

Thermococcus gorgonarius DNA Polimerazının Rekombinant Olarak Üretimi

Bilge Hilal ÇADIRCI¹, Oğuzhan BEBEK¹, Deniz ÇAM¹

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik
Bölümü, TOKAT
bilgehilal.cadirci@gop.edu.tr

Öz: Termostabil bir enzim olan Tgo DNA polimeraz hipertermofilik bir arkea olan *Thermococcus gorgonarius* tarafından sentezlenmektedir. Çalışmamızda 3'-5' ekzonükleaz aktivitesiyle yüksek kalitede DNA sentezi gerçekleştiren Tgo DNA polimeraz, rekombinant olarak üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, üretilen yapay gen uygun restriksiyon enzimleri ile kesilip aynı enzimlerle kesilmiş olan pET28a vektör sistemine ligasyon ile birleştirilmiştir. *E. coli* BL21 hücrelerinde eksprese edilen enzim aktivitesi, PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek kontrol edilmiştir.

Anahtar kelimeler: DNA polimeraz, PCR, Rekombinant DNA teknolojisi, *Thermococcus gorgonarius*.

Recombinant DNA Polymerase Production of *Thermococcus gorgonarius*

Abstract: A thermostable enzyme Tgo DNA polymerase was produced by a hyperthermophilic archaea, *Thermococcus gorgonarius*. In this study, it was aimed to produce the Tgo DNA polymerase which synthesizes highly qualified DNA by its 3'-5'-exonuclease activity, by recombinant DNA technology. For this purpose, synthesized synthetic DNA was cut with restriction enzymes and ligated into a pET28a vector. The activity of the enzyme expressed in *E. coli* BL21 was controlled by PCR reaction.

Keywords: DNA polymerase, PCR, Recombinant DNA technology, *Thermococcus gorgonarius*.

1. Giriş

Yeni bir DNA polinükleotidini sentezleyebilen enzim, DNA polimeraz olarak adlandırılır. Yeni sentezlenen polinükleotitte baz dizilişi, kalıp polinükleotidin baz dizilişine bağlıdır ve eşleniği şeklindedir. Bilinen bütün DNA polimerazlar DNA'yı 5'-3' yönünde sentezlerler. *Escherichia coli*'de 5 tip DNA polimeraz vardır (Fijalkowska ve ark., 2012). İlk keşfedilen DNA polimeraz,

1959'da Arthur Kornberg ve arkadaşlarına nobel ödülü kazandıran, *E. coli*'den izole edilen DNA polimeraz I'dir. Enzim bu reaksiyonu gerçekleştirebilmek için, dört deoksiribonükleotidin 5'trifosfatına (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ihtiyaç duymakta ve Mg⁺² iyonları ve DNA varlığında aktif olmaktadır (Gawel ve ark., 2008).

DNA polimeraz I kendiliğinden DNA sentezini başlatamaz ve mutlaka serbest bir 3'-OH ucuna ihtiyaç duyar. Primer DNA,

DNA sentezi sırasında nükleotidleri eklenebileceği serbest bir 3'-OH grubuna sahip başlangıç noktası sağlar. DNA polimeraz I, primer DNA'nın 3'-OH grubu ile, yeni eklenecek DNA'nın 5'fosfat grubu arasında fosfodiester köprüsü oluşumunu katalizler. DNA polimeraz I *polA* olarak bilinen bir gen tarafından kodlanan, moleküler ağırlığı 103.000 dalton olan bir polipeptittir. DNA polimeraz I'in polimeraz aktivitesi yanında iki enzimatik aktivitesi daha vardır. Bu aktivitelerin ikisi de ekzonükleaz aktivitesidir. DNA polimeraz I hem DNA ipliğini 5' ucundan başlayarak, 5'-3' yönünde kesme aktivitesine, hem de DNA'nın 3'-OH grubundan başlayarak mononükleotidleri 3'-5' yönünde kesme aktivitesine sahiptir. 5'-3' aktivitesi, genellikle 10 nükleotide kadar nükleotid içeren küçük oligomerleri kesip çıkartır (Banach-Orlowska ve ark., 2005). *pol A* geni mutasyona uğratıldığında, DNA'nın hala replike olabildiğinin görülmesi farklı polimerazların da hücrede bulunduğunu göstermiştir (Yang ve Polisky, 1993).

