olarak, L-ramnoz, RhaS'ın sentezi için RhaR aktivatörü ile indükleyici olarak görev alır, bu da Ramnoz regulonunun pozitif kontrolünde bir aktivatör olarak hareket etmesini sağlar [46]. *E. coli*'de L-rhamnozun katabolizması genel olarak kapalıdır, ancak L-ramnoz tarafından

indüklenebilir. İndüksiyon, ramnoz alımının (rhaT) ve metabolizasyonunun (rhaBAD) pozitif aktivasyonu ile L-ramnoz katabolizmasını düzenleyen RhaS ve RhaR genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 2.6). L-ramnoz bölgeleri aynı zamanda katabolit baskı ile de düzenlenir. Yüksek seviyelerde L-N-karbamolaz üretiminde RhaBAD promotörünün kullanıldığı belirtilmiştir [48].

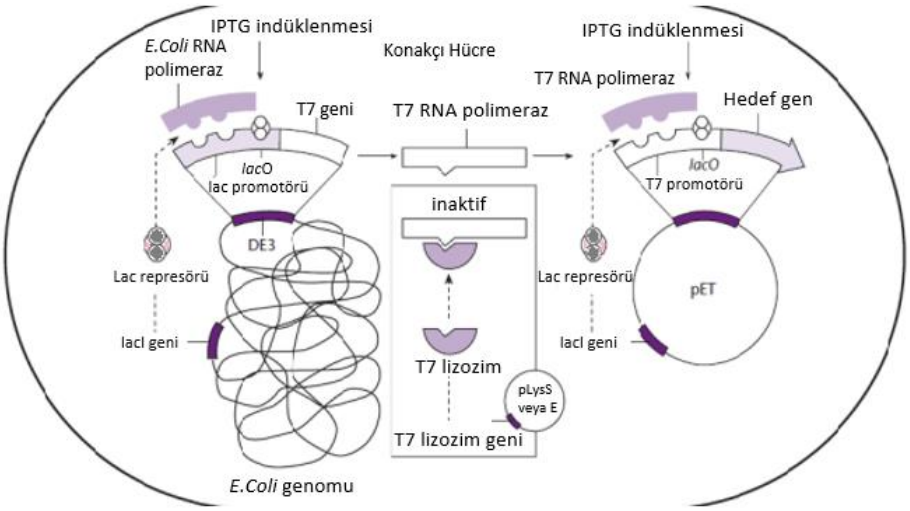


Şekil 2.6 L-Ramnoz ile indüklenebilir rhaPBAD promotörü.

2.3.1.6 T7 RNA Polimeraz Sistemi

Rekombinant protein üretiminde en yaygın tercih edilen polimeraz sistemidir [49]. T7 RNA polimeraz, *E. coli* RNA polimerazından yaklaşık beş kat daha hızlı zincirleri uzatmaktadır. İki polimeraz birbirinden farklı olan promotörleri ayırt edebilmekte ve selektif olarak işlev görebilmektedir (Şekil 2.7). Bu şekilde *E.coli* BL21'de (DE3) binlerce homolog ve heterolog protein başarılı bir şekilde yüksek seviyelerde eksprese edilmiştir. T7 polimerazının geni, bir lac promotörü türevi L8-UV5 lac kontrolü altında ve BL21(DE3) kromozomal suşunda bulunur. L8-UV5 lac promotörü, nokta mutasyonları ile vahşi tip lac promotöründen farklılık gösterir. Bu mutasyon promotor gücünü artırır ve cAMP ve CAP olarak adlandırılan reseptör proteinine bağımlılığı azaltır. Sahip olduğu nokta mutasyonlarının üçüncüsü, güçlü bir promotör meydana getirir ve bu promotörün glikoza karşı toleransı azdır [50]. Bu mutasyonlar, glikoz varlığında bile IPTG ile T7 RNA polimerazın güçlü indüksiyonuna izin verir. Bununla birlikte, T7 RNA polimerazın indüksiyon için bazal ekspresyonu vardır [51,52] ve bu da eğer üretilen proteinler konak hücreler için toksik ise sorunlara yol açabilir [53]. Bazal seviyeyi azaltmanın bir yolu, pLysS veya pLysE vektörleri içeren konakçı suşları ile çalışmaktır. Bu vektörler, T7 RNA polimerazın doğal inhibitörü olan T7 lizozimini

ifade eder [54]. BL21 (DE3)' e kıyasla BL21 (pLysS)'de bazal ekspresyon seviyesi, neredeyse on kat daha düşüktür. Fakat toksisiteye neden olabilecek atıklara sahip bir arka plan yine de mevcuttur. Ayrıca, pLysS veya pLysE içeren suşlarda büyüme oranlarının, T7 lizozim enziminin iki fonksiyonlu özellik göstermesinden dolayı (T7 RNA polimerazın doğal inhibitörü ve peptidoglikan tabakasındaki glikozidik bağını kesmesi) düşük olduğu görünmektedir. İlaveten, T7 lizoziminin, indüksiyondan sonra ekspresyonu azaltabileceği ve belirgin şekilde verimliliğin düşmesine neden olabileceği bilinmektedir [53]. Bunun engellenmesi için, bazal T7 RNA polimeraz seviyesi ortama %0.5-1.0 glikoz eklenerek azaltılabilmektedir [50]. BL21 (DE3) suşu, BL21 (DE3) pLys suşuna göre katabolik baskıya daha dayanıklıdır [52].



Şekil 2.7 *E.coli* T7 RNA polimeraz sisteminin çalışma mekanizması

2.3.2 Transkripsiyon Sonlandırıcılar

Transkripsiyon sonlanması DNA üzerindeki özel baz dizileri ile gerçekleşir;

- Bacteri'da çoğunlukla merkez kısmı tekrar etmeyen ters yönlü, GC- zengin bir tekrar dizisinden oluşan terminasyon sinyali mevcuttur. Böyle bir DNA dizisi transkriptlendiği zaman RNA iç baz eşleşmesiyle bir gövde halka yapısı oluşturarak RNA polimerazın sentezini durdurur [57].
- GC bakımından zengin dizilerin AT bakımından zengin olan diziyle takip edildiği =intrinsik sonlandırıcılar=esas sonlandırıcılar. Bu yapı RNA ve DNA kalıbını birarada tutan ve uzayan U:A baz çiftlerinin oluşmasıyla meydan gelir. Bu yapı her biri sadece iki hidrojen bağı içeren U:A baz çiftleri gibi oldukça zayıftır. RNA polimeraz gövde-halkada faaliyetlerini durdurur ve uzayan üridin dizi bölgesinde DNA ve RNA birbirinden ayrılır ve transkripsiyon sonlanır[57].

- Rho denilen protein faktörü, RNA polimeraz ve DNA'ya bağlanmaz. RNA'ya sıkıca bağlanarak sentezlenen zincirden aşağıya doğru kayarak Rho'ya bağlı terminasyon bölgesine geldiği zaman hem RNA hemde RNA polimerazın birbirinden ayrılmasını sağlar. Ancak Rho; ribozomlara bağlanmış transkriptlere bağlanmaz[57].

Eksprese edilmek istenen genin promotörünün önüne yerleştirilmiş olan bir transkripsiyon sonlandırıcı, arka plan transkripsiyonunu en aza indirebildiği gibi [55]; plazmid kopya sayısının kontrolünde görev alan ROP (Represor of primer) proteininin aşırı üretimi nedeniyle plazmitleri kararsızlaştırabildiği bilinmektedir [56]. Transkripsiyon sonlandırıcıları ve promotör arasındaki inhibisyon etki, önceki kodlama dizisinden sonra promotörün önüne yerleştirilen transkripsiyon sonlandırıcısı ile önlenebilir [4]. Benzer şekilde, Ek olarak, transkripsiyon terminatörleri; mRNA stabilitesini ve protein üretim seviyesini önemli ölçüde artırabilir [56].

2.3.3 Translasyon Başlangıcını Etkileyen Unsurlar

mRNA transkriptinin 5' ucunda yer alan ve ribozomal 16S rRNA 3'ucundaki dizi ile komplementer olan Shine Dalgarno dizisi; ribozomun doğru bir şekilde mRNA ile birleşmesini ve sonrasında yer alan başlangıç kodonu AUG ile translasyonun doğru yerden başlatılmasının ana belirleyicidir [57]. Ancak bugüne kadar, evrensel olarak etkili bir translasyon başlatma konsensüs dizisi tanımlanmadığından ekspresyon vektörlerinin etkinliğinin artırılmasında, sadece transkriptin 5' ucundaki ikincil yapı oluşumu potansiyelini azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar, ribozom bağlanma bölgesi (RBS) sekansının, adenin ve timidin kalıntıları ile zenginleştirilmesini, spesifik kalıntıların mutasyonunu ve translasyonel olarak bağlanmış sistemlerin kullanımını içermektedir [56].

2.3.4 Translasyonel Güçlendiriciler (Enhancerlar)

Genellikle bir genin çok yukarısında ya da aşağısında ve hatta ayrı kromozomda yer alabilen düzenleyici proteinlerin bağlandığı özel diziler olan "translasyon güçlendiriciler"in ekspresyon vektörlerinde kullanımının gen ekspresyon seviyesini artırdığı bilinmektedir. Özellikle *E.coli* ve bakteriyofajlardan gelen sekans elementlerinin, *E. coli*'de belirgin bir şekilde rekombinant gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu tür translasyon güçlendiriciler [58];

- Birkaç yabancı genin translasyonunu sağlayabilen yeni bir ribozom bağlanma bölgesi,

- *E. coli* atpE geni gibi belirli mRNA'ların 5' translasyon olmamış bölgesi içindeki U-zengin bölgeleri
- T7 genlerinde başlama kodonunun hemen aşağısında bulunan "aşağı akış kutusu (Downstream kutusu = CAUGACUGGUGGA; Bakteriyofaj T7 geninin RBS bölgesindeki +15 ve +26 aralığındaki bölge (Downstream kutusu: *E. coli'*de etkin ve bağımsız translasyon başlatma sinyali)" [56].

2.3.5 Translasyonel Terminatörler

Bir durdurma kodonunun varlığı, mRNA translasyonunun sonlandırılması için zorunludur ve *E.coli* ekspresyon vektörleri, "ribozomun atlaması"nı önlemek için sıklıkla üç durdurma kodonunun tümünü içerir. UAA kodonu; *E.coli* için güçlü bir translasyonel sonlandırıcı olmakla birlikte etkinliği tetranükleotit UAAU dizisiyle daha da geliştirilmiştir [4].

2.3.6 mRNA Stabile Ediciler

Hücrelerde gen ekspresyonuna aracılık etme ve protein sentez seviyesini düzenlemek için RNA stabilite kontrolü ve degredasyonu kullanılır [59]. Prokaryotik ekspresyon sistemlerinde; mRNA degradasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir faktördür ve belli bir süre boyunca proteine çevrilebilecek mRNA miktarını sınırlandırır [60]. Prokaryotlarda, hücrede toplam mRNA miktarının azalmasıyla sonuçlanan ve mRNA'yı 3' ucundan degrede eden enzimler RNaz II, RNaz R, PNPaz, RNaz PH, YhaM ve oligo ribonükleaz gibi 3′-5' ekzonükleazlardır [61]. Son yıllarda araştırmacılar, mRNA'ların 3-5′ eksonükleazlar tarafından sindirilmesini önlemek için rastgele mutasyonlarla bir eksonükleaz eksik konakçı suşu seçilmesi veya konak suşundaki nükleazın etkisiz hale getirilmesi üzerine çalışmışlardır [62]. Ancak, her iki yöntemde de hücrelerin normal fizyolojik aktivitesininin önemli ölçüde etkilendiği tespit edilmiştir. Şöyle ki; mutasyon sonucu RNaz aktivitesinin tamamen durdurulması durumunda hücrede istenmeyen mRNA'ların biriktiği, çok sayıda fonksiyonel olmayan proteinlerin elde edildiği ve bakterilerdeki enerji tüketiminin arttığı gözlenmiştir. Fonksiyonel olmayan proteinlerin mRNA dizilerinin çoğunlukla ideal ikincil yapıyı oluşturamadıkları, bu nedenle ürünleri kodlayan hedef genlerin translasyon verimliliğininin büyük ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [63]. Bu nedenle, protein ekspresyonu ve metabolik mühendisliği için normal hücre büyümesi ve metabolizmasını etkilemeden mRNA stabilitesini artırabilen bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla;

- mRNA'ların 3’ UTR’leri, mRNA stabilitesini ve translasyon etkinliğini etkileyerek gen ekspresyonunu belirleyebilir ve ayrıca gelişimsel ve fizyolojik düzenlemeleri mümkün kılarak protein ekspresyonunu da kontrol edebilir [64],
- Palindrom ünitesi olarak da bilinen tekrarlayan ekstragenik palindromik (REP) dizisi, palindromik özelliklerine ve transkripte edilmiş RNA'nın stabil bir kök-ilmek yapısı oluşturabilmesi gerçeğine dayanarak, translasyon olmamış operon bölgesinde bulunan potansiyel bir düzenleyici dizinin varlığı [65],
- *E. coli* ompA transkript gibi bazı mRNA'ların 5’ UTR'sindeki spesifik sekansların, 5’ uçta bir koruyucu ilave bir saç tokası yapısına sahip olması,

gibi bazı düzenlemeler gözlenmektedir. Ancak bugüne kadar tanımlanan stabilizasyon sekanslarının hiçbiri, heterolog mRNA'larda "evrensel stabilizatör" olarak işlev görmemekle birlikte bunların yüksek oranda kararsız transkriptlere entegrasyonu bazı durumlarda etkili olabilmektedir [4].

2.4 Kodon Kullanımı

Eskiden, genetik kod henüz aydınlatılmadan ve herhangi bir genin dizisi belirlenmeden önce kodon kullanımının hücre içinde rastgele bir işlem olduğu ve bir aminoasit için dejenere kodonların eşit sıklıkta kullanıldığı varsayılıyordu. Ancak günümüzde bu varsayımın doğru olmadığı ve kodon kullanımının organizmalar arasında yüksek derecede değişebileceği gösterilmiştir [57]. Amino asitler birden fazla kodon tarafından kodlanır ve her organizma, mevcut 61 amino asit kodonunun kullanımında kendi eğilimini taşımaktadır. Hücrelerin sahip olduğu tRNA’lar, mRNA’ların kodon eğilimi hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır.[66]. Örneğin *E.coli*’ de izolösin aminoasidi yaklaşık 20 izolösin kodonundan sadece AUA tarafından kodlanmaktadır.

Rekombinant hedef genlerin mRNA'sı *E.coli'* de aşırı eksprese edilmek isteniyorsa, kodon kullanımındaki farklılıklar, ekspresyon konakçısında nadir bulunan veya eksik olabilen bir veya daha fazla tRNA'ya olan talep nedeniyle translasyonu engelleyebilir [67,68]. Yetersiz tRNA havuzları; translasyon durması, erken translasyon sonlandırma, translasyon çerçeve kayması ve amino asit yanlış eşleşmesine yol açabilir [69]. Teorik olarak, kültür koşullarının değiştirilmesi, sıcaklığın düşürülmesi, ortam kompozisyonunun değiştirilmesi, indükleyici konsantrasyonunun optimizasyonu gibi yöntemler kodon kullanım önyargısını ve bazı kodon kullanımına dayalı ekspresyon problemlerini hafifletmek için kullanılabilmektedir. Kodon kullanım eğiliminin neden olduğu benzer translasyon problemleri, bol miktarda amino aside sahip olan proteinlerin

yüksek seviyeli ekspresyonuyla da oluşabilmektedir. Bu durumda ekspresyon, kültür ortamına sınırlayıcı amino asit beslenmesi ile geliştirilebilir [67].

2.5 Protein Ekspresyonu İçin Hücresel Bölme Seçimi

Eksprese edilen proteini spesifik bir hücresel bölmeye; yani sitoplazmaya, periplazmaya veya kültür ortamına hedefleme kararı, her bölmenin avantaj ve dezavantajlarının düşünülmesini de beraberinde getirmektedir.

2.5.1 Sitoplazmik Ekspresyon

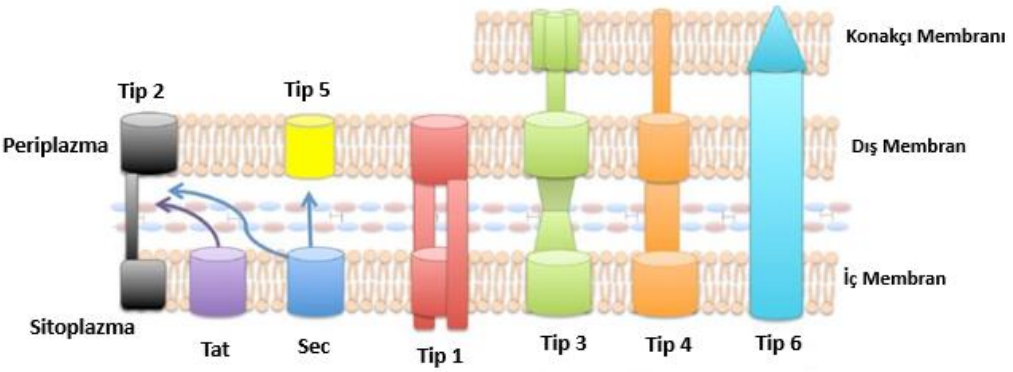
Rekombinant protein üretimi için ilk tercih olan sitoplazma; en yüksek verimin sağlandığı kompartmandır [70]. Hedef proteinin sitoplazmaya salınmasının dezavantajları:

- ✓ Sitoplazmada yüksek seviyeli protein üretiminde sık görülen bir sonuç inklüzyon cisimcikleri oluşumu,
- ✓ Sitoplazmanın toplam hücresel proteinlerin büyük çoğunluğunu içermesinden dolayı ilgili proteinin sitoplazmik protein havuzundan saflaştırılmasının nispeten zor olmasıdır.

2.5.2 Periplazmik Ekspresyon

Sitoplazmada, periplazmik boşlukta olduğundan daha yüksek verim ile protein üretimi gerçekleştirilmesine rağmen periplazmanın oksitleyici ortamı downstream ve N-terminal işlemeyi basitleştirmek için kullanılabilmekte ve uygun protein katlanmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece doğru katlanan proteinlerin saflaştırılması kolay olduğundan ve maliyet azaldığından sitoplazmik proteinler periplazmaya yaygın olarak transfer edilmektedir [70]. Bu transferde, sitoplazma bir ortamı çok indirgediğinden, aktarılacak protein disülfit bağı içermelidir. Disülfit bağları olan proteinler sitoplazma ortamı çok indirgen olduğundan periplazmada birikmektedir. Disülfit bağlayıcı proteinler FkpA, Fk1B, RotA, DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, ve peptidil-prolil izomeraz SurA, oksidasyon işleminde görev almaktadırlar [71,72] . Membrana veya membrandan dışarıya taşınacak olan proteinlere, molekülün başlangıcında sinyal dizisi adıyla (yaklaşık 15-20 amino asit) ilave bir peptit dizisi ile sentezlenirler. Bütün hücrelerde bulunan sinyal tanıma parçacığı (SRP) ile ilgili peptit dizisi tanınır ve proteini periplazmaya taşımak için özel bir membran protein kompleksine gönderilir. Genellikle, tip I ve II mekanizmaları (Tip I sekresyon sistemi: Hly ve Tol gen kümelerini kullanan şaperon bağımlı sekresyon sistemidir. Tip II sekresyon sistemi: Sec ve Tat salgı yolaklarını içeren sitoplazmadan hücre dışına protein salgılanmasında kullanılan zara

bağlı protein kompleksidir) *E.coli*'de protein salgılanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.8). SRP tarafından gerçekleştirilen Sec sisteminde, taşınan protein zar boyunca katlanmadan dizilir ve sadece periplazmaya ulaşınca katlanır. Tat sisteminde ise taşınan protein bir grup arjinin amino asidi içeren kısa bir sinyal dizisine sahiptir. Katlanmış proteindeki bu sinyal dizisi tatBC proteinleri tarafından tanınır [57].



Şekil 2.8 Gram negatif bakterilerde protein sekresyon sistemleri

Rekombinant proteinleri periplazmik boşluğa salgılamak için, proteinin N terminalinde lider bir peptid ile bir füzyon oluşturmak gereklidir. Lpp, LamB, LTB, MalE, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, PelB, PhoA, PhoE, SpA ve Tat gibi sinyal peptitleri rekombinant olarak eksprese edilen proteinlerin salgılanması için kullanılmaktadır [32,33] . Ancak bir sinyal peptidi her zaman, iç zarın içerisinden verimli protein translokasyonu sağlamaz, çünkü diğer yapısal özelliklerde zar taşınmasında etkilidir [73]. Aynı zamanda periplazmada yer alan proteinler, ozmotik şok veya hücre duvarı geçirgenliği ile de periplazmaya salgılanabilmektedir. Bu durumda hücre lizisi gerekli değildir, dolayısıyla sitoplazmik proteinlerden kaynaklı kirlilikte oluşmaz [72]. Proteinlerin periplazmaya daha fazla translokasyonu için sinyal peptidaz I'in aşırı üretimi, translokasyon makinesinin aşırı yüklenmesini önlemek için protein-ekspresyon seviyelerinde azalma gerçekleştirilmesi ve membrana taşıma işlemlerine katılan birkaç proteinin birlikte üretimini içeren çeşitli stratejiler bildirilmiştir [73].

2.5.3 Hücre Dışı Ortama Salgılama

E.coli normalde hücre dışı ortama çok az sayıda protein salgıladığından, bu bölme en düşük proteolitik aktivite seviyesine sahiptir ve muhtemelen çözünür, ilgili proteinlerin saflaştırılması, az sayıda kirletici bakteri proteini sayesinde büyük kolaylık sağlayacağından dolayı hücre dışına protein salgılanması arzu edilen bir stratejidir. Ancak bu strateji şu anda *E.coli*'deki büyük ölçekli rekombinant protein üretimi için uygun değildir. Hücre dışı ortama salgılanması hedeflenen proteinler, iki farklı zar

bariyerini (sitoplazmik ve dış zarları) geçmelidir. Bugüne kadar özellikle dış membrandan membran-translokasyon adımlarını regüle eden moleküler mekanizmalar hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığından dolayı bu işlemi gerçekleştirmek şuan oldukça güç görünmektedir [74,75]. Genel olarak kültür ortamına protein salgılaması için yaygın olarak; protein salgılanmasını etkileyen sinyal sekansları, füzyon ortakları ve geçirgenleştirici ajanların kullanımı sağlanmaktadır [76]. Ancak tüm bu yöntemlerle yapılan çalışmalardan elde edilen protein verimleri düşük seviyelerdedir.

2.6. Proteoliz

Proteoliz, anormal ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması için çeşitli metabolik aktiviteler içeren seçici, düzenlenmiş bir işlemdir. Sistematik çalışmalar, protein kararsızlığının yapısal belirleyicilerinden bazılarını tanımlamıştır [77,78,79]:

- *E.coli'* de işlevsel olan **"N-uç kuralı"** proteolitik yolu; proteinlerin N-terminal kalıntısının tanınması yoluyla protein yıkım oranını yönetir ve N-terminal amino asidinin yarı ömrünü (bozulma olasılığını) belirler (Örneğin, pozitif yüklü ve arginin, lizin, lösin, fenilalanin, tirosin ve triptofan gibi N terminalinde alifatik ve aromatik kalıntıların yaklaşık 2 dakikalık kısa ömürleri vardır ve hızla bozulurlar. Diğer amino asitler ise aynı proteinin N-terminaline eklendiğinde 10 saatten fazla yarılanma ömrüne sahip olabilir).
- Ökaryotik hücreler de etkili olan ubikuitine bağımlı proteoliz, ubiquitilasyon; hücredeki anahtar regülatörlerin kontrolü amacıyla proteinlerin degradasyonu sağlanması için bozunma amaçlı işaretlemenin yapıldığı sistemdir.
- Ökaryotik hücrelerde etkili PEST dizi bağımlı yolları; prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ve treonin (T) bakımından zengin olan PEST dizileri, yine aminoasitlerin bulunduğu proteinlerin hücre içi degradasyonuna neden olurlar.

E.coli' de rekombinant proteinlerin proteolizini ve bunların sınırlamalarını en aza indirmeye yönelik stratejiler arasında;

- ✓ Proteaz eksikliği olan konakçı suşların kullanımı
- ✓ Konakçı hücreleri düşük sıcaklıkta büyütme
- ✓ Periplazmaya veya kültür ortamına proteinleri hedefleme
- ✓ N- ve/veya C-terminale füzyon proteinlerinin oluşturulması
- ✓ Hedef genin çok sayıda tandem kopyalarının kaynaştırılması
- ✓ Moleküler şaperonların veya T4 pin geninin birlikte eksprese edilmesi

- ✓ Spesifik amino asit kalıntılarının yerine proteaz bölünme bölgelerinin elimine edilmesi
- ✓ Hedef proteinin hidrofobikliğinin değiştirilmesi ve fermantasyon koşullarının optimize edilmesi yer almaktadır [56,80].

2.7 Füzyon proteinleri

Protein-füzyon sistemlerinin geliştirilmesi, *E.coli*' de rekombinant proteinlerin yüksek seviyede üretimini ve saflaştırılmasını kolaylaştırmıştır. Füzyon ortakları; inklüzyon cisimleri oluşumunun önlenmesi, gelişmiş katlanma özellikleri, sınırlı proteoliz ve protein saflaştırılmasının kolaylaştırılması gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır [56, 81] (Tablo 2). Yaygın olarak kullanılan füzyon proteinleri; stafilokok protein A, streptokok protein G, *Schistosoma japonicum* glutation-S-transferaz, maltoz bağlayıcı protein, thioredoksin, DsbA ve ubikuitindir. Proteinlerin tespiti ve saflaştırılma kolaylığı için afinite FLAG, His6 ve c-Myc peptidleri gibi (Tablo 2.1) etiketleri kullanılmaktadır.

Tablo 2.1 Füzyon partnerleri ve ligandları

Füzyon Partneri	Ligandı
His6	Ni2+-nitrilotriacetic acid
Glutathione-S-transferase	IgG–sepharose
Staphylococcal protein A	IgG–sepharose
Streptococcal protein G	Albumin
Calmodulin	DEAE–sephadex
Calmodulin-binding peptides	Calmodulin
lac Repressor	Lac operatör
b-Galactosidase	TPEGb–sepharose
Ubiquitin	Ubiquitin
Chloramphenicol acetyltransferase	Chloramphenicol–sepharose
S-peptide (Ribonuclease A, residues 1–20)	S-protein (ribonuclease A, residues 21–124)
Myosin heavy chain	-
DsbA	-
Biotin subunit	-
Avidin	Biotin
Streptavidin	Biotin
Thioredoxin	ThioBond™ resin

2.8 *In vitro* Protein Katlanması

DNA'dan mRNA'ya ve mRNA'dan polipeptide bilgi aktarımında, moleküler tamamlayıcılık ve genetik kod kullanılır. Bu şekilde baz üçlülerin doğrusal dizisi, amino asit dizilerine çevrilir. Genden fonksiyonel protein ve protein katlanmasına kadar olan işlemlerle bu doğrusal bilgi üç boyutlu bir yapıya dönüştürülür. Günümüzde katlanma işleminin altında yatan fiziksel prensipler hakkında çok şey öğrenilmiş olsa da,

katlanma reaksiyonunun karmaşıklığı nedeniyle araştırmacıların belirli bir polipeptidin katlanacağı yapıyı tahmin etmeleri hala büyük bir zorluktur [82].

Protein katlanma probleminin araştırılması, 1960'lı yıllarda, Christian Anfinsen tarafından RNA-parçalayan enzim ribonükleaz A (RNaz A) üzerine geri dönüşümlü katlanma deneyleriyle başlamıştır [83]. RNaz A' ın üre ve bir indirgeyici madde ile inkübasyonu sonucunda disülfit bağı ya da enzimatik aktivitesi olmayan katlanmamış bir protein elde edilmiştir. RNaz A' nın uğramış olduğu denatürasyonun, ribozom üzerindeki sentezini takiben aldığı konformasyona benzediği yaygın görüş olarak kabul edimiştir. Denaturant ve indirgeyici ajan çıkarıldığında, enzimin aktivitesini yavaşça geri kazandığı ve *in vitro* olarak yeniden katlandığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonucu ile, proteinin üç boyutlu yapısının, amino asit dizisinde kodlandığı ve yapı kazanımı için başka hiçbir etkene gerek olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, protein katlanması uygun koşullar altında kendiliğinden yürüyen bir işlemdir [84].

Bir proteinin doğal hali, konformasyonel enerji adasında minimum olarak oldukça dar bir enerjiye karşılık gelirken denatüre hali, yüksek iç enerjiye ve esnekliğe sahip geniş bir enerji ile temsil edilir [85]. Katlanma işlemi sırasında, proteinin çeşitli atomlarının tam olarak konumlandırılmasını sağlayan başta hidrofobik etkileşimler olmak üzere çok sayıda kovalent olmayan etkileşimdir. Hidrofobik moleküllerin entropi ve entalpi nedenleriyle kutupsal bir ortamda birbirleriyle birleşme eğiliminde olmalarından dolayı hidrofobik amino asitler ağırlıklı olarak katlanmış bir proteinin çekirdeğinde bulunur. Oligomerik proteinlerin incelenmesiyle hidrofobik etkileşimlerin katlanmış konformasyonun kararlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Ancak hidrofobik etkileşimlerin zararlı yanları da bulunmaktadır [86]. Erken katlanma aşamalarında, birçok proteinin belli bir miktar hidrofobik özellik gösteren ara maddeler oluşturması nedeniyle protein molekülleri hidrofobik etkileşimlerle birlikte agregatlarla spesifik olmayan ilişkiler kurabilir. Protein konsantrasyonu agregasyon oluşup oluşmayacağının belirlenmesinde önemlidir çünkü agragasyon iki veya daha fazla aşama içeren bir reaksiyondur [87]. İlgilenilen proteinin doğru olarak katlanması sıcaklık, ph, protein konsantrasyonu gibi koşulların değiştirilmesiyle sağlanabilmektedir.

