

T.C.

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF
DOMAINİNİN NMR SOLÜSYON YAPISININ
BELİRLENMESİ VE BAZI İNSAN UBIQUITİLASYON
E3 ENZİMLERİ VE RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞDAŞ DAĞ

HAZİRAN 2012

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF
DOMAINİNİN NMR SOLÜSYON YAPISININ
BELİRLENMESİ VE BAZI İNSAN UBİQUITİLASYON
E3 ENZİMLERİ VE RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞDAŞ DAĞ

HAZİRAN 2012
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ÇAĞDAŞ DAĞ tarafından hazırlanan **ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF DOMAINİNİN NMR SOLÜSYON YAPISININ BELİRLENMESİ VE BAZI İNSAN UBİQUİTİLASYON E3 ENZİMLERİ VE RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 01/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Fatma AYHAN (Jüri Başkanı)

İmza:

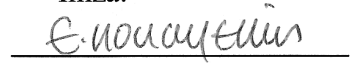
Kimya Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Yrd. Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN (Üye)

İmza:

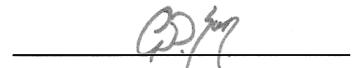
Kimya Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Doç. Dr. Çağdaş D. SON (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı, ODTÜ, Ankara



BÖLÜM BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Gül Asiye AYCIK

İmza

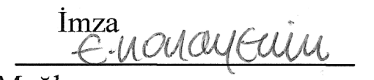
Kimya Bölüm Başkanı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Yrd. Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN

İmza

Danışman, Kimya Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Savunma Tarihi: 01/06/2011

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Çağdaş Dağ

01/06/2012



ÖZET

ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF DOMAINİNİN NMR SOLÜSYON YAPISININ BELİRLENMESİ ve BAZI İNSAN UBİQUİTİLASYON E3 ENZİMLERİ ve RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve SAFLAŞTIRILMASI

Çağdaş DAĞ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN

Haziran 2012, 136 sayfa

Ubiquitin (Ub) ve Ub benzeri (Ubl) proteinler bir dizi enzimatik reaksiyonlar ile ökaryotik proteinleri post translasyonel modifikasyonlara uğratan proteinlerdir. Hedef proteine Ub/Ubl konjugasyonu E1 aktive edici, E2 konjuge edici ve E3 ligazlar olarak adlandırılan üç enzim sınıfının aktivitesini gerektirir ve her bir Ub/Ubl protein için spesifik E1, E2 ve E3 enzimleri mevcuttur. Ub ve Ubl proteinler bağlandığı hedef proteinleri farklı yol ve işlevlere yönlendirirler. Hedef proteinin hangi yol ve işleve yönlendirileceği ise hedef proteine Ub/Ubl proteinin hangi aminoasitten bağlandığına ve bağlanan Ub/Ubl moleküllerinin sayısına göre çeşitlilik göstermektedir.

İnterferonca uyarılan gen 15 (ISG15) bağışıklık sisteminde rol oynayan ubiquitin benzeri bir proteindir. ISG15'in ökaryotik proteinlere kovalent olarak bağlanması ile gerçekleşen post translasyonel modifikasyon ISGylasyon olarak adlandırılır. İnsan ISG15'i için spesifik E1 enzimi Ube1L'dir. Ub/Ubl konjugasyon sistemlerinde E1 enzimleri yapısal ve işlevsel bakımdan benzerlik göstermektedir. E1 aktive edici enzimler genellikle üç domainden oluşurlar; adenilasyon domaini, katalitik sistein domaini ve karboksil terminal ubiquitin benzeri beta grasp/ubiquitin fold (UF) domaini. Literatürde insan Ube1L enzimi ile ilgili yapısal bir çalışma mevcut değildir. Ancak diğer Ub/Ubl proteinler için spesifik E1 enzimleri ile yapılan çalışmalarda, UF domaininin E2 ile etkileşimde ve doğru E2 enziminin seçilmesinde gerekli olduğu gösterilmiştir. Sistemler arasında seçiciliğin nasıl sağlandığının anlaşılmasında yapısal çalışmaların rolü büyüktür ve Ube1L enzimi ile ilgili yapısal çalışmalar bu seçiciliğin anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Bu tezin ilk bölümünde, ISGylasyonda aktive edici E1 enzimi olarak işlev yapan Ube1L'nin ubiquitin benzeri domaininin (UFD) 3 boyutlu NMR solüsyon yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ube1L-UFD için gerekli NMR verileri kaydedilmiş, rezonans atamaları, verilerin analizi ve yapı hesaplamaları kısmi olarak tamamlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, Ube1L-UFD'nin, diğer ubiquitin benzeri proteinlerde olduğu gibi beta-grasp fold olarak adlandırılan yapıya katlandığı ortaya konulmuştur.

Tezin ikinci bölümünde Ub/Ubl sisteminin hedeflerinden birisi olan insan RIG-I (retinoic acid inducible gene-1) proteininin modifikasyona uğrayan CAR (caspase activation and recruitment) domainleri ve bu modifikasyonda işlev yapan E3 enzimlerinin (Trim25 ve RNF125) yapısal çalışmalarda kullanılmak amacıyla üretilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. RIG-I, RNA virüsleri tarafından enfekte olmuş hücrelerde, viral RNA moleküllerinin tanınmasında ve savunma mekanizmasının harekete geçirilmesinde birinci basamakta yer alır. RIG-I'in regülasyonunda ubiquitilasyon önemli bir rol oynar. RIG-I'in ubiquitilasyonunda görev aldığı bilinen iki farklı E3 enzimi mevcuttur; Trim25 ve RNF125. Trim25 ve RNF125 aracılıklı ubiquitilasyonun RIG-I'i farklı sinyal yollarına yönlendirdiği bilinmektedir. RNF125 aracılıklı ubiquitilasyon RIG-I'i degradasyon için proteozoma yönlendirirken, Trim25 aracılıklı ubiquitilasyon RIG-I bağımlı viral bağışıklığın harekete geçirilmesinde gereklidir.

Bu bölümünde, RIG-I CAR domainlerini ve Trim25-SPRY domainini ve RNF125'i kodlayan genler *E. Coli* ekspresyon vektörleri içerisine klonlanmış, bakteriyel sistemde ekspresyonları ve kromatografik yöntemlerle saflaştırılmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca RIG-I CARs ¹⁵N-işaretli olarak üretilmiş ve NMR yapısal çalışmalar için uygun olup olmadığı test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, Trim25-SPRY ve RNF125 proteinlerinin çözünürlüklerinin düşük olduğu, denenen solüsyon koşullarında kararsız oldukları ve hızla çöktükleri gözlenmiştir. RIG-I CARs'ın ise kaydedilen 15N-1H HSQC spektrumundan, test edilen NMR koşullarında kararlı bir üç boyutlu yapıya sahip olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ISG15, Ubiquitin, Ube1L, Ubiquitin fold domain, RIG-I, CARs, RNF125, TRIM25, Protein ekspresyonu, Protein saflaştırılması, İzotopik işaretleme, Bio-NMR, NMR

ABSTRACT

NMR SOLUTION STRUCTURE OF ISG15 ACTIVATING ENZYME UBE1L UF-DOMAIN AND CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION of SOME UBIQUITIN E3 ENZYMES AND RIG-I CARDS

Çağdaş DAĞ

Master of Science (M.Sc)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. E. Sonay ELGİN

June 2012, 136 pages

Ubiquitin (Ub) and ubiquitin-like (Ubl) proteins are common post-translational modifiers of eukaryotic proteins. Ub/Ubl conjugation to target proteins occurs via similar enzymatic cascades and requires the activity of three enzyme classes, namely E1 activating enzymes, E2 conjugating enzymes and E3 ligases. Each Ub/Ubl protein has its own specific set of E1, E2 and E3 enzymes and each Ub/Ubl protein directs its target to different pathways and functions. Which pathway or function target is directed to depends both on the attachment position of Ub/Ubl on the target and the number of attached Ub/Ubl molecules.

Interferon stimulated gene 15 is a ubiquitin-like protein involved in immune defense. Post-translational modification of eukaryotic proteins by covalent attachment of ISG15 is called ISGylation. Specific E1 enzyme for human ISG15 is Ube1L. E1 enzymes in Ub/Ubl conjugation systems display similar structural and functional aspects. They generally consist of three different domains: adenilation domain, the catalytic cysteine domain and the carboxyl terminal ubiquitin-like beta-grasp (β G) / ubiquitin fold (UF). There is no structural work in the literature for human Ube1L enzyme yet. However, structural studies on other Ub/Ubl specific E1s show that UF domain is important for interacting E2s and necessary in selecting the correct E2 for the pathway. Structural studies play important roles in understanding how specificity is achieved in various conjugation systems. Structural studies on human Ube1L will help to understand this specificity.

In the second part of this thesis, production of human RIG-1 CAR (caspase activation and recruitment) domains, which are the targets of various Ub/Ubl modification systems, and two E3 ligases (Trim25 and RNF125), which are involved in ubiquitylation of RIG-1 CARs (CAR domains), were carried out to use in structural studies. In cells infected with RNA viruses, RIG-1 is involved in the first step in recognition of viral RNA molecules and activation of host defense. Ubiquitylation plays an important role in RIG-1 regulation. There are two different E3 enzymes that are known to function in RIG-1 ubiquitylation; Trim25 and RNF125. Ubiquitylation of RIG-1 CAR domains by different E3s, targets RIG-1 to

different signal pathways. While ubiquitylation by RNF125 targets RIG-1 to proteosome for degradation, ubiquitylation by Trim25 is necessary for activation of RIG-1 dependent viral defense system.

In this part, genes coding for RIG-1 CARDS, Trim25-SPRY domain and RNF15 were cloned into *E. Coli* expression vectors, bacterial protein expressions and purification of target proteins by chromatographic methods were carried out. In addition, ¹⁵N-labeled RIG-I CARDS was produced to test whether free domains were suitable for structural studies. Result of these studies showed that both Trim25-SPRY and RNF125 had a low solubility and stability and precipitated immediately under the solution conditions tested. 15N-1H HSQC spectrum of RIG-I CARDS indicated that under the NMR condition used, free domains did not fold into a stable conformation.

Keywords: ISG15, Ubiquitin, Ube1L, Ubiquitin fold domain, RIG-I, CARDS, RNF125, TRIM25, Protein expression, Protein purification, Isotopic labeling, Bio-NMR, NMR

Baharım'a.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca eğitimimin tüm basamaklarında benimle birebir ilgilenen ve karşılaştığım sorunların çözümünde bana hiçbir yardımını esirgemeyen ve elinden gelen tüm fedakarlıkları gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. E. Sonay Elgin'e,

Tez Jürime başkanlık eden ve lisans hayatımdan günümüze üzerimde büyük emekleri olan Prof. Dr. Fatma AYHAN'a, akademik hayatımdaki kariyerimi çizerken örnek aldığım Türkiye'nin yetiştirdiği değerli bilim insanlarından birisi olan tezimin jüri üyesi Doç. Dr. Çağdaş Devrim SON hocama minnettarlığımı sunar,

Medical College of Wisconsin'da gerçekleştirdiğim çalışmalar için hem bana maddi ve manevi destek sağlayan Prof. Dr. Brian F. VOLKMAN'a, University of Wisconsin-Madison ve NMRFAM'de gerçekleştirdiğim çalışmalar kapsamında laboratuvarının kapılarını bana açan Prof. Dr. John L. MARKLEY'e, NMR ile ilgili tüm sorunlarımda ve yapısal çalışmalarda bana destek olan Prof. Dr. W. Milo WESTLER, Dr. Marco TONELLI, Dr. Gabriel CORNILESCU, Dr. Arash BAHRAMI, Dr. Jin Hae KIM, Dr. Kuang-Lung HSUEH'e ve Jamie WIETING'e teşekkürlerimi sunarım.

Madison'daki çalışmalarım ve geçirdiğim zaman kapsamında hertürlü sorunumla ilgilenen tüm zor zamanlarımda yanımda olan ve bana hayatın güzelliklerini gösteren Dr. Çağlar TANRIKULU ve Neslihan ATATİMUR'a şükranlarımı sunar,

NMR ile gerçekleştirdiğim tüm deneysel çalışmalarda benimle ilk basamaktan son basamağa kadar yanımda olan hafta sonu, gece, gündüz dinlemeden benimle bire bir ilgilenen ve benim eğitimim için birçok fedakarlıkta bulunan, üzerimde birçok emeği olan Dr. Josh J. Zarek'e minnettarlığımı sunar,

Yaşantım ve eğitim hayatım boyunca ellerinden gelen tüm imkanları bana sunan ve eğitim hayatım boyunca tüm tercihlerimi destekleyen ve her zaman yanımda olmalarından mutluluk duyduğum annem ve babama sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 104T193, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP-09-245 numaralı Bilimsel Araştırma Projeleri ile desteklenmiştir. Bu tez çalışmasının NMR verileri Medical College of Wisconsin-Milwaukee, Department of Biochemistry, Biomolecular NMR Facility, Milwaukee, WI, ABD ve NIH (5 P41 RR002301-27), NIGMS (8 P41 GM103399-27) tarafından desteklenen NMR Facility at Madison (NMRFAM), Madison, WI, ABD'de toplanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
BÖLÜM 1: ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF DOMAINİNİN NMR SOLÜSYON YAPISININ BELİRLENMESİ	1
1. GİRİŞ	1
1.1. İnterferonlarca Uyarılan Gen 15 Proteininin Keşfi	1
1.2. ISG15'in Yapısı ve Özellikleri	2
1.3. ISG15 Ekspresyonunun Regülasyonu	3
1.4. ISG15'in Biyolojik Fonksiyonları	5
1.5. ISG15 Konjugasyon Yolu (ISGlasyon)	5
1.5.1. ISGlasyonun Mekanizması	5
1.5.1.1. <i>Ube1L E1 enzimi ile ISG15 aktivasyonu</i>	6
1.5.1.2. <i>ISG15in Ube1L'den UbchH8'e transferi</i>	9
1.5.1.3. <i>E3 enzimi yardımı ile ISG15in hedef proteine ligasyonu</i>	9
1.6. Ub ve Ubl Sistemlerin E1 Enzimlerinde UFD	10
1.6.1. Ub E1-UFD	10
1.6.2. Sumo E1-UFD	11
1.6.3. NEDD8 E1-UFD	13
1.6.4. Atg8 E1 enzimi (atg7) Ub Fold domainleri	15
1.7. Mekanizma (yapı) Tabanlı Drug Dizaynı	15
1.7.1. Ub ve Ub benzeri sistemlerde mekanizma tabanlı drug dizayn çalışmaları	16
1.8. NMR Spektroskopisi ve Protein Yapı Tayini	17
1.8.1. NMR Spektroskopisi	17
1.8.1.1. <i>Günümüzde NMR uygulamaları</i>	18
1.8.2. NMR ile Protein yapı tayini	18
1.8.3. Protein yapı tayinin Temel basamakları	19
1.8.4. Yapısı NMR ile saptanan ilk globüler protein	20

1.8.5. Protein yapı hesaplamaları için kullanılan temel NMR deneyleri	21
1.8.5.1. ^{15}N -HSQC	21
1.8.5.2. ^{13}C -HSQC.....	22
1.8.5.3. HNC0	23
1.8.6. Peptid ana zincirindeki atomların atamaları için gerekli deneyler	24
1.8.6.1. HNCA	24
1.8.6.2. HNCACB	26
1.8.6.3. CBCACONH.....	27
1.8.7. Yan zincir atomlarının rezonans atamaları için gerekli deneyler.....	28
1.8.7.1. HCCONH	28
1.8.7.2. CCONH	29
1.8.7.3. HCCH-TOCSY	30
1.8.8. Uzak mesafe etkileşimlerini tespit etmek için gerekli olan deneyler.....	31
1.8.8.1. ^{15}N -NOESY-HSQC	31
1.8.8.2. ^{13}C -NOESY-HSQC alifatik ve ^{13}C -NOESY-HSQC aromatik	32
1.9. Çalışmanın Amacı	33
2. MALZEME VE YÖNTEM	35
2.1. Malzemeler	35
2.1.1. İnsan ISG15 aktive edici E1 enzimi Ube1L'nin UFD'nin gen dizisi	35
2.1.2. Oligonükleotid Primerler.....	35
2.1.2.1. Nokta mutasyonu ile mutajenik protein eldesinde kullanılan primerler.....	35
2.1.3. Kimyasallar ve enzimler.....	36
2.1.4. Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar.....	36
2.1.5. Kullanılan makine ve teçhizat	36
2.2. Yöntem	36
2.2.1. GBI-Ube1L füzyon proteininin ekspresyonu.....	36
2.2.2. C95S ve C95A mutant proteinlerin eldesi.....	37
2.2.3. GBI-UBE1L-UFD proteininin diyaliz ile yeniden katlanması.....	39
2.2.4. Farklı tampon çözeltilerin çözünürlük üzerine etkisinin incelenmesi.....	40
2.2.5. ^{15}N ve ^{13}C işaretli NMR örneklerinin hazırlanması	41
2.2.6. NMR spektroskopisi.....	42
2.2.7. NMR verilerinin işlenmesi ve analizi.....	43
2.2.8. Yapı Hesaplamaları	43
3. BULGULAR VE İRDELEME	44

3.1. GBI-Ube1L-UFD Proteinin Üretimi	44
3.2. Ube1L-UFD (C995A) ve Ube1L-UFD (C995S) Proteinlerinin Eldesi	44
3.3. GB1-Ube1L-UFD Proteinin Diyaliz ile Yeniden Katlanması	45
3.3.1. Denature edici ajanın yeniden katlanmaya etkisi	45
3.3.2. İndirgeyici ajanın yeniden katlanma üzerine etkisi	45
3.3.3. Diyaliz süresi ve protein konsantrasyonunun yeniden katlanma üzerine etkisi	46
3.4. Mutant Proteinler ile GB1-Ube1L-UFD (WT) Proteinin Yeniden Katlanmalarının Karşılaştırılması	46
3.5. Diyaliz Yöntemi ile Yeniden Katlanan Proteinlerin Saflaştırılması	47
3.6. Farklı Tampon Çözeltilerin ve pH'ın Protein Kararlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	49
3.7. GB1-Ube1L-UFD (WT) ve GB1-Ube1L-UFD (CA) Proteinlerinin Kararlılıklarının Karşılaştırılması	50
3.8. NMR için Proteinin Uygunluğunun Belirlenmesi	54
3.9. UBE1L-UFD (wt) Rezonans Atamalarının Yapılması	58
3.10. Dihedral Açık Kısıtları	65
3.11. NOE Atamalarının Gerçekleştirilmesi ve Yapı Hesaplamaları	67
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
4.1. Ube1L-UFD Serbest Halde Kararsızdır ve GB1 gibi Bir Çözünürlük Tagına İhtiyaç Duymaktadır	69
4.2. Ube1L-UFD sistein Mutasyonları Çözünürlük ve Kararlılığı Dikkate Değer Oranda Arttırmamıştır	69
4.3. Ube1L-UFD'nin NMR Spektrumlarında Görünmeyen Bölgeler Mevcuttur ..	70
4.4. Ube1L-UFD Ubiquitin Benzeri Bir İkincil Yapıya Sahiptir	71
BÖLÜM 2: BAZI İNSAN UBİQUITİLASYON E3 ENZİMLERİ VE RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI	73
5. GİRİŞ	73
5.1. RIG-I VE RIG-I Sinyal İletiminin Post Translasyonel Modifikasyonu	73
5.1.1. RIG-I'in işleyişi	74
5.1.2. RIG-I'in post-translasyonel regülasyonu	76
5.1.2.1. <i>TRIM25</i> ve <i>RIplet</i> ile aktivasyonu	76
5.1.2.2. <i>RNF125</i> ile negatif regülasyonu	76
5.1.2.3. Fosforilasyon ile negatif regülasyonu	77
5.1.2.4. <i>ISGlasyon</i> ile negatif regülasyonu	77
5.1.2.5. <i>SUMOlasyon</i> ile pozitif regülasyonu	78
5.2. RIG-I Sinyal Sisteminin Influenza A Virüsü Tarafından Baskılanması	78

5.3. Yapısal Yönden RIG-I Sinyal Mekanizması	78
5.3.1. <i>Homo sapiens</i> (İnsan) RIG-I CTD	79
5.3.2. <i>Anas platyrhynchos</i> (Ördek) RIG-I	80
6. MALZEME ve YÖNTEM	82
6.1. Malzemeler	82
6.1.1. Bakteri suşları.....	82
6.1.1.1. <i>Escherichia coli</i> saklama suşları.....	82
6.1.1.2. <i>Escherichia coli</i> ekspresyon suşları	82
6.1.2. Plasmid vektörleri	83
6.1.2.1. <i>pREP4</i>	83
6.1.2.2. <i>pQE30</i>	84
6.1.3. Klonlanan genlerin ve ekspres edilen proteinlerin dizileri.....	85
6.1.3.1. İnsan Ring Finger Protein 125 (<i>RNF125</i>)	85
6.1.3.3. Tripartite motif-containing 25 <i>SPRY</i> domaini	86
6.1.4. Oligonükleotid primerler.....	87
6.1.4.1. Hedef genlerin izolasyonunda kullanılan primerler	87
6.1.4.2. Plasmid DNA sekans analizi için kullanılan primerler.....	87
6.1.5. Kimyasallar ve enzimler.....	88
6.1.6. Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar.....	88
6.1.7. Kullanılan makine ve teçhizat	88
6.2. Yöntemler	88
6.2.1. Hedef proteinlerin genlerinin sentezi	88
6.2.2. Hedef genlerin <i>PQE30</i> vektörü içerisine klonlanması	88
6.2.2.1. Genlerin izolasyonu.....	88
6.2.2.2. Restriksiyon enzimleri ile yapışkan uçların eldesi	90
6.2.2.3. <i>T4</i> DNA ligaz reaksiyonu	90
6.2.2.4. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	91
6.2.2.5. Transformasyon.....	92
6.2.2.6. Kolonilerin taranması ve DNA dizi analizi	92
6.2.2.7. Agaroz jel elektroforezi (%1,5lik)	93
6.2.3. Hedef proteinlerin üretimi	94
6.2.4. Hedef proteinlerin saflaştırılması	94
6.2.5. Sodyum Dodesil Sulfat – Poli Akrilamid jel elektroforezi	95
6.2.5.1. Jel kasetlerinin hazırlanması.....	95
6.2.5.2. Protein örneklerinin hazırlanması ve jel elektroforezi.....	96

7. BULGULAR ve İRDELEME	97
7.1. Hedef Protein Genlerinin Klonlanması	97
7.1.1. Hedef genlerin eldesi	97
7.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef genlerin çoğaltılması	97
7.1.3. DNA kesme enzimleri ile yapışkan uç eldesi ve T4 DNA ligaz reaksiyonu	98
7.1.4. Koloni PCR ile tarama	98
7.1.5. DNA sekanslama yöntemi ile DNA gen dizilerinin doğrulanması	99
7.2. Hedef Proteinlerin Üretimi	99
7.2.1. Protein ekspresyon testi	99
7.2.2. Hedef Proteinlerin Saflaştırılması	100
7.2.2.1. GB1-TRIM25 SPRY proteinin saflaştırılması	101
7.2.2.2. GB1-RNF125 proteinin saflaştırılması	103
7.2.2.3. RIG-I CARDS proteinin saflaştırılması	106
7.2.3. RIG-I-CARDS'ın TEV protease ile kesme reaksiyonu	111
7.2.4. GB1-RIG-I-CARDS ve RIG-I-CARDS proteinlerinin ¹ H- ¹⁵ N-HSQC analizleri	111
8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	115
8.1. TRIM25 SPRY domaini serbest ve GB1 ile füzyon halde kararsızdır	115
8.2. RNF125 yaygın olarak kullanılan yöntemler ile doğal konformasyonuna katlanmamaktadır.	116
8.3. GB1-RIG-I CARDS kararlı bir üç boyutlu yapıya sahip değildir ve RIG-I CARDS serbest halde kararsızdır.	117
KAYNAKLAR	118
Ek A. Kullanılan Kimyasal ve Enzimler	128
Ek B. Kullanılan Kimyasal ve Enzimler	131
EK C. Makina ve Teçhizat	133
ÖZGEÇMİŞ	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ube1L-UFD gen dizisi	35
Çizelge 2.2. Nokta mutasyon yönteminde kullanılan primerler.....	35
Çizelge 2.3. Yönlendirilmiş mutasyon PCR reaksiyonları.....	38
Çizelge 2.4. DpnI reaksiyonu	38
Çizelge 2.5. pH taramasında kullanılan tampon çözeltiler.....	41
Çizelge 2.6. pH 7.4-8.0 arasında kullanılan farklı tampon çözeltiler ve tuz konsantrasyonu.....	41
Çizelge 3.2. Saflaştırma sonrası GBI-Ube1L-UFD (WT) ve GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin konsantrasyon ve toplam protein miktarları.....	51
Çizelge 3.3. GBI-Ube1L-UFD (WT) ve GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin çözünürlüklerinin zamana bağlı değişimi	51
Çizelge 3.4. TALOS+ programından elde edilen dihedral açı kısıtlarından bazıları.....	66
Çizelge 6.1. <i>Escherichia coli</i> saklama suşlarının genotipleri.....	82
Çizelge 6.2. <i>Escherichia coli</i> ekspresyon suşlarının genotipleri.....	83
Çizelge 6.3. Hedef genlerin izolasyonunda kullanılan primerler	87
Çizelge 6.4. Plasmid DNA sekans analizi için kullanılan primerler	87
Çizelge 6.5. PCR reaksiyon karışımları	89
Çizelge 6.6. PCR reaksiyon basamakları	90
Çizelge 6.7. Hedef genler ve plasmidlerin BamHI/HindII ile kesme reaksiyon karışımı.....	90
Çizelge 6.8. T4 DNA ligaz ile ligasyon reaksiyon karışımları	91
Çizelge 6.9. Koloni PCR bileşenleri	93
Çizelge 6.10. Ayırma Jeli (%16 lik).....	95
Çizelge 6.11. Odaklama Jeli (% 4 luk).....	96
Çizelge 7.1. T4 DNA ligaz sonucu elde edilen yeni plazmit-gen çiftleri	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HsISG15 ve HsUb proteinlerinin kristal yapıları.....	2
Şekil 1.2. HsISG15 proteinin Ub benzeri domainlerinin Ub ile yapısal olarak karşılaştırılması.....	3
Şekil 1.3. Şematik olarak ISGlasyon döngüsü	6
Şekil 1.4. UbcH8 partnerleri ile etkileşim yüzeyleri	8
Şekil 1.5. <i>Saccharomyces cerevisia</i> Uba1-ubiquitin kompleksi	11
Şekil 1.6. E1-Sumo kompleksi	12
Şekil 1.7. <i>Saccharomyces cerevisia</i> Uba2-UFD- Ubc9 kompleksi.....	12
Şekil 1.8. Uba2-UFD'nin Sumo ve UbC9 ile olan komplekslerindeki yapılarının karşılaştırılması.....	13
Şekil 1.9. Uba3-UFD-Ubc12 kompleksi	14
Şekil 1.10. Uba3-UFD NMR solüsyon yapısı.....	14
Şekil 1.11. NMR ile yapısı tayin edilmiş ilk globuler protein olan BUSU IIA nın üç boyutlu yapısı.....	20
Şekil 1.12. ¹⁵ N-HSQC'de enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar	21
Şekil 1.13. Doğal konformasyonuna katlanmış ve katlanmamış bir proteine ait ¹⁵ N-HSQC spektrumları.....	22
Şekil 1.14. ¹³ C-HSQC deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar.....	23
Şekil 1.15. ¹³ C-HSQC spektrumunda gözlenen pikler	23
Şekil 1.16. HNCO deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar.....	24
Şekil 1.17. HNCO spektrumunda gözlenen bir pik örneği.....	24
Şekil 1.18. HNCA deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar.....	25
Şekil 1.19. HNCA deneyinde gözlenen pikler	25
Şekil 1.20. HNCACB enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar	26
Şekil 1.21. HNCACB spektrumunda gözlenen pikler.....	26
Şekil 1.22. CBCACONH deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar	27
Şekil 1.23. CBCACONH spektrumunda gözlenen pikler	27
Şekil 1.24. HCCONH deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar	28
Şekil 1.25. HCCONH spektrumunda gözlenen pikler	29
Şekil 1.26. CCONH deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar	29
Şekil 1.27. CCONH spektrumunda gözlenen atomlar	30
Şekil 1.28. HCCH-TOCSY deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar.....	30
Şekil 1.29. HCCH-TOCSY spektrumunda gözlenen pikler.....	31

Şekil 1.30. ^{15}N -NOESY spektrumunda gözlenen pikler ve protein üzerinde pikleri oluşturan atomlar	32
Şekil 1.31. ^{13}C -NOESY spektrumunda gözlenen pikler ve protein üzerinde pikleri oluşturan atomlar	33
Şekil 3.1. GB1-UBE1L-UFD (WT), GB1-UBE1L-UFD (CA) ve GB1-UBE1L-UFD (CS) proteinlerinin birinci yeniden katlamalarının karşılaştırılması	47
Şekil 3.2. GB1-UBE1L-UFD (WT), GB1-UBE1L-UFD (CA) proteinlerinin ikinci yeniden katlamalarının karşılaştırılması	47
Şekil 3.3. Yeniden katlanmış olan GB1-Ube1L-UFD'nin saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüsü	48
Çizelge 3.1. Farklı Tampon çözeltileri ve pH'in protein kararlılığı üzerine etkisi	50
Şekil 3.4. GB1-Ube1L-UFD (wt) ve GB1-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin zamana bağlı olarak çözünür agregat oluşumlarının karşılaştırıldığı SDS-PAGE jeli	52
Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlardaki GB1-Ube1L-UFD proteinin jel kromatografisi kromatogramları	53
Şekil 3.6. GB1-Ube1L-UFD proteinin jel filtrasyon kromatogramı ve jel görüntüsü	54
Şekil 3.7. 0.4 mM ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD (wt) proteinin ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumu	55
Şekil 3.8. 0.25 mM ^{15}N işaretli ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD (wt) proteinin sıcaklık ile pik şiddetlerinin değişiminin incelendiği ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumları	56
Şekil 3.9. ^{15}N -işaretli GB1-Ube1L- UFD (kırmızı) ve Ube1L- βGD 'nin (yeşil) ^1H - ^{15}N HSQC spektrumları	57
Şekil 3.10. PINE programından elde edilen otomatik rezonans atamalarının olasılık değerleri	58
Şekil 3.11. N ve H değerlerinin ait oldukları atomlar	59
Şekil 3.12. i ve i-1 amino asitlerinin CBCACONH ve HNCACB spektrumlarında oluşturduğu pikler	59
Şekil 3.13. Birbirini takip eden üç amino asitin CBCACONH ve HNCACB stripleri	60
Şekil 3.14. Amino asitlerin alifatik C kimyasal kayma değerlerinin görüldüğü aralıklar	61
Şekil 3.15. Yan zincir ataomlarının atamalarında kullanılan spektrumlar ve gözlenen pikler	62
Şekil 3.16. Amino asitlerin alifatik H kimyasal kayma değerlerinin görüldüğü aralıklar	63
Şekil 3.17. Sırası ile HNCACB, CCONH, HNCO spektrumlarında atanmış pikler	64
Şekil 3.18. HCCH-TOCSY spektrumunda ataması gerçekleştirilen pikler	65

Şekil 3.19. TALOS+ ile eldi edilen aç ı kısıtlarından yapı hesaplamalarında kullanılmak için işaretlenenler	67
Şekil 3.20. Kısmi NOESY atamaları sonrası hesaplanan Ube1L-UFD NMR yapısı	68
Şekil 4.1. PECAN programı ile elde edilen ikinci yapı grafiği	72
Şekil 5.1. RIG-I sinyal iletim sistemi	75
Şekil 5.2. Hs-RIG-I CTD'nin NMR ve X-ray yapıları	79
Şekil 5.3. Hs-RIG-I RD'inin X-ray yapısı	80
Şekil 5.4. Ap-RIG-I	80
Şekil 6.1. Prep 4 plazmitinin gen haritası	83
Şekil 6.2. pQE30 plazmitinin gen haritası	84
Şekil 6.3. pQE30-GB1 ve pQE30-8histag klonlama bölgeleri	85
Şekil 7.1. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak izole edilen genlerin %1.5 lik agaroz elektroforez jel görüntüsü	97
Şekil 7.2. RNF125 Trim25 ve RIG-I CARDS gen spesifik koloni PCR sonuçlarının %1.5 lik agaroz elektroforez jel görüntüleri	98
Şekil 7.3. IPTG ile indüksiyon öncesi ve sonrası protein ekspresyonlarının; liziz sonrası pellet ve süpernetantta bulunan protein miktarlarının incelendiği SDS-PAGE jel görüntüleri	100
Şekil 7.4. PQE-GB1-Trim25 SPRY sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüleri	102
Şekil 7.5. GB1-RNF125 sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüsü	104
Şekil 7.6. GB1-RNF125 proteinin diyaliz ile yeniden katlama işlemi sonrası protein miktarlarını gösteren jel görüntüsü	105
Şekil 7.7. PQE-GB1-RNF125 yeniden katlama sonrası protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüsü	106
Şekil 7.8. PQE-GB1-RIG-I Cards sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüleri	108
Şekil 7.9. GB1-RIGI CARDS jel filtrasyonuna ait jel görüntüsü	109
Şekil 7.10. GB1-RIG-I CARDS proteinin diyaliz ile yeniden katlama işlemi sonrası protein miktarlarını gösteren jel görüntüsü	109
Şekil 7.11. PQE-GB1-RIG-I CARDS yeniden katlama sonrası protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüsü	110
Şekil 7.12. Farklı tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilen TEV proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam ve çözünür protein miktarlarına ait jel görüntüsü	111
Şekil 7.13. GB1-RIG-I CARDS'ın ¹ H- ¹⁵ N-HSQC spektrumu	112

Şekil 7.14. GB1-RIG-I CARDs'ın ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumunda yan zincir ve ana zincir N-H piklerinin detaylı gösterimi	114
--	-----

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1-D	1 Boyutlu
Å	Angstrom
C	Karbon
CH ₃	Metil
D ₂ O	Döteryum di oksit
H	Hidrojen
HCl	Hidroklorik asit
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
Si	Silisyum
°C	Santigrat derece
P	Fosfor
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun logaritmik değeri
Sc	Skandiyum
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
%	Yüzde
~	Yaklaşık
Ala	Alanin
AMP	Adenozin Bir Fosfat
Amp	Anfisilin
Aos1	SUMO-1 Aktive edici enzim 1. alt ünitesi
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
Arg	Arjinin
ATG7	Otofaj bağlantılı protein 7
ATP	Adenozin Üç fosfat
BME	β-mercaptoethanol

BUSI	Bovine seminal inhibitor
Cys	Sistein
Da	Dalton
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	1,4 dithiotreitol
E1	Aktive edici enzim
E2	Konjuge edici enzim
E3	Ligasyon enzimi
g	Gram
Gln	Glütamin
Glu	Glütamik asit
Gly	Glisin
GndHCl	Guanidyum Hidrojen Klorür
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
His	Histidin
Hs	Homo Sapiens
IFN	İnterferon
IPTG	β -D-1-thiogalactopyranosit
IRF9	İnterferon regüle edici faktör 9
IRFE	İnterferon yanıt faktörü bağlama bölgesi
ISG15	İnterferonca uyarılmış gen 15
ISGF3	İnterferonca uyarılmış gen faktör 3
ISRE	İnterferonca uyarılmış yanıt elemanı
İle	İzolösin
Kan	Kanamisin
kDa	Kilo dalton
LB	Luria Bertani Broth
Leu	Lösin
Lys	Lizin
M	Molar
mAu	Mili absorbans ünite
Met	Metiyonin
mg	Miligram
MHz	Megahertz
mL	Mili Litre

mM	Mili Molar
μ M	Mikro Molar
MURF1	Kas RING-finger protein-1.
NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
nm	Nanometre
NMRFAM	National Magnetic Resonance Facility at Madison
NS1B	Yapısal olmayan influenza B proteini
NOE	Nükleer Overhauser etkisi
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	Protein Data Bank
Pfu	Pyrococcus furiosus
Phe	Fenil alanin
pmol	Piko Mol
ppm	Milyonda bir birim (Parts per million)
Pro	Prolin
RING	Gerçekten ilginç yeni gen (Really Interesting New Gene)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SAE1	SUMO aktive edici enzim 1
SAR	Yapı-Aktivite İlişkisi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofez
Ser	Serin
Stat1	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktive edici 1
SUMO	Ubiquitin benzeri küçük düzenleyici.
TBS	Tris-tuz tampon çözeltisi
Thr	Treonin
TOCSY	Toplam korelasyon spektrumu
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
U	Ünite
Ub	Ubiquitin
Uba1	Ubiquitin aktive edici enzim 1
UbcH8	İnsan ubiquitin konjuge edici enzim 8

Ube1L	ISG15 aktive edici enzim
Ubl	Ubiquitin benzeri
Ubp1	Ubiquitin spesifik proteaz 1
UFD	Ubiquitin benzeri katlanmış domain
USP7	Ubiquitin spesifik peptidaz 7
WS	Work shop
wt	Wild type
Val	Valin
βGD	Beta Grasp Domain

BÖLÜM 1: ISG15 AKTİVE EDİCİ E1 ENZİMİ UBE1L-UF DOMAINININ NMR SOLÜSYON YAPISININ BELİRLENMESİ

1. GİRİŞ

Proteinler organizmalarda birçok hücrel döngüde enzim, taşıyıcı, algılayıcı, sinyal iletimi gibi görevler gerçekleştiren makro moleküllerdir. Bu makro moleküller hücrel görevlerini yerine getirebilmek için çoğu zaman translasyon sonrası modifikasyonlara uğratılırlar. Bu modifikasyonlar kimi zaman proteine fosfat, metil, asetat gibi fonksiyonel gruplar eklenmesi ile, kimi zaman ise diğer küçük proteinlerin hedef proteine kovalent olarak bağlanması ile gerçekleşir.

Hedef proteinlere kovalent olarak bağlanmak sureti ile onları modifikasyona uğrattığı tespit edilen ilk protein ubiquitindir (Ub). Ub hedef proteine üç farklı enzim sınıfı yardımı ile bağlanıp hedef proteini farklı hücrel fonksiyonlara yönlendirir ve görevini tamamlayınca deubiquitilasyon enzimleri yardımı ile hedef proteinden ayrılır. Ubiquitin dışında benzer bir enzimatik mekanizma ile hedef proteinlere bağlanarak düzenleyen başka proteinler de bilinmektedir. Bu proteinler ubiquitin benzeri (ubiquitin like, Ubl) proteinler olarak adlandırılır. Sayıları onun üzerinde olan Ubl proteinlerden en çok bilinenleri NEDD8, SUMO ve ISG15 dir.

1.1. İnterferonlarca Uyarılan Gen 15 Proteininin Keşfi

İnterferonca uyarılan gen 15 (ISG15) proteini 157 amino asitten oluşan 17171 Da büyüklüğünde Ub benzeri bir proteindir. İlk olarak 1979 yılında Ehrlich ascites tümör hücrelerinde interferonlara bir tepki olarak ekspres olduğu saptanmıştır (Farrell vd., 1979). Aynı dönemde yapılan moleküler çalışmalar ISG15 geninin interferonlarca uyarılan öncül genler arasında olduğunu ortaya koymuştur (Korant vd. 1984). ISG15 geni tip I interferonlarca (IFN α/β) uyarılarak aktive olur. Buna rağmen Tip II interferonların (IFN γ) ISG15 geni üzerinde bir etkisi yoktur (Korant vd., 1984).

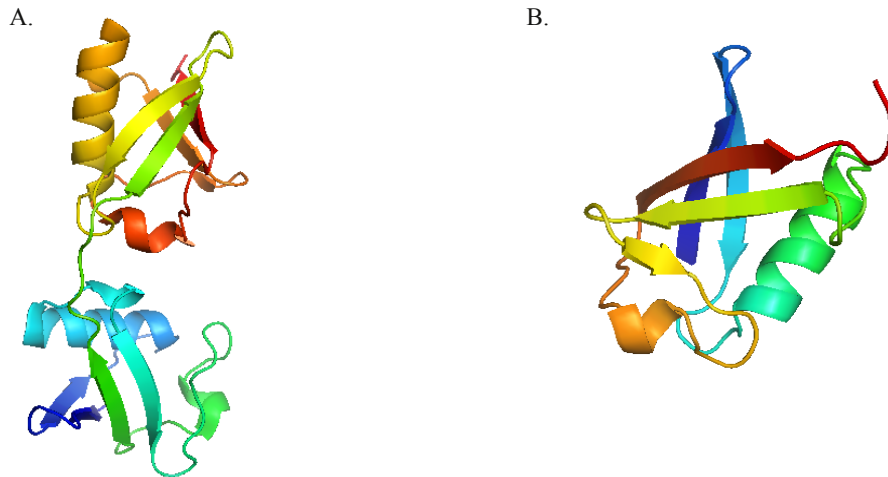
1979 yılında keşfedilen protein 1987 yılına kadar adlandırılmamıştır. Genin kodladığı proteinin saflaştırılması ile SDS-PAGE üzerindeki boyutunun yaklaşık 15

kDa olduğu saptanmıştır ve interferonlar ile olan ilişkisi de göz önünde bulundurularak proteine “Interferon stimulated gene 15” adı verilmiştir.

ISG15 proteinin Ub sistemi ile olan ilişkisi ilk olarak 1987 yılında ortaya koyulmuştur. Ubiquitin proteininin viral enfeksiyonlardaki ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi çalışmalarında şaşırtıcı bir şekilde Ub antikolları ile etkileşen başka bir protein olduğu saptanmıştır (Haas vd., 1987). Bu proteinin tip I interferonlarca (IFN α/β) uyarılırken Tip II interferonlara (IFN γ) yanıt vermediği gözlemlenmiş ve sekans çalışmaları sonucunda daha önceden belirlenmiş olan ISG15 proteini ile aynı protein olduğu ortaya koyulmuştur.

1.2. ISG15’in Yapısı ve Özellikleri

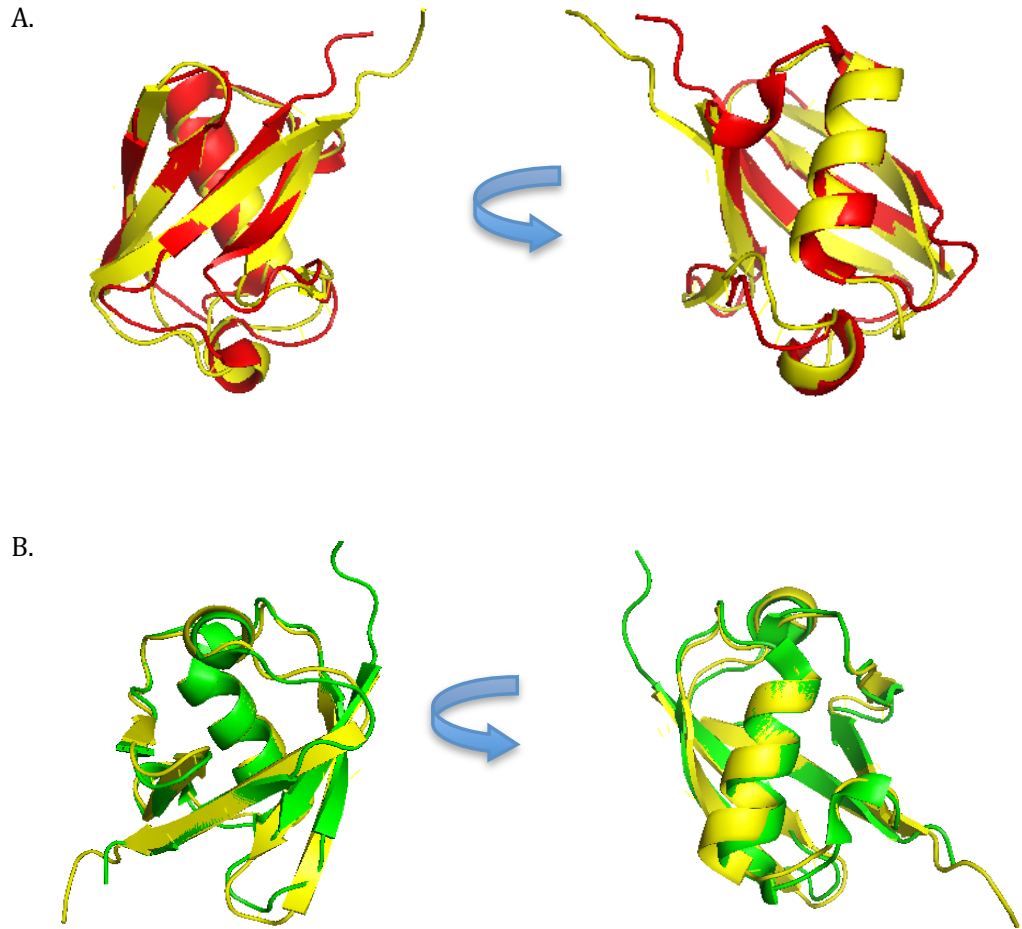
Yapısal olarak Ub benzeri proteinler ailesinde yer alan proteinin X-ışını kristalografisi ile belirlenmiş yapısı mevcuttur. İki adet Ub benzeri domain (β -grasp domain, β GD) içeren ISG15’in her bir Ub benzeri domaini β - β - α - 3_{10} - β - β - 3_{10} - β ikincil yapısına sahiptir (Şekil 1.1) (Narasimhan vd., 2005). Ayrıca, karboksil terminal (C-terminal) β -grasp domaininin serbest halde yapısı da İnsan yapısal genom projesi kapsamında belirlenmiştir.



Şekil 1.1. HsISG15 ve HsUb proteinlerinin kristal yapıları (A. HsISG15 proteininin kristal yapısı (PDB: 1Z2M) B. HsUb proteininin kristal yapısı (PDB: 1UBQ))

Bu domainlerden her birinin biyolojik olarak farklı görevleri vardır. Ub benzeri C-terminal domaini ISG15 proteininin E1 ve E2 enzimlerine bağlanmasında spesifik rol

oyunarken, amino terminal (N-terminal) domaini spesifik olarak hedef proteine ligasyon basamağında rol almaktadır (Chang vd., 2008). ISG15'in her bir domaini amino asit dizisi bakımından ubiquitin ile %30 homoloji gösterir. 5 memeli ISG15 protein dizisi arasında ise %47 oranında benzerlik vardır (Şekil 1.2). Her iki domain de korunmuş LRLRGG dizisi ile bitmekte olup bu korunmuş amino asit dizisi biyolojik fonksiyonlarda hedef proteine bağlanmakta rol alır (Loeb ve Haas 1992).



Şekil 1.2. HsISG15 proteinin Ub benzeri domainlerinin Ub ile yapısal olarak karşılaştırılması (A. HsISG15 N-terminal Domainin (kırmızı) HsUb (sarı) ile uyumu, B. HsISG15 C-terminal Domainin (yeşil) HsUb (sarı) ile uyumu (PDB: 1Z2M, 1UBQ)

1.3. ISG15 Ekspresyonunun Regülasyonu

ISG15 ekspresyonu, gen transkripsiyonu düzeyinde aktinomisin D yardımı ile baskılanabilmektedir (Farrell vd., 1979). Tip I interferonlarca tetiklenen ekspresyonunda ISG15 geninin üst kısmındaki -120 baz çifti uzaklığındaki bölge

önem taşımaktadır (Reich vd., 1987). İnterferonca uyarılmış gen faktör 3 (interferon stimulated gene factor 3, ISGF3) ve interferonlar, ISG15 geninin promoter bölgesindeki interferonca uyarılmış yanıt elemanı (interferon stimulated response element, ISRE) bölgesine bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucu genin aktivasyonu gerçekleşir (Nguyen vd., 1997). Genin promotor bölgesinde 2 adet ISRE bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler interferon yanıt faktörü bağlama bölgesi (interferon response factor binding site, IRFE) ile aynı bölgede yer almaktadır (Tanaka ve Taniguchi, 2000).

ISGF3'ün düzenlenmesi fosforilasyon ile gerçekleşmektedir. Fosforilasyona uğrayan ISGF3 çekirdek içerisine geçiş yapar ve ISRE/IRFE'lere bağlanarak ISG'lerin ekspresyonunu sağlar (Hiscott vd., 1999). ISG15, ISGF3'ün regüle ettiği ISGler arasında rapor edilen ilk hedef gendir (Au vd., 1995). ISGF3 heterotrimerik bir kompleks olup sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktive edici 1 (Stat1), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktive edici 2 (Stat2) ve interferon regüle edici faktör 9 (IRF9) bileşenlerinden oluşmaktadır (Darnell 1997). Viral ve bakteriyel enfeksiyonlar IRF ve ISGF'leri aktive ederler. Dolayısı ile doğal olarak ISG15 ekspresyonunun artmasına neden olurlar (Manthey vd., 1998).

ISG15 ekspresyonunu düzenleyen diğer bir faktörde PU.1'dir. PU.1 B hücreleri ve myeloid hücrelerine özel bir transkripsiyon faktörü olup hematopoiesis ve kan hücrelerinin fonksiyonlarını gerçekleştirmelerinde önemli rol oynamaktadır (Scott vd., 1994). PU.1 bağlanma bölgesi ISRE/IRFE sekansı ile çakışık bir bölgede bulunmakta olup PU.1 IRF4 ve IRF8 ile sinerjik etki yaparak ISG15 promotorunun aktivasyonunda rol almaktadır (Meraro vd., 2002).