DNA polimeraz II, DNA polimeraz I gibi bir DNA tamir enzimidir (proofreading). Fakat çok az polimerizasyon aktivitesi vardır. 5'-3' polimeraz ve 3'-5' ekzonükleaz aktiviteleri vardır. DNA polimeraz III çok sayıda alt birimden oluşan kompleks bir enzimidir. Bu enzim 5'-3' polimeraz ve 5'-3' ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. DNA polimeraz IV ve

V ise DNA polimeraz II ile birlikte hasarlı DNA'nın replikasyonunda önemli rol oynarlar (Banach-Orlowska ve ark., 2005).

Bakteriyal, viral ve ökaryotik DNA polimerazlar hakkında çok şey bilinmesine rağmen, arkeal replikasyon tam olarak aydınlatılmadığı için arkeal DNA polimerazlar hakkında sınırlı bilgiye ulaşılmaktadır. Çoğu bilinen arkeal DNA polimerazlar ökaryotik DNA polimerazların da bulunduğu B tipi sınıfa aittir. Arkeal DNA polimerazlar ökaryotik DNA polimeraz α ve δ 'ya benzemektedir. Ancak ökaryotik DNA polimerazlardan farklı olarak daha yüksek sıcaklıklarda daha düşük hata oranı ile ($3.3-2.2 \times 10^{-6}$) çalışmaktadır. Bu da arkeal DNA polimerazların biyoteknolojik açıdan kullanımını uygun hale getirmektedir (Hopfner ve ark., 1999).

Termostabil DNA polimerazlar genellikle termofil mikroorganizmalardan izole edilmiş olan enzimlerdir. Archaealarda DNA polimeraz sayısı mikroorganizmasına göre değişmektedir. DNA polimerazlarda 5'-3' polimeraz 5'-3' ekzonükleaz 3'-5' ekzonükleaz aktiviteleri bulunmaktadır (Jozwiakowski ve ark., 2014). PCR'da kullanılan Taq DNA polimeraz, sıcak kaplıca sularından izole edilmiş *Thermus aquaticus* bakterisinin DNA polimeraz I enzimidir. Pfu polimeaz, hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* arkesinden izole edilmiş bir polimerazdır. Bu enzimler ısı ile denatüre olmadıkları için in vitro PCR

çalışmalarında, DNA'yı denatüre etmek için 94°C'ye sıcaklık çıkartıldığında aktivitelelerini korurlar (Ishino ve Ishino, 2014).

Bu çalışmada PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)'da kullanılmak üzere yüksek doğrulukta DNA polimerizasyonu yaptığı bilinen *Thermococcus gorgonius* arkesine ait DNA polimeraz rekombinant olarak üretilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hedef Genin Seçilmesi

Elde etmek istediğimiz Tgo DNA polimeraz enziminin genomik dizi National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) web sayfası kullanılarak belirlenmiş ve *Thermococcus*'a ait bir gen, *Escherichia coli* hücresinde sentezletirileceği için kodon optimizasyonunu Serial Cloner 2.6.1 programı kullanılarak yapılmıştır. *BamHI* ve *XhoI* restriksiyon enzimi kesim bölgeleri de ekledikten sonra, elde edilen dizi Sentegen firması tarafından ampisilin direnç geni içeren pTZ57RT vektörü içinde sentezlenmiştir.

