



# ***Escherichia coli* Ekspresyon Plazmiti pTolT'nin Nokta Mutasyonu Yöntemiyle Moleküler Modifikasyonu**

Yakup Ulu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Karaman, Türkiye (ORCID: 0000-0002-8755-2822)

(İlk Geliş Tarihi 21 Ağustos 2019 ve Kabul Tarihi 27 Eylül 2019)

(DOI: 10.31590/ejosat.608637)

**ATIF/REFERENCE:** Ulu, Y. (2019). *Escherichia coli* Ekspresyon Plazmiti pTolT'nin Nokta Mutasyonu Yöntemiyle Moleküler Modifikasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (17), 1-8.

## **Öz**

Bakteriler rekombinant protein üretimi için kolay kültür edilmeleri, basit yapıları ve genetik manipülasyonlara açık olmaları nedeniyle en çok tercih edilen konakçılardır. Özellikle *Escherichia coli* en yaygın olarak kullanılan prokaryotik konakçı olarak pek çok araştırmada karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu avantajlarının yanında, yabancı proteinlerin yüksek miktardaki üretimleri, *Escherichia coli*'de inklüzyon cisimciklerinin oluşmasına veya toksik etkilere neden olabilmektedir. Bu problemlerin aşılması amacıyla geliştirilen pTolT ekspresyon vektörü heterolog proteinlerin *Escherichia coli* periplazmik bölge proteini TolAIII ile birlikte üretilmesine imkân sağlamaktadır. Bununla birlikte TolAIII proteininde 31 ve 56. pozisyonda bulunan sisteinler bu sistemle üretilen diğer proteinler ile istenmeyen disülfid köprüleri kurarak rekombinant proteinin aktivitesi üzerine etki etmektedir. Bu çalışmanın amacı TolAIII proteininde bulunan sisteinlerin kaldırılarak yerine serin amino asitlerinin getirilmesidir. In vitro nokta mutasyonu tekniği, gen klonlama ve ekspresyon stratejilerinin düzenlenmesi amacıyla vektör DNA dizilerinin modifiye edilmesinde, protein yapı ve fonksiyon çalışmalarında ve genetik araştırmalarda sıklıkla kullanılan gelişmiş bir tekniktir. Bu teknikte mutajenik primerler vasıtasıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi ile kalıp plazmid DNA'nın birçok yeni kopyasını meydana getirilir. Sunulan çalışmada QuikChange site-directed mutagenesis metoduyla TolAIII gen dizisinde C31S ve C56S mutasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA sekans analizi sonuçları ile teyit edilen mutasyonun ardından elde edilen yeni plazmid pTolT Delta olarak adlandırılmıştır. Böylece bu çalışma ile geliştirilen yeni ekspresyon sistemi ile üretilen rekombinant proteinlerin doğal üç boyutlu konformasyonlarını kazanmaları daha kolay olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** pTolT, Nokta Mutasyonu, *Escherichia coli*, Rekombinant Protein

## **Molecular Modification of *Escherichia coli* Expression Plasmid pTolT by Point Mutation Method**

### **Abstract**

Bacteria are among the most preferred hosts for their easy culture conditions, simple structure and allowing genetic manipulations for recombinant protein production. *Escherichia coli* is the most widely used prokaryotic host in many studies. In addition to all these advantages, the high amount production of foreign proteins can cause inclusion bodies or toxic effects in *Escherichia coli*. The pTolT expression vector developed to overcome these problems allows the production of heterologous proteins with the *Escherichia coli* periplasmic region protein TolAIII. However, cysteines in positions 31 and 56 of the TolAIII influence the activity of the recombinant protein via unwanted disulfide bridges with other proteins produced by this system. The aim of this study was to remove cysteines in TolAIII protein and replace serine amino acids. The in vitro point mutation technique is an advanced technique that is frequently used for modifying vector DNA sequences, protein structure and function studies, and genetic research to regulate gene cloning and expression strategies. In this technique, polymerase chain reaction (PCR) by mutagenic primers produces many new copies of the template plasmid DNA. In the present study, C31S and C56S mutations in the TolAIII gene sequence have been performed by

\* Sorumlu Yazar: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye, ORCID: 0000-0002-8755-2822, yakupulusu@kmu.edu.tr

QuikChange site-directed mutagenesis method. Following the mutation confirmed by DNA sequence analysis results, the obtained new plasmid was called pToIT Delta. Thus, it will be easier for the recombinant proteins to be produced with the new expression system developed by this study to acquire their natural three-dimensional conformation.

