

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK  
PANKREATİT ile İLİŞKİLİ PROTEİN (PAP) GELİŞTİRİLMESİ**

Didem PAZARLI

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2019



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK  
PANKREATİT ile İLİŞKİLİ PROTEİN (PAP) GELİŞTİRİLMESİ**

**Didem PAZARLI**

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Naci ÇİNE

TÜBİTAK SBAG destekli 115S124 numaralı 1003 projesi kapsamında desteklenmiştir

KOCAELİ

2019

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

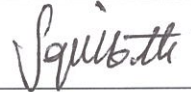
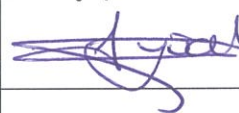

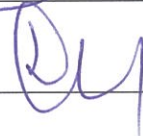
**Tez Adı:** Rekombinant DNA Teknolojisi Kullanılarak Pankreatit ile İlişkili Protein (PAP) Geliştirilmesi.

Tez yazarı: Didem PAZARLI

Tez savunma tarihi: 27.06.2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatma YÜCEL

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI / Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Selma Onorcal	
ÜYE(DANIŞMAN)	Doç. Dr. Fatma YÜCEL	
ÜYE	Doç. Dr. Naci GİVİC	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Deniz S. Akkoyunlu	

### Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... /.... /2019

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

Rekombinant DNA Teknolojisi Kullanılarak Pankreatit ile İlişkili Protein (PAP) Geliştirilmesi

**Amaç:**Sunulan bu tez çalışmasında prognostik belirteç, proliferasyon kontrolü, apoptozis, hücre migrasyonu, hücre invazyonu ve immünoassay çalışmalarının kontrolü amacıyla kullanılabilme potansiyeline sahip olan pankreatit ile ilişkili proteinin (PAP) rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:**Bu tez çalışmasında, erken teşhis ve tedavi amaçlı veya ELISA kitlerinde standart olarak kullanılmaya hazır rekombinant PAP proteini *Pichia Pastoris* X33 suşunda, indüklenebilir AOX promotörü ve salgılama sinyaline sahip pD912 vektörü ile üretilmiştir. Üretilen rekombinant PAP proteininin antijenik özellikleri, ELISA ve Western Blot testleri ile kontrol edilmiştir.

**Bulgular:**Çalışma kapsamında üretilen rekombinant PAP proteininin ticari PAP ile benzer antijeniteye sahip olduğu belirlenmiştir. Üretilen proteinler Western Blot ve ELISA testi ile kontrol edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre rekombinant PAP proteini başarılı bir şekilde üretilmiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, tanı ve tedavi başta olmak üzere birçok alanda kullanılabilir ve standart olarak kullanılabilme potansiyeli olan rekombinant PAP proteini başarılı bir şekilde üretilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**Rekombinant DNA Teknolojisi,Pankreatitle İlişkili Protein, PAP, pD912 vektör, *Pichia Pastoris* , ELISA, Western Blot.

## ABSTRACT

Development of Pancreatitis-Associated Protein (PAP) Using Recombinant DNA Technology

**Objective:** In this thesis, it is aimed to develop pancreatitis related protein (PAP) which has the potential to be used to control prognostic markers, proliferation control, apoptosis, cell migration, cell invasion and immunoassay studies by recombinant DNA technology.

**Method:** In this thesis, the recombinant PAP protein, ready for use as a standard for early diagnosis and treatment or in ELISA kits, was produced in the *Pichia Pastoris* X33 strain with the inducible AOX promoter and pD912 vector with secretion signal. The antigenic properties of the recombinant PAP protein produced were checked by ELISA and Western Blot tests.

**Result:** It was determined that the recombinant PAP protein produced in the study had similar antigenicity to commercial PAP. The proteins produced were checked by Western Blot and ELISA test. Based on the results of the analysis, recombinant PAP protein was successfully produced.

**Conclusions:** As a result, recombinant PAP protein with the potential to be used as a standard is successfully used in many areas, especially in diagnosis and treatment.

**Key words:** Recombinant DNA Technology, Pancreatitis-Associated Protein, PAP, pD912 vector, *Pichia Pastoris*, ELISA, Western Blot.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp büyük sabır ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni sunan, her sıkıntılı anımda yanına çekinmeden gidebildiğim güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki meslek hayatımda da değerli bilgilerinden faydalanabileceğimi düşündüğüm kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Fatıma YÜCEL ve eş danışmanım Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye teşekkürü borç biliyorum.

Bilimsel anlamda gelişmeme büyük katkı sağlayan, sabır ve ilgiyle beni en iyi şekilde yönlendiren, neşesi ve güler yüzüyle modumu sürekli yükselten değerli hocam Dr. Şerife Şeyda PİRİNÇCİ'ye çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda, değerli yorumlarından ve desteğinden faydalandığım Dr. Esin AKÇAEL'e teşekkür ederim.

Bana destek, katkı ve güzel anılar bırakmalarından dolayı laboratuvar arkadaşlarım Bengü ERGENOĞLU, İsmail Selim YILDIRIM, Göksu GÖK, İlkay Göksu POLAT, Seda SEMERCİ ve Gizem AKTUĞ'a teşekkür ediyorum.

Uzak yakın farketmeksizin her an yanımda olduklarını hissettiğim, umutsuzluğa kapılmama fırsat tanımayan, hayatımın her anında desteklerinin benimle olduğunu bildiğim Nazlı MURATOĞLU ve Zarif Seda ÇAKIR'a varlıkları ve bu dönemde sağladıkları destek için çok teşekkür ediyorum.

Bu süreçte enerjimi yüksek tutan, moral motivasyon kaynaklarım Uzman Teknisyen Mustafa ÇAKIR, Dr. Ahsen MORVA, Dr. Altan KARA ve Dr. Ali AYDIN'a bana karşı olan sabırları ve destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans çalışmama büyük katkısı olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başından sonuna beni destekleyen annem, babam, ablam, abim ve yeğenim Şevval'e verdikleri moral, cesaret ve bana olan ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.





## **TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ**

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..... / ..... / 2019

**Didem PAZARLI**

**İmza**

X X X X X

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ .....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Rekombinant Proteinlerin Kullanım Alanları .....	2
1.1.1. Araştırma .....	3
1.1.2. Biyoteknoloji .....	3
1.1.3. Tıp .....	4
1.1.4. Tanı .....	4
1.2. Antijenlerin Özellikleri .....	5
1.3. Antijen Tipleri .....	6
1.3.1. Eksojen Antijenler .....	6
1.3.2. Endojen Antijenler .....	6
1.3.3. Otoantijenler .....	7
1.3.4. Tümör Antijenleri (Neoantijenler) .....	7
1.3.5. Doğal Antijenler .....	7
1.4. Antijen-Antikor Etkileşimleri .....	7
1.5. Pankreatitle ilişkili Protein (PAP) .....	10
1.5.1. PAP'ın Moleküler Yapısı .....	11
1.5.2. PAP'ın Moleküler Fonksiyonları .....	12
1.5.3. Patolojik Süreçte PAP .....	14
1.5.4. PAP ile Yapılan Klinik Çalışmalar .....	15
1.5.5. PAP'ın Tespitinde Kullanılan Yöntemler .....	15

1.6. Fc Füzyon Proteinleri .....	17
1.7. Pichia Pastoris X33.....	19
1.7.1. <i>P. pastoris</i> İfade Sistemi.....	21
2. AMAÇ .....	27
3. YÖNTEM.....	28
3.1. Plazmid DNA'sının GF/C filtresinden eldesi .....	28
3.2. Kompetent <i>E. Coli</i> Top10 Hazırlanması .....	29
3.3. <i>E. Coli</i> 'ye Plazmid Transformasyonu .....	29
3.4. Plazmid DNA İzolasyonu.....	29
3.5. SacI ile Plazmid Kesimi .....	30
3.6. Transformasyon.....	31
3.7. Zeosin Seçilimi.....	32
3.8. <i>Pichia Pastoris</i> 'te Protein Ekspresyonu.....	32
3.9. Sandviç ELISA.....	33
3.10.SDS-PAGE .....	34
3.10.1. Gümüş Boyama .....	34
3.10.2. Western Blotlama .....	35
3.11. Amonyum Sülfat Çöktürme .....	35
3.12. Diyaliz .....	36
3.13. Saflaştırma.....	36
3.14. Liyofilizasyon.....	36
4. BULGULAR .....	37
4.1. <i>E. Coli</i> 'ye Transformasyon .....	37
4.2. Plazmid DNA İzolasyonu.....	37
4.3. <i>Pichia Pastoris</i> X33'te PAP Üretilmesi ve Saflaştırılması .....	38
4.3.1. PAP Geninin Mayaya Transformasyonu.....	38
4.3.2. PAP Üreten Maya Kolonilerinin Seçimi .....	39
4.4. Amonyum Sülfat Çöktürme Optimizasyon .....	43
4.5. PAP'ın Saflaştırılması.....	44
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	50
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	57

EKLER .....	58
EK 1. Kullanılan Çözelti ve Solüsyonlar .....	58
EK 2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ekipmanlar .....	60
EK 3. Deneyleerde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar .....	62
EK 4. Tris-glisin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi için solüsyon içerikleri.....	67
EK 5. Protein Marker .....	68



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Da: Dalton

kDa: Kilo Dalton

M: Molar

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

ng: Nanogram

nm: Nanometre

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

°C: Santigrat Derece

A: Amper

AEC : Aminoetil Karbazol

AP: Alkalen Fosfataz

APC: Antijen Sunucu Hücre

APS: Amonyum Per Sülfat

AOX: Alcohol oxidase

BCIP/NBT: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium

BMMY: Buffered Methanol-complex, Medium

BMGY: Buffered Glycerol-complex, Medium

BSA: Bovine serum albumin

CaCl<sub>2</sub>:Kalsiyum Klorid

dH<sub>2</sub>O: Distile su

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

*E.Coli: Escherichia coli*

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay(Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)

Fab: Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge)

Fc: Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)

FDA: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)  
GMBE: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü  
HCl: Hidroksi klorik asit  
H<sub>2</sub>O: Su  
Ig: İmmünoglobülin  
IgG: İmmünoglobülin G  
KOH: Potasyum Hidroksit  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Dipotasyum fosfat  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Mono potasyum fosfat  
LB: Luria-Bertani  
MAM: Marmara Araştırma Merkezi  
MHC: Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Majör Histokompatibilite Kompleksi)  
NaCl: Sodyum Klorür  
NaOH: Sodyum Hidroksit  
OD: Optik Yoğunluk (Optical Density)  
*P.pastoris*: *Pichia Pastoris*  
PAP: Pancreatitis-Associated Protein (Pankreatitle İlişkili Protein)  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PVDF: Poliviniliden florid (Polyvinylidene fluoride)  
Reg: Rejeneratif  
rpm: Rounds per minute (dakikadaki devir)  
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat  
SDS- PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamit Jel Elektroforezi  
TBS: Tris Buffered Saline  
TEMED: Tetrametil etilen diamin  
TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu  
V: Volt  
YPD: Yeast Extract Peptone Dextrose  
YPDS: Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1. 1. Biyobelirteç keşfinden hastalık teşhisine kadar olan süreç.....	5
Çizim 1. 2. Antikor Yapısı.....	9
Çizim 1. 3. İmmünoglobülin Tipleri.....	10
Çizim 1. 4. PAP Proteininin 3 boyutlu yapısı.....	11
Çizim 1. 5. PAP ile aktive olan anti-enflamatuar yol.....	14
Çizim 1. 6. ELISA tipleri.....	16
Çizim 1. 7. Fc-Füzyon Protein Yapısı.....	19
Çizim 1. 8. <i>Pichia pastoris</i> 'in basitleştirilmiş karbon metabolizması ve gliserol ve metanol metabolizmasında yer alan yolaklardan tanımlanmış enzimler.....	20
Çizim 1. 9. PAP-pD912 Plazmid Haritası.....	25
Çizim 3. 1. PAP Tasarımı ve Dizisi.....	28
Çizim 3. 2. Sandviç ELISA.....	34
Çizim 4. 1. PAP konsantrasyonu, NanoDrop ölçümü. ( 131,51 ng/µl ).....	37
Çizim 4. 2. pD912 Plazmid konsantrasyonu, NanoDrop ölçümü. ( 38,56 ng/µl ).....	38
Çizim 4. 3. Hayatta kalan pd912-PAP kolonileri. ( <i>Pichia Pastoris</i> X33 suşu, zeosin içeren petri).....	39
Çizim 4. 4. Zeosin direnci için test edilen 8 farklı koloni.....	39
Çizim 4. 5. Sandviç ELISA ile transforme edilmiş PAP maya üst sıvılarından elde edilen OD450 değerleri.....	40
Çizim 4. 6. Rekombinant PAP Antijeninin saat optimizasyon sonuçlarının sandviç ELISA'da OD450 değerleri.....	41
Çizim 4. 7. Rekombinant PAP antijeninin SDS jel gümüş boyama görüntüsü.....	42
Çizim 4. 8. Rekombinant PAP antijeninin immünoblotlama görüntüsü.....	42
Çizim 4. 9. Rekombinant PAP maya üst sıvılarının farklı doymuş amonyum sülfat miktarlarıyla sandviç ELISA OD 450'de çökme değerleri.....	43
Çizim 4. 10. PAP'ın manuel saflaştırılma profili.....	44
Çizim 4. 11. 20mM Sodyum Fosfat Bağlama tamponu ile NGC cihazından PAP saflaştırma görüntüsü.....	45
Çizim 4. 12. 20mM Sodyum Fosfat+500mM NaCl Bağlama tamponu ile NGC cihazında PAP saflaştırma görüntüsü.....	45

<b>Çizim 4. 13.</b> 1M NaCl+1,5M Glisin Bağlama tamponu ile NGC cihazında PAP saflaştırma görüntüsü .....	46
<b>Çizim 4. 14.</b> Farklı molaritelerde bağlama tamponu ile yapılan saflaştırma fraksiyonlarının ELISA testi ile OD 450 aktivite ölçümü (* ile gösterilen fraksiyonlar elüsyon fraksiyonlarıdır.).....	46
<b>Çizim 4. 15.</b> Maya üst sıvılarından elde edilen rekombinant PAP'ın farklı dilüsyon oranlarının OD 450 değerleri.....	47





## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Klinikte Anahtar Fc-Füzyon proteinleri ve monoklonal antikorlar (mAb)....	18
Çizelge 1. 2. AOX1 Promotör sisteminin kullanılmasında avantaj ve dezavantajlar. ....	24
Çizelge 3. 1. Kesim Reaksiyonu.....	30



## 1.GİRİŞ

Geçtiğimiz yüzyılda, rekombinant DNA teknolojisi, hedef genlerin ekspresyonlarını kontrol ederek canlılarda arzu edilen özelliklerin geliştirilebileceğinin bir hayal ürünü idi. Bununla birlikte, son dönemde, bu alan insan yaşamında ilerleme sağlamada benzersiz etkiler göstermiştir. Bu teknoloji sayesinde, sağlık sorunları ve beslenme amaçları için gerekli olan önemli proteinler güvenli, uygun bir şekilde ve yeterince üretilebilir hale gelmiştir (Khan ve diğ. 2016). Rekombinant proteinler, biyomedikal biyoteknolojide önemli atılımlar sağlamıştır. Bu proteinler sadece biyomedikal araştırmalarda değil aynı zamanda tedavide de ilaç olarak kullanılmaktadırlar. Tedavide kullanılan ilk rekombinant protein, 1982'de üretilen rekombinant insan insülinidir. 1982 yılından bu yana rekombinant protein endüstrisi hızla büyümüştür. Bugüne kadar, 130'dan fazla rekombinant protein klinik kullanım için Amerika Birleşik Devletleri FDA tarafından onaylanmıştır. Bununla birlikte, 170'ten fazla rekombinant protein dünya çapında üretilmekte ve sağlık alanında kullanılmaktadır (Pham 2018).

Rekombinant bir proteinin üretilmesi için, bir ekspresyon sisteminin kullanılması gerekmektedir. Uygun bir ekspresyon sisteminin seçimi; rekombinant proteinin özelliklerine ve amaçlanan uygulamaya göre değişmekte olup yeterli miktarda protein üretmek için oldukça önemlidir. Son 30 yılda, rekombinant teknolojide proteinleri ekspres etmek için önemli gelişmeler olmuştur. Bu süreçte beşifade sisteminin; *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, baculovirus/böcek hücresi, bitki ve memeli hücrelerinin benzersiz özellikleri ortaya çıkmıştır. *E.coli*'nin aksine, ökaryotik *P.pastoris*, bakulovirüs / böcek hücresi, bitki ve memeli sistemleri, iyi protein katlanmasını ve birçok post-translasyonel modifikasyonu teşvik etmektedir (Burgess ve Deutscher 2009).

İnsan PAP / REG3A (fare PAP / REG3b) veya pankreatit ile ilişkili protein, akut pankreatit (Keim ve diğ. 1991), diyabet ve (Keim ve diğ. 1992) kistik fibroz gibi pankreas hastalıklarına karıştığı için keşfedilmiş C tipi lektin benzeri salgılanan bir proteindir (Barthelme ve diğ. 2001). PAP'ın duyarlılığının ve özgüllüğünün vücut kitle indeksi gibi diğer klinik parametrelerden etkilenip etkilenmediği henüz belirlenmemiştir. Ancak PAP'ın tek başına veya diğer biyobelirteçlerle kombinasyon halinde faydalı bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (Fitzgibbons ve diğ. 2014).

Bu tez çalışmasında, pankreatit ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik olarak rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yüksek afinitede, büyük ölçekte PAP antijeninin geliştirilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu süreçte üretilen PAP'ın farklı proteinlerin tespitinde fayda sağlayacak bir model olabileceği düşünülmektedir.

### **1.1. Rekombinant Proteinlerin Kullanım Alanları**

Rekombinant DNA teknolojisi biyoteknoloji, tıp, araştırma ve tanı alanlarında kullanılabilir. Rekombinant DNA'nın en yaygın uygulaması, teknolojinin biyolojik ve biyomedikal bilimlerde en güncel çalışmalar için önemli olduğu temel araştırmalardır (Brown 2016). Rekombinant DNA teknolojisi, genleri tanımlamak, eşlemek, sıralamak ve fonksiyonlarını belirlemek için kullanılmaktadır. Rekombinant DNA problemleri, tek tek hücreler içindeki ve tüm organizmaların dokuları boyunca gen ekspresyonunun analizinde kullanılmaktadır. Rekombinant proteinler, laboratuvar deneylerinde reaktifler olarak yaygın şekilde kullanılmakla birlikte hücreler ve organizmalar içindeki protein sentezini incelemek, antikor problemleri üretmek için de kullanılabilir (Peter ve diğ. 2008).

Protein tüm organizmalar için önemli bir bileşendir (Mattick ve J.S 2003). Her bir protein molekülü, amino asitlerden yapılmış bir veya daha fazla polipeptit zincirinden oluşur. Doğal olarak oluşan 20 amino asit vardır. Farklı amino asit serileri, protein zincirlerini oluşturmak için peptid bağları ile birbirine bağlanır. Her protein kendine özgü bir amino asit dizisine sahiptir (Zamyatin ve A.A 1984). Yaşam için gerekli olan bilgi DNA veya RNA tarafından kodlanmış olsa da proteinler; kataliz, savunma, taşıma, destek, hareket ve düzenleme dahil olmak üzere organizmalar içinde geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesinde görev alır. Vücuttaki işlevlerine göre, proteinler antikor, enzim gibi farklı kategorilere ayrılabilir. Proteinlerin önemli fonksiyonları göz önüne alındığında, yoğun olarak çalışılmış ve geniş çapta uygulama alanı bulunmuştur (Lodish ve diğ. 2008).

Geçmişte, spesifik bir protein elde etmenin ana yolu, onu genellikle verimsiz ve zaman alan doğal bir kaynaktan izole etmektir. Rekombinant moleküler biyolojik tekniklerindeki son gelişmeler, spesifik bir proteini kodlayan DNA'yı bir ekspresyon vektörüne klonlamayı ve proteini bakteri, maya, böcek hücreleri ve memeli hücreleri gibi ekspresyon sistemlerinde ekspresyonu mümkün kılmıştır (Verma ve diğ. 1998). Basitçe söylemek gerekirse, rekombinant proteinler canlı hücrelerde eksojen DNA'nın ürünleridir. Rekombinant proteinlerin üretimi genellikle iki ana adım içerir. Bunlar; moleküler klonlama ve protein ifadesidir. Günümüzde rekombinant protein

üretimi, yaşam bilimlerinde kullanılan en güçlü tekniklerden biridir. Rekombinant proteinler aşağıda anlatıldığı üzere tıpta, temel bilim araştırmalarında ve biyoteknolojide geniş uygulamalara sahiptir (Chilkoti 2006).

### **1.1.1.Araştırma**

Rekombinant proteinler, protein-protein etkileşimlerini anlamada faydalı araçlar olup moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, biyokimya, yapısal ve biyofizik çalışmalar ve diğer birçok araştırma alanında sıklıkla kullanılmaktadır(Kim ve diğ. 2008). Rekombinant proteinler araştırma alanında enzim, antikor, analiz standartları, antijen veya algılayıcı materyal olarak kullanılabilir (Zhu ve Snyder 2003). Bunların dışında rekombinant proteinlerin araştırma alanında birçok kullanım amacı bulunmaktadır.

### **1.1.2. Biyoteknoloji**

Rekombinant proteinler tıpta, ziraatte, hayvancılıkta, ilaç ve gıda endüstrisinde birçok soruna çözümler üretebilmektedir. Örneğin, 21. yüzyılın dünya sorunları arasında yer alan küresel ısınma, iklim değişikliği, kuraklık, açlık (özellikle Afrika ve Asya'da) gibi sorunlara çözüm bulmak için tarımda besin değeri yüksek bitkiler elde etmek (altın pirinç), hastalıklara, soğuğa, tuza, kuraklığa, böceklerle, herbisitlere (kimyasallara) dirençli bitkiler geliştirmek için bu teknoloji yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca hayvancılıkta; ıslah, verim artırma ve ürün kalitesini iyileştirme, büyümenin artırılması, süt veriminin artırılması, transgenik hayvanlarda tedavi edici maddelerin sütle salgılanması, laktozsuz süt üretimi, döl veriminin, yün veriminin artırılması, hastalıklara dirençlerin artırılması, ıslah endüstrisinde yem içerik maddelerinin besin değeri artırarak, yem ve atık yönetimi maliyetlerini azaltmak, hayvan bağırsak sağlığını desteklemek, hayvan performansını artırmak ve çevreyi iyileştirmek için hayvan yemine enzimler eklenmesi bu kapsamda yer alan çalışmalardır. Ayrıca, laktik asit bakterileri, fermente gıdaların üretimi için uzun zamandan beri kullanılmış ve son zamanlarda laktik asit bakterileri, insan / hayvan sindirimini ve beslenmeyi iyileştirme gibi geniş uygulamalara sahip olacak olan rekombinant proteinlerin ekspresyonu için tasarlanmıştır (Dien ve diğ. 2003).

