



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HALOARCULA HISPANICA*'YA AİT PROTEAZ ENZİMLERİNİN
ESCHERİCHIA COLI'DE REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ VE
ANALİZİ**

AYŞENUR GÜNEŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. Kadir TURAN

2019- İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)
Tez Sahibi : Ayşenur GÜNEŞ
Tez Başlığı : *Haloarcula hispanica*'ya ait Proteaz Enzimlerinin *Escherichia coli*'de
Rekombinant Olarak Üretilmesi ve Analizi
Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 02.05.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Prof. Dr. Kadir TURAN

Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

İstanbul Üniv., Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN

Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 29.05.2019 tarih ve 50 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu

Prof. Dr. Feyza ARICIOLĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

- Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
- Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Ayşenur Güneş

TEŞEKKÜR

Danışmanım olduğu günden beri bana hep inanan, çalışmamın tüm aşamalarını en ince ayrıntısına kadar planlayan, sabırla ilgilenen ve bu süreci en verimli şekilde geçirmemi sağlayan Sayın Prof. Dr. Kadir Turan’a teşekkürü borç bilirim.

Katkılarından dolayı M. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Zorlandığım her anda desteklerini esirgemeyerek sonuca ulaşmama yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Ayşegül Pirinçal’a, Nazife Gelmez’e, Tuğba Koçmar’a teşekkür ederim.

Hayatımın tamamında olduğu gibi bu süreçte de aile olduğumuzu hissettiren anneme, babama ve abime çok teşekkür ederim. Ve on yılı aşkın süredir her daim yanımda olan Gizem Eğilmezer’e, Açıyla Demir’e teşekkür ederim.

Yüksek lisansımın üç yıldır bitmemesini hayretle karşılayan; ama tamamladığımı göremeyen halama teşekkür ederim.

Ayşenur GÜNEŞ

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-200318-0096 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ	xvii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Enzimler	5
4.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	6
4.1.2. Ekstrem (aşırı) koşullarda aktivite gösteren enzimler (Estremozimler)	8
4.2. Proteazlar	9
4.2.1. Aspartik peptidaz	11
4.2.2. Serin peptidaz	14
4.2.3. Sistein peptidaz	17
4.2.4. Metallopeptidaz	19
4.2.5. Treonin peptidaz	20
4.2.6. Glutamik peptidaz.....	21
4.2.7. Asparagin peptid liyaz	21
4.3. Proteaz Kaynakları	22

4.3.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar	22
4.3.2. Hayvansal proteazlar	26
4.3.3. Mikrobiyal proteazlar	27
4.3.3.1. Bakteriyal proteazlar	28
4.3.3.2. Fungal proteazlar	28
4.4. Proteazların Endüstriyel Uygulamaları.....	29
4.4.1. Proteazların deterjan endüstrisinde kullanımı	29
4.4.2. Proteazların süt endüstrisinde kullanımı.....	30
4.4.3. Proteazları deri endüstrisinde kullanımı	30
4.4.4. Pişirme ve gıda işlemede proteazların kullanımı	31
4.4.5. Balık protein hidrolizat elde etmede proteazların kullanımı	32
4.4.6. Eczacılık ve tıp alanında proteazların kullanımı	32
4.5. Halofilik Mikroorganizmalar	33
4.6. Halofilik Arkeler	34
4.7. <i>Haloarcula hispanica</i>	36
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
5.2. Enzimler	38
5.3. Ticari Kitler	39
5.4. Antikorlar	39
5.5. Cihazlar	40
5.6. Besiyerleri	40
5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri	40
5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri	41
5.6.3. <i>Haloarcula hispanica</i> 'nın üretilmesinde kullanılan besiyeri.....	41
5.6.4. Milk-agar besiyeri	41

5.6.5. Zenginleştirilmiş milk-agar besiyeri	41
5.7. Çözeltiler	42
5.7.1. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (% 29 akrilamid / % 1 bis-akrilamid-a/h)	42
5.7.2. Amonyum persülfat çözeltisi (% 10-a/h).....	42
5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5-a/h).....	42
5.7.4. Dekstroz çözeltisi(% 20 -a/h).....	42
5.7.5. DTT çözeltisi (1M).....	42
5.7.6. Etidyum bromür (10 mg/ml).....	42
5.7.7. Fiksasyon çözeltisi(%50 metanol-v/v; %10 asetik asit-v/v).....	43
5.7.8. Gümüş nitrat çözeltisi (% 5 -a/h).....	43
5.7.9. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M).....	43
5.7.10. %70 Etil alkol	43
5.7.11. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0.5 M; pH 8.0).....	43
5.7.12. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1).....	43
5.7.13. Hidroklorik asit çözeltisi (3N).....	44
5.7.14. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M).....	44
5.7.15. Mangan klorür çözeltisi (0.55 M).....	44
5.7.16. Magnezyum sülfat çözeltisi (0.5 M).....	44
5.7.17. PIPES çözeltisi (1M).....	44
5.7.18. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 -a/h).....	44
5.7.19. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M).....	45
5.7.20. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (% 10-a/h).....	45
5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M).....	45
5.7.22. Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (100 mM).....	45
5.7.23. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (100mM).....	45

5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10-a/h).....	45
5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N).....	45
5.7.26. Sodyum karbonat çözeltisi (% 10-a/h).....	45
5.7.27. Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi (% 1-a/h).....	46
5.7.28. Gümüş nitrat / formaldehit çözeltisi (%0.1-a/h / %0.074-h/h)	46
5.7.29. Görüntüleme çözeltisi (%2-a/h sodyum karbonat; %0.04-h/h formaldehit; %0,0004-a/h sodyum tiyosülfat)	46
5.7.30. Tween-20 çözeltisi (%10 - a/h).....	46
5.7.31. Diyaliz çözeltisi (10 mM tris; 50 mM KCl; 1M üre; 50 mM 2- β – merkaptotanol)	46
5.8. Tamponlar	46
5.8.1. Transformasyon Tamponu	46
5.8.2. DNA Ekstraksiyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl; 50 mM glikoz; 10 mM EDTA; pH 8.0)	47
5.8.3. DNA Ekstraksiyon Tamponu II (0.2 N NaOH; % 1-a/h SDS).....	47
5.8.4. DNA Ekstraksiyon Tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)	47
5.8.5. 6x Konsantre DNA yükleme yamponu	47
5.8.6. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M tris; %0.4-a/h SDS; pH:8.8)...	47
5.8.7. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0.5 M tris -%0.4 SDS, a/h, pH:6.8)	47
5.8.8. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8-a/h SDS; % 0.2-a/h Bromophenol mavisi; % 4-h/h 2-Merkaptoetanol; % 40-h/h Gliserin; pH 6.8)	48
5.8.9. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA(TAE) tamponu	48
5.8.10. Tris-Cl Tamponu (1 M; pH 8).....	48
5.8.11. Tris/EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA; pH 8).....	48

5.8.12. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M tris; 1.25 M glisin; pH 8.3).....	48
5.8.13. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM tris; 250 mM glisin; % 0.1 – a/h SDS; pH 8.....	48
5.8.14. Potasyum Fosfat Tamponu (100 mM; pH 7.5).....	49
5.8.15. Protein transfer tamponu	49
5.8.16. 20x Konsantre TBS tamponu	49
5.8.17. 1x TBS ve 1x TBS-T tamponu	49
5.8.18. Hücre parçalama tamponu (10 mM tris; 50 mM KCl; 1 mM EDTA: %0,5-a/h tween-20).....	49
5.8.19. Üre içeren hücre parçalama tamponu (10 mM Tris; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; %0.5-a/h tween-20; 2M üre)	49
5.8.20. Hücre re-süspansiyon tamponu (50mM tris; 50 mM dekstroz; 1mM EDTA).....	50
5.8.21. Saklama tamponu (50 mM tris-HCl; 50 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 1mM DTT; 2mM PMSF; % 50-h/h gliserol)	50
5.9. Plazmit Vektörler	50
5.10. Bakteri Hücreleri	50
5.11. Çalışmada Kullanılan Oligonükleotid Primerler	51
5.12. Primerlerin Fosforillenmesi	51
5.13. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez	52
5.14. Transformasyon İçin <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi	52
5.15. Liyofilize Halde <i>H. hispanica</i> Hücrelerinden Kültür Hazırlanması	53
5.15A. Bakteriden Genom DNA İzolasyonu	53
5.16. <i>H. hispanica</i> Proteaz ve Serin Proteaz genlerinin PZR ile Çoğaltılması	54
5.17. PZR Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Saflaştırılması	54

5.18. Plazmit DNA'ların Ligasyon İçin Doğrusal Hale Getirilmesi	55
5.18.1. pET-14b plazmitinin doğrusal hale getirilmesi	55
5.18.2. pBluescript II SK+ plazmitinin doğrusal hale getirilmesi	56
5.18.3. pAK-Taq plazmitinin doğrusal hale getirilmesi	56
5.19. Doğrusal Hale Getirilen Plazmit DNA'ların Proteaz ve Serin Proteaz Kodlayan DNA Fragmentleri ile Ligasyonu ve Transformasyonu	58
5.20. Koloni PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi	58
5.21. Transformant <i>E. coli</i> Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu	59
5.22. Küçük Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi	60
5.23. Küçük Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Kısmen Saflaştırılması	61
5.24. DNA Dizi Analizleri	61
5.25. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması	62
5.26. <i>H. hispanica</i> Proteaz Enzimlerinin <i>E.coli</i> Hücrelerinde Sentezinin SDS- PAGE ile Analiz Edilmesi	62
5.26.1. Hücre lizatlarının hazırlanması	63
5.26.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması	63
5.26.3. Örneklerin jelde yürütülmesi	63
5.26.4. Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması	64
5.26.5. Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi	64
5.27. İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid (IPTG) Etkisinde Bırakılan Hücrelerde Proteaz Enzimleri Sentezinin Analizi	65
5.28. <i>E. coli</i> Hücrelerinde Rekombinant Proteaz Enzimi Sentezi için Uygun Üreme Sıcaklığın Belirlenmesi	65
5.29. Proteaz Geni Aktarılan <i>E.coli</i> Hücrelerinden Enzim Aktivite Testleri için Lizat Hazırlanması	65

5.30. Ham Lizatlarda Proteinlerin Çöktürülmesi ve Proteazların Kısmen Saflaştırılması	66
5.30.1. Aseton ile çöktürme	66
5.30.2. Diyaliz	66
5.30.3. Sıcaklık uygulaması ile ekstraksiyon	67
5.31. Plazmit Aktarılan <i>E. coli</i> Hücrelerinin Proteaz ve Serin Proteaz Aktiviteleri Bakımından Analiz edilmesi	67
5.31.1. Milk-agar yöntemi	67
5.31.2. Örneklerde proteaz aktivitesinin BSA proteini kullanılarak test edilmesi	68
5.31.3. Azokazein substrat ile spektrofotometrik olarak proteaz aktivitesinin belirlenmesi.....	70
6. BULGULAR.....	71
6.1. Azokazein substrat ile spektrofotometrik olarak proteaz aktivitesinin belirlenmesi.....	71
6.1.1. <i>Haloarcula hispanica</i> hücrelerinden genom DNA izolasyonu ile ilgili veriler	71
6.1.2. Halofilik bakteri serin proteaz ve proteaz genlerinin PZR ile çoğaltılması ile ilgili veriler	72
6.1.3. Proteaz genlerinin klonlanmasında kullanılan <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerinin ligasyon için hazırlanması ile ilgili veriler	76
6.1.4. T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde <i>H. hispanica</i> proteaz genleri taşıyan ekspresyon vektörleri ile ilgili veriler	78
6.1.5. Proteaz ve serin proteaz genlerinin <i>lac</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ile ilgili veriler	82
6.1.6. Proteaz ve serin proteaz genlerinin <i>lacI</i> ve <i>tac</i> promotörleri kontrolünde klonlanması ile ilgili veriler	84

6.1.7. <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerine klonlanan <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin DNA dizi analizi sonuçları	87
6.2. <i>Escherichia coli</i> 'de Halofilik Proteaz ve Serin Proteaz Enzimi Sentezinin SDS- PAGE Teknikleriyle İncelenmesi ile İlgili Veriler.....	92
6.3. <i>E. coli</i> Hücrelerinde Rekombinant Proteaz Enzimi Sentezi için Uygun Üreme Sıcaklığın Belirlenmesi ile İlgili Veriler.....	96
6.4. İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid (IPTG) Etkisinde Bırakılan Hücrelerde Proteaz Enzimleri Sentezinin Analizi ile İlgili Veriler	97
6.5. Transformant <i>E.coli</i> Kültürlerinden Serin Proteaz Enzimi Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler.....	99
6.6. <i>E. coli</i> Hücrelerinde Rekombinant Olarak Sentez Edilen <i>H. hispanica</i> Proteaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Analizi ile İlgili Veriler.....	104
6.7. <i>E. coli</i> Hücrelerinde Sentez Edilen <i>H.hispanica</i> Proteaz Enzimlerinin BSA Kullanılarak Aktivitelerinin Belirlenmesi ile İlgili Veriler.....	107
6.8. <i>E. coli</i> Hücrelerinde Sentez Edilen <i>H. hispanica</i> Proteaz Enzimleri Aktivitelerinin Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Belirlenmesi ile İlgili Veriler	113
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	115
8. KAYNAKLAR	118
9. EKLER.....	148
10. ÖZGEÇMİŞ.....	150

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

a/h	Ağırlık/hacim
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz çifti
BSA	Bovin serum albümin
°C	Santigrat Derece
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DTT	Ditiyotretol
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
g	Gram
g/l	Gram/litre
h/h	Hacim/hacim
HCl	Hidroklorik asit
HRP	Yaban turpu peroksidaz enzimi (<i>İng. horse radish peroxidase</i>)
IPTG	İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid
kDa	Kilo dalton
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani agar
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PIPES	1,4-piperazin etan sülfonik asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TBS	Tris ile tamponlanmış tuz çözeltisi
TBS-T	Tris ile tamponlanmış tuz çözeltisi – Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
UV	Ultraviyole
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
(2-ME)	2- β –Merkaptoetanol

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. İndüklenmiş uyum modeli	6
Şekil 4.2. Peptit bağlarının proteazlar tarafından katalizi	10
Şekil 4.3. Bir aspartik proteaz olan reninin katalitik bölgesinde yer alan korunmuş aspartik asit bakiyeleri	12
Şekil 4.4. Aspartik endopeptidazların kataliz mekanizması	13
Şekil 4.5. Serin proteazların katalitik bölgesinde yer alan korunmuş amino asit bakiyeleri	14
Şekil 4.6. Serin proteazların özgüllüğünden sorumlu bağlayıcı cep	15
Şekil 4.7. Bir serin proteaz olan kimotripsinin katalitik mekanizması	16
Şekil 4.8. Sistein proteaz bakımından zengin bir bitki olan <i>Carica papaya</i> meyvesi	17
Şekil 4.9. Papain benzeri bir sistein proteazın tersiyer yapısı aktif bölgesinde yer alan amino asit bakiyeleri	18
Şekil 4.10. Bir metallopeptidaz olan termolizinin tersiyer yapısı	20
Şekil 4.11. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	20
Şekil 4.12. Scytilidocarboxyl peptidaz B enziminin tersiyer yapısı.....	21
Şekil 4.13. Asparagin peptid liyazların kataliz mekanizması	22
Şekil 4.14. Proteazlar bakımından zengin <i>Carica papaya</i> , <i>Ananas comosus</i> ve <i>Ficus carica</i> bitkileri	24
Şekil 4.15. Yabani enginar bitkisi	25
Şekil 4.16. Serin proteaz olan tripsin enziminin tersiyer yapısı	26
Şekil 4.17. Bakteriler, arkeler ve ökaryotlar arasındaki ilişkileri gösteren filogenetik ağaç.....	33
Şekil 6.1. Halofilik bakteri olan <i>H. hispanica</i> 'dan izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü	71

Şekil 6.2. <i>H. hispanica</i> genom DNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan serin proteaz ve proteaz genlerini kodlayan DNA fragmentlerinin elektroforetik analiz	74
Şekil 6.3. KOD-plus enzimi ve proteaz genlerine özgü fosforillenmiş farklı primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi	75
Şekil 6.4. <i>H. hispanica</i> proteaz enzimlerini kodlayacak <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında yararlanılan plazmitler	76
Şekil 6.5. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b ve pBluescript II SK(+) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforez profilleri	77
Şekil 6.6. <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pAK-Taq plazmit DNA'sı	78
Şekil 6.7. <i>H. hispanica</i> serin proteaz ve proteaz genlerinin pET-14b plazmitinde <i>T7</i> RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri	79
Şekil 6.8. <i>H. hispanica</i> serin proteaz ve proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitinde <i>T7</i> RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri	80
Şekil 6.9. <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin pET-14b ve pBluescript II SK(+) plazmitlerine klonlanması ile elde edilen <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi	81
Şekil 6.10. Proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitlerine <i>lac</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları	83
Şekil 6.11. <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitinde <i>lac</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi.....	83
Şekil 6.12. <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin <i>tac</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları	84
Şekil 6.13. <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin <i>lacI</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları	86

Şekil 6.14. <i>H. hispanica</i> proteaz genlerinin pAK plazmitinde <i>lacI</i> promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen <i>E. coli</i> ekspresyon vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi	86
Şekil 6.15. pET14b plazmitine klonlanan <i>H. hispanica</i> serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	88
Şekil 6.16A. pBluescript II SK(+) plazmitine T7 bakteiyofaj RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanan <i>H. hispanica</i> 'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	89
Şekil 6.16B. pBluescript II SK(+) <i>E. coli lac</i> promotörü kontrolünde klonlanan <i>H. hispanica</i> 'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	90
Şekil 6.17. pAK plazmitine <i>lacI</i> promotörü kontrolünde klonlanan <i>H. hispanica</i> 'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	91
Şekil 6.18. pAKTaq plazmitine tac promotörü kontrolünde klonlanan <i>H. hispanica</i> 'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	92
Şekil 6.19. Proteaz enzimlerini kodlayan ekspresyon vektörleri ile transforme edilen <i>E. coli</i> BL21 ve Top10 hücrelerinde proteaz ve serin proteaz enzimlerinin SDS-PAGE/ gümüş boyama tekniği ve Western melezleme tekniği ile incelenmesi	94
Şekil 6.20. <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinde halofilik bir bakteri olan <i>Haloarcula hispanica</i> 'ya ait proteaz enzimlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi	95
Şekil 6.21. <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinde halofilik bir bakteri olan <i>Haloarcula hispanica</i> 'ya ait proteaz enzimlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi	96
Şekil 6.22. Farklı sıcaklıklarda üretilen <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinde <i>H. hispanica</i> proteaz enzimlerinin SDS-PAGE / gümüş boyama tekniği ile analiz edilmesi	97
Şekil 6.23. Farklı konsantrasyonlarda IPTG içeren ortamlarda üretilen pTac-Prot, pTac-Prot.Flag ve pAKTaq plazmitleri ile transforme edilen <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneklerinde <i>H. hispanica</i> proteaz ve proteaz.flag enzimlerinin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analiz incelenmesi.....	98
Şekil 6.24. IPTG'in <i>E. coli</i> hücrelerinde rekombinant proteaz enzimi sentezine etkisinin SDS-PAGE / gümüş boyama metodu ile analiz edilmesi	99

Şekil 6.25. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag plazmitleri ile transforme edilen <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinden sonik parçalama ile hazırlanan hücre lizatlarında serin proteaz enzimlerinin SDS-PAGE tekniği ile analizi	100
Şekil 6.26. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag ile transforme edilen <i>E. coli</i> hücrelerinden sonik parçalama ve sonrasında sıcak ortamda denatüre koşullarda hazırlanan hücre lizatlarının SDS-PAGE ile analizi.....	101
Şekil 6.27. Şekil 6.26'da SDS-PAGE sonuçları verilen örneklerin diyaliz edilmesi sonrasında soğuk aseton ile çöktürülmesi ile elde edilen proteinlerin elektroforez ile analizi	102
Şekil 6.28. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag ile transforme edilen <i>E. coli</i> hücrelerinden farklı sıcaklıklarda hazırlanan ekstratlerde serin proteaz ve konak bakteri proteinlerinin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analizi	103
Şekil 6.29. <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen H. hispanica serin proteaz enzimi çözünürlüğüne üre ve DTT'nin etkilerinin araştırılması	104
Şekil 6.30. H. hispanica proteaz geni taşıyan plazmit vektörler ile transforme edilen <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinin milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri ...	105
Şekil 6.31. <i>E.coli</i> 'nin farklı suşlarının atıbiyotik içermeyen zenginleştirilmiş milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri	106
Şekil 6.32. H. hispanica proteaz geni taşıyan plazmit vektörler ile transforme edilen <i>E. coli</i> Top10 hücrelerinin milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri ...	106
Şekil 6.33. Serin proteaz enzimi sentez eden <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinden sonikasyon yöntemi ile hazırlanan lizatın BSA üzerinden proteolitik etkilisinin SDS-PAGE ile incelenmesi	108
Şekil 6.34. pET-14b-Ser.Prot plazmiti aktarılan <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinden sıcaklıkta (95 °C'da) bekletilerek hazırlanan lizatların etkisinde bırakılan BSA'nın SDS-PAGE ile analizi	109
Şekil 6.35. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b plazmiti aktarılan <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinden sıcaklıkta (95 °C'da) bekletilerek hazırlanan ve sonrasında üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonu kademeli olarak düşürülen tamponlarda diyaliz edilen lizatların BSA üzerindeki proteolitik etkilerinin SDS-PAGE ile analizi	111
Şekil 6.36. Şekil üzerinde belirtilen konsantrasyonlarda EDTA, DTT ya da 2-β merkaptotanol içeren ortamlarda pET-14b-Ser.Prot plazmiti aktarılan <i>E. coli</i> BL21	

hücrelerinden 5.30.3’de belirtildiği şekilde hazırlanan lizatın ve tripsin enziminin BSA üzerinde gösterdikleri proteaz aktivitelerinin SDS-PAGE ile analizi	112
Şekil 6.37. Farklı plazmitler ile transforme edilen E. coli BL21 hücrelerinden hazırlanan ham özütlerin proteolitik etkisinin azokazein substratı üzerinde denenmesi	114



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Ekstremozimlerin aktivite gösterdikleri ortamlar ve bu enzimleri üreten mikroorganizmaların habitatları	9
Tablo 1.2. Proteaz enziminin katalitik olarak sınıflandırılması	11
Tablo 5.1. Proteaz genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan oligonükleotid primerler	51
Tablo 5.2. Tez çalışması kapsamında oluşturulan plazmitler ve bu plazmitlerin kontrolünde kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri	61

Başlık : *Haloarcula hispanica*'ya ait Proteaz Enzimlerinin *Escherichia coli*'de Rekombinant Olarak Üretilmesi ve Analizi

Öğrencinin Adı : Ayşenur GÜNEŞ

Danışman : Prof.Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı : Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Farklı organizmalardan elde edilen proteolitik enzimler endüstrinin değişik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, ekstremofil özellik gösteren ve çoğalmak için özel koşullar gerektiren *H. hispanica*'ya ait proteaz genlerini, üretilmesi daha kolay ve ucuz olan *Escherichia coli* hücrelerine aktarmak, bu hücrelerde proteaz enzimlerini rekombinant olarak üretmek ve proteolitik aktivitelerini analiz etmek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: *H. hispanica* genomunda proteaz ve serin proteaz geni okuma çerçevesi olarak tanımlanan DNA bölgeleri PZR tekniği ile çoğaltıldı ve *E. coli* hücreleri için geliştirilen, farklı kontrol bölgelerine sahip plazmit vektörlere (pET-14b, pBluescript II SK+ ve pAK-Taq) klonlandı. Klonlanan genlerin doğrulukları DNA dizi analizleri ile saptandı. Rekombinant proteaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde sentezi SDS-PAGE teknikleri ile analiz edildi. Enzim aktiviteleri, hücrelerin milk-agar besiyerinde oluşturdukları üreme zonlarına ve hücrelerden hazırlanan lizatların BSA'yı ve/veya azokazein substratı hidroliz etme özelliklerine bakılarak değerlendirildi.

Bulgular ve Sonuç: Farklı promotör dizileri kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz genlerinin nukleotit dizilerinin doğruluğu DNA dizi analizleri ile ortaya kondu. *H. hispanica* proteaz geninin denenilen farklı *E. coli* suşlarında istenilen düzeylerde ekspresyon yapmadığı görüldü. Buna karşın serin proteaz geninin T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde, *E. coli* BL21 hücrelerinde, diğer hücrel proteinleri ile karşılaştırıldığında yüksek düzeylerde ekspresyon yaptığı saptandı. Bununla birlikte rekombinant serin proteazın hücrelerde inaktif inklüzyon cisimleri halinde biriktiği belirlendi. Rekombinant serin proteazın çözünür forma dönüştürülmesinde kısmen başarı sağlansa da, istenilen düzeylerde enzim aktivitesi saptanamadı. *E. coli* hücrelerinde etkin olarak sentezlenen *H. hispanica* serin proteaz enziminin tekrar aktif forma katlanmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Serin Proteaz, Proteaz, *H. hispanica*, Halofilik, Rekombinant

Title : Recombinant Production and Analysis of *Haloarcula hispanica*'s Proteases Enzymes into *Escherichia coli*
Student's name : Ayşenur GÜNEŞ
Supervisor : Prof. Dr. Kadir TURAN
Department : Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

2. SUMMARY

Aim: Proteolytic enzymes isolated from different organisms are widely used in a various fields of the industry. In this thesis, it was aimed to transfer the protease genes of extremophilic *Haloarcula hispanica* to *Escherichia coli* that is easier ve cheaper to produce, recombinantly produce the proteases ve to analyze their proteolytic activities.

Materials ve Methods: The DNA fragments described as proteases open reading frame on *H. hispanica* genome were amplified by PCR ve cloned into the *E. coli* plasmids (pET-14b, pBluescript II SK + ve pAK-Taq) having different control elements. Accuracy of the genes was determined by DNA sequencing. Recombinant proteases synthesised in *E. coli* was analyzed by SDS-PAGE techniques. Enzyme activities were evaluated by checking of hydrolysis of the BSA ve/or azokazein with the cell lysates ve the zones of cells growing on milk-agar medium.

Results ve Conclusion: The accuracy of the *H. hispanica* proteases genes cloned under the control of different promoters was demonstrated by DNA sequencing. *H. herpanica* protease gene did not express at the desired levels in the different *E. coli* strains tested. In contrast, the serine protease gene under the control of T7 promoter was expressed at high level comparing with other cellular proteins in *E. coli* BL21. However, it was determined that the recombinant serine protease accumulates as inactive inclusion bodies in the cells. Although it was partially succeded in converting the recombinant serine protease to the soluble form, the desired enzyme activity could not be detected. Efforts are going on to refolding of the serine protease into the active form, which is effectively synthesized in *E. coli* cells.

Keywords: Serine Protease, Protease, *H. hispanica*, Halophilic, Recombinant

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşamın temel aktörlerinden olan enzimler, hücrelerdeki tüm biyokimyasal reaksiyonları yönlendiren biyolojik katalizörlerdir. Farklı organizma türlerinde tanımlanmış binlerce farklı enzim bulunmaktadır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (İng. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB*) tarafından, 1961 yılında yayınlanan ilk enzim listesinden günümüze kadar beş binden fazla enzim sınıflandırılmıştır (McDonald ve Tipton, 2014; Tipton ve Boyce, 2000). Hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonları kataliz eden enzimlerin birçoğu hücre dışında da uygun reaksiyon koşulları sağlandığında aktivitelerini sürdürürler. Dolayısıyla bir kısım enzimler farklı endüstri alanlarında kullanılmakta ve ticari olarak büyük bir değer taşımaktadır. Proteolitik enzimler, lipazlar, nükleazlar vb. birçok enzim ticari olarak üretilmekte ve pazara sunulmaktadır. Bu enzimlerin önemli bir bölümü doğal ortamlarının dışında rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak üretilmektedir.

Günümüzde endüstrinin farklı alanlarında başta mikroorganizma kaynaklı enzimler olmak üzere çok sayıda enzim üretilmekte ve kullanılmaktadır. Bu alanda kullanılan ticari enzimlerin en önemli bölümünü proteolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteolitik enzimlerin dünya enzim pazar payının yaklaşık 2/3'ünü oluşturduğu belirtilmektedir (Kasana ve ark., 2011; Saggu ve Mishra, 2017). Proteolitik enzimler özellikle deterjan, deri, et ürünleri, süt ürünleri, ilaç ve çeşitli organik maddelerin sentezlerinde ve çeşitli atıkların arındırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Feijoo-Siota ve ark., 2014; Gupta ve ark., 2013; Heredia-Sandoval ve ark., 2016; Niyonzima ve More, 2015; Singh ve ark., 2016; Theron ve Divol, 2014). Endüstriyel işlemler çoğunlukla aşırı koşullarda (yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek/düşük pH değerleri gibi) gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla, aşırı koşullarda, yapısal özelliklerini koruyabilen ve aktivite gösterebilen enzimler endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır (Coolbear ve ark., 1992; Littlechild, 2015b; Prasad ve Roy, 2018; van den Burg, 2003). Bu tür enzimlerin elde edilmesinde özellikle aşırı koşullarda yaşayabilen mikroorganizmalar dikkat çekicidir (Littlechild, 2015a). Bu çalışmada yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan bir mikroorganizma olan *Haloarcula hispanica* hücrelerine ait proteolitik enzimlerin rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmıştır. *Halobacteriaceae* ailesi içerisinde sınıflandırılan bu

arkebakteri en az 1.5 M NaCl içeren ortamda çoğalabilmekte ve özel koşullar gerektirmektedir. *Escherichia coli* ile kıyaslandığında çoğalma hızları oldukça yavaştır. Bu nedenle, endüstriyel olarak kullanım potansiyeli olan enzimlerin kendi doğal hücrelerinde üretilmesi maliyet açısından uygun değildir. Dolayısıyla bu çalışmada *H. hispanica*'ya ait ele alınan iki proteaz geni *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapmak üzere tasarlanan plazmit vektörlerine klonlandı. *H. hispanica*'ya genlerden serine proteaz (Ref Seq: YP_004786315.1) ve proteaz (Ref Seq: YP_004786353.1) enzimlerini kodlayan genler çalışma kapsamına alındı. Bu genlerin klonlanması ile elde edilen rekombinant plazmit vektörler farklı *E. coli* suşlarına transforme edildi. *H. hispanica* proteaz geni taşıyan *E. coli* suşlarının, farklı kültür koşullarında proteaz enzimi üretme potansiyelleri araştırıldı. Çalışma sonucu elde edilen veriler, *E. coli* hücrelerinin özellikle *H. hispanica*'ya serin proteaz enzimini etkin bir şekilde sentez edebildiğini gösterdi. Farklı koşullarda üretilen transformant *E. coli* hücrelerinde *H. hispanica*'ya proteaz enzimi üretiminin çok sınırlı düzeylerde kaldığı saptandı. *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *H. hispanica*'ya serin proteaz ve proteaz enzimlerinin *in vitro* koşullarda istenilen düzeyde enzimatik aktivite göstermediği belirlendi.

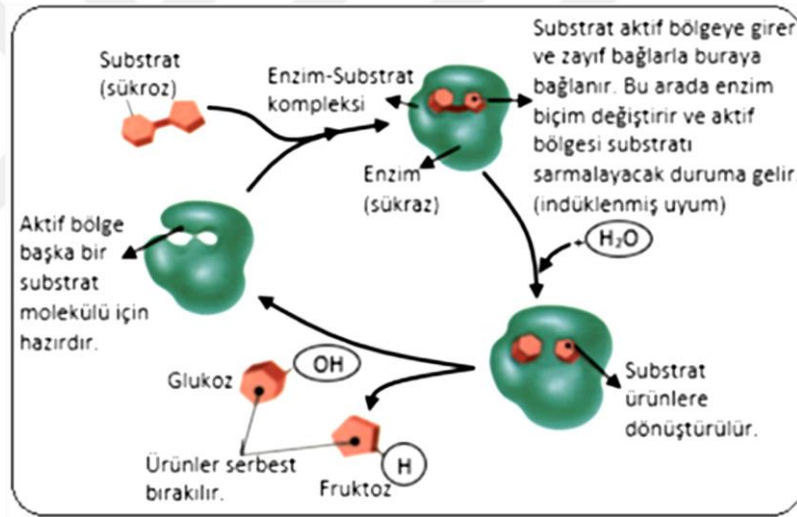
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Enzimler

Enzimler, belirli bir biyokimyasal reaksiyonu gerçekleştirmek için katalizör işlevi gören canlı bir organizma tarafından üretilen biyolojik makro moleküllerdir. Hücre içinde veya hücre dışı ortamda biyokimyasal reaksiyonları hızlandırmak ile karakterize olmuşlardır. Diyastaz 1833 yılında Kimyager Anselme Payen tarafından keşfedilen ilk enzim olmuştur (Martinez Cuesta ve ark., 2015). Daha sonraki yıllarda nişastanın hidrolizinin enzimler ile kataliz edilen bir reaksiyon olduğu bilim insanı Jacob Berzelius tarafından kabul edilmiştir. Nelson ve Griffin 1916'da enzimlerin immobilize edilebildiğini, aktif kömür üzerine invertaz enziminin adsorpsiyonunu gerçekleştirerek göstermişlerdir. Diğer taraftan endüstriyel öneme sahip madde üretmek amacıyla hücrelerde immobilize edilmiştir. Immobilize edilen hücreler, amino asitlerin, organik asitlerin, antibiyotiklerin, enzimlerin ve diğer bileşiklerin üretimi için kullanılmıştır. Immobilize hücre teknikleri, serbest hücre sistemine kıyasla daha yüksek üretim hızına sahiptir ve ürünlerin daha kolay ayrılmasına olanak sağlarlar (Gurung ve ark., 2013). Doğal ortamlardan elde edilen enzimler, eski zamanlardan beri keten ve deri gibi ürünlerin işlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu işlemler mikroorganizma, hayvan ya da bitkisel kaynaklı enzimlere bağlı olabilir. Uygun mikroorganizma suşların seçilmesi enzimlerin daha büyük ölçeklerde üretilmesine olanak sağlamıştır. Bu gelişme enzimlerin tekstil ve deterjan gibi farklı alanlarda da yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Rekombinant DNA teknolojileri enzim üretimi için seçilen mikroorganizmaların daha sofistike hale getirilmesine ve üretilmesi güç olan ticari enzimlerin de üretilmesine katkıda bulunmuştur (Adrio ve Demain, 2010). Ayrıca 1940'lı yıllardan itibaren enzimlerin sadece endüstriyel üretim proseslerinde değil aynı zamanda teşhis aracı olarak da kullanılabileceği ortaya konmuştur. Şu anda kullanılan endüstriyel enzimlerin önemli bir bölümü, çeşitli doğal bileşiklerin parçalanması için kullanılan hidrolitik enzimlerdir. Bu alanda özellikle gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılan proteazlar önemli bir yer tutmaktadır. Proteolitik enzimleri nişasta, tekstil, fırıncılık gibi endüstrilerde kullanılan amilazlar ve selülozlar izler (Underkofler ve ark., 1958).

4.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, gıdaların sindiriminden DNA moleküllerinin sentezine kadar çok geniş bir yelpazede metabolik reaksiyonları spesifik olarak kataliz eden biyolojik moleküllerdir (Bairoch, 2000). Emil Fischer 1894 yılında enzim ve substrat etkileşimi için birbirine tam olarak uyan anahtar kilit modeli önermiştir. Önerilen bu model enzim spesifikliğini açıklarken enzimlerin ulaştığı geçiş durumunun kararlılığını açıklamada yetersiz kalmıştır. Günümüzde enzim ve substratın birbirini bağlanmasının indüklenmiş uyum modeline göre gerçekleştiği görüşü kabul görmektedir. Bu modele göre, enzim substrat olmadığı zaman serbest olarak bulunmaktadır; ancak substrat ile etkileştikten sonra uygun yapısal şekli almakta ve substrat enzimin aktif bölgesine bağlanmaktadır (Robinson, 2015) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İndüklenmiş uyum modeli (<http://www.biyolojiportali.com/konu-anlatimi/2/31/enzimler-canlilarin-yapisinda-bulunan-organik-bilesikler-4> erişim tarihi 06.04.2019)

Enzimler substratları ile karşılaştırıldığında çok daha büyük yapıda olmakla birlikte küçük bir bölgesi (aktif sit) kataliz işlevi görür (Gurung ve ark., 2013). Bazı enzimler reaksiyon sonucu oluşan ürünler veya katalizlenen reaksiyonun substratları için bağlanma ek bölgelerine sahiptirler. Bu bölgelere ürün ya da diğer bazı moleküllerin bağlanması, enzimin aktivitesini artırarak ya da azaltarak enzimin kontrolünü sağlar. Büyük bir çoğunluğu protein yapıda olan enzimler tersiyer yapıda

aktiftirler ve bu yapı sıcaklık artışı ya da çeşitli denatüre edici kimyasal maddeler tarafından inaktif hale getirilebilir. Denatürasyon olayı enzime bağlı olarak tersinir ya da geri dönüşümsüz olabilir.

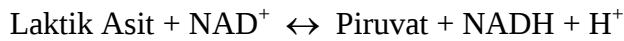
Tanımlanmış enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği - Adlandırma Komitesi (İng. *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology :NC-IUBMB*) tarafından 6 ana gruba ayrılmıştır (McDonald ve ark., 2009).

Bu gruplar;

1. Oksidoredüktaz (EC 1)
2. Transferaz (EC 2)
3. Hidrolaz (E 3)
4. Liyaz (EC 4)
5. İzomeraz (EC 5)
6. Ligaz (EC 6)

Oksidoredüktazlar, iki substrat arasındaki redoks (oksidasyon/redüksiyon) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Biyolojik sistemlerde bu olay hidrojenin substrattan uzaklaştırılması şeklinde gerçekleşir. Laktat dehidrogenaz gibi bazı enzimler bir substrattan NAD^+ 'ye (nikotinamid adenin dinükleotid) H transfer eden enzimlerdir. Bu enzimler dehidrogenazlar alt sınıfında yer alırlar.

laktat dehidrogenaz



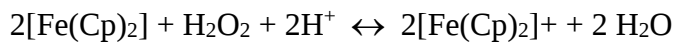
Bazı oksidoredüktaz enzimleri bir substrattan moleküler oksijene hidrojen transferini kataliz ederler ve sonuçta hidrojen peroksit oluşumu gerçekleşir (oksidazlar).

glukoz oksidaz



Oksidoredüktazlar içerisinde yer alan peroksidazlar, hidrojen peroksit ile redüklenmiş substratı (boyalar, aminler ve hidrokinonlar vb) okside eden enzimlerdir.

yaban turpu peroksidazı



Bazı oksidoredüktaz enzimleri direkt olarak moleküler oksijen ile substratlarını okside ederler (oksijenazlar).

laktat monooksijenaz



Transferazlar içerisinde yer alan enzimler, atom gruplarının bir molekülden diğerine transferini katalize eder. Örneğin aminotransferazlar veya transaminazlar, amino asitlerden aldıkları bir amino grubunu bir alfa oksi aside transferini sağlarlar.

Hidrolazlar, su varlığında substratlarının hidrolizini kataliz ederler. Hidrolitik reaksiyonlarda, proteinlerde peptit bağları, karbonhidratlarda glikosidik bağları ve lipidlerde ester bağları su molekülü eklenerek kopar. Bu tez çalışmasına konu olan *H. hispanica*'ya ait proteaz enzimleri de hidrolazlar grubu içerisinde yer alan enzimlerdir.

Liyazlar, karbon-karbon, karbon-oksijen ve karbon-azot arasındaki bağların kırılmasıyla çift bağ oluşumunu katalize ederler. Bu enzimlerde bağların kopması, su molekülü katarak bağları koparan hidrolaz enzimlerinden farklı bir mekanizma ile gerçekleşir.

İzomerazlar, aynı molekülde yer alan grupların bir pozisyonundan diğerine transferini katalize eden enzimlerdir.

Ligazlar, moleküller arasında kovalent bağ oluşturarak onları birleştirirler (Gurung ve ark., 2013; Martinez Cuesta ve ark., 2015). Bu enzimlerin katalizörlüğünde yeni bağların oluşturulmasında ATP gibi yüksek enerjili moleküller kullanılır (Tipton, 1994).

4.1.2. Ekstrem (aşırı) koşullarda aktivite gösteren enzimler (Ekstremozimler)

Ekstremofiller olarak adlandırılan mikroorganizmalar, aşırı koşullar altında (yüksek sıcaklık, yüksek tuz yoğunluğu, yüksek basınç, radyasyon, asidik/bazik pH'ler veya ağır metal tuzları bulunan ortamlar) çoğalabilen organizmalardır ve bu organizmaların önemli bir bölümü prokaryotik organizmaların bir kolu olan arkebakteriler içerisinde yer alırlar (Cavicchioli, 2011; Koga ve Morii, 2007). Ekstrem koşullarda yaşayan bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimler ise ekstremozimler olarak adlandırılırlar. Ekstremozimler organik çözücüler, metaller ve proteolitik

saldırıları varlığında, yüksek sıcaklıklarda ve aşırı pH koşullarında stabilitelerini ve enzimatik aktivitelerini korurlar. Bu nedenle ekstremozimler ekstrem koşullarda gerçekleştirilen endüstriyel işlemlerde kullanılabilirler (Eichler, 2001; van den Burg, 2003). Ekstremozimlerin özellikleri ve bu enzimleri üreten mikroorganizmaların yaşam alanları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1.1).

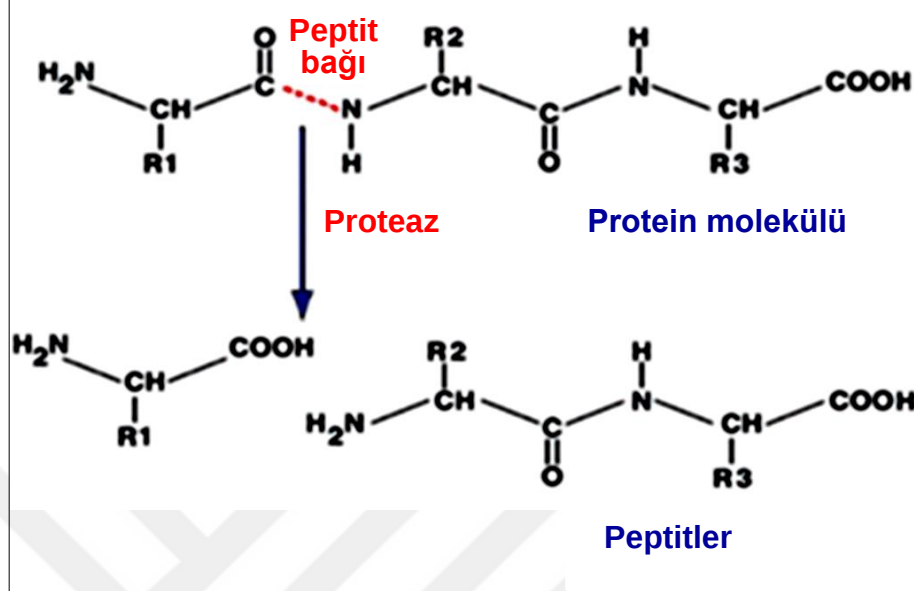
Tablo 1.1. Ekstremozimlerin aktivite gösterdikleri ortamlar ve bu enzimleri üreten mikroorganizmaların habitatları (van den Burg, 2003).

Tip	Ortam Koşulları	Habitat
Halofil	Yüksek tuz konsantrasyonu (2-5 M NaCl)	Tuz gölleri, tuzlu topraklar, kıyı gölleri
Asidofil	Düşük pH <2	Atık artıma tesisleri, maden drenajı
Metallofil	Yüksek ağır metal konsantrasyonu (Cu, Cd, As, Zn)	Derin deniz veya karasal hidrotermal kaynaklar, metal işletme fabrikaları
Alkalifil	Yüksek pH >10	Soda gölleri, alkalın sıcak kaynak suları, maden atıkları
Barofil	Yüksek hidrostatik basınç (40-130MPa)	Okyanus tabanı, derin deniz dipleri
Radiofil	Yüksek iyonize radyasyon (>25 kGy)	Nükleer atık, denizin üst katmanları, karasal yüzeyler
Psikrofil	Düşük sıcaklık <15°C	Arktik ve Antarktika toprakları ve suları, alpin toprakları, derin okyanus suyu ve buzullar

4.2. Proteazlar

Gelişen dünyada çevre ile daha uyumlu olması nedeniyle kimyasal süreçlerin yerine enzimatik yöntemlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Farklı endüstri alanlarında kullanılan enzimler arasında proteolitik enzimler (proteazlar) dünya enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Dolayısıyla proteazlar fizyolojik ve endüstriyel alanlardaki uygulamalarda en baskın hidrolitik enzimlerden biri konumundadır (Cui ve ark., 2015; Nascimento ve ark., 2016; Rao ve ark., 1998; Saggu ve Mishra, 2017). Proteazlar yukarıda da değinildiği gibi hidrolazlar ana sınıfı

içerisinde yer alan, proteinlerdeki peptit bağlarını su molekülü ekleyerek kıran enzimlerdir (Rao ve ark., 1998) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Peptit bağlarının proteazlar tarafından hidrolizi.

Proteazlar Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği - Adlandırma Komitesi tarafından hidrolazlar içerisinde (EC 3) 4.alt grup (EC 3.4 Proteazlar) olarak sınıflandırılmıştır.

- EC 3 (Hidrolazlar)
- EC 3.4 (Proteazlar)

Proteolitik aktiviteye sahip enzimler elde edildikleri kaynağa ve etki mekanizmalarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Proteazlar hayvanlar, bitkiler ya da çeşitli mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Yapısal özellikleri etki mekanizmaları bakımından büyük çeşitlilik göstermeleri proteazların sınıflandırılmasını biraz güçleştirmektedir. Proteazların sınıflandırılmasında daha çok katalizledikleri reaksiyonun tipi ve kataliz bölgesinin amino asit kompozisyonu göz önünde bulundurulur. Proteazlar, proteinler üzerinde etki ettikleri peptit bağının pozisyonuna göre ekzo- ve endo-peptidazlar olarak iki ayrı grup olarak değerlendirilirler. Proteinlerin uç noktalarından kesme yaparken proteazlar ekzo-peptidazlar, iç bölgelerdeki peptit bağlarında kesme yaparlar ise endo-peptidazlar olarak adlandırılırlar. Ekzo-peptidazlar protein molekülünde etki ettikleri uçlara göre

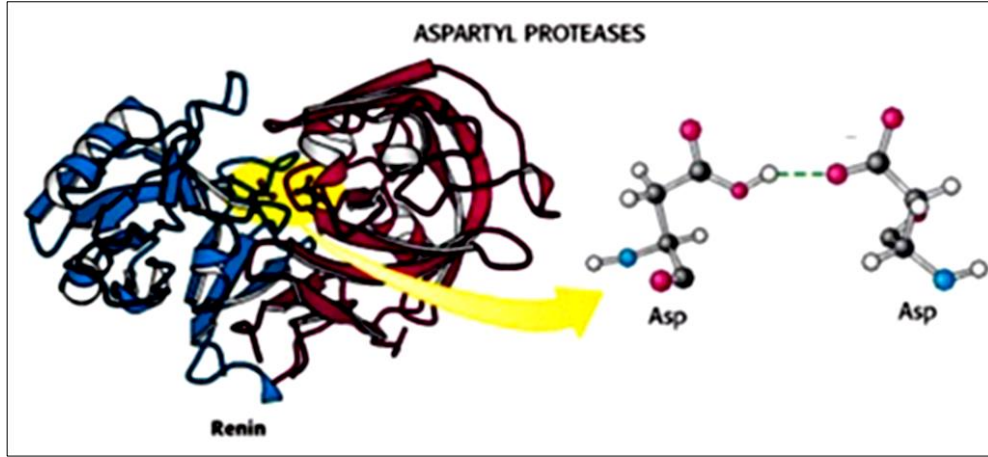
amino-peptidazlar ve karboksi-peptidaz olarak gruplandırılırlar. Endopeptidazlar etki ettikleri bölgedeki fonksiyonel gruplara ve kataliz mekanizmalarına göre ise Tablo 1.2’de verildiği gibi çok sayıda alt gruplara ayrılırlar (da Silva ve ark., 2014; de Souza ve ark., 2015; Halabi ve ark., 2009; Krem ve Di Cera, 2001; Rawlings, 2016).

