



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACANTHAMOEBA CASTELLANII' DEN HSP70 GENİNİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KÜBRA AÇIKALIN COŞKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS

2013

KÜBRA AÇIKALIN COŞKUN

ACANTHAMOEBA CASTELLANII' DEN HSP70 GENİNİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

SİVAS
2013

T.C.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ACANTHAMOEBA CASTELLANII* DEN HSP70 GENİNİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

KÜBRA AÇIKALIN COŞKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEMRA ÖZÇELİK**

SİVAS

2013

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

[Proje No: T-502].

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

ÖZET

ACANTHAMOEBA CASTELLANII DEN HSP70 GENİNİN İZOLASYONU VE KAREKTERİZASYONU

KÜBRA AÇIKALIN COŞKUN

Yüksek Lisans Tezi, Parazitoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK

2013, 83 sayfa

Miktarı genellikle stres altında artan ve moleküler şaperon olarak da adlandırılan proteinlere ısı şok proteinleri (heat shock protein) denir. Isı şok proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını, membranlar arası protein translokasyonunu, proteinlerin agregasyonunun önlenmesini ve zarar görmüş proteinlerin degradasyon için hedeflenmesini sağlarlar. Organizmalar arasında yüksek oranda korunmuşlardır. Hsp'ler molekül ağırlıklarına göre adlandırılırlar ve hücrel strese yanıtta Hsp70 biyokimyasal mekanizmanın kalbidir.

Acanthamoeba castellanii insanlarda çoğunlukla Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE) ve keratite sebep olan amip türüdür. Parazit ve konak etkileşimleri sırasında konak strese girmekte ve bu stresle baş edebilmek için kendi Hsp'lerini kullanmaktadır. *Acanthamoeba* Hsp70 (AcHsp70) konak-parazit ilişkisi sırasında çok önemlidir. Literatürde *Plasmodium falciparum* ile yapılan çalışmalara göre parazit Hsp70'i konak Hsp70 lerine benzediği için konak immün sistemi tarafından ayırt edilememektedir. Bu nedenle AcHsp70'in özelliklerinin bilinmesi, parazit-konak immün sistemini modifiye etmek açısından önemlidir. İmmün sistemin modifiye edilmesi çalışmalarına bir başlangıç olması amacıyla bu çalışmada AcHsp70'in izolasyonunu ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirdik.

Yaptığımız çalışmada Pubmed veri tabanından yararlanarak biyoinformatik yollarla primerler dizayn edilip PCR ile AcHsp70 açık okuma penceresi elde edilmiştir. Bu pencere ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* hücrelerine transforme edilip AcHsp70 rekombinant proteini elde edildi. Elde edilen AcHsp70 proteini kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. AcHsp70'in fonksiyonunu belirlemeye yönelik olarak hidrofobik özellikleri, farklı nükleotidler ve peptitler varlığında davranışları, farklı pH ve sıcaklıktaki çözünürlüğü, Gibbs serbest enerjisinin belirlenmesi, protein agregasyonu, ATP hidrolizi ve sıcaklık stresi altında diğer Hsp'ler ile etkileşimi incelendi.

Sonuç olarak AcHsp70 diğer homolog ve ortologlarına benzer özellikler göstermiştir. AcHsp70'in nükleotit dizisi oldukça ünersaldır ve biyoinformatik yollarla tahmin edilen yapıda diğer Hsp70 lere benzemektedir. Dolayısı ile parazit Hsp70 leri genel bir mekanizma ile etki etmekte olup immün sistem çalışmalarında benzer yollarla ayırt edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acanthamoeba castellanii*, ısı şok proteinleri, stres

ABSTRACT

THE ISOLATION AND CHARACTERISATION OF ACANTHAMOEBA CASTELLANII HSP70 GENE

KUBRA ACIKALIN COSKUN

Masters' Thesis, Department of Parasitology

Supervisor: Prof.Dr. Semra OZCELIK

2013, 83 pages

The proteins that are expressed and augmented under stress conditions and called molecular chaperones are Heat shock proteins. Heat shock proteins help folding of nascent peptides, translocation of proteins through membranes, inhibits protein aggregation and send the misfolded proteins for degradation. Hsps are universally protected in organisms. Hsps are named according to their molecular weight and Hsps are at the middle of stress response.

Acanthamoeba castellanii is a common parasite that cause infections. During parasite-host interaction, host is stressed and use its Hsps to overcome the stress. *Acanthamoeba* Hsp70 (AcHsp70) is essential for host-parasite interaction. According to the research in the literature with *Plasmodium falciparum* parasite Hsp70 can not be distinguished by the host due to similarities between host and parasite Hsp70s. For this reason a knowledge of AcHsp70 properties is important in terms of modifying parasite-host immune system. We isolated and biochemically characterised AcHsp70 as a start to immune system modification research.

In this study primers are designed by employing bioinformatics from Pubmed database and AcHsp70 open reading frame is isolated by PCR method. This frame is cloned into an expression vector and transformed into *E. coli* competent cells and AcHsp70 recombinant protein was obtained. This AcHsp70 protein was purified by

column chromatography. To determine AcHsp70 function: hydrophobic properties, behaviour under different nucleotides and peptides, solubility under different pH and temperatures, Gibbs free energy determination, protein aggregation, ATP hydrolysis and interaction with other Hsps under temperature stress were examined.

As a result AcHsp70 showed similarities to its homologs and orthologs. Nucleotide sequence of AcHsp70 is universal and it is similar to the structure that was predicted by bioinformatic methods. Therefore, parasite infect host through a general mechanism and immune system research must be performed in similar action for distinction between host and parasite.

Key Words: *Acanthamoeba castellanii*, heat shock proteins, stress

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK'e,

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde önemli katkıları bulunan ve tezimin her alanında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr Yusuf TUTAR'a,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen Aykut ÖZGÜR'e

Her konuda yanımda olan manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Yrd.Doç.Dr. M. Emre COŞKUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her anında büyük özveriyle davranan ve desteğini hiç eksik etmeyen anneme sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
TEŞEKKÜR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	11
KISALTMALAR DİZİNİ.....	13
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 ACANTHAMOEBA	4
2.1.1 Sınıflandırılmaları.....	4
2.1.2 Biyolojisi.....	7
2.1.3 Yaşam Döngüsü.....	7
2.1.3.1 Trofozoit Formu.....	9
2.1.3.2 Kist Formu	10
2.1.4 Çevre ve Klinik Ortamda Dağılımı.....	11
2.2 ISI ŞOK PROTEİNLERİ (HSP).....	11
2.2.1 Protein katlanmaları	11
2.2.2 Isı Şok Proteinlerinin Yapı Ve Görevleri	12
2.2.3 Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler	15
2.2.4 Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışındaki Görevleri.....	15
2.2.5 Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık	16
2.2.6 Önemli Hsp Aileleri.....	16
2.2.7 Hsp70 Ailesi	17
2.2.8 Hsp70'in Domain Yapısı	18
2.2.9 Hip, Hop ve CHIP.....	22

2.2.10 Hsp70 – Kanser - Apoptozis.....	22
2.3 PROTEİN SAFLAŞTIRMA.....	23
2.3.1 Kromotografi	24
2.3.2 Elektroforez	25
2.3.2.1 SDS-Gel Elektroforezi.....	26
2.3.3 Floresan Spektroskopisi.....	27
2.3.4 FTIR ve Protein Uygulamaları	31
2.3.4.1 Kromoforlar	31
3. MATERYAL-METOD.....	34
3.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih.....	34
3.2 Kullanılan Malzemeler	34
3.3 Kullanılan Cihazlar	34
3.4 <i>Acanthamoeba castellanii</i> ' nin Eldesi	34
3.5 <i>Acanthamoeba castellanii</i> ' den Total RNA Eldesi.....	35
3.6 cDNA Sentezi	36
3.7 Primer Dizaynı.....	38
3.8 PCR.....	38
3.9 Amplifiye Edilen DNA'nın Tespiti	40
3.10 Çoğaltılan DNA'nın pET 161 Ekspresyon Vektörüne Aktarımı.....	40
3.11 Ekspresyon Vektörünün Kompedan E.coli Hücrelerine Aktarımı	42
3.12 LB Besiyeri ve Plate Hazırlanması.....	42
3.13 Protein Saflaştırılması ve Yapı tayinleri.....	43
3.13.1 Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanması	43
3.13.2 SDS PAGE için Hücrelerin Parçalanması	43
3.13.3 SDS PAGE Analizi.....	43
3.13.4 Hücrelerin Parçalanması	45
3.13.5 Hsp70 Proteininin Saflaştırılması	46

3.13.6	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile <i>A.castellanii</i> Hsp70' inin Yapı Analizi.....	46
3.13.7	AcHsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri.....	47
3.13.8	UV-VIS Spektroskopisi.....	48
3.13.8.1	Söndürme (Quenching).....	48
3.13.9	Lusiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri	48
3.13.10	ATP Hidroliz Deneyi.....	48
4.	BULGULAR.....	50
4.1.	AcHsp70 in dizi analiz sonucu	65
4.2	PCR ürünün agaroz jel ile görüntülenmesi.....	66
4.3	AcHsp70 proteininin SDS-PAGE jel ile görüntülenmesi.....	66
4.4	Fluoresan Spektroskopisi.....	67
4.4.1	Emisyon Spektroskopisi	67
4.4.2	Denaturasyon	68
4.4.3	Söndürme deneyleri	69
4.5	Luminesans spektroskopisi.....	70
4.6	ATP hidrolizi	71
4.7	FTIR analizleri.....	72
5.	TARTIŞMA-SONUÇ.....	73
6.	KAYNAKLAR.....	76
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	83

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2. 1 <i>Acanthamoeba</i> türlerinin kist morfolojisine göre yer aldığı gruplar.....	18
Tablo 2.2 Isı Şok Proteinlerini Artıran Sebepler.....	29
Tablo 2.3 Önemli Hsp Aileleri.....	30
Tablo 3.1 PCR Karışımları.....	54
Tablo 3.2 Klonlama protokolü.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Rrna sekansına göre protistaların sınıflandırılması	19
Şekil 2.2 <i>Acanthamoeba</i> türlerine ait kistlerin büyüklük ve şekline göre ayrımı.....	20
Şekil 2.3 Transmisyon elektron mikroskopunda (tem) uygun şartlardaki trofozoit ve kötü şartlardaki kist formu görüntüsü.....	21
Şekil 2.4 <i>Acanthamoeba</i> türlerinin yaşam döngüsü.....	22
Şekil 2.5 <i>Acanthamoeba</i> trofozoitinin, scanning elektron mikroskopundaki (sem) görüntüsü (a), tem görüntüsü (b), sıvı besiyerinde inverted mikroskop görüntüsü (c).....	23
Şekil 2.6 <i>Acanthamoeba</i> kistinin scanning elektron mikroskopundaki (sem) görüntüsü (a), tem görüntüsü (b), sıvı besiyerinde inverted mikroskop görüntüsü (c).....	23
Şekil 2.7 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları.....	26
Şekil 2.8 Isı şok proteinlerinin fonksiyonları.....	28
Şekil 2.9 Sığır hsp70'in yapısı.....	31
Şekil 2.10 Sığır hsp70'in atpaz domain yapısı.....	33
Şekil 2.11 Sığır hsp70'in substrat bağlanma domain yapısı.....	34
Şekil 2.12 Hhsp70'in üre ile denaturasyon eğrisi.....	44
Şekil 3.1 Cdna sentezi.....	51
Şekil 3.2 Pcr stratejisi.....	53
Şekil 3.3 Topoizomeraz'ın çalışma prensibi.....	56
Şekil 3.4 Pet 161 vektör haritası.....	56
Şekil 4.1. Pcr ürünü agaroz jel görüntüsü.....	66
Şekil 4.2 Achsp70 sds-page jel görüntüsü.....	66

Şekil 4.3 Hsp70 proteininin atp (kesikli çizgi), adp (kesiksiz çizgi) ve nükleotitsiz (nokta) hallerinin içsel emisyon spektrumu. uyarma 290 nm dalga boyunda yapılip giriş ve çıkış yarıkları 5 nm dir.....	67
Şekil 4.4 Hsp70 yapısının farklı üre konsantrasyonlarında bozunmas.....	68
Şekil 4.5 Akrilamid söndürme deneyleri. hsp70 (●), hsp70 ve adp (▲).....	69
Şekil 4.6 Hiçbir etmen yok(◆), hsp70(◆), hsp70 ve atp(■), hsp70 ve sitozol(▲)....	70
Şekil 4.7 Eşlenik analiz ile atp hidroliz tayini.....	71
Şekil 4.8 Nükleotid varlığı ve yokluğunda hsp70 ftır spektrumları.....	71

SİMGELER DİZİNİ

°C	:Celcius
µm	:Mikrometre
ml	:Mililitre
%	:Yüzde
L	:Litre
g	: Gram
mg	: miligram
dk	: dakika
µg	: mikrogram
sn	: saniye
µl	: mikrolitre
cm	: santimetre
mM	: milimolar
nm	: nanometre

KISALTMALAR DİZİNİ

- ADP = Adenozin difosfat
- APS = Amonyum per sülfat
- ATP = Adenozin trifosfat
- BSA = Sığır serum albümini
- DEAE = Dietilaminoetil
- DNA = Deoksiribo nükleik asit
- DnaK = *E.coli* Hsp70 analogu
- DTT = Ditiotireitol
- *E.coli* = *Escherichia coli*
- EDTA = Etilendiamin tetra asetik asit
- FTIR = Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
- GAE = Granülomatöz Amibik Ensefalit
- GrpE = Nükleotit değişim faktörü
- HCl = Hidroklorik asit
- Hsp70 = Heat shock (ısı şok) protein 70
- IR = Infrared Spektroskopisi
- PMSF = Fenilmetilsülfonilflorit
- SDS-PAGE = Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamit jel
- Sup35 = Ökaryotlarda Sub45 ile translasyonu durduran protein
- Sup45 = Ökaryotlarda Sub35 ile translasyonu durduran protein
- TEMED = N,N,N'N' – tetrametiletilediamin
- TEM = Transmisyon electron mikroskobu
- SEM = Skaning Elektron Mikroskobu
- tRNA = Taşıyıcı Ribonükleik asit
- UV-VIS = Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Çevrede toprak ve tatlı sularda oldukça yaygın olarak bulunan protozoonlar arasında olan *Acanthamoeba* türleri amiplerin Amoebida takımının, Acanthapodina alt takımının Acanthamoebidae ailesindedir. Bu tür amipler, granümatöz amibik ensefalit, kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler. *Acanthamoeba*'nın birçok türünün insanda patojen etki gösterdikleri saptanmıştır. *A. castellanii* türü hem GAE hemde keratit olgularından izole edilmiştir. GAE'nin büyük olasılıkla akciğer, deri veya mukozal ülserden kaynaklandığı ve merkezi sinir sistemine [MSS] kan yoluyla geldiği ileri sürülmüştür. *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu keratit, amiplerin kornea ile direkt teması sonucu ortaya çıkmaktadır. Sonuçta göz ve görme kaybına yol açabilir [1,2].

A.castellanii (Neff) serbest yaşayan amiplerde en fazla çalışılan tür olup topraktan ve sulardan izole edilmiştir. Evrimsel açıdan *A. castellanii* Protamoebae ailesindedir. Genom dizisinin bilinmesi orijinin anlaşılması yanında dizileri yapılmış *Dictyostelium discoideum* ve *Entamoeba histolytica* gibi diğer amiplerle karşılaştırılarak önemli özelliklerinin ortaya çıkarılmasına da katkıda bulunur. *A. castellanii* genom dizisi amip yaşam stili, düşük oksijen ortamlarına adaptasyon gibi fonksiyonel genomik uygulamalarının araştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Ayrıca dizi amip konağı ve simbiyozu arasında gen transferinin anlaşılmasında ve hücre içi patojenlerin ve amip konaklarının incelenmesinde iyi bir model olacaktır. Genom verileri farklı patojenlerin ve patojen olmayan amiplerin karşılaştırılmasında, hücre içi patojenlerin ilişkileri ve farklı çevrelerde protozoonların işlevlerinin anlaşılmasında önemlidir [3].

Parazit ve konak organizmanın her ikisi de etkileşimleri sırasında zararlı etkilerden korunmak için Hsp lerden yararlanmaktadır. Hspler'in çoğu patojenin dominant antijenidir. Patojen ve konak otoimmün yanıtı oluştururlar. Aslında Hsp ve immün sistem arasında bir bağıntı vardır [4]. *A. castellanii* diğer canlılarda olduğu gibi streslere yanıt verebileceği bir mekanizmaya sahiptir. Bu parazitin farklı streslere karşı vereceği yanıt parazitin yaşam döngüsünde oldukça önemlidir. Yaşam döngüsü bu parazitin yok edilmesi açısından önemli olduğu için *A. castellanii* Hsp70'i biyokimyasal olarak incelenecektir.

Hücresel strese yanıt verebilmek, protein agregasyonuna dayalı metabolik bozuklukları gidermek veya agregat oluşum mekanizmasını moleküler seviyede önleyen proteinlerin yapısı ve fonksiyonun bulunması çeşitli hastalıkları önleme açısından önemlidir. Ökaryotlarda bu mekanizmanın merkezinde yer alan Hsp ler hakkında henüz yeterli bilgi birikimi yoktur. *S. cerevesiae* üzerinde yapılan çalışmalar ise sürmektedir [5]. Hücrede aynı kompartmanda niçin birden fazla Hsp70 olması ve bazılarının stres altında ekspresyonu henüz anlaşılamamıştır. Hsp70 üzerine yapılan öncül genetik çalışmalar ATPaz domainin [ünitesinin] önemli bir görev teşkil ettiği tespit edilmiştir. Bu domainin diğer domainlerle etkileşimi ve bu etkileşimin agregatlar üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bağlanma sabitlerinin kullanılan substrata göre değişmesi ve ATP hidrolizi sırasında meydana gelen konformasyon değişikliğinin bilinmemesi domainler arasındaki ilişkinin bulunmasını gerekli kılmaktadır. Ayrıca bağlanmadaki bu farklılık niçin her protein agregat oluşturmayıp priona sebep olmadığına yanıtı olabilir. Bunlara ilaveten artan substrat konsantrasyonunun hidrolizi artırması mekanizmayı daha ilginç hale getirmekte ve Hsp70 de hidrolizin mi yoksa bağlanmanın mı önce olduğunun bulunmasını gerekli kılmaktadır [6,7].

A. castellanii'den Hsp70 henüz elde edilememiştir. Genomu veritabanlarında olan bu organizmanın bu önemli ısı şok proteini izole edilip karakterize edilecektir. AcHsp'ler konak-parazit ilişkisi sırasında önemlidir. *A. castellanii*'ye özgün AcHsp'lerin özelliklerin bilinmesi bu parazitin fonksiyonelliğinin azaltılması, parazit-konak immün sistemini modifiye etmek açısından önemlidir. Bu amaç doğrultusunda aşağıda belirtilen plan gerçekleştirilmiştir.

A. HSP70 genlerinin eldesi

1. cDNA oluşturulması ve/veya genom taranması
2. Diğer organizmalar ile homoloji sağlanarak primer dizaynı (birden fazla Hsp70 tespiti için)
3. PCR
4. Restriksiyon sindirimi, subklonlama ile çoğaltma
5. Ekspresyon vektörüne ilgili genin alınması, indüksiyon
6. İlgili proteinin farklı reçineler ile saflaştırılması

B. Hsp70 fonksiyonu

1. Hidrofobik özellikleri
2. Farklı nükleotitler ve substrat peptitler varlığında davranışları
3. Farklı pH ve sıcaklıklarda çözünürlükleri
4. Gibbs serbest enerjisinin belirlenmesi
5. ATP hidrolizi
6. Sıcaklık stresi altında koşaperonlarla etkileşimi

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ACANTHAMOEBA

Acanthamoeba türleri serbest yaşayan amiplerdir ancak koşullar oluştuğunda parazitik yaşama geçebilen toprakta, kaynak ve içme sularında, yiyeceklerde bol miktarda bulunan ve insan vücuduna girerek hastalık meydana getiren canlılardır. Bu tür amipler, GAE, kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba keratiti* ve AIDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirebilirler.

Acanthamoebalar fagositik canlılardır ve *E. coli* gibi mikroorganizmalarla beslenirler [8-10].

2.1.1 Sınıflandırılmaları

Acanthamoeba türü amipler ilk kez 1913 yılında Puschkarew tarafından tozdan izole edilmiş ve *Amoeba polyphagus* olarak adlandırılmıştır. Ardından 1931 yılında Castellani kontamine olmuş maya kültür plaklarından amipleri izole etmiş ve *A. castellanii* olarak adlandırmıştır [9,10].

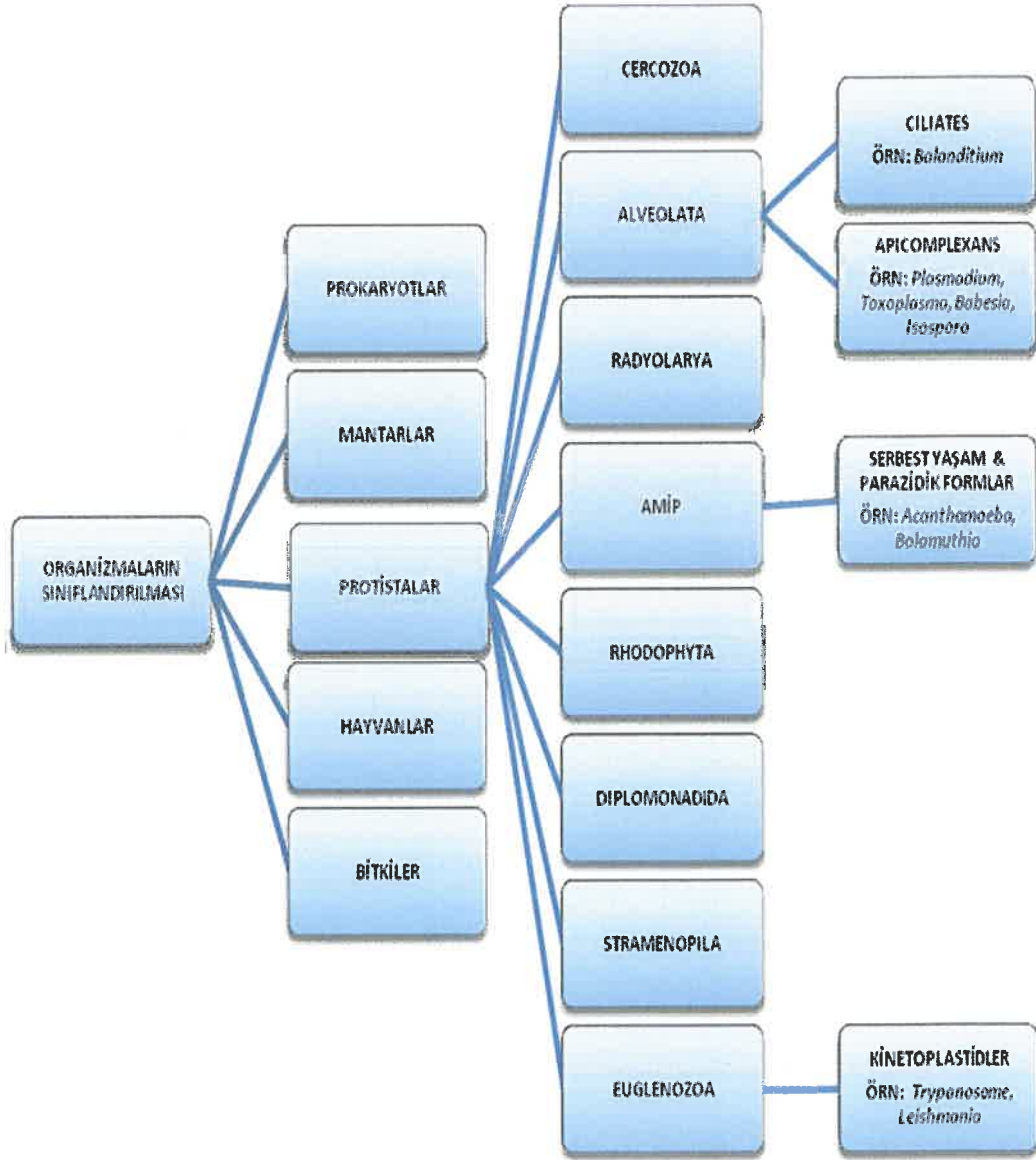
Acanthamoebalar yirmi dörtten fazla türe sahiptir ve morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal kriterler göz önüne alınarak üç farklı gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki türlerin kist büyüklüğü 16-30 μm 'dir, endokist ile ekzokist arasında oldukça büyük fark vardır ve endokist yıldız şeklindedir. İkinci gruptaki kistlerin büyüklüğü ise 18 μm veya daha düşüktür. Ekzokistler buruşmuş bir görünümde ve ekzokistler ise yıldız, üçgen yada yuvarlak şekildedir. Üçüncü gruba giren türlerin ise kist yapıları diğerlerin farklıdır ve küçüktür. Ekzokist düz biçimdedir ve endokist ile ekzokist arasında mesafe çok azdır. Bu gruplara göre türlerin hangi gruba girdiği Tablo 1' de görülmektedir. *Acanthamoebaların* 7 türü insanda çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu türler *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes*' dir [9,10].