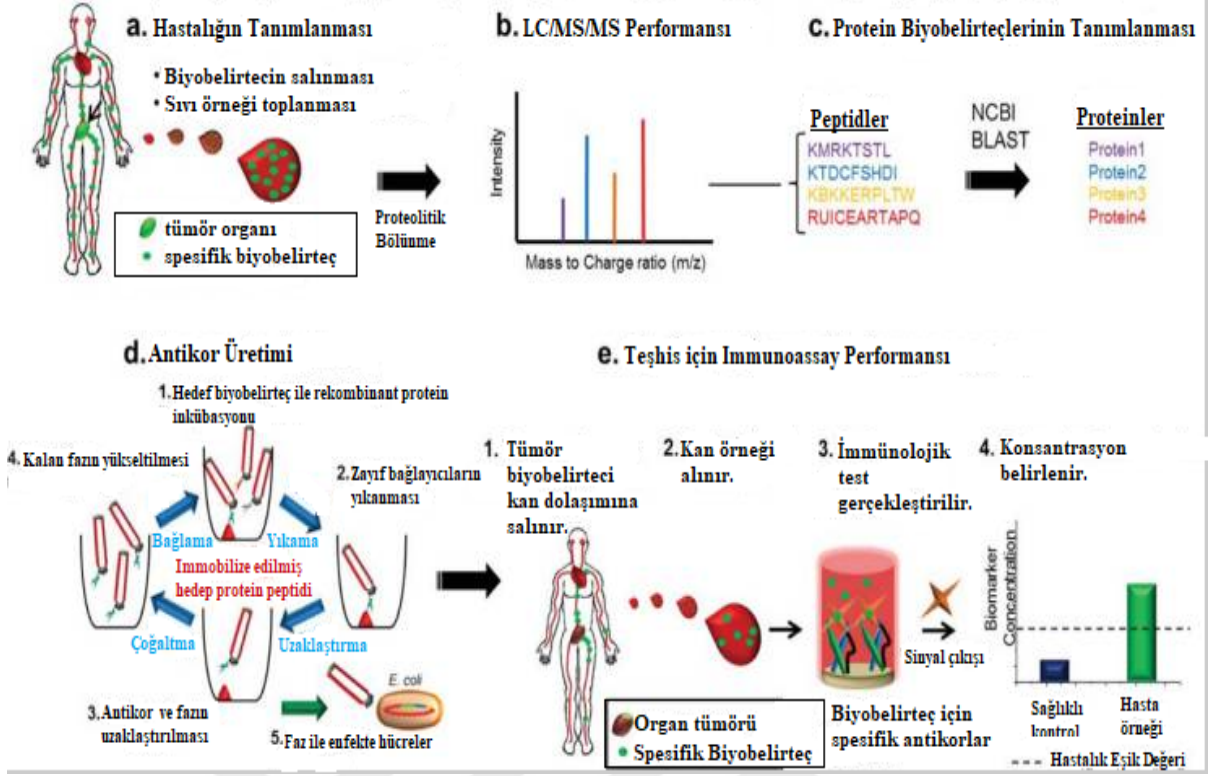
### 1.1.3. Tıp

Sağlık alanında, insan yaşam kalitesini artırıcı ve sağlığını koruyucu yeni teknolojik ürünlerin geliştirilmesinde, yeni ilaçların oluşturulması, ilaçların sadece hastalık olan bölgeye hedeflenmesinin sağlanması, hastalık tanılarının geliştirilmesi, aşılarda geliştirilmesi, insan genomunun anlaşılması ve gen tedavisinde de rekombinant DNA teknolojisi yaygın biçimde kullanılmaktadır.

Terapötik proteinler, diyabet, kanser, bulaşıcı hastalıklar, hemofili ve anemi gibi çeşitli hastalıklar için önemli tedaviler sağlar. Yaygın terapötik proteinler arasında yer alan antikorlar, Fc füzyon proteinleri, hormonlar, interleokinler, enzimler ve antikoagülanlar bulunur (Leader ve diğ. 2008). Terapötik uygulamalar için rekombinant proteinlere yönelik artan bir talep vardır. Genetik mühendisliği ile elde edilen insan proteinleri, terapötik ilaç pazarında önemli bir rol oynamaktadır (Ferrer-Miralles ve diğ. 2009). Günümüzde, bütün rekombinant terapötik proteinlerin çoğu memeli hücrelerinde üretilmektedir, çünkü memeli hücreleri doğal olarak meydana gelenlere benzer şekilde yüksek kaliteli proteinler üretebilmektedir. Ek olarak, pek çok onaylanmış rekombinant terapötik protein, iyi karakterize edilmiş genetiği, hızlı büyümesi ve yüksek verimli üretimi nedeniyle *E.coli*'de üretilir (Huang ve diğ. 2012).

### 1.1.4. Tanı

Protein biyobelirteçleri, tıbbi teşhislerde kullanılan en yaygın biyobelirteç türüdür. Biyobelirteç arayışında, aday proteinlere veya normal ve hastalıklı dokular arasında kalitatif veya kantitatif olarak farklılık gösteren transkripsiyon sonrası modifikasyonlar için rekombinant afinite reaktifleri üretilir. Biyobelirteçler belirli bir hastalığın göstergesi olarak tanımlandıktan sonra immünolojik olarak tanımlanır ve kesin bir teşhis konulabilir (Çizim 1.1 ). (Kierny ve diğ. 2012).



**Çizim 1.1.** Biyobelirteç keşfinden hastalık teşhisine kadar olan süreç. Kierny ve diğ. (2012)'den alınmıştır.

Antijenler de bu alanda belirteç ve standart olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser teşhisi için rekombinant antijenlerin kullanımı sıklıkla artmıştır (Meeusen ve diğ. 2017). Biyobelirteçlerin tanımlanmasının ardından protein yapısındaki biyobelirteçler sıklıkla antikor-antijen etkileşimine dayalı tanı sistemleri ile belirlenmektedir. Bu noktada rekombinant proteinler standart referans antijen olarak yer almaktadır.

Bu çalışma kapsamında üretilen rekombinant proteinlerin tanı sistemlerinde referans antijen olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

## 1.2. Antijenlerin Özellikleri

Organizmanın kalıtsal yapısına yabancı olan ve organizmaya girdiğinde kendine özgü immün cevaba yol açan, immün cevap sonucu ortaya çıkan ürün ve hücrelerle özgül olarak birleşme özelliğindeki maddelere antijen denir. Moleküler seviyede bir antijen, bir antikorun antijen bağlanma bölgesinde "bağlanma" kabiliyeti ile karakterize edilir (Gavin ve diğ. 2006). Antikorlar, antijenin yüzeyinde sunulan spesifik moleküler yapılar arasında ayırım yapma eğilimindedir. Antijenler genellikle proteinler, peptidler veya polisakkaritlerdir. Bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmaların parçalarının yanı sıra (kat,

kapsül, hücre çeperi, flagella, fimbria ve toksinler) vücuda "yabancı" olarak tanımlanan ve organizmada immün yanıt oluşturabilecek her yapıyı içerir. Lipitler ve nükleik asitler yalnızca proteinler ve polisakaritler ile birleştirildiğinde immünojeniktir. Örneğin, lipitler ve polisakaritlerin kombinasyonu, gram negatif bakteriyel endotoksinin birincil bileşeni olan lipopolisakaritlerdir (LPS). LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarını oluşturur ve bağlandığında güçlü bir immün tepkiye neden olur. Hücreler, immünojenik antijenlerini, immün sisteme, major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülü vasıtasıyla sunar. Sunulan antijene ve MHC molekülünün türüne bağlı olarak bir antijen nedeniyle birkaç immün hücre tipi aktif hale gelebilir.

Antijenler, farklı antikor sınıfları tarafından bağlanabilecek birkaç yapısal etkileşim bileşenine sahiptir. Bu farklı yapısal bileşenlerin her birinin, aynı zamanda antijenik determinant olarak da adlandırılan bir epitop olduğu düşünülmektedir. Kompleks yapıdaki bir antijenin reseptörler ile birleşebilen ve uyarıya yol açabilen bölgelerine "epitop" veya "antijenik determinant" denir. Bu nedenle, çoğu antijen, her biri belirli bir epitopa özgü olan birkaç farklı antikorla bağlanma potansiyeline sahiptir. Bir antikordaki antijen bağlayıcı reseptöre paratop denir ve bu reseptör antijenin epitopuna özgüdür. "Anahtar-Kilit" metaforunu kullanarak, antijenin kendisi her biri farklı bir kilitle eşleşebilen bir anahtar dizisi - herhangi bir epitop bir "anahtar" - olarak görülebilir (Parham 2009).

### **1.3. Antijen Tipleri**

#### **1.3.1. Eksojen Antijenler**

Eksojen antijenler vücuda dışarıdan, örneğin solunum, yutma veya enjeksiyon yoluyla giren antijenlerdir. Eksojen antijenler, en yaygın antijen türleridir ve alerjiye neden olabilecek polen veya yiyecekleri, ayrıca bakteri ve enfeksiyona neden olabilecek diğer patojenlerin moleküler bileşenlerini içerir (Anonim 2015-07-30).

#### **1.3.2. Endojen Antijenler**

Endojen antijenler, normal hücre metabolizmasının bir sonucu olarak normal hücrelerin içinde, viral ya da hücre içi bakteriyel enfeksiyon (her ikisi de çoğalmak için içerden hücreleri değiştiren) nedeniyle üretilmiştir. Ardından fragmanlar, enfekte olmuş hücrelerin yüzeyinde MHC sınıf I molekülleri ile birlikte sunulur (Anonim 2015-07-30).

### **1.3.3. Otoantijenler**

Otoantijenler, normal "kendi" protein veya konağın kendi immün sistemi tarafından saldırıya uğrayan ve otoimmün bir hastalığa neden olan protein veya nükleik asit kompleksidir. Bu antijenlerin normal şartlar altında bağışıklık sisteminin hedefi olmaması gerekmesine rağmen genetik ve çevresel faktörler nedeniyle organizma kendi antjenlerine karşı normal bağışıklık toleransını kaybedebilmektedir (Anonim 2015-07-30).

### **1.3.4. Tümör Antijenleri (Neoantijenler)**

Bu antijenler, tümör hücrelerinin yüzeyindeki MHC I veya MHC II molekülleri tarafından sunulur ve normal hücrelerin kanser hücrelerine malign transformasyonu sırasında tümöre özgü bir mutasyondan kaynaklanır. Birçok tümör, bu antijeni ifade etmesine rağmen antijen tanıma ve bağışıklık sistemi tarafından öldürülmekten kaçınmanın yollarını geliştirmiştir (Schumacher ve Schreiber 2015).

### **1.3.5. Doğal Antijenler**

Doğal bir antijen, bir antijen sunucu hücre (APC) tarafından henüz küçük parçalara işlenmemiş bir antijendir. T hücreleri doğal antijenleri bağlayamaz, ancak APC'ler tarafından sindirilmelerini ve işlenmelerini gerektirir, oysa B hücreleri önceden işlenmeden doğal olanlarla aktive edilebilir (Anonim 2015-07-30).

## **1.4. Antijen-Antikor Etkileşimleri**

Antijenler, spesifik olarak T ve B hücreleri tarafından tanınan moleküllerdir (Janeway 2005). Antijenleri tanımlarken immünojenite ve antijenite olmak üzere iki özellik ayırt edilmelidir. İmmünojenite, verilen bir antijenin bir immün yanıtı indüklemeye kapasitesi olarak ve antijenite ise T ve B hücreleri tarafından eksprese edilen antijene spesifik reseptörler tarafından tanınacak antijen kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, her immünojen bir antijendir, fakat tüm antijenler immünojen değildir.

Antijenler, antijenik determinantlar veya epitoplardan oluşurlar. Antijenlerin büyük çoğunluğunu temsil eden proteinlerde, iki tip antijenik determinant ayırt edilebilir: sürekli veya segmental determinantlar sürekli amino asit rezidülleri primer sekansında bulunur. Süreksiz veya toplanmış determinantlar, primer dizilimde uzak olan ancak proteinlerin üçüncül yapısında topografik olarak toplanmış artıklar tarafından oluşturulmuştur. Antijene özgü T ve B hücre reseptörlerinin birleşme sahası, üç boyutlu bir amino asit agregatı düzenlemesinden oluşur ve bu nedenle bir polipeptit antijeninin birçok yapısı arasında farklı bağlanma davranışları görülebilmektedir. Örneğin sentetik

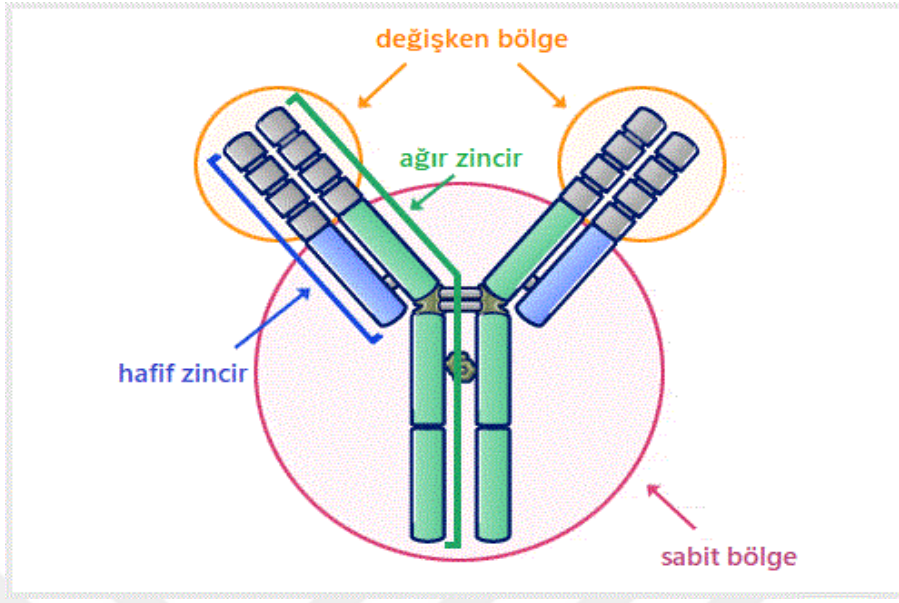


peptidlerin bazıları nativ antijene kıyasla (T ve B hücre reseptörlerine) daha yüksek afinite ile bağlanabilmektedir. Böylece, birleştirme sahasının üç boyutlu yapısı, en uygun konformasyonunu tanımlar. Bu anlamda tüm antijenik determinantlar konformasyoneldir. Antijene ya da immünize edilen organizmaya bağlı olarak, bir antijenin T ve B hücreleri tarafından tercihen tanınan epitoplari immünodominant bölge olarak tanımlanır. (Adorini 1998).

Antikorlar veya immünoglobulinler, hem membrana bağlı hem de çözüner formlarda ifade edilen multimerik glikoproteinlerdir (Pier GB ve diğ. 2004). İmmünoglobülin ağır zincir geni, dört farklı segmental elemandan oluşan lokuslarda kodlanır. Bunlar; değışken, çeşitlilik, birleştirme ve sabit bölgelerdir. Üç farklı segmental eleman hafif zinciri kodlar; değışken, birleştirme ve sabit bölgeler. Farklı hafif ve ağır zincir gen familyalarını oluşturan segmental elemanların sayısı farklı türlerde değışiklik gösterir (Litman ve diğ. 1993). Antikorlar, adaptif bağışıklık sisteminin B hücreleri tarafından, çoğunlukla plazma hücreleri olarak adlandırılan farklılaştırılmış B hücreleri tarafından salgılanır (Borghesi ve Milcarek 2006). Antikorların genel yapısı Çizim 1.2.'de gösterilmektedir.






B hücreleri üzerindeki immünoglobulin reseptörü, immün tepkiler sırasında B hücrelerinin aktivasyonunda ve T hücrelerine sunulması için antijenin içselleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Çözüner moleküller olarak, antikorlar kanda ve sekresyonlarda bulunur, yabancı antijenleri dolaşımında tanımaya ve temizlemeye yarar (Pier GB ve diğ. 2004).

Antikorlar hemen hemen her kimyasal maddeye karşı üretilebilir ve bu nedenle büyük yapısal çeşitliliğe sahiptirler (Pier GB ve diğ. 2004).



**Çizim 1.2.**Antikor Yapısı. Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd'den alınmıştır.

İnsanlarda beş farklı immünoglobülin sınıfı vardır: IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD (Çizim 1.3.). IgA ve IgG sırasıyla iki ve dördü alt sınıfa ayrılabilir. Bütün immünoglobülinler, bir veya daha fazla disülfid bağıyla birleştirililen 55-70kDa sınıfına özgü ağır zincirlerden (g, m, a, ε and d) oluşur (Maverakis ve diğ. 2015).

			 Salgı Bileşeni		
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Ağır Zincir	$\mu$ (mu)	$\gamma$ (gamma)	$\alpha$ (alpha)	$\epsilon$ (epsilon)	$\delta$ (delta)
Moleküler Ağırlık (Da)	900k	150k	385k	200k	180k
Serumdaki Total Antikor (%)	6%	80%	13%	0.002%	1%
Tamamlayıcı Düzeltme	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Fonksiyon	Birincil yanıt, tamamlayıcıyı düzeltir. Monomer, B hücresi reseptörü olarak görev yapar.	Ana kan antikor, toksinleri nötralize eder, opsonizasyon.	Mukus, gözyaşı ve tükürük salgılar.	Alerji ve anti-paraziter aktivite antikor.	B hücre reseptörü

**Çizim 1.3.**İmmünoglobülin Tipleri. (Anonim 2014)

Bir antikor ve onun antijeni arasındaki etkileşim, yüksek tuz konsantrasyonları, aşırı pH, deterjanlar ve bazen de saf epitopun kendisinin yüksek konsantrasyonları ile rekabeti yoluyla bozulabilir. Antikor molekülü ile antijen etkileşimlerinde elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerin tümü bağlanmaya katkıda bulunabilir (Janeway ve diğ. 2001).

### 1.5. Pankreatitle ilişkili Protein (PAP)

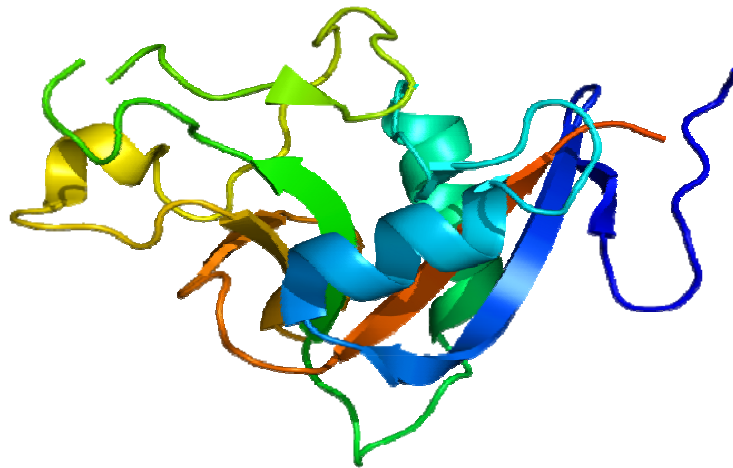
Pancreatitis Associated Protein (PAP), literatürde ve internet ortamında Regenerating Islet-Derived Protein III-Alpha, Regenerating Islet-Derived 3 Alpha, REG-3-Alpha, HIP/PAP, PAP1, PAP adları ile de yer almaktadır.

PAP insanlarda rejenera edici adacık türevi  $3\alpha$  (REG3A) geni tarafından kodlanan bir proteindir. Reg ailesi her biri sadece 16kDa'luk karbonhidrat tanıma bölgesi ve N-terminali salgılama sinyalinden oluşan, ayrı bir memeli C-tipi lektin grubunu oluşturur. Pankreatik adacık hücre rejenerasyonu, pankreatik stellat hücre aktivasyonu ve karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili salgılanan kalsiyum bağımlı bir lektin proteindir. PAP, normal pankreasta az miktarda salgılanan, pankreatitin akut fazı sırasında yüksek miktarda ifade edilen bir proteindir. Bu protein, asiner hücrelerin apikal bölgelerine immüno lokalize olabilir (Li ve diğ. 2016).

C tipi lektinlerden olan PAP, birkaç farklı yaklaşım kullanılarak keşfedilmiştir. Ancak doku dağılımı, fonksiyonu ve düzenlenmesi büyük ölçüde bilinmemektedir. Ancak son yapılan çalışmalar PAP proteininin salgılandığında olgunlaşmış olduğunu ve normal insan dokularında bağırsak ve pankreasın hem endokrin hem de ekzokrin hücre bölümlerinde spesifik olarak dağıtıldığını göstermektedir. (Christa ve diğ. 1996).

### 1.5.1. PAP'ın Moleküler Yapısı

PAP C tipi lektinler ailesi içerisinde tanımlanmış en küçük proteindir (Christa ve diğ. 1994). PAP üç boyutlu yapısı Çizim 1.4.'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar fare ve insan PAP kodlama dizilerinin yüksek oranda korunduğunu göstermiştir (Orelle ve diğ. 1992).PAP'ın birincil yapısı, başka bir pankreas proteini olan reg / litostatin ile anlamlı bir benzerlik ortaya koymuştur ve bakterilerin agregat oluşturma kapasitesini açıklayabilen C tipi lektinlerin karboksil terminal bölgesi ile önemli ölçüde benzerliğe sahip olduğu görülmüştür (Kemppainen ve diğ. 1996). İnsan PAP geni kemirgen-insan hibrit hücreleri ve in situ kromozomal hibridizasyonu kullanılarak kromozom 2p12 ile haritalanmıştır. PAP geni 2748 baz çifti içerir ve kodlama dizisi altı ekzon üzerine yayılır. İlk üç ekzon, sırasıyla olgun proteinin NH<sub>2</sub>-terminal ucunun mRNA'sının 5' kodlanmayan bölgesini, sinyal peptidini ve 39 amino asidini kodlar (Dusetti ve diğ. 1993). Gen TATAAA ve CCAAT 28 ve 52 içeren bir promotöre sahiptir (Dusetti ve diğ. 1994).Diğer üç ekzon, hayvansal lektinlerin karbonhidrat tanıma alanı ile önemli homolojiye sahip bir protein alanını kodlar (Dusetti ve diğ. 1993).



**Çizim 1.4.**PAP Proteininin 3 boyutlu yapısı. (Anonim 2009)

### 1.5.2. PAP'ın Moleküler Fonksiyonları

PAP dizisi, proteinin salgılanmasında yer alacak bir sinyal peptidine bağlı tek bir karbonhidrat tanıma alanından oluşmakta ve karbonhidrat bağlanması için gereken iki kalsiyum iyonunun koordinasyonunu büyük ölçüde düzenlemektedir (Lasserre ve diğ. 1992). PAP herhangi bir oligosakkarit ile seçici ve kovalent olmayan bir şekilde etkileşime giren ve yaklaşık 20 monosakkarit rezidüsü içeren bir molekül olup, glikosidik bağlantılarla bağlanma sağlayabilir. Yine seçici ve kovalent olmayan bir şekilde, peptidoglikan ile bakteri hücre duvarlarında bulunan glikokonjugat sınıfından herhangi bir komponent ile etkileşime girebilir.

İnsanlarda Reg1A, Reg1B, Reg3A (PAP), Reg3G ve Reg4 dahil olmak üzere beş Reg aile üyesi tespit edilmiştir. Pankreatik kanser hücrelerinde Reg1A geninin aşırı ekspresyonunun, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak hızlandırılmış hücre proliferasyonu ve tümör büyümesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Reg3 alt ailesi PAP (Reg3A) ve Reg3G, inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak aktivasyon gösterdikleri için pankreatit ilişkili proteinler olarak bilinir. Son çalışmalarda, PAP'ın JAK2 / STAT3 sinyal yolu yoluyla interlökin-6'ya yanıt olarak pankreatik kanser hücresi büyümesini hızlandığı bildirilmiştir (Li ve diğ. 2016). Pankreas enflamatuvar koşullar altında iken, proinflamatuvar sitokin IL-6'nın IL-6R ile birleştiğinin, JAK2'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmektedir. Bu durumda STAT'ların tirozin fosforilasyonu, dimerizasyonu ve nükleer lokalizasyonu tetiklenmekte, bunu takiben hücrenin doğrudan G1'den S fazı içine ilerlemesini hızlandırmaktadır. Sonuç olarak nükleer protein CyclinD1 ekspresyonunun teşvik edilerek, Bcl familyasının antiapoptozunu ve REG3A proteinlerinin öncü büyüme ekspresyonlarını artırdığı belirlenmiştir (Liu ve diğ. 2015).

PAP'ın en önemli özelliklerinden biri belirtildiği gibi tümör oluşumu sırasında bir onkogen gibi davranmasıdır. Yapılan çalışmalarda, pankreatik adenokarsinomlu hastalarda pankreatik sıvı veya serumda PAP konsantrasyonlarının yüksek olduğu belirlenmiş ve pankreatik dokularda PAP aşırı ekspresyonu pankreatik kanserde tümör aktivitesi ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu için PAP'ın umut verici bir tümör markörü olduğü düşünölmektedir (Wang ve diğ. 2014). PAP'ın aşırı ekspresyonu, yüksek proliferasyon, invazyon, migrasyon, metastazlar ve tümör seviyesi ile ilişkilidir (Liu ve diğ. 2015). PAP'ın, gastrik kanser ve kolorektal kanser dahil olmak üzere birçok kanser türünde etkisinin olduğü bildirilmiştir (Qui ve diğ. 2018). Bunun sebebi PAP'ın artan

ekspresyonu ile tümör boyutunda büyüme, olumsuz farklılaşmalar, tümör evresinin daha hızlı ilerlemesi ve daha düşük sağ kalımla ilişkili olduğu ve azalan ekspresyon ile de hücre migrasyonu ve invazyonunun inhibe edilmesidir (Ye ve diğ. 2016). PAP, fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) / Akt-GSK3 $\beta$  sinyal yolu ekseninde boyunca gastrik kanser hücrelerinin invazyonunu, proliferasyonunu ve apoptozisini düzenleyebilir.