2.9 *In vivo* Protein Katlanması

In vitro durumun aksine, tüm proteinlerin yaşayan bir hücrede aynı koşullar altında katlanması gerekmektedir. Canlı bir organizmada hücreler genellikle agregatlaşmış proteinlerden yoksundur ve bu beklenmeyen bir durumdur. Bunun iki açıklaması vardır.

İlk nedeni, *in vivo* olarak agregatlaşmanın oluşması ancak bu ürünlerin proteazlar ile uzaklaştırılmasıdır. İkincisi nedeni, şaperonlar denen karmaşık protein makineleri ile hücrelerde yeni sentezlenmiş proteinlerin kendiliğinden katlanma reaksiyonunun hızlanması ve böylece agregatlaşmanın önlenmesidir. Moleküler şaperonlar, katlanma veya daha genel olarak hücrede proteinlerin konformasyonel düzenlemelerinin meydana geldiği tüm bölümlerde bulunmaktadır. Protein sentezi, katlanmamış polipeptit zincirlerinin ana kaynağı olmasına rağmen, fizyolojik olmayan yüksek sıcaklıklar veya bazı kimyasalların varlığı da proteinleri yapısal olarak kararsız hale getirebilmekte hatta açabilmektedir. Bu olay proteinlerin fonksiyon kaybına ve protein agregatlarının birikimine neden olur. Hücre, ısı şoku tepkisi veya stres tepkisi olarak adlandırılan bir olgu olan artan miktarlarda spesifik koruyucu proteinler yani şaperonlar üreterek bu tehdide yanıt verir [88].

2.10 Protein Agregasyonu ve İnklüzyon Cisimciklerinin Biyolojik Rolü

Protein agregasyonu, termal stresin sıradan bir sonucudur. Protein eksprese eden genlerin aşırı ekspresyonu sonucu genlerin aşırı ekspresyonu, stres proteinlerinin ekspresyonu indüklenir. Böylece ilgili protein agregatlaşma gösterir ve inklüzyon cisimcikleri oluşur. *E.coli*' de inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen rekombinant proteinler; inaktif, agregat oluşturan, çözünmeyen, genellikle doğal olmayan intra ve moleküler disülfit bağlarına ve olağandışı serbest sisteinlere sahip yapılardır [5]. İnklüzyon cisimcikleri oluşumu aktif protein eldesini engellemektedir ve bu cisimcikler rekombinant protein üretiminde bazı proteinlerin üretimini büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Aktif protein elde etmek için; bu cisimcikler hücreden çıkarılmalı, denaturantler ile proteinler çözünür hale getirilmeli ve disülfit bağları indirgeyici ajanlar kullanılarak elimine edilmelidir. Yeniden katlanma; denaturant ve indirgeyici ajanın uzaklaştırılması ve ardından proteinin renatürasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Kullanılan renatürasyon işlemleri; hava oksidasyonu, glutatyon reoksidasyon sistemi, protein-S-sülfonat ve protein-S-glutatyon sisteminin karışık disülfitlerini içerir.

Pek çok proteinde inklüzyon cisimciği oluşumu ile ilişkili ana fiziko kimyasal parametreler; ortalama yük ve dönüş-tortu-kalıntı, sistein ve prolin fraksiyonları, hidrofiliklik ve toplam kalıntı sayısıdır [89]. İnklüzyon cisimcikleri olarak rekombinant protein üretiminin birkaç avantajları olmasının yanında biyolojik olarak aktif proteinin inklüzyon cisimlerinden geri kazanımı, büyük ölçekli üretim için çok pahalı

olabilmektedir [6]. Bu nedenle proteinlerin doğal 3 boyutlu yapı oluşumunu sağlamaya yönelik birçok ekspresyon strateji geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları;

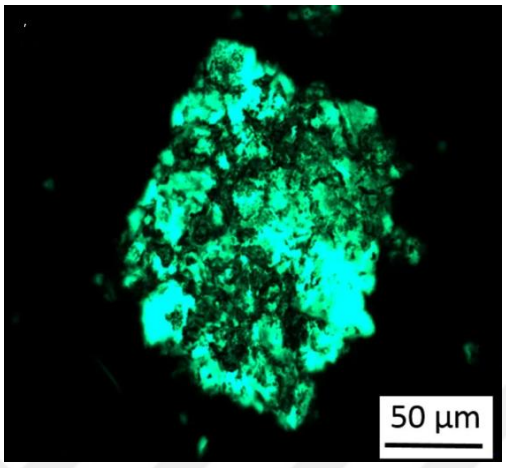
- ✓ Moleküler şaperonlar ile birlikte ekspresyon
- ✓ Uygun redoks potansiyelini sağlamaya yönelik thioredoksin-eksik konakçı suşların kullanılması
- ✓ Protein sentezi oranının düşürülmesi
- ✓ Düşük sıcaklıklarda bakteriyel kültürlerin büyütülmesi
- ✓ Füzyon partneri kullanılarak protein çözünürlüğü ve katlanmayı arttırmaktır [7, 8].

Şaperonların hedef protein ile birlikte ekspresyonu, birkaç monomerik ve multimerik proteinin üretimini arttırmasına rağmen, bu stratejinin başarısı proteine özgü olarak [6, 16,90] değişmektedir. Aşırı eksprese edilen proteinlerin disülfit bağlarının eksikliği ve/veya post-translasyonel modifikasyonların yokluğu gibi faktörler moleküler şaperonların varlığında bile, gerçek konfigürasyonlarında katlanamamasına neden olmaktadır. Sitoplazmanın redoks hali de disülfit bağ oluşumunda önemli bir etkendir. *E.coli'*de iki yol disülfit bağlarının azalmasına katkıda bulunmaktadır: thioredoksin redüktaz ile thioredoksinden oluşan thioredoksin sistemi ve glutatyon redüktaz, glutatyon ile üç glutaredoxinden oluşan glutaredoksin sistemi [91]. Thioredoksin redüktaz (trxB) eksik olan *E.coli* suşlarının kullanımı, disülfit bağ oluşumunu kolaylaştırır ve sülfiril indirgenme potansiyeline katkıda bulunur [92].

Önceki yıllarda inklüzyon cisimcikleri oluşumunun kısmen katlanmış ara maddelerin geri dönüşü olmayan birikimi ile pasif olarak gerçekleştiği düşünülmekteydi. Bakterilerdeki protein agregasyonunun; termal stres sonucu gerçekleşen bir işlem olduğu, inklüzyon cisimciklerinin hareketli yapılar oluşturduğu ve bu yapıların uygun koşullarda tekrar eski yapısına sahip olabildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. İnklüzyon cisimcikleri oluşumu, belirli stres koşullarında hücresel makine tarafından desteklenebilmektedir. Böylece yanlış katlanmış polipeptitleri daha fazla işlenene kadar katlanmış veya proteolize edilmiş şekilde geçici olarak depolar. Hücre fizyolojisinde protein agregasyonunun daha iyi anlaşılması; inklüzyon cisimcikleri oluşumunun daha yüksek çözünürlük için daha verimli bir şekilde minimize edilebilmesine izin verebilir, aynı zamanda yanlış katlanma tehlikesini idare etmeye yönelik hücre mekanizmaların karmaşıklığının ayrıntılı olarak kavranabilmesini sağlayabilir. Belirli bir rekombinant proteinin hem proteolitik stabilitesi hem de çözünürlüğü önceden tahmin edilememekte ve çözünür protein üretimi deneme yanılma işlemi olarak devam etmektedir.

2.10.1 İnklüzyon Cisimciklerinin Bileşimi ve Fizikokimyasal Özellikleri

İnklüzyon cisimcikleri; optik mikroskopi ile yaklaşık 2 μm^3 boyutunda görülebilen, reflaktil parçacıklar olarak ve transmisyon elektron mikroskobu ile tanımlanmış, belirli bir yapıya sahip olmayan, elektron açısından yoğun agregatlar olarak gözlenebilmektedirler [93,94] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 1: 1 Oranında manyetik parçacıklarla karıştırılmış GFP inklüzyon cisimcikleri

İnklüzyon cisimciklerinin saflaştırılmış parçacıkların taranan görüntüleri farklı düzleştirilmiş yüzeylere sahip, silindirik veya oval biçimler ortaya çıkarmaktadır [94,95] . İnklüzyon cisimcikleri, yoğun parçacıklar olmasına rağmen yüksek oranda hidratlanır ve gözenekli bir yapı gösterir [95,96].

2.10.2 *In vitro*' da İnklüzyon Cisimciklerinin Geri Kazanımı

Pek çok protein *in vitro*'da koşullar iyileştirilerek yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilmektedir ancak yaşayan bir organizmada bu süreç daha farklıdır. Özellikle, yüksek protein konsantrasyonu ve sıcaklığı, istenmeyen bir yan reaksiyon olarak, üretken bir katlanma ile rekabet eden agregasyonu artırır [86]. İnklüzyon cisimcikleri oluşmasının inhibe edilmesi rasyonel bir yaklaşım olarak ele alınmadığından ve diğer taraftan inklüzyon cisimcikleri kolayca saflaştırılabildiğinden bu protein agregatları ayrıca nispeten saf bir polipeptit kaynağı olarak da gözlenmiştir. Bu cisimciklere tekrardan doğal konformasyon kazandırmak için *in vivo* yeniden katlama adımları gerektirmektedir. Füzyon proteinlerine sıcaklığın yükseltilerek agregat etiketlerinin eklenmesi ile rekombinant proteinler saflaştırılabilse de agregat oluşturmuş proteinin yeniden katlanması kolay bir işlem değildir ve belirli basamaklarda optimizasyon gerektirir [97,98] . Proteinlerin etkili yapısını kazanabilmesi üç basamaktan oluşmaktadır:

- ✓ İnklüzyon cisimciklerinin izole edilerek yıkanması
- ✓ Agregatlatmış proteinin çözünürlüğünün sağlanması
- ✓ Çözündürülmüş proteinin yeniden katlanması.

Renatürasyon etkili bir şekilde yapı kazanımı için en önemli basamaktır. Renatürasyon basamağının etkinliği ilgili proteinin birlikte agregatlaştığı diğer farklı tür proteinlere bağlıdır [99]. Bu stratejiye göre kullanılabilecek çeşitli alternatif protokoller sonuçta rekombinant proteinin verimine ve istenen nihai saflığına bağlı olacaktır.

İnklüzyon cisimlerini içeren hücreler genellikle yüksek basınçlı homojenizasyon veya mekanik, kimyasal ve enzimatik metotların [100,101,102,103] bir kombinasyonu ile parçalanır ve inklüzyon cisimleri, elde edilen hücre ekstraktlarından santrifüjleme ile izole edilebilir [104]. Daha sonra, uygulanan yıkama basamağında üre veya guanidinyum klorür (Gdn·HCl) gibi kaotropik maddeler ve Triton X-100 veya SDS gibi kimyasallar ile zar proteinlerini ve diğer kirleticiler uzaklaştırılmaktadır. Gdm·HCl tamamen protein yapısının açılmasını sağlar ve daha güçlü kaotropik yapısı nedeniyle üreye tercih edilir ve diğer taraftan, üre çözeltileri, özellikle alkalin pH'da uzun süreli inkübasyonun ardından serbest amino gruplarının karbamilasyonuna yol açan izosiyant içerir [105]. Aşırı pH'ın ve uygun sıcaklığın kullanımı ile de inklüzyon cisimcikleri çözülebilmektedir [106], ancak geri dönüşü olmayan kimyasal modifikasyonlar ve asit ayrılması, uygulanacak protein spektrumunu kısıtlar. En yaygın kullanılan deterjanlar SDS ile N-asetiltrimetilamonyum bromürdür (CTAB) ve protein agregatlarını ayrıştırmaktadır [107,108] . Deterjanla çözünen proteinler genellikle aktiftir, bu nedenle yeniden katlama aşamasını gereksiz kılar. Çözündürme aşamasında indirgeyici ajanlar ve az miktarda denatüre edici maddeler ile yüksek miktarda hidrostatik bir basınç (1-2 kbar) da kullanılabilmektedir [104,109] . Çözünme işlemi sırasında, beta-merkaptoetanol, DTT (1,4-ditiotreitol) veya DTE (1,4-ditioeritritol) gibi indirgeyici ajanların varlığı, doğal olmayan disülfit bağlarının oluşumunu önleyebilmektedir. Ayrıca sisteinlerin metal katalizörlü oksidasyonunu önlemek için EDTA veya EGTA gibi şelatlama ajanları tavsiye edilir. İnklüzyon cisimcikleri ile birlikte agregat oluşturabilecek proteazların çıkarılması, çözündürme sırasında proteolitik bozunmayı önlemek için kritiktir [110,111]. Denatüre proteinlerin renatürasyonu, fazla denatüre edicilerin ve indirgeyici ajanların çıkarılmasıyla gerçekleştirilir, böylece proteinlerin kendiliğinden katlanabileceği uygun bir ortam yaratılır [98]. Bu işlemde; içinde tampon değişim basamakları bulunan diyaliz, diafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi veya katı bir yüzeyde immobilizasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır [112]. En basit

yöntem, bir renatürasyon tamponu içerisinde çözündürülmüş proteinin seyreltilmesidir. Düşük denatüre protein konsantrasyonu, agregatlaşmanın önüne geçmekte ve çok sayıda ardışık aşama içeren [103] seyreltme veya sürekli beslemeli [107] sistemlerde başarı sağlamaktadır. Diyaliz [113] ve diafiltrasyon [114] gibi tampon değiştirme yöntemleri de, protein fraksiyonunun bir kısmının zara bağlanarak kaybedilmesine rağmen etkilidir. Denatüre proteinler katı bir desteğe sabitlenerek renatürasyon sırasında moleküller arası etkileşimlerin önlenmesiyle agregatlaşma azalmaktadır. Bu durumda, matrise bağlanmak için proteinin His-tag [104] veya selüloz bağlayıcı bölge gibi bir füzyon partneri içermesi gerekir [115]. Disülfit bağlı proteinlerin renatürasyonu, yüksek disülfit bağı oluşumu için yeterli oksidatif bir ortam yaratan bir redoks sistemi içeren tamponlar gerektirir. Oksidasyonu teşvik etmenin en basit yolu, metal iyonlarının varlığında hava veya O_2'dir [116].

Ayrıca, Zn^{2+} veya Ca^{2+} gibi spesifik kofaktörler de agregatlaşmayı önleyebilmektedir. Tüm bu mekanik stratejilerin bir tamamlayıcısı olarak maltoz bağlayıcı proteine füzyon bağlanması gibi [117,118] birkaç protein mühendisliği yaklaşımının da izole edilen inklüzyon cisimciklerinden yeniden protein katlanmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir.

2.10.3 İnklüzyon Cisimcikleri ve Proteazlar

Yanlış katlanmış proteinler, sadece katlanma veya yeniden katlanma girişimleri için bir şaperonun hedefi değil aynı zamanda bozunma için proteazların da hedefidir. Şaperonlar ve proteazlar, hücresel proteinlerin katlanma durumunu araştırmaya ayrılmış kalite kontrol hücre sisteminin [119] ana gövdesini oluşturur. Ancak katlanma girişimleri veya proteoliz arasındaki ayrımın nasıl gerçekleştiği veya hedef polipeptitlerdeki belirli sinyallerin hangi iki olay arasında karar vermede rol oynadığı açık değildir. Rekombinant hücrelerde proteoliz ve agregatlaşma, katlanma-katlanmama durumu açısından antagonistik olaylar olarak gözlemlenmektedir. Önceden, agregatlaşmış proteinlerin proteolizden korunmuş olduğu ve bunun sonucunda inklüzyon cisimcikleri oluşumunun *in vitro* olarak tekrar katlanabilir korumalı- sağlam protein üretmenin, saklamanın ve geri kazanmanın bir yolu olarak kabul edilmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar, agregatlaşmış proteinlerin hem *in vitro* [120] hem de *in vivo* [121,122] olarak proteolitik sindirime duyarlı olduğu ve fizyolojik koşullar altında bile proteaz duyarlılığını göstermiştir. İlginç bir şekilde, proteaz eksikliği olan suş kullanımının; çözünmeyen hücre fraksiyonu ve daha büyük inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna sebep olduğu da gözlemler arasındadır [123,124]. Aynı zamanda, proteolitik olarak kararlı proteinler, yakından ilişkili, ancak daha dengesiz proteinlerden daha

büyük inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır [123]. Ökaryotik hücrelerde inhibisyon veya proteazom, protein agregasyonunun artmasına neden olur [125,126, 127] ve ilişkili nöropatolojiler için daha yüksek risk altındadır [128]. Sonuçta protein agregasyonunun en büyük nedeninin, hücresel proteazların fonksiyonunun azalması veya bozulmaya ugraması olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmişitir. Agregasyon, proteolitik kararlılığın bir nedeninden daha fazla bir sonuçtur.

2.11 Moleküler Şaperonlar

Bakteriyel sistemlerde üretilen bakteriye ait olmayan proteinlerin çoğu, özellikle yüksek translasyon seviyelerinde doğal yapıya ulaşamamaktadır. Bakteriyel şaperonlar, doğru katlanmayı sağlayıp, agregatlaşmayı önleyerek hücre polipeptitlerinin konformasyonel olarak işlemesinde rol oynarlar [10,11,12,13] . Bununla birlikte, şaperonlar bakteri hücrelerinde sınırlayıcı olduklarından [14,15] ısı şoku tepkisi uyarılsa bile, biyolojik ürünlerin uygun bir şekilde yapılandırılmasını garanti edemez. Bu sınırlama nedeniyle, seçilen şaperon kodlayan genin hedef rekombinant genle birlikte ekspresyonu, gelişmiş katlanma düzeyi ve arttırılmış çözünürlük ile sonuçlanabilmektedir [6,16]. Öte yandan, farklı şaperon grupları katlama girişimleri sırasında işbirliği içinde hareket edebilirler. DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES'in koordine edilmiş aktivitesi iyi tanımlanmış aynı zamanda bağımsız işlevleri de bulunana önemli şaperonlardır [129,130]. Bununla birlikte işbirliği içindeki bu şaperonların, alternatif olarak katlanma girişimleri veya agregatlaşmayı önlemek için yanlış katlanmış polipeptitler ile etkileşime girebildiği bilinmektedir [17,131,132].

Hücrenin yeni bir polipeptitin sentezine harcadığı enerji miktarı göz önüne alındığında, bir proteinin aktif konformasyonuna verimli bir şekilde katlanmasını teşvik etmek için stratejiler geliştirilmesi şaşırtıcı değildir. Moleküler evrim sırasında, polipeptit dizileri sadece biyolojik özelliklerine göre değil, aynı zamanda verimli bir şekilde katlanıp katlanamadıklarına göre seçilmişlerdir. Erişilebilir konformasyon alanını arttırmak için, hücreler katlanmış polipeptitlerle birleşen bir dizi protein olan moleküler şaperonlar geliştirmiş, böylece agregasyonu önleyerek ATP'ye bağımlı bir şekilde üretken katlanmayı teşvik etmiştir [133].

İnklüzyon cisimcikleri oluşumu, hücre şaperonlarının aracılık ettiği bir işlemle *in vivo* olarak geri döndürülebilir [9]. Biyosentetik açıdan strese sokulan hücrelerde, daha önceden oluşmuş olan inklüzyon cisimcikleri hızla parçalanarak önemli bir kısmı

proteolize olur [134]. Hücrede birbirinden farklı özellik gösteren şaperonların bulunmaması proteoliz işlemini önemli ölçüde etkilemektedir.

2.11.1 Moleküler Şaperonlarda Bulunan İşlevsel Özellikler

Moleküler şaperon adlandırması, işlevsel olarak birbiriyle ilişkili bir protein grubunu tarif etmektedir. Moleküler şaperonlar moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Hücreler bir şaperon sınıfına ait birden fazla şaperonu sentezleyebilmektedirler. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 şaperonunun 14 farklı versiyonunu üretmektedir [135]. Aynı moleküler şaperon sınıfından gelen proteinler sıklıkla önemli miktarda dizi homolojisi gösterir, yapısal ve işlevsel olarak ilişkilidir, oysa farklı ailelerin şaperonları arasında neredeyse hiç homoloji yoktur. Farklı aileeden gelen şaperonlar aynı işlevsel özellikleri taşıyabilmektedirler. Herhangi bir moleküler şaperonun temel özelliği açıkça katlanmamış veya kısmen katlanmış ve böylece hidrofobik yüzeyi açığa çıkmış polipeptitlere bağlanma kabiliyetidir.

Genel olarak, moleküler şaperonlar, hedef proteinlerde konformasyonel değişiklikler meydana getirmektedir. Örneğin bir proteinin kontrollü bir şekilde açılması, şaperon ve hücresel protein yıkım sistemleri arasında bir interaksiyona neden olur. Doğal olmayan katlanma girişimleri, lokal enerjinin minimumda sıkıştığı yanlış-farklı oluşumlara sebebiyet verir [136]. Şaperon-aracılı açılım bu üretken olmayan etkileşimleri bozar ve polipeptidin doğal yapısına ulaşması için yeni bir şans sunar.

Protein katlanmasının başında ve yanlış katlanmış protein oluştuğunda bu proteinlerin hidrofobik bölgelerine çözücüler kolaylıkla ulaşabilmektedir. Bu durum onları agregat oluşturmaya müsait duruma getirmektedir. Bu hidrofobik protein türlerinin moleküler şaperonlarla birleştirilmesi, agregatlaşmayı verimli bir şekilde azaltır. Hidrofobik etkileşimin düşük özgüllüğü ve katlama ara maddelerinin konformasyonel esnekliği, şaperonların, aminoasit sekansında ve konformasyonda geniş ölçüde farklılık bulunan çok çeşitli polipeptitlere bağlanabilmesini sağlar. Bununla birlikte, çoğu doğal protein ve geç katlanma hidrofobik etkileşimlere sahip olmadığından moleküler şaperonlar için substrat niteliği taşımaz.

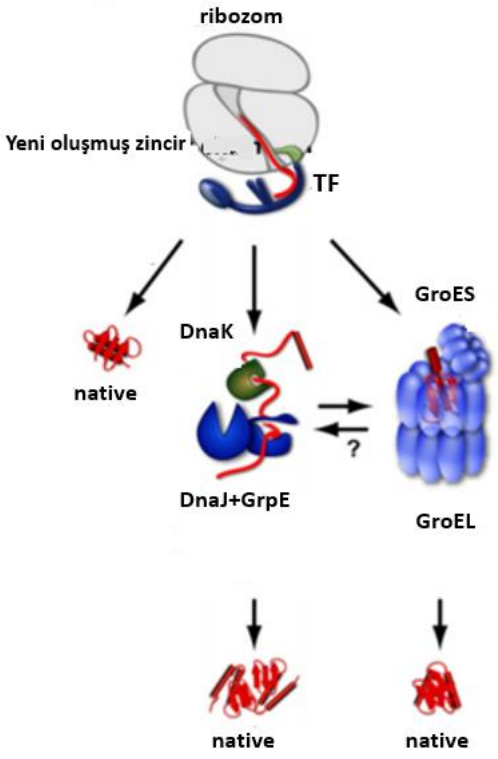
2.11.2 Moleküler Şaperon Çeşitleri

2.11.2.1. Trigger Faktörü

Trigger Faktör (TF), bakterilerde bilinen tek ribozomla ilişkili şaperondur. Bakteriler ve bitkilerde kloroplastlarda bulunurlar. Ancak arkeler ve ökaryotik sitosolde yapısal olarak farklı ribozom ile ilişkili faktörler vardır [137]. Ökaryotik sitosolde

bulunmamasına rağmen,TF, ökaryotik ribozom ile ilişkili şaperonlarla belirli bir işlevsel benzerlik paylaşmaktadır [18].

E. coli TF, ribozomlara göre iki - üç kat daha fazla miktara sahip, yapısal olarak bol miktarda eksprese edilen sitozolik bir proteindir (~50 μM ribozomlara karşı ~20 μM TF) [19]. TF doğrudan büyüyen polipeptit zincirlerinin ribozomdan çıktığı ve kalabalık sitozole girdiği ribozomal çıkış bölgesinde lokalizedir [138]. TF, potansiyel olarak devam eden sentez sırasında erken dönemde birçok polipeptit ile etkileşime girer ve yeni zincirlerle birleşen ilk şaperon olarak sitozolik proteinlerin de novo katlanmasında TF ile işbirliği yapan DnaK ve GroEL şaperon makineleri gibi downstream faktörlerin erişimini kısıtlar (Şekil 2.10) [139].

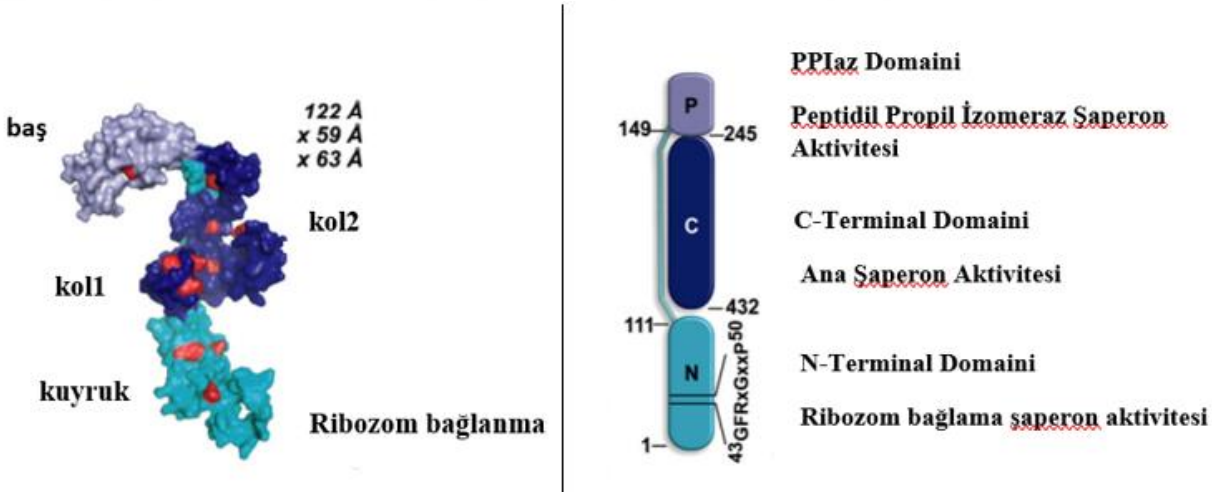


Şekil 2.10 *E. coli*' de yeni sentezlenen sitozolik proteinlerin katlanmasında şaperon etkisinin modeli.

Ribozomla ilişkili şaperonlar, yeni sentezlenmiş proteinlerin ilk katlama adımlarını yönlendirip büyüyen polipeptit zincirlerini yanlış katlanma ve agregasyona karşı korumak açısında ilk sırayı aldığından TF, doğal yapıya katlanmayı doğrudan sağlayabilir veya DnaK ve GroEL gibi ribozomlara bağlanmayan ilave şaperonlar tarafından desteklenir. Trigger Faktör, DnaK ve GroEL arasında sitosolik proteinlerin

katlanmasındaki işlevsel işbirliğini ve yeni polipeptid zincirlerinin enzimatik işleminde ve yer değiştirmesinde etkili olan diğer ribozom ilişkili faktörler arasındaki etkileşimi kapsar[132].

48 kDa büyüklüğündeki TF proteini, üç domainden oluşmaktadır ve toplam ebatları 122 x 59 x 63 Å olan uzun, ejderha şeklinde bir yapıya sahiptir (Şekil 2.11). TF'nin N-terminal alanı (aa 1-149) yapısal olarak bakteri şaperonu Hsp33'ün bölümleriyle yapısal olarak ilişkilidir, ancak TF, imza-motifi ("GFRxGxxP") içeren, ribozom yerleşmeye aracılık eden ek bir sarmal-ilmek-sarmal elemanı taşımaktadır [140]. Bu eleman TF'nin ribozoma bağlanması için gerekli ve yeterlidir, TF'nin şaperon aktivitesine katkıda bulunur ve TF ejderini (kuyruğunu) (aa 1-1110) ve uzun bir bağlayıcı bölgeyi (aa 111–149) oluşturur [141].



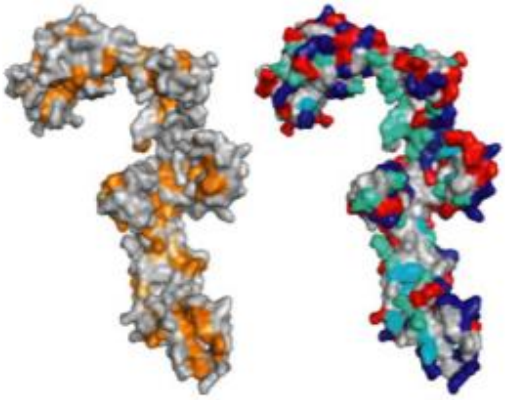
Şekil 2.11 TF'nin yapısı ve üç alanlı organizasyonu[132]. N-terminal alanı (N; camgöbeği) ejderha şeklindeki TF (PDB 1W26) 'nin "kuyruğunu", PPIase etki alanını (P, açık mavi) "baş" kısmını ve merkezde C-terminal alanı (C, koyu mavi) iki çıkıntılı "kol" kısmını oluşturur. Tanımlanan yeni oluşan zincir etkileşim bölgeleri kırmızıyla vurgulanır. Ribozom bağlama imza motifi ("GFRxGxxP") belirtilir.

