



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT OLARAK ESCHERICHIA COLI İÇERİSİNDE
AKTİF TEN-ELEVEN TRANSLOKASYON ENZİMİ İFADESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Ali PAMUK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

Gaziantep
2018

BEYAN

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

Tarih:

İmza:

Ad Soyadı: Ali PAMUK

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK'e, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında engin bilgilerinden yararlanma fırsatı bulduğum, yardım ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir Engin ESER'e teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU hocama ve Anabilim Dalımızın sayın hocaları, Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI, Prof. Dr. Seyithan TAYSI, Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENCI, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖRKMEZ ve Yrd. Doç. Dr. Elif İŞBİLEN'e teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamda kullandığımız proje malzemelerinin önemli bir kısmı TUBİTAK 114C129 no'lu proje (BİDEB-2232, Dr. Bekir Engin Eser) kapsamında desteklendiği için de TUBİTAK'a teşekkür ederim.

Ayrıca Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Shameem Saadat'a da ufuk açıcı tavsiyelerinden ötürü teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta eşim Reyhan PAMUK olmak üzere bana yıllarca emek vererek bugünlerime getiren babam Şemsettin PAMUK ve annem Meryem PAMUK'a sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
1.1. Epigenetiğin Tanımı ve Tarihçesi	3
1.1.2. Epigenetik Mekanizmalar	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Gen İfadesini Doğrudan Etkileyen Mekanizmalar	5
2.1.1 Histon Modifikasyonları	5
2.1.2. DNA Modifikasyonları	5
2.1.2.1. DNA Metilasyonu	5
2.1.2.2. DNA Demetilasyonu	7
2.2. DNA Metilasyonunda Anormallikler ve İlişkili Hastalıklar	7
2.2.1 Epigenetik ve Kanser	7
2.2.2. Epigenetik ve Diyabet	9
2.2.3 Epigenetik ve Alzheimer	9
2.3. TET Enzimleri ve Yeni Epigenetik İşaretler	10
2.3.1 TET Enzimlerinin Vitamin C ile Regülasyonu	11
2.4. Enzimler ve Enzim Kinetiğini Etkileyen Faktörler	11
2.4.1 TET Enzimlerinin Mekanizma ve Kinetiklerinin İncelenmesinin Önemi	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Protein Eldesi için Gen Dizaynı	14
3.2. LB-Agar Tabağı Hazırlanması	14
3.3. Kompetent Hücre Hazırlanması ve Transformasyon	15
3.4. Bakteri Hücrelerinde Rekombinant Protein Ekspresyonu	16
3.5 Lizis Çözeltisinin Hazırlanması	16
3.6 Protein Saflaştırılması	17

3.7 Protein Denatürasyonu	18
3.7.1 Tekrar Katlama Metodu	18
3.7.2 Seyreltme Metodu	19
3.7.3 Diyaliz Metodu	19
3.8. Katlanmış Proteinden Histidin Etiketinin Kopartılması	20
3.9. Protein Karakterizasyonu	20
3.9.1 SDS PAGE	21
3.9.1.1. SDS PAGE Jel Hazırlama	21
3.9.1.2. Yükleme Jeli Hazırlama	22
3.9.2. Konsantrasyon Hesaplama	22
3.9.3. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktarının Spektrofotometrik Tayini	22
3.9.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Spektrofotometrik Tayini	23
3.10. Aktivite Analiz Reaksiyonları	24
3.10.1 HPLC Metodu ile Aktivite Analizi	25
3.10.1.1. HPLC Örneklerinin Hazırlanması	25
3.10.1.2. HPLC Cihazının Hazırlanarak Örneklerin Yürütülmesi	25
3.10.2. Süksinik Asit Metodu ile Aktivite Kontrolü	26
4. BULGULAR	27
4.1. 4.1. TET1 Proteini Katalitik Bölgesinin Standart Yöntemlerle Rekombinant Yoldan E.coli İçerisinde İfadesi ve Protein Saflaştırılması	27
4.1.1. Proteini Sentezleyen DNA Dizisini Taşıyan Plasmidin Ekspresyon Bakteri Hücresi İçerisine Transform Edilmesi	27
4.1.2. Rekombinant Protein Ekspresyonu, SDS-PAGE Jel Elektroforez Analizi ve Protein Saflaştırması	28
4.2. Proteinin Aktifliğinin Süksinik Asit Metoduyla Kontrol Edilmesi	32
4.2.1. Deterjan Yoluyla Proteinin Çözünür ve Aktif Hale Getirilmesi Çalışmaları	33
4.2.2. Denatürasyon/Tekrar Katlama Yoluyla Aktif ve Çözünür Enzim Eldesi Çalışmaları	34
4.3. Protein Ekspresyonunun ve Protein Çözünürlüğünün SDS-PAGE Jel Elektroforez Yöntemiyle Tayini	37
4.4. Aktivite Analiz Reaksiyonları ve Ürün Analizi	39
4.4.1. Tekrar Katlanmış (Refolded) Protein ile Aktivite Analizleri	40
4.5. Katlanmış Proteinden Thrombin Vasıtasıyla Histidin-Etiketinin Kopartılması	41