Bunun yanında ISG15 proteinin aktivasyonu post-translasyonel olarak da düzenlenmektedir. ISG15 proteini hücre içerisinde aktif olmayan öncül olarak sentezlenir. Bu öncül yapının karboksil terminalinde proteinin biyolojik fonksiyonunu yerine getirmesini baskılayan fazladan bir peptid zinciri yer almaktadır. Bu peptit zinciri karboksil terminalinde bulunan glisinin hedef proteinler ile etkileşimini önler. ISG15'in ekspresyonu sonrasında bu ekstra peptit zinciri Ubp1 enzimi yardımı ile kesilir. Bu sayede protein biyolojik olarak aktif hale geçer.

1.4. ISG15'in Biyolojik Fonksiyonları

ISG15'in en iyi bilinen biyolojik fonksiyonu bağışıklık sisteminde virüslere karşı görev yapmasıdır (Skaug ve Chen 2010, Yuan ve Krug 2001). Bunun yanında ISG15 insanlarda, bağışıklık sisteminde (sitokin olarak) (Knight ve Cordova 1991, Recht vd., 1991), ve hücre içi sinyal iletim sistemlerinde (Jeon vd., 2009, Jeon vd., 2008, Whitmarsh 2009) düzenleyici olarak işlev yapmaktadır. Ayrıca hem tümör baskılayıcı olarak (Feng vd., 2008, Liu vd., 2003) hem de göğüs kanseri ile ilgili çalışmalarda onkojenik bir faktör olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir (Bektas vd., 2008).

1.5. ISG15 Konjugasyon Yolu (ISGlasyon)

Ubiquitin benzeri bir protein olan ISG15 hem yapısal hem de işleyiş açısından ubiquitine benzemektedir. ISG15' de Ub gibi 3 farklı enzim sınıfı yardımı ile hedef proteinlere ilave edilir. ISG15'in hedef proteine kovalent olarak bağlanması sonucunda gerçekleşen bu translasyon sonrası modifikasyon prosesi ISGlasyon olarak adlandırılır (Loeb ve Haas 1992). Kütle spektroskopisi temelli yapılan proteomik çalışmalarda çok sayıda ökaryotik proteinin ISG15 proteini ile bağlanmak sureti ile modifikasyona uğratıldığı ortaya çıkarılmıştır (Zhao vd., 2005). Ub ve Ubl modifikasyon sistemlerinde işlev yapan enzimler her ne kadar yapı ve mekanizma bakımından benzerlik gösterebilirler de hedef proteinler için büyük bir özgüllüğe sahiptirler (Haas ve Siepmann 1997).

1.5.1. ISGlasyonun Mekanizması

ISGlasyon da tıpkı diğer ubiquitin benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar gibi üç enzim sınıfının aktivitesini gerektirir. Bu enzimler; E1 aktive edici, E2 konjuge edici ve E3 ligazlar olarak adlandırılırlar. Mekanizma birbirini takip eden enzimatik kaskatlardan oluşmaktadır (Şekil 1.3).

Bunun ardından ikinci bir ISG15 proteini yine ATP yardımı ile E1 enzimi ile bağlanır (Bohnsack ve Haas 2003, Haas vd., 1982). Böylece aktivasyon basamağı sonunda E1 enzimi, biri kovalent olarak tiyo ester bağı ile bağlı diğeri kovalent olmayan şekilde bağlı, iki ISG15 molekülü ile yüklenmiş olur. Bu basamağın ardından kaskatın ikinci basamağına geçilir. İkinci basamak ISG15'in E1 enziminden E2 enzime transferini kapsayan basamaktır.

Ube1L;

112 kDa büyüklüğünde olan Ube1L, ubiquitin E1 enzimi Uba1 gibi monomerik bir proteindir (Yuan ve Krug 2001). Bazı ubiquitin benzeri sistemlerde görev yapan E1 enzimleri ise heterodimeriktir. (Hershko ve Ciechanover 1998).

Ube1L de ISG15 gibi gen düzeyinde interferonlar tarafından aktive edilir. Ube1L'nin ISG15 ile olan ilişkisi ortaya çıkartılmadan önce birçok akciğer kanserinde Ube1L geninin delesyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu nedenle tümör baskılayıcı bir özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir (Kok vd., 1995).

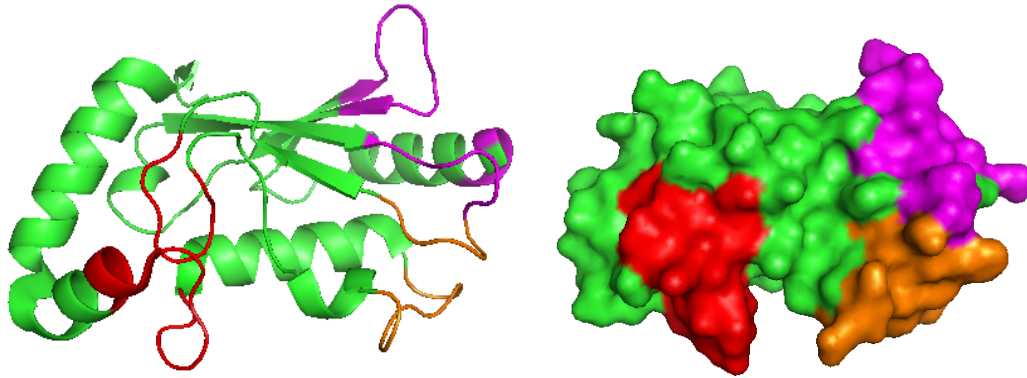
Ube1L'nin ISG15 ile olan ilişkisi influenza B virüsünün NS1B proteininin fonksiyonunun araştırılması sırasında ortaya koyulmuştur. Yuan ve Krug'un 2001 yılında yayınlanan çalışmalarında ISG15 proteinin E1 enzimini bulmak için geliştirilen hücre dışı analiz yöntemleri ile Ube1L'nin ISG15 ile kompleks oluşturduğu ve bu enzimin ISG15 proteinin E1'i olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanında yine aynı çalışmada ISG15'in spesifik olarak NS1B ile bağlandığı ortaya koyulmuştur. Bu bağlanmanın ISG15'in antiviral yanıtta görev almasını ve ISG15 için gerekli olan basamakların gerçekleşmesini inhibe ettiği saptanmıştır (Yuan ve Krug 2001).

Tüm Ub benzeri protein sistemlerinde E1 enzimleri yapısal ve fonksiyonel bakımdan benzerlik gösterirler. E1 enzimleri üç domain içerirler; adenilasyon domaini, katalitik sistein domaini ve karboksil terminal ubiquitin benzeri beta-grasp domaini/ubiquitin fold domaini (UFD). ISG15 sırasında Ube1L hem ISG15 hem de E2 enzimi ile etkileşir. Bu etkileşimler sonucunda ISG15 E1 enziminden E2 enzimi üzerine aktarılır. E1 enziminin ISG15 ile kovalent olarak etkileşen kısmı katalitik sistein domainidir. E1-E2 etkileşimine her ne kadar E1'in tüm domainleri katılsa da UFD domaininin hem etkileşim için gerekli olduğunu hem de doğru E2'nin seçilmesinde önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Durfee vd., 2008a). Günümüze

kadar literatürde henüz Ube1L proteini üzerine sonuçlanan yapısal bir çalışma bulunmamaktadır.

E2 enzimleri;

Enzimatik kaskatta görev yapan enzim sınıflarından ikincisini oluşturan E2 enzimleri taşıyıcı enzimler/konjuge edici enzimler olarak da isimlendirilmektedirler. Bu sınıf enzimlerin temel görevi E1 tarafından aktive edilmiş Ubl proteini hedef proteine taşımaktır. E2 enzimlerinin üzerinde üç farklı etkileşim yüzeyi bulunmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. UbcH8 partnerleri ile etkileşim yüzeyleri (Şekilde E1 ile etkileşen bölge mor, E3 ile etkileşen turuncu, Ubiquitin ile etkileşen bölge ise kırmızı ile işaretlenmiştir.)

İlk yüzey E2 enziminin Ub ile etkileşiminde, ikinci yüzey E1 enzimi ile etkileşiminde üçüncü yüzey ise E3 enzimi ile etkileşimde görev alan yüzeylerdir. E2 enzimleri direkt olarak hedef protein ile etkileşmezler Ub benzeri proteini E3 enzimine taşırlar. E2 enzimleri üzerindeki E1 ve E3 enzimleri için olan etkileşim yüzeyleri kısmi olarak birbirleri ile çakışmaktadır (Huang D. T. vd., 2005, Huang L. vd., 1999). Bu çakışmanın yanında E1 ve E3 enzimleri ancak E2 enziminin farklı konformasyonel yapılarına bağlanabilirler. Bunların bir sonucu olarak E1 ve E3 enzimleri E2 enzimine aynı anda bağlanmayıp birbirini takip eden periyotlarda bağlanabilmektedirler (Reverter ve Lima 2005).

UbcH8 (UBE2L6);

153 amino asitten meydana gelen proteini kodlayan gen 11. Kromozomun q12 bölgesinde yer almaktadır (Ardley vd., 2000). Tıpkı Ube1L ve ISG15 gibi tip I interferonlar ve viral enfeksiyonlarca ekspresyonu tetiklenen protein 17767 Dalton büyüklüğündedir (Kim K. I. vd., 2004, Zhao vd., 2004).

İlk olarak ubiquitilasyon sisteminde görev aldığı ortaya çıkarılan proteinin ilerleyen zamanlarda ISGlasyonda da görev aldığı ortaya çıkarılmıştır (Kim K. I. vd., 2004). Birçok E2 enzimi tek bir Ub/Ubl protein için spesifik olmasına rağmen, UbcH8'in hem Ub hem de ISG15 modifikasyon sistemlerinde işlev yapması proteine farklı bir ilgi kazandırmaktadır (Zhao vd., 2004).

2005 yılında kristal yapısı (pdb: 1wzw) ortaya çıkarılan UbcH8'in 2009 yılında da Ub ile NMR verilerine dayalı modellenmiş kompleks yapısı (pdb: 2kjh) ortaya konulmuştur (Serniwa ve Shaw 2009). Bu kompleks yapıda UbcH8'in Ub ile etkileşime giren yüzeyi ve bu etkileşimde görev alan amino asitlerin hangilerinin büyük önem taşıdığı ortaya koyulmuştur. Ancak Ub-UbcH8 arasındaki doğal etkileşim NMR çalışmaları ile saptanamadığından, Ub C-terminalindeki glisin sisteine dönüştürülerek iki protein arasında disulfid bağı ile kararlı bir yapı oluşması sağlanmıştır (Serniwa ve Shaw 2009).

1.5.1.2. ISG15in Ube1L'den UbcH8'e transferi

ISGylasyonun ikinci basamağında, Ube1L'nin katalitik sisteinine tiyoester bağı ile bağlı bulunan ISG15'in E2 üzerindeki katalitik sisteine transferi gerçekleşir. Bu aktarım **trans-tiyolasyon** olarak adlandırılır. Bu transferin gerçekleşebilmesi için E1 ve E2 enzimlerinin birbiri ile nonkovalent olarak etkileşmesi gereklidir.

Durfee ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınlanan çalışmalarında hem Ube1L hem de UbcH8'in E1-E2 etkileşiminde rol alan bölgeleri belirlenmiştir. Adı geçen çalışmada Ube1L-UFD'nin tek başına UbcH8 ile etkileşimde yeterli olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Ube1L-UFD'nin E1'den E2'ye ISG15 aktarımı için gerekli olduğu ortaya koyulmuştur. Ube1L-UFD delesyona uğratıldığında, E1-E2 etkileşiminin ve transtiyolasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir (Durfee vd., 2008b). UbcH8'in N-terminalinde bulunan ilk 39 amino asidinin seçicilikte ve Ube1L ile etkileşimde gerekli olduğu gösterilmiştir (Durfee vd., 2008b).

1.5.1.3. E3 enzimi yardımı ile ISG15in hedef proteine ligasyonu

ISGylasyonda son basamak E2 üzerindeki ISG15'in E3 ligazlar yardımı ile hedef proteine aktarılmasıdır. Bu basamak sonucunda ISG15'in karboksil terminalinde

bulunan glisin hedef protein üzerindeki bir lizin yan zincirine izopeptit bağı ile kovalent olarak bağlanır. Bu aktarımda E3 enzimleri hem hedef proteinin tanınmasında hem de izopeptit bağının oluşumu reaksiyonunun katalizlenmesinde görev alırlar (Huibregtse vd., 1995a, Scheffner vd., 1995).

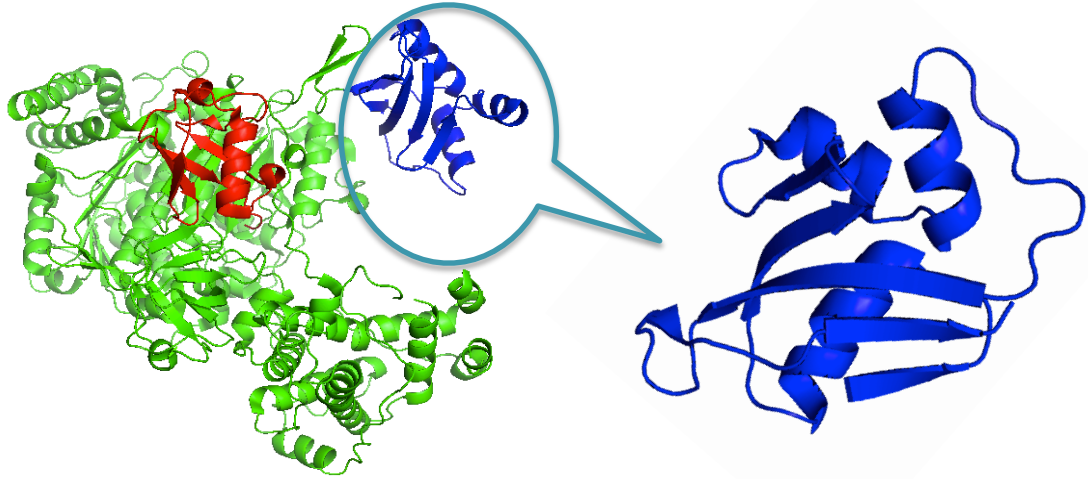
E3 enzimleri temel olarak 3 sınıfa ayrılmışlardır. Bu sınıflar HECT (E6AP C terminali ile homolog) sınıfı, RING/U-box sınıfı ve bu iki sınıfa dahil olmayan E3'lerin oluşturduğu sınıftır (Huibregtse vd., 1995b).

1.6. Ub ve Ubl Sistemlerin E1 Enzimlerinde UFD

Ub ve Ubl modifikasyon sistemlerinde her bir Ub/Ubl protein için bir ya da birkaç E1 enzimi mevcuttur. E1 enzimleri birden fazla E2 enzimleri ile etkileşerek Ub/Ubl proteini farklı hedef proteinlere yönlendirirler. E1-E2 etkileşimlerinde UFD'lerinin bağlanma ve seçiciliğin sağlanmasında önemli olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (Durfee vd., 2008b, Tokgoz vd., 2012, Wang J. vd., 2010a). Günümüze kadar birçok farklı Ubl proteinlerin E1-UF domainleri yapısal çalışmalar ile incelenmiştir. Bu sistemlerden bazıları; Ub, Sumo, Nedd8, Atg8'dir.

1.6.1. Ub E1-UFD

Uba1 110-120 kDa boyutunda monomerik bir proteindir. İnsan Uba1 proteininin yapısı henüz tayin edilememiştir ancak 2008 yılında *Saccharomyces cerevisia* Uba1 enziminin Ub ile oluşturduğu kompleksinin üç boyutlu yapısı X-ışınları kromatografisi ile belirlenmiştir (Şekil 1.5) (Lee ve Schindelin 2008).

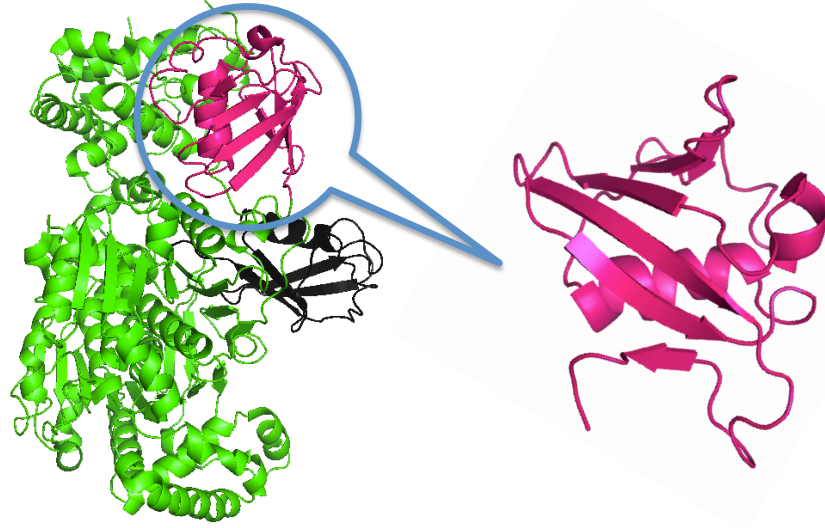


Şekil 1.5. *Saccharomyces cerevisia* Uba1-ubiquitin kompleksi (Ub: kırmızı, Uba1-UF:mavi PDB: 3CMM)

Saccharomyces cerevisia Uba1-Ub kompleksi yapısında UF domainin β - β - α - β - β - α - β yapısına katlanmış olduğu görülmektedir. Bu yapıda ikinci alfa heliksin diğer UFD'lere göre daha uzun olduğu ve kırık doğru bir yapıda olduğu dikkat çekmektedir. E2 enzimlerinin ikinci alfa heliks bölgesine bağlandığı düşünüldüğünde bu farklılığın seçicilikte rol alabileceği ağırlıkla muhtemeldir. Bunun yanında aynı yapıdaki (PDB: 3CMM) simetrik iki kompleks karşılaştırıldığında UF Domainin farklı koformasyonlarda olduğu görülmektedir. Kristal yapısındaki bu iki farklı konformasyonel yapı UFD'nin hareketli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu hareketli yapı sayesinde E1-E2 etkileşiminin kolaylaştığı düşünülmektedir (Lee ve Schindelin 2008).

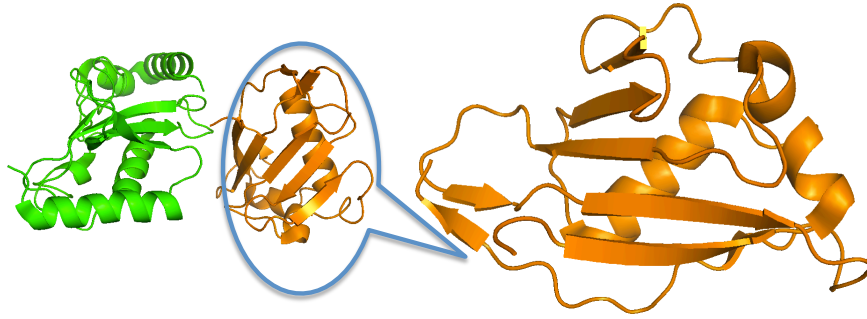
1.6.2. Sumo E1-UF

Sumo sisteminde E1 enzimi iki farklı alt birimden oluşan bir heterodimerdir. İnsan Sumo E1 enziminin alt birimleri Uba2 ve Aos1 olarak mayada ise SAE1-SAE2 (Uba2) olarak adlandırılmaktadır. *Homo Sapiens* Uba2-UFD'ini içeren iki adet kristal yapı bulunmaktadır (Şekil 1.6) (Lois ve Lima 2005, Olsen vd., 2010).



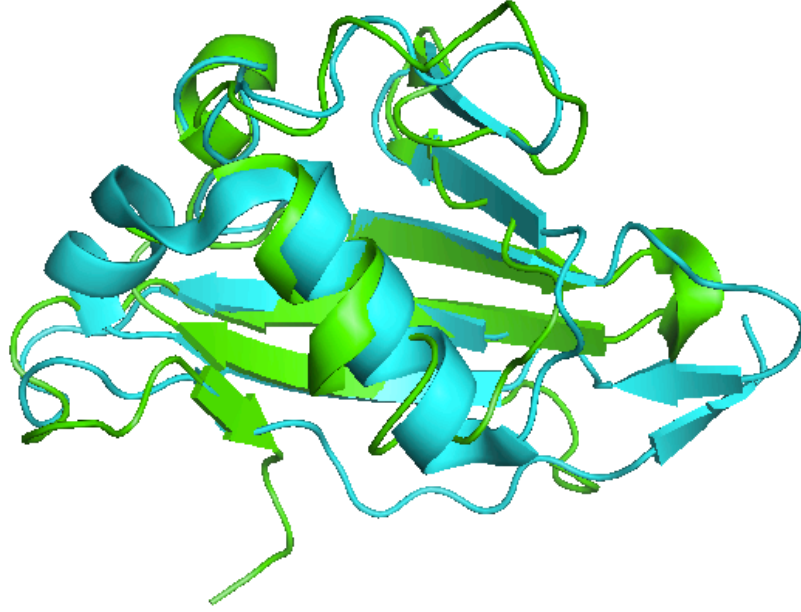
Şekil 1.6. E1-Sumo kompleksi (Sumo: siyah. Sae2-UFD: pembe ile gösterildi. PDB: 1Y8R)

SUMO sisteminin *Saccharomyces cerevisia* Uba2-UFD-Ubc9 kompleksini içeren yapı ise 2010 yılında yayınlanmıştır (Şekil 1.7) (Wang J. vd., 2010b). Sumo sisteminin E1 enziminin hem E1 hem de E2 ile etkileşimlerinden meydana gelen komplekslerinin olması sistemin işleyişine ışık tutmak için büyük bir katkı sağlamıştır.



Şekil 1.7. *Saccharomyces cerevisia* Uba2-UFD- Ubc9 kompleksi (Uba2-UFD: Turuncu, Ubc9: Yeşil. PDB: 3ONG)

Bu iki farklı organizmaya ait olan yapının içerdiği Uba2-UFD'ler karşılaştırıldığında yapılar arasında çok büyük bir farklılık olmadığı görülmektedir (Şekil 1.8) (RMSD: 3.60 Å ve 51 atom üst üste çakışmıştır). Bu iki farklı organizmadan elde edilen UFD domainleri de göstermektedir ki UFD yapıları çok iyi bir şekilde korunmuştur.

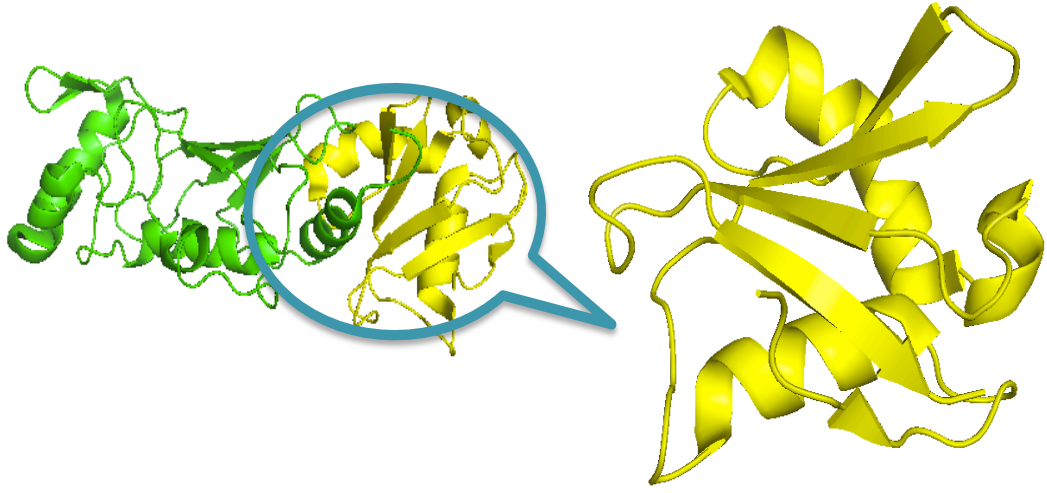


Şekil 1.8. Uba2-UFD'nin Sumo ve UbC9 ile olan komplekslerindeki yapılarının karşılaştırılması
(ScUbc9 ile ScUba2-UFD yapısı mavi, ScSUMO ile HsUba2 yapısındaki Uba2-UFD ise yeşil ile gösterilmiştir. PDB:3ONG, PDB:1Y8R)

Sumo sisteminin E1 enzimi ile yapılmış olan diğer bir yapısal çalışmada Sumo ile E1 enziminin kompleksi ve adenilasyon basamağında E1 sistein domainindeki büyük açılmal değişim incelenmiştir (Olsen vd., 2010). Bu yapıdaki E1-UFD 2005 yılında elde edilen kristal yapısı ile aynı yapıya sahiptir (PDB: 3KYC).

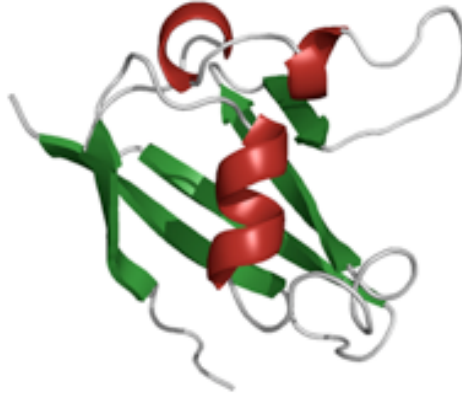
1.6.3. NEDD8 E1-UFD

NEDD8 E1 enzimi APPBP1-Uba3 heterodimerinden oluşmaktadır. UFD'i Uba3'ün karboksil terminalinde yer almaktadır. Ub benzeri sistemler arasında en çok yapısal çalışma yapılmış olan sistem NEDDlasyon sistemidir. Nedd8 E1 enziminin hem serbest hem de çeşitli E2, Nedd8-E2 kompleksleri halinde kristal yapıları mevcuttur (Bohnsack ve Haas 2003, Huang D. T. vd., 2005). Şekil 1.9'da Uba3-UFD'nin E2 ile kompleks halde yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.9. Uba3-UFD-Ubc12 kompleksi (Ubc12: Yeşil, Uba3-UFD: Sari ile gösterilmektedir. PDB: 1Y8X)

Ubc12 enzimi ile kompleks yapısında Uba3-UFD'nin ikinci alfa heliksi kararlı bir yapıya sahiptir ancak NMR ile belirlenmiş serbest Uba3 yapısında ve E2 içermeyen kompleks yapılarında aynı bölgenin alfa heliks formunu kaybetmiş hareketli bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.10). Bu alfa heliksin serbest halde iken dinamik bir yapıya sahip olmasının bağlanmada önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.10. Uba3-UFD NMR solüsyon yapısı (Beta tabakalar yeşil, alfa heliks ikinci yapısına sahip bölgeler kırmızı ile renklendirildi. PDB:2LQ7)

1.6.4. Atg8 E1 enzimi (atg7) Ub Fold domainleri

Atg8 sistemi noncanonical E1 ve E2 enzimleri ile görev yapan Ub benzeri bir konjugasyon sistemidir. *Saccharomyces cerevisia* organizmasında görev yapan Atg8'in E1 enzimi atg7 olarak adlandırılır ve diğer Ub benzeri post-translasyonel sistemlerin E1lerinin içerdiği gibi UFD içerir. Bu domain diğer UFDler ile karşılaştırıldığında dizi bakımından bir benzerlik göstermemektedir.

1.7. Mekanizma (yapı) Tabanlı Drug Dizaynı

Yakın geçmişte kuantum fiziğinde gerçekleşen hızlı gelişmeler ve bunun ortaya çıkardığı yüksek performanslı bilgisayarlar, bilimin birçok farklı dalında büyük değişimlere imkan sağlamıştır. Bunun yanında biyokimya, moleküler biyoloji, tıp gibi farklı disiplinler arası işbirliği yeni ve etkili araştırma alanlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu alanlardan bir tanesi de mekanizma tabanlı drug dizaynıdır. Mekanizma tabanlı drug dizaynı temel olarak hedef sistemde seçilen proteinin deneysel olarak belirlenmiş ya da bilgisayar tabanlı olarak hesaplanmış yapısında bulunan aktif bölgeye uygun ve sistemin mekanizmasının işleyişini durdurmaya yönelik drug bulunmasına dayanır. Bu kapsamda bilgisayar yardımı ile birçok drug dizayn edilmiştir. Ancak bilgisayar tabanlı dizaynların gerçekleştirilmesi sonrası belirlenen moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin optimizasyonu ve analoglarının sentezlenmesi hem uzun zaman gerektiren hemde maddi olarak yüksek maliyete sahip bir yöntemdir. Bunun yanında mekanizma tabanlı dizaynlarda kimi zaman enzimlerin aktif bölgelerine drug dizaynı gerçekleştirilse de birçok zaman sistemin işleyişini durdurmak için protein-protein etkileşimlerini durdurmak gerekmektedir. Birçok sistemde protein-protein etkileşim yüzey alanları çok geniştir ve bu yüksek alanlar için sadece bilgisayar tabanlı drug dizaynlarında zorluk yaşanmaktadır.

1996 yılında Stephen W. FESIK'in ortaya çıkardığı yeni bir yöntem ile drug dizayn yöntemine yeni bir boyut getirmiştir. "Structure-activity relationships by NMR" (SAR by NMR) ismini taşıyan bu yeni yöntem ile drug dizayn için gerçekleşen disiplinler arası çalışmalarda NMR'ın kullanımı daha da büyük yer kazanmaya

başlamıştır (Shuker vd., 1996). "SAR by NMR" yöntemi ile drug dizaynının ilk basmağında bilgisayar tabanlı bir seçim sistemi ile proteinin etkileşim bölgesindeki farklı bölümleri ile etkileşebilecek küçük bileşikler belirlenir (Billeter 1995, Diercks vd., 2001, Fesik vd., 1997, Hajduk vd., 1999, Hajduk vd., 1997, Hanzawa and Takizawa 2010, Jahnke 2003, Klages vd., 2007, Rose vd., 1999, Shuker vd., 1996). Sonrasında bu küçük bileşiklerin ¹⁵N-HSQC NMR titrasyonu ile deneysel olarak protein ile etkileşimleri belirlenir. Bu basamakta NMR'ın önemi birkez daha ortaya çıkmaktadır. NMR yönteminde deneylerin kısa sürelerde tamamlanması birçok farklı bileşiğin kısa surede test edilmesine imkan vermektedir (Hanzawa ve Takizawa 2010, Pellecchia vd., 2008, Zartler ve Shapiro 2006). Bunun yanında NMR yönteminde proteinin drug ile etkileşiminin detaylarını ve etkileştiği bölgeleri ve etkileşim gücünü aynı anda ve kompleksin yapısını belirlemeden gözlemlemek mümkündür. Bunun yanında NMR'ın bu yöntemdeki diğer bir avantajıda diğer tekniklerin sahip olmadığı atomik düzeyde moleküler dinamiğin pikosaniyeden saniyeye kadar değişen geniş bir ararıta izlenebilmesine imkan vermesidir. NMR ile mekanizma tabanlı drug dizaynının ilk basamağında sistemin etkileşiminde kilit rol oynadığı düşünölen domainlerin yapı tayinleridir. Bu nedenle bu çalışma ISGlasyon sistemi için geliştirilebilecek mekanizma tabanlı drug dizaynına temel oluşturmaktadır.

1.7.1. Ub ve Ub benzeri sistemlerde mekanizma tabanlı drug dizayn çalışmaları

Ub ve Ub benzeri sistemlerin işleyişinde görev alan enzimlerin yapılarının bir bir aydınlatılması ile bu sistemler ile ilgili mekanizma tabanlı drug keşifleri de doğru orantılı olarak artmaya başlamıştır. Mekanizma tabanlı drug dizayn çalışmalarından ilki Milenyum farmasötik firması tarafından bulunan MLN 4924 kodu ile isimlendirilen moleküldür. MLN 4924, NEDD8 aktivasyon enziminin aktif bölgesine bağlanarak enzimin aktivitesini durdurmaktadır (Brownell vd., 2010, Chen vd., 2011, Soucy vd., 2009a, Soucy vd., 2009b, Tanaka T. vd., 2012). 2008 yılında keşfedilen bu molekülün NEDD8 E1 enzimini baskılama yolu ile melanomada tümör büyümesini baskılaması beklenmektedir. Molekül ile ilgili gerçekleştirilen klinik demeler öncesi yapılan çalışmalar olumlu sonuç vermiş olup klinik safhalardaki testler ve denemeler devam etmektedir.

Bunun yanında Ubiquitin sisteminde deubiquitilasyon basamağında görev alan USP7'nin aktivitesinin baskılanması için bulunan P-005091, BAP-1 deubiquitilasyon enziminin aktivitesinin baskılanması için keşfedilen TG2-103-1, ubiquitin yardımı ile protein degradasyonunun son basamağını oluşturan proteasomun inhibisyonu için keşfedilen CEP-18770, MLN-9708, PR-171 molükülleri, Ub E3 enzimi MuRF1'in aktivitesini baskılamak için bulunan P-013222 molekülü Ub ve Ub benzeri sistemlerin çeşitli basamaklarını inhibe etmek için dizayn edilen druglar arasında yer almaktadır.

1.8. NMR Spektroskopisi ve Protein Yapı Tayini

1.8.1. NMR Spektroskopisi

NMR spektroskopisinin temeli atom çekirdeğinin manyetik özelliklere sahip olmasına ve kuantum fiziğine dayanmaktadır. Atom çekirdeğinin sahip olduğu manyetik özellik sayesinde, manyetik momenti sıfırdan farklı bir atom çekirdeğine uygulanan manyetik enerjinin atom çekirdeği tarafından absorblandığı ve absorblanan bu enerjinin tekrar geri salındığı bulunmuştur. Bu geri salınan enerji, uygulanan manyetik radyasyonun gücüne ve uygulanan atomun manyetik özelliklerine göre farklı bir frekansta rezonans vermektedir. Sıklıkla kullanılan izotoplar manyetik momentleri sıfırdan farklı olan ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{29}Si gibi atom izotoplarıdır. Buna rağmen neredeyse tüm atomların NMR için uygun manyetik momenti sıfırdan farklı izotopları bulunmaktadır.

1940'li yılların başında Isaac Rabi'nin geliştirdiği yöntem sayesinde atom çekirdeğinin manyetik özelliklerinin ve farklı frekanslarda oluşturduğu rezonansların kaydedilmesini sağlamıştır. Bu çalışma ile hız kazanan araştırmalar sonucu 1946 yılında Felix Block ve Edward M. Purcell ilk NMR cihazını geliştirmişlerdir. İlk NMR cihazının oluşturabildiği rezonans frekansı sadece 30 Mhz'dir.

İlk NMR cihazının keşfinden sonraki 25 yıllık surede NMR aktif moleküllerin 1-D spektrumları üzerine bir çok çalışma yapılmasına rağmen NMR in gelişiminde çok ilerleme kaydedilememiştir. Ancak bu durgun süreç 1970 yılında iki boyutlu NMR spektroskopisinin geliştirilmesi ile büyük bir hız kazanmıştır. Bugün kaydedilebilen

üç, dört ve hatta beş boyutlu spektrumlar NMR spektroskopisinin gücüne büyük bir güç katmıştır.

NMR spektroskopisinin bilim için önemini bu alanda yaptıkları çalışmalar ile Nobel ödülü alan bilim adamlarının bir listesi açıkça ortaya koymaktadır: 1943 yılında Otto Stern Fizik dalında protonların manyetik momentleri ile ilgili çalışması ile, 1944 yılında Isidor I. Rabi fizik dalında NMR'ın temelini oluşturan çalışmalarıyla, 1952 de Felic Bloch ve Edward M. Purcell Fizik dalında ilk NMR cihazını hayata geçirmeleri ile, 1991 de Richard R. Ernst ve 2002 yılında Kurt Wüthrich Kimya dalında yüksek çözünürlüklü NMR spektroskopisinin geliştirilmesi ve NMR ile protein yapı tayini ile ilgili çalışmaları ile, 2003 yılında ise Paul Lauterbur ve Peter Mansfield Tıp alanında manyetik rezonans ile görüntüleme tekniği ile ilgili çalışmaları ile Nobel ödülünü kazanmışlardır.

1.8.1.1. Günümüzde NMR uygulamaları

Günümüzde NMR hem bilim hem tıp hem de endüstri alanında sıklıkla kullanılan güçlü bir teknik haline gelmiştir. Günümüzde NMR kullanım alanlarından bazıları;

- Biyo-makro moleküllerin üç boyutlu yapılarının belirlenmesinde,
- Biyo makro moleküllerin moleküler dinamik çalışmalarında,
- Moleküller arası zayıf etkileşimlerin belirlenmesinde,
- Molekül spesifik ilaç dizaynında,
- Membran proteinlerinin yapılarının belirlenmesinde,
- Metabolomik analizlerde,
- Kimyasal analizlerde,
- Polimer maddeler ile ilgili çalışmalarda,

olarak sıralanabilir. Böyle geniş bir kullanım alanı olan bir teknik olmasına rağmen belki de en büyük dezavantajı cihazın ve kullanım giderlerinin yüksek masraflar oluşturmasıdır.

1.8.2. NMR ile Protein yapı tayini

NMR ile protein tayini, proteini oluşturan amino asitlerin içerdikleri C, N ve H atomlarına yollanan enerji ile atomların oluşturdıkları rezonanslardan elde edilen

bilgilerin bir araya getirilmesine dayanır. Temel olarak yapı hesaplamaları için iki farklı tip bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan ilki yakın mesafe korelasyon (through bond) deneyleri olarak adlandırılan deneylerden elde edilir. Korelasyon deneylerinde manyetizasyon kovalent bağlar vasıtası ile bir atomdan diğerine transfer edilir. Bu deneylerden elde edilen veriler doğrultusunda dizisel rezonans atamaları gerçekleştirilir.

İkinci tip bilgi uzak mesafe (through space) etkileşimlerinin gözlenebildiği deneylerden elde edilir. Bu deneylerde manyetizasyon boşluk vasıtası ile bir atomdan diğerine aktarılır ve aralarında 5 Å veya daha az mesafe olan atomlar arasında rezonans gözlenebilir. Böylece proteinde peptid sıralaması bakımından birbirlerine uzak olmalarına rağmen üç boyutlu yapıda birbirine yakın olan amino asitler hakkında bilgi elde edilebilir.

1.8.3. Protein yapı tayinin Temel basamakları

NMR ile protein yapı tayini 3 basamağa ayırmak mümkündür.

1) Protein örneğinin hazırlanması: İlk basamak protein örneğinin hazırlanmasıdır.

NMR ile protein tayininde ^{15}N , ^{13}C işaretli, yüksek saflıkta ve yüksek konsantrasyonda protein örneği gereklidir.

2) NMR verilerinin toplanması: Yapı analizi için gerekli olan tüm iki ve üç boyutlu NMR verilerin kaydedilip işlenmesinden oluşan basamaktır.

3) Verilerin analizi ve yapı hesaplamaları:

a) Rezonans atamaları: Proteini oluşturan amino asitlerin C, N ve H atomlarının kimyasal kayma değerlerinin belirlenmesini içerir.

b) Konformasyonel kısıtların elde edilmesi: Kimyasal kayma değerlerinden faydalanarak ikincil yapı ve torsiyon açısı kısıtları değerlerinin elde edildiği ve uzak mesafe deneylerinde elde edilen sinyal şiddetlerinin mesafe kısıtlarına dönüştürüldüğü basamaktır.

c) Yapı hesaplaması: Elde edilen rezonans değerleri, uzun ve kısa mesafe ve açı kısıtları kullanılarak protein üç boyutlu yapısının bilgisayar programı yardımı ile hesaplandığı basamaktır.

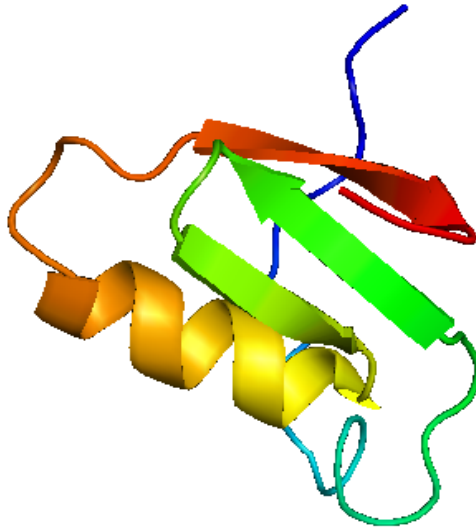
d) Yapı düzenleme (Refinement): Elde edilen protein üç boyutlu yapıların

enerjilerinin minimalizasyonunu içeren basamaktır.

Yukarıdaki temel basamakları kullanarak 1985 yılında Kurt Wüthrich ve arkadaşları ilk kez bir globüler proteinin NMR ile üç boyutlu yapı tayinini gerçekleştirmişlerdir.

1.8.4. Yapısı NMR ile saptanan ilk globüler protein

NMR spektroskopisinin küçük moleküllerin yapı analizinde kullanılması 1950'li yıllara dayansa da, protein yapı tayini için kullanılması ancak Kurt Wüthrich ve grubunun 1975 yılı ve sonrasında NMR'ın biyomoleküllerin analizi için kullanması alanında geliştirdiği yöntemler ile mümkün olmuştur. Kurt Wüthrich ve grubunun yıllarca yaptığı deneysel ve teorik çalışmalar 1985 yılında son noktaya ulaşmıştır (Wuthrich 2001). 1985 yılında Kurt Wüthrich ve arkadaşları seminal inhibitor IIA (BUSI IIA)(PDB:1BUS) globüler proteinin NMR yapısını yayınlamaya bir ilke imza atmışlardır (Williamson vd., 1985). Şekil 1.11'de üç boyutlu yapısı verilmiş olan BUSI IIA 57 amino asitten oluşan bir proteindir.



Şekil 1.11. NMR ile yapısı tayin edilmiş ilk globuler protein olan BUSI IIA'nın üç boyutlu yapısı (PDB:1BUS)

BUSI IIA proteinin üç boyutlu yapısının belirlenebilmesi için gerekli olan örnek doğal kaynağından izole edildiğinden sadece doğal oranlarda ^{13}C ve ^{15}N izotopları içermektedir. Bu nedenle, NMR verilerini toplamak için protein örneği 16 mM'a kadar konsantre edilmiştir. Günümüzde ise bakteriyel sistemler yardımı ile rekombinant izotopik işaretli protein üretimi ucuz ve kolaydır. Bu nedenle

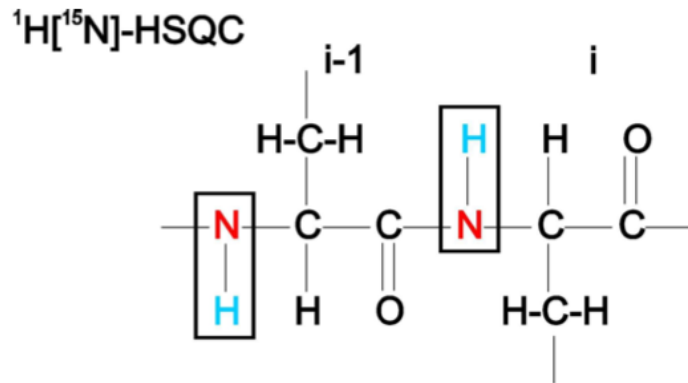
günümüzde NMR ile yapılan yapısal çalışmalarda 0.4 – 0.6 mM izotopik işaretli protein yapı tayini için yeterli olmaktadır.

1.8.5. Protein yapı hesaplamaları için kullanılan temel NMR deneyleri

1.8.5.1. ^{15}N -HSQC

^{15}N -HSQC deneyi iki boyutlu NMR deneylerinden en sık kullanılanıdır. İki boyutlu spektrumda x-eksenini ^1H , y-eksenini ise ^{15}N kimyasal kayma değerleri oluşturmaktadır. ^1H - ^{15}N HSQC deneyinde neredeyse protein üzerindeki alifatik tüm ^{15}N - ^1H bağlarının oluşturduğu kimyasal kaymaları gözlemek mümkündür (Bodenhausen ve Ruben 1980). Bu spektrumda tek gözlenemeyen amino asit azot atomu, aromatik halka içerisinde bulunan Prolin amino asidininidir.

^1H - ^{15}N HSQC spektrumunda hem ana zincir üzerindeki N-H bağlarının hem de amino asitlerin yan zincirlerindeki N-H bağlarının oluşturduğu korelasyonu gözlemlemek mümkündür (Şekil 1.12) (Bodenhausen ve Ruben 1980).

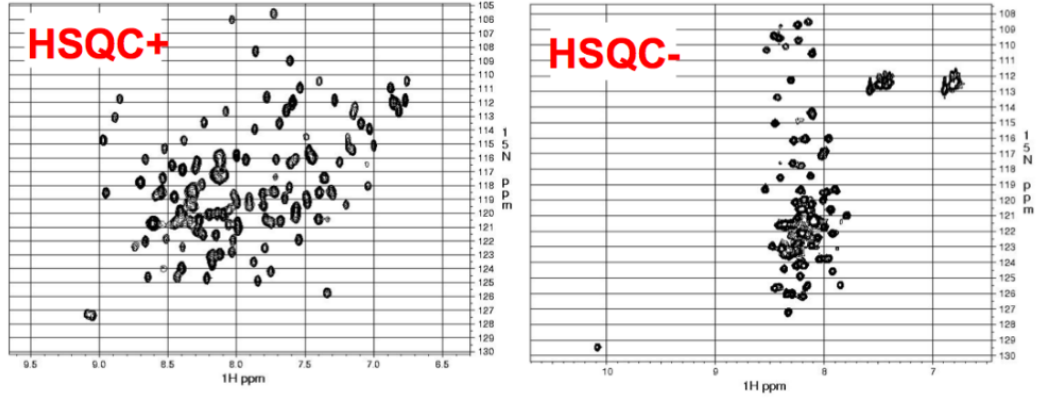


Şekil 1.12. ^{15}N -HSQC’de enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

^1H - ^{15}N HSQC deneyinin en sık kullanılan iki boyutlu NMR deneyi olmasının en büyük nedenlerinden birisi proteinin katlanması ve NMR için uygun olup olmadığı konusunda kısa zamanda net bilgiler verebiliyor olmasıdır. Her ne kadar deney verilerinin toplanma süresi protein örneğinin konsantrasyonuna göre değişiklik gösteriyor olsa da 1-2 mM konsantrasyona sahip bir örnek ile sadece 10 dakikada kaydedilebilmektedir.

Bir protein çözelti içerisinde doğal konformasyonuna katlanmış bir şekilde

bulunuyor ise peptid bağı üzerindeki ^{15}N atomlarının ^1H 'ler ile oluşturdukları korelasyonların ^1H kimyasal kayma değerleri 6 ile 10 ppm aralığında bir kaç ppm'lik bir bölgeye dağılmış olarak bulunur. Ancak protein katlanmamış bir şekilde bulunuyor ise proton boyutundaki değerler 8.0 ppm civarında yaklaşık 1 ppm'lik dar bir aralığı sıkışmış olarak gözlenir (Şekil 1.13).

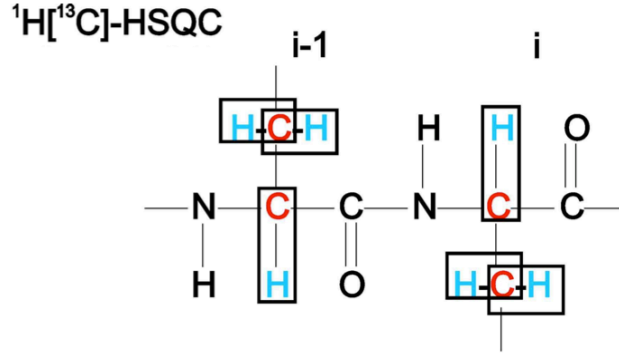


Şekil 1.13. Doğal konformasyonuna katlanmış ve katlanmamış bir proteine ait ^{15}N -HSQC spektrumları (NMRFAM WS, 2011)

^1H - ^{15}N HSQC spektrumundan elde edilen bu bilgi sayesinde proteinin üç boyutlu yapı tayinine uygun şartlarda olup olmadığı kısa zamanda ve düşük maliyetlerle tespit edilebilir. Bunun yanında ^{15}N -H korelasyon değerleri bir proteinin parmak izleri olarak adlandırılabilir kadar spesifik değerler olmaları nedeni ile de büyük önem taşımaktadırlar.

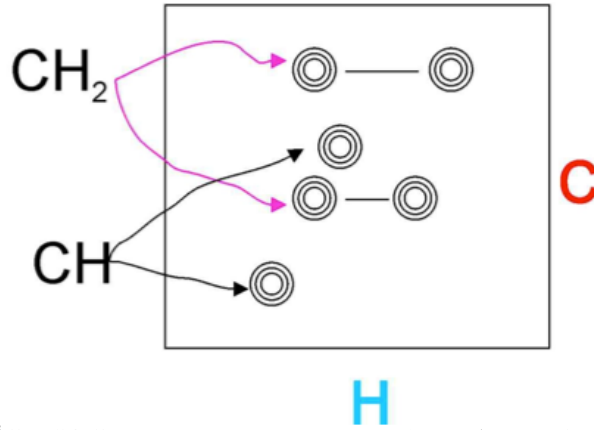
1.8.5.2. ^{13}C -HSQC

İki boyutlu ^1H - ^{13}C HSQC, karbon atomları ile onlara bağlı protonlar arasındaki korelasyonların gözlemlendiği bir deneydir (Şekil 1.14). Hem peptid ana zincirini oluşturan karbonların hem de yan zincir karbonlarının kovalent bir bağ ile bağlı oldukları protonlar ile etkileşimlerinin incelenmesine imkan verir (Şekil 1.15).