TF'nin orta alanı (aa 150-245), peptitil-prolil cis / trans izomeraz (PPIaz) olarak katalitik aktivite gösterir ve PPIaz'ların FKBP (FK506 bağlayıcı protein) ailesine aittir [142]. Bu bölge üç boyutlu yapıda ribozom bağlama bölgesine en uzak lokalize olan ejderhanın "başını" oluşturur [143]. TF, *in vitro* prolin sınırlı katlanma reaksiyonlarının oldukça etkili bir katalizörü olarak işlev görürken enzimatik PPIase aktivitesi TF'nin de novo katlanmasına yardımcı olmada genel şaperon işlevi için gerekli değildir [144]. Ancak, tüm PPIase alanı, *in vivo* olarak TF'nin şaperon fonksiyonu için vazgeçilmezdir [145].

Bununla birlikte, PPIase alanı, TF'nin şaperon aktivitesine katkıda bulunur ve yardımcı bir substrat bağlanma bölgesi olarak işlev görebilir [145].

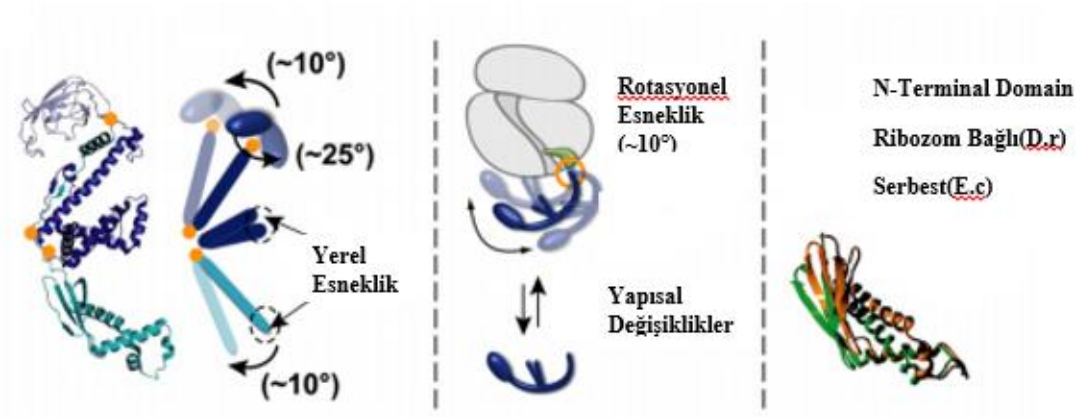
TF'nin C-terminal alanı (aa 246-432), TF molekülünün neredeyse yarısını oluşturur ve TF'nin ana şaperon modülünü temsil eder. Bu bölge ejderhanın merkez bedenini ve iki çıkıntılı sarmal "kolu" şekillendirmektedir [143]. Üç boyutlu yapıda, C-terminal alanı, N-terminali ve PPIase alanları arasında bulunur ve kritik olarak N-terminali ve PPIase alanlarını bağlayan bölümlerin parçaları (aa 111-113) ile stabilize edilir. İzole edilmiş PPIase ve N-terminal alanların aksine, stabilize C-terminal alanı kendi başına *in vitro* şaperon aktivitesi gösterir [145]. Sağlam C-terminal alanı içeren TF fragmanları, agregasyonu önler ve denatüre model substratların yeniden katlanmasını teşvik ederken C-terminali kesilmeleri, TF'nin şaperon aktivitesini bozar [145]. Belirgin sekans homolojisi olmamasına rağmen, TF'nin C-terminal alanı, periplazmik *E.coli* şaperonu SurA'nın şaperon alanına ve bilinmeyen fonksiyona sahip bir *Mycoplasma pneumonia* proteini olan tam uzunlukta MPN555'e yapısal homoloji gösterir [146]. Bu nedenle, çeşitli hücresel fonksiyonları yerine getirmek için çeşitli şekillerde kullanılan yapısal olarak korunmuş bir şaperon modülü oluşturabilir.

TF, tek bir substrat bağlanma yerine sahip değildir, ancak bütün iç boşluk oluşturucu yüzeyini substrat yerleşimi için kullanır (Şekil 2.12) [143]. Bu substrat bağlanma yüzeyi karışık bir karaktere sahiptir. Bu yüzey hidrofilik ve hidrofobik kalıntılar ve TF'nin hem hidrofobik hem de hidrofilik etkileşimler yoluyla substratlarla etkileşime girmesini sağlayan bazı sürekli hidrofobik etkileşimler ortaya çıkarmaktadır.



Şekil 2.12 TF'nin yüzey özellikleri [132]. TF'nin N ve C-terminal bölgelerinin boşluk-oluşturucu etkileşim yüzeyleri. (Sol) Polar olmayan artıklar turuncu (Ala, Leu, Ile, Phe, Trp, Val) ve açık turuncu (Pro) ile işaretlenmiştir. (Sağ) Kutup artıkları kırmızı (Asp, Glu), mavi (Arg, His, Lys), greencyan (Asn, Gln, Ser, Thr) ve camgöbeği (Tyr) ile renklendirilmiştir.

E.coli, Deinoccocus radiodurans ve *Thermogota maritima'* dan substrat bağlı, ribozom bağlı ve serbest TF'deki mevcut yapısal verilerin karşılaştırılması [143], TF'nin oldukça esnek yapıda olduğunu göstermektedir. N-terminal bölgesindeki domain içi düzenlemeleri, C-terminal bölgesi içindeki menteşe bükme ve ilmek bölgelerinde ek yerel esneklik (Şekil 2.13) ile TF molekülü oldukça esnek yapıdadır. Bu esneklik, TF aktivitesi için çeşitli şekillerde faydalı olabilmektedir.



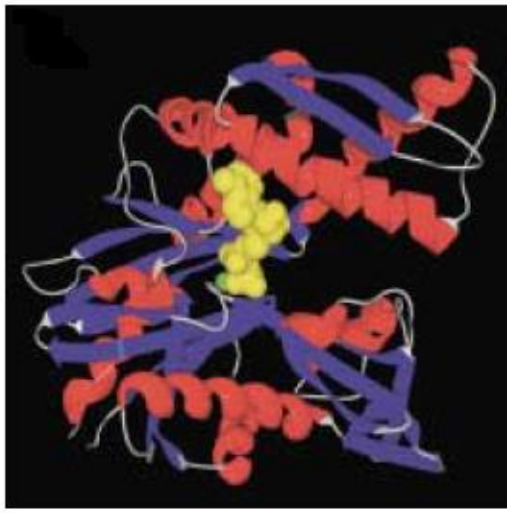
Şekil 2.13 TF içindeki esneklik ve konformasyonel düzenlemelerin modeli [132].

2.11.2.2 Hsp70 Sistemi

Hsp70 proteinleri; ökaryotik hücrelerin çoğunda, bakterilerde ve birçok arkede bulunmaktadır ve şaperon sisteminin ana bölümünü oluşturlar. Bu şaperon grubunun en kapsamlı çalışılan temsilcisi olan DnaK proteini, *E.coli'* de bulunmaktadır ve Hsp70 protein ailesi ile %50 özdeşliğe sahiptir. DnaK, DnaJ ve GrpE şaperon takımı; yeni ortaya çıkan proteinlerin katlanması [147], DNA ve RNA sentezi [148], ribozom assembly [149], ısı şok tepkisinin düzenlenmesi [150], proteoliz [151] ve I, F ve P1 replikasyonu [152] dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel işlemlerde yer almaktadır. Hsp70 'in bütün bu işlemlerde ortak işlevi, kısmen katlanmış polipeptitlerde kısa hidrofobik bölümlerin bağlanmasıdır; böylece agregatlaşmanın önlenmesi ve katlanma işleminin durdurulmasını sağlar [20].

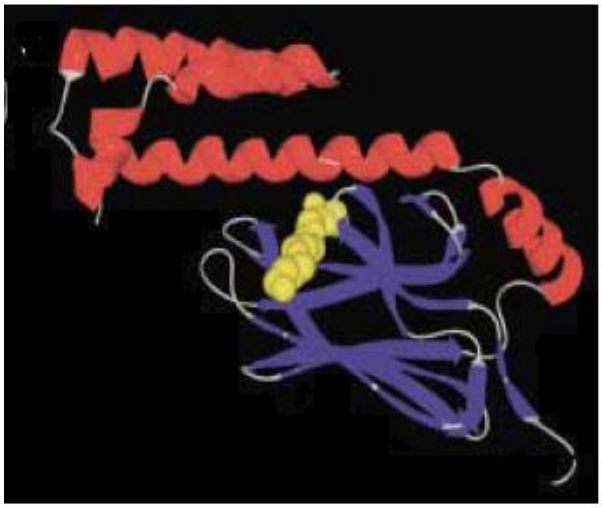
In vivo olarak DnaK şaperonu, GroES ve onun yardımcı şaperonu olan GroEL arasındaki işbirliğine benzer şekilde şaperon aktivitesinin düzenlenmesine yardımcı olan DnaJ ve GrpE yardımcı şaperonları proteinleri ile aktivitesini devam ettirmektedir. DnaK, şaperon fonksiyonunda önemli olan zayıf bir ATPaz aktivitesine sahiptir. Hem DnaJ hem de GrpE, birinci olarak nükleotit hidrolizini destekleyerek DnaK'nın ATPaz döngüsünü hızlandırır ve ikinci olarak nükleotit salımını teşvik ederler [153].

Hsp70 şaperonları, N-terminal ATPaz ve daha az yer kaplayan C-terminal peptit bağlama alanı olamak üzere iki işlevsel birimden meydana gelmektedir. ATPaz ve peptid bağlama alanlarının yapıları belirlenmiştir [21]. Hsp70'in ATPaz domeni (Şekil 2.14), nükleotit bağlama bölgesini içeren bir yarıkla ayrılmış iki alt alandan oluşmuştur [154]. C terminal bölgesinin peptit bağlama fonksiyonu bağlı nükleotidin yapısına göre değişmektedir. ATP durumunda, peptid substratları, düşük afiniteye rağmen çok hızlı bir şekilde bağlanır ve ayrışır [155]. N-terminal alanına bağlı hiçbir nükleotit veya ADP olmadığında, peptit bağlama ve ayrılma oranları düşer ve afinite önemli ölçüde artar [21].



Şekil 2.14 DnaK'ya ait nükleotit bağlama bölgesinin kristal yapısı (ADP bağlı)[71]. Proteinin farklı alt bölgelerinin katkılarıyla yapı kazandırılan derin bir oyuk içine bir nükleotit (sarı renkte) bir magnezyum iyonu (yeşil renkte) bağlanmaktadır. ATP bağlayıcı proteinler olan aktin ve hekzokinazın yapısı bu oluşan yapıyla benzerlik göstermektedir.

Peptit bağlama domenini iki yapı meydana getirmektedir: üstte sandviç şeklinde hidrofobik yapıda bir yarık ve altta heliks yapıda alana sahip iki yapısal birim (Şekil 2.15). Peptit substratı bu yarığa bağlanmaktadır. Peptit ve sandviç arasındaki hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ile yerinde tutulur. Bu heliksel alan ilgili peptidi bağlanma bölgesinde tutmak için yarığın üst bölgesini kapatır. Bu kapalı yapı, yüksek peptit afinitesini ve yavaş değişim kinetiğini kolayca açıklayacağı için, Hsp70'in ADP durumuna karşılık gelmesi çok muhtemeldir. Mevcut model, ATP bağlanmasının, sarmal kapağı peptit bağlama oluğundan çıkaran şaperonda konformasyonel bir değişiklik yarattığını ve böylece çözücüye erişilebildiğini varsaymaktadır [156].



Şekil 2.15 DnaK'ya ait peptit bağlama bölgesinin kristal yapı görüntüsü (Heptamerik peptit bağlı)[72]. Peptit bağlama bölgesi, sekiz adet antiparalel- β şeritin (mavi) alt alana yerleştirilmesiyle oluşan hidrofobik yapıdaki oluktan meydana gelmektedir. NRLLLTG peptidi(sarı renkte) bu oluğa bağlanmakta ve heliks yapıdaki alt alan (kırmızı renkte) peptidi yerine sabitlemektedir. Bu oluşan yapı Hsp70'in ilgi durumu yüksek yapısını göstermektedir.

Peptit kütüphaneleriyle yapılan analizler Hsp70'in tercihen hidrofobik artıklar içeren peptidlere bağlandığını göstermiştir [157].

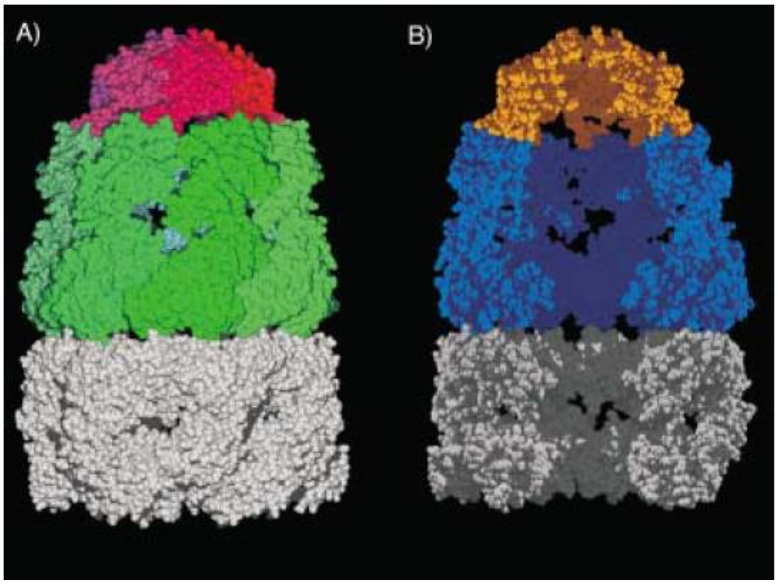
DnaJ (Hsp40), çoklu fonksiyonel alanlardan oluşan çeşitli protein sınıfına aittir. Bu fonksiyonel alanlardan bir tanesi olan 75-amino asitlik J alanı, tüm Hsp40 şaperonlarında korunur. J alanının, Hsp70 ve onun yardımcı şaperonu Hsp40 arasındaki etkileşim için gerekli olduğu mutasyonal analizler ile doğrulanmıştır [158]. J alanının ismi *E.coli*'deki Hsp40 muadili olan DnaJ'den gelmektedir. Hsp40'ın en önemli özelliği, peptitlere bağlanması ve Hsp70'in ATP hidrolizini uyarmasıdır [159]. Hsp70'in ATP bağlı durumunda Hsp40, ilgili peptit ile kompleks oluşturur, bu kompleks Hsp70'in açık peptit bağlama yarığına iletilir ve Hsp40 tarafından katalizlenen ATP hidrolizi ile bu yapı sabitlenir. Hsp70'in işlevsel döngüsü, şaperonu dinamik moduna geri döndüren ve bağlı polipeptidin ayrışmasına izin veren ATP için ADP'nin değişimi ile tamamlanır.

Hsp40 varlığında ATP hidrolizi hızlandırılır ve artık hız sınırlayıcı adım olmayabilir. Bu nedenle, çevrimin potansiyel olarak yavaş ikinci reaksiyonunun, nükleotit değişimi, ayrıca stimüle edilir. Bundan sorumlu olan yardımcı bileşik ise nükleotid içermeyen Hsp70 ile stabil bir şekilde etkileşime giren, ancak nükleotit bağlı Hsp70 ile etkileşime girmeyen GrpE'dir [160]. Buna göre GrpE, Hsp70'in nükleotitler için afinitesini azaltır.

Öncelikle bağlı olan ADP’nin salınması için GrpE, Hsp70'e bağlanır. Daha sonra, ATP'nin Hsp70'e bağlanması, GrpE'nin salınmasını uyarır [161]. DnaK'ın nükleotid içermeyen ATPaz alanına bağlı olan GrpE'nin kristal yapısı, GrpE ve DnaK'nın nükleotitler için afinitesini neden azalttığı konusunda bazı ipuçları verir [162]. Komplekste bulunan nükleotit bağlayıcı bölgenin serbest DnaK'dan daha açıkta bulunması, nükleotit ve protein arasındaki etkileşimleri azaltmaktadır.

2.11.2.3 GroE Sistemi

E. coli' nin GroE proteinleri, en kapsamlı çalışılan moleküler şaperonlardandır [163]. GroEL ve GroES şaperon proteinleri moleküler ağırlıklarına göre sırasıyla 57 kDa ve 10 kDa boyutundadır. *E.coli* için hayati öneme sahip proteinlerdir [164]. GroEL'in en çarpıcı özelliği, her iki ucunda açık olan bir namluya benzeyen kuaterner yapısıdır [165]. On dört alt birim, iki adet 45 ä çapında iki ayrı oyuk oluşturan yedi üyeli halkadan oluşmuştur (Şekil 2.16). GroEL alt birimleri üç alana bölünür. Ekvatoryal alanlar varilin orta kısmını oluşturmaktadır. Bu alanlar ATP'nin hidrolizini katalizlerler ve halkaların birbirleriyle olan temaslarını sağlamaktadırlar. Apikal alanlar, varilin dış bölgerinde yerleştirilmiştir ve bu alanlar protein substratlarının ve yardımcı şaperonu GroES'in bağlanmasında görev almaktadırlar. Ekvatoryal ve apikal alanlar, GroE'nin işlevsel döngüsü sırasında büyük yapısal yeniden düzenlemelere izin veren hareketli menteşeler görevi gören ara alanlar ile bağlanır [130].

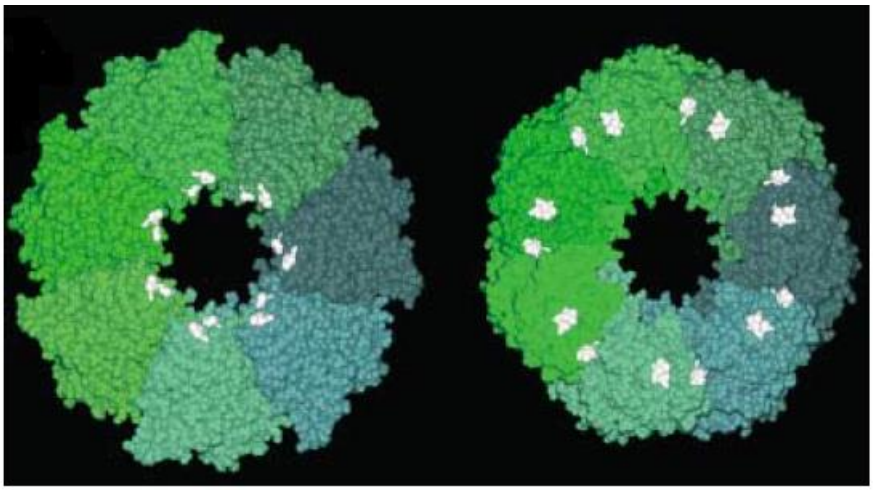


Şekil 2.16 X-Ray ışını kristalografisi ile belirlenen, *E. coli*'de GroE şaperonunun yapısı [130]. A) GroEL çift halka ve GroES tek halkadan meydana gelen asimetrik GroE mermi kompleksinin yandan görüntüsü. Merkez bölgeye uzak olan GroEL halkası (gri renkte). Merkez bölgeye yakın olan yedi alt birimli GroEL halkası (yeşil renkte).

Proksimal halkanın tepesinde yardımcı şaperon GroES (kırmızı renkte) B) Bir GroE mermisinin enine görüntüsü. GroEL halkaları polipeptitlerin katlandığı bir boşluk içermektedir. GroES'in üst GroEL halkasına bağlanması, üst boşluğa erişimi engeller ve aynı zamanda apikal alanların bir hareketini beraberinde getirir. Böylece merkeze yakın olan bölgedeki boşluğun eni 45 ä ' dan 80 ä' ya, yüksekliği 73 ä'dan 85 ä' a artış gösterir.

GroEL'in yardımcı şaperonu GroES, 75 diameter çapında kubbe şeklinde bir halka yapıdadır ve yedi alt birimden oluşmaktadır [166]. GroES'in önemli bir özelliği hareketli ilmek olarak adlandırılan, GroEL'e bağlanmaya aracılık eden 16 amino asitten oluşan bir gerginliktir [167]. GroES'in bağlanması, GroEL namlusunun uçlarında meydana gelir ve nükleotidler, yani ADP veya ATP, ilgili GroEL halkasının ekvatoryal bölgelerine bağlı olmalıdır[22]. Stokiyometrilerinde farklılık gösteren ve uygun bir şekilde mermi ve futbol topu olarak adlandırılan GroES ve GroEL arasında iki tip kompleks literatürde tanımlanmıştır [168]. Mermilerde, GroEL halkalarından sadece biri GroES ile ilişkilidir, futbol toplarında ise her iki GroEL halkası görünüşte simetrik bir parçacık oluşturmak için GroES ile kapatılmıştır. ADP'nin varlığında, mermiler baskın tür gibi gözükse de, ATP varlığında hem futbol topu hem de mermiler gözlenir.
GroEL, aynı zamanda şaperoninler de denen Hsp60 şaperon ailesine aittir. Hsp60 ailesi işlevselliği bakımından 2 gruba ayrılmaktadır. I. grup şaperoninlerin halkaları, yedi alt birimden oluşmaktadır ve yardımcı şaperon ile fonksiyon gösterebilmektedirler. Bakterilerde, mitokondride ve ökaryotik hücrelerin kloroplastlarında bulunurlar. II. grup şaperonin halkaları sekiz veya dokuz alt birimden oluşmaktadır. İkinci grup şaperoninler yardımcı şaperona ihtiyaç duymaz. Arke ve ökaryotların sitozollerinde bulunurlar. I. Grup şaperoninlere kıyasla, II. Grup şaperoninler için moleküler araştırmalar sınırlıdır [169].
GroEL şaperonu, katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinlerin en belirgin özelliği olan hidrofobik bölgeler ile olası substratlarının farkına varmaktadır. Polipeptit bağlanmasındaki hidrofobik etkileşimlerin baskınlığı, bağlanma reaksiyonunun termodinamik özelliklerinin belirlenmesiyle gösterilmiştir [170]. GroEL üzerindeki protein bağlanma bölgesi; mutasyonel analiz, daha yakın zamanda izole edilmiş apikal alan ve GroEL ile bir hidrofobik peptid arasındaki bir kompleksin X-ışını kristal yapıları ile tanımlanmıştır [171]. İlgili peptit, peptit bağlama bölgesindeki merkezi boşluktaki hidrofobik oluk içine yerleşir (Şekil 2.17). Bağlanma bölgesi ve katlanmamış proteinler esnek yapıdadırlar. Bu nedenle iki taraf da ilgili proteinin özelliğine göre

kolay şekil alabilir ve yapısal düzenlemelere açık yapıdadır [172]. Bu nedenle GroEL çok çeşitli kısmen katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlere bağlanabilmektedir.



Şekil 2.17 GroES'in bağlanması üzerine GroEL yapısındaki değişiklikler[130]. Sol: Bir GroEL halkasını oluşturan yedi alt birim (mavi ve yeşil renkte). Hidrofobik amino asitler (beyaz renkte) [40]. GroES bağlanmadığında, hidrofobik aminoasitler merkezi boşuğun içine yerleşim gösterir ve böylece katlanmamış polipeptitlere ilgi artar. Sağ: GroES bağlandığında, hidrofobik amino asitlerin bulunduğu bölge yaklaşık 90 derece kayar. Hidrofobik etkileşim alt ünite arayüzlerine gömülü hale gelir, böylece boşluğun iç yüzeyi esas olarak hidrofilik hale gelir ve bağlı polipeptidin salınmasına neden olur.

GroEL'e bağlıyken çeşitli substrat proteinlerinin yapıları karakterize edilmiştir. GroEL'in, büyük ölçüde katlanmamış polipeptitlerden yüksek yapılandırılmış stabil katlama ara maddelerine kadar bir dizi farklı konformasyonla etkileşime girebildiği anlaşılmaktadır[173]. Katlanma (yani yapı oluşumu) veya GroEL'e bağlanma hidrofobiklik ile indüklendiğinden polipeptidin hangi yolu seçeceği termodinamiğe bağımlıdır. Protein katlandığında hidrofobik artıklar, proteinin iç bölgesinde hidrofobik çekirdek oluşturarak çözücüden korunurken; bağlanma durumunda, hidrofobik artıklar, GroEL'in olukları ile etkileşerek çözünürlerden korunmaktadır.

GroE'nin işlevsel döngüsündeki ana unsur, iki ortak şaperon arasındaki etkileşimdir. GroES co-şaperonunun bağlanması, GroEL partikülünde büyük yapısal değişikliklere neden olur [165]. Öncelikle GroES, polipeptidin bağlı olduğu halkayı kaplayan kapak görevi görerek halkanın boşluğunu kapatır. İkinci olarak ise, boşluğun yapısını tamamen değiştiren, GroEL'deki apikal alanların sıkı (sert) gövde hareketini indükleyerek apikal alanlardaki polipeptit bağlanmasından sorumlu olan hidrofobik etkileşimleri büyük ölçüde kutupsal kalıntılarla değiştirir. Bununla birlikte, hidrofobik

polipeptitlere olan afinite kuvvetle azalır ve bağlı substrat kapalı oyuğa serbest bırakılır [174]. Böylece bu alanın değişimiyle boşluğun büyüklüğü 85000 ä3' ten 175000 ä3' e artış gösterir. Bu, salınan polipeptidin, kendi doğal durumuna ulaşmak için gereken konformasyon düzenlemelerine maruz kalması için yeterli alan sağlar. Dolayısıyla, GroES'in bağlanması, bir şaperonu bağlanma modundan katlanma moduna geçiren bir moleküler anahtar görevi görür: bağlanmış proteinin verimli katlanmayı destekleyen bir ortama salınmasını uyarır [174]. Ancak, şaperonun sonlu oyuk hacminden dolayı, GroE destekli katlama 60 kDa' dan daha küçük proteinlerle sınırlıdır. Katlanma için hem GroEL hem de GroES gerektiren ancak boyutu 82 kDa civarı oyuğa sığmayacak kadar büyük proteinler de mevcuttur [175]. Bununla birlikte, bu özel durumda, GroE aracılı katlama mekanizmasında farklılıklar görünmektedir [176].

GroE içinde proteinin (kısmi) katlanmasından sonra, proteinin boşluktan çıkması ve hücre içinde biyolojik fonksiyon göstermesi gerekir. Ancak bu sırada GroES yolunu kapatırken farklı bir ayırma stratejisi izlemektedir. GroEL/GroES kompleksi sabit bir yapıdadır ancak ATPaz içinde katlanacak polipeptid, GroES'in tam zamanında ayrılmasını sağlayarak işlev görür. GroES ve i bulunduran halka (cis yapıdaki halkaya bağlı yedi ATP molekülü) 0.25 ± 0.5 dak^{-1} 'da ADP'ye çevrilmektedir [176]. Bu durum, GroEL'de trans halkanın ATP ilgisini artıran yapı değişikliğini oluşturmaktadır. Böylece ATP, trans halkaya bağlanmakta, daha sonra cis halkadaki GroES ayrılmakta ve kapsüllenmiş protein boşluktan çıkarılmaktadır [177].

2.12 Bruselloz Hastalığı

Bruselloz; gram(-), fakültatif, intraselüler *Brucella* grubu bakterilerinin oluşturduğu, endemik, bulaşıcı ve enfeksiyöz bir hastalıktır [23]. Özellikle sığır, koyun, keçi ve domuz gibi evcil hayvanlarda yavru atımına neden olup aynı zamanda hayvanlardan insanlara da bulaşarak (zoonozis), ekonomik yönden zarar verici ve halk sağlığı yönünden de önemli bir hastalıktır. Evcil hayvanlarda yavru atma hastalığı olarak bilinen hastalık, insanlarda Dalgalı humma, Bang hastalığı, Malta humması ve Akdeniz humması olarak da bilinmektedir [178].

Bruselloz; Ortadoğu, Latin Amerika, Afrika, Asya, Akdeniz bölgesi gibi dünyada birçok yerde görülmekteyken; ülkemizde ise hayvan hareketlerinin fazla olmadığı ve atık vakalarının nadir olduğu Orta ve Doğu Karadeniz sahil şeridindeki iller dışında, ülke genelinde yaygın olarak görülmektedir[179].

Brusellozun kontrolü genel hijyenik tedbirlerin uygulanması, karantina, enfekte hayvanların sürüden çıkarılması (test ve kesim) ve aşılama yöntemleri ile sağlanmaktadır. Sığırlarda *B. abortus* S19 aşısı, koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev.1 aşısı bu amaçla kullanılmaktadır[180].

2.13 Hastalık Faktörü: *Brucella*

Brucella, küçük (0.5-0.7x0.6-1.5 µm), kapsüllenmemiş, hareketsiz, spor oluşturmayan, fakültatif, intraselüler, kokobasil cinsinden gram(-) patojen bir bakteridir [181]. Genellikle tek hücre halinde ve nadiren kısa zincirler oluşturmaktadır. Mukoid koloni oluşturan suşlarda kapsül görülebilmektedir. Aerop şartlarda ürerler, zorunlu anaerop şartlarda üremezler. Ancak özellikle *B. abortus* ilk izolasyonda %5-10 CO_2'li ortama gereksinim duyar. *Brucella* türleri intraselüler yaşadıklarından, beslenme ihtiyaçları komplekstir. İlk izolasyonlarında pepton, glikoz ve tuz içeren zengin besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir. Optimal üreme ısıları 37°C olmakla birlikte, 10-40 °C arasında üreyebilirler. Üremeleri için gerekli optimal pH 6.7-7.4' dür. Kültürde en az 48 saatlik inkubasyonu takiben düzgün kenarlı, yuvarlak, nemli, parlak koloniler oluştururlar. Kolonileri hemolizsiz ve pigmentsizdir. Katalaz ve oksidaz pozitiftirler. Üreaz oluşturmaları değişkendir. Nitratları nitritlere indirgerler [181].