4.6. Aktif Enzim Elde Edilmesi Amacıyla SUMO Füzyon Proteinin Kullanılması	43
5. TARTISMA	50
6. SONUÇ	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	59



KISALTMALAR DİZİNİ

5-caC	5-Karboksi Sitozin
5-fC	5-Formil Sitozin
5-hmC	5-Hidroksimetil Sitozin
5-mC	5-Metilsitozin
Alfa-KG	Alfa-Ketoglutarat
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BCA	Bikinkoninik Asit
BER	Base Excision Repair
BSA	Bovine Sığır Serum Albumin
DNA	Deoksiribo Nükleikasit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
DNMT	DNA Metiltransferaz
DTT	Ditiyotretol
E.Coli	Escherichia Coli
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HAT	Histon Asetiltransferaz
HMT	Histon Metiltransferaz
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IPTG	Isopropyl B-D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
RNA	Ribo Nükleikasit
SAM	S-Adenozilmetiyonin
SDS PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid
TET	Ten Eleven Translocation
TET1-CD	TET1 Katalitik Domain

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 3.1. BCA reaktifi varlığında örneklerin 562 ve 800 nm'deki absorbanları

Tablo 3.2. Standart BSA konsantrasyonlarının 562 ve 800 nm'deki absorbanları

Tablo 3.3. Örneklerin 595 nm'deki ve 800 nm'deki absorbanları

Tablo 3.4. Standart BSA konsantrasyonu elde edebilmek için kullanılan tampon çözelti hacimleri

Tablo 4.1. Protein İfadesi Koşulları

Tablo 4.2. Deterjan ve denatürasyon/tekrar katlama koşullarında protein eldesi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA üzerindeki metilasyon

Şekil 4.1. pET28b vektörü içerisinde TET1 geni ve genin aktarılması için kullanılan restriksiyon enzimleri

Şekil 4.2. TET1-CD plasmidi transform edilmiş BL21(DE3) hücrelerinin seçici olarak LB-Agar-Kanamaysın petri tabakları üzerinde kolon halini almaları

Şekil 4.3. Birinci ekspresyon sonucu elde edilen örnekler

Şekil 4.4. İkinci ekspresyondan elde edilen örnekler

Şekil 4.5. İkinci Ekspresyondan elde edilen lizat örnekleri ve saflaştırılmış örneklerin yan yana yürütülmesi

Şekil 4.6. Üçüncü ekspresyondan elde edilen örnekler

Şekil 4.7. Tablo 2’de yer alan birinci ekspresyondan elde edilen örnekler

Şekil 4.8. Tablo 2’de yer alan 4. ekspresyondan elde edilen örnekler (1. Kısım)

Şekil 4.9. Tablo 2’de yer alan 4. ekspresyondan elde edilen örnekler (2. Kısım)

Şekil 4.10. Kontrol amacıyla hazırlanan oligo substratına ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.11. Kontrol ve ful enzimatik reaksiyonlara ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması

Şekil 4.12. Tekrar katlama sonrası SDS-PAGE jeli

Şekil 4.13. TET1 katalitik birim amino asit dizisi

Şekil 4.14. Tekrar Katlama sonrası SDS-PAGE Jeli

Şekil 4.15. Tekrar Katlama sonrası thrombinle muamele edilmiş enzim ile yapılan aktivite analizi

Şekil 4.16. SUMO ekspresyon vektörünün ayrıntıları ve genimizin takılacağı kesim

Şekil 4.17. SUMO-TET1 füzyon protein ekspresyonu ve saflaştırması sırasında alınan örneklerin SDS-PAGE jeli üzerinde yürütülmüş hali

Şekil 4.18. SUMO-TET1 füzyon protein ekspresyonu yapılan hücrelerin parçalanması sonucu elde edilen lizat (süpernatant kısmı) ile yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları

Şekil 4.19. Saflaştırılmış SUMO-TET1 füzyon protein ile yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları

Şekil 4.20. SUMO-TET1 füzyon proteininden SUMO kısmının kesilmesi amacıyla saflaştırılmış SUMO-TET1 proteininin SUMO ekspres proteaz ile muamele edilmesi

sonrası yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları



ÖZET

REKOMBİNANT OLARAK ESCHERİCHİA COLİ İÇERİSİNDE AKTİF TEN-ELEVEN TRANSLOKASYON ENZİMİ İFADESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Ali PAMUK

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

59 Sayfa, Ocak 2018

Son yıllarda epigenetik üzerine yapılan araştırmaların artması ve genetiğin açıklamakta yetersiz kaldığı konuların epigenetik ile ifade edilebilmesi, epigenetik mekanizmaların ortaya çıkarılmasını zorunlu kılmıştır. Yapılan epigenetik çalışmalar sonucunda, epigenetik mekanizmaların bozulmasının birçok nörodejeneratif hastalık ve özellikle kanser ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. En bilinen epigenetik mekanizmaların başında DNA metilasyonu gelmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda DNA demetilasyonunda görevli TET (ten-eleven translokasyon) adı verilen protein ailesinin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinlerin DNA metilasyonunu aktif olarak geri çevirmesi yanında oluşturduğu metilsitozin türevleri aracılığıyla epigenetik kontrol mekanizmasını önemli bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Ancak TET proteinlerinin oldukça kompleks olan epigenetik değişikliklere etki mekanizması hala aydınlatılamamıştır. Proteinlerin kinetik davranışının bu etki mekanizmalarından biri olabileceği düşünülmektedir. Bu noktada ihtiyaç duyulan en önemli araçlardan biri, TET proteinlerinin detaylı kinetik ve mekanistik çalışmalar için çok miktarda aktif olarak eldesidir. Bu çalışmamızda TET1 proteini katalitik bölgesinin rekombinant olarak E.coli bakterisi içerisinde eldesi ve aktif şekilde saflaştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: 5-metilsitozin, DNA Demetilasyonu, Epigenetik, Rekombinant Protein Eldesi, TET Proteini.

ABSTRACT

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT ACTIVE TEN-ELEVEN TRANSLOCATION ENZYME IN ESCHERICHIA COLI

Ali PAMUK

Master Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Associate Professor Dr. Hülya ÇİÇEK

59 Pages, January 2018

Increasing research on epigenetics in recent years and the inability to explain some of the subjects with genetically, have necessitated the uncovering of epigenetic mechanisms. As a result of the epigenetic studies made, it has been found that the deterioration of the epigenetic mechanisms is associated with many neurodegenerative diseases and especially cancer. DNA methylation is one of the most common epigenetic mechanisms. In recent years, studies have revealed the existence of a protein family called TET (ten-eleven translocation), which is responsible for DNA demethylation. These proteins have been shown to actively reverse DNA methylation and to significantly affect the epigenetic control mechanism through the methylcytosine derivatives they form. However, the mechanism of the TET proteins on the highly complex epigenetic changes is still unclear. The kinetic behavior of proteins is thought to be one of these mechanisms of action. One of the most important thing needed at this point is the production of active TET proteins in a large amount in order to study kinetic and mechanistic of TET proteins. In this study, it was aimed to purify the catalytic domain of TET1 protein recombinantly and actively in E. Coli bacteria.

Key Words: 5-methylcytosine, DNA Demethylation, Epigenetics, Expression of Recombinant Protein, TET Protein.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Epigenetiğin Tanımı ve Tarihçesi

Bilim adamları yıllar boyu organizmaların karakterini araştırırken çevresel faktörler ile genetik faktörleri kıyaslamış ve hangisinin baskın olduğu konusunda net bir çözüm önerisinde bulunamamışlardır. 1956 yılında Conrad Waddington adlı İngiliz bilim adamı yayınladığı makalede aktarılan kazanılmış karakterlerde çevresel faktörlerin de etkin olduğunu başarıyla göstermiştir(1). Yaptığı deneylerde belirli çevresel etkilere maruz kalmış farelerin kazandıkları yeni karakterleri sonraki nesillere aktardığını gözlemlemiş ve bu fareleri de aynı çevresel faktörlere maruz bırakarak bir sonraki nesilde de aynı karakterleri gözlemlemeyi başarmıştır. Daha sonraki nesillerde o karakteri etkileyen çevresel faktörler ortadan kalksa bile aynı karakter sonraki nesillere başarıyla aktarılabilmiştir. Bu yeni karakter farenin genetiğine başarıyla kaydedilmiştir ve bu yönetime genetik asimilasyon adını vermiştir. Bu çevresel etkiler acaba gen seviyesinde bir mutasyona sebebiyet vermiş olabilir miydi? Bu tabi ki mümkün olabilirdi ancak çok kısa bir zamanda sadece birkaç jenerasyon sonrası bunun mümkün olması ve sadece birkaç bireyde değil bütün grupta aynı değişimi göstermesi tabii ki mutasyonla açıklanamayacak bir etkiydi. İşte bu tip çevresel etkilerle genetik yapıda herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesinin değişmesi olayına epigenetik denir. Epigenetik, genetik ötesi anlamına gelir ki genetik yapının değişmemesine karşılık gen ekspresyonundaki farklılıklar sonucunda ortaya çıkan yeni karakterlerin bir sonraki nesillere aktarılmasına olanak tanır.