Tablo 1.2. Proteaz enziminin katalitik olarak sınıflandırılması (da Silva, 2017).

	Nükleofilik ajan	Başlıca üretim Kaynakları	Enzim sınıfı
Serin peptidaz	Serin kalıntısı (Ser)	Hayvan, bitki, bakteri mantar ve virüsler	Hidrolaz E.C.3.4.
Aspartik peptidaz	İki aspartat ile aktifleşmiş su molekülü	Hayvan, bitki, bakteri mantar ve virüsler	Hidrolaz E.C.3.4.
Sistein peptidaz	Sistein kalıntısı (Cys)	Hayvan, bitki, bakteri mantar ve virüsler	Hidrolaz E.C.3.4.
Metallopeptidaz	Metalik iyonlar ile aktifleşmiş su molekülü	Hayvan, bitki, bakteri ve mantar	Hidrolaz E.C.3.4.
Glutamik peptidaz	Glutamat ile bağlantılı su molekülü	Bakteri ve mantar	Hidrolaz E.C.3.4.
Treonin peptidaz	Treonin kalıntısı (Thr)	Bakteri, arke, mantar	Hidrolaz E.C.3.4.
Asparagin peptid Liyaz	Asparagin kalıntısı (Asn)	Bakteri, arke, mantar Virüs	Liyaz E.C. 4.3.2

4.2.1. Aspartik peptidaz

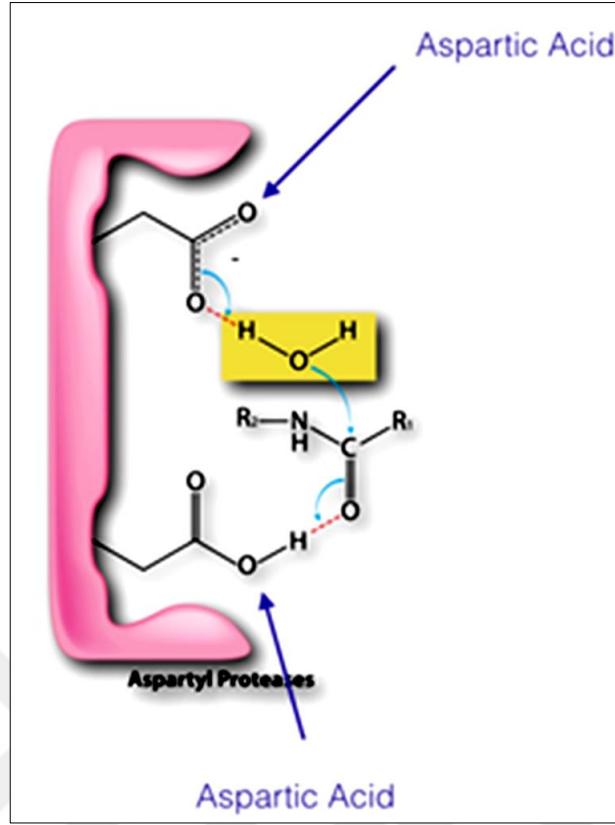
Aspartik veya aspartil peptidazlar, katalitik aktivitelerini aspartik asit bakiyeleri üzerinde gösteren endopeptidazlardır. Bu enzimler genel olarak aktif bölgelerinde korunmuş aspartik asit bakiyesine sahiptirler (Şekil 4.3). Aspartik proteazların çoğu asidik pH değerlerinde (~ 3-5) maksimum aktiviteye sahiptir ve 3-4.5 aralığında izoelektrik noktaları vardır. Streptomyces'ten elde edilen iki statin kalıntısını içeren, doğal olarak oluşan bir heksapeptid olan pepstatin A tarafından inhibe edilirler (Davies, 1990).



Şekil 4.3. Bir aspartik proteaz olan reninin katalitik bölgesinde yer alan korunmuş aspartik asit bakiyeler.

(http://oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/stryer7/9/figure_09_16_02.jpg-erişim tarihi 06.04.19)

Aspartik endopeptidazlar, pepsin (A1), retropepsin (A2) ve retrovirüslerden (A3) kaynaklı enzimler olarak üç aileye ayrılmıştır. Yapısal olarak, çoğu aspartik peptidazların A1 pepsin ailesine ait olduğu bilinmektedir. Diğer pepsin benzeri enzimler gibi, aspartik peptidazlar inaktif halde (zimojen) sentez edilirler. Sentezden hemen sonra sinyal dizileri kesilerek atılır ve proenzim olarak salgılanırlar. Daha sonra diğer proteazlar ile ya da otokatalitik olarak kesilerek aktive olurlar (Davies, 1990). Bu enzimler diazoketon bileşikleri ile bakır iyonlarının varlığında inhibe edilirler (Rao ve ark., 1998). Genel olarak kabul edilen kataliz mekanizması, aktif bölgedeki iki aspartik asit bakiyesinin substrat-peptid bağındaki nükleofilik saldırıya aracılık eden bir su molekülünü aktifleştiren genel bir asit-baz mekanizmasıdır (Yegin ve ark., 2011) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Aspartik endopeptidazların kataliz mekanizması.

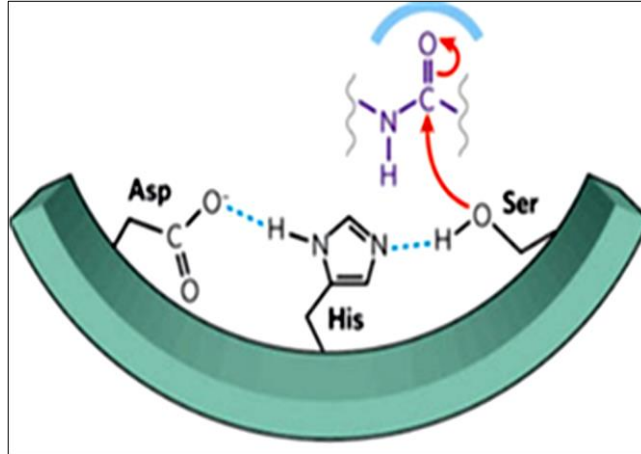
(<http://oregonstate.edu/instruct/bb450/450material/OutlineMaterials/13EnzymeMechanism/1ProteaseCategories.jpg>-erişim tarihi 06.04.19)

Bu proteaz grubu enzimler, kazein hidrolizatlarının elde edilmesi, peptit sentezi ve meyve sularındaki bulanıklığın giderilmesi gibi çeşitli endüstriyel sektörlerde kullanılmaktadır (Yegin ve ark., 2011). Peynir üretiminde kullanılan aspartat endopeptidaz olan kimozinin (rennin) yeni doğan geviş getiren hayvanlardan elde edilmesinde etik problemlerle karşılaşılmasından dolayı, hem üretim maliyetinin düşük olması ve hem de kısa sürede elde edilebilmesi nedeniyle *E. coli*, *Aspergillus niger* ve *K. lactis* gibi mikroorganizmalardan rekombinant olarak elde edilmektedir (Alves ve ark., 2007; Brannon ve ark., 2015; da Silva ve ark., 2016; Doron ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2010; Yegin ve ark., 2011). Aspartik endopeptidazlar aynı zamanda birçok hastalığın tedavisi için umut vadeden ilaç hedefleridir (Dash ve ark., 2003). Bu proteaz grubunda yer alan bazı enzimlerin önemli hastalıkların ortaya çıkmasında rolleri vardır: pepsin (peptik ülseri) renin (hipertansiyon), HIV proteazı (AIDS), katepsin D (kanser), plasmepsin (sıtma). Bu nedenle özellikle tedavi etme

potansiyeli olan proteaz inhibitörlerini geliştirmek için çalışmalar önem kazanmıştır. Doğal peptit olan pepstatin A (Morishima ve ark., 1970; Motwani ve ark., 2015) ve grassystatin A'nın (Kwan ve ark., 2009) her ikisi de aspartat peptidazları inhibe etmektedir. Statin kalıntısı yapısındaki hidroksil grubu, bu bileşiklerin proteaz enzimlerini inhibe etmesini sağlayan temel etmendir (Al-Awadhi ve ark., 2016; Dali ve ark., 2012). İnhibitörlerdeki bu hidroksil grubu, peptid hidrolizindeki tetrahedral ara ürün ve enzim arasındaki doğal bağlanma etkileşimlerini taklit ederek proteazın katalitik bölgesindeki aspartat bakiyesi ile etkileşir (Baldwin ve ark., 1993).

4.2.2. Serin peptidaz

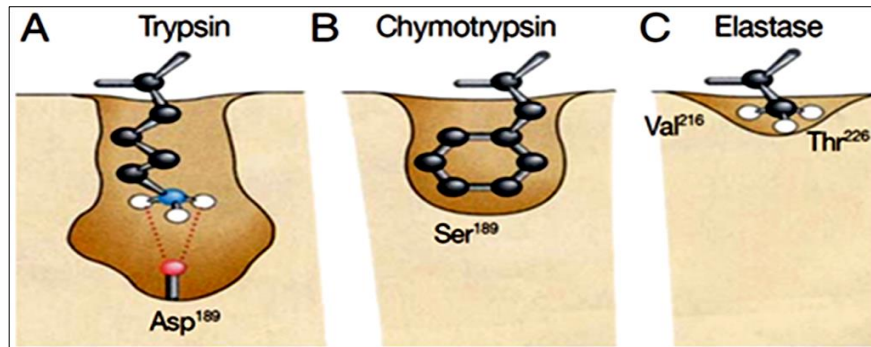
Serin proteazlar, aktif bölgedeki nükleofilik serin bakiyesi taşıyan enzimlerdir. Enzimin katalitik bölgesinde kataliz için önem taşıyan His, Ser ve Asp amino asit bakiyeleri yer almaktadır. Bu enzimler endopeptidaz ya da ekzopeptidaz aktivitesi gösterebilirler. Çoğu serin proteazlar pH 6–11 değerleri arasında maksimum kataliz aktivitesi gösterirler ve izoelektrik pH değerleri 4-6 aralığındadır. Mantarlardan izole edilen bazı alkali serin proteazlar pH 10 civarında optimum kataliz aktivitesine sahiptirler. Bu enzimlerin pH 8-9 aralığında yüksek izoelektrik pH değerleri vardır (Page ve Di Cera, 2008; Rao ve ark., 1998).



Şekil 4.5. Serin proteazların katalitik bölgesinde yer alan korunmuş amino asit bakiyeleri. (<https://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-14398894> - erişim tarihi 06.04.19)

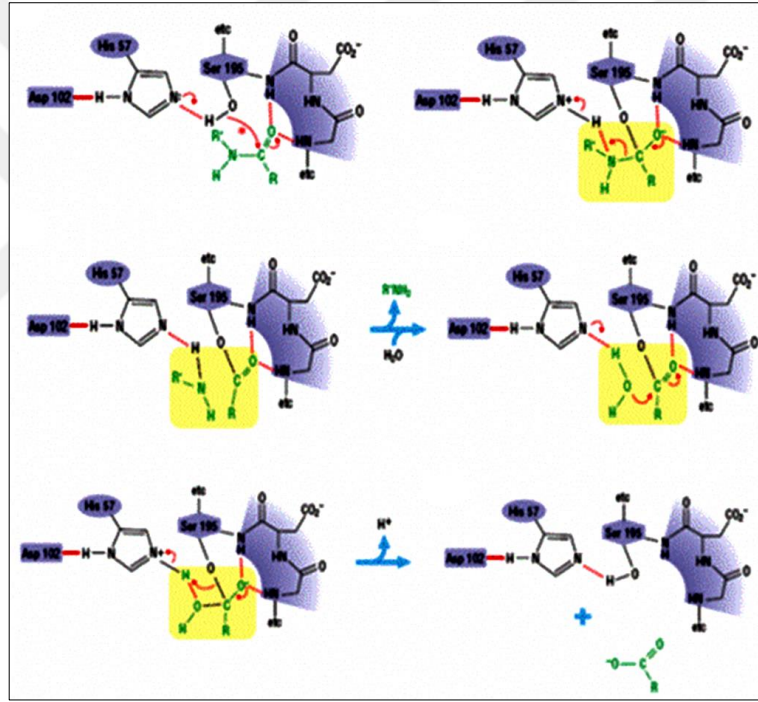
Serin proteazlar, besinlerin sindirimi, hücrelerin kontrollü ölümü (apoptoz), hücre içi ve hücre dışı sinyal iletimi, kan pıhtılaşmasında iş gören proteinlerin proteolitik kesimi ile aktivasyonu gibi organizmalar için hayati önem taşıyan olaylarda işlev görürler. Bunların yanı sıra kardiyopulmoner hastalık ve amfizem gibi hastalıkların patogenezinde önemli oldukları bilinmektedir. Serin proteaz enzimleri organizmalardaki doğal işlevleri dışında endüstrinin değişik alanları (peynir üretimi, deterjan sanayii vb.), deri tedavisi gibi sağlık alanında kullanılmaktadırlar. Sindirim sisteminin önemli enzimlerinden olan kimotripsin başlıca serin proteazlardandır. Substrat spesifikliğine göre tripsin benzeri, kimotripsin benzeri ve elastaz benzeri olarak üç ana alt gruba ayrılır (da Silva ve ark., 2014; Neurath, 1986; Tetley, 1993). Bu enzimler fenilmetilsülfonil florid (PMSF), tripsin inhibitörü, antipain, kimostatin tarafından inhibe edilirler.

Bir serin proteaz olan tripsin enziminin substrat spesifikliğı, aktif cep bölgesinin tabanında yer alan negatif yüklü aspartik asit (Asp) bakiyesinden kaynaklanır. Bu özelliğinden dolayı substratta lizin (Lys) ve argininin (Arg) gibi pozitif yüklü amino asit bakiyelerinin peptid bağlarını koparır. Kimotripsin katalitik spesifikliğı ise serin (Ser) ve glisin (Gly) içeren hidrofobik bir cebe bağlıdır. Aktif cepte yer alan fenilalanin (Phe), triptofan (Trp) ve tirozin (Tyr) gibi hidrofobik amino asit bakiyeleri, peptid bağlarının hidrolizlenmesini sağlar. Elastaz enzimi daha küçük bir substrat bağlayıcı aktif bölgeye sahiptir. Bu enzim tripsin veya kimotripsinden daha küçük bir aktif cep yapısına sahiptir ve cepte yer alan alanin (Ala), glisin (Gly) ve valin (Val) gibi küçük, nötral amino asit bakiyeleri peptid bağlarının hidroliz edilmesine katkı sağlar (Yang ve ark., 2015) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Serin proteazların özgülüğünden sorumlu bağlayıcı cep modeli. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384789/figure/f1-kjp-53-1-1> erişim tarihi 09.04.19)

Bir serin proteaz olan kimotripsin enziminin katalitik mekanizması genel olarak dört aşamada değerlendirilir. Birinci aşama substrat bağlanmasıdır, substrat enzimin tanıma bölgesine bağlanır ve amid bağının karbonilini açığa çıkarır. İkinci aşama nükleofilik saldırıdır, histidin (His 57) bakiyesi serinin (Ser 195) hidroksil grubundan protonu çeker ve Ser 195 substratta kesilecek peptit bağının karbonil grubuna saldırır. Karbonil grubunda yer alan oksijen tek bağlı duruma geçer ve negatif yük kazanır. Bu bölgeye oksi-anyon boşluk adı verilir. Üçüncü aşama protonasyondur, histidin üzerinde bulunan serin protonu, enzime sıkı bağlanmayan peptidin C-terminali tarafından alınır. Son aşama deasilasyondur, su molekülü açıl-enzim kompleksine saldırır ve katalitik üçlü restore edilir (Yang ve ark., 2015) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Bir serin proteaz olan kimotripsinin katalitik mekanizması.

(https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme_Catalytic_Mechanism/Proteases/Chymotrypsin erişim tarihi 09.04.19)

Günümüzde deterjan sanayiinde kullanılan proteazların çoğu serin proteazların subtilizin ailesi içinde yer alırlar. Bu enzimler birçok organizmada tanımlanmış olmasına karşın hemem hemen tümü *Bacillus* türlerinden izole edilmektedir. Bu enzimler, temelde pH 12 gibi yüksek pH değerlerinde aktif ve stabil yapılarını

korudukları için deterjanlarda kullanılması uygundur. (Fujinami ve Fujisawa, 2010). Deterjanlarda kullanılacak proteazların hem sığağa dayanıklı (termostabilite) hem de düşük sıcaklıklarda aktif olmaları tercih edilir. Düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren subtilizinler, *Bacillus*'lara ait bilinen subtilisin üzerinden başarıyla yapılandırılmıştır (Siddiqui ve ark., 2009; Tindbaek ve ark., 2004; Wintrode ve ark., 2000).

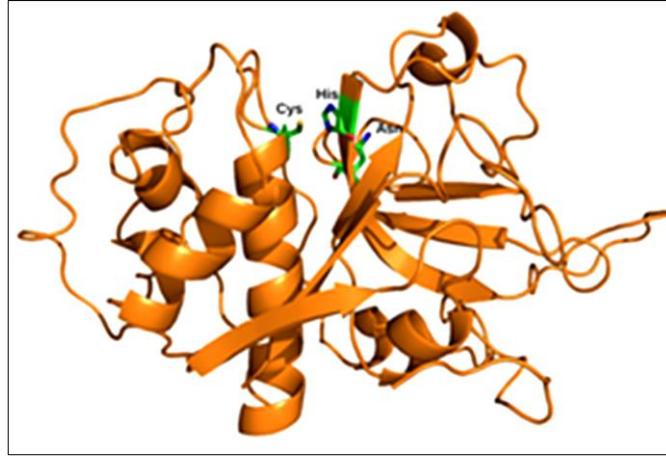
4.2.3. Sistein peptidaz

Sistein proteazlar tiol proteazlar olarak da bilinen proteolitik enzimlerdir. Bu grup içerisinde yer alan enzimler nükleofilik sistein tiol bakiyesinin rol aldığı genel bir kataliz mekanizmasına sahiptirler (Dou ve Carruthers, 2011). Sistein proteazlar, papaya, ananas, incir ve kivi gibi meyvelerde yaygın olarak bulunurlar (Brocklehurst ve Philpott, 2013) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sistein proteaz bakımından zengin bir bitki olan *Carica papaya* meyvesi. (<https://www.essentialsofaustralia.com/products/productid884> erişim tarihi 09.04.19)

Sistein proteazların katalitik etkileri aktif bölgede yer alan bir sistein amino asit bakiyesine bağlıdır. Katalizde önemli olan histidin (His) ve sistein (Cys) tüm tiyol peptidazlarda bulunur. Papain benzeri sistein peptidazda ise kataliz bölgesi genellikle His, Cys ve asparagin (Asn) amino asit bakiyelerinden oluşur (Brocklehurst ve Philpott, 2013) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Papain benzeri bir sistein proteazın tersiyer yapısı aktif bölgesinde yer alan amino asit bakiyeleri.

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=4842899_fphar-07-00107-g001.jpg – erişim tarihi 09.04.19)

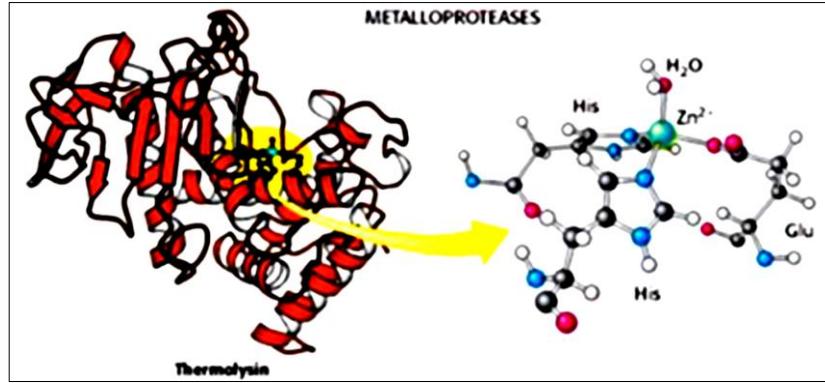
Sistein peptidazlar genel olarak, pH 4.5-7 aralığında maksimum aktivite gösterirler. Enzimde tiyol grubunun oksidasyona olan yüksek eğilimi nedeniyle, proteolitik reaksiyon için ortamında sodyum bisülfid, hidrojen siyanür gibi indirgeyici ajanlara gereksinim duyulur. Sistein proteazlar N-etilmaleimid, iyodoasetik asit ve E-64 gibi moleküller tarafından inhibe olurlar (Brocklehurst ve Philpott, 2013). Tüm canlı organizmalarda sistein proteaz enzimleri bulunmakla birlikte bu enzimlerin önemli bir bölümü virüs kaynaklıdır. Bakteri türlerinden *Clostridium histolyticum*'da clostripain, *Porphyromonas gingivalis*'de gingipain; mantarlardan *Aspergillus flavus*'da katepsin B; protozoalardan *Trypanosoma cruzi*'de cruzipain; bitkilerden *Carica papaya*'da papain ve kimopapain, *Ficus glabrata*'da fisin, *Ananas comosus*'ta bromelain, *Actinidia chinensis*'de aktinidin ve *Calotropis gigantea*'da kalotropin DI tanımlanmış sistein proteazlardır. Memelilerde ise iki ana sistein proteazı grubu saptanmıştır. Bunlar sitoplazmil kalpainler (kalpain tip I, kalpain tip II) ve lizozomal katepsinlerdir (katepsinler: B, C, H, K, L, M, N, S, T, V, ve W) (McGrath, 1999; Rawlings ve Barrett, 1999).

Sistein proteazlar proteinlerin proteolitik yıkımı dışında, insanlarda çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında da etkilidirler (Chapman ve ark., 1997; Vasiljeva ve

ark., 2007). Örneğin parazitlere ait sistein proteazlar hemoglobin hidrolizi, kan hücresi invazyonu ve yüzey proteinlerinin işlenmesinde anahtar rol oynar (Lecaille ve ark., 2002; Sajid ve McKerrow, 2002; Sijwali ve Rosenthal, 2004). Diğer taraftan, parazit veya virüs kaynaklı katepsinler ve diğer bazı sistein proteazlar, sıtma, Afrika uyukusu hastalığı, artrit, osteoporoz, bağışıklıkla ilgili hastalıklar ve AIDS gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olan enzimlerdir. Bu nedenle bu enzimler ilaç geliştirme çalışmalarında hedef olarak ele alınmaktadırlar (Gills ve ark., 2007; Hirai ve ark., 2013; Lecaille ve ark., 2002; Petrov ve ark., 2000; Salminen-Mankonen ve ark., 2007).

4.2.4. Metallopeptidaz

Metalloproteazlar, kataliz için iki değerlikli metal iyonlara gereksinim duyan proteazlardır. Bu grup içerisinde yer alan enzimler endoproteazlar ya da ekoproteazlar olarak işlev görebilirler. Proteolitik bir reaksiyonu kataliz edebilmeleri için yapısında genellikle katyon olarak çinko bulunmaktadır. Bununla birlikte bakır, demir, kobalt, mangan ve nikel gibi diğer metal iyonları da bu enzimler için tanımlanmıştır. Metallopeptidazların aktif bölgeleri başlıca His-Glu-Xaa-Xaa-His (Xaa: aynı amino asit) amino asit bakiyeleri içerir (Ward ve ark., 2009). Yapılarında iyon bulundurmaları nedeniyle bu enzimler etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikoletraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı maddeler ile inhibe olurlar (da Silva ve ark., 2013; Merheb-Dini ve ark., 2009). Kolagenaz ve elastaz (bakteri ve mantarlar), yılan zehirlerinin hemorajik toksinleri ve bakteriyel termolizin gibi metallopeptidazlar katalitik aktivite bakımından farklılıklar gösterirler. *B. stearothermophilus* tarafından sentez edilen nötr çinko proteaz olan termolizin, en iyi karakterize edilmiş metalloproteazlardan biridir (Şekil 4.10). Yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan bu enzimin 80 °C'ta yarılanma ömrü ortalama 1 saattir. Enzime bağlanan dört kalsiyum atomu stabiliteyi artırır (Ward ve ark., 2009).



Şekil 4.10. Bir metallopeptidaz olan termolizinin tersiyer yapısı.

(http://oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/stryer7/9/figure_09_16_03.jpg - erişim tarihi 09.04.19)

Bu enzim grubu içerisinde yer alan matriksin olarak da adlandırılan matriks metalloproteinaz (MMP's) kalsiyum bağımlı, çinko iyonu taşıyan endopeptidazlardır. MMP'lar hücre dışı matriksin proteinlerini hidrolize ederler. Hücre dışı matriksin proteinleri çeşitli hücrelere yapısal destek sağlayan proteinler, sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinler ve sinyal proteinleri gibi karmaşık bir protein ağıdır (Brinckerhoff ve Matrisian, 2002). Bu proteinler matriks metalloproteinazların da katılımıyla sürekli yeniden modellenirler (Solomonov ve ark., 2016).

4.2.5. Treonin peptidaz

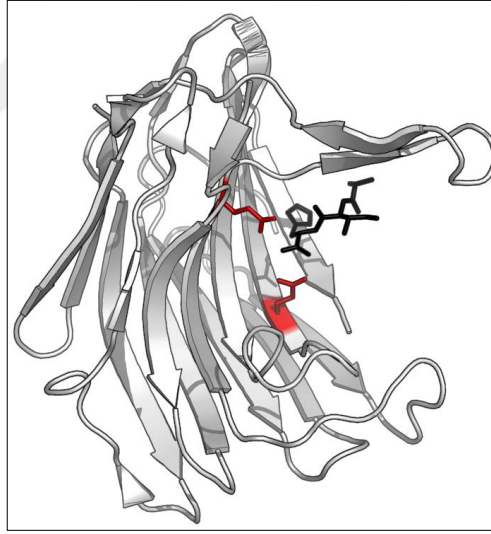
Treonin peptidaz, hücre içi proteinlerin kontrollü yıkımında işlev gören proteazom kompleksinin bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. Basit bir ökaryotik organizma olan *Saccharomyces cerevisiae*'ye (Şekil 4.11) ait proteazomun kristalografik yapı analizinde, aktif bölgede N-terminal treonin bakiyesinin saptanması ile keşfedilmiştir. Standart peptidaz inhibitörlerine karşı direnç gösterdiklerinden proteozomun katalitik tipi açıklık kazanmamıştır. (Ward ve ark., 2009).



Şekil 4.11. *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.

4.2.6. Glutamik peptidazlar

Glutamik peptidazlar aktif bölgelerinde glutamik asit (Glu) bakiyesi taşıyan proteolitik enzimlerdir (Şekil 4.12). İlk olarak *Scytalidium lignicolum*'da tanımlanmış ve pepstatin A'ya duyarlı olmayan karboksil proteaz olduğu saptanmıştır. Bu proteaz grubu ilk aşamada aspartat proteaz olarak kabul edilmiştir; ancak yapısal kararlılığı yeni bir proteaz ailesine ait olduğunu ortaya koymuştur (Oda, 2012). Daha sonra *Scytalidium lignicola* ve *Aspergillus niger* var. makrosporus'dan sırasıyla, scitalidoglutamik peptidaz ve aspergilloglutamik peptidaz elde edilmiştir. Bu iki enzimin aktif bölgesinin Glu ve glutamin (Gln) amino asit bakiyeleri bulunduğu saptanmış ve glutamik peptidazlar olarak kesin tanımlamaları yapılmıştır. *Aspergillus niger* var. microsporus'den elde edilen glutamik peptidaz, sırasıyla substrat olarak kazein ve hemogloblin kullanıldığında pH 2 ve pH 1.1'de maksimum proteolitik aktivite göstermiştir (Rawlings ve ark., 2011; Yabuki ve ark., 2004).



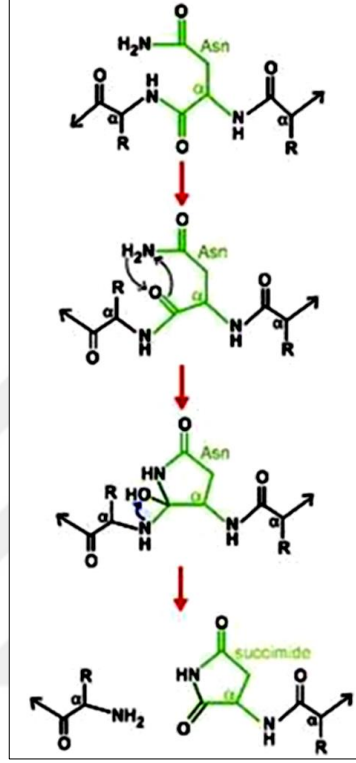
Şekil 4.12. Scytalidocarboxyl peptidaz B enziminin tersiyer yapısı.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Glutamic_peptidase#/media/File:Glutamic_peptidase.png – erişim tarihi 28.03.2019)

4.2.7. Asparagin peptid liyaz

Yukarıda Tablo 1.2'de verilen yedi proteaz grubundan biri de asparagin peptid liyazlardır. Bir asparagin bakiyesi, eliminasyon reaksiyonu ile peptid bağının kırılması için nükleofil olarak asparagin peptid liyaz enziminin katalitik mekanizmasına katılır.

Asparagin karbonil karbonu ile beş üyeli süksünimid halkası oluşturabilir ve doğru koşullar altında kendisini ana zincirden ayırarak ürünün iki yarısını serbest bırakabilir (Şekil 4.13). Sonuç olarak asparagin peptid liyazlar proteolitik enzim olmakla birlikte peptidaz değildirler (Dehart ve Anderson, 2007).



Şekil 4.13. Asparagin peptid liyazların kataliz mekanizması

4.3. Proteaz Kaynakları

Proteolitik aktiviteye sahip enzimlerin canlılarda hem hücre içi hem de hücreler dışı ortamlarda proteinlerin yıkımını kataliz ettikleri düşünüldüğünde, tüm çok hücreli ya da tek hücreli ökaryotik organizmalar ve prokaryotlarda yaygın olarak bulunan enzimlerden olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla tüm canlılar proteaz enzimleri için kaynak olarak kabul edilebilir (Kasana, 2010).

4.3.1. Bitkisel kaynaklı proteazlar

Yukarıda da değinildiği gibi proteazlar, polipeptid zincirlerinde uçlara yakın bölgelerde (eksopeptidaz) ya da iç bölgelerde (endoproteaz) yer alan peptit bağlarını keserler. Eksoproteazlar, proteinlerin N-terminal uçtan kesim yapan aminopeptidazlar

ve C-terminal uçtan kesim yapan karboksipeptidazlar olarak farklılaşmışlardır (Motyan ve ark., 2013). Endoproteazlar enzimleri ise katalitik mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Bitkilerde, beş sınıf endoproteaz tanımlanmıştır. Bunlar; serin, sistein, aspartik, metallo ve treonin endopeptidazlardır. En çok kullanılan bitkisel kaynaklı proteazlar ise sistein, aspartik ve serin proteaz gruplarına aittir (Rawlings ve ark., 2010). Bitkilerden izole edilen proteazlar geniş bir sıcaklık ve pH aralığında proteolitik aktivite gösterdiklerinden endüstriyel kullanım açısından ilgi çekicidirler. Ticari enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiş olsalar da bitkisel kaynaklı enzimler de büyük önem taşımaktadır.

Carica papaya (papain, kimopapain, karikain, glisil endopeptidaz), *Ananas comosus* (meyve bromelain, kök bromelain, ananain, comosain) ve *Ficus glabrata*'dan (fisin) elde edilen sistein proteazlar ticari önemi olan bitkisel kaynaklı enzimlerdir (Rawlings ve ark., 2010) (Şekil 4.14). Ortalama 25- 30 kDa molekül ağırlığına sahip olan bu enzimlerin çoğu pH 5.0 - 8.0 arasında maksimum aktivite göstermektedir (Dubey ve ark., 2007). *Carica papaya*'dan elde edilen papain, sistein proteazların yapı çalışmalarında model olarak kullanılmıştır. Bu enzim pH 5-7 değerleri arasında optimum katalitik aktivite gösterir. Papain diğer proteazlara göre sıcaklığa daha dayanıklıdır ve 10-90 °C sıcaklık aralığında aktivite gösterir (Van Der Maarel, 2010). Karikain, papain lateksinden saflaştırılan bir diğer proteaz enzimidir (Dubois ve ark., 1988). Kimopapain, papain ve karikaine göre sıcaklığa daha duyarlıdır. Buna karşın kimopapain pH 2'de stabilitesini koruması bakımından farklılık gösterir (Lockwood, 1952). Bromelain, ananasların köklerinden ve olgunlaşmamış meyvelerinden elde edilen bir özüttür. Kök bromelian pH 6.0-8.5 aralığı ve 50-60°C sıcaklıklarda optimum aktivite gösterir. Meyve bromelaini, kök bromelaine kıyasla daha yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir (Gen Lei ve ark., 2007). Fisin, *Ficus glabrata* bitkisinin kurutulmuş lateksinden elde edilir (Sgarbieri ve ark., 1964). Bu enzim *Ficus carica* ve *Ficus elastica* gibi diğer *Ficus* türlerinde de bulunmaktadır (Şekil 4.14). 10-15 g ağırlığındaki yeşil incir yaklaşık olarak 100-150 mg fisin içerir. Optimum pH'ı 5.0-8.0, optimum sıcaklığı 45- 55 °C aralığındadır (Badgujar ve ark., 2014).



Şekil 4.14. Proteazlar bakımından zengin *Carica papaya*, *Ananas comosus* ve *Ficus carica* bitkileri.

Bitki sistein proteazları doğal ortamlarında yaşlanma, programlanmış hücre ölümüyle birlikte bitkilerin büyümesine ve gelişmesi ile ilişkili biyokimyasal reaksiyonlarda işlev görürler. Hücrelerde proteinlerin yeniden sentezinde ve yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasında proteazlara önemli roller düşer (Martinez ve ark., 2007). Hidrolitik enzimler bitki savunma mekanizmalarında da rol aldıklarından, bu grup içerisinde yer alan sistein proteazların da böceklerden korunmada önemli olduğu düşünülmektedir (Boller, 1986). Mısır bitkisi kallusunda bulunan serin proteazlar, ciddi mısır zararlısı olan sonbahar tırtıl larvalarının büyümesinin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Jiang ve ark., 1995; Pechan ve ark., 2000). Fisin, papain, ve bromelain gibi sistein proteazların, papaya ağaçlarını otçul böceklerden koruduğu, yaprakların zarar gördüğünde sıızan lateks üretimiyle saptanmıştır (Konno ve ark., 2004). Papain benzeri proteazlar dejeneratif, invazif ve bağışıklık sistemi ile ilişkili hastalıklarda proteolitik aktivite gösteren temel enzimler olarak tanımlanmıştır (Bromme ve Kaleta, 2002; Lecaille ve ark., 2002).

Endüstri alanında süt pıhtılaşmasında kullanılan ticari enzimlerin tümü, asidik pH değerlerinde aktivite gösteren aspartik proteazlardır (Silva ve Malcata, 2005). Bu alanda yaygın olarak kullanılan aspartik proteaz, rennette bulunan kimozen enzimidir (Vioque ve ark., 2000). Rennetin doğal kaynağı buzağuların şirdenidir. Rennetin doğal kaynağından izolasyonu maliyetli ve miktar olarak yetersizdir. Bundan nedenle buzağı kimozen enzimi, ilgili genin aktarılmasıyla farklı mikroorganizmalarda rekombinant olarak üretilmektedir (Seker ve ark., 1999). Süt endüstrisinde kullanılan diğer bitkisel proteazlar, bazı ülkelerde rekombinant buzağı peynir mayasının yüksek maliyeti ve dini inanışlar sebebiyle alternatif oluştursa da, bu proteazlar düşük verim ve

istenmeyen tat bırakma gibi dezavantajlara sahiptir (Shah ve ark., 2014). Süt pıhtılaşma aktivitesi gösteren aspartik proteaz enzimleri, enginar (*Cynara scolymus* L.), süt devedikeni (*Silybum marianum* L. Gaertn.), kardoon (*Cynara cardunculus*) çiçeklerinde tespit edilmiştir (Garcia ve ark., 2014; Llorente ve ark., 2004; Rafizadeh ve ark., 2018). Yabani enginardan (Şekil 4.15) elde edilen pıhtılaştırıcısının enzim bileşenlerinin, buzağı renneti ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu bitkiden elde edilen toz bitki pıhtılaştırıcısının, buzağı şirden rennetinden elde edilen kimozine göre daha yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu belirtilmektedir (Pino ve ark., 2009). Böcek yiyen bitkilerde aspartik proteazların böceklerin sindiriminde de işlevsel olukları anlaşılmıştır (Tokes ve ark., 1974).



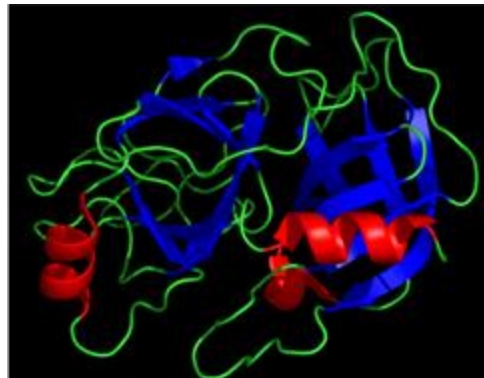
Şekil 4.15. Yabani enginar bitkisi.

Serin proteazlar, ağaçsı bitkilerden baklagillere ve otlara kadar geniş bir yelpazede bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzimler bitkilerin farklı organlarında bulunmakla birlikte özellikle meyvelerde daha fazla miktarlarda bulunmaktadır (Barrett ve Rawlings, 1995). Kavun (*Cucumis melo*) meyveleri mezokarpından (meyvenin yenilebilen kısmı) elde edilen bir enzim olan kukumisin, en iki karakterize edilen bitki serin proteazlarından biridir (Antao ve Malcata, 2005). Kukumisinin aktif bölgesindeki serin bakiyesi yakınında bulunan Gly-Thr-Ser-Met amino asit bakiyeleri, bir mikrobiyal serin proteaz olan subtilizin ile aynıdır. Bu enzimin bazik pH'de (pH 10) ve 70 °C sıcaklıkta yüksek kataliz aktivitesine sahiptir (Kaneda ve Tominaga, 1975).

Bazı serin proteazların tıbbi açıdan önemini ortaya koyan çalışmalar vardır. *Euphorbia milii* (dikenli taç) bitkisi lateksinden elde edilen milin (Yadav ve ark., 2006) ve *Morus indica* (dut) bitkisi lateksinden elde edilen dimerik subtilizin benzeri indikain (Singh ve ark., 2008) enzimleri tıbbi kullanımı için üzerinde çalışılan enzimlerdir. Dimerik subtilizin benzeri serin proteazlar, kan serum glukozu, kolesterol ve lipid düzeylerini düşürmek için kullanılmıştır. Bu enzimin diüretik ve balgam söktürücü etkileri de rapor edilmiştir (Andallu ve ark., 2001; Andallu ve Varadacharyulu, 2003; Doi ve ark., 2000; Jang ve ark., 2002). *Euphorbia milii*'de elde edilen milin, karaciğer iltihabında ve insanlarda, koyunlarda ve sığırlarda parazitik bir hastalık olan şistozomiyaza karşı kullanılmaktadır. Milin, yüksek stabilite ve proteolitik aktiviteye sahip olması nedeniyle gıda endüstri uygulamalarında iyi bir seçenektir (Schall ve ark., 2001; Souza ve ark., 1997).

4.3.2. Hayvansal proteazlar

Hayvansal kaynaklı proteazlar arasında pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin en iyi bilinen enzimlerdir. Tripsin, besin olarak alınan proteinlerin hidrolizinden sorumlu, pankreas bezi tarafından salgılanan bir proteazdır. Molekül ağırlığı 23,3 kDa olan tripsin enzimi pH 8'de, 37 °C sıcaklıkta maksimum proteolitik aktiviteye sahiptir (Şekil 4.16). Tripsin enzimi serin proteaz grubu içerisinde yer alır. Bu enzim ile hazırlanan protein hidrolizatlarında istenmeyen acımsı bir tat olması nedeniyle gıda endüstrisinde kullanımı tercih edilememektedir. Bununla birlikte bazı özel tıbbi uygulamalarda ve bakteri besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılır (Rao ve ark., 1998).



Şekil 4.16. Serin proteaz olan tripsin enziminin tersiyer yapısı.

Hayvanlarda pankreas bezinden salgılanan diğer bir enzim olan kimotripsin 23,8 kDa ağırlığında bir serin proteazdır. Kimotripsin peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan bakiyelerinde sonraki karboksil gruplarından keser. Saf olarak elde edilen kimotripsin, yüksek maliyeti nedeniyle daha çok tanı amaçlı uygulamalarda ya da çeşitli analizlerde kullanılmaktadır. Kimotripsin, süt proteini hidrolizatlarının alerjik etkilerini azaltmak için yaygın olarak kullanılır. Tripsin ve kimotripsin enzimleri pankreasta inaktif formu üretilir ve ince bağırsağa salınır. Tripsin enzimi bağırsak mukozasında bulunan diğer bazı proteazlar ile aktif hale gelir. Aktif tripsin enzimi, kimotripsinojeni belirli bir noktadan keserek birkaç aşamada gerçekleşen aktif kimotripsine dönüşme işlemini başlatır (Rao ve ark., 1998). Pepsin, molekül kütlesi 34,5 kDa olan neredeyse tüm omurgalıların midesinde bulunan asidik bir proteazdır. Aspartil proteaz grubuna aittir. pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterirken, pH 6'nın üzerinde inaktive edilir. Bu nedenle pepsinin aktif olarak protein sindirimine katılabilmesi için mide sıvısının asit karakterli olması gerekir. Bu da mide bezleri tarafından salgılanan hidroklorik asit varlığı ile sağlanır. Bu enzim, iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizinin gerçekleştirir (Rao ve ark., 1998). Rennin (kimozen), yeni doğan geviş getiren hayvanların midesinde salgılanan aspartik proteazdır. Molekül ağırlığı 30,7 kDa olan rennin aktif olmayan prorennin formunda sentez edilir ve pepsinin proteolitik etkisiyle ya da otokataliz ile aktif rennine dönüştürülür. Rennin peynir üretimi için süt proteini K-kazeini Phe 105 ve Met 106 amino asit bakiyeleri arasındaki peptid bağlarını keserek sütün pıhtılaşmasını sağlar (Mohanty ve ark., 2003; Rao ve ark., 1998).

4.3.3. Mikrobiyal proteazlar

Bitki ve hayvanlardan elde edilen proteazların endüstrideki talebi karşılayacak düzeyde olmaması mikroorganizma kaynaklı enzimlerin önemini arttırmaktadır. Büyük bir çeşitliliğe sahip olan mikroorganizmalar, ticari değeri olan birçok enzim için kaynak oluşturlar. Dünya genelinde ticari enzim pazarının yaklaşık olarak %40'ını mikroorganizma kaynaklı enzimler oluşturmaktadır (Godfrey ve West, 1996). Özellikle yüksek sıcaklık, geniş pH aralığı, yüksek tuz konsantrasyonları ve şelatlama ajanlarının varlığı gibi ekstrem koşullarda yaşamlarını sürdürebilen mikroorganizmalar diğer enzim kaynaklarına göre çok daha avantajlıdır (Cobb ve ark.,

2012; de Souza ve ark., 2015; Raveendran ve ark., 2018). Mikroorganizmalar arasında bakteriler, mantarlar ve küfler proteazlar için kaynak oluştururlar. Bunlara viral proteazları da eklemek gerekir (Dos Santos Aguilar ve Sato, 2018).

4.3.3.1. Bakteriyal proteazlar

Bacillus cinsine ait organizmalar birçok nötr ve alkali ortamda katalitik aktiviteye sahip enzimler üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 aralığında ve düşük sıcaklıklarda katalitik aktiviteye sahiptirler. Hayvansal proteazlar ile karşılaştırıldıklarında hidroliz edilen proteinlerinde daha düşük düzeyde tat değişimlerine (acılık) neden olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde tercih edilirler (Adinarayana ve ark., 2003). *Bacillus cereus* tarafından kültür ortamından salgılanan bir mikrobiyal süt pıhtılaştırma proteaz enzimi, kısmen saflaştırılmıştır (Guevara ve ark., 2001). Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus firmus*'den izole edilen hücre dışı alkali proteaz enziminin pH 9.0 ve 40°C sıcaklıkta maksimum kataliiz aktivite gösterdiği saptanmıştır (Rao ve Narasu, 2007). Bir diğer *Bacillus* türü olan *Bacillus licheniformis* sıcaklığa ve deterjanlara dayanıklı alkali serin proteaz üretebilmektedir. Bu proteaz enziminin pH 10,5'de ve 68°C sıcaklıkta maksimum aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Fakhfakh-Zouari ve ark., 2010). Bazı organik çözücülere karşı dayanıklı bir alkalın proteaz enzimi *Bacillus licheniformis* YP1A tarafında salgı formunda üretildiği saptanmıştır. Bu enzimin %50 (h/h) konsantrasyonlarda DMSO, DMF veya sikloheksan gibi organik çözücü içeren ortamlarda, 40 °C'da, 1 saat bekletildiğinde aktivitesini %95 oranında koruduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2009).