**Keywords:** pToIT, Point Mutation, Escherichia coli, Recombinant Protein

## 1. Giriş

Son yıllarda proteinler farmakolojik ürünlerin ve pek çok endüstriyel prosesin ayrılmaz birer parçası haline gelmişlerdir. Günümüzde endüstriyel olarak kullanılan çoğu enzimden; terapötik olarak kullanılan peptidlere kadar pek çok protein yapısında disülfid bağlarını içermektedir. Bu disülfid bağlarının oluşumu özellikle heterolog ekspresyon sistemlerinde protein katlanmalarını etkileyebilmektedir. Bazı durumlarda protein mühendisliği uygulamalarıyla disülfid bağları oluşturan sistein gibi amino asitler yapıya eklenerek yeni disülfid köprüleriyle protein stabilitesi ve aktivitesi değiştirilebileceği gibi; bu amino asitlerin başkalarıyla değiştirilmesi yoluyla da var olan sistin köprüleri ortadan kaldırılarak proteinin üç boyutlu konformasyonu farklılaştırılabilir. Özellikle hücre dışı ortamda fonksiyonunu gösteren enzimler, büyüme faktörleri, hormonlar ve toksinler gibi ekstraselüler proteinler hücre dışı ortam şartlarına daha iyi adapte olabilmek, denatürasyon ve proteolitik degregasyondan korunabilmek adına genellikle daha fazla disülfid bağı ve glikolizasyon bölgesi içerirler. Disülfid bağları özellikle 3 boyutlu yapıyı stabilize ederek termodinamik açıdan proteini daha kararlı bir yapıda tutar. Bu dayanıklılık aslında pratik uygulamalarda; yüksek sıcaklık, yüksek asidik veya bazik ortam, yüksek konsantrasyondaki organik çözücüler gibi ekstrem çevresel şartlara daha iyi dayanım anlamına gelebildiği gibi; aynı zamanda terapötik proteinlerin raf ömrünün uzun olmasında da etkilidir (Mansfeld ve ark., 1997). Disülfid köprülerinin, özellikle heterolog ekspresyon sistemlerinde kimerik olarak üretilen rekombinant proteinlerin birbirleri arasında oluşması durumunda protein aktivitesini olumsuz etkilemesi veya saflaştırma sırasında özellikle afinite tag'larının kolon ile yeterince etkileşememesinden dolayı verim ve aktivite kayıplarına da yol açması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Bulaj ve ark., 2005).

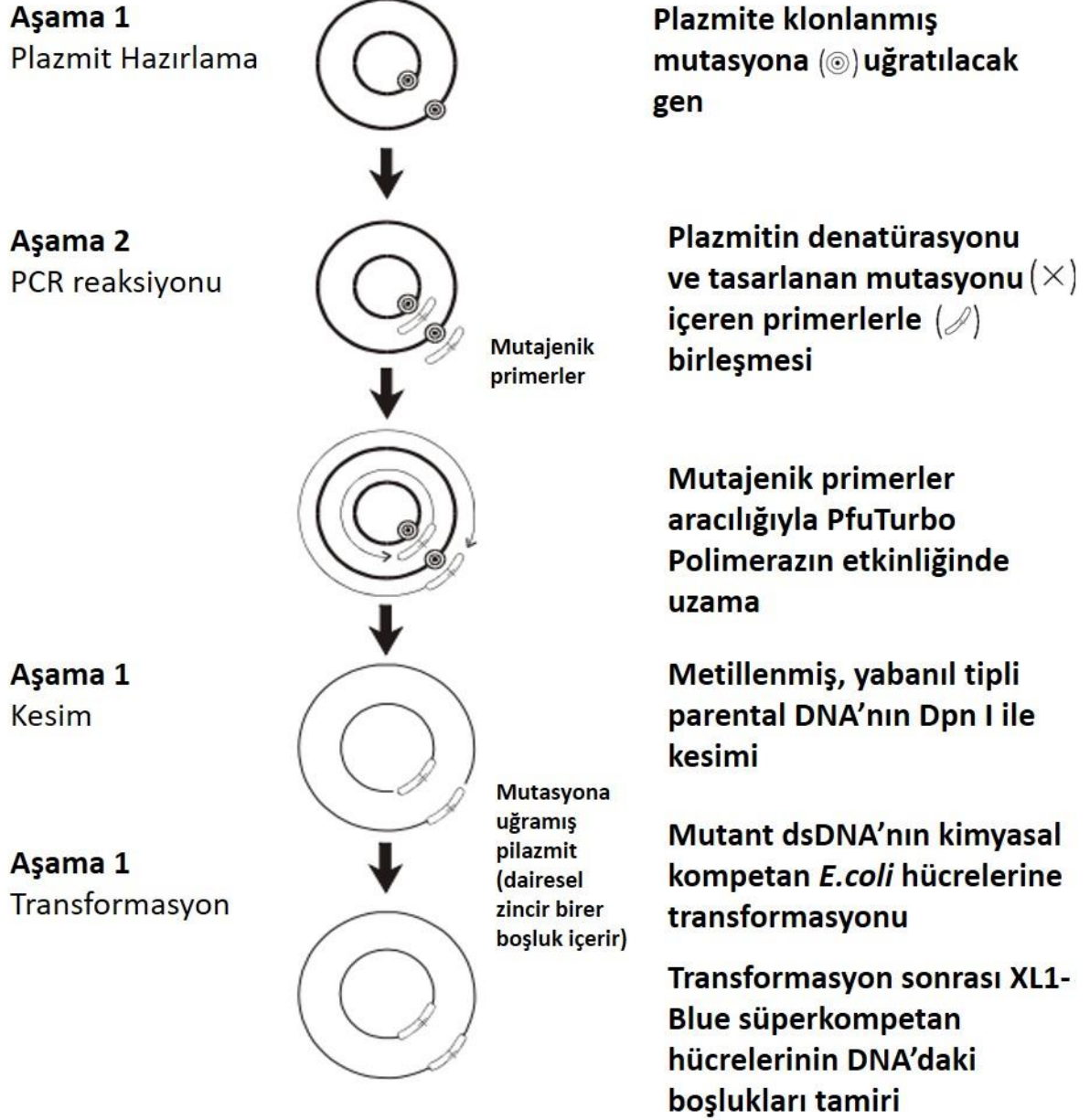
Rekombinant proteinlerin heterolog ekspresyon sistemlerinde yeterince saf ve fonksiyonel olarak üretilmeleri her zaman mümkün olmayabilmektedir. Üç boyutlu konformasyonunu kazanmış, aktif ve saf proteinlerin elde edilebilmesi için günümüzde çok sayıda farklı konakçı kullanılarak bu problemler aşılmaya çalışılmaktadır. 20 yılı aşkın süredir *Escherichia coli* (*E.coli*) heterolog protein ekspresyonu çalışmalarında üzerinde barındırdığı pek çok avantaj sayesinde en fazla tercih edilen konakçılardan birisi olmuştur. Bunlar arasında; uzun yıllardır çoğu bilimsel araştırmaya konu olması sayesinde bilim insanlarının *E. coli* protein ifade sistemleri hakkında ciddi bir tecrübeye sahip olması, kültürünün kolay ve düşük maliyetli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi sayılabilir (Ulus ve ark., 2016).