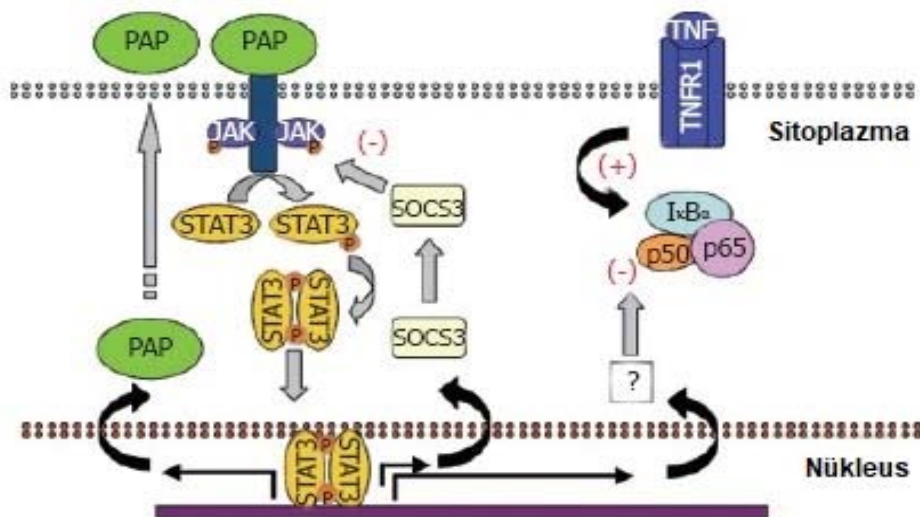
PAP'ın diyabet ve pankreatitte de ekspresyonu önemli ölçüde artmış olduğu için pankreatik inflamasyonda önemli bir rol oynar (Liu ve diğ. 2015). Akut pankreatitte nükleer faktör kapp B (NF- $\kappa$ B) sinyal yollarını aktive ederek kısmen doku koruma fonksiyonu uygular. PAP Akt kinaz ve up regüle eden CyclinD1 / Cyclin-bağımlı kinaz 4 (CDK4) sinyal yolunu aktive ederek hücre büyümesini uyarır (Xu ve diğ. 2016).

PAP'ın bir diğer fonksiyonu bakteriyel proliferasyonun kontrolünde bir antimikrobiyal olarak görev almasıdır. PAP'ın anti bakteriyel ve anti-apoptotik *in vitro* olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *in vivo* olarak kesin biyolojik fonksiyonu açık değildir (Motoo ve diğ. 2001). Antimikrobiyal fonksiyonuna ek olarak, insan PAP'ının fare homologu olan RegIII $\beta$ 'nin ekspresyonu, mukozal hasar ve karaciğer hasarı gibi birkaç doku yaralanmasından sonra arttığı ve doku rejenerasyonunu etkilediği öne sürülmüştür. PAP'ın psoriatik fenotip ile ilgili olduğunu doğrulamak için, imiquimodla indüklenen bir psoriatik fare modeli değerlendirilmiş ve hem mRNA'nın hem de RegIII $\beta$  proteininin kulak veya sırt derisinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu veriler, PAP veya RegIII $\beta$ 'nin, psoriasisin hiperproliferatif keratinositlerinde yüksek oranda eksprese edildiğini, ancak normal deride veya diğer deri enflamasyonu veya hiperproliferasyon formlarında evrensel olarak eksprese edilmediğini göstermiştir (Lai ve diğ. 2012).

PAP, hücre içi veya hücre dışı sinyallerin birleştirilmesi ve sinyalin, membran aktivitesinde bir değişiklik başlatması veya sinyal transdüksiyonunun bir parçası olarak durumunu iletmek için membranın bir tarafından diğerine iletilmesi gibi görevlerde de yer almaktadır. (Gaudet ve diğ. 2011). PAP serum seviyeleri pankreatitin biyolojik belirteci olarak da kullanılabilir. Yapılan birçok araştırmada PAP'ın, yenidoğanlarda Kistik Fibrozis (KF) hastalığının erken teşhisinde belirleyici ajan olarak kullanılabilen önemli bir protein olduğu gösterilmiştir (Sarles ve diğ. 1999; Sommerburg ve diğ. 2014; Iovanna ve diğ. 1994; Barthelmy ve diğ. 2001; Sarles ve diğ. 2005). PAP, topuk kanında ölçülebilen ve pankreastan stres durumlarında salgılanan bir proteindir. Genelde, normal serum PAP konsantrasyonlarının aralığı 0-25 ng/ml (ortalama 12.5 ng/ml)'dir. PAP konsantrasyonunun artışı hastalığın belirteci olarak kullanılmaktadır (Iovanne J.L. 1994).

### 1.5.3. Patolojik Süreçte PAP

PAP'ın, düşük mikromolar konsantrasyonlarda (1, 4) gram-pozitif bakteriler için doğrudan bakteri öldürücü olduğu ve memeli lektinleri için benzersiz bir biyolojik işlev ortaya koyduğu gösterilmiştir. PAP, kısa peptidlerle çapraz bağlanmış alternatif N-asetilglukosaminve N-asetilmuramik asit polimeri olan hücre duvarı peptidoglikanına bağlanarak bakterisit aktivitesini sağlamaktadır. Bu bulgu ile RegIII lektinleri, farklı bir peptidoglikan bağlayıcı protein sınıfı olarak tanımlanmıştır (Lehotzky ve diğ. 2010).PAP'ın aynı zamanda vücut sıvısında antimikrobiyal peptidlerin aracılık ettiği mikroplara karşı immün yanıt oluşumunda ve yine hücre popülasyonunun genişlemesi ile sonuçlanan hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu bilinmektedir (Gaudet ve diğ. 2011). Bunun yanında plazma hücresi membran adezyon molekülleri üzerinden heterofilik hücre-hücre adezyonu oluşumunda da görev almaktadır (Christa ve diğ. 1996). Bunlara ek olarak çok hücreli organizmaların gelişimi, keratinosit farklılaşmasının negatif düzenlenmesi, hücre popülasyonu proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi, keratinosit proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi, yara iyileşmesinin pozitif düzenlenmesi, peptid hormonuna cevap ve bazı organizmalarda hücre duvarı bozulması gibi biyolojik süreçlerin ilerleyişinde PAP etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Gaudet ve diğ. 2011). PAP ile aktive olan anti-enflamatuar yol Çizim 1.5.'te gösterilmektedir.



**Çizim 1.5.**PAP ile aktive olan anti-enflamatuar yol. Closa ve diğ. (2007)'den alınmıştır.

#### 1.5.4. PAP ile Yapılan Klinik Çalışmalar

Akut pankreatit, hafif ve kendi kendini sınırlayan yaralanmalardan şiddetli fulminan nekroza kadar değişen, değişken şiddeti olan bir hastalıktır. Yapılan testlerin (skorlama sistemleri, laboratuvar parametreleri, BT taraması) ağır komplike pankreatiti tespit etmekteki doğruluk seviyelerinin %60 ile %80 arasında olduğu belirtilmiştir. PAP ile yapılan ilk çalışmalar, hafif ve ağır pankreatit vakalarını ayırt etme potansiyeli açısından umut verici olmuştur. PAP normal pankreas sekresyonunda saptanamaz durumda olup pankreatitin akut fazında aşırı eksprese edilebilir durumdadır. Sağlıklı deneklerde (n=103), PAP için ortalama serum değeri  $3.97 \pm 0.32$  mg / l (  $1.32 \pm 9.02$  mg / l aralığı) aralığında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ELISA testinin arka plan değerinden istatistiksel olarak farklı sonuç vermemiştir. Başvuru sırasında, hafif pankreatitli hastaların %34'ü normal PAP değerlerine sahip olmakla birlikte hiçbir zaman komplikasyon geliştirmemiş oldukları bildirilmiştir. Şiddetli pankreatitli hastalarının serumlarının ise her zaman anormal PAP değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan ve literatürden yola çıkılarak akut pankreatitli hastalarda serumdaki PAP değerinin izlenmesinin hastalığın şiddetini oldukça iyi tahmin ettiği sonucuna varılmıştır (özgüllük %68, duyarlılık %47).

Yapılan çalışmalar, PAP ekspresyonunun, pankreatitte bir teşhis yardımıdan ziyade, genel olarak pankreas hücre sel zedelenmesinin erken göstergesi olarak daha fazla potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. PAP pankreasta sadece pankreatik strese yanıt olarak üretilir. Uzun süreli alkol tüketiminden sonra, serum PAP konsantrasyonlarının yükseldiği tespit edilmiştir (Paaanen ve Nordback 1999).

#### 1.5.5. PAP'ın Tespitinde Kullanılan Yöntemler

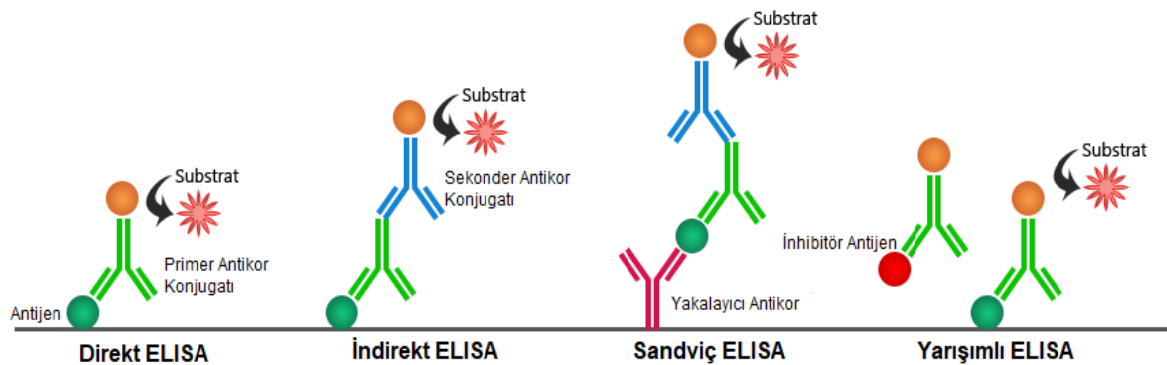
Bağışıklık testleri, antikorların hedef moleküllerin spesifik yapılarına göre bağlanma yeteneklerini görmek amacıyla antikor-antijen etkileşimini temel alan biyokimyasal tespit için kullanılan yöntemlerdir. Antikorlar, belirli bir antijen yapısı veya analit kullanılarak geliştirilmiş ve seçilmiş olduğundan oldukça spesifiktirler ve sadece hedef yapılarına bağlanabilirler (Porsch-Özcürümez ve diğ. 2004). İmmünoblotlama ve Enzim bağlı İmmüno sorbent deneyi (ELISA) yaygın olarak kullanılan bağışıklık testlerindedir.

Western blotlama (protein blotlama veya immünoblotlama), elektroforez sonrası proteinlerin immüno-modülasyonu için güçlü ve önemli bir prosedürdür. 1979'da elektroforezlenmiş bir jelden protein transferi protokolünün başlatılmasından bu yana, protein blotlama büyük ölçüde gelişmiştir (Kurien ve Scofield 2006). Western blot, jel elektroforezinden sonra uygulanabilen moleküler bir tespit yöntemidir. Proteinleri antikor



saptamasına hazır hale getirmek için jelin içinden nitroselüloz (NC) veya poliviniliden diflorürden (PVDF) yapılmış membrana aktarmak gerekmektedir. Ardından membran, sığır serum albümini (BSA) veya kazein gibi reaktif olmayan bir protein ile bloke edilmektedir. Proteinin NC veya PVDF membranına spesifik olmayan bağlanmasının önlenmesinden sonra, hedefe özgü birincil antikor membrana uygulanmaktadır. Ardından enzim ile işaretlenmiş sekonder antikor, antikor-antijen etkileşiminin etiketlenmesi için kullanılmaktadır. Spesifik etkileşim substrat uygulaması ile izlenebilmektedir (Porsch-Özcürümez ve diğ. 2004). Spesifik antikor-antijen etkileşiminin izlenmesi, substratın uygulanmasıyla gerçekleştirilir.

ELISA tekniği, İsveç Stokholm Üniversitesi'nden baş araştırmacı Peter Pearlman ve Eva Engvall tarafından kavramsallaştırılmıştır (Lequin 2005). ELISA tıpta, bitki patolojisinde ve biyoteknolojide teşhis aracı olarak ve çeşitli endüstrilerde kalite kontrolü için kullanılmıştır. ELISA, bir numunede antikor veya antijenin varlığını tespit etmek için immünolojide kullanılan enzim bağlı bağışıklık testi yöntemidir (Crowther 1995). ELISA metodunda basitçe, numuneden alınan antijenler 96 kuyucuklu plak yüzeyine uygulanmaktadır. Antijene bağlanmak üzere yüzeye spesifik bir antikor uygulanmaktadır. Bu antikor bir enzime bağlanmakta ve son olarak enzimin substratını içeren bir madde ortama eklenmektedir. Sonuç olarak, reaksiyon genellikle renk değişikliği olarak saptanabilen bir sinyal üretmektedir (Engvall ve Perlmann 1971). Ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometre cihazıyla saptanabilmektedir. Elde edilen absorbans değeri ürün miktarının saptanmasına olanak sağlamaktadır (Cabrini ve diğ. 1990). Dört farklı ELISA uygulaması vardır; direkt, indirekt, sandviç ve yarışımlı ELISA (Çizim 1.6.).



**Çizim 1.6.**ELISA tipleri. (Anonim 2017)

Direkt ELISA yönteminde, plakanın yüzeyi doğrudan antikor veya antijen ile kaplanmaktadır. Bir enzim ile etiketlenen antikor veya antijen ölçümü sağlamakta olup sinyal, antijen veya antikor miktarını belirlemek için ölçülmektedir (Engvall 2010; Hornbeck 2001).

İndirekt ELISA, 1978 yılında direkt ELISA yönteminden ilham alan Lindström ve Wager tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemin indirekt yöntem olarak adlandırılmasının nedeni, ölçülecek antijeni belirleyen ve ayıran şeyin birincil antikor değil, ortama yerleştirilmiş başka bir antikor olmasıdır.

Bu yöntemde hastalık taşıyan serum, antijen kaplı kuyulara ilave edilmekte ve hasta serumundaki antikorlar plaktaki antijenlere bağlanmaktadır. Ardından antijen-antikor kompleksini görünür hale getirmek için serumdaki antikoru tanıyan ve enzim ile etiketlenen ikincil bir antikor ortama eklenmektedir (Aydın 2015).

Sandviç ELISA yönteminde, kuyular bir yakalayıcı antikor ile kaplanmakta ve örnek, antikorla kaplı plakakuyularına eklenmektedir. Ardından, antijene özgü enzim ile etiketlenen antikorlar eklenmektedir. İlgili protein iki antikor molekülü arasında sıkışmış olduğundan, bu yöntem Sandviç ELISA adı verilir. Sandviç ELISA'ların diğer tüm ELISA'lardan 2-5 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Aydın 2015).

Yarışımlı ELISA yönteminde, kuyuların yüzeyi, antijene özgü antikor veya antikora özgü antijen ile kaplanmaktadır. Ölçülecek olan numune ve enzim etiketli antijen veya antikor aynı anda kuyuya yerleştirilmektedir. Etiketli ve etiketsiz antijen (hasta antijeni) veya antikor molekülleri, kuyucuklardaki antikor veya antijene bağlanmak için birbirleriyle rekabet etmektedir. Analit konsantrasyonu ile elde edilen renklenme yoğunluğu arasında ters bir orantı vardır. Başka bir deyişle, serumda analiz edilen antijenin veya antikorum miktarı düşük olduğunda, daha yüksek miktarlarda absorbans gözlemlenmektedir (Aydın 2015).

## **1.6.Fc Füzyon Proteinleri**

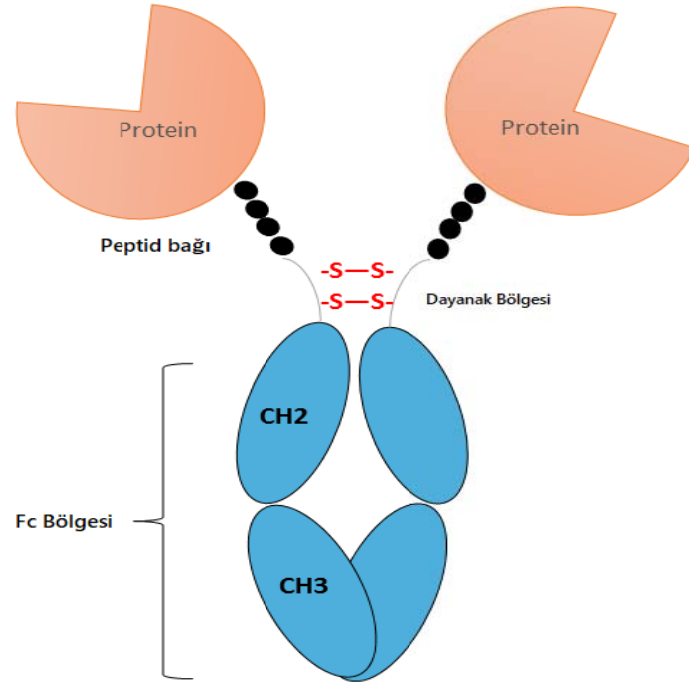
Rekombinant füzyon proteinleri biyolojik araştırmalarda veya tedavi alanında kullanım için rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yapay olarak üretilir (Baldo ve B.A 2015). 1989 yılında ilk bağışıklık yetmezliği (HIV) virüsünün T hücrelerine girmesini engelleyen CD4-Fc-füzyon antagonistlerinin tanımlanmasından bu yana, Fc-füzyon proteinleri, piyasaya sürülen birçok önemli başarı ile bir dizi patolojiyi azaltmadaki etkinlikleri bakımından yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Fc temelli füzyon proteinleri, doğrudan başka bir peptide bağlanan bir immünoglobulin Fc bölgesinden oluşur. Ekli Fc

alanı ayrıca, bu moleküllerin, onkolojik terapilerde ve aşılarda kullanımları için önemli bir özellik olan bağışıklık hücrelerinde bulunan Fc reseptörleriyle etkileşime girmesini sağlar (Czajkowsky ve diğ. 2012). Fc füzyon proteinlerinin genel yapısı Çizim 1.7'de gösterilmiştir.

Fc-füzyonlarla mevcut çalışmanın en büyük odağı terapötik uygulamalarda olmuştur ve son zamanlarda kayda değer birkaç başarı Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.**Klinikte Anahtar Fc-Füzyon proteinleri ve monoklonal antikorlar (mAb). Czajkowsky ve diğ. (2012)'den alınmıştır.

Ticari ad (genel ad)	Açıklama	İlk FDA onayının belirtilmesi	evre	şirket
<b>Fc-füzyon</b>				
Nulojix (belatacept)	CTLA-4, insan IgG1'in Fc değerine kaynaşmıştır.	Organ reddi	FDA Onaylandı (2011)	Bristol-Meyers Squibb
Eylea (afibercept)	VEGFR1 / VEGFR2, insan IgG1'in Fc'sine bağlı	Yaşa bağlı makula dejenerasyonu	FDA Onaylandı (2011)	Regeneron İlaç
Arcalyst (riloncept)	IL-1R, insan IgG1'in Fc değerine kaynaşık	Kriyopirin ilişkili periyodik sendromlar	FDA Onaylandı (2008)	Regeneron İlaç
NPlate (romiplostim)	İnsan IgG1'in Fc'sine kaynaşık trombopoietin bağlayıcı peptid	Kronik immün trombositopenik purpura hastalarında trombositopeni	FDA Onaylandı (2008)	Amgen / Pfizer
Orencia (abatacept)	Mutasyona uğramış CTLA-4, insan IgG1'in Fc'sine kaynaşmış	Romatoid artrit	FDA Onaylı (2005)	Bristol-Meyers Squibb
İyi niyetli (alefacept)	LFA-3, insan IgG1'in Fc değerine kaynaşmıştır.	Sedef hastalığı ve nakil reddi	FDA Onaylı (2003)	Astellas Pharma
Enbrel (etanersept)	TNFR, insan IgG1'in Fc değerine kaynaşık	Romatoid artrit	FDA Onaylı (1998)	Amgen / Pfizer
<b>mAb'ler</b>				
Rituxan / MabThera (rituximab)	Kimerik fare / insan IgG1 CD20'yi hedef alır	B hücreli lenfomalar	FDA Onaylı (2006)	Biogen Idec / Genentech Hoffman-La Roche (Avrupa)
Herceptin (trastuzumab)	HER2'yi hedef alan kimerik fare / insan IgG1'i	Meme kanseri ve gastroözofageal bileşke adenokarsinom	FDA Onaylı (2006)	Genentech
Campath / Lemtrada (alemtuzumab)	B ve T lenfositlerinde CD52'yi hedefleyen hümanize IgG1	B hücresi kronik lenfositik lösemi. Faz III'da da multipl skleroz için denemeler	FDA Onaylandı (2007)	Genzyme
Prolia / Xgeva (denosumab)	Tam insan IgG2 hedefleme RANKL	osteoporoz	FDA Onaylandı (2010)	Amgen
Tysabri (natalizumab)	Hümanize IgG4 hedefleme alfa-4 integrin	Multipl skleroz ve Crohn hastalığı	FDA Onaylı (2004)	Biogen Idec ve Élan
Vectibix (panitumumab)	EGFR, ErbB-1 ve HER1'i hedef alan tamamen insan IgG2	Metastatik kolorektal kanser (mutasyona uğramamış KRAS'lı hastalarda)	FDA Onaylı (2006)	Amgen



**Çizim 1.7.**Fc-Füzyon Protein Yapısı. (Anonim 2015)

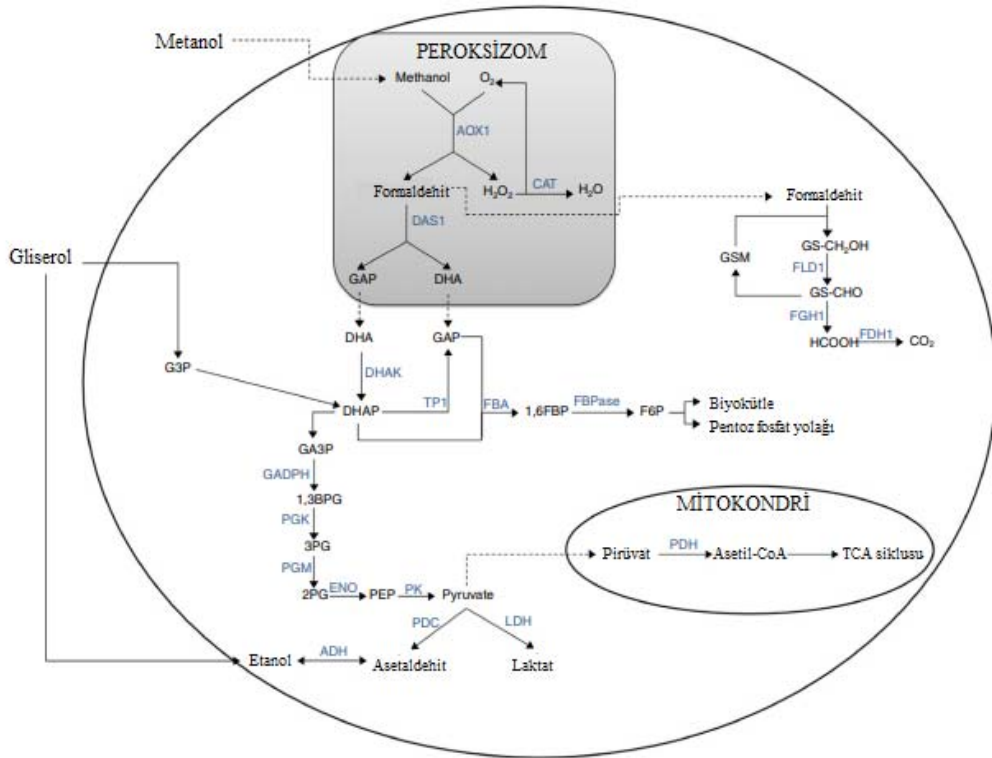
Biyofiziksel bakış açısından, Fc domeni bağımsız olarak katlanır ve ortak molekülün hem *in vitro* hem de *in vivo* çözünürlüğünü ve stabilitesini geliştirebilirken, teknolojik bir bakış açısından, Fc bölgesi protein üretiminde afinite kromatografisi ile protein G / A ile uygun maliyetli etkin saflaştırmaya izin verir (Carter ve P.J. 2011). Bizim çalışmamızda bu nedenle insan Fc bölgesi tercih edilmiştir.