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi, Rhizobiaceae grubu bakterilere aittir [182]. Şu ana kadar *Brucella* cinsi içinde on iki tür tanımlanmıştır*: B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. neotomae, B.ovis, B.canis, B. ceti, B. inopinata , B. microti, B. papionis, B. pinnipedialis, B. vulpis* [183]. Bu sınıflandırma temel olarak patojenite ve konakçı tercihindeki farklılıklara dayanmaktadır [184]. Dünya genelindeki ana patojenik türleri; koyun ve keçi brusellozundan ve insanlarda en şiddetli enfeksiyonun üretilmesinden sorumlu olan *B. Melitensis*, sığır brusellozunun ana etiyolojik ajanı *B. abortus* ve domuz brusellozdan sorumlu olan *B. suis*'tir. Bu üç *Brucella* türü, konakçılarında düşük ekonomik kayıplara yol açan yavru atımı ve kısırlığa neden olabilmektedir. *B. ovis, B. canis* ve *B. neotomae* sırasıyla koç, köpek ve çöl faresi brusellozundan sorumludur. *B. melitensis, B. abortus* ve *B. suis* türleri çeşitli biovarlar içerir. Türler ve biyovarlar; serotiplendirme, faj tiplemesi, boya hassasiyeti, CO_2 gereksinimi, H_2S üretimi ve metabolik özellikler ile fenotipik karakterizasyona dayanan diferansiyel testlerle ayırt edilmektedir[185].

Terapötik ve aşı stratejilerinin iyileştirilmesi amacıyla yapılan araştırmalar, *Brucella*'nın başarılı kronik enfeksiyonlar kurması ve immün sistem tarafından yok edilmekten

kaçınmasına izin veren patojenik belirleyicileri anlamaya odaklanmıştır. Böylece *Brucella*'nın immün kontrolünü sağlamaya yönelik Thl hücresel immünite geliştirilmiştir [186, 187] Bununla birlikte, *Brucella*-duyarlı T hücrelerinin mobilizasyonu ilk önce innate bağışıklık sisteminin "sentinel (koruyucu)" dendritik hücrelerinin tanınmasını ve bu hücrelerin etkili antijen sunan hücreler haline gelmesi için aktifleştirilmelerini gerektirir [188]. Doğal immün hücreler, Gram(-) bakterilerdeki lipopolisakkarit (LPS) tabakası gibi tekrarlanan hücresel patternler (PAMP'ler) yoluyla patojenleri tespit eder [189, 190].

B. melitensis, B. abortus ve B. suis suşları ana yüzey antijeni O-zincirini içeren pürüzsüz lipopolisakkarit (S-LPS) veya O-zincir içermeyen pürüzlü lipopolisakkarit (R-LPS) eksprese eden pürüzsüz (S) veya pürüzlü (R) olarak oluşabilir. *B. ovis* ve *B. canis,* R-LPS' yi ana yüzey antijeni olarak ifade eden doğal R türleridir. Zoonotik S türleri *B. melitensis, B. suis* ve *B. abortus*, dış zara bağlanmış tam bir LPS molekülünü (S-LPS) eksprese etmektedirler[191]. S-LPS'nin ise ana virülans faktörü olduğu gösterilmiştir [192]. Sahip olduğu O-zinciri kısmı, *Brucella* hücre yüzeyinin en antijenik yapısını temsil etmektedir [193] ve ayrıca S-Brucella enfeksiyonuna karşı önemli bir koruyucu antijen olduğu fare modelinde gösterilmiştir [194].

O-zinciri ayrıca, enfekte olmuş konağın antikor yanıtlarında bir immünodominant antijendir ve S-*Brucella* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların serodiagnozu için kullanılan testlerin serolojik reaksiyonlarında yer alan başlıca antijenik determinanttır [195].

2.14 *Brucella abortus*

B. abortus, başlıca sığırlarda enfeksiyon oluşturmaktadır; fakat manda, deve, geyik, at, koyun, köpek, domuz ve insanlara da bulaşabilmektedir. İnsanlar için patojenitesi bakımından *B. suis*'ten sonra gelir ve 7 biyotipi vardır [196].

Brucella spp.'nin ana dış zar proteinleri (OMP'ler) 1980'lerin başında tanımlanmış, potansiyel immünojenik ve koruyucu antijenler olarak karakterize edilmişlerdir. *Brucella* türleri; grup 1 (94 kDa), grup 2 (41–43 kDa) ve grup 3(25–31 kDa) Omp'leri olarak isimlendirilen 3 büyük grup dış membran proteinine sahiptir [197]. Grup 1 Omp'leri dış membranın küçük komponentleri olarak isimlendirilirken grup 2 Omp'leri fonksiyonel porinler olarak adlandırılır [198]. Grup 2 porin proteinlerini şifreleyen genler 1980'lerin sonunda tanımlanmıştır ve *Brucella* genomunda yakından bağlantılı ve büyük ölçüde özdeşliğe sahip (>%83) iki gen, omp2a ve omp2b'den oluşmaktadır.

1990'larda, grup 3 proteinlerini kodlayan iki gen tanımlanmış ve omp25 ve omp 31 olarak adlandırılmıştır. Omp25 ve omp 31'in öngörülen amino asit dizileri %34 benzerlik taşımaktadır [199]. 31 kDa Omp (Omp31)'nin ikinci porin olduğu öne sürülürken 25 kDa Omp (Omp25)'in fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir [199]. *B. abortus* genomu, yaklaşık 10 kb genomik delesyon nedeniyle omp31 geninden yoksundur[200].

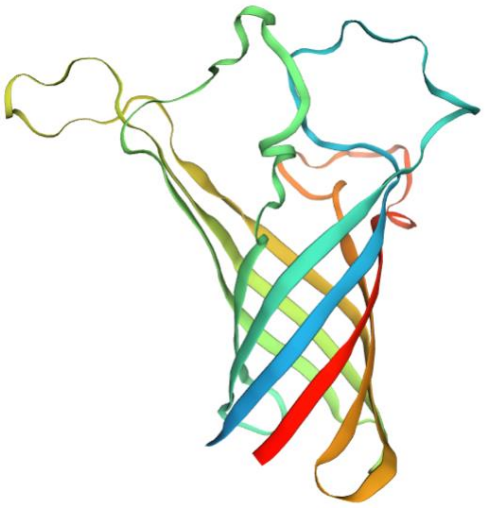
2.15 Omp25 proteini

Omp25, *Brucella*'nın dış zarı üzerinde bulunan ve muhtemelen hücrenin altındaki peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlı bir transmembran proteinidir[201]. Omp25'in PCR-RFLP analizi, omp25 geninin *Brucella* türleri, biovarlar ve suşlarda yüksek oranda korunduğunu göstermiştir [202]. *B.abortus* omp25 geninin sekanslanması ve amino asit dizisinin belirlenmesiyle, bu genin *R. leguminorarum'* un RopB OMP'si ile önemli homoloji (yaklaşık% 40 özdeşlik) gösterdiği ortaya çıkarılmış [199] ve bu protein, Omp25'in peptidoglikana bağlı olduğunu göstermiştir [203]. Son homoloji araştırmaları, *Brucella* Omp25 proteininin, *Agrobacterium tumefaciens, Mesorhizobium loti* ve *Sinorhizobium meliloti* gibi Rhizobiaceae bakteri grubunun diğer üyelerindeki birçok hipotetik OMP ile yaklaşık %40 özdeşlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Olgun Omp25 proteininin alternatif olarak kısa dönüşlerle periplazmaya doğru veya uzun dış ilmeklerle bağlı sekiz adet transmembran dizisi içerdiği tahmin edilmektedir (Şekil 2.18) [204].

Dış hücre zarını ve peptidoglikanı kapsayan bir transmembran proteini olarak Omp25, *Brucella'*nın organizmanın konak hücreye bağlanma veya istila edilmesinde rol oynayarak ruminant konakçıda hastalığa neden olması için gereklidir. Omp25 yokluğu (mutasyon çalışmaları) durumunda; konağın bu patojene karşı immün tepkisini değiştirebildiği, tipik bir hücre aracılı veya humoral immün yanıt oluşturulamadığı ve sonrasında hastalığın prognozun kötüleştiği görülmektedir. Dış zar proteini Omp25; TNF-a, IFN-α ve sitokin üreten hücrelerinin stimülasyonunda özellikle makrofaj uyarımında önemli rol oynar. Yapılan çalışmada yağ bazlı bir adjuvanla birlikte yüksek Omp25 ekstresi veya doğal Omp25 ihtiva eden *Brucella* hücre duvar ekstresi ile aşılanmış farelerde yüksek immun cevabın oluşturulduğu ve böylece virülant sorununa karşı önemli bir koruma sağlandığı tespit edilmiştir [205]. Rekombinant Omp25 eksprese eden *E.coli*' nin hücre lizatlarının fareleri *B. melitensis'*in farklı R suşları ile mücadeleye karşı koruyabileceği gösterilmiştir [206]. Yağ bazlı bir adjuvanla birlikte *B.*

abortus'tan doğal izole edilen Omp25 ile aşılanan sığırların, 3 aylık süre zarfında Omp25'e özgü lenfosit proliferasyonu sağladığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları gösterdiği tespit edilmiştir [207].

Bu bilgilerden yola çıkılarak Omp25 proteininin, brusellozis hastalığı açısından önemli virülans faktörü ve majör antijenden biri olduğu görülmektedir. Ayrıca hem Omp25 hem de diğer *Brucella* dış zar proteinleri (OMP'ler), dikkate değer bir immünojeniklik özelliğe sahip hücreye özgü yüzey antijenleridir [24]. Bundan dolayı Omp'ler bruselloza karşı rekombinant aşıların üretiminde mükemmel adaylardır [24].



Şekil 2.18 Omp25 proteinin 3 boyutlu yapı modellemesi

3

Materyal ve Metot

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

• Yatay elektroforez- Mini-Sub® Cell GT Systems

• Güç kaynağı- Biorad Powerpac Basic

• Nanodrop- Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers

• Dikey elektroforez- Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems

• Western transfer sistemi- Trans-Blot Turbo Transfer System

• Mikrodalga- Arçelik

• UV görüntüleme cihazı- Vilber Lourmat UV Camera and transilluminator

• Manyetik Karıştırıcı- RH basic

• Soğutmalı Santrifüj- Beckman Coulter Allegra X 30

• Çalkalayıcı- Biosan 3D Sunflower Mini-Shaker

• Hassas terazi- Sartoriuz

• Ph metre- Mettler Toledo Seven Compact/Ion S220

• Soğutmalı Etüv- JSR büyük hacimli etüv

• Etüv- Memmert UN55

• Buzdolabı- Arçelik

• UV Spektrofotometre- Shimadzu UV 1800

• Isı bloğu- Inovia Dry Bath

• Sonikatör- Bandelin SONOPULS ultrasonic homogenizers

• Vortex- IKA V1S000

• Kabin- ESCO Class II

• Milipore- Q Gradient Su Cihazı

• -80°C dondurucu- Thermo Scientific FORMA 702

3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmit Suşları

BL21 Star™ *E.coli* kompetan hücreleri Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kitin (InvitrogenTM, K102-01) ticari alımı ile temin edildi. Kullanılan

E.coli suşları Lennox L Broth Base (LB-Invitrogen) ve LB agar (Invitrogen)' da; ayrıca transformasyon deney aşamasında Super Optimal Broth (SOC-Invitrogen) medyumda kültüre edildi. Deneyde kullanılan şaperon plazmitleri (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) Takara Bio.(cat.#3340)'dan temin edildi.

3.1.3 Plazmit DNA İzolasyonu

ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kit (Zymo Research- D4209) kullanıldı.

3.1.4 Elektroforez Reaktifleri

Agaroz (Sigma-Aldrich), tampon (TAE- Multicell), DNA boyası (Biomatik- A4209), yükleme boyası (Thermo Scientific- R0611), ve DNA markırı (Thermo Scientific 1 kb DNA Ladder- SM0311) kullanılan reaktiflerdir.

3.1.5 Ekspresyon

Transformasyon seçilimi için ampisilin (HiMedia-MB1045G) ve kloramfenikol (HiMedia-TC20425G) antibiyotikleri; ekspresyonu indüklemek için isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Bioline-BIO37036), şaperonları indüklemek için L-arabinoz (Hi-Media-GRM037100G) ve tetrasiklin (HiMedia-MB17825G) antibiyotikleri kullanıldı.

3.1.6 Proteinlerin Hazırlanması, SDS-PAGE ile Analizi ve Boyama

Protein lizis tamponu hazırlamak için KH_2PO_4 (Merck), K_2HPO_4 (Merck), NaCl (Sigma), KCl (Merck), gliserol (Multicell), Triton X-100 (Biomatic), imidazol (Biomatic); SDS-PAGE için Tris-HCl (Multicell), Akrilamid/Bis solüsyonu %30 (Biorad-1610158), SDS (Multicell), Amonyum persülfat (APS-Sigma-Aldric-08091), tetrametilletilendiamin (TEMED-Sigma Aldric); yükleme boyası hazırlamak için Tris-HCl (Multicell), gliserol (Multicell), β-merkaptoetanol (Biomatik), bromofenol mavisi (Biomatik) ve SDS (Multicell); yürütme tamponu hazırlamak için Tris (Himedia), Sodyum dodesil sülfat (SDS-Multicell) ve glisin (Himedia); coomassie boyama için coomassie brillant blue (Biomatik), metanol (Isolab) ve asetik asit (Sigma-Aldrich); son olarak boyayı uzaklaştırmak ve jeli görünür kılmak için asetik asit (Sigma-Aldrich) ve metanol (Isolab) kullanıldı.

3.1.7 Western Blot Reaktifleri

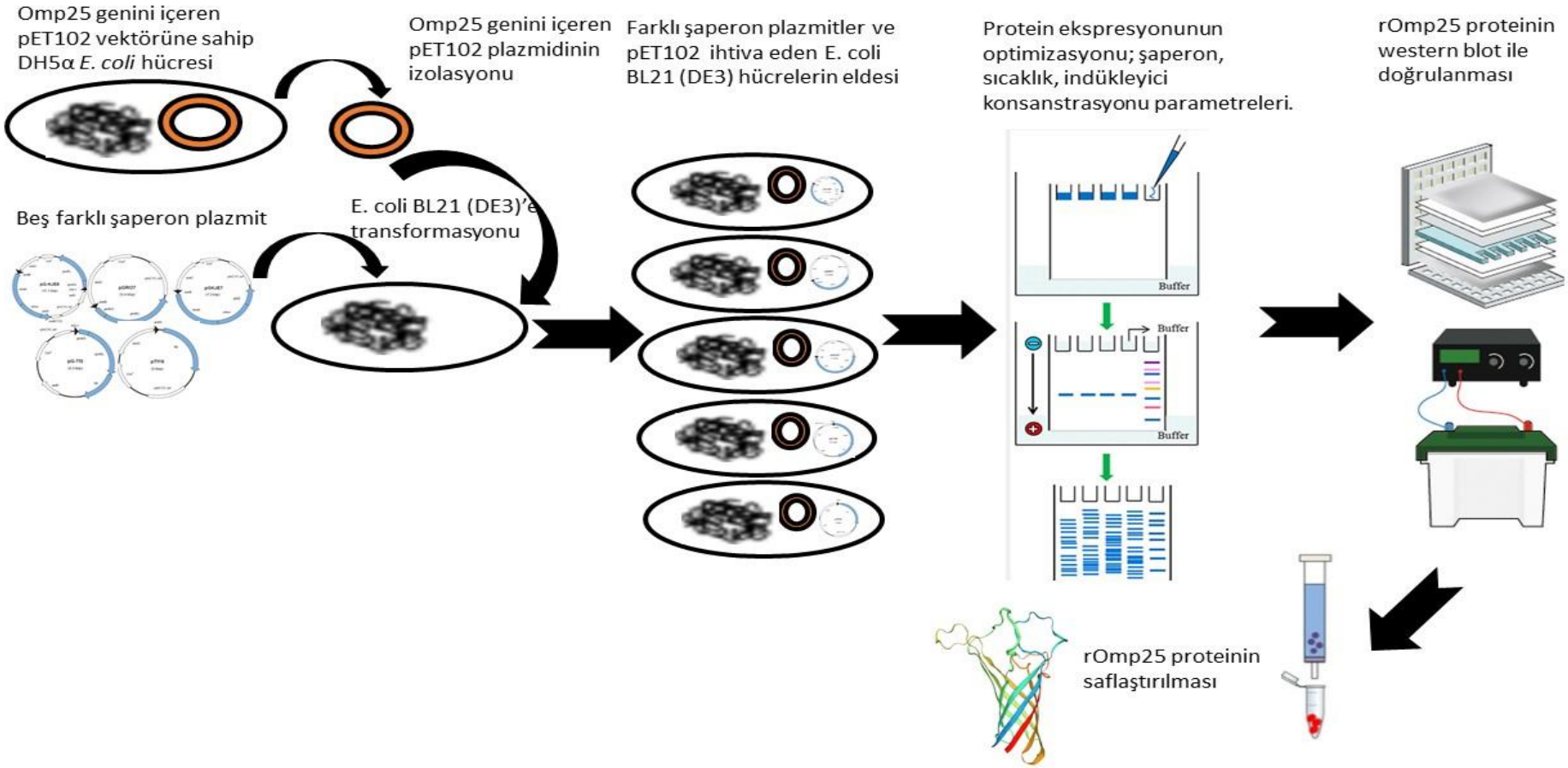
Western analizi için Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry blotlama sistemi, Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer paketi, nitroselüloz membran (Thermo Scientific-88018) ve fitre kağıtları (Thermo Scientific- 88605) kullanıldı. Bloklama, tampon ve

yıkama çözeltileri Tris (Himedia), glisin (Himedia), metanol (Isolab), SDS (Multicell), (PBS-Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), süt tozu (Bioshop-SKI400.500) kullanılarak hazırlandı. Primer ve sekonder antikor olarak sırasıyla His-probe Antibody (H-3): sc-8036 ve Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (31430) tercih edildi. Deteksiyon aşamasında 3'-Diaminobenzidine (DAB-Thermo Scientific-34001), PBS (Sigma-Aldrich) ve H_2O_2 (Sigma- Aldric) kullanıldı.

3.1.8 Protein Saflaştırılması

Doğal ve denatüre koşullarda saflaştırma yaparken rezin olarak HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) kullanıldı. Doğal şartlarda uygulanan saflaştırma protokolünde bağlanma tamponuna lizozim (Thermo Scientific) eklendi. Doğal şartlarda yapılan saflaştırma protokolünde bağlanma, yıkama ve elüsyon çözeltileri NaH_2PO_4(Sigma), imidazol (Biomatik), NaCl (Himedia) kullanılarak hazırlanırken; denatüre koşullarda uygulanan saflaştırma protokolünde PBS(Sigma-Aldrich), NaH_2PO_4(Sigma), imidazol (Biomatik), NaCl (Himedia), üre (Sigma- Aldric), Triton X-100 (Biomatik), Tris-HCl (Multicell) ve gliserol (Multicell) kullanılarak hazırlandı.

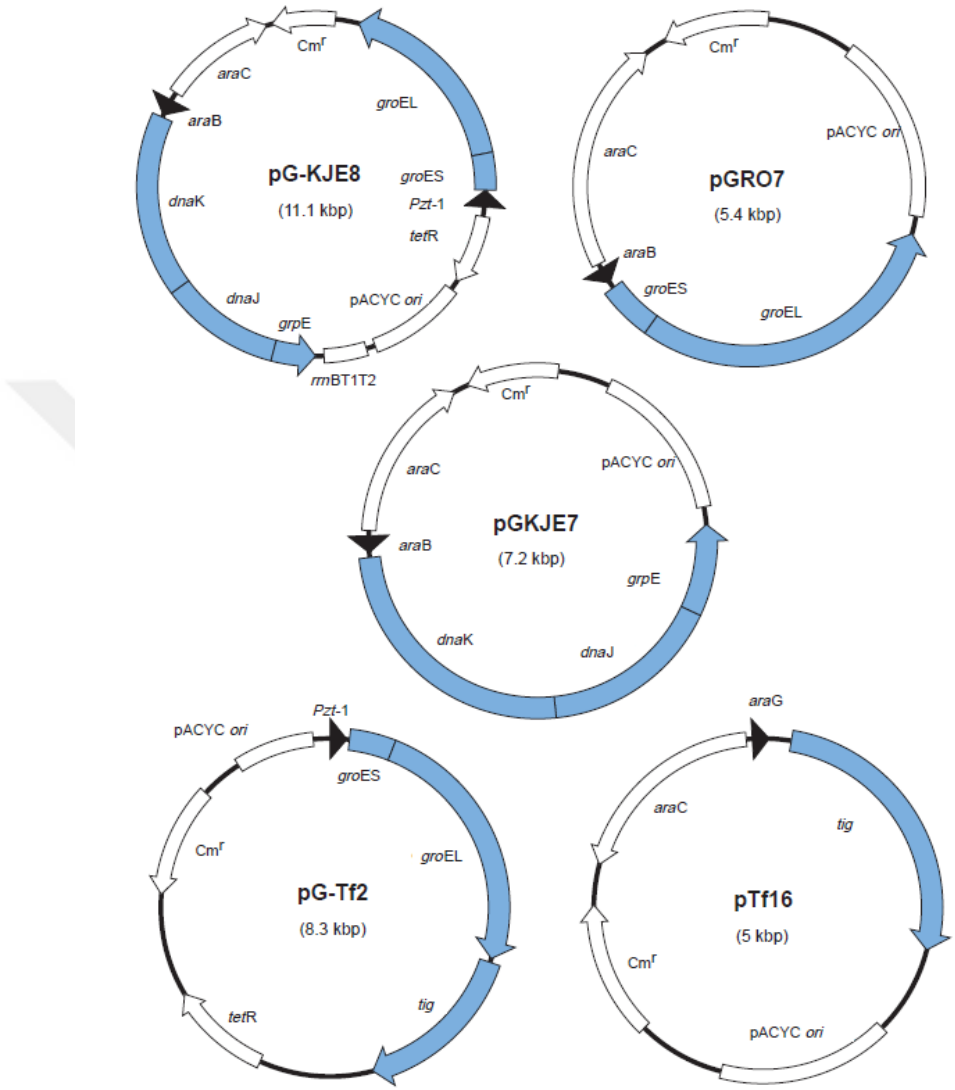
3.2 Metot



Şekil 3.1 Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması

3.2.1 Takara Şaperon Plazmitleri

Takara Bio's Chaperone Plazmid Seti (Şekil 3.2) (Tablo 3.1), beş farklı tipte şaperon plazmidinden oluşur. Plazmitler, protein katlama işleminde işbirliği içinde çalıştığı bilinen çoklu moleküler şaperonların verimli ifadesini sağlamak için tasarlanmıştır.



Şekil 3.2 Şaperon plazmitleri vektör haritaları

Tablo 3.1 Şaperon plazmitleri ve özellikleri

No.	Plazmit	Şaperon	Promotör	Direnç Markerı	İndükleyici(kon.)
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	*araB* *Pzt-1*	Cm	L-Arabinose (0.5 mg/ml) Tetracyclin (1-10 ng/ml)
2	pGro7	groES-groEL	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5 mg/ml)
3	pGKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5 mg/ml)

4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	*Pzt-1*	Cm	Tetrasiklin (1-10 ng/ml)
5	pTf16	tig	*araB*	Cm	L-Arabinose (0.5 mg/ml)

3.2.2 Şaperon Plazmitlerinin Transformasyonu

Hedef proteinin ve şaperonların birlikte ekspresyonunu sağlamaya yönelik bir sistem oluşturmak için iki aşamalı transformasyon içeren bir yöntem kurgulanmıştır: *E. coli*' nin bir şaperon plazmiti ile transformasyonu, transformasyonu yapılan hücrelerin kompetan duruma getirilmesi ardından hedef protein için bir ekspresyon plazmidi ile transformasyonu.

1. 5 farklı şaperon plazmidi için 5 tane One Shot™ BL21(DE3) Chemically Competent *E. coli* hücrelerinden 5 vial buz üzerinde eritildi.
2. Hücrelerden 50 µL alınarak 1,5 mL ependorflara paylaştırıldı.
3. Her birinin üzerine 2 µL şaperon plazmidi eklendi.
4. Buzda 30 dk inkübe edildi.
5. 42 ^{o}C ayarlanan ısı bloğunda 45 sn ısı şoku uygulandı.
6. Tekrar buza alınarak 2 dk bekletildi.
7. Daha sonra üzerlerine 350 mL SOC medium eklendi.
8. 37 °C'de 200 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
9. 20 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar petrilere 100 µL hacimde ekim yapıldı. Kontrol olarak antibiyotiksiz besiyerine ve ampisilin içeren besiyerlerine de ekim yapıldı.
10. Petriler 17 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
11. Ertesi gün transformantların seçilimi sağlandı.

3.2.3 Kompetan Hücre Hazırlama

1. Şaperon plazmidi içeren transformant kolonilerden biri seçilerek 20 µg/mL kloramfenikol içeren 5 mL LB'ye inoküle edildi. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C 220 rpm'de 17 saat inkübasyona bırakıldı.
2. Gece kültüründen 500 µL alınarak 250 mL hacimli erlende önceden 37°C'ye ısıtılmış 50 mL LB' ye aktarıldı.
3. OD değeri 0,5-0,6 arasında bir değere ulaştığında önceden soğutulmuş 50 mL'lik falkonlara 25 mL hacimlerde aktarıldı.
4. Falkonlar buzda 10 dk bekletildi.

5. 4000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı.

6. 10 mL 100 mM $CaCl_2$ (+4°C, ph=7) pelletlerin üzerine eklendi ve hafifçe pipetaj yapılarak karıştırıldı.

7. Karışımın üzerine 200 µL gliserol eklendi.

8. Önceden soğutulmuş 1,5 mL'lik ependorflara 50 µL paylaştırıldı.

9. Aynı kompetan hücre hazırlama prosedürü 5 farklı plazmit için tekrarlandı.

3.2.4 Omp25 Gen Bölgesi İçeren Rekombinant Plazmit DNA'sı İzolasyonu

Ampisilinli besiyerinde seçilimi yapılmış bakteri kolonilerinden bir tanesi seçilerek 100 µg/mL ampisilin içeren 10 mL NB'ye inoküle edildi. Bir gece 37°C çalkalayıcı etüvde 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kit protokolüne göre plazmit izolasyonu yapıldı.

1.10 mL canlanmış gece kültürü 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi ve supernatant atıldı.

2. Pelletin üstüne 250 µL ZymoPURE™P1 solüsyonu eklendi ve pellet pipetaj yapılarak homojenize edildi.

3. Üzerine 250 µL ZymoPURE™ P2 ilave edildi ve 6-8 kez hızlıca ters düz edildi. Oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi.

4. Lizisi tamamlanmış hücrelerin üzerine 250 µL yarım saat buz üzerinde soğutulmuş ZymoPURE™P3 solüsyonu eklendi. 3-4 kez ters düz edilerek karıştırıldı. Sarı renk oluşumuyla nötralizasyon gerçekleşti ve karışım buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra 16000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

5. Üst kısım alınarak üzerine 275 µL ZymoPURE™ Binding Buffer eklendi. Ters düz edilerek homojenize olması sağlandı.

6. Karısım 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilen kolona alındı.

7. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 5000g'de 1 dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.

8. Kolona 800 µL ZymoPURE™ Wash 1 eklendi ve 5000 g'de 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.

9. 800 µL ZymoPURE™ Wash 2 eklendi ve 5000 g'de 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.

10. 200 µL ZymoPURE™ Wash 2 eklendi ve 5000 g'de 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.

11. Kolon bir kere daha boş bir şekilde 10000 g'de 1 dk santrifüjlendi.

12. Kolon temiz 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 30 µL ZymoPURE™ Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 10,000 g'de 1 dk santrifüjlenerek plazmit DNA çöktürüldü. Gerek görülmesi durumunda ikinci elüsyon yapıldı.

13. Plazmit miktarı ve saflığı Nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.

3.2.5 Agaroz Jelde Yürütme

Plazmid DNA'sı %0,8 agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. 40 mL TAE tamponu içerisinde 0.32 g agaroz mikrodalgada eritilerek çözündürüldü. İçerisine 2 µL 20,000X Sybr Safe DNA boyası eklendi. Hazırlanan tankın içerisine dökülüp tarak yerleştirilerek donması beklendi. Örnekler 6x yükleme boyasından 1 µL ve 5 µL DNA örneği karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 2 µL marker (1kb) yüklendi. 120V'da 40 dakika yürütüldü. Bantlar ultraviyole ışık altında görüntülendi.

3.2.6 Rekombinant Plazmit DNA'sının Transformasyonu

1. Hazırlanan 5 farklı şaperon plazmidini içeren 5 farklı kompetan hücre buz üzerinde eritildi.
2. Her birinin üzerine 2 µL plazmit eklendi.
3. Buzda 30 dk inkübe edildi.
4. 42 ^{o}C'ye ayarlanan ısı bloğunda 45 saniye ısı şoku uygulandı.
5. Tekrar buza alınarak 2 dakika bekletildi.
6. Daha sonra üzerlerine 350 mL SOC medium eklendi.
7. 37°C'de 200 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
8. 20 µg/mL kloramfenikol ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB agar petrilere 100 µL hacimde ekim yapıldı. Kontrol olarak plazmit transformasyonu yapılmayan hücrelerin aynı besiyerine ekimi yapıldı.
10. Petriler 17 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
11. Ertesi gün transformantların seçilimi sağlandı.