2.2. Genin pET28a Vektörüne Klolanması

Klonlama teknikleri Sambrook ve Russell (2001)'e göre yapılmıştır. Tgo DNA Polimeraz genini içeren plazmid ve pET28a vektörünün *XhoI* (Thermo) ve *BamHI*

(Promega) ile kesimi, uygun tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzimle kesim ile ilgili optimizasyonlar, DNA miktarına göre hesaplanmıştır. Restriksiyon karışımı, üretici firmanın önerilerine göre hazırlanmıştır. Genel olarak 20µL son hacim için, 2 µL vektör, 4µL 10x tampon, 2µL, 10U/mL *BamHI*, 1 µL *XhoI*, 11µL dH₂O kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda iki restriksiyon enzimi aynı tamponda kesim yapmadığı için, ilk önce *BamHI* ile kesim yapılmıştır, sonra da *XhoI* ile tek tek kesim yapılmıştır. Gerek duyulduğunda DNA konsantrasyonu etanol ile presipitasyon tekniği kullanılarak yoğunlaştırılmıştır.

Kesim gerçekleştirildikten sonra %0.8'lik agaroz jelde görüntülenen fragmentler, Biobasic jel ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda prosedür uygulanarak jelden izole edilmiştir. Spektrofotometrik olarak konsantrasyonları belirlendikten sonra, fragmentler T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak +4°C'de gece boyunca birbirine bağlanmıştır. Daha sonra ligasyon ürününün CaCl₂ yöntemi ile kompetent hale getirilmiş *E.coli* DH5α hücrelerine ısı şoku transformasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 µL ligasyon ürünleri, kanamycin içeren LB agar besiyerlerine yayıldıktan sonra, petriler 37°C'de 1 gece etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Etüvden çıkarılan petrilere oluşan koloniler, içinde 5ml+5 µl kanamycin sıvı kültür bulunan steril tüplere kürdan aracılığıyla aktarıldıktan sonra gece boyunca 37°C'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Üreyen hücrelerden plasmid profilleri gözlemek için jelde yürütülür. Bunun için öncelikle 100°C'de 5 dakika bekletilen hücreler, 13000 rpm'de santrifüj edildikten sonra doğrudan agaroz jele yüklenerek plazmit varlıkları araştırılır. Bu basamak, petride çok sayıda transformant olduğu zaman gerçekleştirilmiştir.

Doğru ebatta plazmit içerdiği gözlemlenene hücrelerden izole edilen plazmitlerin ebatları sadece BamHI enzimi ile kesilerek doğrulandıktan sonra, protein ekspresyonu çalışmaları yapılmıştır.

2.3. Tgo DNA Polimeraz Enziminin Ekspresyonu

Protein ekspresyonu için *E. coli* BL21 pLysE suşu kullanılmıştır. Restriksiyon kesimleri sonucunda Tgo DNA polimeraz enziminin başarılı bir şekilde klonlandığı anlaşıldıktan sonra kompetent hale getirilmiş *E. coli* BL21 pLysE suşuna daha önce anlatıldığı gibi ısı şoku ile transformasyon işlemi yapılmıştır. Transforme edilen *E.coli* hücreleri klorofenikol ve kanamisin içeren LB agar besi yerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş, üreyen hücrelerden koloniler olarak tekrar antibiyotik içeren 4 ml'lik LB besiyerine alınıp 1 gece inkübe edilmiştir. Büyüyen hücreler klorofenikol ve

kanamisinli 50 ml LB besi yeri bulunan erlenlere inoküle edilerek, 600 nm'deki OD değeri yaklaşık 0.6'ya ulaştığında buz üzerinde 10 dakika soğutulmuş ve daha sonra 1M IPTG (İzopropil tiyogalaktozit) ilave edilerek indüklenerek 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İndükleme sonrasında hücre kültürü 8000 rpm de 5 dakika santrifüjlenerek ortamdan besi yeri uzaklaştırılmış ve pellet 10 mM Tris-HCl pH: 8.5 içerisinde çözülmüştür. Hücreler soğuk ortamda sonikatör kullanılarak parçalanmıştır. 10000 rpm, 10 dakika santrifüj sonucu çözümlü haldeki proteinlerin bulunduğu süpernatant, Tgo Polimeraz kaynağı olarak kullanılmıştır. Süpernatant, 80 °C'da 10 dk ısıtılarak süpernatanttaki diğer proteinler denatüre edilerek saflaştırma yapılmıştır. 15000 rpm'de 30dk santrifüj edilerek süpernatantta aktif haldeki Tgo Polimeraz diğer proteinlerden ayrılmıştır. Karışım içerisine son konsantrasyon %50 gliserol, 50 mM KCl, 10 mM 2-Merkaptoetanol, 0.1 mM EDTA olacak şekilde ilaveler yapıldıktan sonra -20°C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