4.3.3.2. Fungal proteazlar

Mantarlar hızlı çoğalmaları ve üretim maliyetlerinin düşük olması nedeniyle proteaz üretiminde sıklıkla kullanılan mikroorganizmalardır. Bunlara ek olarak ürettikleri enzimleri büyük oranlarda kültür ortamına salgılamaları saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmaktadır (Anitha ve Palanivelu, 2013; de Souza ve ark., 2015). Mantarlar hem katı yüzey fermentasyonu hem de batık fermantasyon teknikleri ile çoğaltılarak, proteaz üretimi gerçekleştirilebilir (Devasena, 2010). *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi bazı filamentli mantar türlerinin, batık fermantasyon koşullarında yüksek seviyelerde hücre dışı proteaz enzimi ürettikleri bilinmektedir (te Biesebeke ve ark., 2005). *Aspergillus* türleri tarafından salgı formunda üretilen birçok proteaz

enzimi kapsamlı şekilde analiz edilmiştir. Bu enzimlerin birçoğu gıda ve içecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (de Souza ve ark., 2015). Uzun süredir endüstriyel alanda kullanılan *Aspergillus oryzae* toksik etkisi olmayan bir tür olarak belirlenmiştir. Bu mantar türü, buğday kepeği, pirinç kepeği, öğütülmüş soya fasulyesi ya da küspe gibi yüzeylerde çoğalabilmektedir (Vishwanatha ve ark., 2010). *Penicillium* türleri de proteazlar ve diğer endüstriyel enzimlerin üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu türlerin türlerinin katı hal ve batık fermantasyon koşullarında alkalın proteaz üretilmeleri ilgi çekicidir. *Penicillium griseoroseum* ve *Penicillium camemberti*'nin asit proteazları ürettiği bildirilmektedir (de Souza ve ark., 2015). *Mucor pusillus* ve *Mucor miehei*, mucor renninler olarak da bilinen aspartat proteazları salgı formunda üreten mantarlardır. Bu enzimler, yüksek süt pıhtılaşma aktivitesine ve düşük proteolitik aktiviteye sahiptir ve peynir endüstrisinde renninin yerine kullanılabilirler (Martin ve ark., 1980). Bununla birlikte mucor renninlerin yüksek termal stabilitesi, uzun olgunlaşma sürecinde peynirin tadını bozabilmesi istenen bir durum değildir (Maheshwari ve ark., 2000).

Termofilik mantarlar, yüksek sıcaklıklarda katalitik aktiviteye sahip hidrolaz enzimleri üretirler. Sıcaklığı 65-85 °C arasında aktivite gösteren termostabil proteazlar pişirme, bira üretimi, deterjan ve deri endüstrisinde kullanılabilir (Haki ve Rakshit, 2003; Macchione ve ark., 2008).

4.4. Proteazların Endüstriyel Uygulamaları

Bitki, hayvan ve tek hücreli mikroorganizmalardan doğal koşullarda ya da rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak elde edilen enzimler kimya endüstrisinden gıda endüstrisine kadar çok geniş bir alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

4.4.1. Proteazların deterjan endüstrisinde kullanımı

Çeşitli kaynaklardan elde edilen proteolitik enzimler temizlikte kullanılan tüm deterjanların ana bileşenleridir (Rao ve ark., 1998). Protein içeriği bakımından zengin olan süt ve kan gibi maddelerle kirlenmiş materyallerde proteinleri hidroliz ederek daha kolay uzaklaştırmak için çamaşır deterjanlarına enzim ilavesi yapılmaktadır. Protein içeren lekeler, proteolitik olarak parçalanmadan yıkandıkları

zaman kumaş üzerinde pıhtılaşmış halde kalma oranları yüksektir (Maurer, 2004). Deterjanlara katılan enzim, vücut salgılarından ve süt, yumurta, et ve balık gibi protein içerikli yiyeceklerden gelen kirlerin de uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Çamaşırların yıkandığı koşullar sıcaklık, pH ve deterjanların kullanıldığı ekstrem koşullardır. Bu koşullarda kullanılacak enzimlerin deterjan çözeltisinde stabilitesini koruması, sıcak ortamlarda ve bazik pH değerlerinde aktivite görmesi gerekmektedir (Vojcic ve ark., 2015). Deterjanların çok yaygın olarak kullanılması nedeniyle deterjan proteazları dünya genelinde en önemli endüstriyel enzim gruplarından birini oluşturur (Gupta ve ark., 2002; Maurer, 2004). Bu alanda kullanılan proteaz enzimlerinin önemli bir bölümü *Bacillus* türlerinden elde edilen subtilizin serin proteaz enzimleridir. Bu enzimler, pH 12'ye kadar bazik ortamlarda stabilitelerini koruduklarından ve aktivitelerini kaybetmediklerinden dolayı ekstrem çamaşır yıkama koşulları için uygun enzimlerdir (Fujinami ve Fujisawa, 2010). Diğer taraftan, deterjanlarda kullanılacak proteazların stabil yapıda olmaları yanı sıra düşük sıcaklıklarda da aktivite göstermeleri istenir. Doğal *Bacillus* subtilizin enzimleri temel alınarak, protein mühendisliği teknikleri ile soğuk ortamda aktif subtilizin enzimleri elde edilmiştir (Siddiqui ve ark., 2009; Tindbaek ve ark., 2004; Wintrode ve ark., 2000).

4.4.2. Proteazların süt endüstrisinde kullanımı

Proteolitik enzimlerin yaygın kullanım alanlarından bir de süt endüstrisidir. Özellikle peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcı proteazlar çok büyük öneme sahiptirler. Süt pıhtılaştırıcı proteolitik enzimler arasında hayvansal rennet, mikrobiyal süt pıhtılaştırıcı enzimler, bitkisel rennet, genetiği değiştirilmiş kimozen yer alır. Süt pıhtılaştırıcı proteaz enzimleri aspartik proteaz sınıfına içerisinde sınıflandırılırlar. Mikrobiyal proteazlar sıcağa dayanıklı olmaları nedeniyle peynirde acı tat bırakma sorunu oluştururlar. Bu nedenle normal pastörizasyon sıcaklıklarında tamamen inaktive olan proteazlar geliştirilmiştir. Peynir yapımında önemli bir etken olan kazein içeriğinin yüksek olması nedeniyle kimozen enziminin kullanılması tercih edilmektedir (Rani ve ark., 2012).

4.4.3. Proteazları deri endüstrisinde kullanımı

Derinin işlenmesi; ıslatma, kıl giderme, tabaklama gibi farklı aşamalar halinde gerçekleştirilir. Derinin en önemli bileşeni proteinlerdir. Bu nedenle derilerin

işlenmesinde proteolitik enzimlerin kullanımı önemli bir gereksinimdir. İşlemler sırasında ortaya çıkan deri artıkları sağlık için önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu tehlikeli atıkların ortadan kaldırılmasında kimyasal maddelere alternatif olarak proteolitik enzimlerin kullanılması hem çevre kirliliğinin azalmasına hem de deri kalitesinin iyileşmesine olanak sağlamaktadır. Proteazlar, derinin yapısında bulunan kollajen olmayan bileşenlerinin seçimli hidrolizinde, albüminler ve globülinler gibi fibriler yapıda olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Deri işleme aşamalarından olan ıslatma aşamasında mikroorganizma kaynaklı alkalın proteazlar kullanılmıştır. Alkalın proteazlar, suyun daha hızlı emilimini gerçekleştirerek derinin ıslanması sürecini büyük ölçüde azaltmıştır. Kalsiyum hidroksit ve sodyum klorür içeren ortamda alkalın proteazlar kıl giderme için kullanılır, bu da atık su miktarında azalmaya yol açar. İşlenecek materyalde bulunan elastin ve keratin gibi matris proteinleri enzimin seçiminde önemlidir (Rani ve ark., 2012).

4.4.4. Pişirme ve gıda işlemede proteazların kullanımı

Buğday unu, gıda endüstrisinde son derece önemlidir. Buğday unu çözünmesi zor olan bir protein olan gluten içerir. *Aspergillus oryzae*'dan elde edilen endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar gluteni hidrolize etmek için kullanılır. Buğday unundan hazırlanan hamurun proteazlar ile muamele edilmesi, hamurun işlenmesini kolaylaştırır, karıştırma süresini azaltır ve ekmek somunu hacimlerinin artmasını sağlar. Bakteriyel proteazlar, hamurun uzama kabiliyetini ve dayanıklılığını artırmak için kullanılır (Rani ve ark., 2012). Ayrıca bromelain buğday gluteninin IgE epitopunu kesmesi nedeniyle hipoalerjenik buğday unu elde etmek için de kullanılmıştır (Tanabe ve ark., 1996).

Bir diğer önemli gıda olan etin yumuşaklığını artırmak için proteazlar denenmiştir. Papainin ette yumuşaklığı artırmada en büyük etkiyi gösterdiği belirlenirken, dokusal değişiklikleri olumsuz yönde etkileyebileceği belirtilmiştir. Bromelain yumuşaklığı artırır ve kollajeni, kontraktil proteinlerden daha fazla bozar. Fisin ise miyofibriller ve kollajen proteinlerin dengeli bir şekilde bozulmasını sağlar (Sullivan ve Calkins, 2010). Ayrıca papain ve bromelain kuru işlemeli jambonun üretiminde de kullanılır (Scannell ve ark., 2004).

4.4.5. Balık protein hidrolizat elde etmede proteazların kullanımı

Özellikle balıkçılığın gelişmiş olduğu ülkelerde deniz ürünlerini işleyen üretim tesislerinde açığa çıkan biyolojik atıklar önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu biyolojik atıklar, besin değeri yüksek ve kolay sindirilebilen ürünlere dönüştürülebilir. Balık protein hidrolizatlarının (BPH) elde edilmesinde sindirim sistemi enzimlerinden yararlanılır. Deniz ürünlerinin işlenmesinde kalan atıkların enzimatik yöntemle hidrolizi, besin kalitesi ve fonksiyonel özellikleri bakımından değerlendirildiğinde kimyasal yöntemlere göre daha avantajlı görülmektedir. BPH'ler, biyoaktif peptit kaynağı veya azotlu substratlar olarak kullanım potansiyeli vardır (Horn ve ark., 2005; Klompong ve ark., 2009). Bitkilerden elde edilen papain, bromelain, fisin ve alkalaz gibi ticari proteazlar BPH üretmek için kullanılmaktadır (Aspmo ve ark., 2005).

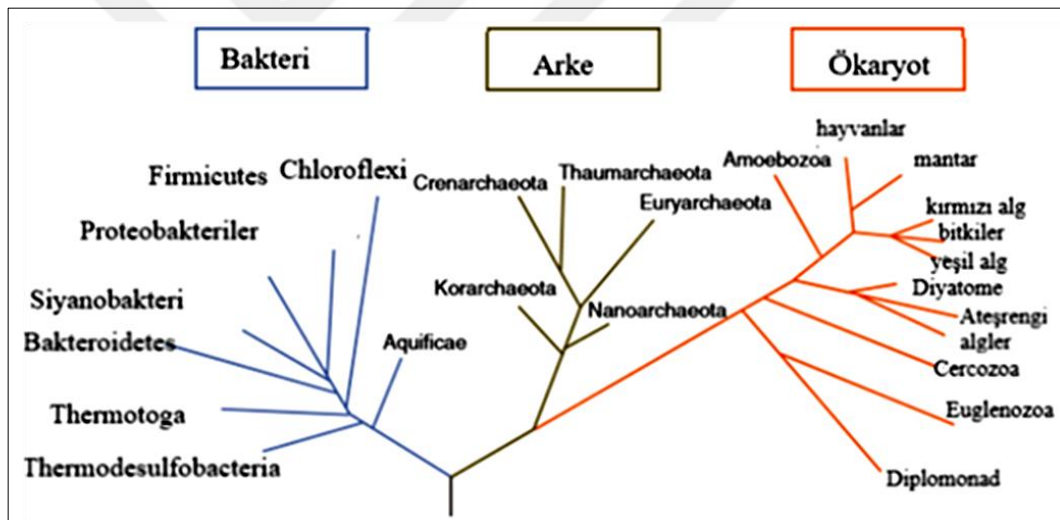
4.4.6. Eczacılık ve tıp alanında proteazların kullanımı

Proteolitik enzimler tıpta tedavi ve cerrahi uygulamalarda denenmiş ya da kullanımı önerilmiştir. Proteaz içeren bazı preparatlar klinik uygulamalarda başarılı sonuçlar verirken, bazıları ise istenilen sonucu vermemiştir. İnsan kaynaklı bir serin proteaz olan, aktive olmuş protein C, rekombinant olarak üretilmiş ve Drotrecogin alfa (XigrisTM olarak da bilinir) adıyla piyasaya sürülmüş ve şiddetli sepsis vakalarının tedavisi için lisans almıştır. Bununla birlikte istenilen düzeyde etkinlik elde edilemediği için 2011 yılında piyasadan geri çekilmiştir (Mecikoglu ve ark., 2006). *Aspergillus oryzae*'den elde edilen bazı proteazlar, litik enzim eksikliği sendromlarında oral yoldan verilmiştir. Yanık ve yaraların tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotikler ve clostridial kollajenaz veya subtilisin birlikte kullanılmıştır. *Jatropha curcus* lateksinden elde edilen kurkain proteazının yara iyileştirici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Rani ve ark., 2012). Kimopapain bel fıtığının nükleoliz yoluyla tedavisi için (Sagher ve ark., 1995; Simmons ve ark., 2001); papain, bromelain ve fisin bazı romatizmal hastalıklarda anti inflamatuvar ilaçlar olarak denenmiştir (Lotz-Winter, 1990; Maurer, 2001). Tripsin, kimotripsin, papain içeren enzim karışımının meme ve kalın bağırsak kanseri ve plazmasitoma tedavisinde iyi sonuç verdiği belirtilmektedir (Beuth, 2008; Salas ve ark., 2008). Papain, kemomekanik diş çürüğü temizleme amaçlı kullanılan papakarienin jelinin ana maddesidir. Bu jel, diş kemiğindeki kollajen fibrilleri arasındaki birleşimleri etkili bir

şekilde kırarak döner aletlerin kullanılmasını engellemiş olur (Kotb ve ark., 2009; Lopes ve ark., 2007). Proteazlar sindirim sisteminde sindirimi kolaylaştırmak amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır (Rani ve ark., 2012).

4.5. Halofilik Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar farklı özelliklere sahip çoğunlukla tek hücreli mikroskobik yaşam formlarıdır. Genotipik ve fenotipik özelliklerine göre bakteri, arke ve ökaryot organizma grupları içerisinde sınıflandırılırlar (Şekil 4.17). Bakteriler ve arkeler evrimsel olarak çok farklı olmalarına karşın yapısal olarak benzerdir. Her iki grup da membran ile ayrılmış bir çekirdek yapısı ve organel taşımazlar (Kittelman ve ark., 2013).



Şekil 4.17 Bakteriler, arkeler ve ökaryotlar arasındaki ilişkileri gösteren filogenetik ağaç (Woese ve ark., 1990).

Halofiller, aşırı tuzlu ortamlarda yaşayabilen ve çoğalan mikroorganizmalardır. Halofilik mikroorganizmalar, çoğunlukla bakteri ve arkeler içerisinde yer alan prokaryotik özellik gösteren organizmalardır. Bununla birlikte ökaryotik özellik gösteren halofilik organizmalar da bilinmektedir (Butinar ve ark., 2005). Halofiller tuzların denatüre edici etkilerine karşı kendilerini korumalarının yanı sıra, hücre içi ve hücre dışı tuz konsantrasyonu farklılıklarına bağlı olarak ortaya çıkan yüksek osmotik

basıncı da dengeleyebilme kabiliyetine sahiptirler (Le Borgne ve ark., 2008). Halofilik mikroorganizmalar gelişmeleri için ihtiyaç duydukları NaCl konsantrasyonuna göre; az halofiller, ılımlı halofiller, sınır aşırı halofiller ve aşırı halofiller olmak üzere dört ayrı sınıfa içinde değerlendirilebilirler (Oren, 2008). Halofil özellik göstermeyen mikroorganizmalar 0.2 M'dan daha düşük tuz içeren ortamlarda iyi ürerler. Az halofilik mikroorganizmalar üreyebilmek için ortamda 0,5-2,5 M arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl'e gereksinim duyarlar ve bu grup organizmalar çoğunlukla fakültatif halofillerdendir (Oren, 2008). Ilımlı halofiller, 0,5-2,5 M oranında NaCl içeren ortamlarda iyi ürerler, gelişmeleri ve diğer metabolik süreçleri için orta derecede tuz konsantrasyonuna gereksinim duyduklarından asıl halofillerin ortaya çıkışını temsil ederler. Sınır aşırı halofiller, 1,5-4,0 M arasında değişen konsantrasyonlarda tuz içeren ortamlarda ürerler ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanacak şekilde adapte olmuşlardır. Bu organizmaların birçoğu zorunlu halofillerdir. Aşırı halofiller ise 2,5-5,2 M gibi yüksek konsantrasyonlarda NaCl'e gereksinim duyarlar. Aşırı halofillerin hemen hemen hepsi zorunlu halofillerdir. Çoğunluğunu halofilik arkelerin oluşturduğu bu organizmalar kendilerini yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilecek şekilde adapte edebilen oldukça özelleşmiş organizmalardır (Oren, 2002). Aşırı halofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarına adaptasyon mekanizmaları, bu mikroorganizmaları biyokimyasal uygulamaların da odağı haline getirmiştir (Kastritis ve ark., 2007).

4.6. Halofilik Arkeler

Halofilik arkeler arkebakterilerin *Euryarchaeota* şubesi (filum), Halobacteria sınıfı içinde yer alan çoğunlukla aerobik ve kırmızı pigmentli mikroorganizmalardır (Andrei ve ark., 2012). *Halobacteriaceae* ailesinin halofilik üyelerinin birçoğu hücre stabilitesini korumak ve yaşamını sürdürmek için yüksek konsantrasyonlarda tuzların varlığına gereksinim duyarlar. Bununla birlikte, göreceli daha düşük tuzlu ortamlarda gelişebilen *Halobacteriaceae* üyeleri ise deniz suyuna yakın tuzluluk gösteren ortamlarda yaşamlarını sürdürürler (Purdy ve ark., 2004). Tanımlanan birçok halofilik arke türü, 150 g/L'nin üzerindeki tuz konsantrasyonunda en iyi şekilde yaşamlarını sürdürürler (Oren ve Ventosa, 2014). *Halobacteriaceae* ailesinin tüm üyeleri varlıklarını sürdürmek için en az 1.5 M NaCl'e ihtiyaç duyan aşırı halofillerdir. Bu türler için yaşam için ideal olan NaCl konsantrasyonu 2.0- 4.5 M aralığıdır.

Halobacterium salinarum gibi bazı türlerde hücre içi tuz konsantrasyonu 6 M gibi çok yüksek değerleri bulabilir (Robinson ve ark., 2005). *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* ve *Natronobacterium* cinsleri halofilik olma özelliklerinin yanı sıra, pH 9.5-10.0 arasında yaşamlarını sürdüren alkalifilik organizmalardır (Kamekura ve ark., 1997). Bu organizmalar, Antarktika'daki hipersalin gölü (*Halorubrum lacusprofundi*), Ölü Deniz (*Haloferax volcanii*), Büyük Tuz Gölü (*Halorabdus utahensis*) (Şekil 4.18), Mısır'da bir hipersalin soda gölü (*Natronomonas pharaonis*) gibi çeşitli yerlerden izole edilmişlerdir (Anderson ve ark., 2016; Calo ve ark., 2011; Mullakhanbhai ve Larsen, 1975; Robinson ve ark., 2005).



Şekil 4.18. Amerika Birleşik Devletleri, Utah, Büyük Tuz Gölü görünümü. (<https://www.trtavaz.com.tr/haber/tur/yasam/iki-farkli-rengiyle-utahin-buyuk-tuz-golu/384943> -erişim tarihi 02.04.2019)

Halobacteriaceae ailesi içinde sınıflandırılan *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natronococcus* ve *Natronomonas* gibi birçok mikroorganizmaların, üremek için amino asitlere ve bazı kompleks bileşiklere gereksinimleri vardır (Oren ve ark., 2009). Bu türlerin gelişmesi için besinler arasında amino asitler, şekerler (glukoz, laktoz, fruktoz, riboz vb.) ve organik asitler bulunur (Khemili-Talbi ve ark., 2015). *Halobacterium*, *Halococcus* ve *Haloarcula* türlerinde CO₂'i tutma yetenekleri saptanmış olmasına karşın ototrofik büyüme özellikleri saptanmamıştır (Danon ve Caplan, 1977; Javor, 1984). Haloarkeaların anaerobik koşullar altında, nitrat (Tomlinson ve ark., 1986), fumarat, elementel sülfür ve trimetilamin N-oksit gibi birçok elektron alıcısı kullanılarak geliştiği bilinmektedir (Elshahed ve ark., 2004; Muller ve DasSarma, 2005; Torregrosa-Crespo ve ark., 2016). Az sayıda

Halobacterium cinsinin, arginin fermentasyonunu kullanarak anaerobik olarak geliştigi anlaşılmıştır (Hartmann ve ark., 1980).

4.7. *Haloarcula hispanica*

Bu tez çalışması kapsamında proteaz enzimleri çalışılan *Haloarcula hispanica* türü ilk olarak İspanya'da bir solar tuzundan izole edilen aşırı halofilik bir organizmadır (Ding ve ark., 2014). *Halobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında düşük restriksiyon aktivitesi göstermesi nedeniyle arkebakteri çalışmaları için tercih edilen türlerden biridir (Cline ve Doolittle, 1992). Ek olarak, *H. hispanica* birçok araştırmacı tarafından bilimsel araştırmalar için model archaeon olarak önerilmiştir. Tuzlu ortamlarda virüslerin araştırılmasında konakçı olarak yararlanıldığı bilinmektedir (Porter ve ark., 2007). *H. hispanica*'da enfeksiyon yapan virüsler ile ilgili bir çok çalışmaya rastlanmaktadır (Demina ve ark., 2016; Jaakkola ve ark., 2012; Porter ve ark., 2013). *H. hispanica*'nın, karbonun fazla olduğu durumlarda polihidroksialkanoatlar üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Polihidroksialkanoatlar enerji ve karbon depolamak için önem taşımaktadır (Ding ve ark., 2014).

Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamaya adapte olmaları *H. hispanica*'dan elde edilecek enzimlerin de ekstrem koşullarda stabilite ve işlevselliklerini koruyabilme potansiyelleri nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Hutcheon ve arkadaşları (Hutcheon ve ark., 2005) *H. hispanica*'dan izole ettikleri alfa amilaz enziminin yüksek tuz içerikli tamponlarda satabilitatesini koruduğunu göstermişlerdir. Aynı şekilde *H. hispanica*'ya ait malat sentaz, β -metilmalil koenzim A liyaz (Borjian ve ark., 2017) ve glutation S-transferaz enzimi (Çakır, 2012) ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmada ele alınan *H. hispanica* proteaz genleri üzerinden kodlanan proteaz enzimleri ile ilgili literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu bağlamda proteaz enzimlerinin endüstriyel kullanım potansiyelleri de göz önünde bulundurularak *H. hispanica*'ya ait proteaz ve serin proteaz genleri DNA teknolojilerine yararlanılarak *E. coli* hücrelerine aktarılmış ve bu genler üzerinden kodlanan enzimlerin ekspresyon düzeyleri ve proteolitik aktiviteleri analiz edilmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromfenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum Bromür	Fluka, Almanya
Etil Alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glukoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Gümüş nitrat	Merck, Almanya
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid	Santa Cruz, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
Magnezyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Magnezyum sülfat	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenglikol-4000	Sigma Aldrich, ABD

Pipes	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Polietilenimin	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Sodyum tiyosülfat	Sigma Aldrich, ABD
Tetrametiletildiamin	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin(T-1426)	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween-20	Sigma Aldrich, ABD
Triton X-100	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
2- β –Merkaptoetanol (2-ME)	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

Proteaz genlerinin klonlanması aşamalarında ve elde edilen plazmit DNA'larının kontrol edilmesinde *BglI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI*, *ClaI*, *PstI*, *DraI*, *BamHI* ve *SmaI* (MBI Fermentas ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleaz enzimlerinden yararlanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri

Ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında alkalin fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase - Fermentas), Klenow enzimi (New England Biolabs), T4 DNA ligaz (TaKaRa) ve T4 polinükleotid kinaz (New England Biolabs) enzimleri kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar

PZR ile proteaz enzimi kodlayan DNA dizilerinin çoğaltılması ve rekombinant plazmitlerin koloni PZR ile kontrol edilmesi deneylerinde KOD-plus (Toyobo, Japonya) ve standart Taq DNA polimeraz enzimleri (Biotechrabbit) kullanıldı.

Diğer enzimler

DNA izolasyonu deneylerinde RNA'dan kaynaklı kontaminasyonlarını engellemek amacıyla RNaz A (Roche) ve bakteri hücrelerinin parçalanması aşamalarında lizozim (Roche) enzimlerinden yararlanıldı.

5.3. Ticari Kitler

Bakterilerden genom DNA izolasyonunda (Invitrogen Cat. No. K1820-01) ve DNA moleküllerinin agaroz jel üzerinden saflaştırılmasında (jel ekstraksiyon kiti Qiagen) ticari kitlerden yararlanıldı.

5.4. Antikorlar

SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerin Western melezleme tekniği ile analiz edilmesinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-flag (DYKDDDDK) (ThermoFisher MA1-91878) antikoru; sekonder antikor olarak ise anti-fare IgG-HRP (Invitrogen/Thermo 31420) antikoru kullanıldı.

5.5. Cihazlar

Bakteriyolojik etüv	Memmert, Almanya
Çalkalayıcı etüv	N-Biotek, Güney Kore
Çalkalayıcı su banyosu	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Dikey jel elektroforez cihazları	Cleaver Scientific, İngiltere
Hassas terazi	Shimadzu, Japonya
Jel görüntüleme cihaz	DNR Bio Imaging Systems, İsrail
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Masaüstü santrifüj	Hettich, Almanya
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
PZR cihazları	ABI, ABD / Techne, ABD
Soğutmalı santrifüjler	Sigma, ABD /Backman, ABD
Steril çalışma kabini	Holten, Danimarka
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Su banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
Tüp karıştırıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet, ABD
Sonikatör	Bandelin, Almanya

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Luria-Bertani (LB) besiyeri

10 g tripton (Santa cruz), 5 g maya özütü (Multicell) ve 10 g sodyum klorür (Merck) deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.6.2. Luria-Bertani agar (LBA) besiyeri

LB sıvı besiyerine % 1.5 (a/h) oranında agar (Multicell) eklenerek hazırlandı.

LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Gerekli durumlarda besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonda ampicilin eklendi.

5.6.3. *Haloarcula hispanica*'nın üretilmesinde kullanılan besiyeri

5 g maya özütü, 200 g NaCl, 18.5 g MgSO₄ .6H₂O, 1 g sodyum glutamat, 2 g KCl, 3 g tri-sodyum sitrat, 1.96 g CaCl₂.2H₂O, 1.16 g FeSO₄.H₂O, 0.36 mg MnCl₂.4H₂O deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, NaOH ile pH'si pH 7'ye ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Besiyeri 121 °C'da 15 dakika otoklavda tutularak steril hale getirildi (Lu ve ark., 2008).

5.6.4. Milk-agar besiyeri

Katı besiyerinde bakterilerin proteaz aktivitelerini saptamak amacıyla NaCl içermeyen ya da %0.1 ve % 0.2 (a/h) konsantrasyonlarda NaCl içeren milk-agar besiyerleri hazırlandı. 2,5 g yağı alınmış süt tozu ve 1.5 g agar 80 ml distile su içerisinde karıştırıldı ve 110 °C'da 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyerlerine 5 ml % 20 (a/h) steril dekstroz çözeltisi, %0.01 (a/h) final konsantrasyonda olacak şekilde steril MgSO₄ çözeltisi (%10-a/h), 100 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde ampicilin çözeltisi (100 mg/ml), %0.1 (a/h) ya da %0.2 (a/h) final konsantrasyonlarda olacak şekilde steril NaCl çözeltisi (%20-a/h) eklendi. Plazmit taşımayan bakteriler için hazırlanan besiyerlerine antibiyotik katılmadı. Besiyerlerinin hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, petrilere döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaları sağlandı.

5.6.5. Zenginleştirilmiş milk-agar besiyeri

1 g tripton, 0,5 g maya özütü, 1g NaCl ve 1.5 g agar distile su içerisinde karıştırıldı ve hacmi 80 ml'ye tamamlandı. Besiyeri 115 °C'da 15 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Besiyerine, aynı koşullarda steril edilen %10 (a/h)'luk yağı alınmış süt tozu çözeltisinde 20 ml eklendi. Gerekli görülen durumlarda besiyerlerine sterilizasyon sonrasında, %0.01 (a/h) final konsantrasyonda olacak şekilde steril MgSO₄ çözeltisi (%10-a/h) ve/veya 100 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde ampicilin çözeltisi

(100 mg/ml) eklendi. Besiyeri petrilere döküldü ve oda sıcaklığında katılaşması sağlandı.

5.7. Çözeltiler

5.7.1. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (% 29 akrilamid / % 1 bis-akrilamid-a/h)

29 gram akrilamid ve 1 g bis-akrilamid deiyonize distile su içinde çözündürüldü, hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µm filtreden geçirildi. Hazırlanan çözelti karanlıkta 4 °C' da saklandı.

5.7.2. Amonyum persülfat çözeltisi (% 10-a/h)

1 g amonyum persülfat, deiyonize distile su ile çözündürüldü ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1.5 ml'lik plastik tüplerde 0.5 ml'lik kısımlara bölünerek -20 °C' da saklandı.

5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5-a/h)

25 g yağsız süt tozu, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x TBS ve 1 ml % 10 Sodyum Azid (NaN_3) eklendi. Hazırlanan çözelti 4 °C' da saklandı.

5.7.4. Dekstroz çözeltisi (% 20 –a/h)

100 gr dekstroz deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C' da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.7.5. DTT çözeltisi (1M)

1.54 g DTT, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik kısımlar halinde -20 °C' da saklandı (DTT $M_w = 154.25$).

5.7.6. Etidyum bromür (10 mg/ml)

0.1 gr etidyum bromür 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Çözelti karanlıkta 4 °C' da saklandı.

5.7.7. Fiksasyon çözeltisi (%50 metanol-v/v; %10 asetik asit-v/v)

50 ml metanol, 40 ml deiyonize distile su ve 10 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

5.7.8. Gümüş nitrat çözeltisi (% 5 -a/h)

5 g gümüş nitrat deiyonize distile su içerisinde çözöldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

5.7.9. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)

69.4 gr kalsiyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözöndüröldükten sonra çözeltinin hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi (CaCl₂ Mw: 110.98).

5.7.10. %70 Etil alkol

70 ml saf etil alkol, deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.11. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0.5 M; pH 8.0)

186.1 g EDTA 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözöndüröldü. Kristal NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril hale getirildi (EDTA Mw: 372.2).

5.7.12. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1)

Kristal halde fenol, 65° C'da çözöndüröldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH:8) eklendi ve 30 ile 60 dakika arasında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, ortam 4 °C'da bekletildi ve üst faz bir su trompu aracılığıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve doyurulmuş fenol 4 °C'da saklandı. Fenol:Kloroform:İzoamil alkol karışımı hazırlamak için, Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında

kullanıldı (Maniatis ve ark., 1982).

5.7.13. Hidroklorik asit çözeltisi (3N)

75 ml deiyonize distile suya 29,56 g (25 ml) % 37'lik (a/a) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı (HCl Mw: 36.46; d: 1.186 g/ml).

5.7.14. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)

69.4 g kalsiyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi (CaCl₂ Mw: 110.98).

5.7.15. Mangan klorür çözeltisi (0.55 M)

54.4 g mangan klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı (MnCl₂.4H₂O Mw:197.9).

5.7.16. Magnezyum sülfat çözeltisi (0.5 M)

11.42 g magnezyum sülfat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı (MgSO₄ Mw: 228.45).

5.7.17. PIPES çözeltisi (1M)

30.2 g pipes, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7.5'e ayarlandı. Hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı (Pipes Mw: 302.37).

5.7.18. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 -a/h)

40 g PEG-4000, deiyonize distile su içinde çözündürülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtre ile filtre edildi.

5.7.19. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)

% 40 PEG-4000 çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

5.7.20. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (% 10-a/h)

5 g polietilenimin, deiyonize distile su ile seyreltilerek 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtre ile steril edildi.

5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)

93,2 g potasyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 500 ml'ye tamamlandı (KCl Mw: 74.55).

5.7.22. Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (100 mM)

2,72 g potasyum di-hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı (KH_2PO_4 Mw: 136.09).

5.7.23. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (100mM)

3,48 g di-potasyum hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı (K_2HPO_4 Mw: 174.18).

5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10-a/h)

10 g SDS deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 g sodyum hidroksit deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı (NaOH Mw:39.99).

5.7.26. Sodyum karbonat çözeltisi (% 10-a/h)

25 g sodyum karbonat deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

5.7.27. Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi (% 1-a/h)

1 g sodyum tiyosülfat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.28. Gümüş nitrat / formaldehit çözeltisi (%0.1-a/h / %0.074-h/h)

0.1 g gümüş nitrat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve hacmi 100 ml' ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit eklendi.

5.7.29. Görüntüleme çözeltisi (%2-a/h sodyum karbonat; %0.04-h/h formaldehit; %0,0004-a/h sodyum tiyosülfat)

2 g sodyum karbonat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve hacmi 100 ml' ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit ve 40 µl %1'lik sodyum tiyosülfat (a/h) eklendi.

5.7.30. Tween-20 çözeltisi (%10 - a/h)

10 g (9 ml) Tween-20, deiyonize distile su ile karıştırıldı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
(d = 1.11 g/ml).

5.7.31. Diyaliz çözeltisi (10 mM tris; 50 mM KCl; 1M üre; 50 mM 2- β – merkaptotetanol)

10 ml 1M tris, 20 ml 2,5 M KCl, 250 ml 4M üre ve 3,5 ml 14,3 mM 2-β merkaptotetanol karıştırıldı. Hacim deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5.8. Tamponlar

5.8.1. Transformasyon Tamponu

2 ml 1 M pipes, 2 ml 2.5 M CaCl₂, 20 ml 2.5 M KCl ve 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M MnCl₂ eklendi. Hacim deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.2 µm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.8.2. DNA Ekstraksiyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl; 50 mM glikoz; 10 mM EDTA; pH 8.0)

5 ml 1 M Tris-Cl, 10 ml 1 M glikoz ve 4 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.8.3. DNA Ekstraksiyon Tamponu II (0.2 N NaOH; % 1-a/h SDS)

Bir hacim 2 N NaOH, 1 hacim % 10 SDS çözeltisi ve 8 hacim deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı. Çözelti kullanım öncesi taze hazırlandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.8.4. DNA Ekstraksiyon Tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11.5 ml glasiyal asetik asit deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ Mw: 98.14) (Maniatis ve ark., 1982).

5.8.5. 6x Konsantre DNA Yükleme Tamponu

25 mg Bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, üzerine 3.45 ml % 87'lik gliserin eklenerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.8.6. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M tris; %0.4-a/h SDS; pH:8.8)

45.43 g Tris ve 1 g SDS 200 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 8.8' e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

5.8.7. 4x Konsantre pakitleme jeli tamponu (0.5 M tris -%0.4 SDS, a/h, pH:6.8)

6.05 g Tris ve 0.4 g SDS 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 6.6'ya ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su il 100 ml'ye tamamlandı.

5.8.8. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8-a/h SDS; % 0.2-a/h Bromophenol mavisi; % 4-h/h 2-Merkaptoetanol; % 40-h/h Gliserin; pH 6.8)

1.21 g Tris, 4 g SDS ve 0.1 g bromofenol mavisi, 20 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Üzerine 2 ml 2-β merkaptotanol ve 23 ml % 87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı ve 1 ml'lık kısımlar halinde -20 °C'da saklandı.

5.8.9. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendi. Agaroz jel elektroforez deneylerinde 1:50 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı (Maniatis ve ark., 1982).

5.8.10. Tris-Cl Tamponu (1 M; pH 8)

121.1 g Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Tris Mw: 121.1).

5.8.11. Tris/EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA; pH 8)

10 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH: 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.12. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M tris; 1.25 M glisin; pH 8.3)

30.3 g Tris ve 187.68 g glisin, deiyonize su içinde çözündürüldü ve pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra hacmi iki litreye tamamlandı (Glisin Mw = 75.07).

5.8.13. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM tris; 250 mM glisin; % 0.1 – a/h SDS; pH 8.3)

200 ml 5x Tris-glisin tamponu üzerine 10 ml % 10'luk (a/h) SDS çözeltisi eklendi ve deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5.8.14. Potasyum Fosfat Tamponu (100 mM; pH 7.5)

200 ml 100 mM dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi üzerine, pH değeri 7.5 olana kadar 100 mM potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.8.15. Protein transfer tamponu

200 ml 5x Tris-glisin tamponu üzerine 100 ml metanol eklendi ve deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.16. 20x Konsantre TBS tamponu

160 g NaCl, 4 g KCl ve 60 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon otoklavda 121 °C'da 20 dakika tutularak steril edildi.

5.8.17. 1x TBS ve 1x TBS-T tamponu

1x TBS tamponu, 20x konsantre TBS tamponu deiyonize distile su ile 1/20 oranında seyreltilerek hazırlandı. TBS-T tamponu x1 TBS tamponuna % 0.1 final konsantrasyonda olacak şekilde %10 triton x-100 çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.8.18. Hücre parçalama tamponu (10 mM tris; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; %0,5-a/h tween-20)

0,5 ml 1M tris, 1 ml 2,5 M KCl, 0,1 ml 0,5 M EDTA ve 2,5 ml %10-a/h tween-20 karıştırıldı. Hacim deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.19. Üre içeren hücre parçalama tamponu (10 mM Tris; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; %0.5-a/h tween-20; 2M üre)

0.5 ml 1M tris, 1 ml 2.5 M KCl, 0.1 ml 0.5 M EDTA, 2.5 ml %10-a/h tween 20 ve 12.5 ml 8 M üre karıştırıldı. Hacim deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.20. Hücre re-süspansiyon tamponu (50mM tris; 50 mM dekstroze; 1mM EDTA)

2.5 ml 1M tris, 2.5 ml 1M dekstroze ve 0.1 ml 0.5M EDTA karıştırıldı ve hacim deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.21. Saklama tamponu (50 mM tris-HCl; 50 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 1mM DTT; 2mM PMSF; % 50-h/h gliserol)

5 ml 1M Tris -HCl (pH 7.9), 2 ml 2.5 M KCl, 0.05 ml 0.5M EDTA, 0.25 ml 1 M DTT, 125 ml saf gliserol karıştırıldı ve 0,5 mM final konsantrasyonda olacak şekilde 100 mM PMSF eklendi. Hacim deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlandı (Pluthero, 1993).

5.9. Plazmit Vektörler

Haloarcula hispanica proteaz genleri farklı bakteri promotör dizilerinin kontrolünde klonlandı. Bunun için pET-14b (Novagen), pBluescript II SK (+) ve pAK-Taq (Addgene) plazmitlerinden yararlanıldı.

5.10. Bakteri Hücreleri

Haloarcula hispanica:

Proteaz enzimini kodlayan genlerin kaynağı olarak *H. hispanica* bakteri ırkı (Juez ve ark., 1986) kullanıldı. Bu bakteri türü liyofilize halde RIKEN-BRC (Japonya)'den temin edildi.

Escherichia coli suşları:

Proteaz genlerinin klonlanması ve oluşturulan plazmitlerin çoğaltılmasında *E. coli* Mach1 suşu kullanıldı. *H. hispanica*'ya ait proteaz enzimlerin ekspresyonu ve aktivitelerinin analizi ile ilgili çalışmalarda, *E. coli* Mach1 suşu ile birlikte BL21, TOP-10, DH5α JM107 suşlarından yararlanıldı.

5.11. Çalışmada Kullanılan Oligonükleotid Primerler

H. hispanica proteaz genlerinin PZR ile çoğaltılması, genlerin klonlanması, rekombinant bakteri kolonilerinin koloni-PZR ile seçilmesi ve DNA dizi analizlerinde Tablo 5.1’de verilen oligonükleotid primerlerden yararlanıldı.

Tablo 5.1. Proteaz genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan oligonukleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
H-ser.prot.-For	5'-ATGTTAACAGCCCTCTGTG-3'
H-ser.prot.-Rev	5'-TTATCGCGGTGTCGCGATG-3'
H-prot.-For	5'- ATGTTGTGCCCTGATATTGG-3'
H-prot.-Rev	5'- TCAGTCCCCGGTCGAGGC-3'
H-ser.prot.minus-For	5'-TTAACAGCCCTCTGTGATTTTAA-3'
H-prot.minus-For	5'-TTGTGCCCTGATATTGGCC-3'
H-ser.prot.flag-Rev	5'-TCATTTATCATCTTTATAATCTCGCGGTGTCGCGATGCC-3'
H-prot.flag-Rev	5'- TCATTTATCATCATCTTTATAATCGTCCCCGGTCGAGGCAGG-3'
pAK-LacI-For	5'-GCGCAACGCAATTAATGTAAGTTA-3'
pAK-LacI-minus-Rev	5'-ATTCAACCACCCTGAATTGACTC-3'
pBlue-sq-For	5'- GTAAAACGACGCCAGTGAG-3'
pGEX-3' sq	5'- CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG-3'
pAK-sq-For (Sq-OKP-For)	5'- CCTATGGAAAAACGCCAGCAAC-3'
pET-sq-For	5'- AGGGAGACCACAACGGTTTC-3'
pET-sq-Rev	5'- TGGCAGCAGCCAACTCAGC-3'
Vec-GFP-sq-For	5'- CATTCGTAGAATTCCAAC TG-3'
pAK-LacI/GTG-Rev	5'- CACATTCACCACCCTGAATTGA-3'

5.12. Primerlerin Fosforillenmesi

H. hispanica proteaz genleri, genom DNA’sı üzerinden, restriksiyon enzimleri için hedef dizi taşımayan primerler kullanılarak çoğaltıldı. Bu nedenle sentetik oligonukleotid primerler, PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendikten sonra deneylerde kullanıldı. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon 37 °C’da 1 saatte tamamlandı. Sonrasında reaksiyon ortamları 85 °C’da 5 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı.

Reaksiyon Karışımı

<i>İleri primer</i>	:	2.5 μ l (250 pMol)
<i>Geri Primer</i>	:	2.5 μ l (250 pMol)
<i>rATP karışımı (10 mM)</i>	:	8.0 μ l
<i>Reaksiyon tamponu (x10)</i>	:	2.0 μ l
<i>Deiyonize distile su</i>	:	4.5 μ l
<i>T4 polinukleotid kinaz (10U/μl)</i>	:	0.5 μ l
<i>Toplam hacim</i>	:	20.0 μ l

5.13. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde %1 (a/h) agaroz jeller kullanıldı. 1 g agaroz üzerine 100 ml distile su eklendi. Çözelti kaynatılarak agaroz çözündürüldü. Çözeltinin üzerine 2 ml x50 konsantre TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 °C'ye düştüğünde 2 μ l 10 mg/ml konsantrasyonda etidyum bromür çözeltisi eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel katılaştıktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Analiz edilecek DNA örnekleri 5:1 oranında x6 konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.14. Transformasyon İçin *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Genlerin klonlanması, oluşturulan plazmit vektörlerin çoğaltılması ve proteaz enzimlerinin analizi ile ilgili çalışmalarda 5.10'da verilen *E. coli* suşlarından yararlanıldı. Bu suşlar, plazmitlerin aktarılabilmesi için kompetent hale getirildi. Bunun için -80 °C'da %20 (a/h) gliserinli ortamda saklanan bakteri stoklarından LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C'da etüve bir gece boyunca üremeleri sağlandı. Katı besiyerinde oluşan bakteri kolonilerden 2-3 koloni alındı ve antibiyotik içermeyen 5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Kültürler 37°C'da 150 dev./dak. çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik kültürler 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23-25 °C'da 150 dev./dak. çalkalama hızında üremeye

bırakıldı. Kùltürler, $OD_{600} \sim 0.25 - 0.3$ değere ulaştığında kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kùltürler, 4 °C’da 10 dakika, 4000 dev./dak. hızda santrifüj edilerek bakterilerin çökelmesi sağlandı. Çökeltiler 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler tekrar 4 °C’da 10 dakika 4000 dev./dak. hızda santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere 0.2-0.5 ml’lik porsiyonlar halinde -80 °C’da saklandı.

5.15. Liyofilize Halde *H. hispanica* Hücrelerinden Kùltür Hazırlanması

Liyofilize edilmiş halde temin edilen *H. hispanica* hücreleri, 1 ml hacimde bu bakteri için hazırlanan besiyerinde (5.6.3) steril koşullarda süspanse edildi ve hücre süspansiyonu 250 ml’lik erlen içerisinde 80 ml hacimde besiyerine eklendi. Ortam 150 dev./dak. çalkalama hızında 37°C’da 6 gün boyunca inkübe edildi. Hazırlanan kùltür hem DNA izolasyonu hem de bakteri stoklarının hazırlanmasında kullanıldı.

5.15A. Bakteriden Genom DNA İzolasyonu

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri kùltüründen 10 ml alındı ve genom DNA izolasyonunda kullanıldı. Genom DNA izolasyonu ticari kit (invitrogen Cat No. K1820-01) ile gerçekleştirildi. Bunun için kùltür oda sıcaklığında 6000 dev./dak. hızda, 15 dakika santrifüj edildi ve hücreler çöktildi. Hücre çökeltisi 2 mg/ml konsantrasyonda proteinaz K içeren, 200 µl tampon içerisinde süspanse edildi ve 55°C’da 2 saat bekletildi. Ortama 20 µl RNaz A (20 mg/ml) çözeltisi eklendi. Hücre süspansiyonu 5 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra, üzerine 200 µl parçalama/bağlama tamponu, 200 µl saf etil alkol eklendi ve 5-10 saniye karıştırıldı. Elde edilen karışım (~600 µl) saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüj edildi. Kolona bağlanan DNA’lar iki farklı yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra, 100 µl elüsyon tamponunda elüe edildi. Elde edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve ileride kullanılmak üzere -20°C’da saklandı.