### 1.7. *Pichia Pastoris* X33

*P. pastoris*, genellikle rekombinant DNA teknikleriyle protein üretimi için kullanılan bir mayadır. Bu mayanın protein ifadesi için avantajları arasında fermentatif büyümenin yanı sıra solunumla büyüme için sıkı düzenlenmiş ve etkin promotörlerinin bulunması yer almaktadır.*P.pastoris*, basit alkollü metanol ile büyüeyebilen bir metilotroftur ve diğer mikroorganizmaların çoğunu ve koruyucu sistemlerini öldürebilecek güce sahip, oldukça güçlü metanol solüsyonlarında kolaylıkla yetiştirilebilir (Cregg ve diğ. 2009).*P.pastoris* metanol ve gliserol metabolizma yolağı Çizim 1.8. 'de gösterilmektedir.

*P. pastoris*, ilk olarak 1973'te Philips Petroleum tarafından, tek hücreli proteinin (SCP) hayvansal yem talebini yerine getirmesi için kullanıldı. O zamandan beri çeşitli rekombinant proteinlerin üretilmesi için kapsamlı bir şekilde

araştırılmaktadır. Endüstrileşen enzimler ve biyofarmasötikler dâhil olmak üzere 500'den fazla protein bu ekspresyon sisteminde ifade edilmiş olup, son yıllarda artan sayıda ticari ürün pazara ulaşmıştır (Safder ve diğ. 2018). Bu maya, kolay çoğalması ve genomunun kolayca manipüle edilmesi ile birlikte *E. coli*'nin avantajlı özelliklerinin birçoğuna sahiptir. Fakat bunun yanında ökaryot olması nedeniyle gelişmiş katlanma ve çeşitli post-translasyonel modifikasyon yeteneklerine de sahiptir (Brondyk2009).



**Çizim 1.8.** *Pichia pastoris*'in basitleştirilmiş karbon metabolizması, gliserol ve metanol metabolizmasında yer alan yollardan tanımlanmış enzimler. Zepeda ve diğ. (2018)'den alınmıştır.

### 1.7.1. *P. pastoris* İfade Sistemi

*P. pastoris* kullanılarak yabancı herhangi bir genin ifadesinde üç temel adım vardır:

- 1) Genin ifade vektörüne eklenmesi,
- 2) İfade vektörünün *P.pastoris* konağına girmesi,
- 3) Yabancı genin ifadesi için potansiyel kolonilerin incelenmesi.

*P.pastoris*'teki heterolog protein üretiminin çoğunluğu, metanol metabolizması için gerekli olan enzimlerin sadece hücreler metanol üzerinde büyüdüğüde mevcut olduğu gerçeğine dayanmaktadır (Macaulay 2005). Diğer tüm rekombinant protein üretim sistemlerinde olduğu gibi *P.pastoris* kullanarak rekombinant protein üretmek için plazmid vektörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Plazmidler, çift sarmallı ekstra kromozomal DNA dizileridir ve genellikle konakçı hücrenin çoğaltma makinesini kullanırlar (Del Solar ve diğ. 1998). Plazmidler, otonom bir şekilde, dairesel ekstrakromozomal DNA'yı kopyalarlar ve genelde 15 kb'ye kadar DNA ekini klonlamak için kullanılabilirler (Casali ve Preston 2003). Spesifik yapıları özelliklere sahip olan plazmidler, laboratuvarında klonlama amacıyla yaygın olarak kullanılır. Klonlama için uygun olan vektörlerde genellikle restriksiyon enzimi kesim bölgelerini içeren çoklu klonlama bölgeleri yer alır. Plazmidleri içeren bakteriler, saatler içinde bakteride milyonlarca vektörün kopyasını oluşturabilir ve çoğaltılan bu vektörler, daha fazla manipülasyon için bakterilerden izole edilebilir. Plazmidler, özellikle transkripsiyon vektörleri olarak kullanılabilir ve bu plazmitler, protein ekspresyonu için çok önemli dizilerden yoksun olabilir.

Protein ekspresyonu için kullanılan plazmidler, protein üretimi için temel araçlar olup ifade vektörleri olarak adlandırılır. İfade vektörleri destekleyici, ribozomal bağlanma bölgesi ve başlangıç kodunu gibi bir doğru translasyon başlatma dizisi, bir sonlandırma kodunu ve bir transkripsiyon sonlandırma dizisi gibi protein translasyonu için elementler içerir. (Brown TA 2010; Old ve Primrose 1981). Vektör, güçlendirici ve promotör bölgeler olarak görev yapan ve ekspresyon vektörü üzerinde taşınan genin verimli transkripsiyonuna yol açan düzenleyici sekansları içerecek şekilde tasarlanmıştır (Amann ve diğ. 1983). İyi tasarlanmış bir ekspresyon vektörünün amacı, proteinin verimli üretimidir ve bu, daha sonra proteine dönüştürülebilir önemli miktarda kararlı haberci RNA'nın üretilmesiyle başarılabilir. Bir proteinin ekspresyonu, sıkı bir şekilde kontrol edilebilir ve bazı sistemlerde bir indükleyici kullanımıyla istenen protein yüksek miktarda

üretilebilir (Old ve Primrose 1981). Prokaryotlar ve ökaryotlar arasında protein sentezi sistemlerinde farklılıklar vardır, bu nedenle ekspresyon vektörleri seçilen konak için uygun ekspresyon elementlerine sahip olmalıdır. Örneğin, prokaryot ekspresyon vektörleri, ribozomların bağlanması için translasyon başlama yerinde bir Shine-Dalgarno sekansına sahip olurken ökaryot ekspresyon vektörleri Kozak konsensüs sekansını içerecektir (Kozak 1999).

Promotör, transkripsiyonu başlatır ve bu nedenle klonlanmış genin ekspresyonu için kontrol noktasıdır. Ekspresyon vektöründe kullanılan promotörler genellikle indüklenebilir özelliktedirler. Bununla birlikte gen ekspresyonu, bazı ekspresyon vektörlerinde yapısal (yani protein sürekli eksprese edilir) da olabilir. Sıkı kontrol edilen promotörlere sahip ekspresyon vektörlerinde bile indüksiyon olmadığında düşük seviyeli protein sentezi gözlemlenebilir (Corden ve diğ. 1980). Bir promotör, belirli bir genin transkripsiyonunu düzenleyen DNA bölgesidir. *P.pastoris*'te ifade için kullanılan promotörlerin çoğu, genellikle hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunan metanol metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerden elde edilmiştir. *S. cerevisiae* gibi model maya türleriyle karşılaştırıldığında, *P. pastoris*'te kullanılabilir promotör dizilerinin sayısı oldukça düşüktür ve ayrıca güçlü promotörlerle sınırlıdır. Bununla birlikte, bazı uygulamalar için şaperonların ekspresyonu veya diğer salgılama faktörlerinin ifadesi gibi, daha düşük transkripsiyon aktivitesi olan bir promotör kullanılması daha uygun olabilir (Shen ve diğ. 1998). AOX ve GAP promotörleri *P.pastoris* için kullanılan promotörlerdir.

### **Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAP) Promotörü**

GAP promotörü, çeşitli heterolog proteinlerin sürekli ifadesi için kullanılır (Waterham ve diğ. 1997) ve bu promotörün kullanımı metanol kullanımı gerektirmez (Vassileva ve diğ. 2001). Bu durum büyüme ve indüksiyon işlemi sırasında karbon kaynağının değiştirilmesinin gerekli olmadığı (Cereghino ve Cregg 2000), kültürün uygulanmasının daha kolay olduğu ve sürekli kültürlerin uygulanması için büyük potansiyel gösterdiği anlamlarına gelmektedir (Vassileva ve diğ. 2001). Bununla birlikte, bu promotör sürekli olarak ifade edildiğinden, maya için toksik olan proteinlerin üretimi için iyi bir seçim değildir. GAP promotörünü kullanmanın avantajı, indüksiyon için metanolün gerekli olmaması ve kültür için gereken karbon kaynağını değiştirerek deformasyonun büyümesinin engellenebilmesidir (Haberland ve diğ. 2002). Bununla birlikte, GAP promotörü yapısal olarak eksprese edildiğinden, maya için toksik olan proteinlerin üretimi için iyi bir seçim değildir (Cereghino ve Cregg 2000).

## Alkol oksidaz (AOX) Promotörü

*P.pastoris*, kuvvetle uyarılabilen promotör içeren AOX1 ve AOX2 olmak üzere iki alkol oksidaz genine sahiptir (Daly ve Hearn 2005). *P.pastoris*'te, heterolog genler genellikle metanol kullanım yolundaki ilk enzimi kodlayan ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş olan alkol oksidaz I geninin (AOX1),  $P_{AOX1}$  promotörünün kontrolü altında ifade edilir (Tschopp ve diğ. 1987). AOX enzimi, metanol, etanol ve 1-propanol gibi kısa alifatik alkollerin oksidasyonunu katalizleyen, glukosemettanol-kolin oksidoredüktazlar ailesine aittir. Bazı metilotrofik maya türlerinde AOX, tetramerik ve heksamerik formlara sahip olmasına rağmen, her biri prostetik bir grup olarak kovalent olmayan bir şekilde bağlanmış bir flavin adenin dinükleotit molekülüne sahip sekiz aynı alt birimden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı (600 kDa) bir moleküldür (Zhang ve diğ. 2009). Bu enzim AOX1 geni tarafından kodlanır ve hücre süspansiyonlarındaki metanol oksidasyon hızı ortamda çözünen oksijen konsantrasyonuyla doğrusal olarak orantılı iken  $O_2$  için düşük afinite sunar (Harber ve Veenhuis 1989). AOX, metanol metabolizmasında kilit bir enzimdir ve metanol katabolizmasında ilk adımı kataliz eder: metanolden ortaya çıkan  $H_2O_2$  üretimi ile formaldehite oksidasyonu. Amino asit dizisinde %97 özdeşliğe sahip olan AOX1 ve AOX2 adlı iki izoenzimi sunar, ancak ifadeleri farklı promotörler tarafından kontrol edilir (Zhang ve diğ. 2009). Genellikle istenen protein için olan gen AOX1 promotörünün kontrolü altına sokulur, bu da protein üretiminin metanol ilavesiyle indüklenebileceği anlamına gelir (FitzGerald ve diğ. 1997).

GAP ve AOX promotörlerinin seçimi için avantaj ve dezavantajlar Çizelge 1.2.'da gösterilmiştir.

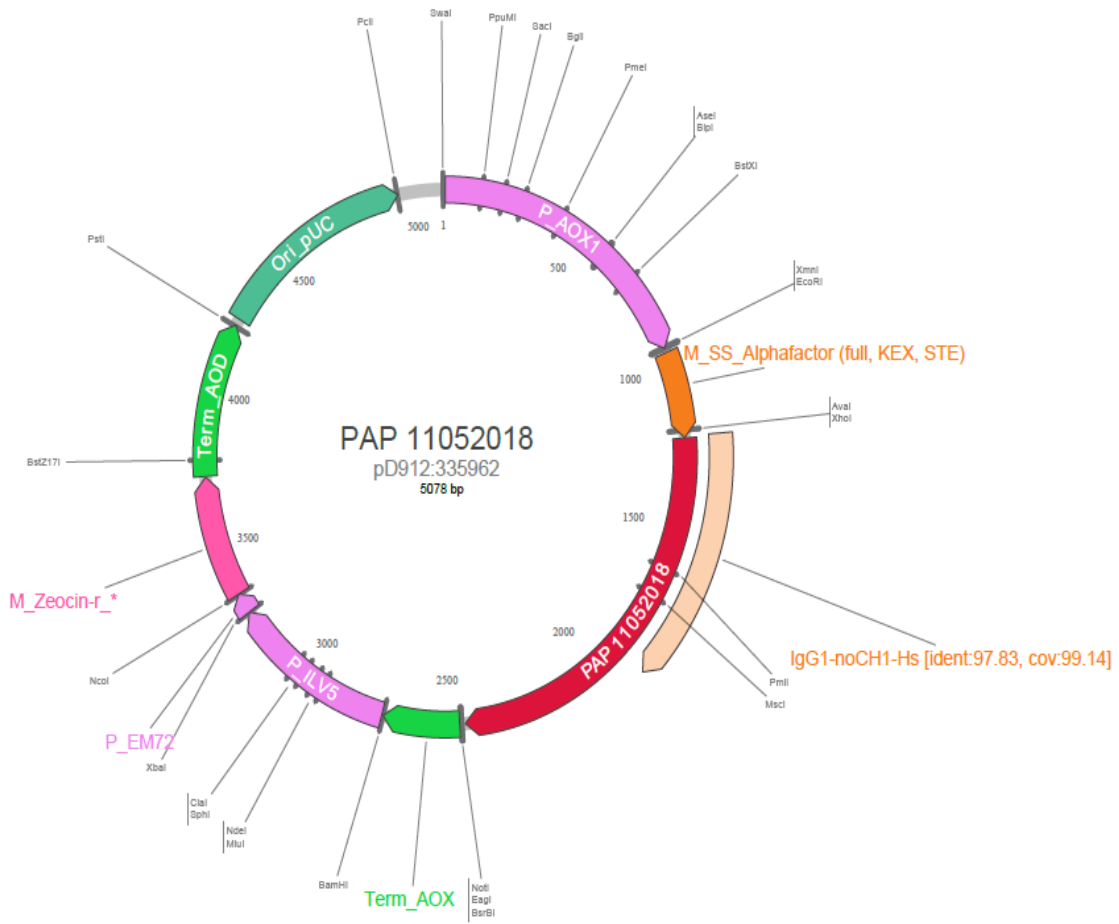


**Çizelge 1.2.**AOX1 Promotör sisteminin kullanılmasında avantaj ve dezavantajlar. Macauley ve diğ. (2005)'den alınmıştır.

<b>AOX1 Promotör sisteminin kullanılmasında avantaj ve dezavantajlar</b>	
<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
Baskılama / indüksiyon mekanizmasının kontrolüyle yabancı proteinin transkripsiyonu sıkı şekilde düzenlenir.	İşlemler sırasında metanolün izlenmesi, problemlerin güvenilmezliği ve ölçümün komplikasyonlarından dolayı genellikle zordur.
Hücre için toksik olsalar bile yüksek seviyede yabancı protein ifade edilebilir.	Metanol yangın tetikleyicisidir; dolayısıyla, işlemler için gerekli olan miktarların büyük ölçekte olması arzu edilmez.
Gen ifadesinin aşırı ifade edilmesinden önce, transkripsiyonun başlangıçtaki karbon kaynağı tarafından baskılanması hücre bölünmesinin verimli gerçekleşmesini sağlar.	Metanol esas olarak, belirli gıda ürünleri ve katkı maddelerinin üretiminde kullanılmaya uygun olmayan petrokimyasal kaynaklardan elde edilir.
Metanol ilavesiyle, transkripsiyonun indüksiyonu kolayca elde edilebilir.	Kesin bir zaman noktasında birinden diğerine geçiş yaparken iki karbon kaynağı gereklidir.

Mayada rekombinant protein üretimi için önemli olan bir diğer parametre proteinin hücre içi / dışı üretilmesidir. Heterolog proteinler hemen hemen tüm durumlarda ya sitoplazmaya hedeflenir ya da tercihen kültür süpernatantına salgılanır. Sitoplazmik ekspresyon, genellikle salgı yollarının potansiyel sınırlamaları söz konusu olmadığından, yüksek ekspresyon seviyelerine yol açar. Bununla birlikte, sitoplazmada ekspresyon ile ilgili birkaç olumsuz özellik mevcuttur. Örneğin, hücrelerin patlatılması üretim sırasında ek adımlar gerektirmektedir (Richardson ve diğ. 1988). Hücreler, genellikle yüksek basınçlı homojenizasyonla (maya hücresi duvarlarının çok sağlam olduğu bilinmektedir) parçalanır, daha sonra lizatın ayrılması gerekir ve ürün, hücresel bileşenlerin sadece bir kısmıdır (Weik ve diğ. 1998). Bu yüzden ilave saflaştırma işlemi yapılmalıdır. Çoğu durumda protein katlanması ve işlenmesi -özellikle disülfid bağ oluşumu- sitoplazmik ekspresyon için ciddi bir sınırlama oluşturur (Mattanovich ve diğ. 2012).

Alternatif olarak, proteinler uygun bir salgılama sinyal dizisi eklenerek salgılanmayı hedefleyebilir. Sekresyon sistemi temel olarak protein miktarını arttırmakla ilgilidir (İdiris ve diğ. 2010). Maya sekresyon sinyali ortamda rekombinant proteinlerin üretimini büyük ölçüde kolaylaştırır. Ayrıca proteaz saldırısını azaltabilir ve proteinlerin doğru katlanmasını sağlayabilir. Vektörler, sekresyon sinyalleri ile veya sekresyon sinyalleri olmadan elde edilebilir. İndüklenebilir (AOX) veya konstrüktif (GAP) promotörü vardır ve antibiyotik direnci taşırlar. *P. pastoris*'e transforme edildiklerinde vektörlerin genomuna entegre olması beklenmektedir. Bu çalışmada kullanılmış olan pD912 vektörünün haritası Çizim 1.9. 'da gösterilmektedir.



**Çizim 1.9.** PAP-pD912 Plazmid Haritası

pD912 vektörü *P. pastoris* genomuna entegre olacak şekilde tasarlanmıştır. Plazmid üzerindeki bölgeler;

Ori\_pUC : Genomda replikasyonun başlatıldığı sekanstır. pUC ori, hücre başına 500 plazmidin daha fazla üretimine izin veren izin veren *E.Coli* plazmid pBR322'den türetilmiş mutasyona uğramış bir orijin formudur.

P\_AOX1 : *P. pastoris*'te kuvvetli ve sıkı regüle edilmiş metanol ile indüklenebilir alkol oksidaz promotörüdür. AOX1 promotörü metanol tarafından uyarılır ve glikoz tarafından baskılanır.

P\_EM72 : EM7 promotörü, *E. coli*'de antibiyotik direnç geninin yapısal ekspresyonunu sağlayan T7 promotöründen türetilmiş bir sentetik bakteri promotörüdür.

P\_ILV5 : ILV5 geninden ILV5 promotörü, güçlü ifadeleri sürdürebilir.

SS\_Alphafactor(full, KEX, STE) : *Saccharomyces cerevisiae*'de maya çiftleşme feromon alfa faktöründen türetilen bir salgı sinyali, mayadaki heterolog proteinlerin salgılanmasını kolaylaştırır.Kex ve ste13 içeren tam alfa faktörü proteininin tam bir formu, bölünme bölgelerini korur.

Zeocin-r : Zeosin direnci, Shble geninin ürünü tarafından sağlanır.Sh ble gen ürünü antibiyotiğe bağlanır, böylelikle artık DNA bölünmesine neden olmaz.Zeosin, bakır iyonu  $Cu^{2+}$  varlığına bağlı olarak mavi renktedir.Zeosin etkisi, aerobik hücrelerin çoğunda etkilidir.Tipik olarak memeli ve maya hücrelerinde 10-30  $\mu g / ml$  vebakteri için ise 25  $\mu g / ml$  kullanılır.

## 2. AMAÇ

Bu tez çalışmasında, PAP antijeninin *P.pastoris* X-33 maya suşunda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretim ve saflaştırma optimizasyonlarının yapılması hedeflenmiştir. Mayada üretimin gerçekleştirilebilmesi için uygun plazmid seçimi ve gen tasarımı büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada pD912 plazmidi seçilmiştir. Kullandığımız indüklenebilir AOX promotörüne sahip plazmid, methanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmıştır. İndüklenebilir plazmid kullanılması üretimin yüksek verimlilikle gerçekleşmesini sağlamıştır. Tasarlanan plazmidde gen bölgesi ve Fc bölgesi arasına eklenen amino asit dizisi saflaştırma işlemi sonrasında PAP proteinini orjinal formatında kullanma olasılığı sunmuştur. Ayrıca rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılan His-Tag işaretlemeye saflaştırma nikel kolonlarla yapılmakta ve üretilen proteinin üç boyutlu yapısına bağlı olarak düşük verimle saflaştırma sorunu ile karşı karşıya kalılabilmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla His-Tag yerine antikorlarda bulunan ve antikorların saflaştırılmasında kullanılan Fc bölgesi PAP proteinine eklenmiştir. Fc etiketli rekombinant protein, hücre kültürü süpernatantından direkt olarak saflaştırılmak istenmiş ve bu doğrultuda bir dizi saflaştırma optimizasyon çalışması yapılması amaçlanmıştır. Fc etiketli protein tıpkı bir IgG antikoru gibi proteinA, proteinG kolonu kullanılarak saflaştırılabilmektedir.

Bu çalışmada, pankreatitle ilişkili hastalıkların tanısında ve KF hastalığının erken tanısında kullanılan ELISA kitleri ile bebek kanlarında biyolojik belirteç olarak bulunan PAP miktarının belirlenmesi çalışmalarında standart olarak kullanılmak üzere rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak PAP üretimi ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Ticari değeri oldukça yüksek olan ve ELISA testlerinde standart protein olarak kullanılan PAP antijenleri, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ülkemizde ilk kez üretilmiştir.

### 3. YÖNTEM

Bu çalışma, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Tanı Teknolojileri Laboratuvarında SBAG destekli 115S124 numaralı 1003 projesi kapsamında yürütülmüştür. Proje kapsamında geliştirilen PAP antijeni immün testlerde ve tanıda standart olarak kullanmak amacıyla geliştirilmiştir.

#### 3.1. Plazmid DNA'sının GF/C filtresinden eldesi

PAP antijeninin ifadesi için indüklenebilir AOX promotörü ve salgılama sinyali içeren pD912 vektörü ATUM firmasına sentezlettilerak temin edilmiştir. Temin edilen DNA'nın tasarımı Çizim 3.1.'de gösterilmektedir. Plazmid vektör filtre kağıdına emdirilmiş olarak gönderilmiştir.

```
OKTHICPCPAPELLOGPSVFLFPKPKDTLNRTPFYTCVVDYSINEDPEVKFNYYDGGVEVHNA
Fc
KTKPREBOYNSITYRVBALTVLNDQWLNQKEYKCKVSNKALPAPEKTSKAKGQPREFOYTLPPSR
Fc
EEMTKNDVSLTCLVWGFYPSIDIAVEWESNGQFENNYKTPPVLDGDDGFFLYSKLTVDKSRWQGN
VFSCSVMEALHNHYTKSLSLSPGKAAANSIDUISNPVDSRRPACKIPNDLKQKVMNHQYKDDDDK
Fc Esnek Baölavıcı FLAG
EFPQRELPSARRCPKQSKAYGSHCTALFLSPKSWTDAQLACQKRPBGNLYSVLQBAEBSFYSSLVK
PAP
SGNSYSYWIQLHDPTQGTQEPNGEOWEYSSSDVWMTFAWERNPSTISSPQNCASLSRSTAFLRWK
PAP
DYKGNVRLPTYCKFTL
PAP
```

Çizim 3.1. PAP Tasarımı ve Dizisi

Filtrenin merkezine doğrudan 50 µl PBS eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 0.6 ml'lik eppendorftüpün altı enjektör ile delindi, 0.6ml'lik tüpe filtrenin yarısı kesilerek yerleştirilmiş ve 1.5ml'lik tüp içine yerleştirildi. 1.5ml'lik 14000 rpm'de santrifüj edildi. Böylelikle filtreye emdirilmiş olan plazmid DNA elüe edilerek 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı. Elde edilen DNA miktarı Nanodrop ile belirlendi.

### 3.2. Kompetent *E.Coli* Top10 Hazırlanması

Top10 hücreler LB agar petriye çizilerek, gece boyu 37°C'de inkübe edildi. Koloni seçimi yapılarak 5 ml LB medium içine inoküle edildi ve gece boyu 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 220 rpm'de inkübe edildi. Sonraki gün 50 ml LB medium içine 5ml hücre kültüründen eklendi ve 37 °C'de çalkalamalı inkübasyon yapıldı. 2 saat kadar bir sürede OD<sub>600</sub>'de 0.48-0.75 değerleri okunmuş olmalıdır. Koşullar sağlandığı takdirde, bakteri kültürü 50 ml falkon içerisine alındı ve 15dk. buzda inkübe edildi. Daha sonra 3800 rpm'de +4°C'de 10 dk. çöktürme işlemi yapıldı. Süpernatant atıldı, pellet 15 ml 0.1M steril buzda CaCl<sub>2</sub> solüsyonu ile çözüldü ve 15dk. buzda inkübe edildi. Daha sonra tekrar 3800 rpm'de +4°C'de 10dk. çöktürme işlemi yapıldı. Süpernatant atıldı, pellet steril buzda 4 ml 0.1M CaCl<sub>2</sub> ve %20 gliserol solüsyonu ile çözüldü. Son olarak -80 °C'de saklanmak üzere 100µl'lik aliquotlar hazırlandı.