2.4. Tgo DNA Polimeraz Enziminin Aktivite Tayini

Isı denatürasyonu yolu ile saflaştırılmış Tgo polimerazın aktivite tayini için PZR denemeleri yapılmıştır. Bunun için template olarak elimizde bulunan *Pseudomonas* DNA'sı ve universal bakteri primerleri

EubF, (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve EubR, (5'-GGAACATGTGTGGCGGGCC-3') kullanılmıştır. Reaksiyon tamponu 5X konsantrasyonundaki 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 87.5 mM (NH₄)₂SO₄, 6.25 mM MgCl₂, %2.5 tween 20 %7.5 DMSO olarak kullanılmıştır.

Reaksiyon koşulları; başlangıç denatürasyon 94°C 2 dk. 1 döngü, denatürasyon 94°C 30 s annealing 52°C 60 s, uzama 72°C 2 dk., 30 döngü ve son uzama, 72°C 7 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

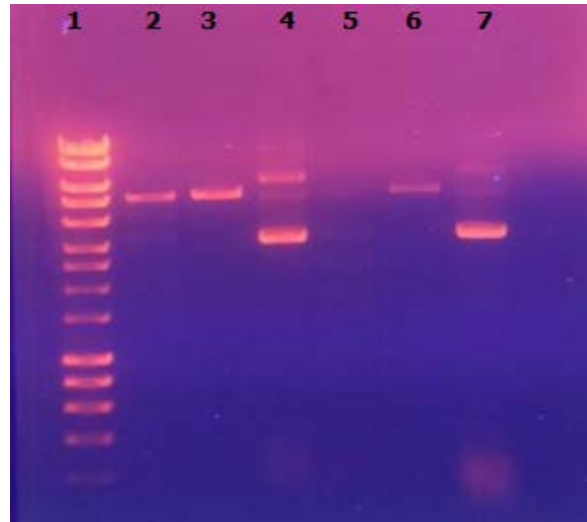
3. Sonuçlar ve Tartışma

Termo-stabil bir enzim olan Tgo DNA polimeraz hipertermofilik bir archaea olan *T. gorgonarius* tarafından sentezlenmektedir. 3'-5' ekzonükleaz aktivitesiyle Tgo DNA polimeraz yüksek kalitede DNA sentezi gerçekleştirir (Jozwiakowski ve ark., 2014).

Çalışmamızda domainler arasında klonlama yapıldığı ve bu anlamda ekspresyonda kodon eğilimlerinin önemi olduğu için Tgo DNA polimeraz geni *in vitro* olarak sentezlenmiştir. *BamHI* ve *XhoI* restriksiyon kesim bölgeleri içeren yapay genin ve pET28a ifade vektörünün ikili kesimi verimli olmadığı için, ayrı ayrı tüplerde, enzimlerin uygun çalışma koşulları altında kesimler gerçekleştirilmiştir.

Tgo DNA polimeraz geni 2324 ve pTZ57RT vektörü 2886 baz çifti

uzunluğunda olduğu için toplam 5210 baz çifti uzunluğunda bir bant elde edildiği Şekil 1'de gözlenmektedir. Uygun koşullar belirlendikten sonra restriksiyon enzimleri ile kesimler 100 µl son hacimde yapılmış ve reaksiyon sonrası jel ekstraksiyonları yapılarak temiz bantlar elde edilmiştir. İşlem sonrası 9.8 ng/µL konsantrasyonlarında elde edilen DNA fragmentleri, molar katsayıları 3:1 olacak şekilde aşağıdaki formül kullanılarak karıştırılmış ve T4 DNA ligaz varlığında +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.