5.16. *H. hispanica* Proteaz ve Serin Proteaz Genlerinin PZR ile Çoğaltılması

Halofilik bakteri proteaz ve serin proteaz genleri, *H. hispanica*'dan izole edilen genom DNA'sı üzerinden, Tablo 5.1'de nükleotit dizileri verilen fosforillenmiş, *H-ser.prot.-For/H-ser.prot.-Rev*; *H-ser.prot.-For/H-ser.prot.flag-Rev*; *H-ser.prot.minus-For/H-ser.prot.-Rev*; *H-ser.prot.minus-For/H-ser.prot.flag-Rev*; *H-prot.-For/H-prot.-Rev*; *H-prot.-For/H-prot.flag-Rev*; *H-prot.minus-For/H-prot.-Rev* ve *H-prot.minus-For/H-prot.flag-Rev* primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR için reaksiyon karışımı:

<i>Kalıp DNA (~ 25 ng/ µl)</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>İleri/Geri primer karışımı (5 pM/µl)</i>	<i>4,0 µl</i>
<i>dNTP karışımı (2,5 mM)</i>	<i>3,0 µl</i>
<i>Reaksiyon tamponu (x10)</i>	<i>4,0 µl</i>
<i>MgSO₄ (25 mM)</i>	<i>2.0 µl</i>
<i>Deiyonize distile su</i>	<i>24 µl</i>
<i>KOD-plus(1U/ µl)</i>	<i>1.0 µl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>40,0 µl</i>

PZR, 95°C sıcaklıkta 3 dakikalık ön denatürasyondan sonra, 32 döngü halinde “95 °C’da 20 saniye / 48-54 °C’da 20 saniye / 68 °C’da 1 dakika” ve bir döngü 68 °C 10 dakika olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

5.17. PZR Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Saflaştırılması

PZR ürünlerinin hacmi 100 µl’ye tamamlandı, üzerine 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10 dakika -80 °C’da bekletildi. 14.000 dev./dak. hızda santrifüj santrifüj edildi. DNA çöktelleri üzerine 0.5 ml %70 etil alkol eklendi, 2-3 saniye karıştırıldı ve 2 dakika 14.000 dev./dak. hızda tekrar santrifüj edildi. Üst sıvılar uzaklaştırıldı, DNA çöktelleri kurutuldu ve 20 µl TE tamponunda

5.18. Plazmit DNA'ların Ligasyon İçin Doğrusal Hale Getirilmesi

5.18.1. pET-14b plazmitinin doğrusal hale getirilmesi:

Reaksiyon karışımı:

<i>pET-14b</i>	<i>25 μl (~ 2.5 μg)</i>
<i>Reaksiyon tamponu (x10)</i>	<i>10 μl</i>
<i>Deiyonize distile su</i>	<i>64 μl</i>
<i>NcoI (10U/ μl)</i>	<i>1 μl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>100 μl</i>

55

fenol/kloroform/izoamil alkol ile ekstre edildi ve DNA'lar etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltisi 45 µl deiyonize distile suda çözündürüldü. Defosforilasyon işlemi için çözündürülen DNA örneğine 5 µl 10x konsantre SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) tamponu ve 2 µl (2U) SAP enzimi eklendi. Reaksiyon 37 °C'da 1 saatte tamamlandı. Reaksiyon sonrası DNA örneği eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol ile ekstre edildi ve DNA'lar etil alkol ile çöktürüldü. Çökelti 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve daha sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

5.18.2. pBluescript II SK+ plazmitinin doğrusal hale getirilmesi:

pBluescript II SK+ plazmit DNA'sı *EcoRV* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve 2 saat 37 °C'da bekletildi. *EcoRV* enzimi küt uçlu DNA fragmentleri oluşturduğundan bu enzim ile kesilen DNA örneklerine Klenow enzimi uygulanmadı. Kesilen pBluescript II SK+ plazmit DNA'ları yukarıda belirtildiği şekilde fenol/kloroform/izoamil alkol ile ekstre edildi ve SAP enzimi ile defosforile edildikten sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

Reaksiyon karışımı:

<i>pBluescript II SK+</i>	5 µl (2.5 µg)
<i>Reaksiyon tamponu(x10)</i>	10 µl
<i>Deiyonize distile su</i>	84 µl
<i>EcoRV (10U/ µl)</i>	1 µl
<i>Toplam hacim</i>	100 µl

5.18.3. pAK-Taq plazmitinin doğrusal hale getirilmesi:

pAKTaq Engelke ve diğerleri (Engelke ve ark., 1990) tarafından geliştirilmiş *tac*. ve *lacI* promotör dizileri taşıyan bir plazmit vektördür. Bu çalışmada *H. hispanica* proteaz genlerini *tac* ve *lacI* promotör dizilerinin kontrolünde klonlamak için pAK-Taq vektöründen yararlanıldı. İlk aşamada plazmit üzerindeki taq geni restriksiyon enzimleri ile kesilip çıkartıldı ve pAK olarak isimlendirilen bir ara vektör oluşturuldu. Bunun için pAK-Taq plazmit vektörü *EcoRI* ve *XbaI* ile kesildi. Oluşan yapışkan uçlar

Klenow enzimi ile küt uçlu hale dönüştürüldü. Plazmitin büyük fragmenti agaroz jel ile saflaştırıldı ve T4 DNA ligaz enzimi ile ligasyona uğratarak pAK vektörü elde edildi. pAK vektöründe *lacI* promotör dizisi sonrasında uygun restriksiyon enzimi kesim noktası bulunmadığından, bu plazmit ters (inverz) PZR tekniği ile doğrusal hale getirildi. Bu amaçla Tablo 5.1’de nükleotid dizileri verilen *pAK-LacI-For*, *pAK-LacI-Rev* ve *pAK-LacI/GTG-Rev* primerlerinden yararlanıldı. PZR için aşağıda verilen karışım hazırlandı.

PZR için reaksiyon karışımı:

<i>pAK Plazmit DNA'sı</i>	1,0 μ l (50 ng)
<i>pAK-LacI-For</i> (5 pM/ μ l)	4,0 μ l
<i>pAK-LacI-Rev</i> ya da <i>pAK-LacI/GTG-Rev</i> (5pM/ μ l)	4,0 μ l
<i>dNTP karışımı</i> (2,5 mM)	3,0 μ l
<i>Reaksiyon tamponu</i> (x10)	4,0 μ l
<i>MgSO₄</i> (25 mM)	2.0 μ l
<i>Deiyonize distile su</i>	21 μ l
<i>KOD-plus</i> (1U/ μ l)	1.0 μ l
<i>Toplam hacim</i>	40,0 μ l

PZR koşulları; 95°C sıcaklıkta 3 dakikalık ön denatürasyondan sonra, 32 döngü “95 °C’da 20 saniye / 54 °C’da 20 saniye / 68 °C’da 4 dakika” ve bir döngü 68 °C 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve yukarıda belirtildiği şekilde (5.13) agaroz jel elektroforezi tekniği ile saflaştırıldı. Saflaştırılan doğrusal DNA molekülleri daha sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20°C’da saklandı.

H. hispanica proteaz genlerinin pAK-Taq vektöründe *tac* promotör dizisi kontrolünde klonlamak için, 2.5 μ g plazmit DNA’sı 50 μ l hacim içerisinde *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile iki aşamalı olarak kesildi. Daha sonra DNA örneği yukarıda anlatıldığı şekilde (5.18.1) fenol/kloroform/izoamil alkol ile ekstre edildi, etil alkol ile çöktürüldü ve 25 μ l hacim içerisinde SAP enzimi ile defosforile edildi. Reaksiyon ortamı 65°C’da 20 dakika bekletilerek SAP enziminin inaktive

olması sağlandı. *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesim sonucunda oluşan plazmitin büyük fragmenti agaroz jel ile saflaştırıldı.

5.19. Doğrusal Hale Getirilen Plazmit DNA'ların Proteaz ve Serin Proteaz Kodlayan DNA Fragmentleri ile Ligasyonu ve Transformasyonu

5.16'da belirtildiği gibi hazırlanan proteaz ve serin proteaz kodlayan DNA fragmentleri ile doğrusal hale getirilen defosforile plazmit DNA'larının yaklaşık konsantrasyonları agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Yaklaşık 20-30 nanogram plazmit DNA'sı ve 50-100 ng proteaz veya serin proteaz kodlayan DNA örnekleri 0.2 ml'lik PZR tüplerinde karıştırıldı. Reaksiyon karışımının hacmi DNA örneklerinin konsantrasyonlarına göre 10 ya da 20 µl olarak belirlendi. Reaksiyon ortamına 1/10 hacim x10 konsantre T4 DNA ligaz tamponu ve 1-2 µl T4 DNA ligaz enzimi (1U/ µl)(TaKaRa) eklendi. Ligasyon 15°C'a ayarlı PZR cihazında yaklaşık 15-16 saatte tamamlandı. Transformasyon için ligasyon ürünleri 1,5 ml'lik plastik tüplere aktarıldı. Transformasyon için ligasyon ürünü 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerine daha önce 5.14'de anlatıldığı üzere hazırlanan kompetent *E. coli* Mach1 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 80 saniye 42 °C'da su banyosunda, 3 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30-45 dakika arasında inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 100-200 µl antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37 °C'da gece boyu üremeye bırakıldı. Plazmit alan transformant kolonilerden istenilen rekombinant plazmiti taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlanarak küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

5.20. Koloni PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi

Transformasyon sonrası, katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden ortalama 8-12 koloni steril kürdan ile alındı ve 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 5 µl deiyonize distile su içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin PZR cihazında 95°C'da 5 dakika bekletilerek parçalandı. PZR için plazmit örneklerine bakılarak tercihen biri vektör içerisinde, diğeri klonlanan DNA fragmenti içerisinde belirli bir bölgeye bağlanan uygun primer çiftleri seçildi. Örneklerin üzerine aşağıda verildiği şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl eklendi ve PZR gerçekleştirildi.

Koloni PZR reaksiyon karışımı:

	<u>x1</u>	<u>xN</u>
<i>İleri primer(10 pmol/ µl)</i>	<i>1.0 µl</i>	<i>Nx1.0 µl</i>
<i>Geri primer(10 pmol/ µl)</i>	<i>1.0 µl</i>	<i>Nx1.0 µl</i>
<i>dNTP(2,5mM)</i>	<i>1.0µl</i>	<i>Nx1.0 µl</i>
<i>MgCl₂(50 mM)</i>	<i>1.0 µl</i>	<i>Nx1.0 µl</i>
<i>Reaksiyon tamponu(x10)</i>	<i>2.0 µl</i>	<i>Nx2.0µl</i>
<i>Deiyonize distile su</i>	<i>8.9 µl</i>	<i>Nx8.9 µl</i>
<i>Taq DNA polimeraz(5U/ µl)</i>	<i>0.1 µl</i>	<i>Nx0.1 µl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>15 µl</i>	<i>Nx15 µl</i>

* N: örnek sayısı

PZR koşulları, 95 °C’da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, 94 °C-15 sn/ 50-55°C-15 sn/ 72 °C-2 dakika olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Pozitif sonuç veren örneklerle ait kolonilerden 5 ml doygun sıvı kültür (LB+amp) hazırlandı ve küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

5.21. Transformant *E. coli* Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu

Koloni PZR ile seçilen pozitif transformant kolonilerden kontrol ve dizileme amaçlı kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Seçilen kolonilerden ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı. Örnekler 37°C’da, 180 dev./dak. hızda bir gece boyunca çalkalayıcı etüvde bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 7000 dev./dak. hızda 3 dakika santrifüj edildi ve hücreler çöktüldü. Hücre çökeltisi üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I eklenerek süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 300 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 225 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4°C’da, 15000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edildi ve çökelti halinde uzaklaştırıldı.

Plazmit DNA'sını içeren üst sıvı 1,5'lik plastik tüplere aktarıldı. Üst sıvı üzerine 2,5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C'da, 15000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA'ların çökmesi sağlandı. DNA çökeltisi üzerine 0.5 ml % 70 etil alkol yıkandı. Örnekler kurutulduktan sonra 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte rekombinant plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenen bantları veren DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.22. Küçük Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların Kontrolü ve DNA Dizi Analizi

Küçük ölçekte hazırlanan plazmit DNA'ları, restriksiyon haritalarına göre belirlenen uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Bu amaçla 2-5 µl plazmit DNA'sı distile su ile 18 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamı, 2 µl reaksiyon tamponu (x10) ve 2-5U (0,2-0,5 µl) arasında değişen miktarlarda enzim eklendikten sonra 37°C'da 1-2 saat bekletildi. Sürenin sonunda örnekler 5 µl x6 konsantre DNA yükleme tamponu katıldı ve %1'lik agaroz jele uygulandı. Plazmit vektörlerin restriksiyon haritaarı göz önünde bulundurularak agaroz jel elektroforez sonuçları değerlendirildi. Plazmit DNA örneklerinin kontrolü amacıyla kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri Tablo 5.2'de verildi.

Tablo 5.2. Tez çalışması kapsamında oluşturulan plazmitler ve bu plazmitlerin kontrolünde kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri.

Plazmit Vektörler	Kullanılan Restriksiyon Enzimleri
<i>pBlue-ser.prot</i>	<i>ClaI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pBlue-ser.prot.flag</i>	<i>ClaI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pBlue-prot</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pBlue-prot.flag</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pET-ser.prot</i>	<i>ClaI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pET-prot</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pET-prot.flag</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pET-ser.prot.flag</i>	<i>ClaI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>pAK-prot</i>	<i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i>
<i>pAK-prot.flag</i>	<i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i>
<i>placI-prot/GTG</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>placI-prot.flag/GTG</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>placI-ser.prot/GTG</i>	<i>BglI</i>
<i>placI-prot</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>placI-prot.flag</i>	<i>PstI</i> ve <i>EcoRI</i>
<i>placI-ser.prot</i>	<i>BglI</i>

5.23. Küçük Ölçekte Hazırlanan Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Kısmen Saflaştırılması

Küçük ölçeklerde hazırlanan plazmit DNA örnekleri, dizi analizlerinde için PEG/NaCl ile kısmen saflaştırıldı. TE tamponundaki örnekler RNaz enzimi katılmış 4 hacim PEG/NaCl çözeltisi eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde bekletildi. Daha sonra örnekler 4 °C'da 15000 dev./dak. hızda, 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktüldü. DNA çöktürmeleri 1 ml % 70 etanol ile yıkandı, kurutuldu ve 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü. Örneklerdeki yaklaşık DNA konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak belirlendi.

5.24. DNA Dizi Analizleri

PEG/NaCl ile kısmen saflaştırılan plazmit DNA örneklerinden uygun olanları seçilerek DNA dizi analizi tekniği ile analiz edildi. DNA dizi analizleri için özel bir firmadan hizmet alınımı yapıldı.

5.25. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğru olduğu saptanan plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli* Mach1 hücrelerine transforme edildi. LBA(+) besiyerinde oluşan transformantlardan 2-3 koloni seçilerek 5 ml LB (+) besiyerine ekildi ve 37 °C'da 180 dev./dak. çalkalama hızında bir gece inkübe edildi. Hazırlanan kültürler, 50 ml taze LB(+) besiyerlerine aktarıldı ve 37°C'da 180 dev./dak. çalkalama hızında 15-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 7000 dev./dak. hızda 10 dakika santrifüj edildi ve hücreler çöktüldü. Hücre çökeltisi üzerine 1 ml DNA Ekstraksiyon Tamponu I eklenerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 2 ml DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 1.5 ml DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4°C'da, 15000 dev./dak hızda 15 dakika santrifüj edildi ve çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'sını içeren üst sıvı temiz tüplere aktarıldı. Üst sıvı üzerine 0.7 hacim izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C'da, 14000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA'ların çökmesi sağlandı. DNA çökeltisi üzerine 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandı. Örnekler kurutulduktan sonra 200 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan orta ölçekte rekombinant plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. DNA örnekleri yukarıda (5.23) belirtildiği şekilde PEG/NaCl ile kısmen saflaştırıldı ve- 20 °C'da saklandı.

5.26. *H. hispanica* Proteaz Enzimlerinin *E.coli* Hücrelerinde Sentezinin SDS-PAGE ile Analiz Edilmesi

H. hispanica'ya ait proteaz enzimlerinin *E.coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentezi, SDS-PAGE ile araştırıldı. SDS-PAGE sonrası proteinlerin görüntülenmesinde gümüş boyama tekniğinden ya da flag uzantılı proteaz enzimleri için Western melezleme tekniğinden yararlanıldı.

5.26.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

H. hispanica'ya ait proteaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde sentez edilmesinde bu bakterinin BL21, MachI, Top10, DH5 α , ve JM107 suşları denendi. İlk aşamada, daha önce verildiği şekilde (5.14) kompetent hale getirilen bu bakteri suşları plazmit DNA'lar ile transforme edildi. Ampisilin içeren LBA besiyerinde oluşan transformant kolonilerden 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı, 37°C'da, 180 dev./dak. çalkalama hızında gece boyu inkübe edilerek doymuş kültürler hazırlandı. Kültürlerden 1 ml alınarak 7500 dev./dak. hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltileri 200 μ l deiyonize distile su ile süspanse edildi ve eşit hacimde de 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu eklendi. Örnekler 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi ve proteinlerin denatürasyonu için 95-100 °C'da 5 dakika tutuldu. Çözünmeyen hücresel atıklar 15.000 dev./dak. hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve üst sıvı SDS-PAGE ile incelendi.

5.26.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Protein elektroforezi işleminde 100x100x10 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller %10'luk ayırma ve %6'lık paketleme jeli olmak üzere iki kısım olarak hazırlandı. Ayırma jeli; 5 ml deiyonize distile su, 4 ml % 30'luk akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 3 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 50 μ l %10'luk APS çözeltisi ve 20 μ l TEMED karıştırılarak hazırlandı ve kasetlere döküldü. Jel yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerize olması amacıyla üzerine 500-600 μ l deiyonize distile su eklendi. Polimerizasyon işleminden sonra, jel yüzeyinde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve üzerine paketleme jeli döküldü. Paketleme jeli; 2,75 ml deiyonize distile su, 1 ml %30'luk akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1,25 ml 4x paketleme jel tamponu, 20 μ l %10'luk APS çözeltisi ve 7,5 μ l TEMED karıştırılarak hazırlandı. Jel kasetlerine taraklar yerleştirildi ve akrilamidin polimerizasyonu sağlandı.

5.26.3. Örneklerin jelde yürütülmesi

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan jeller (5.26.2) tris-glisin tamponu içeren tanka yerleştirildi. Daha önce hazırlanan denatüre protein örneklerinden, 2,5-10 μ l arasında değişen miktarlarda jele yüklendi. Elektroforez işlemi, iki jel kaseti için ilk 15 dakikada 80 volt, daha sonra 140 voltta 75-90 dakikada tamamlandı. Elektroforez

sonrasında ayrıştırılan proteinler gümüş boyama tekniği ile boyanarak görünür hale getirildi ya da Western melezleme tekniği uygulanarak proteaz enzimlerinin sentez edilip edilmediği saptandı.

5.26.4. Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Poliakrilamid jellerde ayrıştırılan az miktarlarda proteinlerin analiz edilmesi için, CBB (Coomassie Brilliant Blue) ile boyama tekniğine göre daha hassas olan gümüş boyama yöntemi uygulandı. Bunun için jeller ilk aşamada fiksasyon çözeltisi (%50 metanol: %40 glasiyel asit) içerisinde 1 saat, daha sonra ise %50 metanol içerisinde 30 dakika düşük hızda karıştırılarak fikse edildi. Daha sonra 3 kez deiyonize distile su içerisinde 20 dakika süre ile yıkandı. Jeller %0,02'lik sodyum tiyosülfat çözeltisinde 2 dakika bekletildi, 2 kez deiyonize distile su ile kısa süreli yıkandı ve karanlıkta ortamda gümüş nitrat çözeltisinde (%0,1 gümüş nitrat, %0,074 formaldehit) 30 dakika düşük hızda karıştırıldı. Görüntüleme işleminden önce jeller deiyonize distile su ile 2 kere kısa süreli yıkandı. Jellerin üzerine görüntüleme çözeltisi (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat) eklenerek protein bantların görünür hale dönmesi sağlandı ve hemen sonrasında ortama fiksasyon çözeltisi (%50 metanol: %40 glasiyel asit) eklenerek reaksiyon durduruldu.

5.26.5. Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi

Elektroforez sonucunda jel üzerinde ayrılan proteinler nitroselüloz membrana transfer edildi. Bu amaçla transfer kasetleri arasında 'sünger-filtre kağıdı- nitrosellüloz membran- jel- filtre kağıdı- sünger' sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve 45 dakika 45 voltta ve 90 dk 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işleminde sonra membranlar 1-2 saat bloklama çözeltisinde bekletildi ve bir gece boyunca bloklama çözeltisi içerisinde 1/1000 oranında seyreltilen primer antikor (fare anti-flag (DYKDDDDK)) etkisinde bırakıldı. Membranlar bir kez 20 dakika TBS-T ile, iki kez 20 dakika TBS ile yıkandı. Daha sonra membranlar TBS içerisinde 1/4500 oranında seyreltilen yaban turpu peroksidazı (*Ing. horse radish peroxidase : HRP*) bağlı anti fare IgG antikoru etkisinde bırakıldı. İşlem sonrası membranlar bir kez 20 dakika TBS-T ile, iki kez 20 dakika TBS ile yıkandı. Proteinler, kemilüminesens substrat (H&C, RPN2232) kullanılarak bir jel görüntüleme sistemi ile (DNR Bio) görüntülendi.

5.27. İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid (IPTG) Etkisinde Bırakılan Hücrelerde Proteaz Enzimleri Sentezinin Analizi

Çalışmada oluşturulan plazmit vektörlerde proteaz genlerini kontrol eden promotör dizileri dolaylı (*T7* RNA polimeraz promotörü; *E. coli* *BL21* hücrelerinde *T7* RNA polimeraz geni *lacUV5* promotörü kontrolündedir) ya da direkt olarak (*lac* ve *tac* promotörleri) IPTG ile regüle edilebilen promotörlerdir. Dolayısıyla IPTG'in bu plazmit vektörler ile transforme edilen hücrelerde proteaz enzimlerinin sentezine etkileri araştırıldı. Bunun için plazmit aktarılan hücrelerden LB(+amp) besiyerinde küçük ölçeklerde (5-10 ml) doymuş kültürler hazırlandı. Kültürlerden alınan 2 ml'lik örnekler taze besiyeri ile 5 ml'ye tamamlandı ve ortama 0.05 mmol ile 0.5 mmol arasında değişen final konsantrasyonlarda olacak şekilde 100 mM IPTG çözeltisinden eklendi. Kültürler 37°C'da, 200 dev./dak. çalkalama hızında 6 saat boyunca üremeye bırakıldı. Daha sonra 3 ml kültür alınarak 7000 dev./dak. hızda 5 dakika santrifüj edildi ve hücreler çöktürüldü. Hücre çöktürmeleri 200 μ l deiyonize distile su içerisinde süspansiyon edildi ve eşit hacimde 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Örnekler yukarıda belirtildiği (5.26.1) şekilde insülin iğnesinden geçirildi ve proteinlerin denatürasyonu için 95-100 °C'da 5 dakika tutuldu. Hazırlanan hücre lizatları proteaz enzimleri için SDS-PAGE ile analiz edildi.

5.28. *E. coli* Hücrelerinde Rekombinant Proteaz Enzimi Sentezi için Uygun Üreme Sıcaklığının Belirlenmesi

Plazmit aktarılan transformant *E.coli* hücrelerinden 5 ml LB (+amp) besiyerlerine ekim yapıldı. Kültür ortamları 25 °C, 30 °C ya da 37 °C'da, 200 dev./dak. çalkalama hızında bir gece boyunca üremeye bırakıldı. Hazırlanan kültürlerden alınan örnekler hem proteaz sentez düzeyi bakımından SDS-PAGE ile incelendi, hem de proteaz aktivite testlerinde kullanıldı.

5.29. Proteaz Geni Aktarılan *E.coli* Hücrelerinden Enzim Aktivite Testleri için Lizat Hazırlanması

Proteaz geni aktarılan *E. coli* hücreleri ilk aşamada 5 ml LB(+amp) besiyerine ekildi. Yaklaşık 8 saat boyunca 30°C'da 180 dev./dak. çalkalama hızında inkübe edilerek ön

kültürler hazırlandı. Hazırlanan ön kültürler 150 ml LB(+amp) besiyerlerine aktarıldı. Gece boyu 30 °C’da 180 dev./dak. çalkalama hızında bırakılarak doygun kültürler hazırlandı. Kültürler 7000 dev./dak. hızda santrifüj edildi ve hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltileri 5 ml hücre re-süspansiyon tamponunda süspanse edildi. Her bir örneğe 100 µl 1mg/ml lizozim eklendi ve 37°C’da yarım saat boyunca tutuldu. Hücreler 7000 dev./dak. hızda 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökeltilerin her biri 4 ml parçalama tamponu (5.8.18) içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonları gücü %80’e ayarlı bir sonikatör ile buz üzerinde 10 saniye sonikasyon, 10 saniye bekleme döngüleri halinde 10 dakika süreyle sonike edildi. Sonikasyon sonrası örnekler 4°C’da 15.000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar ve çökeltiiler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’da saklandı.

5.30. Ham Lizatlarda Proteinlerin Çöktürülmesi ve Proteazların Kısmen Saflaştırılması

Yukarıda belirtildiği (5.29) şekilde hazırlanmış hücre lizatlarındaki proteinler soğuk aseton ile çöktürüldü. Sonikasyon sonrasında arta kalan ve olası proteaz içeren hücre çökeltilerinden 85-90 C’da sıcaklık uygulaması ile ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen örneklerde proteinler SDS-PAGE ile analiz edildi.

5.30.1. Aseton ile çöktürme

Sonikasyon ile hazırlanan lizatlardan 1 hacim alındı ve üzerine 3-4 hacim soğuk aseton eklendikten sonra -20°C’da 20 dakika bekletildi. Süre sonunda asetonun etkisiyle çökelen proteinler 4°C’da 15.000 dev./dak. hızda 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökeltiiler oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilerek kurutuldu. Protein çökeltiileri TE ya da saklama tamponu içerisinde çözündürüldü, SDS-PAGE deneylerinde ve proteaz enzimi aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C’da saklandı.

5.30.2. Diyaliz

Sonikasyon ile parçalama ya da sıcak ortamda ekstraksiyon ile hazırlanan örneklerin bir kısmı 5.7.31’de belirtildiği şekilde hazırlanan ve farklı oranlarda seyreltilen diyaliz çözeltisi içerisinde diyaliz edildi. Protein örneklerden 3 ml alınarak diyaliz tüplerine

(Orange Scientific-OrDial-MWCO 6000-8000) aktarıldı ve ilk aşamada 1:10 oranında seyreltilen çözeltide 2 saat boyunca 4°C’da diyaliz edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve sonrasında örnekler 1:100 oranında seyreltilen diyaliz çözeltisine alındı. Seyreltik çözeltide bir gece diyaliz edilen örnekler iz miktarda (0.25 mM) 2-β-merkaptoetanol içeren 50 mM tris tamponuna aktarıldı ve 4 saat diyaliz edildi. Son aşamada ise örnekler 24 saat boyunca deiyonize distile suda bekletildi. Elde edilen örnekler SDS-PAGE deneylerinde ve proteaz enzimi aktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C’da saklandı.

5.30.3. Sıcaklık uygulaması ile ekstraksiyon

Sonikasyon ile parçalama sonrasında arta kalan çökelilerde çözünmemiş halde kaldığı düşünülen proteaz enzimleri 85-90 °C’da sıcaklık uygulaması ile ekstre edildi. Çökeltiler uygun hacimlerde parçalama tamponunda (ortama 8M üre, 1 mM DTT, 100 µg/ml PEI eklendi) süspansiyonları 85-90°C’da 1 saat tutuldu ve 15.000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı SDS-PAGE ile analiz edildi.

5.31. Plazmit Aktarılan *E. coli* Hücrelerinin Proteaz ve Serin Proteaz Aktiviteleri Bakımından Analiz edilmesi:

Farklı plazmitler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinin proteaz ve serin proteaz enzimi aktiviteleri saptanmasında üç farklı yöntem izlendi.

- i. Milk-agar besiyerinde proteolitik aktivitelerine bakılarak
- ii. Bovin serum albümini hidroliz edip etmedikleri SDS-PAGE ile incelenerek
- iii. Azokazein substratı kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile

5.31.1. Milk-agar yöntemi

E.coli hücreleri proteaz veya serin proteaz genleri klonlanan plazmit vektörler ile transforme edildi. Elde edilen transformant colonilerden 5.6.4 ve 5.6.5’de belirtildiği şekilde hazırlanan besiyerlerine çizgi ekim tekniği ile ekim yapıldı. Kültürler 37 °C’da 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bakteri üreme bölgelerinde zon oluşumları incelenerek değerlendirme yapıldı.

5.31.2. Örneklerde Proteaz aktivitesinin BSA proteini kullanılarak test edilmesi

Bu deneyler en iyi ekspresyon yaptığı saptanan pET-ser.prot ile transforme edilmiş *E. coli* BL21 hücrelerinden hazırlanan lizatlar ile gerçekleştirildi. Proteaz enzimleri için substrat olarak 50 mM Tris-Cl tamponunda çözündürülen bovin serum albümin (BSA), kontrol enzimi olarak ise TPCK (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone) ile işlem görmüş tripsin enzimi kullanıldı. Reaksiyon 50 µl 50 mM Tris-Cl tamponu (pH. 8) içerisinde gerçekleştirildi. Bunun için aşağıda oranları verilen bir karışım hazırlandı ve 37 °C’da 16 saat süre ile inkübe edildi. Süre sonunda örneklerle eşit hacimde 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu eklendi ve BSA’nin hidroliz olup olmadığı SDS-PAGE ile analiz edildi.

Reaksiyon karışımı:

<i>Hücre lizatı (enzim)</i>	<i>0.25 µl, 0.5 µl, 1 µl ya da 2 µl</i>
<i>BSA çözeltisi (1mg/ml), 50 mM Tris-Cl içerisinde)</i>	<i>25 µl</i>
<i>50 mM Tris-Cl tamponu (pH.8)</i>	<i>24.75 µl, 24.5 µl, 24 µl ya da 23 µl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>50 µl</i>

Kontrol olarak kullanılan tripsin enzimi, hücre lizatı yerine 0.5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, ya da 4 µg/µl final konsantrasyonda olacak şekilde ortama katıldı.

Farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında proteaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Hücre lizatlarında proteaz enzimi aktiviteleri 100 mM ve 300 mM NaCl konsantrasyonlarında NaCl ihtiva eden 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,5) tamponunda gerçekleştirildi. Substrat olarak aynı tamponlar içerisinde çözündürülerek hazırlanan BSA kullanıldı. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon 37 °C’da 16 saat sürede gerçekleştirildi.

Reaksiyon karışımı:

<i>Hücre lizatı (enzim)</i>	<i>0.25 µl, 0.5 µl, 1 µl ya da 2 µl</i>
<i>100 mM ya da 300 mM NaCl içeren fosfat tamponunda hazırlanan BSA çözeltisi (1mg/ml)</i>	<i>25 µl</i>
<i>100 mM ya da 300 mM NaCl içeren fosfat tamponu (pH 7.5)</i>	<i>24.75 µl, 24.5 µl, 24 µl ya da 23 µl</i>
<i>Toplam hacim</i>	<i>50 µl</i>

Kontrol olarak kullanılan tripsin enzimi, hücre lizatı yerine 0.5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, ya da 4 µg/µl final konsantrasyonda olacak şekilde ortama katıldı. Reaksiyon ortamına eşit hacimde 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu eklenerek sonlandırıldı ve BSA hidrolizi SDS-PAGE tekniği ile incelendi.

2-ME, DTT, EDTA ve İyonların (Ca^{++} ve Mg^{++}) proteaz enzimi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bu bileşik ve iyonların proteaz enzimi aktivitesine etkisi yukarıda verildiği şekilde 100 mM NaCl içeren 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,5) tamponunda 5 µl hücre lizatı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamına (50 µl), aşağıda verilen final konsantrasyonlarda 2-ME, DTT, EDTA, Ca^{++} ya da Mg^{++} iyonu eklendi.

	Ortama Katılma Miktar (µl)	Final Konsantrasyon (mM)
<i>50 mM DTT</i>	<i>1 µl / 3 µl</i>	<i>1 mM / 3 mM</i>
<i>50 mM EDTA</i>	<i>1 µl / 3 µl</i>	<i>1 mM / 3 mM</i>
<i>50 mM 2-ME</i>	<i>1 µl / 3 µl</i>	<i>1 mM / 3 mM</i>
<i>100 mM $CaCl_2$</i>	<i>2 µl</i>	<i>4 mM</i>
<i>100 mM $MgCl_2$</i>	<i>2 µl</i>	<i>4 mM</i>

Reaksiyon ortamları gece boyu 37 °C’da inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu eklendi ve BSA hidrolizi SDS-PAGE tekniği ile incelendi. Kontrol olarak tripsin enzimi kullanıldı.

5.31.3. Azokazein substrat ile spektrofotometrik olarak proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Kısım 5.29, 5.30 ve 5.30.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan örnekler kullanıldı. Farklı plazmitler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinden hazırlanan proteaz ve serin proteaz enzimlerinin aktiviteleri substrat olarak azokazein kullanılarak belirlendi. Bu testlerde kullanılmak üzere Tris- CaCl_2 ve 100 mM NaCl içeren Tris- CaCl_2 tamponları hazırlandı. Azokazein bu tamponlarda çözündürülerek %1 azokazein çözeltisi elde edildi. 200 μl %1’lik azokazein üzerinde 40 μl hücre lizati eklendi ve ortam 37°C’a ayarlanmış su banyosunda 60 dakika bekletildi. Deneylerde kontrol saf tripsin enzimi kullanıldı. Sürenin bitiminde ortama 160 μl (%15-a/h) TCA eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Örnekler 10 dakika buzlu su içerisinde bekletildikten sonra 12.000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlara eşit hacimde 1M NaOH eklendi. Elde edilen üst sıvıların 440 nm dalga boyunda absorban değerleri (OD_{440}) spektrofotometre ile ölçüldü.

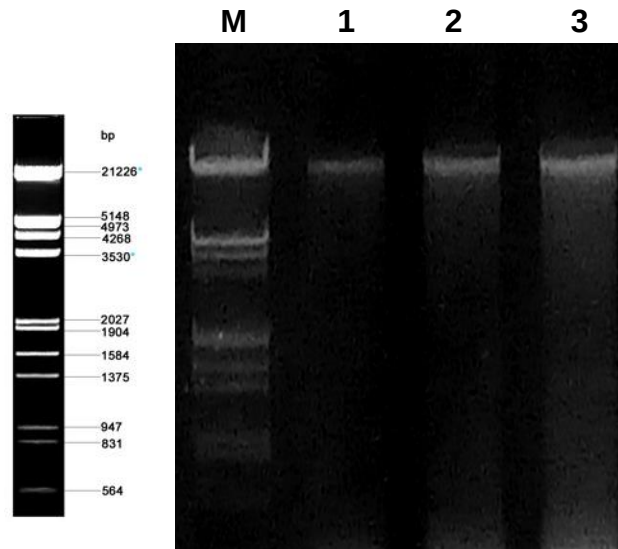
6. BULGULAR

6.1. *Haloarcula hispanica* Serin Proteaz ve Proteaz Genlerinin Plazmit Vektörlere Klonlanması ile İlgili Veriler

Aşırı halofilik bir arkebakteri olan *H. hispanica*, üreme hızı yavaş ve özel koşullar gerektiren bir mikroorganizmadır. Bundan ötürü tez çalışmasında *H. hispanica*'ya ait serin proteaz ve proteaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak üretilmesi hedeflendi. *H. hispanica*'ya ait proteaz ve serin proteaz enzimini kodlayan genler, bu arkebakteriden izole edilen genomik DNA üzerinden PZR ile çoğaltıldı ve *E.coli*'de ekspresyon yapan plazmit vektörlerine klonlandı. Oluşturulan ekspresyon vektörleri farklı *E.coli* ırklarına aktarıldı. Bu hücrelerin *H. hispanica*'ya ait proteaz ve serin proteaz ekspresyon düzeyleri ve sentez edilen proteaz ve serin proteaz enziminin aktivitesi değerlendirildi.

6.1.1. *Haloarcula hispanica* hücrelerinden genom DNA izolasyonu ile ilgili veriler

Küçük ölçekte hazırlanan *H. hispanica* kültüründen metot kısmında (5.15A) verildiği şekilde izole edilen genom DNA'ları agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 6.1). Elektroforez sonuçları, elde edilen genom DNA'larının PZR ile proteaz ve serin proteaz genlerinin çoğaltılması için uygun olduğu gösterdi.



Şekil 6.1. Halofilik bakteri olan *H. hispanica*'dan izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. 1-3. Agaroz jele farklı miktarlarda (2 µl - 4 µl - 8

µl) uygulanan DNA örneklerini göstermektedir. *M. HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen Lambda bakteriyofaj DNA'sı (λ DNA/*HindIII*+*EcoRI*). Genomik DNA kontrolünde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında TAE tamponunda 25 dakikada tamamlandı.

6.1.2. *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz genlerinin PZR ile çoğaltılması ile ilgili veriler

H. hispanica'ya ait proteaz ve serin proteaz genleri, bu genler için oluşturulan oligonükleotid primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Primerler, aşağıda verilen bakterinin referans dizilerinden yararlanılarak oluşturuldu.

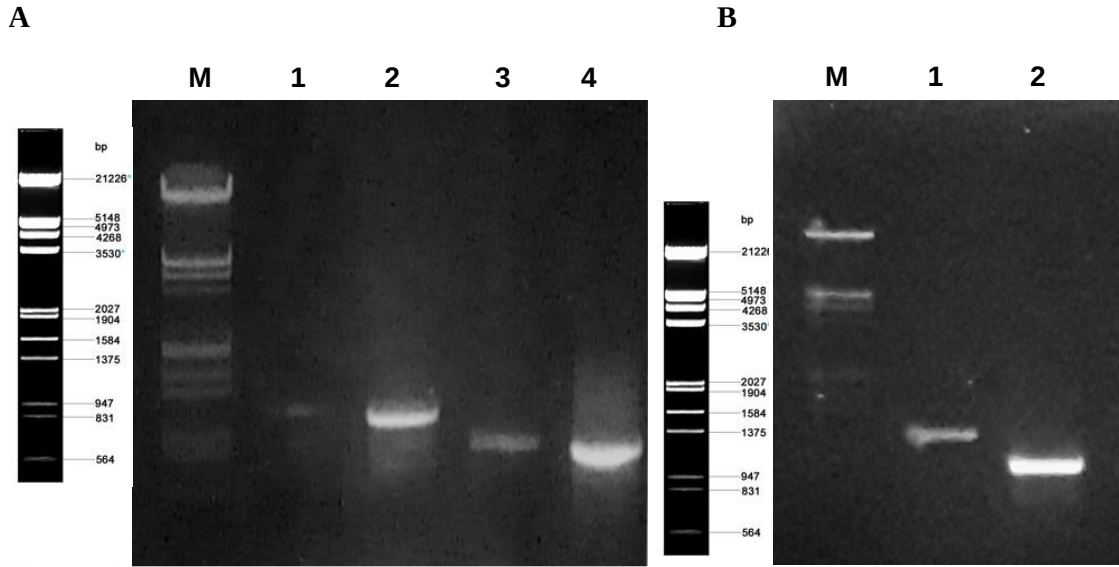
Haloarcula hispanica N601 / serin proteaz (Ref Seq: AHB65457.1)

ATCTTAACAGCCCTCTGTGATTTTTATGATACGGGGTTTCACACCGGCGACAGCCGC
TCTACCGGTCAGTGGTTCTGTTCCGAGGGAGTATCACAGCATCGCTCCGTGTGGCCC
AGCGACGCTCCTACTCCCAGCGCTTTTGCTGCGCGCCGCCGGGCATCGATATGGAC
TACACCGCCGTCACGCACACGACGACTGACCGACGGCTCGGGAGACTCCCGTCAGGA
CGAGCCGTGTCCGTGACTGTCCACCGGTACGTCGGCAGCCCCGGGCCGACAGTGTAT
ATTCAGGCGGCGCAACACGGCATCGAACTCAACGGCCCAGCCGCGTTACGGCGACTG
CACGACCGCCTGACCGACGCGGCTATCGCCGGGACAGTACTTGTTCATCCAGTCGTG
AACCAGCTCGCGTTCGATCACCGGTCGTACATGACCCCCGGCGAGTACGACGTGATG
AACCCGAACCTGAACCGCGTGTGGCCGGGAGACGAGTCCGGAAGCCTACAGGAACAG
TTTGCCGCTCGGCTGTGGGAACTCGTGAAAGACGCGGACGCCGCGGTTCGATCTCCAC
ACCGGCACGGCAGATATGCTGGAACACGTCAGATGCCGGGCGGGCGACCCGGCCGCC
GAGCGCCTCGCCGAAGCGTTCGGTACTTCCTACAGAATCACCGACGAGTCCGAGGAC
ACCGGCGACGACGGCTCTGGCGGGACGTTCCGCGCTGCGGCTGCGGCAGCCGGCATT
CCGGTTATCACGGCGGAGCTATCGAACAGTCGCCGATAGCACAGGACGCGGTTGCG
GCTGGTGTGACGGGATACAGAATCTCCTGCGCGAGCGGGCAGTCCTCCCGGCAGAG
CCGGAGCCCCACGCCGGGACGAGCGGTGCTTCGAAACGACGCGGAGCCGGTCACCGCG
TCGGAATCGGGATTGTTTGAATGTGCGCCGGACATCGCCGTCGGTGACACTGTGAC
GCCGGGGAGCGACTGGGGGCTGTCTACGAACCCTCCTCGTTTCGAGCAACAACAGGTC
GTCTCAGCGACAGAACGAGGAGTGATATTCTCGCTTGCCAGGGAGTCTGTCGTCTG
AAAGGGGAACGCCTCGCAGG**CATCGCGACACCGCGATAA**

Haloarcula hispanica N601 /proteaz (Ref Seq: AHB66303.1)

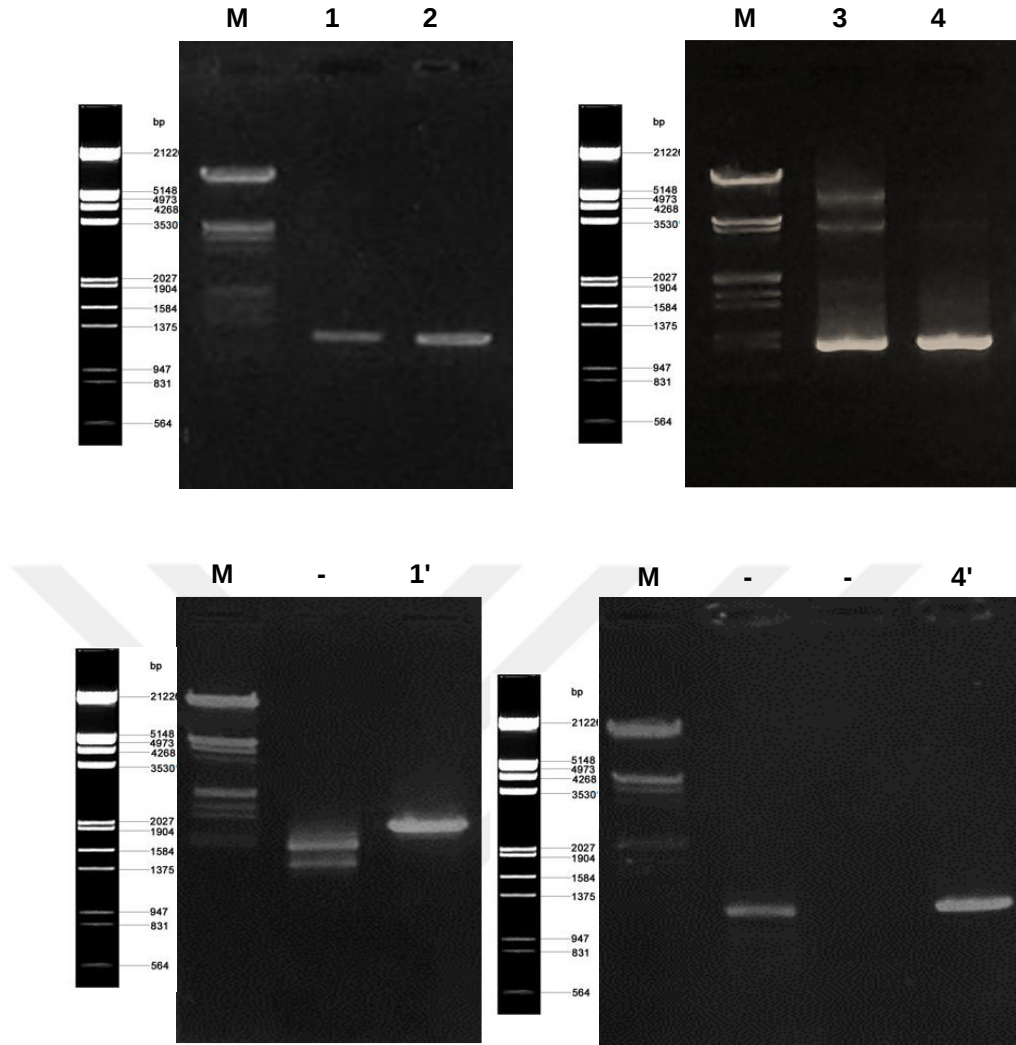
ATGTTGTGCCCTGATATTGGCCTGCCGAGATTCAGCAGCGGGCCGTTGGTTCCCGTT
GTAGCGTACCTCCTGGTAATTGTCGTCCTCTCCGGACTGGTGATCATCTCCCCCGG
GCATCGCCGCCGCCCGTCTTGGGAATGCTCTGGGGTGTCTTCCTCGTCGCACTCACC
GTTGGTGCGCTCAGAATTGAGACCGTCTCACCGCGCTCTCTGCTCCCGCCTGTTTCG
ACACTGATACCCGTGATCGGGGTGGTCATCGCGTTCTGGGGACTGTACAACCTTGT
GCGGTGCGCCCTCGCGGTGGGTGGGATCTCCGGGTTTCGACGCCTCGCTGTCGAGAACC
GCTGCCCACCCGCTGCTGTATCTCGCGGCGCTTTTTCAGTTCGCTTCTGTTCACTGCG
ATCCCGGAAGAACTCCTCTTTTCGCACGTACCTGCAGGAGAAATTCACGAGGCTGGCC
GGCGGGGCGACTCGGCGTGCGGTGCTGGCTGGTATCGGCCTTGTCGCAGTCCTATTT
GCTCTGTTTCATCTCCCGCGGTGGTTTCTCGCATCGGGGCACGGCGTCGGTTCCGCG
CTGGCAGCCAGACTCCTCGGACTGACGCTCATGGGACTCGCTTACGGGAGCGTATAC
GCACTGACGGGCAACCTCTGGCTCGTCGCCCTGTTCCATGCATCGATGAATCAGCCG
CCGGTAATCGTATCGGTGCATATCCCGACCGAGCTACATCTGGTAGCGAGTGTGATC
GAGTATGCCGCCATCGTCTCGCTTGTCTACCTGACTGTTTCGGGTGGTCAATCCGGC
GGGACACCGCTGATCTGGTCACGGCGGAACAACCCT**GCCTCGACCGGGGACTGA**

Serin proteaz ve proteaz kodlayan DNA fragmentlerinin PZR ile çoğaltılmasında gene özgü primerler kullanılarak 5.12’de belirtilen koşullar uygulandı. İlk aşamada standart Taq DNA polimeraz enzimi ile her iki genin PZR ile çoğaltılması için ön denemeler gerçekleştirildi. PZR sonucu elde edilen DNA fragmentleri %1’lik agaroz jel elektorforezi ile incelendi. Şekil 6 2A’da görüldüğü gibi *H. hispanica* proteaz geni için 852 b.ç. ; serin proteaz geni için ise 1122 b.ç. boyutlarında DNA fragmentleri elde edildi. Taq DNA polimeraz ile yapılan denemede 3 mM Mg⁺⁺ konsantrasyonunun uygun olduğu saptandı. Bununla birlikte, standart Taq DNA polimeraz enziminin hata yapma frekansının yüksek olması ve küt uçlu PCR ürünleri elde etmek için uygun olmaması nedeniyle, fosforillenmiş primer çiftleri (Serin proteaz için: *H-ser.prot.-For/H-ser.prot.-Rev*; Proteaz için: *H-prot.-For/H-prot.-Rev*) ve KOD-plus enzimi ile kodlayıcı DNA fragmentleri çoğaltıldı (Şekil 6.2B) ve ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında bu DNA fragmentleri kullanıldı.