TÜRLER	SUŞ TIPLERİ ^a	SEKANS TIPLERİ	GRUP	İZOLASYON ^b
<i>A. astronyxis</i>	30137	T7	I	Su
<i>A. castellani</i>	30011	T4	II	Maya Kültürü
<i>A. commondani</i>	30135	T9	I	Bahçe Humusu
<i>A. culbertsoni</i>	30171	T10	III	Maymun Böbrek Hücre Kültürü
<i>A. divionensis</i>	50238	-	II	Toprak
<i>A. echinulata</i>	50239	-	I	Gübre
<i>A. griffini</i>	30731	T3	II	Deniz Suyu Örneği
<i>A. hatchetti</i>	30730	T11	II	Liman Çökeltisi
<i>A. healyi</i>	CDC:1283:V013	T12	III	Beyin Dokusu
<i>A. jacobsi</i>	30732	-	III	Deniz Birikintisi
<i>A. lenticulata</i>	30841	T5	III	Yüzme Havuzu
<i>A. lugdunensis</i>	50240	T4	II	Havuz
<i>A. mauritaniesis</i>	50253	T4	II	Kanalizasyon Çamuru
<i>A. palestinensis</i>	30870	T2	III	Toprak
<i>A. pearcei</i>	50435	T3	I	Kanalizasyon Birikintisi
<i>A. polyphaga</i>	CCAP1501/3A	T4	II	Gölet
<i>A. pustulosa</i>	50252 [GE3a]	T2	III	Havuz
<i>A. quina</i>	50241	-	II	Yüzme Havuzu
<i>A. rhysodes</i>	30973	T4	II	Toprak
<i>A. royreba</i>	30884	T4	III	İnsan Korikarsinom Hücreleri
<i>A. stevensoni</i>	50438	T11	II	Yumuşakça Yatağı
<i>A. triangularis</i>	50254	T4	II	İnsan Dışkısı
<i>A. tubiashi</i>	30867	T8	I	Nehir Yatağı

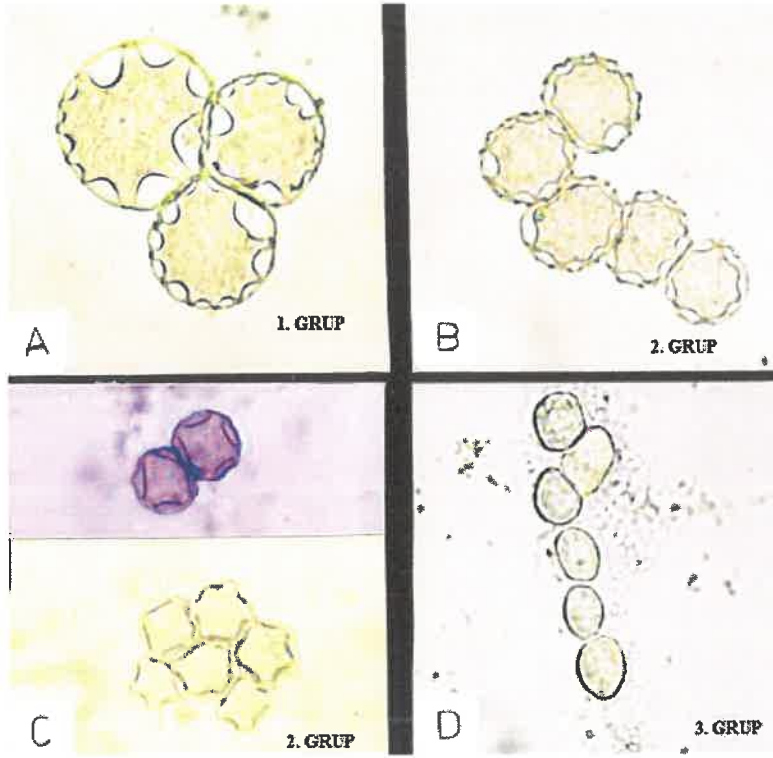
Tablo 2. 1 *Acanthamoeba* türlerinin kist morfolojisine göre yer aldığı gruplar [11]

^a ATCC' a göre numaraları

^b Suşun orijinal izolasyon yeri



Şekil 2.1 rRNA sekansına göre protistaların sınıflandırılması [9]



Şekil 2.2 *Acanthamoeba* türlerine ait kistlerin büyüklük ve şekline göre ayrımı [9,10].

2.1.2 Biyolojisi

Ozmotik basıncı dengelemek için su atımına yarayan bir veya daha fazla miktarda kontraktıl vakuollere sahiptirler. Sitoplazma içerisindeki diğer tip vakuoller ise içerisinde lizozim, sindirim vakuolleri ve yüksek sayıda glikojen içeren vakuollerdir. Plazma zarı %33 oranında protein içerirken, %25 oranında fosfolipid, %13 oranında sterol, %29 oranında lipofosfonoglikan içerir [12-13]. *Acanthamoeba* da bulunan önemli fosfolipidler %45 fosfatidil-kolin, %33 fosfatidiletanolamin, %10 fosfatidilserin, %6 oranında fosfoinositid ve %4 oranında difosfatidilgliserol' dur [14].

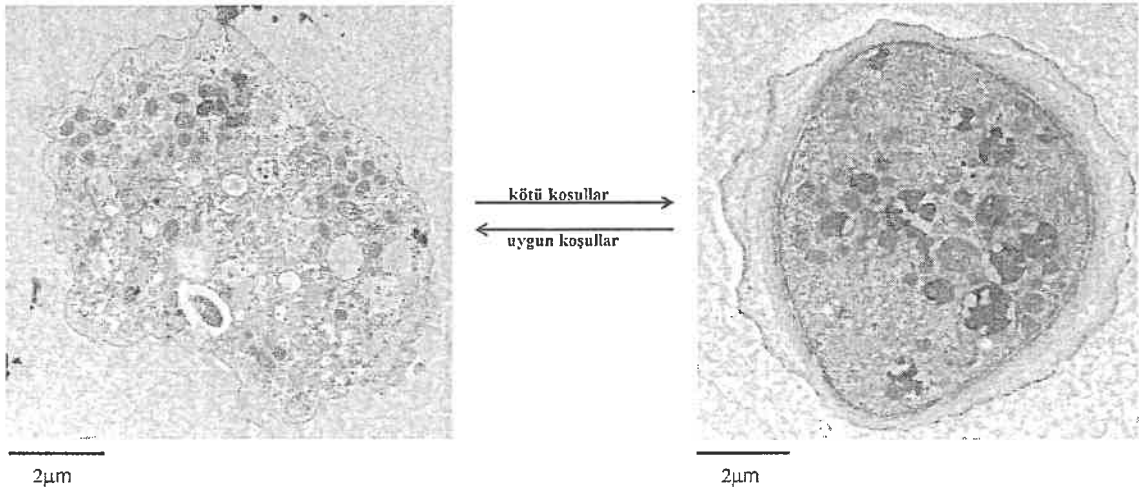
Acanthamoeba trofozoitleri büyük boyutta mitokondriye sahiptir [şekil 3]. T4 genotipine sahip *A. castellanii*' nin mitokondrial DNA genom boyutu 41,591 bp' dir. T4 genotipine ait *A. castellanii* Neff suşunun genom boyutları yaklaşık olarak 45 Mb' dir [15].

2.1.3 Yaşam Döngüsü

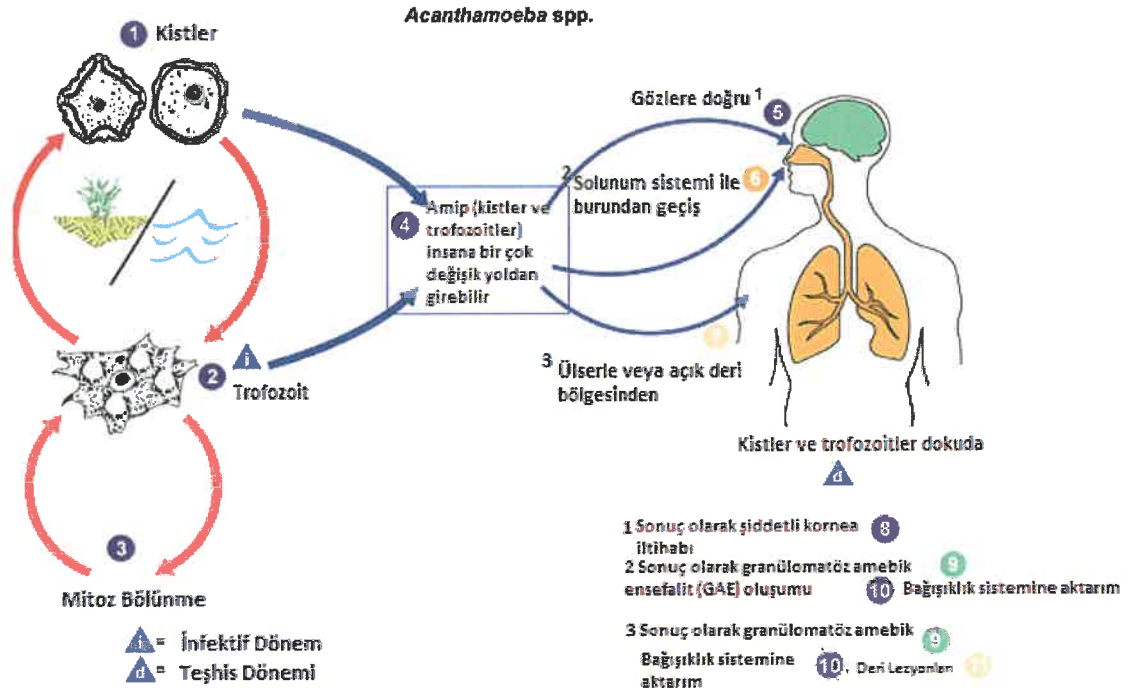
Acanthamoeba türleri zorunlu parazit olmadıklarından bir konak zinciri söz konusu değildir. *Acanthamoebaların* yaşam döngüsü birbirini izleyen iki safhadan oluşmaktadır.

Birincisi çapının yaklaşık olarak 20-40 μm olduğu aktif olarak beslenen büyüyen çoğalan trofozoit formu, ikincisi çapının 13-23 μm olduğu durağan haldeki kist formudur. Trofozoit döneminde *Acanthamoeba*' lar beslenmek için organik partiküller ve başka mikroorganizmalara ihtiyaç duyarlar. Optimum şartların olduğu ortam varlığında (besin, nötr pH, 30°C) mitoz bölünme geçirirler. Yaşadığı ortam şartlarının kötüleşmesi durumunda çift duvarlı kist formuna dönüşürler (şekil 2).

Acanthamoeba' lar, insan vücudunda özellikle MSS ve göz başta olmak üzere deri, akciğer, mukoza ve toraksta yerleşebilirler. Bu amipler, dokuda hem trofozoit, hem de kist halinde bulunurlar [9,10,16-18].



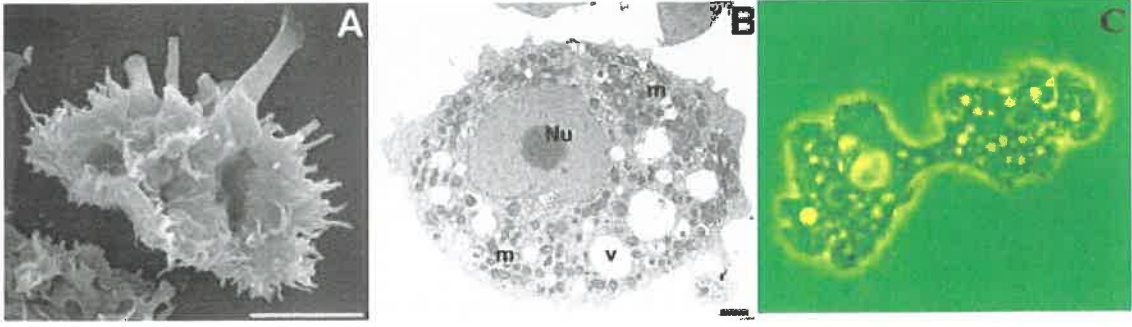
Şekil 2.3 Transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) uygun şartlardaki trofozoit ve olumsuz koşullarda oluşan şartlardaki kist formu görüntüsü [9].



Şekil 2.4 *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü [19].

2.1.3.1 Trofozoit Formu

Acanthamoeba trofozoitleri 1-2 μm büyüklüğündeki akantopod adı verilen dikenimsi yalancı ayaklarıyla kolaylıkla tanımlanabilirler. Bu akantopodları sayesinde yüzeye tutunmayı, hareket etmeyi ve besinleri yakalamayı sağlarlar. Trofozoitler tek çekirdeğe sahiptir ve büyüklüğü bir trofozoitin altında biri kadardır. Düzgün ve kıvrımlı endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, serbest ribozomlar, besin vakuelleri, mitokondri ve mikrotubuller bulunmaktadır. *Acanthamoebalar* bu safhada aktif olarak bakteri, mantar, alg ve küçük organik partiküllerle beslenirler [17,18]. Katı besinleri fagositoz, sıvı besinleri ise pinositoz yoluyla alırlar. Üremeleri eşeysiz olarak ikiye bölünmeyle olur [10].

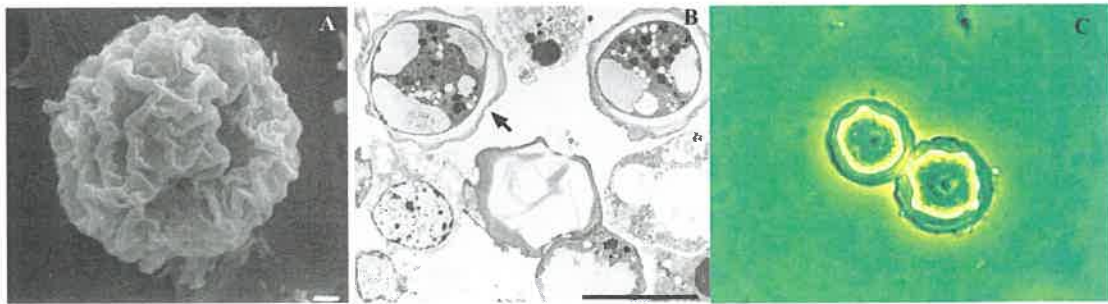


Şekil 2.5 *Acanthamoeba* trofozoitinin, scanning elektron mikroskopundaki (SEM) görüntüsü (A), TEM görüntüsü (B), sıvı besiyerinde inverted mikroskop görüntüsü (C) [10,20].

2.1.3.2 Kist Formu

Kötü koşullarda (besin eksikliği, yüksek yada düşük ozmolarite, ekstrem sıcaklık, v.b) trofozoitler kist formuna dönüşür ve bu olay “encystment” olarak bilinir. Tek çekirdeğe sahip olan kistler endokist ve ektokist denilen çift tabakadan oluşur ve bu nedenle dış koşullara karşı dayanıklıdırlar. Kıvrımlı görünen dış tabaka sayesinde bir kültürde kistler kolaylıkla görülebilirler.

SEM’ da bakıldığında akantopodların yüzeyinin kısa bir işlemle kaplanıp kısılması - kalınlaşmasını içeren morfolojik değişimler olgun kistin yüzeyinin karakteristik özelliğini gösterir [şekil 2.6A] [10,11,16].



Şekil 2.6 *Acanthamoeba* kistin scanning elektron mikroskopundaki (SEM) görüntüsü (A), TEM görüntüsü (B), sıvı besiyerinde inverted mikroskop görüntüsü (C) [10,20].

2.1.4 Çevre ve Klinik Ortamda Dağılımı

Acanthamoeba deniz suyu, okyanus sedimentleri, plajlar, göl suyu, toprak, tatlı su gölleri, kaplıcalar, tuzlu su gölleri, Antarktika, su-hava arayüzü ve hava da dahil olmak üzere çeşitli doğal ortamlarda izole edilebilmektedir. *Acanthamoebalar* şişelenmiş maden sularından, distile su şişelerinden, elektrik ve nükleer santrallerin soğutma kulelerinden, jakuzi ve küvetlerden, havalandırma kanallarından, nemlendirici makinalarından, klima ünitelerinden, duş başlıklarından, kanalizasyonlardan, cerrahi aletlerden, kontak lensler ve saklama kaplarından, balıklardan vb. izole edilebilmektedir. *Acanthamoebalar* hastanelerden, fizyoterapi yüzme havuzlarından, diyaliz ünitelerinden, taşınabilir ve sabit göz yıkama istasyonlarından, insan burun boşluklarından, gırtlakdan, boğaz kültürlerinden, akciğer dokusundan, deri lezyonlarından, insan dışkılarından, kornea biyopsilerinden, maksiller sinüslerden, mandibular otogreftlerden, dışkı örneklerinden, kritik hastaların idrarlarından, beyin omurilik sıvısı ve beyin nekropsilerinden elde edilebilmektedir. Yukarıda anlatılanlara dayanarak *Acanthamoeba*'nın her yerde bulunduğu kabul edilmektedir ve rutin hayatımızda bizler bu organizmayla karşılaşmaktayız bunun tespitinde ise Yeni Zelanda' da ki sağlıklı bireylerin %100' nde anti-*Acanthamoeba* antikor' larına rastlanmasıyla anlamaktayız [21,22].

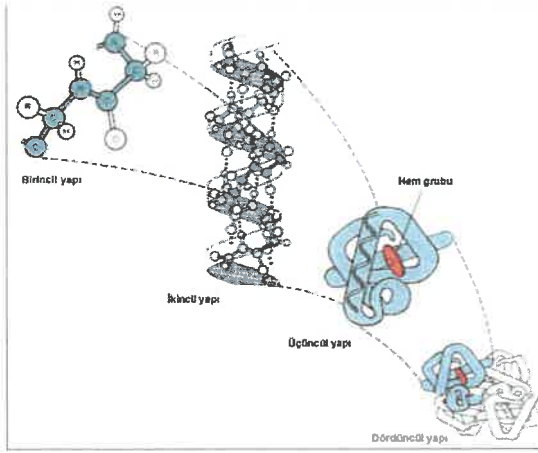
2.2 ISI ŞOK PROTEİNLERİ (HSP)

2.2.1 Protein katlanmaları

Proteinler organizmaların metabolik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için oldukça önemli yapılardır. Bu fonksiyonları yerine getirebilmeleri için üç boyutlu yapılarına katlanmaları ve bu doğal hallerini korumaları gerekmektedir.

Üç boyutlu yapılarına katlanabilmeleri için gerekli bilgi proteinin birincil yapısında şifrelenmiştir [24]. Proteinlerin yapısında dört düzey vardır: birincil, ikincil, üçüncül ve bazen dördüncül yapıdır. Proteinde birincil yapı peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış amino asitlerin doğrusal dizisidir. Polipeptid zinciri bölgelerinin düzenli katlanmasıyla ikincil yapı meydana gelir. Protein katlanmasının en yaygın iki tipi α -

sarmal ve β - kıvrımlı tabakadır. Çubuk benzeri α -sarmalda amino asitler kendilerini düzenli sarmal bir konformasyona uyarlarlar. β - kıvrımlı tabaka ise farklı polipeptid zincirlerinde veya aynı polipeptid zincirinin farklı bölgelerinde ki peptit bağları arasında oluşan hidrojen bağları ile meydana gelir. Üçüncül yapı, birincil yapıda birbiri ile bitişik ya da çok uzakta bulunan amino asitlerin uzaysal düzenlenmesiyle ilgilidir. Protein üç boyutlu yapıya bir defa katlandığında, bu konformasyon sadece hidrofobik etkileşimlerce değil, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları ve eğer varsa disülfid bağları tarafından da sürdürülür. Dördüncül yapıdaki proteinlerde ise birden fazla polipeptid zinciri bir araya gelmesi söz konusudur [25]. Uygun fizyolojik koşullar altında, küçük proteinler doğal konformasyonlarına kendiliğinden katlanırlar ancak büyük proteinler katlanması için yardıma ihtiyaç duyarlar. Moleküler kalabalığın fazla olduğu sitozolde ve strese maruz kalmış hücrelerde proteinlerin katlanma prosesi güçleşir. Yanlış katlanmış veya zarar görmüş proteinler belli bir kritik noktanın üzerinde birikirse Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jacob, kistik fibrosis ve Gaucher hastalığı gibi hastalıklara sebep olmaktadır [24,26,27].



Şekil 2. 7: Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları [28]

2.2.2 Isı Şok Proteinlerinin Yapı ve Görevleri

Bir canlının fizyolojik ve biyokimyasal dengesinin bozulmasına sebep olan iç ve dış faktörlere “stres faktörleri” denir ve bu faktörlere hücrelerin verdiği tepkiye “hücre stres yanıtı” denir [29,30]. Hücrede miktarı stresle artan ve moleküler şaperon olarak

adlandırılan proteinlere "ısı şok proteinleri (Hsp)" denir. Bu proteinler stres proteinleri olarak da adlandırılırlar. Hücrede protein katlanmasına yardım ederek, uygunsuz katlanmaları ve protein agregasyonunu önlerler. Ayrıca membranlar arası protein translokasyonunu, zarar görmüş proteinlerin degradasyon için hedeflenmesini, düzeltilebilecek proteinlerin tekrar yapılanmasını da sağlarlar ve bu fonksiyonları yerine getirirken koşaperon ve/veya partner şaperonlarla çalışırlar [27,30].

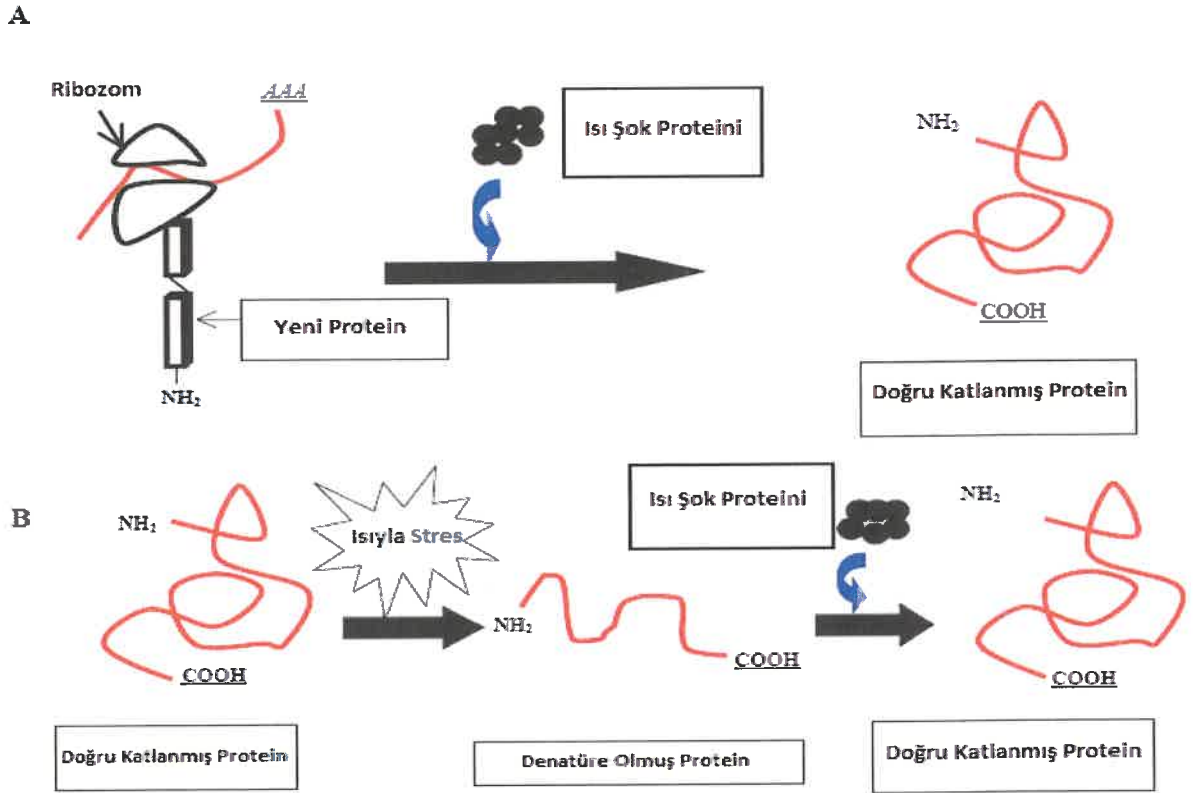
Stres, proteinlerin hidrofobik bölgelerinin açığa çıkmasını sağlar, bu da ısı şok proteinlerinin daha fazla etkileşebileceği yüzey alanı oluşturur. Fakat stresin fazla olması proteinlerin şaperonlarla etkileşim yüzeyini artırdığı gibi aynı zamanda protein-protein etkileşimlerine de olanak sağlar. Bu etkileşimler agregat oluşturur ve agregat oluşumu organizmaya zarar verir. Özellikle hayati işlevleri olan proteinlerdeki agregasyon, büyük sorunlar ortaya çıkarabilir. Örneğin mayada transkripsiyon faktöründe meydana gelen agregasyon prion oluşumunu tetikler. Bu sebeple hücrelerde yeterli sayıda şaperon bulunması ve bunların işlevlerini eksiksiz yapması organizmanın yaşamını sürdürmesi açısından oldukça önemlidir [31].