Şekil 1.14. ^{13}C -HSQC deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

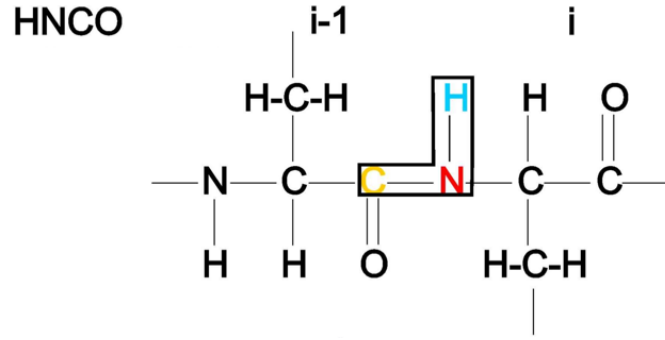
Şekil 1.15’de görüldüğü gibi eğer karbon atomuna bağlı tek bir ^1H var ise spektrumda tek bir pik gözlenir iken, ^{13}C atomuna bağlı iki ^1H atomu var ise bu durumda ^{13}C -HSQC spektrumunda ^{13}C kimyasal kayma değerleri aynı ^1H kimyasal değerleri farklı iki pik gözlenir.



Şekil 1.15. ^{13}C -HSQC spektrumunda gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

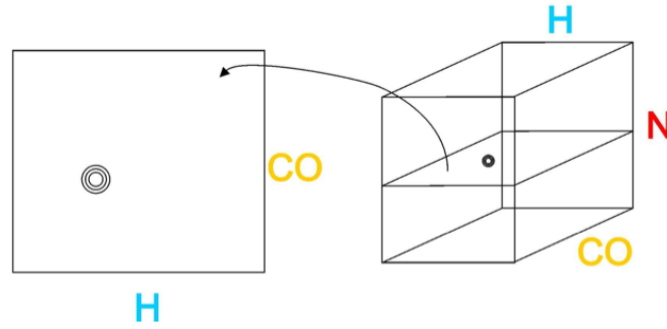
1.8.5.3. *HNCO*

HNCO, peptid zinciri üzerindeki bir amino asidin N-H’i ile kendisinden bir önceki aminoasidin karbonil karbonu arasındaki korelasyonun belirlenmesinde kullanılan bir deneydir (Şekil 1.16) (Kay vd., 2011).



Şekil 1.16. HNCO deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Enerji *i* amino asitinin ana zincir amino azotuna bağlı protonu üzerinden azot atomu vasıtasıyla *i-1*'inci amino asitin karbonil karbonuna aktarılır ve manyetizasyon aynı yolu izleyerek hidrojen atomuna kadar döner (Şekil 1.16) (Grzesiek ve Bax 1992b, Kay vd., 2011).



Şekil 1.17. HNCO spektrumunda gözlenen bir pik örneği (NMRFAM WS, 2011)

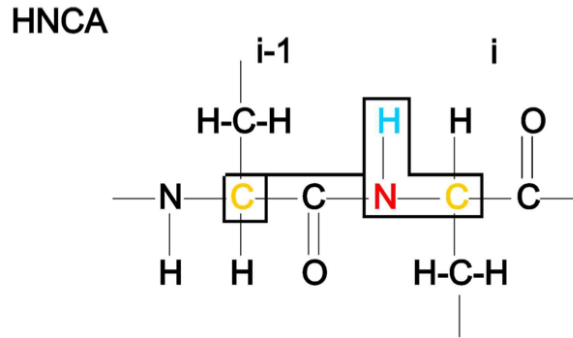
Bu deney üçlü korelasyon deneylerinin en duyarlılarından olup manyetizasyon sonucu elde edilen veriler hem ana zincir atomalarında hem de ikincil yapı belirlemelerinde önemli bir yere sahiptir (Şekil 1.17).

1.8.6. Peptid ana zincirindeki atomların atamaları için gerekli deneyler

1.8.6.1. HNCA

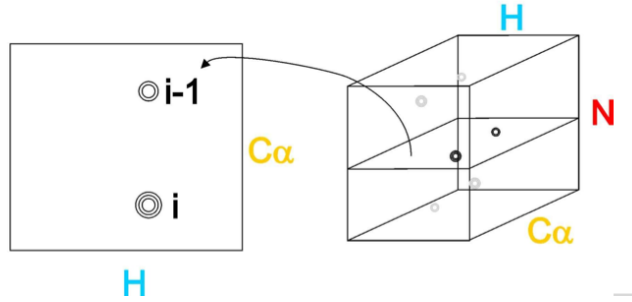
Proteini oluşturan peptid ana zinciri üzerindeki atamalar için gerekli olan en temel deneydir. Deneyde enerji hedef amino asidin amid protonundan azot üzerine ve buradan da hem kendi alfa karbonuna hem de bir önceki amino asidin alfa karbonuna

aktarılır ve rezonans aynı yolu izleyerek geri döner (Şekil 1.18) (Farmer vd., 1992, Kay vd., 2011).



Şekil 1.18. HNCA deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Bu enerji aktarımı sonucu *i* amino asidinin amino grubu ile hem bir önceki amino asidin alfa karbonu hem de kendi alfa karbonu arasındaki rezonans bilgileri elde edilir (Farmer vd., 1992). Bu deneyde azot atomundan enerjinin kendi alfa karbonuna aktarımında izlenen yol, bir önceki amino asidin alfa karbonuna aktarımında izlenen yoldan çok daha kısa olduğu için, spektrum üzerinde oluşan pik şiddetleri farklılık gösterir (Kay vd., 2011).

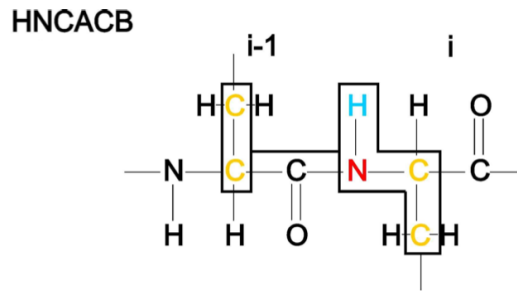


Şekil 1.19. HNCA deneyinde gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

Şekil 1.19’da görüldüğü gibi *i*’nci amino asidin amino grubu ile enerjinin ilk aktarıldığı kendi alfa karbonu arasındaki korelasyon pikinin şiddeti *i*-1’inci amino asidin alfa karbonu arasındaki korelasyon piki şiddetinden daha kuvvetlidir (Grzesiek ve Bax 1992b).

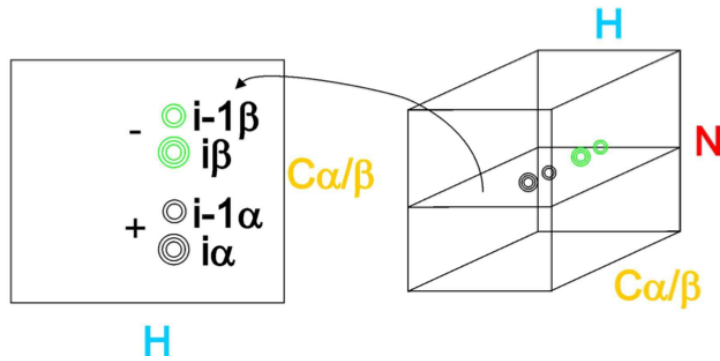
1.8.6.2. HNCACB

Tıpkı HNCA deneyinde olduğu gibi enerji yine hedef amino asidin amid protonundan azot üzerine ve buradan da hem kendi alfa karbonuna hem de bir önceki amino asidin alfa karbonuna aktarılır. Ancak bu asamadan sonra enerji geri dönmek yerine bir adım daha ileriye geçerek her iki amino asidinde beta karbonlarına aktarılır (Şekil 1.20) (Muhandiram ve Kay 1994).



Şekil 1.20. HNCACB enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Manyetizasyonun beta karbonlarına ulaştıktan sonra aynı yolu izleyerek amid protonuna geri döner. Gerçekleştirilen bu enerji aktarımı sonucu hedef ve bir önceki amino asidin hem alfa hem de beta karbonlarının manyetik rezonans değerleri belirlenmiş olur.



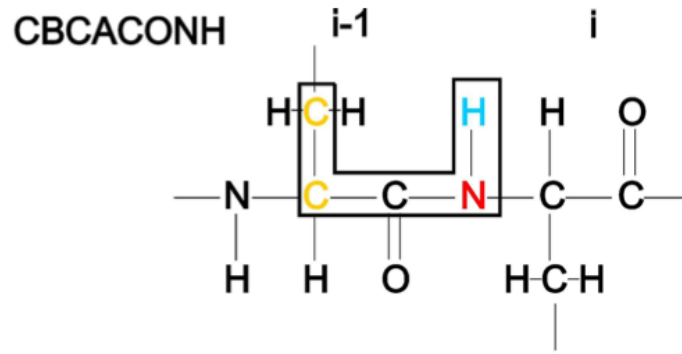
Şekil 1.21. HNCACB spektrumunda gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

Bu spektrumda beta karbonlarının piklerinin negatif alfa karbonlarının piklerinin ise pozitif olması alfa ve beta karbon rezonanslarının ayırt edilmesinde büyük kolaylık sağlar (Şekil 1.21) (Muhandiram ve Kay 1994). Ayrıca, HNCA deneyinde olduğu gibi, amid grubunun kendi karbon atomları ile oluşturduğu piklerin şiddeti bir önceki amino asidin karbon atomları ile oluşturduğu piklerin şiddetinden daha

fazladır.

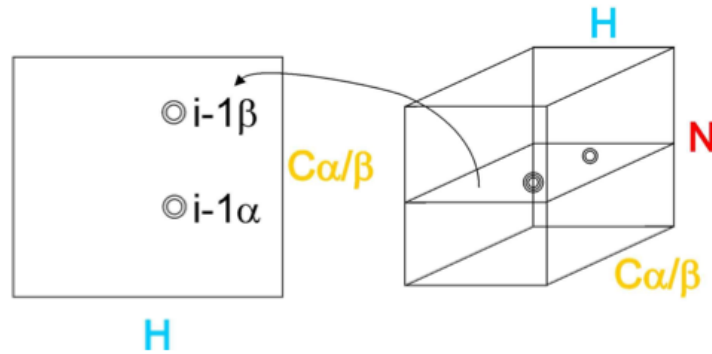
1.8.6.3. CBCACONH

Manyetizasyon ilk olarak bir önceki amino asidin alfa ve beta protonlarına aktarılır. Beta protonuna aktarılan enerji beta karbonunu izleyerek alfa karbonuna, alfa protonuna aktarılan enerji ise doğrudan alfa karbonuna aktarılır. Bunun sonrasında ise karbonil karbonu üzerinden hedef amino asidin amid grubuna aktarılır (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. CBCACONH deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Sonuç olarak *i*'nci amino asidin N-H grubu ile *i-1*'inci amino asidin alfa ve beta karbonları arasında korelasyon pikleri gözlemlenir (Şekil 1.22) (Grzesiek ve Bax 1992a).



Şekil 1.23. CBCACONH spektrumunda gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

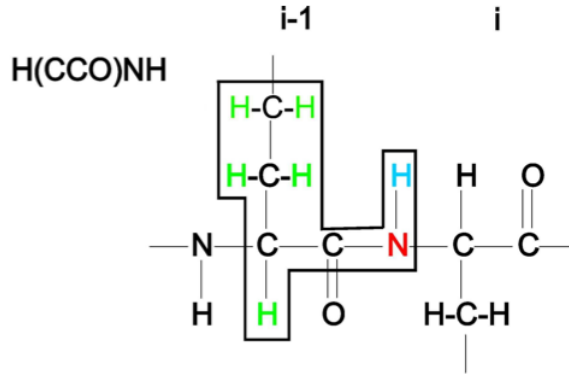
CBCACONH spektrumundan elde edilen bilginin HNCACB spektrumundan elde edilen bilgi ile birleştirilmesi, peptit zincirinde birbirini takip eden amino asit

rezonanslarının belirlenmesini mümkün kılar. Ancak CBCACONH'in hassasiyeti manyetizasyonun amino protonundan diğer atomlara aktarıldığı deneylerdeki kadar yüksek değildir. Bu nedenle molekül ağırlıkları büyük olan proteinlerin CBCACONH spektrumlarında çok fazla sinyal kirliliği oluşabilmektedir. Böyle durumlarda CBCACONH deneyinden elde edilen veriler HNCO, HNCA gibi deneyler ile desteklenmelidir (Grzesiek ve Bax 1992a).

1.8.7. Yan zincir atomlarının rezonans atamaları için gerekli deneyler

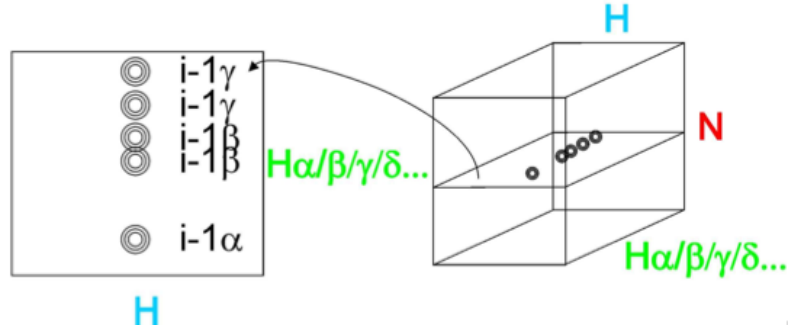
1.8.7.1. HCCONH

Yan zincir atomlarının rezonans değerlerinin belirlenmesinde kullanılan en temel deneylerden biri HCCONH'tir. Bu deneyde ilk adımda manyetizasyon yan zincirlerde bulunan tüm hidrojen atomlarından hidrojen atomlarının bağlı oldukları karbonlara aktarılır (Şekil 1.24) (Montelione vd., 1992). Manyetizasyon karbonlar arasında izotropik bir karışım haline gelir ve ardından karbonil karbonuna aktarılır. Manyetizasyon buradan bir sonraki amino asitin amid azotuna geçer ve son olarak azota bağlı hidrojen atomunda sonlanır (Grzesiek vd., 1993, Montelione vd., 1992).



Şekil 1.24. HCCONH deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Oluşan üç boyutlu spektrumda iki boyutu ^1H diğer boyutu ise ^{15}N oluşturur.

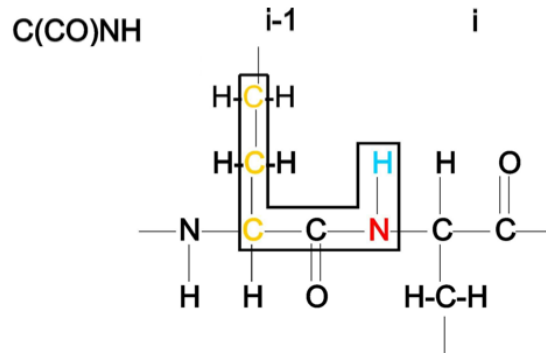


Şekil 1.25. HCONH spektrumunda gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

Deneyin ilk adımında enerji tüm yan zincir protonlarından bağlı karbonlara aktarıldığından elde edilen spektrumda tüm yan zincir protonlarının kimyasal kayma değerleri gözlenebilmektedir (Şekil 1.25). Böylece HCONH tüm yan zincir protonlarının atamalarının yapılmasına imkan verir (Grzesiek vd., 1993, Montelione vd., 1992).

1.8.7.2. CCONH

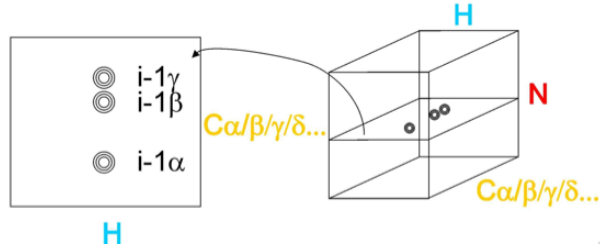
CCONH yan zincir karbonlarının rezonans atamalarının yapılmasında kullanılır (Grzesiek vd., 1993). Bu deneyde manyetizasyon aktarımı HCONH ile benzerlik göstermesine rağmen i-1'inci amino asitin karbon atomları ile i'ninci amino asitin N-H grubu arasındaki korelasyon gözlemlenir (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. CCONH deneyinde enerjinin aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Elde edilen üç boyutlu spektrumun bir boyutunu ^{13}C bir boyutunu ^{15}N diğer boyutunu ise ^1H kimyasal kayma değerleri oluşturmaktadır. Spektrum üzerinde tüm yan zincir karbonlarının oluşturduğu manyetik rezonans piklerini görmek

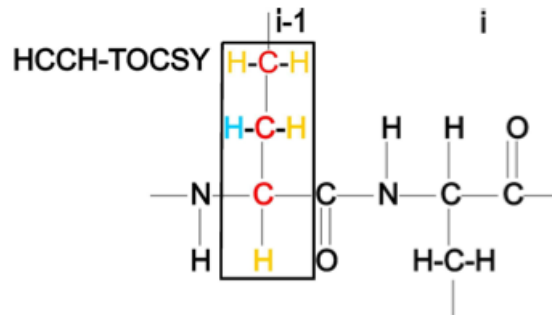
mümkündür (Şekil 1.27) (Grzesiek vd., 1993).



Şekil 1.27. CCONH spektrumunda gözlenen atomlar (NMRFAM WS, 2011)

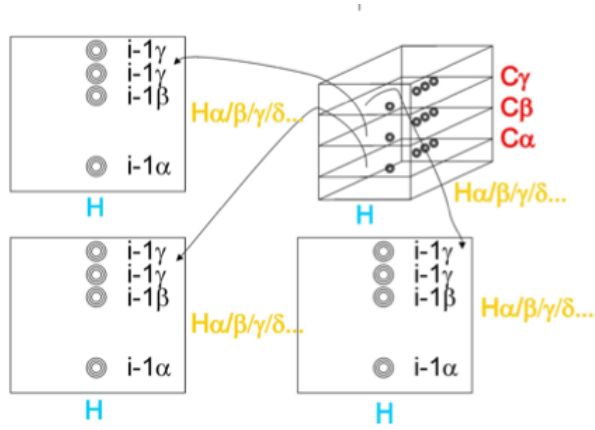
1.8.7.3. HCCH-TOCSY

Yan zincir atomlarının rezonans atamalarında en yaygın olarak kullanılan deneydir. Manyetizasyon yan zincir protonlarından bu protonların bağlı olduğu karbonlara aktarılır ve bunu izotropik bir ^{13}C karışımı takip eder ve son olarak enerji yan zincir protonlarına geri döner (Şekil 1.28) (Bax vd., 1990, Olejniczak vd., 1992).



Şekil 1.28. HCCH-TOCSY deneyinde enerji aktarımının gerçekleştiği atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Sonuç olarak elde edilen spektrumda her bir karbon atomu için ayrı bir strip gözlenir. Her bir karbon stripinde o karbon ile hem o karbona hem de o amino asite ait diğer tüm karbonlara bağlı protonlar arasında birer korelasyon piki görmek mümkündür (Şekil 1.29) (Bax vd., 1990, Olejniczak vd., 1992).



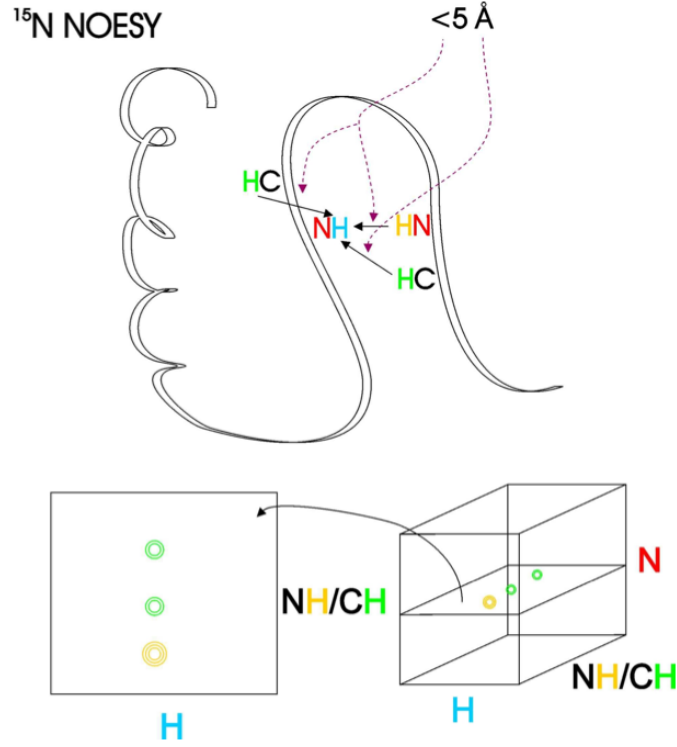
Şekil 1.29. HCCH-TOCSY spektrumunda gözlenen pikler (NMRFAM WS, 2011)

1.8.8. Uzak mesafe etkileşimlerini tespit etmek için gerekli olan deneyler

1.8.8.1. ^{15}N -NOESY-HSQC

Manyetizasyonun kovalent bağlar üzerinden aktarıldığı korelasyon deneylerinden farklı olarak bu deney manyetizasyonun boşlukta transferine dayanır. Enerji aktarımında peptid zinciri kullanılmadığı için dizide birbirinden uzak olan atomlar arasındaki mesafe bilgilerinin elde edilmesinde büyük bir avantaj sağlar (Şekil 1.30) (Marion vd., 1989a, Zuiderweg ve Fesik 1989).

Deneyde manyetizasyon ilk olarak tüm protonlar arasında Nükleer Overhauser etkisi ile (Nuclear Overhauser Effect ,NOE) aktarılır ve ardından yakındaki bir amid azotuna aktarılır. Aktarım sonrası rezonans amid azotu üzerinden hidrojenlere geri aktarılır. Sonuç olarak hedef peptid bağındaki N-H azotuna 5 Å'dan daha yakın olan tüm protonlar için rezonans verisi elde edilir (Marion vd., 1989a, Marion vd., 1989b).

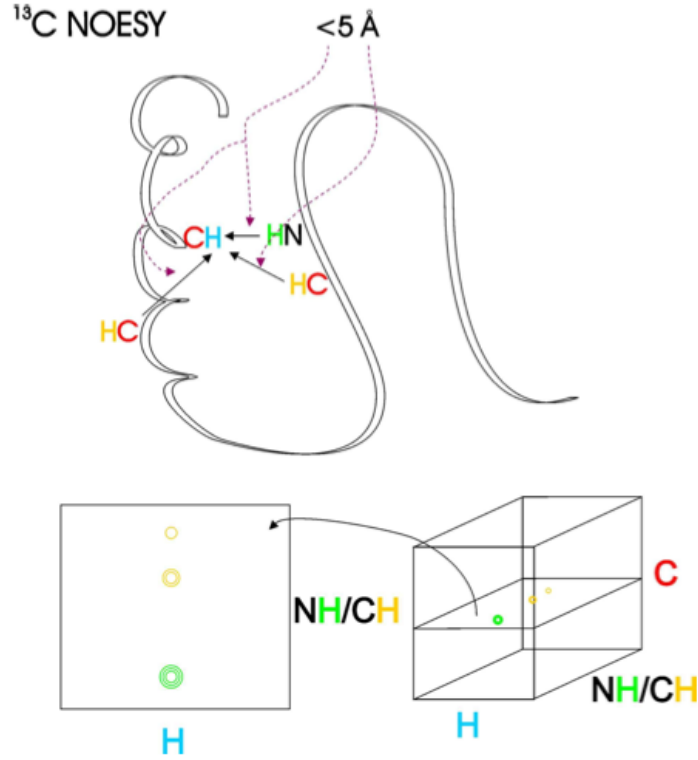


Şekil 1.30. ^{15}N -NOESY spektrumunda gözlenen pikler ve protein üzerinde pikleri oluşturan atomlar (NMRFAM WS, 2011)

Deney sonucu oluşan spektrumda gözlenen piklerin şiddetleri protonun amid azotuna olan uzaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir. Eğer bir proton hedef amid azotuna protein üç boyutlu yapısında diğer protona göre çok daha yakın ise pik şiddeti de bu oranda çok daha şiddetli olmaktadır. Bu özelliği sayesinde NOESY spektrumundaki pik şiddetleri yapı hesaplamalarında mesafe kısıtlarına çevrilerek kullanılmaktadır (Marion vd., 1989a, Marion vd., 1989b).

1.8.8.2. ^{13}C -NOESY-HSQC alifatik ve ^{13}C -NOESY-HSQC aromatik

^{15}N -NOESY deneyinde olduğu gibi ilk adımda manyetizasyon NOE yardımı ile tüm hidrojenler arasında dağıtıldıktan sonra yakındaki karbon atomları üzerine aktarılır. Bu aktarım sonrası son adım olarak ise manyetizasyon protonlar üzerine geri döner ve rezonans değerleri kaydedilir (Şekil 1. 31).



Şekil 1.31. ^{13}C -NOESY spektrumunda gözlenen pikler ve protein üzerinde pikleri oluşturan atomlar (NMRFAM WS, 2011)

^{13}C -NOESY deneyi sayesinde hidrojene bağlı tüm karbonlar hakkında bilgi edinebilmek mümkündür. Tıpkı ^{15}N -NOESY’de olduğu gibi ^{13}C -NOESY’de de karbon atomuna 5 Å’dan yakın olan tüm protonların kimyasal kayma değerleri spektrum üzerinde gözlenebilir. Burada da pik şiddetleri uzaklığa göre değişim gösterip yapı hesaplamalarında kullanılmaktadır.

Enerjinin aktarımı ve rezonans oluşumu için aromatik ve alifatik karbonlara farklı frekanslarda aktarım yapılması gerekmektedir. Bu nedenle Tüm amino asitlerin ^{13}C -NOESY etkileşimlerinin belirlenmesi için iki farklı NMR verisi kaydedilir. İlk deneyde alifatik karbonlara uygun frekans kullanılarak alifatik karbonlar için ^{13}C -NOESY spektrumları elde edilir ve bu deney ^{13}C -NOESY-alifatik olarak isimlendirilir. İkinci olarak ise aromatik karbonlara ve aromatik karbonlardan enerji geçişi sağlanacak şekilde karbon frekansı ayarlanarak aromatik karbonların rezonans değerleri belirlenir ve bu deney ^{13}C -NOESY-aromatik olarak isimlendirilir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, ubiquitin benzeri bir post-translasyonel sistem olan ISGlasyonda işlev yapan E1 enzimi Ube1L'nin E2 ile etkileşiminde rol oynayan domaininin (UFD) NMR solüsyon yapısının belirlenmesini hedefledi. Yapının, E1-E2 düzeyinde seçiciliğın nasıl sağlandığı konusunun anlaşılmasına yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

2.1.1. İnsan ISG15 aktive edici E1 enzimi Ube1L'nin UFD'nin gen dizisi

Ube1L-UFD gen dizisi Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ube1L-UFD gen dizisi

```
cag acg ttc cat cac ctg aag tgg acc tct tgg gac cgt ctg aag gta cca gct ggg cag
Q   T   F   H   H   L   K   W   T   S   W   D   R   L   K   V   P   A   G   Q
cct gag agg acc ctg gag tcg ctg ctg gct cat cct cag gag cag cac ggg ttg agg gtg
P   E   R   T   L   E   S   L   L   A   H   P   Q   E   Q   H   G   L   R   V
agg atc ctg ctg cac ggc tca gcc ctg ctc tat gcg gcc gga tgg tca cct gaa aag cag
R   I   L   L   H   G   S   A   L   L   Y   A   A   G   W   S   P   E   K   Q
gcc cag cac ctg ccc ctc agg gtg aca gaa ctg gtt cag cag ctg aca ggc cag gca cct
A   Q   H   L   P   L   R   V   T   E   L   V   Q   Q   L   T   G   Q   A   P
gct cct ggg cag cgg gtg ttg gtg cta gag ctg agc tgt gag ggt gac gac gag gac act
A   P   G   Q   R   V   L   V   L   E   L   S   C   E   G   D   D   E   D   T
gcc ttc cca cct ctg cac tat gag ctg taa
A   F   P   P   L   H   Y   E   L   -
```

2.1.2. Oligonükleotid Primerler

2.1.2.1. Nokta mutasyonu ile mutajenik protein eldesinde kullanılan primerler

Nokta mutasyonlarının gerçekleştirilmesi için yapılan PCR'da kullanılan primer dizileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Nokta mutasyon yönteminde kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi
5' Ube1L C995S	5' GTGCTAGAGCTGAGCAGTGAGGGTGACGACG 3'
3' Ube1L C995S	5' CGTCGTCACCCTCACTGCTCAGCTCTAGCAC 3'
5' Ube1L C995A	5' GTGCTAGAGCTGAGCGCTGAGGGTGACGACG 3'
3' Ube1L C995A	5' CGTCGTCACCCTCAGCGCTCAGCTCTAGCAC 3'

2.1.3. Kimyasallar ve enzimler

Tüm çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve enzimler en az biokimyasal saflık derecesinde olup EK A da verilmiştir.

2.1.4. Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar

Tüm çalışmalarda kullanılan Çözelti ve Tamponlar yüksek saflıkta kimyasallar kullanılarak hazırlanmış olup EK B de verilmiştir.

2.1.5. Kullanılan makine ve teçhizat

Çalışmalar kullanılan tüm makine ve teçhizatların kalibrasyonları düzenli olarak kontrol edilmiş olup çalışmada kullanılan makine ve teçhizat EK C de verilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. GBI-Ube1L füzyon proteininin ekspresyonu

Ube1L-UFD proteinini kodlayan geni içeren modifiye edilmiş pQE30-GB1-6His plazmiti *E. Coli* SG13009 (Qiagen) ekspresyon suşu içerisine transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Transformasyon sonrası 100 µg/mL ampicillin (amp) ve 25 µg/mL kanamisin (kan) içeren 10 mL LB besi yeri petri üzerinden alınan tek bir koloni ile inoküle edildi. Bu bakteri kültürü 37 °C’de 250 devir/dakıkada (rpm) çalkalanarak 1 gece inkübe edildikten sonra ertesi gün 100 µg/ml amp ve 25 µg/ml kan içeren 1 litre LB besiyeri içerisine aktarıldı. Bakteriler 250 rpm 37 °C’de hücre yoğunluğu OD₆₀₀ 0,8-1,2 oluncaya kadar inkübe edildi. Hedeflenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, protein ekspresyonu son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilavesi ile indüklendi. Ardından, protein ekspresyonu 250 rpm, 37 °C’de 5 saat gerçekleştirildi. IPTG ilavesi öncesi ve sonrası her 1 saat sonunda 1 mL kültür alınarak 5000 × g de 10 dakika santrifüjlendi ve sıvı besiyeri atılarak hücre pastasını içeren katı kısım 100 µl TBS içerisinde çözüldü. Protein ekspresyonu SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edildi.

Ekspresyon tamamlandıktan sonra bakteri hücreleri $4500 \times g$ de 40 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Santrifüjleme işlemi sonrası elde edilen hücre pastası bir sonraki işleme kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.2.2. C95S ve C95A mutant proteinlerin eldesi

Ube1L-UFDnin içerdiği tek sistein nedeni ile kararsız bir yapıda olduğu düşünülerek bu amino asidi kodlayan nükleotid dizisine yönlendirilmiş mutasyon yöntemi uygulandı. Yönlendirilmiş mutasyon yöntemi ile sistein amino asidini kodlayan nükleotid dizisi serin veya alanin amino asidini kodlayacak şekilde değiştirildi.

Bu yöntemde öncelikle hedef protein geninde oluşturulacak mutasyonlara spesifik ve her bir mutasyon için iki adet olmak üzere dört adet primer dizayn edildi. Primerlerin dizayn edilmesinde uzunluklarının 25-45 baz çifti olmasına, % GC içeriğinin en az % 50 olmasına, dizayn edilen primerlerin erime sıcaklıklarının $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve üzeri olmasına ve mutasyona uğratılacak nükleotid bölgesinin primlerin her iki ucuna eşit uzaklıkta olmasına dikkat edildi.

Mutajenik PCR yönteminin uzama basamağında polimeraz enziminin tüm plazmiti sentezlemesi gerektiği için kullanılan polimeraz enziminin spesifik olmayan mutajenik hatalar yapmaması gerekir. Bu nedenle mutajenik PCR reaksiyonunda hata frekansı çok düşük olan ve 10 kilo baz çiftine kadar olan uzunluktaki DNA zincirlerini sentezleyebilen Pfu DNA polimeraz (Fermentas) enzimi kullanıldı. PCR reaksiyon döngüsü Çizelge 2.3'de verildiği gibidir.

Çizelge 2.3. Yönlendirilmiş mutasyon PCR reaksiyonları

	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4
PQE30-GBI-Ube1L-BGD (50 ng/ µL)	0.7 µl	---	0.7 µl	---
PQE30-8HT-Ube1L-BGD (70 ng/ µL)	---	0.5 µl	---	0.5 µl
Primer				
5'-Ube1L-BGD(C995A)(50 pmol/ µL)	1.25 µl	1.25 µl	---	---
3'-Ube1L-BGD(C995A)(50 pmol/ µL)	1.25 µl	1.25 µl	---	---
5'-Ube1L-BGD(C995S)(50 pmol/ µL)	---	---	1.25 µl	1.25 µl
3'-Ube1L-BGD(C995S)(50 pmol/ µL)	---	---	1.25 µl	1.25 µl
dNTP (10 mM)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgSO4 (25 mM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10x PFU buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
PFU polimeraz (2,5 U/ µL)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
dd.H2O	33.3 µl	33.5 µl	33.3 µl	33.5 µl

arındırıldı. PCR reaksiyonunda kullanılan ve mutant olmayan geni içeren kalıp DNA plazmiti DpnI ezimi ile muamele edilmek suretiyle kesilerek ortamdan uzaklaştırıldı. DpnI enziminin kesme aktivitesi gösterdiği bölge DNA dizisi üzerindeki metilasyona uğramış 5' – GA(CH₃)[^]TC–3' dizisidir. PCR reaksiyonu sonucu elde edilen DNA dizileri metilasyona uğramamış olmasına rağmen kalıp DNA olarak kullanılan plazmit DNA bakteriyel ortamdan izole edilmesi nedeni ile metilasyona uğramıştır. Kalıp DNA'nın metilasyona uğramış olması özelliğinden yararlanılarak PCR reaksiyonu sonrası DpnI enziminin sadece kalıp DNA'yı kesip etkisiz hale getirmesi sağlandı. DpnI enzimi reaksiyonu çizelge 2.4'de verildiği gibidir. Tüm PCR ürünleri için reaksiyon karışımları 37 °C'de 2,5 saat inkübe edildi.

Çizelge 2.4. DpnI reaksiyonu

	Reaksiyon karışımı
10x Tango Buffer	4 µL
PCR reaksiyonu	35 µL
DpnI (10 U/ µL)	1 µL
Toplam hacim	40 µL

PCR ile çoğaltılan mutant plazmitler *E. Coli* Novablue suşu içerisine transform edildi. Böylece plazmitlerin içerdikleri kesik uçların birleştirilmesi ve çoğaltılması sağlandı. Transformasyon basamağı sonrası elde edilen kolonilerin istenilen mutasyonu içerip içermediği DNA dizi analizi ile belirlendi. İstenilen mutasyonu

içerdiği saptanan plazmitlerden mutant protein üretimi gerçekleştirildi.

2.2.3. GB1-UBE1L-UFD proteininin diyaliz ile yeniden katlanması

GB1-Ube1L-UFD'nin bakteriyel ekspresyon sisteminde ekspresyonu sırasında hücre içinde çözünmeyen agregatlar (inclusion bodies) halinde çöktüğü tespit edildi. Bu agrege olmuş proteini yeniden üç boyutlu yapısına katlamak ve saflaştırmak için – 80 °C'de saklanan hücre pastasına, her bir gram hücre için 10 mL liziz tamponu ilave edilerek hücreler homojenize edildi. Hücre duvarını parçalamak için hücreler 10 dakika buz üzerinde sonikasyon işlemine tabi tutuldu ve 30 dakika 14000 × g'de santrifüjlenerek çözünür olmayan hücresel bileşenlerin çöktürülmesi sağlandı.

Çözünmeyen agregatlar oluşturan GB1-6His-Ube1L-UFD çöken kısım (pellet) içerisinde yer aldığı için işleme pellet ile devam edildi. Lipid gibi hücre bileşenlerinin uzaklaştırılması için pellet 2 kez % 0.5 Triton X-100 içeren TBS tampon çözeltisi ile yıkandı. Her yıkama basamağı sonrasında pellet yine 30 dakika 14000 × g'de santrifüjlenerek çöktürüldü. Yıkanan pellet içerisindeki agregatlar 6 M GndHCl ve 10 mM DTT içeren TBS içerisinde 1 gece oda sıcaklığında karıştırılarak denatürasyona uğratıldı. Ertesi gün çözünmesi tamamlanmış olan protein çözeltisi 30 dakika 14000 × g'de santrifüjlendi ve çözünmeyen partiküllerin çözeltiden uzaklaştırılması sağlandı. Santrifüj sonrası çözünür kısım molekül ağırlığı geçirgenlik üst sınırı 3.5 kDa olan diyaliz membranı içerisine aktarıldı ve 5 mM DTT içeren 5 litre TBS tamponu içerisinde 8 saat boyunca diyaliz edildi. Tampon çözelti yenilenerek diyaliz işlemine 16 saat daha devam edildi. Ardından diyaliz membranı içerisindeki karışım 30 dakika 14000 × g'de santrifüjlenerek çöken kısım ayrıldı. Süpernetant 5mL hacimli nikel afinite kolonuna 3 mL/dakika hız ile yüklendi. Yükleme sonrası 5 mM DTT ve 20 mM imidazol içeren TBS çözeltisi ile istenmeyen proteinler kolondan uzaklaştırılıp 280 nm'de absorbans sabitleninceye kadar yıkama gerçekleştirildi. Yıkama sonrası hedef protein gradiyent elüsyon (TBS içerisinde 20-500 mM Imidazol ve 5mM DTT) yöntemi ile kolondan uzaklaştırıldı. Elde edilen elüsyon fraksiyonları %16'lık SDS-PAGE ile kontrol edilerek hedef protein içeren fraksiyonlar belirlendi. Protein içeren fraksiyonlardan imidazol uzaklaştırıldı ve konsantre edildi. Proteinin GB1 ile füzyon olarak daha kararlı olduğu ve GB1'in

kesilip uzaklaştırılması durumunda hemen çöktüğü tespit edildiğinden sonraki işlemlere füzyon protein ile devam edildi.

2.2.4. Farklı tampon çözeltilerin çözünürlük üzerine etkisinin incelenmesi

NMR ile yapı tayini çalışmalarında protein örneği yüksek derecede saf olmalı ve ayrıca NMR veri kaydı süresince (en az bir-iki hafta) yüksek konsantrasyonlarda (mM) yapısını kaybetmeden ve çökmeden kararlı kalabilmelidir. Protein çözünürlüğünü ve kararlılığını etkileyen en önemli faktörler arasında tuz konsantrasyonu, pH, tampon çözelti sayılabilir. Bu faktörlerin protein çözünürlük ve kararlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan diyaliz ve ultrafiltrasyon gibi yöntemler yüksek miktarda protein ve uzun zaman gerektirmektedir.

GB1-Ube1L-UFD için uygun NMR koşullarının belirlenmesinde protein sarfiyatını minimuma indirmek amacıyla mikro-drop tarama yöntemi kullanıldı. Bu sayede farklı koşullarda proteinin çözünürlük ve kararlılığı daha hızlı ve daha az protein kullanılarak tarandı. Mikro-drop tarama işlemi için öncelikle gerekli olan protein üretilip saflaştırıldı. sonrasında 10 mM Tris-HCl pH 7.4 tamponu içerisinde 200 μ M'a değiştirildi.

Tüm tarama işlemleri 24 kuyulu hücre kültürü plakaları ve lamel kullanılarak gerçekleştirildi. Kuyular içerisine test edilecek tampon çözeltiden 1 mL eklendi. Ardından lamel üzeri dikkatli bir şekilde temizlenerek üzerinde 2 μ L protein çözeltisi ve 1 μ L kuyu içerisindeki tampon çözelti eklenerek pipet yardımı ile karıştırıldı. Bu işlem her bir tampon çözelti için tekrarlandı. Kuyuların etrafı silikon ile kaplandı ve lameller hedef kuyular üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Bu işlem sonrası plaka 25 °C'de karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Her 24 saate bir kuyular üzerindeki lameller mikroskop altında incelenerek çökme miktarları kaydedildi. Bu işlem 6 gün boyunca devam etti.

Bu çalışmada öncelikle pH 5.0-8.0 aralığında hedef proteinin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi. Proteinin en kararlı olduğu pH değerinin belirlenmesinde kullanılan tampon çözeltiler Çizelge 2.5'de verildiği gibidir.

Çizelge 2.5. pH taramasında kullanılan tampon çözeltiler

Tampon Çözelti	Molarite (mM)	pH	Molar NaCl
Sodyum Fosfat	50	5	50
Sodyum Fosfat	50	5.5	50
Sodyum Fosfat	50	6	50
Sodyum Fosfat	50	6.5	50
Sodyum Fosfat	50	7	50
Sodyum Fosfat	50	7.5	50
Sodyum Fosfat	50	8	50

Bu işlem sonrasında belirlenen pH aralığı için uygun tamponlama özelliği gösteren bileşikler arasından proteinin kararlılığının en yüksek olduğu tampon sistemi ve tuz konsantrasyonu belirlendi. Test edilen tampon çözeltiler ve tuz konsantrasyonları Çizelge 2.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. pH 7.4-8.0 arasında kullanılan farklı tampon çözeltiler ve tuz konsantrasyonu

Tampon Çözelti	Molarite (mM)	pH	NaCl (mM)	Tampon Çözelti	Molarite (mM)	pH	NaCl (mM)
TAPS	50	8	0	ARG-GLT	50	7.4	0
TAPS	50	8	50	ARG-GLT	50	7.4	50
HEPES	50	7.4	0	ARG-GLT	50	8	0
HEPES	50	7.4	50	ARG-GLT	50	8	50
TRICIN	50	8	0	IMIDAZOL	50	7.4	0
TRICIN	50	8	50	IMIDAZOL	50	7.4	50
HEPPS	50	7.65	0	TRIS	50	7.6	0
HEPPS	50	7.65	50	TRIS	50	7.6	50

2.2.5. ^{15}N ve ^{13}C işaretli NMR örneklerinin hazırlanması

Rezonans atamaları ve yapı hesaplamaları için gerekli olan ^{15}N ve ^{13}C izotopik işaretli protein üretimi M9 minimal besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi. M9 minimal besiyeri içerisinde tek azot kaynağı olarak ^{15}N -amonyum klorür ve tek karbon kaynağı olarak ^{13}C -glukoz kullanılarak bakteriler tarafından sentezlenen proteinlerin ^{15}N ve ^{13}C olarak işaretli olması sağlandı. İzotopik işaretli protein

ekspresyonunda ilk basamak olarak Ube1L-UFD protein genini içeren modifiye pQE-30-GBI plazmitini taşıyan M15 pREP4 ekspresyon suşu amp (100 µg/mL) ve kan (25 µg/mL) içeren LB-Agar besiyeri içeren petri içersine yayıldı ve 37 °C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün petriden alınan tek koloni ile amp (100 µg/mL) ve kan (25 µg/mL) içeren 10 mL’lik sıvı LB besiyerinin inokülasyonu gerçekleştirildi. Inokülasyon sonrası hücreler 37 °C ve 250 rpm’de 18 saat inkübe edildi. Bu kültürden alınan 1 mL ile amp (100 µg/mL) ve kan (25 µg/mL) içeren 2 x 50 mL M9 besi yeri inoküle edildi. Bakteriler 37 °C ve 250 rpm’de 14 saat çoğaltıldı. 14 saat sonrasında bu bakteri kültürünün tamamı amp (100 µg/mL) ve kan (25 µg/mL) içeren 2 x 950 ml M9 besi yeri içersine aktarıldı. Hücre yoğunluğu 0.8 oluncaya kadar 37 °C ve 250 rpm’de hücreler çoğaltıldı. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaşılmca protein ekspresyonunu başlatmak için 1 mM IPTG eklendi ve IPTG sonrası hücreler 6 saat daha aynı koşullarda çoğalmaya bırakıldı. Bu süre sonunda bakteriler 4500 x g’da 30 dakika santrifüjlendi ve proteinlerin saflaştırılmasına kadar – 80 °C’de saklandı.

İzotopik işaretli protein saflaştırmasında diyaliz yöntemi ile yeniden katlanma işlemi uygulandı. Saflaştırma işlemi sonrası protein örneği 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM NaCl, 5 mM DTT çözeltisi içersine alınarak molekül ağırlığı geçirgenlik limiti 5000 Dalton olan filtre kullanılarak basınçlı konsantratör ile 500 µL’ye konsantre edildi.

2.2.6. NMR spektroskopisi

Ube1L-UFD proteini yapı tayini için gerekli olan tüm NMR verileri Medical College of Wisconsin-Milwaukee, Department of Biochemistry, Biomolecular NMR Facility, Milwaukee, WI, ABD’de kaydedildi.

GBI-Ube1L-UFD’inin yapı hesaplamaları için gerekli NMR verileri, 25 °C’de 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM NaCl, % 0.02 NaN₃ ve % 10 D₂O içeren tampon çözelti içersinde bulunan 0.4 mM konsantrasyondaki ¹⁵N ve ¹³C işaretli protein örneği ile gerçekleştirildi.

Rezonans atamalarının gerçekleştirilmesi için; 2D ¹⁵N-HSQC, 2D ¹³C-HSQC-alifatik, 3D hassasiyeti arttırılmış (sensitivity enhanced, SE) HNCA, 3D SE HNCB,

3D SE HNCA, 3D SE HNCACB, 3D SE HN(CO)CA , 3D SE CCONH, 3D SE HCCONH, 3D SE HBHACONH, 3D HNCACO, 3D SE HNCOCACB ve 3D HCCH-TOCSY verileri toplandı (Grzesiek ve Bax 1992a, b, Grzesiek vd., 1993, Kay vd., 2011, Marion vd., 1989a, Montelione vd., 1992, Muhandiram ve Kay 1994, Olejniczak vd., 1992, Wishart ve Sykes 1994). Yapı hesaplamalarında kullanılan mesafe kısıtlamaları için ise 3D SE ^{15}N -NOESY-HSQC (Zhang vd., 1994), 3D SE ^{13}C -NOESY-HSQC-alifatik ve 3D ^{13}C -NOESY-HSQC-aromatik verileri toplandı.

2.2.7. NMR verilerinin işlenmesi ve analizi

Tüm NMR verileri NMRPipe (Delaglio vd., 1995) yazılım paketi kullanılarak proses edildi. NMR verilerinin analizleri XEASY (Bartels vd., 1995) yazılımı ile gerçekleştirildi. Kimyasal kayma değerlerinden ikincil yapı elemanlarının tespit edilmesinde, chemical shift index (CSI) (Wishart ve Sykes 1994) program paketi kullanıldı. $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^{13}\text{C}'$, ve ^{15}N kimyasal kayma değerleri, TALOS+ (Shen vd., 2009) programı ile açılı kısıtlarına dönüştürüldü.

2.2.8. Yapı Hesaplamaları

Yapı hesaplamaları Machintos işletim sistemi içeren bilgisayarda CYANA 3.0 (Guntert 2004) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. GBI-Ube1L-UFD Proteinin Üretimi

GBI-Ube1L-UFD proteini geçmişte yapılan çalışmalar göstermiştir ki 37 °C’de 1 mM IPTG ile protein ekspresyonu sonucu ekspres olan tüm protein çözünmez agregatlar oluşturarak çökmektedir. Bu çalışmada ilk olarak sıcaklık, IPTG konsantrasyonu gibi koşulları değiştirerek protein ekspresyonu sonucu çözünür protein elde edilmesine çalışıldı. Bu amaçla hücre yoğunluğu OD₆₀₀’de 0.8’e ulaştıktan sonra ortam sıcaklığı düşürülerek (18, 22 veya 25 °C’ye) ve ekspresyon süresi 12-15 saate çıkartılarak protein çözünürlüğü arttırılmaya çalışıldı. Bunun yanında hem düşük sıcaklıkta ekspresyonda hem de 37 °C’deki protein ekspresyonları sırasında IPTG 0,1-2 mM aralığında değişik konsantrasyonlarda eklenerek IPTG derişiminin protein ekspresyonuna etkisi incelendi. Ancak hem sıcaklık hem de IPTG konsantrasyonu ile ilgili denenen optimizasyon çalışmalarının protein ekspresyonun çözünür olarak gerçekleşmesini sağlayamadığı belirlendi. Bunun yanında 1 mM’dan yüksek IPTG konsantrasyonundan protein ekspresyonunu arttırıcı bir etkisinin olmadığı belirlendi. Bu nedenle büyük ölçekli protein ekspresyonlarında 37 °C ve 1 mM IPTG konsantrasyonunda 5-6 saat protein ekspresyonu sonucu çözünür olmasa da, yeniden katlama metodu için maksimum protein miktarının ulaşıldığı belirlendi.