1.1.1. Epigenetiğin Önemi

Epigenetik faktörlerin DNA üzerinde değişikliğe sebebiyet vermeden gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişiklikler ve bu değişiklikler sonucunda ortaya çıkan karakterlerin sonraki nesillere aktarıldığı göz önüne alındığında epigenetiğin ne kadar önemli olduğu rahatlıkla anlaşılabılır. Ancak bunun da ötesinde son yıllarda yapılan araştırmalarda epigenetik mekanizmalardaki bozulmaların çeşitli hastalıklara neden olduğu ve özellikle nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile olan ilişkisi dikkat çekmektedir (2,3,4). Bu açıdan da epigenetik mekanizmaların tam olarak aydınlatılması ve elde edilen bilgiler sonucunda artan kanser vakalarının azaltılması ve hatta kemoterapi ve radyoterapi gibi hastalarda ağır hasarlar bırakan tedavi metodlarına

alternatif yöntem olarak kullanılabilmesi epigenetik çalışmaların en büyük motivasyon kaynağıdır.

1.1.2. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar karmaşık bir takım moleküler olaylar sonucunda bazı genlerin susturulup, bazılarının aktivasyonuna dayanır. İnsan genomunun sadece %1,5'i protein kodlayan genlerden meydana gelir ki bu da yaklaşık 25000 gen olduğu anlamına gelir (5). Bu 25000 gen mükemmel bir uyum içerisinde belirli zamanlarda ve belirli hücrelerde ifade edilmelidirler. Genlerin çalışmasındaki bu mükemmel uyum, iyi bir müzik dinletisinin ortaya çıkması için, doğru zamanda doğru enstrümanın çalmasını sağlayan bir orkestra şefine benzetilebilir.

Epigenetik mekanizmalar gen ifadesini doğrudan ve dolaylı yünden etkileyen mekanizmalar olarak ikiye ayrılırlar. Dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar genellikle noncoding RNA'nın (siRNA, miRNA vb.) mRNA'yı etkileyerek protein sentezini engellemesini içerir. Doğrudan gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar ise histon proteinlerindeki ve DNA düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır (6). Bu mekanizmaların da ötesinde gen ifadesini etkileyen çevresel bir takım etkilerden de söz edebiliriz. Bunlar arasında yetersiz beslenme üzerinde çalışılan konuların başında gelir. Yetersiz beslenme sonucu, DNA ve histon metilasyonu için gerekli olan metil grubunun yeteri kadar alınamaması nedeniyle oluşabilecek hipometilasyon sonucunda gen ifadesinde bozukluk meydana gelebilir (7).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gen İfadesini Doğrudan Etkileyen Mekanizmalar

2.1.1 Histon Modifikasyonları

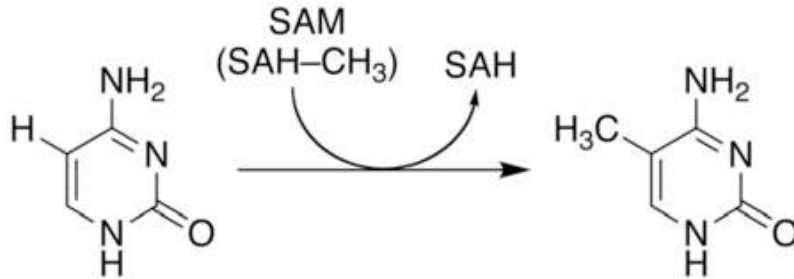
DNA'nın sarıp sarmalanarak paketlenmesini sağlayan histon proteinleri birtakım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında en önemlileri; Histon asetilasyonu ve histon metilasyonu sayılabilir (8). Histon asetiltransferazlar (HAT), histon proteinlerinin asetillenmesinde görev alırken, Histon metil transferazlar (HMT), histon proteinlerinin metillenmesinden sorumludur. Histon proteinlerinde gerçekleşen bu posttranslasyonel modifikasyonlar lizin rezidülerinin asetillenmesi ve/veya metillenmesi şeklinde meydana gelir. Bu modifikasyonlar sonucunda kromatin yapı gevşeyerek ya da sıkılaşarak gen ifadesinin kontrol edilmesine olanak sağlar. Histon proteinlerinin asetillenmesi kromatin yapıyı gevşeterek gen ekspresyonunu aktifleştirirken, deasetilasyon ise kromatin yapının tekrar sıkı formuna geçerek gen ifadesinin susturulması anlamına gelir. Histon proteinlerindeki lizin rezidülerinin metillenmesi ise metillenmenin gerçekleştiği bölgeye göre kromatin yapının sıkılaşmasını ya da gevşemesini sağlayarak gen ifadesinin aktifleştirilmesini veya susturulmasını sağlayabilir.