Şekil 6.2. *H. hispanica* genom DNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan serin proteaz ve proteaz enzimlerini kodlayan DNA fragmentlerinin elektroforetik analiz. **A.** Standart Taq DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılan DNA fragmentleri. **1-2-serin prteaz geni; 3-4 proteaz geni** (1 ve 3 no'lu örnekler: 2 mM MgCl₂ ; 2 ve 4 örnekler 3 mM MgCl₂). **B.** Termostabil KOD-plus enzimi ile çoğaltılan serin proteaz (**1**) ve proteaz (**2**) kodlayan DNA fragmentleri. **M.** λ DNA/(*Hind*III+*Eco*RI). Elektroforez işlemi Şekil 6.1'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

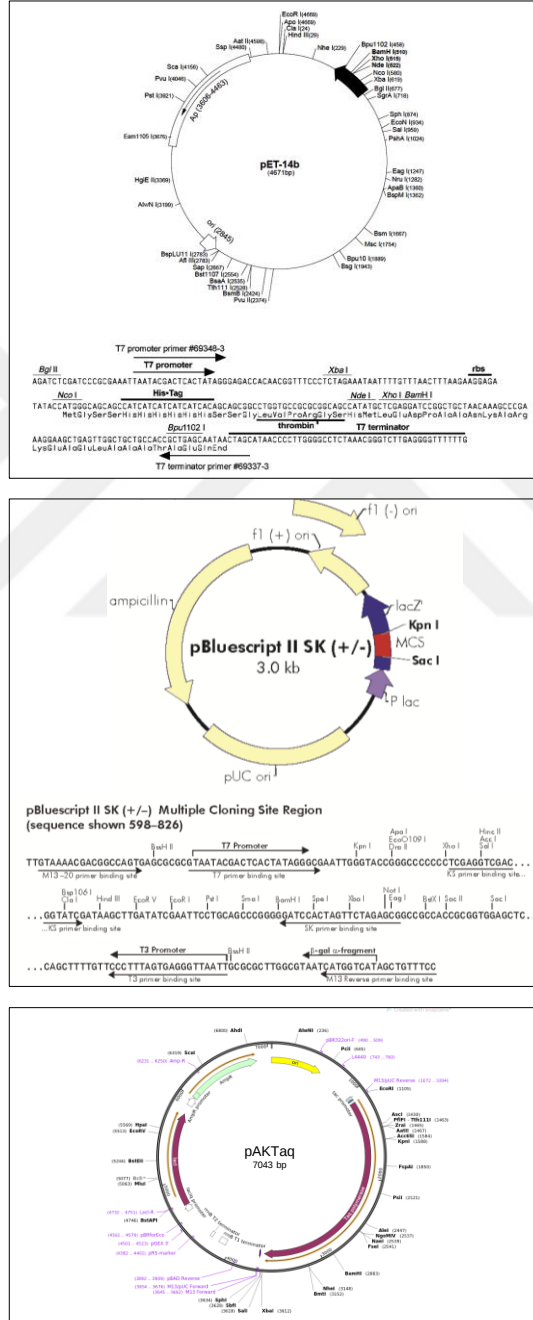
Çalışmada *H. hispanica* genleri farklı plazmitlerde, farklı promotörlerin kontrolünde, flag uzantılı enzim kodlayacak şekilde de klonlandığı için, flag kodlayıcı dizi taşıyan ve/veya ATG başlangıç kodu taşımayan DNA fragmentleri fosforillenmiş farklı primer çiftleri ve KOD-plus enzimi kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. *Nco*I ile kesilerek Klenow enzimi ile küt üçlü hale dönüştürülen pET-14b plazmitinde bağlantı noktasında ATG dizisi olduğundan, bu plazmite klonlanan proteaz genleri ATG başlangıç kodu taşımayan ileri primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. KOD-plus enzimi ve proteaz genlerine özgü fosforillenmiş farklı primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi. **1.** Flag kodlayıcı dizi taşıyan serin proteaz geni (kullanılan primerler: *H-ser.prot.-For/H-ser.prot.flag-Rev*); **2.** ATG başlangıç kodu bulunmayan serin proteaz geni (kullanılan primerler: *H-ser.prot.minus-For/H-ser.prot.-Rev*); **3.** ATG başlangıç kodu bulunmayan proteaz geni (kullanılan primerler: *H-prot.minus-For/H-prot.-Rev*); **4.** Flag kodlayıcı dizi taşıyan proteaz geni (kullanılan primerler: *H-prot.-For/H-prot.flag-Rev*); **1'.** ATG başlangıç kodu bulunmayan Flag kodlayıcı dizi taşıyan serin proteaz geni (kullanılan primerler: *H-ser.prot.minus-For/H-ser.prot.flag-Rev*); **4'.** ATG başlangıç kodu bulunmayan Flag kodlayıcı dizi taşıyan proteaz geni (kullanılan primerler: *H-prot.minus-For/H-prot.flag-Rev*). **M.** λ /(*HindIII+EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

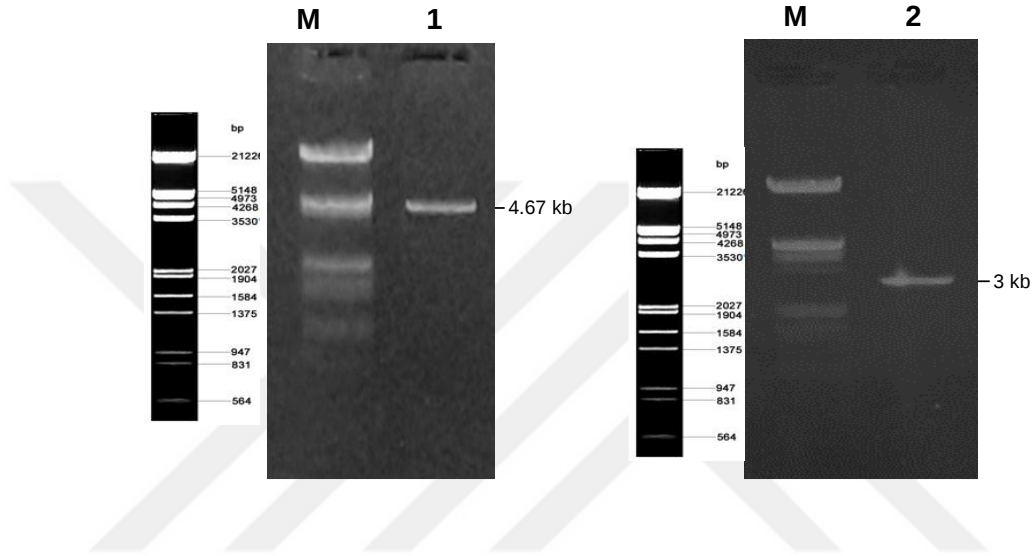
6.1.3. Proteaz genlerinin klonlanmasında kullanılan *E. coli* ekspresyon vektörlerinin ligasyon için hazırlanması ile ilgili veriler

Bu tez çalışması kapsamında *E. coli* hücrelerinde rekombinant proteaz enzimleri üretmek için Şekil 6.4’de restriksiyon haritaları verilen pET-14b, pBluescript II SK(+) ve pAK-Taq plazmit vektörlerinden yararlanıldı.



Şekil 6.4. *H. hispanica* proteaz enzimlerini kodlayacak *E. coli* ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında yararlanılan plazmitler.

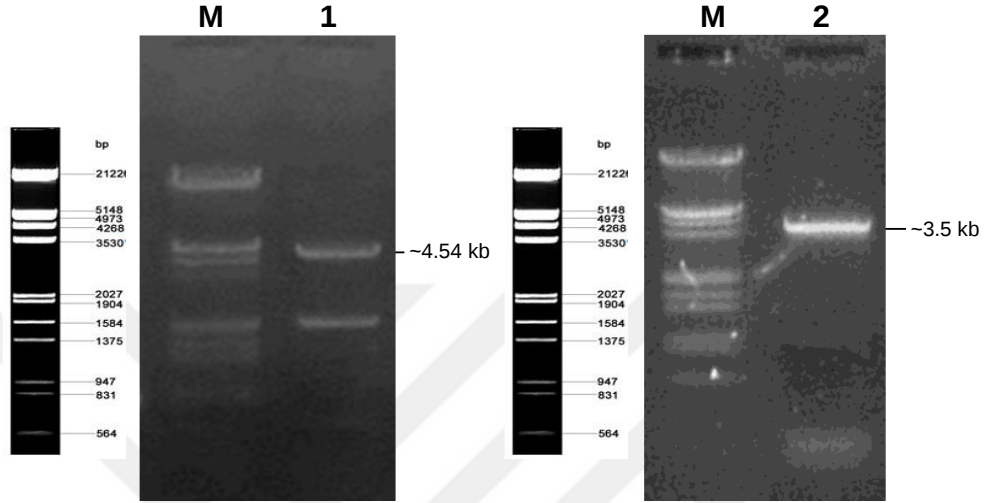
Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi için promotör taşıyan pET-14b plazmiti *NcoI* restriksiyon enzimi ile; hem laktoz promotörü (P_{lac}) hem de T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pBluescript II SK(+) plazmiti *EcoRV* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Kesilen DNA örnekleri agaroz jel elektrofori ile kontrol edildi (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b (1) ve pBluescript II SK(+) (2) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforez profilleri. pET-14b plazmit DNA'sı *NcoI* restriksiyon enzimi, pBluescript II SK(+) plazmit DNA'sı ise *EcoRV* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek doğrusal hale getirildi. **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

pAK-Taq plazmit vektörüne *H. hispanica* proteaz genlerinin klonlanmasında iki farklı yol izlendi. Proteaz genleri plazmitte yer alan *Taq* ya da *LacI* genleri ile değiştirildi. *Tac* promotör dizisi kontrolünde olan *Taq* geni *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkartıldı. Kesim sonucu elde edilen büyük DNA fragmenti agaroz jel üzerinden saflaştırılarak proteaz genleri ile ligasyona uğratıldı (Şekil 6.6). Diğer taraftan *EcoRI* ve *XbaI* ile enzimleri ile kesildikten sonra, Klenow enzimi ile küt uçu hale getirilen plazmitin büyük DNA fragmenti T4 DNA ligaz enzimi ile halkasal hale dönüştürülerek pAK olarak adlandırılan bir ara vektör elde edildi (Bu vektör ile ilgili

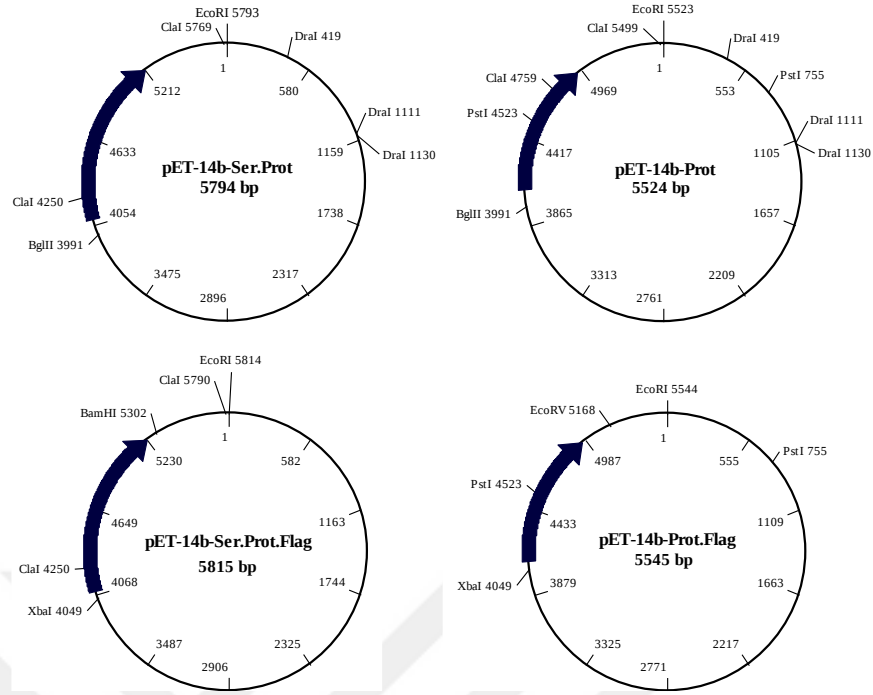
sonuç verilmemiştir). Bu ara vektör üzerindeki *LacI* geni *pAK-LacI-For* ve *pAK-LacI-Rev* primerinden (Tablo 5.1) yararlanılarak ters PZR ile plazmitin kalan bölgesi çoğaltılarak uzaklaştırıldı (Şekil 6.6). Plazmitin PZR ile çoğaltılan *LacI* geni dışındaki kısmı agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı.



Şekil 6.6. *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen *pAK-Taq* plazmit DNA'sı (1) ve ters PZR ile *LacI* geni dışında kalan kısmı çoğaltılan *pAK* plazmit DNA'sının (2) agaroz jel elektroforezi profilleri. **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

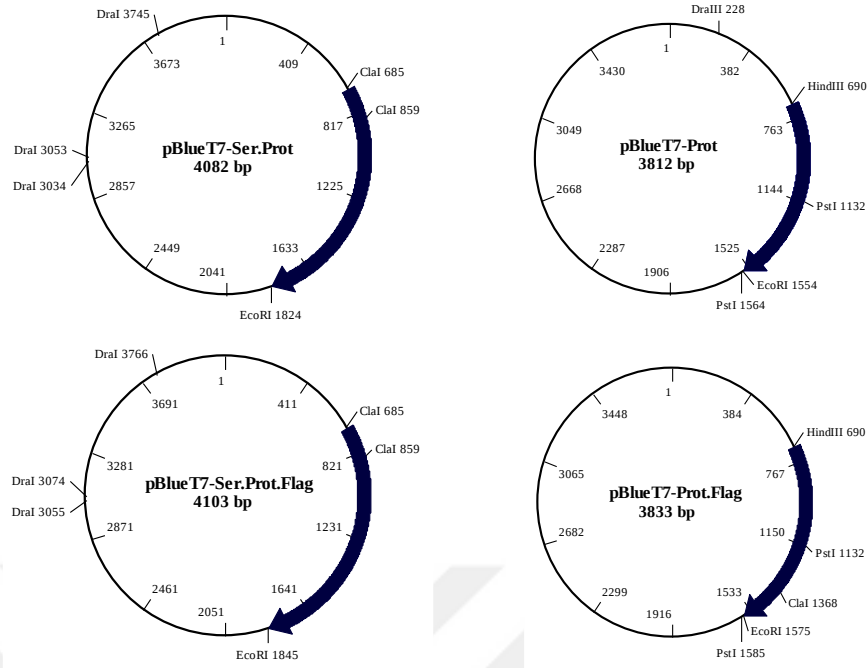
6.1.4. T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde *H. hispanica* proteaz genleri taşıyan ekspresyon vektörleri ile ilgili veriler

Yukarıda verildiği şekilde PZR ile elde edilen *H. hispanica* proteaz genlerinin *NcoI* ile kesilerek doğrusal hale getirilen *pET-14b* plazmit vektörleri ile ligasyona uğratıldı ve bunun sonucunda Şekil 6.7'de restriksiyon haritaları verilen dört farklı yeni vektör elde edildi. Bu plazmit vektörlerin oluşturulmasında, ATG başlangıç kodu taşımayan flag uzantılı ya da flag uzantısız proteaz genleri kullanıldı. Oluşturulan plazmit vektörler *pET-14b-Ser.Prot*, *pET-14b-Prot*, *pET-14b-Ser.Prot.Flag* ve *pET-14b-Prot.Flag* olarak adlandırıldı.



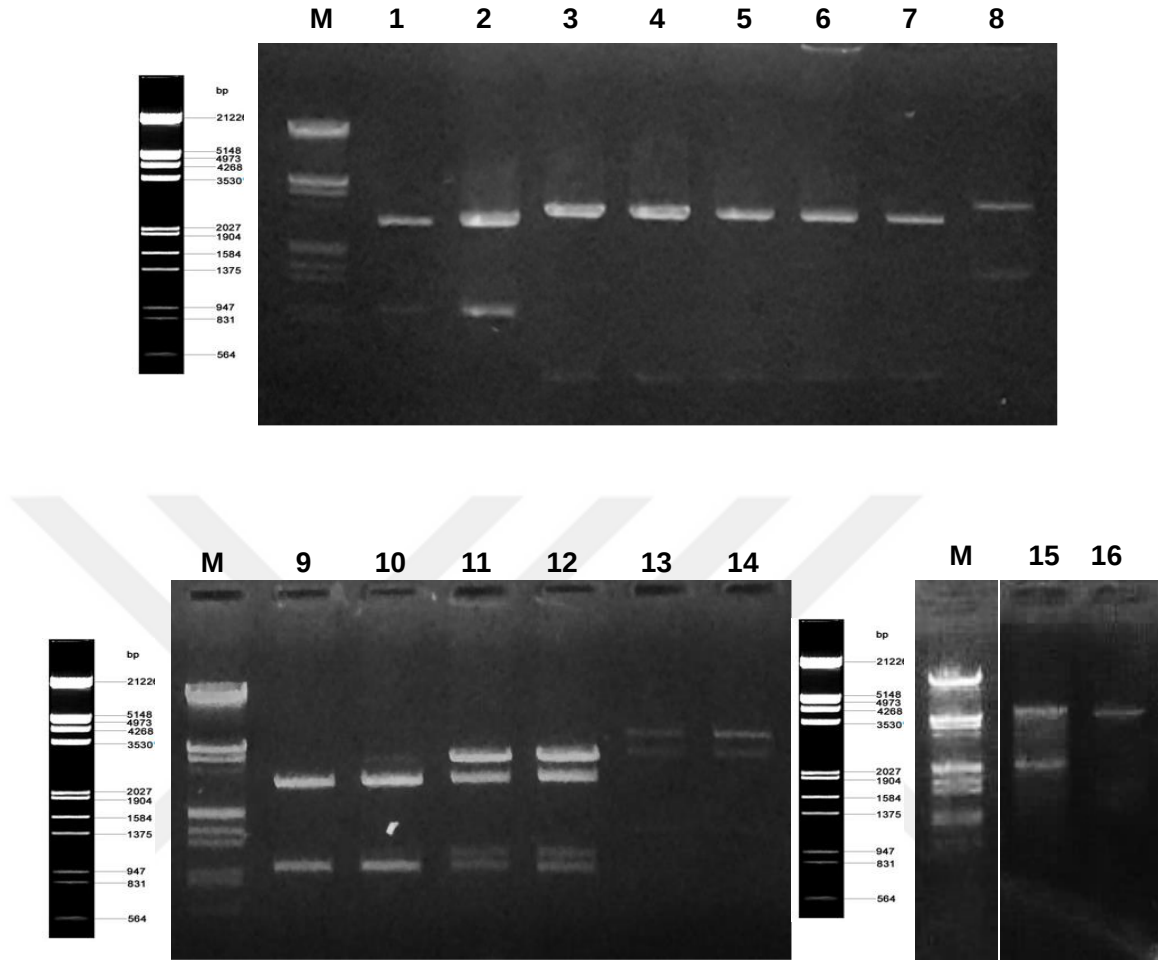
Şekil 6.7. *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz genlerinin pET-14b plazmitinde T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri. Plazmit vektörlerin restriksiyon haritalarının oluşturulmasında BioEdit programından yararlanıldı.

pET-14b plazmitinde olduğu gibi, *H. hispanica*'ya ait PZR ile çoğaltılan proteaz genleri *EcoRV* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pBluescript II SK(+) plazmit DNA'sı ile ligasyona uğratıldı ve dört farklı ekspresyon vektörü oluşturuldu. Bu vektörlerin oluşturulmasında ATG başlangıç kodu taşıyan flag uzantılı ya da flag uzantısız proteaz genleri kullanıldı. Oluşturulan plazmit vektörler pBlueT7-Ser.Prot, pBlueT7-Prot, pBlueT7-Ser.Prot.Flag ve pBlueT7-Prot.Flag olarak adlandırıldı (Şekil 6.8).



Şekil 6.8. *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitinde *T7* RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri. Plazmit vektörlerin restriksiyon haritalarının oluşturulmasında BioEdit programından yararlanıldı.

H. hispanica proteaz genlerinin pET-14b ve pBluescript II SK(+) plazmitlerinde *T7* RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesildi ve sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi (Şekil 6.9).

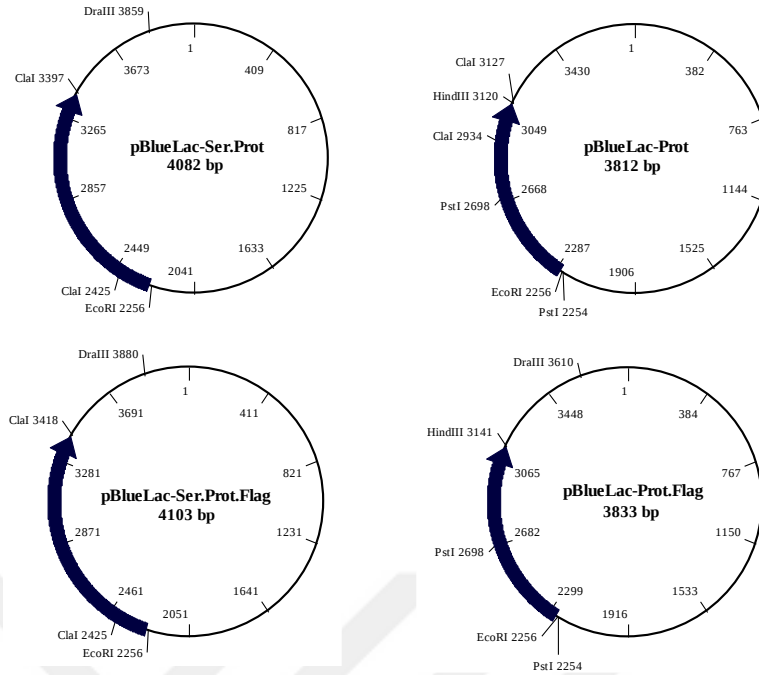


Şekil 6.9. *H. hispanica* proteaz genlerinin pET-14b ve pBluescript II SK(+) plazmitlerine klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi. pET-14b-Ser.Prot: 13-14 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pET-14b-Prot:8 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pET-14b-Ser.Prot.flag: 15 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pET-14b-Prot.Flag:16 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueT7-Ser.Prot: 1-2,12 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueT7-Prot:3-4 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueT7-Ser.Prot.Flag:9-11 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueT7-Prot.Flag: 5-7 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi). **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon enzimleri ile kesilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin, agaroz jeller üzerinde beklenen boyutlarda DNA fragmentleri oluşturduğu görüldü.

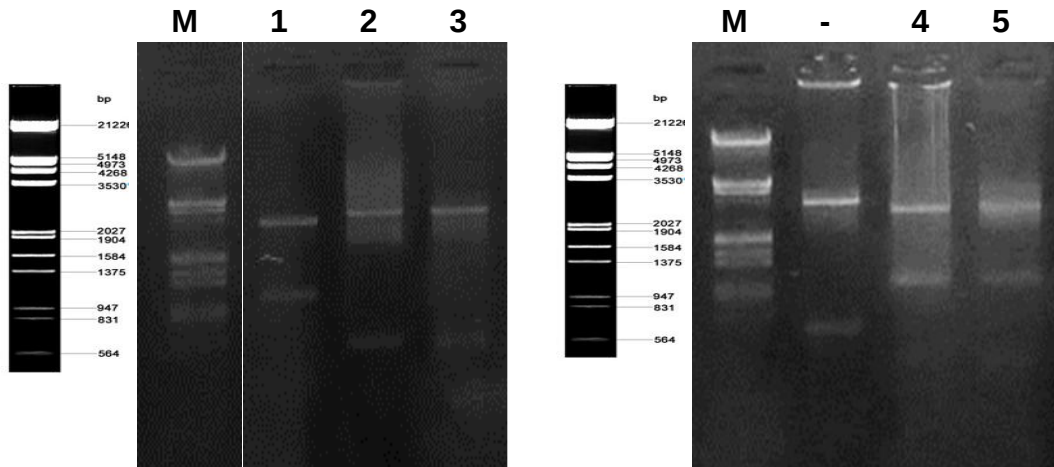
6.1.5. Proteaz ve serin proteaz genlerinin *lac* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ile ilgili veriler

Rekombinant protein ekspresyonu için bakteri suşunun seçiminde özellikle kullanılan ekspresyon vektörünün taşıdığı promotör gibi kontrol elementleri büyük önem taşımaktadır. T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan vektörler ekspresyon için T7 bakteriyofaj RNA polimeraz enzimine bağımlıdır ve *E. coli* BL21 gibi T7 RNA polimerazı enzimi sentez eden hücrelerde işlev görebilirler. Buna karşın *lac* promotörü uygun koşulların sağlanması durumunda tüm *E.coli* suşlarında işlevseldir. Bu nedenle çalışma kapsamında T7 promotörüne ters oryantasyonda *lac* promotörü de taşıyan pBluescript II SK(+) plazmit vektöründen yararlanıldı. Bunun için ilave bir işlem uygulanmadı, yukarıda 6.1.4'te belirtildiği şekilde *EcoRV* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen pBluescript II SK(+) plazmiti ile proteaz genlerinin ligasyonu sonucu oluşan vektörler arasından, T7 RNA polimeraz promotörüne ters oryantasyonda fragment alan plazmitler koloni-PZR tekniği ile seçildi. Şekil 6.10'da haritaları verilen, pBlueLac-Ser.Prot, pBlueLac-Prot, pBlueLac-Ser.Prot.Flag ve pBlueLac-Prot.Flag olarak isimlendirilen ekspresyon vektörleri elde edildi.



Şekil 6.10. Proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitlerine *lac* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları.

Proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitinde *lac* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler de restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek kontrol edildi (Şekil 6.11). Agaroz jellerde plazmit vektörler için beklenen büyüklüklerde DNA fragmentleri saptandı.



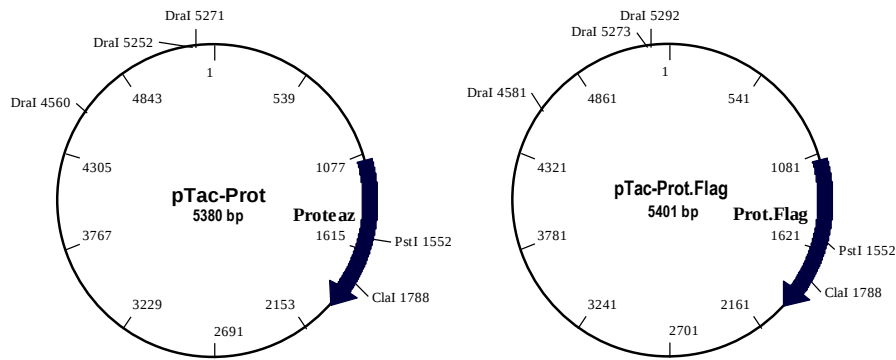
Şekil 6.11. *H. hispanica* proteaz genlerinin pBluescript II SK(+) plazmitinde P_{lac} promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin

restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi. pBlueLac-Ser.Prot: 1 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueLac-Prot: 2 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueLac-Ser.Prot.flag: 4-5 (*ClaI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pBlueLac-Prot.flag: 3 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi). **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.1.6. Proteaz ve serin proteaz genlerinin *lacI* ve *tac* promotörleri kontrolünde klonlanması ile ilgili veriler

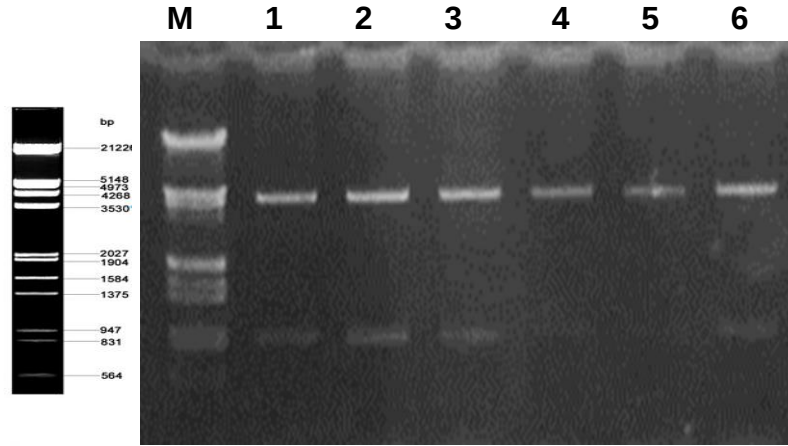
Yukarıda restriksiyon haritası verilen pAKTaq plazmit vektörü (bk. Şekil 6.4), *tac* promotörü kontrolündeki Taq DNA polimeraz genini *E. coli* hücrelerinde etkin bir şekilde ekspres etmektedir (Eken, 2017). Bu nedenle plazmit üzerindeki *tac* promotörü kontrolündeki taq geni *H. hispanica* proteaz genleri ile değiştirildi. Bu vektörlerin oluşturulmasında proteaz ve proteaz.flag genleri, pBlueLac-Prot ve pBlueLac-Prot.Flag plazmit vektörlerinden *EcoRI/HindIII* restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek türetildi. Yapışkan uç taşıyan bu DNA fragmentleri, *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek taq geni uzaklaştırılan plazmit ile (bk. Şekil 6.6) ile ligasyona uğratıldı ve Şekil 6.12A’de restriksiyon haritaları verilen pTac-Prot ve pTac-Prot.Flag vektörleri elde edildi. Elde edilen vektörlerin doğruluğu restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile gösterildi (Şekil 6.12B).

A



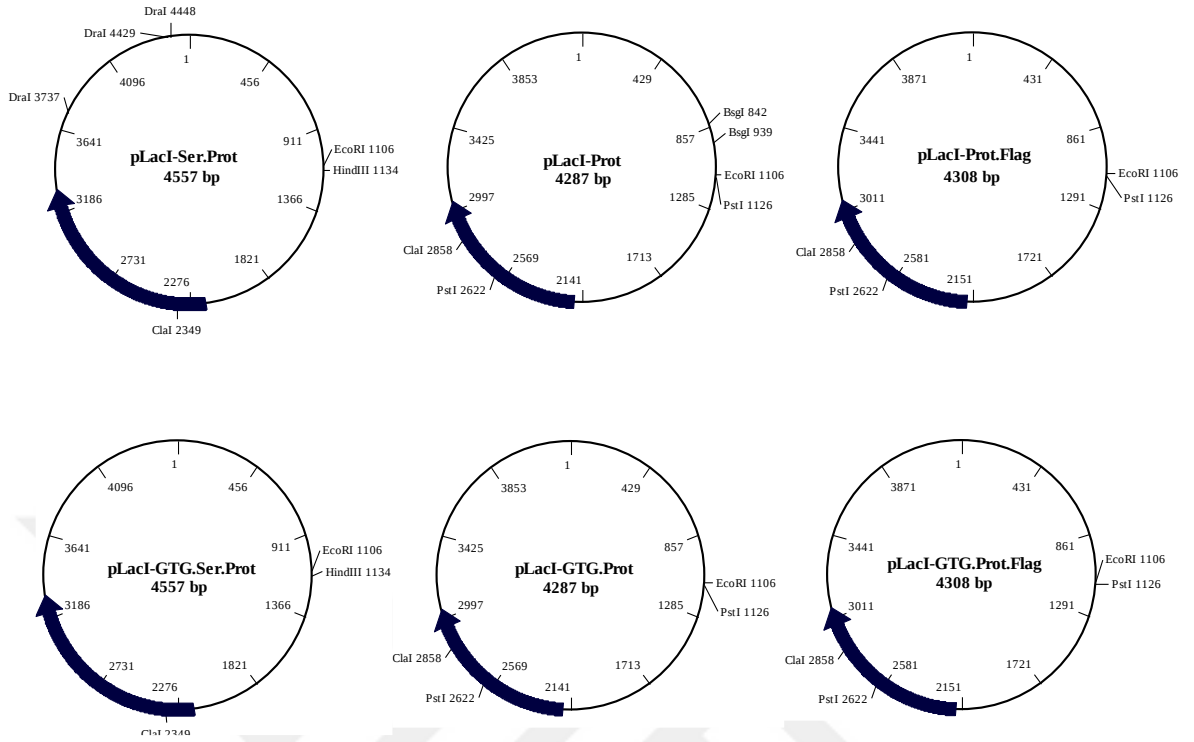
Şekil 6.12. (A); *H. hispanica* proteaz genlerinin *tac* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları.

B



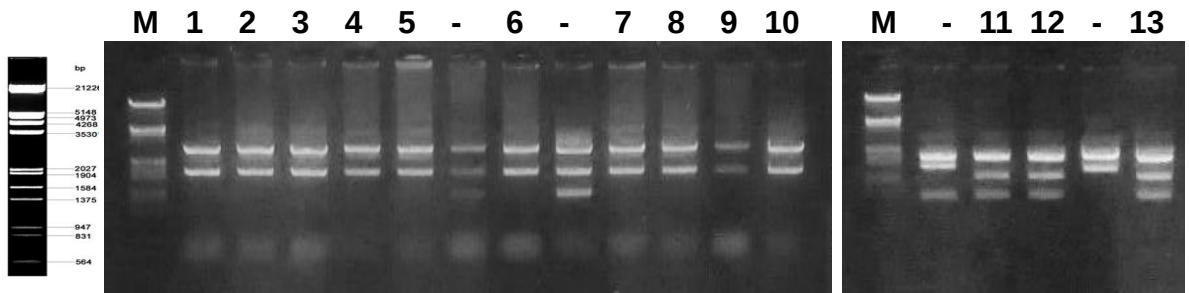
Şekil 6.12. (B); *HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen plazmitlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. **1-3.** pTac-Prot, **4-6.** pTac-Prot.Flag. **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

pAKTaq plazmitinde yer alan güçlü promotörlerden biri de *lacI* genini kontrol eden *lacI* promotörüdür. *LacI* geni başlangıç kodu olarak GTG dizisi taşımaktadır. Bu nedenle *H. hispanica* proteaz genleri ATG ya da GTG başlangıç kodu taşıyacak şekilde *lacI* promotörü kontrolünde klonlandı. Bunun sonucunda Şekil 6.13’de haritaları verilen altı farklı ekspresyon vektörü elde edildi. ATG başlangıç kodu taşıyan proteaz genleri klonlanan plazmit vektörler, pLacI-Ser.Prot, pLacI-Prot.Flag ve pLacI-Prot; GTG başlangıç kodu taşıyan proteaz genleri klonlanan plazmit vektörler ise pLacI-GTG.Ser.Prot, pLacI-GTG.Prot.Flag ve pLacI- GTG.Prot olarak isimlendirildi.



Şekil 6.13. *H. hispanica* proteaz genlerinin *lacI* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları.

Elde edilen plazmit vektörlerinin doğruluğu restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek belirlendi (Şekil 6.14). Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş plazmitlerin ortaya koyduğu elektroforez profillerinin plazmitlerin restriksiyon haritaları ile uyumlu olduğu saptandı.



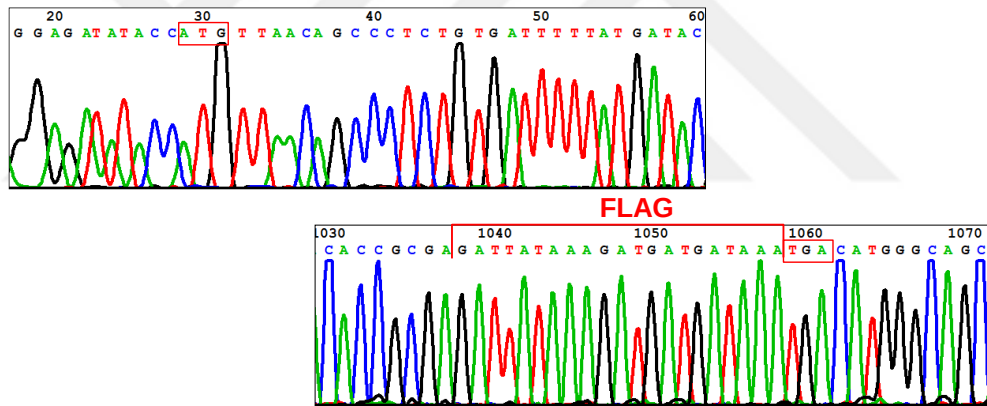
Şekil 6.14. *H. hispanica* proteaz genlerinin pAK plazmitinde *LacI* promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi. pLacI-Ser.Prot:13 (BglI enzimi ile kesildi);

pLacI-Prot.Flag:7-10 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pLacI-Prot:4-6 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pLacI-GTG.Ser.Prot:11-12 (*BglI* enzimi ile kesildi); pLacI-GTG.Prot.Flag:4-6 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi); pLacI-GTG.Prot:1-2 (*PstI* / *EcoRI* enzimleri ile kesildi). **M.** λ DNA/(*HindIII*+*EcoRI*). Elektroforez işlemi Şekil 6.1’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

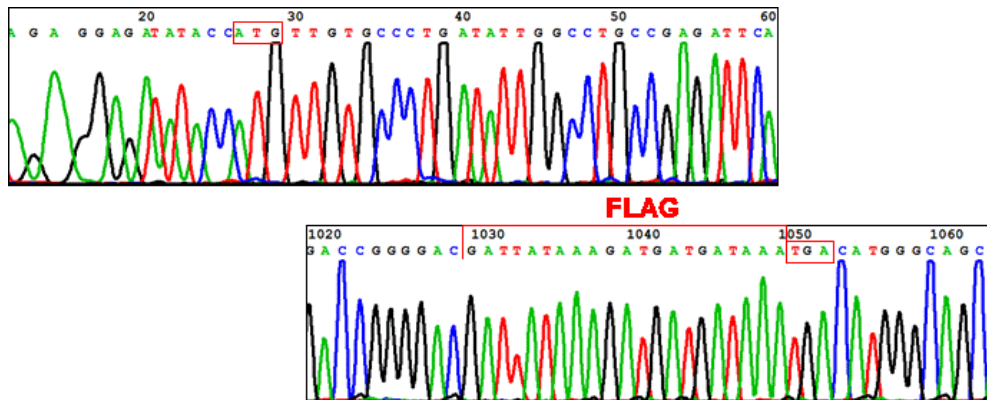
6.1.7. *E. coli* ekspresyon vektörlerine klonlanan *H. hispanica* proteaz genlerinin DNA dizi analizi sonuçları

Bu çalışma kapsamında oluşturulan ekspresyon vektörlerindeki *H. hispanica*’ya ait proteaz genlerinin ve gen-plazmit bağlantı noktalarının nukleotid dizileri Sanger tekniğine dayalı DNA dizi analizleri ile saptandı. Şekil 6.15’de pET-14b plazmitine klonlanan proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları verildi.

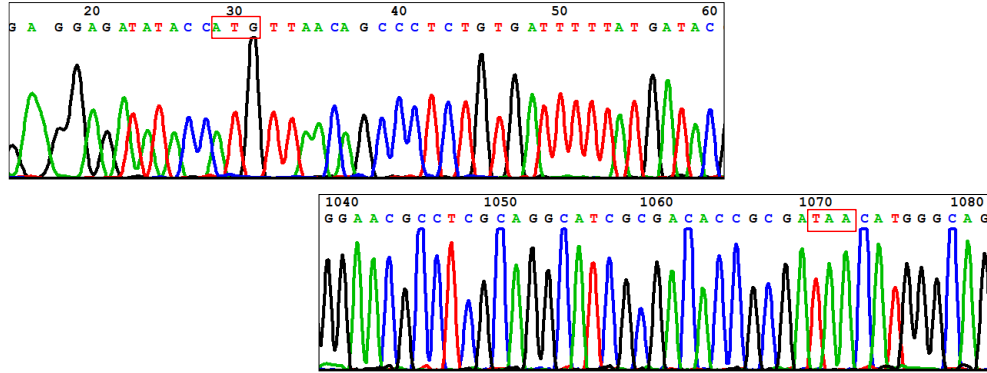
pET-14b.Ser.Prot.Flag



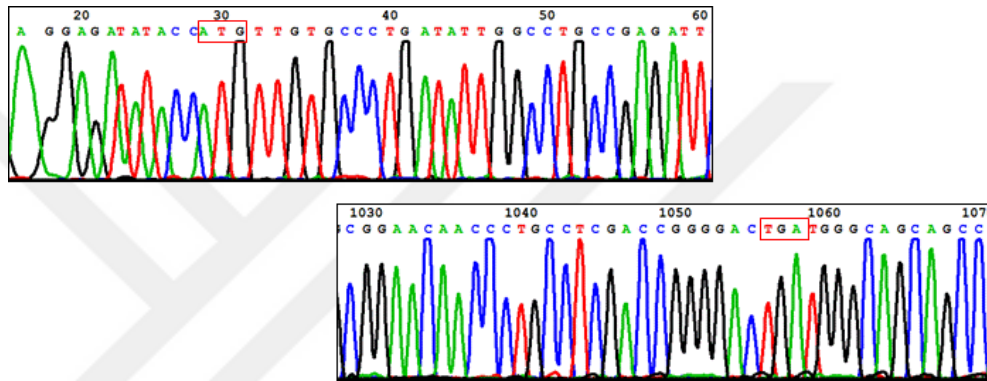
pET-14b.Prot.Flag



pET-14b.Ser.Prot



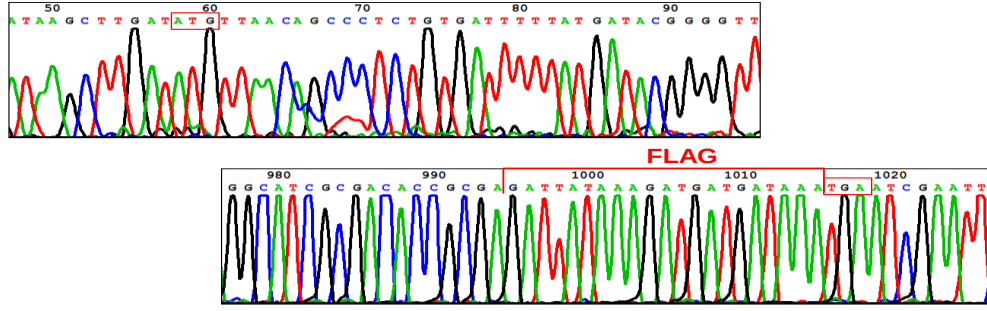
pET-14b.Prot



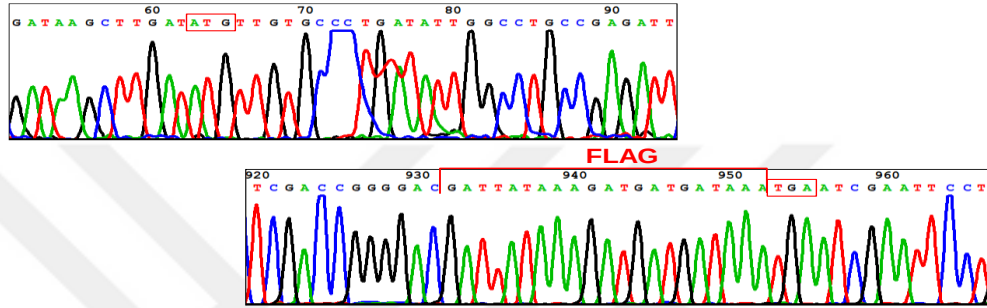
Şekil 6.15. pET14b plazmitine klonlanan *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar proteaz genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

pBluescript II SK(+) plazmitinde iki farklı oryantasyonda klonlama sonucu elde edilen T7 RNA polimeraz promotörü kontrolündeki proteaz genlerinin DNA dizisi kromatogramları Şekil 6.16A'da *lac* promotörü kontrolünde klonlanan proteaz genlerinin kromatogramları ise Şekil 6.16B'de verildi.