3.2. Ube1L-UFD (C995A) ve Ube1L-UFD (C995S) Proteinlerinin Eldesi

Uba3-UFD kararlı bir yapıya sahip olduğu halde Uba1 ve Ube1L proteinlerinin UFD’leri kararsız yapıya sahiptirler. Bu üç E1 enziminin UF domainleri karşılaştırıldığında, Ube1L-UFD ve Uba1-UFD’lerinin sistein içerdiği ancak Uba3-UFD’nin sistein içermediği görüldü. Bu nedenle Ube1L-UFD’nin içermiş olduğu sistein amino asidinin mutasyona uğratılması ile proteinin daha kararlı bir yapıya sahip olabileceği düşünülerek Cys-Ala ve Cys-Ser mutasyonları gerçekleştirildi.

Mutant proteinler yönlendirilmiş mutasyon tekniği ile elde edildi ve ekspresyon düzeyleri incelendi. Mutant proteinlerin ekspresyonlarında mutant olmayan protein ile karşılaştırıldığında gözlenebilecek ciddi bir değişiklik olmadığı ve mutant proteinlerin de çözünmeyen agregatlar şeklinde üretildikleri belirlendi.

3.3. GBI-Ube1L-UFD Proteinin Diyaliz ile Yeniden Katlanması

GBI-Ube1L-UFD (wt) proteinin bakteriyel sistem içerisinde ekspresyonu sonucu tüm proteinin çözünmeyen agregatlar halinde çöktüğü tespit edildiğinden yeniden çözünür hale getirilmesi için diyaliz yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Denature edici ajanın yeniden katlanmaya etkisi

GBI-Ube1L-UFD (wt) proteinin yeniden çözünür hale getirilmesinde denatüre edici ajan olarak önce 6 M üre kullanıldı. Ancak üre içerisinde proteinin denatürasyon oranının düşük olduğu ve agregatların zor çözüldüğü belirlendi. Ayrıca denatürasyon sonrası yeniden katlama basamağında proteinin büyük bir oranda tekrar çöktüğü belirlendi. Üre ile yeniden katlamanın olumsuz sonuç vermesinin ardından bir başka denatüre edici ajan olan GndHCl (7 M) kullanıldı. 7 M GndHCl'nin TBS içerisinde hazırlanmış olan çözeltisi ile gerçekleştirilen denatürasyon/renatürasyon çalışmalarında, proteinin katlanma veriminin daha yüksek olduğu tespit edildi.

3.3.2. İndirgeyici ajanın yeniden katlanma üzerine etkisi

Ube1L-UFD tek bir sistein içerdiğinden moleküller arası disülfid bağı oluşturmaya çok yatkın bir yapıya sahiptir. Bu nedenle hem diyaliz çözeltisi içerisine hem de denatürasyon çözeltisi içerisine % 0.1 β -mercaptoethanol (BME) koyularak sistein amino asidinin indirgenmiş halde saklanması sağlandı. Ancak BME varlığında katlanan proteinin kısa süre içerisinde yeniden çöktüğü belirlendi. Bu nedenle BME yerine daha kuvvetli bir indirgeyici ajan olan Dithiothreitol (DTT) kullanıldı. 5-10 mM DTT varlığında gerçekleştirilen denatürasyon ve yeniden katlama işleminde daha iyi sonuçlar alındı. İlk yeniden katlama sonrası pelletteki proteinin ~%65'inin

çözünür hale geldiği, ikinci yeniden katlama sonrası ise; ilk katlama sonrası pellette kalan proteinin ~%70'inin çözünür hale geldiği SDS-Page jellerinin ImageJ programı ile analiz edilmesi sonucunda belirlendi.

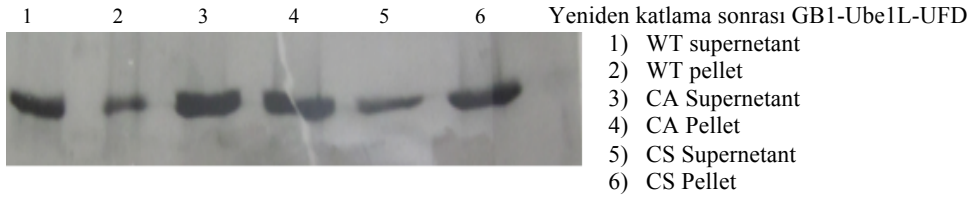
3.3.3. Diyaliz süresi ve protein konsantrasyonunun yeniden katlanma üzerine etkisi

Diyaliz süresi ve protein konsantrasyonunun da proteinin yeniden katlanma oranına etki ettiği saptandı. Proteinin denatürasyon işlemi sonrası ilk diyaliz tamponu içerisinde protein örneğinin kalma süresinin 8 saatin üzerinde olduğunda proteinin yeniden agregasyona uğradığı ve çöktüğü belirlendi. Ayrıca diyaliz sırasında protein konsantrasyonu 0.3 mg/mL'den yüksek olduğunda proteinin katlanma veriminin büyük oranda düştüğü saptandı.

Bu bulgular doğrultusunda büyük ölçekli protein yeniden katlama çalışmalarının denatürasyon basamağı için proteinin son konsantrasyonu 0.1-0.3 mg/mL olacak şekilde 7 M GndHCl ve 10 mM DTT içeren TBS tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmasının en uygun koşullar olduğu belirlendi. Diyaliz ile renatürasyonda ise protein örneğinin ilk TBS tamponu içerisinde 8 saat ikinci TBS tamponu içerisinde ise 12-16 saat bekletilmesinin en iyi sonuç verdiği tespit edildi. Bu koşullarda gerçekleştirilen ilk katlama sonrası pelet ve süpernetantta kalan protein miktarlarını gösteren %16'lık SDS-PAGE jeli Şekil 3.1'de gösterilmektedir.

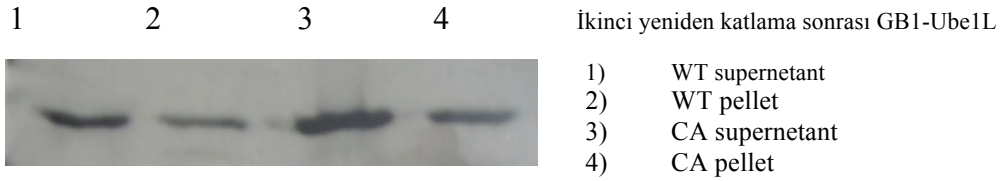
3.4. Mutant Proteinler ile GB1-Ube1L-UFD (WT) Proteinin Yeniden Katlanmalarının Karşılaştırılması

Eşit miktarda hücre kültüründen elde edilen GB1-Ube1L-UFD (wt), GB1-Ube1L-UFD (CA) ve GB1-Ube1L-UFD (CS) proteinleri ile gerçekleştirilen birinci yeniden katlama sonrası pellet ve süpernetantta kalan protein miktarları %16 SDS-PAGE jeli üzerinde karşılaştırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. GB1-UBE1L-UFD (WT), GB1-UBE1L-UFD (CA) ve GB1-UBE1L-UFD (CS) proteinlerinin birinci yeniden katlamalarının karşılaştırılması

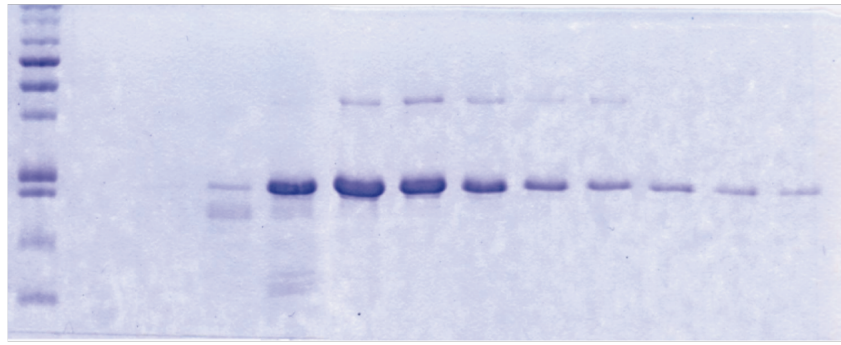
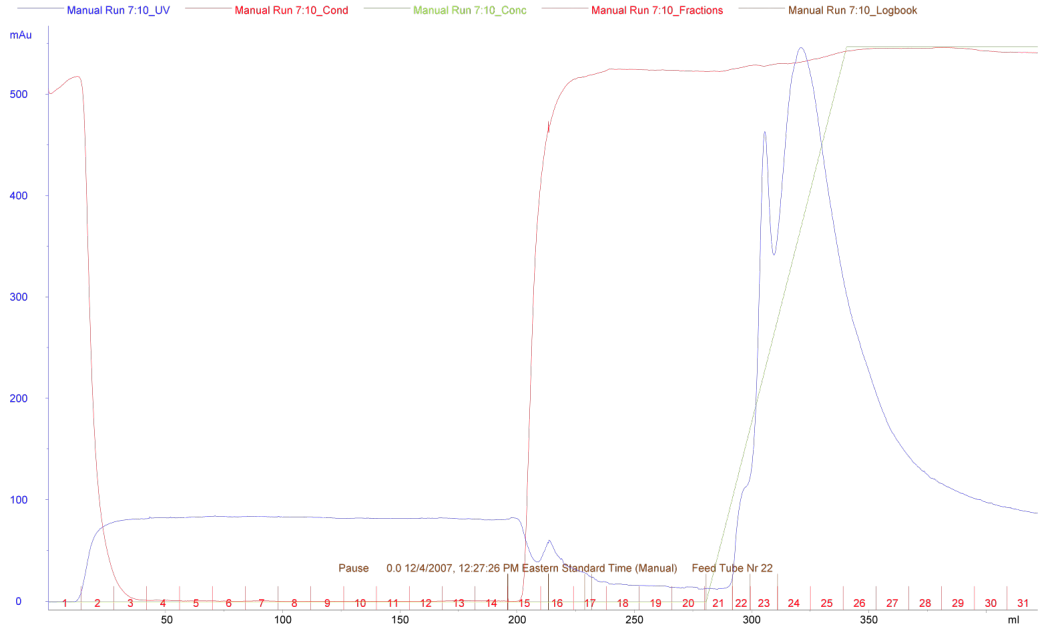
İlk katlama işlemi sonucu elde edilen jeldeki katlanmış protein miktarları karşılaştırıldığında CA mutasyonunun protein katlanmasına büyük bir etki etmediği ancak CS mutasyonun negatif yönde etki ettiği gözlemlendi. WT ve CA mutant proteinleri ile ikinci kez yeniden katlama işlemi gerçekleştirilerek katlanan protein miktarları karşılaştırıldı (Şekil 3.2). Her iki katlama sonucunda CA mutasyonunun proteinin yeniden katlanmasında büyük bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.



Şekil 3.2. GB1-UBE1L-UFD (WT), GB1-UBE1L-UFD (CA) proteinlerinin ikinci yeniden katlamalarının karşılaştırılması

3.5. Diyaliz Yöntemi ile Yeniden Katlanan Proteinlerin Saflaştırılması

Diyaliz yöntemi ile yeniden doğal konformasyonuna katlanan GB1-Ube1L-UFD (wt) HisTrap Nikel afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırma basamağına ait kromatogram ve fraksiyonların yer aldığı jel Şekil 3.3’de gösterilmektedir. Şekil 3.3’de de görüldüğü gibi diyaliz ile katlanan protein HisTrap sonrası yüksek bir oranda saf olarak elde edildi.



- | | |
|------------------|------------------|
| 1) Marker | 2) Fraksiyon 8 |
| 3) Fraksiyon 16 | 4) Fraksiyon 22 |
| 5) Fraksiyon 23 | 6) Fraksiyon 24 |
| 7) Fraksiyon 25 | 8) Fraksiyon 26 |
| 9) Fraksiyon 27 | 10) Fraksiyon 28 |
| 11) Fraksiyon 29 | 12) Fraksiyon 30 |
| 13) Fraksiyon 31 | |

Şekil 3.3. Yeniden katlanmış olan GB1-Ube1L-UFD'nin saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüsü

Buradan elde edilen elüsyon fraksiyonları (23-30) birleştirilerek konsantre edildi. Santrifüjleme yolu ile konsantrasyon sırasında proteinin yüksek oranda çöktüğü gözlemlendi. Bu nedenle konsantrasyon işlemi yüksek basınç altında çalışan bir Amicon konsantratör yardımıyla gerçekleştirildi.

Yapılan denemelerde GB1-Ube1L-UFD'nin imidazol içeren elüsyon tamponunda

kararlı olmadığı belirlendi. Bu nedenle elüsyon fraksiyonları birleştirildikten sonra önce TBS ile en az 4 kat seyreltilerek konsantrasyon işlemine başlandı. İmidazol ortamdan tamamen uzaklaştırılmadan önce protein konsantrasyonu 20 μM 'ın altında tutularak protein agregasyonu önlenildi. Yüksek basınç yardımı ile konsantrasyon yönteminde haznenin içerisinde bulunan karıştırıcı sayesinde protein örneği sürekli karıştırılarak agregasyon oranı minimuma indirildi. Protein örneği +4 °C'de 5 mM DTT içeren TBS içerisinde 0.2-0.4 mM'a kadar konsantre edildi. Ancak, proteinin bu konsantrasyonda oda sıcaklığında 2-3 gün içerisinde büyük oranda çöktüğü gözlemlendi.

3.6. Farklı Tampon Çözeltilerin ve pH'ın Protein Kararlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

GB1-Ube1L-UFD (wt)'nin NMR çalışmaları için en kararlı olduğu koşulların tespit edilmesinde mikro-drop yöntemi kullanıldı. GB1-Ube1L-UFD'nin maksimum kararlılığa sahip olduğu optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan taramalarda, pH 7.5-8.0 arasında kararlı olduğu ve pH 7.5 değerinden düşük değerlerde tamamen çöktüğü tespit edildi.

Proteinin pH 7.5-8.0 aralığında kararlı olduğunun belirlenmesi sonrasında bu aralıkta tamponlama özelliği olan farklı tampon çözeltilerin ve farklı tuz konsantrasyonlarının çözünürlük ve kararlılık üzerine etkileri test edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Farklı Tampon çözeltileri ve pH'ın protein kararlılığı üzerine etkisi

Tampon ismi	NaCl konsantrasyonu (mM)	pH	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	Proteinin kararlı olduğu süre
TAPS	0	8	0	1	1	2	3	5 gün
TAPS	50	8	0	1	3	5	-	4 gün
HEPES	50	7.4	0	0	0	1	1	6 gün
HEPES	50	8	0	0	0	0	0	6 gün
Tricine	0	7.4	0	1	4	5	-	4 gün
Tricine	50	7.4	1	3	5	-	-	3 gün
Tricine	50	8	1	3	5	-	-	3 gün
EPPS,HEPPS	0	7.65	3	5	-	-	-	2 gün
EPPS,HEPPS	50	7.65	3	5	-	-	-	2 gün
ARG-GLT	0	7,4	3	5	-	-	-	2 gün
ARG-GLT	50	7,4	5	-	-	-	-	1 gün
ARG-GLT	0	8	3	5	-	-	-	2 gün
ARG-GLT	50	8	5	-	-	-	-	1 gün
Imidazol	0	7,4	0	2	2	2	3	6 gün
Imidazol	50	7,4	1	3	3	5	-	5 gün
Tris	0	7,4	0	0	0	0	1	6 gün
Tris	50	7,4	0	0	0	1	1	6 gün

Çizelge 3.1'den de görüldüğü gibi proteinin en kararlı olduğu tampon çözeltilerin HEPES ve Tris-HCl olarak belirlendi. Tuz konsantrasyonunun birçok proteinde kararlılığı artırıcı etkisi olmasına rağmen GB1-Ube1L-UFD'nin kararlılığını düşürdüğü ve tuz içermeyen tampon çözeltilerde proteinin daha kararlı olduğu belirlendi.

3.7. GB1-Ube1L-UFD (WT) ve GB1-Ube1L-UFD (CA) Proteinlerinin Kararlılıklarının Karşılaştırılması

Mutast proteinlerin katlanması ile ilgili çalışmalar CS mutasyonunun proteinin yeniden katlanması üzerine negatif, CA mutasyonunun ise çok büyük bir etkisi

olmadığını gösterdi. Bu doğrultuda CS mutasyonu devre dışı bırakılıp protein kararlılığının karşılaştırılmasında sadece WT ve CA mutant proteinler kullanıldı. 500 mL’lik hücre kültürlerinden aynı şartlar altında elde edilip, aynı şartlar altında konsantre edilen proteinlerin konsantrasyonları ve toplam protein miktarları Çizelge 3.2’de görülmektedir.

Çizelge 3.2. Saflaştırma sonrası GBI-Ube1L-UFD (WT) ve GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin konsantrasyon ve toplam protein miktarları

Örnek ismi	Protein konsantrasyonu	Elde edilen GBI-Ube1L-UFD miktarı (500 mL’den)
WT 1	0.232 mM	5.62 mg
WT 2	0.250 mM	4.62 mg
WT 3	0.226 mM	3.80 mg
CA 1	0.240 mM	5.07 mg
CA 2	0.238 mM	4.08 mg
CA 3	0.226 mM	5.22 mg

Çizelge 3.2’den de görüldüğü gibi CA mutant proteininin WT protein ile karşılaştırıldığında verim üzerinde dikkate değer bir etkisi olmamıştır. Mutasyonun protein kararlılığı üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla örnekler 4 gün boyunca karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında % 0.1 mM BME içeren TBS tamponu içerisinde bekletilerek konsantrasyon değişimleri incelendi. Protein konsantrasyon değişimleri Çizelge 3.3’de görülmektedir.

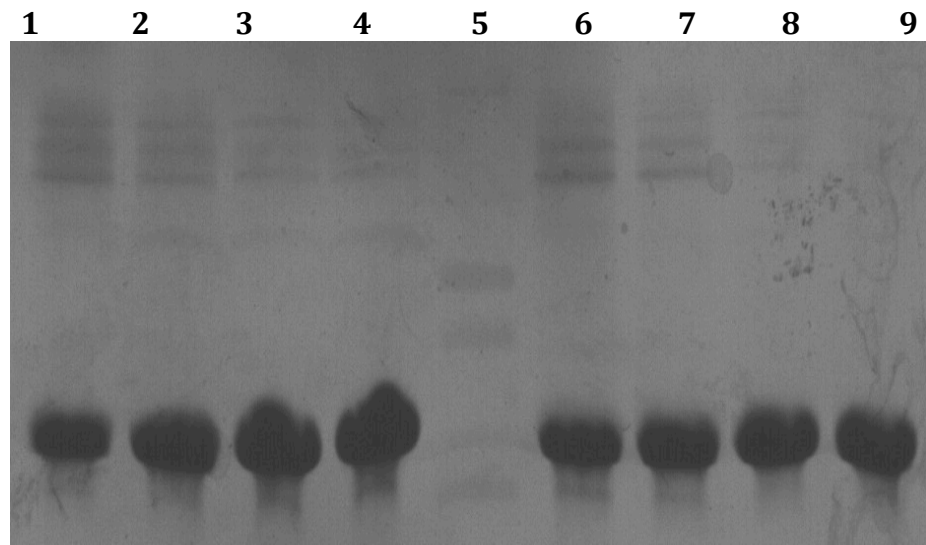
Çizelge 3.3. GBI-Ube1L-UFD (WT) ve GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin çözünürlüklerinin zamana bağlı değişimi

Örnek ismi	Baslangic	1 gün sonra	4 gün sonra	% azalış
WT 1	0.232 mM	0.226 mM	0.221 mM	%5
WT 2	0.250 mM	0.243 mM	0.235 mM	% 6
WT 3	0.226 mM	0.214 mM	0.193 mM	%15
CA 1	0.240 mM	0.237 mM	0.237 mM	% 1
CA 2	0.238 mM	0.235 mM	0.231 mM	%3
CA 3	0.226 mM	0.224 mM	0.220 mM	%3

Protein konsantrasyonlarındaki değişim değerleri CA mutasyonunun WT proteine göre biraz daha kararlı olduğunu gösterdi. Protein konsantrasyonundaki değişimler incelendiğinde CA proteininde çok büyük bir değişim olmamasına rağmen WT

protein konsantrasyonunda %5-15 oranında bir azalış olduğu belirlendi.

GBI-Ube1L-UFD (wt) proteini DTT varlığında bile kısa süre içerisinde hem agregasyona uğrayıp çökmekte hem de çözünür halde bulunan agregatlar oluşturmaktadır. CA mutant proteininde de benzer şekilde çözünür agregatların oluşup oluşmadığının belirlenmesi için aynı konsantrasyonda hazırlanmış olan wt ve mutant protein örneklerinin oda sıcaklığında iki hafta süre kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Bu örneklerden 2., 4., 8. ve 14. günlerde alınan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Elde edilen SDS-PAGE jeli Şekil 3.4’de görülmektedir.



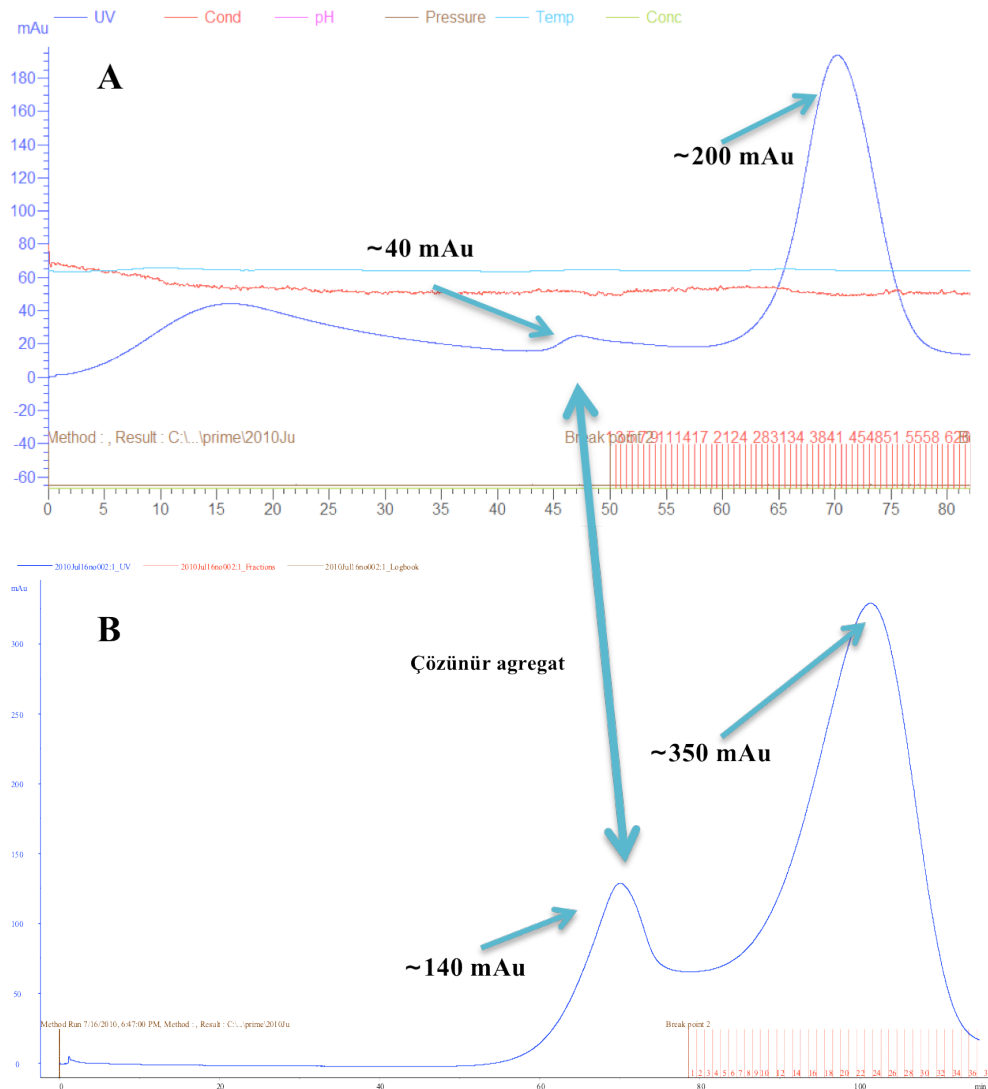
- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) 2 hafta sonra GBI-UBE1L WT | 2) 8 gün sonra GBI-UBE1L WT |
| 3) 4 gün sonra GBI-UBE1L WT | 4) 1 gün sonra GBI-UBE1L WT |
| 5) MARKER | 6) 2 hafta sonra GBI-UBE1L CA |
| 7) 8 gün sonra GBI-UBE1L CA | 8) 4 gün sonra GBI-UBE1L CA |
| 9) 1 gün sonra GBI-UBE1L CA | |

Şekil 3.4. GBI-Ube1L-UFD (wt) ve GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinlerinin zamana bağlı olarak çözünür agregat oluşumlarının karşılaştırıldığı SDS-PAGE jeli

Şekil 3.4’te görüldüğü gibi agregat oluşumu zamana bağlı olarak her iki proteinde de artış göstermektedir ve 2 hafta sonunda GBI-Ube1L-UFD (wt) proteininde oluşan agregat oranı GBI-Ube1L-UFD (CA) proteinine göre daha fazladır. Hem kararlılık testleri hem de SDS-PAGE’deki agregasyon oranları göstermektedir ki GBI-Ube1L-UFD (CA) proteini WT proteine kıyasla biraz daha kararlı bir yapıya sahiptir.

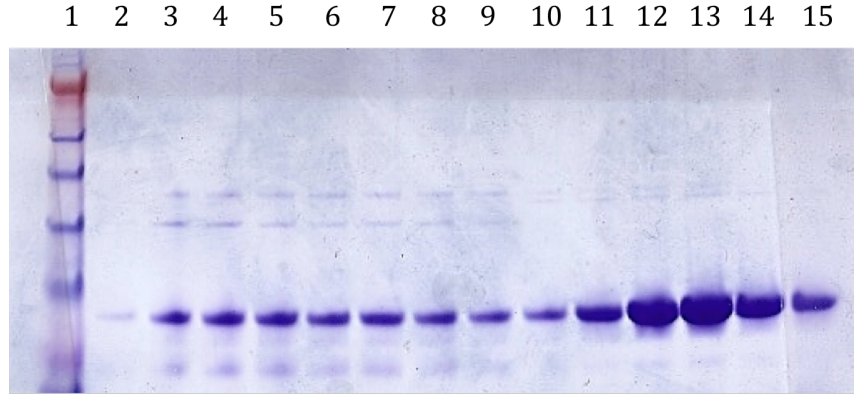
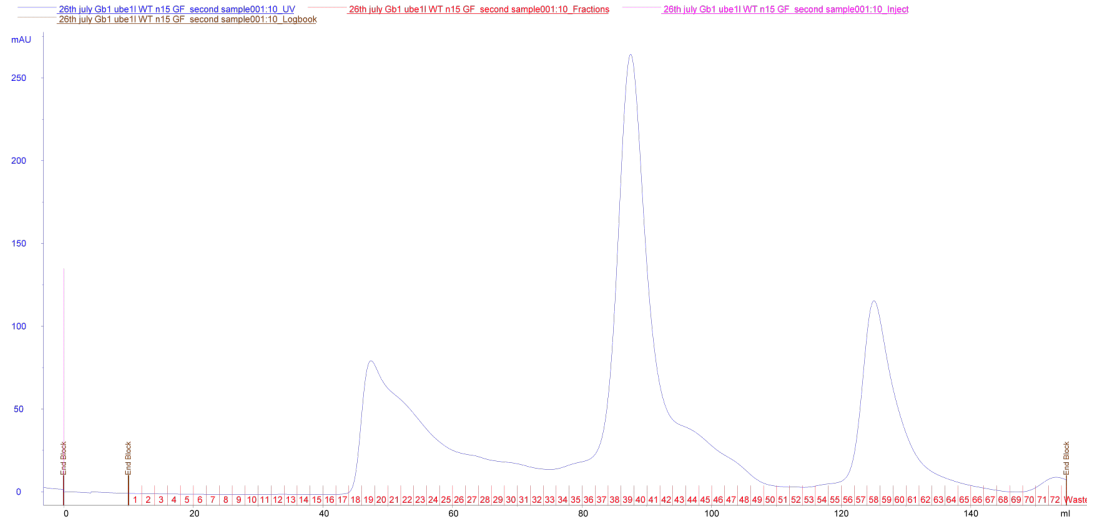
Çözünür agregat oluşumunun incelenmesi ile ilgili çalışmalarda protein konsantrasyonunun da agregat oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.5’de

0.05 mM ve 0.1 mM protein örneklerinin jel filtrasyon kromatogramları görülmektedir.



Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlardaki GB1-Ube1L-UFD proteinin jel kromatografisi kromatogramları ((sephadex-100) a) 0.05 mM 1 mL protein örneğinin kromatogramı b) 0.1 mM 1 mL protein örneğinin kromatogramı)

Şekil 3.5’de ki kromatogramda da görüldüğü gibi agregasyon oluşumu ile protein konsantrasyonu arasında doğru bir orantı vardır. Her iki örneğin kromatogramları karşılaştırıldığında 0.1 mM konsantrasyona sahip olan proteinin oluşturduğu kromatogramdaki çözünür agregat miktarı 2 kat daha fazladır. Jel filtrasyonunda gelen ilk piklerin çözünür agregatları içerdiğini destekleyen SDS-PAGE jel görüntüsü ve ait olduğu kromatogram Şekil 3.6’da verilmiştir.



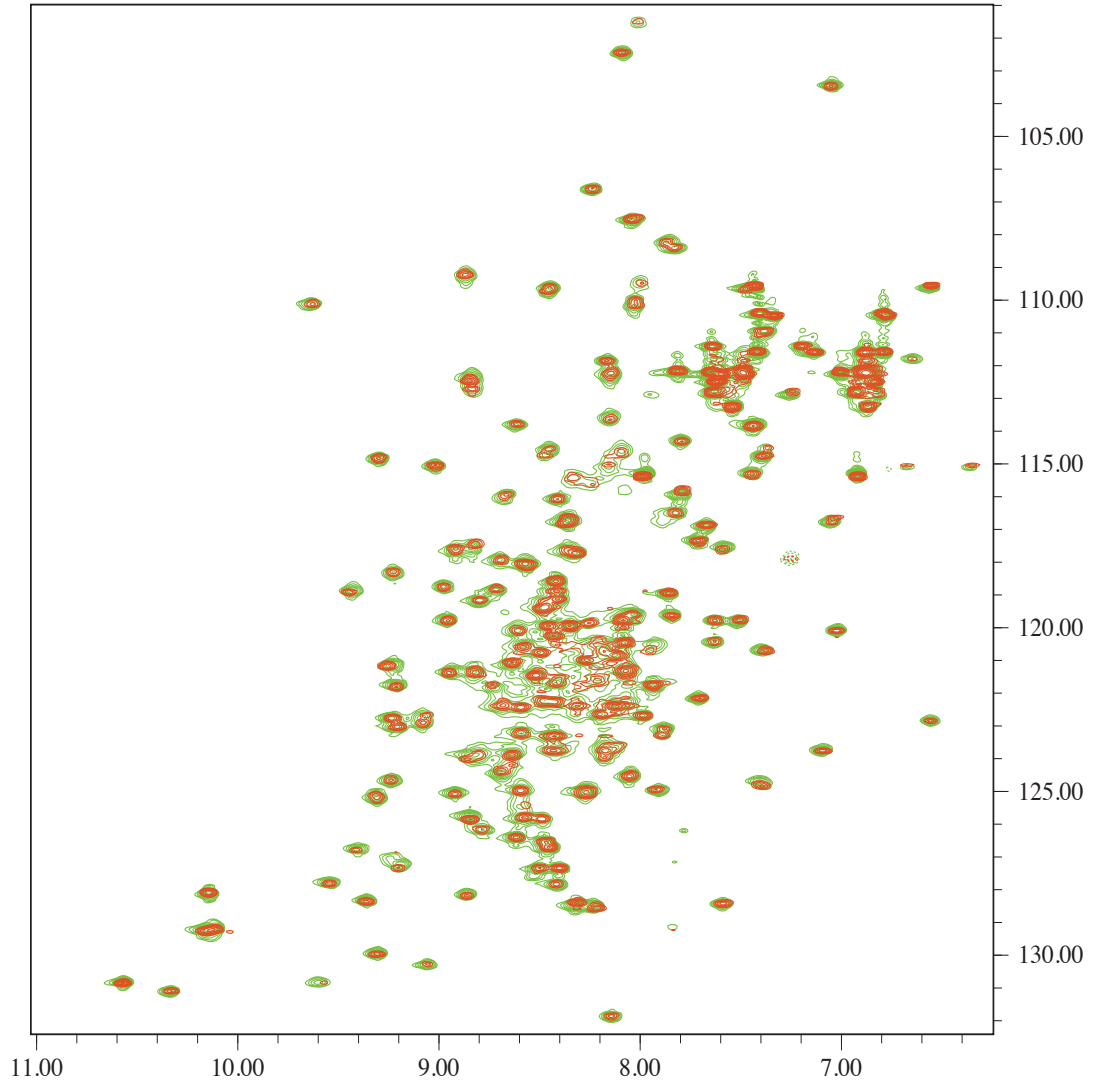
- | | |
|-----------------|------------------|
| 1) Marker | 9) Fraksiyon 25 |
| 2) Fraksiyon 18 | 10) Fraksiyon 37 |
| 3) Fraksiyon 19 | 11) Fraksiyon 38 |
| 4) Fraksiyon 20 | 12) Fraksiyon 39 |
| 5) Fraksiyon 21 | 13) Fraksiyon 40 |
| 6) Fraksiyon 22 | 14) Fraksiyon 41 |
| 7) Fraksiyon 23 | 15) Fraksiyon 42 |
| 8) Fraksiyon 24 | |

Şekil 3.6. GBI-Ube1L-UFD proteinin jel filtrasyon kromatogramı ve jel görüntüsü
(Sephadex-100)

3.8. NMR için Proteinin Uygunluğunun Belirlenmesi

NMR çalışmaların da ilk basamak proteinin çözelti içerisinde doğal konformasyonuna katlanmış olup olmadığını belirlemektir. Bunun belirlenmesi için 0.4 mM konsantrasyondaki ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD (wt) proteinin ^1H - ^{15}N -HSQC

spektrumu kaydedildi (Şekil 3.7). Ardından örnek oda sıcaklığında 9 gün boyunca bekletilerek NMR çalışmaları için yeterince kararlı olup olmadığı belirlendi.

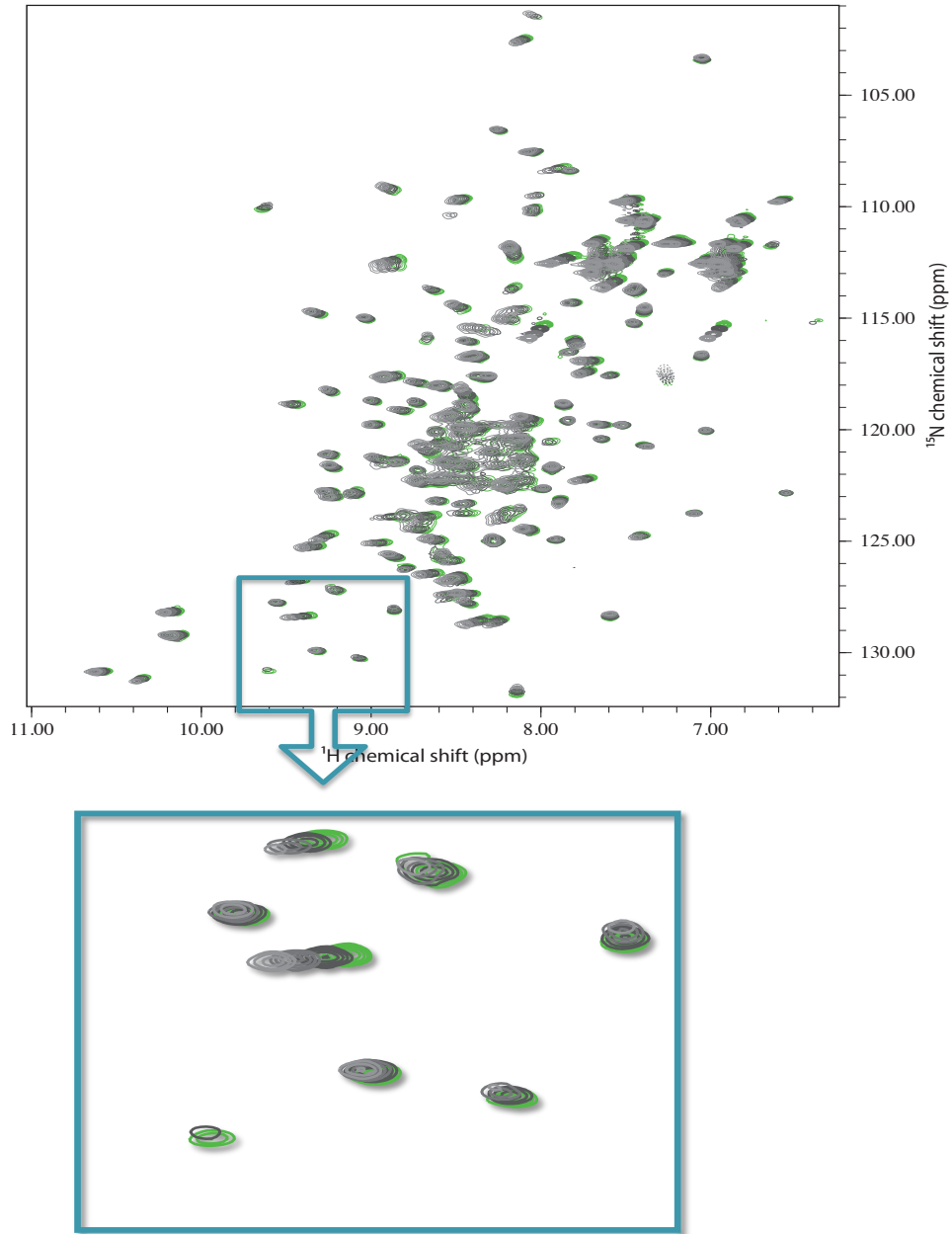


Şekil 3.7. 0.4 mM ^{15}N -GBI-Ube1L-UFD (wt) proteinin ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumu (yeşil 1.gün, kırmızı 9. gün sonunda)

Şekil 3.7’de de görüldüğü gibi 1. ve 9. günlerde kaydedilen spektrumlar üst üste konduğunda piklerde çok büyük bir değişiklik olmadığı yalnızca pik şiddetlerinde bir miktar azalma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ^1H - ^{15}N piklerinin proton kimyasal kayma değeri ekseninde katlanmış bir protein için beklenen yaklaşık 6.5 ile 10.5 ppm arasında geniş bir aralığa yayılmış olduğu anlaşıldı. Ancak füzyon protein için prolinler hariç beklenen 181 pikten yalnızca ~%85’inin (156 pik) mevcut olduğu belirlendi. 9 gün arayla kaydedilen ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumlarından proteinin bu süre

boyunca büyük oranda kararlı kaldığı ve NMR için uygun olduğu sonucuna ulaşıldı.

Protein yapı tayini için uygun NMR sıcaklığının belirlenebilmesi için ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD örneğinin farklı sıcaklıklarda ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumları kaydedildi ve elde edilen spektrumlar birbirleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.8).

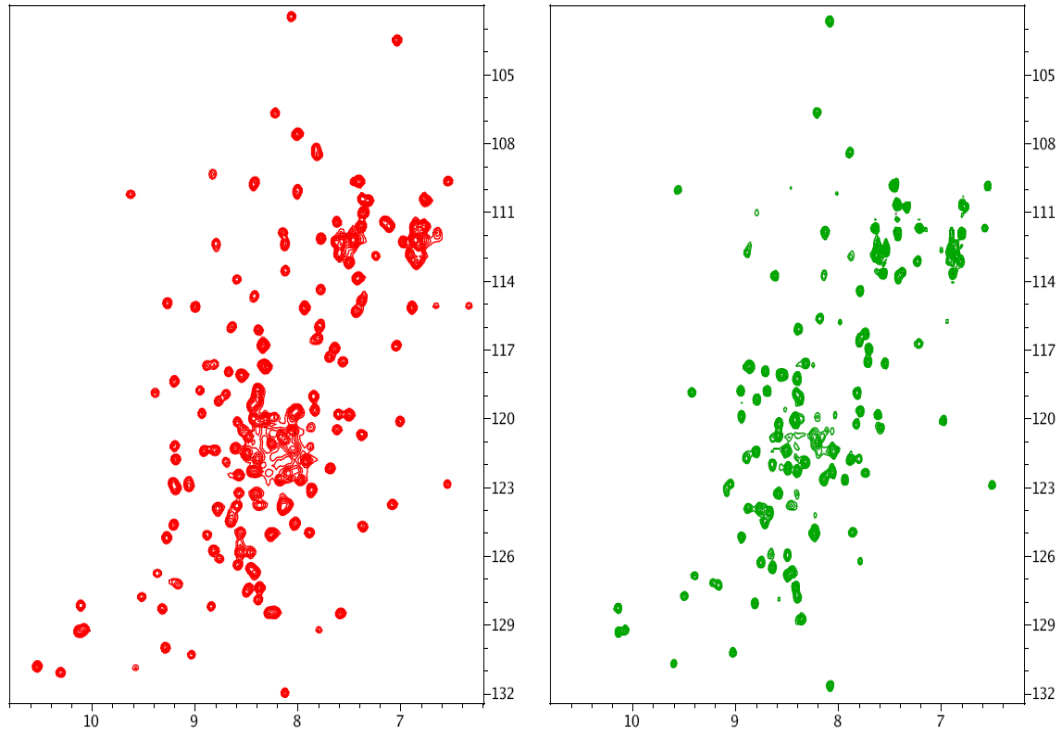


Şekil 3.8. 0.25 mM ^{15}N işaretli ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD (wt) proteinin sıcaklık ile pik şiddetlerinin değişiminin incelendiği ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumları (yeşil 25 $^{\circ}\text{C}$, siyah 20 $^{\circ}\text{C}$, koyu gri 15 $^{\circ}\text{C}$, açık gri 10 $^{\circ}\text{C}$)

Şekil 3.8’de de görüldüğü gibi bazı piklerin şiddeti sıcaklığın azalışı ile yüksek

oranda zayıflamıştır. ^1H - ^{15}N -HSQC deneyleri amino asitlerin N-H piklerinin en şiddetli gözlemlendiği deneylerden birisidir. Eğer ^1H - ^{15}N -HSQC’de pikler zayıf ise bu 3 boyutlu deneylerde bu piklerin görülemeyeceğinin bir işaretidir. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen ^1H - ^{15}N -HSQC deneylerinden elde edilen sonuçlardan yapı tayini için 25 $^{\circ}\text{C}$ ’den düşük sıcaklıkların uygun olmadığı anlaşılmıştır.

Ube1L-UFD’nin GB1 tagından ayrıldığında uzun süre kararlı olmadığı görülmüştür. Bu nedenle Ube1L-UFD’nin yapı tayini için gerekli olan verilerin GB1 ile füzyon halinde iken toplanması gerekmiştir. Ancak bunun öncesinde GB1’in Ube1L-UFD yapısı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığı belirlenmelidir. Bu amaçla ^{15}N -GB1-Ube1L-UFD (wt) ve ^{15}N -Ube1L-UFD (wt) proteinlerinin ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumları kaydedilerek karşılaştırılmış ve böylece GB1 füzyon proteininin Ube1L-UFD (wt) proteinin doğal konformasyonuna bir etkisi olup olmadığı incelenmiştir (Şekil 3.9).



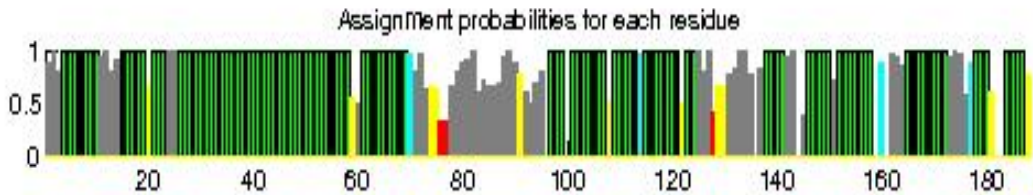
Şekil 3.9. ^{15}N -işaretli GB1-Ube1L- UFD (kırmızı) ve Ube1L- βGD ’nin (yeşil) ^1H - ^{15}N HSQC spektrumları

Şekil 3.9’da görüldüğü gibi GB1 füzyon proteininin varlığında Ube1L-UFD’nin N-H pik dağılımı değişmemektedir. Bu da GB1 tagının Ube1L-UFD’in yapısında önemli

değişikliğe neden olmadığını göstermektedir.

3.9. UBE1L-UFD (wt) Rezonans Atamalarının Yapılması

GB1-Ube1L-UFD (wt) proteinin NMR için uygun koşulların belirlenmesi sonrası 0.4 mM konsantrasyondaki ^{15}N - ^{13}C işaretli protein ile gerekli NMR verileri toplandı. Bu veriler yardımı ile ilk olarak protein ana zincirini oluşturan atomların rezonans atamaları gerçekleştirildi. Rezonans atamalarında HSQC, HNCO, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, C(CO)NH, H(CCO)NH, HBHA(CO)NH spektrumları kullanıldı. Ayrıca PINE yazılımından elde edilen kısmi rezonans atama sonuçları da değerlendirildi (Şekil 3.9).

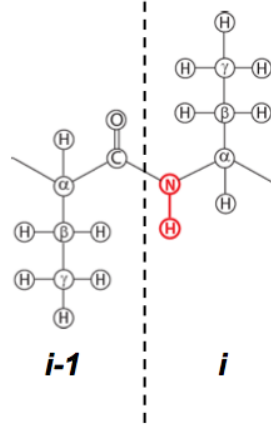


Şekil 3.10. PINE programından elde edilen otomatik rezonans atamalarının olasılık değerleri

Şekil 3.10’da görüldüğü gibi PINE ile elde edilen otomatik atama sonucunda ilk 70 amino asitin rezonans atamaları neredeyse tamamlanmıştır. Bu bölgedeki amino asit dizisi GB1 proteinine aittir. GB1 proteininden sonraki Ube1L-UFD’ye ait olan amino asitlerin atamalarında ise çok fazla eksik ve yanlış atamalar olduğu belirlendi. Bu nedenlerle PINE’den elde edilen rezonans atamalarından sadece kısmi olarak faydalanılarak rezonans atamalarının kalan kısmı manual olarak gerçekleştirildi.

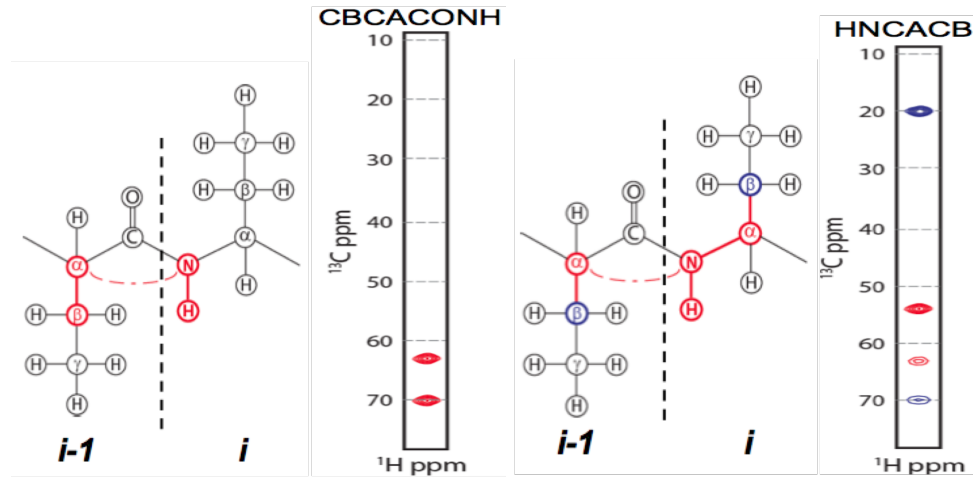
Manual rezonans atamalarında ilk olarak ^1H - ^{15}N -HSQC üzerinde GB1 proteininden geldiği düşünülen N-H pikleri belirlenerek pik listesinden çıkarıldı. Böylece sadece Ube1L-UFD proteininden geldiği bilinen pikler kullanılarak Ube1L-UFD proteinin rezonans atamaları gerçekleştirilmesi hedeflendi.

Rezonans atamalarında ilk olarak protein ana zincir atomlarının atamaları yapıldı. Bu atamalar için ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumundan işaretlenen pikler önce 3 boyutlu CBCACONH spektrumuna yüklendi.



Şekil 3.11. N ve H değerlerinin ait oldukları atomlar

Şekil 3.11’de ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumundan seçilen bir pikin hangi atomlara ait olduğu gösterilmektedir. CBCACONH spektrumunda bu N ve H değerlerine karşılık gelen stripte iki adet pik gözlemlendi. Bunlar bir önceki atomun $\text{C}\alpha$ ve $\text{C}\beta$ atomlarına aittir. CBCACONH spektrumunda gözlenen $\text{C}\alpha$ ve $\text{C}\beta$ rezonansları bir önceki amino asite ait olarak işaretlendikten sonra bu spektrumun pik listesi kaydedilerek daha sonra HNCACB spektrumuna yüklendi. HNCACB spektrumunda hem N ve H değerlerinin ait olduğu amino asidin (i), hemde bir önceki amino asidin (i-1) $\text{C}\alpha$ ve $\text{C}\beta$ atomlarına ait pikler gözlemlendi (Şekil 3.12).