Rekombinant protein üretimi çalışmalarında ilgilenilen proteine ek olarak ilave edilen ve ortamdaki diğer proteinlere göre üretilen proteine farklı özellikler katan işaretleyiciler genel olarak protein tag'ları olarak bilinirler. *E.coli*'de proteinler direkt veya füzyon olarak ekspres edilebilir (LaVallie ve McCoy, 1995; Makrides, 1996). Füzyon olarak heterolog protein ifadesinin amaçları arasında; afinite tag'larının ilave edilmesi (His Tag, glutathione-S-transferase, cellulose binding domain gibi), proteinleri daha çözünebilir hale getirme (thioredoxin), disülfid bağlarının oluşumu (thioredoxin) veya üretilen proteinlerin periplazma bölgesine yönlendirilmesi gibi amaçlarla yapılmaktadır (Crowe ve ark., 1994; Derman ve ark., 1993; Stewart ve ark., 1998). Bir proteinin füzyon partneri olarak kullanılabilmesi için küçük boyutlu olması ve özellikle *E.coli*'de üretiminin önemli miktarda olması gerekir.

TolA, *E.coli*'de iç zarın bütünlüğünün korunmasında ve kolisinler ile bakteriyofajların alımında rol oynayan periplazmik bir proteindir (Levengood ve ark., 1991; Lazzaroni ve ark., 1999). Üç farklı alt birimden oluşan TolA proteininin bir kısmı kısa N-terminal alt birim olarak adlandırılan kısımdır ve burası tek bir transmembran heliks kısmından oluşmaktadır. Bu bölge aynı zamanda TolA'yı iç membrana bağlayan kısım olarak bilinir. İkinci büyük alt birim ise, yoğunlukla polar amino asitlerden oluşur ve yapısal olarak  $\alpha$ -heliks şeklindedir. Üçüncü alt birim ise C-terminal alt birim (TolA-III) olarak adlandırılır ve diğerlerine göre daha küçük olan bu kısım 92 amino asitten oluşmaktadır (Lubkowski ve ark., 1999). *E.coli*'de heterolog proteinlerin ekspres edilmesi için geliştirilen pTol vektörü de TolA-III proteininin füzyon partneri olarak kullanıldığı bir plazmittir. Gerçekleştirilen çalışmalarda TolA-III ile birlikte üretilen proteinlerin *E.coli*'de üretilen tüm proteomun %20'sine kadar ulaşabildiği gösterilmiş ve litre hücre kültürü başına 50-90 mg kadar füzyon protein elde edilmiştir. *E.coli*'de rekombinant protein üretilmesinde kullanılan ve özellikle heterolog proteinleri periplazmik bölgeye yönlendirmesiyle inklüzyon cisimciklerinin oluşmasına engel olan; toksik proteinlerin üretilmesinde kullanılan pToIT ekspresyon plazmiti TolA-III proteini sayesinde geliştirilmiş bir plazmittir (Anderluh ve ark., 2003).