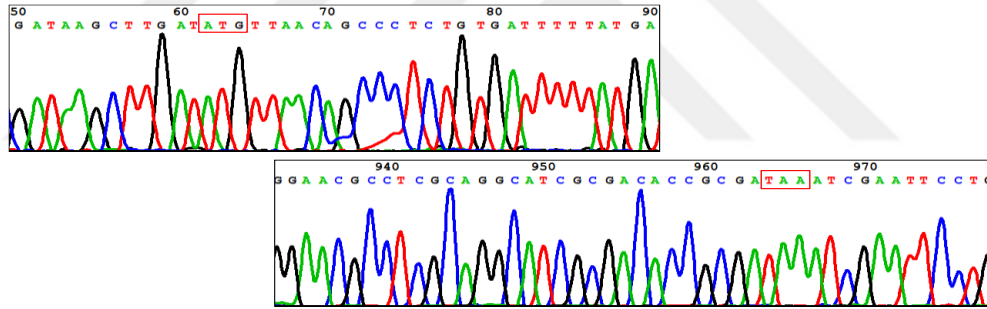
pBlueT7.Ser.Prot.Flag



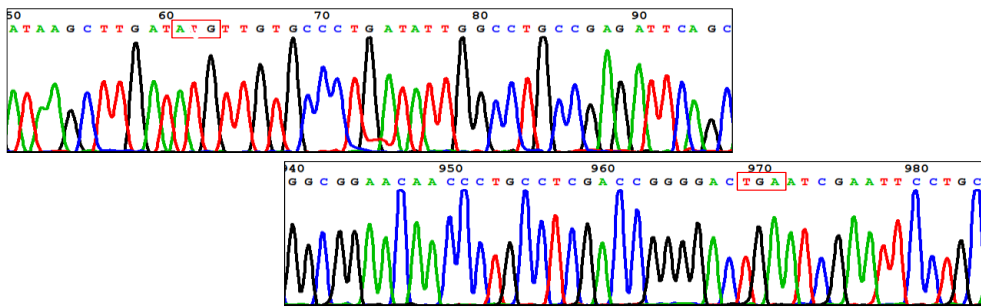
pBlueT7-Prot.flag



pBlueT7-Ser.Prot

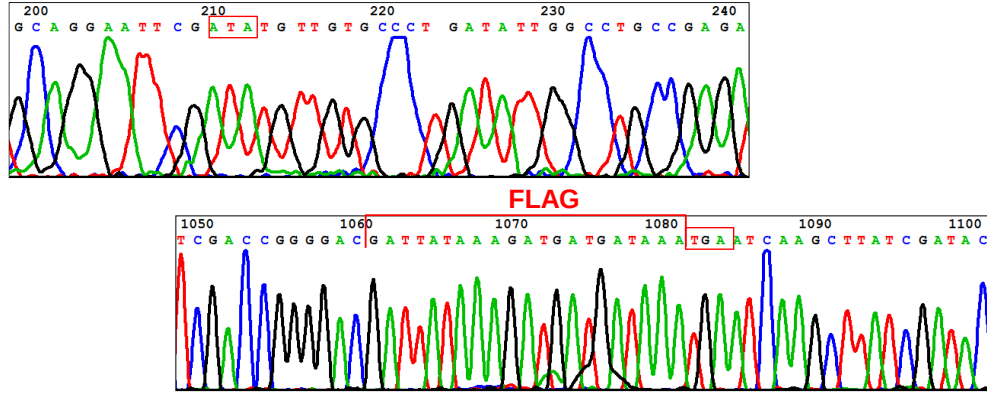


pBlueT7-Prot

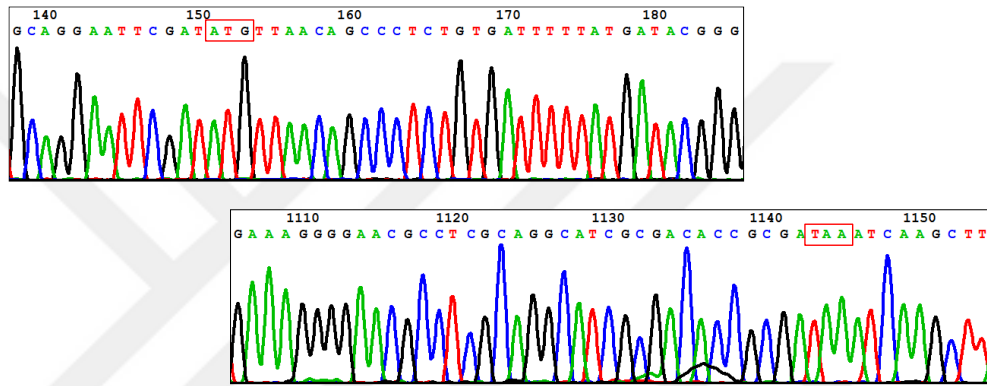


Şekil 6.16A. pBluescript II SK(+) plazmitine *T7* bakteiyofaj RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica* 'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar proteaz genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

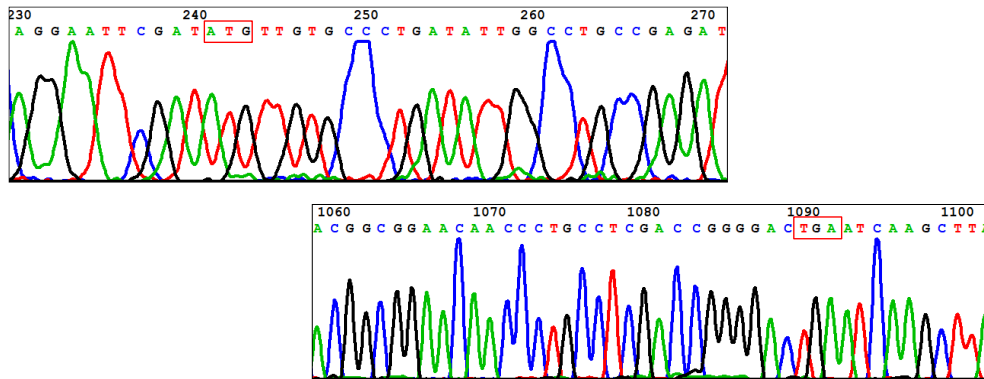
pBlueLac.Prot.flag



pBlueLac.Ser.Prot.



pBlueLac.Prot.

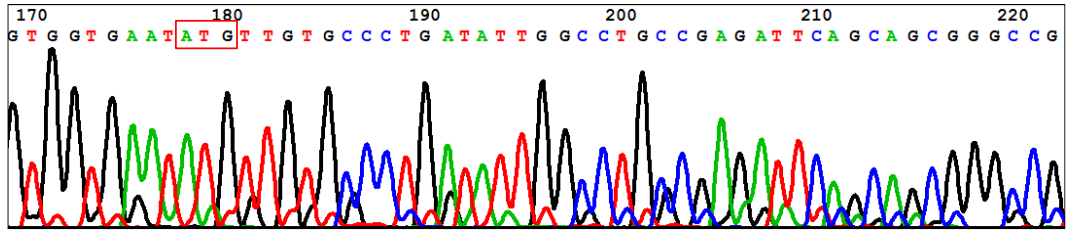


Şekil 6.16B. pBluescript II SK(+) *E. coli lac* promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica*'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar proteaz genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

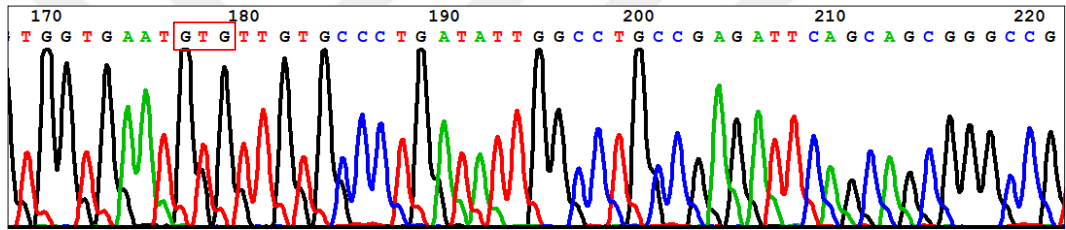
pET-14b'de klonlanan *H. hispanica*'ya ait proteaz geninin ekspresyonu ile ilgili sorunlar yaşandığından dolayı, bu gen pAK plazmitinde *lacI* promotörü kontrolünde

hem ATG başlangıç kodu ile hem de GTG (plazmit vektörde LacI geni GTG ile başladığından) kodu ile klonlandı ve elde edilen dört farklı vektörde tek yönlü dizileme yapılarak genin başlangıç kodlarını da kapsayan 5'-bölgesi incelendi. DNA dizi analizi kromatogramları Şekil 6.17'da verildi.

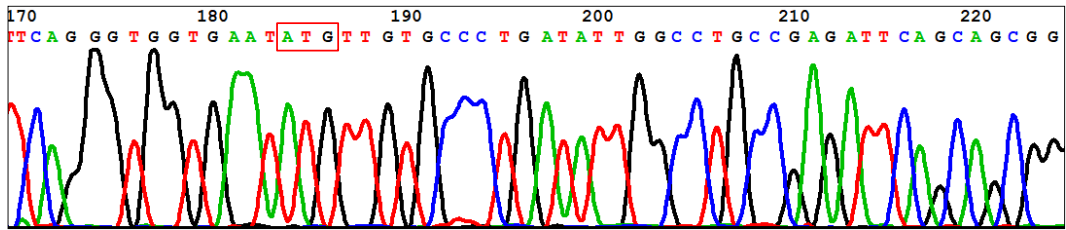
pLacI-Prot.Flag



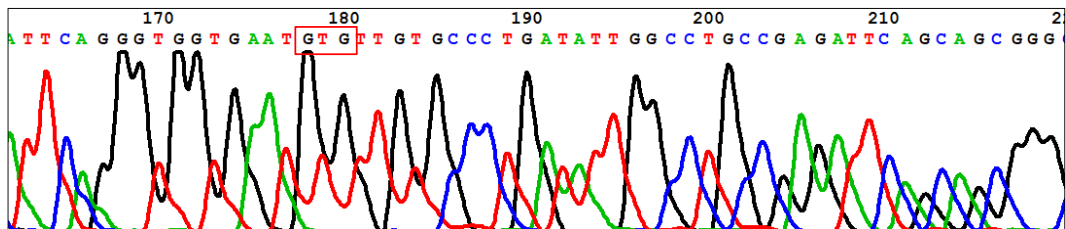
pLacI-GTG.Prot.Flag



pLacI-Prot



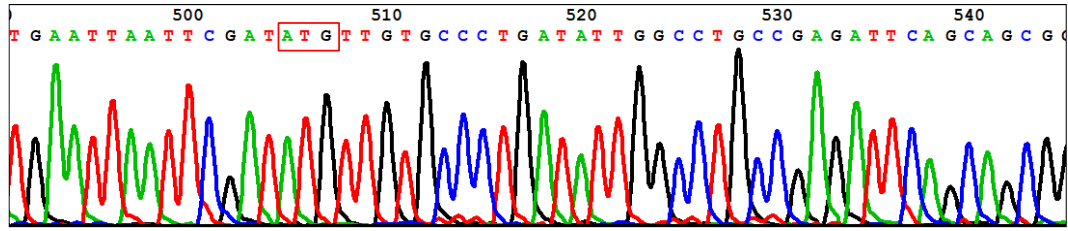
pLacI-GTG.Prot



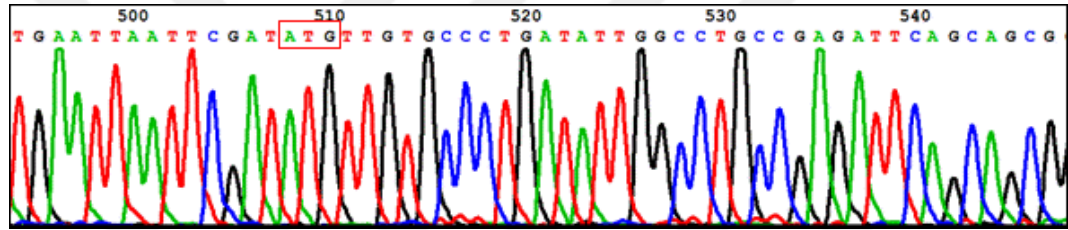
Şekil 6.17. pAK plazmitine *lacI* promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica*'ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar proteaz genlerinin sadece 5'- bölgesini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

pAKTaq plazmitinde bulunan Taq geninin *H. hispanica* proteaz genleri ile değiştirilmesinde alt klonlama tekniğinden yararlanıldı. Bu nedenle elde edilen pTac-Prot ve pTac-Prot.Flag plazmitlerinde genlerin sadece 5'-bölgeleri tek yönlü olarak dizilendi. DNA dizisi kromatogramları Şekil 6.18’de verildi.

pTac.Prot



pTac.Prot.Flag



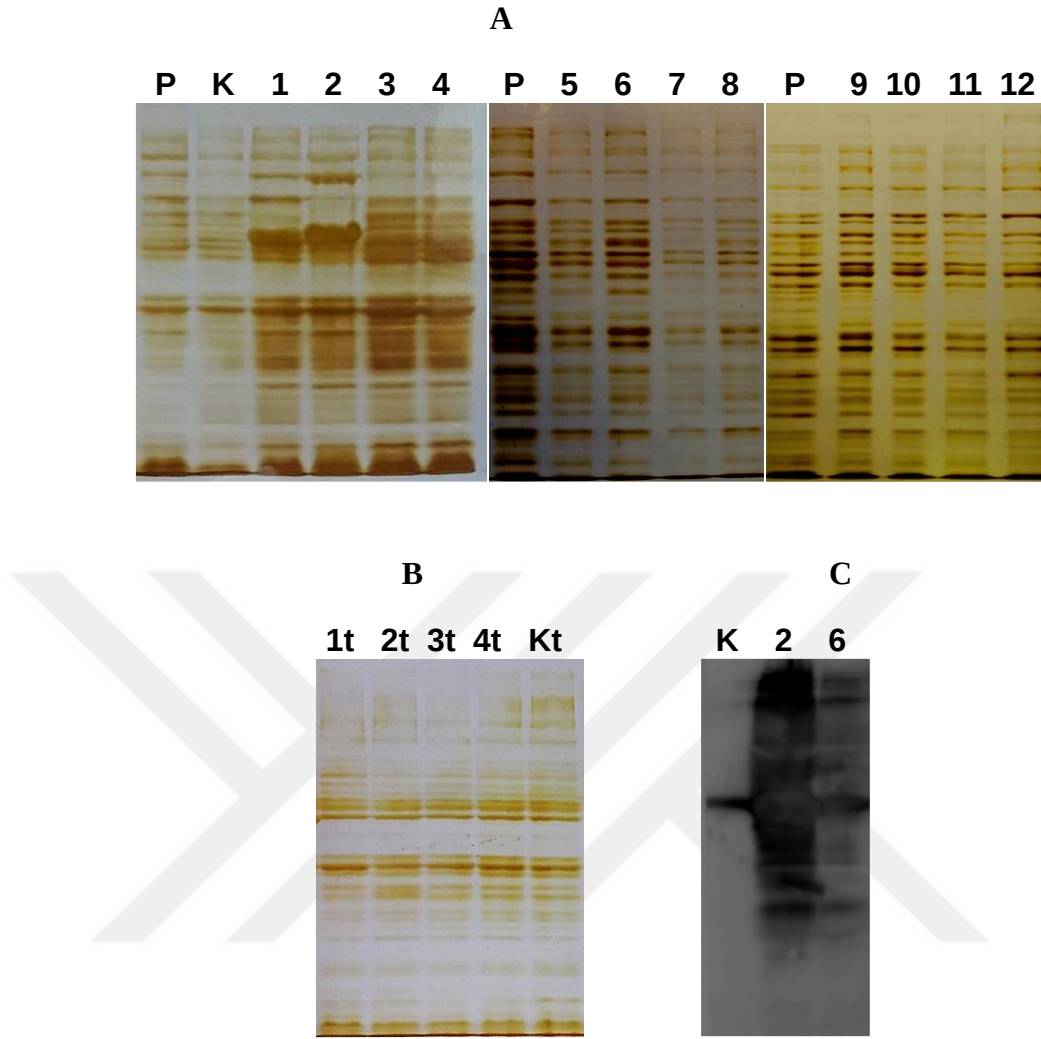
Şekil 6.18. pAKTaq plazmitine *tac* promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica*’ya serin proteaz ve proteaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar proteaz genlerinin sadece 5'- bölgesini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir

Yukarıda Şekil 6.15 - 6.18’de verilen plazmit vektörlerin DNA dizi analizi kromatogramları incelendiğinde klonlanan tüm genlerin ve gen ile plazmit bağlantı noktalarının, teorik olarak tasarlanan vektörler ile birbir aynı olduğu saptandı. DNA dizi analizleri ile doğrulukları kesinleşen bu plazmitler kompetent *E. coli* suşlarına transforme edildi ve klonlanan genlerin ekspresyon yapıp yapmadıkları SDS-PAGE teknikleri ile incelendi.

6.2. *Escherichia coli*’de Halofilik Proteaz ve Serin Proteaz Enzimi Sentezinin SDS-PAGE Teknikleriyle İncelenmesi ile İlgili Veriler

H. hispanica’ya ait proteaz ve serin proteaz genlerini taşıyan farklı ekspresyon vektörlerinin belirlenen *E.coli* hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları SDS-

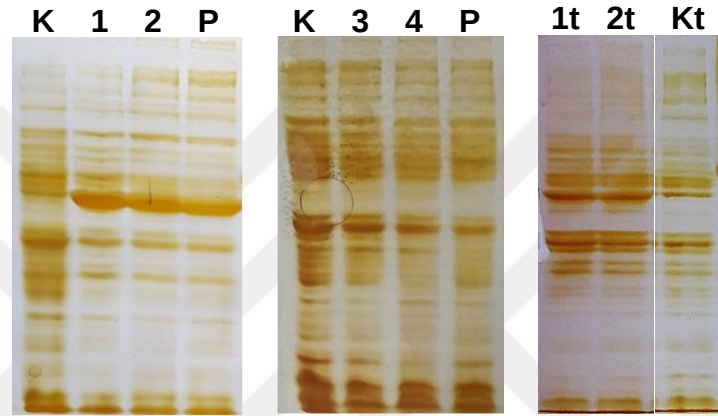
PAGE teknikleriyle incelendi. Elektroforez işleminden sonra proteinler ve proteaz enzimleri gümüş boyama yöntemiyle; flag uzantılı proteaz enzimleri ise Western melezleme yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, pET-14b plazmitinde *T7* RNA polimeraz promotörü kontrolündeki serin proteaz geninin *E.coli* BL21 hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yaptığını gösterdi (Şekil 6.19A ve 19B). Benzer şekilde pBluescript II SK(+) plazmitinde *T7* bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan serin proteaz geninin *E.coli* BL21 hücrelerinde ekspresyon yaptığı fakat ekspresyon düzeyinin daha düşük olduğu görüldü (Şekil 6.19A ve 19C). Buna karşın, pBluescript II SK(+) plazmitinde *lac* promotörü kontrolünde klonlanan genlerin, gümüş boyama tekniği ile belirlenebilecek düzeyde ekspresyon yapmadığı saptandı (Şekil 6.19A). *H. hispanica*'ya ait proteaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalarda, yukarıda Şekil 6.15 - 6.18'de verilen DNA dizi analiz sonuçlarından da görüldüğü gibi, protez genlerinin nükleotid dizisinde ya da vektör ile bağlanma noktalarında herhangi bir hata olmamasına rağmen, SDS-PAGE sonrası gümüş boyama ya da western melezleme deneyleri sonucunda, bu gen için oluşturulan plazmitler ile transforme edilen *E. coli* BL21 ve diğer suşlarında hücrelerinde ekspresyon belirlenemedi (Şekil 6.19A). Bu plazmitlerin *E. coli* Top10 suşunda da belirlenebilir düzeyde proteaz ekspresyona etmediği saptandı (Şekil 6.19B).



Şekil. 6.19. Proteaz enzimlerini kodlayan ekspresyon vektörleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 ve Top10 hücrelerinde proteaz ve serin proteaz enzimlerinin SDS-PAGE /gümüş boyama tekniği (A ve B) ve Western melezleme tekniği (C) ile incelenmesi. 1.pET-14b-Ser.Prot; 2.pET-14b-Ser.Prot.Flag; 3.pET-14b-Prot; 4.pET-14b-Prot.Flag; 5.pBlueT7-Ser.Prot; 6.PBlueT7-Ser.Prot.Flag; 7.PBlueT7-Prot; 8.pBlueT7-Prot.Flag; 9.pBlueLac-Ser.Prot; 10.pBlueLac-Prot; 11.pBlueLac-Prot.Flag; 12.pBlueLac-Ser.Prot.Flag; 1t.pBlueLac-Ser.Prot.Flag \Top10; 2t. pBlueLac-Prot \Top10; 3t. pBlueLac-Ser.Prot \Top10 ; 4t. pBlueLac-Prot.Flag \Top10; Kt.Top10; K.BL21. Deneyde %10'luk ayırma ve %6'lık paketleme jeli kullanıldı. Elektroforez işlemi, ilk 15 dakikada 80 volt, daha sonra 140 voltta 75 dakikada tamamlandı.

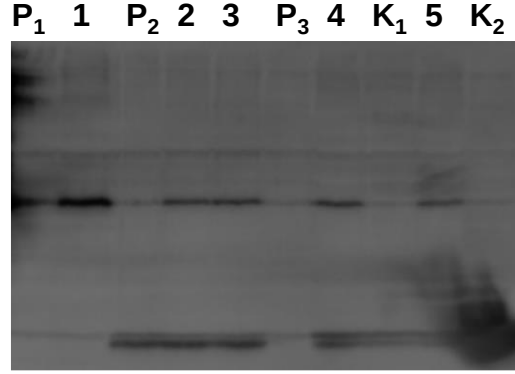
H. hispanica'ya ait proteaz geninin ekspresyonu ile ilgili yaşanan sorunun, klonlamada yararlanılan plazmitlerdeki promotör dizilerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını

belirlemek için, hem flag uzantılı proteaz geni hem de flag taşımayan proteaz geni pAKTaq plazmitinde bulunan *lacI* ve *tac* promotör dizilerinin kontrolünde yeniden klonlandı. Elde edilen bu plazmit vektörlerin farklı *E. coli* suşlarında anlatım yapıp yapmadıkları SDS-PAGE /gümüş boyama tekniği ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar *lacI* ve *tac* promotörü kontrolünde klonalanan *H. hispanica* proteaz genlerinin de *E. coli* hücrlerinde gümüş boyama tekniği ile ayırt edilebilecek düzeyde anlatım yapmadıklarını ya da sentez edilen enzimin stabil olmadığına gösterdi (Şekil 6.20).



Şekil 6.20. *E.coli* BL21 hücrelerinde halofilik bir bakteri olan *Haloarcula hispanica*'ya ait proteaz enzimlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi. Proteinler ve enzimler elektroforez sonrası gümüş boyama tekniği ile görüntülendi. **1.** pTac-Prot / *E.coli* BL21, **2.** pTac-Prot.Flag / *E.coli* BL21, **3.** pLacI-Prot / *E.coli* BL21, **4.** pLacI-Prot.Flag / *E.coli* BL21. K.BL21, P. pAKTaq/BL21, 1t. pTac-Prot.Flag \Top10 , 2t. pTac-Prot \Top10, Kt.Top10. Elektroforez işlemi Şekil 6.19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

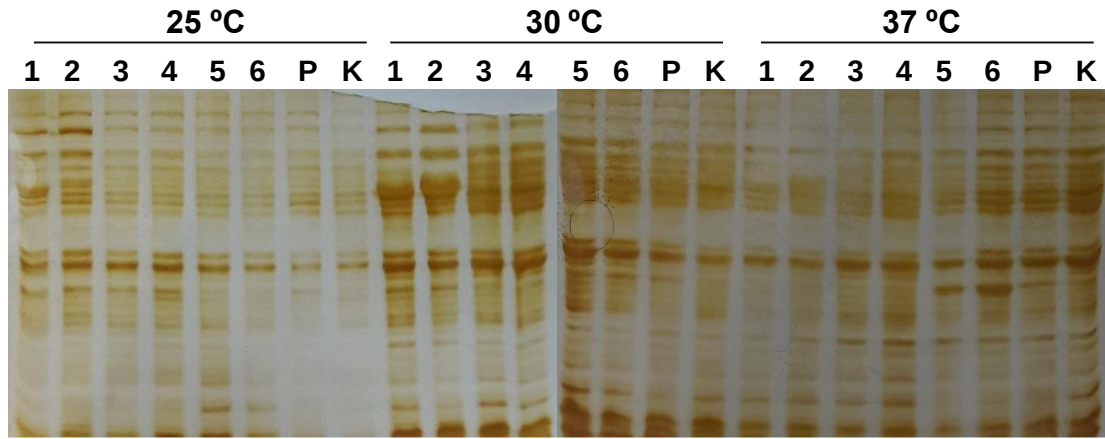
T7, *lacI* ve *tac* promotör dizileri kontrolünde flag uzantılı proteaz kodlayan plazmitlerin *Escherichia coli*'nin belirlenen suşlarında ekspresyonu Western melezleme yöntemi ile incelendi. Kontrol olarak flag uzantısı taşımayan proteaz genleri ile transforme edilen bakteriler kullanıldı. Şekil 6.21'de görüldüğü gibi *E. coli* BL21 ve Mach1 hücrlerinde düşük düzeylerde proteaz enzimleri saptandı.



Şekil 6.21. Flag uzantılı proteaz kodlayan plazmitler ile transforme edilen *E.coli* hücrelerinde proteaz enziminin SDS-PAGE/Western melezleme ile incelenmesi. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak fare monklonal anti-flag antikor, sekonder antikor olarak anti-fare IgG-HRP kullanıldı. **P1.** pET-14b-Prot / BL21 (kontrol). **1.** pET-14b-Prot.Flag / BL21. **P2.** placI-Prot / BL21 (kontrol) **2.** placI-GTG.Prot.Flag. **3.** placI-Prot.Flag. **P3.** placI-Prot / Mach1 (kontrol). **4.** placI-GTG.Prot.Flag / Mach1. **K1.** placI-Prot / Mach1 (kontrol). **5.** placI-Prot.Flag / Mach1. **K2.** *E. coli* Mach1 (kontrol).

6.3. *E. coli* Hücrelerinde Rekombinant Proteaz Enzimi Sentezi için Uygun Üreme Sıcaklığın Belirlenmesi ile İlgili Veriler

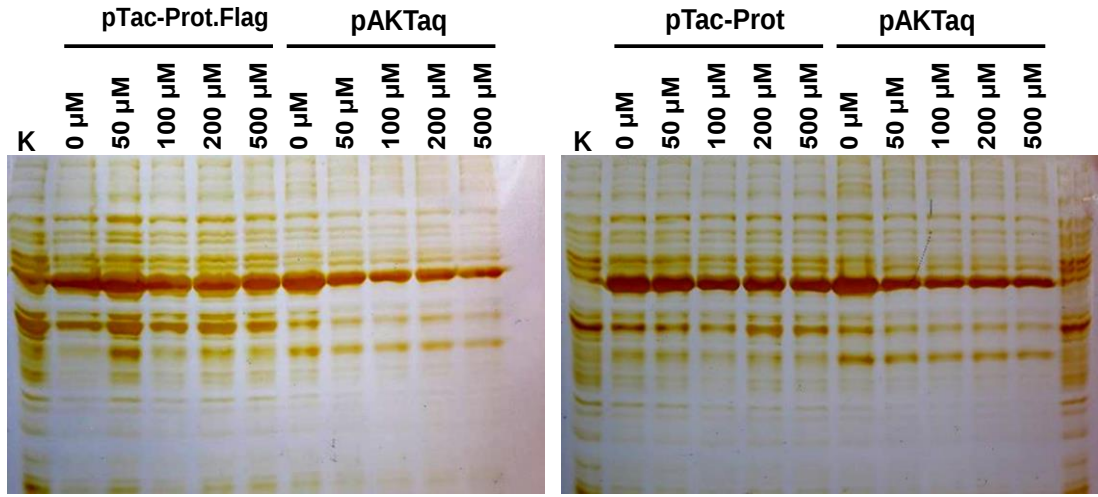
H. hispanica'ya ait proteaz ve serin proteaz genleri aktarılan *E.coli* BL21 suşunda proteaz enzimi sentezi için uygun olan üreme sıcaklığını saptamak için hücreler 25°C, 30°C ve 37°C'larda üretildi ve sonrasında, hücrelerden hazırlanan lizatlar SDS-PAGE/gümüş boyama tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.22'de verildi. *E.coli* BL21 hücrelerinde etkin olarak ekspresyon yapan pET-Ser.Prot ve pET-Ser.Prot.Flag plazmitleri temel alındığında, *H. hispanica* enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde üretilmesinde en uygun sıcaklığın 30°C olduğu görüldü.



Şekil 6.22. Farklı sıcaklıklarda üretilen *E. coli* BL21 hücrelerinde *H. hispanica* proteaz enzimlerinin SDS-PAGE / gümüş boyama tekniği ile analiz edilmesi. 1. pET-Ser.Prot / *E.coli* BL21; 2. pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E.coli* BL21. 3. pET-14b-Prot / *E.coli* BL21. 4. pET-14b-Prot.Flag / *E.coli* BL21. 5. placI-Prot / *E.coli* BL21. 6. placI-Prot.Flag / *E.coli* BL21. P. pET-14b / BL21. K. Plazmit aktarılmamış *E. coli* BL21. Elektroforez işlemi Şekil 6.19’da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

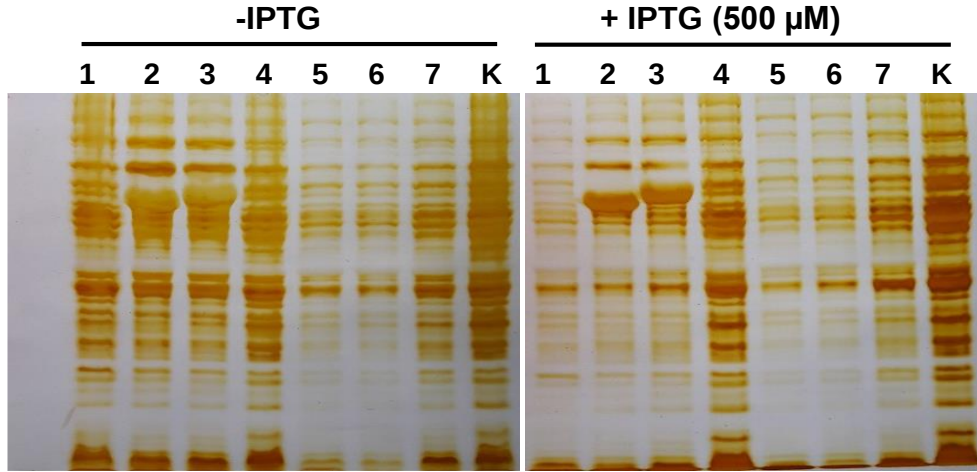
6.4. İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosid (IPTG) Etkisinde Bırakılan Hücrelerde Proteaz Enzimleri Sentezinin Analizi ile İlgili Veriler

IPTG (İng. *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) laktoz operonunun regülasyonunda iş gören laktoz izomeri allolaktoza benzer bir moleküldür, fakat β -galaktozidaz enzimi için substrat görevi görmez. Bu molekül allolaktoz ile benzer bir işleve sahiptir. Bu çalışmada oluşturulan plazmit vektörlerde klonlanan genlerin ekspresyonları direkt ya da dolaylı olarak lac promotörü ile ilişkili olduğundan, farklı konsantrasyonlarda IPTG içeren ortamlarda üretilen *E. coli* hücrelerinde sentez edilen *H. hispanica* enzimleri SDS-PAGE/gümüş boyama tekniği ile incelendi. Tac promotörü kontrolünde proteaz geni taşıyan plazmitler ile transforme edilen, 50-500 mikromolar (μ M) konsantrasyonda IPTG içeren besiyerlerinde üretilen *E. coli* hücrelerinden hazırlanan lizatlarda total proteinlerin SDS-PAGE ile analiz sonuçları Şekil 6.23’de verildi. Elde edilen veriler incelendiğinde IPTG’in çalışmada kullanılan transformant *E. coli* suşlarında, uygulanan koşullarda *H. hispanica* enzimlerini sentezi bakımından anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü.



Şekil 6.23. Farklı konsantrasyonlarda IPTG içeren ortamlarda üretilen pTac-Prot, pTac-Prot.Flag ve pAKTaq plazmitleri ile transforme edilen *E.coli* BL21 bakteri örneklerinde *H. hispanica* proteaz ve proteaz.flag enzimlerinin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analiz incelenmesi. **K.** *E.coli* BL21 (kontrol). Elektroforez işlemi Şekil 6.19’da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Benzer şekilde, *H. hispanica* proteaz genleri taşıyan pET-14b ve pBluescript II SK+ plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinde de, 500 μ M final konsantrasyonda IPTG içeren ortamlarda, özellikle bu hücrelerde etkin olarak sentez edilen serin proteaz ve serin proteaz.flag enzimleri gözönünde bulundurulduğunda, bu enzimlerin sentezinde belirgin bir fark olmadığı saptandı (Şekil 6.24).



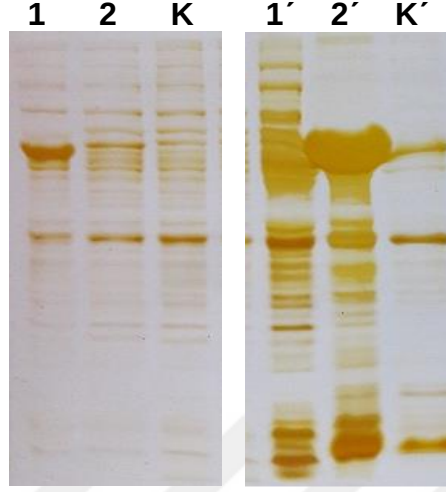
Şekil 6.24. IPTG'in *E. coli* hücrelerinde rekombinant proteaz enzimi sentezine etkisinin SDS-PAGE / gümüş boyama metodu ile analiz edilmesi.

1. pET-14b / *E.coli* BL21. 2. pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E.coli* BL21. 3. pET-14b-Ser.Prot / *E.coli* BL21. 4. pET-14b-Prot.Flag / *E.coli* BL21. 5. pBlueT7-Prot / *E.coli* BL21. 6. pBlueT7-Prot.Flag / *E.coli* BL21. 7. pBlueT7-Ser.Prot.Flag / *E.coli* BL21. K. *E.coli* BL21 (kontrol). Elektroforez işlemi Şekil 6.19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.5. Transformant *E.coli* Kültürlerinden Serin Proteaz Enzimi Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler

Yukarıda sonuçları verilen deneylerde, plazmit aktarılan *E. coli* hücrelerinde proteaz enzimlerinin sentez edilip edilmedikleri, hücrelerin SDS-örnek tamponunda tamamen parçalanması ile hazırlanan lizatların SDS-PAGE ile analiz edilerek belirlendi. Bununla birlikte, SDS-örnek tamponu proteaz aktivitelerinin saptamak için hazırlanacak hücre ekstrelerinin hazırlanması için uygun bir tampon değildir. Bu nedenle, hücrelerde enzim aktivite testleri için en ideal yöntemlerden biri olan sonikasyon ile hücre parçalama yöntemi uygulandı. Bu denemelerde, *E. coli* BL21 hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yapan pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag plazmitlerinden yararlanıldı. Sonikasyon sonrasında hücre lizatları santrifüj edildi ve hem üst sıvıda hem de çökeltide serin proteaz enzimlerinin varlığı SDS/PAGE gümüş boyama tekniği ile kontrol edildi (Şekil 6.25). Elde edilen veriler,

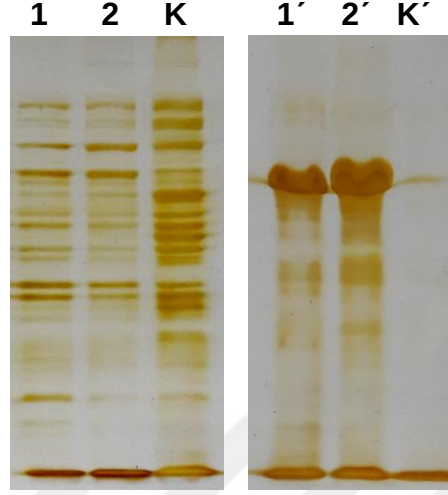
sonikasyon sonrası, serin proteaz enzimlerinin büyük ölçüde çökelti halinde kaldığını gösterdi.



Şekil 6.25. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinden sonik parçalama ile hazırlanan hücre lizatlarında serin proteaz enzimlerinin SDS-PAGE tekniği ile analizi. Jeller metot kısmında verildiği şekilde gümüş boyama tekniği ile boyandı. **1.** pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **2.** pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **K.** *E. coli* BL21(üst sıvı). **1', 2' ve K'** sonikasyon ile hazırlanan aynı örneklerin çökeltileri. Elektroforez işlemi Şekil 6.19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

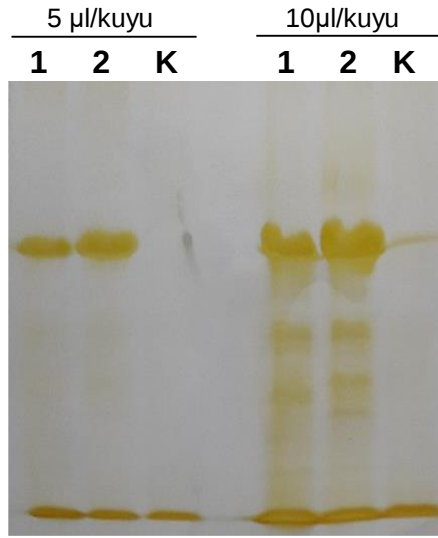
E. coli hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *H. hispanica* serin proteaz enzimlerinin büyük bir olasılıkla inklüzyon cisimleri halinde sentez edilmesi ve sonikasyon ile parçalama sonrasında, hücresel artıklar ile çökmesi nedeniyle, çökeltiden serin proteaz enzimlerini geri kazanmak amacıyla farklı yöntemler denendi. Bu yöntemlerden birinde hücre çökeltileri DTT ve üre içeren bir tamponda süspanse edilerek yüksek sıcaklık uygulandı. Sıcaklık uygulamasından sonra ortam santrifüj edildi ve üst sıvıda kalan proteinler SDS/PAGE ile incelendi. Proteinlerin denatüre olabileceği bu koşullarda rekombinant olarak sentez edilen serin proteaz enzimlerin büyük bir saflıkla diğer hücresel protein ve hücresel artıklardan ayrıldığı görüldü (Şekil 6.26). Denatüre koşullarda sıcaklık uygulanmasına karşın serin proteaz

enzimlerinin tek bant halinde ayrılması, primer yapısında bir bozulmanın olmadığı sonucunu verdi.



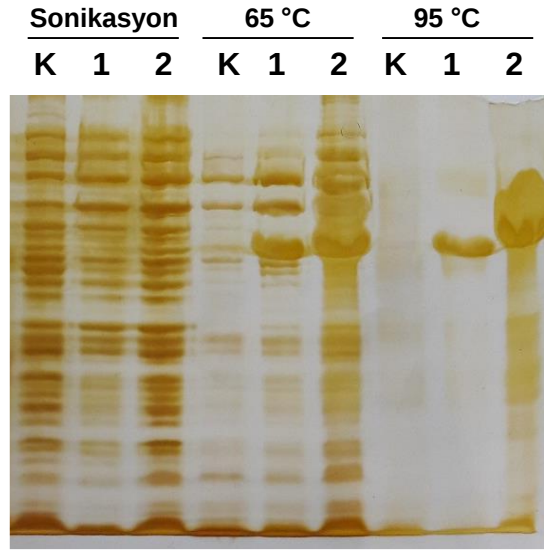
Şekil 6.26. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinden sonik parçalama ve sonrasında sıcak ortamda denatüre koşullarda hazırlanan hücre lizatlarının SDS-PAGE ile analizi. Jeller metot kısmında verildiği şekilde gümüş boyama tekniği ile boyandı. **1.** pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **2.** pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **K.** *E. coli* BL21(üst sıvı). **1', 2' ve K'** sonikasyon ile hazırlanan aynı örneklerin çöktülerinden denetüre koşullarda ekstre edilen proteinler. Elektroforez işlemi Şekil 6.19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Denatüre koşullarda sıcaklık uygulaması ile hücre çöktülerinden ekstre edilen protein örnekleri, üre ve 2- β merkaptotanol konsantrasyonu kademeli olarak düşürülen Tris-Cl tamponlarına karşı diyaliz edildi ve diyaliz sonrası ortamda bulunan proteinler soğuk aseton ile çöktüldü. Çöktülen proteinler SDS-PAGE ile incelendi (Şekil 6.27). Diyaliz edilen proteinlerin soğuk aseton ile kolayca geri kazanılabildiği görüldü.



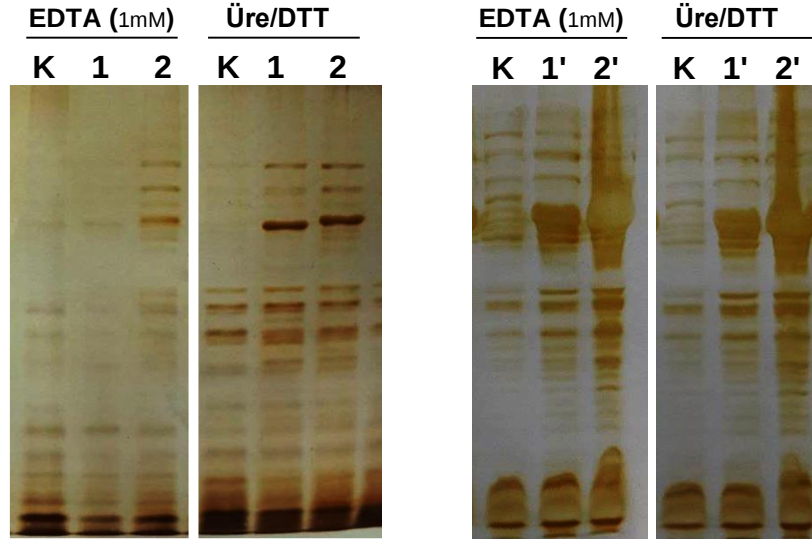
Şekil 6.27. Şekil 6.26’da SDS-PAGE sonuçları verilen örneklerin diyaliz edilmesi sonrasında soğuk aseton ile çöktürülmesi ile elde edilen proteinlerin elektroforez ile analizi. **1.** pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21 lizatı. **2.** pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21 lizatı. **K.** *E. coli* BL21.

Sıcak ortamdan hücrelerin parçalanmasının serin proteaz enzimlerinin çözünür hale gelmesinde önemli olduğunun görülmesi nedeniyle, transformant hücrelerden iki farklı sıcaklıkta (65 °C ve 95 °C) ekstraksiyon denendi ve örnekler SDS-PAGE ile analiz edildi. Elektroforez sonuçları Şekil 6.28’de verildi. Buzlu suda soğutularak sonikasyon ile parçalanmış örneklerin üst sıvılarında ayırt edilebilir rekombinant serin proteaz enzimi bantları görülmezken, 65 °C’da bekletilerek ekstre edilen örneklerin üst sıvılarında serin proteazların belirgin olarak arttığı, 95 °C’da hazırlanan örneklerde ise neredeyse tüm hücresel proteinlerin çöktüğü, proteaz enzimlerinin ise üst sıvıda kaldığı görüldü. Bu sonuç sıcaklık artışının, rekombinant proteinlerin çözünür forma geçmesinde önemli bir etken olduğunu gösterdi.



Şekil 6.28. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinden farklı sıcaklıklarda hazırlanan ekstratlerde serin protez ve konak bakteri proteinlerinin SDS-PAGE / Gümüş boyama tekniği ile analizi. **1.** pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **2.** pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21 lizatı (üst sıvı). **K.** *E. coli* BL21(üst sıvı). Elektroforez işlemi Şekil 6.19’da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

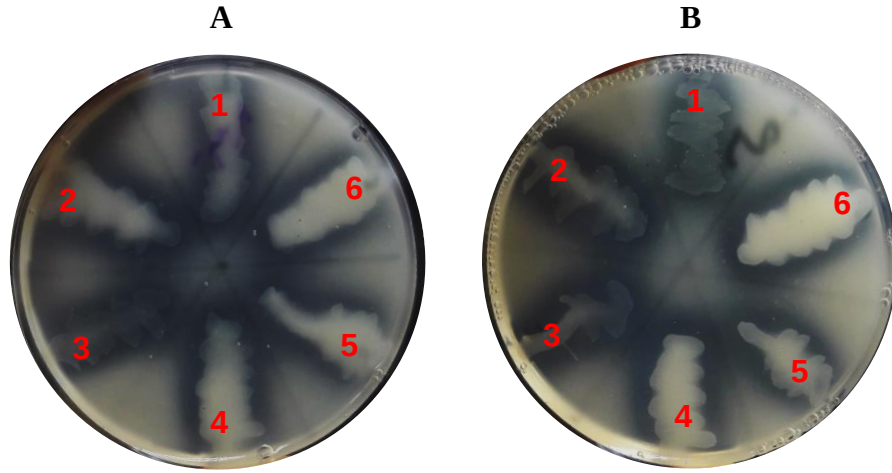
Yüksek sıcaklıkta (95 °C) kısa süre (5 dakika) bekletilerek parçalanmış hücre çöktellerinden 2M üre ve 1mM DTT içeren tamponda protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Hücre çöktelleri 5 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı, üst sıvılarda ve çöktide protein analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.29’da verildi. Üre ve DTT’nın rekombinant proteinlerin çözünür forma geçişini arttırdığı, fakat yeterli olmadığı, proteinlerin önemli ölçüde çökteli halinde kaldığı görüldü.



Şekil 6.29. *E. coli* BL21 hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *H. hispanica* serin proteaz enzimi çözünürlüğüne üre ve DTT'nin etkilerinin araştırılması. Ekstraksiyon tamponuna 2 M üre ve 1mM DTT eklendi. 1. pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21 lizatu (üst sıvı). 2. pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21 lizatu (üst sıvı). K. *E. coli* BL21(üst sıvı). 1', 2' ve K', santrifüj sonrası elde edilen örneklerin çöktürleri. Elektroforez işlemi Şekil 6.19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

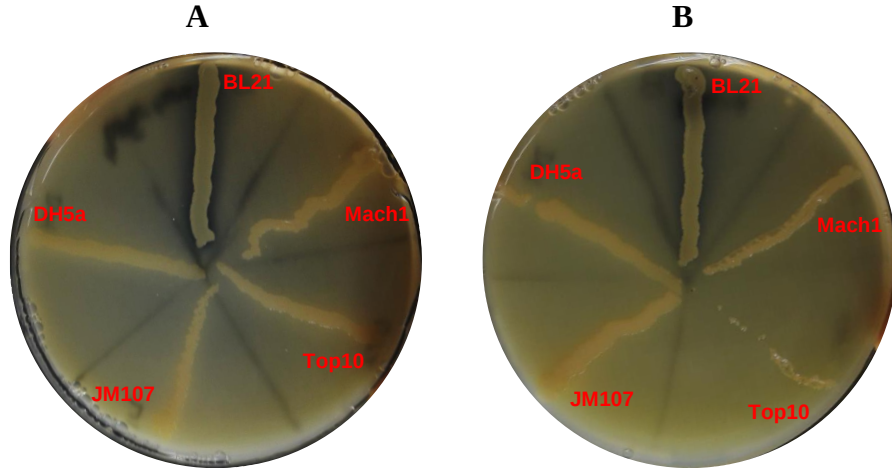
6.6. *E. coli* Hücrelerinde Rekombinant Olarak Sentez Edilen *H. hispanica* Proteaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Analizi ile İlgili Veriler

Metot kısmında verildiği gibi, *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *H. hispanica* proteaz enzimlerinin proteolitik aktiviteleri, hücrelerden hazırlanan ham lizatlarda ya da kısmen saflaştırılan örneklerde farklı yöntemler izlenerek araştırıldı. İlk aşamada, plazmit aktarılan *E. coli* hücreleri parçalanmaksızın, milk agar besiyerine çizgi şeklinde ekilerek, hücrelerin proteaz aktiviteleri değerlendirildi. Bunun için pET-14b plazmitinde T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde proteaz geni taşıyan plazmitler ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücreleri % 1 ve % 2 konsantrasyonlarda NaCl içeren milk agar besiyerlerine ekildi ve ortamdaki proteinlerin yıkım profilleri incelendi (Şekil 6.30). Şekil 6.30'dan da görüldüğü gibi milk agar katı besiyerinde çizgi şeklinde üreyen bakterilerin çevresinde, pET-14b plazmiti taşıyan *E. coli* BL21 bakterilerine göre daha geniş zonlar oluştu. Bununla birlikte, kontrol bakterilerde de proteinlerin yıkılmasına bağlı zon oluşması, *E. coli* BL21 bakteri suşunun endojen proteaz bakımından da aktif olduğu sonucunu verdi.



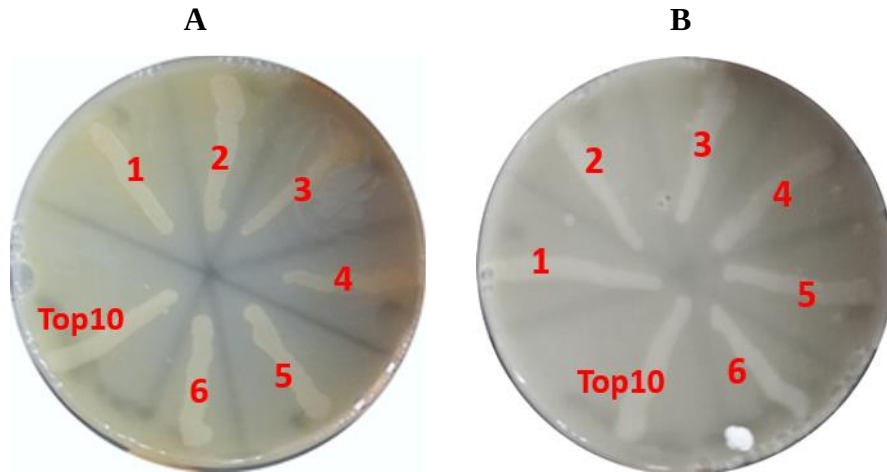
Şekil 6.30. *H. hispanica* proteaz geni taşıyan plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinin milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri. **1.** pET-14b-Ser.Prot / *E. coli* BL21. **2.** pET-14b-Ser.Prot.Flag / *E. coli* BL21. **3.** pET-14b-Prot / *E. coli* BL21 (*his* uzantılı proteaz). **4.** pET-14b-Prot / *E. coli* BL21. **5.** pET-14b-Prot.Flag / *E. coli* BL21. **6.** pET-14b / *E. coli* BL21 (Kontrol).