3.2.7 Ekspresyon

İki aşamalı transformasyondan sonra pozitif kolonilerden bir tanesi seçilip 20 µg/mL kloramfenikol ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde inoküle edildi ve 200 rpm'de 17 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 20 µg/mL kloramfenikol, 100 µg/mL ampisilin ve çalışılacak şaperon plazmidi tipine göre indükleyici (0.5 - 4 mg/mL L-arabinoz ve 1 - 10 ng/mL tetrasiklin konsantrasyon aralığında) (pG-KJE8 plazmidi için L-arabinoz ve tetrasiklin; pGro7, pKJE7 ve pTf16 plazmidi için L-arabinoz; pG-Tf2 için tetrasiklin) içeren ve 1 mL gece kültüründen eklenen LB 'de OD600 değeri 0,6 olana kadar 37'de inkübe edildi. 100 mM stok IPTG çözeltisi hazırlamak için 10 mL distile su içerisinde 0,238 g IPTG çözüldü. 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Kültüre, 1 mM final konsantrasyonu olacak şekilde stok IPTG çözeltisinden eklendi. Eş zamanlı olarak rekombinant pET102/D-TOPO plazmitini içermeyen BL21(DE3) kontrol hücreleri de 1 mM IPTG ile indüklendi. En verimli şekilde çözünür protein elde etmek için optimizasyon çalışmaları yapıldı. 30 °C'de 5

saat ekspresyon 28 °C'de 20 saat, 25 °C'de 22 saat kültürler inkübe edildi. Aynı zamanda IPTG konsantrasyonu 0.5 mM 'a düşürülerek ekspresyon kurgulandı. Ayrıca şaperon plazmitlerinin indükleyici konsantrasyonları da değiştirilerek ekspresyon yapıldı. 0. ve ekspresyonun bittiği saatteki kültürlerden 7'şer mL örnek alınarak 9,000 rpm'de 10 dk soğuk santrifüjde (+4°C) çevrildi. Üst sıvı atıldı. Hücreler, SDS-PAGE analizi için -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.8 Örnek Hazırlama ve SDS-PAGE

-20°C'de muhafaza edilen hücre pelletleri çıkarılıp çözüldükten sonra 500 µL lizis tamponunda (50 mM potasyum fosfat, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, %10 gliserol, %0,5 Triton X-100, 10 mM imidazol, pH=7,8) çözüldü. %50'lik güç kullanılarak 10 sn sonikasyon 20 sn bekleme olacak şekilde toplam 3 dakika sonike edildi. Örnekler +4°C'de 14,000 g'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ve pelletler ayrı tüplere hazırlandı. SDS-PAGE, BIO-RAD Mini- PROTEAN® 3 CelI jel elektroforez sistemi kullanılarak hazırlandı. PAGE için %10'luk yürütme jeli ve %5'lik yükleme jeli olarak hazırlanan jeller aşağıdaki protokolle hazırlandı:

Yürütme jeli (%10);

1. Distile Su- 3,8 mL
2. %30 Akrilamid/Bis Solüsyonu – 3,4 mL
3. 1,5 M Tris-HCl (pH-8,8)- 2,6 mL
4. %10'luk SDS- 100 µL
5. APS (10%)- 100 µL
6. TEMED- 10 µL

Yükleme jeli (%5)

1. Distile Su- 3,60 mL
2. %30 Akrilamid/Bis Solüsyonu- 670 µL
3. 0,5 M Tris-HCl (pH-6,8)- 625 µL
4. %10'luk SDS- 50 µL
5. APS (10%)- 50 µL
6. TEMED- 5 µL

Camlar doğru biçimde yerleştirildikten sonra hazırlanan yürütme jelinin 2/3'ü iki cam arasına dikkatlice döküldükten sonra üzeri distile su ile kaplanarak polimerleşmesi beklendi. Bu arada yükleme jeli hazırlandı. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerindeki su alınarak üzerine yürütme jeli döküldü ve taraklar yerleştirildi. Yürütme jelinin de aynı şekilde polimerleşmesi beklendi ve daha sonra hazırlanan jel tarağı dikkatlice çıkarılıp yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, 0,1 % SDS) ile doldurulan tankın içerisine yerleştirildi. Supernatant ve pellettten 50 µL alınıp 50 µL boya (2,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 mL gliserol (100%), 0,4 mL β-merkaptoetanol, 0,02 g bromofenol blue, 0,4 g SDS) ile karıştırıldı. Supernatant ve pelletler önceden 95°C'ye ısıtılmış ısı bloğunda 5 dk kaynatılıp denatüre edilerek yüklemeye hazır hale getirildi. Kuyucuklara 30 µL hacimde yüklendi. Elektrotlar dikkatlice güç kaynağına bağlandı. 80 V'da bir saat ve akabinde 120 V'da bir buçuk saat yürütme gerçekleştirildi.

3.2.9 Jellerin Coomassie Boyaması

Örnekler yürütüldükten sonra jel dikkatlice sistemden çıkarıldı. %0,1 coomassie brillant blue, %40 metanol, %10 asetik asit içeren boyama çözeltisine alındı. 2 dakika kaynatılarak boyanın jele geçmesi sağlandı ve jeller boyanın içinde gece boyu bekletildi. Ertesi gün %5 metanol, %7 asetik asit içeren boya uzaklaştırma çözeltisiyle boya uzaklaştırıldı ve bantlar görünür duruma geldi.

3.2.10 Western Blot

E.coli BL21(DE3) konakçısında farkli şaperonla birlikte ekspresyonu gerçekleştirilen Omp25 proteininin varlığı western blot yöntemiyle doğrulandı. Western Blot yöntemi, Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Öncelikle membrana aktarılmadan önce proteinlerin SDS-PAGE ile yürütüldü. SDS-PAGE aşaması yukarıdaki protokole göre gerçekleştirildi.
2. Membrana aktarım için iki yöntem uygulandı. Öncelikle jele uygun kesilen membran ve filtre kağıtları 15 dakika transfer tamponunda bekletildi. (Transfer tamponu; 500 mL hacim için 39 mM glisin,48 mM Tris, %20 metanol,1.3 mM SDS).
3. Zemine filtre kağıdı ve üzerine sırasıyla jel, membran, filtre kağıdı konularak ve aralarında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilerek sandviç yapıldı.
4. Trans-Blot Transfer Sistemi kullanılarak 25 V'da 45 dk blotlama gerçekleştirildi.
5. Aynı zamanda Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer paketi ile de aktarım gerçekleştirildi. Paketin içeriğinden çıkan filtre kağıtlarının arasına jel dikkatlice ve hava

kabarcığına yer bırakmadan yerleştirilerek turbo modunda 25V'da 7 dk aktarım gerçekleştirildi.

6. Aktarımdan sonra membran dikkatlice ayrılarak Membran PBS- Tween 20 (2ml Tween 20 / 1 L PBS) ile 5 dk yıkandı.

7. %5'lik bloklama çözeltisi (5 gr süt tozu / 100 mL PBS- Tween 20) ile 1,5 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.

8. Membran PBS- Tween 20 ile tekrar 5 dk yıkandı.

9. Primer antikor olarak His-probe Antibody (H-3): sc-8036 kullanıldı. Antikor, % 5'lik süt tozu çözeltisinde 1:500 oranında seyreltilerek +4°C'de, çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

10. Ertesi gün PBS- Tween- 20 ile 5'er dk'dan üç yıkama yapılarak süt tozu uzaklaştırıldı.

11. Sekonder antikor olarak Goat anti-Mouse IgG (H+L) kullanıldı. Antikor, 1:5000 oranında %5'lik süt tozu içerisine eklendi ve membranın üstüne eklenip 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı.

12. Membran, PBS- Tween-20 ile 10 dk süresince iki kere yıkandı.

13. PBS ile 5 dk yıkaması yapıldı.

14. Saf su ile 5 dk yıkama yapılarak görüntülemeye geçildi. 50 mL PBS içerisinde 30 mg DAB ve 50 µL H_2O_2 çözüldü. Membran bu çözeltiye batırılıp bant oluşuncaya kadar bekletildi.

3.2.11 Affinite Kromotografi ile Saflaştırma

Şaperonlar ile birlikte ekspresyonu gerçekleştirilerek çözünürlüğü artırıldığı düşünülen Omp25 proteini, doğal koşullarda saflaştırma işlemine tabi tutuldu.

Doğal koşulda saflaştırma

Bağlanma tamponu (pH:8 -25 mL)

50mM NaH_2PO_4	0.1 g
10mM imidazol	0.01 g
500mM NaCl	0.73 g

Yıkama Tamponu (pH:8 -25 mL)

50mM NaH_2PO_4	0.1 g
20mM imidazol	0.03 g
500mM NaCl	0.73 g

Elüsyon Tamponu (pH:8 -25mL)

50mM NaH_2PO_4	0.1 g
500mM imidazol	0.8 g
500mM NaCl	0.73 g

Bufferlar 0.22 µm filtre ile steril edildi.

1-1 litre hücre kültürü ile çalışıldı. 25 ^oC'de 22 saat ekspresyonu yapılan 6 erlen içinde 160 ml'lik kültürler 9000 rpm'de 10 dk çöktürüldü.
2-9 mL lik binding buffer içine 9 mg lizozim eklendi ve çözündürüldü. Her bir falkona 1,5 mL paylaştırıldı.
3-Buzda yarım saat inkübe edildi.
4-Eş zamanlı olarak 1 mL rezin 2,5 mL binding buffer ile karıştırılıp buzda yarım saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
5-Daha sonra hücreler 50 % güç ile (10 sn sonikasyon 20 sn ara) sonike edildi. 15.000 g'de 15 dk +4^oC'de çöktürüldü ve supernatant alındı.
6-Resin ise 1000 g'de 1 dk çöktürüldü ve üst kısım atıldı.
7-Resinin üstüne supernatant ve 2 mL binding buffer eklenerek çalkalayıcıda +4^oC'de 45 dk inkübe edildi. Daha sonra 1000 g'de 1 dk sanrifüj yapıldı.1 mL lik örnek alındı geri kalan resini kaldırmadan atıldı.
8-Resinin üzerine 3 mL yıkama buffer eklendi ve 1000 g de 1 dk santrifüj yapıldı.1 mL lik örnek alınıp gerisi atıldı. Aynı işlem 3 sefer tekrarlandı ve her seferinde örnek alındı.
9-Daha sonra 1 mL elüsyon buffer eklendi 1000 g'de santrifüj yapıldı ve 500 µl örnek alındı aynı işlem 6 kez tekrar edildi. Örnekler +4 ^oC'de 1 gece saklandı.

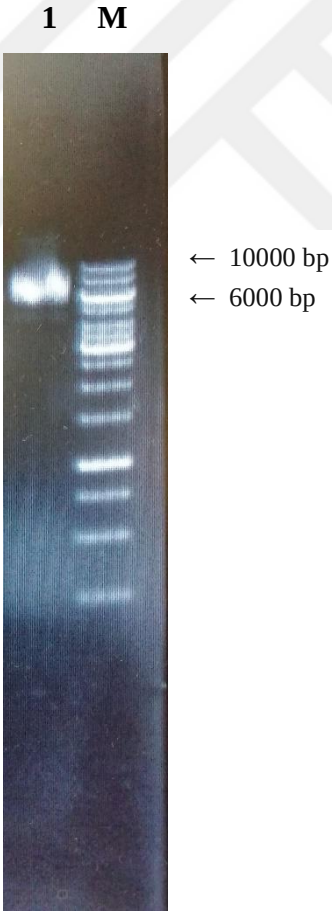
4

Sonuç ve Öneriler

4.1 Deneysel Bulgular

4.1.1 Omp25 Gen Bölgesi İçeren Rekombinant Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit izolasyonu, 100 µg/mL ampisilin içeren 10 mL LB besiyerinde inoküle edilen Omp25 gen bölgesi içeren rekombinant plazmit DNA'sı ihtiva eden DH5α bakteri kültüründen gece boyu büyütülerek ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kiti kullanılarak ve ilgili kit protokolüne göre yapıldı. Plazmit DNA miktarı nanodrop ile ölçülerek 110 ng/µL olarak bulundu. A260/A280 oranı ise 1,9 olarak tespit edildi. Plazmit DNA'sı % 0.8' lik hazırlanan agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1). Jel görüntüsünde plazmide ait 6957 bç ürün görülmektedir.

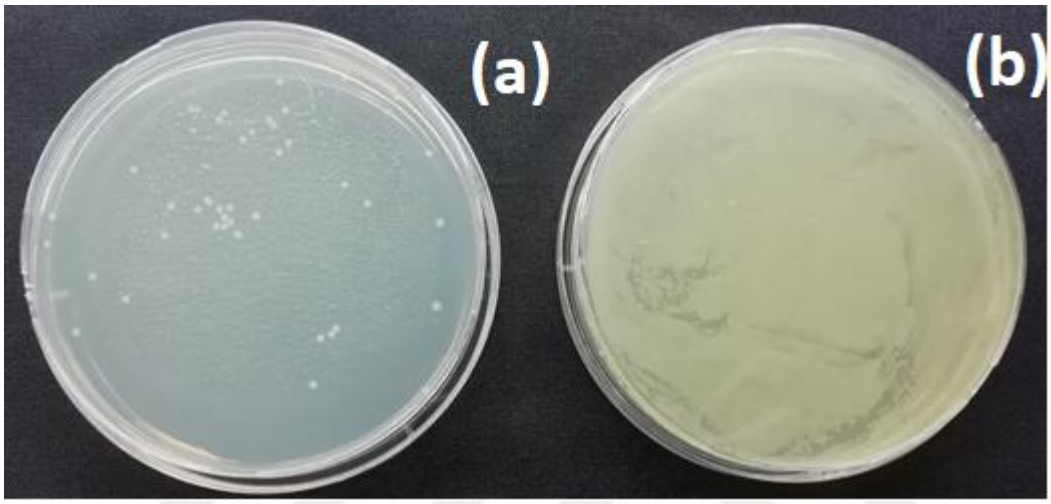


Şekil 4.1 Plazmit DNA agaroz jel görüntüsü. M: GeneRuler DNA Marker 1: Plazmit DNA

4.1.2 Transformasyon

4.1.2.1 Şaperon Plazmit DNA'larının Transformasyonu

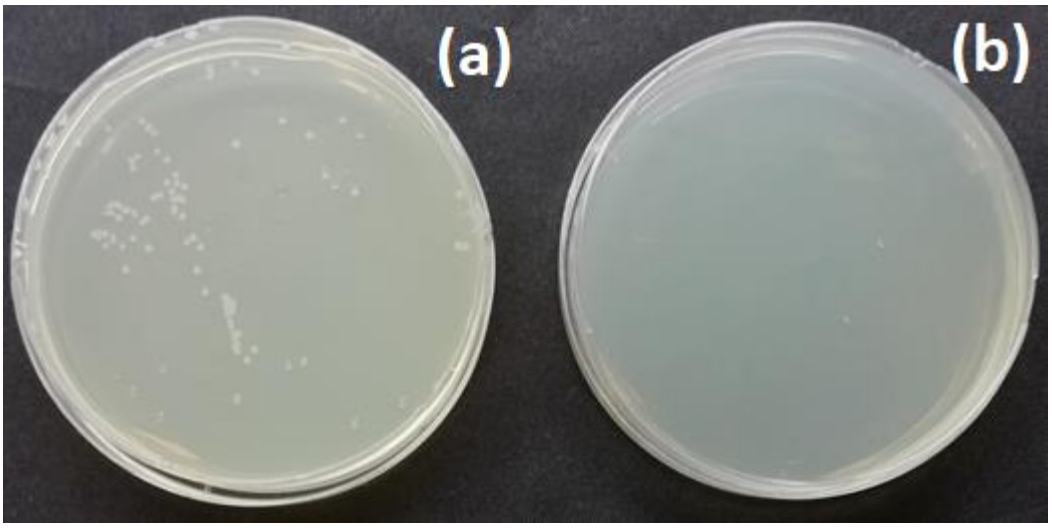
Beş farklı şaperon plazmidi için 5 farklı transformasyon reaksiyonu kuruldu. Şaperon plazmitlerinin ilgili transformasyon prosedürüne göre *E.coli* BL21(DE3) kompetan hücrelerine transformasyonu yapıldı. Ardından 20 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar besiyerine 100 µL hacimde ekim yapıldı. Petriler 17 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.2' de transformant koloniler görülmektedir.



Şekil 4.2 Şaperon plazmidi transformasyonu sonucu transformant koloniler. a) 20 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde üreyen transformant koloniler, b) Antibiyotik içermeyen besiyerindeki üreyen koloniler.

4.1.2.2 Omp25 Gen Bölgesi İçeren Rekombinant Plazmit DNA'larının Transformasyonu

Transformasyonu yapılan ve içlerinde şaperon plazmidi ihtiva eden koloniler seçilerek kompetan hücre haline getirildi. Beş farklı şaperon plazmidi içeren beş farklı hücreye Omp25 gen bölgesi içeren rekombinant plazmitlerin transformasyonu transformasyon prosedürüne göre gerçekleştirildi. Ardından 20 µg/mL kloramfenikol ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB agar besiyerine 100 µL'lik hacimde ekim yapıldı. Petriler 17 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Şekil 4.3' de transformant koloniler görülmektedir.



Şekil 4.3 Omp25 plazmidi transformasyonu sonucu transformant koloniler. a) 20 μg/mL kloramfenikol ve 100 μg/mL ampisilin içeren LB agar besiyerinde üreyen transformant koloniler. b) İçerisinde plazmit bulundurmayan ve 20 μg/mL kloramfenikol ve 100 μg/mL ampisilin içeren LB agar besiyerine ekilmiş kontrol petrisi.

4.1.3 rOmp25 proteinin ekspresyonunun optimizasyonu

Rekombinant Omp25 proteininin, translasyon verimini ve çözünürlüğü artıran 13 kDa ağırlığındaki thioredoksin proteini ve karboksi terminal ucundaki 3 kDa'luk His-tag ile birlikte toplam protein ağırlığı 41 kDa 'dur. rOmp25 proteinin çözünürlüğünü artırmak için;

30°C'de gerçekleştirilen ekspresyon çalışmaları:

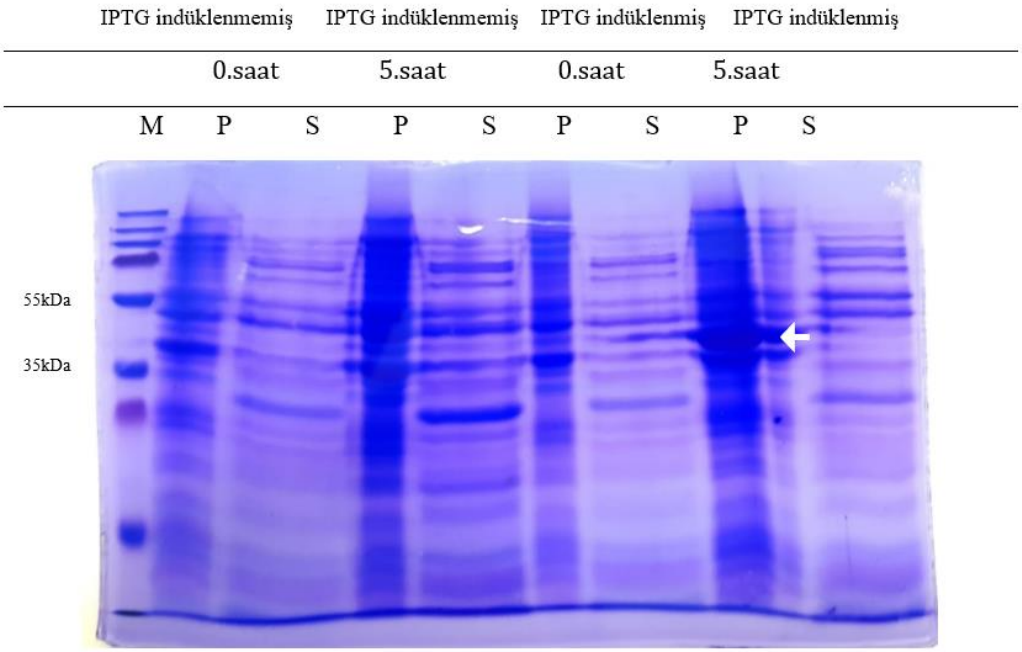
30°C'de 5 saat süresince şaperon plazmitleri ile birlikte 1 mM IPTG kullanılarak *E.coli* BL21(DE3) içerisindeki Omp25 geninin ekspresyonu indüklenmiştir. Sadece Omp25 gen bölgesi ihtiva eden rekombinant plazmit DNA'sının (Omp25 plazmit) ekspresyon profili şekil 4.4' de gösterilmiştir. Farklı kültürlerde ayrı ayrı olmak koşuluyla diğer beş farklı şaperon plazmidini (pgro7, pgKJE7, pgTf16, pGKJE8, pGTf2 ayrı ayrı olmak üzere) ve Omp25 plazmidini birarada içeren hücre ekspresyon profilleri sırasıyla şekil 4.5, şekil 4.6, şekil 4.7, şekil 4.8, şekil 4.9'de gösterilmiştir.

pgro7, pKJE7 ve pgTf16 şaperon plazmitlerinin indükleyicisi L-arabinozun konsantrasyon miktarı 0.5 - 4 mg/mL aralığında önerildiğinden 4 farklı konsantrasyonda deneme yapılmıştır (0.5mg/mL-1mg/mL-2mg/mL-4mg/mL). SDS-PAGE ile gözlemlenen şaperon ekspresyonlarında en iyi sonuç 1 veya 2 mg/mL L-arabinoz kullanımında elde edilmiş olup sonuçlar Şekil 4.5- 4.6- 4.7' de hücre ekspresyon profilleri ayrıntılı sunulmuştur.

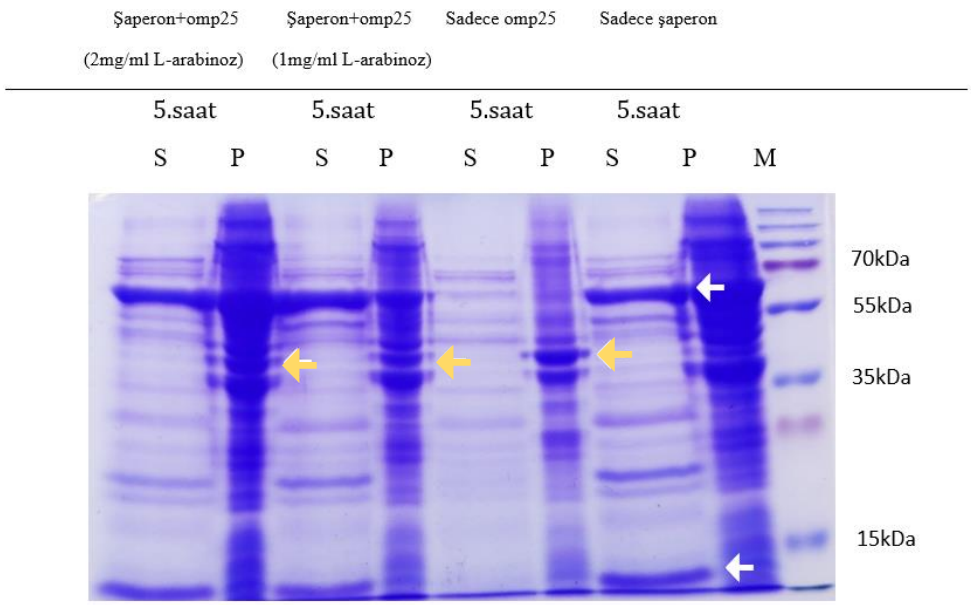
pGTf2 şaperon plazmitinin indükleyicisi tetrasiklinin konsantrasyon miktarı 1-10 ng/mL aralığında önerildiğinden 4 farklı konsantrasyonda deneme yapılmış (1 ng/ml- 2 ng/ml- 5

ng/ml -10 ng/ml) ve şaperon ekspresyonunda en iyi sonuç 5 veya 10 ng/mL tatrasiklin kullanımında elde edilmiş olup sonuçlar Şekil 4.8' de ayrıntılı gösterilmiştir.

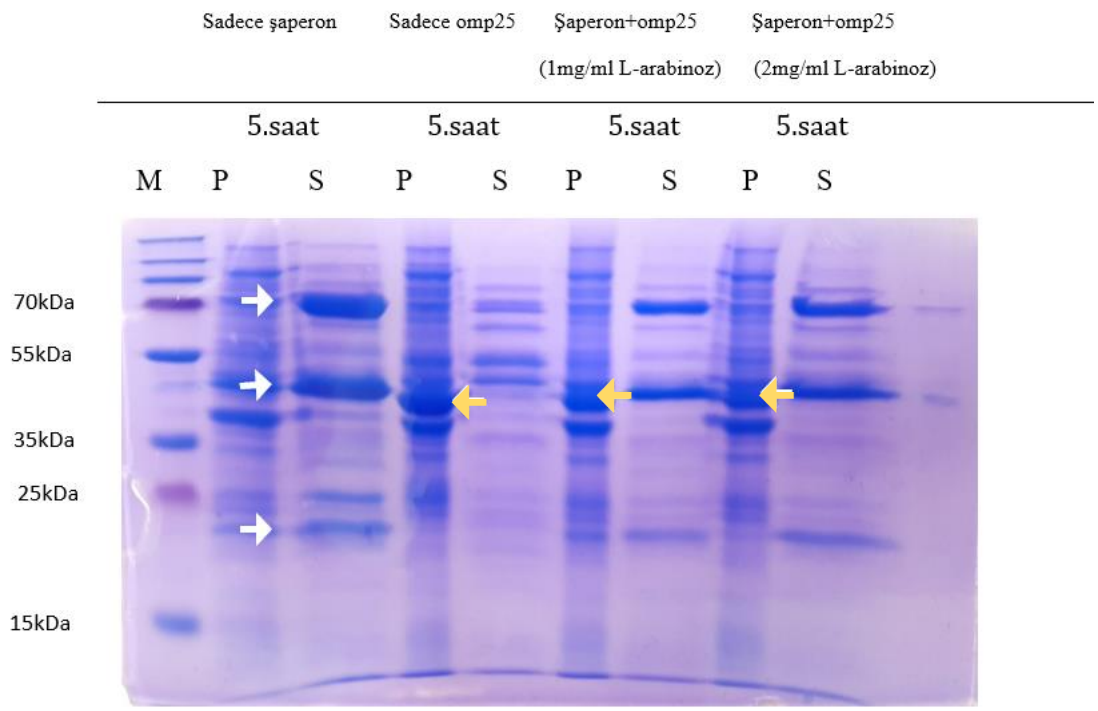
pGKJE8 şaperon plazmidinin indükleyicisi L-arabinoz ve tatrasiklindir. L-arabinoz konsantrasyon miktarı 1 mg/mL tutularak 4 farklı tatrasiklin konsantrasyonunda çalışılmış ve SDS-PAGE sonuçlar ile en iyi şaperon ekspresyonu 5 ve 10 ng/mL tatrasilin kullanımında gözlemlenmiştir. Şekil 4.9' da şaperon ekspresyon profilleri detaylı gösterilmiştir.



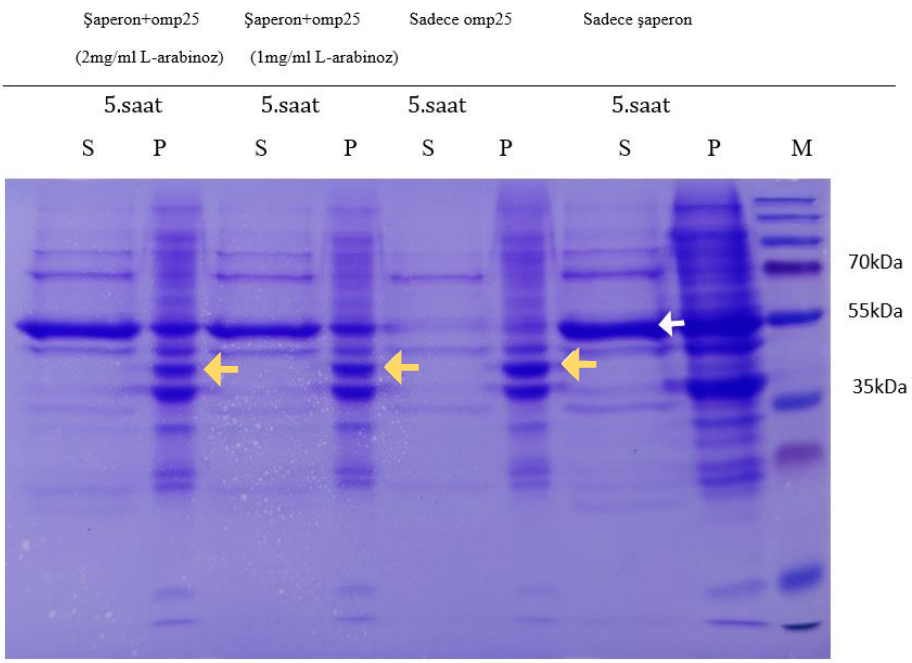
Şekil 4.4 30 °C'de indüklenen sadece Omp25 gen bölgesi içeren rekombinant plazmit DNA'sını içeren hücrenin ekspresyon profili



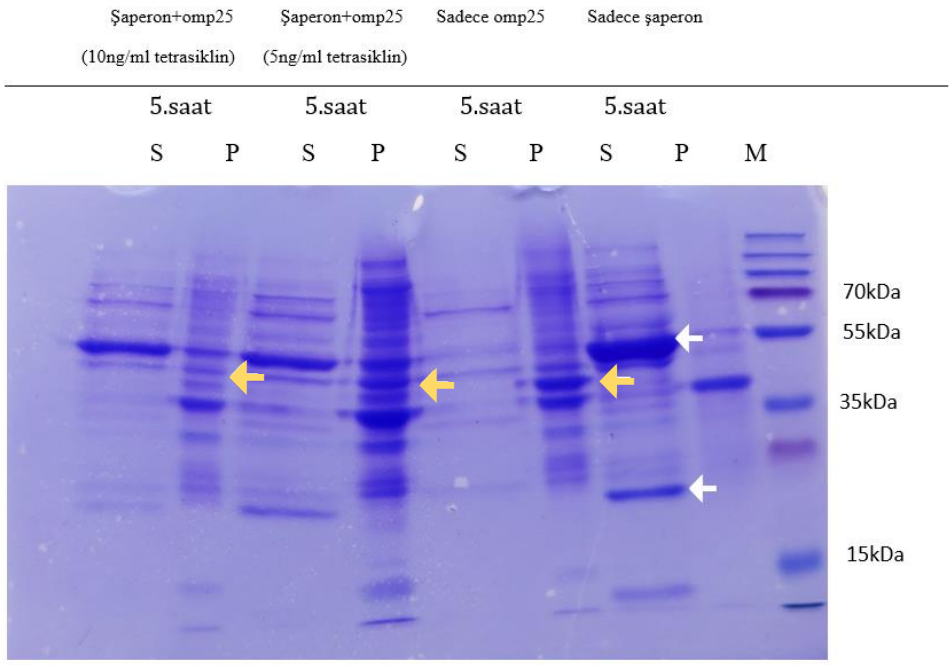
Şekil 4.5 30 °C'de indüklenen pgro7 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. Supernatantta gözlemlenen kalın bantlar, indüklenen GroEL Şaperonu (60 kDa) ve GroES Şaperonu (10 kDa) şaperonlarıdır. Beyaz renkte gösterilen oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sarı renkte gösterilen oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.6 30 °C'de indüklenen pKJE7şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. Supernatantta gözlemlenen kalın bantlar, şaperon plazmidinin sahip olduğu ve indüklenen dnaK (70 kDa), dnaJ (40 kDa) ve grpE (22 kDa) şaperonlarıdır. Beyaz renkte gösterilen oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sarı renkte gösterilen oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.