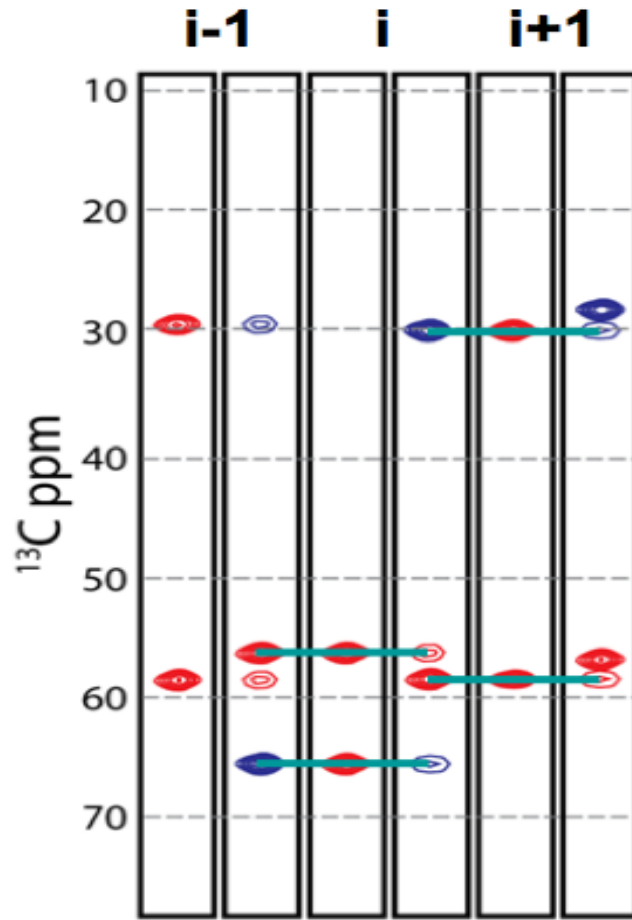


Şekil 3.12. i ve i-1 amino asitlerinin CBCACONH ve HNCACB spektrumlarında oluşturduğu pikler

HNCACB spektrumunda, CBCACONH spektrumundan elde edilen bilgi doğrultusunda, hangi piklerin i-1’in $\text{C}\alpha$ ve $\text{C}\beta$ atomlarına hangi piklerin i’nin $\text{C}\alpha$ ve

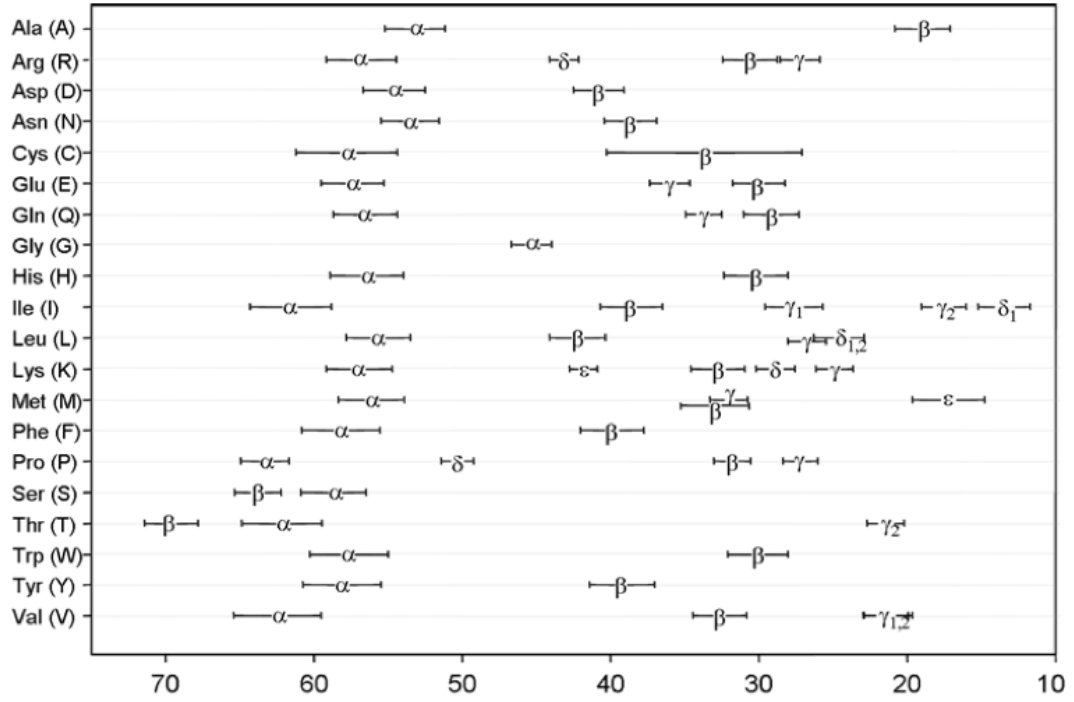
C β atomlarına ait olduğu tespit edildi. Daha sonra HNCACB spektrumundaki striplerde birbiri ile uyuşan C α ve C β pikleri belirlenerek birbirini takip eden striplerin sıralanması sağlandı. Bu işlem tekrarranarak amino asit dizisinde hem ileri hem de geri yönde striplerin sıralanmasına çalışıldı. Bu ilerlemenin tıkandığı noktalarda, tıkanma amino asit dizisindeki bir prolinden kaynaklanmıyor ise farklı spektrumlardan faydalanılarak atamaların tamamlanmasına çalışıldı.

Peptid ana zincir üzerinde birbirine takip eden amino asitlerin atomlarına ait piklerin Şekil 3.13’de gösterildiği gibi birbiri ardına sıralanması sonrası bu dizilerin hangi amino asitlerden geldiğinin belirlenmesine geçildi.



Şekil 3.13. Birbirini takip eden üç amino asitin CBCACONH ve HNCACB stripleri

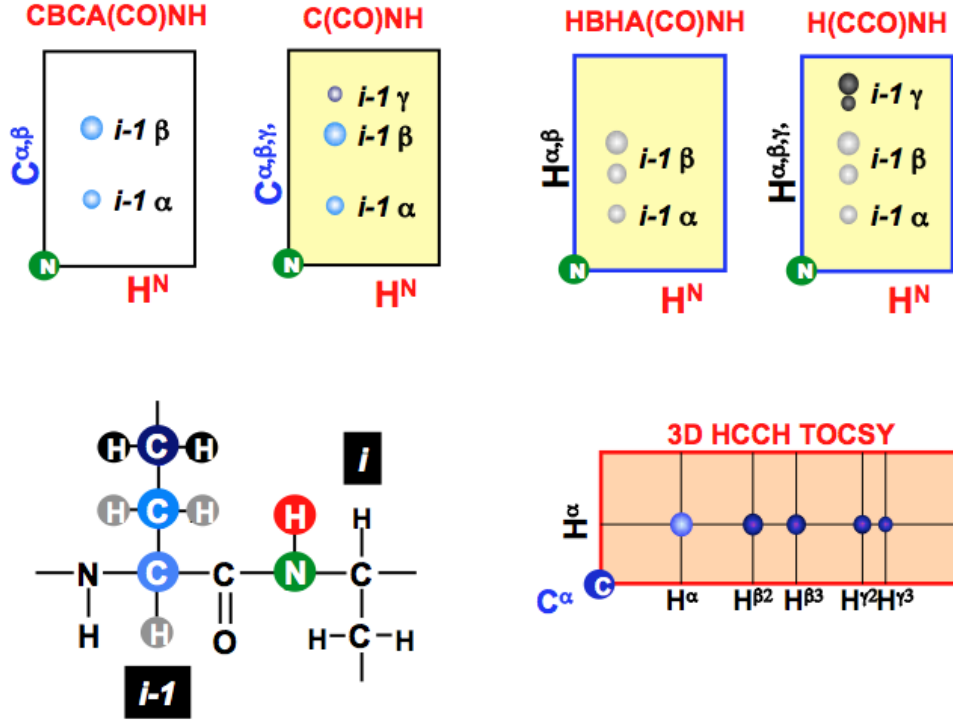
Pikleri hangi amino asitlerden geldiğinin belirlenmesinde Şekil 3.14’de verilmiş olan amino asitlere ait beklenen ortalama karbon kimyasal kayma değerlerinden faydalanıldı.



Şekil 3.14. Amino asitlerin alifatik C kimyasal kayma değerlerinin görüldüğü aralıklar

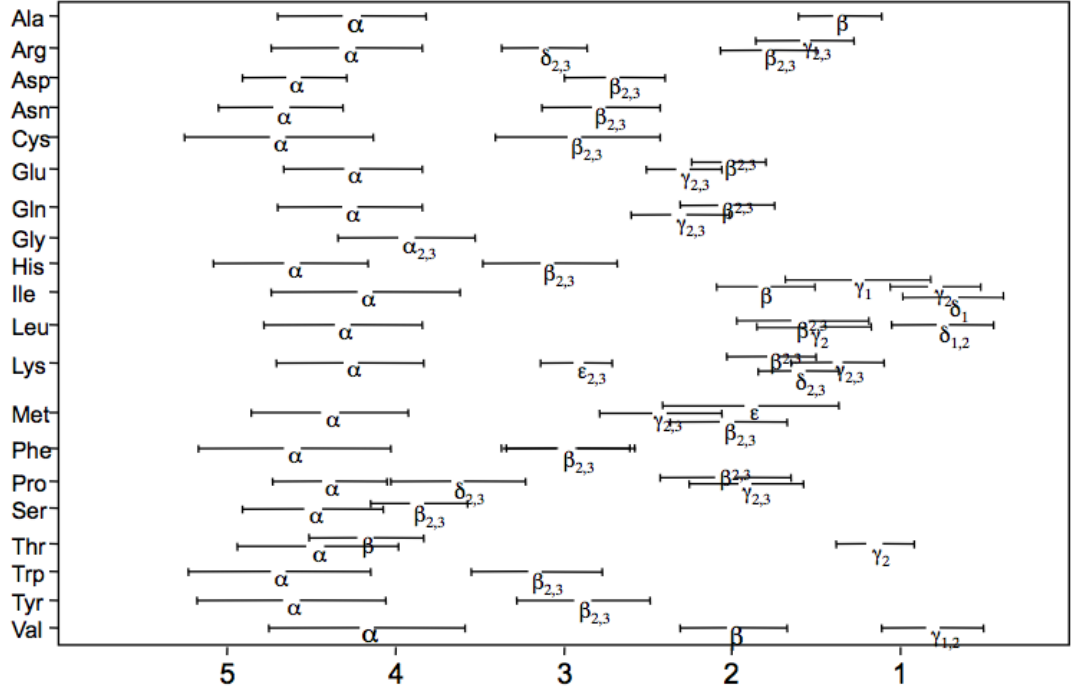
Bunun yanında tablodada görüldüğü gibi bazı amino asitlerin sahip olduğu spesifik özelliklerden de faydalanılarak atamaların kolaylaştırılması sağlandı. Bu özellikler arasında treonin ve serin amino asitlerinin beta karbonlarının alfa karbonlarına göre daha yüksek ppm değerlerine sahip olması, glisin amino asitinin sadece alfa karbonunun bulunması, alanin amino asitinin beta karbonunun çok düşük bir ppm değerine sahip olması sıralanabilir.

Bu işlemler ile amino asitlerin ana zincir atamaları tamamlandı ve yan zincir atamalarına geçildi. Yan zincir atamalarında kullanılan spektrumlar ve bu spektrumlarda hangi piklerin gözlendiği Şekil 3.15’de verilmiştir.



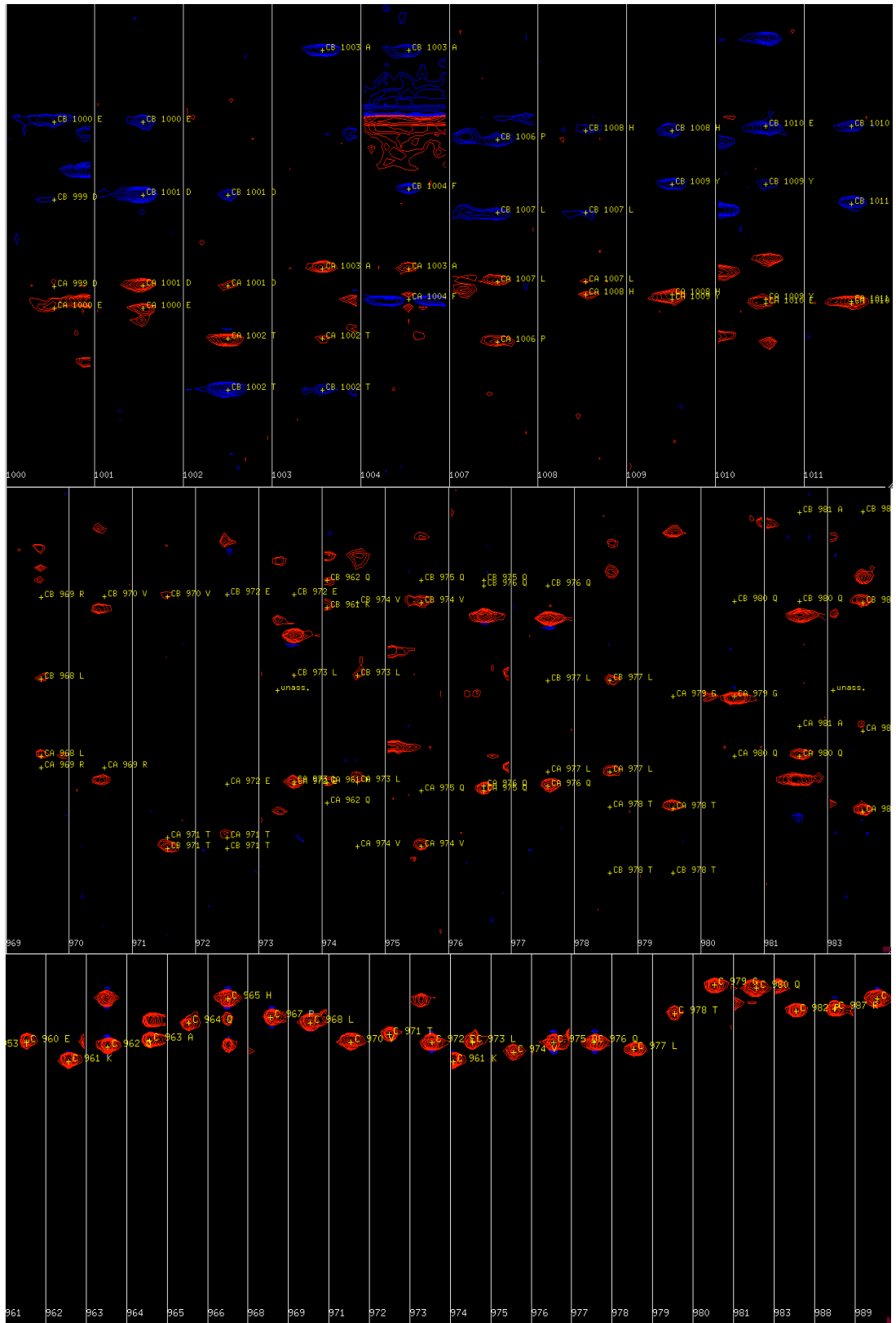
Şekil 3.15. Yan zincir ataomlarının atamalarında kullanılan spektrumlar ve gözlenen pikler

^1H - ^{15}N -HSQC spektrumundaki atamaları gerçekleştirilmiş piklere karşılık gelen stripler CBCA(CO)NH de sırası ile belirlendi ve sonrasında bu striplere karşılık gelen stripler C(CO)NH spektrumunda açıldı. Bu spektrumda C γ ve C δ atomlarının atamaları gerçekleştirildi. Sonrasında bu stripe karşılık gelen HBHA(CO)NH stripinde H α ve H β atomlarının atamaları gerçekleştirildi. Bu atamaların sonrasında ise aynı amino asit stripi H(CCO)NH spektrumunda belirlendi ve alifatik H α ve H β ve H γ rezonans atamaları gerçekleştirildi. Amino asitlerin tipik alifatik proton kimyasal kayma değerleri Şekil 3.16'de verilmiştir.



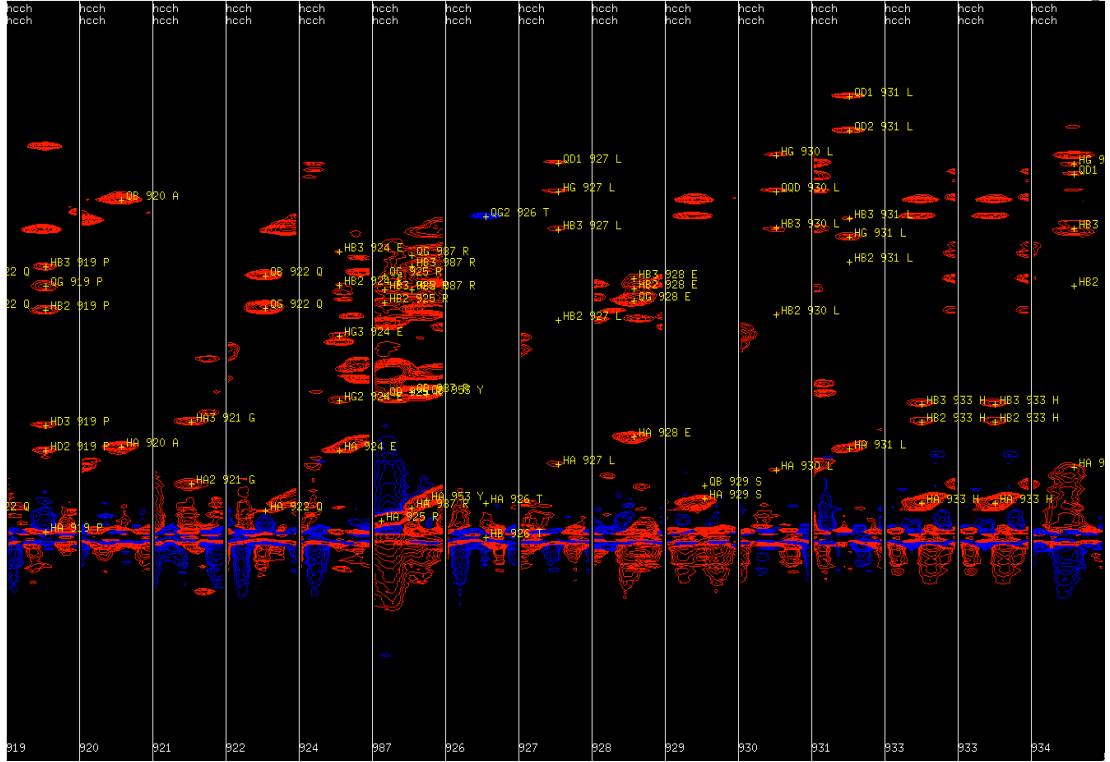
Şekil 3.16. Amino asitlerin alifatik H kimyasal kayma değerlerin görüldüğü aralıklar

Bu atamalar sonrası elde edilen spektrumlarda yapılan atamaların bir bölümü şekil 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.17. Sırası ile HNCACB, CCONH, HNCO spektrumlarında atanmış pikler

Ayrı ayrı spektrumlarda gerçekleştirilen atamalar sonrasında atamalar, hem C ve H atamalarının birleştirilmesi hemde diğer spektrumlarda atması yapılamayan atomların atamalarının gerçekleştirilebilirliğinin incelenmesi için HCCH-TOCSY spektrumunda aktarıldı. HCCH-TOCSY spektrumunda atamaları gerçekleştirilen amino asitlerin bir bölümü Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. HCCH-TOCSY spektrumunda ataması gerçekleştirilen pikler

Ube1L-UFD’nin ilk 18 amino asidine (902-919) ait rezonanslar belirlenemedi. Rezonans atamaları gerçekleştirilen tüm atomların rezonans değerleri prot dosyası içerisinde birleştirildi. Hiç bir veri bulunmaması nedeni ile bundan sonraki adımlar için kullanılan prot dosyasından Ube1L-UFD’nin 902-919 bölgesindeki amino asidi çıkarıldı.

3.10. Dihedral Açılı Kısıtları

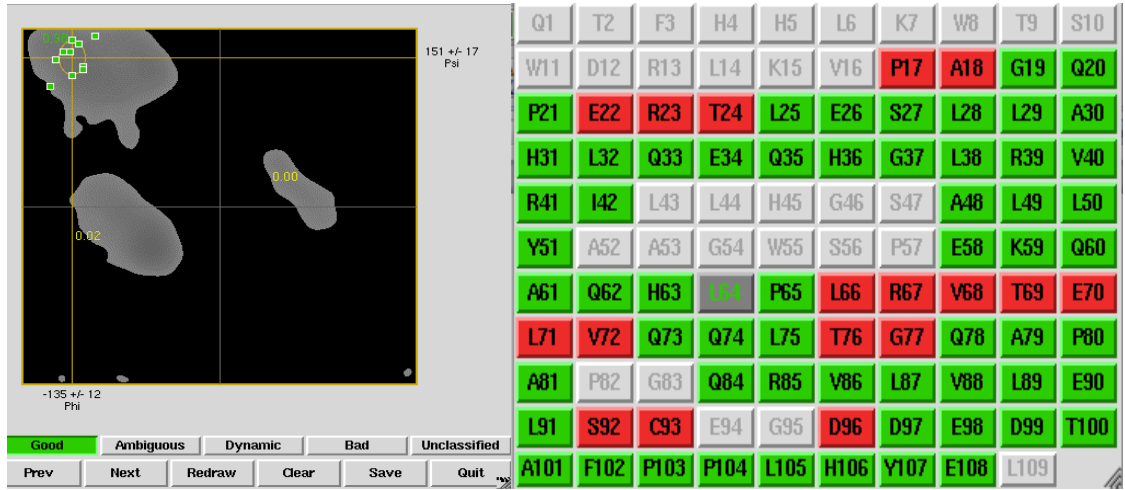
Rezonans atamalarının tamamlanması sonrasında $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^{13}\text{C}'$, ve ^{15}N kimyasal kayma değerleri TALOS+ programı ile tahmini torsion açılı değerlerine

çevrildi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. TALOS+ programından elde edilen dihedral açı kısıtlarından bazıları

920	ALA	PHI	-116	-58	944	ILE	PSI	137	163	980	GLN	PHI	-137	-85
920	ALA	PSI	-48	8	950	ALA	PHI	-156	-104	980	GLN	PSI	136	162
922	GLN	PHI	-137	-107	950	ALA	PSI	136	170	981	ALA	PHI	-154	-102
922	GLN	PSI	93	161	951	LEU	PHI	-144	-120	981	ALA	PSI	106	150
923	PRO	PSI	134	156	951	LEU	PSI	129	145	982	PRO	PSI	124	174
925	ARG	PHI	-107	-63	952	LEU	PHI	-144	-104	983	ALA	PHI	-151	-95
925	ARG	PSI	-37	13	952	LEU	PSI	131	159	983	ALA	PSI	111	167
927	LEU	PHI	-67	-57	953	TYR	PHI	-125	-81	986	GLN	PHI	-120	-74
927	LEU	PSI	-50	-38	953	TYR	PSI	137	191	986	GLN	PSI	103	157
928	GLU	PHI	-67	-55	960	GLU	PHI	-66	-56	988	VAL	PHI	-144	-116
928	GLU	PSI	-51	-29	960	GLU	PSI	-44	-36	988	VAL	PSI	132	158
929	SER	PHI	-70	-60	961	LYS	PHI	-71	-65	989	LEU	PHI	-141	-101
929	SER	PSI	-49	-35	961	LYS	PSI	-44	-36	989	LEU	PSI	126	150
930	LEU	PHI	-69	-51	962	GLN	PHI	-68	-60	990	VAL	PHI	-110	-76
930	LEU	PSI	-53	-39	962	GLN	PSI	-49	-35	990	VAL	PSI	105	133
931	LEU	PHI	-68	-58	963	ALA	PHI	-67	-57	991	LEU	PHI	-120	-100
931	LEU	PSI	-45	-37	963	ALA	PSI	-44	-26	991	LEU	PSI	128	150
932	ALA	PHI	-69	-63	964	GLN	PHI	-90	-54	992	GLU	PHI	-154	-122
932	ALA	PSI	-46	-34	964	GLN	PSI	-44	-16	992	GLU	PSI	145	161
933	HIS	PHI	-69	-59	965	HIS	PHI	-103	-63	993	LEU	PHI	-147	-123
933	HIS	PSI	-52	-40	965	HIS	PSI	-42	-4	993	LEU	PSI	134	168
934	LEU	PHI	-66	-60	966	LEU	PHI	-100	-60	999	ASP	PHI	-75	-61
934	LEU	PSI	-45	-35	966	LEU	PSI	133	163	999	ASP	PSI	-46	-28
935	GLN	PHI	-68	-62	967	PRO	PSI	146	162	1000	GLU	PHI	-73	-59
935	GLN	PSI	-48	-42	969	ARG	PHI	-92	-76	1000	GLU	PSI	-52	-28
936	GLU	PHI	-75	-55	969	ARG	PSI	-42	-4	1001	ASP	PHI	-104	-66
936	GLU	PSI	-48	-38	972	GLU	PHI	-81	-53	1001	ASP	PSI	-47	-1
937	GLN	PHI	-88	-72	972	GLU	PSI	-54	-26	1002	THR	PHI	-71	-61
937	GLN	PSI	-46	-20	973	LEU	PHI	-89	-61	1002	THR	PSI	-40	-28
938	HIS	PHI	-120	-88	973	LEU	PSI	-41	-9	1004	PHE	PHI	-138	-76
938	HIS	PSI	-19	3	974	VAL	PHI	-152	-100	1004	PHE	PSI	92	148
940	LEU	PHI	-118	-58	974	VAL	PSI	91	171	1005	PRO	PSI	144	164
940	LEU	PSI	127	153	975	GLN	PHI	-64	-56	1006	PRO	PSI	144	160
941	ARG	PHI	-127	-69	975	GLN	PSI	-44	-30	1007	LEU	PHI	-110	-48
941	ARG	PSI	93	155	976	GLN	PHI	-65	-59	1007	LEU	PSI	114	136
942	VAL	PHI	-126	-104	976	GLN	PSI	-44	-32	1008	HIS	PHI	-126	-92
942	VAL	PSI	126	138	977	LEU	PHI	-109	-71	1008	HIS	PSI	113	145
943	ARG	PHI	-112	-78	977	LEU	PSI	-44	22	1009	TYR	PHI	-130	-96
943	ARG	PSI	139	159	979	GLY	PHI	77	103	1009	TYR	PSI	112	138
944	ILE	PHI	-146	-102	979	GLY	PSI	-17	13	1010	GLU	PHI	-123	-79
										1010	GLU	PSI	113	133

Elde edilen torsion açı değerleri sadece iyi olarak sınıflandırılan değerler seçilerek yapı hesaplılarında kullanıldı. Şekil 3.19’de TALOS+ ile eldi edilen açı kısıtlarından yapı hesaplamalarında kullanılmak için seçilmiş olanlar gösterilmektedir.



Şekil 3.19. TALOS+ ile eldi edilen açı kısıtlarından yapı hesaplamalarında kullanılmak için işaretlenenler

Dihedral açı kısıtlamaları yapı hesaplamalarında kullanılmak için seçilmiş olan amino asitler Şekil 3.19’de yeşil ile işaretlenmiş olarak görülmektedir.

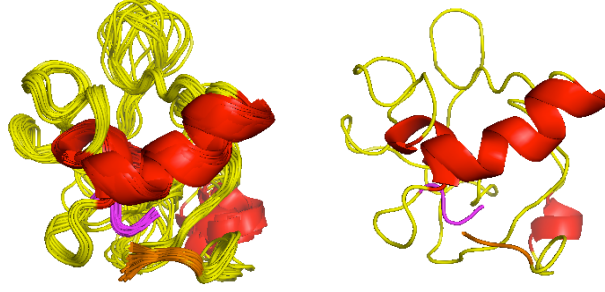
3.11. NOE Atamalarının Gerçekleştirilmesi ve Yapı Hesaplamaları

Proteindeki atomların rezonans atamaları mümkün olduğunca tamamlandıktan sonra tüm kimyasal kayma değerlerini içinde toplayan bir ‘.prot’ dosyası oluşturuldu. Bu rezonans değerlerini içeren dosya NOESY spektrumlarına yüklenerek NOE atamaları gerçekleştirildi. NOE atamalarında Xeasy programının olası atama (possible assign) modülü kullanıldı. NOESY spektrumlarının her bir stripindeki pikler, öncelikle amino asidin kendi protonlarına, sonra komşu protonlara atandı. Bu atamalar tamamlandıktan sonra hala atanmayan pikler ise uzak mesafe atamaları için değerlendirildi. NOE atmaları için Xeasy programının otomatik atama modülünden faydalanılmaya çalışılsada rezonans atamalarındaki eksikliklerden dolayı istenen sonuç alınamadı. Bu nedenle NOE atamaları manuel olarak gerçekleştirildi ve kısmi olarak tamamlandı.

Kısmi NOE atamaları sonuçları ile elde edilen yapılardan ana zincir RMSD değeri en düşük olan

yapının RMSD değeri (920-1011) 0.69 Å ve hesaplamalar sonrası elde edilen en iyi 20 yapının RMSD değerlerinin ortalaması ise 1.12 Å’dur. Bu değerler yapı hakkında

kesin yargılara varabilmek için yüksek değerler olmasına rağmen yapının hangi bölgelerinin birbiri ile uzak mesafe etkileşimleri ile etkileştiği konusunda fikir vermektedir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Kısmi NOESY atamaları sonrası hesaplanan Ube1L-UFD NMR yapısı (N terminali pembe, C terminali turuncu alfa heliksler kırmızı ile gösterildi.)

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1. Ube1L-UFD Serbest Halde Kararsızdır ve GB1 gibi Bir Çözünürlük Tagına İhtiyaç Duymaktadır

Ube1L enziminin diğer E1 enzimleri ile amino asit dizilerinin hizalanması yolu ile 902-1011 numaralı amino asitlerinin UF domainini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışmada diğer domainlerinden bağımsız olarak histidin tagı ile birlikte ekspres edilen Ube1L-UFD'nin serbest halde kararsız olduğu ve NMR ile yapısal çalışmalar için uygun olmadığı belirlendi. Hedef domainin çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırabilmek amacıyla GB1 çözünürlük tagı ile birlikte elde edilmesi yoluna gidildi. GB1-Ube1L-UFD füzyon proteininin çözünür olarak ekspresyonu sağlanamadı ancak renatürasyonu başarılı sonuç verdi. GB1 tagının kesilerek uzaklaştırılması sonucunda ise Ube1L-UFD'nin tekrar çöktüğü gözlemlendi. Bu nedenle NMR ile yapı tayini çalışmalarında hedef domainin GB1 ile füzyon olarak kullanılmasına karar verildi.

NMR için en uygun tampon çözelti, tuz konsantrasyonu ve pH değerlerinin tespit edilmesinde microdrop testi uygulanarak optimum koşullar tespit edildi. GB1-Ube1L-UFD'nin tuz içermeyen HEPES (pH 7.65) ve Tris-HCl (pH 7.4) içerisinde en kararlı olduğu belirlendi. GB1 çözünürlük tagı ile birlikte ve uygun çözelti koşullarında protein NMR yapısal çalışmaları için yeterli olan 1 mM konsantrasyona kadar deriştirilebildi ve bu koşullarda yeterli süre bozulmadan saklanabildi.

4.2. Ube1L-UFD sistein Mutasyonları Çözünürlük ve Kararlılığı Dikkate Değer Oranda Arttırmamıştır

Yapılan ekspresyon, saflaştırma ve konsantrasyon çalışmaları sonucu elde edilen veriler GB1-Ube1L-UFD'nin hem çözünür hem de çözünmez agregatlar oluşturduğunu ortaya koydu. Domainin kararsız olmasının ve kolayca agregasyona uğramasının nedenlerinden birinin domainin içerdiği serbest sistein amino asidi olabileceği düşünüldüğünden bu amino asit mutasyona uğratılarak domainin kararlılığının arttırılmasına çalışıldı.

Sistein amino asitinin serine mutasyonu füzyon proteinin renatürasyonunu olumsuz yönde etkiledi. Serinin alanine dönüştürülmesi sonucunda füzyon proteinin kararlılığı bir miktar arttırılabilse de mutasyon serbest domainin GB1 olmadan üretilmesine imkan sağlamadı. Ayrıca mutasyon agregat oluşumu problemini ortadan kaldırmadı. Bu nedenlerle yapısal çalışmalarda WT füzyon proteinin kullanılmasına karar verildi.

4.3. Ube1L-UFD'nin NMR Spektrumlarında Görünmeyen Bölgeler Mevcuttur

^{15}N ve ^{13}C işaretli olarak hazırlanan GB1-Ube1L-UFD örneği ile NMR yapı tayini için gerekli tüm veriler kaydedildi ve analiz edildi. Rezonans atamaları sırasında domainin N terminal bölgesinde bulunan 18 amino asite (902 ile 919 arası) ve 945-949 ve 954-959 amino asitlerini içeren bölgeye ait pikler korelasyon deneylerinin hiç birisinde gözlenemedi. Füzyon proteinin ^1H - ^{15}N HSQC spektrumunda da elde edilen piklerin sayısının beklenen piklerin sayısından daha az olduğu tespit edilmişti. NMR spektrumunda piklerin zayıflaması ve kaybolmasının başlıca nedenlerinden birisi konformasyonel çeşitliliktir. Eğer protein, domain veya domaininin bir segmenti iki veya daha fazla konformasyonel form arasında bir denge içerisinde ise ve bu konformasyonların birbirlerine dönüşüm hızları NMR zaman ölçeğine göre orta dönüşüm hızında (intermediate exchange rate) gerçekleşiyor ise sinyaller giderek yayılarak gözlenemez hale gelir. Burada, NMR sinyallerinin gözlenemeyecek düzeyde yayılmasının ve kaybolmasının en muhtemel nedeni, söz konusu bölgelerin dinamik bir konformasyonel çeşitlilik içerisinde olmalarıdır.

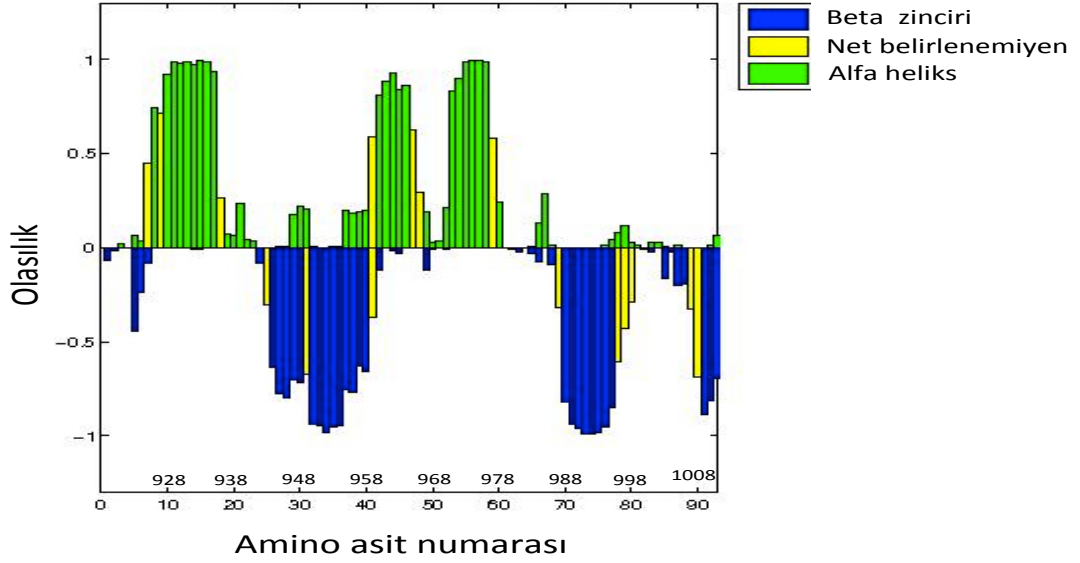
UFD'lerinin ortak yapısal özelliklerinden bir tanesi domainin N-terminal bölgesi ile C-terminal bölgesi arasında antiparalel bir beta tabaka içermesidir. Ube1L-UFD'nin NOESY spektrumlarının analizi sonucunda karboksil terminalinde bulunan 1008-1010 numaralı amino asitler ile amino terminaline yakın bölgede bulunan 919-921 amino asitleri arasında beta tabaka yapısında gözlenen türden uzak mesafe pikleri olduğu belirlendi. Bu nedenle dizi hizalama analizleri sonucunda Ube1L'nin UFD'i olarak tahmin edilen segmentin (902-1011 arası) 902'den ziyade 916-919 arasında başladığı düşünülmektedir. 902-916 arasında kalan kısmın ise domainler arası bölgeyi oluşturduğu tahmin edilmektedir. Domainler arasındaki bölgeler birçok proteinde dinamik ve domainlerin pozisyonlarının değişmesine imkan tanıyan

bölgelerdir. Bu nedenle bu bölgenin konformasyonel esneklik içerisinde olması ve bunun sonucunda NMR sinyallerinin zayıflamış/kaybolmuş olması muhtemeldir.

NMR spektrumlarında gözlenmeyen diğer bölgeler ise 945-949 ve 954-959 amino asitlerini içerir. E1 enzimlerinin UFD'lerinin Ub/Ubl proteinin doğru E2 ye aktarılmasında önemli olduğu bilinmektedir. Ub benzeri NEDD8 ve SUMO konjugasyon sistemlerinin UFD'lerinin serbest NMR yapılarından elde edilen sonuçlarda UFD'lerin E2 enzimi ile etkileşen bölgelerinin konformasyonel esnekliğe sahip olduğu gösterilmiştir ((Wang J. H. et al. 2009)). Ayrıca SUMO E1 UFD'sinde bu konformasyonel esnekliği kısıtlayan mutasyonların SUMO'nun E1'den E2'ye transferini engellediği belirlenmiştir. Bu bulgular, E1 UFD'nin E2 bağlayan bölgesinde konformasyonel esneklik/çeşitliliğin önemli hatta bazı durumlarda gerekli olduğunu göstermektedir. Ube1L-UFD yapısında da NMR spektrumlarında görülmeyen bu bölgelerinin (945-949 ve 954-959) E2 ile etkileşimde rol alan bölgeler olması muhtemeldir. Ube1L-UFD doğal E2 enzimi olan UbcH8 varlığında NMR spektrumlarının ve yapısının incelenmesi ve E2 etkileşim bölgesinin tespit edilmesi bu hipotezi destekleyecek çalışmalar arasındadır.

4.4. Ube1L-UFD Ubiquitin Benzeri Bir İkincil Yapıya Sahiptir

Rezonans atamaları kullanılarak PECAN programında elde edilen ikincil yapıyı gösteren grafik Şekil 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.1. PECAN programı ile elde edilen ikinci yapı grafiği.

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi 919 numaralı amino aside karşılık gelen 1. amino asitten başlayarak ilk 4 amino asidin beta konformasyonu yapısına katlanmış olduğu görülmektedir. Bu beta zinciri ($\beta 1$) proteinin karboksil terminalinde bulunan 5. beta zinciri ($\beta 5$) ile etkileşerek antiparalel bir beta tabaka oluşturur. 926-937 amino asitler arasında yaklaşık 10 amino asitten oluşan uzun bir alfa heliks ($\alpha 1$) ve onu takip eden iki beta zinciri yer almaktadır. Bu beta zincirlerinden birisi 938-945 ($\beta 2$) amino asitler arasında, diğeri ise 947-956 ($\beta 3$) amino asitler arasındaki bölgede bulunmaktadır. Bu beta tabaka çiftini takiben ise iki alfa heliks ($\alpha 2$ ve $\alpha 3$) yer almaktadır. Proteinin N terminalinde ise dördüncü (988- 997) ve beşinci (1002-1011) beta zincirlerini oluşturan amino asit dizileri yer almaktadır. İkincil yapısı tıpkı diğer UFDler gibi β - α - β - β - α - α - β - β olan protein tipik bir Ubiquitin benzeri bir ikincil yapıya sahiptir. Domainin hangi bölgelerinin E2 ile etkileşimde görev aldığı ise gelecekte yapılacak titrasyon ve mutasyon çalışmaları ile belirlenebilir.

BÖLÜM 2: BAZI İNSAN UBIQUITİLASYON E3 ENZİMLERİ VE RIG-1-CARDS'IN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

5. GİRİŞ

5.1. RIG-I VE RIG-I Sinyal İletiminin Post Translasyonel Modifikasyonu

İnsan vücudu günlük hayatta sık sık viral ve mikrobiyal organizmalar ile karşılaşmaktadır. Ancak bu organizmalar birçok zaman insan hücrelerini enfekte edemeden bağışıklık sistemi tarafından algılanırlar ve yok edilirler. Viral enfeksiyonlar sırasında bağışıklık sistemi sitokinler ve Tip I interferonları yüksek düzeylerde üreterek viral enfeksiyonu baskılamaya çalışır (O'Neill ve Bowie 2010). Tip I interferonların salgılanması bağışıklık sisteminde görev yapan monosit, makrofaj, T ve B gibi birçok hücrenin de aktivasyonunu sağlar.

Bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşılık vermesini sağlayan birçok reseptör vardır ve bu reseptörler sayesinde vücuda giren enfeksiyonlar algılanır (Loo ve Gale 2011). Bu reseptörler genel olarak patojen tanıma reseptörleri olarak adlandırılır ve hücre içerisine giren organizmanın sahip olduğu çeşitli moleküller sayesinde organizmayı tanımlarlar (Yoneyama ve Fujita 2007).

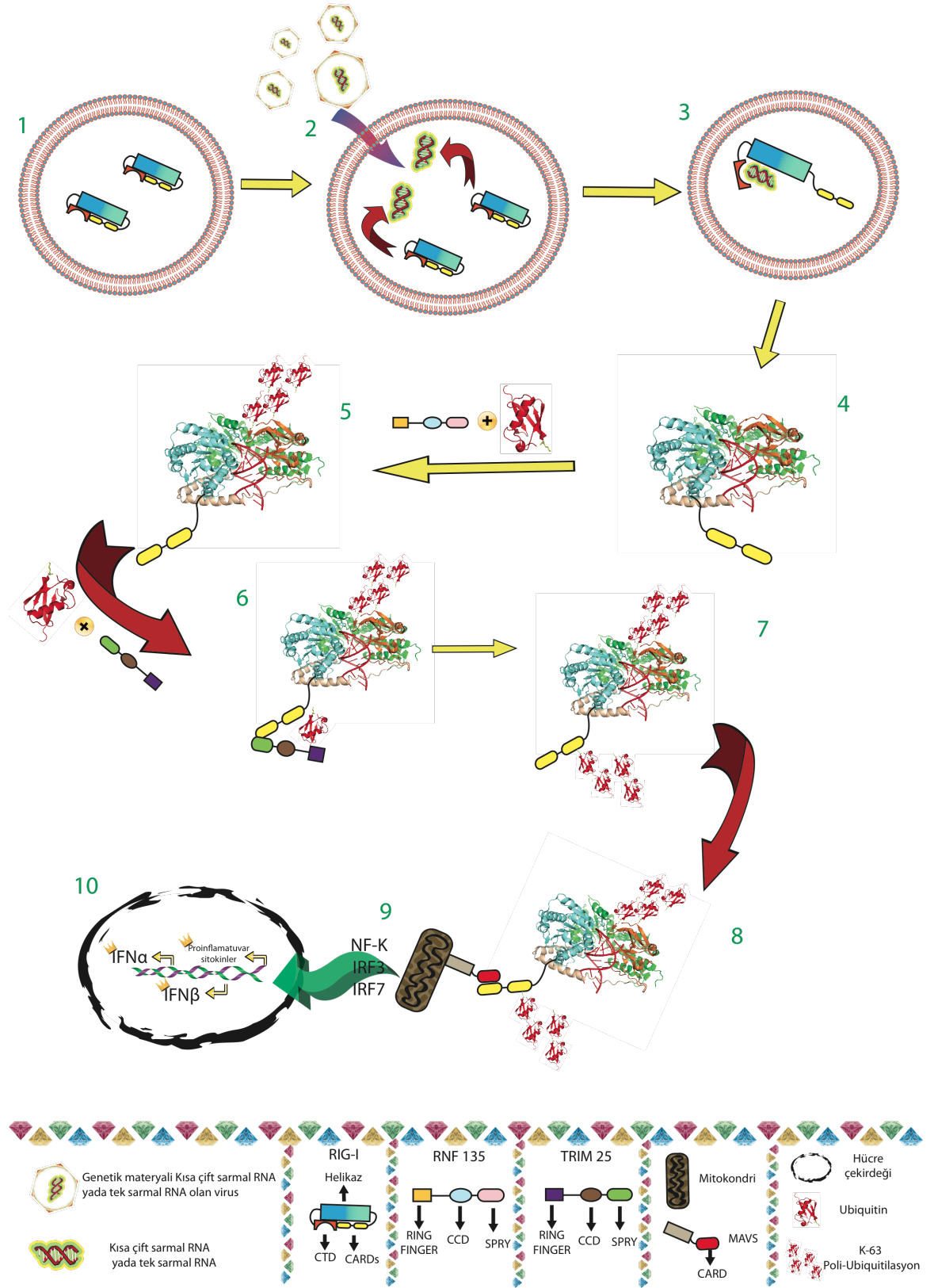
Patojen tanıma reseptörlerinin birçok çeşidi olup farklı organizmaları tanımlayan farklı reseptör grupları vardır. Hücre içerisine giren viral enfeksiyonları tanımlayan reseptörlerden bir tanesi de retinoik asit tarafından indüklenebilir gen-I (retinoic acid inducible gene-I) (RIG-I)) adı verilen reseptördür (Rehwinkel 2010). RIG-I hücre içerisinde bulunan sitoplazmik bir reseptördür. RIG-I reseptörü birçok tek zincir (Influenza A, measles, Sendai, Hepatit C) ve kısa çift sarmal (vesicular stomatitis virüs) RNA virüslerine karşı Tip I interferon cevaplarının oluşturulmasında merkezi bir göreve sahiptir (Takahasi vd., 2008).

Yapısal olarak RIG-I 3 farklı domainden oluşur; RNA helikaz, N-terminalinde kaspaz etkinleştirici ve temin domainleri (Caspase activation and recruitment domains(CARDS)), C-terminal düzenleyici domainlerdir.

5.1.1. RIG-I'in işleyişi

RIG-I RNA'nın 5' ucunda bulunan trifosfat grubunu tanıyarak viral RNA'ya dimer olarak bağlanır (Kato et al. 2011, Kawai ve Akira 2008). Bu bağlanma sonrasında RIG-I'in CARDS olarak isimlendirilen domainleri dışa doğru açılırlar. Sinyal iletimi için RIG-I'in iki farklı E3 tarafından ubiquitilasyonu gereklidir. Bunlardan ilki RIPTET (RNF135) Ubiquitin E3 vasıtası ile RIG-I karboksil terminalinde gerçekleştirilen K63 tipi ubiquitilasyondur. İkincisi ise TRIM25 ubiquitin E3 ile RIG-I'in CARDS domainine gerçekleştirilen K63 tipi ubiquitilasyondur (Gack vd., 2007).

RIG-I'in öncelikle RIPTET aracılıklı ubiquitilasyona uğratıldığı ve bu ubiquitilasyonun ikinci ubiquitilasyon için gerekli yapısal karalılığı sağladığı düşünülmektedir (Gack vd., 2008, Oshiumi vd., 2009, Oshiumi vd., 2010). RIPTET ile karboksil terminalindeki ilk ubiquitilasyon sonrasında, TRIM25 ubiquitin E3 ligazın SPRY domaini RIG-I CARD'larla etkileşerek RIG-I'in K172 amino asidini K63 tipi ubiquitilasyona uğratar (Gack vd., 2008). Bu ubiquitilasyon işlemi RIG-I'in sinyal mekanizmasındaki bir alt basamaktaki partneri ile etkileşmesi için zorunlu bir işlemdir. Bu ubiquitilasyon olmadan proteinin sinyal sistemindeki bir sonraki bileşen olan mitokondriyal anti-viral sinyal proteini (MAVS) ile etkileşmediği belirlenmiştir. MAVS mitokondrinin dış yüzeyinde bulunan bir protein olup tıpkı RIG-I gibi CAR domainine sahiptir. K63 tipi ubiquitilasyonuna uğramış olan RIG-I CARDS, MAVS'ın CARD'ı ile etkileşir ve anti-viral cevabın bir alt basamağa aktarılmasını sağlar (Inn vd., 2011).



Şekil 5.1. RIG-I sinyal iletim sistemi

5.1.2. RIG-I'in post-translasyonel regülasyonu

5.1.2.1. *TRIM25 ve RIPLET ile aktivasyonu*

RIG-I proteinin işleyişinin düzenlenmesinde çok sayıda post-translasyonel modifikasyon önemli rol almaktadır (Bennett ve Harper 2010). Bunlardan ilki yukarıda da bahsedildiği gibi RIG-I proteinin regülasyonunda görev alan RIPLET (RNF135) enzimi ile gerçekleşen ubiquitilasyondur. RIPLET ubiquitin E3 ligaz RIG-I'in karboksil terminalinde bulunan K849 ve K851 amino asitlerini K63 tipi ubiquitilasyona uğratmaktadır (Oshiumi vd., 2010). İkinci modifikasyon ise TRIM25 vasıtası ile gerçekleşen K63 tipi ubiquitilasyondur (Oshiumi vd., 2009). Bu iki modifikasyon da RIG-I aracılıklı viral savunma sisteminin harekete geçmesi ve sinyalin bir alt basamağa iletilmesi için gerekli modifikasyonlar olmaları nedeni ile pozitif regülasyon (upregulation) olarak sınıflandırılır (Oshiumi vd., 2012).