Milk agarlı besiyerinde pET-14b plazmiti taşıyan *E. coli* BL21 bakteri suşunun endojen proteaz aktivitesi göstermesi nedeniyle, diğer *E. coli* suşları da proteaz aktiviteleri bakımından test edildi. Şekil 6.31’de görüldüğü gibi *E. coli* DH5α, JM107, Top10 ve Mach1 suşlarının milk agar katı besiyerlerinde proteaz aktivitesi göstermedikleri saptandı.



Şekil 6.31. *E.coli* 'nin farklı suşlarının antibiyotik içermeyen zenginleştirilmiş milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri. **A.** %0.01 (a/h) konsantrasyonda $MgSO_4$ içeren besiyeri. **B.** $MgSO_4$ katılmamış besiyeri.

Zenginleştirilmiş milk agar katı besiyerinde proteaz aktivitesi göstermeyen *E. coli* suşlarından Top10, lac ve tac promotörü kontrolünde proteaz geni taşıyan plazmitler ile transforme edildi ve transformant bakterilerin proteaz aktiviteleri Mg^{2+} varlığında ve yokluğunda test edildi (Şekil 6.32). Elde edilen sonuçlar, milk agar katı besiyerine çizgi şeklinde ekilen transformant *E. coli* Top10 bakterilerinin proteoliz zonu oluşturmadığı, dolayısıyla uygulanan koşullarda proteaz aktivitesi göstermediği saptandı.

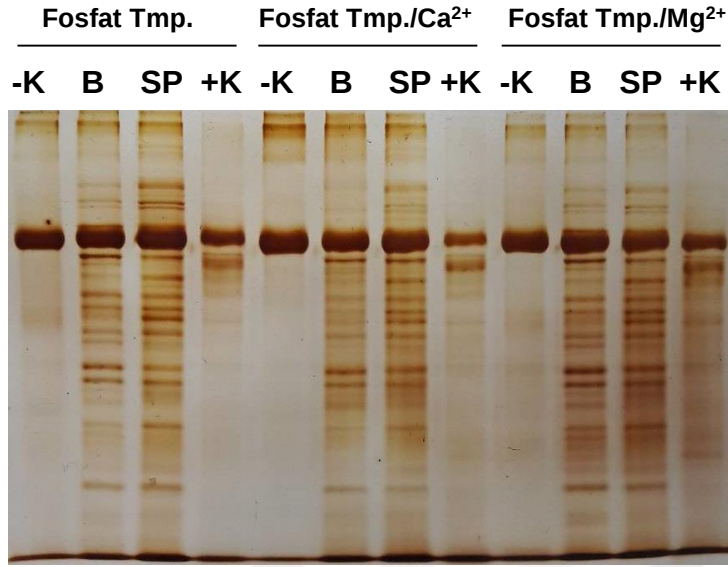


Şekil 6.32. *H. hispanica* proteaz geni taşıyan plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* Top10 hücrelerinin milk agar besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri. **1.** pTac-Prot.Flag / *E. coli* Top10. **2.** pTac-Prot / *E. coli* Top10. **3.** pBlueLac-Ser.Prot /

E. coli Top10. 4. pBlueLac-Prot / *E. coli* Top10. 5. pBlueLac-Ser.Prot / *E. coli* Top10. 6. pBlueLac-Prot.Flag / *E. coli* Top10. A. %0.01 (a/h) konsantrasyonda MgSO₄ içeren besiyeri. B. MgSO₄ katılmamış besiyeri.

6.7. *E. coli* Hücrelerinde Sentez Edilen *H. hispanica* Proteaz Enzimlerinin BSA Kullanılarak Aktivitesinin Belirlenmesi ile İlgili Veriler

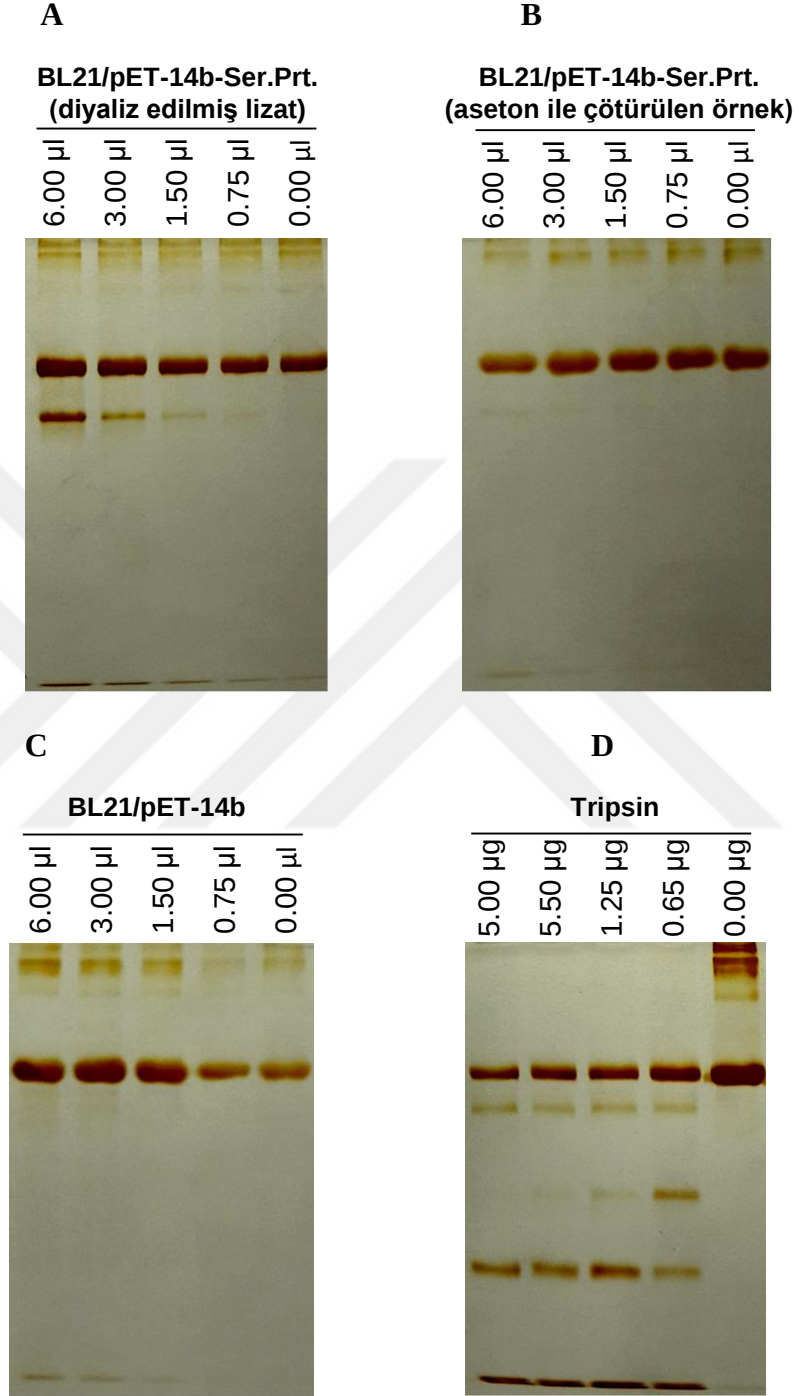
Milk agar katı besiyerinde çizgi şeklinde üretilen bakteriler, hücre dışına salgılanan proteaz enzimleri bakımından test edilebilirler. Bu nedenle çalışmada, sonikasyon ve/veya sıcaklık uygulaması ile parçalanan hücrlerden hazırlanan lizatlarda proteaz aktiviteleri, bovin serum albümin (BSA) üzerinde bir yıkıma neden olup olmadıkları, reaksiyon sonrasında ortamdaki BSA, SDS-PAGE ile analiz edilerek araştırıldı. Bu deneylerde kontrol olarak bir serin proteaz olan tripsin enziminden yararlanıldı. Deneylerde, pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag ile transformde edilen *E. coli* BL21 hücrelerinden hazırlanan lizatlar kullanıldı. Transformant hücrlerden sonikasyon ile parçalama metodu ile hazırlanan lizatların BSA üzerinde denenmesi ile ilgili sonuçları Şekil 6.33’de verildi. Reaksiyon Ca²⁺ ya da Mg²⁺ iyonu varlığında ve bu iyonların yokluğunda fosfat tampomunda (100 mM, pH: 7,5) gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, kontrol bakteri (B: pET-14b ile transforme edilen) ile serin protez sentez eden (SP: pET-14b-ser.prot ile transforme edilen) bakterilerden hazırlanan lizatlar karşılaştırıldığında, bu iki örnek arasında belirgin bir fark olmadığını gösterdi. Tripsin etkisinde bırakılmış BSA örneklerinin (+K) farklı koşullarda önemli ölçüde yıkıldığı saptandı. Ca²⁺ ya da Mg²⁺ iyonlarının varlığı sonucu etkilemedi.



Şekil 6.33. Serin proteaz enzimi sentez eden *E. coli* BL21 (pET-14b-Ser.Prot plazmiti ile transforme edilen bakteri) hücrelerinden sonikasyon yöntemi ile hazırlanan lizatın BSA üzerinden proteolitik etkisinin SDS-PAGE ile incelenmesi. Reaksiyon 25 µg BSA içeren 50 µl fosfat tamponu (100 mM, pH: 7,5) içerisinde, 5 µl hücre lizatı kullanılarak gerçekleştirildi. **-K.** negatif kontrol, enzim ya da hücre lizatı eklenmemiş örnek. **B.** pET-14b plazmiti ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrlerinden hazırlanan lizat. **SP.** pET-14b-Ser.Prot plazmiti ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrlerinden hazırlanan lizat. **+K.** 5µg tripsin etkisinde bırakılan örnek. Reaksiyon 50 µl hacimde 100 mM fosfat tamponunda (pH.7.5), 37 °C’da 16 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Şekil 6.19’da verilen elektroforez koşulları uygulandı.

Yukarıda da değinildiği gibi, sonikasyon ile parçalan hücrelerde, çok az miktarlarda rekombinant serin proteaz enzimi çözünür formda bulunduğu için, farklı şekillerde ekstere edilen enzim örneklerinin proteolitik aktiviteleri benzer yöntem ile BSA üzerinde denendi. *H. hispanica* serin proteaz enzimi sentez eden *E. coli* BL21 hücrlerinden sıcakta (95 °C’da) bekletilerek hazırlanan ve diyaliz edilen örneğin ve diyaliz edilen örnekten soğuk aseton ile çöktürme sonucu elde edilen saflık derecesi yüksek örneğin (bk. Şekil 6.27) BSA üzerinde denenmesi ile ilgili sonuçlar Şekil 6.34’de verildi. Serin proteaz geni klonlanmamış pET-14b plazmiti aktarılan kontrol bakterilerden aynı yöntem ile hazırlanan örnek ile karşılaştırıldığında, gerek diyaliz

edilen lizatın, gerekse bu lizattan aseton ile çöktürülerek elde edilen proteinlerin gözle görülür bir proteolitik ativite göstermediği saptandı.

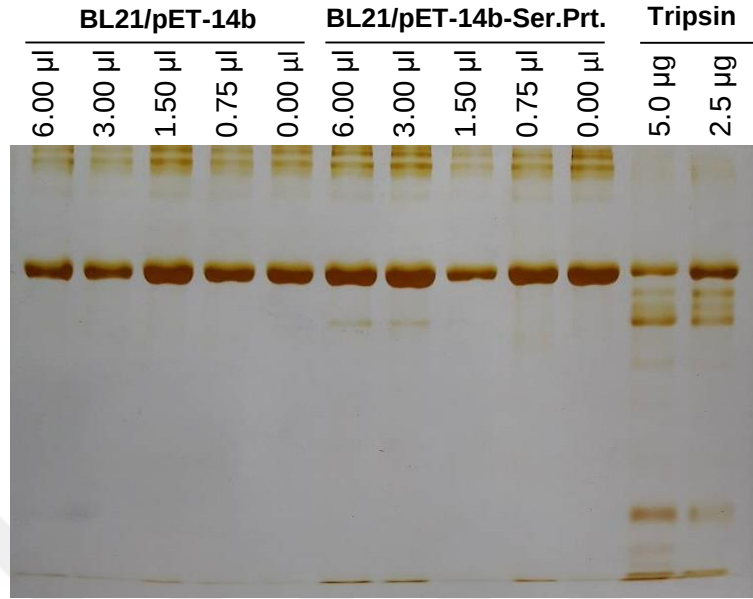


Şekil 6.34. pET-14b-Ser.Prot plazmiti aktarılan *E. coli* BL21 hücrelerinden sıcaklıkta (95 °C’da) bekletilerek hazırlanan lizatların etkisinde bırakılan BSA’nın SDS-PAGE ile analizi. **A.** 95 °C’da parçalanan hücrelerden hazırlanan ve diyaliz edilen lizat. **B.** Diyaliz edilen örnekten aseton ile çöktürülerek elde edilen protein fraksiyonu. **C.** pET-

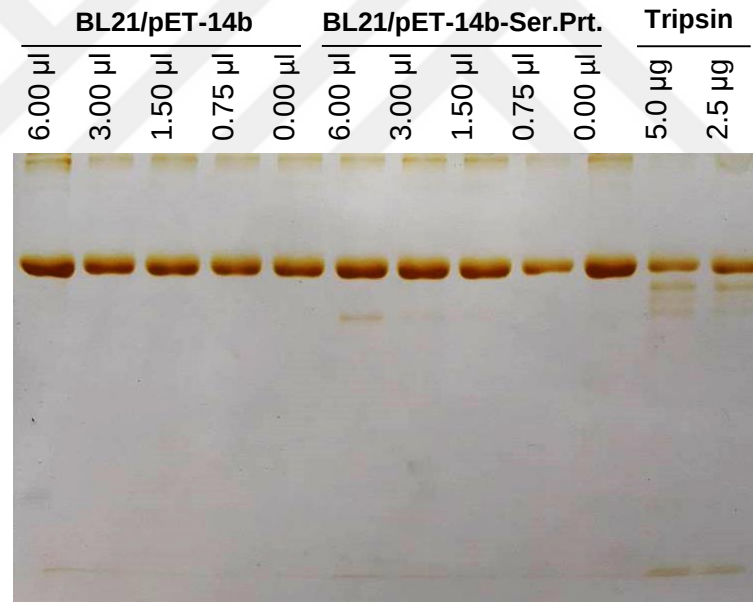
14b plazmiti aktarılan *E. coli* BL21 hücrelerinden hazırlanan lizat (kontrol). **D.** Farklı miktarlarda Tripsin enzimi etkisinde bırakılan BSA örnekleri. Reaksiyon 50 µl hacimde Tris-Cl tamponunda (pH.8), 37 °C’da 16 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Şekil 6.19’da verilen elektroforez koşulları uygulandı.

Yapılan bazı çalışmalarda, bakterilerde inklüzyon cisimcikleri halinde sentez edilen inaktif enzimlerin diyaliz ortamında üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonunun kademeli olarak düşürülmesinin proteinlerin doğru katlamalarına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Jevsevar ve ark., 2005). Bu çalışmada da *H. hispanica* serin proteaz enzimi sentez eden *E. coli* BL21 hücrelerinden sıcaklık uygulaması ile elde edilen örnekler, kademeli olarak üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonu düşürülen ortamlara karşı diyaliz edildi ve bu örnekler farklı ortam koşullarında BSA üzerinde denendi. İlk aşamada diyaliz edilen hücre lizatları 100 mM ve 300 mM NaCl içeren potasyum fosfat tamponunda denendi ve sonuçlar SDS-PAGE sonrası gümüş boyama metodu incelendi (Şekil 6.35). Şekil 6.35’den de görüldüğü gibi hücre lizatlarında beklene aktivite saptanamadı.

A

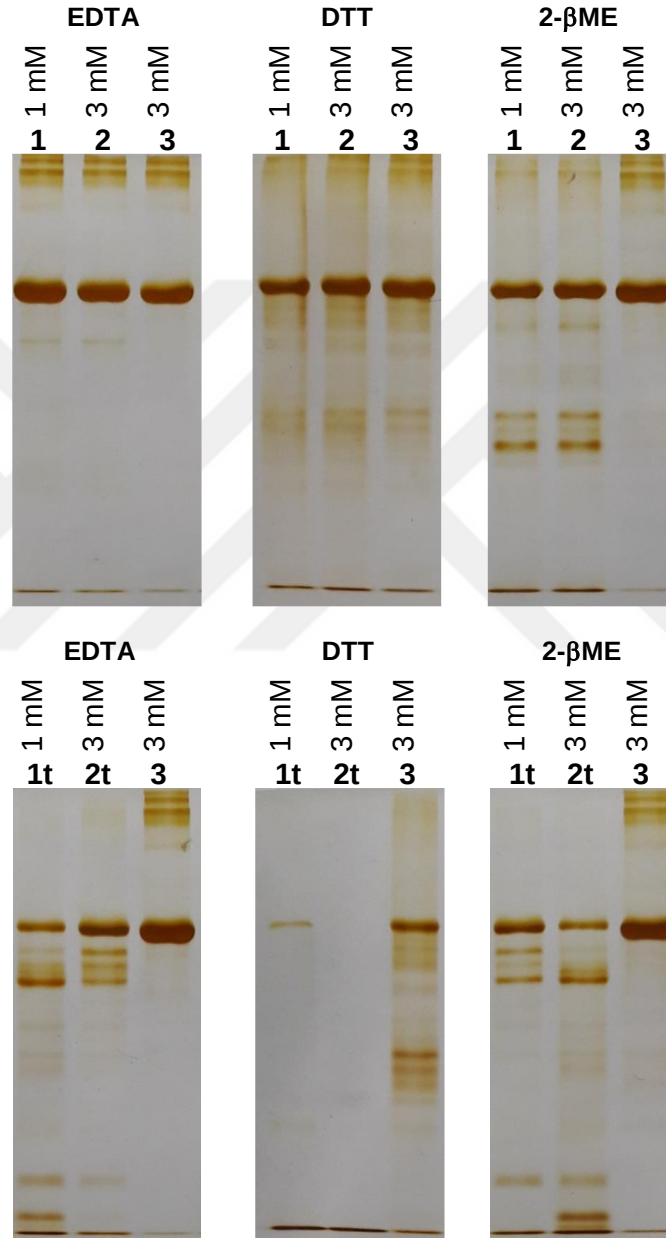


B



Şekil 6.35. pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b plazmiti aktarılan *E. coli* BL21 hücrelerinden sıcaklıkta (95 °C’da) bekletilerek hazırlanan ve sonrasında üre ve 2- β merkaptotanol konsantrasyonu kademeli olarak düşürülen tamponlarda diyaliz edilen lizatların BSA üzerindeki proteolitik etkilerinin SDS-PAGE ile analizi. Pozitif kontrol olarak şekil üzerinde gösterilen miktarlarda saf tripsin enzimi kullanıldı. **A.** 100 mM NaCl içeren ortam. **B.** 300 mM NaCl içeren ortam. Reaksiyon 50 μ l hacimde fosfat tamponunda (pH.7.5), 37 °C’da 16 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Şekil 6.19’da verilen elektroforez koşulları uygulandı.

Diğer taraftan EDTA, DTT ve 2-β merkaptotanol'un olası etkilerini saptamak amacıyla, yukarıda belirtildiği gibi üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonları düşürülen tamponlarda kademeli olarak diyaliz edilen serin proteaz örneklerinin BSA üzerinde proteolitik aktiviteleri bu bileşiklerin varlığında test edildi. Deney sonuçları Şekil 6.36'da verildi.



Şekil 6.36. Şekil üzerinde belirtilen konsantrasyonlarda EDTA, DTT ya da 2-β merkaptotanol içeren ortamlarda pET-14b-Ser.Prot plazmiti aktarılan *E. coli* BL21 hücrelerinden 5.30.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan lizatın ve tripsin enziminin BSA üzerinde gösterdikleri proteaz aktivitelerinin SDS-PAGE ile analizi. 1 ve 2 no'lu

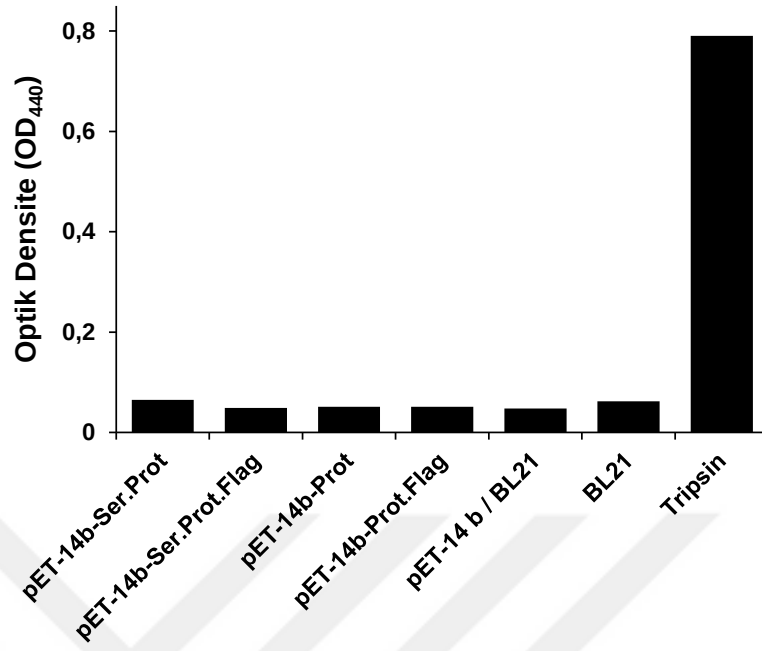
örneklerde 5 µl lizat; 1t ve 2t örneklerinde 2 µg tripsin enzimi kullanıldı. 3 no'lu örneklere lizat ya da tripsin eklenmedi. Reaksiyon 50 µl total hacimde 25µg BSA içeren 100 mM fosfat tamponunda (pH.7.5), 37 °C'da 16 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Şekil 6.19'da verilen elektroforez koşulları uygulandı.

Sonuçlar değerlendirildiğinde ortama katılan EDTA'nın gerek serin proteaz örneklerde (1 ve 2) gerekse serin proteaz eklenmemiş örnekteki (3) BSA'da bir enzimatik yıkım görünmemektedir. DTT içeren ortamda BSA'da serin proteazdan bağımsız olarak bir miktar yıkılma olduğu saptanmıştır. 2-β ME içeren ortamda ise kontrolde (3) BSA yıkımı görülmezken, serin proteaz içeren örneklerde yıkım görünmektedir. Benzer sonuç kontrol olarak kullanılan tripsin içeren örneklerde (1t, 2t ve 3) de saptanmıştır. Bununla birlikte DTT içeren ortamlarda BSA'nın tripsin enzimi ile büyük ölçünde yıkıldığı görünmektedir.

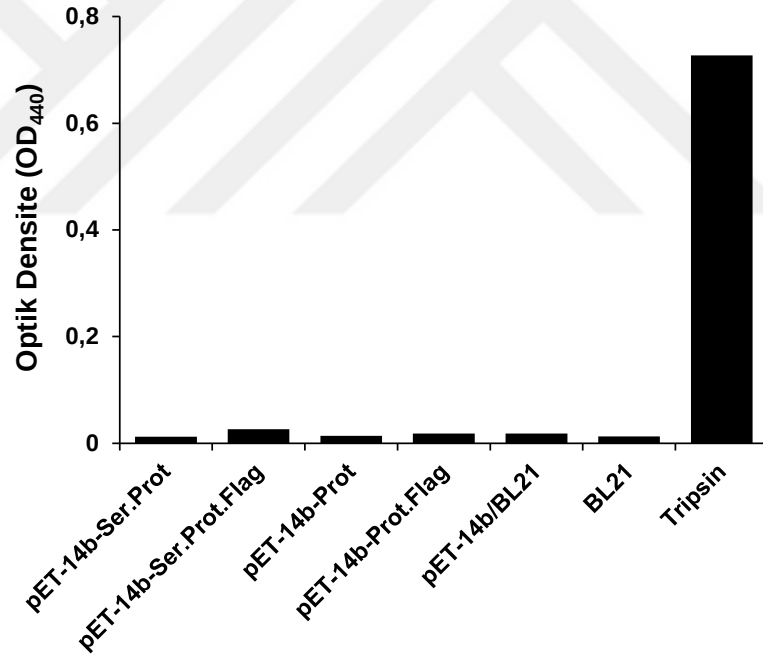
6.8. *E. coli* Hücrelerinde Sentez Edilen *H. hispanica* Proteaz Enzimleri Aktivitelerinin Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Belirlenmesi ile İlgili Veriler

Çalışma kapsamında *H. hispanica* proteaz enzimlerinin rekombinant olarak üretilmesine en iyi sonuç T7 promotörü kontrolünde proteaz geni taşıyan plazmitler ile transforme edilen *E.coli* BL21 hücrlerinde elde edildi. Bundan dolayı spektrofotometrik yöntemle aktivite tayinlerinde pET-14b-Ser.Prot, pET-14b-Ser.Prot.Flag, pET-14b-Prot, pET-14b-Prot.Flag ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinden sonik parçalama ile hazırlanan lizatlar denendi. Substrat olarak ise Tris-CaCl₂ ve 100 mM NaCl içeren Tris-CaCl₂ tamponlarında çözündürülerek hazırlanan %1 azokazein çözeltisi kullanıldı. Deneylerde kontrol olarak tripsin enzimi kullanıldı. Spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen veriler Şekil 6.37'de verildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde Tris-CaCl₂ tamponlarında (Şekil 6.37A) ya da NaCl içeren Tris-CaCl₂ tamponlarında (Şekil 6.37B) lizat eklenen ortamlarda azokazein hidroliz edilmediği görüldü. Denatüre koşullarda hazırlandıktan sonra üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonu kademeli olarak azalan ortamlarda diyaliz edilen enzim örnekleri ile de benzer sonuçlar alındı.

A



B



Şekil 6.37. Farklı plazmitler ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinden hazırlanan ham özütlerin proteolitik etkisinin azokazein substratı üzerinde denenmesi. **A.** Aktivitenin Tris-CaCl₂ tamponunda çözündürülerek hazırlanan %1 azokazein çözeltisi kullanılarak belirlenmesi, **B.** Aktivitenin 100 mM NaCl içeren Tris-CaCl₂ tamponlarında çözündürülerek hazırlanan %1 azokazein çözeltisi kullanılarak belirlenmesi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğal fonksiyonları hücre içi ya da hücre dışı biyokimyasal reaksiyonları kataliz etmek olan enzimler, günümüzde biyoteknoji, moleküler genetik ve DNA teknolojileri alanlarındaki gelişmelere paralel olarak artan bir şekilde bakteriler, mayalar, bitkiler ve diğer ökaryotik organizmalar kullanılarak endüstriyel düzeylerde üretilmektedir. Enzimler, çevre için risk oluşturmama, biyolojik yıkıma uğrama, hızlı ve yüksek özgüllikle reaksiyonları kataliz etme, endüstriyel proseslerde maliyeti önemli ölçüde düşürme, verimliliği artırma ve düşük atık üretimine yol açma gibi eşsiz avantajlara sahiptirler. Bu nedenle farklı endüstri alanlarında çok geniş bir kullanım yelpazesine sahiptirler. Bu tez çalışmasına da konu olan proteaz enzimleri, deterjan, gıda, ilaç, kimya, deri, kağıt ve ipek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta ve dünya genelindeki toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Adinarayana ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2002; Nascimento ve ark., 2016).

Enzimlerin endüstriyel üretiminde DNA teknolojileri çok önemli bir yer tutmaktadır. Bunun nedeni genel olarak enzimlerin kendi doğal ortamlarında üretilmesinin maliyetinin daha yüksek olmasıdır. Rekombinant DNA teknolojisi, insan için patojen olan veya toksin üreten, üretilmesi zor ve maliyeti yüksek olan, hatta kültüre edilemeyen mikroorganizmalara ait enzimlerin ve proteinlerin üretimine olanak tanımaktadır. Bu yolla özellikle ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalardan her geçen gün artan sayıda enzim elde edilmektedir. DNA teknolojileri, uygun promotörler, sinyal dizileri, çoklu gen kopyaları kullanarak enzim üretimini artırma olanağı sunmaktadır (Adrio ve Demain, 2010; Dalmaso ve ark., 2015; Liu ve ark., 2013; Raddadi ve ark., 2015). Enzimlerin aktivite, stabilite ve özgülüklerinin artırılmasını hedefleyen protein mühendisliği uygulamalarının da temelini de rekombinant DNA teknolojileri oluşturmaktadır (Damborsky ve Brezovsky, 2014; Singh ve ark., 2013). Bu verilerin ışığında, tez çalışması kapsamında halofilik bir arkebakteri olan *Haloracula hispanica*'ya ait iki proteaz enziminin *Escherichia coli* hücrelerinde rekombinant olarak üretilmesi, saflaştırılması ve proteaz aktiviteleri bakımından analizleri gerçekleştirilmiştir.

H. hispanica yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyen bir organizmadır. Bu bakımdan hücresel yapıları, protein ve enzimler bakımından yüksek tuz

konsantrasyonuna adapte olmuştur (Demina ve ark., 2016; Hanhijarvi ve ark., 2016; Zorgani ve ark., 2014).

E. coli hücreleri ile karşılaştırıldığında üremesi çok daha yavaş ve maliyetlidir. Bu bakımdan, DNA veri bankalarından yararlanılarak seçilen *H. hispanica*'ya ait serin proteaz ve proteaz genleri bu genlere özgü primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapacak şekilde plazmit vektörlere klonlandı. Elde edilen rekombinant plazmitler, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak seçilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edildi. Plazmit vektörlere klonlanan genlerin nihai kontrolleri DNA dizi analizleri ile gerçekleştirildi ve *E. coli* hücrelerinde rekombinant enzim sentezi çalışmalarında kullanıldı.

Çalışmaya *H. hispanica*'ya ait proteaz genlerinin izolasyonu ile başlandı. Prokaryotik organizma olması ve genlerinde intron taşımaması nedeniyle (Ding ve ark., 2014), *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz enzimlerini kodlayan DNA fragmentleri, direkt olarak genom DNA üzerinden PZR ile çoğaltıldı (Şekil 6.1, Şekil 6.2). Genom DNA üzerinden proteaz enzimlerini kodlayıcı bölgelerin PZR ile çoğaltılması aşamasında reaksiyon koşullarının optimize edilmesi dışında bir sorun yaşanmadı. Elde edilen proteaz gen fragmentleri, *E. coli* hücrelerinde ekspresyon için farklı plazmit vektörlere klonlandı.

Herhangi bir organizmaya ait proteinin başka bir prokaryotik ya da ökaryotik organizmada rekombinant olarak üretilmesinde değişik yöntemler izlenmektedir. Bunun için en temel gereksinim, protein kodlayacak DNA fragmentinin konak organizmada ekspresyon yapacak şekilde uygun regülasyon bölgelerinin kontrolünde klonlanmasıdır. *E. coli*, kolay ve düşük maliyetlerde üretilebildiği için, özellikle glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyon gerektirmeyen peptit ve proteinlerin rekombinant olarak üretilmesinde en çok kullanılan prokaryotik bir organizmadır (Baeshen ve ark., 2014; Rosano ve Ceccarelli, 2014).

E. coli hücrelerinde rekombinant protein sentezi için farklı protein ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Rekombinant olarak sentez edilecek proteinlerin bir kısmı konak bakteri için toksik etki gösterebilmektedir (Dumon-Seignovert ve ark., 2004; Rosano ve Ceccarelli, 2014; Özaydın, 2018). Bu gibi durumlarda laktoz operonunda bulunan lac promotöründe olduğu gibi regüle edilebilen ekspresyon sistemleri tercih edilmektedir. *Lac* operonu kontrol mekanizması direkt olarak protein

ekspresyonlarında kullanılabildiği gibi, indirekt olarak T7 RNA polimeraz enzimi sentezini kontrol eden mekanizma olarak da kullanılabilmektedir. İlk kez Studier ve arkadaşları (Dubendorff ve Studier, 1991; Rosenberg ve ark., 1987; Studier ve Moffatt, 1986) tarafından geliştirilmiş olan bakteriyofaj T7 promotörü ve T7 RNA polimeraz enzimine bağlı protein ekspresyon sistemi IPTG ile indirekt olarak kontrol edilmektedir. Bu araştırmacılar bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi tarafından tanınan promotöre sahip pET plazmit vektörlerini geliştirmişlerdir. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi çok aktif ve özgünlüğü yüksek olan bir enzimdir. Normal koşullarda T7 RNA polimeraz enzimi *E. coli* hücrelerinde sentez edilen bir enzim değildir. Bu enzim tarafından tanınan T7 bakteriyofaj promotörü *E. coli* RNA polimeraz enzimi tarafından tanınmaz. Dolayısıyla pET-14b plazmitinde bu promotör kontrolünde klonlanan genlerin transkripsiyonu için bakteriyofaj T7'ye ait RNA polimeraz enzimine gereksinim vardır. Bu nedenle bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimin kodlayan geninin konak hücrelere aktarılması gerekmektedir. Araştırmacılar pET-14b plazmit vektörlerinde T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan genlerin ekspresyon yapabilmesi için gerekli olan RNA polimeraz enzimini T7 bakteriyofajı ile konak hücreleri enfekte ederek sağlamışlardır. Bir diğer yöntem olarak bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* suşları (BL21-DE3) geliştirmişlerdir. *E. coli* genomuna entegre edilen bakteriyofaj T7 RNA polimeraz geni, IPTG ile indüklenen *lacUV5* promotör kontrolünde klonlanmıştır. Bu hücrelerinde T7 RNA polimeraz enzimi sentezinin IPTG ile indüklenmesi sağlanmıştır. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* suşları pET plazmitlerinde bakteriyofaj T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanan genlerin ekspresyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Baneyx, 1999; Graumann ve Premstaller, 2006; Rosano ve Ceccarelli, 2014). Bu tez çalışması kapsamında ele alınan *H. hispanica* proteaz genleri de ilk aşamada T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pET-14b plazmitine klonlandı ve pET-14b-Ser.Prot, pET-14b-Prot, pET-14b-Ser.Prot.Flag ve pET-14b-Prot.Flag olarak isimlendirilen bir dizi rekombinant plazmit elde edildi (Şekil 6.7). Farklı organizma gruplarında rekombinant DNA teknolojilerini kullanarak heterolog protein üretme çalışmalarında, sıklıkla karşılaşılan sorundan bir ekspresyon düzeyinin beklenenin çok altında gerçekleşmesi ya da hiç ekspresyonun saptanamamasıdır. Dolayısıyla çalışmalarda farklı promotör ve regülasyon bölgeleri

taşıyan plazmit vektörlerin kullanılması kaçınılmazdır. Bu tez çalışması kapsamında da *H. hispanica* proteaz genleri T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pET-14b plazmitine ek olarak aynı promotör diziyi taşıyan pBluescript II SK(+) plazmit vektöründe de klonlanarak pBlueT7-Ser.Prot, pBlueT7-Prot, pBlueT7-Ser.Prot.Flag ve pBlueT7-Prot.Flag plazmit vektörleri elde edildi. DNA dizi analizleri sonucunda, *H. hispanica* proteaz genlerinin gerek pET-14b gerekse pBluescript II SK(+) plazmitinde T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlaması ile elde edilen rekombinant vektörlerin istenilen genleri doğru oryantasyonda ve doğru nukleotid dizilere sahip olduğu ortaya kondu (Şekil 6.15, Şekil 6.16A).

Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanan genlerin ekspresyonu tamamen viral RNA polimeraz enzimi varlığına bağlıdır. *E. coli* hücrelerinde heterolog proteinlerin sentezi çalışmalarında, bakterinin kendi RNA polimeraz enzimi tarafından kullanılan lac, tac, lacI, ve trc *E. coli* promotör dizilerinden de yararlanmaktadır. Doğal koşullarda *E. coli* hücrelerine ait lac promotörü, lacI düzenleyici (regülatör) geni tarafından kodlanan bir repressör proteinin kontrolünde çalışan *cis-etkili* bir bölgedir. Bu promotör lacI geni tarafından kodlanan düzenleyici protein tarafından baskılanır (Balaeff ve ark., 2004; Villa ve ark., 2005). Düzenleyici proteinin lac promotörü üzerindeki baskısı laktoz şekeri ya da laktoz izomeri allolaktoza benzer bir molekül IPTG varlığında ortadan kalkar. IPTG, laktozun aksine *E. coli* hücrelerinde sentez edilen β -galaktozidaz enzimi tarafından substrat olarak kullanılmaz. Bu özellikleri nedeniyle, lac promotörü toksik etki gösteren, hücrelerin çoğalma hızını yavaşlatan, ya da inaktif formlarda sentez edilen proteinlerin kontrollü bir şekilde sentezini sağlamak amacıyla kullanışlı bir regülasyon bölgesidir (Drepper ve ark., 2011). Bu çalışma kapsamında kullanılan pBluescript II SK(+) plazmiti, bakteriyofaj T7 promotörüne ters oryantasyonda lac promotör dizisi de taşımaktadır. *H. hispanica* proteaz genlerinin klonlanmasında, pBluescript II SK(+) plazmitinin bu özelliği göz önünde bulundurularak, genler lac promotör dizisi kontrolünde de klonlandı ve pBlueLac-Ser.Prot, pBlueLac-Prot, pBlueLac-Ser.Prot.Flag ve pBlueLac-Prot.Flag olarak isimlendirilen ekspresyon vektörleri elde edildi.

E. coli hücrelerinde protein üretiminde yaygın olarak kullanılan promotörlerden tac promotörü (Amann ve ark., 1988) triptofan operonu ve laktoz

operonu promotörlerinin kombinasyonu ile oluşturulan yapay bir promotördür (de Boer ve ark., 1983). Çalışma kapsamında yaşanabilecek olası ekspresyon sorunları göz önünde tutularak *H. hispanica* proteaz genleri pAKTaq (Engelke ve ark., 1990) plazmit vektöründe tac promotörü kontrolünde klonlandı. Tac promotör dizisi kontrolünde *Termus aquaticus*'a ait DNA polimeraz geni taşıyan bu plazmit vektörde DNA polimeraz enzimi genin *H. hispanica* serin proteaz ve protez genleri ile değiştirildi (Şekil 6.12A).

Bakterilerde laktoz şekeri kullanımı ile ilgili operonun transkripsiyon düzeyinde kontrolü laktoz repressörü olarak da adlandırılan düzenleyici protein ile sağlanır (Lapierre ve ark., 2002). Bu protein lacI geni tarafından kodlanır ve laktoz yokluğunda β -galaktosidaz enzimi üretimini engeller. Laktoz operonunun yakınında yer alan bu gen sürekli anlatım yapan (konstitütif) bir gendir, dolayısıyla genin taşıdığı güçlü promotöre (lacI) bağlı olarak bol miktarda repressör protein sentezi gerçekleşir. pAKTaq plazmit vektörü, *T. aquaticus* DNA polimeraz geni ile birlikte lacI genini de yapısında taşımaktadır. Bu çalışmada *H. hispanica* protez geni, pAKTaq plazmitinden DNA polimeraz geninin çıkartılması ile oluşturulan pAK ara vektöründe lacI promotörü kontrolünde klonlanarak pLacI-Ser.Prot, pLacI-Prot.Flag pLacI-Prot, pLacI-GTG.Ser.Prot, pLacI-GTG.Prot.Flag, pLacI-GTG.Prot olarak isimlendirilen ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Şekil 6.13). Sonuç olarak, pET-14b, pBluescript II SK(+) , pAKTaq plazmitlerine *H. hispanica* serin protez ve proteaz genleri doğal halleriyle ya da flag uzantılı bir şekilde bakteriyofaj T7 promotörü, lac promotörü, tac promotörü ve lacI promotörü kontrolünde klonlanarak bir dizi *E. coli* ekspresyon vektörü elde edildi. DNA dizi analizleri ile doğrulukları kesinleşen bu plazmit vektörler *E. coli*'nin farklı suşlarına transforme edilerek, proteaz enzimlerinin sentez edilip edilmediği elektroforez teknikleri ile analiz edildi ve sentez edilen enzimler aktivite bakımından test edildi.

Proteinlerin doğal konak organizma dışında farklı bir organizmada rekombinant olarak üretilmesinde uygun regülasyon bölgelerinin seçilmiş olması her zaman olumlu sonuç vereceği anlamına gelmemektedir. Bunu belirlemenin yolu, rekombinant plazmitlerin konak bakteriye transforme edilmesi ve ilgili proteinlerinin sentez edilip edilmediğinin, SDS-PAGE teknikleri ile analiz edilmesidir. Dolayısıyla, bu çalışma kapsamından oluşturulan plazmit vektörlerden, bakteriyofaj T7 RNA

polimeraz promotörü taşıyan, bu nedenle T7 RNA polimeraz enzimine bağımlı olanlar *E. coli* BL21 suşuna transforme edildi ve bu hücrelerden hazırlanan total lizatlarda serin proteaz ve proteaz enzimleri elektroforez teknikleri ile incelendi. pET-14b plazmitine klonlanan *H. hispanica* serin proteaz enziminin hem doğal haliyle hem de flag uzantılı olarak *E. coli* BL21 hücrelerinde etkin bir şekilde sentez edildiği saptandı (Şekil 6.1A). Bu örneklerden flag uzantılı serin proteaz enziminin sentezi, anti-flag antikorları kullanılarak Western melezleme tekniği ile de doğrulandı (Şekil 6.19C). Benzer şekilde pBluescript II SK(+) plazmitinde bakteriyofaj T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanan serin proteaz geninin de ekspresyon yaptığı, fakat ekspresyondüzeyinin daha düşük olduğu görüldü (Şekil 6.19A). Buna karşın aynı plazmitlerde T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz geninin belirlenebilir düzeyde ekspresyon yapmadığı belirlendi (Şekil 6.19A, 6.19B). Proteaz geninin, serin proteaz geni ile birebir aynı regülasyon bölgeleri altında klonlanmasına, DNA dizi analizi sonuçlarının tasarlanan gen yapılarıyla uyumlu olmasına ve herhangi bir dizi hatasının bulunmamasına karşın (Şekil 6.15 - 6.18), proteaz ekspresyonunun saptanamamasının nedeninin enziminin stabil olmamasından ya da hücre için zararlı etkiye sahip olmasından kaynaklanabileceğini sonucuna varıldı. Bu tip sorunların aşılmasında izlenen yöntemler arasında *E. coli*'de düşük kopya oluşturan plazmit vektörlerin kullanılması ya da sıkı bir şekilde kontrol edilen promotörlerin kullanılmasıdır (Saida ve ark., 2006). pET-14b ve pBluescript II SK(+) plazmitlerinde yer alan T7 bakteriyofaj promotörü güçlü bir promotör olmakla birlikte, *E. coli* BL21 hücrelerinde T7 RNA polimeraz enzimini kodlayan gen IPTG ile indüklenen *lacUV5* promotör kontrolünde klonlanmıştır. Bu nedenle, T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz genlerinin dolaylı olarak kontrollü ekspresyon yapmaları beklenir. Bu plazmitler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinin IPTG içermeyen ortamlarda da serin proteaz enzimini kodladıkları, ortama IPTG eklenmesinin bu enzimin sentezinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Şekil 6.24). Benzer bir şekilde *E. coli* BL21 hücrelerinde proteaz enzimi sentezine IPTG'in etkili olmadığı görüldü (Şekil 6.23, Şekil 6.24). *E. coli* BL21 hücrelerinde IPTG olmaksızın T7 RNA polimeraz enziminin aktif olması ve buna bağlı olarak serin proteaz enziminin sentez edilmesi, *lacUV5* promotörünün tam olarak kontrol edilmediğini, az miktarda sentez edilen T7 RNA polimeraz enziminin

rekombinant protein ekspresyonu için yeterli olduğunu gösterdi. Yapılan çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir (Mertens ve ark., 1995; Studier, 1991).

Bakteriyofaj T7 promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz geninin *E. coli* BL21 hücrelerinde beklenen ekspresyonu göstermemesi, bu genin farklı promotörler kontrolünde klonlanarak denenmesini gerektirdi. Dolayısıyla proteaz geni *lac*, *tac* ve *lacI* promotörleri taşıyan plazmit vektörlere klonlandı (Şekil 6.10, Şekil 6.12A). Bu plazmitlerde taşınan promotörler *E. coli* promotörleri olduğundan, ekspresyon için *E. coli* BL21 suşu ile birlikte diğer suşların da denenmesine olanak verdi. Bununla birlikte *H. hispanica* proteaz enziminin rekombinant olarak üretilmesinde istenilen sonuç alınamadı (Şekil 6.20, Şekil 6.21). *E. coli* hücrelerinde, farklı plazmit vektörlerde farklı promotörlerin kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz geninin ekspresyonunun saptanamaması, bu iki organizma arasındaki kodon tercihi farklılığından ya da enzimin stabil olmamasından kaynaklanmış olması olasılığını güçlendirmektedir.

Bu çalışmasının önemli hedeflerinden biri de *E. coli* hücrelerinde sentez edilen *H. hispanica* serin proteaz ve proteaz enzimlerinin proteaz aktivitesine sahip olup olmadıklarının gösterilmesidir. Uygulanan koşullarda *H. hispanica* proteaz enziminin *E. coli* hücrelerinde istenilen düzeyde sentez edilememesi nedeniyle, enzim aktivitesi çalışmalarına serin proteaz enzimi üzerinden devam edildi. Çalışmada pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag plazmitleri ile transforme edilen *E. coli* BL21 bakteri suşu kullanıldı. İlk aşamada bu plazmitler ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinde serin proteaz üretimi için optimum sıcaklık koşulları belirlendi. Rekombinant protein üretiminde, kullanılan besiyerinin içeriği ile birlikte ortam sıcaklığı büyük önem taşımaktadır. Kültürlerin üretildiği sıcaklık sadece protein miktarı için değil aynı zamanda proteinlerin aktiviteleri açısından da önemlidir (de Groot ve Ventura, 2006). Bu çalışmada da üç farklı sıcaklıkta (25°C, 30°C ve 37°C) hazırladığımız *E. coli* BL21 kültürlerinde en yüksek serin proteaz sentezinin 30°C’da hazırlanan kültürde gerçekleştiği görüldü (Şekil 6.22).