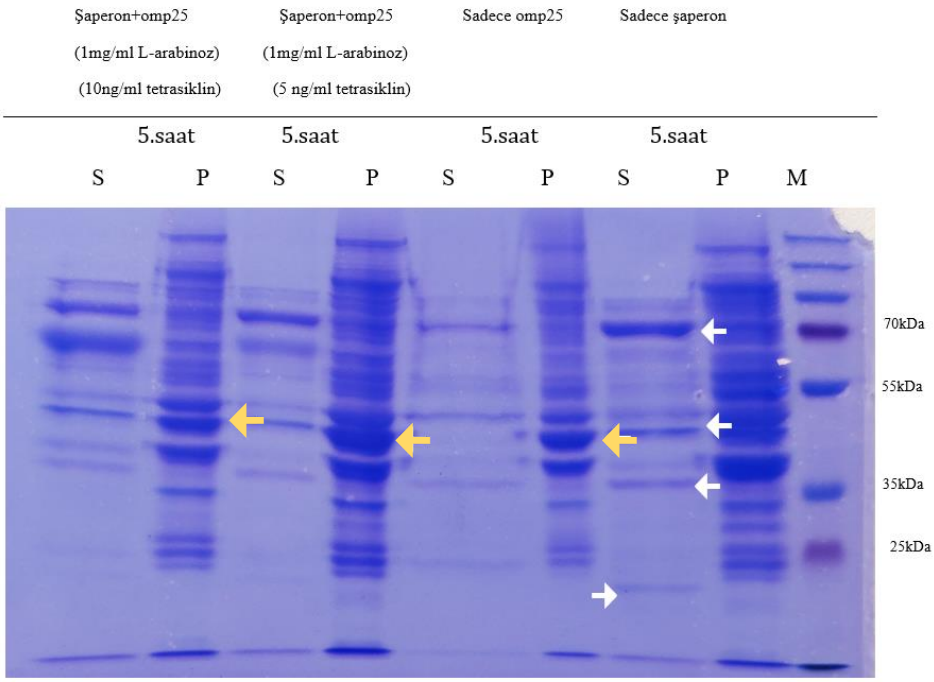


Şekil 4.7 30 °C'de indüklenen pgtf16 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. Supernatantta gözlemlenen kalın bantlar, şaperon plazmidinin sahip olduğu ve indüklenen tig (56kDa) şaperonudur. Beyaz renkte gösterilen oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sarı renkte gösterilen oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.8 30 °C'de indüklenen pGTf2 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. Supernatantta gözlemlenen kalın bantlar, şaperon plazmidinin sahip

olduğu ve indüklenen groEL Şaperonu(60 kDa), tig (56 kDa) ve groES(10 kDa) şaperonlarıdır. Beyaz renkte gösterilen oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sarı renkte gösterilen oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



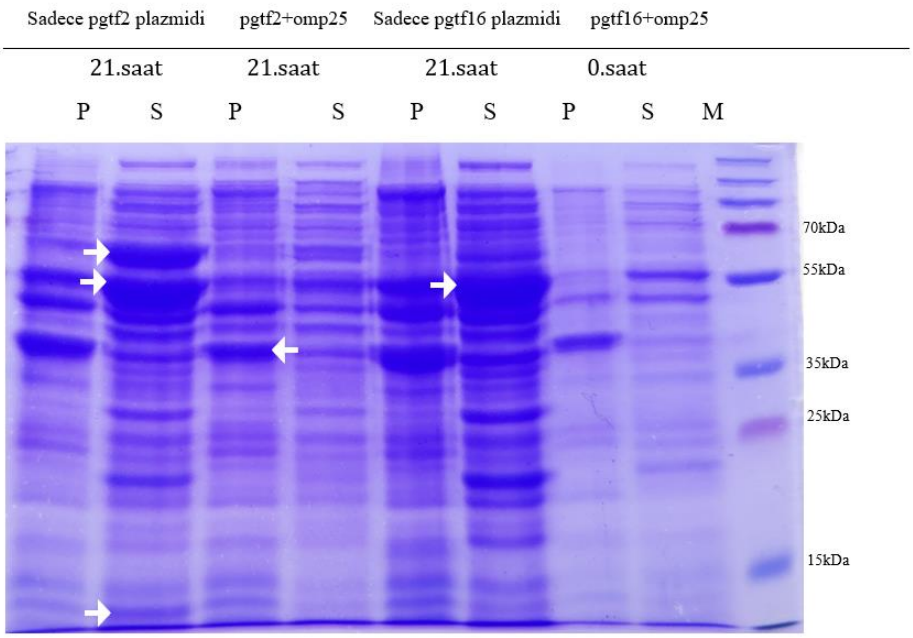
Şekil 4.9 30 °C'de indüklenen pgKJE8 şaperon plazmidi ve Omp25 plamidini içeren hücrenin ekspresyon profili. Supernatantta gözlemlenen kalın bantlar, şaperon plazmidinin sahip olduğu ve indüklenen groES(10 kDa), groEL(60 kDa), tig (56 kDa), DnaK(70 kDa), DnaJ (40kDa), grpE (22 kDa) şaperonlarıdır. Beyaz renkte gösterilen oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sarı renkte gösterilen oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.

Beş farklı şaperon plazmidiyle indükleyici konsantrasyonlarına yönelik yapılan ekpresyon çalışmaları sonucunda, supernatantlarda şaperon ekspresyon profillerinde anlamlı farklılıklar tespit edilmiş olmakla birlikte Omp25 protein ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

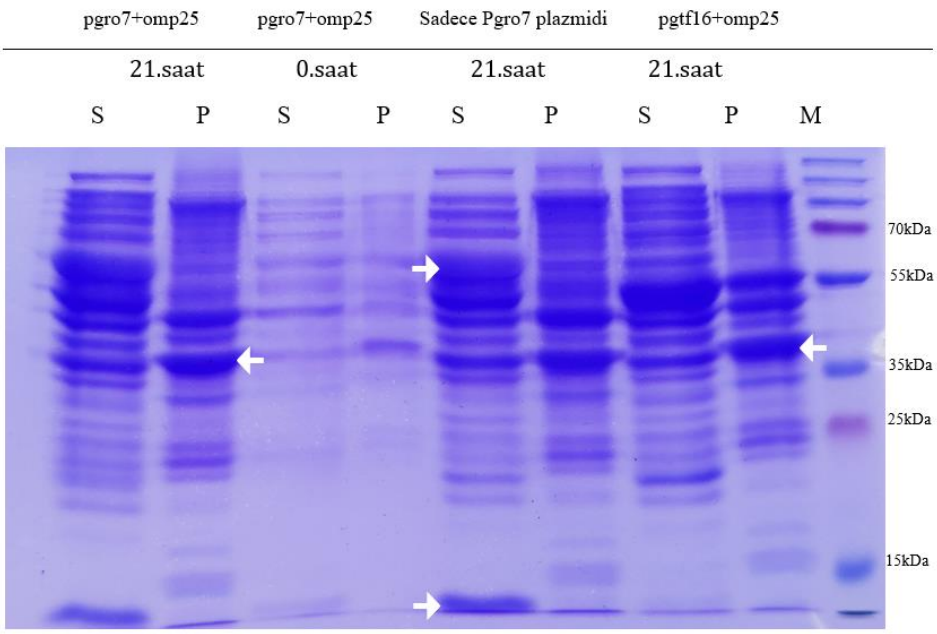
Bundan dolayı Omp25 proteinin çözünebilir ekspresyonunu artırma amacıyla sıcaklık strateji esas alınarak 25°C'de ekspresyon yapılmıştır.

25°C'de gerçekleştirilen ekspresyon çalışmaları:

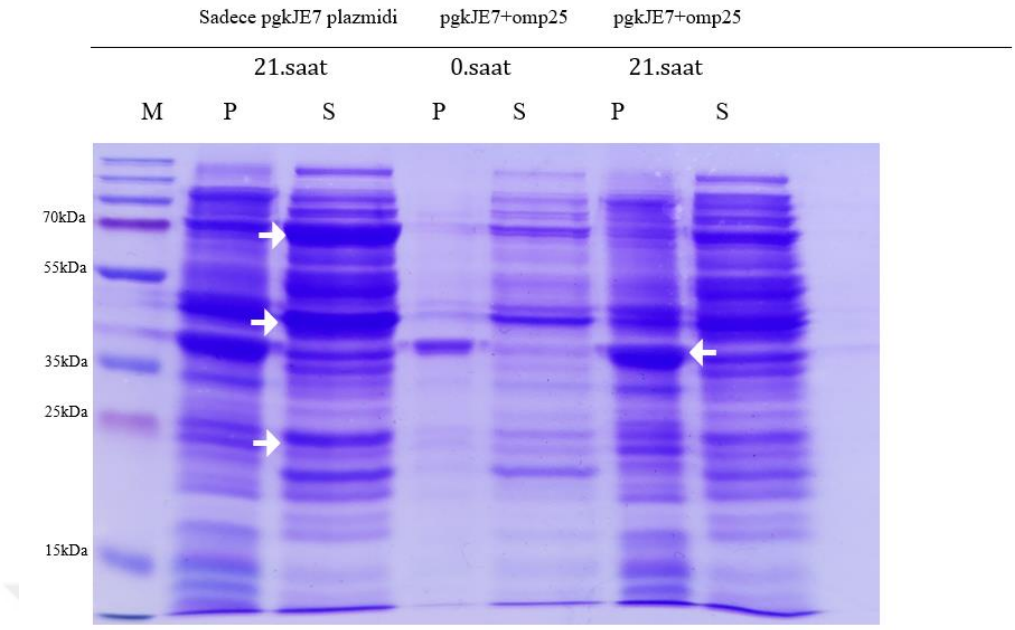
25°C'de 21 saat boyunca 1mM IPTG ile ekspresyon indüklenmiş ve ekspresyon profillerinin SDS-PAGE görüntüleri Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13' de gösterilmiştir.



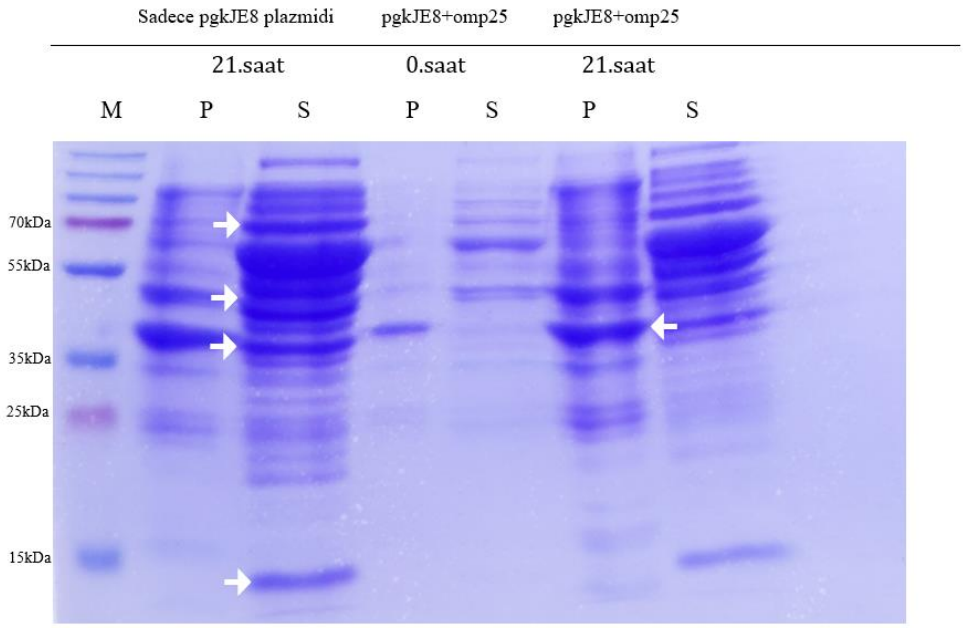
Şekil 4.10 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf2 ve rOmp25/pgtf16 şaperon plazmitlerinin ekspresyon profilleri. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sol yöndeki ok eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.11 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf16 ve rOmp25/pgro7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profilleri. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sol yöndeki oklar eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.12 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE7 şaperon plazmidi ile indüklenen ekspresyon profili. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sol yöndeki ok, eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.

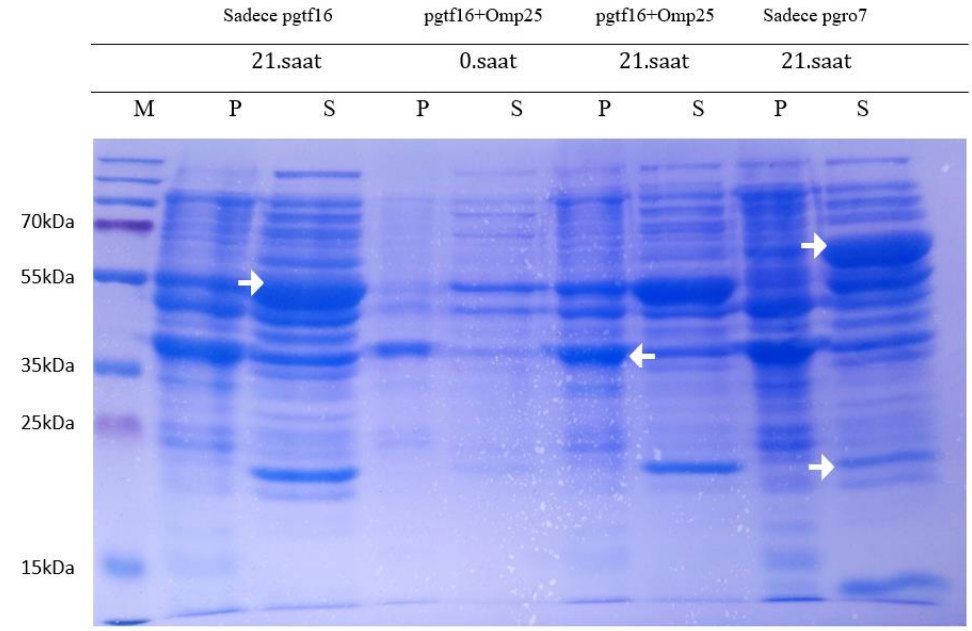


Şekil 4.13 25 °C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE8 şaperon plazmidi ile indüklenen ekspresyon profili. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermektedir. Sol yöndeki ok, eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.

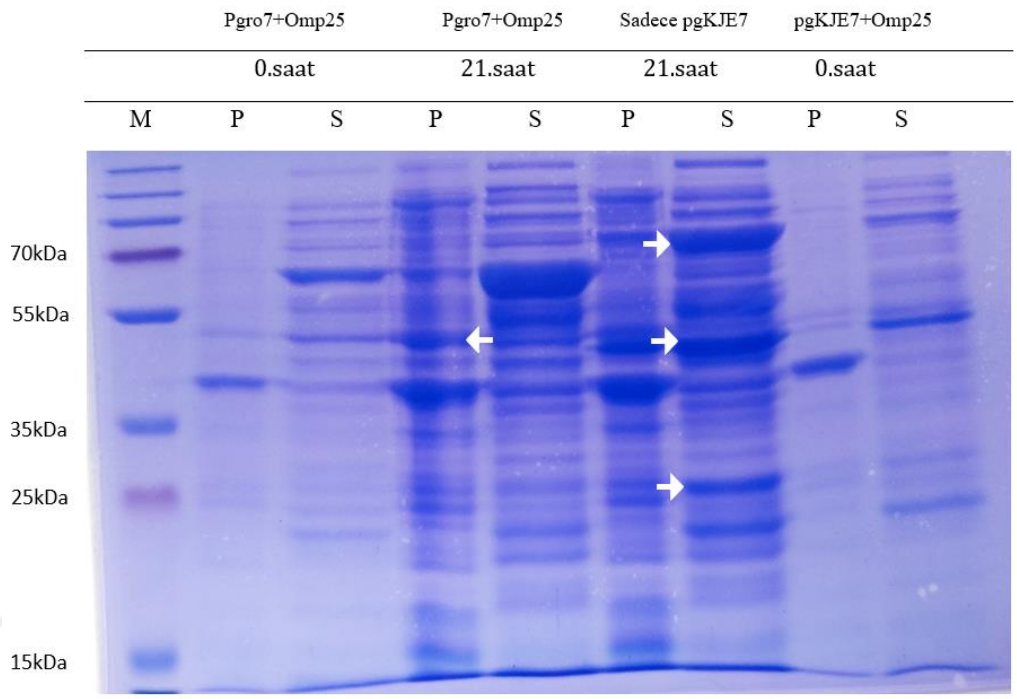
Sonuçta 30°C'de yapılan ekspresyona oranla 25°C'deki ekspresyonda supernatanta atılan toplam protein miktarında artış gözlenmiştir. Aynı şekilde Omp25 proteininin olduğu bant aralığında supernatantta protein bandı gözlemlenmiştir.

IPTG konsantrasyonu azaltılarak gerçekleştirilen ekspresyon çalışmaları:

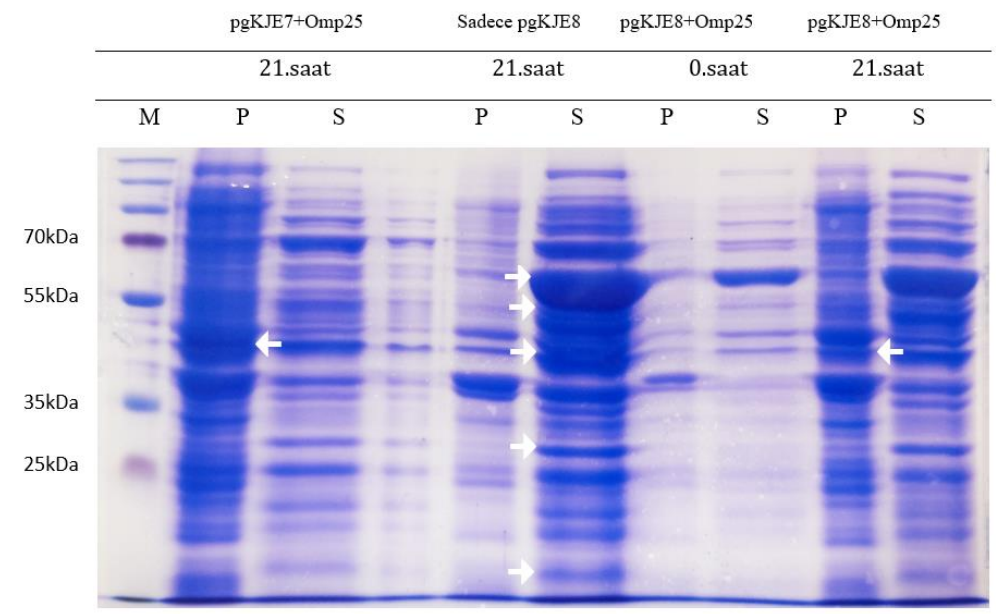
Çözünebilir protein ekspresyonunu artırma stratejilerinden biri olan IPTG konsantrasyonu yarıya düşürülerek ekspresyon yapılmıştır. 0.5 mM IPTG kullanılarak 25 °C'de 21 saat boyunca ekspresyon indüklenmiştir. Sonuçta SDS-PAGE analizleri şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.17' deki gibidir. SDS-PAGE analizlerinden görüldüğü üzere indükleyici konsantrasyonunu yarıya düşürmek anlamlı bir fark yaratmamıştır.



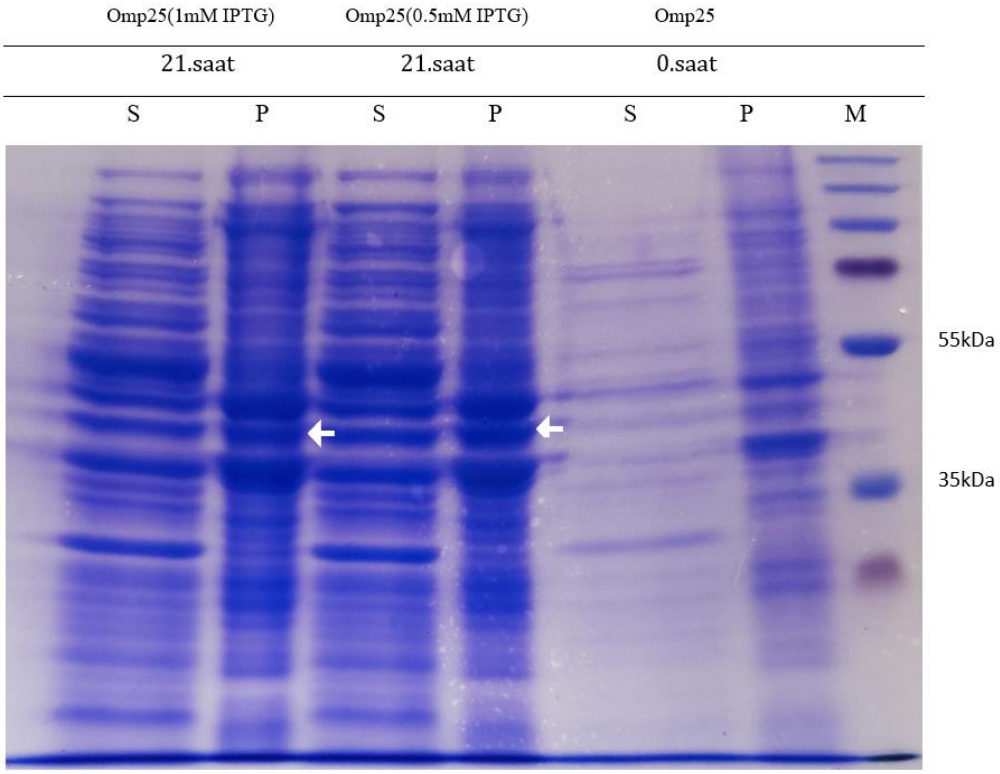
Şekil 4.14 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgtf16 ve rOmp25/pgro7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermekteyken, sol yöndeki ok, eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.15 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgro7 ve rOmp25/pgKJE7 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermekteyken, sol yöndeki ok, eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



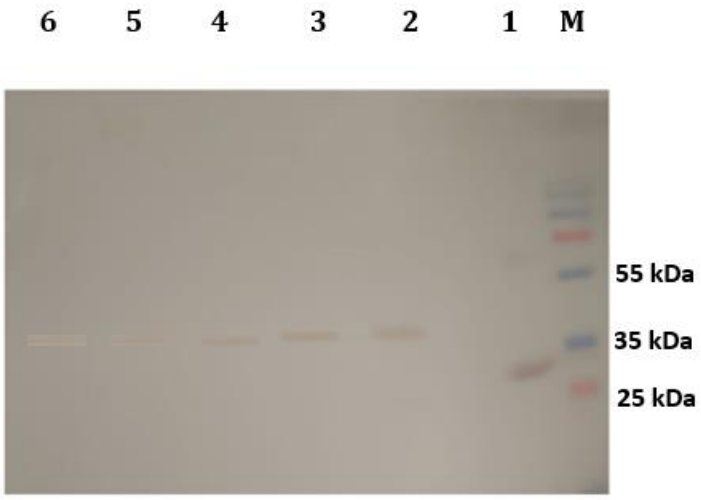
Şekil 4.16 25 °C'de 0,5 mM IPTG ile indüklenen rOmp25/pgKJE7 ve rOmp25/pgKJE8 şaperon plazmitleri ile indüklenen ekspresyon profili. Sağ yöndeki oklar şaperon plazmitlerinin sahip olduğu şaperonları göstermekteyken, sol yöndeki ok, eksprese edilmiş Omp25 proteinini göstermektedir.



Şekil 4.17 Sadece Omp25 şaperon plazmidinin 25°C'de 0.5mM ve 1 Mm IPTG ile 21 saat boyunca indüklenen ekspresyon profili.

4.1.4 Western Blot Analizi

BL21(DE3) *E. coli* konakçısında ekspresyonu gerçekleştirilen 41 kDa boyutundaki Omp25 füzyon proteininin varlığı Western Blot yöntemi kullanılarak His-probe Antibody (H-3): sc-8036 antikorları ile doğrulandı (Şekil 4.18). Ancak 25°C'de ekspresyonu yapılarak pellette varlığı doğrulanan Omp25 proteini, supernatantta SDS-PAGE'de bant görülmesine rağmen western blot analizi ile doğrulanamamıştır. Doğal saflaştırma ile elüsyonlarda SDS-PAGE'de yaklaşık 41 kDa büyüklüğünde bant görülmesi üzerine western blot analizi uygulanmış ancak Omp25 proteininin varlığı yine doğrulanamamıştır. Bu proteinin PgKJE8 plazmidinde bulunan 40kDa boyutundaki DnaJ şaperonu olduğu düşünülmektedir. Pozitif kontrol olarak ticari rekombinant Omp25 (rOmp25) proteini kullanılmıştır. Ticari rOmp25 proteininin N-terminalinde 10xHis tag ve C terminalinde Myc-tag bulunmakla birlikte beklenen protein ağırlığı 27,8 kDa olmasına rağmen protein yükünden kaynaklı jelde 32kDa boyutunda gözlenmektedir.

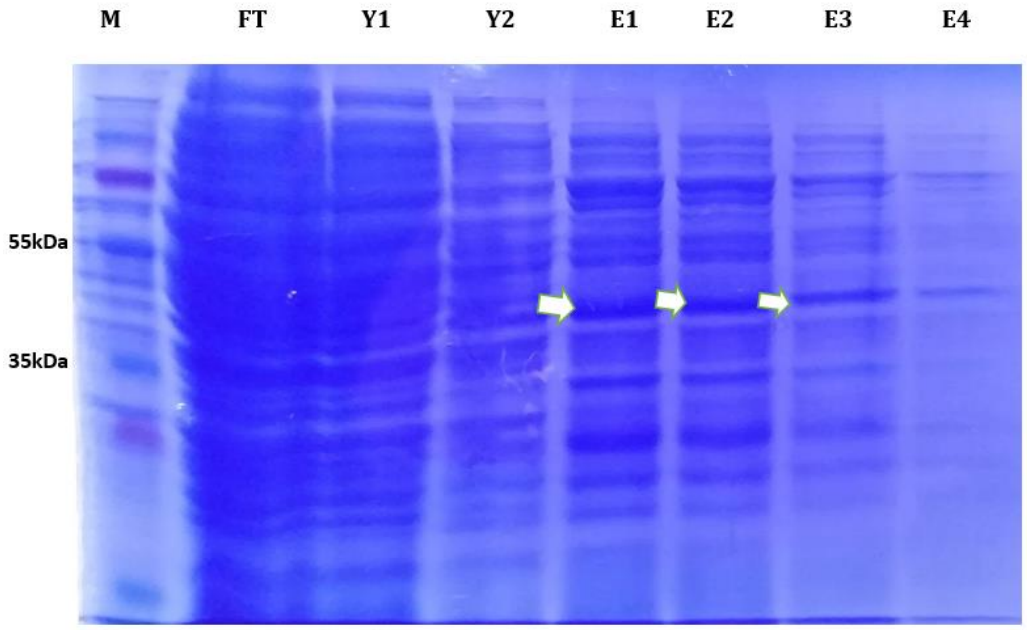


Şekil 4.18 25°C'de moleküler şaperonlar ile indüklenen ekspresyon sonrası western blot analizi (M:Marker, 1:Ticari rOmp25, 2: pgtf16 şaperon plazmidi ile indüklenen Omp25 pellet, 3: pgtf2 şaperon plazmidi ile indüklenen Omp25 pellet, 4: pgro7 şaperon plazmidi ile indüklenen Omp25 pellet, 5: pgKJE7 şaperon plazmidi ile indüklenen Omp25 pellet, pgKJE8 şaperon plazmidi ile indüklenen Omp25 pellet)

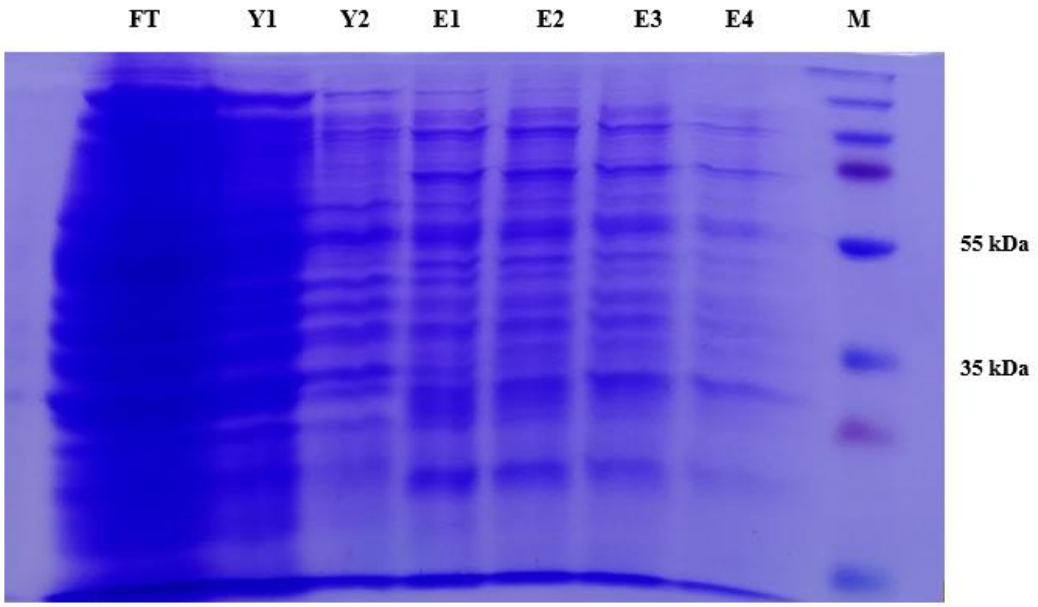
4.1.5 Saflaştırma

Rekombinant Omp25 proteininin C-terminal'ine eklenmiş olan 6 his-tag bölgesi, saflaştırmanın afinite kromatografisi ile yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Kolon dolgu maddesi olarak polihistidin bölgesi ile etkileşimi bilinen nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz kullanıldı. Bütün şaperon plazmitlerini ve Omp25 gen bölgesini içeren hücrenin 25°C'de indüklenen ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal şartlarda saflaştırma yapıldı. Doğal şartlarda gerçekleştirilen saflaştırma işleminde elde edilen yıkama (Y1, Y2) ve elüsyon fraksiyonlarında (E1, E2, E3,E4) beklenen boyutta (41 kDa) protein bandı gözlemlendi (Şekil 4.19). Ancak western blot analizi uygulandığında Omp25 proteininin varlığı doğrulanamadı. Bu proteinin pgKJE8 ve pgKJE7 plazmitlerinde bulunan 40kDa boyutundaki DnaJ şaperonu olduğu düşünülmektedir.