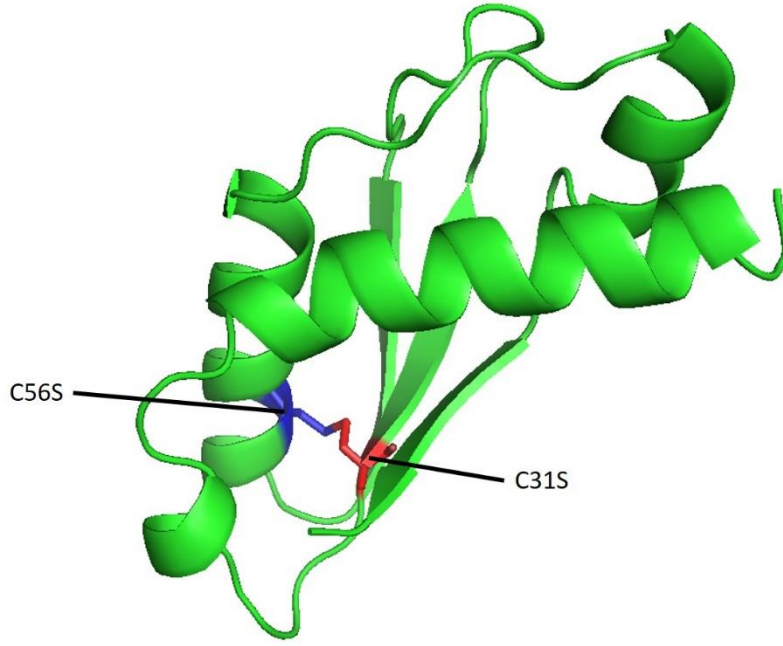
In vitro nokta mutasyonu tekniği, gen klonlama ve ekspresyon stratejilerinin düzenlenmesi amacıyla vektör DNA dizilerinin modifiye edilmesinde, protein yapı ve fonksiyon çalışmalarında ve genetik araştırmalarda sıklıkla kullanılan gelişmiş bir tekniktir. Bu teknikte mutajenik primerler vasıtasıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi ile kalıp plazmid DNA'nın birçok yeni kopyasını meydana getirilir. PZR ile bu yeni kopyaları meydana getirirken de bu sistemde Pfu DNA polimeraz enzimi istenilen yeni mutasyonları içeren yeni DNA dizilerini de bu kopyaların içerisine yerleştirir. Buradaki en önemli nokta mutasyonları içeren primerlerin dizaynıdır. Primerler istenilen mutasyonlar için minimum sayıda nükleotid değişikliği ile içermelidir. Her bir primer mutlaka çift ipçikteki karşı diziyeye eşlenik olmalıdır (mutasyonu içeren dizinin her iki tarafından 5'-3' da eşlenik olan yaklaşık 18-20 nükleotid mutlaka alınmalıdır). Primerlerin oluşturduğu dizi ona eşlenik dizi ile birleşirken uçlarda daha sonra tamir edilecek olan birer boşluk meydana gelir. PZR işlemi takiben elde edilen ürün Dpn I restriksiyon enzimi ile kesilir. Dpn I endonükleaz enzimi metillenmiş DNA ya

spesifiktir ve bu yüzden kesim esnasında ana kalıp DNA'yı (wild type) keserek yok eder ve geriye sadece PZR işlemi ile gerçekleştirilen metillenmemiş ve istenilen mutasyonu içeren plazmid DNA kalır (Şekil 1) (Agilent QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Catalog # 200518).



Şekil 1. QuikChange site-directed mutasyon işleminin özeti (Agilent QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Catalog # 200518)

Bu çalışma kapsamında da *E. coli* ekspresyon plazmidini pTolT vektörü QuikChange site-directed mutagenesis kiti kullanılarak modifiye edilmiş ve TolA-III proteininde bulunan iki Cys (C) rezidüsü Ser (S) ile değiştirilerek (C56S ve C31S mutasyonları) bu sistemle üretilen füzyon proteininin diğer partneri ile non-spesifik disülfid köprülerinin oluşmasının ve non-spesifik protein katlanmalarının önüne geçilmiştir (Şekil 2). Elde edilen yeni vektör pTolT Delta olarak adlandırılmıştır.