### 3.3. *E.Coli*'ye Plazmid Transformasyonu

Tüpler -80'den alınarak buz üzerinde yaklaşık 10 dakika kadar bekletildi. Plazmidler kompetent *E.coli* Top10 üzerine eklenerek üretilerek yaklaşık 30 dakika kadar buz üzerinde bekletildi. Tüpler Thermo Shaker cihazında 42°C'de 1 dakika süreyle ısı şokuna uğratıldı ve tekrar buz üzerine alınarak 5 dakika kadar buz üzerinde inkübasyon yapıldı. Isı şokuna maruz bırakılan *E.coli*'ye 37°C'ye ısıtılmış 800 ul LB ilave edildi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. *E.coli*, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi, 600 µl süpernatant atıldı ve pellet, kalan LB'de çözüldü. Süspanse edilmiş *E.coli* hücreleri, zeosin eklenmiş LB agar içeren petrilere yayıldı ve 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Hayatta kalan ve büyüeyebilen *E.coli*, plazmid transformasyonunun pozitif bir sonucu olarak antibiyotik direnci kazanmış oldu.

### 3.4. Plazmid DNA İzolasyonu

Zeosin içeren LB agar plakalarından seçilen koloni, zeocin ile 5 ml sıvı LB'de inkübe edildi ve gece boyunca 37°C'de 220 rpm'de inkübe edildi. Ertesi gün, *E. coli*'de yetiştirilen plazmidler Thermo Scientific GeneJet Miniprep kiti ile izole edildi.

250µl (RNaz içeren) resüspanسیون solüsyonundaki pellet hücreleri yeniden süspanse edildi. Süspanse hücre mikrosantrifüj tüpüne alındı, pipetajla süspanse edildi. Ardından 250µl lizis solüsyonundan eklenerek gözle görülür değişim olana kadar tüp ters düz edildi. Sonra 350µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve tüp ters düz edildi. 5 dakika santifüj edildi.

Süpernatant pipetlenerek spin kolonuna aktarıldı. 1 dakikalık santrifüj yapılmış istenilen kısım tüpün dibine toplandı. Spin kolona 500µl yıkama solüsyonu eklendi, 60sn. kadar santrifüj edildi istenilen kısım tüpün dibine toplandı. Yıkama solüsyonuyla aynı işlem yinelendi. Spin kolonu yeni bir 1.5ml'lik mikrosantrifüje aktarıldı. Plazmid DNA'yı ayırabilmek için 50µl elüsyon tamponu spin kolon membranı merkezine eklendi. Oda sıcaklığında 4dk. inkübe edilip 2 dk. santrifüj işlemi yapıldı. Kolon atılarak saflaştırılmış plazmid DNA'sı -20°C'de saklandı.

### 3.5. SacI ile Plazmid Kesimi

Maya hücresine transformasyon öncesinde plazmid DNA'nın lineerize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle PAP genini içeren maya vektörü Çizelge 3.1.'de gösterilen kesim reaksiyonu ile kesilerek lineerize edildi.

**Çizelge 3.1.**Kesim Reaksiyonu

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
DNA	20µl
CutSmart®	5µl
SacI	1µl
ddH <sub>2</sub> O	24µl

Bu reaksiyon karışımına 37°C'de 2 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından lineerize plazmid PCR Clean Up kiti kullanılarak temizlendi ve transformasyona hazır hale getirildi.

GenElute PCR Temizleme Kiti, tek iplikli veya çift iplikli PCR amplifikasyon ürünlerinin (100 bp ila 10 kb) fazla primer, nükleotit, DNA polimeraz, tuz ve yağ gibi reaksiyondaki diğer bileşenlerden hızlı bir şekilde saflaştırılması için tasarlanmıştır. Bu kit, silika bağlamanın avantajlarını mikrosipin formatıyla birleştirir ve fenol, kloroform gibi pahalı reçineler veya toksik organik bileşiklere olan ihtiyacı ortadan kaldırır.

1. Toplama tüpü içerisine spin kolonu yerleştirildi. Spin kolonuna 0.5 ml kolon hazırlama solüsyonu eklendi. Kolon hazırlama solüsyonu DNA'nın membrana bağlanmasını maksimize ederek verimi artırır. Ardından 14000 rpm'de 90 saniye santrifüj edildi. Bu kit kullanılarak yapılan tüm santrifüj aşamaları 14000 rpm'de gerçekleştirilmiştir.
2. 1 hacim numune için 5 hacim bağlama solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Solüsyon bağlama kolonu içine aktarıldı. Kolon 14000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Elüat kısmı atıldı fakat toplama tüpü saklandı.
3. Bağlama kolonu toplama tüpü içerisine yerleştirildi. Kolona 0.5 ml seyreltilmiş yıkama solüsyonu eklendi ve 1 dk. 14000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı. Elüat kısmı atıldı, toplama tüpü saklandı.
4. Kolon toplama tüpü içine yerleştirildi. Fazla etanolün uzaklaştırılması için kolon 2 dk. boyunca 14000 rpm'de santrifüj edildi. Elüat ve toplama tüpü atıldı.
5. Kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. Kolonun ortasına 50 µl elüsyon çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyon işlemi yapıldı.
6. DNA'yı ayırmak için, kolon 1 dk. 14000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen elüat içerisinde DNA elde edildi.

### **3.6. Transformasyon**

50'lik falkona 10 ml YPD Broth'a *P.pastoris* X33 suşu ekimi yapıldı ve 1 gece 30°C'da büyütüldü. Büyütülen *P.pastoris*'lerden 200 µl alınarak 200ml sıvı YPD besiyerineinoküle edildi. Hazırlanan kültür bir gece 30°C'de büyümeye bırakıldı. Sonraki gün kültürün A<sub>600</sub> değeri 1,211 olarak belirlendi. Konsantrasyonu ölçülen kültür, her bir transformasyon için  $8 \times 10^8$  hücre olacak şekilde ayarlandı.

Kültürler 50ml'lik falkonlara eşit olarak dağıtıldı. 4000rpm'de, 4°C'de 7dk. süreyle çöktürüldü. Hücreler üzerindeki süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine 40ml dH<sub>2</sub>O eklendi. Hücreler tekrar 4000rpm'de, 4°C'de 7dk. süreyle çöktürüldü, süpernatant uzaklaştırıldı. Her falkon için 2 ml 100mM LiCl, 10mM DTT, 0.6 M sorbitol ve 10 mM Tris-HCl pH 7.5 karışımında süspansiyon edilip oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Bu işlem sonrasında, hücreler 4000rpm'de, 4°C'de 7dk. süreyle çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet +4°C'de muhafaza edilen 50 ml. 1M sorbitolde yıkandı.

Son olarak, hücreler sırasıyla 25 ml, 10 ml ve 5 ml 1M sorbitol ile tekrar yıkanarak, son konsantrasyonu  $10^{10}$  hücre/mL olacak şekilde resüspansiyon edildi. Hücrelerin 1/1000 seyreltmeyle A<sub>600</sub> değeri alındı. Bu değer 0,423 olarak belirlendi.



Bu şekilde hazırlanan *P. pastoris* hücrelerinden 100µl alındı ve lineerize DNA'dan 10 µl ile karıştırılarak 0.2 cm küvette buzda 5 dk. boyunca bekletildi. Bekleme sonrasında hücreler 2kV'de elektropore edildi. Elektroporasyonu takiben küvete, buzda muhafaza edilmiş 1M sorbitolden 1 ml eklendi. Bu karışım 30°C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle karıştırıldı. Daha sonra 1M 1 ml YEPD eklendi ve 30°C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle karıştırıldı. Tüm karışım 100µg/mL Zeocin içeren petrilere ekilerek 4 gün süreyle 30°C'de büyümeye bırakıldı.

### **3.7. Zeosin Seçilimi**

Ekim için 0.5 mg/ml, 1 mg/ml ve 5 mg/ml olacak şekilde farklı zeosin miktarları içeren üç çeşit YPD agar hazırlandı. Her petri 8 eş bölgeye ayrılıp, numaralandırıldı.

96'lık steril plate'e 50 µl/kuyu steril dH<sub>2</sub>O eklendi. Büyüyen kolonilerden steril pipet ucuyla alınıp dH<sub>2</sub>O bulunan kuyularda pipetaj yapıldı. Kuyulardan 5'er ul alınıp, numaralandırılmış bölgelere çizilerek ekildi. Petriler 30°C'de inkübe edildi. Gün sonunda YPDS agarlara PAP için 5 mg/ml zeocin içeren petriden koloni seçimi yapıldı. Petri 30°C'de 4 gün süreyle inkübe edildi.

### **3.8. *Pichia Pastoris* 'te Protein Ekspresyonu**

1. YPDS agar petrilerinden seçilen koloni steril 250 ml'lik erlen içerisinde 25ml BMGY ortamına inoküle edildi. OD 600 değeri 2-6'ya ulaşınca kadar 30°C'de çalkalamalı inkübatörde işleme devam edildi.

2. Hücreler uygun OD değerine ulaştığında gliserol stok hazırlandı. 25 ml hücre kültürünün 800 µl'si 2 ml'lik cryo tüpe aktarıldı ve 200 ml steril %50 gliserol eklendi. Gliserol stoklar dondurularak -80°C'de muhafaza edildi.

3. 25ml'lik kültürün geri kalanı 50ml'lik falkona aktarıldı ve 3800 rpm'de 12 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp kalan BMGY besiyerinin uzaklaşması için tüpler steril zemin üzerinde baş aşağı bekletildi. Hücre agregatını yıkamak ve kalan ortamı uzaklaştırmak amacıyla 20 ml BMMY ile ortam yeniden süspansiyon edildi, gliserol kalması durumunda sonraki ifade engellenebilir. Bu işlemin ardından oda sıcaklığında 3800 rpm'de 12 dakika boyunca çöktürme işlemi yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Ekspresyonun indüklenmesi ve OD 600 değerinin 1.0'e ulaşması için 1 litrelik erlen içerisinde 200 ml BMMY ortamına hücre agregatı süspansiyon edildi. Şişe kalaycı pamuğu ile örtüldü ve 30°C'de çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı. Yeterli havalandırma, metanol indüksiyonu sırasında verimli ekspresyon için önemli bir parametredir. Bu

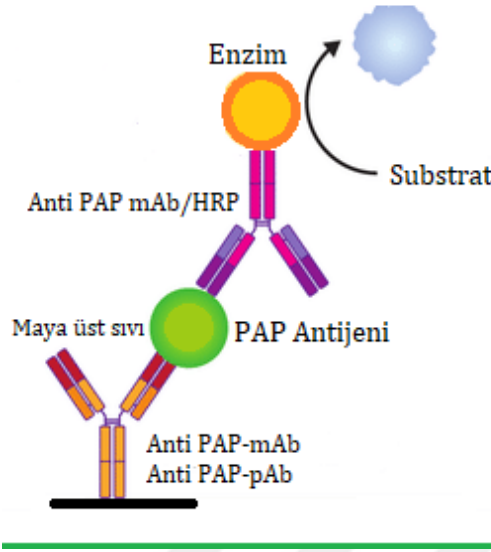
nedenle birkaç sistem denendi ve en verimli olan yöntem kalaycı pamuğu olduğu için bu metodla devam edildi.

5. İndüksiyonu korumak için her 24 saatte bir total hacmin % 0.5'i kadar steril metanol eklendi.

6. Ekspresyonun başlamasından sonraki belirli zaman noktalarında (bizim çalışmamızda 24, 48, 72 96. saatler) kültürün 1 ml'si 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Oda sıcaklığında 13200 rpm'de 7 dakika süreyle santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatantlar ayrı bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj türüne aktarıldı. Farklı zaman noktalarından alınan numuneler, indüksiyondan sonra protein ekspresyonu için en uygun zaman periyodunu belirlemek üzere SDS-PAGE ve immünblotlama ile analiz edildi.

### **3.9. SandviçELISA**

ELISA testi için 100ng/kuyu olacak şekilde anti-PAP rabbit monoklonal antikoru (mAb) ile tabana kaplama işlemi yapıldı. +37°C'de 1 saat inkübasyon işlemi yapıldı. Antikorla kaplanmış olan kuyular daha sonra PBS içinde 0.5% Tween 20 içeren yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı ve +4°C'de gece boyunca %1 Hammerstein Kazein,%1.5 PVP (Polivinilpirolidon) ve 40 µl/ml 1M NaOH ile inkübe edildi.Sonraki gün bloklanmış plate 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra kuyulara 100'er µl maya üst sıvısı eklendi ve 1 saat boyunca +37°C'de inkübasyon işlemi yapıldı. Ardından yıkama tamponuyla 3 yıkama yapıldı ve TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Tanı Teknolojileri Laboratuvarı'nda daha önceden üretilmiş HRP işaretli anti-PAP antikoru 300ng/kuyu olacak şekilde kuyulara yüklendi. 1 saat +37°C'de inkübasyon işlemi yapıldı ve 1 saatin sonunda plate 3 kere yıkandı. Sonrasında 1:10000 konsantrasyonda streptavidinde 20 dakika +37°C'de inkübe edilen plak 5 kere yıkandı ve daha sonra TMB substratı ile inkübe edildi.Renk oluşumundan sonra, reaksiyon 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile durduruldu. Elde edilen görüntü 450 nm'de okundu. Yapılan sandviç ELISA genel şeması Çizim 3.2.'de gösterilmektedir.



**Çizim 3.2.**Sandviç ELISA

### 3.10.SDS-PAGE

Protein veya polipeptidlerin molekül ağırlıklarına göre jelde elektrik akımı ile tespit edilmesini sağlamaktadır. İlk aşamada cam plaklar alkol ve saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Cam plaklar aparata yerleştirildi. SDS-PAGE jel içeriği EK 4.'te verilmiştir. Üst jel hazırlandıktan sonra cam plaklar arasına pipetlendi ve jelin üst kısmının pürüzsüz olması için üzerine izopropil alkol kondu. Jel polimerize olduktan sonra saf su ile yıkama yapıldı ve kurutma kağıdı ile jele değmeden alkol uzaklaştırıldı. Üst jel hazırlanıp alt jelin üzerine eklendi ve taraklar yerleştirildi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra taraklar çıkarıldı. Kuyular önce saf su ile daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı ve tanka yerleştirildi. Numuneler belirlenen miktarda yükleme boyası ile karıştırılıp kuyulara yüklendi. Tank kapağı kapatılarak elektrotlar uygun şekilde bağlandı ve belirli süreyle yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel çalışmanın niteliğine göre farklı metodlarla analiz edildi.

#### 3.10.1. Gümüş Boyama

Jel 1 saat boyunca veya gece boyu fiksasyon tamponunda çalkalayıcıda inkübe edildi. 20'şer dakika olmak üzere %50 EtOH tamponunda 3 kere yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda jel 1 dakika ön muamele tamponuyla muamele edildi ve hemen sonra 20'şer

saniye olmak üzere 3 kere dH<sub>2</sub>O ile yıkama işlemi yapıldı. Ardından jel bant fiks tamponunda 20 dakika boyunca çalkalayıcıda bırakıldı. Sonrasında 2 kez olmak üzere dH<sub>2</sub>O ile 20'şer saniye yıkama işlemi yapıldı. Ardından jel geliştirme tamponu ile muamele edildi ve bantlar gözlenene kadar bu işlem sürdürüldü. Bantlar gözlemlendiğinde 2 kez 2'şer dakika boyunca dH<sub>2</sub>O ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Geliştirme işleminin durdurulması amacıyla jel durdurma tamponu ile muamele edildi. Sonrasında gözlemlenen bantlar taranarak değerlendirmeye alındı.

### **3.10.2. Western Blotlama**

-Bu işlem için öncelikle SDS-PAGE jeller Transblot cihazında transfer tamponu yardımıyla 2A, 20V ve 20dakika parametreleri kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. Ardından membrana en az 1 saat olmak üzere veya gece boyu +4°C'de %1'lik süt tozu ile çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi yapıldı. Bu işlemi takiben membran 10'ar dakika olmak üzere 3 kere TBS-T tamponu ile yıkandı ve TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojileri Laboratuvarı'nda geliştirilmiş olan 75µl anti-PAP 9B7 antikoru 30ml TBS tamponu ile sulandırılarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde muamele edildi. Ardından 3 kere 10'ar dakika boyunca TBS-T tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 1/10000 oranında TBS tamponu içerisinde sulandırılan Alkalen fosfataz/Peroksidaz işaretli anti-fare IgG ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Membran 10'ar dakika olmak üzere 5 kere TBS-T tamponu ile yıkandı. Ardından, ikincil antikorun alkalen fosfataz ile işaretli olduğu durumda bantlar gözlenene kadar membran 10ml dH<sub>2</sub>O'de çözdürülen NBT/BCIP tablet substratı ile muamele edildi ve değerlendirme işlemleri yapıldı. İkincil antikorun peroksidaz ile işaretli olduğu durumda ise AEC substratı kullanıldı.

### **3.11. Amonyum Sülfat Çöktürme**

Maya üst sıvısına salınan PAP antijenini yoğunlaştırmak amacıyla ilk adımda Amonyum sülfat çöktürme metodu kullanıldı. Üst sıvının 2,5 katı kadar amonyum sülfat çözeltisi +4°C'de düşük miktarlarda eklendi ve manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. 4 saat boyunca +4°C'de üst sıvı ve amonyum sülfat karıştırılarak inkübe edildi. Daha sonra karışımlar uygun tüplere alınarak 9500rpm'de, +4°C'de, 35 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet 3ml PBS'te çözüldü ve diyaliz işlemi gerçekleştirildi.

### **3.12. Diyaliz**

Diyaliz işlemi için solüsyon olarak saflaştırma işleminde kullanılan bağlama tamponu kullanıldı. Diyaliz membranı içine alınan örnek 1 litre bağlama tamponu bulunan mezürde manyetik karıştırıcı yardımıyla +4°C'de bekletildi. 1 gün gece boyu ve sonraki gün 2 kere solüsyon değiştirildi. Diyaliz membranı içerisinde alınan örnek üzerinde değerlendirme işlemleri yapıldı.

### **3.13. Saflaştırma**

Üretilen rekombinant antijenlerin, maya üst sıvısında bulunan diğer proteinlerden ayrılabilmesi için Fc kuyruğuna bağlanan Protein A ve Protein G immünoafinite kolon kromatografisi (manuel veya NGC BioRad sistemi) ile saflaştırma çalışmaları yapıldı. Amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı ve diyaliz edilmiş protein fraksiyonları 13200 rpm'de 7 dakika süreyle santrifüj edildi ve üst sıvı ayrı tüpe alındı. Ayrılan üst sıvı 1:1 oranda bağlama tamponu ile karıştırıldı. Protein ve bağlama tamponu karışımı 0,45 µm filtreden geçirilerek kolona verildi. Kolondan önce kolonun 5 katı hacminde bağlama tamponu, ardından bağlama tamponu ile aynı oranda karıştırılmış saflaştırılacak örnek, ardından absorbans değeri sıfırlanana kadar tekrar bağlama tamponu ve kolon materyaline bağlanmış olan proteinleri toplamak için absorbans değeri sıfırlanana kadar elüsyon tamponu verildi.

Elüsyon fraksiyonlarda beklenen absorbans değerlerini içeren eppendorf tüplerine 75 µl denge tamponu eklendi. Kolon tekrar kullanılmak üzere %20 etanolden geçirildi ve +4°C'de muhafaza edildi. Kromatografi sonucu elde edilen fraksiyonlar protein aktivitesi, bağlama ve elüsyon performansının belirlenmesi amacıyla ELISA testi ile kontrol edildi.

### **3.14. Liyofilizasyon**

Saflaştırma işleminin ardından yüksek yanıt veren antijen fraksiyonları bir araya getirildi ve dH<sub>2</sub>O'ya karşı +4°C'de diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz tüpü içindeki protein içeren sıvı falkona aktarıldı ve falkonun ağzı parafilm ile kapatıldı. Daha sonra parafilm üzerinde küçük delikler açıldı. Örnekler bir gece boyunca -80°C'de donduruldu. Dondurma işlemi sonrası liyofilizatör cihazında liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

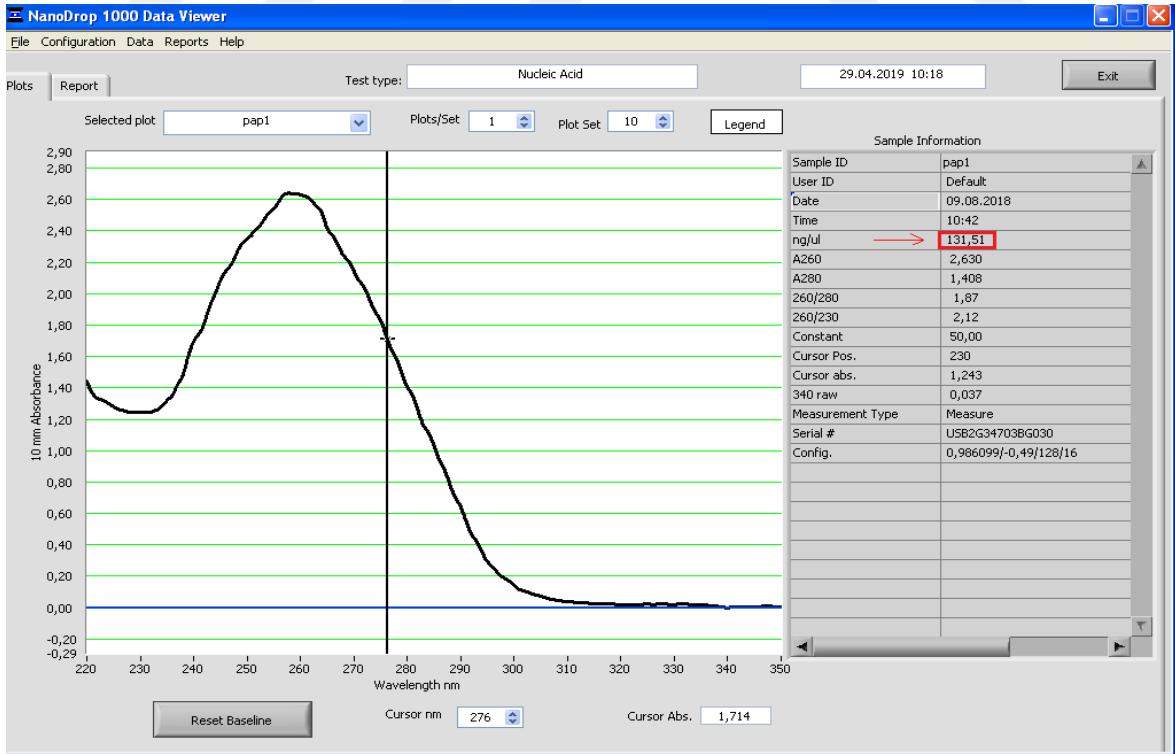
## 4. BULGULAR

### 4.1. *E.Coli*'ye Transformasyon

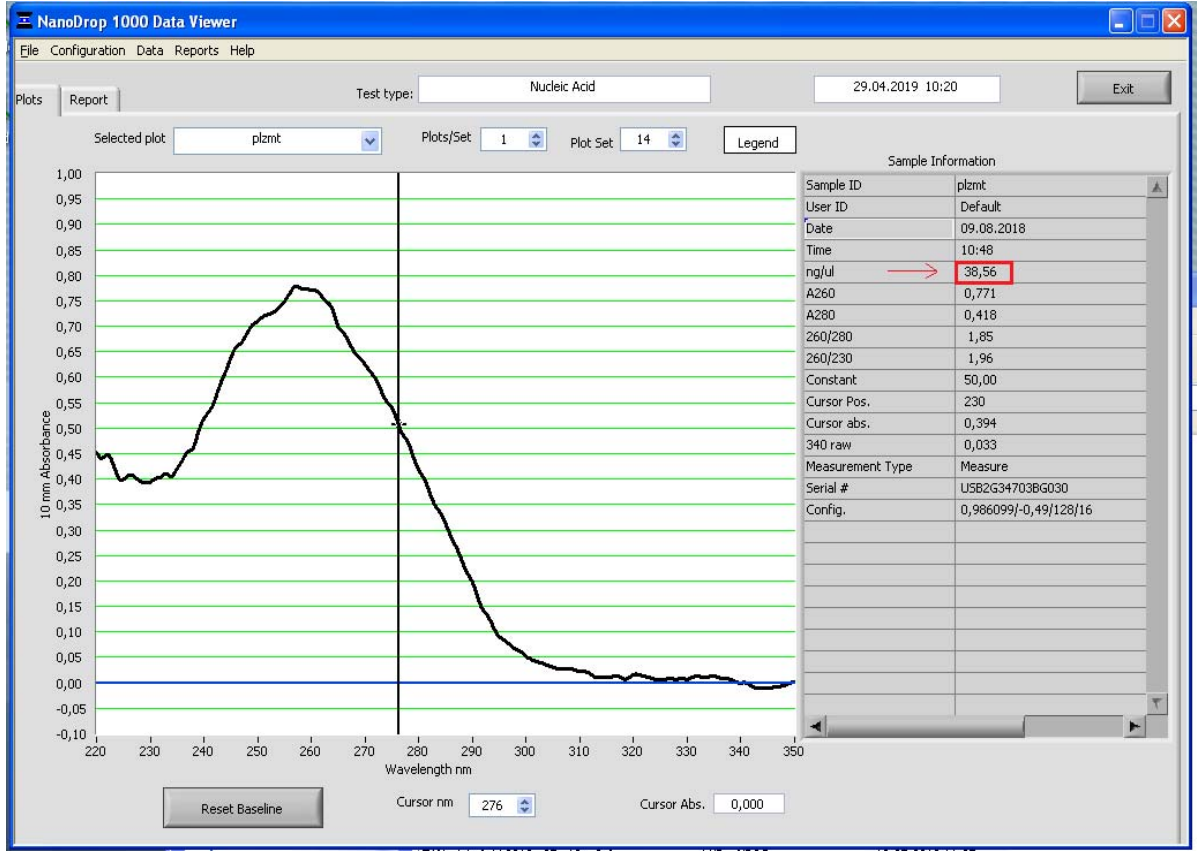
Zeosin, bakterilerin varlığını sınırlayan bir antibiyotiktir. Koloniler zeosinli düşük tuzlu LB petrilerinde dirençli olarak başarıyla büyütüldü. pD912 vektöründe var olan zeosin direnç geni, bakterilerin petri üzerinde hayatta kalmalarını sağlamıştır. Ligasyon başarı ile gerçekleştirilmiştir.