Eş zamanlı sadece Omp25 gen bölgesini içeren plazmide sahip hücrenin ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal saflaştırma yapıldığında yıkama ve elüsyon fraksiyonlarında beklenen boyutta (41 kDa) bant gözlemlenmedi (Şekil 4.20).



Şekil 4.19 Bütün şaperon plazmitlerini ve Omp25 gen bölgesini içeren hücrenin 25°C'de indüklenen ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal şartlarda saflaştırma görüntüsü (FT: Flow through; Y1: Yıkama1; Y2: Yıkama 2; E1: Elüsyon1; E2: Elüsyon 2; E3: Elüsyon 3; E4: Elüsyon 4)



Şekil 4.20 Sadece Omp25 gen bölgesini içeren hücrenin 25°C'de indüklenen ekspresyonu sonucu elde edilen kültürden doğal şartlarda saflaştırma görüntüsü(FT: Flow through; Y1: Yıkama1; Y2: Yıkama 2; E1: Elüsyon1; E2: Elüsyon 2; E3: Elüsyon 3; E4: Elüsyon 4)

4.2. Sonuç ve Öneriler

B.abortus izolatına ait Omp25, *Brucella*'nın dış zarı üzerinde bulunan ve peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlı bir transmembran proteinidir [201]. Omp25 proteininin, bruselloz hastalığı açısından önemli virülans faktörü ve majör antijenden biri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [206,207]. Bruselloz hastalığına karşı aşı aday molekülü olan Omp25 proteini, başarılı bir şekilde eksprese edilmiş ancak sitoplazmada inklüzyon cisimciği oluşturduğu saptanmıştır [216]. Bu tez çalışmasında sitoplazmada inklüzyon cisimciği oluşturduğu saptanan Omp25 proteininin farklı moleküler şaperonlar içeren şaperon plazmitleriyle birlikte ekspresyonu sonucu çözünürlüğünün artırılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik 5 farklı şaperon plazmidi (**pG-KJE8** (dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL), **pGro7** (groES-groEL), **pGKJE7** (dnaK-dnaJ-grpE), **pG-Tf2** (groES-groEL-tig), **pTf16** (tig)) Takara Bio.'dan temin edilmiştir. Omp25 gen bölgesi Atabey tarafından yapılan çalışma ile pET102 vektörüne klonlanmıştır [216]. 5 farklı şaperon plazmitleri ve rekombinant Omp25 gen bölgesini içeren plazmit, 5 ayrı T7 RNA polimerazı içeren *E.coli* BL21(DE3) hücre hattına iki aşamalı transformasyon ile transforme edilmiştir. rOmp25 proteini; 25 kDa ağırlığındaki Omp25 proteini ve ilgili vektörde bulunan 13 kDa thioredoksin proteini, 3 kDa'luk Histag ile birlikte toplam 41 kDa ağırlığındadır. pET102+Omp25 gen bölgesinin transforme edildiği *E.coli* BL21(DE3) suşunda 30°C'de 5 saat sonunda ilgili protein 1 mM IPTG ilavesiyle başarılı bir şekilde eksprese edilmiş ve sonuç SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Daha sonra sırasıyla pET102+Omp25+pG-KJE8, pET102+Omp25+pGro7, pET102+Omp25+pGKJE7, pET102+Omp25+ pG-Tf2, pET102+Omp25+ pTf16 içeren 5 farklı hücre için 30°C'de 5 saat, 1 mM IPTG ile ekspresyon indüklenmiştir. pTf16, pGKJE7 ve pGro7 plazmitlerinin indükleyicisi L-arabinoz miktarı 0,5-4 mg/ml arasında önerilmiştir. Dört farklı konsantrasyonda (0,5-1-2-4 mg/ml) deneme yapılarak ekspresyon profilleri incelendiğinde 1-2 mg/ml L-arabinoz kullamının en ideali olduğu saptanmıştır. pG-Tf2 plazmidinin indükleyicisi tetrasiklin kullanımı, 1-10 ng/ml arasında önerilmiştir. Dört farklı konsantrasyonda (1-2-5-10 ng/ml) deneme sonucunda 5-10 ng/ml tetrasiklin kullamınının en ideali olduğu saptanmıştır. pG-KJE8 plazmidinin indükleyicisi L-arabinoz ve tetrasiklindir. L-arabinoz kullanımında en ideal konsantrasyon olan 2 mg/ml sabit tutularak 4 farklı tetrasiklin konsantrasyonunda (1-2-5-10 ng/ml) deneme yapılmış ve en iyi sonucun 5 ve 10 ng/ml tetrasiklin kullanımında elde edildiği tekrar saptanmıştır.

Moleküler şaperonlar ile yapılan ekspresyon denemeleri sonucu SDS-PAGE analizinde supernatantta Omp25 proteini gözlenmemiştir. Ancak;

- tig, GroEL ve GroES şaperonlarını içeren pG-Tf2 şaperon plazmidi kullanımıyla Omp25 proteinin ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine protein çözünürlüğünü artırma stratejilerinden biri olan sıcaklık düşürülerek, 25 derecede 22 saat boyunca ekspresyon indüklenmiştir. Şaperon plazmidi ve Omp25 gen bölgesini içeren her bir hücrenin ekspresyon profilinde, supernatantta bulunan toplam protein miktarı artış göstermiştir.
- Sırasıyla 70kDa, 40 kDa ve 22 kDa moleküler ağırlıklarda olan Dna, DnaJ ve GrpE şaperonlarını içeren pGKJE7 bulunduran hücrelerin supernatantında, 41 kDa aralığındaki bölgede kalın bir bant gözlemlenmektedir. Ancak bu kalın bandın pGKJE7 plazmidi için içeriğinde bulunan yaklaşık 40 kDa boyutunda olan DnaJ şaperonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.
- Sırasıyla 60kDa ve 10 kDa ağırlığındaki GroEL ve GroES şaperonlarını içeren pGro7 şaperon plazmidinde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; sadece Omp25 plazmidi içeren kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 25°C'de ekspresyon sonucu supernatantta gözlemlenen Omp25 proteini miktarı pGro7 şaperon plazmidi içeren hücreyle neredeyse aynı miktardadır. Bu nedenle supernatantta görülen protein bandının *E.coli*'nin kendi eksprese ettiği bir proteini olduğu düşünülmektedir.
- 56 kDa ağırlığındaki tig şaperonunu içeren pTf16 şaperonunu bulunduran hücrenin 25 °C'deki ekspresyonu sonucu 41 kDa civarında supernatantta kalın bir bant gözlemlenmiş fakat wesstern blot analizi ile bu bant doğrulanamamıştır. Bu nedenle bu bandın ya *E.coli*'nin kendi ürettiği bir protein sayılmakta veya miktarı çok az olduğundan dolayı western blot analizi ile doğrulanamadığı düşünülmektedir.
- Sırasıyla moleküler ağırlıkları 60 kDa,10 kDa,70 kDa, 40 kDa,56 kDa, 22 kDa olan GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, Tf, GrpE şaperonlarını içeren pG-KJE8 şaperon plazmidinde elde edilen bulgular incelendiğinde supernatantta 41 kDa civarında çok kalın bir bant gözlemlenmektedir. Ancak bu bandın plazmidin sahip olduğu 40 kDa boyutunda olan DnaJ moleküler şaperonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Moleküler şaperonlar ile yapılan ekspresyon denemeleri sonucu SDS-PAGE analizinde pellette gözlemlenen Omp25 proteini miktarında 5 farklı şaperon plazmidinin kullanımı büyük ve anlamlı bir fark yaratmamıştır.

Western blot yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmalarda; peletteki 41 kDa boyutundaki Omp25 füzyon proteininin varlığı His-probe antikoru ile doğrulanırken supernatanttaki Omp25 proteini varlığı doğrulanamamıştır. Doğal şartlarda gerçekleştirilen protein saflaştırması sonrasında da elüsyonda mevcut yaklaşık 41 kDa boyutundaki kalın bir bantın western blot

analizi ile rOmp25 olduğu tespit edilememiştir. İlgili kalın protein bandının, yaklaşık 40 kDa boyutunda olan DnaJ şaperonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Protein çözünürlüğünü artırma stratejilerinden bir diğeri olan IPTG miktarı düşürülerek gerçeleştirilen ekspresyon çalışmalarında da; pelletteki protein miktarında düşüş gözlemlenmiş ancak supernatanttaki protein miktarında anlamlı bir fark oluşmamıştır.

Literatürde moleküler şaperonlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde; Antarktika psikrofil bakteri *Psychrobacter sp.*'den klonlanan soğuk aktif lipaz geni Lip-948, Lip-948 taşıyan pColdl plazmidi *E.coli* BL21'e transforme edilip ekspresyon gerçekleştirildiğinde ilgili proteinin total proteinin yaklaşık %39'unu oluşturduğu ve çoğunun inklüzyon cisimcikleri biçiminde bulunduğu SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. Bunun üzerine yapılan çalışmada farklı moleküler şaperonların aynı hücre içinde ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve farklı şaperonların birlikte ekspresyonunun değişen derecelerde çözünür LIP-948 oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. pTf16 ve pGro7 şaperonları ile birlikte ekspresyonu, çözünür LIP-948 miktarını azalttığı halde; sırasıyla pKJE7, pG-Tf2, pG-KJE8 şaperon plazmitleri ile birlikte eksprese edildiğinde çözünür ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. LIP-948, pG-KJE8 şaperon plazmidi ile eksprese edildiğinde hücre içi çözünür proteinlerin % 19.8'e kadar çıktığı ve 108.8 U/mg spesifik bir aktiviteye sahip olarak çözünür formda en verimli şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir [208].

E.coli 'de tek zincirli değişken fragman (scFv) 3A21'nin (anti-sığır ribonükleazı) salgı üretimi üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmada; sitoplazmik şaperonlar olan GroEL/ES, DnaK / DnaJ / GrpE, trigger faktörün 3A21 scFv ile birlikte ekspresyonu, sitoplazmik, periplazmik ve hücre dışı çözünür fraksiyondaki antijen bağlama aktivitesinin oranlarını etkilemiş ancak toplam aktivitede şaperon ile birlikte eksprese olmayan kontrole kıyasla anlamlı bir fark yaratmamıştır. Öte yandan, periplazmik şaperonlar olan, Skp veya FkpA' nın (DsbC hariç) birlikte ekspresyonu, tüm çözünebilir fraksiyonlarda bağlanma aktivitesini büyük ölçüde artırmıştır. Sitoplazmik ve periplazmik şaperonların kombinasyonları ise verimliliği düşürmüştür. Skp veya FkpA'yı birlikte eksprese eden hücrelerin kültürlerinde, hücre dışı ortamda ELISA ve Western blot ile önemli miktarda 3A21 scFv tespit edilmiş ve hücre dışı 3A21 scFv üretim seviyesi 40 mg/L civarında hesaplanmıştır. Skp ile birlikte eksprese edilen 3A21 scFv'nin bağlanma aktivitesi, FkpA ile olandan biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, periplazmik şaperon Skp ve FkpA'nın birlikte ekspresyonunun, *E. coli* kullanılan bir kültür ortamında scFv'nin salgılama üretimi için son derece faydalı olduğunu göstermiş, ancak sitoplazmik şaperonlar ve çoklu şaperon kombinasyonlarının etkili olmayabileceği de belirtilmiştir [209].

İnsan kaynaklı fibroblast büyüme faktörü (HbFGF) ekspresyon plazmidi ile birlikte *E. coli*'ye transformasyonu sonrası üretilen toplam hbFGF miktarı, SDS-PAGE ve ELISA ile analiz edildiği çalışmada; TF ve DnaK / DnaJ / GrpE'nin hbFGF'yi destabilize ettiği, DnaK / DnaJ / GrpE / GroEL / GroES ve GroEL / GroES kombinasyonlarının stabilize ettiği, GroEL / GroES / TF kombinasyonunun hbFGF üretimini olumsuz yönde etkilediği ortaya çıkarılmıştır [210].

P*seudomonas fluorescens* DSM 50106'da tanımlanan Baeyer-Villiger monooksigenaz'ı (BVMO) kodlayan gen, *E.coli* BL21 (DE3) ve JM109'da klonlanarak fonksiyonel olarak eksprese edildiğinde SDS-PAGE analizi sonuçları yaklaşık 56 kDa boyutlu proteininin inklüzyon cisimcikleri oluşturduğunu göstermiştir. Rekombinant çözünür BVMO enziminin, *E. coli*'deki üretiminin artırılması DnaK / DnaJ / GrpE moleküler şaperonların birlikte eksprese edilmesiyle sağlanmıştır. BL21 (DE3) için DnaK / DnaJ / GrpE'nin ekspresyonu, çözünür fraksiyondaki BVMO miktarını en az on kat (6 saatlik ekspresyondan sonra) (çözünebilir fraksiyonda ve inklüzyon cisimciklerinde yaklaşık olarak eşit miktarda rekombinant enzim ile) artırmıştır. JM109 için ise; DnaK/DnaJ/GrpE ile birlikte GroES/GroEL ve GroES/GroEL ile karşılaştırıldığında, çözünür miktarlarda çözülebilir enzim miktarının artmasına neden olmuştur. Aynı zamanda bu sistem için trigger faktörün etkili olmadığı gösterilmiştir [211].

Candida antarktika (CalB) mayasındaki lipaz B geninin *E.coli* Origami B suşunda fonksiyonel ekspresyonunun değerlendirildiği çalışmada; thioredoksin-CalB füzyon proteininin ekspresyonunun 17 U mg^{-1} verimle gerçekleştiği, lac promotörünün kontrolü altındaki CalB ekspresyonunun 2 U mg^{-1} verimle, cspA promotörünün kontrolü altında (doğal formu) CalB ekspresyonunun 11 U mg-1 verimle gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Farklı şaperonların ilgili gen ile birlikte eksprese edilmesi, aktif protein oluşumunu 61 U mg-1 verimle sağlamıştır. CalB, en verimli şekilde pGro7 plazmidinin (61 U mg^{-1}) ekspresyonu altında eksprese edilmiştir. Fonksiyonel enzimin ekspresyonu ayrıca, pG-Tf2 (33 U mg^{-1}), pTf16 (24 U mg-1) ve daha küçük ölçekte pG-KJE8 plazmitlerinin (18 U mg-1) birlikte eksprese edilmesiyle arttırılmıştır. PKJE7 plazmidi ile birlikte ekspresyon anlamlı bir etki göstermemiştir. CalB ekspresyonunun densitometrik olarak aktivite ile tayin edildiği çalışmada en yüksek çözünürlükteki CalB protein miktarı pGro7 ile, ardından pG-Tf2 ve pTf16 plazmitleri ile sağlanmıştır [212].

CRM197 proteini, birçok konjuge aşıda kullanılan difteri toksin mutantıdır. PET32a vektörü tarafından verilen tüm etiketleri içeren bir füzyon CRM197 (fCRM197), düşük sıcaklıkta birkaç şaperon proteinini birlikte eksprese eden *E.coli*' de çözünür bir protein olarak

üretilmiştir. Trigger faktör (Tf) ile fCRM197 ekspresyonu 25°C' de 12 saat boyunca indüklendiğinde çözünür fCRM197' nin (150.69±8.95 ug/mL) oluşumunu diğer şaperonlardan daha büyük bir oranda artış göstermiştir. Bununla birlikte, uzun süreli külvitasyon, fCRM197 birikiminin kademeli olarak düşmesine neden olmuştur. Buna karşılık, 15 °C'de, TF'li veya TF'siz, fCRM197, 48 saatte en yüksek seviyede birikmiştir (sırasıyla 153.70±13.14 μg/mL ve 150.07±8.13 μg/mL). Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile 15 °C' de yetiştirilen kültürlerde inkluzyon cisimciklerinin yanı sıra hücre lizizi oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. fCRM197, 25 °C'de indüklendiğinde, TF içermeyen kültürlere kıyasla, TF eksprese eden hücrelerin canlılığı, 15 ° C'de kültürlendiğinde artış göstermiştir [213].

Baeyer-Villiger monooksigenazını kodlayan ve *Pseudomonas putida* KT2440' da tanımlanan genin (BMVO) klonlanması ve fonksiyonel olarak *E.coli*' de eksprese edilmesi sonucu yüksek çözünür protein verimi, moleküler şaperonların birlikte ekspresyonu ile sağlanabilmiştir. BVMO, 30°C 'de, Takara şaperon plazmit seti tarafından sağlanan farklı şaperon kombinasyonları ile birlikte eksprese edilmiştir. *E.coli* JM109 suşunda pG-Tf2 veya pGro7 şaperon plazmitleriyle ilgili genin birlikte ekspresyonu sonucu belirgin şekilde daha yüksek çözünür BVMO miktarlarına yol açmışken sadece pKJE7 tek başına veya pTf16 ile kombinasyon halinde BVMO eksoresyonu üzerinde sadece hafif pozitif etki gösterdiği görülmüştür [214].

CD137 ligandı (CD137L), T hücrelerinin aktivasyonu için pozitif ortak uyarıcı sinyaller sağlamak üzere CD137' yi bağlayan tümör nekroz faktörü üst ailesinin bir üyesidir. CD137/CD137L ile birlikte stimülasyon kanser tedavisi için umut vaat eden yaklaşımlardan biri haline gelmiştir. Önceki raporlar, *E.coli'*de eksprese edilen CD137L' nin inklüzyon cisimcikleri oluşturması veya düşük verim ile sonuçlandığını göstermiştir. Rekombinant CD137L ve Takara firmasının şaperon plazmit setinden beş farklı tipte şaperon ekibinin birlikte ekspresyonu için optimal kültür koşulları ve rekombinant insan CD137L proteininin çözünür ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve analiz edilmiştir. *E. coli* sitoplazmasında CD137L'nin zayıf ekspresyonu, GroES-GroEL-Tf şaperonlarının birlikte ekspresyonu ile önemli ölçüde geliştirilmiştir [215].

Tüm bu çalışmalar esas alınarak sitoplazmada inklüzyon cisimciği oluşturduğu saptanan Omp25 proteininin farklı moleküler şaperonlar içeren vektörler kullanılarak gerçekleştirilen ko-ekspresyonu sonucu çözünürlüğünün artırılmasının amaçlandığı bu çalışmada; **pG-KJE8** (dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL), **pGro7** (groES-groEL), **pGKJE7** (dnaK-dnaJ-grpE), **pG-Tf2** (groES-groEL-tig), **pTf16** (tig) plazmitlerinin Omp25 geni ihtiva eden pET102 vektörü ile birlikte ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak bu farklı beş plazmit ile gerçekleştirilen

tüm çalışmalarda çözünür rOmp25 protein miktarı artırılamamıştır. Beraberinde çözünürlüğün artırılmasına yönelik olarak sıcaklığın ve indükleyici konsantrasyonunun düşürülmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak çözünür rOmp25 protein miktarı yine artırılamamıştır.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar neticesinde ileriki çalışmalarda, çözünürlüğü artırma stratejilerinden biri olan sinyal peptitleri kullanılarak ilgili proteinin stoplazmik zar boyunca istenen periplazmaya veya direkt hücre dışına hedeflenmesi yönteminin kullanılabilirliği değerlendirilebilir. Membranlar üzerindeki sinyal tanıma parçacığına yanıt vermede kritik bir rol oynayan 2-10 amino asitli pozitif yüklü N-alanı, membran translokasyonuna aracılık eden 10 ila 20 amino asitli hidrofobik H alanı ve Ala-X-Ala sekanslı bir kesim bölgesi içeren C alanından oluşmakta olan ve OmpA, PelB, DsbA, MalE, TorA, OsmY gibi türevleri olan sinyal peptitlerinin etkinliği proteine özgüdür ve bu yöntem de deneme yanılma yöntemine dayanmaktadır. İstenen bir protein için optimal sinyal peptidini bulmanın en umut verici yolu, büyük sinyal peptit kütüphaneleri kullanılarak sinyal peptit varyasyonu veya alternatif olarak bir bölgeye yönelik veya rastgele mutajenez stratejileri kullanılarak ilgili sinyal peptidinin optimizasyonudur. Öte yandan bazı çalışmalarda, periplazmik şaperonlar ile ilgili proteinin birlikte ekspresyonunun çözünür protein miktarını artırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte Skp, FkpA, DsbC gibi periplazmik şaperonlar ile ilgili proteinin ekspresyonu da diğer değerlendirilebilcek yöntemler arasında yer almaktadır. Ancak bu yöntem de deneme yanılma yöntemine dayanmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms", *Biotechnology Advances,* vol. 27, no. 3, pp. 297-306, May-Jun 2009.

[2] F. M. Wurm, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," *Nature Biotechnology,* vol. 22, no. 11, p. 1393, 2004.

[3] F. Baneyx, "Recombinant protein expression in Escherichia coli," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 10, no. 5, pp. 411-421, 1999.

[4] G. Hannig and S. C. Makrides, "Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli," *Trends in Biotechnology,* vol. 16, no. 2, pp. 54-60, 1998.

[5] B. Fischer, I. Sumner, and P. Goodenough, "Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies," *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 41, no. 1, pp. 3-13, 1993.

[6] G. Georgiou and P. Valax, "Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 7, no. 2, pp. 190-197, 1996.

[7] J. Martin and F. U. Hartl, "Chaperone-assisted protein folding," *Current Opinion in Structural Biology,* vol. 7, no. 1, pp. 41-52, 1997.

[8] T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii, "Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 270, no. 43, pp. 25328-25331, 1995.

[9] M. Carrio and A. Villaverde, "Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies," *Journal of Biotechnology,* vol. 96, no. 1, pp. 3-12, 2002.

[10] E. Schwarz, H. Lilie, and R. Rudolph, "The effect of molecular chaperones on *in vivo* and *in vitro* folding processes," *Biological Chemistry Hoppe Seyler,* vol. 377, pp. 411-416, 1996.

[11] M. Ehrnsperger, S. Gräber, M. Gaestel, and J. Buchner, "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation," *The Embo Journal,* vol. 16, no. 2, pp. 221-229, 1997.

[12] L. Veinger, S. Diamant, J. Buchner, and P. Goloubinoff, "The small heat-shock protein IbpB from Escherichia coli stabilizes stress-denatured proteins for subsequent

refolding by a multichaperone network," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 273, no. 18, pp. 11032-11037, 1998.

[13] A. P. Ben-Zvi and P. Goloubinoff, "Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones," *Journal of Structural Biology,* vol. 135, no. 2, pp. 84-93, 2001.

[14] J. G. Thomas and F. Baneyx, "Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing heat-shock proteins," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 271, no. 19, pp. 11141-11147, 1996.

[15] G. H. Lorimer, "A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*," *The Faseb Journal,* vol. 10, no. 1, pp. 5-9, 1996.

[16] J. G. Wall and A. Plückthun, "Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 6, no. 5, pp. 507-516, 1995.

[17] R. J. Ellis and F. U. Hartl, "Principles of protein folding in the cellular environment," *Current Opinion in Structural Biology,* vol. 9, no. 1, pp. 102-110, 1999.

[18] T. Rauch *et al.*, "Dissecting functional similarities of ribosome-associated chaperones from Saccharomyces cerevisiae and *Escherichia coli*," *Molecular Microbiology,* vol. 57, no. 2, pp. 357-365, 2005.

[19] E. Crooke, B. Guthrie, S. Lecker, R. Lill, and W. Wickner, "ProOmpA is stabilized for membrane translocation by either purified *E.coli* trigger factor or canine signal recognition particle," *Cell,* vol. 54, no. 7, pp. 1003-1011, 1988.

[20] E. Craig and P. Yan, "Molecular Chaperones and Folding-Catalysts, Ed: Bukau, B," ed: Harwood, 1999.

[21] X. Zhu *et al.*, "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK," *Science,* vol. 272, no. 5268, pp. 1606-1614, 1996.

[22] H. Saibil, Z. Dong, S. Wood, and A. A. DER MAUER, "Binding of chaperonins," *Nature,* vol. 353, no. 6339, p. 25, 1991.

[23] G. Pappas, N. Akritidis, M. Bosilkovski, and E. Tsianos, "Brucellosis," *The New England journal of medicine,* vol. 352, no. 22, pp. 2325-36, Jun 2 2005.

[24] V. Gupta, J. Vohra, R. Kumari, K. Gururaj, and V. Vihan, "Identification of Brucella isolated from goats using Pst I site polymorphism at Omp2 gene loci," *Indian Journal of Animal Sciences,* vol. 82, no. 3, p. 240, 2012.

[25] S. JR., "Escherichia coli recombinant DNA technology. ," *American Society of Microbiology Press*vol. 2nd edition, pp. 1693–711., 1996.

[26] F. R. Schmidt, "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 65, no. 4, pp. 363-72, Sep 2004.

[27] K. Terpe, "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems," *Applied Microbiology and Biotechnology*, journal article vol. 72, no. 2, p. 211, June 22 2006.

[28] Y. Ni and R. Chen, "Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*," *Biotechnology Letters*, vol. 31, no. 11, p. 1661, 2009.

[29] D. Petsch and F. B. Anspach, "Endotoxin removal from protein solutions," *Journal of Biotechnology*, vol. 76, no. 2-3, pp. 97-119, 2000.

[30] N. Jenkins and E. M. Curling, "Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 16, no. 5, pp. 354-364, 1994.

[31] J. R. Swartz, "Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, no. 2, pp. 195-201, 2001.

[32] J. Choi and S. Lee, "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, no. 5, pp. 625-635, 2004.

[33] F. Mergulhao, D. K. Summers, and G. A. Monteiro, "Recombinant protein secretion in Escherichia coli," *Biotechnology Advances*, vol. 23, no. 3, pp. 177-202, 2005.

[34] J. Shiloach and R. Fass, "Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development," *Biotechnology Advances*, vol. 23, no. 5, pp. 345-357, 2005.

[35] L. M. P. Maldonado *et al.*, "Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta," *Biomolecular Engineering*, vol. 24, no. 2, pp. 217-222, 2007.

[36] C. P. Chou, "Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 76, no. 3, pp. 521-532, 2007.

[37] M. S. Wong, S. Wu, T. B. Causey, G. N. Bennett, and K.-Y. San, "Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production," *Metabolic engineering*, vol. 10, no. 2, pp. 97-108, 2008.

[38] B. Gronenborn, "Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promotor of *Escherichia coli*," *Molecular and General Genetics Mgg*, vol. 148, no. 3, pp. 243-250, 1976.

[39] C. M. Elvin *et al.*, "Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*," *Gene*, vol. 87, no. 1, pp. 123-126, 1990.

[40] C. A. Love, P. E. Lilley, and N. E. Dixon, "Stable high-copy-number bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*," *Gene*, vol. 176, no. 1-2, pp. 49-53, Oct 17 1996.

[41] H. B. Lowman and M. Bina, "Temperature-mediated regulation and downstream inducible selection for controlling gene expression from the bacteriophage lambda pL promoter,", *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 133-6, Nov 30 1990.

[42] V. Menart, S. Jevsevar, M. Vilar, A. Trobis, and A. Pavko, "Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR,PL promoters from phage lambda,", *Biotechnol Bioeng*, vol. 83, no. 2, pp. 181-90, Jul 20 2003.

[43] A. Skerra, "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli", *Gene*, vol. 151, no. 1-2, pp. 131-5, Dec 30 1994.

[44] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith, "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter", *Journal of bacteriology*, vol. 177, no. 14, pp. 4121-30, Jul 1995.

[45] M. P. Mayer, "A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript", *Gene*, vol. 163, no. 1, pp. 41-6, Sep 22 1995.

[46] A. Haldimann, L. L. Daniels, and B. L. Wanner, "Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon,", *Journal of Bacteriology*, vol. 180, no. 5, pp. 1277-86, Mar 1998.

[47] M. P. DeLisa, J. Li, G. Rao, W. A. Weigand, and W. E. Bentley, "Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor", *Biotechnol Bioeng*, vol. 65, no. 1, pp. 54-64, Oct 5 1999.