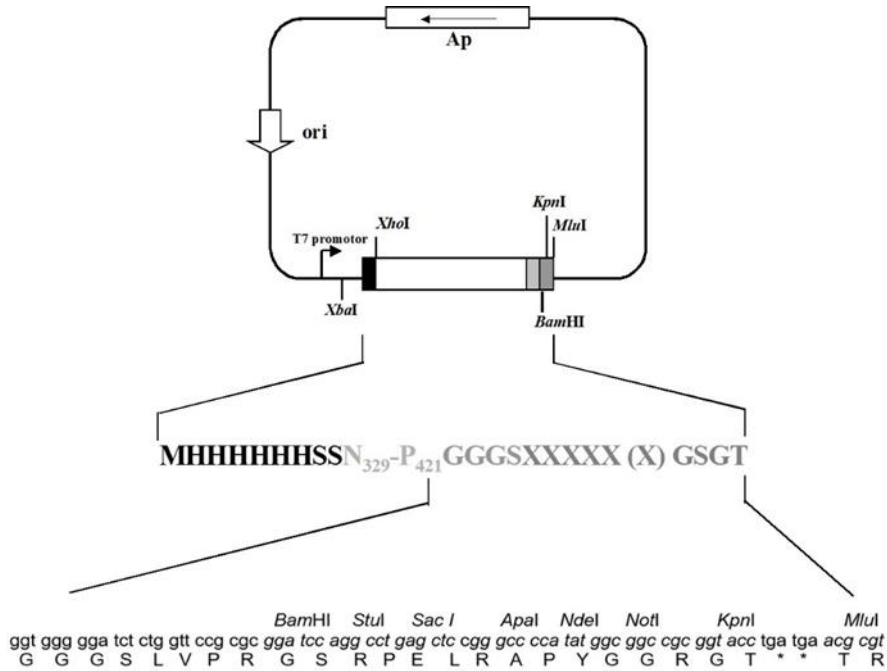


Şekil 2. *E.coli* TolA III proteini ve mutasyon gerçekleştirilen bölgeler (Şekil 1tol kodlu PDB dosyası kullanılarak PyMOL programında oluşturulmuştur)

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Primer Tasarımı

QuickChange mutasyon tekniği genellikle nokta mutasyonlarının, amino asit değişimlerinin, tek veya daha fazla amino asit eklenmesi veya silinmesi işlemlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılan bir metottür. Bu teknik uygulanırken gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işleminde Pfu DNA polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim diğer polimeraz enzimlerinden çok daha az hata payına sahip olması ve yüksek proofreading aktivitesiyle ayrılır. Bu teknikte kullanılan oligonükleotid primerlerin her birinin mutasyonun gerçekleştirileceği vektörün her bir zincirine tamamlayıcı baz dizilerinden oluşturulmuş ve gerçekleştirilmek istenen mutasyona ait değişikliği orta kısmında içermesine dikkat edilmiştir. Oligonükleotid primerlerinin hedef plazmit DNA ile birleşmesinin ardından PfuTurbo DNA polimeraz enzimi kullanılarak PZR gerçekleştirilmiş ve sonucunda ilgili mutasyonları içeren yeni PZR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1). Bir sonraki aşamada ise PZR ürünlerine Dpn I (hedef sekans: 5'-Gm6ATC-3') restriksiyon enzimi ile muamele edilerek parental kalıp DNA'ların uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 3. *pTolT E.coli* ekspresyon vektörü ve çoklu klonlama bölgesi (Anderluh ve ark., 2003)

Bu çalışmada gerçekleştirilmek istenen mutasyonlar 56. ve 31. pozisyondaki sisteinlerin yerine serin amino asitinin getirilmesidir (Sırasıyla C56S ve C31S mutasyonları). Bu işlem için pToIT plazmiti (Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. İsa GÖKÇE tarafından laboratuvarımız gönderilmiştir.) (Şekil 3) üzerinde yer alan TolAIII proteini gen dizisinde (Şekil 4) 31. ve 56. pozisyondaki sistein rezidülerini kodlayan TGT'nin, serin amino asidini kodlayan AGT ile değiştirilmesine yönelik ileri ve geri primerler tasarlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. QuickChange mutasyon reaksiyonu için tasarlanan primerler

Primer Adı	Primer Sekansı	T <sub>M</sub> (°C)
pTOL C1F	GTCCTATGCAGGCAAACCACTACGCTGCGCATAAACTG	73,5
pTOL C1R	CAGTTTTATGCGCAGCGTACTGGTTTTGCCTGCATAGGAC	73,5
pTOL C2F	GGTGGCGATCCCGCACTTACTCAGGCTGCGTTGGCAGCAG	>75
pTOL C2R	CTGCTGCCAACGCAGCCTGACTAAGTGCGGGATCGCCACC	>75