### 4.2. Plazmid DNA İzolasyonu

PAP genleri ve pD912 plazmid vektörünü çoğaltmak adına *E.coli* ile bakteriyel transformasyon gerçekleştirildi. Bunu takiben gece boyu inkübe edilen ve antibiyotikli LB petrilerinden bir koloni seçildi. Sonraki gün, plazmidler izole edildi ve konsantrasyonları NanoDrop'ta ölçüldü. İzolasyon sonucu 131,51 ng/μl PAP ve 38,56 ng/μl pD912 plazmidleri izole edildi (Çizim 4.1. ve Çizim 4.2.).



Çizim 4.1.PAP konsantrasyonu, NanoDrop ölçümü. ( 131,51 ng/μl )



**Çizim 4.2.**pD912 Plazmid konsantrasyonu, NanoDrop ölçümü. ( 38,56 ng/µl )

Plazmidler, Thermo Scientific GeneJet Miniprep plazmid izolasyon kitinin talimatları izlenerek başarıyla izole edildi.

### 4.3. Pichia Pastoris X33'te PAP Üretilmesi ve Saflaştırılması

#### 4.3.1. PAP Geninin Mayaya Transformasyonu

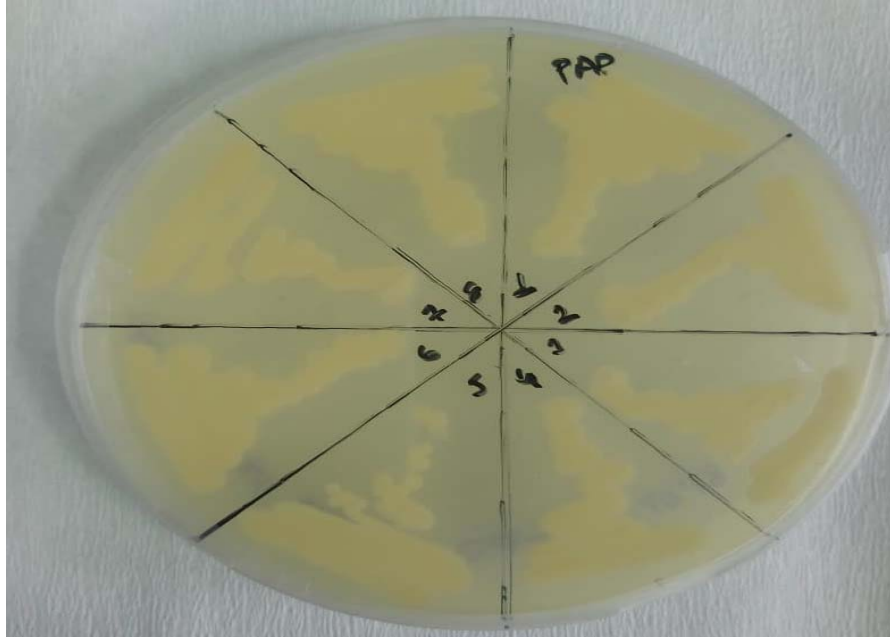
Transforme edilen mayalar, zeosin içeren YPD petrisinde hayatta kaldı. PAP izoformunun transformasyonu başarıyla gerçekleştirildi (Çizim 4.3.).



**Çizim 4.3.**Hayatta kalan pd912-PAP kolonileri. (*Pichia Pastoris* X33 suşu, zeosin içeren petri)

#### 4.3.2. PAP Üreten Maya Kolonilerinin Seçimi

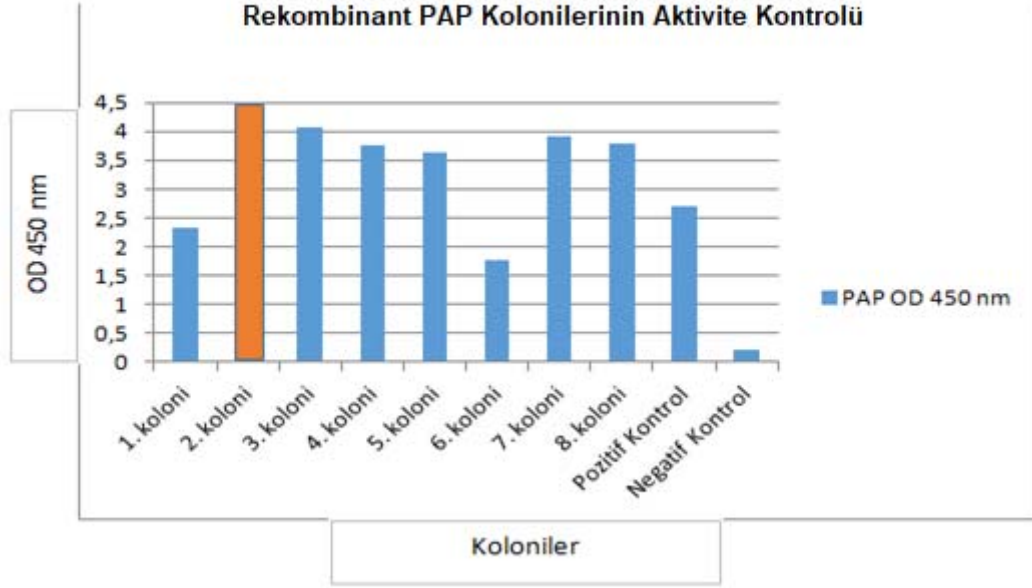
İncelenen 8 farklı koloniden tümünün başarıyla PAP ürettiği tespit edildi (Çizim 4.4.).



**Çizim 4.4.**Zeosin direnci için test edilen 8 farklı koloni

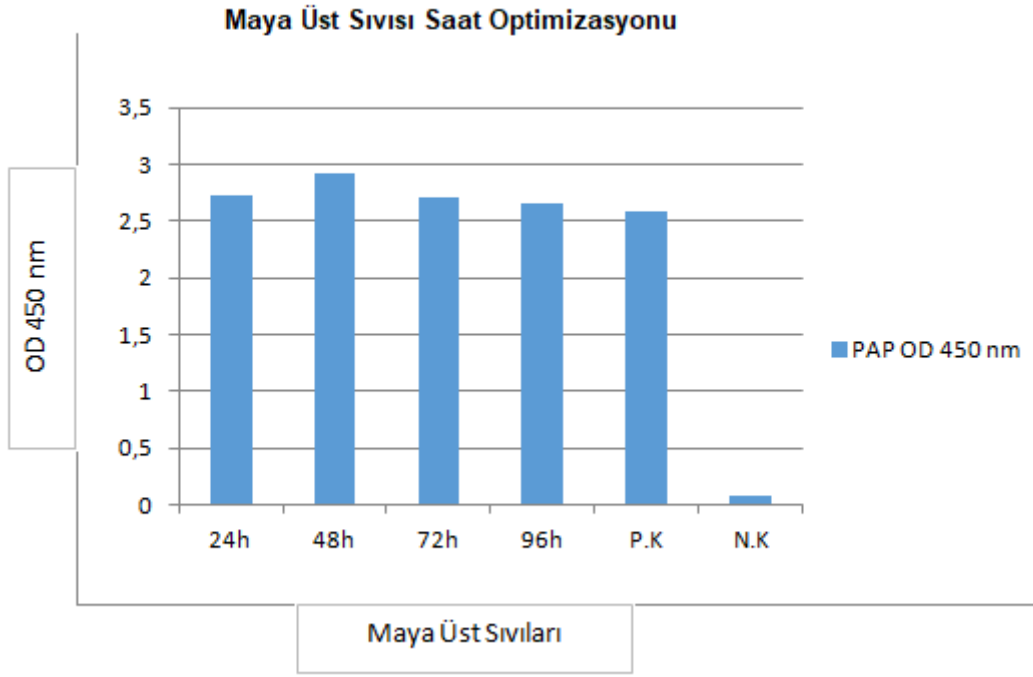


Petriden toplanan 8 ayrı koloni için ayrı ayrı 50 ml'lik falkonlarda sıvı BMGY / BMMY ortamında 96 saatlik büyütme işlemi yapıldı. Sandviç ELISA testinde en yüksek yanıtı veren koloni seçildi(2. koloni)(Çizim 4.5.). İlerleyen adımlarda 2. koloni ile çalışmalara devam edildi.

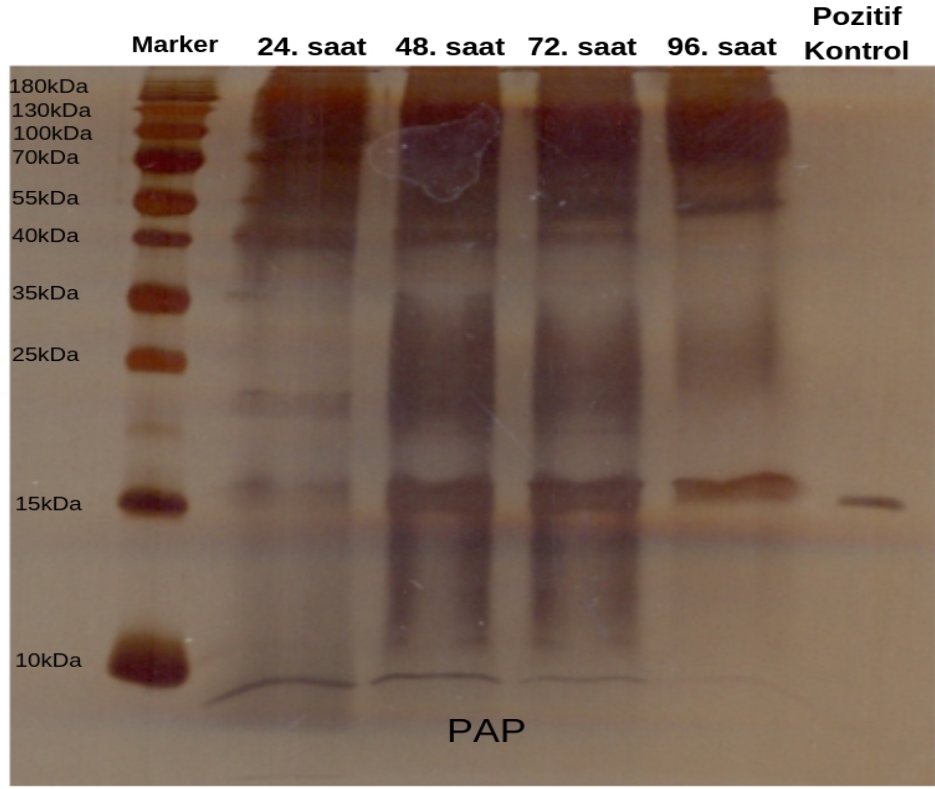


**Çizim 4.5.** Sandviç ELISA ile transforme edilmiş PAP maya üst sıvılarından elde edilen OD450 değerleri

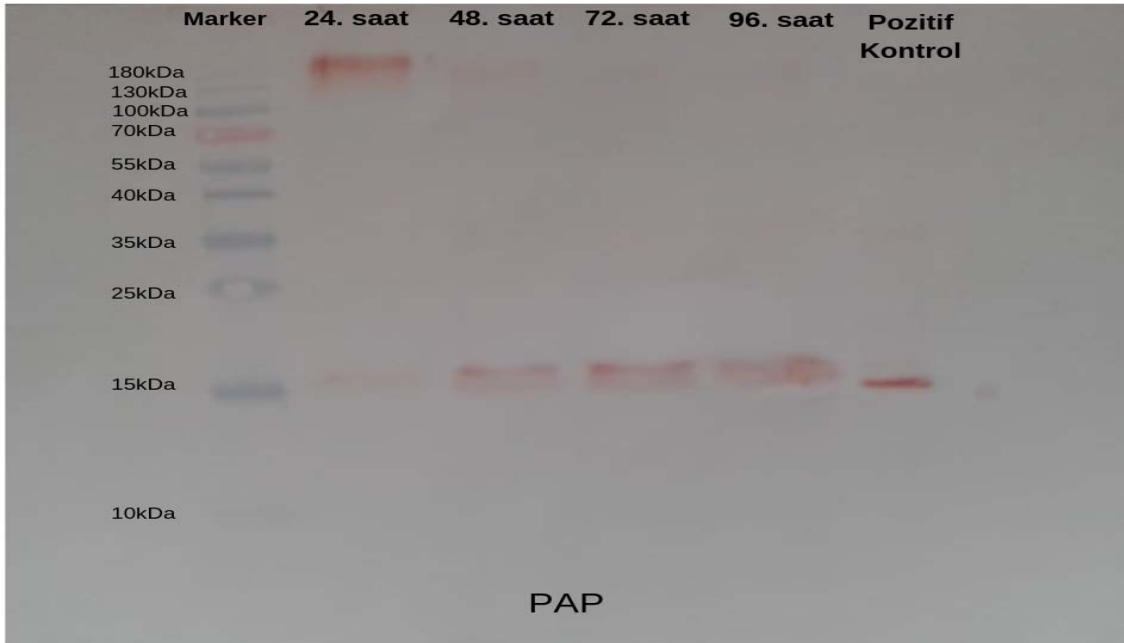
Fonksiyonel olarak tanımlanan PAP proteinlerinin optimum kültür zamanlarının tespiti için 24 saatte bir metanol ile indüksiyon işlemi yapıldı (Çizim 4.6.). Her 24 saatte bir toplanan üst sıvılar SDS-PAGE ve western blot ile analiz edildi. SDS-PAGE ve western blot analizleri, %15 SDS-PAGE jeller kullanılarak yapıldı (Çizim 4.7.). Hazırlanan jellere 15 µl örnek, 5 µl yükleme boyası karıştırılarak yüklendi. Pozitif kontrol olarak 1 µg PAP ve belirteç olarak da 2,5 µl Thermo protein markerı kullanıldı. Proteinler 90V'dan başlamak üzere kademeli olarak 120V'a yükseltılarak yaklaşık 90 dakika kadar yürütüldü. Jellerden biri gümüş boyama ile diğeri PVDF membrana aktarılarak Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi (Çizim 4.8.).



**Çizim 4.6.** Rekombinant PAP Antijeninin saat optimizasyon sonuçlarının sandviç ELISA'da OD450 değerleri



**Çizim 4.7.**Rekombinant PAP antijeninin SDS jel gümüş boyama görüntüsü

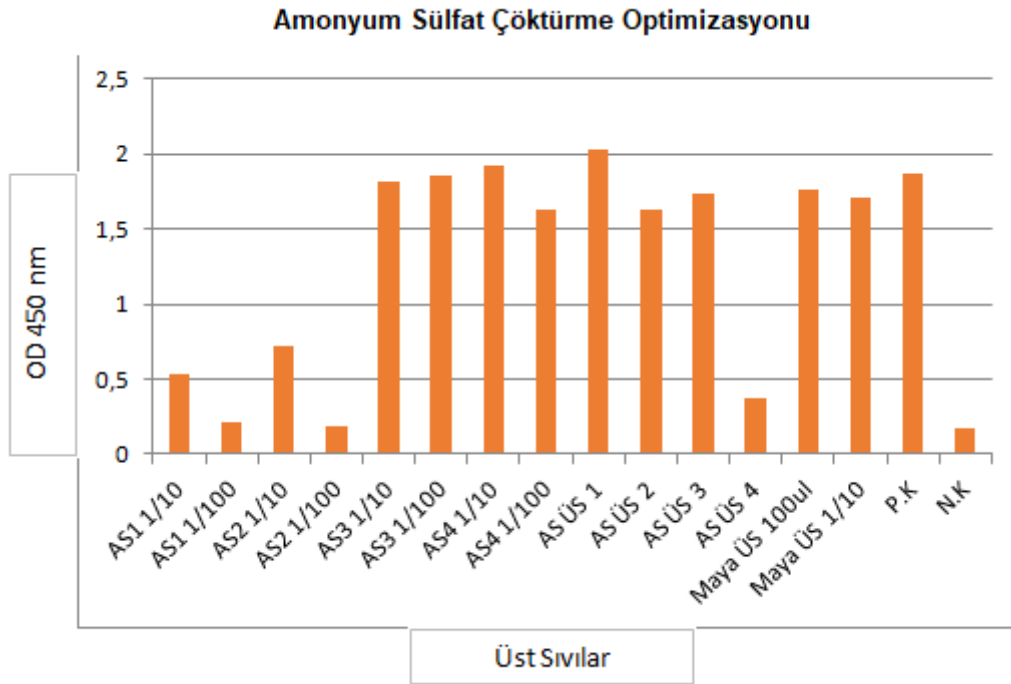


**Çizim 4.8.**Rekombinant PAP antijeninin immünoablottlama görüntüsü

SDS-PAGE, immüblotlama ve ELISA sonuçlarına göre rekombinant PAP proteinin üretimi için en uygun zamanın 72 saatlik indüksiyon olduğu belirlendi. Rekombinant PAP proteini 72. saat sonunda hem stabil hem de aktif durumdadır.

#### 4.4. Amonyum Sülfat Çöktürme Optimizasyonu

Üretilen proteinin konsantre edilmesi, saflaştırılması ve saklama aşamasında kolaylık sağlaması amacıyla amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulandı. Yanıt alındığı bilinen maya üst sıvıları farklı miktarlarda doyurulmuş amonyum sülfat ile muamele edildi. Optimizasyon çalışması için minimum miktarda numune ile çalışıldı. Her 1 ml maya üst sıvısına 1:1 kat, 1:1,5 kat, 1:2 kat ve 1 : 2,5 kat olacak şekilde doyurulmuş amonyum sülfat çözeltisi ile çöktürüldü. Sandviç ELISA sistemi ile üst sıvılar test edildi. En verimli sonucun 1 ml örnek için 2,5 ml doyurulmuş amonyum sülfat eklendiği durumda elde edildiği belirlendi. Rekombinant maya üst sıvılarının analiz edildiği sandviç ELISA testi sonuçları Çizim 4.9.'da gösterilmektedir.



**Çizim 4.9.** Rekombinant PAP maya üst sıvılarının farklı doymuş amonyum sülfat miktarlarıyla sandviç ELISA OD 450'de çökme değerleri

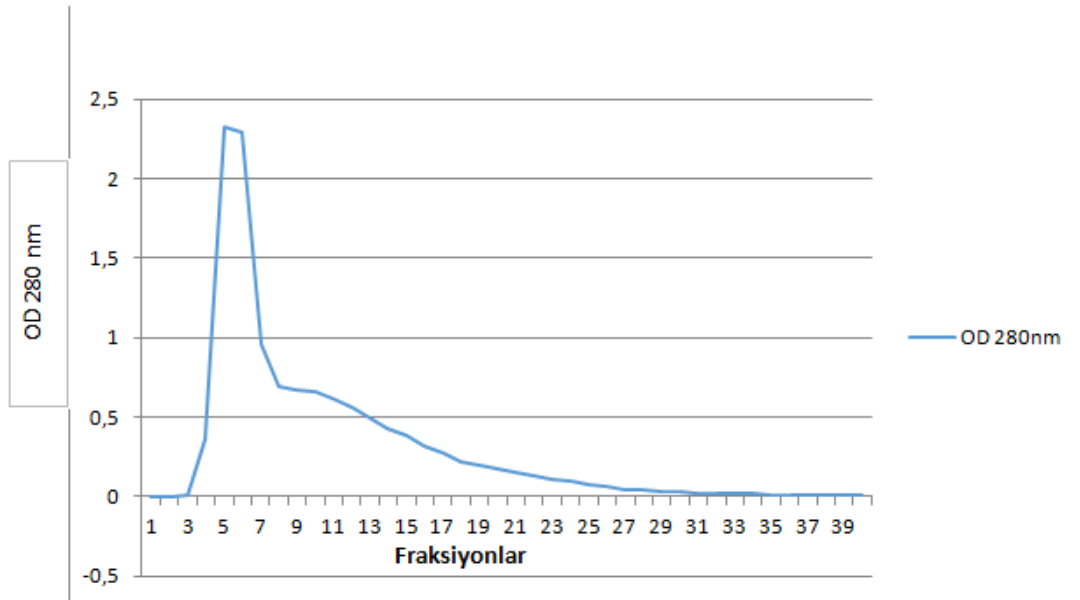
(AS1 = 1 ml Maya üst sıvı + 1 ml Doymuş Amonyum Sülfat , AS2 = 1 ml Maya üst sıvı + 1,5 ml Doymuş Amonyum Sülfat, AS3 = 1 ml Maya üst sıvı + 2 ml Doymuş Amonyum Sülfat, AS4 = 1 ml Maya üst sıvı + 2,5 ml Doymuş Amonyum Sülfat)

#### 4.5. PAP'ın Saflaştırılması

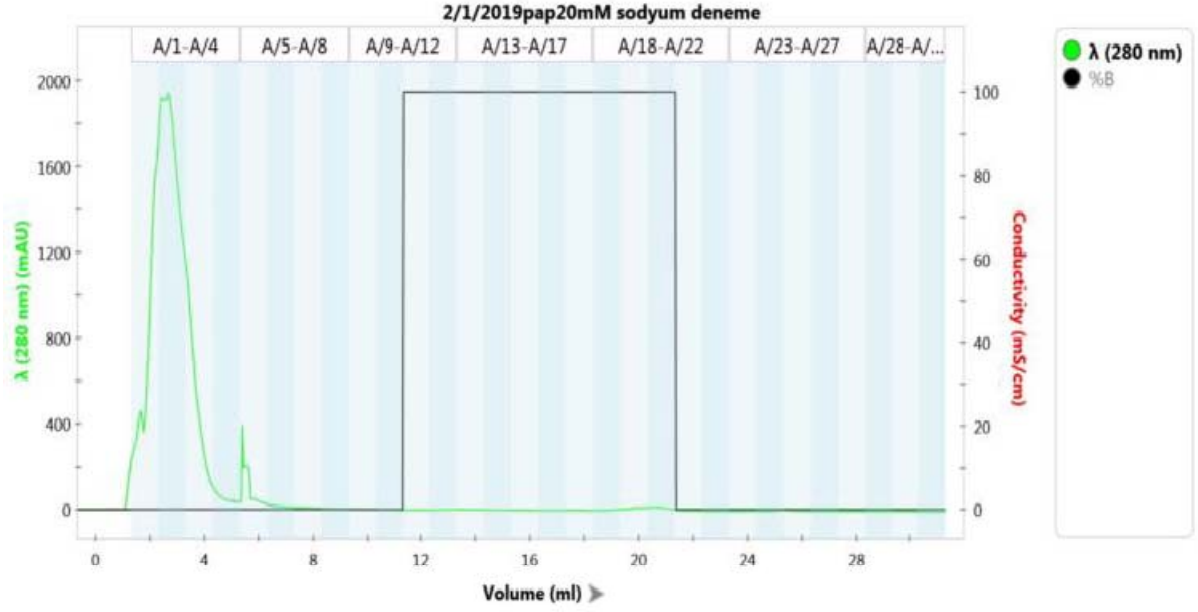
Saflaştırma optimizasyonları için protein A ve protein G kolonları denenmiş, farklı molarite değerlerinde bağlama tamponları denenmiştir. Saflaştırma işlemleri hem Next Generation Chromotography (NGC) cihazında hemde manuel olarak gerçekleştirilmiştir. Manuel yapılan saflaştırma işleminde protein A kolonu kullanılmıştır. Bağlama tamponu için 3M NaCl + 1,5M Glisin kullanılmıştır (Çizim 4.10). NGC cihazında yapılan saflaştırma ile manuel saflaştırma karşılaştırıldığında NGC cihazında daha verimli sonuç alındığı tespit edilmiştir.