5.1.2.2. *RNF125 ile negatif regülasyonu*

RIG-I sinyal iletiminin harekete geçirilmesinde olduğu gibi baskılanmasında da (negatif regülasyon/down-regulation) ubiquitilasyon görev almaktadır. UbcH5 E2 ve RNF125 E3 enzimleri aracılığı ile RIG-I K48 tipi poli-ubiquitilasyona uğratılmaktadır (Arimoto vd., 2007). Bu ubiquitilasyon sonrası RIG-I proteinin sinyal iletimini gerçekleştirmediği, degradasyona uğratılmak üzere proteozoma yönlendirildiği belirlenmiştir. Hem RIG-I hem de RNF125 ve UbcH5 proteinlerinin ekspresyonlarının interferonların varlığında arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu artışların zamanlamaları sistemin ne kadar muazzam bir şekilde düzenleyici görev yaptığını göstermektedir. Viral enfeksiyon sonrası aktive olan interferonlar tarafından ilk 12-24 saat içerisinde RIG-I proteinin ekspresyonunda çok büyük bir artış olduğu belirlenmiştir (Arimoto vd., 2007). Buna rağmen UbcH5 ve RNF125 proteinlerinin ekspresyonlarındaki artış daha uzun süre alıp 24-36 saat sonra gerçekleşmektedir (Arimoto vd., 2007). Böylece bu ekspresyonel düzenleme sayesinde RIG-I proteinin görevini gerçekleştirmesine süre tanınmakta ve 24 saat sonrasında da degradasyonu gerçekleştirilmektedir (Inn vd., 2011).

5.1.2.3. Fosforilasyon ile negatif regülasyonu

RIG-I CARDS üzerinde bulunan K172 amino asidine çok yakın bir bölgede bulunan T170 amino asidinin fosforilasyona uğraması sonucu RIG-I'nin anti-viral işlevinin baskılandığı ortaya çıkarılmıştır (Gack vd., 2010). K172'nin K63 tipi poli-ubiquitilasyona uğratılmasının sistemin işleyişi için zorunlu bir basamak olduğu düşünüldüğünde sadece 1 amino asit sonrası yer alan Thr170'in fosforilasyona uğratılmasının ubiquitilasyonu baskılaması şaşırtıcı bir sonuç değildir. RIG-I T170'in fosforilasyonu sonrası TRIM25 enziminin ubiquitilasyon reaksiyonunu katalizleyebilmek için K172'ye gerekli mesafede yaklaşamadığı ve bu nedenle de fosforilasyona uğramış proteinin K63 ubiquitilasyonun baskılandığı düşünülmektedir. Bunun ilaveten RIG-I CARDS üzerinde yer alan S8'in fosforilasyona uğraması sonucu da RIG-I'nin TRIM25 ile etkileşemediği belirlenmiştir (Nistal-Villan vd., 2010).

5.1.2.4. ISGlasyon ile negatif regülasyonu

RIG-I proteinin regülasyonunda bir başka düzenleyici post translasyonel modifikasyon da ISGlasyondur. RIG-I ISGlasyon ile negatif regülasyona uğramaktadır. ISGlasyona uğramış olan RIG-I in sinyal iletimini gerçekleştiremediği bilinmektedir. Ancak negatif regülasyonun mekanizması tam olarak bilinmemektedir ve bu hususta farklı hipotezler ortaya atılmıştır: İlk hipoteze göre, RIG-I'nin ISGlasyona uğratılması; RNF125 aracılığı ile K48 tipi ubiquitilasyonu ve degradasyona yönlendirilmesi için gerekli bir faktördür (Kim M. J. vd., 2008). İkinci hipoteze göre ise, ISG15 kendi E2 enzimi olan UbcH8 ile etkileşimi vasıtası ile dolaylı olarak RIG-I aktivitesini regüle etmektedir. RNF125 RIG-I'yi UbcH5 E2 enzimi ile ubiquitilasyona uğratmaktadır. Ancak RNF125'in UbcH8'e olan afinitesi UbcH5'e olan afinitesinden daha yüksektir ve dolayısı ile UbcH8 varlığında UbcH5 yerine UbcH8 ile etkileşir. Ortamdaki ISG15 düzeyinin yükselmesi sonucunda UbcH8 RNF125'i serbest bırakarak ISG15 ile etkileşmektedir. Böylece serbest kalan RNF125, UbcH5 ile etkileşerek RIG-I i ubiquitilasyona uğratmaktadır (Arimoto vd., 2008).

5.1.2.5. SUMOlasyon ile pozitif regülasyonu

RIG-I proteini üzerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlardan bir diğeri de SUMOlasyondur (Ubiquitin benzeri küçük düzenleyici (Small Ubiquitin like modifier)). RIG-I Ubc9 E2 enzimi yardımı ile SUMO-I SUMOlasyonuna uğramaktadır. RIG-I'in SUMOlasyona uğraması ile doğru orantılı olarak K63 türü ubiquitilasyonunda da artış olmaktadır (Mi vd., 2010). Bu artış doğrultusunda da sinyal iletimi güçlenmektedir.

5.2. RIG-I Sinyal Sisteminin Influenza A Virüsü Tarafından Baskılanması

Konakçı organizmaların bağışık sistemlerinin viral enfeksiyonlara karşı birçok mekanizma geliştirdiği bilinmektedir. Ancak gün geçtikçe viral organizmaların da konakçı organizmaların savunma mekanizmasını etkisiz kılmaya yönelik mekanizmalar geliştirdiği ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalardan biri de Influenza A virüsü tarafından RIG-I sinyal sistemini etkisiz kılmaya yönelik olarak geliştirilmiştir (Gack vd., 2009).

RIG-I proteininin K63 tipi poli-ubiquitilasyonu için CARDs domaini ile TRIM25'in SPRY domaini etkileşmektedir. Ancak Influenza A virüsünün sahip olduğu Yapısal olmayan protein-1 (non-structured protein-1 (NS1)) varlığında bu etkileşimin gerçekleşmediği gösterilmiştir. NS1 TRIM25'in coiled coil domain (CCD) ine bağlanır. NS1'in TRIM25 CCD'ye bağlanması sonucunda TRIM25'in RIG-I ile etkileşmesi engellenir (Gack vd., 2009). Bu engelleme nedeni ile de RIG-I'i ubiquitilasyona uğraması gerçekleşmemektedir.

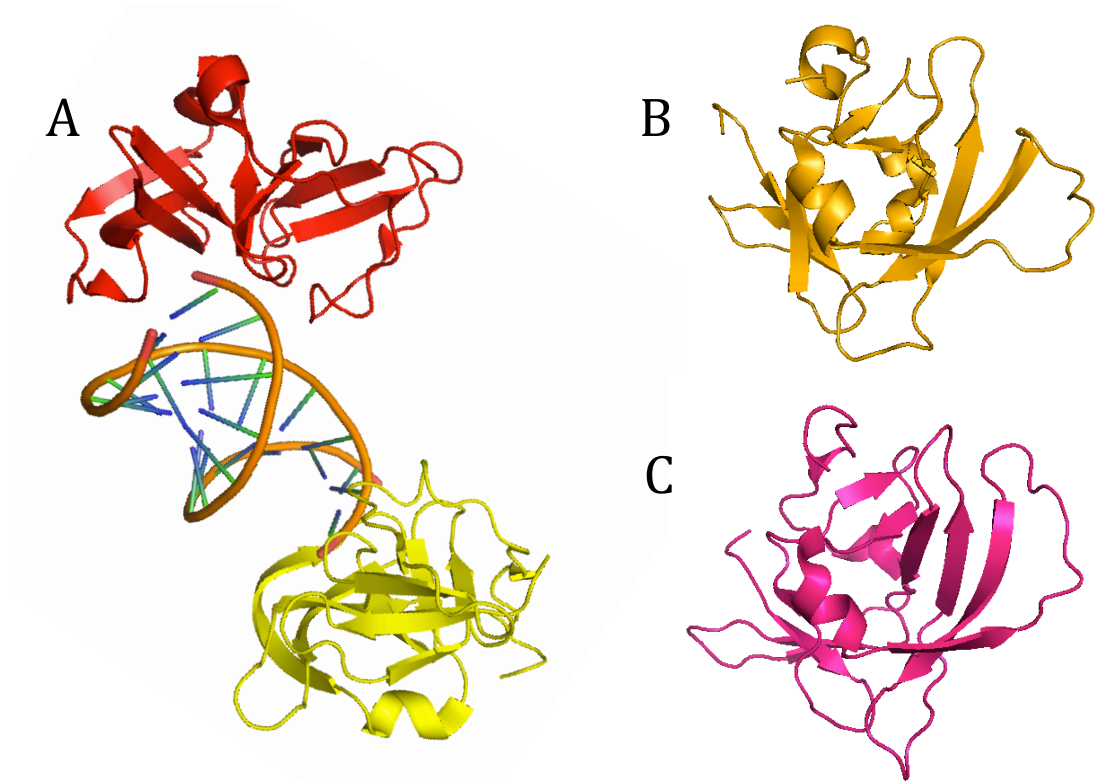
5.3. Yapısal Yönden RIG-I Sinyal Mekanizması

Farklı organizmaların RIG-I proteinleri üzerinde çeşitli yapısal çalışmalar olmasına rağmen henüz insan RIG-I'i ile ilgili yapısal çalışmalar sınırlıdır. İnsan RIG-I RNA helikaz ve karboksil terminal domainlerinin yapıları literatürde mevcuttur ancak CARDs'ın yapısı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çok çeşitli post-

translasyonel modifikasyonlara maruz kalan bu domainin yapı fonksiyon ilişkilerinin belirlenmesi önemlidir.

5.3.1. *Homo sapiens* (İnsan) RIG-I CTD

İnsan RIG-I karboksil terminal domaininin (CTD) serbest halde belirlenmiş bir adet NMR ve iki adet kristal yapısı bulunmaktadır(Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Hs-RIG-I CTD'nin NMR ve X-ray yapıları A)Hs-RIG-I CTD- 12 bp-dsRNA kompleksi, B) Hs-RIG-I CTD NMR yapısı, C) Hs-RIG-I CTD X-ray yapısı (PDB:3LRR, 2RMJ, 2QFB)

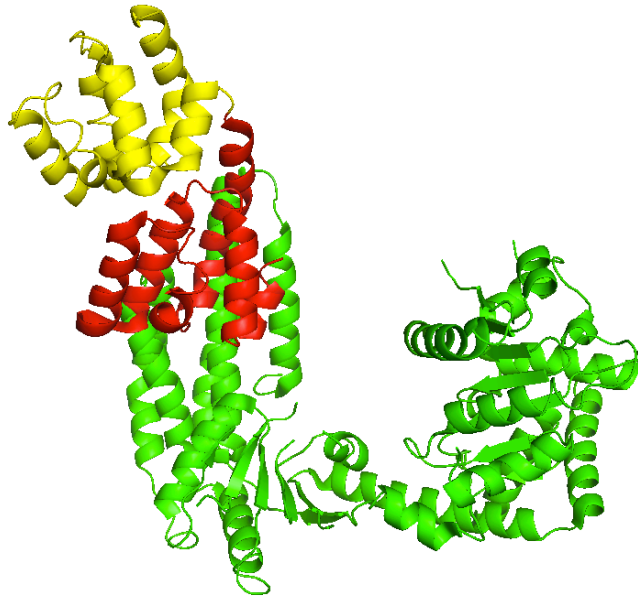
Bu yapısal çalışmalar sayesinde hem proteinin CT domainin RNA'ya hangi bölgesinden bağlandığı hem de bu etkileşimlerde önemli olan amino asitler belirlenmiştir. RIG-I'in regülatör domainin yapısı ise 2008 yılında belirlenmiştir (Şekil 5.3) (Cui vd., 2008). Literatürde CARDS ile ilgili yapısal bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 5.3. Hs-RIG-I RD'inin X-ray yapısı (PDB:2QFD)

5.3.2. *Anas platyrhynchos* (Ördek) RIG-I

Anas platyrhynchos (ördek) RIG-I proteinin X-ışınları difraksiyonu yöntemi ile belirlenmiş olan yapısı mevcuttur (Kowalinski vd., 2011). Bu çalışmada Hs-RIG-I ile yapılan denemelerde proteinin kararsızlığı nedeni ile yapısı ile ilgili bilgiler elde edilemediği vurgulanmıştır.



Şekil 5.4. Ap-RIG-I, (CARD1:Sarı, Card2:Kirmizi ve proteinin domainleri yeşil ile işaretlidir.

(PDB:4A2W)

Bu yapıda CARDS net bir şekilde gözlenebilse de proteinlerin sahip olduğu organizmalar arasında dizisel farklılıklar nedeni ile Hs-RIG-I proteinin CARDS'ın yapısının aydınlatılması önemlidir (Şekil 5.4).

Bu çalışmada ise; birçok farklı post-traslasyonel modifikasyonlara uğrayan Hs-RIG-I proteinin Cards bölgesinin, bu bölge ile etkileşerek bölgeyi K63 tipi ubiquitilasyona uğratan TRIM25 ubiquitin E3 enziminin SPRY domainin ve yine CARDS bölgesini K48 tipi ubiquitilasyona uğratan RNF125 ubiquitin E3 enziminin bakteriyel ekspresyon sistemlerine klonlanmaları ve NMR ile yapılacak yapısal çalışmalar için uygunlukları test edildi.

6. MALZEME VE YÖNTEM

6.1. Malzemeler

6.1.1. Bakteri suşları

6.1.1.1. *Escherichia coli* saklama suşları

Klonlama sonrasında ve uzun süreli saklamalarda tüm plazmitler Novablue ve/veya DH5 α saklama suşlarında saklandı. Elde edilen rekombinant plazmitler çok hassas oldukları için transformasyon verimliliği ve plasmit kararlılığı önemlidir. Saklama suşlarının Çizelge 6.1 de genotipleri verilmiş olup bu suşlar yüksek transformasyon verimliliğine (1×10^8 cfu/ μ g) sahip olup plasmidlerin kararlılığına yardımcı olmaktadır.

Çizelge 6.1. *Escherichia coli* saklama suşlarının genotipleri

Bakteri suşu	Genotip
NovaBlue	endA1 hsdR17 (rK12 ⁻ mK12 ⁺)supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z M15 ::Tn10] (Tet ^R)
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

6.1.1.2. *Escherichia coli* ekspresyon suşları

Tüm hedef protein genleri pQE30 ekspresyon vektörünün varyantlarına klonlandı. Bu vektörlerde yüksek düzeyde rekombinant protein ekspresyonuna imkan veren T5 promotor sistemi bulunmaktadır. pREP4 plasmidi rekombinant protein ekspresyonunun hücre yoğunluğu istenen düzeye ulaşana kadar baskılanmasına, sıkı bir şekilde kontrollü olarak gerçekleşmesine ve aynı zamanda sitotoksik rekombinant plazmitlerin nispeten kararlı kılınmasına imkan verir. Bu çalışmada E. Coli K12 suşundan türetilmiş olan ve pREP4 plazmiti içeren M15[pREP4] ve SG13009[pREP4] ekspresyon suşları kullanıldı. Suşların genotipleri Çizelge 6.2 de

verilmiştir.

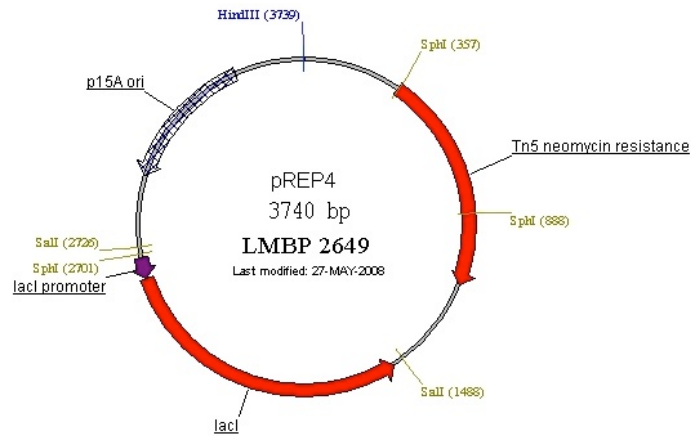
Çizelge 6.2. *Escherichia coli* ekspresyon suşlarının genotipleri

Bakteri suşu	Genotip
SG13009[pREP4]	NalS, StrS, RifS, Thi ⁺ , Lac ⁺ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁺ , F ⁺ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺
M15[pREP4]	NalS, StrS, RifS, Thi ⁺ , Lac ⁺ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁺ , F ⁺ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺

6.1.2. Plasmid vektörleri

6.1.2.1. *pREP4*

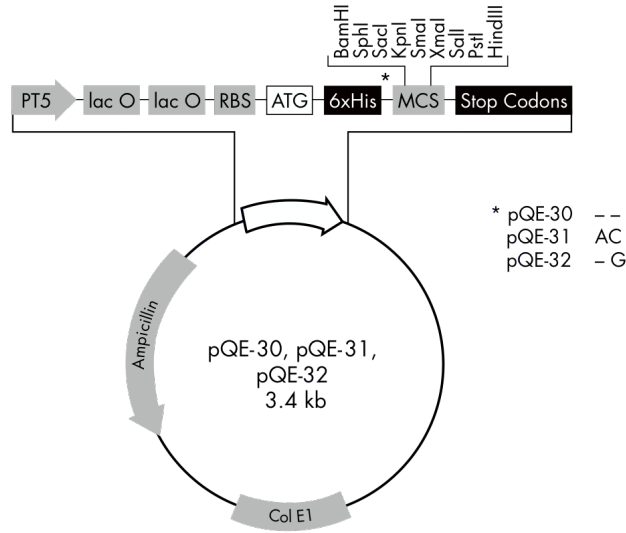
pREP4 vektörü üzerinde *lacI* ve kanamisin direnç genlerini taşıyan 2649 bp uzunluğundadır bir plazmittir (Şekil 6.1). *lacI* geni laktoz yokluğunda lac baskılayıcı (lac represör) proteini ekspres eder. Bu protein ekspresyon plazmiti üzerinde bulunan Lac operonuna bağlanarak rekombinant protein ekspresyonunu sıkı bir şekilde baskılar. Ortama beta galoktozidaz tarafından hidrolizlenemeyen bir laktoz analogu olan İzopropil β -D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) ilave edildiğinde IPTG, lac baskılayıcı proteine bağlanarak onu etkisiz hale getirir. Bu sayede serbest kalan lac promoter bölgesi bu bölgenin kontrolü altında olan recombinant genin ekspresyonunu gerçekleştirir. Bu çalışmada kullanılmış olan konak hücrelerde pREP4 plazmiti bulunmaktadır.



Şekil 6.1. Prep 4 plazmitinin gen haritası

6.1.2.2. pQE30

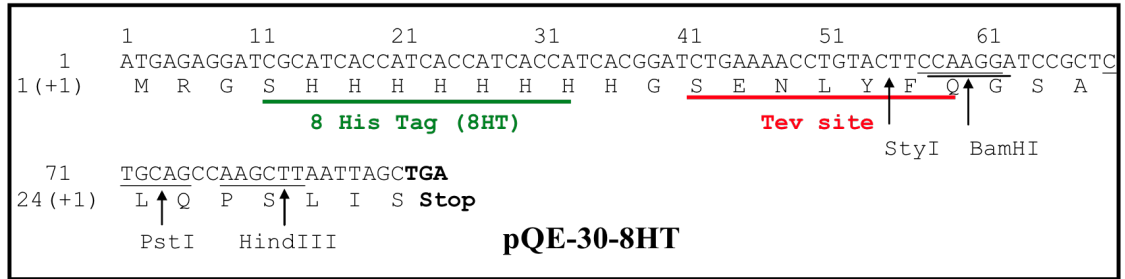
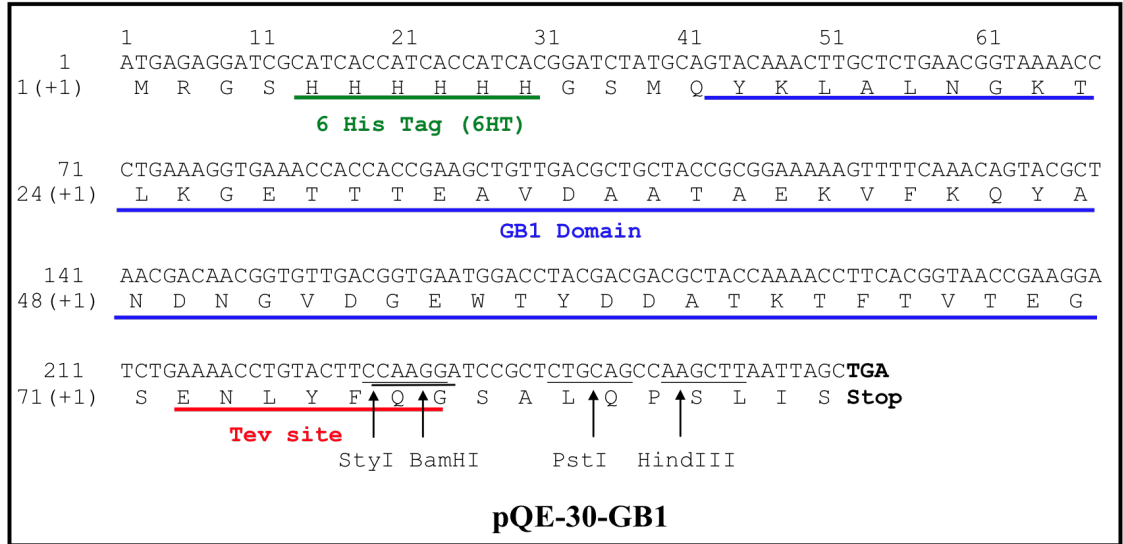
Hedef genlerin ekspresyonunda pQE-30 (Qiagen) vektörü kullanılmıştır. pQE-30 plazmit haritası şekil 6.2’de verilmiştir. pQE-30 plazmiti yaklaşık 3400 baz çifti büyüklüğünde halkasal bir vektör olup, Col E1 replikasyon bölgesine sahiptir.



Şekil 6.2. pQE30 plazmitinin gen haritası

Col E1 replikasyon bölgesi içeren plazmit varyantları hem ürettikleri Colicin E1 sayesinde diğer *E. Coli* suşlarının üremesini baskılar, hem de yüksek replikasyon özellikleri sayesinde hücre başına yüksek kopya sayısına ulaşarak hedef genin yüksek miktarda ekspresyonuna imkan verir. Bunun yanında, içerdiği ampisilin rezistans geni sayesinde bu plazmiti içeren *E. Coli* hücrelerinin ampisilin antibiyotiği içeren ortamda yaşayabilmesine imkan sağlamaktadır.

Bu çalışmada protein ekspresyon vektörü olarak modifiye edilmiş pQE-30 vektör varyantları olan pQE30-6Histag-GB1 (pQE30-GB1) ve pQE30-8histag (pQE30-8HT) vektörleri kullanıldı. Bu vektörlerin klonlama bölgeleri şekil 6.3’de gösterilmiştir.



Şekil 6.3.pQE30-GB1 ve pQE30-8histag klonlama bölgeleri

6.1.3. Klonlanan genlerin ve ekspres edilen proteinlerin dizileri

6.1.3.1. İnsan Ring Finger Protein 125 (RNF125)

atg ggt agc gtt ctg agc acc gat agc ggt aaa agc gca ccg gca agc gca acc gca cgt
M G S V L S T D S G K S A P A S A T A R
gca ctg gaa cgt cgt cgt gat ccg gaa ctg ccg gtt acc agc ttt gat tgt gca gtt tgt
A L E R R R D P E L P V T S F D C A V C
ctg gaa gtt ctg cat cag ccg gtt cgt acc cgt tgt ggt cat gtt ttt tgt cgt agc tgt
L E V L H Q P V R T R C G H V F C R S C
att gca acc agc ctg aaa aat aat aaa tgg acc tgt ccg tat tgc cgt gca tat ctg gcg
I A T S L K N N K W T C P Y C R A Y L A
agc gaa ggt gtt ccg gca acc gat gtt gca aaa cgt atg aaa agc gag tac aaa aat tgt
S E G V P A T D V A K R M K S E Y K N C
gcc gaa tgt gat acc ctg gtt tgt ctg agc gaa atg cgt gca cat att cgt acc tgc cag
A E C D T L V C L S E M R A H I R T C Q

aaa tat atc gat aaa tat ggt ccg ctg caa gaa ctg gaa gaa acc gca gca cgt tgt gtt
 K Y I D K Y G P L Q E L E E T A A R C V
 tgt ccg ttt tgt cag cgt gaa ctg tat gaa gca gca cgt tgt gtt tgt ccg ttt tgt cag
 C P F C Q R E L Y E A A R C V C P F C Q
 cgt gaa ctg tat gaa gat agc ctg ctg gat cat tgt att acc cat cat cgt agc gaa cgt
 R E L Y E D S L L D H C I T H H R S E R
 cgt ccg gtt ttt tgt ccg ctg tgt cgt ctg att ccg gat gaa aat ccg agc agc ttt agc
 R P V F C P L C R L I P D E N P S S F S
 ggt agc ctg att cgt cat ctg caa gtt agc cat acc ctg ttt tat gat gat ttc atc gat
 G S L I R H L Q V S H T L F Y D D F I D
 ttt aat att att gaa gag gcc ctg att cgt cgt gtt ctg gat cgt agt ctg ctg gaa tat
 F N I I E E A L I R R V L D R S L L E Y
 gtg aat cat agc aac acc acc taa
 V N H S N T T *

6.1.3.2. Retinoik asit tarafından aktive edilen gen-1 Caspase Activation and Recruitment Domainleri (RIG-1 CARDs)

atg acc acc gaa cag cgt cgt agc ctg caa gca ttt cag gat tat att cgt aaa acc ctg
 M T T E Q R R S L Q A F Q D Y I R K T L
 gac ccg acc tat att ctg agc tat atg gca ccg tgg ttt cgt gaa gaa gaa gtt cag tat
 D P T Y I L S Y M A P W F R E E E V Q Y
 att cag gcc gaa aaa aat aat aaa ggt ccg atg gaa gca gca acc ctg ttt ctg aaa ttt
 I Q A E K N N K G P M E A A T L F L K F
 ctg ctg gaa ctg caa gaa gaa ggt tgg ttt cgc ggt ttt ctg gat gca ctg gat cat gca
 L L E L Q E E G W F R G F L D A L D H A
 ggt tat agc ggt ctg tat gaa gca att gaa agc tgg gat ttt aaa aaa att gaa aaa ctg
 G Y S G L Y E A I E S W D F K K I E K L
 gaa gaa tat cgc ctg ctg ctg aaa cgt ctg caa ccg gaa ttt aaa acc cgt att att ccg
 E E Y R L L L K R L Q P E F K T R I I P
 acc gat att att agc gat ctg agc gaa tgc ctg att aat cag gaa tgt gaa gaa att ctg
 T D I I S D L S E C L I N Q E C E E I L
 caa att tgt agc acc aaa ggt atg atg gca ggc gca gaa aaa ctg gtt gaa tgt ctg ctg
 Q I C S T K G M M A G A E K L V E C L L
 cgt agc gat aaa gaa aat tgg ccg aaa acc ctg aaa ctg gca ctg gaa aaa gaa cgc aat
 R S D K E N W P K T L K L A L E K E R N
 taa
 *

6.1.3.3. Tripartite motif-containing 25 SPRY domaini

atg aaa gtt ctg gaa acc ttt ctg gca aaa agc cgt ccg gaa ctg ctg gaa tat tat att

M K V L E T F L A K S R P E L L E Y Y I
aaa gtg att ctg gat tat aat acc gca cat aat aaa gtt gcc ctg agc gaa tgc tat acc
K V I L D Y N T A H N K V A L S E C Y T
gtt gca agc gtt gca gaa atg ccg cag aat tat cgt ccg cat ccg cag cgt ttt acc tat
V A S V A E M P Q N Y R P H P Q R F T Y
tgt agc cag gtt ctg ggt ctg cat tgc tat aaa aaa ggc att cat tat tgg gaa gtg gaa
C S Q V L G L H C Y K K G I H Y W E V E
ctg caa aaa aat aat ttt tgc ggt gtg ggt att tgc tat ggt agc atg aat cgt cag ggt
L Q K N N F C G V G I C Y G S M N R Q G
ccg gaa agc cgt ctg ggt cgt aat agc gca agc tgg tgt gtt gaa tgg ttt aat acc aaa
P E S R L G R N S A S W C V E W F N T K
att agc gcc tgg cat aat aat gtg gaa aaa acc ctg ccg agc acc aaa gca acc cgt gtt
I S A W H N N V E K T L P S T K A T R V
ggt gtt ctg ctg aat tgt gat cat ggc ttt gtg att ttt ttt gcc gtt gcc gat aaa gtg
G V L L N C D H G F V I F F A V A D K V
cat ctg atg tat aaa ttt cgc gtg gat ttt acc gaa gca ctg tat ccg gca ttt tgg gtt
H L M Y K F R V D F T E A L Y P A F W V
ttt agt gcc ggt gca acc ctg agc att tgt agc ccg aaa taa
F S A G A T L S I C S P K *

6.1.4. Oligonükleotid primerler

6.1.4.1. Hedef genlerin izolasyonunda kullanılan primerler

Çizelge 6.3. Hedef genlerin izolasyonunda kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi	Tm değeri
HsRNF125-BamHI	5' GCGCGCGGATCCATGGGTAG 3'	70.71 °C
HsRNF125-HindIII	5' GCGCGCAAGCTTTTAGGTGGTG 3'	68.57 °C
HsTrim25spry-BamHI	5' GCGCGCGGATCCATGAAAG 3'	67.87 °C
HsTrim25spry-HindIII	5' GCGCGCAAGCTTTTATTTTCGG 3'	66.52 °C
RIGI-CARDS- BamHI	5' GCGCGCGGATCCATGACCAC 3'	72.01 °C
RIGI-CARDS- HindIII	5' GCGCGCAAGCTTTTAATTGCGTTC 3'	69.78 °C

6.1.4.2. Plasmid DNA sekans analizi için kullanılan primerler

Çizelge 6.4. Plasmid DNA sekans analizi için kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi
Modifiye edilmiş PQE30 promoter	5' GTGAGCGGATAACAATTA 3'
Modifiye edilmiş PQE30 terminator	5' GCCCGGCGGAACCGAGC 3'
pQE-F	5' CCCGAAAAGTGCCACCTG 3'
pQE-R	5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3'

6.1.5. Kimyasallar ve enzimler

Tüm çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve enzimler en az biokimyasal saflık derecesinde olup EK A da verilmiştir.

6.1.6. Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar

Tüm çalışmalarda kullanılan Çözelti ve Tamponlar yüksek saflıkta kimyasallar kullanılarak hazırlanmış olup EK B de verilmiştir.

6.1.7. Kullanılan makine ve teçhizat

Çalışmalar kullanılan tüm makine ve teçhizatların kalibrasyonları düzenli olarak kontrol edilmiş olup çalışmada kullanılan makine ve teçhizat EK C de verilmiştir.

6.2. Yöntemler

6.2.1. Hedef proteinlerin genlerinin sentezi

Çalışmalarda kullanılan RIG-I-CARDS, TRIM25-SPRY domaini, ve RNF125 proteinlerini kodlayan genler GENEART firmasına sentezletildi. Genlerin dizileri *E.Coli* kodon kullanımına göre optimize edildi ve pMA vektörü içerisine klonlanmış şekilde teslim alındı.

6.2.2. Hedef genlerin PQE30 vektörü içerisine klonlanması

6.2.2.1. Genlerin izolasyonu

pMA bir ekspresyon vektörü olmadığından bu vektör içerisindeki genler modifiye pQE30 vektörleri içerisine aktarıldı. Bu amaçla hedef gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR yönteminde hedef genlerin amplifikasyonu için kullanılan primerler Alpha DNA (Montreal, QC Kanada) şirketine sentezlettirildi

(Çizelge 6.3). PCR reaksiyon karışımları Çizelge 6.5’de de gösterilmiştir. PCR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra reaksiyonlar PCR cihazı ile gerçekleştirildi.

Çizelge 6.5. PCR reaksiyon karışımları

	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4	Reaksiyon 5	Reaksiyon 6
Kalıp DNA (100 ng/μL)						
pMA-Trim25	2 μL	2 μL	-	-	-	-
pMA-RNF125	-	-	2 μL	2 μL	-	-
pMA-RNF125	-	-	-	-	2 μL	2 μL
Taq polimeraz (1 ng/μL)	1 μL	2 μL	1 μL	2 μL	1 μL	2 μL
10xTaq Buffer	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
MgCl ₂ (25 mM)	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
dNTP karışımı (10 mM)	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
dd.H ₂ O	31 μL	30 μL	31 μL	30 μL	31 μL	30 μL
Primerler (50 pmol/μL)						
Trim25-BamHI	1 μL	1 μL	-	-	-	-
Trim25-HindIII	1 μL	1 μL	-	-	-	-
RNF125-BamHI	-	-	1 μL	1 μL	-	-
RNF125-HindIII	-	-	1 μL	1 μL	-	-
RIG-I Cards-BamHI	-	-	-	-	1 μL	1 μL
RIG-I Cards-HindIII	-	-	-	-	1 μL	1 μL
Toplam	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

PCR cihazında reaksiyonlarının gerçekleşmesi için kullanılan reaksiyon basamakları Çizelge 6.6’da verilmiştir. PCR reaksiyonu sonucu çoğaltılan genler %1,5lik agaroz jelde kontrol edildi. Çoğaltılan hedef genlerin bir sonraki basamak olan kesme enzimleri yardımı ile kesilmesi için saf ve reaksiyon bileşenlerinden arındırılmış olması gerekir. Bu nedenle PCR reaksiyonları PCR temizleme kiti yardımı ile saflaştırıldı.

Çizelge 6.6. PCR reaksiyon basamakları

Basamak numarası	Tekrar sayısı	Sıcaklık	Süre
1. basamak	1x	95 °C	5 dk
2. basamak	30x	95 °C	45 s
		52 °C	1 dk
		72 °C	1 dk
3. basamak	1x	72 °C	10 dk
4. basamak	1x	4 °C	∞

6.2.2.2. Restriksiyon enzimleri ile yapışkan uçların eldesi

İki farklı DNA dizisinin bir araya getirilmesi için birbiri ile tamamlayıcı (komplementer) yapışkan uçlar içermeleri gerekmektedir. Bu yapışkan uçların elde edilmesi için spesifik DNA dizilerini tanıyan ve kesen tip II restriksiyon enzimleri kullanılır. Kesme reaksiyonları karışımı çizelge 6.7’de verilmiştir. Tüm genler ve hedef plazmidler için BamHI/HindIII kesme enzim çifti kullanıldı. Kesme reaksiyonları 16 saat 37 °C’de inkübasyona tabi tutuldu.

Çizelge 6.7. Hedef genler ve plazmidlerin BamHI/HindIII ile kesme reaksiyon karışımı

10x Buffer R	2 µl
BamHI (10 U/µl)	1 µl
HindIII (10 U/µl)	1 µl
Plazmit/gen (40-120 ng/µl)	7 µl
dd.H ₂ O	9 µl
Toplam	20 µl

İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımları % 1,5lik agaroz jelde yürütüldü. UV ışık yardımı ile görüntülendi ve DNA parçaları jelden bisturi yardımı ile kesilerek izole edildi. Kesilen jel bölgelerinden DNA parçaları DNA jel ekstraksiyon kiti kullanılarak saflaştırıldı.

6.2.2.3. T4 DNA ligaz reaksiyonu

Birbirine komplementer yapışkan uçlar içerecek şekilde hazırlanan genler ve

plasmidler T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak birleştirildi. Ligasyon reaksiyonları çizelge 6.8’de belirtildiği gibi hazırlanarak 16 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 6.8. T4 DNA ligaz ile ligasyon reaksiyon karışımları

	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2	Reaksiyon 3	Reaksiyon 4	Reaksiyon 5	Reaksiyon 6
a-PQE-GBI(50 ng/μL)	2 μl	-	2 μl	-	2 μl	-
c-PQE-8HT(40 ng/μL)	-	2 μl	-	2 μl	-	2 μl
2-RNF125(60 ng/μL)	5 μl	5 μl	-	-	-	-
3-Trim25 spry(45 ng/μL)	-	-	5 μl	5 μl	-	-
4-RIG-I cards(50 ng/μL)	-	-	-	-	5 μl	5 μl
10x Ligaz buffer	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
ATP (10 mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
T4 DNA ligaz (1 U/μL)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl

Ligasyon reaksiyonu sonucunda oluşan recombinant plazmitler, transformasyon yöntemi ile kompetant Novablue hücreleri içerisine aktarıldı. Transformasyon sonrası 100 μg/ml ampicilin içeren Luria-Bertani agar katı besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekilen hücreler 1 gece saat 37 °C’de inkübe edildi.

6.2.2.4. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Bakteriyel plazmitlerin saklanması ve protein üretiminde kullanılan bakteriyel hücrelerin hücre duvarları kimyasal yoldan zayıflatılarak kompetent (plazmitler için geçirgen) hale getirildi. Bu işlem için öncelikle bakteriyel suş – 80 °C gliserol stokundan öze yardımı ile seçici antibiyotikleri içeren LB-Agar besiyerlerine ekildi ve 1 gece 37 °C’de inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrası petriden tek bir koloni alınarak seçici antibiyotikleri içeren 10 ml LB sıvı besi yeri içerisine aktarıldı. Hücreler 250 rpm 37 °C’de 1 gece büyütüldü. Ertesi gün gece kültüründen 0.5 μL alınarak 50 mL LB içerisine eklendi. Yeni bakteri kültürü OD₆₀₀ 0.3-0.4 ye kadar büyütüldü ve 10 dakika 1500 g, 4 °C’de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek pellet 5 ml soğuk 1x TSS içerisinde yeniden çözüldü. Ardından buz üzerindeki 1,5 ml’lik tüpler içerisine 200’er μL eklenerek -80 °C’ye kaldırıldı.

6.2.2.5. Transformasyon

Transformasyon işleminde önceden hazırlanmış olan 200 µL'lik kompetent hücreler – 80 °C'den çıkarıldı. Buz üzerinde 20 dakika bekletildi. 1 ng plasmid (ligasyon sonrası işlemlerde ise ligasyon reaksiyon karışımının tamamı) buz üzerindeki kompetent hücreler ile karıştırıldı. Sonrasında karışım 20 dakika yeniden buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 42 °C kuru blok ısıtıcı üzerine yerleştirilen örnekler 90 dakika ısı şokuna tabi tutuldu ve ardından yeniden birkaç saniye buz üzerinde bekletildi. Bu işlem sonrasında her tüp içerisine 750 µl LB sıvı besiyeri eklendi ve hücreler 37 °C çalkalamalı inkübatörde 1 saat çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler 3000 devir/dakika hızda 3 dakika santrifüj edildi ve dekantasyon işlemi ile sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çöken hücreler dekantasyon sonrası kalan sıvı kısım içerisinde yeniden süspansiyon edildi ve bu süspansiyondan alınan 20 µL örnek LB-agar katı besiyeri üzerine drigaski spatülü yardımıyla ekildi. Ekim sonrası petripler 37 °C'de 1 gece inkübe edildi.

6.2.2.6. Kolonilerin taranması ve DNA dizi analizi

Transformasyon işlemi sonrası petriplerde oluşan kolonilerin taşıdıkları plazmitlerin hedef geni içerip içermediği gen spesifik koloni PCR yöntemi ile belirlendi. Bunun için LB-agar petriplerde oluşan tek koloniler alınarak 25 µl lik nükleaz-free su içerisinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu su banyosunda 5 dk kaynatılıp 16000×g 'de santrifüjlendi. Süpernatandan alınan 5 µL, koloni PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

Koloni PCR'da amplifikasyon gen spesifik primerler (genlerin pQE-30 vektörlerinden amplifikasyonunda kullanılan primerler) ile gerçekleştirilmiştir. Gen spesifik koloni PCR reaksiyonları çizelge 6.9'da yer almaktadır. Reaksiyonlar sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek kontrolü yapıldı.

Çizelge 6.9. Koloni PCR bileşenleri

Koloni PCR bileşenleri	Miktar (µL)
Kalıp DNA	5
Gen spesifik primer II (50 pmol/µl)	1
Gen spesifik primer I (50 pmol/µl)	1
10x Taq Buffer	2
25mM MgCl ₂	1,2
dNTP karışımı (her birinden 2mM)	0,5
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,5
dd H ₂ O	8,8
Toplam	20

Gen spesifik primerler ile koloni PCR sonucunda hedef gen için pozitif bant veren koloniler, 10 mL lik LB+amp besiyerlerinin inokülasyonunda kullanıldı. Bu sıvı besiyerleri, 1 gece 37 derecede 250 rpm de inkübe edildi. Ertesi gün, santrifüj yolu ile hücre pastaları ayrıldı ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitler dizi analizi için Macrogen, Kore firmasına gönderildi ve dizi analizleri kontrol edildi.

6.2.2.7. Agaroz jel elektroforezi (%1,5lik)

1,5 gram agaroz 100 ml 1 × Tris-asetik asit-EDTA çözeltisi (TAE) içerisine eklendi ve agaroz tamamen çözününceye kadar mikro dalga fırında kaynatıldı. Karışım bir süre soğutulduktan sonra içerisine 10 mg/mL ethidium bromur çözeltisinden 5 µL eklendi. Karışım jel yatağı üzerine dökülerek taraklar yerleştirildi ve jel donmaya bırakıldı. Donmuş jel yürütme tankı içerisine yerleştirildi ve taraklar çıkarılarak yükleme kuyuları hazır hale getirildi.

Jele yüklenecek örneklerin kuyu içerisinde çökmesini sağlamak için 6× yükleme boyası eklendi ve örnekler kuyulara mikro pipet yardımı ile yüklendi. Bunun yanında yüklenen örneklerin boyutunu belirlemek için 1 kbp ve 100 bp boyutundaki markerlar kullanıldı. Yüklenen örnekler 70 voltta 90 dakika yürütüldü. Yürütme sonrası jel görüntüleme cihazı yardımı ile görüntülenerek fotoğraflandı.

6.2.3. Hedef proteinlerin üretimi

RIG-I CARDS, RNF125, TRIM25 SPRY domainlerini içeren modifiye PQE30-GBI plazmitleri *E. Coli* SG13009 ekspresyon suşu içerisinde transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Transformasyon sonrası 100 µg/mL ampicillin ve 25 µg/mL kanamycin içeren 10 ml LB besi yeri içerisinde tek koloni ekimi yapıldı. İnokülasyon sonrası 250 rpm 37 °C’de 1 gece inkübe edilen bakteri kültürleri ertesi gün 100 µg/mL ampicillin (amp) ve 25 µg/mL kanamycin içeren 1 litre LB besiyeri içerisinde 1:100 oranında seyreltilti ve 250 rpm 37 °C’de hücre yoğunluğu OD₆₀₀ 0,8-1,2 oluncaya kadar inkübe edildi. Trim25 SPRY ve RIG-I CARDS proteinlerinin üretiminde; bakteri kültürleri buz üzerinde 21 °C’ye kadar soğutulduktan sonra ekspresyon 200 µM IPTG ilavesi ile indüklendi. Protein ekspresyonu 250 rpm, 21 °C’de 15 saat süre boyunca gerçekleştirildi. Her 5 saat sonunda 1 mL kültür alınarak 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi ve sıvı kısım atılarak katı kısım 100 µl TBS içerisinde çözüldü. Ardından SDS-PAGE yöntemi ile protein ekspresyonu kontrol edildi.

RNF125 proteinin üretiminde ise IPTG ilavesinden önce proteinin doğal konformasyonuna katlanması için gerekli olan çinko (100 µM ZnCl₂) ortama eklendi. Bunun sonrasında ise bakteri kültürü buz üzerinde 19 °C’ye soğutulularak son konsantrasyon 200 µM olacak şekilde IPTG ilave edildi. IPTG ilavesi sonrası 250 rpm, 19 °C’de 18 saat ekspresyonu gerçekleştirildi ve her 6 saatte sonunda 1 mL kültür alınarak 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Sıvı kısım atılarak katı kısım 100 µL TBS içerisinde çözüldü. SDS-PAGE yöntemi ile protein ekspresyonu kontrol edildi.

Ekspresyon sonunda hücre kültürleri 4 °C ve 4500 rpm’de 40 dakika santrifüjlenerek saflaştırma basamağına kadar – 80°C’de saklandı.

6.2.4. Hedef proteinlerin saflaştırılması

Derin dondurucuda (– 80°C) saklanan hücre pastası buz üzerinde çödürüldükten sonra içerisinde her 1 gram hücre pastası için 1 mg/mL lizozom içeren 10 ml liziz tamponu eklendi. Ardından hücreler bu tampon içerisinde süspanse edildi. Karışım 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra hücreler sonikasyon yöntemi ile

parçalandı.

Sonikasyon sonrası karışım içerisinde 50 µL örnek alınarak 15000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası sıvı kısım başka bir 1,5 ml tüp içerisine alınarak kalan pellet üzerine 50 µL TBS eklendi. Daha sonra her iki örnek üzerine 50 µL 2× yükleme boyası eklenerek SDS-PAGE yöntemi ile üretilen proteinleri çözünür bir şekilde süpernetantta mı yoksa çökmüş bir şekilde pellet içerisinde mi bulundukları tespit edildi.

Çözünür olarak ekspres edilen proteinlerin saflaştırmasında Akta Prime Plus protein saflaştırma sistemi kullanıldı. Klonlanan tüm hedef proteinler N-terminal Histag'ı içerdiklerinden ilk olarak hücre lizizinden elde edilen süpernatant Ni^{2+} afinite kromatografisi yöntemine tabii tutuldu. Afinite kromatografisi yardımı ile ön saflaştırması gerçekleştirilen proteinlere jel kromatografisi uygulanarak ikinci basamak saflaştırma gerçekleştirildi. Çözünür olarak ekspres olmayan proteinlerin saflaştırılmasında ise diyaliz ile yeniden katlama yöntemi uygulandı (Bknz Bölüm 1 2.3.3).

6.2.5. Sodyum Dodesil Sulfat – Poli Akrilamid jel elektroforezi

6.2.5.1. Jel kasetlerinin hazırlanması

Proteinlerin ekspresyonu, saflaştırılması, konsantre edilmesi gibi tüm basamaklarda proteinlerin saflıkları ve boyutları SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edildi. Hedef proteinlerin büyüklükleri 20-40kDa arasında değiştiğinden % 16lik ayırma (çizelge 6.10) % 4 lük odaklama jeli (çizelge 6.11) kullanıldı.

SDS-PAGE yönteminde 10 x 8 x 0.46 boyutlarına sahip cam kaset sisteminden oluşan Bio-rad mini jel sistemi kullanıldı. Jel kasetleri hazırlanan % 16 lik ayırma jeli (Çizelge 6.10) ile 6 cm yüksekliğe kadar dolduruldu.

Çizelge 6.10. Ayırma Jeli (%16 lik) (6 jel için)

% 40lik Akrilamid-BisAkrilamid (29:1)	12 mL
Ayırma jeli Tamponu	11.3 mL
% 10 SDS	300 µL
dd.H ₂ O	5.2 mL
TEMED	12.5 µL
% 10 APS	600 µL

Ayırma jelinin üzeri izopropanol ile kaplanarak düz bir yüzey oluşması sağlandı ve jel donmaya bırakıldı. Ayırma jelinin donmasının ardından üzerindeki alkol dökülerek su ile yıkandı. Hazırlanan % 4 lük odaklama jeli (Çizelge 6.11) ayırma jeli üzerine dökülerek tarak yerleştirildi ve jel donmaya bırakıldı. Hazırlanan jeller kullanılana kadar 10 mL katot tamponu içerisinde + 4 °C’de saklandı.

Çizelge 6.11. Odaklama Jeli (% 4 luk) (6 jel için)

% 40lik Akrilamid-Bis-Akrilamid (29:1)	1.2 mL
Yükleme Tamponu	4.2 mL
% 10 SDS	125 µL
dd.H₂O	5.4 mL
TEMED	5 µL
% 10 APS	500 µL

6.2.5.2. Protein örneklerinin hazırlanması ve jel elektroforezi

Jele yüklenecek olan 10 µL örnek içerisine 10 µL 2× yükleme boyası eklendi. Hazırlanan örnekler 5 dakika kaynatıldı ve buz üzerinde yeniden soğutuldu. Her kasette kuyulardan en az birine 6 µL marker diğer kuyulara ise protein örneklerinden 15 µl yüklenerek 160 Voltta 80 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrası cam kaset arasından jel çıkarılarak boyama çözeltisi içerisinde 30 dakika boyandı. Ardından 1 gün boyunca boya çıkarma çözeltisinde bekletildi. Jeller görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı.