Primerler tasarlanırken her iki primerin de (ileri ve geri primer) tasarlanan mutasyonu içermesine, ayrıca ileri ve geri primerlerin hedef DNA'nın aynı bölgesindeki karşıt zincirlere birebir eşlenik olmasına dikkat edilmiştir. Primerlerin kalıp DNA'ya daha sıkı bağlanabilmesi ve PZR ürünlerini mutant olmaya zorlaması amacıyla hem 5' hem de 3' uçlarında G veya C nükleotidlerinin olmasına özellikle dikkat edilmiştir. Kit üreticisi firma tarafından tasarımı gerçekleştirilen primer çiftlerinin 25 ile 45 baz uzunluğunda olması tavsiye edildiğinden dolayı bu çalışmada da 40 baz uzunluğundaki oligonükleotidler primer olarak kullanılmıştır. Buradaki hassas noktalardan birisi primer uzunluğunun 45 bazdan daha fazla olmamasıdır. Çünkü uzunluk daha da arttıkça oligonükleotidlerde sekonder yapıların gözlenme ihtimali fazlalaşarak non-spesifik PZR ürünlerinin elde edilmesi veya başarısız PZR gerçekleşme ihtimali kuvvetlenmektedir. Tasarlanan primerler Eurofins Genomics (EU) firmasından temin edilmiştir. Yine üretici firma tarafından tavsiye edildiği şekliyle hedeflenen mutasyonun primer çiftinin orta bölgesine yerleştirilmesine, mutajenik bölgenin her iki tarafında en az 15'er baz eşlenik sekansın bulunmasına özellikle dikkat edilmiştir.

```

gccaccgaatttctctagaatattttggttacttttagaaggagatataccatgcatcac
A T E F P L E Y F V Y F R R R Y T M H H
catcaccatcactcgcagcaacaatggcgcacatcaggggcccgatatcaataactatgccggg
H H H H S S N N G A S G A D I N N Y A G
cagattaaatctgctatcgaaagtaagttctatgacgcacatcgctcctatgcaggcaaac
Q I K S A I E S K F Y D A S S Y A G K T
tgtacgctgcgcataaaactggcaccgatggatggttactggatcaaacctgaagggt
C T L R I K L A P D G M L L D I K P E G
ggcgatcccgcactttgtcaggctgcggtggcagcagctaaacttgccaagatcccgaaa
G D P A L C Q A A L A A A K L A K I P K
ccaccaagccaggcagtatatgaagtgttcaaaaacgcgccattggacttcaaaccgggt
P P S Q A V Y E V F K N A P L D F K P G
gggggatctctggttccgcgcggatccaggcctgagctccggggcccatatggcggccgc
G G S L V P R G S R P E L R A P Y G G R
ggtacctgatgaacgcgt
G T - - T R
    
```

Şekil 4. TolAIII proteinine ait DNA ve amino asit sekansı (Gokce ve ark., 2008)

## 2.2. QuickChange Reaksiyonu için PZR

PZR için tasarlanan primerler son konsantrasyonları 10 pmol mL<sup>-1</sup> olacak şekilde seyreltilmiştir. Kalıp olarak kullanılan pToIT plazmiti *E.coli* Mach I suşunda çoğaltılarak Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs. Inc.) ile saflaştırılmıştır (Ulusu ve ark., 2016). Saflaştırma sonucunda elde edilen plazmid konsantrasyonu mikro hacimli spektrofotometre ile ölçülmüş ve 37,7 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. QuickChange reaksiyonu için kullanılan kit protokolünde 5-50 ng mL<sup>-1</sup> aralığındaki kalıp DNA konsantrasyonu en iyi PZR sonucu için optimize edildiğinden dolayı saflaştırılan 37,7 ng mL<sup>-1</sup> olarak saflaştırılan pToIT plazmiti PZR için kullanılmıştır. Her bir mutasyona özgü olmak üzere primerler ile PZR karışımı Tablo 2'deki gibi hazırlanmıştır. Kit üreticisi firma tarafından önerildiği şekilde nokta mutasyonunu gerçekleştirmek üzere PZR için 12 döngü seçilmiştir (Tablo2).



Tablo 2. QuickChange reaksiyonu için PZR karışımları ve parametreleri (Agilent QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Catalog # 200518)