Denenen sistemlerde sodyum fosfat bağlama tamponu farklı molaritelerde hazırlanmış ancak elüsyon kısmında protein gözlenememiştir (Çizim 4.11. ve Çizim 4.12.).

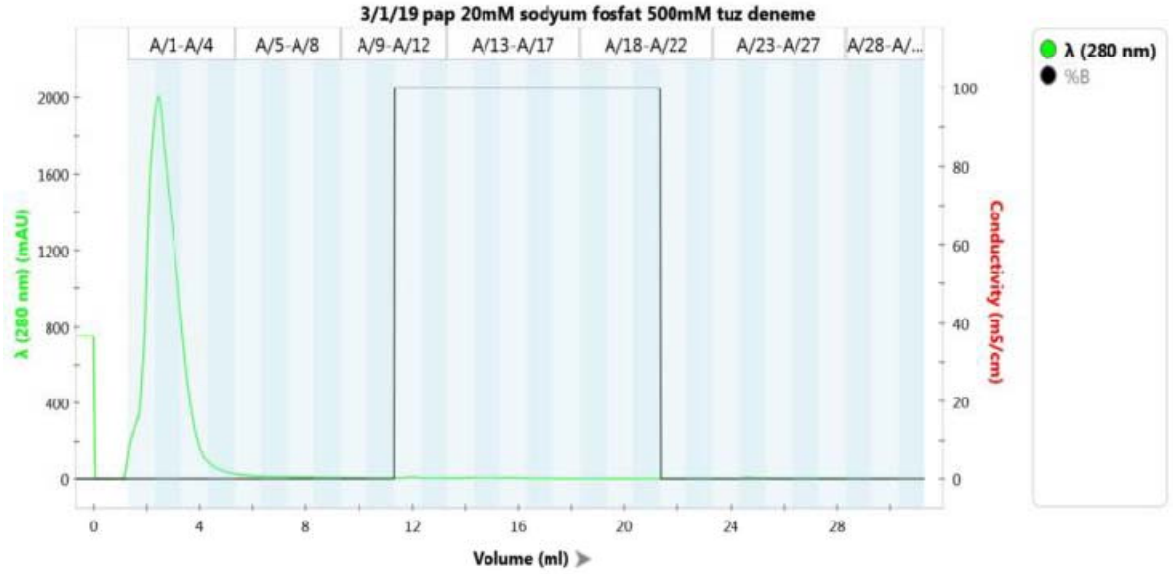
NaCl ve Glisin ile hazırlanan bağlama tamponunda da farklı molariteler denenmiştir. En yüksek absorban değeri 1M NaCl + 1,5M Glisin bağlama tamponunda gözlemlenmiştir (Çizim 4.13.) Bu sistemde fraksiyonlar biriktirilmiş ve elüsyon kısımları bir araya getirilerek protein elde etme çalışmaları devam ettirilmiştir. Elüsyon aşamasında protein gözlenen fraksiyonlar toplanarak sandviç ELISA testi uygulanmıştır (Çizim 4.14.).



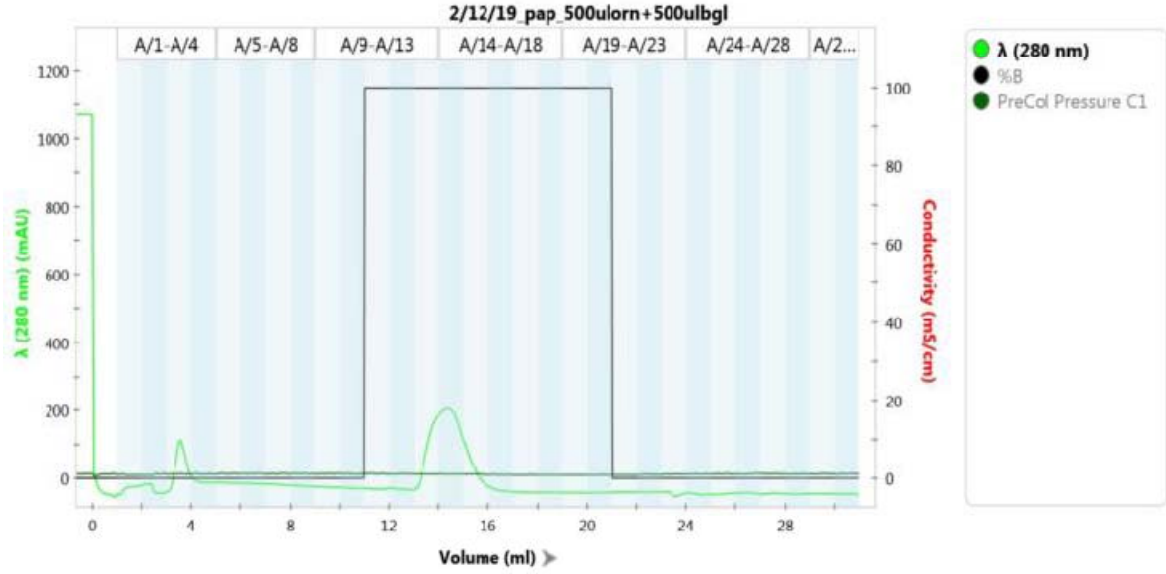
Çizim 4.10.PAP'ın manuel saflaştırılma profili



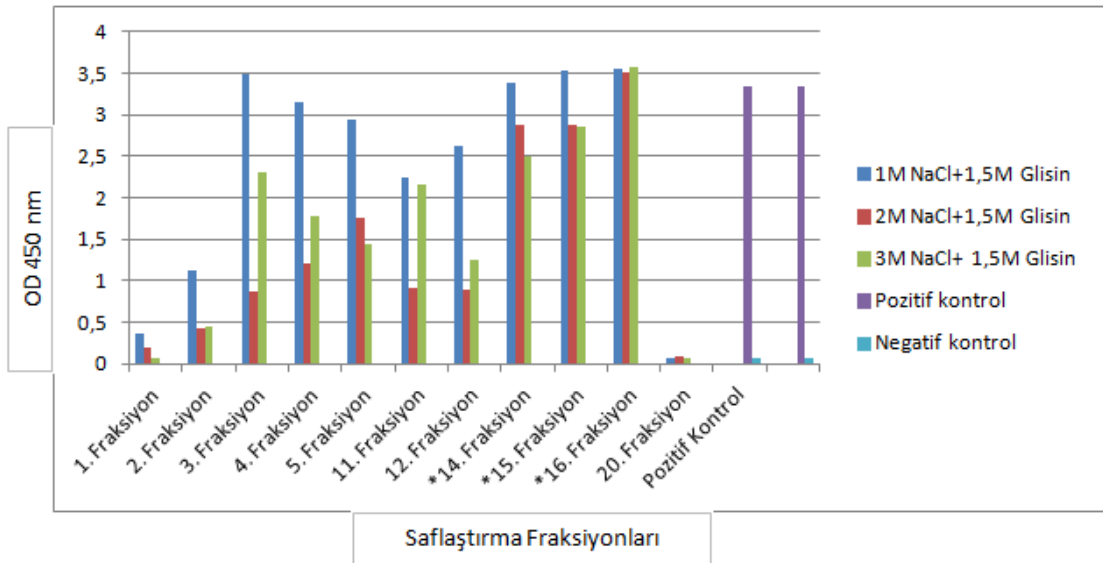
**Çizim 4.11.**20mM Sodyum Fosfat Bağlama tamponu ile NGC cihazından PAP saflaştırma görüntüsü



**Çizim 4.12.**20mM Sodyum Fosfat+500mM NaCl Bağlama tamponu ile NGC cihazında PAP saflaştırma görüntüsü

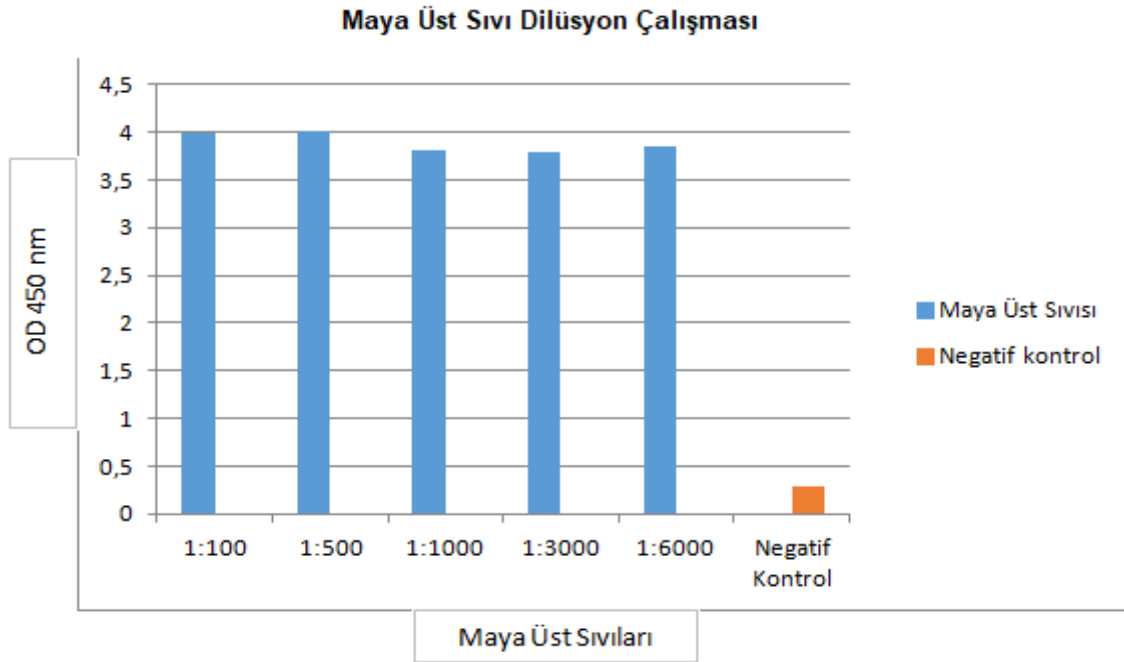


**Çizim 4.13.**1M NaCl+1,5M Glisin Bağlama tamponu ile NGC cihazında PAP saflaştırma görüntüsü



**Çizim 4.14.**Farklı molaritelerde bağlama tamponu ile yapılan saflaştırma fraksiyonlarının ELISA testi ile OD 450 aktivite ölçümü (\* ile gösterilen fraksiyonlar elüsyon fraksiyonlarıdır.)

ELISA ve NGC cihazı kromotogramları sonuçlarında görüldüğü üzere PAP antijenleri 1M NaCl+1,5M Glisin Bağlama tamponu kullanıldığında saflaştırılabilmektedir. Öte yandan bu antijenin ticari kullanımı hedeflenmektedir. Bu nedenle maliyet ve adım azaltmaya yönelik adımların değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle maya üst sıvıları hiçbir işleme tabi tutulmadan doğrudan üretildiği gibi farklı dilüsyon oranlarında sandviç ELISA yöntemiyle test edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen rekombinant maya üst sıvılarının ideal olarak 1 : 5000 seyreltme oranında çalışmalarda standart olarak kullanılabilmesi belirlendi. Maya üst sıvılarına işlem yapılmadan belli oranlarda PBS içinde dilüsyon uygulandı. Sonuçlar Çizim 4.15.'da gösterilmiştir.



**Çizim 4.15.** Maya üst sıvılarından elde edilen rekombinant PAP'ın farklı dilüsyon oranlarının OD 450 değerleri



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kanser ve kistik fibroz dahil pankreatitle ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisi için standart bir PAP proteinin üretilmesi amaçlanmaktadır. Çalışma, literatürde de belirtildiği üzere biyobelirteç olarak rekombinant PAP izoformunun üretilmesine dayandırılmaktadır.

Akut pankreatit sırasında PAP gen ekspresyonu, pankreas asiner hücrelerinde yüksek oranda düzenlenir (Gironella ve diğ. 2007). İnsan serumunda yapılan çalışmalar serum PAP düzeylerinin pankreatitin ciddiyeti ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Iovanne ve diğ. 1994). PAP'ın maksimum ekspresyonu, pankreasta ve serumda akut pankreatitin indüksiyonundan sonraki 24 saat içinde tespit edilebilir (Zenilman ve diğ. 2000).

Akut pankreatit, pankreasın iltihaplanması durumudur. Pankreas kanalının birleşim noktasından etkilenen safra taşı pankreatite yol açabilmektedir. Bunun nedenleri arasında ağır alkol kullanımı, sistemik hastalıklar, travmalar ve küçüklerde kabakulak sayılabilmektedir. Akut pankreatit bir kez gerçekleşebilir; tekrar edebilir veya kronik pankreatite kadar ilerleyebilir. Hafif vakalar genellikle hastanede yatış, ağrı kontrolü, intravenöz beslenme desteği ve intravenöz sıvı rehidrasyonu gibi konservatif önlemlerle başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Ağır vakalar, hastalığın komplikasyonlarını izlemek ve yönetmek için yoğun bakım ünitesine kabul edilmeyi gerektirebilmektedir. Komplikasyonların, optimal tedavi ile bile yüksek mortalite ile ilişkili bulunmaktadır (Bassi ve diğ. 2001). Akut pankreatit klinik olarak teşhis edilebilmektedir. Ancak hafif akut pankreatiti şiddetli nekrotik pankreatitten ayırmak için bilgisayarlı tomografi (BT) değerlendirmesi gerekmektedir. Tanı ve tedavi alanında akut pankreatit durumları zorlukla gösterilir. Pankreas hücrelerinin zarar görmesi durumunda çeşitli biyokimyasal belirteçler tanı ve tedavi sürecinde kullanılmıştır. PAP, pankreatit durumlarında kullanılan önemli belirteçlerden biridir. Özgüllüğü ve duyarlılığı, akut pankreatit tanısı koymak veya şiddetli akut pankreatit vakalarını hafif bir farkı ayırt etmek için yeterince iyi olmayabilir ancak serumda veya pankreas sıvısında yüksek PAP seviyesinin bulunması, pankreasın hücresel zedelenmeye verdiği pankreas tepkisine işaret edebilir.

Önceki çalışmalar, prokaryotik ve ökaryotik konakları kullanarak (Cash ve diğ. 2006; Namikawa ve diğ. 2006; Bödeker ve diğ. 1999; Li ve diğ. 2003), pankreas sıvısından PAP içeren rejenerasyon (Reg) türlerinin izolasyonunu ve PAP izoformlarının üretildiğini bildirmiştir (Zenilman ve diğ. 2000; Folch-Puy ve diğ. 2006). PAP izoformları, rekombinant proteinlerin kültür ortamından, vücut sıvılarından veya ekspresyon vektörlerinden immünoafinite yoluyla doğrudan izole edilmesi yoluyla elde edilebilir (Namikawa ve diğ. 2006; Li ve diğ. 2003).

Bu çalışmada, PAP geninin pD912 ekspresyon vektörüne klonlanmasıyla üretilen füzyon proteini mayaların 96 saatlik gelişimi içerisinde metanol ile indüksiyonun ardından kolayca ifade edilmiştir. Vektöre insan IgG1 antikorunun Fc bölgesi eklenerek antijen tespit sisteminde kullanılan fare antikorlarının çapraz yanıtı sebep olması engellenmiştir.

Çalışma, literatürlerde belirtildiği şekilde, çeşitli alanlarda kullanılmakta olan rekombinant Pankreatit ile ilişkili protein (PAP) izoformunun oluşturulmasına dayandırılmıştır (Rosty ve diğ. 2002). *Pichia Pastoris* X33 suşu ile üretilen rekombinant PAP üst sıvıları saflaştırılmış ancak çok verimli yanıt alınamamıştır. Bu yüzden doğrudan maya üst sıvıları ELISA testinde denenmiş ve yüksek sinyal alınmıştır. Üretilen maya üst sıvıları TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojileri Laboratuvarında üretilmekte olan kistik fibrozis tanı kitleri içerisinde denenmiş ve testlerde verimli sonuç alınmıştır. Bu doğrultuda üretilen PAP maya üst sıvılarının, pankreatit ile ilişkili hastalıkların tanısında standart olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada pankreatitle ilişkili hastalıkların tanısında kullanılmak üzere rekombinant DNA teknolojisi ile antijen üretimi ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak rekombinant PAP antijenlerinin tanı kitlerinde standart olarak kullanılması hedeflenmektedir.

Rekombinant olarak üretilen PAP protein yapıları, KF hastalığının yeni doğan bebeklerde erken tanısı için kullanılan PAP ELISA kitlerinde ve bebek kanında yer alan PAP belirteç proteinlerinin miktarsal tayininde standart olarak kullanılmaktadır. TÜBİTAK SBAG 1003 115S124 nolu “Yenidoğan Taramalarında Kistik Fibrozisin Erken Tanısı için İmmunreaktif Tripsinojen (IRT) ve Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) ELISA Kitlerinin Geliştirilmesi” başlıklı proje kapsamında desteklenen bu tez çalışmasında PAP ELISA kitlerinde standart olarak kullanılacak rekombinant PAP antijenlerinin üretimi çalışmaları yapılmıştır.

Pankreatit durumlarında mortalite verileri yüksek olduğu için erken tanı oldukça önemlidir. PAP'ın pankreatit durumlarında erken tanı için potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Bu tez çalışmasında, kistik fibrozis gibi pankreatit temelli hastalıkların tanı süreçlerinde kullanılmak üzere rekombinant Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) üretimi hedeflenmiştir. Buna ek olarak geliştirilen tanı kitlerinde bu antijenin kullanılması hedeflenmektedir. Rekombinant antijen üretimi sırasında proteini ifade etmek için hangi sistemin kullanıldığı, hangi ifade vektörünün kullanıldığı, proteinin tamamının mı yoksa bir kısmının mı ifade edilmesi gerektiği, proteinin etiketlenip etiketlenmemesi ve saflaştırma faktörleri gibi özellikler göz önüne alınarak planlama yapılması çok önemlidir. Rekombinant antijen üretimi için temel adımlar cDNA'nın alınıp ifade klonunun oluşturulması, klonlama, proteinin uygun bir sistem içerisinde ifade edilmesi, küçük ölçekte üretim testi, proteinin saflaştırılması ve protein karakterizasyonu olmak üzere sıralanmaktadır. Bu çalışmada, antijen üretimi sırasında saflaştırmayı kolaylaştırmak ve hızlandırmak adına insan Fc bölgesi antijene entegre edilmiştir.

Bu çalışmada, *P.pastoris*X33 model organizmasında rekombinant PAP üretimi verimli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. ELISA testi kullanılarak üretilen proteinlerin

spesifitesi ve sinyalleri test edilmiştir. Bu doğrultuda kullanılan tanı kit sistemlerinde standart antijen olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir. Bu üretimler sırasında besiyeri optimizasyonları, farklı indüksiyon sistemleri denenmesi, saflaştırma optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ticari PAP antijeni ile sandviç ELISA sisteminde karşılaştırma yapılması planlanmıştır. Rekombinant olarak üretilen maya üst sıvıları üzerinde saflaştırma optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ancak bağlama aşamasında stabilite sağlanamamış olup saflaştırmanın her basamağında protein kaybı yaşanmıştır. Bu sorun üzerine maya üst sıvısı Sandviç ELISA sisteminde saflaştırma işlemlerine tabi tutulmadan doğrudan kullanılarak denenmiş ve yüksek yanıt alınarak istenilen sonuca varılabilmektedir. Deneyler, üretilen rekombinant PAP antijeninin TÜBİTAK MAM GMBE laboratuvarında ticari PAP'a karşı geliştirilen antikorlar tarafından tespit edilebildiğini göstermektedir.

ELISA sonuçlarına göre, rekombinant olarak üretilen PAP proteininin ticari PAP ile benzer antijeniteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar rekombinant PAP'ın ticari PAP ile benzer bir yapıya sahip olduğunu, antikorların aynı epitoplara kolayca bağlayabildiğini göstermektedir. SDS PAGE ve Western Blot sonuçları, PAP'ın rekombinant ve ticari formunun moleküler ağırlığının 18.5kDa bandında benzer olduğunu ortaya koymuştur. Yine yapılan sandviç ELISA sonucuna göre, maya üst sıvısının hiçbir işleme tabi tutulmadan farklı dilüsyon oranlarında başarıyla çalıştığı ortaya konulmuştur.

Gelecek çalışmalarda, PAP tespitini amaçlayan antikor geliştirme çalışmalarında, immünizasyon molekülü veya antijen standardı olarak rekombinant olarak üretilen PAP antijeni kullanılabilir.

Sunulan bu tez çalışmasında, pankreatit ilişkili hastalıkların tanısında kullanılabilir potansiyeline sahip olan rekombinant PAP antijen üretimi hedeflenmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş PAP farklı hastalıkların tanısında, PAP ELISA kitlerinde, bebek kanında yer alan PAP belirteç proteinlerinin miktarsal tayininde bazı proteinlerin tespitinde yüksek verimde kullanılabilir potansiyel bir biyobelirteç modeli oluşturmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adorini, L. (1998). Immunodominance.
- Amann, E., Brosius, J., & Ptashne, M. (1983). Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 25(2-3), 167-178.
- Anonim, (2009). [https://en.wikipedia.org/wiki/REG3A#/media/File:Protein\\_REG3A\\_PDB\\_1uv0.png](https://en.wikipedia.org/wiki/REG3A#/media/File:Protein_REG3A_PDB_1uv0.png) (erişim tarihi 09.05.2019)
- Anonim, (2014). <https://www.prosci-inc.com/resources/antibody-development-guide/antibody-structure-and-properties/> (erişim tarihi 09.05.2019)
- Anonim, (2015). <https://absoluteantibody.com/product-category/recombinant-protein/fc-fusion-proteins/> (erişim tarihi 09.05.2019)
- Anonim, (2015-07-30). "Antigen". US National Library of Medicine. Retrieved.
- Anonim, (2017). <https://www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170728-which-elisa> (erişim tarihi 09.05.2019)
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Baldo, B. A. (2015). Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety. *Drug safety*, 38(5), 455-479.
- Barthelme, S., Maurin, N., Roussey, M., Ferec, C., Murolo, S., Berthéze, P., ... & Sarles, J. (2001). Evaluation of 47,213 infants in neonatal screening for cystic fibrosis, using pancreatitis-associated protein and immunoreactive trypsinogen assays. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 8(3), 275-281.
- Bassi, C., Falconi, M., Butturini, G., & Pederzoli, P. (2001). Early complications of severe acute pancreatitis. In *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Zuckschwerdt.
- Borghesi, L., & Milcarek, C. (2006). From B cell to plasma cell. *Immunologic research*, 36(1-3), 27-32.
- Bödeker, H., Keim, V., Fiedler, F., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (1999). PAP I Interacts with Itself, PAP II, PAP III, and Lithostathine/regIa. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 2(3), 150-154.
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. In *Methods in enzymology* (Vol. 463, pp. 131-147). Academic Press.
- Brown TA (2010). "Chapter 2 - Vectors for Gene Cloning: Plasmids and Bacteriophages". *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction* (6th ed.) Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8173-0.
- Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (Eds.). (2009). *Guide to protein purification* (Vol. 463). Academic Press.
- Cabrini, G., Pederzini, F., Perobelli, L., & Mastella, G. (1990). An evaluation of an enzyme immunoassay method for immunoreactive trypsin in dried blood spots. *Clinical biochemistry*, 23(3), 213-219.
- Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Experimental cell research*, 317(9), 1261-1269.
- Casali, N., & Preston, A. (Eds.). (2003). *E. coli plasmid vectors: methods and applications* (Vol. 235). Springer Science & Business Media.
- Cash, H. L., Whitham, C. V., & Hooper, L. V. (2006). Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 48(1), 151-159.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- Chilkoti, A., Christensen, T., & MacKay, J. A. (2006). Stimulus responsive elastin biopolymers: applications in medicine and biotechnology. *Current opinion in chemical biology*, 10(6), 652-657.
- Christa, L., Carnot, F., Simon, M. T., Levavasseur, F., Stinnakre, M. G., Lasserre, C., ... & Brechot, C. (1996). HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(6), G993-G1002.
- Closa, D., Motoo, Y., & Iovanna, J. L. (2007). Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(2), 170.
- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C., & Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science*, 209(4463), 1406-1414.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., & Chappell, T. (2009). Expression in the yeast *Pichia Pastoris*. In *Methods in enzymology* (Vol. 463, pp. 169-189). Academic Press.
- Crowther, J. R. (1995). ELISA. Theory and practice, Humana Press. Totowa, New Jersey.