Isı şok proteinleri ilk defa 1962 yılında, F. Ritossa tarafından, *Drosophila busckii* larvasının inkübatörde yüksek ısıya maruz bırakılmış tükrük bezi hücrelerinde, şişkinleşip kabarmış kromozomların tespit edilmesiyle bulunmuştur. Yüksek ısıya maruz kalarak sterse giren hücrelerdeki bu kromozomal şişkinliklerin, ısı şok proteinini kodlayan gen bölgeleri olduğu ve bu proteinlerin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak şişkinleştikleri ortaya çıkmış ve ilk defa 1974 yılında "ısı şok proteini" ismi verilmiştir [29].

Bu proteinlerin molekül ağırlıkları 15kDa ile 110kDa arasında değişir ve isimlendirilmeleri de molekül ağırlıklarına göre olmaktadır [32]. Bu proteinler normal koşullar altındaki hücrelerde de bulunurlar fakat miktarları azdır, ani ısı değişimleri ve diğer stres faktörleri ile karşılaştıklarında miktarları hızla artar. Isı şok proteinleri hücrenin strese karşı direncini güçlendirirler. Kuvvetli hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri sayesinde kolay denatüre olmazlar. Büyüme, farklılaşma, bölünme, hücre ölümü dahil, hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşırlar [27,29].

Isı şok proteinleri hücredeki fonksiyonlarına göre sürekli sentezlenenler ve stres uyarımlılar (Hsc-Hsp) olmak üzere iki guruba ayrılırlar [33]. Sürekli eksprese olanlar normal hücre şartlarında henüz katlanmamış polipeptitlere bağlanırlar ve bunların

düzgün şekilde hedef organellere taşınmasını sağlarlar. Stres uyarımları ise stres koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan hücre hasarını sınırlandırmak, proteinlerin agregasyonunu önlemek, bozulan proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve stres uyarımlı hücre ölümüne engel olmak gibi görevlere sahiptirler [34,30].



Şekil 2.8 Isı Şok Proteinlerinin Fonksiyonları [35]

Hsp'leri kodlayan genlerin bulunduğu gen ailelerinin, evrim sürecinde fonksiyon ve yapı bakımından en fazla korunmuş gen ailesi olduğu bilinmektedir. Çünkü evrim sürecinde hücreler bir stres ile karşılaştıkları zaman canlı kalabilmelerini sağlayacak, stres sinyalini saptayan, izleyen ve yanıt verebilen bir mekanizma geliştirmişlerdir. Bu sayede stres durumunda hücreler ve dokular hasar görmekten ve apoptozisten korunmuş olurlar [30].

Hsp'lerin gen transkripsiyonu, ısı şok transkripsiyon faktörü ile Hsp gen promotor bölgelerindeki ısı şok elementlerinin etkileşimi aracılığıyla sağlanır. Normal koşullar altında ısı şok faktör1 (HSF1) stoplazma içerisinde DNA'ya bağlı olmayan bir monomer molekül gibi bulunur. Stres koşulları altında DNA'ya bağlanma kapasitesine

sahip olmak için üç fosfatlı forma dönüşür ve stoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte ısı şok protein geninin promotor bölgesine bağlanarak, Hsp transkripsiyonunu sağlar ve Hsp sentezini artırır [29].

2.2.3 Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler

Isı şok proteinlerinin artışı sadece ısıya bağlı olarak değil, pek çok farklı sebeplerle de artabilir. Bunlardan bazıları şunlardır [29,36]:

Tablo 2.2 Isı Şok Proteinlerini Artıran Sebepler

Çevresel Faktörler	Hastalıklar	Hücre Etkileşimi
Isı şoku (yüksek veya düşük)	Ateş	Normal hücre döngüsü
Ağır metal	Yangı	Büyüme faktörleri
Enerji metabolizması inhibitörleri	İskemi	Gelişme ve farklılaşma
Kemoterapotik ajanlar	Hipertrofi	
	Hücrel hasar	
	Malignensi	

2.2.4 Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışındaki Görevleri

Hsp'ler normalde hücre içerisinde bulunurlar. Hücre dışında ise hücrelerin öldüğü ve içeriklerinin dışarı atıldığı durumlarda bulunurlar. Bu dağınık hücrelerin planlanmamış ölümü nekroz olarak adlandırılır ve hücrede sadece hatalı eylemler meydana getirir. Hücrenin dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü bir indükleyici etkide bulunurlar [34,36].







2.2.5 Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık

Hücre dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü tehlike sinyalleri gönderirler. Pek çok patolojik ajanın konakta immun cevap oluşturmada rol oynayan antijenik ajanlardır. Farklı parazitlerde Hsp'lerin strese karşı toleransları, antijenik özellikleri farklıdır [37,38]. Stres proteinlerine karşı gelişen immun cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşıda (anti self) reaksiyon gelişimine sebep olabilmektedir [34]. Sağlıklı bireylerin enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immun cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir [39]. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesinde meydana gelen aksaklıklar bazı otoimmun rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Stres proteinleri immun cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar [36,37].

2.2.6 Önemli Hsp Aileleri

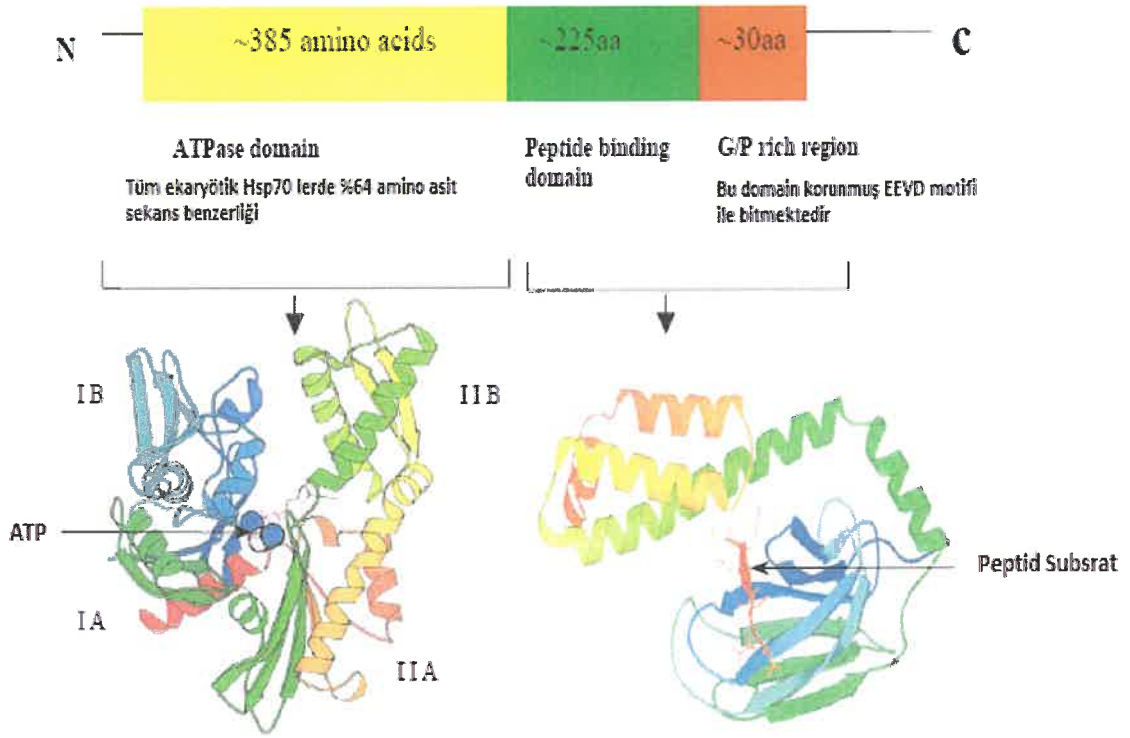
Stres proteinleri, molekül ağırlıklarına göre bazı alt guruplara ayrılırlar. Bu gurubun üyeleri sadece büyüklük yönünden değil, başka özellikleriyle de benzerlik gösterirler. Örneğin Hsp70 ve Hsp60 aileleri benzer fonksiyonlar görürler ve bunların amino asit sıralanmaları % 50'nin üzerinde benzerlik gösterir. Ayrıca moleküler ağırlıkları büyük olan Hsp100, Hsp90 ve Hsp70 proteinlerinin sekansları bitkiler aleminde büyük benzerlik gösterir [40].

Tablo 2.3 Önemli Hsp Aileleri [41]

Önemli ısı şok proteinlerinin yerleri ve fonksiyonları					
Aile	Organizma	Şaperon	Yer	Fonksiyon	
Hsp100	E.coli S.cerevisiae	ClpA, B, C Hsp104	Sitozol Sitozol	 6- to 7-mer	Protein agregatlarından substrat proteinlerin çekilmesi ve diğer şaperonlar yardımıyla yeniden katlama
Hsp90	E.coli S.cerevisiae İnsan	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Sitozol Sitozol Sitozol Çekirdek ER Mitokondri	 Dimer	Sinyal transdüksiyonu rolü vardır(steroid hormon reseptörleri, tirozin kinazların etkileşimleri), ısı şok yanıtının düzenlenmesi, hücre döngüsü ve proliferasyonda rol alır.
Hsc/Hsp70	E.coli S.cerevisiae İnsan	DnaK Ssa1-4, Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hsc70, Hsp70 BIP, mHsp70	Sitozol Sitozol ER Mitokondri sitozol çekirdek ER Mitokondri	 Monomer	Isı şok yanıtını düzenler, Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin doğru konformasyona erişimini sağlar, apoptozisi önler, membranlar arası protein translokasyonunda görev alır.
Hsp60	E.coli S.cerevisiae Bitkiler İnsanlar	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Sitozol Mitokondri Kloroplast Mitokondri	 14-mer	Katlanma ve denature proteinlerin stabilizasyonu
Hsp40	E.coli S.cerevisiae İnsanlar	dnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2	Sitozol Sitozol Çekirdek	 Monomer	Hsp70'in ATPase aktivitesi için gerekli olan ko-şaperondur. (substrat bağlanması-salınması)
Small Hsps	E. coli İnsan	IbpA, IpbB Hsp27 crystallin	Sitozol Sitozol Sitozol	 8-24 mer	Proteinlerin kümeleşmesinin önlenmesi, hücrelerin ısı stresine dayanıklılık göstermeleri ve anti-apoptotik fonksiyon

2.2.7 Hsp70 Ailesi

Hücre sel strese yanıtta Hsp70'ler biyokimyasal mekanizmanın kalbini oluştururlar. Bu protein 70kDa'luk olup, katlama prosesinde oldukça önemli bir yere sahiptir(42-45). Hsp70 yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasını, stoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi yapılara protein taşınmasını sağlamaktadır(46). Ayrıca peptitlerin hidrofobik bölgelerine bağlanarak proteinlerin kümeleşmelerini önlemekte ve böylece stres altındaki proteinlerin üç boyutlu yapılarını korumalarını sağlamaktadırlar [33]. Yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi, düzeltilemeyenlerin yıkım için hedeflenmesi, peptitlerin birbirine bağlanması, HSF1'in çalışmasını düzenlenmesi gibi görevleri de vardır ve ATPaz aktivitesi gösterirler. Hsp70'ler tüm bu fonksiyonları koşaperonlarla ve/veya partner şaperonlarla birlikte yaparlar [47-50].

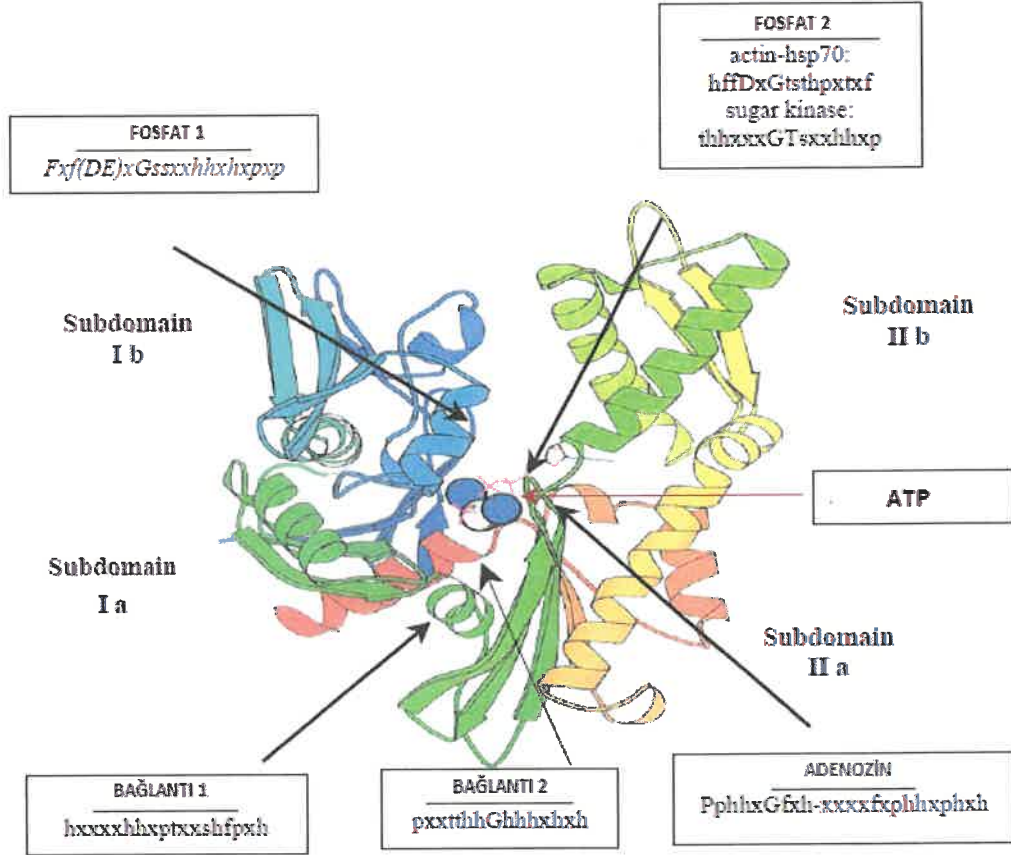


Şekil 2.9 Sığır Hsp70'in Yapısı [35]

2.2.8 Hsp70'in Domain Yapısı

Hsp70 üç domaine sahiptir. Birincisi, N terminali ATPaz domaini olup, 44kDa'dur. ATPase domaini iki büyük globüler subdomainden oluşur, her bir subdomain de iki küçük subdomainden oluşur. Bu domainler ortada bir yarık oluşturacak şekilde bulunurlar ve dip kısma bir nükleotid bağlanır. Sığır Hsc70 ATPase domaininin X ışını kullanılarak yapısına bakıldığında, iki β ve γ fosfat bağlama lobu ile hidrofobik fosfat bağlama lobunun etkileşimleri ile adenosin nükleotidin aktif bölgeye bağlandığı görülmüştür. Nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmalarında ise ATPase domaininin yüksek esneklikte olduğu ve farklı subdomainlerde biri diğerini etkileyecek şekilde gerçekleşen eğme ve kırpma hareketleri sayesinde nükleotid bağlama yarığının açılıp kapanmasının yönetildiği tespit edilmiştir. Bu açılıp kapanmalar nükleotidin bağlanıp serbest kalmasını sağlar. Burada ATP hidrolizi gerçekleşir ve substrat bağlanma domainine sinyal gönderilir. Bu sinyalin gönderilmesiyle substrata zayıf olarak bağlanmış olan Hsp70, substratı sıkıca kavrar. Bu ADP+P salınımlarında NEF (nükleotid exchange factor) adı verilen bir protein ailesinden bahsedilmelidir. NEF ailesi çok

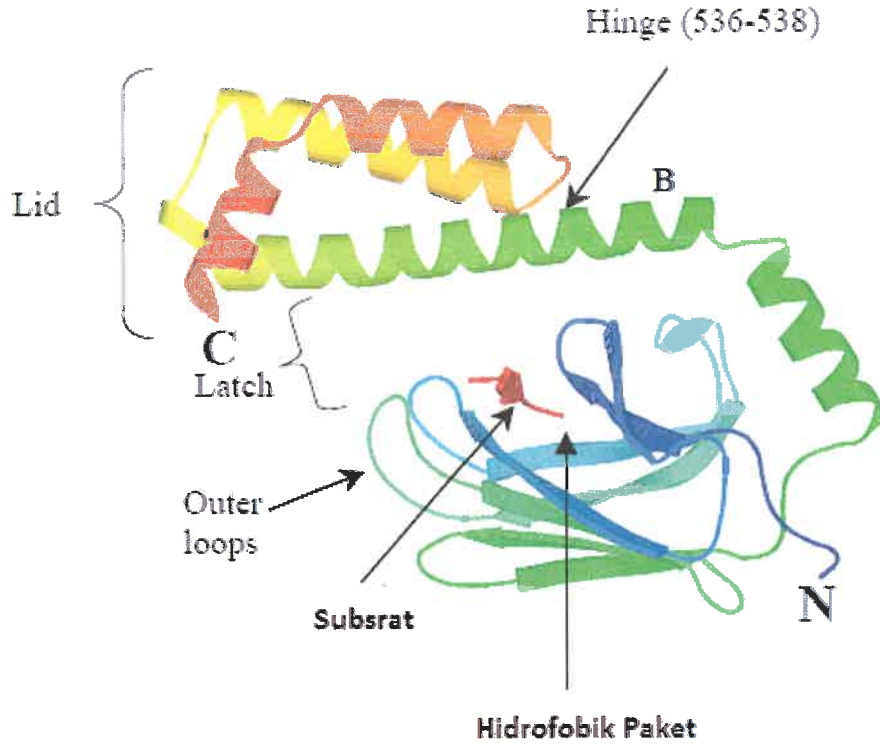
çeşitli ve tam tanımlanmamış protein sınıfından oluşmuş olup, prokaryotlarda GrpE olarak, ökaryotlarda ise Bag1, Fes1p ve Hsp110 olarak adlandırılır. NEF bir kısaç gibi davranarak NBD (nükleotid bağlanma domaini) sıkır ve ADP salınımını kolaylaştırır. Bu sonraki ATP'nin domaine bağlanmasını ve yeni Hsp70 katlama prosesinin başlamasını sağlar [49,50]. Adenin nükleotidinin hidrolizi sadece Hsp70 tarafından sağlanırsa katlama oranı düşük olur, fakat hidrolizi bir koşaperon olan Hsp40'ın J domaini indüklerse, katlama oranı 1000 katına çıkar. Yapılan çalışmalarda peptitlerin hidrofobikliğinin ATP hidroliz oranını etkilediği de tespit edilmiştir. Hidrofobiklik açısından güçlü olan peptit, daha zayıf olan peptide göre Hsp70'in ATP hidrolizini çok daha iyi uyarır [33,49].



Şekil 2.10 Sığır Hsp70'in ATPaz Domain Yapısı [35]

İkinci domain yapısı Middle domaindir ve Hsp70 ailesi içerisinde oldukça yüksek oranda korunmuş, substrat bağlanma domaini (SBD) olarak adlandırılan bir

domainidir. Bu domain hakkındaki pek çok bilgiye *E.coli* DnaK (HSP70 homologu) üzerinde yapılan çalışmalarla ulaşılmıştır. SBD 25kDa β yaprak subdomaininden ve 10kDa helikal subdomaininden oluşur. Peptit bağlama bölgesi sandviç benzeri bir oluşum gösterir. Burada iki tane 4 zincirli β -yaprakla beraber, ikisi içte ikisi dışta olmak üzere yukarı doğru çıkıntı yapmış 4 tane lob yer alır. Ayrıca birde helikal subdomain vardır, bu da 5 tane helixden (A,B,C,D,E) oluşur. Helix B bir kapak meydana getirir ve bu kapak dıştaki loblarla iki hidrojen bağıyla bağlanan tuz köprüsü oluşturur ve katlanacak olan substrat, substrat bağlanma domainine bağlanınca kapanarak, Hsp70'in substrata olan affinitesinin artmasını sağlar. Kapağın kapanması ATPase domaininden ADP+P oluşumuna bağlı olarak gelen sinyal ile indüklenir, kapak dönme hareketi yaparak SBD'yi kapatır [41,49]. SBD içerisindeki oyuk hidrofobik bir merkez olup, substrat ile merkez arasındaki hidrofobik etkileşimlerle substrat olması gereken konformasyona erişir [26]. ATPase domainine yeni bir ATP'nin bağlanmasıyla kapak açılır ve substrat serbest bırakılır, Hsp70 yeni bir döngüye girmeye hazır hale gelir [33].



Şekil 2.11 Sığır Hsp70'in substrat Bağlanma Domain Yapısı [35]

Üçüncü yapı ise C terminalidir ve 18 kDa'luk bir domaindir ve substrat bağlama domaininin bir kısmıyla beraber kapak görevi görür. Birçok ökaryotik sitozolik Hsp70'in C terminali, yüksek korunumlu bir oktapeptit içerir. Bu oktapeptit çeşitli koşaperonlarla Hsp'nin etkileşime girmesine aracılık eder. İçerisinde Hsp40'ında bulunduğu pek çok koşaperon, tetratrikopeptit (TPR) tekrarlarından oluşan protein etkileşim motifleri içerirler. Bu TPR ile şaperonun oktapeptit kısmı etkileşime girer ve maya sitozolik Hsp70'in ATPase domainini uyarıcı etkide bulunur [50,51].

Yapılan pek çok çalışmada, Hsp70'lerin hücrede farklı veya aynı kompartma bulunmalarına rağmen, aynı kompartmanda bulunanlar arasında bile fonksiyonel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Maya üzerinde yapılan çalışmalarda Hsp70 ve Hsc70'in domain yapıları karşılaştırılarak, aralarındaki benzerlik ve farklılıklar bulunmaya çalışılmıştır. Hsc70'in hücrede normal durumda bulunduğu, Hsp70'in ise hücre bir stresle karşılaştığı zaman eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Domainlerin karşılaştırılmasında ise büyük oranda benzerlikler görülmüş fakat tamamen aynı olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca farklı türler arasında domain değiş tokuşu yapıldığında Hsp70'lerin işlevsel olduğu, ancak değiş tokuşun Hsp70-Hsc70 ile yapıldığı durumda ise işlevselliğin ortadan kalktığı görülmüştür. Özellikle insan Hsp70'i ile Hsc70'inin SBD'leri maya Hsp70'leri ile değiş tokuş yapıldığında oluşan proteinin yapısında ciddi farklılıklar görülmezken, ATPase domain değiş tokuşunda önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durum Hsp70 ile Hsc70 ATPase domain fonksiyonlarının farklı olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan ayrıntılı çalışmalarda bu farklılığın sadece ATPase domaininden kaynaklanmadığı, domainler arası etkileşimin ve protein-protein etkileşimlerinin de Hsp70 ve Hsc70 fonksiyonları için hayati derecede önemli olduğu belirlenmiştir [33,52]. Hücrede bu kadar farklı Hsp izoformunun bulunması, bunların substratlarla ve koşaperonlarla etkileşimi, aynı kompartmanda bulunan ve birbirine çok benzeyen formların farklı farklı işlevler yapması sırasındaki mekanizmalar hala tam aydınlatılamamıştır [53].

Maya sitozolde Ssa ve Ssb olmak üzere iki farklı tip Hsp70'e sahiptir. Ssa dört, Ssb 2 farklı izoforma sahiptir. Sitosolik Hsp'ler çekirdeğe ve diğer organellere protein taşınımını sağlarlar ve denature proteinleri yıkım için hedeflerler. Maya sitozolünde birkaç tane koşaperon bulunur ve bunlardan en iyi tanımlanmış olan Hsp40'lar, Ydj1 ve Sis1 dir [48,51]. Hsp40 sahip olduğu J domaini sayesinde substratı tutarak Hsp70'e getirir ve bu J domaini Hsp70'in ATPase domainini uyarır. Bu uyarım kapak

bölmesinin kapanmasına ve Hsp70'in substratı sıkıca kavramasına yarar. Ardından da Hsp70 substratı uygun konformasyona getirir [54].

Hsp70'in fonksiyonel farklılıklarının, etkileştikleri spesifik Hsp40'dan ve substrat sınıfından kaynaklandığı sanılmaktadır [22].