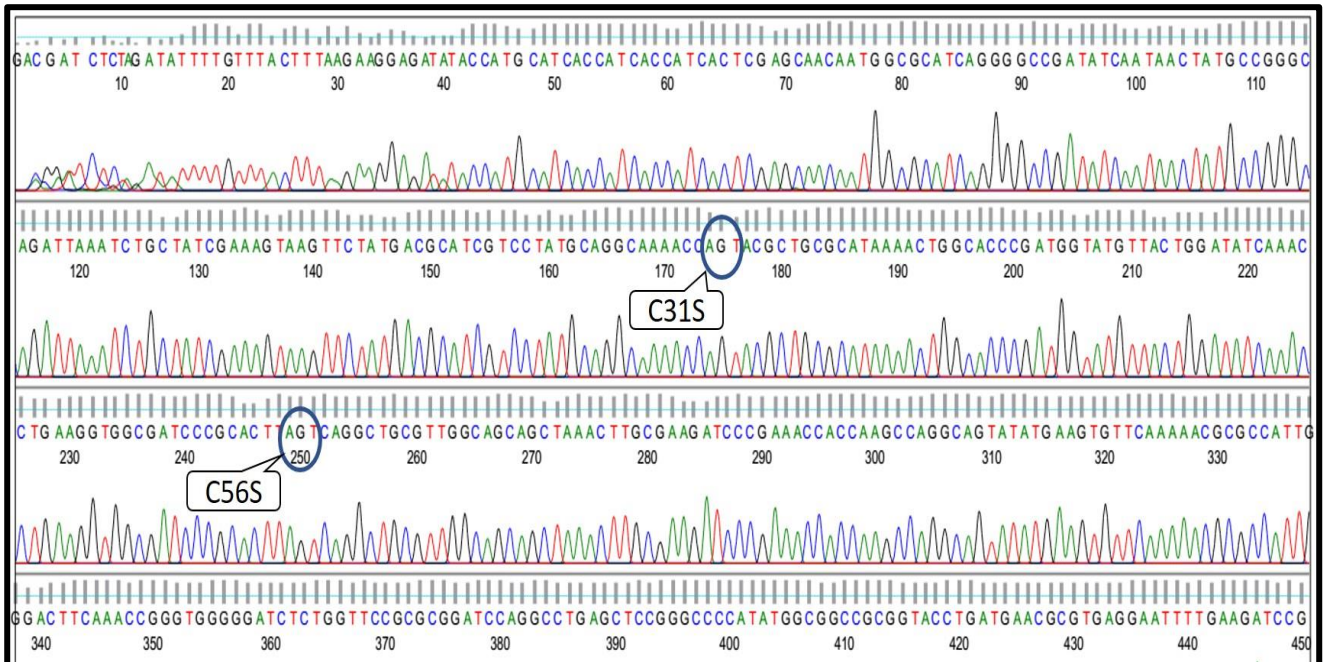
PZR Bileşeni	Miktar	Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
PZR Tamponu (10 X)	5 µl	1	1	95 °C	30 sn
Kalıp DNA	2 µl	2	12-18	95 °C	30 sn
İleri Primer	1 µl			55 °C	1 dk.
Geri Primer	1 µl			68 °C	1 min/kb plazmid
dNTP (2 mM)	5 µl				
Ultra Pfu DNA Polimeraz	1 µl				
ddH <sub>2</sub> O	35 µl				
<b>TOPLAM</b>	<b>50 µl</b>				

### 2.3. Dpn I Kesimi

Elde edilen PZR ürünleri içerisinde parental (metillenmiş) DNA'ların yok edilmesi amacıyla metilasyonu gerçekleştirmiş DNA numunelerine spesifik olan Dpn I restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için her bir PZR ürününe 10 U/µl Dpn I enziminden 1 µl ilave edilerek kesim başlatılmıştır. Reaksiyon karışımı hafifçe çalkalanarak ve pipet ile birkaç defa alt üst edildikten sonra santrifüj edilmiştir. Daha sonra numuneler 1 saat 37 °C'de inkübe edilerek kesim gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mutant plazmid DNA'lar ısı şoku ile (Uluslu ve ark., 2016) NEB® Turbo Competent E. coli (High Efficiency) hücrelerine transforme edilerek Amp (+) LB Agar içeren petri kaplarına yayma ekim yapılmıştır.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Sunulan bu çalışmada *Escherichia coli* ekspresyon vektörü pToIT moleküler olarak nokta mutasyonu tekniği ile modifiye edilerek sisteinlerinden arındırılmıştır. Söz konusu vektör prokaryotik rekombinant protein üretimi için sıklıkla tercih edilen *E. coli*'de kimerik proteinlerin üretilerek saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Genetik mühendisliği teknikleriyle pToIT plazmitine klonlanan bir gen, indüklenebilir T7 promotörü altında *E. coli* periplazmik bölge proteinlerinden olan TolAIII ile birlikte füzyon olarak ifade edilmektedir. Protein mühendisliği çalışmalarında özellikle heterolog proteinlerin üretilmesinde sıklıkla karşılaşılan inklüzyon cisimciğinin oluşması, konakçı hücre tarafından üretilen proteinin toksik olarak algılanması gibi durumlara karşı geliştirilmiş olan pToIT ekspresyon plazmitinin açık okuma çerçevesi sırasıyla; 6 X His Tag, TolA III *E.coli* periplazmik proteini, thrombin enzimi tanıma bölgesi (LVPRGS), ilgilenilen protein ve sonlanma kodonundan oluşmaktadır (Şekil 3). Bu çalışmada pToIT ekspresyon plazmitinin modifiye edilerek pToIT Delta'nın (sisteinleri giderilmiş) elde edilmesinin temel amacı, heterolog proteinde bir veya daha fazla sistein bulunması durumunda istenmeyen disülfid çapraz bağlarının oluşarak proteinin 3 boyutlu konformasyonunu değiştirme ihtimalinin önüne geçilmesidir. Gerçekleştirilen QuikChange site-directed mutagenesis reaksiyonuyla iki aşamada TolA-III proteininde bulunan iki Cys (C) rezidüsü Ser (S) ile değiştirilerek (C56S ve C31S mutasyonları) pToIT delta plazmiti elde edilmiştir. Gerçekleştirilen mutasyonun doğrulanması amacıyla DNA sekans analizi yapılan mutant plazmitlere ait dizileme kromatogramı Şekil 5.'te verilmiştir. Kromatogram FinchTV Version 1.4.0 programında görüntülenmiştir.