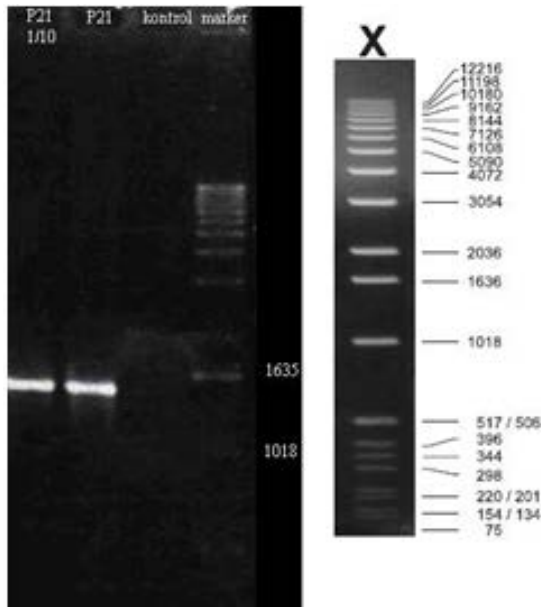
Şekil 1. Restriksiyon enzimleri ile kesim 1)DNA Ladder 2)pTZ57RT+BamHI 3)pTZ57RT+XhoI 4)pTZ57RT 5)pET28a+BamHI 6)pET28a+XhoI 7)pET28a

Insert kütlesi (ng)=3x [insert ebatı (bp)](Vektör ebatı (bp)) x vektör kütlesi (ng)

İnsert:vektör molar konsantrasyon oranları 1:1, 3:1 ve 6:1 olacak şekilde çeşitli optimizasyonlar yapıldıktan sonra *E.coli* DH5α hücrelerine ısı şoku ile transforme

edilmiştir. Transformantların inkübasyonu sonucunda elde edilen kolonilerden doğru ebatta vektör içeren hücreler belirlendikten sonra izole edilen plazmit, yine ısı şoku ile *E. coli* BL21 pLysE suşuna aktarılarak hücreler indüklenmiş ve inkübasyon sonucu büyüyen hücreler parçalanmış ve proteinler izole edilmiştir.

E. coli hücresine ait proteinler yüksek sıcaklık ile denatüre olacağı için, protein karışımı ısıtıldıktan sonra aktif olan proteinin Tgo DNA polimeraz olacağı kabul edilerek PCR çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 2. *Pseudomonas* geninin Tgo DNA polimeraz ile amplifikasyonu

Optimizasyonlar sonrası *Pseudomonas* hücresine ait olan 1400 kb büyüklüğünde 16s rRNA kodlayan gen bölgesi, üretmiş olduğumuz Tgo DNA polimeraz ile çoğaltılmıştır (Şekil 2). Şekil 2’de de görüldüğü gibi bantlar oldukça parlak ve temiz görünmektedir. Bilindiği gibi rRNA’lar ribozomun yapısında bulunan,

protein sentezinin gerçekleştirilebilmesi için mRNA’yı ribozoma sabitleyen böylelikle sentezlenen ilk aminoasitin metionin/formilmetionin olmasını sağlayan, evrimsel olarak çok az değişikliğe uğramış 1200-1600 bp uzunluğunda RNA’lardır. Çalışmamızda bu bölgenin çoğaltılmasının nedeni, *Pseudomonas*larda 16s rRNA’yı kodlayan DNA bölgesinin yaklaşık 1400 baz uzunluğunda olduğunun bilinmesinden kaynaklanmaktadır. Reaksiyon karışımı içine eklenen Tgo polimerazın aktif olduğu ve *Pseudomonas* DNA’sından bu bölgeye ait beklenen uzunlukta geni çoğaltması, saflaştırılan Tgo Polimerazın aktif olduğunu göstermektedir. DNA polimeraz eklenmeyen reaksiyon karışımında herhangi bir bant oluşumunun gözlemlenmemesi de, bant gözlemlenme sebebinin, Tgo Polimeraz aktivitesinden olduğunu kanıtlamaktadır.