[48] B. Wilms *et al.*, "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter," ,*Biotechnol Bioeng*, vol. 73, no. 2, pp. 95-103, Apr 20 2001.

[49] F. W. Studier and B. A. Moffatt, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes", *Journal of Molecular Biology,* vol. 189, no. 1, pp. 113-30, May 5 1986.

[50] T. H. Grossman, E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy, and M. S. Osburne, "Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability", *Gene,* vol. 209, no. 1-2, pp. 95-103, Mar 16 1998.

[51] J. W. Dubendorff and F. W. Studier, "Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor", *Journal of Molecular Biology,* vol. 219, no. 1, pp. 45-59, May 5 1991.

[52] S. H. Pan and B. A. Malcolm, "Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3)", *BioTechniques,* vol. 29, no. 6, pp. 1234-8, Dec 2000.

[53] F. W. Studier, "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system", *Journal of Molecular Biology,* vol. 219, no. 1, pp. 37-44, May 5 1991.

[54] B. A. Moffatt and F. W. Studier, "T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase", *Cell,* vol. 49, no. 2, pp. 221-7, Apr 24 1987.

[55] D. Stueber and H. Bujard, "Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes," *The Embo Journal,* vol. 1, no. 11, pp. 1399-1404, 1982.

[56] S. C. Makrides, "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli",*Microbiological Reviews,* vol. 60, no. 3, pp. 512-38, Sep 1996.

[57] J. M. M. Michael T.Madigan, "Brock Biology of Microorganisms," vol. eleventh edition, 2010.

[58] B. Andrews *et al.*, "A tightly regulated high level expression vector that utilizes a thermosensitive lac repressor: production of the human T cell receptor Vβ5. 3 in *Escherichia coli*," *Gene,* vol. 182, no. 1-2, pp. 101-109, 1996.

[59] E. Evguenieva-Hackenberg and U. Blaesi, "Attack from both ends: mRNA degradation in the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus," ed: Portland Press Ltd., 2013.

[60] T. Maeda, Y. Tanaka, N. Takemoto, N. Hamamoto, and M. Inui, "RNase III mediated cleavage of the coding region of mraZ mRNA is required for efficient cell division in Corynebacterium glutamicum," *Molecular Microbiology,* vol. 99, no. 6, pp. 1149-1166, 2016.

[61] N. Takemoto, Y. Tanaka, and M. Inui, "Rho and RNase play a central role in FMN riboswitch regulation in Corynebacterium glutamicum," *Nucleic Acids Research,* vol. 43, no. 1, pp. 520-529, 2014.

[62] Q. Zhang, J. R. McCorkle, M. Novak, M. Yang, and D. M. Kaetzel, "Metastasis suppressor function of NM23-H1 requires its 3′-5′ exonuclease activity," *International Journal of Cancer,* vol. 128, no. 1, pp. 40-50, 2011.

[63] M. B. Stead *et al.,* "Analysis of *Escherichia coli* RNase E and RNase III activity *in vivo* using tiling microarrays," *Nucleic Acids Research,* vol. 39, no. 8, pp. 3188-3203, 2010.

[64] T. A. Hughes, "Regulation of gene expression by alternative untranslated regions," *Trends in Genetics,* vol. 22, no. 3, pp. 119-122, 2006.

[65] W. Liang, K. E. Rudd, and M. P. Deutscher, "A role for REP sequences in regulating translation," *Molecular Cell,* vol. 58, no. 3, pp. 431-439, 2015.

[66] H. Dong, L. Nilsson, and C. G. Kurland, "Co-variation of trna abundance and codon usage inescherichia coliat different growth rates," *Journal of Molecular Biology,* vol. 260, no. 5, pp. 649-663, 1996.

[67] J. F. Kane, "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 6, no. 5, pp. 494-500, 1995.

[68] E. Goldman, A. H. Rosenberg, G. Zubay, and W. F. Studier, "Consecutive Low-usage Leucine Codons Block Translation Only When Near the 5′ End of a Message inEscherichia coli," *Journal of Molecular Biology,* vol. 245, no. 5, pp. 467-473, 1995.

[69] C. Kurland and J. Gallant, "Errors of heterologous protein expression," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 7, no. 5, pp. 489-493, 1996.

[70] G. Georgiou and L. Segatori, "Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 16, no. 5, pp. 538-545, 2005.

[71] J. C. Joly and J. R. Swartz, "Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase," *Biochemistry,* vol. 33, no. 14, pp. 4231-4236, 1994.

[72] A. Shokri, A. Sandén, and G. Larsson, "Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*," *Applied Microbiology and Biotechnology,* vol. 60, no. 6, pp. 654-664, 2003.

[73] S. C. Makrides, "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.,* vol. 60, no. 3, pp. 512-538, 1996.

[74] M. Sandkvist and M. Bagdasarian, "Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 7, no. 5, pp. 505-511, 1996.

[75] A. P. Pugsley, O. Francetic, O. M. Possot, N. Sauvonnet, and K. R. Hardie, "Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria–a review," *Gene,* vol. 192, no. 1, pp. 13-19, 1997.

[76] J. A. Stader and T. J. Silhavy, "Engineering *Escherchia coli* to secrete heterologous gene products," in *Methods in enzymology*, Elsevier, 1990, pp. 166-187.

[77] J. W. Tobias, T. E. Shrader, G. Rocap, and A. Varshavsky, "The N-end rule in bacteria," *Science,* vol. 254, no. 5036, pp. 1374-1377, 1991.

[78] R. T. Baker, "Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 7, no. 5, pp. 541-546, 1996.

[79] S. Rogers, R. Wells, and M. Rechsteiner, "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis," *Science,* vol. 234, no. 4774, pp. 364-368, 1986.

[80] M. Murby, M. Uhlén, and S. Ståhl, "Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*," *Protein Expression and Purification,* vol. 7, no. 2, pp. 129-136, 1996.

[81] E. R. LaVallie and J. M. McCoy, "Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 6, no. 5, pp. 501-506, 1995.

[82] R. B. r. W. F. van Gunsteren, C. Peter, X. Daura, Angew, *Chem. Int. Ed.* , vol. 40, p. 351 ± 355, 2001.

[83] C. B. Anfinsen, "Principles that govern the folding of protein chains," *Science,* vol. 181, no. 4096, pp. 223-230, 1973.

[84] R. Jaenicke, "Folding and association of proteins," *Progress in Biophysics and Molecular Biology,* vol. 49, no. 2-3, pp. 117-237, 1987.

[85] T. E. Creighton, "Protein folding," *Biochemical journal,* vol. 270, no. 1, p. 1, 1990.

[86] R. Jaenicke and R. Seckler, "Protein misassembly *in vitro*," in *Advances in Protein Chemistry*, vol. 50: Elsevier, 1997, pp. 1-C10.

[87] T. Kiefhaber, R. Rudolph, H.-H. Kohler, and J. Buchner, "Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation," *Biotechnology,* vol. 9, no. 9, p. 825, 1991.

[88] J. Ellis, "Proteins as molecular chaperones," *Nature,* vol. 328, pp. 378-379, 1987.

[89] D. L. Wilkinson and R. G. Harrison, "Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli," *Biotechnology*, vol. 9, no. 5, p. 443, 1991.

[90] P. A. Cole, "Chaperone-assisted protein expression," *Structure*, vol. 4, no. 3, pp. 239-242, 1996.

[91] W. A. Prinz, F. Åslund, A. Holmgren, and J. Beckwith, "The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coliCytoplasm," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 25, pp. 15661-15667, 1997.

[92] E. R. Lavallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, and J. M. McCoy, "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm," *Biotechnology*, vol. 11, no. 2, p. 187, 1993.

[93] M. Carrio, J. Corchero, and A. Villaverde, "Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria," *Fems Microbiology Letters*, vol. 169, no. 1, pp. 9-15, 1998.

[94] G. A. Bowden, A. M. Paredes, and G. Georgiou, "Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*," *Biotechnology*, vol. 9, no. 8, p. 725, 1991.

[95] M. M. Carrió, R. Cubarsi, and A. Villaverde, "Fine architecture of bacterial inclusion bodies," *Febs Letters*, vol. 471, no. 1, pp. 7-11, 2000.

[96] G. Taylor, M. Hoare, D. Gray, and F. Marston, "Size and density of protein inclusion bodies," *Biotechnology*, vol. 4, no. 6, p. 553, 1986.

[97] D. E. Meyer and A. Chilkoti, "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides," *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 11, p. 1112, 1999.

[98] L. Vallejo and U. Rinas, "Strategies for refolding inclusión body proteins," *Protein Production in Bacterial Cell Factories. Trivandrum, India: Research Singpost*, pp. 59-71, 2002.

[99] A. L. Fink, "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid," *Folding and Design*, vol. 3, no. 1, pp. R9-R23, 1998.

[100] R. R. Burgess, " Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl," in *Methods in enzymology*, Elsevier, 1996, pp. 145-149.

[101] I. Kurucz, J. A. Titus, C. R. Jost, and D. M. Segal, "Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies," *Molecular Immunology*, vol. 32, no. 17-18, pp. 1443-1452, 1995.

[102] J. Stöckel, K. Döring, J. Malotka, F. Jähnig, and K. Dornmair, "Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimeric class II major histocompatibility complex (MHC) molecules," *European Journal of Biochemistry,* vol. 248, no. 3, pp. 684-691, 1997.

[103] J. Maachupalli-Reddy, B. D. Kelley, and E. D. B. Clark, "Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme," *Biotechnology Progress,* vol. 13, no. 2, pp. 144-150, 1997.

[104] E. D. B. Clark, "Refolding of recombinant proteins," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 9, no. 2, pp. 157-163, 1998.

[105] S. Misawa and I. Kumagai, "Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies," *Peptide Science,* vol. 51, no. 4, pp. 297-307, 1999.

[106] K. H. Hamaker, J. Liu, R. J. Seely, C. M. Ladisch, and M. R. Ladisch, "Chromatography for rapid buffer exchange and refolding of secretory leukocyte protease inhibitor," *Biotechnology Progress,* vol. 12, no. 2, pp. 184-189, 1996.

[107] T. E. Creighton, *Protein structure: a practical approach* (no. 174). Oxford University Press, 1997.

[108] G. Stempfer and R. Rudolph, "Improved Refolding of a Matrix-Bound Fusion Protein," *Annals of the New York Academy of Sciences,* vol. 782, no. 1, pp. 506-512, 1996.

[109] D. Foguel, C. R. Robinson, P. C. de Sousa Jr, J. L. Silva, and A. S. Robinson, "Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates," *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 63, no. 5, pp. 552-558, 1999.

[110] P. C. Babbitt, B. L. West, D. D. Buechter, I. D. Kuntz, and G. L. Kenyon, "Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in Escherichia coli leads to improved recovery of active enzyme," *Biotechnology,* vol. 8, no. 10, p. 945, 1990.

[111] G. Georgiou and P. Valax, "Isolating inclusion bodies from bacteria," in *Methods in Enzymology*, vol. 309: Elsevier, 1999, pp. 48-58.

[112] A. P. Middelberg, "Preparative protein refolding," *Trends in Biotechnology,* vol. 20, no. 10, pp. 437-443, 2002.

[113] J. M. Yon, "The specificity of protein aggregation," *Nature Biotechnology,* vol. 14, no. 10, p. 1231, 1996.

[114] M. E. Goldberg, R. Rudolph, and R. Jaenicke, "A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme," *Biochemistry,* vol. 30, no. 11, pp. 2790-2797, 1991.

[115] M. A. Speed, J. King, and D. I. Wang, "Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation," *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 54, no. 4, pp. 333-343, 1997.

[116] G. Dorin, P. McAlary, and K. Wong, "Bacterial production of hydrophobic polypeptides," *Wo Patent,* vol. 96, p. 39523, 1996.

[117] D. Sachdev and J. M. Chirgwin, "Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin," *Protein Expression and Purification,* vol. 12, no. 1, pp. 122-132, 1998.

[118] Y. Nominé, T. Ristriani, C. Laurent, J.-F. Lefèvre, É. Weiss, and G. Travé, "Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein," *Protein Expression and Purification,* vol. 23, no. 1, pp. 22-32, 2001.

[119] D. Dougan, A. Mogk, and B. Bukau, "Protein folding and degradation in bacteria:¶ To degrade or not to degrade? That is the question," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* vol. 59, no. 10, pp. 1607-1616, 2002.

[120] R. Cubarsí, M. M. Carrió, and A. Villaverde, "In situ proteolytic digestion of inclusion body polypeptides occurs as a cascade process," *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 282, no. 2, pp. 436-441, 2001.

[121] J. Corchero, R. Cubarsí, and A. Villaverde, "Limited*in vivo*Proteolysis of Aggregated Proteins," *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 237, no. 2, pp. 325-330, 1997.

[122] X. Carbonell and A. Villaverde, "Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion," *Biotechnology Letters,* vol. 24, no. 23, pp. 1939-1944, 2002.

[123] J. Corchero, E. Viaplana, A. Benito, and A. Villaverde, "The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of β-galactosidase fusion proteins in *E. coli*," *Journal of Biotechnology,* vol. 48, no. 3, pp. 191-200, 1996.

[124] R. Rosen, D. Biran, E. Gur, D. Becher, M. Hecker, and E. Z. Ron, "Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases," *Fems Microbiology Letters,* vol. 207, no. 1, pp. 9-12, 2002.

[125] H. J. Rideout and L. Stefanis, "Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require transcription and ubiquitination," *Molecular and Cellular Neuroscience,* vol. 21, no. 2, pp. 223-238, 2002.

[126] K. S. P. McNaught, L. M. Björklund, R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner, and C. W. Olanow, "Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats," *Neuroreport,* vol. 13, no. 11, pp. 1437-1441, 2002.

[127] E. Junn, S. S. Lee, U. T. Suhr, and M. M. Mouradian, "Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 277, no. 49, pp. 47870-47877, 2002.

[128] S. Mitsui *et al.*, "Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease," *Annals of the New York Academy of Sciences,* vol. 977, no. 1, pp. 216-223, 2002.

[129] H. Schröder, T. Langer, F. Hartl, and B. Bukau, "DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage," *The Embo Journal,* vol. 12, no. 11, pp. 4137-4144, 1993.

[130] S. Walter, "Structure and function of the GroE chaperone," *Cellular and Molecular Life Sciences Cmls,* vol. 59, no. 10, pp. 1589-1597, 2002.

[131] F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl, "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein," *Science,* vol. 295, no. 5561, pp. 1852-1858, 2002.

[132] F. Hoffmann and U. Rinas, "Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*," in *Physiological stress responses in bioprocesses*: Springer, 2004, pp. 143-161.

[133] M.-J. Gething and J. Sambrook, "Protein folding in the cell," *Nature,* vol. 355, no. 6355, p. 33, 1992.

[134] M. M. Carrió and A. Villaverde, "Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible," *Febs Letters,* vol. 489, no. 1, pp. 29-33, 2001.

[135] B. Bukau, *Molecular chaperones and folding catalysts*. Hardwood Academic Publishers, 1999.

[136] L. P. W. W. Colon, F. Sherman, H. Roder, *Biochemistry* vol. 36, p. 12535 ± 12 541, 1997.

[137] R. D. Wegrzyn and E. Deuerling, "Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* vol. 62, no. 23, pp. 2727-2738, 2005.

[138] F. Schlünzen *et al.*, "The binding mode of the trigger factor on the ribosome: implications for protein folding and SRP interaction," *Structure,* vol. 13, no. 11, pp. 1685-1694, 2005.

[139] R. S. Ullers, E. N. Houben, J. Brunner, B. Oudega, N. Harms, and J. Luirink, "Sequence-specific interactions of nascent *Escherichia coli* polypeptides with trigger factor and signal recognition particle," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 281, no. 20, pp. 13999-14005, 2006.

[140] O. Kristensen and M. Gajhede, "Chaperone binding at the ribosomal exit tunnel," *Structure,* vol. 11, no. 12, pp. 1547-1556, 2003.

[141] T. Henrichs *et al.*, "Target-directed proteolysis at the ribosome," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 102, no. 12, pp. 4246-4251, 2005.

[142] C. Scholz, G. Stoller, T. Zarnt, G. Fischer, and F. X. Schmid, "Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding," *The Embo Journal,* vol. 16, no. 1, pp. 54-58, 1997.

[143] L. Ferbitz, T. Maier, H. Patzelt, B. Bukau, E. Deuerling, and N. Ban, "Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins," *Nature,* vol. 431, no. 7008, p. 590, 2004.

[144] G. Kramer *et al.*, "Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 279, no. 14, pp. 14165-14170, 2004.

[145] F. Merz, A. Hoffmann, A. Rutkowska, B. Zachmann-Brand, B. Bukau, and E. Deuerling, "The C-terminal domain of *Escherichia coli* trigger factor represents the central module of its chaperone activity," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 281, no. 42, pp. 31963-31971, 2006.

[146] E. Bitto and D. B. McKay, "Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins," *Structure,* vol. 10, no. 11, pp. 1489-1498, 2002.

[147] A. Gragerov, E. Nudler, N. Komissarova, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman, and V. Nikiforov, "Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 89, no. 21, pp. 10341-10344, 1992.

[148] D. S. Hwang, E. Crooke, and A. Kornberg, "Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 265, no. 31, pp. 19244-19248, 1990.

[149] J.-H. Alix and M.-F. Guerin, "Mutant DnaK chaperones cause ribosome assembly defects in Escherichia coli," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 90, no. 20, pp. 9725-9729, 1993.

[150] D. Straus, W. Walter, and C. A. Gross, "DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32," *Genes & Development,* vol. 4, no. 12a, pp. 2202-2209, 1990.

[151] D. B. Straus, W. A. Walter, and C. A. Gross, "*Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis," *Genes & Development,* vol. 2, no. 12b, pp. 1851-1858, 1988.

[152] H. J. Hoffmann, S. K. Lyman, C. Lu, M.-A. Petit, and H. Echols, "Activity of the Hsp70 chaperone complex--DnaK, DnaJ, and GrpE--in initiating phage lambda DNA replication by sequestering and releasing lambda P protein," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 89, no. 24, pp. 12108-12111, 1992.

[153] J. Gamer, H. Bujard, and B. Bukau, "Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ32," *Cell,* vol. 69, no. 5, pp. 833-842, 1992.

[154] K. M. Flaherty, D. B. McKay, W. Kabsch, and K. C. Holmes, "Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 88, no. 11, pp. 5041-5045, 1991.

[155] D. Schmid, A. Baici, H. Gehring, and P. Christen, "Kinetics of molecular chaperone action," *Science,* vol. 263, no. 5149, pp. 971-973, 1994.

[156] B. Bukau and A. L. Horwich, "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines," *Cell,* vol. 92, no. 3, pp. 351-366, 1998.

[157] S. Rüdiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, and B. Bukau, "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries," *The Embo Journal,* vol. 16, no. 7, pp. 1501-1507, 1997.

[158] D. M. Cyr, T. Langer, and M. G. Douglas, "DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70," *Trends in Biochemical Sciences,* vol. 19, no. 4, pp. 176-181, 1994.

[159] D. Wall, M. Zylicz, and C. Georgopoulos, "The NH2-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 269, no. 7, pp. 5446-5451, 1994.

[160] K. Liberek, J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos, and M. Zylicz, "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, no. 7, pp. 2874-2878, 1991.

[161] H.-J. Schönfeld, D. Schmidt, H. Schröder, and B. Bukau, "The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quaternary structures and interactions of the DnaK and GrpE components," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 5, pp. 2183-2189, 1995.

[162] C. J. Harrison, M. Hayer-Hartl, M. Di Liberto, F.-U. Hartl, and J. Kuriyan, "Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK," *Science*, vol. 276, no. 5311, pp. 431-435, 1997.

[163] H. Grallert and J. Buchner, "A structural view of the GroE chaperone cycle," *Journal of Structural Biology*, vol. 135, no. 2, pp. 95-103, 2001.

[164] O. Fayet, T. Ziegelhoffer, and C. Georgopoulos, "The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures," *Journal of Bacteriology*, vol. 171, no. 3, pp. 1379-1385, 1989.

[165] Z. Xu, A. L. Horwich, and P. B. Sigler, "The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP) 7 chaperonin complex," *Nature*, vol. 388, no. 6644, p. 741, 1997.

[166] J. F. Hunt, A. J. Weaver, S. J. Landry, L. Gierasch, and J. Deisenhofer, "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution," *Nature*, vol. 379, no. 6560, p. 37, 1996.

[167] A. Richardson, F. Schwager, S. J. Landry, and C. Georgopoulos, "The importance of a mobile loop in regulating chaperonin/co-chaperonin interaction humans versus Escherichia coli," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 7, pp. 4981-4987, 2001.

[168] O. Llorca, S. Marco, J. L. Carrascosa, and J. M. Valpuesta, "The formation of symmetrical GroEL-GroES complexes in the presence of ATP," *Febs Letters*, vol. 345, no. 2-3, pp. 181-186, 1994.

[169] I. Gutsche, L.-O. Essen, and W. Baumeister, "Group II chaperonins: new TRiC (k) s and turns of a protein folding machine," *Journal of Molecular Biology*, vol. 293, no. 2, pp. 295-312, 1999.

[170] Z. Lin, F. P. Schwarz, and E. Eisenstein, "The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 3, pp. 1011-1014, 1995.

[171] L. Chen and P. B. Sigler, "The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity," *Cell*, vol. 99, no. 7, pp. 757-768, 1999.

[172] S. Falke, M. T. Fisher, and E. P. Gogol, "Structural changes in GroEL effected by binding a denatured protein substrate," *Journal of Molecular Biology*, vol. 308, no. 4, pp. 569-577, 2001.

[173] H. Lilie and J. Buchner, "Interaction of GroEL with a highly structured folding intermediate: iterative binding cycles do not involve unfolding," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, no. 18, pp. 8100-8104, 1995.

[174] M. Mayhew, A. C. da Silva, J. Martin, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and F. U. Hartl, "Protein folding in the central cavity of the GroEL–GroES chaperonin complex," *Nature*, vol. 379, no. 6564, p. 420, 1996.

[175] C. Sakikawa, H. Taguchi, Y. Makino, and M. Yoshida, "On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 30, pp. 21251-21256, 1999.

[176] T. K. Chaudhuri, G. W. Farr, W. A. Fenton, S. Rospert, and A. L. Horwich, "GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated," *Cell*, vol. 107, no. 2, pp. 235-246, 2001.

[177] H. S. Rye *et al.*, "Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL," *Nature*, vol. 388, no. 6644, p. 792, 1997.

[178] A. M, "Türkiye'de hayvan brusellozunun durumu ve bruselloz mücadele projesi," *1.Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, Bilgehan Basımevi,İzmir,* pp. 166–177 1987.

[179] M. J. Corbel, *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization, 2006.

[180] E. M. Dorneles, N. Sriranganathan, and A. P. Lage, "Recent advances in Brucella abortus vaccines," *Veterinary Research*, vol. 46, no. 1, p. 76, 2015.

[181] P. R. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Pfaller, and R. Yolken, "Manual of clinical microbiology. 2003," *American Society for Microbiology, Washington, DC*, 2009.

[182] M. Yanagi and K. Yamasato, "Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 107, no. 1, pp. 115-120, 1993.

[183] L. o. p. names(LPNS). (2016, 15 Jan). *Genus Brucella* [Online]. Available: http://www.bacterio.net/brucella.html.

[184] M. Corbel, "Genus Brucella," *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, p. 377, 1984.

[185] G. G. Alton, L. M. Jones, R. Angus, and J. Verger, *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la recherche Agronomique (INRA), 1988.

[186] B. Clapp, J. A. Skyberg, X. Yang, T. Thornburg, N. Walters, and D. W. Pascual, "Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and th17 cell responses," *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 10, pp. 4165-4174, 2011.

[187] M.-A. Vitry *et al.*, "Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of Brucella melitensis infection in mice," *Infection and Immunity*, vol. 80, no. 12, pp. 4271-4280, 2012.

[188] R. Maldonado-López and M. Moser, "Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses," in *Seminars in Immunology*, 2001, vol. 13, no. 5: Elsevier, pp. 275-282.

[189] N. Lapaque, I. Moriyon, E. Moreno, and J.-P. Gorvel, "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, no. 1, pp. 60-66, 2005.

[190] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, and I. R. Poxton, "Structure and function of lipopolysaccharides," *Microbes and Infection*, vol. 4, no. 8, pp. 837-851, 2002.

[191] A. M. Whatmore, "Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, no. 6, pp. 1168-1184, 2009.

[192] C. A. Allen, L. G. Adams, and T. A. Ficht, "Transposon-derived Brucella abortusrough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival," *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 3, pp. 1008-1016, 1998.

[193] A. Cloeckaert, P. De Wergifosse, G. Dubray, and J. Limet, "Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay," *Infection and Immunity*, vol. 58, no. 12, pp. 3980-3987, 1990.

[194] P. Elzer, R. Jacobson, S. Jones, K. Nielsen, J. Douglas, and A. Winter, "Antibody-mediated protection against Brucella abortus in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19," *Immunology*, vol. 82, no. 4, p. 651, 1994.

[195] M. J. De Bagüés, C. Marin, J. Blasco, I. Moriyon, and C. Gamazo, "An ELISA with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of B. melitensis infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or

conjunctival B. melitensis strain Rev 1 vaccination," *Veterinary Microbiology*, vol. 30, no. 2-3, pp. 233-241, 1992.

[196] M. Z. Khan and M. Zahoor, "An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies," *Tropical Medicine and Infectious Disease*, vol. 3, no. 2, p. 65, 2018.

[197] D. Verstreate, M. Creasy, N. Caveney, C. Baldwin, M. Blab, and A. Winter, "Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization," *Infection and Immunity*, vol. 35, no. 3, pp. 979-989, 1982.

[198] J. T. Douglas, E. Rosenberg, H. Nikaido, D. Verstreate, and A. Winter, "Porins of Brucella species," *Infection and Immunity*, vol. 44, no. 1, pp. 16-21, 1984.

[199] N. Vizcaino, A. Cloeckaert, M. S. Zygmunt, and G. Dubray, "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 9, pp. 3744-3751, 1996.

[200] N. Vizcaíno, A. Cloeckaert, M. S. Zygmunt, and L. Fernández-Lago, "Molecular Characterization of a BrucellaSpecies Large DNA Fragment Deleted in Brucella abortusStrains: Evidence for a Locus Involved in the Synthesis of a Polysaccharide," *Infection and Immunity*, vol. 67, no. 6, pp. 2700-2712, 1999.

[201] A. Cloeckaert, I. Jacques, P. De Wergifosse, G. Dubray, and J. Limet, "Protection against Brucella melitensis or Brucella abortus in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the Brucella A and M smooth lipopolysaccharides," *Infection and Immunity*, vol. 60, no. 1, pp. 312-315, 1992.

[202] A. Cloeckaert, J.-M. Verger, M. Grayon, and O. Grepinet, "Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of Brucella," *Microbiology*, vol. 141, no. 9, pp. 2111-2121, 1995.

[203] H. P. Roest, C. Bloemendaal, C. A. Wijffelman, and B. Lugtenberg, "Isolation and characterization of ropA homologous genes from Rhizobium leguminosarum biovars viciae and trifolii," *Journal of Bacteriology*, vol. 177, no. 17, pp. 4985-4991, 1995.

[204] S.-M. P. MODELLING. (2017, 15 Jan). *Omp25 Protein Modelling* [Online]. Available: https://swissmodel.expasy.org/.

[205] J. Montaraz, A. Winter, D. Hunter, B. Sowa, A. Wu, and L. Adams, "Protection against Brucella abortus in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies," *Infection and Immunity*, vol. 51, no. 3, pp. 961-963, 1986.

[206] R. Bowden, A. Cloeckaert, M. Zygmunt, and G. Dubray, "Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of Brucella melitensis (Omp25) expressed in Escherichia coli," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 39-48, 1998.

[207] A. Winter *et al.*, "Effectiveness of natural and synthetic complexes of porin and O polysaccharide as vaccines against Brucella abortus in mice," *Infection and Immunity*, vol. 56, no. 11, pp. 2808-2817, 1988.

[208] C. Shuo-shuo, L. Xue-zheng, and S. Ji-hong, "Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948," *Protein Expression and Purification*, vol. 77, no. 2, pp. 166-172, 2011.

[209] H. Sonoda, Y. Kumada, T. Katsuda, and H. Yamaji, "Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in Escherichia coli," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 111, no. 4, pp. 465-470, 2011.

[210] H. Mirzahoseini, "Stability of recombinant proteins in *Escherichia coli*: the effect of co-expression of five different chaperone sets," *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, vol. 20, no. 4, 2009.

[211] A. Kirschner, J. Altenbuchner, and U. T. Bornscheuer, "Cloning, expression, and characterization of a Baeyer–Villiger monooxygenase from Pseudomonas fluorescens DSM 50106 in *E. coli*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, no. 5, pp. 1065-1072, 2007.

[212] D. Liu, R. Schmid, and M. Rusnak, "Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm—a screening system for a frequently used biocatalyst," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, no. 5, pp. 1024-1032, 2006.

[213] P. Mahamad, C. Boonchird, and W. Panbangred, "High level accumulation of soluble diphtheria toxin mutant (CRM197) with co-expression of chaperones in recombinant Escherichia coli," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 14, pp. 6319-6330, 2016.

[214] J. Rehdorf, A. Kirschner, and U. T. Bornscheuer, "Cloning, expression and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440," *Biotechnology Letters*, vol. 29, no. 9, pp. 1393-1398, 2007.

[215] S. Wang, A. Tan, J. Lv, P. Wang, X. Yin, and Y. Chen, "Soluble expression of recombinant human CD137 ligand in *Escherichia coli* by co-expression of

chaperones," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 39, no. 3, pp. 471-476, 2012.

[216] T. Atabey, Bruselloza Karşı Endemik Brucella Abortus'tan Rekombinant Omp25 Proteini Eldesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.