Şekil 5. QuikChange site-directed mutagenesis reaksiyonu sonucunda elde edilen pToIT Delta plazmitine ait DNA sekans analizi kromatogramı

Proteinlerin ve peptidlerin doğal yapıları; molekülün esnekliğini, konformasyonunu ve katlanmasını direkt veya indirekt olarak belirleyen pek çok etkileşim tarafından stabilize edilir. Hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler gibi, bu etkileşimlerin çoğu, non-kovalent ve genellikle zayıf etkileşimlerdir. Diğer bir taraftan ise, kovalent etkileşimlerin, özellikle küçük boyutlarından dolayı hidrofobik amino asitleri az miktarda içermelerinden dolayı peptidlerin katlanmalarında daha etkili oldukları düşünülmektedir (Khoo ve Norton, 2011). Kovalent etkileşimlerin en çok bilinen örneği ise özellikle iki sistein amino asidi arasında meydana gelen disülfid bağlarıdır. Bu bağlar genellikle; büyüme faktörleri, hormonlar, enzimler, toksinler ve arkealar tarafından üretilen termostabil intraselüler proteinlerde bol miktarda bulunurlar (Mallick ve ark., 2002). Disülfid bağlarının çoğu, proteinin 3 boyutlu konformasyonunu devam ettirmek dışında fonksiyon için görev almazlar, fakat bu bağların varlığı proteinlerin tersiyer yapılarının oluşturulmasında ve devamında direkt olarak ilgili oldukları için proteinlerin aktivitesini ciddi oranda etkileyebilirler.

Sequence ID: Query_186115 Length: 89 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 89 <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
172 bits(437)	2e-63	Compositional matrix adjust.	87/89(98%)	87/89(97%)	0/89(0%)
pToIT	1	SGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTC	TLRIKLAPDGMLLDIKPEGGDPAL	QAAL	60
pToIT-Delta	1	SGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTS	TLRIKLAPDGMLLDIKPEGGDPAL	QAAL	60
pToIT	61	AAAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKP			89
pToIT-Delta	61	AAAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKP			89

Şekil 6. pToIT ve pToIT Delta plazmitlerinde bulunan TolA III aminoasit sekansı hizalama sonuçları (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

## 4. Sonuç

Sonuç itibarıyla doğal bir proteinde bulunan disülfid bağının ortadan kaldırılması veya yeni sisteinler ile yeni disülfid bağlarının teşekkülü yapıya bağlı olarak fonksiyonu etkileyebilmektedir. Bu çalışmada da elde edilen pToIT Delta plazmitinin yabancı tipte olan pToIT ile sekans hizalama sonuçlarına bakıldığında (Sekans hizalama işlemi NCBI BLAST On-line programı ile gerçekleştirilmiştir) (Şekil 6) TolA III proteininin 31. ve 56. pozisyonunda bulunan sistein rezidülerinin kaldırılarak serin'e dönüştürüldüğü görülmektedir. Böylece pToIT Delta ekspresyon plazmiti kullanılarak gerçekleştirilecek heterolog gen ekspresyonu çalışmalarında doğal olmayan disülfid çapraz bağlarının oluşması engellenmiş olacaktır.

## Kaynakça

- Agilent QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual Catalog # 200518
- Anderluh, G., Gökçe, I., & Lakey, J. H. (2003). Expression of proteins using the third domain of the Escherichia coli periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein expression and purification*, 28(1), 173-181.
- Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology advances*, 23(1), 87-92.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stiiber, D., & Henco, K. (1994). 6xHis-ni-nta chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. In *Protocols for gene analysis* (pp. 371-387). Humana Press.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. *Science*, 262(5140), 1744-1747.
- Gokce, I., Anderluh, G., & Lakey, J. H. (2008). *U.S. Patent No. 7,348,408*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Khoo, K., & Norton, R. S. (2011). Role of disulfide bonds in peptide and protein conformation. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Analysis and Function of Amino Acids and Peptides* (pp. 395-417). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- LaVallie, E. R., & McCoy, J. M. (1995). Gene fusion expression systems in Escherichia coli. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), 501-506.
- Lazzaroni, J. C., Germon, P., Ray, M. C., & Vianney, A. (1999). The Tol proteins of Escherichia coli and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS microbiology letters*, 177(2), 191-197.
- Levengood, S. K., Beyer, W. F., & Webster, R. E. (1991). TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(14), 5939-5943.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A., & Wlodawer, A. (1999). Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure*, 7(6), 711-722.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 60(3), 512-538.

- Mallick, P., Boutz, D. R., Eisenberg, D., & Yeates, T. O. (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9679-9684.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B. W., Veltman, O. R., Van den Burg, B., Venema, G. & Eijsink, V. G. (1997). Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11152-11156.
- Stewart, E. J., Åslund, F., & Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO journal*, 17(19), 5543-5550.
- Ulus, Y., Şentürk, S. B., Kuduğ, H., & Gökçe, İ. (2016). Expression, purification, and characterization of bovine chymosin enzyme using an inducible pTOLT system. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(6), 596-601.