DNA polimeraz enzimleri yaygın olarak tarımdan tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarına kadar birçok alanda rutin analizlerde kullanılan PZR çalışmalarında kullanılmaktadır (Kovalskaya ve ark., 2014; Grogan, 2015; Mitchel ve ark., 2016). Böyle çalışmalarda düşük hata oranı oldukça önemlidir. Düşük hata oranına sahip arkeal DNA polimeraz enzimlerinin piyasaya girmesi ile diğer enzimlerin kullanımının kısıtlanacağı öngörülmektedir (Zhang ve ark., 2015).

Bu enzimlerin üretimi uluslararası platformalarda gerçekleştirilmiştir fakat

ülkemize kullanılmak istendiğinde çok yüksek maliyet, ürünün teslimat süresinin uzunluğu gibi birçok sorun ortaya çıkmaktadır. Bu çalışma kapsamında uluslararası platformda yapılan üretimlerde oluşan maliyetlerden daha düşük bir maliyette daha fazla miktarda ürün üretimi

yapılacaktır. Böylece ülkemiz açısından enzim sektörü olarak dışa bağımlılık azalacaktır. Bilimsel çalışmalarda düşük maliyet ve kolay ulaşılabilmesiyle üretimi gerçekleştirilecek olan enzimin kullanımı sağlanmış olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209/B - Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı kapsamında 1139B411500184 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Banach-Orlowska M, Fijalkowska IJ, Schaaper RM, Jonczyk P (2005). DNA polymerase II as a fidelity factor in chromosomal DNA synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 58(1): 61-70.
- Fijalkowska IJ, Schaaper RM, Jonczyk P (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev* 36(6): 1105-1121.
- Gawel D, Pham PT, Fijalkowska IJ, Jonczyk P, Schaaper RM (2008). Role of accessory DNA polymerases in DNA replication in *Escherichia coli*: analysis of the dnaX36 mutator mutant. *J Bacteriol* 190(5): 1730-42.
- Grogan DW (2015). Understanding DNA repair in hyperthermophilic archaea: persistent gaps and other reasons to focus on the fork. *Archaea* 2015: 942605.
- Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA, Laue F, Ankenbauer W, Huber R, Angerer B (1999). Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci Biochemistry* 96(7): 3600–3605.
- Ishino S and Ishino Y (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Front Microbiol* 5: 465.
- Jozwiakowski SK, Keith BJ, Gilroy L, Doherty AJ, Connolly BA (2014). An archaeal family-B DNA polymerase variant able to replicate past DNA damage: occurrence of replicative and translesion synthesis polymerases within the B family. *Nucl Acids Res* 42(15): 9949–9963.
- Kovalskaya N, Owensa R, Bakera CJ, Deahl K, Hammond RW (2014) Application of a modified EDTA-mediated exudation technique and guttation fluid analysis for potato spindle tuber viroid RNA detection in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J Virol Methods* 198: 75–81.

- Mitchell KJ, Wood JR, Llamas B, Patricia A, McLenachan PA, Kardailsky O, Scofield RP, Worthy TH, Cooper A (2016). Ancient mitochondrial genomes clarify the evolutionary history of New Zealand's enigmatic acanthisittid wrens. *Mol Phylogenetics Evol* 102: 295–304.
- Sambrook J and Russell DW (2001). Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yang YL and Polisky B (1993). Suppression of ColEI high-copy-number mutants by mutations in the polA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 428-437
- Zhang L, Kang M, Xu J, Huang Y (2015) Archaeal DNA polymerases in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 6585–6597.