Rekombinant proteini üretimi sırasında, ele alınan proteinlerin hücre içerisinde inklüzyon cisimcikleri olarak da adlandırılan çözünmeyen agregatlar halinde birikmesi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Baneyx ve Mujacic, 2004; Clark, 2001; Yamaguchi ve Miyazaki, 2014). Bu şekilde sentez edilen proteinler çoğunlukla aktif

konformasyonda değildir (Carrio ve Villaverde, 2001). Bu durum rekombinant proteinler için bir dezavantaj olarak görülse de, proteinlerin saflaştırılması aşamasında büyük kolaylık sağlamaktadır (Vallejo ve Rinas, 2004). Çalışmada, pET-14b-Ser.Prot ve pET-14b-Ser.Prot.Flag plazmitleri ile transforme edilen ve 30 °C’da üretilen *E. coli* BL21 hücreleri sonikasyon ile parçalandıktan sonra, santrifüj ile elde edilen üst sıvıda ve çökeltide serin proteaz enzimi SDS-PAGE ile analiz edildiğinde, üst sıvıda daha az çökeltide ise daha fazla enzimin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 6.25). Bu veriler *H. hispanica* serin proteaz enziminin *E. coli* hücrelerinde daha çok inklüzyon cisimcikleri şeklinde biriktiği sonucunu verdi. Bu durum, yukarıda da değinildiği gibi, serin proteaz enzimlerinin, diğer hücresel artıklardan ayrıştırılmasında önemli bir kolaylık sağladı. Serin proteaz sentez eden *E. coli* hücrelerinin sıcaklık uygulaması ile parçalanması sonucu elde edilen lizatlarda ve bu lizatlardan aseton ile çöktürülerek elde edilen örneklerde, serin proteazın diğer hücresel artıklardan büyük ölçüde arındırılmış olduğu saptandı (Şekil 6.26, Şekil 6.27, Şekil 6.28, Şekil 6.29). Proteaz enzimleri, peptit ve proteinlerin yapıtaşları olan amino asitler arasındaki kovalent bağları (peptit bağları) kıran enzimlerdir (Lopez-Otin ve Bond, 2008). Bu enzimlerin katalizörlüğünde organizmalar dışarıdan alınan besinlerin parçalanmasını ya da hücre içi protein sentez-yıkım döngüsünün devamlılığını sağlarlar (Bell ve ark., 2016). Dolayısıyla proteinlerin proteaz enzimleri ile yıkılması reaksiyonları hem hücre içerisinde hem de hücre dışında gerçekleştirilir. Özellikle bir kısım mikroorganizmalar, sentez ettikleri proteaz enzimlerini hücre dışına salgılar ve ortamda bulunan proteinlerin yıkımının kataliz ederler (Rao ve ark., 1998). Mikrobiyolojide, farklı mikroorganizma türlerinin hücre dışına salgılanan proteazlar bakımından aktif olup olmadıkları, protein içeren katı besiyerlerinde test edilir (Ribitsch ve ark., 2012). Yaygın olarak kullanılan testlerden biri de milk-agar besiyerine hücrelerin ekilmesi ve proteaz aktivitesine bağlı olarak protein yıkım zonlarının oluşup oluşmadığına bakılmasıdır. Bu çalışmada da *H. hispanica* proteaz genleri aktarılmış, ya da bu genleri taşımayan *E. coli* suşları milk-agar besiyerine öze ile yayma yöntemi ile ekilerek, proteaz aktiviteleri bakımından test edildi. Kullanılan *E. coli* suşlarından BL21 suşunda endojen proteazlara bağlı olarak protein yıkım zorlarının oluştuğu saptandı (Şekil 6.30). *E. coli* DH5α, JM107, Top10 ve Mach1 hücrelerinde ise belirgin bir zon oluşumu gözlenmedi (Şekil 6.31). *H. hispanica*’ya ait serin proteaz ve proteaz enzimlerinin doğal ortamlarında ya da

rekombinant olarak başka bir konak hücrelerde üretildiklerinde hücre dışına salgılanıp salgılanmadıklarına dair bir veriye rastlanmadı. *H. hispanica* proteaz geni aktarılan *E. coli* BL21 suşlarının milk agar besiyerindeki üreme profilleri incelendiğinde, kontrole oranla daha fazla protein yıkımı saptandı (Şekil 6.30 / 1-2-3). Bununla birlikte *E. coli* BL21 suşunun endojen proteazlar bakımından aktif olması, bu sonuca kuşkulu yaklaşmamıza neden oldu. Aynı şekilde *H. hispanica* proteaz geni aktarılan diğer *E. coli* hücrelerinin proteaz aktiviteleri milk-agar besiyerlerine ekilerek test edildi, fakat proteaz aktivitelerinde bir değişiklik saptanamadı (Şekil 6.32).

İntrasellüler protein ya da enzimlerin elde edilebilmesi için hücrelerin parçalanması gerekir. Bunun için özellikle bakteri veya maya hücrelerinin parçalanmasında mekanik ya da mekanik olamayan (kimyasal/enzimatik yıkım) yöntemler izlenir (Najafpour, 2007). Ekstraksiyon işleminden sonra enzimlerin aktivitelerini korunması önemlidir. Bu gibi durumlarda mekanik yöntemlerden biri olan (sonikatör) ile hücrelerin parçalanması tercih edilen bir yöntemdir (Capelo ve ark., 2004; Lee Ying Yeng ve ark., 2013). Bu çalışmada da ilk aşamada *H. hispanica* serin proteaz geni aktarılan hücrelerden sonikatör ile parçalanarak hazırlanan lizatlarda proteaz aktiviteleri test edildi. Proteaz aktivitelerinin test edilmesinde iki farklı yol izlendi. Bunlardan ilkinde hazırlanan hücre lizatlarının standart bovin serum albümini (BSA) hidroliz edip etmedikleri analiz edildi. Fosfat tamponunda, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının varlığında da gerçekleştirilen reaksiyonda BSA'nın hem kontrol hücrelerden hem de serin proteaz sentez eden hücrelerden hazırlanan lizatlar ile hemen hemen aynı oranlarda yıkıldığı saptandı. Mg^{2+} iyonu varlığında, hücre lizatlarında bulunan proteazların hem de kontrol olarak kullanılan tripsin enziminin daha aktif olduğu gözlemlendi (Şekil 6.33). Dolayısıyla BSA proteininde görülen yıkımın *H. hispanica* serin proteazından ziyade endojen proteazlardan kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Bu tez çalışmasında *H. hispanica*'ya ait genom projesi çalışması sonucunda serin proteaz geni olarak tanımlanan bölgenin (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP006884.1> -erişim tarihi 06.02.18) T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılması ile bu enzimin etkin bir şekilde üretilmesi sağlanmıştır. Buna karşın sentez edilen

proteinlerin hücrelerde inklüzyon cisimleri halinde sentez edilmiş olması yüksek bir olasılıktır. Sonikasyon ile parçalanmış hücrelerde, serin proteaz enzimlerinin önemli bir kısmının santrifüjleme ile ayrıştırılan çöktide çıkması (Şekil 6.25) bu durumu desteklemektedir. Parçalanmış hücrelerden elde edilen üst sıvılarda düşüş miktarlarında serin proteaz enziminin saptanması, ekstraksiyon yönteminde değişiklik yapmamızı gerektirdi. Serin proteaz kodlayan plazmit aktarılan *E. coli* BL21 hücreleri 95 °C’da sıcakta üre ve DTT içeren tamponda parçalandığında, enzimlerin çözünür hale geçtiği ve primer yapılarını koruduğu saptandı (Şekil 6.26). Uygulanan bu yöntemin en önemli dezavantajı üretilen rekombinant proteinlerin denatüre olma olasılığıdır.

Bakterilerde inaktif inklüzyon cisimleri halinde sentez edilen rekombinant proteinlerin, denatüre koşullarda çözünür hale dönüştürülmesi ve aktif formda yeniden katlanması sıklıkla başvurulan yöntemlerdir (Ramage ve ark., 1995; Singh ve ark., 2015). Diyaliz ortamında üre ve 2-β merkaptotanol gibi denatüre edici maddelerin kademeli bir şekilde uzaklaştırılması ile proteinlerin aktif formda yeniden katlanabildiği gösterilmiştir (Jevsevar ve ark., 2005; Upadhyay ve ark., 2014). Mevcut bu literatür verilerinden yola çıkarak denatüre koşullarda elde edilen serin proteaz örnekleri, üre ve 2-β merkaptotanol konsantrasyonları kademeli olarak azaltılan tamponlara ve sonrasında bu maddeleri içermeyen tampona karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrasında proteinler SDS-PAGE ile incelendiğinde primer yapılarını muhafaza ettikleri ve önemli ölçüde saf oldukları belirlendi (Şekil 6.27). Elde edilen bu örnekler NaCl içermeyen, 100 mM ve 300 mM konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda BSA üzerinde denendi. SDS-PAGE ile yapılan analizler enzim etkisinde bırakılan BSA örneklerinde önemli bir yıkım olmadığı saptandı (Şekil 6.34, 6.35).

Denatüre koşullarda ekstre edildikten sonra diyaliz edilen *H. hispanica* serin proteaz enzimi aktivitesine şelatlayıcı ve redükleyici moleküllerin (EDTA, DTT ve 2-β merkaptotanol) olası etkileri araştırıldı. Şelatlayıcı bir molekül olan EDTA’nın bazı serin proteazlar ve özellikle metalloproteinazlar üzerinde inhibe edici etki yaptığı bildirilmektedir (Hamin Neto ve ark., 2016; Hazra ve ark., 2012; Rao ve ark., 1998; Shimokawa Ki ve ark., 2002; Wankhade ve ark., 2011). Bu çalışmada EDTA’nın serin proteaz enziminin aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, buna karşın kontrol olarak kullanılan tripsin enziminin aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 6.36). Proteazlar ile yapılan bazı çalışmalarda redükleyici ajanların

enzim aktivitelerini arttırdığı bilinmektedir (Kamran ve ark., 2015; Beg ve Gupta, 2003; Esakkiraj ve ark., 2016).

Dolayısıyla DTT ve 2-β merkaptetanolün serin proteaz enzimlerinin aktif forma dönüşmelerinde yardımcı olabileceği düşünüldü. DTT'nin kontrol olarak kullanılan tripsinin aktivitesini arttırmakla birlikte, enzim ya da serin proteaz içermeyen ortamlarda da BSA'da kısmen yıkılmaya neden olduğu saptandı. Bu nedenle DTT'nin *H. hispanica* serin proteaz enzimi üzerindeki etkisi ile ilgili bir sonuca varılamadı. Redükleyici bir ajan olan 2-β merkaptetanol içeren ortamda gerçekleştirilen reaksiyonlarda serin proteazın BSA'da yıkıma neden olduğu belirlendi. Serin proteaz içermeyen ortamda ise 2-β merkaptetanole bağlı bir yıkım gerçekleşmedi. Bu sonuç *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *H. hispanica* serin proteaz enziminin, denatüre koşullarda ekstre edildiğinde, diyaliz yöntemiyle denatüre edici ajanların kademeli olarak uzaklaştırılması ile aktif forma dönüştürülebileceğini düşündürdü.

Azokazein substrat kullanılarak, sonik parçalama ile hazırlanan hücre lizatlarında beklenen proteolitik aktivite saptanamamıştır (Şekil 6.37). Bu sonucun rekombinant serin proteaz enziminin çözünür formda sentez edilmemesi ve önemli ölçüde inaktif inklüzyon cisimleri halinde sentez edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğer olasılık *H. hispanica* genom projesi sonucu elde edilen verilerden serin proteaz geni olduğu varsayılan açık okuma çerçevesinin aktif proteaz enzimi kodlamamasıdır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında *H. hispanica* genomu üzerinde proteaz ve serin proteaz geni olarak tanımlanan açık okuma çerçeveleri, rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak farklı kontrol elementlerine sahip çok sayıda *E. coli* ekspresyon vektörlerine klonlandı. Farklı promotör dizileri kontrolünde klonlanan *H. hispanica* proteaz geninin *E. coli* hücrelerinde istenilen düzeylerde ekspresyon yapmadığı görüldü. Buna karşın T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanan *H. hispanica* serin proteaz geninin, T7 RNA polimeraz enzimi kodlayan *E. coli* BL21 hücrelerinde, diğer hücresel proteinleri ile karşılaştırıldığında yüksek düzeylerde ekspresyon yaptığı saptandı. Hücre lizatlarının SDS-PAGE ile analizleri sonucunda *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen serin proteaz enzimlerinin inaktif

inklüzyon cisimleri halinde sentez edildiği belirlendi. İnküzyon cisimleri halinde sentez edilen serin proteaz enzimlerinin çözüñür forma dönüştürülmesinde kısmen başarı sağlansa da, elde edilen örneklerde istenilen düzeylerde enzim aktivitesi saptanamadı. *E. coli* hücrelerinde yüksek düzeylerde sentez edilen ve denatüre koşullarda hazırlandığında primer yapısını koruyan *H. hispanica* serin proteaz enziminin tekrar aktif forma katlanmasına yönelik çalışmalar sürdürölmektedir.



8. KAYNAKLAR

- Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS: Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech* 2003;4:E56.
- Adrio JL, Demain AL: Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng Bugs* 2010;1:116-131.
- Al-Awadhi FH, Ratnayake R, Paul VJ, Luesch H: Tasiamide F, a potent inhibitor of cathepsins D and E from a marine cyanobacterium. *Bioorg Med Chem* 2016;24:3276-3282.
- Alves AC, Rogana E, Barbosa Cde F, Ferreira-Alves DL: The correction of reaction rates in continuous fluorometric assays of enzymes. *J Biochem Biophys Methods* 2007;70:471-479.
- Amann E, Ochs B, Abel KJ: Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988;69:301-315.
- Andallu B, Suryakantham V, Lakshmi Srikanthi B, Reddy GK: Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2001;314:47-53.
- Andallu B, Varadacharyulu N: Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2003;338:3-10.
- Anderson IJ, DasSarma P, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Del Rio TG, Tice H, Dalin E, Bruce DC, Goodwin L, Pitluck S, Sims D, Brettin TS, Detter JC, Han CS, Larimer F, Hauser L, Land M, Ivanova N, Richardson P, Cavicchioli R, DasSarma S, Woese CR, Kyrpides NC: Complete genome sequence of the Antarctic *Halorubrum lacusprofundi* type strain ACAM 34. *Stand Genomic Sci* 2016;11:70.
- Andrei AS, Banciu HL, Oren A: Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett* 2012;330:1-9.
- Anitha TS, Palanivelu P: Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expr Purif* 2013;88:214-220.

- Antao CM, Malcata FX: Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem* 2005;43:637-650.
- Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VG: Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2005;248:65-68.
- Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH, Mahajan RT: Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. *Pharm Biol* 2014;52:1487-1503.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Redwan EM: Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* 2014;13:141.
- Bairoch A: The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 2000;28:304-305.
- Balaeff A, Koudella CR, Mahadevan L, Schulten K: Modelling DNA loops using continuum and statistical mechanics. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2004;362:1355-1371.
- Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC, 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW: Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6796-6800.
- Baneyx F, Mujacic M: Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2004;22:1399-1408.
- Baneyx F: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:411-421.
- Barrett AJ, Rawlings ND: Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys* 1995;318:247-250.
- Beg QK, Gupta R. Purification ve characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme ve Microbial Technology* 2003;32:294–304.
- Bell RA, Al-Khalaf M, Megeney LA: The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle* 2016;6:16.
- Beuth J: Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? *Integr Cancer Ther* 2008;7:311-316.

- Boller T. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plants with other organisms.
In: Dalling MJ, eds. Plant Proteolytic Enzymes. Vol.1 ed. Boca Raton, Florida: CRC;1986, p: 67–96.
- Borjian F, Han J, Hou J, Xiang H, Zarzycki J, Berg IA: Malate Synthase and beta-Methylmalyl Coenzyme A Lyase Reactions in the Methylaspartate Cycle in *Haloarcula hispanica*. J Bacteriol 2017;199.
- Brannon JR, Thomassin JL, Gruenheid S, Le Moual H: Antimicrobial Peptide Conformation as a Structural Determinant of OmpT Protease Specificity. J Bacteriol 2015;197:3583-3591.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:207-214.
- Brocklehurst K, Philpott MP: Cysteine proteases: mode of action and role in epidermal differentiation. Cell Tissue Res 2013;351:237-244.
- Bromme D, Kaleta J: Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. Curr Pharm Des 2002;8:1639-1658.
- Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N: The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. FEMS Microbiol Ecol 2005;51:155-166.
- Calo D, Guan Z, Naparstek S, Eichler J: Different routes to the same ending: comparing the N-glycosylation processes of *Haloferax volcanii* and *Haloarcula marismortui*, two halophilic archaea from the Dead Sea. Mol Microbiol 2011;81:1166-1177.
- Capelo JL, Ximenez-Embun P, Madrid-Albarran Y, Camara C: Enzymatic probe sonication: enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. Anal Chem 2004;76:233-237.
- Carrio MM, Villaverde A: Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. FEBS Lett 2001;489:29-33.
- Cavicchioli R: Archaea--timeline of the third domain. Nat Rev Microbiol 2011;9:51-61.
- Chapman HA, Riese RJ, Shi GP: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annu Rev Physiol 1997;59:63-88.

- Clark ED: Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:202-207.
- Cline SW, Doolittle WF: Transformation of members of the genus *Haloarcula* with shuttle vectors based on *Halobacterium halobium* and *Haloferax volcanii* plasmid replicons. *J Bacteriol* 1992;174:1076-1080.
- Cobb RE, Si T, Zhao H: Directed evolution: an evolving and enabling synthetic biology tool. *Curr Opin Chem Biol* 2012;16:285-291.
- Coolbear T, Daniel RM, Morgan HW: The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1992;45:57-98.
- Cui H, Yang M, Wang L, Xian CJ: Identification of a New Marine Bacterial Strain SD8 and Optimization of Its Culture Conditions for Producing Alkaline Protease. *PLoS One* 2015;10:e0146067.
- Çakır,A. Halofilik Mikroorganizmalar Olan *Pseudomonas halophila* DSM 3050 ve *Haloarcula hispanica* ATCC 33960'da Glutasyon S-Transferaz (GST) Enziminin Optimizasyonu ve Spesifik Aktivitesinin Belirlenmesi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Eskişehir (Danışman: Prof. Dr. K Güven).
- da Silva RR, Caetano RC, Okamoto DN, de Oliveira LC, Bertolin TC, Juliano MA, Juliano L, de Oliveira AH, Rosae JC, Cabral H: The identification and biochemical properties of the catalytic specificity of a serine peptidase secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Protein Pept Lett* 2014;21:663-671.
- da Silva RR, de Freitas Cabral TP, Rodrigues A, Cabral H: Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. *Braz J Microbiol* 2013;44:235-243.
- da Silva RR, Souto TB, de Oliveira TB, de Oliveira LC, Karcher D, Juliano MA, Juliano L, de Oliveira AH, Rodrigues A, Rosa JC, Cabral H: Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2016;43:1059-1069.

- da Silva RR: Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2017;183:1-19.
- Dali B, Keita M, Megnassan E, Frecer V, Miertus S: Insight into selectivity of peptidomimetic inhibitors with modified statine core for plasmepsin II of *Plasmodium falciparum* over human cathepsin D. *Chem Biol Drug Des* 2012;79:411-430.
- Dalmaso GZ, Ferreira D, Vermelho AB: Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs* 2015;13:1925-1965.
- Damborsky J, Brezovsky J: Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 2014;19:8-16.
- Danon A, Caplan SR: CO₂ fixation by *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett* 1977;74:255-258.
- Dash C, Kulkarni A, Dunn B, Rao M: Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2003;38:89-119.
- Davies DR: The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem* 1990;19:189-215.
- de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M: The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:21-25.
- de Groot NS, Ventura S: Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* 2006;580:6471-6476.
- de Souza PM, Bittencourt ML, Caprara CC, de Freitas M, de Almeida RP, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira Filho EX, Pessoa Junior A, Magalhaes PO: A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol* 2015;46:337-346.
- Dehart MP, Anderson BD: The role of the cyclic imide in alternate degradation pathways for asparagine-containing peptides and proteins. *J Pharm Sci* 2007;96:2667-2685.
- Demina TA, Atanasova NS, Pietila MK, Oksanen HM, Bamford DH: Vesicle-like virion of *Haloarcula hispanica* pleomorphic virus 3 preserves high infectivity in saturated salt. *Virology* 2016;499:40-51.

- Ding JY, Chiang PW, Hong MJ, Dyll-Smith M, Tang SL: Complete Genome Sequence of the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula hispanica* Strain N601. *Genome Announc* 2014;2.
- Doi K, Kojima T, Fujimoto Y: Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 2000;23:1066-1071.
- Doron L, Copenhagen-Glazer S, Ibrahim Y, Eini A, Naor R, Rosen G, Bachrach G: Identification and characterization of fusolisin, the *Fusobacterium nucleatum* autotransporter serine protease. *PLoS One* 2014;9:e111329.
- Dos Santos Aguilar JG, Sato HH: Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res Int* 2018;103:253-262.
- Dou Z, Carruthers VB: Cathepsin proteases in *Toxoplasma gondii*. *Adv Exp Med Biol* 2011;712:49-61.
- Drepper T, Krauss U, Meyer zu Berstenhorst S, Pietruszka J, Jaeger KE: Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90:23-40.
- Dubendorff JW, Studier FW: Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 1991;219:45-59.
- Dubey VK, Pande M, Singh BK, Jagannadham MV. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*. 2007; 6: 1077-1086.
- Dubois T, Kleinschmidt T, Schnek AG, Looze Y, Braunitzer G: The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. II. The primary structure of proteinase omega. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369:741-754.
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L: The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 2004;37:203-206.
- Eichler J: Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* 2001;19:261-278.

- Eken B. *Thermus Aquaticus* DNA Polimeraz I Enziminin Rekombinant DNA Teknolojisi İle Üretimesi, Saflaştırılması ve Analizi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. K Turan).
- Elshahed MS, Savage KN, Oren A, Gutierrez MC, Ventosa A, Krumholz LR: *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2275-2279.
- Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D: Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 1990;191:396-400.
- Esakkiraj P, Meleppat B, Lakra AK, Ayyanna R, Arul V. Cloning, expression, characterization ve application of protease produced by *Bacillus cereus* PMW8. *RSC Advances* 2016;6:38611-38616.
- Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Haddar A, Kanoun S, Nasri M: A novel serine metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather meal: biochemical and molecular characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:329-344.
- Feijoo-Siota L, Blasco L, Rodriguez-Rama JL, Barros-Velazquez J, Miguel T, Sanchez-Perez A, Villa TG: Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Adv DNA Gene Seq* 2014;8:44-55.
- Fujinami S, Fujisawa M: Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-- past, present and future. *Environ Technol* 2010;31:845-856.
- Garcia V, Rovira S, Boutoia K, Ferrandini E, Lopez Morales MB: Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*). *J Sci Food Agric* 2014;94:552-559.
- Gen Lei X, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H. Phytase: source, structure ve application. In Polaina J, MacCabe AP, eds. *Industrial Enzymes: Structures, Function ve Applications*. 1nd ed. Dordrecht: Springer; 2007, p: 505-530
- Gills JJ, Lopiccio J, Tsurutani J, Shoemaker RH, Best CJ, Abu-Asab MS, Borojerdi J, Warfel NA, Gardner ER, Danish M, Hollander MC, Kawabata S, Tsokos M, Figg WD, Steeg PS, Dennis PA: Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress,

- autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2007;13:5183-5194.
- Godfrey T, West S. Introduction industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, eds. *Industrial Enzymology*. 2nd ed. London: Macmillan; 1996, p:1-8.
- Graumann K, Premstaller A: Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 2006;1:164-186.
- Guevara MG, Daleo GR, Oliva CR: Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiol Plant* 2001;112:321-326.
- Gupta R, Beg QK, Lorenz P: Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:15-32.
- Gupta R, Sharma R, Beg QK: Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 2013;33:216-228.
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V: A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int* 2013;2013:329121.
- Haki GD, Rakshit SK: Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 2003;89:17-34.
- Halabi N, Rivoire O, Leibler S, Ranganathan R: Protein sectors: evolutionary units of three-dimensional structure. *Cell* 2009;138:774-786.
- Hamin Neto YA, de Oliveira LC, de Oliveira JR, Juliano MA, Juliano L, Arantes EC, Cabral H: Analysis of the Specificity and Biochemical Characterization of Metalloproteases Isolated from *Eupenicillium javanicum* Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptides. *Front Microbiol* 2016;7:2141.
- Hanhijarvi KJ, Ziedaite G, Haeggstrom E, Bamford DH: Temperature and pH dependence of DNA ejection from archaeal lemon-shaped virus His1. *Eur Biophys J* 2016;45:435-442.
- Hartmann R, Sickinger HD, Oesterhelt D: Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:3821-3825.
- Hazra S, Guha R, Jongkey G, Palui H, Mishra A, Vemuganti GK, Basak SK, Mandal TK, Konar A: Modulation of matrix metalloproteinase activity by EDTA prevents posterior capsular opacification. *Mol Vis* 2012;18:1701-1711.

- Heredia-Sandoval NG, Valencia-Tapia MY, Calderon de la Barca AM, Islas-Rubio AR: Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality. *Foods* 2016;5.
- Hirai T, Kanda T, Sato K, Takaishi M, Nakajima K, Yamamoto M, Kamijima R, Digiovanni J, Sano S: Cathepsin K is involved in development of psoriasis-like skin lesions through TLR-dependent Th17 activation. *J Immunol* 2013;190:4805-4811.
- Horn SJ, Aspino SI, Eijsink VG: Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *J Appl Microbiol* 2005;99:1082-1089.
- Hutcheon GW, Vasisht N, Bolhuis A: Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles* 2005;9:487-495.
- In: Dalling MJ, eds. *Plant Proteolytic Enzymes*. Vol.1 ed. Boca Raton, Florida: CRC; Jaakkola ST, Penttinen RK, Vilen ST, Jalasvuori M, Ronnholm G, Bamford JK, Bamford DH, Oksanen HM: Closely related archaeal *Haloarcula hispanica* icosahedral viruses HHIV-2 and SH1 have nonhomologous genes encoding host recognition functions. *J Virol* 2012;86:4734-4742.
- Jang MH, Kim H, Shin MC, Lim BV, Lee TH, Jung SB, Kim CJ, Kim EH: Administration of *Folium mori* extract decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 2002;90:189-192.
- Javor BJ: Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:352-360.
- Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V: Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog* 2005;21:632-639.
- Jiang B, Siregar U, Willeford KO, Luthe DS, Williams WP: Association of a 33-kilodalton cysteine proteinase found in corn callus with the inhibition of fall armyworm larval growth. *Plant Physiol* 1995;108:1631-1640.

- Juez G, Rodriguez-Valera F, Ventosa A, Kushner D *Haloarcula hispanica* sp. nov. ve *Haloferax gibbonsii* sp. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 1986; 8: 75–79.
- Kamekura M, Dyall-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, Kates M: Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:853-857.
- Kamran A, Ur Rehman H, Ul Qader SA, Baloch AH, Kamal M: Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. *J Genet Eng Biotechnol* 2015;13:59-64.
- Kaneda M, Tominaga N: Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *J Biochem* 1975;78:1287-1296.
- Kasana RC, Salwan R, Yadav SK: Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:262-276.
- Kasana RC: Proteases from psychrotrophs: an overview. *Crit Rev Microbiol* 2010;36:134-145.
- Kastritis PL, Papandreou NC, Hamodrakas SJ: Haloadaptation: insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. *Int J Biol Macromol* 2007;41:447-453.
- Khemili-Talbi S, Kebbouche-Gana S, Akmuoussi-Toumi S, Angar Y, Gana ML: Isolation of an extremely halophilic arhaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles* 2015;19:1109-1120.
- Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, Janssen PH: Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One* 2013;8:e47879.

- Klompong V, Benjakul S, Yachai M, Visessanguan W, Shahidi F, Hayes KD: Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *J Food Sci* 2009;74:C126-133.
- Koga Y, Morii H: Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:97-120.
- Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K: Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J* 2004;37:370-378.
- Kotb RM, Abdella AA, El Kateb MA, Ahmed AM: Clinical evaluation of Papacarie in primary teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2009;34:117-123.
- Krem MM, Di Cera E: Molecular markers of serine protease evolution. *EMBO J* 2001;20:3036-3045.
- Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish VK: Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit Rev Biotechnol* 2010;30:243-258.
- Kwan JC, Eksioglu EA, Liu C, Paul VJ, Luesch H: Grassystatins A-C from marine cyanobacteria, potent cathepsin E inhibitors that reduce antigen presentation. *J Med Chem* 2009;52:5732-5747.
- Lapierre L, Mollet B, Germond JE: Regulation and adaptive evolution of lactose operon expression in *Lactobacillus delbrueckii*. *J Bacteriol* 2002;184:928-935.
- Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R: Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008;15:74-92.
- Lecaille F, Kaleta J, Bromme D: Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 2002;102:4459-4488.
- Lee Ying Yeng A, Kadir MS, Ghazali HM, Raja Abd Rahman RN, Saari N: A comparative study of extraction techniques for maximum recovery of glutamate decarboxylase (GAD) from *Aspergillus oryzae* NSK. *BMC Res Notes* 2013;6:526.
- Li S, He B, Bai Z, Ouyang P. A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A. *Journal of Molecular Catalysis B*. 2009;56(2-3):85–88.

- Littlechild JA: Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts. *Archaea* 2015b;2015:147671.
- Littlechild JA: Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2015a;3:161.
- Liu J, Huang X, Withers BR, Blalock E, Liu K, Dickson RC: Reducing sphingolipid synthesis orchestrates global changes to extend yeast lifespan. *Aging Cell* 2013;12:833-841.
- Llorente BE, Brutti CB, Caffini NO: Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem* 2004;52:8182-8189.
- Lockwood LB: Industrial enzymes, production and use. *Trans N Y Acad Sci* 1952;15:2-5.
- Lopes MC, Mascarini RC, da Silva BM, Florio FM, Basting RT: Effect of a papain-based gel for chemomechanical caries removal on dentin shear bond strength. *J Dent Child (Chic)* 2007;74:93-97.
- Lopez-Otin C, Bond JS: Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 2008;283:30433-30437.
- Lotz-Winter H: On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta Med* 1990;56:249-253.
- Lu Q, Han J, Zhou L, Zhou J, Xiang H: Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *J Bacteriol* 2008;190:4173-4180.
- Macchione MM, Merheb CW, Gomes E, da Silva R: Protease production by different thermophilic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 2008;146:223-230.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK: Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:461-488.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
- Martin P, Raymond MN, Bricas E, Dumas BR: Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochim Biophys Acta* 1980;612:410-420.

- Martinez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM: The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys J* 2015;109:1082-1086.
- Martinez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ: Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *J Exp Bot* 2007;58:1099-1107.
- Maurer HR: Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1234-1245.
- Maurer KH: Detergent proteases. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:330-334.
- McDonald AG, Boyce S, Tipton KF: ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D593-597.
- McDonald AG, Tipton KF: Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *FEBS J* 2014;281:583-592.
- McGrath ME: The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1999;28:181-204.
- Mecikoglu M, Saygi B, Yildirim Y, Karadag-Saygi E, Ramadan SS, Esemeli T: The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:1208-1214.
- Merheb-Dini C, Cabral H, Leite RS, Zanphorlin LM, Okamoto DN, Rodriguez GO, Juliano L, Arantes EC, Gomes E, da Silva R: Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *J Agric Food Chem* 2009;57:9210-9217.
- Mertens N, Remaut E, Fiers W: Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N Y)* 1995;13:175-179.
- Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Kaushik JK, Grover S, Batish VK: Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Dairy Res* 2003;70:37-43.
- Morishima H, Takita T, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H: The structure of pepstatin. *J Antibiot (Tokyo)* 1970;23:263-265.
- Motwani HV, De Rosa M, Odell LR, Hallberg A, Larhed M: Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. *Eur J Med Chem* 2015;90:462-490.

- Motyán JA, Toth F, Tozser J: Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 2013;3:923-942.
- Mullakhanbhai MF, Larsen H: *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol* 1975;104:207-214.
- Muller JA, DasSarma S: Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine N-oxide as terminal electron acceptors. *J Bacteriol* 2005;187:1659-1667.
- Najafpour GD. advanced downstream processing in biotechnology. In Najafpour GD, eds. *Biochemical Engineering ve Biotechnology*. 1st ed. Amsterdam; Elsevier; 2007, p: 390-415.
- Nascimento TP, Sales AE, Porto CS, Brandao RM, de Campos-Takaki GM, Teixeira JA, Porto TS, Porto AL, Converti A: Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016;1025:16-24.
- Neurath H: The versatility of proteolytic enzymes. *J Cell Biochem* 1986;32:35-49.
- Niyonzima FN, More S: Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep Biochem Biotechnol* 2015;45:233-258.
- Oda K: New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J Biochem* 2012;151:13-25.
- Oren A, Arahal DR, Ventosa A: Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:637-642.
- Oren A, Ventosa A: International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Halobacteriaceae: minutes of the closed meeting, 31 July 2014, Montreal, Canada. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:3913.
- Oren A: Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 2008;4:2.
- Oren A: Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;39:1-7.

- Özaydın Ş. İnfluenza Virüsü Yüzey Antijen Proteinlerinin Mikroorganizmalarda Rekombinant Olarak Üretilmesi ve Analizi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. K Turan).
- Page MJ, Di Cera E: Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1220-1236.
- Pechan T, Ye L, Chang Y, Mitra A, Lin L, Davis FM, Williams WP, Luthe DS: A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. *Plant Cell* 2000;12:1031-1040.
- Petrov V, Fagard R, Lijnen P: Effect of protease inhibitors on angiotensin-converting enzyme activity in human T-lymphocytes. *Am J Hypertens* 2000;13:535-539.
- Pino A, Prados F, Galan E, McSweeney PLH, Fernandez-Salguero J. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Res Int.* 2009;42:324–30
- Porter K, Russ BE, Dyall-Smith ML: Virus-host interactions in salt lakes. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:418-424.
- Porter K, Tang SL, Chen CP, Chiang PW, Hong MJ, Dyall-Smith M: PH1: an archaeovirus of *Haloarcula hispanica* related to SH1 and HHIV-2. *Archaea* 2013;2013:456318.
- Prasad S, Roy I: Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. *Recent Pat Biotechnol* 2018;12:33-56.
- Purdy KJ, Cresswell-Maynard TD, Nedwell DB, McGenity TJ, Grant WD, Timmis KN, Embley TM: Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environ Microbiol* 2004;6:591-595.
- Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Neifar M, Fava F: Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:7907-7913.
- Rafizadeh A, Koohi-Dehkordi M, Sorkheh K: Molecular insights of genetic variation in milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) populations collected from southwest Iran. *Mol Biol Rep* 2018;45:601-609.
- Ramage P, Cheneval D, Chvei M, Graff P, Hemmig R, Heng R, Kocher HP, Mackenzie A, Memmert K, Revesz L, et al.: Expression, refolding, and

- autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J Biol Chem* 1995;270:9378-9383.
- Rani K, Rana R, Datt S. Review on latest overview of proteases. *International Journal Of Current Life Sciences-Vol.2., Issue,1.* 2012;12-18.
- Rao K, Narasu ML. Alkaline protease from *Bacillus firmus* MTCC 7728. *African Journal of Biotechnology*. 2007; 6(21): 2493-2496.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:597-635.
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S, Pandey A: Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol Biotechnol* 2018;56:16-30.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J Biol Chem* 2011;286:38321-38328.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D227-233.
- Rawlings ND, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 1999;27:325-331.
- Rawlings ND: Peptidase specificity from the substrate cleavage collection in the MEROPS database and a tool to measure cleavage site conservation. *Biochimie* 2016;122:5-30.
- Ribitsch D, Heumann S, Karl W, Gerlach J, Leber R, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Eiteljoerg I, Remler P, Siegert P, Lange J, Maurer KH, Berg G, Guebitz GM, Schwab H: Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: Screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. *J Biotechnol* 2012;157:140-147.
- Robinson JL, Pyzyna B, Atrasz RG, Henderson CA, Morrill KL, Burd AM, Desoucy E, Fogleman RE, 3rd, Naylor JB, Steele SM, Elliott DR, Leyva KJ, Shand RF: Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family halobacteriaceae) as revealed by arrhenius plots. *J Bacteriol* 2005;187:923-929.
- Robinson PK: Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 2015;59:1-41.

- Rosano GL, Ceccarelli EA: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014;5:172.
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW: Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 1987;56:125-135.
- Saggu SK, Mishra PC: Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PLoS One* 2017;12:e0188724.
- Sagher O, Szabo TA, Chenelle AG, Jane JA: Intraoperative chemonucleolysis as an adjunct to lumbar discectomy. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20:1923-1927.
- Saida F, Uzan M, Odaert B, Bontems F: Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci* 2006;7:47-56.
- Sajid M, McKerrow JH: Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:1-21.
- Salas CE, Gomes MT, Hernandez M, Lopes MT: Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry* 2008;69:2263-2269.
- Salminen-Mankonen HJ, Morko J, Vuorio E: Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets* 2007;8:315-323.
- Scannell AG, Kenneally PM, Arendt EK: Contribution of starter cultures to the proteolytic process of a fermented non-dried whole muscle ham product. *Int J Food Microbiol* 2004;93:219-230.
- Schall VT, Vasconcellos MC, Rocha RS, Souza CP, Mendes NM: The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant Molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Trop* 2001;79:165-170.
- Seker S, Beyenal H, Tanyolac A. Modeling milk-clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *J Food Sci.* 1999;64:525–9.
- Sgarbieri VC, Gupte SM, Kramer DE, Whitaker JR: Ficus Enzymes. I. Separation of the Proteolytic Enzymes of *Ficus Carica* and *Ficus Glabrata* Latexes. *J Biol Chem* 1964;239:2170-2177.

- Shah MA, Mir SA, Paray MA. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science ve Technology*. 2014; 94 (1): 5-16.
- Shimokawa Ki K, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H, Kaneko S: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 2002;8:32-36.
- Siddiqui KS, Parkin DM, Curmi PM, De Francisci D, Poljak A, Barrow K, Noble MH, Trewhella J, Cavicchioli R: A novel approach for enhancing the catalytic efficiency of a protease at low temperature: reduction in substrate inhibition by chemical modification. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:676-686.
- Sijwali PS, Rosenthal PJ: Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4384-4389.
- Silva SV, Malcata FX: Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J Dairy Sci* 2005;88:1947-1954.
- Simmons JW, Nordby EJ, Hadjipavlou AG: Chemonucleolysis: the state of the art. *Eur Spine J* 2001;10:192-202.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK: Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 2015;14:41.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK: Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 2016;6:174.
- Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee JK: From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci* 2013;14:1232-1277.
- Singh VK, Patel AK, Moir AJ, Jagannadham MV: Indicaain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry* 2008;69:2110-2119.
- Solomonov I, Zehorai E, Talmi-Frank D, Wolf SG, Shainskaya A, Zhuravlev A, Kartvelishvily E, Visse R, Levin Y, Kampf N, Jaitin DA, David E, Amit I, Nagase H, Sagi I: Distinct biological events generated by ECM proteolysis by two homologous collagenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:10884-10889.

- Souza CA, de-Carvalho RR, Kuriyama SN, Araujo IB, Rodrigues RP, Vollmer RS, Alves EN, Paumgarten FJ: Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:1325-1332.
- Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986;189:113-130.
- Studier FW: Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 1991;219:37-44.
- Sullivan GA, Calkins CR: Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Sci* 2010;85:730-734.
- Tanabe S, Arai S, Watanabe M: Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:1269-1272.
- te Biesebeke R, van Biezen N, de Vos WM, van den Hondel CA, Punt PJ: Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:75-82.
- Tetley TD: New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 1993;48:560-565.
- Theron LW, Divol B: Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:8853-8868.
- Tindbaek N, Svendsen A, Oestergaard PR, Draborg H: Engineering a substrate-specific cold-adapted subtilisin. *Protein Eng Des Sel* 2004;17:149-156.
- Tipton K, Boyce S: History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics* 2000;16:34-40.
- Tipton KF: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. *Eur J Biochem* 1994;223:1-5.
- Tokes ZA, Woon WC, Chambers SM: Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta* 1974;119:39-46.

- Tomlinson GA, Jahnke LL, Hochstein LI: *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:66-70.
- Torregrosa-Crespo J, Martinez-Espinosa RM, Esclapez J, Bautista V, Pire C, Camacho M, Richardson DJ, Bonete MJ: Anaerobic Metabolism in *Haloferax* Genus: Denitrification as Case of Study. *Adv Microb Physiol* 2016;68:41-85.
- Underkofler LA, Barton RR, Rennert SS: Production of microbial enzymes and their applications. *Appl Microbiol* 1958;6:212-221.
- Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK: Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol* 2014;5:486.
- Vallejo LF, Rinas U: Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 2004;3:11.
- van den Burg B: Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:213-218.
- Van Der Maarel, M. Starch-processing enzymes. In: Whitehurst R J, Van Oort M, eds. *Enzymes in Food Technology* 2nd ed. West Sussex, UK : Wiley-Blackwell; 2010, p:320-331.
- Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B: Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 2007;13:387-403.
- Villa E, Balaeff A, Schulten K: Structural dynamics of the lac repressor-DNA complex revealed by a multiscale simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6783-6788.
- Vioque M, Gomez R, Sanchez E, Mata C, Tejada L, Fernandez-Salguero J: Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J Agric Food Chem* 2000;48:451-456.
- Vishwanatha KS, Rao AG, Singh SA: Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37:129-138.

- Vojcic L, Pitzler C, Korfer G, Jakob F, Ronny M, Maurer KH, Schwaneberg U: Advances in protease engineering for laundry detergents. *N Biotechnol* 2015;32:629-634.
- Wankhade G, Majumdar A, Kamble PD, Harinath BC. Mycobacterial secretory SEVA TB ES-31 antigen, a chymotrypsin-like serine protease with lipase activity ve drug target potential. *Biomedical Research* 2011; 22: 45-8.
- Wintrode PL, Miyazaki K, Arnold FH: Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J Biol Chem* 2000;275:31635-31640.
- Yabuki Y, Kubota K, Kojima M, Inoue H, Takahashi K: Identification of a glutamine residue essential for catalytic activity of aspergilloglutamic peptidase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 2004;569:161-164.
- Yadav SC, Pande M, Jagannadham MV: Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry* 2006;67:1414-1426.
- Yamaguchi H, Miyazaki M: Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* 2014;4:235-251.
- Yang Y, Wen Y, Cai YN, Vallee I, Boireau P, Liu MY, Cheng SP: Serine proteases of parasitic helminths. *Korean J Parasitol* 2015;53:1-11.
- Yegin S, Fernandez-Lahore M, Jose Gama Salgado A, Guvenc U, Goksungur Y, Tari C: Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:949-960.
- Zorgani MA, Patron K, Desvaux M: New insight in the structural features of haloadaptation in alpha-amylases from halophilic Archaea following homology modeling strategy: folded and stable conformation maintained through low hydrophobicity and highly negative charged surface. *J Comput Aided Mol Des* 2014;28:721-734.

9. EKLER

2. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi, 14-16 Kasım 2018, İSTANBUL

P-46

***Haloarcula hispanica*'ya ait proteaz enzimlerinin *Escherichia coli*'de rekombinant olarak üretilmesi ve analizi**

Ayşenur GÜNEŞ^{1*}, Kadir TURAN¹

¹Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, İstanbul, Turkey.

*gunesaysenur@hotmail.com.tr

Endüstriyel işlemler çoğunlukla ekstrem koşullarda (yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek/düşük pH değerleri gibi) gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilen enzimler endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Proteolitik enzimler ilaç ve çeşitli organik maddelerin sentez edilmesinde; deterjan, deri ve gıda sanayiinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1-3]. Bu çalışmada yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan bir mikroorganizma olan *Haloarcula hispanica*'ya ait iki farklı proteaz enzimi (proteaz ve serin proteaz) *Escherichia coli* hücrelerinde rekombinant olarak üretildi ve proteolitik aktiviteleri analiz edildi.

Çalışmada yararlanılan *H. hispanica* bakterisi ırkı [4] RIKEN-BRC (Japonya)'den temin edildi. Bu bakterinin tüm genom analizi çalışmasında [5] proteaz ve serin proteaz olarak tanımlanan gen bölgeleri, genom DNA'sı üzerinden PZR tekniği ile izole edildi ve farklı promotör dizileri taşıyan plazmit vektörlere (pET-14b, pBluescript II SK+ ve pAK-Taq) klonlandı. Klonlanan genlerin doğrulukları DNA dizi analizleri ile saptandı. Rekombinant proteaz enzimi sentezinde *E. coli* bakterisinin BL21, Mach1, TOP-10, DH5α ve JM107 suşları denendi. *E. coli* hücrelerinde *H. hispanica* proteaz enzimlerinin sentezi SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ve gümüş boyama tekniği ile incelendi. Farklı plazmitler ile transforme edilen bakterilerde proteaz aktiviteleri üç farklı yöntem ile araştırıldı: i. Milk-agar besiyerinde proteolitik aktivitelerine bakılarak; ii. Bovin serum albümini hidroliz edip etmedikleri SDS-PAGE ile incelenerek; iii. Azokazein substratı kullanılarak spektrofotometrik yöntemle.

SDS-PAGE/Gümüş boyama tekniği ve SDS-PAGE/Western Melezleme tekniği sonuçları, proteaz enzimlerinin *E. coli* BL21 suşunda pET-14b plazmiti üzerinde T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde etkin bir şekilde sentez edildiğini gösterdi. pBluescript II SK+ plazmitinde taşınan T7 RNA polimeraz promotörün proteaz enzimi sentezinde yetersiz kaldığı saptandı. *E. coli* *tac* ve *lacIq* promotörleri kontrolünde klonlanan genlerden beklenen sonuç alınamadı. *E. coli* BL21 suşundan hazırlanan lizatlar ile yapılan çalışmalar, *H. hispanica* proteaz enzimlerinin hücrede zor çözünen agregatlar halinde sentez edildiği sonucunu verdi. Bu nedenle farklı yöntemler ile yapılan proteaz aktivite tayinlerinde istenilen düzeylerde

proteolitik aktivite saptanamadı. *E. coli* hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen enzimlerin denatürasyonu ve aktif formda yeniden katlanmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-200318-0096 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Roy I, Prasad S. Recent Pat Biotechnol 2017;12:33-56.
- [2] Littlechild JA. Front Bioeng Biotechnol 2015;3:1-9.
- [3] Coolbear T, Daniel RM, Morgan HW. Adv Biochem Eng Biotechnol 1992;45:57-98.
- [4] Juez G, et al. Syst Appl Microbiol 1986;8:75-79.
- [5] Liu H, et al. J Bacteriol 2011;93(21):6086-6087.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	AYŞENUR	Soyadı	GÜNEŞ
Doğum Yeri	Bakırköy/İstanbul	Doğum Tarihi	05.09.1993
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	Tel	0536 850 87 44
E-mail	gunesaysenur@hotmail.com.tr	T.C Kimlik No	13129800352

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Yer/Bölüm	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Biyokimya	2019
Lisans	Kocaeli Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/ Kimya	2015
Lise	Tuzla Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Stajyer	Atabay İlaç Fabrikası	07.2013-08.2013

Yabancı Dil Bilgisi

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	Zayıf

Sınav Bilgileri

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	65,41	67,17	67,46

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Power Point	İyi
Microst Office Word	İyi