- Czajkowsky, D. M., Hu, J., Shao, Z., & Pleass, R. J. (2012). Fc fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO molecular medicine*, 4(10), 1015-1028.
- Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia Pastoris* : a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18(2), 119-138.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2), 434-464.
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 258-266.
- Duseti, N. J., Frigerio, J. M., Fox, M. F., Swallow, D. M., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (1994). Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein (PAP) gene. *Genomics*, 19(1), 108-114.
- Duseti, N. J., Frigerio, J. M., Keim, V., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (1993). Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes. *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14470-14475.
- Engvall E.(2010). The ELISA enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*; 56:319–20
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, 8(1), 17.
- FitzGerald, K., Holliger, P., & Winter, G. (1997). Improved tumour targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in *Pichia pastoris*. *Protein engineering*, 10(10), 1221-1225.
- Fitzgibbons, T. P., Paolino, J., Dagorn, J. C., & Meyer, T. E. (2014). Usefulness of pancreatitis-associated protein, a novel biomarker, to predict severity of disease in ambulatory patients with heart failure. *The American journal of cardiology*, 113(1), 123-126.
- Folch-Puy, E., Granell, S., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L., & Closa, D. (2006). Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-κB activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3774-3779.
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in bioinformatics*, 12(5), 449-462.
- Gavin, A. L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., & Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*, 314(5807), 1936-1938.
- Gironella, M., Folch-Puy, E., LeGoffic, A., Garcia, S., Christa, L., Smith, A., ... & Dagorn, J. C. (2007). Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut*, 56(8), 1091-1097.
- Haberland, J., Kriegesmann, A., Wolfram, E., Hummel, W., & Liese, A. (2002). Diastereoselective synthesis of optically active (2R, 5R)-hexanediol. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 595-599.
- Harber W, Veenhuis M. (1989). *Metabolism of one-carbon compounds*. In: Rose AH, Harrison JS, eds. The Yeast. 3, 2nd ed. London: Academic Press; 289–316.
- Hornbeck P,(2001). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol*, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0201s01> (Chapter 2: Unit 2.1).
- Huang, C. J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(3), 383-399.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., & Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2), 403-417.
- Iovanna, J. L., Keim, V., Nordback, I., Montalto, G., Camarena, J., Letoublon, C., ... & Dagorn, J. C. (1994). Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 106(3), 728-734.
- Janeway, Charles A Jr; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark J (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5 ed.). New York: Garland Science. ISBN 0-8153-3642-X.
- Janeway CA, Jr. (2005). *Immunobiology* (6th ed.). Garland Science. ISBN 0-444-07310-4.
- Keim, V., Iovanna, J. L., Rohr, G., Usadel, K. H., & Dagorn, J. C. (1991). Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis. *Gastroenterology*, 100(3), 775-782.
- Keim, V., Iovanna, J. L., Orelle, B., Verdier, J. M., Büsing, M., Hopt, U., & Dagorn, J. C. (1992). A novel exocrine protein associated with pancreas transplantation in humans. *Gastroenterology*, 103(1), 248-254.

- Kemppainen, E., Sand, J., Puolakkainen, P., Laine, S., Hedström, J., Sainio, V., ... & Nordback, I. (1996). Pancreatitis associated protein as an early marker of acute pancreatitis. *Gut*, 39(5), 675-678.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International journal of genomics*, 2016.
- Kierny, M. R., Cunningham, T. D., & Kay, B. K. (2012). Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano reviews*, 3(1), 17240.
- Kim, K. H., Shim, J. H., Seo, E. H., Cho, M. C., Kang, J. W., Kim, S. H., ... & Kim, J. (2008). Interleukin-32 monoclonal antibodies for immunohistochemistry, Western blotting, and ELISA. *Journal of immunological methods*, 333(1-2), 38-50.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187-208.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.
- Lai, Y., Li, D., Li, C., Muehleisen, B., Radek, K. A., Park, H. J., ... & Zhang, T. (2012). The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity*, 37(1), 74-84.
- Lasserre, C., Christa, L., Simon, M. T., Vernier, P., & Bréchet, C. (1992). A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. *Cancer research*, 52(18), 5089-5095.
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature reviews Drug discovery*, 7(1), 21.
- Lehotzky, R. E., Partch, C. L., Mukherjee, S., Cash, H. L., Goldman, W. E., Gardner, K. H., & Hooper, L. V. (2010). Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7722-7727.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), 2415-2418.
- Li, A., Crimmins, D. L., Luo, Q., Hartupee, J., Landt, Y., Ladenson, J. H., ... & Dieckgraefe, B. K. (2003). Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. *Protein expression and purification*, 31(2), 197-206.
- Li, Q., Wang, H., Zogopoulos, G., Shao, Q., Dong, K., Lv, F., ... & Gao, Z. H. (2016). Reg proteins promote acinar-to-ductal metaplasia and act as novel diagnostic and prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(47), 77838.
- Litman, G. W., Rast, J. P., Shamblott, M. J., Haire, R. N., Hulst, M., Roess, W., ... & Amemiya, C. T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular biology and evolution*, 10(1), 60-72.
- Liu, X., Wang, J., Wang, H., Yin, G., Liu, Y., Lei, X., & Xiang, M. (2015). REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3A–JAK2/STAT3 positive feedback loop. *Cancer letters*, 362(1), 45-60.
- Lodish, H., Darnell, J. E., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... & Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. In *Recombinant gene expression* (pp. 329-358). Humana Press, Totowa, NJ.
- Mattick, J. S. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, 25(10), 930-939.
- Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Patel, F., Wilken, R., ... & Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *Journal of autoimmunity*, 57, 1-13.
- Meeusen, E., Lim, E., & Mathivanan, S. (2017). Secreted Tumor Antigens–Immune Biomarkers for Diagnosis and Therapy. *Proteomics*, 17(23-24), 1600442.
- Motoo, Y., Watanabe, H., Yamaguchi, Y., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., ... & Sawabu, N. (2001). Pancreatitis-associated protein levels in pancreatic juice from patients with pancreatic diseases. *Pancreatology*, 1(1), 43-47.
- Namikawa, K., Okamoto, T., Suzuki, A., Konishi, H., & Kiyama, H. (2006). Pancreatitis-associated protein-III is a novel macrophage chemoattractant implicated in nerve regeneration. *Journal of Neuroscience*, 26(28), 7460-7467.
- Old, R. W., & Primrose, S. B. (1981). *Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering* (Vol. 2). Univ of California Press
- Orelle, B., Keim, V., Masciotra, L., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (1992). Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *The Journal of clinical investigation*, 90(6), 2284-2291.

- Paajanen, H., & Nordback, I. (1999). Pancreatitis-associated proteins: experimental and clinical studies. *Addiction biology*, 4(1), 13-16.
- Parham, Peter. (2009). *The Immune System*, 3rd Edition, pg. G:2, Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- Peter Walter; Alberts, Bruce; Johnson, Alexander S., Lewis, Julian; Raff, Martin C., Roberts, Keith (2008). *Molecular Biology of the Cell (5th. edition, Extended version)*. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4111-6.
- Pham, P. V. (2018). Medical Biotechnology: Techniques and Applications. In *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 449-469). Academic Press.
- Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM (2004). *Immunology, Infection, and Immunity*. ASM Press. ISBN 978-1-55581-24-1.
- Porsch-Özcürümez, M., Kischel, N., Priebe, H., Splettstösser, W., Finke, E. J., & Grunow, R. (2004). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11(6), 1008-1015.
- Rosty, C., Christa, L., Kuzdzal, S., Baldwin, W. M., Zahurak, M. L., Carnot, F., ... & Yeo, C. J. (2002). Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer research*, 62(6), 1868-1875.
- Qiu, Y. S., Liao, G. J., & Jiang, N. N. (2018). REG3A overexpression suppresses gastric cancer cell invasion, proliferation and promotes apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 41(6), 3167-3174.
- Safder, I., Khan, S., Islam, I. U., & Kazim, M. (2018). *Pichia Pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomedical Letters*, 4(1), 1-13.
- Sarles, J., Barthelemy, S., Férec, C., Iovanna, J., Roussey, M., Farriaux, J. P., ... & Berthézène, P. (1999). Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 80(2), F118-F122.
- Sarles, J., Berthézène, P., Le Louarn, C., Somma, C., Perini, J. M., Catheline, M., ... & Berthelot, J. (2005). Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *The Journal of pediatrics*, 147(3), 302-305.
- Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 348(6230), 69-74.
- Shen, S., G. Sulter, et al. (1998). "A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*." *Gene* 216(1): 93-102.
- Sommerburg, O., Krulisova, V., Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., ... & Balasckakova, M. (2014). Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(1), 15-23.
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., & Gingeras, T. R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic acids research*, 15(9), 3859-3876.
- Wang, J., Zhou, H., Han, Y., Liu, X., Wang, M., Wang, X., ... & Xiang, M. (2014). SOCS3 methylation in synergy with Reg3A overexpression promotes cell growth in pancreatic cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 92(12), 1257-1269.
- Weik, R., Francky, A., Striedner, G., Raspor, P., Bayer, K., & Mattanovich, D. (1998). Recombinant expression of alliin lyase from garlic (*Allium sativum*) in bacteria and yeasts. *Planta medica*, 64(04), 387-388.
- Xu, Q., Fu, R., Yin, G., Liu, X., Liu, Y., & Xiang, M. (2016). Microarray-based gene expression profiling reveals genes and pathways involved in the oncogenic function of REG3A on pancreatic cancer cells. *Gene*, 578(2), 263-273.
- Verma, R., Boleti, E., & George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*, 216(1-2), 165-181.
- Ye, Y., Xiao, L., Wang, S. J., Yue, W., Yin, Q. S., Sun, M. Y., ... & Zhang, H. (2016). Up-regulation of REG3A in colorectal cancer cells confers proliferation and correlates with colorectal cancer risk. *Oncotarget*, 7(4), 3921.
- Zamyatnin, A. A. (1984). Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 13(1), 145-165.



- Zepeda, A. B., Pessoa, A., & Farias, J. G. (2018). Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *brazilian journal of microbiology*.
- Zenilman, M. E., Tuchman, D., Zheng, Q. H., Levine, J., & Delany, H. (2000). Comparison of reg I and reg III levels during acute pancreatitis in the rat. *Annals of surgery*, 232(5), 646.
- Zhu, H., & Snyder, M. (2003). Protein chip technology. *Current opinion in chemical biology*, 7(1), 55-63.



# ÖZGEÇMİŞ

## 1. Bireysel Bilgiler

- **Adı Soyadı:**Didem PAZARLI
- **Doğum Yeri ve Tarihi:** İzmit 02.10.1995
- **Uyruğu:**Türkiye Cumhuriyeti
- **Medeni Durumu:**Bekar
- **Çalıştığı Kurum:** TÜBİTAK MAM
- **İletişim Adresi ve Telefon:**didempazarli@gmail.com 0546 282 73 72

## 2. Eğitim Durumu

- **Yabancı Dili:** İngilizce
- **Lise:** İzmit Gazi Lisesi (2013)
- **Ön Lisans:** Anadolu Üniversitesi / Açıköğretim Fakültesi / Sağlık Kurumları İşletmeciliği (2016)
- **Lisans:** İstanbul Üniversitesi / Fen Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik (2017)
- **Yüksek Lisans:** Kocaeli Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji (2019)

## 3. Bilimsel Etkinlikler

- **Aldığı Burslar:**TÜBİTAK SBAG destekli 115S124 numaralı 1003 projesinde Yüksek Lisans Bursiyeri

## EKLER

### EK 1. Kullanılan Çözelti ve Solüsyonlar

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
2-Propanol	Sigma-Aldrich	24137
4X Laemmlı Sample Buffer	BioRad	1610747
Acrylamide	Sigma-Aldrich	A8887
AEC Staining Kit	Sigma-Aldrich	AEC101
Agar	Sigma-Aldrich	5039
Agaroz	Sigma-Aldrich	9012366
Amonyum PerSülfat	BioRad	161-0700
Amonyum Sülfat	Merck	101217
Anti Fare Ig(G,A,M)- Alkalen Fosfataz Konjugatı	Sigma-Aldrich	A0162-1ML
Asetik Asit	ISOLAB	901.013.2500
BCIP/NBT Substrate	Roche	11697471001
Bis-N, N'-Metylene Bis- Acrylamide	BioRad	161-0201
Bovin Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A9056
CutSmart	NEB	B7204S
D-Biotin	Acros-Organics	58-85-5
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich	S1876
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
Etanol	Sigma-Aldrich	32221
EtilenDiaminTetraAsetikAsit	Sigma-Aldrich	60-00-4
Formaldehyde solution about %37	Merck	1.04002.2500
Glacial Asetik Asit	Merck	64-19-7

Glisin	Sigma-Aldrich	G8898
Glikoz	Sigma-Aldrich	50-99-7
Hammerstein Kazein	Sigma-Aldrich	E0789
HCl	Merck	100317
Human PAP (Reg3A)	Sino Biological	11235-H08H
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	7758-11-4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	7778-77-0
KOH	Sigma-Aldrich	131058-3
LB, Agar	FLUKA	L3027
LB, Broth	Sigma-Aldrich	L3022
Methanol	Merck	67-56-1
Mouse Reg3A	Sino Biological	11235-R019
NaCl	Sigma-Aldrich	31434
NaOH	Merck	1310-73-2
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa	Thermo Scientific™	23225
Pepton, Bakteriyolojik	Sigma-Aldrich	91249
Pepton, Mikolojik	Sigma-Aldrich	77199
Polivinil alkol	Sigma-Aldrich	P8136
Polivinil pirolidan	Sigma-Aldrich	PVP40
SacI, Restriksiyon Enzimi	NEB	R0156S
SDS	Sigma-Aldrich	670-54-2
Sitrik Asit	Sigma-Aldrich	C0759
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich	70166
Streptavidin-POD Konjugat	Roche	11089153001
TEMED (N,N,N',N' Tetra Metil Etilen Diamin)	Sigma-Aldrich	T9281
Trisma Base	Sigma-Aldrich	T6066
Tween 20	Sigma-Aldrich	9005-64-5

Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	Sigma-Aldrich	Y0626
Zeocin™, Antibiyotik	Invitrogen	11006-33-0

## EK 2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ekipmanlar

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
+4 Dolap	Bosch
-20 Dolap	Bosch
15, 50 ml Falkon Tüpler	TPP
2.5, 10, 20, 100, 1000, 5000 µl'lik Mikropipetler	Thermo
300 µl'lik çok kanallı pipetler	Thermo
50, 250, 500, 1000 cc şişe	Schott
0,1-10µl, 10-200µl, 50-1000µl, 1000-5000µl pipet ucu	Eppendorf
Blotlama Cihazı	BioRad
Çalkalayıcı	BioSan
Elektroporatör	Eppendorf
ELISA 96 kuyulu plaklar	Nunc
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	Biotek BioTek Instruments
ELISA çoklu plak yıkama cihazı	Biotek BioTek Instruments
Fraksiyon ayırma makinesi	BioRad
Güç Kaynağı	BioRad
Hassas terazi	Precisa Gravimetrics AG
Hava akımlı kabinler	Heraus
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica
Jel Elektrophorez Sistemi	BioRad
Lateks eldiven	Broche

Liyofilizatör	Martin Christ
Manyetik karıştırıcı	Sigma- Aldrich
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf
Mini masaüstü santrifüj	LMS Harmony
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific,
Orbital Karıştırıcı	Edmund Bühler
Otoklav	Sistek
Peristaltik Pompa	Pharmacia
Petri	Nunc
pH metre	Mettler Toledo
Protein A kolonu	GE
Pudrasız Eldiven	Broche
PVDF membran	Thermo
Santrifüj tüpü 0,2 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 1,5 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 2 ml	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Nüve
Sıvı Azot tankı ve azot taşıma Tankları	Union Carbide Nitrogen
Sıvı Kromatografi Sistemi	NGC™, BioRad
Spektrometre	Biochrom Libra
Tek kullanımlık pipet uçları	Eppendorf
Ultrasantrifüj	Hitachi
Ultrasonik banyo	Bandelin
Vorteks	Scientific Industries

### **EK 3. DeneYlerde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar**

#### **SDS PAGE Jel İÇeriği**

- ✓ %30 Akrilamid

29,1 gram Akrilamid ve 0,9 gram Bis-akrilamid, 100 ml dH<sub>2</sub>O iÇerisinde karanlık ortamda çözdürülmüştür.

- ✓ %10 SDS

10 gram SDS, 100 ml dH<sub>2</sub>O iÇerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

- ✓ %10 APS

0,1 gram APS, 1 ml dH<sub>2</sub>O iÇerisinde çözülerek jel dökme sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

- ✓ Tris-HCl (1,5M pH:8.8)

1,5M Trisma-Base istenilen miktarda tartılarak dH<sub>2</sub>O iÇerisinde çözölmüştür. pH HCl ile 8.8'e ayarlanmıştır.

- ✓ Tris-HCl (1M pH:6.8)

1M Trisma-Base istenilen miktarda tartılarak dH<sub>2</sub>O iÇerisinde çözölmüştür. pH HCl ile 6.8'e ayarlanmıştır.

- ✓ 10X Yürütme Tamponu

30,3 gram Trisma-Base, 144,1 gram Glisin ve 10 gram SDS tartılarak dH<sub>2</sub>O iÇerisinde çözdürülmüştür. Jeller yürütülürken 1X olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile seyreltme işlemi yapılarak kullanılmıştır.

#### **Gümüş Boyama özeltilerinin Hazırlanışı**

- ✓ Fiksasyon Tamponu

%50 Metanol, %12 Asetik Asit, 0,5 ml %37 Formaldehit 1 litre dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Bu işlem çeker ocak altında yapılmıştır.

- ✓ Yıkama Tamponu

%50 Etanol ve %50 dH<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlanmıştır.

✓ Ön Muamele Tamponu

0,2 gram  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 litre  $\text{dH}_2\text{O}$  içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

✓ Bant Fiks Tamponu

$\text{AgNO}_3$  (2g/lt) ve 0.75 ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlanmıştır.

✓ Geliştirme Tamponu

60g/lt  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 mg/lt  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ve 0,5ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlanmıştır.

✓ Durdurma Tamponu

%50 Metanol ve %12 Asetik Asit 1 litre  $\text{dH}_2\text{O}$  ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

✓ Son Yıkama Tamponu

%50 Etanol ve %50  $\text{dH}_2\text{O}$  olacak şekilde hazırlanmıştır.

### **Western Blot Çözeltilerinin Hazırlanışı**

✓ 1X PBS

150mM NaCl ve 10mM fosfat tamponu ihtiyaç olan hacim kadar  $\text{dH}_2\text{O}$  içinde çözülüp hazırlanmıştır.

✓ 1X TBS

9,68 gram Trisma-Base ve 32 gram NaCl tartılıp  $\text{dH}_2\text{O}$  içinde çözdürülmüştür. Bunu takiben pH : 7.2'ye ayarlanmıştır.

✓ 1X TBS-T

1 litre TBS çözeltisi içerisine 0.5ml Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır.

✓ Fosfat Tamponu

150 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 150 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  çözeltileri hazırlandı.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solüsyonuna  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  solüsyonu eklenerek çözeltinin pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır.



## **ELISA Testi Çözeltilerinin Hazırlanışı**

### ✓ Yıkama Tamponu

1X PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır.

### ✓ Bloklama Tamponu

%1 Hammerstein Kazein ve %1,5 PVP PBS içerisinde çözülerek 80°C'ye ısıtılmış, 40 µl/ml 1M NaOH eklenerek inkübe edilmiştir.

### ✓ Substrat Tamponu

0,027 gram ZnCl<sub>2</sub>, 0,04 gram MgCl<sub>2</sub> ve 1,5 gram glisin 200 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmüş ve katı KOH kullanılarak pH 10,4'e ayarlanmıştır.

## **Antijen Saflaştırma için Çözeltilerin Hazırlanışı**

### ✓ Doyurulmuş Amonyum Sülfat Çözeltisi

İhtiyaç duyulan miktarda çözelti için dH<sub>2</sub>O içerisinde çökme gözlemlenene kadar amonyum sülfat eklenmiştir.

### ✓ Bağlama Tamponu

-3M NaCl, 1.5M Glisin ihtiyaç duyulan miktarda dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır.

-2M NaCl, 1.5M Glisin ihtiyaç duyulan miktarda dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır.

-1M NaCl, 1.5M Glisin ihtiyaç duyulan miktarda dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır.

### ✓ Elüsyon Tamponu

0. 1M Glisin ihtiyaç duyulan miktarda dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, HCl ile pH 2.7'ye ayarlanmıştır.

### ✓ Denge Tamponu

1M Trizma Base ihtiyaç duyulan miktarda dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, HCl ile pH 9'a ayarlanmıştır.

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce ultrasonikatörde degaze edilmiştir.

## **Besiyerleri**

### **YPD**

1% Maya Özütü

2% Pepton

2% Dekstroz

### **YPDS**

1% Maya Özütü

2% Pepton

2% Dekstroz

1M D-Sorbitol

### **YPDS-Agar**

1% Maya Özütü

2% Pepton

2% Dekstroz

1 M D-Sorbitol

2% Agar

### **Düşük Tuzlu Zeocinli LB Agar**

0.5% Maya Özütü

1% Tripton

0.5% NaCl

1.5% Agar

2.5mg Zeocin

## Düşük Tuzlu LB

0.5% Maya Özütü

1% Tripton

0.5% NaCl

## BMGY/BMMY

8gr maya özütü

560ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürüldü ve 20dk otoklavlandı.

16gr pepton

- 1M Potasyum Fosfat Tamponu, pH 6.0

24ml KHPO<sub>4</sub>

KOH ile pH 6.0'a ayarlandı.

156ML KHPO<sub>4</sub>

- 10X YNB (13.4% Amonyum Sülfat ve Amino asit içermeyen Maya Nitrojen Bazı)  
26.8gr amonyum sülfat ve amino asit içermeyen maya nitrojen bazı 200ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülerek filtreyle sterilize edildi.
- 500X Biotin (0.02% Biotin)

10mg biyotin 50ml dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülerek filtreyle sterilize edildi.

- 10X Metanol (5% Metanol)

5ml metanol 95ml dH<sub>2</sub>O ile karıştırıldı. Filtreyle sterilizasyon işlemi yapıldı.

- 10X Gliserol (10% Gliserol)

10ml gliserol 90ml dH<sub>2</sub>O ile karıştırıldı. Filtreyle sterilize edildi.

Otoklavlanmış karışım oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra aşağıdaki eklemeler yapıp, karışım iyice karıştırılır:

## BMGY

- 80ml 1M Potasyum Fosfat Tamponu, pH 6.0
- 80ml 10X YNB
- 0.16ml 500X Biotin
- 80ml Gliserol

## BMMY

- 80ml 1M Potasyum Fosfat Tamponu, pH 6.0
- 80ml 10X YNB
- 0.16ml 500X Biotin
- 80ml Metanol

## EK 4. Tris-glisin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi için solüsyon içerikleri

	10 ml		5 ml
Solüsyon bileşenleri	Ayrırma Jeli (%15)	Solüsyon bileşenleri	Stoklama jeli (%5)
dH <sub>2</sub> O	2.3 ml	dH <sub>2</sub> O	3.4 ml
%30 Akrilamid	5.0 ml	%30 Akrilamid	0.83 ml
Tris-HCl (1,5M pH: 8.8)	2.5 ml	Tris-HCl (1M pH: 6.8)	0.63 ml
%10 SDS	0.1 ml	%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.1 ml	%10 APS	0.05 ml
Temed	0.004 ml	Temed	0.005 ml

## EK 5. Protein Marker

(PageRuler™ Prestained Protein Ladder)