2.2.9 Hip, Hop ve CHIP

Hip, insan Hsc70'nin ATPase domaini ile etkileşime giren 43kDa'luk bir proteindir. Hip Hsp70'i ADP durumunda stabilize ederek, Hsp70' in şaperon aktivitesine devam etmesini sağlar ve böylece premature substratların salınımını önler [49,55,56]. Hop 60kDa büyüklüğünde bir protein olup, ilk kez mayada ısı şok proteinlerinin (yeast Sti1) yanıtlarının düzenlenmesinde görev alan proteinler için yapılan genetik taramada tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda progesteron reseptör kompleksinin bir bileşeni olduğu tespit edilmiştir. Hop, Hsp70 ve Hsp90 ile etkileşime girer. In vitro deneylerde progesteron reseptörlerinin olgunlaşma oranlarını hızlandırdığı tesbit edilmiştir. Mayada Sti1'in maya Ssa1'in ATPase aktivitesini stimule ettiği tesbit edilmişse de, memelilerde böyle bir özellik gözlenememiştir.

CHIP 35 kDa olup, Hsp70 ve Hsp90'ın C terminaline bağlanmak için Hop ile rekabete girer. Ubiquitin, ligaz gibi davranarak Hsc70 substratlarının proteozomlar tarafından yıkımını sağlar [50].

2.2.10 Hsp70 – Kanser - Apoptozis

Hsp'ler ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce tümör hücrelerinden izole edilmişlerdir. CD8+ ve CD4+ lenfositlerini, doğal katil hücrelerini (natural killer) harekete geçirirler, aynı zamanda sitokinlerin salgılanmasını ve dendritik hücrelerin indüklenmesini sağlarlar. Dendritik hücreler primer immun yanıtta antijen sunucu hücrelerdir ve T hücrelerini uyarırlar. Natural killer denen doğal katil hücreleri ise aslında beyaz kan hücreleridir ve immun sistemin oldukça önemli elemanlarıdır. Tümör hücrelerinde Hsp70 membrana bağlanarak, immun sistem için tümör hücrelerini hedef haline getirir. Doğal katil hücreleri, membrana bağlı Hsp70'lere CD94 reseptörleriyle bağlanırlar. Bağlandıkları hücreler granzim B salgılar ve bu enzim sayesinde tümör hücresi apoptozis için

induklenmiş olur. Bu aktivasyon mekanizması, anti kanser ilaç geliştirmek için çaba gösteren araştırıcıların dikkatini çekmektedir [57].

Apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan bu süreç, doku homeostazının korunmasında kritik bir role sahip olduğu gibi, fetal gelişim ve erişkin dokulardaki pek çok fizyolojik olayda da önemli rollere sahiptir [58].

Protein denaturasyonu ve agregasyonu apoptozisi tetikler. Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs" dan CASPASE" olarak türetilmiştir. Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonu hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla, ER aracılığıyla olabildiği gibi, mitokondrideki sitokrom c aracılığıyla da olabilir. Stresin neden olduğu apoptozisi Hsp70, sitokrom c ile etkileşime girebilme yeteneği sayesinde önler. Ekstrinsik ve intrinsik yollardan kaynaklanan apoptozisi Hsp70, Hsp27 ile birlikte bloke eder [58]. Kanserde de Hsp70 seviyesi çok artar, bu sayede özofagus, böbrek ve pankreas kanserlerinde, melanoma da iyi bir prognoz sağlar. Fakat diğer tip kanserlerde prognoz ya çok azdır ya da yoktur. Hsp ailesi kanser tedavisinde önemli bir kapı açar, çünkü hücrenin yaşam mücadelesinde anahtar role sahiptir. Tümör gelişiminde ve metastazında Hsp seviyesi çok artar. Bu sebeple immunoterapide ilaç hedeflenmesinde kullanılabilir. İmmun yanıtın artmasında ve hücrelere antijen sunumunun aktivasyonunda Hsp70 kullanılır. Aşı üretiminde kullanılabilirler. Bu da kanserin ve enfeksiyon hastalıklarının önlenmesini sağlar [51,59].

2.3 PROTEİN SAFLAŞTIRMA

Proteinin moleküler yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri ekstraselüler veya intraselüler olması ve hücre içinde bulunduğu yerin bilinmesi saflaştırma sürecinin belirlenmesinde çok yardımcı olur. Saflaştırma sırasında, bu işlemin ne oranda başarılığını izlemek için, protein miktarının hassas ve spesifik olarak belirlenmesi gerekir [60]. Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriőtirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaőtırılmış

olur. Çöktürme, ekstraksiyon ve absorpsiyon kromatografi teknikleri bu amaçla kullanılabilir.

Ayrıca gücü açısından çöktürme ve ekstraksiyon teknikleri etkin değilken kromatografik teknikler özellikle afinite kromatografisi çok etkindir ve 1000 kattan fazla saflaştırma sağlar. Afinite-ultrafiltrasyon kombinasyonu gibi yüksek ayırma güçlü tekniklerin kullanılması saflaştırma prosesindeki adım sayısını çok düşürür. Fakat afinite tekniklerinin çok pahalı olduğu, bu nedenle çöktürme gibi ucuz teknikler ile kontaminantların önemli oranda uzaklaştırılmasından sonra uygulanmaları gerektiği unutulmamalıdır. Protein saflaştırmada uygulanacak teknikler genel olarak aşağıdaki sırayı izler:

- Homojenizasyon
- Çöktürme
- İyon değişim kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Jel Geçirgenlik kromatografisi

Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatografisi ile uzaklaştırılır.

2.3.1 Kromatografi

Kromatografi; ayrılacak maddelerin uygun bir hareketli faz yardımıyla, sabit bir fazdan geçirilmesi sırasında, hareket hızlarının farklı olmasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Ayrılacak maddelerin sabit fazla etkileşme tipine, hareketli fazın gaz veya sıvı olmasına ve deney tekniğine göre; Kromatografi çeşitli sınıflara ayrılmaktadır.

Biyokimyada kolon kromatografisi çok kullanılır. Kolon ayrılacak maddelerin tutulmasını sağlayacak bir dolgu maddesiyle doldurulur. Uygun bir çözücüde çözülmüş olan maddeler kolondan geçirilir. Bu sırada dolgu maddesiyle etkileşmenin zayıf ya da kuvvetli olmasına bağlı olarak ayrılacak maddeler kolondan farklı hızlarla geçerler. Kolonda farklı noktalara sürüklenmiş olan maddeler uygun çözücülerle (tamponlarla)

kolondan alınır. Kolondan tampon çözeltilerle alınan maddeler fraksiyonlar halinde ayrı tüplere toplanır ve böylece ayırma işlemi gerçekleşmiş olur [61].

2.3.2 Elektroforez

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. Bu küçük parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar [62]. Diğer bir deyişle elektroforez, ortam pH'sına göre, pozitif (+) ya da negatif (-) olarak yüklenen kolloid taneciklerin, bir elektrik alanında, kendi net yüklerine zıt yük taşıyan anot veya katoda doğru farklı hızlarda sürüklenmeleridir. Proteinler; elektrik yükü, büyüklükleri (yük/kütle oranı), şekil gibi özelliklerine göre ayrılırlar. Elektroforez, genellikle poliakrilamid jel üzerinde yapılır. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaz. Elektroforez yönteminin değişik biçimleri vardır:

- Kağıt elektroforez:
- Serbest veya hareketli cephe elektroforez
- Kuşak (zone) elektroforezi
- Disk elektroforezi:
- izoelektrik odaklama
- SDS-gel elektroforezi

Elektroforetik yöntemler;

- Karışım içinde bulunan protein sayısını tespit etmek (kağıt ve jel elektroforezi)
- Saflaştırılmış proteinin saflık derecesini belirlemek (SDS-PAGE).
- Saflaştırılmış proteinin molekül kütlelerini tayin etmek (SDS-PAGE) amacıyla kullanılır [63].

2.3.2.1 SDS-Gel Elektroforezi

Başarılı bir elektroforez yapılabilmesi için analizi yapılacak örnek onunla reaksiyon vermeyen ve örneğin elektrik alanda ilerlemesini engellemeyen bir zemin kullanmakla mümkün olur. Böyle bir kimyasal zemin polimerlerin özellikleri çalışılırken keşfedilmiş ve poliakrilamid olarak nitelendirilmiştir. Poliakrilamid yapabilmek için akrilamid, N,N'-metilen-bis (akrilamid), tetrametilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfata ihtiyaç vardır. Ammonyum persülfat suda çözüldüğünde serbest radikal iyonları oluşturur ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot -}$). Eğer bu radikal iyonları akrilamid ile biraraya getirilirse serbest radikal akrilamid molekülü üzerine taşınır. Aktive edilmiş bu akrilamid molekülü çevresindeki diğer akrilamid molekülleri ile etkileşerek uzunca bir polimer oluşturur. Bu polimerlerin oluşturduğu çözelti hali hazırda her ne kadar yoğunca ise de jeli oluşturmaz. Jel oluşumu bu polimer parçalarının çapraz bağlanmasını gerektirir. Bu işlem N,N'-metilen-bis (akrilamid) tarafından sağlanır. Bu madde iki akrilamid molekülünün reaktif olmayan uçlarının kafa kafaya verdiği bir molekül olarak düşünülebilir.

Oluşan ağın içerisindeki boşlukların büyüklüğünü iki parametre belirler:

- Kullanılan akrilamid miktarı
- Çapraz bağlanmanın derecesi

Toplam akrilamid miktarına ve bis akrilamid miktarına bağlı olarak jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü ayarlanabilir.

Bu yüzden birçok jel formülasyonunda bis akrilamid konsantrasyonu % 5'e ayarlanıp sabit tutulurken jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü akrilamid konsantrasyonu ile oynanarak belirlenir. TEMED'in jel karışımına eklenme nedeni onun katalizör görevi görmesindedir. Genelde % 0.4 oranında eklenen TEMED polimerleşme reaksiyonunu hızlandırır.

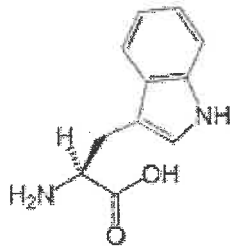
Polimerleşmenin doğasını anlamada tartışılacak son bir konuda polimerleşmenin içerisinde gerçekleştiği tampon sistemidir. Tampon sistemi ortamın pH'sını hem jel üzerinde hem de jel yürütme sistemi içerisinde korumada ve ayrıca akımın jel içerisinde geçmesi için gerekli elektrolit miktarını sağlamada kullanılır. Bu yüzden uygun bir tampon seçebilmek jel elektroforezinin sonuçları açısından önemlidir.

Proteinlerin jel üzerinde uygun şekilde hareket edebilmeleri için SDS ile muamele edilmeleri gerekir. SDS globüler yapıdaki proteinleri açarak, onların düz bir zincir

haline gelmelerini sağlar ve hepsini negatif yükler. Negatif yüklenen proteinler elektroforezde negatif kutuptan pozitif kutba doğru, molekül ağırlıklarına göre hareket ederler [64,65].

2.3.3 Floresan Spektroskopisi

Triptofan, proteinler içindeki en yüksek floresans özelliğine sahip olan amino asittir. Triptofan o kadar yaygın bir şekilde kullanılır ki, “doğal protein floresans” terimi çoğu zaman triptofan floresansı olarak adlandırılır.



Şekil 2.12 Triptofanın yapısı

Sulu çözeltilerde triptofan, yaklaşık 350 nm boyutuna ve yaklaşık 60 nm enine sahip geniş ve yapısı olmayan bir floresans bandı sergilemektedir. Farklı araçlar kullanılarak fakat aynı koşullar altında hesaplanan triptofan floresans spektrumunun, spektrum ölçümlerindeki farklılıklar yüzünden düşük seviyelerde olmak kaydıyla farklı şekiller ve genişlikler (348-353 nm) kazandığını belirtmek gerekmektedir. Malesef, yakın-ultraviyole bölgelerindeki aletlerin spektrum ölçümleri için günümüzde henüz genel geçerliliği olan standartlar bulunmamaktadır. Dipolar anlardaki (yaklaşık 4D) büyük artışın nedeni uyarım olduğundan dolayı, emisyonadaki değişiklikler daha kuvvetlidir. Bu değişiklik, kromofor dipolünü ve çözücü dipolleri içeren yönelim gevşeme süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Triptofanın emisyonunun çevrenin hareketliliğine ve kutuplaşmasına karşı olan bu duyarlılığı, protein yapıları ve dinamikleri çalışmalarında triptofan floresansını önemli bir araç haline getirmektedir [66].

Hemen hemen bütün kutuplu protein grupları bir ölçüde triptofan floresansını söndürebilir. Fotoiyonlaşma, sistem arası çaprazlaşma, uyarılmış yapılanma, uyarılmış alan protonu ve uyarılmış alan elektron transferi muhtemel ışınmasız süreçler arasında

bulunmaktadır. Aspartik ve glutamik asit amino asitinin nötr halde bulduklarında çok etkili dinamik söndürücülerdir. Lizin ve arginin de dinamik söndürücülerdir, fakat bunlar yüklü halde bulduklarında daha etkilidirler. Düşük pH değerine sahip histidin, indol halkasıyla karmaşık dizilimli bir yapı oluşturarak söndürücü etkiye sahip olabilmektedir. Daha düşük etkinlikte olmak kaydıyla, protona sahip olmayan histidin de triptofan floresansını söndürebilmektedir. Tek sisteinin de etkili bir söndürücü olmasına rağmen, disülfür de triptofan floresansının en güçlü söndürücülerinden biridir. Bunlara ek olarak, amit ve peptit gruplarının da dinamik söndürücüler olarak hareket ettikleri gösterilmiştir. Triptofan emisyonunun ve hem emiliminin spektrum örtüşümünden dolayı, hem-içeren proteinlerde uzun-dizilimli enerji transferi sönümü çok önemlidir. Bu gibi etkiler protein floresansı analizlerini karmaşık hale getirirse bile, bunlar çok önemli yapısal bilgilerin elde edilmesi süreçlerinde kullanılmaktadır. Örneğin, membrana bağlı sitokromda (b₅) bulunan Trp-109 hem-söndürücü iki protein alanı arasındaki mesafe dağılımının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Triptofan; oksijen, hidrojen peroksit, iyadür, bromür, akrilamit, süksinimit, dikloroasetamit, piridinyum hidroklorid, NO₃⁻, Cs²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ ve Mn²⁺ gibi birçok madde tarafından meydana gelen söndürmelere karşı gerçekten çok duyarlıdır. Söndürücülere karşı olan bu duyarlılık, söndürme ölçümleri yardımıyla proteinlerdeki triptofan amino asitlerinin ulaşılabilirliğini ve erişilebilirliğinin belirlenmesini sağlamaktadır.

En yüksek floresans özelliğine sahip olan ikinci amino asit ise, tirozindir. Fakat tirozinin uygulanması çoğu zaman triptofan içermeyen proteinlerle sınırlıdır. Fenilalanin floresansı çok zayıftır ve protein çalışmalarında hemen hemen hiç kullanılmamaktadır. Diğer bir doğal floresans sınıfı, en bilindikleri NADH'e (indirgenmiş β-nikotinamid adenin dinükleotid) olan kofaktörleri içermektedir.

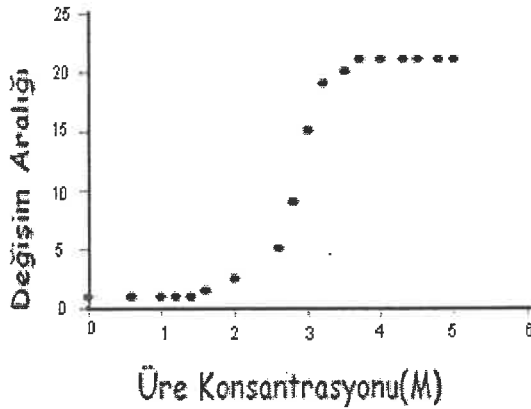
NADH'nin floresans özellikleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Sulu çözeltilerde, floresansın kuantum verimi çok düşüktür ve molekülün konformasyonundan dolayı floresansın yaşam süresi subnanosaniye dizini içerisindedir. Karaciğere bağlı olan alkol dehidrojenazı, floresansta ve emilimdeki maviye kayan bir spektruma neden olurken kuantum verimindeki artışında sebebidir. Substrat analog izobütiramit ile üçlü bir bileşik oluşumu bu etkinin boyutlarını daha da artırmaktadır. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, nanosaniye dizilim içinde değişiklik

göstermektedir. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, ikili ve üçlü bileşiklerde uyarılmış bir alan reaksiyonunu ifade eden karmaşık bir değişime maruz kalmaktadır. Proteinlerdeki amino asitlerin var olan floresans özellikleri, kimyasal denatüranlar, sıcaklık, pH değişimleri ve basıncın neden olduğu katlanma/katlanmama geçişlerinin izlenmesi amacıyla uzun zamandır kullanılmaktadır. Özellikle triptofan artıklarının floresan özellikleri protein yapısının bozulmasına etkin bir şekilde duyarlıyken, fenilalanin ve tirozinin düşük miktardaki ürünleri ve bunların problemleri bu tür çalışmalar için bir dereceye kadar daha az duyarlıdır.

Floresans özelliklerdeki değişimler, protein katlanmış ve katlanmamış profillerinin kinetik ve denge düzenlemelerinde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen bu değişimlerin fiziksel açıklamalarının detaylarına nadiren rastlanmaktadır. Genel olarak proteinin katlanması iki basamaklı prosesle iyi bir şekilde anlatılmıştır ve floresans özelliğinin izlenmesiyle elde edilen bilgiler (profiller), sirküler dikroizm ile elde edilenlerle uyumludur. Böyle durumlarda, floresans profilleri protein yapısındaki genel hasarların indikatörleri olarak alınırken, bunlar triptofan artıklarının yerlerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak birçok çalışmada floresans katlanma/katlanmama profilleri, özellikle triptofan artıklarının yerlerindeki yapısal değişikliklerden kaynaklandığından, iki basamaklı olmayan davranışla açıklanmaktadır [67]. Bu nedenle bazı durumlarda floresans profilleri katlanma/katlanmama geçişlerinde geçici ve sabit ara ürünler hakkında bilgiler verilmektedir.

Son yıllarda bir ve iki triptofan içeren proteinlerin doğal durumlarında var olan floresansın tanımlanmasında çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir [67]. Proteinlerin floresans özellikleri oldukça karakteristiktir. Proteinlerin hem doğal hem de denatüre durumları arasındaki farklılıklardan dolayı, proteinlerin doğal ve denatüre durumlarının rölatif ürün miktarı oranları arasında yaygın olarak değişkenlik göstermektedir [68]. Örneğin; bazı proteinlerde doğal durumda triptofan emisyonu yüksek oranda söndürülmektedir. Böyle katlanmamış floresans süresi ve şiddetinde büyük artışlara yol açmaktadır. Diğer yandan, diğer proteinlerde doğal durumda triptofan nispeten yüksek miktardaki ürün iken, katlanmamış durumda floresansı etkin şekilde söndürülmüştür. Yukarıdaki verilen referanslar, tek triptofan içeren proteinlerin floresans düşüşlerinin tek ekponensiyel düşüşle nadiren açıklanabilir ve düşüş hızlarındaki bu heterojenliğin katlanmış yapılarıdaki konformasyonel durumların heterojenliğini yansıttığını göstermektedir.

Şimdiye kadar, kararlı durum floresans şiddetlerinin tek dalga boyundaki emisyonlarındaki değişimlerinin ölçümleri yeterince bilgi verici değildir. Ancak izlenebilir olarak protein katlanmalarında floresans kullanımı genellikle basittir. Protein yapılarının indikatörleri olarak başlıca üç parametrenin izlenmesi gereklidir. Bu üç parametre; emisyonun şiddeti ortalama enerji veya emisyonun ortalama dalga boyu ve polarizasyondur. Daha detaylı ve iyi çözümlenmiş bilgiler elde edebilmek için bu parametrelerin kararlı durum modu gibi zaman çözümlemede araştırılmadır. Hsp70 proteinde triptofan olmamasına rağmen altı tane tirozin kromoforu vardır. Floresans spektrumu ise bize bu kromoforik yapıları hakkında bilgi verir.



Şekil 2.13 Hsp70'in üre ile denaturasyon eğrisi [26]

Başta sabit bir şekilde devam eden eğrinin ilk kısmı, eklenen ürenin proteini denature etmeye başladığını, daha sonra yükseliş gösteren eğrinin ikinci kısmı ise denature olan proteinin kromoforik yapılarından kaynaklı bir sinyal artışının meydana geldiğini gösterir. Ve son olarak da yine sabit bir şekilde devam eden üçüncü kısmı ise artık proteinin tamamen denature olduğunu göstermektedir. Ürenin yapısı proteine oldukça benzerdir. Yapısındaki NH bağı ve CO bağı üreyi protein yapısına benzer kılar. Proteinin üçüncül yapısını alabilmesi için gerçekleştireceği zayıf bağlanmaları engeller ve dipeptitlerin oluşmasına engel olur. Bundan dolayı protein gerekli yapıyı alamaz ve denature olur [69].

2.3.4 FTIR ve Protein Uygulamaları

Infrared (IR) spektroskopisi ile moleküllerin elektromanyetik enerji ile etkileşimde bulunulması sonucunda meydana gelen moleküler hareketleri belirlemektedir. Elektromanyetik spektrumun orta IR aralığı ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), birçok işlevsel gruba ait titreşimlerden kaynaklanan absorpsiyon bantlarını içermektedir. IR spektrumundaki her bir absorpsiyon bandı, absorpsiyon maksimumunun dalga numarası, bant genişliği ve gücü ile tanımlanmaktadır. Bir absorbansa ait dalga numarası, buna neden olan moleküler hareket, kimyasal bağda yer alan atomlar ve çevrelerinin konformasyonu için karakteristiktir. Diğer taraftan bant genişliği ve gücü moleküllerin hareket oranı ile doğru orantılıdır.

Fourier Dönüştürülmü IR Spektroskopisi (Fourier Transformed IR Spectroscopy, FT-IR) yöntemi, spektral bilgilerin alışımlı IR spektroskopisine oranla çok daha iyi çözünürlük ile elde edilmesini, hızlı, hassas ve doğru analiz yapılmasını sağlamaktadır. Bu yöntemle çok bileşenli örneklerin çalışılması mümkündür. Bir absorbansa ait dalga numarasının saptanma doğruluğu, FT-IR yöntemi ile 0.01 cm^{-1} den fazla olmaktadır. Mikrobiyoloji alanında, bir hücrenin FT-IR spektrumu o hücrenin biyokimyasal bileşenleri (proteinler, lipitler, DNA/RNA ve karbonhidratlar) hakkında bilgi edinmemizi sağlayan parmak izi gibi tanımlayıcı bir bilgidir. Ölçümlerin yüksek hassasiyeti ve doğruluğundan dolayı mikroorganizmaları zincir seviyesine kadar tiplendirebilir [70].

2.3.4.1 Kromoforlar

Peptit bağlarını içeren proteinlerin konformasyon çalışmalarında IR spektroskopisinden sıklıkla yararlanılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki Amid-I bölgesinde yapılmaktadır.

Peptit bağlarının bu bölgedeki IR ışınların absorblaması CCN deformasyonu ile CN gerilmesinin küçük katkılarıyla birlikte esas olarak CO gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [71,72].

Amid-II bölgesi ($1500-1600 \text{ cm}^{-1}$) esas olarak N-H bükülme (ve daha az oranda C-N gerilmesinden) sinyallerini içermektedir. Daha yüksek ve daha düşük frekanslı Amid bandları (Amid-A ve B ve III- VI bandları) daha zayıf şiddetlidirler veya daha az

tanımlanmışlardır ve daha az sıklıkla kullanılırlar. Ancak her biri, belirli durumlarla yararlanılacak önemli özelliklere sahiptirler.

Birçok durumda, Amid-I bandı protein katlanma/katlanmama çalışmalarının spektral özellikleri için çok büyük faydalar sağlamaktadır. 1600–1700 cm^{-1} aralığındaki absorpsiyon bandı veren farklı ikincil yapıların belirlenmesi, normal mode hesaplamaları sentetik polipeptidlerin farklı çevresel koşullardaki analizlerini ve ikincil yapıları bilinen proteinlerin detaylı çalışmalarının kombinezonuna dayanmaktadır [73].

Son zamanlarda kabul edilen sonuçlara göre α – heliks 1650 ve 1658 cm^{-1} aralığında absorpsiyon gösterirken, α – helikse ait bandlar 1650 cm^{-1} in aşağısındadır ve yeni hesaplamalar sinyallerin 1640 cm^{-1} in aşağısında bulunabileceğini önermektedir [74,75]. Düz zincirler (β plakası) genellikle 1620 ve 1640 cm^{-1} (veya daha düşük) aralığında bir veya daha fazla absorpsiyon bandı vermekle birlikte 1670 ve 1680 cm^{-1} aralığında daha zayıf band verirler [73]. Dönme ve bükülmeler 1660 cm^{-1} üzerinde bir seri pik oluşumuna neden olmaktadır. Model peptitlerdeki dönmeler üzerinde yapısal çalışmalarla mevcut bükülmelerin doğasıyla ilgili bilgiler sağlanmakla birlikte gerçek proteinlerin bu bölgedeki komplekslikleri daha kesin analizleri önlemektedir.