7. BULGULAR VE İRDELEME

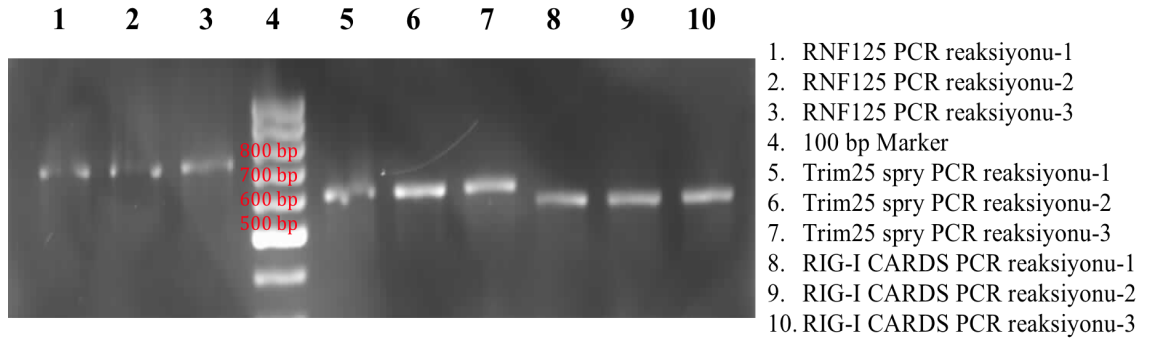
7.1. Hedef Protein Genlerinin Klonlanması

7.1.1. Hedef genlerin eldesi

GENEART firmasına sentezletilen genler *E. Coli* Novablue saklama suşu içerisine transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Bu işlem sonrasında hücreler 10 mL LB içerisinde çoğaltıldı ve ardından plazmit izolasyon kiti ile izole edildi. İzole edilen plazmitler polimeraz zincir reaksiyonu için kalıp DNA olarak kullanıldı.

7.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef genlerin çoğaltılması

PCR ile amplifiye edilen hedef genlerin boyutlarını gösteren agaroz jelinin görüntüsü Şekil 7.1’de verilmiştir.



Şekil 7.1. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak izole edilen genlerin %1.5 lik agaroz elektroforez jel görüntüsü

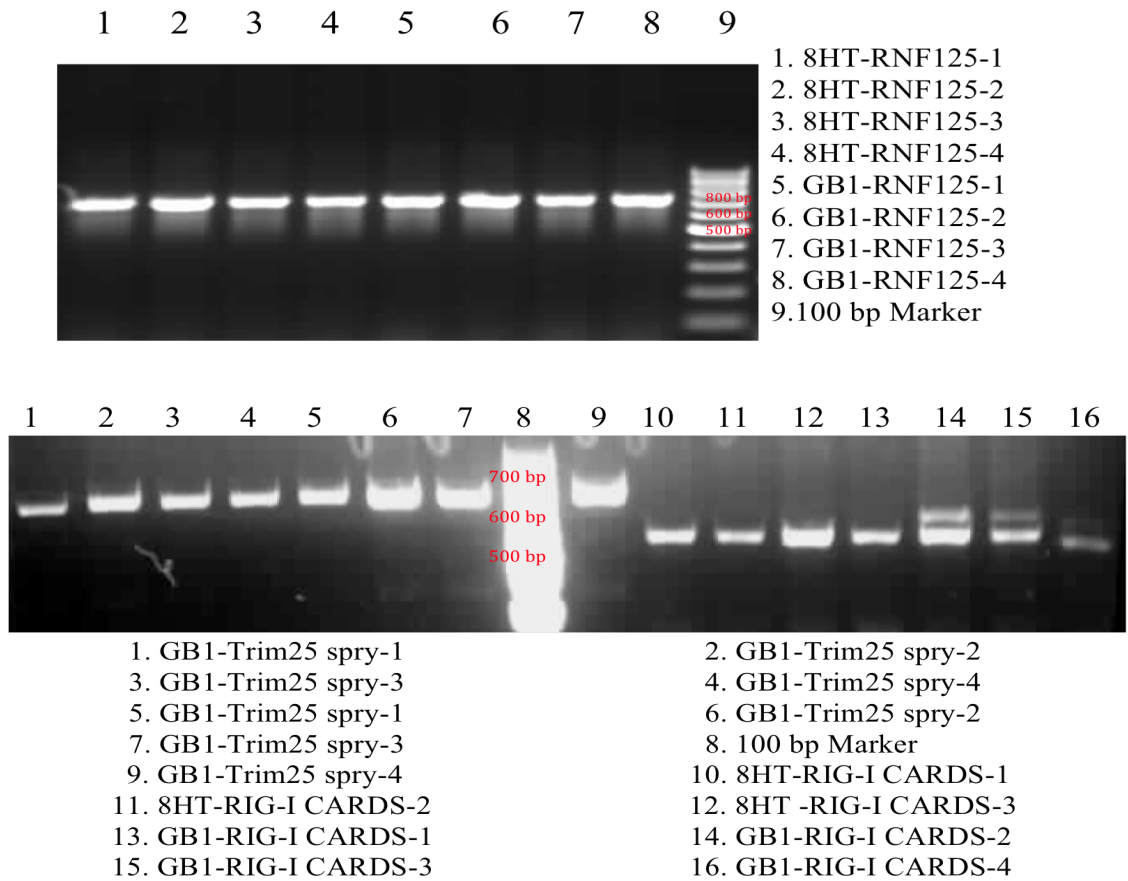
Şekil 7.1’de ki jelde gözlenen bantlar hedef proteinleri kodlayan DNA dizilerinin boyutları ile örtüşmektedir. Bu bantlar dışında bantlar gözlemlenmemesinde spesifik olmayan ürünlerin oluşmadığını göstermektedir.

7.1.3. DNA kesme enzimleri ile yapışkan uç eldesi ve T4 DNA ligaz reaksiyonu

PCR reaksiyonu sonrası BamHI/HindIII enzim çiftleri ile kesilip T4 DNA ligaz ile birleştirilen gen-plazmit çiftleri aktarıldıkları kompetant hücreler başarılı bir şekilde büyütülmüştür. Buda hedef plazmidlerin bakteriler içerisine aktarımının olumlu sonuçlandığını göstermektedir.

7.1.4. Koloni PCR ile tarama

Ligasyon reaksiyonlarının novablue hücrelerine transfromasyonu sonrası elde edilen kolonilerin içerdikleri plazmitlerin hedef genleri içerip içermedikleri koloni PCR yöntemi ile kontrol edildi. Taranan kolonilerden elde edilen PCR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jellerinin görüntüleri Şekil 7.2’de verilmiştir.



Şekil 7.2. RNF125 Trim25 ve RIG-I CARDS gen spesifik koloni PCR sonuçlarının %1.5 lik agaroz elektroforez jel görüntüleri

Şekil 7.2'deki jel görüntülerinde GB1-RIG-I CARDS-2 ve GB1-RIG-I CARDS-3 kolonileri dışında tek bant gözlemlenmektedir. Bu tek bantlar PCR reaksiyonu sonucu sadece tek bir ürünün oluştuğunu göstermektedir. Bunun yanında gözlenen bantların hedef proteinleri kodlayan gen boyutları ile örtüşmesi klonlama işlemi sonucu hedef genleri plazmidler içerisine aktarıldığını göstermektedir. GB1-RIG-I CARDS-2 ve GB1-RIG-I CARDS-3 kolonileri dışındaki kolonilerin plazmit izolasyonları gerçekleştirildi.

7.1.5. DNA sekanslama yöntemi ile DNA gen dizilerinin doğrulanması

Hedef gen dizilerini içerdiği tespit edilen kolonilerden izole edilen plazmitler Macrogen, Kore firmasına kargo yolu ile gönderilerek DNA dizi analizleri gerçekleştirildi ve sonuçlar kontrol edildi. Kontrol edilen dizi analizlerinde gen dizilerinin doğru olduğu belirlendi ve klonlama basamakları sonucunda Çizelge 7.1'deki plazmid gen çiftleri elde edilmiş oldu.

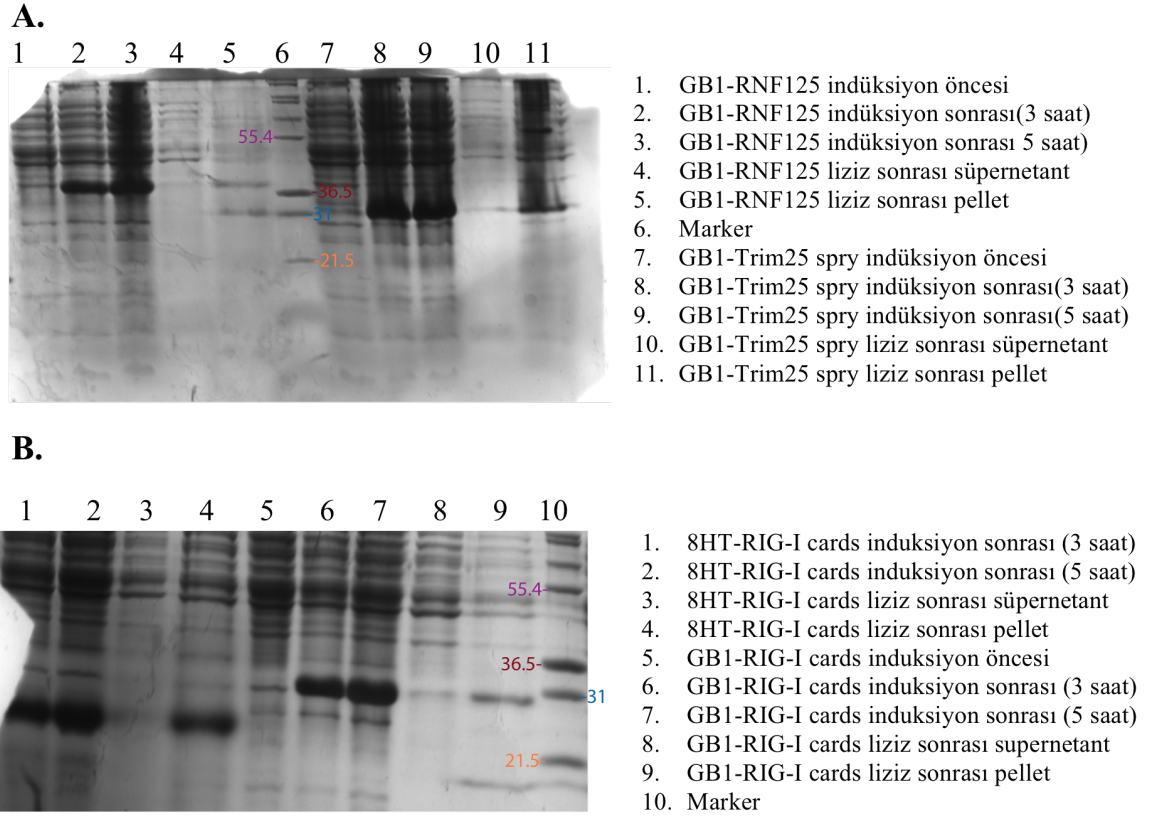
Çizelge 7.1. T4 DNA ligaz sonucu elde edilen yeni plazmit-gen çiftleri

PLAZMIT	GEN
PQE-GBI	RNF125
PQE-8HT	RNF125
PQE-GBI	TRIM25 SPRY
PQE-8HT	TRIM25 SPRY
PQE-GBI	RIG-I CARDS
PQE-8HT	RIG-I CARDS

7.2. Hedef Proteinlerin Üretimi

7.2.1. Protein ekspresyon testi

Hedef proteinlerin ekspresyonları LB besi yerinde IPTG ile indüklendi. Hedef protein ekspresyon düzeyleri SDS-PAGE ile kontrol edildi. Ekspres olan proteinlerin çözünür olup olmadıkları yine SDS-PAGE yöntemi belirlendi. Hedef genlerin ekspresyonlarını ve çözünür olarak mı yoksa çözünmeyen agregatlar şeklinde mi elde edildiklerinin gösteren jeller Şekil 7.3'de görülmektedir.



Şekil 7.3. IPTG ile indüksiyon öncesi ve sonrası protein ekspresyonlarının; liziz sonrası pellet ve süpernetantta bulunan protein miktarlarının incelendiği SDS-PAGE jel görüntüleri (A. GB1-RNF125 ve GB1-Trim25 füzyon proteinleri, B. 8HT-RIG-I CARDS ve GB1-RIG-I CARDS füzyon proteinleri)

Şekil 7.3'deki ilk jelde GB1-RNF125 proteinin ve GBI-Trim25 füzyon proteinlerini indüksiyon öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında proteinlerin ekspres olduğu görülmektedir. Buna rağmen ekspres olan her iki proteininde nerede ise tamamının pelletedir. İkinci jeldeki örneklerden görüldüğü gibi hem GBI hem 8HT tagları içeren RIG-I CARDS proteinlerinin ekspresyonunun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. GBI-RIG-I füzyon proteinin bir miktar çözünür olarak ekspresyonunun gerçekleştiği görülmesine rağmen 8HT-RIG-I CARDS'ın nerede ise tamamen pellette olduğu görülmektedir.

7.2.2. Hedef Proteinlerin Saflaştırılması

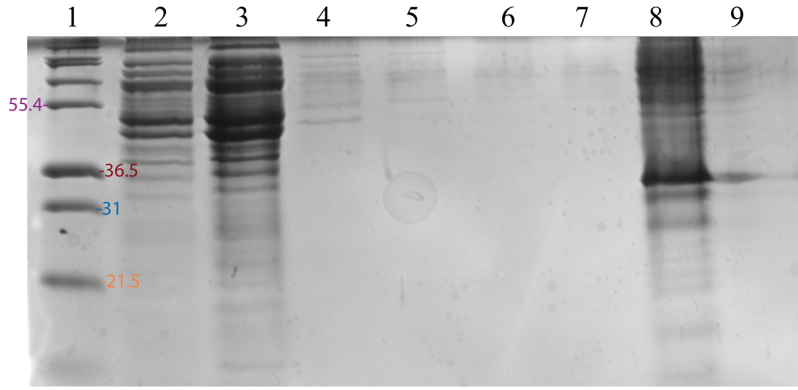
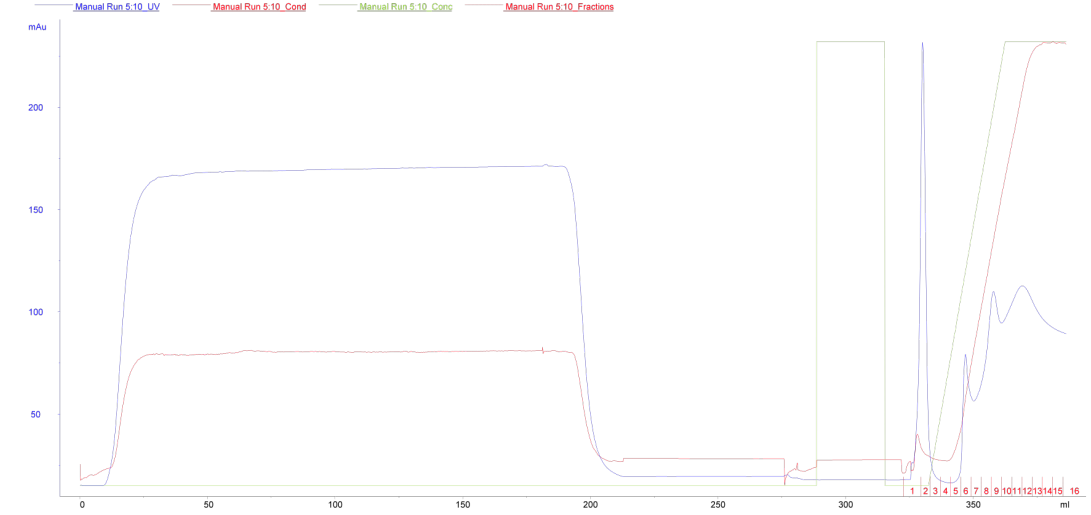
Hedef proteinler 1 litre LB besiyeri içerisinde üretildiler, sonikasyon yardımı ile hücreler parçalandı ve Akta Prime plus protein saflaştırma cihazı kullanılarak Ni afinite kolonu yardımı ile çözünür olarak üretilen proteinler direk çözünür olarak

üretilmeyenler ise yeniden katlandıktan sonra saflaştırıldılar. Her basamakta proteinler SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edilmişlerdir. Aşağıda proteinlerin saflaştırma basamaklarından elde edilen Kromatogramlar ve SDS-PAGE jellerinin fotoğrafları verilmiştir.

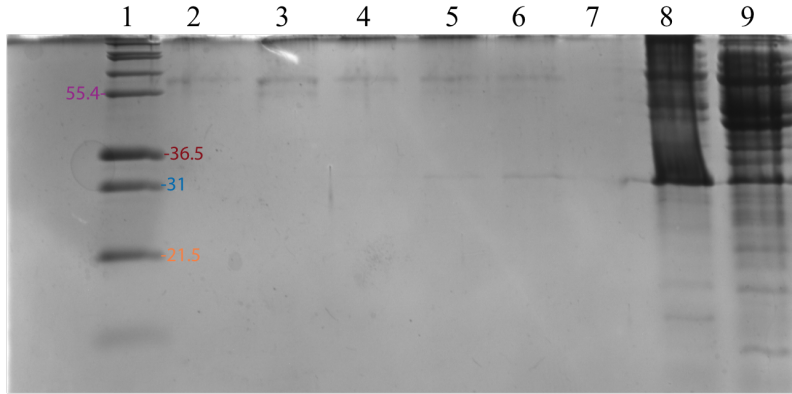
7.2.2.1. GB1-TRIM25 SPRY proteinin saflaştırılması

TRIM25 SPRY alifatik indeksi (78.46) yüksek olan domainidir. Bu nedenle ekspresyonunda GB1 çözünürlük tagı kullanıldı. Şekil 7.4’de yer alan ikinci jeldeki 8. ve 9. kuyulardaki liziz sonrası pellet ve süpernerant örnekleri incelendiğinde proteinin büyük oranda pellette bulunduğu görülmektedir. Buda GB1 proteinin domainin çözünürlüğüne istenilen oranda etki etmediğini göstermektedir.

Trim25 proteinin GB1 ile füzyon olan varyantının ekspresyonu sonrası çözünür protein saflaştırılmasından elde edilen kromatogram Şekil 7.4’te verildiği gibidir. Kromatogram incelendiğinde gradiyent elüsyonun başlaması ile ilk olarak kolona spesifik olmayan şekilde bağlanmış olan proteinlerin kolondan ayrıldığı fraksiyon 1 ve fraksiyon 2’nin jel görüntülerinden anlaşılmaktadır. Gradiyent elüsyon tamponunun oranının %70-80’e ulaşması ile hedef proteinin elüsyonunun başladığı görülmektedir. Kromatogramın bu bölgesine denk gelen fraksiyon 14 ve fraksiyon 15 incelendiğinde beklenen protein boyutunda bant gözlenirse de yüksek oranda protein örneğinin jel boyunca dağıldığı görülmektedir. Bu nedenle afinite kromatografisi sonrası fraksiyon 14 ve 15’in birleştirilerek spin konsantratör yardımı ile konsantre edilmesi ve jel filtrasyonu ile ikinci adım saflaştırmanın gerçekleştirilmesi planlandı. Ancak konsantrasyon işlemi sırasında protein örneği yüksek oranda çöktü. Bu da proteinin kullanılan sulu çözelti ortamlarında yüksek oranda kararsız olduğunu göstermektedir.



1. Marker
2. Fraksiyon 2
3. Fraksiyon 3
4. Fraksiyon 6
5. Fraksiyon 7
6. Fraksiyon 8
7. Fraksiyon 13
8. Fraksiyon 14
9. Fraksiyon 15



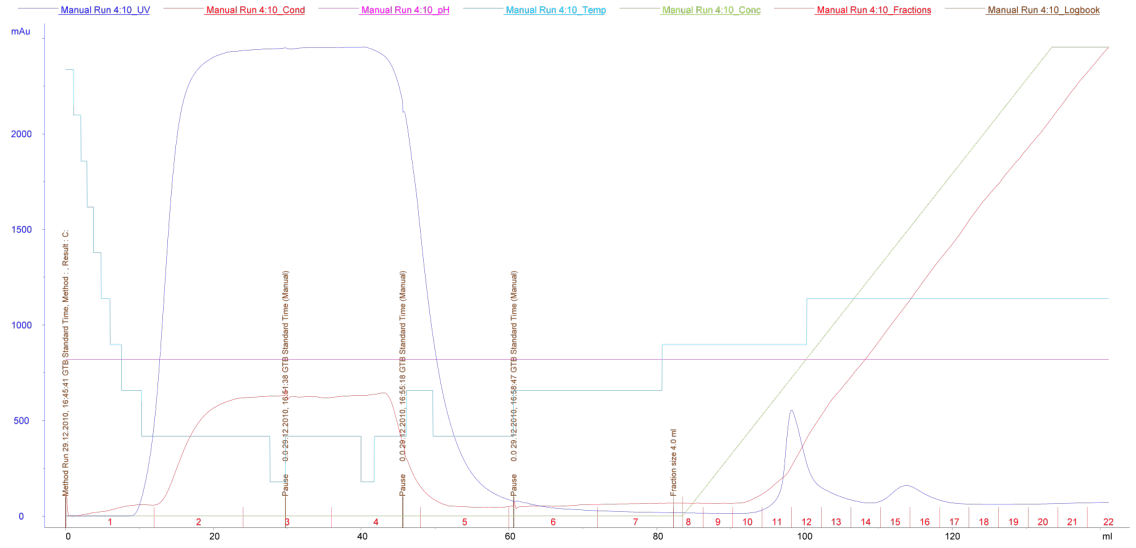
1. Marker
2. Fraksiyon 16
3. Fraksiyon 17
4. Fraksiyon 18
5. Fraksiyon 19
6. Fraksiyon 20
7. -
8. Liziz sonrası Pellet
9. Liziz sonrası süpernetant

Şekil 7.4. PQE-GBI-Trim25 SPRY sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüleri

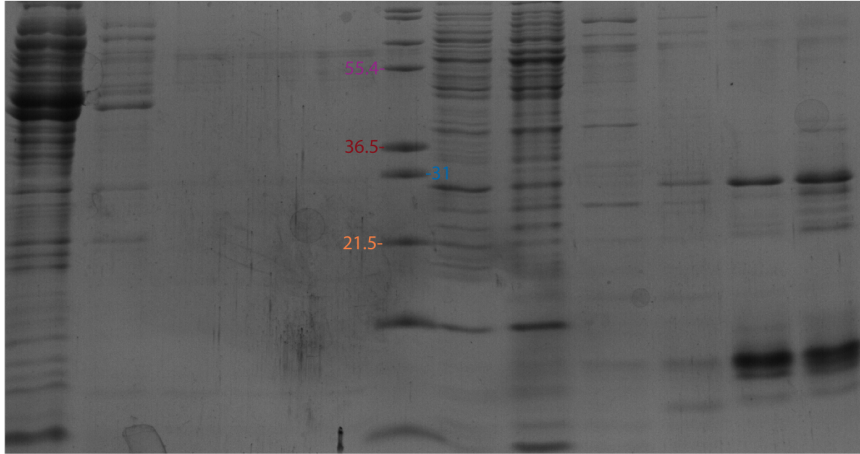
7.2.2.2. GB1-RNF125 proteinin saflaştırılması

özünür protein saflaştırılması;

RNF125 bir zinc finger domaini içermesi nedeni ile doğal konformasyonuna katlanabilmek için çinko iyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle proteinin ekspresyonunda olduğu gibi saflaştırma basamaklarında da kullanılan çözeltilerde $ZnCl_2$ kullanıldı. Şekil 7.5’de verilmiş olan çözünür protein saflaştırılmasına ait kromatogramda elüsyon esnasında iki farklı pik görölmektedir. Fraksiyon 11-13 arasında görölen ilk pike ait jel görüntüsü incelendiğinde yüksek oranda safsızlık içediğı görölmektedir. İkinci pik elüsyon çözelti oranı %50’ye yükseldiğinde fraksiyon 15-17 aralığında gözlemlenmiştir. Bu fraksiyonlardan elde edilen örneklerin SDS-PAGE görüntüleri Şekil 7.5’de verilmiştir. Jelde 11. ve 12. kuyularda yer alan bu örneklerde iki adet baskın bant görünmektedir. Füzyon proteinin boyutu yaklaşık 35kDa dur ve Şekil 7-3 A da 1 ve 2. kuyularda füzyon proteininin 36.5 kDa markerının çok az üzerinde yürüdüğü görölmektedir. Ancak Şekil 7-5’deki jelde görölen bantlardan (11 ve 12. kuyular) büyük olanı 31kDa markerının altında küçük olanı ise 14 kDa ile 6 kDa markerları arasında bulunmaktadır. Bu proteinlerin boyutları füzyon proteini için beklenen boyut ile örtüşmemektedir. Bu nedenle elüsyonda elde edilen proteinlerin kolona non-spesifik olarak tutunmuş olan diğerk bakteriyel proteinler olabilecekleri veya saflaştırma sırasında degradasyona uğramış füzyon protein parçaları olabilecekleri düşünölmektedir. Bu veriler doğrultusunda proteinin çözünür kısımda dikkate değerk oranda ekspresyonunun gerekleşmediğı, çözünmeyen agregatlar halinde ekspres olduğu ve pelletten izolasyonunun ve renatürasyonunun gerekli olduğu tespit edilmiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



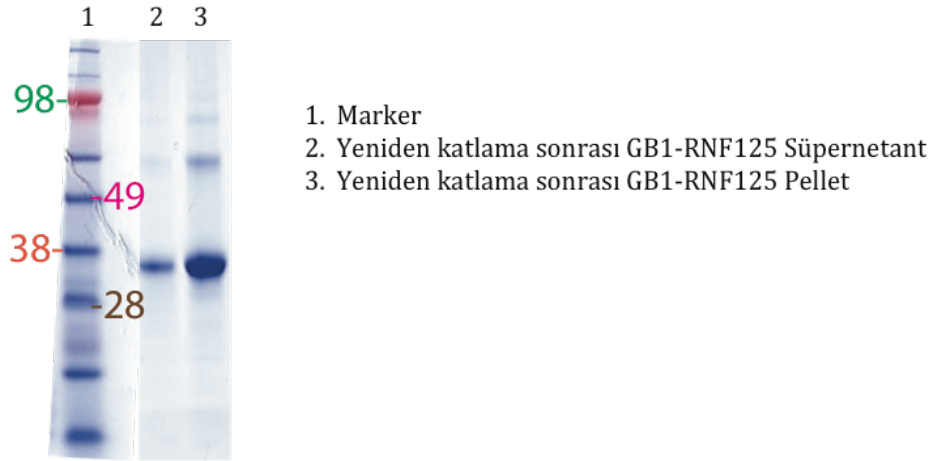
1. Fraksiyon 3
2. Fraksiyon 5
3. Fraksiyon 8
4. Fraksiyon 9
5. Fraksiyon 10
6. Marker
7. Fraksiyon 11
8. Fraksiyon 12
9. Fraksiyon 13
10. Fraksiyon 14
11. Fraksiyon 15
12. Fraksiyon 16
13. Fraksiyon 17

Şekil 7.5. GB1-RNF125 sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırmasına ait kromatogram ve jel görüntüsü

Yeniden katlanan proteinin saflaştırılması;

GB1-RNF125 füzyon proteini çözünmeyen agregatlar şeklinde ekspres edildiğinden proteinin pelletten izolasyonu ve renatürasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Pellette bulunan protein öncelikle denatürasyon çözeltisi ile muamele edilerek denatürasyona uğrattıldı. Daha sonra saflaştırmadan önce diyaliz ile yeniden katlama işlemi gerçekleştirildi (2 mM DTT içeren 1x TBS). Yeniden katlama işlemi sonrası pellet ve süpernetantta bulunan protein miktarları şekil 7.6'de verilmiştir. GB1-RNF125'nin diyaliz yöntemi ile yeniden katlanmasında verimin çok düşük olduğu ve proteinin yüksek oranda pellette

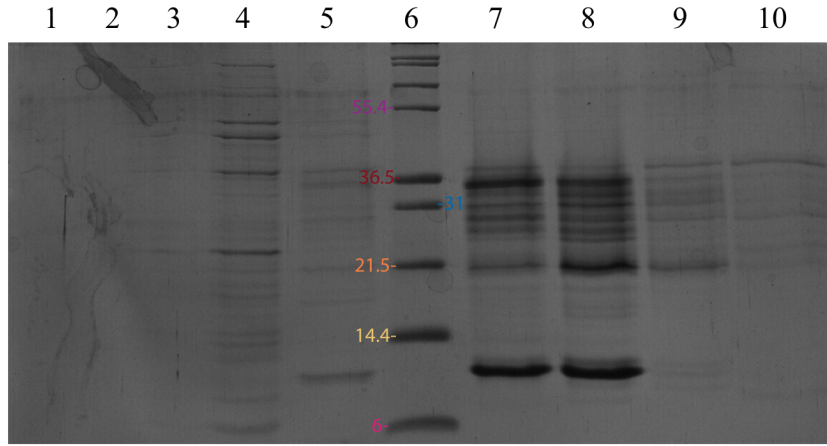
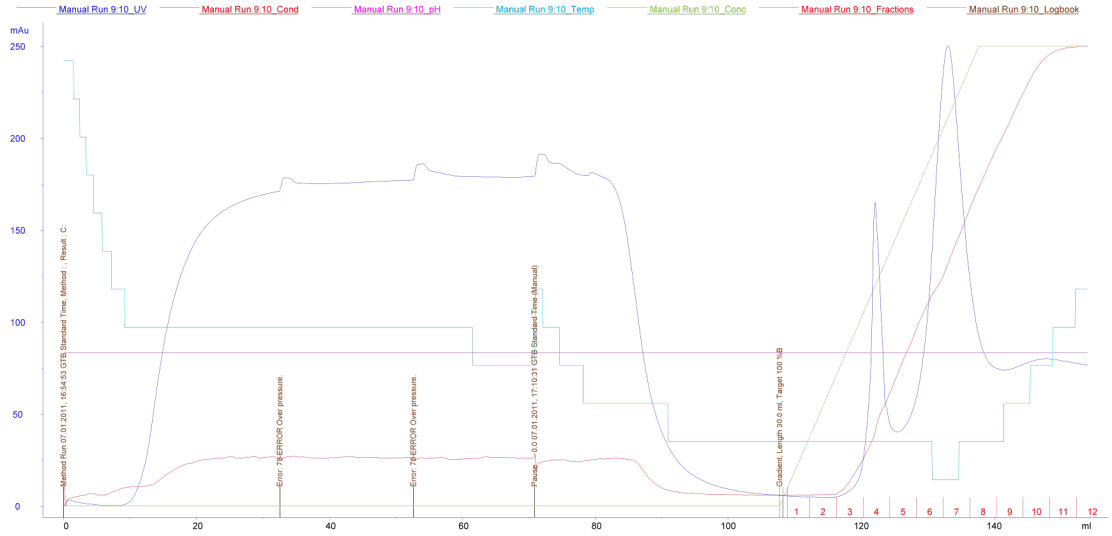
kaldığı görülmektedir.



Şekil 7.6. GB1-RNF125 proteinin diyaliz ile yeniden katlama işlemi sonrası protein miktarlarının gösteren jel görüntüsü

Proteinin boyutunun marker ile karşılaştırılması sonucu protein bantının beklenen boyutta olduğu görülmektedir.

Proteinin yeniden katlanması sonrası süpernatant kısmında bulunan proteinin Ni afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 7.7’de verilmiştir. Protein saflaştırılması sonrası elde edilen elüsyon fraksiyonlarından 6 ve 7 de istenilen hedef proteinin bulunduğu görülmektedir. Pellet kısmından renatürasyon yolu ile elde edilen çözünür füzyon proteini (Şekil 7.6, 2. kuyu) oldukça saf olmasına ve düşük molekül ağırlıklı proteinler içermemesine rağmen, afinite kromatografisinde elde edilen elüsyon fraksiyonlarının jel görüntülerinde çok sayıda füzyon proteininden daha düşük molekül ağırlıklı protein bantlarının varlığı tespit edilmiştir. Özellikle, çözünür kısımdan yapılan saflaştırmada olduğu gibi, 6 kDa ile 14 kDa markerları arasında yeni şiddetli bir bantın ortaya çıktığı görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda geçen zaman içerisinde proteinin degresasyona uğramaya başladığı görülmektedir. Bunun yanında yine jelin Fraksiyon 6 ve 7’nin bulunduğu bölgesinde birbirini takip eden protein bantlarının degrede olmuş füzyon proteinler olduğu düşünülmektedir. Diyaliz yöntemi ile gerçekleştirilen yeniden katlama sonrası gerçekleştirilen saflaştırmada elde edilen protein örneğinin yukarıdaki bahsedilen sorunlar içermesi ve doğal konformasyonunda olmadığı düşünülmesi nedeni ile jel filtrasyonu gerçekleştirilmedi.



1. Fraksiyon 1
2. Fraksiyon 2
3. Fraksiyon 3
4. Fraksiyon 4
5. Fraksiyon 5
6. Marker
7. Fraksiyon 6
8. Fraksiyon 7
9. Fraksiyon 8
10. Fraksiyon 9

Şekil 7.7. PQE-GB1-RNF125 yeniden katlama sonrası protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüsü

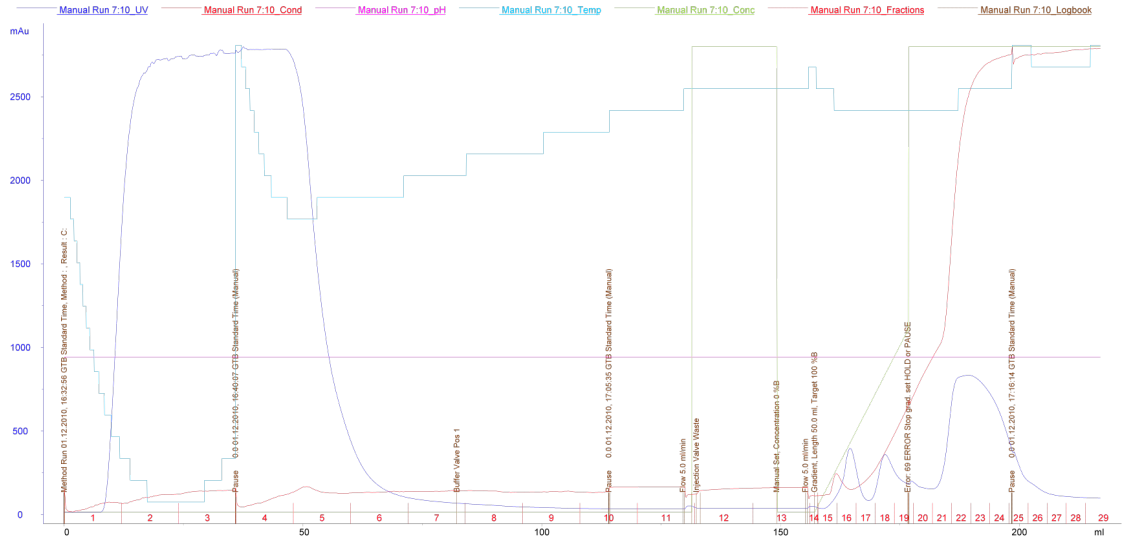
7.2.2.3. RIG-I CARDs proteinin saflaştırılması

Çözünür proteinin saflaştırılması ;

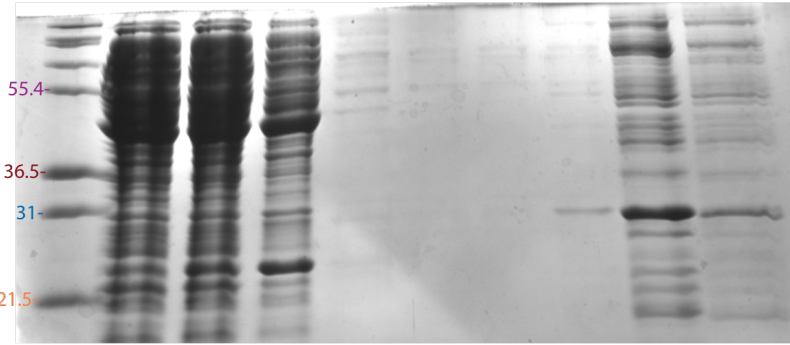
RIG-I Cards'ın sonikasyon sonrası Ni afinite kromatografisi kullanılarak çözünür protein saflaştırmasına ait kromatogram şekil 7.8'da verilmiştir (yıkama tamponunda 2 mM DTT içeren 1x TBS, elüsyon tamponunda ise yıkama tamponu + 0.5 M İmidazol). Hedef proteinin Fraksiyon 21-26 arasında geldiği gözlemlenmektedir. RNF125 ve TRIM25 SPRY ile kıyaslandığında aynı miktardaki hücre pastasından elde edilen protein veriminin çok daha fazla olduğu görülmektedir.

Bu ilk saflaştırma adımı sonrası elde edilen fraksiyonlar (Fraksiyon 21-Fraksiyon 26)

birleştirilerek konsantre edildi ve imidazol uzaklaştırıldı. Konsantrasyon işlemi ile sonrası 1 ml hacme konsantre edilen protein örneği jel filtrasyonu ile saflaştırıldı. Jel filtrasyonunda (Sephacryl S-100, 2 mM DTT içeren 1x TBS) gerçekleştirilen kısmi fraksiyonlama ile elde edilen hedef proteini içeren fraksiyonlara ait jel görüntüsü Şekil 7.9’da verilmiştir. Jel filtrasyonu sonrası elde edilen örneklerde hedef protein bandının yanında düşük konsantrasyonlarda farklı bantlar olduğu grlmektedir. Bu farklı bantlar aynı proteinin degrade olmuş varyantları olabileceği gibi molekül ağırlığı hedef proteine çok yakın olan farklı proteinlerde olabilir. Her ne kadar jel filtrasyonu sayesinde proteinler boyutsal olarak ayrılıyor olsa da jel filtrasyonunun ayırma gücüne bağlı olarak birbirine yakın molekül ağırlığına sahip proteinleri ayırmakta yetersiz kalabilmektedir. Bu saflaştırma işlemi sonrası safsızlık oranı düşük olması nedeni ile safsızlıklar gözardı edildi ve hedef protein konsantre edildi. Konsantrasyon işlemi sırasında protein bir kaç kez 2 mM DTTieren 1x TBS tamponu ile yıkanarak İmidazol uzaklaştırıldı. Son basamak olarak protein örneğinin HSQC verileri toplanarak analizi gerçekleştirildi.

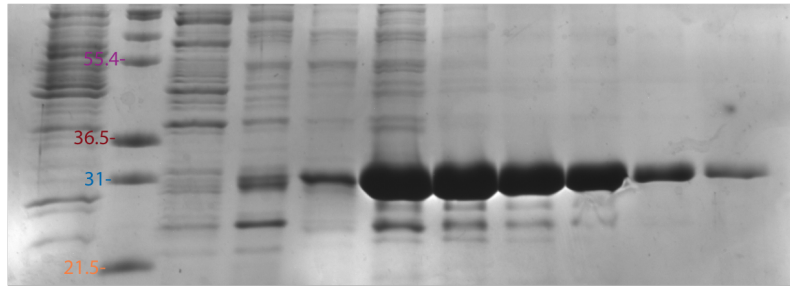


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



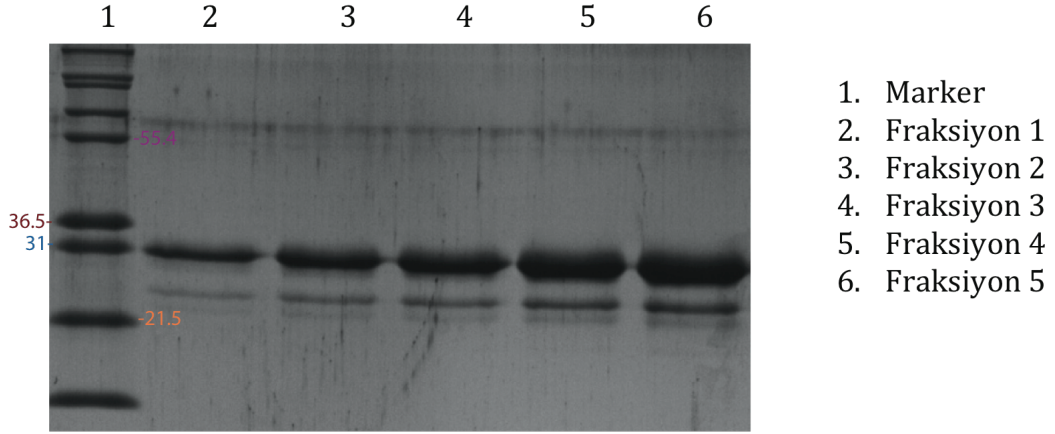
1. Marker
2. Fraksiyon 3
3. Fraksiyon 4
4. Fraksiyon 5
5. Fraksiyon 7
6. Fraksiyon 9
7. Fraksiyon 14
8. Fraksiyon 15
9. Fraksiyon 16
10. Fraksiyon 17

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



1. Fraksiyon 18
2. Marker
3. Fraksiyon 19
4. Fraksiyon 20
5. Fraksiyon 21
6. Fraksiyon 22
7. Fraksiyon 23
8. Fraksiyon 24
9. Fraksiyon 25
10. Fraksiyon 26
11. Fraksiyon 27

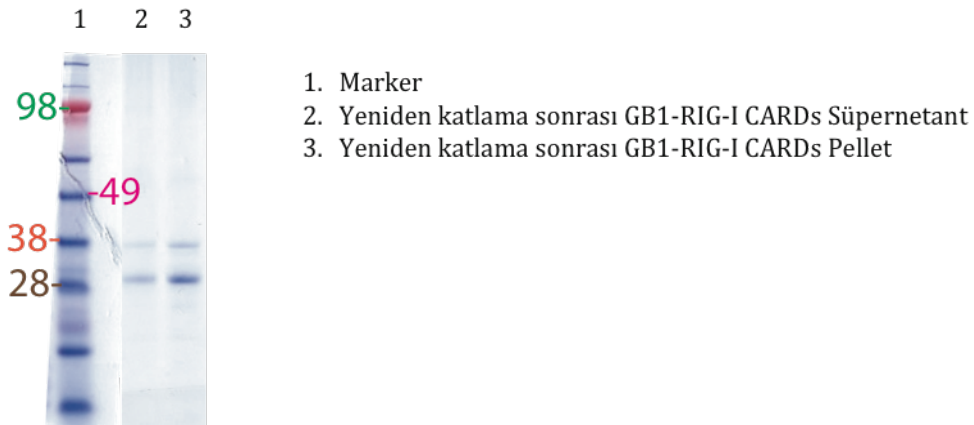
Şekil 7.8. PQE-GBI-RIG-I Cards sonikasyon sonrası çözünür protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüleri



Şekil 7.9. GB1-RIGI CARDs jel filtrasyonuna ait jel görüntüsü

Yeniden katlanan proteinin saflaştırılması;

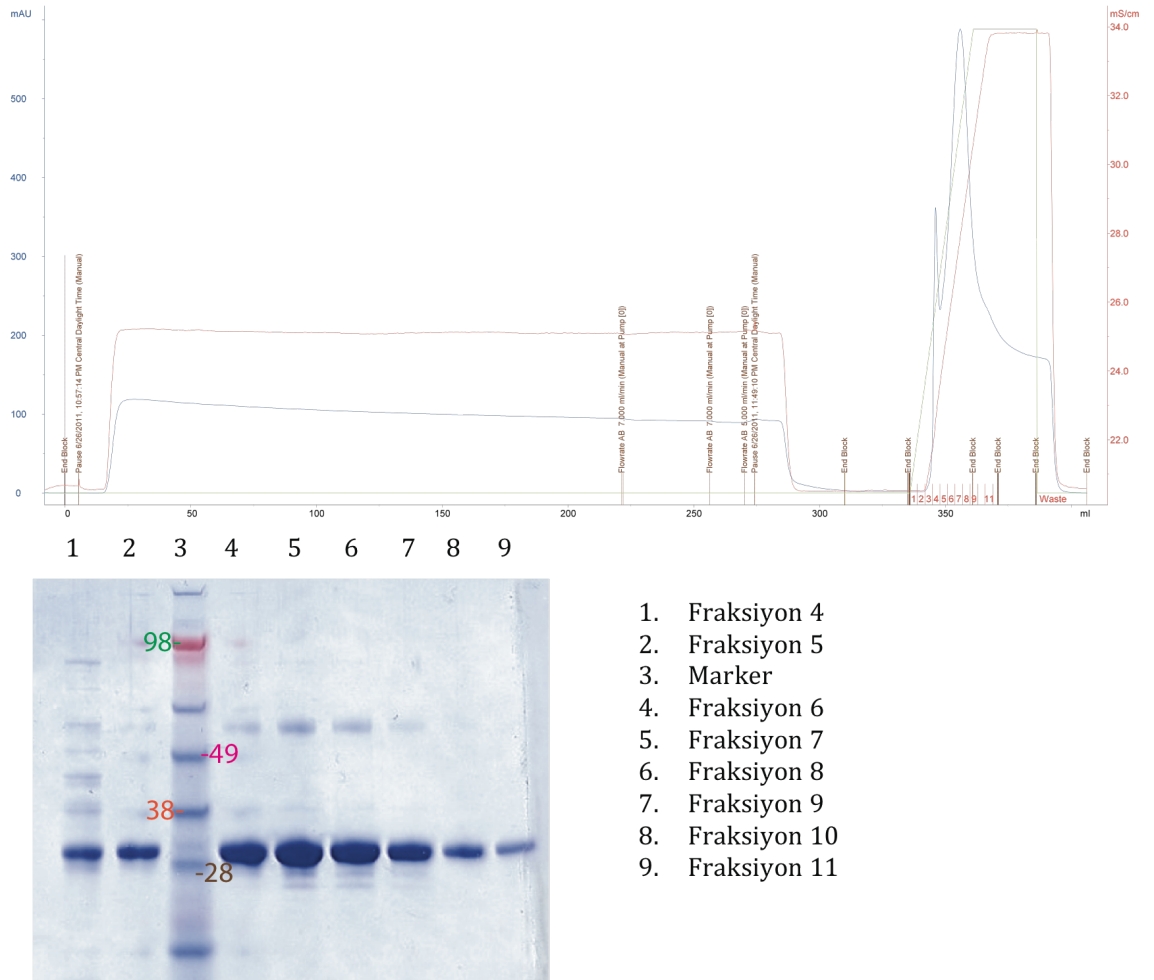
GB1-RIGI CARDs 4 adet sistein amino asidi içermekte olup bu amino asitler 2 adet di sülfid bağı oluşturmaktadır. Bakteriyel sistem içerisinde disülfid bağı içeren proteinlerin katlanmasında çoğu zaman sorunlarla karşılaşmaktadır. Böyle bir sorunla karşılaşıldığında disülfid bağı içeren proteinlerin inclusion body olarak ekspres edilip in vitro olarak yeniden katlanması tercih edilen bir yöntemdir. RIG-I proteinin çözünür olarak ekspres olan kısmının üç boyutlu yapıya katlanmadığı HSQC sonuçlarından tespit edildi. Bu nedenle GB1-RIGI CARDs'ın inclusion body olarak ekspres edilip diyaliz yöntemi (2 mM DTT içeren 1x TBS) ile yeniden katlanması da gerçekleştirildi. Proteinin yeniden katlanması sonrası pellet ve süperneratta kalan protein miktarları şekil 7.10'de verilmiştir.



Şekil 7.10. GB1-RIG-I CARDs proteinin diyaliz ile yeniden katlama işlemi sonrası protein

miktarlarını gösteren jel görüntüsü

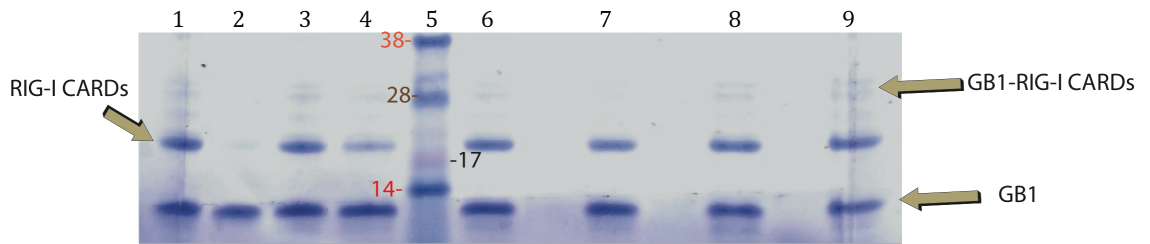
Yeniden katlama işlemi sonrası hedef proteinin afinite kolonu yardımı ile saflaştırılması gerçekleştirildi. Yeniden katlama sonrası gerçekleştirilen saflaştırma işlemine ait kromatogram şekil 7.11’de verilmiştir. Proteinin yeniden katlama sonrası yüksek oranda saf olduğu şekil 7.11’deki jelde görülmektedir. Hedef proteinleri içeren fraksiyonlar (4-11 arası) birleştirilerek konsantre edildi ve imidazol çözelti ortamından uzaklaştırıldı. Konsantre edilen proteinin jel filtrasyonu (Sephadex S-75, 2 mM DTT içeren 1x TBS) ile ikinci basamak saflaştırması gerçekleştirildi. Jel filtrasyonu sonrası protein konsantre edilerek HSQC (Şekil 7.13) verileri toplanarak analizi gerçekleştirildi.



Şekil 7.11. PQE-GB1-RIG-I CARDs yeniden katlama sonrası protein saflaştırma kromatogramı ve jel görüntüsü

7.2.3. RIG-I-CARDS'ın TEV protease ile kesme reaksiyonu

NMR ile protein yapı tayinlerinde protein boyutu büyüdükçe (özellikle 20-30 kDa'dan büyük proteinlerde) piklerin üst üste çakışmaları sorunu ortaya çıkmakta ve rezonans atamalarının gerçekleştirilmesi güçleşmektedir. Bu nedenle proteinlerin çözünür olarak ekspresyonuna ve katlanmasına yardımcı olarak kullanılan 8,5 kDa büyüklükteki GB1 tagının NMR yapı analizleri aşamasında bulunması tercih edilmez. GB1-RIG-I CARDsfüzyonunun boyutu 29,9 kDa'dur. Bu yüzden proteinin ekspresyonu ve yeniden katlanması sonrası GB1'den ayrılması proteinin yapı analizini kolaylaştıracaktır. GB1 ile füzyon ve serbest halde iken proteinlerin kararlılıkları için gerekli olan pH ve tuz konsantrasyonu değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle hem GB1'in RIG-I CARDs'dan uzaklaştırılması hem de RIG-I CARDs'ın kararlı olduğu koşulların belirlenmesi için farklı tampon çözeltiler varlığında TEV kesme reaksiyonu gerçekleştirildi (şekil 7.12).