Amid-I bölgesindeki çalışmalardaki zorluklar daha rasgele tipteki yapılarla çok daha iyi anlaşılacaktır [75]. Düzensiz polipeptitler genellikle 1640–1650 cm^{-1} bölgesinde absorpsiyon oluşturmaktadırlar [73]. Ayrıca, α heliks yapısına sahip olmadığı bilinen proteinler 1650 ve 1660 cm^{-1} aralığında etkin absorpsiyon gösterirler; ki bunlar bu bölgede rasgele zincir konformasyonlarının belirlenmesine yol açarlar [76].

Bu zorluklara rağmen, Amid-I bölgesi uygun çözünürlük zenginleştirmesinden sonra proteinlerin ikinci yapı içeriklerinin analizinde etkin biçimde kullanılmaktadır [73]. Hem eğri uydurma hem de örnek tanıma prosedürlerinin kullanımları başarılı sonuçlar vermesine rağmen, her bir metodun eleştirildiği yönleri vardır. Bu analizlerden sağlanan bilgiler protein katlanma/katlanmama oldukça yararlı olmalarına rağmen, mutlak gerekli değildir. Bu tip analizlerle ilgili detaylı çalışmalar birçok yerde özetlenmiştir [76]. Amid-II bandının basit yapısal analizlerde kullanılması daha az kesinlikte bilgiler sağlar. Alfa heliks 1550 cm^{-1} e yakın bant ve 1520 cm^{-1} de daha zayıf sinyal oluştururken β yapısı 1530 ve 1560 cm^{-1} etrafında güçlü ve zayıf sinyaller oluşmasına yol açmaktadır. Daha düzensiz yapılar genellikle 1535–1550 cm^{-1} yakınında absorpsiyon göstermektedirler.

Tüm kimyasal yapılar, titreşimsel absorpsiyon bantlarına sahip olan kovalent bağlar içermektedirler. Bu nedenle, diğer kromofomaların çeşitlilikleri, katlanma/katlanmama çalışmaları süresince proteinlerin, FTIR ile izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bunlar, non-Amid bölgelerinde amino asit yan zincirlerinin zayıf sinyallerini fosfat atıkları, hem grupları, karbon monoksit ve oksijen içermektedir. Ayrıca karbon monoksit ve oksijen gibi IR sinyallerine sahip olan ligandlar hem gurupların bağlanırlar ve FTIR ile yaygın şekilde çalışılmaktadırlar [77]. Bu bağların IR frekansları ve şiddetleri spektral olarak izole edilebildikleri, ölçülebildiklerinden ve bunların spektral özellikleri protein konformasyonu için duyarlı olduklarından proteinlerin katlanma durumlarının izlenmesinde kullanılabilirler [78].

3. MATERYAL-METOD

3.1 DeneYlerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu alışma Cumhuriyet niversitesinde Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı ve Eczacılık Fakültesi Biokimya A.D. ÖĞretim yesi Doç.Dr. Yusuf Tutar'ın laboratuvarında Őubat 2012- Aralık 2012 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.2 Kullanılan Malzemeler

Acanthamoeba castellanii suşu (ATCC 30010), total RNA izolasyon kiti (Roche High Pure RNA Isolation Kit), cDNA izolasyon kiti(Roche Transcriptor First Strand cDNA Kit), PCR purification kiti(Thermo), AgaroZ jel ekstraksiyon kit(Fermentas) ,Tag polimeraz(Fermentas), DNTP(Fermentas) , DNA ladder(fermentas 1kb), agaroZ, PCR tüpü, 1,5 ml lik ependorf, etanol, Ekspresyon vektörü, subklonlama vektörü, DH5 ve BL21DE3 kompedan hücre, EtBr, pET161 TOPO vektör (Invitrogen).

3.3 Kullanılan Cihazlar

Deneyde Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya), santrifüj (Sigma, Almanya), elektroforez cihazları (Biorad, İngiltere), Gradient PCR (Thermo Scientific, Almanya), Florimetre (Shimadzu), NDSC (Calorimetry Sciences Corporation, ABD), FPLC (KTA, ABD), FTIR (Nicolet-520, Almanya), çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific, ABD), otoklav (Selecta, Almanya) kullanıldı.

3.4 *Acanthamoeba castellanii'* nin Eldesi

ATCC'den gelen *Acanthamoeba castellanii* suşu zerine *E. coli* sürülüp, besleyici değeri olmayan agar (NNA) plaklarına ekildi ve plaklar 30° C'de inkübasyona bırakıldı. Birkaç gün sonra plaklarda trofozoitler gözlendi. AgaroZ zerine steril su eklendi ve ze yardımıyla trofozoitler agaroZ üzerinden toplandı ve total RNA izolasyonu yapmak üzere ependorf tüpünde alındı.

3.5 *Acanthamoeba castellanii*'den Total RNA Eldesi

Total RNA bir organizmada bulunan tüm RNA'ların izole edilmesidir. Total RNA eldesinden sonra cDNA elde edebilmek için mRNA'ların ayrıştırılması gerekir. Ökaryotlarda mRNA'ların izolasyonu için poliA kuyruğu kullanılır. RNA izolasyonu 4 aşamada gerçekleştirilir:

- Hücrelerin parçalanması
- Nükleoproteinlerin denatürasyonu
- Hücre kaynaklı ribonükleazların inaktivasyonu
- RNA'nın ortamdaki DNA ve proteinlerden ayrılması

Ribonükleazların inaktivasyonu zordur. En önemli ribonükleaz kaynakları havadaki küfler ve kullanıcının elleridir. Bu nedenle izolasyon sırasında sterilizasyona çok dikkat edilmeli, izolasyondan hemen sonra RNA'lar hızlı şekilde -80 °C ye kaldırılmalıdır.

Total RNA eldesi için Roch firmasının High Pure Total RNA izolasyon kiti kullanıldı. İzolasyon basamakları şunlardır:

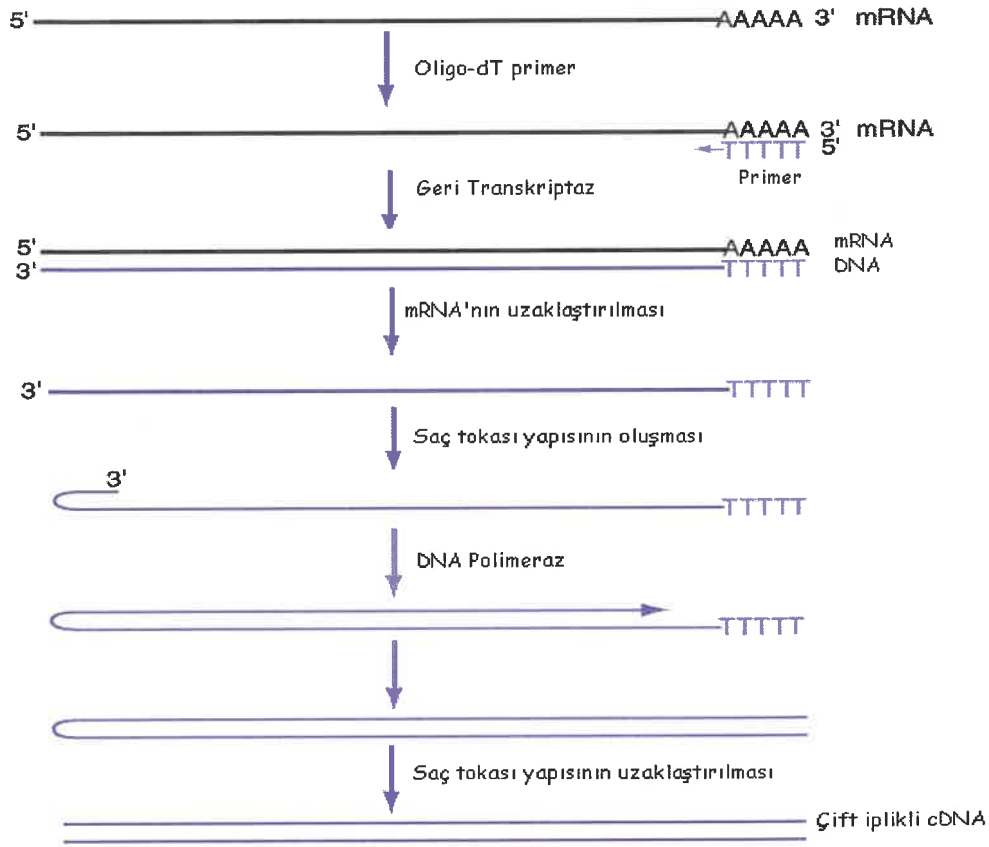
1. Agar plaklarından toplanan *A. castellanii* 200 µl alınarak, üzerine 200 µl PBS ve 400 µl parçalama tamponu eklendi ve vortex yapıldı.
2. Filtre tüpü toplama tüpüne takılarak, örnek üzerine max 700 µl olacak şekilde pipetle eklendi.
3. 10.000 rpm de 15s santrifüj yapıldı. Alttaki toplama tüpü atıldı, yeni toplama tüpü takıldı.
4. Aynı bir steril 1.5 ml tüpe 90 µl DNA parçalama kiti ve 10 µl DNase 1 eklendi ve güzelce karıştırıldı. Bu yeni karışım filtre tüpünün üzerine eklendi ve 15dak oda ısısında bekletildi.
5. Üzerine 500µl yıkama tamponu 1 eklendi. 10.000rpm de 15sn santrifüjlendi. Alttaki toplama tüpü atıldı, yeni toplama tüpü takıldı.

6. Bunun üzerine 500µl yıkama tamponu 2 eklenerek, 10.000rpm de 15sn santrifüjlendi. Tekrar yeni toplama tüpü takılarak, 200µl yıkama tamponu 2 eklendi ve max hızda 2 dak santrifüjlendi.

7. Toplama tüpü atılarak, yeni toplama tüpü takıldı ve RNA'yı elde etmek için 75µl Elüsyon Buffer eklenerek 10.000 rpm de 1dak santrifüjlendi. Alttaki çözelti RNA'dır. RNA çabuk bozulan bir molekül olduğu için hızlı bir şekilde -80 °C'ye kaldırıldı.

3.6 cDNA Sentezi

Bir önceki basamakta elde ettiğimiz mRNA stabil olmadığından, DNA'ya çevrilmesi gerekir. mRNA'nın, cDNA'ya çevrilmesine ters transkripsiyon "Reverse Transcription" veya cDNA sentezi "cDNA Synthesis" adı verilir. Bu işlemi gerçekleştiren enzim ise ters transkriptaz "Reverse Transcriptase" olarak tanımlanır. Ters transkriptaz RNA viruslarında bulunmuştur. Ters transkriptaz mRNA'nın, poli-T kuyruğu olan bir primer kullanarak DNA kopyasını çıkarır. Bu kopya, cDNA'nın ilk zinciridir. Reaksiyon sonucu ortamda RNA-DNA melez molekülü bulunur. Ters transkriptaz enzimlerinin RNAaz aktivitesi ile mRNA zinciri uzaklaştırılır. Tek iplikli DNA molekülü 3' ucundan kendi üzerine katlanarak "Loop" primer oluşturur. Saç tokası "Hairpin" yapısının 3' ucundan ikinci zincir sentezlenir. S1 nukleaz saç tokası yapısını ortadan kaldırır. (Şekil 3.1) [79]



Şekil 3.1 cDNA sentezi [80]

mRNA'dan cDNA elde etmek için Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı. İzlenen basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. 5 µl total RNA, 1 µl oligo-dT ve 7 µl su alınarak ependorf tüpüne kondu. Toplam hacim 13 µl olmalıdır. Bu karışım PCR cihazına konularak 65°C de 15 dk bekletildi.
2. PCR'dan çıkan örnek hemen buza kondu. Ayrı bir ependorf alınarak 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 0,5 µl RNase inhibitör, 2 µl dNTPmix ve 0,5 µl enzim alındı, hafif santrifüj yapıp bir önceki basamakta hazırlanan çözeltinin üzerine eklenerek çok hızlı bir şekilde PCR'a konuldu. PCR'da 55 °C de 30 dk, 85 °C' de 5dk daha bekletildikten sonra c DNA sentezi tamamlanmış oldu. PCR'dan çıkan örneğimiz hemen buza konarak tepkime durduruldu. Örnek +4 °C' ye kaldırıldı. (+4 °C' de 1-2 hafta güvenle saklanabilir, uzun süre saklanacaksa -20°C'ye kaldırılmalıdır, reaksiyon tüplerinde karışımlar hazırlanırken en son enzimler konulmalıdır.)

3.7 Primer Dizaynı

Elde ettiğimiz cDNA'lardan Hsp70'in gen bölgesinin çoğaltılması için uygun primerlerin dizayn edilmesi gereklidir. Bunun için PUBMED veritabanından daha önce belirlenen protein dizilerinden biyoinformatik teknikler kullanılarak Hsp70'e ait gen bölgeleri karşılaştırıldı ve üniversal primer karışımları dizayn edildi.

Primerlerin dizaynında pET161 vektörü için, forward primerin 5' ucuna CACC bazları eklendi, reverse primerde ise stop kodonu çıkarılarak tersten yazıldı, reverse primerin 5' ucunun CACC bazlarına komplementer olmamasına dikkat edildi. Primer dizayn edilirken İnvitrogen firmasına ait Champion™ Pet Directional Topo Expression Kit kullanıcı kataloğundan yararlanıldı. Primerin bu şekilde tasarlanması, Hsp70 gen bölgesinin çoğaltılarak, vektöre başarılı bir şekilde aktarılmasını sağladı.

3.8 PCR

Temelde 3 aşamadan oluşur;

- -DNA Zincirinin Açılması(Denatürasyon): Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır.
- Primerlerin Açılan DNA Zincirine Bağlanması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir.
- Primer Uzaması (Primer Extesion): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır.

Bu üç basamaktan oluşan işlem 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır [79,80].

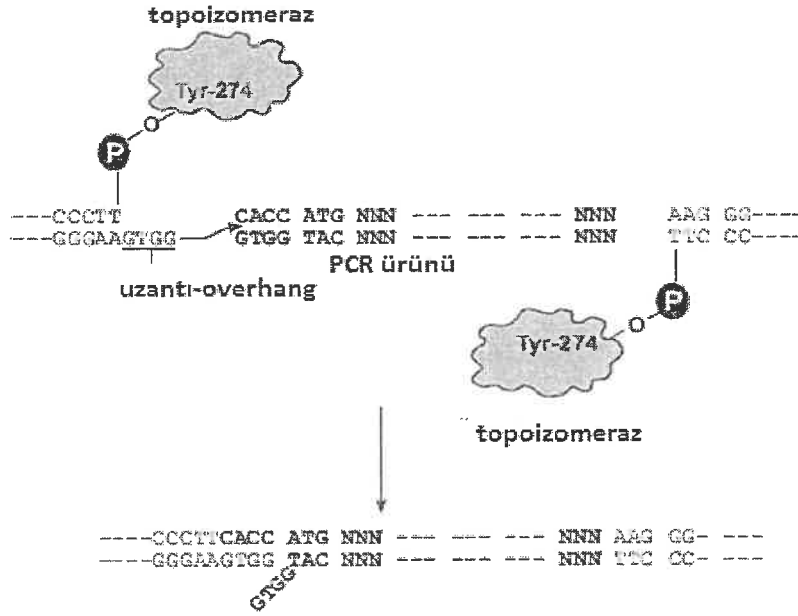
dd H ₂ O	11 µl	
Total 25 µl		
95 °C	5 dk	(ön denaturasyon)
95 °C	30sn	(denaturasyon)
57-60°C	45sn	(primerlerin bağlanması) → 35 döngü
72 °C	42sn	(uzama)
72 °C	7dk	(son uzama)

3.9 Amplifiye Edilen DNA'nın Tespiti

PCR sonrası amplifiye işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için jel elektroforez yapıldı. Bunun için 50ml 1X TAE (Tris, Asetat, EDTA) içerisine 0,5gr agaroz eklenerek, mikrodalga fırında misel görüntüsü kalmayana kadar ısıtıldı, daha sonra soğumaya bırakıldı, hafifçe soğuyan jelin içerisine 15µl ethidium bromid eklenerek, tarakları yerleştirilmiş olan tanka döküldü. Yarım saat donması beklendikten sonra taraklar çıkarılarak, 6X yükleme tamponundan 1µl alındı ve üzerine 5µl PCR ürünü konarak kuyucuklara yüklendi. Ayrıca bir kuyucuğa da marker yüklenerek, 120 voltda 1 saat yürütüldü.

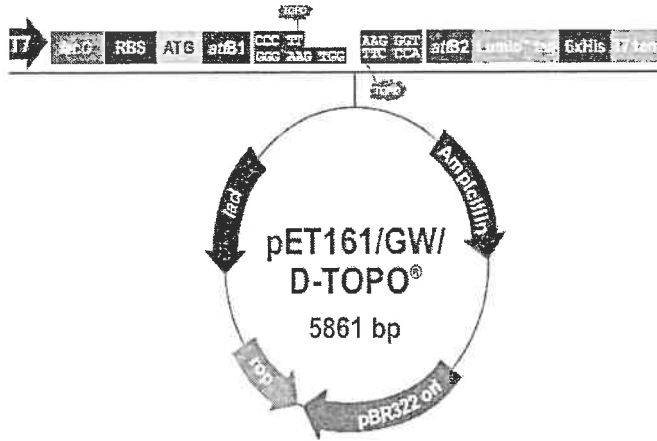
3.10 Çoğaltılan DNA'nın pET 161 Ekspresyon Vektörüne Aktarımı

Klonlamada ekspresyon vektörünün kullanılması, klonlamanın doğrudan yapılmasını sağlamaktadır. Diğer vektör tiplerinde olduğu gibi restriksiyon enzimlerine, ligazlara gerek kalmaz. Klonlama, topoizomerazın DNA çift sarmalını aşırı torsiyondan korumak amacıyla CCCTT nükleotid dizisinden kesmesi ve tekrar birleşmesi esasına dayanır. Aşağıdaki şekilde bu durum görselleştirilmiştir:



Şekil 3.3 Topoizomeraz'ın çalışma prensibi [82]

CCCTT nükleotid bölgesinden vektörü kesen topoizomeraz, 5' ucuna CACC nükleotidi eklenmiş PCR ürününü vektöre bağlayarak, herhangi bir ekstra restriksiyon ya da ligasyon işlemine gerek kalmadan klonlanacak geni vektöre aktarır. Vektör 5861 bp taşır ve üzerinde klonlamadan sonra rekombinant olan vektörlerin seçilimine izin verecek ampisilin direnç geni ve yine klonlanan genin ekspresyonununun gerçekleşmesini sağlayacak T7 promotor bölgeleri taşır.



Şekil 3.4 pET 161 vektör haritası [82]

PCR'da çoğaltılan ve jel elektroforezi ile doğrulanan gen bölgesinin vektöre aktarımı için pET161 ekspresyon vektörü kullanıldı. Aktarım yapılırken öncelikle TOPO klonlama reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımında PCR ürünü ile vektörün

0,5:1 ile 2:1 oranında bulunmasına dikkat edildi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre olacak hazırlanarak, hafifce karıştırılıp, 5 dak oda sıcaklığında inkübe edildi. Böylece PCR ürünü vektöre klonlanmış oldu.

Tablo 3.2 Klonlama protokolü

Taze PCR ürünü	0.5-4 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	5 µl
TOPO vektör	1 µl
Total hacim	6 µl

3.11 Ekspresyon Vektörünün Kompedan *E.coli* Hücrelerine Aktarımı

Transformasyon işlemi için 42 °C su banyosu, 37 °C inkübatör, LB plate (100 µg/ml amfisilin), oda sıcaklığına getirilmiş S.O.C ve kompedan *E.coli* hücrelerinin buzda çözündürülmesi gerekmektedir. Hazırlıklar tamamlandıktan sonra 3 µl Topo klonlama reaksiyon karışımı ve bir tüp *E.coli* karıştırıldı. Buzda 5-10 dk inkübe edildikten sonra 42°C su banyosunda 30 sn bekletildi ve hemen buza kondu. Buzdayken üzerine 250 µl SOC eklenip, 37 °C' de 1 saat 200 rpm çalkalamalı inkübatörde yatay şekilde 1 saat inkübe edildi. Bir saatin sonunda 100-200 µl alınıp tripton, maya ve NaCl içeren Lowry Broth (LB) plate'e yayılarak bir gece 37 °C de inkübasyona bırakıldı.

3.12 LB Besiyeri ve Plate Hazırlanması

Kompedan *E.coli* hücrelerinin çoğaltılması için LB besiyeri hazırlandı. Her 1 L için 10g tripton, 5 g maya ve 10 g NaCl, 950 ml suda çözündürüldü ve pH NaOH ile 7.0 ayarlandı ve üzerine 15 g agar eklenerek 1lt'ye tamamlandı. Otoklavda 20 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda otoklavdan çıkarılarak sıcaklığın yaklaşık 55 °C'ye ulaşması beklendi ve içerisine 100 µg/ml amfisilin eklenerek platelere döküldü. İnkübatöre kondu ve bir gece bekletildi.

3.13 Protein Saflaştırılması ve Yapı tayinleri.

3.13.1 Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanması

Küçük kültür için 10 ml LB hazırlanıp otoklavlandı. Yaklaşık 55°C 'ye kadar soğuduktan sonra 10 µl amfisilin (50 mg/ml) eklenip, içine bir miktar daha önce platalere ekilen transformant hücre, steril kürdan yardımıyla konulduktan sonra 37°C de bir gece çalkalandı. Ertesi gün şişede bulanma görüldü. Bulanma bize hücrelerin uygun şekilde çoğaldığını gösterdi. Aynı bir kaptan 1L LB hazırlanıp, otoklava kondu. Biraz soğuduktan sonra 1ml amfisilin(50mg/ml) eklendi ve küçük kültürde büyüyen hücreler üzerine eklendi. O.D₅₅₀=0.6-0.7 olana kadar 37 °C de çalkalandı. Bu değere ulaşıldığı zaman 1L için 2 ml IPTG (0.1 M) eklenip 37°C de 4-5 saat daha çalkalandı. Bu sürenin sonunda büyüyen hücreler 5000 rpm de 10 dk 4°C de santrifüjlendi. Santrifüj sonunda dipte kalan pelet plazmit taşıyan hücrelerdir. Bu hücreler -20 °C de donduruldu.

3.13.2 SDS PAGE için Hücrelerin Parçalanması

Donmuş haldeki hücrelerin çözülmesi için üzerlerine 1ml NSB (no salt buffer-100ml 0,5M Na₃PO₄, 4 ml EDTA, 50 ml gliserol, 1L su, PH 7) eklenerek, pipetajla hücrelerin tamamen çözülmesi sağlandı. Bu karışımdan 50 µl alınıp ependorf tüpüne konarak, 15000 rpm de 5dk santrifüjlendi. Sıvı kısım atılarak üzerine 200 µl SDS konuldu ve vortexlendi. Sıcaklığı 70 °C olan su banyosunda 10dk bekletildi. Tekrar en yüksek hızda 10 dk santrifüjlendi ve SDS PAGE analizi için hazırlandı. (Amaç kolondan saflaştırma yapılmadan önce proteinin doğrulanmasıdır).

3.13.3 SDS PAGE Analizi

Jelin hazırlanması:

SDS-PAGE jeli hazırlanmadan önce, camları su ve deterjan yardımıyla temizlendi. Yüzeyinde hiçbir kalıntı kalmaması için % 70'lik alkol ile silindi. Daha sonra dikey elektroforez sistemi kuruldu. Ayırma jeli (% 10'luk separating gel) hazırlanarak camların arasına 1 ml'lik pipet aracılığıyla, yukarıdan 2 cm boşluk kalacak şekilde

döküldü ve herhangi bir kabarcık oluşumunun önlenmesi ve düz bir zemin elde edilebilmesi için üzerine bir miktar suya doymuş bütanol eklendi. Ayırma jelinin polimerize olması için yaklaşık yarım saat beklendikten sonra üst jel (% 4'lük stacking jel) hazırlandı. Suyu doymuş bütanol distile su ile yıkandıktan sonra, camların arasındaki su kalıntıları kurutma kağıdı kullanılarak alındı ve üst jel camların arasına döküldü. Hemen taraklar yerleştirildi ve yaklaşık yarım saat jelin donması beklendi. Taraklar dikkatlice çıkarıldı. Kuyucuklar distile su ile yıkanarak temizlendi. Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine yerleştirildi ve tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu (6gr Tris, 28.8 gr Glisin, 0.2 gr SDS ve 2 L'ye kadar su) ile dolduruldu.

Alt jel (Ayırma jeli)

- 4 ml distile su
- 2.50 ml 1,5 M Tris pH 8.8
- 3.34 ml % 30 Akrilamid
- 100 µl % 10 SDS
- 50 µl % 10 APS
- 10 µl TEMED

Üst jel (Stacking-sıkılaştırma jeli)

- -3 ml distile su
- 1.25 ml 0.5M Tris pH 6.8
- 650 µl % 30 Akrilamid
- 25 µl % 10 APS
- 50 µl % 10 SDS
- 12 µl TEMED

Örneklerin yüklenmesi:

Ependorf tüplerine SDS-PAGE için ayrılmış protein örnekleri,

50 µl örnek + 50 µl 2X yükleme tamponu

50 µl BSA + 50 µl 2X yükleme tamponu

olacak şekilde hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Yükleme tamponu, 1ml 0.5 M Tris, 1ml % 10 SDS, 0.5 ml β-merkaptoetanol, 1ml gliserol ,0.0065 g EDTA, 0.0004 g bromfenol mavisi ve 10ml'ye ulaşacak kadar su içermektedir.

Örnekler kuyucuklara yerleştirildikten sonra jel 150-180 volt arasında bir voltaj seçilerek yaklaşık 45 dk yürütüldü.

Proteinlerin jel üzerinde görünür hale gelmesi-jelin boyanması:

Elektroforez bittikten sonra jel sistem üzerinden dikkatlice çıkarıldı. Ardından jel boyama çözeltisinin içerisine konularak, çalkalayıcıda iyice boyanana kadar bekletildi. Boyama işleminden sonra jel arıtma çözeltisinde bir süre bekletildi ve bantların en iyi görüldüğü noktada distile su ile ıslatılmış Whatman kağıdı üzerinde, jelatin film ile sarılarak 80 °C'ta 1,5 saat süreyle kurutuldu.

Boyama çözeltisi: 200 ml Metanol, 50 ml Asetik asit, 0.5 gr % 0.25'lik Coomassie blue ve 250 ml distile su

Arıtma çözeltisi: 200 ml Metanol, 50 ml Asetik asit ve 250 ml distile su

3.13.4 Hücrelerin Parçalanması

LB besiyerinde büyütülen hücreler 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve elde edilen çökelek parçalama işlemi için hazırlandı. Çökelek "Breaking Buffer"(50 mM Tris pH: 6,8, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA ve %5 gliserol.) çözeltisi ile çözülerek mekanik parçalayıcı bead-beater'a yerleştirildi. Parçalayıcıya çözelti konulduktan sonra hücreleri parçalaması için 0,5 mm'lik Zirconia/Silica Beads eklendi. Parçalayıcı 4 °C de 3-5 dk süresince 1 dakika ara verilerek hücreler parçalandı. Parçalama tamamlandıktan sonra elde edilen çözeltide proteinlerin yanı sıra hücre duvarı, hücre zarı, organeller, lipidler v.b. bulundurduğu için 14000 rpm de 4 °Cde 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.

Santrifüj sonrasında elde edilen çökelek atıldı (hücre duvarı, hücre zarı, organeller, lipidler v.b. içeren) ve çözelti (protein, DNA v.b içeren) saflaştırma işlemi için -20 °C de saklandı.

3.13.5 Hsp70 Proteininin Saflaştırılması

Proteinler tek aşamalı Nikel kolon saflaştırma işleminden geçirildi. Alkolle süspansiyon halindeki reçine santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldı ve su ile yıkanarak alkol ile suyun yer değiştirmesi sağlandı. Bu işlem iki kere daha tekrarlandı. Son olarak da reçine iki kere miktarının yaklaşık üç katı kadar tamponla yıkandı ve tekrar tamponla süspansiyon oluşturularak kolona yüklendi. Parçalanmış protein çözeltisi kolona yüklendi. Reçinenin proteini tamamen tutması için protein çözeltisi iki kere kolona yüklendi. Fraksiyon toplayıcı ve Peristaltik pompa da düzeneğe yerleştirildi. Değişik derişimlerde imidazole çözeltileri (100 mM–500 mM) hazırlanarak bir gradient oluşturmak için kolondan geçirildi. Bu şekilde proteinlerin ayrılması ve kolondan sıyırılması sağlandı. Fraksiyon toplayıcı ile kolondan örnekler toplandı. Birbirinden ayrılmış proteinler kolondan farklı zamanlarda çıktığından karışım halinde bulunan proteinler birbirinden ayrılmış oldu. Fraksiyon toplayıcı ile ayrılmış olan protein örnekleri UV- spektroskopisinde 280 nm dalga boyunda absorpsiyonları okundu. Yüksek değerli pikler veren fraksiyonlar poliakrilamid jele yüklendi (SDS-PAGE).

3.13.6 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile *A.castellanii* Hsp70' inin Yapı Analizi

Elde edilen protein çözeltisi, hazırlanan peletlerin (0,1g Potasyum Bromür (KBr) havanda dövüldü uygun presleme kabına alınarak 10 bar'lık basınç altında preslendi) üzerine damlatılarak FTIR spektroskopisinde Amid-I bölgesinde (1600-1700cm⁻¹) spektrumu alındı. Bu yolla Hsp70 proteininin Amid-I bölgesinde spektrumları alındı. Protein için 1,8M'lık ATP ve 0,95M'lık ADP varlığında bu deneyler tekrarlandı.

Bu proteinler tümü ile α -heliks, tümü ile β -sheet ve karma yapılardan oluşmaktadırlar. FTIR sinyali proteindeki kromofor bandlarının çakışması sonucunda tek bir absorpsiyon bandı verdiğiinden dolayı ikincil yapıların verdiği sinyaller nümerik analiz ile belirlendi ve proteinin apo ve holo halleri karşılaştırıldı [26].

3.13.7 AcHsp70 Proteinlerinin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri

Saflaştırılarak elde edilen proteine 6M'lık üre çözeltisi eklendi. Florimetrede 290nm'de uyarılarak 300–500 floresans aralığında ve 5–5 nm yarı aralığında emisyon spektrumu alındı. Daha sonra bu çözeltilere 1.8M'lık ATP (adenozin tri fosfat) ve 0.95M'lık ADP (adenozin di fosfat) eklenip aynı parametreler kullanılarak spektrumları alındı. Elde edilen bu spektrumlardan en yüksek floresans değerlerine karşılık gelen 343 nm tespit edildi. Farklı üre ve nükleotit derişimlerinde proteinler titre edilerek floresan değerleri elde edildi. Titrasyon eğrisinden katlanmış / katlanmamış protein oranları tespit edilerek serbest enerji değerleri hesaplandı. Bu değerler üre derişiminin sıfır olduğu “y” eksenine ekstrapole edilerek proteinin termodinamik kararlılığı hesaplandı. Grafikten 1 ve 2 numaralı eşitlikler kullanılarak proteinlerin kararlılıkları hesaplandı.

$$F_u = (YF - Y) / (YF - YU) \quad (1)$$

$$F_f = (Y - YU) / (YF - YU) \quad (2)$$

- F_f = Katlanmış (başlangıçtaki) protein oranı
- F_u = Katlanmamış (denature olmuş) protein oranı
- YF = Katlanmış proteinden kaynaklanan maksimum floresans
- Y = Denaturasyon eğrisinde herhangi bir nokta
- YU = Katlanmış proteinden kaynaklanan minimum floresans

Bu değerlerden aşağıdaki K (denge sabiti) her bir üre derişimi için hesaplandı.

$$K = F_u / F_f \quad (3)$$

Son olarak da hesaplanan K değerlerinden ΔG değerleri hesaplandı.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

Bu değerler $x = 0$ noktasına ekstrapole edilerek üresiz çözeltilerdeki proteinin Gibbs serbest enerjisi hesaplandı.

3.13.8 UV-VIS Spektroskopisi

3.13.8.1 Söndürme (Quenching)

Hsp70 proteininde triptofan olmamasına rağmen altı tane tirozin kromoforu vardır. Akrilamid ve potasyum iyodür ile söndürme yapıp farklı bölgelerde yer alan bu kromoforların farklı koşullarda ne kadarının proteinin içine gömülüp ne kadarının yüzeye çıkacağı hesaplandı ve yapısal değişiklikler tespit edildi. Ksv (Stern-Volmer) değerleri olası konformasyonel değişikliklerde protein kromoforlarının çevresindeki değişimlerin bir göstergesidir.

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} (Q) \quad (5)$$

- F_0 = Protein floresansı
- F = Söndürücü eklendikten sonraki floresansı
- K = Söndürme sabiti
- Q = Söndürücü derişimi [26]

3.13.9 Lusiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri

6 M'lık üre çözeltisi hazırlandı. Üre ile denatüre edilen lusiferaz iki balık türünden ekstrakte edilen ve DEAE iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan Hsp70'ler ile seyreltilerek lüsiferaz test çözeltisinde renaturasyonu hesaplanmıştır. Kör olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Lüsiferaz kemilüminesans özelliği olduğu için katlanma oranı lüminometre (Biofix lumi-10 Macherey–Nagel luminometer) ile takip edildi[33].


3.13.10 ATP Hidroliz Deneyi

ATPaz reaksiyonu sonucunda substrat olan ATP'nin, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkan Pi'nin kolorimetrik olarak molibdat çöktürmesiyle belirlenmesi esasına dayanan bu yöntemde reaksiyonun birinci basamağını standart


ATPaz reaksiyonu oluşturmaktadır. ATPaz reaksiyonunda, 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM ATP ve 10 µg/µl saf enzim kullanılıp 500 ml son hacimdeki reaksiyon bakterinin büyüme sıcaklığı olan 55°C'de 15 dakika süre ile yürütülecektir. Reaksiyonun ikinci basamağında ise, ATPaz reaksiyonu sonucu oluşan Pi'nin dolayısıyla ATPaz aktivitesinin belirlenmesidir. Birinci basamakta elde edilen reaksiyondan 20 µl alınarak 1,5 ml ependorf içerisinde 500 µl tampon 1 (litrede 100 g TCA, 10 g Thiourea, 30 g Mohr tuzu (ferrik amonyum sülfat = FAS·6H₂O)) eklenecek ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant yeni bir tüpe alınacak. Üzerine tampon 2 (200 ml'de 45 ml konsantre H₂SO₄, 22 g amonyum molibdat) eklenip karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübesi ile enzim içermeyen reaksiyon karşımı kör olarak kullanılarak fosfor standardı (5 mg/100 ml fosfor standardı olarak 0,2197 g/l KH₂PO₄) ile birlikte OD₆₆₀ ölçümleri yapıp, enzimli ve enzimsiz reaksiyonlar arasındaki fark alınarak enzimin salıverdiği Pi miktarı, mg/100 ml olarak hesaplanacaktır. Bu aynı zamanda enzimin ATP'yi parçalama değeri olarak alındı. Kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

Reaksiyon farkının absorbanası / Standart reaksiyonun absorbanası (mg/100 ml fosfor oluşumu)=


1c1 | X52314.1_cd 1 ATGACA-----TTCGAC-----GG----- 14
 gi | 309689 | gb | M1 1 TATACAAAAGATTTAAGAAAAAATGGCTAGTGCAAAAGGTTCAAAACCAAATTTTCCAGAATC 63
 1c1 | U85648.1_cd 1 ATGGCG-----GACTCT-----CC----- 14
 1c1 | U40190.1_cd 1 ATGACA-----GGA-----CC----- 11

 cons 1  63

1c1 | AY582837.1_ 4 -----CAC----- 6
 1c1 | U11761.1_cd 21 -----AGCTATTGGTATTGATTAGGTACCACATACATCATGTGTGGTGTATGGAGAAACGA 77
 1c1 | Z26134.1_cd 15 -----GGCAGTAGGTATAGATCTCGGGACGACATATTCATGTGTAGGTGTGTGAAGAACGA 71
 1c1 | X52314.1_cd 15 -----CGCCATCGGCATCGACCTGGCCACGACGTACTCGTGGTGGCCGTGTGGCAGAACGA 71
 gi | 309689 | gb | M1 64 CAATATCGCTATTGGAAATTGATTAGGTACTACTTATTCTTGTGTGGTGTATGGAGAAATGA 126
 1c1 | U85648.1_cd 15 -----TGCTGTGGGTATTGACCTTGGCACCACCTATTCITTCGGTAGGTGTGTGAAGAACGA 71
 1c1 | U40190.1_cd 12 -----AGCAAATTGGAATTGACTTTGGGTACCACATACATCCTGTGTGGCGGTATACAAGGACAA 68

 cons 64  126

1c1 | AY582837.1_ 7 -----CAAGGTAATCGCGTGACCCCGTCGTACGTCGCCCTTTAC 44
 1c1 | U11761.1_cd 78 TACTGTAGATAATTGTTCCAAAACGATCAAGGTAACCGTACAACACCAATCATATGTAGCATTTAC 140
 1c1 | Z26134.1_cd 72 CGGTGTAGAGATTATAGCGGAATGATCAGGGTAATAGAACGACACCGTCTTATGTTGCAATTAC 134
 1c1 | X52314.1_cd 72 ACCGCTGGATATCATCGGGAACGACCCAGGCAACCCGACACACCCGTCGTACGTTGCCGTTTAC 134
 gi | 309689 | gb | M1 127 AAATGTAGATAATTATGCTAAATGACCAAGGTAATAGAACAAACCCCACTTATGTTGCTTTTAC 189
 1c1 | U85648.1_cd 72 TGCTGTGGAAATCATCGGGAACGACCAAGGAAACAGGACGACCCCGTCTTACGTCGCCGTTTAC 134
 1c1 | U40190.1_cd 69 TAACGTAGAAATCATCCCAAATGACCAGGGAACAGGACAAACGCCGTCCTACGTCGCCATTTAC 131

 cons 127  189

1c1 AY582837.1_	45	CGACACTGAGCGTCTCATCGGAGATGCCGCCAAGAACAAGTGGCCATGAACCCGACAAACAC	107
1c1 U11761.1_cd	141	AGAAACTGAGCGTCTTATTGGTGTATGCAGCAAAAGAACCAAGTTGCTAGAAAACCCAGAAAATAC	203
1c1 Z26134.1_cd	135	AGATACAGAGAGGTTAGTAGGAGATGCAGCAAAAGAATCAGGTCGCAAGAACCCTGAAAATAC	197
1c1 X52314.1_cd	135	GGACTCGGAGCGCCTGATCGGCCGATGCCCGGAAAGAACCCAGGTGGCAATGAACCCGACAAACAC	197
gi 309689 gb M1	190	CGATACCGAAAGATTAAATTGGAGATGCTGCTAAAACCAAGTAGCTAGGAATCCAGAAAATAC	252
1c1 U85648.1_cd	135	CGACACGGAGAGACTTGTCCGGTGTGCTGCGAAAGAACCAAGTGCACGCAACCCGGAAAACAC	197
1c1 U40190.1_cd	132	TGACACCGAAAGATTAAATCCGGTGACGCAGCAAAAACCAAGAAAGCCCGTAACCCAGAAAACAC	194

cons ** *

1c1 AY582837.1_	108	TGCTTCGATGCCAAGCGTCTCAATCGGTGCTAATCGGTAACACTCCGACCCCGTCGTGACGCTGACAT	170
1c1 U11761.1_cd	204	AGTTTTTGATGCTAAACGCTCTTATTGGTAGAAAAGTTTGATGATCAGGCAGTACAAAGTGATAT	266
1c1 Z26134.1_cd	198	TGCTTTTGATGCTAAAAGATTAAATCGGAAGAAAGTTTCGATGATCCGGCTGTACAGGCAGATAT	260
1c1 X52314.1_cd	198	GGTGTTCAGCGGAAGCGCCTGATGGCCGCAAGTTCAACGACTCGGTTGTGTCAGTCGGACAT	260
gi 309689 gb M1	253	AGTATTTGATGCTAAGAGATTAAATGGTAGAAAATTTACAGAAATCATCAGTACAAAGTGATAT	315
1c1 U85648.1_cd	198	CATTTTCGATGCCAAGCGCCTAAATCGGTGCGAAAGTTTGATGATCCCTCGGTCCAGTCGGACAT	260
1c1 U40190.1_cd	195	AAATTTTCGACGCCCAAGAGGGTCAATGGCCAGGAAAGTTTGACGACAGAACAGTCCAGGAGGACAT	257

cons *

1c1 AY582837.1_	171	GAAGCACTGGCCCTTCAAGGTCAATCCAGAAGCCCGGCAAGCCCTACATCCAGGTTGAGTA	233
1c1 U11761.1_cd	267	GACTCACTGGCCATTAAAGTAGTTAGAGGTTCCAAAGGACAAAGCCAAATCATCAGTGTAAACTA	329
1c1 Z26134.1_cd	261	GAAACACTGGCCGTTTACAGTTAAGCAGGTTCCAGGAGGCAAGCCCTCTAATAGAAAGTTAATTA	323
1c1 X52314.1_cd	261	GAAGCACTGGCCGTTCAAGGTGACGACGAAGGCGGACGACAAAGCCCAATGATTCGGGTGCAGTA	323
gi 309689 gb M1	316	GAAACATTGGCCATTCACTGTTAAATCAGGTGTTGATGAGAAAACCAAATGATTTGAAGTTACCTA	378
1c1 U85648.1_cd	261	GAAGCATTGGCCATTCAAGGTCAATGCTGGTCCGGGAGACAAGCCCTTCATTTGAAGTCACGTA	323

1c1|U40190.1_cd 258 GAAGCACTGGCCATTCAAAGTTACCAACGGACCACCAAGGAAAGCCGAACATTGAAGTGACCTT 320

cons 316 ** ** ***** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** *

1c1|AY582837.1_ 234 CAAGGGCGAGACCAAGGAGTTCTCTCCTGAGGAAATCTCTTCGATGGTCTCGTCAAGATGAA 296
1c1|U11761.1_cd 330 CTTAGGTGAAAAGAAAGGAATTCCATGCTGAAGAAATTTCTGCTATGGCTTTACAAAAGATGAA 392
1c1|Z26134.1_cd 324 TCAAGGCAGCAAGAAGACCTTTCATCCTGAAGAGATA TCAGCAATGGTCTTGATGAAGATGAA 386
1c1|X52314.1_cd 324 CCGCGGCGAGGAGAAACCTTCACGCCGGAGGAGATCAGCTCGATGGTCTGCTGAAGATGAA 386
gi|309689|gb|M1 379 TCAAGGAGAAAAGAAAATTATTCATCCAGAAATAATTCCTTCTATGGTATTACAAAATAATGAA 441
1c1|U85648.1_cd 324 CCAGGGAGAGAAGAAGACGTTCCACCCCTGAAGAGGTTTCCGCCCATGGTTTTGGGCCAAAATGAA 386
1c1|U40190.1_cd 321 CCAAGGTGAAAAGAACCTTCCACGCAGAGAGATATCTCCATGGTCTTACCAAGATGAA 383

cons 379 ** ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **

1c1|AY582837.1_ 297 GGAGACCGCAGAGCCCTACCTCGGCCAGCCCATCAACTCGGCCGTCATTACGGTCCCCCGGTA 359
1c1|U11761.1_cd 393 GGAGATCTCTGAAGCATACTTGGGTGCGCCAAATTAAGAACGCTGTAGTTACTGTTCAGCTTA 455
1c1|Z26134.1_cd 387 AGAAAATAGCTGAAGCATTCA TAGGAAAGAAAGTTAAAGAAGCTGTTATTACTGTACCTGCATA 449
1c1|X52314.1_cd 387 GGAGACGGCGGAGGCGTACCTGGGCAAGCAGGTGAAGAAGGCCGTTGGTGACGGTGCCGGCGTA 449
gi|309689|gb|M1 442 AGAAAATGCTGAAGCATTTTAGGAAAATCTATAAAAGAAATGCTGTCAATTACCGTTCAGCTTA 504
1c1|U85648.1_cd 387 GGAAAATCGGGAGGCTTACCTCGGCAAGGAAGTGAAGGAGGCCGTCATTACCGTTCCTGCCTA 449
1c1|U40190.1_cd 384 GGAAAATAGCCGAAGCCTTTTTGGGAAAGAGCCGTCAAGGACGTCTCATCACCGTTCAGCCCTA 446

cons 442 ** * * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **

1c1|AY582837.1_ 360 CTTCAACGACTCGCAGAGGCGAGGCCACGAAAGGACGCTGGTACCATCTCCGGTATGCAGGTCAA 422
1c1|U11761.1_cd 456 TTTCAATGACTCACAGCGTCAAGCAACAAAGGATGCAGGTGCAATTGCTGGTTTGAATGTAAT 518

1c1 Z26134.1_cd	450	TTTTAACGACTCACAAAGACAAGCAACAAAAGATGCTGGGACTATCGCAGGATTAAATGTCTT	512
1c1 X52314.1_cd	450	CTTCAACGACTCGCAGGCCAGGCAACGAAAGGACGCCGGCACGATGCTGGCCTGGAGGTGCT	512
gi 309689 gb M1	505	TTTTAACGATTACAAAGACAAGCTACTAAAGATGCTGGTACAAATTGCAGGATTAAATGTTAT	567
1c1 U85648.1_cd	450	CTTCAACGATTCCGACGGTCAGGCTACCAAGGATGCTGGTACCAATTGCCCGGCCTCAGCGTCCCT	512
1c1 U40190.1_cd	447	CTTCAACGACTCTCAAAGACAAGCAACCAAGGACGCCGGAACCATAGCCGGACTCAATGTTCAT	509
cons	505	*** ** ** ** **	567
1c1 AY582837.1_	423	GCGAATCATCAACGAGCCCAACCGCCCGCTATTGCCCTACGGTCTCGACAAGAAAGTCCAGGG	485
1c1 U11761.1_cd	519	GAGAATCATTAACGAGCCAACTGCAGCTGCTATTGGCTTAGGCTTTGATAAGAAAGGAACTGG	581
1c1 Z26134.1_cd	513	AAGAAATTAATGAGCCTACTGCAGCAGCTATTGCATATGGTTAGATAAGAAAGGACACGG	575
1c1 X52314.1_cd	513	GCGCATCATCAACGAGCCGAC - GC - G - CGCCATCGCGTACGGCCCTGGACAAGGGCGACGACGG	572
gi 309689 gb M1	568	GAGAATTAATTAATGAACCTACTGCAGCTGCTATTGCATATGGTTACACAAAAAGGAAAAGG	630
1c1 U85648.1_cd	513	CCGCATTATCAACGAGCCCAACAGCGGCTGCCATTGCTTATGGTCTGGACAAGAAAGGGCTGC	575
1c1 U40190.1_cd	510	GAGGATCATCAACGAGCCAACTGCAGCAGCCATAGCCCTACGGTTTAGATAAGAAAGGGCGCGG	572
cons	568	*** ** ** ** * ** ** ** **	630
1c1 AY582837.1_	486	TGAG --- ATGAAACGTGCTCATCTTCGATCTTGGCGGGGTACTTTCGACGTCTCGTCCCTCAC	545
1c1 U11761.1_cd	582	CGAG --- AGAAATGTATTGATCTTCGATTTAGGTGGTACTTTTGGATGTATCATTTAATAAC	641
1c1 Z26134.1_cd	576	GGAG --- ATGAAATGTGCTTATCTTTGATAATGGGAGGGGTACCTTTTGAATGTATCTTTAATAAC	635
1c1 X52314.1_cd	573	CAAGCAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTCGATGTGAGCCTGTGAC	635
gi 309689 gb M1	631	TGAA --- AAGAACATTTTAAATTTTCGACTTAGGAGGAGGTACATTTTGAATGTATCATTTAATAAC	690
1c1 U85648.1_cd	576	TGAG --- ATGAAACGTCTCATCTTCGACATGGGTGGCGGTACGTTTCGATGTGTCGCTGCTTAC	635
1c1 U40190.1_cd	573	TGAG --- AAGAACGTTTAAATATTCGATTTGGGTGGTGGTACCTTCGATGTTAGCATAATTGAC	632
cons	631	* ** ** ** **	693