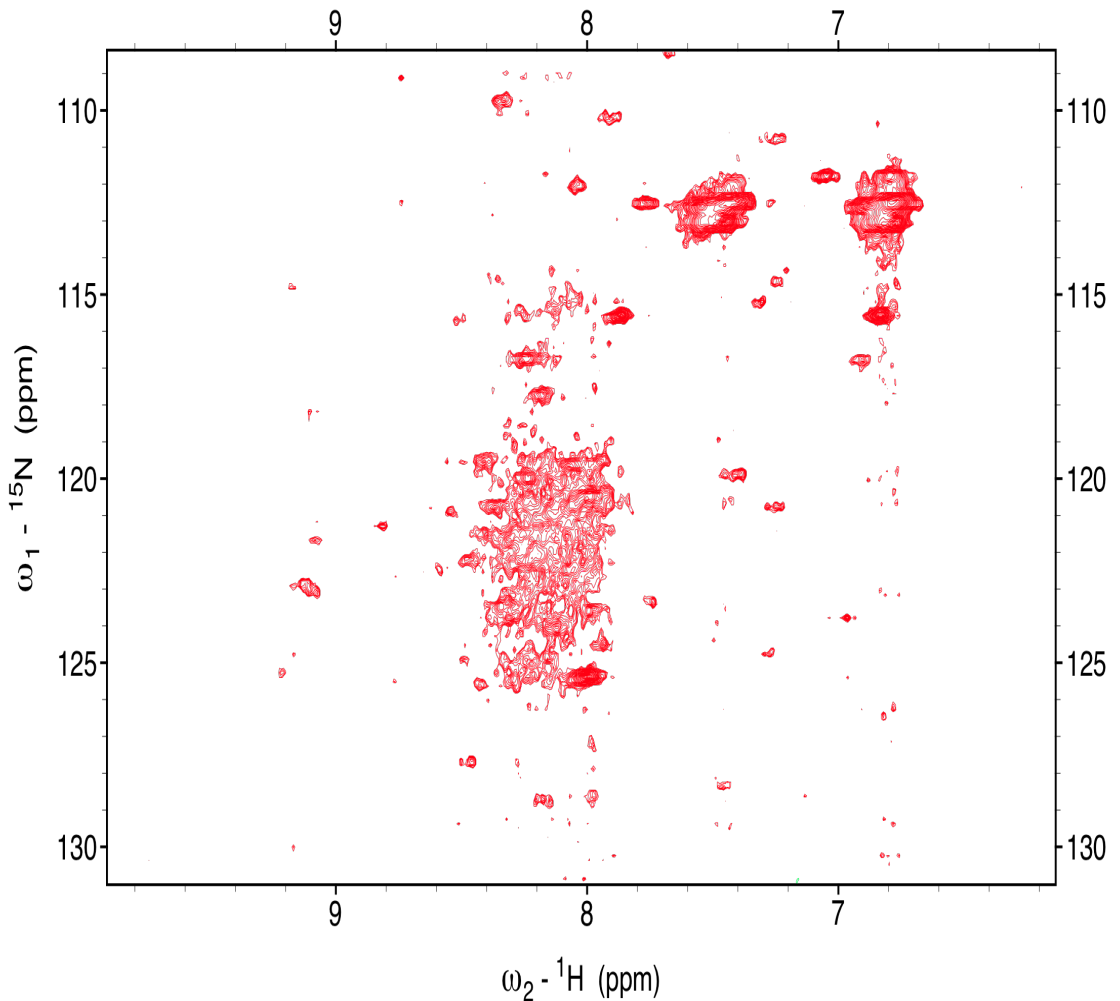
1. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam protein (Bis-Tris pH:6.0)
2. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası çözünür protein (Bis-Tris pH:6.0)
3. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam protein (Bis-Tris pH:6.0, 300 mM NaCl)
4. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası çözünür protein (Bis-Tris pH:6.0, 300 mM NaCl)
5. Marker
6. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam protein (Tris pH:7.4)
7. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası çözünür protein (Tris pH: 7.4)
8. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam protein (Tris pH: 7.4, 300 mM NaCl)
9. Tev proteaz kesme reaksiyonu sonrası çözünür protein (Tris pH: 7.4, 300 mM NaCl)

Şekil 7.12. Farklı tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilen TEV proteaz kesme reaksiyonu sonrası toplam ve çözünür protein miktarlarına ait jel görüntüsü

7.2.4. GBI-RIG-I-CARDS ve RIG-I-CARDS proteinlerinin ^1H - ^{15}N -HSQC analizleri

Proteinlerin tampon çözeltiler içerisinde kararlı ve çözünür eldesi yapısal çalışmalar için gereklidir ancak proteinin çözünür olarak elde edilmesi her zaman doğal üç

boyutlu yapısına katlandığı anlamına gelmez. Proteinin doğal konformasyonuna katlanıp katlanmadığını ve NMR yapısal çalışmaları için uygun olup olmadığını anlamının en kolay ve hızlı yolu, protein örneğini ^{15}N işaretli olarak hazırlayıp ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumunun analizini gerçekleştirmektir. Proteinin sahip olduğu N-H bağlarının dağılımını gösteren ^1H - ^{15}N -HSQC’de proton eksenindeki kimyasal kayma değerlerinin dağılımının 1-2 ppm’lik bir aralıkta toplanmış olması, o proteinin doğal konformasyonuna katlanmadığının bir işaretidir. 400 μM konsantrasyona sahip ^{15}N -GB1-RIGI-CARDS’a ait ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumu şekil 7.13’de verilmiştir.

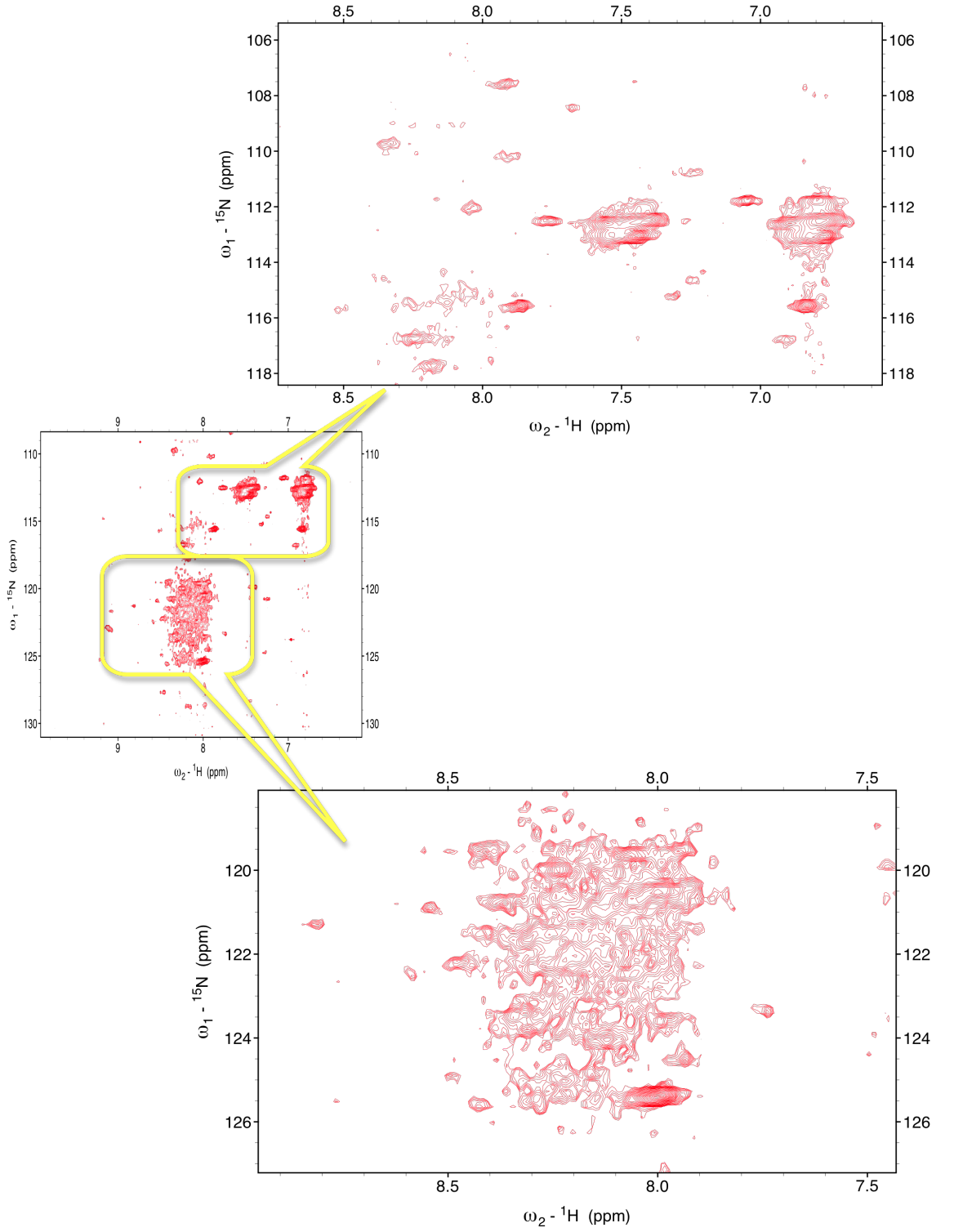


Şekil 7.13. GB1-RIG-I CARDS’ın ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumu

^{15}N -GB1-RIGI-CARDS’a ait ^1H - ^{15}N -HSQC’de protonların oluşturduğu rezonansların 8.75-7,75 ppm gibi dar bir aralıkta yayılım gösterdiği görülmektedir.

Spektrumda gözlemlenmesi beklenen GB1 proteinine ait olan ^1H - ^{15}N dağılımlarının da beklenen bölgelerde görülmemesi proteinin tamamen katlanmamış bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bir kısım yan zincir ve ana zincir ^1H - ^{15}N rezonansları detaylı olarak şekil 7.14’de görülmektedir. 400 μM protein konsantrasyonu ^1H - ^{15}N piklerinin yüksek çözünürlükte gözlenebileceği bir konsantrasyondur Ancak Şekil 7.14’de piklerin çok zayıf olduğu ve üst üste binmiş bir şekilde bulundukları görülmektedir. Bu konsantrasyonda bir proteinin bu düzeyde düşük sinyal vermesi, proteinin büyük bir olasılıkla NMR koşullarında çözünür agregatlar oluşturduğuna işaret eder.

Proteinler doğal konformasyonlarına sahip iken her bir amino asitin çevresinde farklı amino asitler bulunduğu için rezonans değerleri birbirinden farklı olmaktadır. Ancak protein katlanmamış bir yapıya sahip ise amino asitlerin etkileştiği diğer amino asitlerin miktarı da nerede ise yok denecek kadar azalmaktadır. Bu nedenle de aynı amino asitler nerede ise üst üste denilebilecek kadar çok yakın rezonans verirler. Bu bilgiler doğrultusunda RIGI-CARDS kendisi katlanmamış olduğu gibi bunun yanında GB1 proteininde doğal konformasyonuna katlanmasını önlemiştir.



Şekil 7.14. GB1-RIG-I CARDs'ın ^1H - ^{15}N -HSQC spektrumunda yan zincir ve ana zincir N-H piklerinin detaylı gösterimi

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasının ikinci bölümü kapsamında RNA virüslerinin (vesicular stomatitis, Newcastle disease, influenza gibi) hücre içerisine girişinin algılanmasında görev alan RIG-I proteinin CAR domainlerinin ve bu domainlerin post translasyonel modifikasyonunda işlev yapan E3 enzimleri RNF125'in ve TRIM25-SPRY domaininin NMR ile yapısal çalışmalarda kullanılmak amacıyla elde edilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Ayrıca elde edilen örneklerin yapısal çalışmalar için uygunlukları da test edildi.

8.1. TRIM25 SPRY domaini serbest ve GB1 ile füzyon halde kararsızdır

Proteinlerin diğer proteinler ile etkileşimlerinde görev alan yüzeyleri çoğu zaman hidrofobik amino asitler bakımından zengin bölgelerdir. TRIM25-SPRY domaini proteinin direk olarak RIG-I CARs ile etkileşim yüzeyini oluşturmaktadır. Bunun yanında TRIM25 SPRY domaini 16 adet lösin, 7 adet izolösin içermektedir. Bu kadar çok hidrofobik amino asitler içermesi, domainin yüksek oranda hidrofobik olduğunu sulu ortamlarda çözünürlüğünün az olması ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir. Serbest TRIM25-SPRY domaininin kararsızlık indeksi değeri (instability index) 33.05 ve GB1 ile füzyon olarak ise 23.67 olarak hesaplanmıştır (Expasy). Bunun yanında GRAVY (grand average of hydropathicity) değeri serbest halde -0.126'dır. Bir proteinin kararsızlık indeksi 40' üzerinde ise ya da GRAVY değeri pozitif ise bu proteinin sulu çözeltiler içerisinde kararsız olma ihtimalinin yüksek olacağının bir göstergesidir. TRIM25-SPRY domainin bu iki değerinde hidrofobikliğe çok yakın olduğu görülmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar ile de domainin GB1 ile ve serbest olarak yüksek oranda çözünmez agregatlar olarak ekspres olduğu belirlendi. Bunun yanında proteinin yeniden katlama çalışmalarında da başarılı bir sonuç elde edilemedi.

GB1'in çözünürlük tagının TRIM25-SPRY domaininin kararlılığını ve çözünürlüğünü arttırmakta istenen sonucu sağlamaması gelecekteki çalışmalarda farklı yöntemlerin denenmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur. TRIM25-SPRY domainin doğal partneri olan RIG-I CARs ile co-ekspresyonu yada SUMO, GST

gibi farklı ekspresyon tagları ile ekspresyonunun denenmesi TRIM25-SPRY'ın kararlılığını ve çözünürlüğünün artırılmasında yardımcı olabilir.

8.2. RNF125 yaygın olarak kullanılan yöntemler ile doğal konformasyonuna katlanmamaktadır.

Yapısal olarak ring finger protein sınıfında bulunan RNF125'in ring finger domaini 36 ile 76. amino asitleri arasında yer almaktadır. RNF125 proteini 17 adet sistein amino asidi içermektedir. Bu 17 sisteinlerden 7 tanesinin ring finger içerisinde bulunduğu ve çinko atomları ile koordinasyona girerek C₃-H-C₄ tipi RING domaini oluşturduğu düşünülmektedir. Geriye kalan 10 sistein ise ikiyeşerli olarak 5 disülfid bağı oluşturarak proteinin yapısal kararlılığını sağlamaktadır. Bu çalışmada temel saflaştırma yöntemleri ve diyaliz ile yeniden katlama metodu kullanılarak proteinin katlanmasına çalışılmasına rağmen başarılı olunamamıştır. Bunun en muhtemel nedeninin RING finger domaininden çok disülfid bağlarının doğru oluşamaması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Literatürde sadece RING finger domainlerinin hiçbir ek çalışma gerektirmeden bakteriyel sistemlerde doğal konformasyonel yapılarında saflaştırıldıklarını gösteren örnekler mevcuttur (Kandias vd., 2009). Proteinlerin içerdiği disülfid bağı sayısı arttıkça proteinlerin doğal konformasyonlarına katlanabilmeleri için ek işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar için proteinin sadece RING finger içeren domainin tek başına saflaştırılmasının başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Proteinin tamamının yeniden katlanması istenirse, katlama sırasında çeşitli redoks ajanları kullanılması ve ardından HPLC gibi seçiciliği çok daha yüksek saflaştırma yöntemlerinin denenmesi olumlu sonuçlar verebilir. Çünkü HPLC ile aynı proteinin farklı disülfid bağı oluşturmuş varyantlarının bile ayrılması mümkündür.

Kimizaman hedef proteinlere eklenen çözünürlük tagleri proteinlerin katlanmasına engel olup kararsızlaştırabilmektedir. N-terminalinde bulunan GB1 RING finger domainine yakın olup GB1 varlığında RNF125'in baskılanıyor olabilir. Bu nedenle çözünürlük tagi olan GB1 in C-terminaline eklenmesi yada farklı bir çözünürlük tagi ile proteinin ekspresyonu ilerki çalışmalarda denenebilir.

8.3. GB1-RIG-I CARDs kararlı bir üç boyutlu yapıya sahip değildir ve RIG-I CARDs serbest halde kararsızdır

RIG-I CARDs'ın GB1 ile füzyon halde ekspresyonu sonucu proteinin bir kısmının çözünür şekilde süpernatantta bulunduğu bir miktar proteinin ise pellette çözünmez agregatlar oluşturduğu belirlendi. Çözünür şekilde ekspres olan protein direk olarak kromatografik yöntemler ile saflaştırıldı. Pellette bulunan protein ise önce yeniden katlama işlemine tabii tutuldu daha sonra saflaştırıldı. ^{15}N işaretli olarak elde edilen proteinin 0.4 mM'a konsantre edilmesi sonrası kaydedilen ^1H - ^{15}N HSQC spektrumunda oluşan piklerin doğal yapısına katlanmış bir proteinin spektrumundan beklenen dağılımı göstermediği belirlendi. Bunun yanında pik şiddetlerinin de 0.4 mM konsantrasyonda bir protein için beklenenden çok daha zayıf olduğu tespit edildi. Bu ancak RIG-I CARDs'ın çok büyük molekül ağırlıklı suda çözünen agregatlar oluşturması durumunda mümkün olabilir. Bu bulgular doğrultusunda bu şekilde hazırlanmış olan RIG-I CARDs örneklerinin NMR yapısal çalışmaları için uygun olmadığını gösterdi.

RIG-I'in GB1 ile füzyon halde NMR için uygun olmadığı tespit edildiğinden, GB1 tagının TEV proteaz enzimi ile muamele etmek suretiyle uzaklaştırılması yoluna gidildi. Ancak serbest RIG-I'in serbest halde kararsız olduğu ve konsantre edilmesi sırasında kısa sürede çöktüğü belirlendi. RIG-I CARDs anti viral bağışıklık sisteminin doğal işleyişinde viral enfeksiyonun algılanması sonrası dışa doğru açılan hareketli bir yapıya sahiptir.

CARD domainlerinin ayrı ayrı klonlanması yada farklı çözünürlük tagları ile klonlanması ve ekspresyonu domainin doğru bir şekilde katlanmasını yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Ardley HC, Rose SA, Tan N, Leek JP, Markham AF, Robinson PA. 2000 Genomic organization of the human ubiquitin-conjugating enzyme gene, UBE2L6 on chromosome 11q12, *Cytogenet Cell Genet.*, 89: 137-140.
- Arimoto KI, Konishi H, Shimotohno K. 2008 UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I, *Mol. Immunol.*, 45: 1078-1084.
- Arimoto KI, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. 2007 Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 7500-7505.
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM. 1995 Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 11657-11661.
- Bartels C, Xia TH, Billeter M, Guntert P, Wuthrich K. 1995 The Program Xeasy for Computer-Supported Nmr Spectral-Analysis of Biological Macromolecules, *J. Biomol. NMR.*, 6: 1-10.
- Bax A, Clore GM, Gronenborn AM. 1990 H-1-H-1 Correlation Via Isotropic Mixing of C-13 Magnetization, a New 3-Dimensional Approach for Assigning H-1 and C-13 Spectra of C-13-Enriched Proteins, *J. Magn. Reson.*, 88: 425-431.
- Bektas N, et al. 2008 The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer, *Breast Canc Res.*, 10.
- Bennett EJ, Harper JW. 2010 Ubiquitin Gets CARDed, *Cell*, 141: 220-222.
- Billeter M. 1995 NMR for structural studies in drug discovery, *Perspect Drug Discov Des.*, 3: 151-167.
- Bodenhausen G, Ruben DJ. 1980 Natural Abundance N-15 Nmr by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy, *Chem Phys Lett.*, 69: 185-189.
- Bohnsack RN, Haas AL. 2003 Conservation in the mechanism of Nedd8 activation by the human AppBp1-Uba3 heterodimer, *J. Biol. Chem.*, 278: 26823-26830.
- Brownell JE, et al. 2010 Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-

AMP mimetic in situ, *Mol Cell*, 37: 102-111.

Chang YG, Yan XZ, Xie YY, Gao XC, Song AX, Zhang DE, Hu HY. 2008 Different roles for two ubiquitin-like domains of ISG15 in protein modification, *J. Biol. Chem.*, 283: 13370-13377.

Chen JJ, et al. 2011 Mechanistic studies of substrate-assisted inhibition of ubiquitin-activating enzyme by adenosine sulfamate analogues, *J Biol Chem*, 286: 40867-40877.

Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. 2008 The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I, *Molecular Cell*, 29: 169-179.

Darnell JE, Jr. 1997 STATs and gene regulation, *Science*, 277: 1630-1635.

Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. 1995 Nmrpipe - a Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes, *J. Biomol. NMR.*, 6: 277-293.

Diercks T, Coles M, Kessler H. 2001 Applications of NMR in drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5: 285-291.

Durfee LA, Kelley ML, Huibregtse JM. 2008a The basis for selective E1-E2 interactions in the ISG15 conjugation system, *J Biol Chem.*, 283: 23895-23902.

Durfee LA, Kelley ML, Huibregtse JM. 2008b The basis for selective E1-E2 interactions in the ISG15 conjugation system, *J Biol Chem.*, 283: 23895-23902.

Farmer BT, Venters RA, Spicer LD, Wittekind MG, Muller L. 1992 A Refocused and Optimized Hnca - Increased Sensitivity and Resolution in Large Macromolecules, *J. Biomol. NMR.*, 2: 195-202.

Farrell PJ, Broeze RJ, Lengyel P. 1979 Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells, *Nature*, 279: 523-525.

Feng Q, et al. 2008 UBE1L causes lung cancer growth suppression by targeting cyclin D1, *Mol. Cancer Ther.*, 7: 3780-3788.

Fesik SW, Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP. 1997 SAR by NMR: An NMR-based approach for drug discovery, *Protein Eng.*, 10: 73-73.

Gack MU, Nistal-Villan E, Inn KS, Garcia-Sastre A, Jung JU. 2010

Phosphorylation-Mediated Negative Regulation of RIG-I Antiviral Activity, *J. Virol.*, 84: 3220-3229.

Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, Inn KS, Liang C, Cui S, Myong S, Ha T, Hopfner KP, Jung JU. 2008 Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 16743-16748.

Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, Farzan M, Inoue S, Jung JU, Garcia-Sastre A. 2009 Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I, *Cell Host Microbe*, 5: 439-449.

Gack MU, et al. 2007 TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity, *Nature*, 446: 916-U912.

Grzesiek S, Bax A. 1992a Correlating Backbone Amide and Side-Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance Nmr, *J Am Chem Soc.*, 114: 6291-6293.

Grzesiek S, Bax A. 1992b Improved 3d Triple-Resonance Nmr Techniques Applied to a 31-Kda Protein, *J Magn Reson.*, 96: 432-440.

Grzesiek S, Anglister J, Bax A. 1993 Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in C-13/N-15-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of C-13 Magnetization, *J Magn Reson. Series B*, 101: 114-119.

Guntert P. 2004 Automated NMR structure calculation with CYANA, *Methods Mol Biol*, 278: 353-378.

Haas AL, Siepmann TJ. 1997 Pathways of ubiquitin conjugation, *Faseb Journal*, 11: 1257-1268.

Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. 1982 Ubiquitin-activating enzyme, Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation, *J Biol Chem.*, 257: 2543-2548.

Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. 1987 Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin, *J Biol Chem.*, 262: 11315-11323.

Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. 1999 NMR-based screening in drug discovery, *Q Rev Biophys.*, 32: 211-240.

Hajduk PJ, et al. 1997 Discovery of potent nonpeptide inhibitors of stromelysin

- using SAR by NMR, *J Am Chem Soc.*, 119: 5818-5827.
- Hanzawa H, Takizawa T. 2010 NMR Screening in the Fragment-based Drug Discovery, *Yakugaku Zasshi- J Pharm Soc. of Japan*, 130: 325-333.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998 The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, 67: 425-479.
- Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R. 1999 Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor, *J Interferon Cytokine Res*, 19: 1-13.
- Huang DT, Paydar A, Zhuang M, Waddell MB, Holton JM, Schulman BA. 2005 Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1, *Mol. Cell.*, 17: 341-350.
- Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP. 1999 Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade, *Science*, 286: 1321-1326.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. 1995a A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5249.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. 1995b A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2563-2567.
- Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, Shi MD, Wong LY, Iwai K, Jung JU. 2011 Linear Ubiquitin Assembly Complex Negatively Regulates RIG-I- and TRIM25-Mediated Type I Interferon Induction, *Mol. Cell.*, 41: 354-365.
- Jahnke W. 2003 NMR in drug discovery, *Chimia*, 57: 59-59.
- Jansson M, Li YC, Jendeborg L, Anderson S, Montelione BT, Nilsson B. 1996 High-level production of uniformly ¹⁵N- and ¹³C-enriched fusion proteins in *Escherichia coli*, *J Biomol NMR*, 7: 131-141.
- Jeon YJ, et al. 2009 ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway, *Embo Reports*, 10: 374-380.
- Kandias NG, Chasapis CT, Bentrop D, Episkopou V, Spyroulias GA. 2009 High yield expression and NMR characterization of Arkadia E3 ubiquitin ligase RING-H2 finger domain, *Biochem Biophys Res Comm.*, 378: 498-502.
- Kato H, Takahashi K, Fujita T. 2011 RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for

- non-self RNA, *Immunol Rev.*, 243: 91-98.
- Kawai T, Akira S. 2008 Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling, *Year Immunol.* 2008, 1143: 1-20.
- Kay LE, Ikura M, Tschudin R, Bax A. 2011 Three-dimensional triple-resonance NMR Spectroscopy of isotopically enriched proteins, *J Magn Reson*, 213: 423-441.
- Kim KI, Giannakopoulos NV, Virgin HW, Zhang DE. 2004 Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation, *Mol Cell Biol.*, 24: 9592-9600.
- Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, Yoo JY. 2008 Negative feedback regulation of RIG-1-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation, *J. Virol.*, 82: 1474-1483.
- Klages J, Coles M, Kessler H. 2007 NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery, *Analyst*, 132: 693-705.
- Knight E, Cordova B. 1991 Ifn-Induced 15-Kda Protein Is Released from Human-Lymphocytes and Monocytes, *J. Immunol.*, 146: 2280-2284.
- Kok K, Van den Berg A, Veldhuis PM, Franke M, Terpstra P, Buys CH. 1995 The genomic structure of the human UBE1L gene, *Gene Expr*, 4: 163-175.
- Korant BD, Blomstrom DC, Jonak GJ, Knight E, Jr. 1984 Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon, *Journal of Biological Chemistry*, 259: 14835-14839.
- Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. 2011 Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA, *Cell*, 147: 423-435.
- Lee I, Schindelin H. 2008 Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes, *Cell*, 134: 268-278.
- Liu MJ, Li XL, Hassel BA. 2003 Proteasomes modulate conjugation to the ubiquitin-like protein, ISG15, *Journal of Biological Chemistry*, 278: 1594-1602.
- Loeb KR, Haas AL. 1992 The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 267: 7806-7813.

- Lois LM, Lima CD. 2005 Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1, *Embo Journal*, 24: 439-451.
- Loo YM, Gale M. 2011 Immune Signaling by RIG-I-like Receptors, *Immunity*, 34: 680-692.
- Manthey CL, Wang SW, Kinney SD, Yao Z. 1998 SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes, *J Leukoc Biol*, 64: 409-417.
- Marion D, Kay LE, Sparks SW, Torchia DA, Bax A. 1989a 3-Dimensional Heteronuclear Nmr of N-15-Labeled Proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 111: 1515-1517.
- Marion D, Driscoll PC, Kay LE, Wingfield PT, Bax A, Gronenborn AM, Clore GM. 1989b Overcoming the Overlap Problem in the Assignment of H-1-Nmr Spectra of Larger Proteins by Use of 3-Dimensional Heteronuclear H-1-N-15 Hartmann-Hahn Multiple Quantum Coherence and Nuclear Overhauser Multiple Quantum Coherence Spectroscopy - Application to Interleukin-1-Beta, *Biochemistry*, 28: 6150-6156.
- Meraro D, Gleit-Kielmanowicz M, Hauser H, Levi BZ. 2002 IFN-stimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element, *J Immunol*, 168: 6224-6231.
- Mi Z, Fu J, Xiong Y, Tang H. 2010 SUMOylation of RIG-I positively regulates the type I interferon signaling, *Protein Cell*, 1: 275-283.
- Montelione GT, Lyons BA, Emerson SD, Tashiro M. 1992 An Efficient Triple Resonance Experiment Using C-13 Isotropic Mixing for Determining Sequence-Specific Resonance Assignments of Isotopically-Enriched Proteins, *J Am Chem Soc.*, 114: 10974-10975.
- Muhandiram DR, Kay LE. 1994 Gradient-Enhanced Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr Experiments with Improved Sensitivity, *J Magn Reson. Series B*, 103: 203-216.
- Narasimhan J, Wang M, Fu Z, Klein JM, Haas AL, Kim JJ. 2005 Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15, *J Biol Chem.*, 280: 27356-27365.
- Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. 1997 The growing family of interferon regulatory

factors, *Cytokine Growth Factor Rev*, 8: 293-312.

Nistal-Villan E, Gack MU, Martinez-Delgado G, Maharaj NP, Inn KS, Yang HY, Wang R, Aggarwal AK, Jung JU, Garcia-Sastre A. 2010 Negative Role of RIG-I Serine 8 Phosphorylation in the Regulation of Interferon-beta Production, *J Biol Chem.*, 285: 20252-20261.

O'Neill LAJ, Bowie AG. 2010 Sensing and Signaling in Antiviral Innate Immunity, *Current Biology*, 20: R328-R333.

Olejniczak ET, Xu RX, Fesik SW. 1992 A 4d-Hcch-Tocsy Experiment for Assigning the Side-Chain H-1-Resonance and C-13-Resonance of Proteins, *J Biomol NMR.*, 2: 655-659.

Olsen SK, Capili AD, Lu XQ, Tan DS, Lima CD. 2010 Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1, *Nature*, 463: 906-U977.

Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. 2012 Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I, *J Biochem*, 151: 5-11.

Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. 2009 Riplet/RNF135, a RING Finger Protein, Ubiquitinates RIG-I to Promote Interferon-beta Induction during the Early Phase of Viral Infection, *J Biol Chem.*, 284: 807-817.

Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. 2010 The Ubiquitin Ligase Riplet Is Essential for RIG-I-Dependent Innate Immune Responses to RNA Virus Infection, *Cell Host & Microbe*, 8: 496-509.

Pellecchia M, et al. 2008 Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age, *Nat Rev Drug Discov.*, 7: 738-745.

Recht M, Borden EC, Knight E. 1991 A Human 15-Kda Ifn-Induced Protein Induces the Secretion of Ifn-Gamma, *J Immunol.*, 147: 2617-2623.

Rehwinkel J. 2010 Exposing Viruses: RNA Patterns Sensed by RIG-I-like Receptors, *J Clin Immunol.*, 30: 491-495.

Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E, Jr., Darnell JE, Jr. 1987 Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 6394-6398.

Reverter D, Lima CD. 2005 Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex, *Nature*, 435: 687-692.

Rose PW, Luty BA, Schaffer L, Marrone TJ. 1999 Virtual "SAR by NMR.", *Abstr*

Paper Am Chem Soc., 218: U492-U492.

- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. 1995 Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade, *Nature*, 373: 81-83.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. 1994 Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages, *Science*, 265: 1573-1577.
- Serniwka SA, Shaw GS. 2009 The Structure of the UbcH8-Ubiquitin Complex Shows a Unique Ubiquitin Interaction Site, *Biochemistry*, 48: 12169-12179.
- Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A. 2009 TALOS plus : a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts, *J Biomol NMR*, 44: 213-223.
- Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. 1996 Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science*, 274: 1531-1534.
- Skaug B, Chen ZJ. 2010 Emerging role of ISG15 in antiviral immunity, *Cell*, 143: 187-190.
- Soucy TA, Smith PG, Rolfe M. 2009a Targeting NEDD8-activated cullin-RING ligases for the treatment of cancer, *Clin Cancer Res*, 15: 3912-3916.
- Soucy TA, et al. 2009b An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer, *Nature*, 458: 732-736.
- Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M, Inagaki F, Fujita T. 2008 Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses, *Molecular Cell*, 29: 428-440.
- Tanaka N, Taniguchi T. 2000 The interferon regulatory factors and oncogenesis, *Semin Canc Biol*, 10: 73-81.
- Tanaka T, Nakatani T, Kamitani T. 2012 Inhibition of NEDD8-conjugation pathway by novel molecules: Potential approaches to anticancer therapy, *Mol Oncol*.
- Tokgoz Z, Siepmann TJ, Streich F, Jr., Kumar B, Klein JM, Haas AL. 2012 E1-E2 interactions in ubiquitin and Nedd8 ligation pathways, *J Biol Chem*, 287: 311-321.
- Wang J, Taherbhoy AM, Hunt HW, Seyedin SN, Miller DW, Miller DJ, Huang DT, Schulman BA. 2010a Crystal structure of UBA2(ufd)-Ubc9: insights into

- E1-E2 interactions in Sumo pathways, *Plos One*, 5: e15805.
- Wang J, Taherbhoy AM, Hunt HW, Seyedin SN, Miller DW, Miller DJ, Huang DT, Schulman BA. 2010b. Crystal Structure of UBA2(ufd)-Ubc9: Insights into E1-E2 Interactions in Sumo Pathways, *Plos One*, 5.
- Wang JH, Lee B, Cai S, Fukui L, Hu WD, Chen Y. 2009 Conformational Transition Associated with E1-E2 Interaction in Small Ubiquitin-like Modifications, *J Biol Chem.*, 284: 20340-20348.
- Whitmarsh AJ. 2009 Filamin B: a scaffold for interferon signalling, *Embo Reports*, 10: 349-351.
- Williamson MP, Havel TF, Wuthrich K. 1985 Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J Mol Biol.*, 182: 295-315.
- Wishart DS, Sykes BD. 1994 The C-13 Chemical-Shift Index - a Simple Method for the Identification of Protein Secondary Structure Using C-13 Chemical-Shift Data, *J Biomol NMR.*, 4: 171-180.
- Wuthrich K. 2001 The way to NMR structures of proteins, *Nat Struct Biol.*, 8: 923-925.
- Yoneyama M, Fujita T. 2007 Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity, *J Biol Chem.*, 282: 15315-15318.
- Yuan W, Krug RM. 2001 Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein, *Embo Journal*, 20: 362-371.
- Zartler ER, Shapiro MJ. 2006 Protein NMR-based screening in drug discovery, *Current Pharmaceutical Design*, 12: 3963-3972.
- Zhang OW, Kay LE, Olivier JP, Formankay JD. 1994 Backbone H-1 and N-15 Resonance Assignments of the N-Terminal Sh3 Domain of Drk in Folded and Unfolded States Using Enhanced-Sensitivity Pulsed-Field Gradient Nmr Techniques, *J Biomol NMR.*, 4: 845-858.
- Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. 2005 Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 10200-10205.
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, Huibregtse JM, Krug RM. 2004 The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the

E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein,
Proc Natl Acad Sci U S A, 101: 7578-7582.

Zuiderweg ERP, Fesik SW. 1989 Heteronuclear 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy
of the Inflammatory Protein C5a, *Biochemistry*, 28: 2387-2391.

Ek A. Kullanılan Kimyasal ve Enzimler

KİMYASAL ADI	MARKA
Agarose	sigma
Agar agar	merck
Amonyum klorid	JT baker
Amonyum sülfat	merck
Ampicillin-natriumsalz	applichem
Borik acid	JT baker
Bromo phenol blue	JT baker
Kalsiyum klorid dihidrat	merck
Kobalt 2 klorid hexahidrat	sigma
Coomassie brillant blue	applichem
Bakır 2 klorür	merck
Edta	applichem
D(+)glukoz monohidrat	riedel de haen
Glisin	applichem
Guanidium klorid	merck
L-histidin monohidroklorid monohidrat	merck
İmidazol	fluka
Demir 3 klorid	merck
Kanamisin sülfat	Applichem
Demie 2 nitrat	Merck
magnezyum klorürhexahidrat	JT baker
magnezyum sülfat hexahidrat	JT baker
manganez 2 klorid tetrahidrat	Fluka
nikel 2 sülfat hexahidrat	Merck
pepton	Merck
potasyum klorid	Merck
potasyum dihidrojen fosfat	Merck

polietilen glikol 3350	Sigma
potasyum hidroksit	JT baker
sodyumhidrojen fosfatdihidrat	merck
disodyumhidrojen fosfat dihidrat	Merck
sodyum klorid	Merck
sodyum hidroksit	JT baker
sodyum dodesil sülfat	Fluka
tris	JT baker
üre	Merck
yeast	Criterion
zinc klorid	Fluka
T4 DNA ligaz	Fermentas
BamHI	Fermentas
HindIII	Fermentas
DpnI	Fermentas

EK B. BESİYERİ, ÇÖZELTİ VE TAMPONLAR

Bakteriyel besiyerleri

Luria-Bertani sivi besiyeri

10 g NaCl, 5 g maya ekstraktı, 10 g pepton 950 ml d.H₂O içerisinde çözülerek 5 N NaOH yardımı ile pH 7.0'ye ayarlanmış ve çözelti 1 litreye tamamlanmıştır.

Luria-Bertani kati besiyeri

10 g NaCl, 5 g Maya ekstraktı, 10 g Pepton, 15 g Agar 950 ml dd.H₂O içerisinde çözülerek 5 N NaOH yardımı ile pH:7 ye ayarlanmış ve çözelti 1 litreye tamamlanmıştır.

M9 minimal besiyeri ve stok çözeltileri

2800 ml hacimli flask içerisinde 800 ml d.H₂O otoklavlanmış ve ardından içerisine sirasi ile 2 ml 1 M MgSO₄ , 500 ul 0.2 M CaCl₂, 1 ml 1000x Vitamin çözeltisi, 1ml 1000x metal çözeltisi, 200 ml 5x M9 tuzları karışımı, 20 ml %20'lik glikoz çözeltisi ve gerekli antibiyotikler eklendi.

5x M9 Tuzları karışımı (1 litre)

64 g Na₂HPO₄.7H₂O,

15 g KH₂PO₄,

2.5 g NaCl,

5 g NH₄Cl 950 ml d.H₂O içerisinde çözülmüş, 1 litreye tamamlanmış ve otoklavlandı.

Metal çözeltisi (Trace Metal Solution)

8.1 g FeCl₃.6H₂O

1.2 g ZnSO₄.7H₂O

2.1 g CoCl₂ .6H₂O

2.1 g Na₂MoO₄.2H₂O

2,4 g CuSO₄.5H₂O

600 mg H_3BO_3

1,5 g $MnSO_4$

15 ml konsantre HCl icerisinde cozulmus ve 258 ml dd. H_2O eklenerek cozulmustur REF Jansson High leve production of uniformly (Jansson et al. 1996).

1000x Vitamin cozeltisi

0.4 g Pantotenik Asit kalsiyum Tuzu,

0.4 g kolin klorur,

0.4 g Folik asit,

0,8 g myo-inositol,

0,4 g nikotin amid,

0,4 g paradoksal hidroklorur,

0,04 g riboflavin,

0,4 g thiamin hidroklorur 800 ml dd. H_2O icerisinde cozulerek pH 7.2ye ayarlandi (Jansson et al. 1996).

Stok Tampon cozelti

10x Fosfat Tampon Cozeltisi (PBS)

80 g NaCl, 2 g KCl, 17.74 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 2.4 g KH_2PO_4 950 ml dd. H_2O icerisinde cozuldu ve pH:7,4 e ayarlandiktan sonra 1 litreye dd. H_2O ile tamamlandi.

10x Tris Tampon Cozeltisi (TBS)

1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl 900 ml dd. H_2O icerisinde cozuldu ve konsantre HCl ile pH:7,4 e ayarlandiktan sonra 1 litreye dd. H_2O ile tamamlandi.

50x Tris-Asetik asit-EDTA Tampon Cozeltisi (TAE)

900 ml dd. H_2O icerisinde 242 g Tris, 57.1 ml glacial asetik asit ve 18.6 g EDTA eklendi ve karisim cozukdukten sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandi.

SDS-PAGE stok cozelti

Ayirma Jel Tamponu (200 ml)

72.5 g Tris, 0.6 g SDS 180 ml d. H_2O icerisinde cozuldu, pH 8.45'e ayarlandi ve 200

ml'ye tamamlandı.

Yükleme jel Tamponu (100 ml)

6.05 g Tris 90 ml d.H₂O içerisinde çözülür ve pH: 6.8'e ayarlandıktan sonra d.H₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

2x Jel Yükleme Boyası

1.6 ml 1 M Tris(pH: 6.8), 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml B-merkaptoethanol, 4 mg Bromfenolblue, 1.4 ml d.H₂O karışımı çözülerek kullanılabilecek kadar + 4 °C'de saklandı.

10x Anot Tampon Çözeltisi

35.6 g Tris 200 ml dd.H₂O içerisinde çözülür ve son hacim dd.H₂O 250 ml'ye tamamlandı.

10x Katot Tampon Çözeltisi

7.5 g Tris, 36 g Glisin, 2,5 g SDS 200 ml dd.H₂O içerisine eklenerek çözülür ve son hacim 250 ml'ye dd.H₂O ile tamamlandı.

Jel Boyama Çözeltisi (Staining Solution)

0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 20 ml asetik asit, 100 ml Methanol ve 80 ml d.H₂O içerisinde çözülür.

Jel Boya Çıkarma Çözeltisi (Destaining Solution)

20 ml methanol, 10 ml Asetik asit 170 ml d.H₂O içerisine karıştırıldı.

Diğer çözeltiler

1x TSS (100 ml)

10 gram PEG 3350, 0.86 gram MgSO₄·7 H₂O ve 5 ml DMSO 80 ml LB içerisinde çözülür ve ardından 100 ml'ye LB ile tamamlandı ve ardından 0.22 µm steril filtre ile filtrelendi.

1 M IPTG

2,38 gram IPTG 9 ml dd.H₂O içerisinde çözülür ve ardından 10 ml'ye dd.H₂O ile tamamlandı ve 0.22 µm filtre ile filtrelenerek 1 ml'lik hacimlere bölündü ve - 20 °C'de saklandı.

EK C. MAKİNA VE TEÇHİZAT

<u>Makina / Teçhizat ismi</u>	<u>Markası</u>
NMR	Bruker
Derin Dondurucu -20 °C	Vestel
Buzdolabı	Vestel
Derin Dondurucu -80 °C	New Brunswick Scientific
Elektroforez Tankı	BİO-RAD
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Mini Santrifüj	Hettich
Otoklav	Hirayama
pH metre	İno Lab
Vorteks	Yellow line
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Sonikasyon Cihazı	HD
Akta Prime Plus protein saflaştırma sistemi	GE
Hassas Terazı	Ohaus
Mikro Dalga Fırın	Arçelik
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
UV-Spektrometre	Shimadzu
Mikropipetle	Nichipet
PCR cihazı	Bio-RAD
Etüv	Nüve

ÖZGEÇMİŞ

ÇAĞDAŞ DAĞ
dagcagdas@gmail.com

Kişisel

DOĞUM TARİHİ : 1987

DOĞUM YERİ : İZMİR

Eğitim

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU

KİMYA ANABİLİM DALI (Yapısal Biyoloji ve Biyokimya)YÜKSEK LİSANS (2009-2012)

AUTONOMA DE BARCELONA FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE BİYOKİMYA (Şubat,2012- Temmuz 2012)

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ (Çift Anadal Programı) (2010)

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ

KİMYA BÖLÜMÜ (2009)

İZMİR ATATÜRK LİSESİ

(İngilizce, Anadolu Bölümü) (2005)

İş Tecrübeleri ve Stajlar

UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON, USA

BIYOKİMYA BÖLÜMÜ

Ziyaretçi Öğrenci (Mayıs 2011-Ağustos 2011)

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ

KİMYA BÖLÜMÜ

Asistan Öğrenci (Ocak 20011-Şubat 2012)

MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, MILWAUKEE, USA

BIYOKİMYA BÖLÜMÜ

LABORATUVAR ASİSTANI (Haziran 2010 – Ekim 2010)

T.C. İZMİR BORNOVA BELEDİYESİ ÇEVRE DENETİM MÜDÜRLÜĞÜ

GIDA DENETİM BÖLÜMÜ (Haziran 2006 – Ağustos 2006)

Proje Deneyimi

Araştırmacı MU-Bap projesi- RNF125, RIG-I cards domain ve Trim25 SPRY domainlerini klonlanması, üretimi ve saflaştırılması

Bursiyer- 110T517- Yeni Azo Bileşiklerinin Ve Azo-Metal Komplekslerinin Sentezi, DNA Bağlanma Ve Kesme Özelliklerinin Belirlenmesi

Araştırmacı-Great Lakes Regional Center of Excellence for Biodefense and Emerging Infectious Diseases Research (GLRCE) Projesi- Phage lysins as novel anti-bacterial agents (Medical College of Wisconsin)

Proje Yürütücülüğü- Tübitak lisans projesi-İnsan ISG15 ve ubiquitin E2 enzimlerinin klonlanması, ekspresyonu ve yapısal çalışmalarda kullanılmak üzere ¹⁵N ve ¹³C işaretli olarak üretilmesi

Araştırmacı-TUBITAK 104T193-Ubiquitin aktive Edici E1 Enziminin (HsUba1a) Ubiquitin Benzeri Domaininin Üç boyutlu Yapısının ve Ubiquitin Konjugasyon Sistemindeki Diğer Bileşenler İle Etkileşimlerinin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Yöntemleri İle Belirlenmesi

Makaleler

-E2 Binding Surface on Uba3 β -grasp Domain Undergoes a Conformational Transition, Elgin, ES; Peterson, FC; Volkman, BF; Dag, C; Haas, AL **Proteins Structure, Functions and Bioinformatics** published online: 31 JUL 2012 DOI: 10.1002/prot.24148

-Overexpression, Purification, Refolding and stability studies of Interferon Stimulated Gene 15 Activating Enzyme Ubiquitin Fold Domain for NMR studies, Dag, C; Ziarek JJ; Elgin, ES **Protein Expression and Purification (manuscript in preparation)**

Uluslararası Kongrelerde gerçekleştirilen Poster Sunumları

The 35th Steenbock Symposium 'Advances in Biomolecular NMR, Madison, USA, Temmuz 2011

E2 Binding Surface on Uba3- β -grasp Domain Undergoes a Conformational Transition in the Free Form

2010 Chemical and Biological Defense Science and Technology (CBD S&T) Conference, Chicago. USA, Eylül 2010

“The PlyG receptor is an essential polysaccharide cell wall component unique to *Bacillus anthracis*”

Ulusal Kongrelerde gerçekleştirilen Sözlü Sunumları

26. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla, Ekim 2012

“ISG15 Aktive Edici E1 Enzimi Ube1L-UF Domaininin NMR Solüsyon Yapısının Belirlenmesi”

Ulusal Kongrelerde gerçekleştirilen Poster Sunumları

26. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla, Ekim 2012

“İnsan RIG-1 CARDs Domainlerinin ve Bu Domainlerin Ubikuitilasyonunda Rol Oynayan Çeşitli E3 Enzimlerinin Yapısal Çalışmalar İçin Üretilmesi”

Uluslararası Katılımlı ITU 5. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, İstanbul, Ağustos 2011

“Cloning, expression and purification of human RIG-I CARDs in *E.Coli* and optimization of expression conditions for soluble protein expression”

“Ubiquitin ve Ubiquitin Benzeri Ökaryotik Post-Translasyonel modifikasyon sistemleri”

2. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, Bolu, Haziran 2011

“İnsan UbcH8 proteininin bakteriyel sistemdeki çözünür ekspresyon düzeyinin GB1 çözünürlük tagı yardımı ile artırılması”

Kromatografi Kongresi, Trabzon, 2010

“Rekombinant İnsan ubiquitin aktive edici E1 enzimi beta gras domaininin Ni Sepharose kolonu üzerinde katlanması”

Katılınan Sempozyum ve Kurslar

1. **26. Ulusal Kimya Kongresi**, Muğla (Ekim, 2012)
2. **Bio-NMR 2012**, Barcelona, İspanya (Mart, 2012)
3. **NMRFAM Protein Structure Determination Workshop**, Madison, USA (Haziran, 2011)
4. **The 35th Steenbock Symposium 'Advances in Biomolecular NMR**, Madison, USA (Temmuz 2011)
5. **Uluslararası Katılımlı ITU 5. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi**, İstanbul (Ağustos 2011)
6. **Protist 2010**, İstanbul (Nisan 2010)
7. **KATÜ Kromatografi 2009**, Trabzon (Eylül 2009)
8. **EGE Üniversitesi Protein Analitiği Yaz Okulu**, Bodrum (Eylül 2009)
9. **EGE Üniversitesi 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi**, İzmir (Ağustos 2008)
10. **Ulusal afinite teknikleri Kongresi**, Marmaris (Mayıs 2008)
11. **BIOMED 2008**, Marmaris (Mayıs 2008)
12. **İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi**, İstanbul (8-11 Eylül 2007)