1c1 AY582837.1_	546	TATCGAGGAGGGCA	608	TATCGAGGAGGGCA
1c1 U11761.1_cd	642	TATTGAAGATGGTAT	704	TATTGAAGATGGTAT
1c1 Z26134.1_cd	636	AATTGAGGACGGTAT	698	AATTGAGGACGGTAT
1c1 X52314.1_cd	636	GATCGACGGGGCAT	698	GATCGACGGGGCAT
gi 309689 gb M1	691	TATTGAAGATGGTAT	753	TATTGAAGATGGTAT
1c1 U85648.1_cd	636	AATCGAAGACGGTAT	698	AATCGAAGACGGTAT
1c1 U40190.1_cd	633	CATAGAAGATGGTAT	695	CATAGAAGATGGTAT
cons	694	** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **	756	** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
1c1 AY582837.1_	609	TTTGTGATAACCGCA	668	TTTGTGATAACCGCA
1c1 U11761.1_cd	705	TTTGTGATAACAGACT	767	TTTGTGATAACAGACT
1c1 Z26134.1_cd	699	CTTGTGATAATAGACT	761	CTTGTGATAATAGACT
1c1 X52314.1_cd	699	CTTGTGATAATAGACT	761	CTTGTGATAATAGACT
gi 309689 gb M1	754	TTTGTGATAACAGACT	816	TTTGTGATAACAGACT
1c1 U85648.1_cd	699	TTTGTGATAACAGACT	761	TTTGTGATAACAGACT
1c1 U40190.1_cd	696	CTTGTGATAACAGACT	758	CTTGTGATAACAGACT
cons	757	** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **	819	** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
1c1 AY582837.1_	669	CATCTCCGGCAACCGT	731	CATCTCCGGCAACCGT
1c1 U11761.1_cd	768	TTTAACTCAAATGCTA	830	TTTAACTCAAATGCTA
1c1 Z26134.1_cd	762	TCCGAGCAAAACAGT	824	TCCGAGCAAAACAGT
1c1 X52314.1_cd	762	CCTGGCTCGAGCCAC	824	CCTGGCTCGAGCCAC
gi 309689 gb M1	817	TTTATCAAAAATAAGT	879	TTTATCAAAAATAAGT

1c1 U85648.1_cd	762	CATCAGCACCAACGCCGTGCCCTTCGTCGCCTGCCGTACCCAGTCCGAGCGCACCAAGAGAAC	824
1c1 U40190.1_cd	759	CATCTCATCAAACAAGAGAGCTCTAAGGAGACTAAGGACCCACTGTGAACGTGCAAAAGAGAGT	821
cons	820	* *	882
1c1 AY582837.1_	732	TTTGTGTCGTCGCCACTCAGACCAACATGAGATCGACTCTCTCTTCGAGGGGTATCGATTCTTA	794
1c1 U11761.1_cd	831	TTTGTCACTTCTACTCAAGCTACAATTGAGTTAGATTCACTCTATGAAGGTAATTGATTAATTC	893
1c1 Z26134.1_cd	825	ATTATCAAGCAGCACACAAGCAACAATTGAGATAGACTCTTTATTTGAGGGTATTGATTAATTC	887
1c1 X52314.1_cd	825	GCTGTGTCGTCGCGGACGCAAGCGGACGATCGAGATCGAGCGGCTGTTTCGAGAACGTTGACTTTCA	887
gi 309689 gb M1	880	TTTATCATCATCTACACAAGCTACAATTGAAATAGATTCCCTTATTTGAAGGTAATTGATTAACAG	942
1c1 U85648.1_cd	825	TCTCTCTAGCAGCACTCAGGCAACCATCGAAATTGACTCTCTTTTGGAGGGCATTGACTACTTC	887
1c1 U40190.1_cd	822	ACTCTCAAGCTCAACCCAGGCCACCATTGAACCTCGACTCTCTATACGAGGGCATTGACTACAAA	884
cons	883	* *	945
1c1 AY582837.1_	795	CACCTCGATCACCCGTCGCCGTTTCGAGGAGCTCTGCGCCGATCTTTTCCGTTTCGACCATGGA	857
1c1 U11761.1_cd	894	AGTTGCCATCAGTAGAGCTAGATTTCGAAGAACTCTGCGCCGATTACTTCCGTGCAACTTTAGC	956
1c1 Z26134.1_cd	888	TGTGTCCCTTCTAGAGCTCGCTTTGAGGAATTATGCATGGAATTACTTCAGGAACCTCTCTTGT	950
1c1 X52314.1_cd	888	GGCCACCATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGACCTGTTCGCGCAGCAGGATCCA	950
gi 309689 gb M1	943	TGTTACTGTAAGTAGAGCAAGATTGAAAGAATTATGTAATCGACTATTTCCGTTGATACTTTAAAT	1005
1c1 U85648.1_cd	888	TGTGTCTATCTCTCGTCCGCGCTTTGAGGAGCTTTTGCAATGGACTACTTCCCGCAACTCCCTGTT	950
1c1 U40190.1_cd	885	CACCACCATTAGCAGGGCAAGGTTTCGAGGAGCTCTGTAAACGAGAAGTTCAGAAGCACACTGGT	947
cons	946	* *	1008
1c1 AY582837.1_	858	CCCCGTCGAGAAAGGTCCTCCCGCAGCCCAAGATGGACAAGCCGCTCGGTGAGCGGAGGTCGTGCT	920
1c1 U11761.1_cd	957	TCCAGTTGAGAAAGTACTCAAGGATGCTGGTATGGACAAGAGATCTGTACATGATGTTGTATTT	1019
1c1 Z26134.1_cd	951	ACCTGTTGAAAAGGTTCTGAAAAGACAGCGGCAATTGATAAACCGCAGTGTACATGAAGTAGTACT	1013
1c1 X52314.1_cd	951	GCCGGTGGAGCGTGTCTGCAGGACCGCAAGATGGACAAGCCGCTCCGTGCACGACGTTGGTGTCT	1013

gi 309689 gb M1	1006	TCCAGTAGAAAAAGTTTTAAAGGATGCTATGATGGATAAAAAAAGTGTACATGAAGTTGTTTT	1068
lc1 U85648.1_cd	951	GCCCGTCGAGAAGGTCCTCAAGGACTCTGGTATTGACAAGCGCTCGGTGAGCGAAAGTTGTGTT	1013
lc1 U40190.1_cd	948	TCCAGTTGAGAAGGCACCTGAGTCCCTCAGGACTTGACAAGAAGCATCCACGAAGTCGTGTT	1010
cons	1009	** ** *	1071
lc1 AY582837.1_	921	CGTCGGTGGTCCACCCTGATCCCAAGATCCAGCAGCTCGTTACCCAGTTCCTTCAACGGCAA	983
lc1 U11761.1_cd	1020	GGTTGGTGGTCTACACGTAATCCAAAGGTTCAGGCCCTTGATTCAGGAATCTTTAAACGGTAA	1082
lc1 Z26134.1_cd	1014	TGTCGGTGGATCTACTCGTATTCGGAAGATACAGCAACTTATTCAGAGTTCCTTCAACGGTAA	1076
lc1 X52314.1_cd	1014	GGTGGCGGGTCAACGGCATCCCGAAGGTGCAGTCCCTCGTGTGGACTTCTTCGGCGGCCAA	1076
gi 309689 gb M1	1069	AGTTGGTGGTCTACAAGAAATCCAAAAATCCAAACTTAAATAAAAAGAAATCTTTAATGGTAA	1131
lc1 U85648.1_cd	1014	GGTTGGTGGATCTACCCGTAATCCCAAGATTCAGCAGCTCATCAGTTCCTTCAACGGAAA	1076
lc1 U40190.1_cd	1011	AGTCGGTGAAGTACCAGAAATCCCAAGATCCCAACCCCTCATCAAGAACTTCTTCAACGGAAA	1073
cons	1072	** ** *	1134
lc1 AY582837.1_	984	GGAGCCCTGCAAGTCGATCAACCCCGATGAGGCCGTGCTTACGGTGTCTGCCGTCCAGGCCCGC	1046
lc1 U11761.1_cd	1083	AGAGCCATGCAAAAGCAATCAATCCAGACGAAGCTGTTGCTTATGGTGTGCTGTACAAGCTGC	1145
lc1 Z26134.1_cd	1077	GGAGCCCTGCCGATCGATTAACCCCTGATGAAGCTGTTGCAATATGGTGTGCTGCAAGCAGC	1139
lc1 X52314.1_cd	1077	GGAGCTGAACAAGATCAACCCCGACGAGGCTGTCCGTTACGGCGGGCGGTGCAGGCCCTT	1139
gi 309689 gb M1	1132	AGAAGCATGCAGATCAATTAACCCAGATGAAGCTGTTGCATATGGTGCAGCTGTACAAGCAGC	1194
lc1 U85648.1_cd	1077	GGAGCCGTGCAGGTCGATCAACCCCGATGAGGCCGTTGCCGTACGGTGTGCTGTCCAGGCAGC	1139
lc1 U40190.1_cd	1074	GGAGCCATGCAGGTCATCAACCCAGACGAAGCATGTTGCCCTACGGTGCAGCAGTCCCAAGCCGC	1136
cons	1135	** *	1197

1386

*** ** ** ** **

1324

cons

1298

CATCCAGGTCTACGAGGGCGAGCGTGCCATGACCAGGGACAACAACATGCTCGGCAAGTTCCGA

1236

lcl|AY582837.1_

1391

GATCCAAGTTTATGAGGGTGAGAGAGCCATGACTAAGGATAACCACTCTCCTCGGAAGTTCCA

1329

lcl|U11761.1_cd

1385

TATTCAAGTGTTTGAAGGAGAGAGAGCTATGACTAAGGATAATAATCTCTTAGGTAAGTTTCA

1323

lcl|Z26134.1_cd

1385

CATCCAGGTCTTTCGAGGGCGAGCGCGGATGACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTCCGA

1323

lcl|X52314.1_cd

1440

AATTCAAGTATATGAAGGTGAAAGAGCCTTAACCAAAGATAACAATTTATAGGAAAATTCCA

1378

gi|309689|gb|M1

1385

GATTCAGGTGTACGAAGGTGAGCGTGCGATGACCAAAGACAACAACCTCCTGGGCAAAATTCCA

1323

lcl|U85648.1_cd

1382

GATTCAGGTGTAAAGGTGAACGTGCAATGACCAAGGACAACAACCTTGCTCGGAAAGTTCCA

1320

lcl|U40190.1_cd

1449

*** ** ** ** **

1387

cons

1361

GCTCACTGGCATCCCCCGCTCCCCGGGTGTCCTCAGATCGAGGTCACCTTCGACATTTGA

1299

lcl|AY582837.1_

1454

FTTGTATGGTATTCACACCAGCACCAGAGGTGTACCAACAATGAAGTCACCTTTGATATTTGA

1392

lcl|U11761.1_cd

1448

TTTAGACGGTATTCGCGCGGCACCGAGAGCGGTACCGCAGATAGAGGTGACGTTGATATTTGA

1386

lcl|Z26134.1_cd

1448

CCTGTCCGGCATCCCGCGCGCGCGGTGTGCGCGCAGATCGAGGTGACGTTCCGACCTGGA

1386

lcl|X52314.1_cd

1503

CTTAGATGGTATTCACCTGCACCAAGAAAGGTACCACAATCGAAGTTACATTCGATATTCGA

1441

gi|309689|gb|M1

1448

CCTGGATGGTATCCCCCGCCCCCGTGGTGTCCCCCAATCGAAGTCACTTTCGATATTCGA

1386

lcl|U85648.1_cd

1445

CCTAACAGGAATCGCTCCCGCTCCAAGAGGTGTTCCCTCAAATGAAGTCACCTTCGACATTTGA

1383

lcl|U40190.1_cd

1512

*** ** ** ** *

1450

cons

1384

CGCCAAACGGTATCCCTCAAACGTCA-----

1362

lcl|AY582837.1_

1517

TGCTAATGGTATCTTGAATGTGTCTGCTGTTGATAAAGAGTACTGGTAAGAGCAGCAAGATCAC

1455

lcl|U11761.1_cd

1511

CGCCAAACGGTATTATGAATGTAACACTGCACAGAAAGAACACCCGGTAAATCAAATCAAATCAC

1449

lcl|Z26134.1_cd

1c1|X52314.1_cd 1449 CGCAAACGGCATCCTGAACGTGTCCGGGAGGAGAAAGGGCACCGGCAAGCGCAACCCAGATCAC 1511
 gi|309689|gb|M1 1504 TGCTAACGGTATCTTAAACGTTACGGCTGTAGAAAAATCCACTGGTAAACAAAAACCATATTAC 1566
 1c1|U85648.1_cd 1449 CGCTAACGGTATCATGAACGTACAGCGCAAGACAAGTCCACCGGAAAGAGCAACCAAAATCAC 1511
 1c1|U40190.1_cd 1446 CGCAAATGGTATCTTGAACGTCAACCGCCATGGACAAGTCGACTGGAAAAGTCGGAACACAGTAC 1508

cons 1513 ** ** ** * ** **

1c1|AY582837.1 1385 -----ACG-----CC-----GC 1391
 1c1|U11761.1_cd 1518 TATTACTAACGATAAGGTAGATTATCAAAGGTA TCTGATATTGAACGTATGGTTAATGATGC 1580
 1c1|Z26134.1_cd 1512 TATTACAAACGATAAAGGACGACTAAGCCAA ---GGTGAATTCGATAGGATGGTAGCTGAAGC 1571
 1c1|X52314.1_cd 1512 CATCAACCAACGACAAGGGCCGGCTGAGCAAG ---GACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGC 1571
 gi|309689|gb|M1 1567 AATTACCAACGACAAAAGGAAGATTATCTCAA ---GATGAAAATTGATCGTATGGTTAATGATGC 1626
 1c1|U85648.1_cd 1512 CATCACGAACGACAAGGGCCCGCTCAGTGCG ---TCCGAAAATCGACCGCATGGTCAAGAGGC 1571
 1c1|U40190.1_cd 1509 CATCAACCAACGACAAGGGCCGCTTGAGCCAG ---GAAGAAAATTGACAGAATGGTTGAGGAGGC 1568

cons 1576 ***

1c1|AY582837.1 1392 CGA-----CA-----AG----- 1398
 1c1|U11761.1_cd 1581 TGAGAAATACAAGGGTGAGGATGAGCAGACAGACTTAAGATTGAGGCTAAGAACTCTTTGGA 1643
 1c1|Z26134.1_cd 1572 TGAGAAATATAAGGCTGAAGATGAAGCAAATAAACAAGAGTAGAAGCTAAGAAATGCCACTTGA 1634
 1c1|X52314.1_cd 1572 GATGAAGTACGAGGGCGGACGACAGGGCCGACGGCCGACCCGGTGGAGGCAAAAGAACGGCCTGGA 1634
 gi|309689|gb|M1 1627 TGAAAATAACAAGCAGAAGATGAAGAAAACAAGAAAAGAAATCGAAGCAAGAAACAGCCCTTGA 1689
 1c1|U85648.1_cd 1572 AGAGAAGTACAAGCCGAAGACGAACAGAACAGCACCGTGTGGAGGCCGAAAGAAATGGCCCTGGA 1634
 1c1|U40190.1_cd 1569 TGAGAAAGTACAAGGAGGACGAGAGCCGAGGAA GTGCGTTGAGAGCAAAACATAAGCTTGA 1631

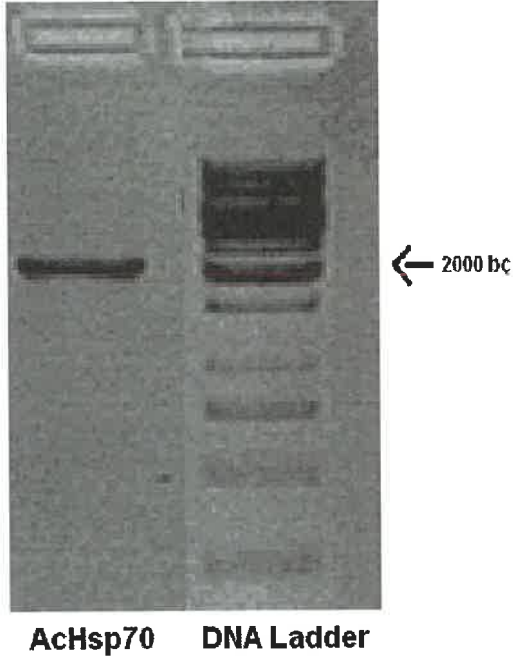
cons 1639

Dizayn edilen primerler ile elde edilen PCR ürünü dizi analizine gönderilip aşağıdaki sonuç elde edilmiştir.

ATGGCGGACTCTCCTGCTGTGGGTATTGACCTTGGCACCACCTATTCTTGCGTAGGTGTGT
GGAAGAACGATGCTGTGGAAATCATCGCGAACGACCAGGGAAACAGGACGACCCCGTCTC
ACGTCGCGTTCACCGACACGGAGAGACTTGTCCGGTGATGCTGCGAAGAACCAAGTCGCAC
GCAACCCGGAAAACACCATTTTCGATGCCAAGCGCCTAATCGGTGCGCAAGTTTGATGATCC
CTCGGTCCAGTCGGACATGAAGCATTGGCCATTCAAGGTCATTGCTGGTCCGGGAGACAA
GCCCTCATTGAAGTCACGTACCAGGGAGAGAAGAAGACGTTCCACCCTGAAGAGGTTTC
CGCCATGGTTTTGGGCAAATGAAGGAAATCGCGGAGGCTTACCTCGGCAAGGAAGTGAA
GGAGGCCGTCATTACCGTTCCTGCGTACTTCAACGATTGCGAGCGTCAGGCTACCAAGGA
TGCTGGTACCATTGCCGGCCTCAGCGTCTCCGCATTATCAACGAGCCCACAGCGGCTGC
CATTGCTTATGGTCTGGACAAGAAGGGCTGCGGTGAGATGAACGTCCTCATCTTCGACATG
GGTGGCGGTACGTTTCGATGTGTCGCTGCTTACAATCGAAGACGGTATCTTTGAAGTCAAG
GCCACCGCTGGTGACACCCATCTTGGTGGTGAAGATTTGACAACCGTTTGGTGGACTTCT
GCGTCCAGGACTTCAAGCGCAAGAACCGCGGAAAGGACATCAGCACCAACAGCCGTGCC
CTTCGTGCGCTGCGTACCCAGTGCAGCGCACCAAGAGAACTCTCTCTAGCAGCACTCAG
GCAACCATCGAAATTGACTCTCTTTTTGAGGGCATTGACTACTCTGTGTCTATCTCTCGTGC
GCGCTTTGAGGAGCTTTGCATGGACTACTTCCGCAACTCCCTGTTGCCGTCGAGAAGGT
CCTCAAGGACTCTGGTATTGACAAGCGCTCGGTGAGCGAAGTTGTGTTGGTTGGTGGATC
TACCCGTATCCCCAAGATTCAGCAGCTCATCACTGACTTCTTCAACGGAAAGGAGCCGTGC
AGGTGATCAACCCCGATGAGGCCGTTGCGTACGGTGCTGCTGTCCAGGCAGCGATCTTG
AAGGGAGTTACCAGCTCTCAGGTGCAGGATTTGCTTCTTCTGGATGTTGCGCCTCTCTCTC
TCGGTCTGGAGACAGCTGGTGGTGTGATGACCAAGCTGATTGAAAGAAACACGTGGCGTC
ATGACCGCGCTCATCCCCGCAACACCACCATCCCCACCAAGAAGACCCAGGTCTTCTCC
ACCTACTCGGACAACCAGCCCGGCGTGCTCATCCAGGTCTACGAGGGCGAGCGTGCCAT
GACCCGCGACAACAACCTCCTCGGCAAGTTCGAGCTCTCGGGCATCCCCCGCGCCCC
GCGGTGTGCCCCAGATCGAGGTCACCTTCGACATTGACGCCAACGGTATCCTCAACGTCA
ACGCCGCGACAAGACCACCGGTGCTCCGAGAAGATCACCATCACCAACGACAAGGGC
CGTCTCTCCAAGGAGGAGATCGAGCGCATGGTCAAGGAGGCCGAGAAGTACAAGAACGA
CGACGAGAACGCCAAGGAGAAGGTGAGGCCAAGAACGCCCTCGAGAACTACGCCTACA
CCATGCGCAACACCATCCGCGACGACAAGATCGCCTCCAAGCTCGACTCGGGCGACAAGT
CCAAGATCGAGGAGGCCGTCGACGCCGTCATCAAGTGGCTCGACACCAACCAGACCGCC
GAGAAGGACGAGTTCGAGCACAAAGCGCAAGGAGCTCGAGGACCTCTGCAACCCCATCTTC
ACCAAGATGTACCAGGGTGCCGGCGGGCGCTGGCGGCATGCCGACATGGGCGGCATGG
GCGGCGGCTTCCCCGGCGGTGCTGGCGGTTTTCCCCGGCGGCGGGCTCCCCGGCGGTGG
TGCCCGTCCCTCTGGCGGTT

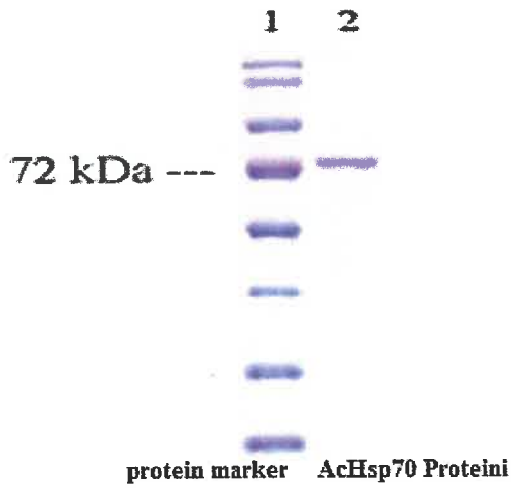
4.2. PCR ürünün agaroz jel ile görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünü %1 lik agaroz jelde 1 kb lik DNA ladder kullanılarak görüntülenmiştir. Ürün yaklaşık 2000 bp uzunluğundadır.



Şekil 4.1. PCR ürünü agaroz görüntüsü.

4.3. AcHsp70 Proteininin SDS-PAGE jel ile görüntülenmesi

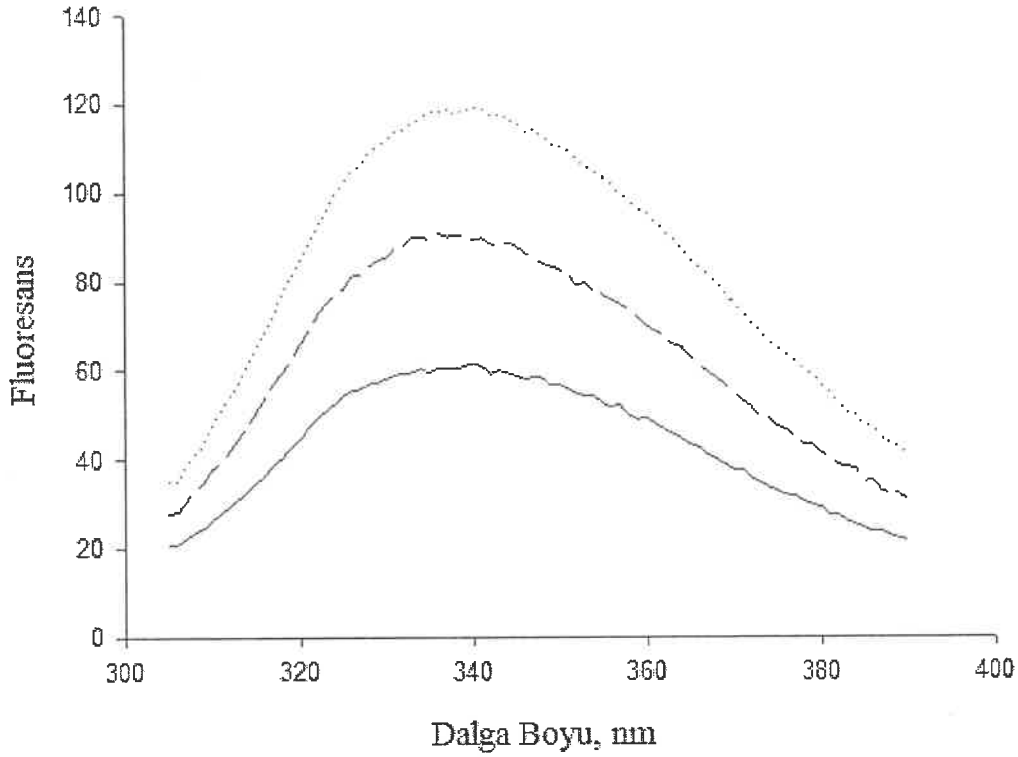


Şekil 4.2 AcHsp70 SDS-PAGE jel görüntüsü

4.4 Fluoresan Spektroskopisi:

4.4.1. Emisyon Spektroskopisi:

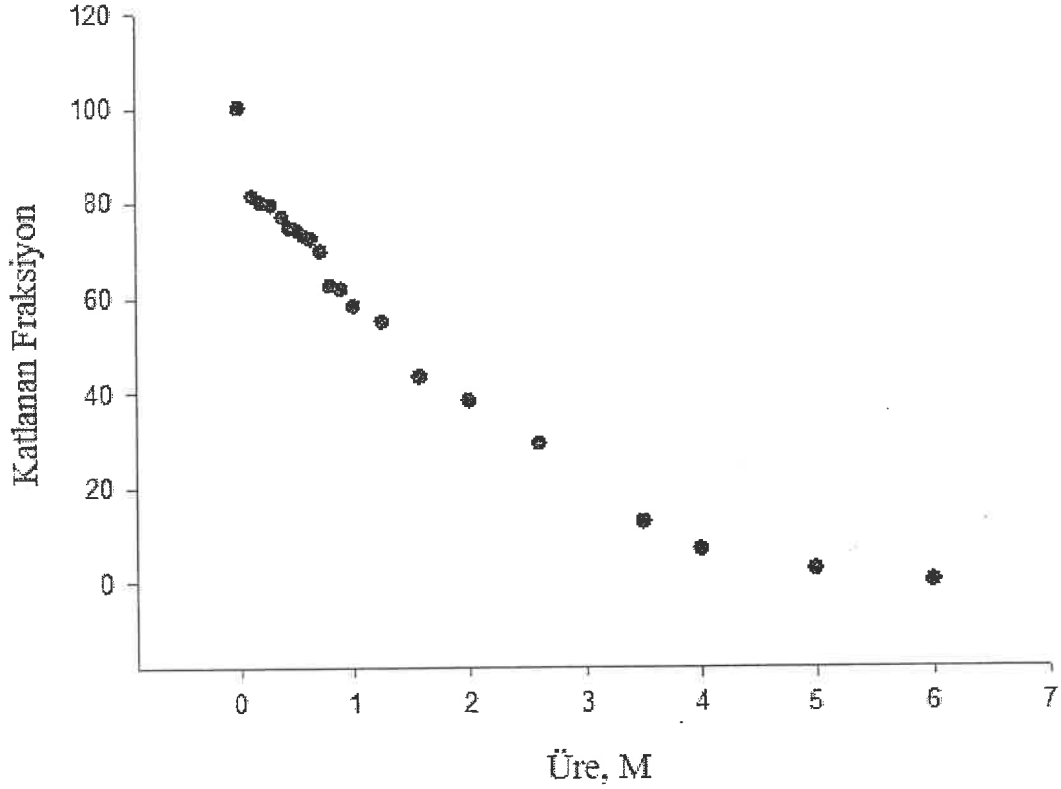
Fluoresan spektroskopisi proteinlerdeki kromoforların emisyonunu kullanarak protein yapısında meydana gelen konformasyonel değişim tayininde oldukça etkin bir yöntemdir. Bu özellikten yararlanarak izole ettiğimiz Hsp70 proteininin ATP, ADP ve nükleotit yokluğunda emisyon spektrumlarını aldık (Şekil 4.3.1). Nükleotit varlığında 10 nm lik kırmızıya kayma gözlemlenmesi, Hsp70 proteininin ligand bağlanması ile konformasyonunun değişimini göstermektedir. Nükleotit varlığı protein spektrumunu söndürmesi (quenching) sinyalde azalmaya sebep olmuştur. Bu söndürme tamamen hidrolize nükleotit (ADP) varlığında daha fazladır.



Şekil 4.3 Hsp70 proteininin ATP (kesikli çizgi), ADP (kesiksiz çizgi) ve nükleotitsiz (nokta) hallerinin içsel emisyon spektrumu. Uyarma 290 nm dalga boyunda yapılp giriş ve çıkış yarıkları 5 nm dir.

4.4.2. Denaturasyon:

Gibbs serbest enerjisi proteinlerin kararlılıkları için iyi bir ölçüdür. Bu termodinamik verinin hesaplanması için proteinlerin renatüre olması gereklidir. Diğer türlerde gözlemlendiği gibi bu çalışmada kullanılan Hsp70 renatüre olmamıştır. Dolayısı ile Gibbs serbest enerjisi hesaplanamamıştır. Farklı koşullar (iyonik şiddet, pH, farklı tampon sistemleri) Hsp70 proteininde renaturasyonu sağlayamamıştır. Benzer sonuçlar nanoDSC ile de elde edilmiştir. Sıcaklık-basınca dayalı denaturasyon işlemlerinde asit bazlı denaturasyon ile aynı sonucu vermiştir. Bunun bir sebebi Hsp70 yapılarının oldukça hidrofobik yapılara bağlanmasıdır. Kendi yapısı bozulan Hsp70 bir diğeri için substrat olduğundan Hsp70 muhtemelen oligomerleşmekte ve sonra kümeleşmektedir. Şekil 4.3.2 ye baktığımızda ikincil yapıların muhtemelen 2 M üre konsantrasyonunda bozulmaya başladığı gözlemlenebilir.



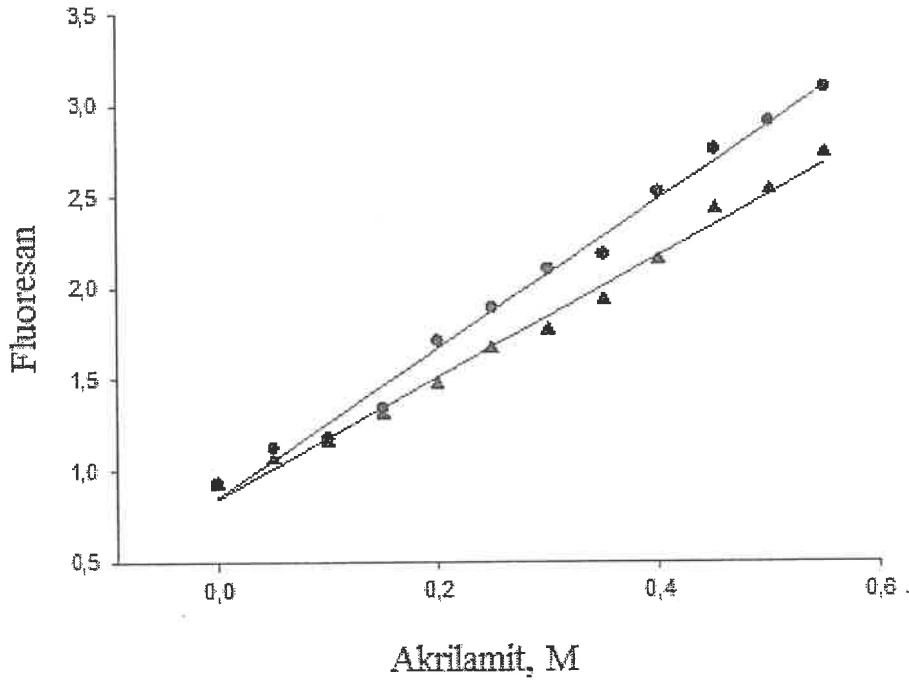
Şekil 4.4 Hsp70 yapısının farklı üre konsantrasyonlarında bozunması.

4.4.3. Söndürme deneyleri:

Akrilamit söndürme deneyleri 290 nm eksitasyon sağlanarak akrilamit kaynaklı girişimlerin önüne geçilmiş oldu. 1M stokdan titrasyon yapılarak deneyler tekrar edildi. ADP konsantrasyonu 2 mM alındı ve emisyonlar 332 nm de kaydedildi. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Analizler $F_0/F: 1 + K [Q]$ Stern–Volmer formülüne göre yapıldı. F_0 ve F akrilamit yokluğunda ve varlığındaki fluoresan şiddeti, $[Q]$ molar konsantrasyon ve K Stern–Volmer sabitidir.

Akrilamit nükleotit varlığı ve yokluğunda benzer şekilde etkimiş ve K değerleri 0,315 ve $0,225 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar kromofor çevresinin ligand bağlanması ile oldukça farklı değişimler vermediğini göstermektedir (Şekil 4.3.3). ATP

nükleotidi ADP ye çevrildiğinden ve aşırısının söndürmeye katkısı olduğu için hesaplamalar sadece ADP nükleotiti ile yapılmıştır.



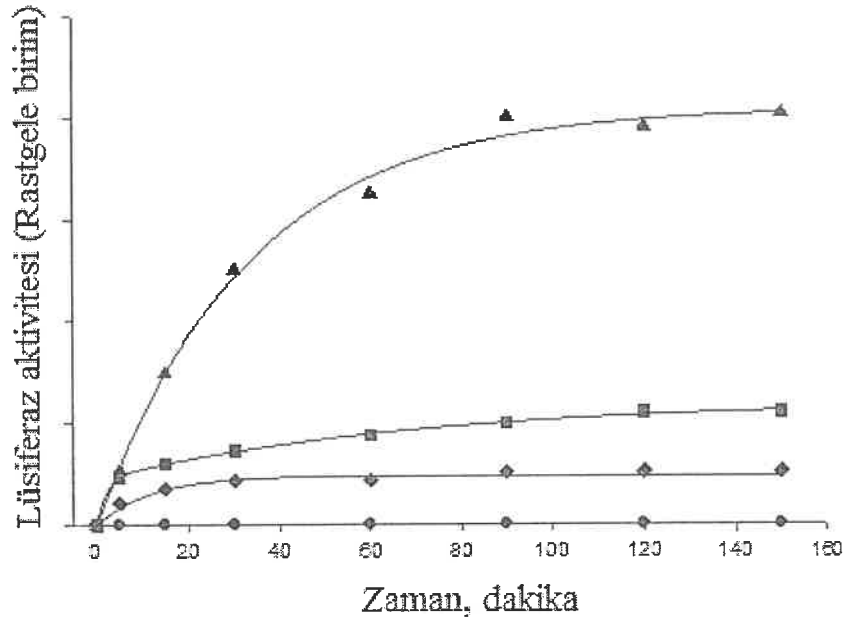
Şekil 4.5 Akrilamit söndürme deneyleri. Hsp70 (●), Hsp70 ve ADP (▲).

4.5. Luminesans spektroskopisi:

Lüminesans rasgele bir ışınım yöntemi olmasına rağmen özellikle kalabalık makromolekül ortamlarında oldukça etkili bir yöntemdir. Lüminesans veren doğal bir rotein olan lüsiferaz oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hsp70 proteininin en önemli fonksiyonlarından birisi protein katlamak olması sebebi ile üre ile denatüre edilip seyreltilen lüsiferaz Hsp70 ile muamele edilerek proteinin katlama derecesi hesaplanmıştır.

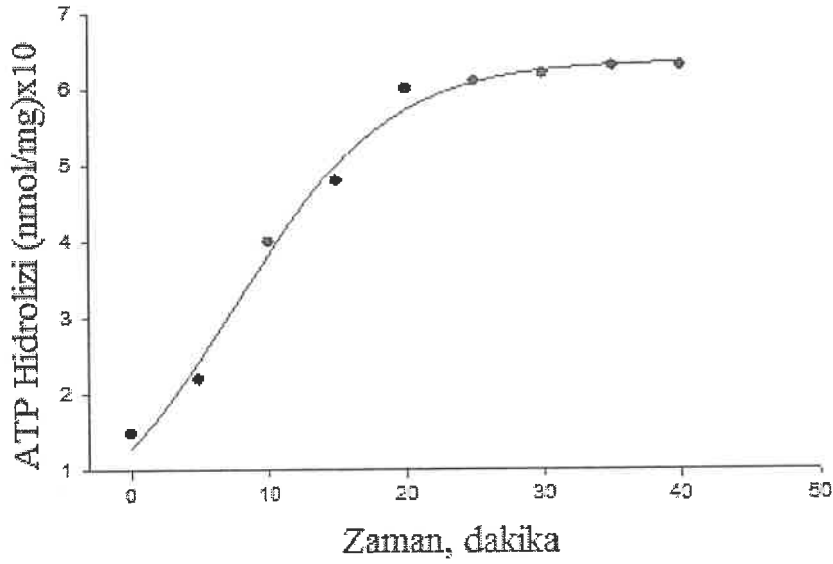
Hiçbir etmen olmadığı zaman lüminesans hep aynı kalmasına rağmen ortama Hsp70 ilavesi agregasyonu kısmi olarak engellemiştir. ATP ilavesi ile Hsp70 in etkinliği ve katlama oranı artmıştır. Hsp70 hücrede diğer proteinlerle koordine olduğu için hücre sitozolü ilavesi ile katlanma maksimum hale gelmiştir (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.6 Hiçbir etmen yok (●), Hsp70 (◆), Hsp70 ve ATP (■), Hsp70 ve sitozol (▲).

4.6 ATP hidrolizi

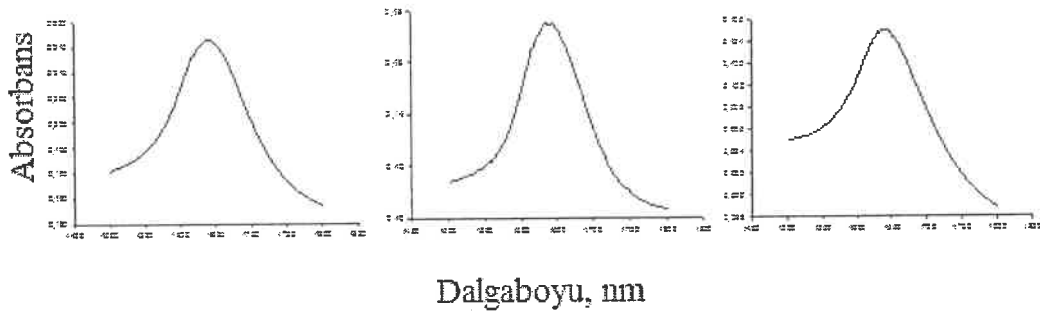
ATP hidrolizi Hsp70 proteinlerinin işlevi için önemli bir göstergedir. Tezin bu kısmında Hsp70 proteinin ATP hidroliz oranları kontrol edildi ve eşlenik analizlerin fosfat ölçme metoduna göre daha duyarlı olduğu gözlemlendi. ATP hidrolizi ilk 10 dk lineer artsada 20 dk sonra sabit bir konsantrasyona gelmiştir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.7 Eşlenik analiz ile ATP hidroliz tayini.

4.7 FTIR analizleri

Amid II bölgesi (1700-1600 nm) bölgesi kullanılarak Hsp70 proteinin yapısında meydana gelen değişimler incelenmiştir (Şekil 4.4.1 A. Hsp70, . Hsp70 + ATP, C. Hsp70 + ADP). FTIR spektrumlarında ikincil yapılar örtüştüğü için Peak Fit programı ile analizleri yapılan spektrumlarda nükleotit ilavesi ile %2 α -heliks- \rightarrow β -tabaka dönüşümü gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 Nükleotid varlığı ve yokluğunda Hsp70 FTIR spektrumları

5.TARTIŞMA- SONUÇ

Hücrel stres öncelikli olarak hücrenin fonksiyonlarını yerine getiren askerleri yani proteinleri etkilemektedir. Proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki küçük değişimler dahi fonksiyonlarını yitirmelerine sebep olmaktadır. Organizmalar proteinlerin yapılarını korumak için farklı taktikler geliştirmişlerdir. Bunların içerisinde en etkin metot proteinlerin doğal üç boyutlu yapısına kavuşmasını sağlayan ısı şok proteinleridir (Hsp). Hsp protein katlama mekanizmasının en önemli parçası Hsp70 protein ailesidir. Hsplerin birden fazla biyokimyasal rolleri vardır fakat en önemlileri substrat proteinlerin katlanması, katlanamaması halinde degradasyona gönderilmesidir.

Daha önce çoğu organizmada çalışılmasına rağmen *A. castellanii* de hiç çalışılmamıştır. Bu tez çalışması ile *A. castellanii*'den izole edilip rekombinant DNA teknolojisi ile aşırı eksprese edilen Hsp70 kolon kromatografisi ile saflaştırılıp, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Hsp70 türler arasında korunması nedeniyle birçok organizmada universal olarak bulunmaktadır. Hsp70 ler sadece hücrenin bir kompartmanında lokalize olmayıp aynı kompartmanda birden çok redundant formu bulunabilmektedir. Farklı koordine proteinler ile etkileşen bu formların farklı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada Hsp70 proteininin olası konformasyonel değişikliklerin incelenmesi ile başlamıştır. Nükleotid varlığında proteinin floresan ışımaları karşılaştırılmış ve konformasyonel değişimin daha çok üç boyutlu yapıda olduğu görülmüştür. Hsp70 deki ATPaz ünitesine nükleotidin bağlanması ile bir sinyal oluşmakta ve bu sinyal substrat bağlama domainine ulaşarak, substratın katlanması için hidrofobik ortam oluşmaktadır. Kromoforların sulu ortama çıkması yada proteinin içine gömülmesi katlama mekanizmasının işleyişi sırasında protein yüzeyindeki değişimlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla söndürme deneyleri, floresan ve FTIR deneylerini desteklemiştir. Kromoforlara nükleotidin etkisi oldukça küçüktür. Konformasyonel değişim proteinlerin yüzeyinden ziyade üniteler arası etkileşimle olmaktadır. Hsp70 proteini renature olmadığı için DSC deneyleri yapılamamıştır.

FTIR deneyleri proteinlerin ikincil yapılarında belirgin bir değişme olmadığını önermiştir. Yani konformasyonel değişimler globüler yapıda gözlemlenebilir. Söndürme deneyleri nükleotid varlığında derişim göstermemesi proteinlerin "rigid body movement" katı yüzey hareketi yaptığının bir göstergesidir. Nükleotidler hidroliz

sonrası sinyali substrat bağlanma ünitesine iletmesi proteinde belirgin konformasyonel değişim göstermeden oluşmaktadır.

Plasmodium falciparum'da (Pf) son yıllarda yapılan deneylerde bu parazitin enfeksiyon işleminde Hsp proteinlerinin etkin bir görev yaptığı açığa çıkarılmıştır. Özellikle eritrositlerde yapılan çalışmalarda Pf nin Hsp yapısı diğer organizmalar benzediği için immün sisteminin yanılıısına sebep olduğu ve enfeksiyona yol açtığı rapor edilmiştir [83].

Protozoanlar diğer organizmalarda olduğu gibi stres koşullarının oluşturduğu hasarları minimize etmek için biyokimyasal ve moleküler yanıt verebilirler. Bu yanıtların arasında ısı şok proteinleri en önemlisidir. Protozoanlarda farklı HSP aileleri belirlenmiş ve en önemli üye 70 kDa lık Hsp70 olduğu belirlenmiştir. Protozoonlardaki bu moleküler şaperonlar ökaryot organizmadakilere benzer. Hsp70 ler parazitik protozoonlarda ve heterosenik tripanosomatit parazitlerinde (*Trypanosoma* and *Leishmania*) yaygın olarak çalışılmıştır. Çünkü bu parazitler yaşam döngüleri boyunca majör sıcaklık farklılıklarına maruz kalırlar. Omurgasız vektörlerden (ektotermal) memeli konaklarına (endotermal) geçtiklerinde sıcaklık farklılıkları ile karşılaşılırlar ve klasik ısı şok cevabına maruz kalıp ısı şok protein sentezi yaparlar. Örneğin *Trypanosoma cruzi* de HSP70 seviyeleri 28 °C den 37 °C ye çıktığında 4 kat artar [84]. Sıcaklık değişimi ile artan sentezinin yanında, parazit HSP leri yaşam döngüsündeki diferansiyasyon-başkalaşım sürecinde de etkin görev alırlar. Örnek olarak *Leishmania major* un promastigot-amastigot transformasyonu verilebilir [85].

HSP70 in yüksek seviyede ekspresyonu *Toxoplasma gondii* nin bradizoit-takizoit geçişinde de gözlemlenmektedir [86].

Parazit HSP70 antijen olarak da görev yaptığı ve konağın immün sistemine yanıt olduğu *Trypanosoma cruzi* de gösterilmiştir [87]. Patojenik *Entamoeba histolytica*' nun trofozoit formunun Hsp70 proteini invaziv amoebiasis hastalarında immün cevaba sebep olmuştur. Ayrıca insan Hsp70 ile %70 sekans benzerliği bulunmaktadır [88]. Parazitlerin aksine Hsp70 ler serbest yaşayan protozoonlarda daha az çalışılmıştır. *Amoeba proteus* ve *A. Borokensis* ısı şok proteinleri ile çalışma yapılmıştır [89].

Acanthamoeba parazitinin yedi suşundan sadece ikisi konstitif HSP70 eksprese etmiş ve bu fark farklı *Acanthamoeba* suşlarının potansiyel patojenitesine bağlanmıştır [90].

Acanthamoeba hava, toprak ve suda yaşayan farklı türlerden oluşmaktadır. Bu amipler dünya çapında yaygın olarak bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklar ve bakteriyel

besinleri gibi çevresel faktörler *Acanthamoeba*'nın oluşmasına yardımcı olurlar. Birçok *Acanthamoeba* farklı kirlilik yerlerinden izole edilmiştir. Farklı koşullarda sağ kalımları morfolojik ve fizyolojik adaptasyonlarından kaynaklıdır. Bu çalışma *A. castellanii* de HSP70 proteini üzerine bir ilk çalışma olmuştur. Stress altında *in vitro* da yapılan bu çalışma ile universal olarak korunan Hsp ailesinden Hsp70 çalışılmış ve analog ve ortologları ile benzer biyokimyasal etkilige sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma *A. castellanii* yaşam döngüsünde Hsp70 in önemi ve olası rolleri için bir başlangıç olmuştur. Hsp70 ile stres karşısında adaptif mekanizma biyokimyasal ve moleküler seviyede çalışılmıştır. HSP70 in biyokimyasal fonksiyonelliğine rağmen araştırmacılar yoğunlukla bakteri ve çok hücreli hayvanlarda çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Bu çalışma ile literatürde eksikliği hissedilen farklı bir organizma merceğe altına alınmıştır.

- Proteinlerinin Önemi ve Termotolerans, Journal of Fisheries Sciences, (2010), 4(3):246-253
- [31] Tutar, Y.(2011). Ssa1p function in the presence of nucleotide and Ssa1p oligomeric properties, Cumhuriyet Medical Journal, 33:26-32
- [32] Fen Ma, Y., Zhang, Y. and Weiss, L.M. (2004). Identification and characterisation of a regulatory region in the *Toxoplasma gondii* hsp70 genomic locus, Int J Parasitol. 2004 March 9; 34(3):333-346
- [33] Tutar, Y. (2006). Heat Shock Proteins, Substrate Specificity and Modulation of Function, Protein&Peptide Letters, 2006, 13, 699-705
- [34] Laad A.D, Thomas M.L, Fakih A.R, Chiplunkar SV. (1999). Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells, Int J Cancer. 80(5):709-14
- [35] Matambo T.S Biochemical characterization of plasmodium falciparum heat shock protein 70, 2003. yüksek lisans tezi. rhodes university
- [36] Baykal, Y., Gök, F. ve Kocabalkan, F. (2000). Isı şok proteinleri ve hastalıklardaki rolü, Klin Tıp Bilimleri GATA İç Hastalıkları Anakara, 20:187-195
- [37] Mresca, B. and Kobayashi, G.S. (1994). Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen, Experientia 50 (1994), Birkhauser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland
- [38] Nagasawa, H., Oka, M., Maeda, K., Jian-Guo, C., Hisaeda, H., Ito, Y., Good, R.A. and Himeno, H. (1992). Induction of Heat Shock Protein Closely Correlates With Protection Against *Toxoplasma Gondii* Infection, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, pp.3155-3158, April 1992
- [39] Chen, M., Aosai, F., Norose, K., Mun, H.S., Ishikura, H. et al. (2004). *Toxoplasma gondii* infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice, Internal Immunology, Vol.16, No.7, pp.937-946
- [40] Üzümcü, Z.(2009). Pseudomonas sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD., Adana. 7-12s
- [41] Zorzi, E. and Bonvini, P. (2011) Inducible Hsp70 in the Regulation of Cancer Cell Survival: Analysis of Chaperone Induction. Expression and Activity in cancers, 2011, 3, 3921-3956, doi:10.3390/cancers3043921

- [84] Requena J.M., Jimenez_Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santaren J.F., Lopez M., Patarroyo E. and Alonso C. 1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 201_211)
- [85] Van der Ploeg L., Giannini S. and Cantor Ch. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science.* 228, 1443_1446
- [86] Silva N. M., Gazzinelli R.T., Silva D.A., Ferro E.A., Kasper L.H. and Mineo J.R.1998. Expression of *Toxoplasma gondii*_specific heat shock protein 70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. *Infect. Immun.* 66, 3959_3963
- [87] Requena J.M., Soto M., Guzman F., Maekelt A., Noya O. and Patarroyo M.E.A. 1993. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol. Immunol.* 30, 1115_1121.
- [88] Ortner S., Plaimauer B., Binder M., Wiedermann G., Scheiner O. and Duchene M. 1992. Humoral immune response against a 70_kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Mol. Bio_chem. Parasitol.* 54, 175_183.
- [89] Kalinina L.V., Khrebtukova I.A., Podgomaya O.L., Wasik A. and Sikora J. 1988. Heat shock proteins in *Amoeba*. 1. Effect of high temperature on *Amoeba proteus* and *Amoeba borokensis*. *Europ. J. Protistol.* 24, 64_68.
- [90] In: *Handbook of Molecular Chaperones: Roles, Structures, and Mechanisms* ISBN: 978-1-60876-366-5 Editors: P. Durante, L. Colucci, pp. 293-312, 2010 Nova Science Publishers, Inc.