2.1.2. DNA Modifikasyonları

2.1.2.1. DNA Metilasyonu

En iyi bilinen epigenetik mekanizmaların başında metilasyon gelir. Metilasyon aslında gen ekspresyonunu düzenleyen geri dönüşümlü kimyasal bir olaydır ve hem DNA'ya hem de Histon proteinlerine metil grubu takılması ile gen ifadesine etki eder (9, 10). DNA üzerindeki metilasyon, DNA Metiltransferaz (DNMTs) denilen enzim ailesi tarafından genom içerisindeki sitozinin 5 pozisyonundaki karbon atomunun metillenerek 5-metilsitozinin (5-mC) oluşması olayıdır. Bu reaksiyonda metil grubu S-Adenozilmetiyonin (SAM) adı verilen modifiye bir amino asit tarafından karşılanır ve 5 pozisyonundaki karbona kovalent bağlanarak DNA modifiye edilmiş olur (11). DNA metilasyonu bitkilerde ve omurgalılarda yaygın olarak görülen bir modifikasyondur. DNA metilasyonun gerçekleşebilmesi için üç çeşit DNMTs'a (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) ihtiyaç vardır (12). DNMT1 kurulmuş DNA metilasyon patternleri bakımından yani yarı metillenmiş DNA'ların ve DNA replikasyonu ile oluşan yeni

sarmalın eski sarmala göre metillenmesinden sorumlu iken, DNMT3a ve DNMT3b metillenmemiş CpG dinükleotidlerini metilleyerek yeni ya da de Novo DNA patternları kurmaktan sorumludur.



Şekil 2.1. DNA üzerindeki metilasyon (www.aginganddisease.org sitesinden alınmıştır)

İnsan Genomik DNA'sının yaklaşık %3-5'i metilsitozin bazından oluştuğu için 5-mC çoğu zaman beşinci baz olarak da adlandırılır. Somatik hücrelerde, 5-mC genellikle CpG adacıkları denilen sitozin nükleotidi ile guanidine nükleotidinin yoğun olarak yanyana bulunduğu bölgelerde meydana gelir (13, 14). CpG adacıkları genelde 1000-2000 baz çifti uzunluğunda ve çoğu zaman genlerin promotor bölgeleri yakınında meydana gelirler. Bu genellemeden farklı olarak, embryonik kök hücrelerdeki CpG bölgeleri dışında da önemli miktarlarda 5-mC tespit edilmiştir. İnsan genomu metillenmiş ya da metillenmemiş halde yaklaşık 30 milyon CpG dinükleotidi barındırır (15). Genel olarak genomik DNA'daki çoğu CpG bölgeleri yoğun bir şekilde metillenmiş bir halde bulunmaktadır. Bunun yanında normal somatik hücrelerin promotor bölgelerine yakın germ-line dokulardaki CpG adacıklarının metillenmeden kalması gen ekspresyonuna olanak tanır (14). Bir genin promotor bölgesindeki CpG adacıklarının metillenmesi gen ekspresyonun baskılanarak susturulması anlamına gelir ki DNA metilasyonu ile özellikle dokuya özel genlerin susturularak bu genlerin yanlış dokularda ekspre olması engellenmiş olur (14). Hücrelerin farklı dokularda farklı görevler üstlenmesi ve bu dokulardaki bazı genlerin susturulup bazılarının aktive edilmesi bu yöntemle olmaktadır.

2.1.2.2. DNA Demetilasyonu

DNA metilasyonunun mekanizması hakkında detaylı çalışmalar sayesinde yeterli bilgiye sahipken, bu olayın geri dönüşümü olan demetilasyon (metil grubunun

uzaklaştırılması) hakkında son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda bir takım bilgiye ancak ulaşılabilmektedir. DNA demetilasyonunu, pasif ve aktif DNA demetilasyonu olarak ikiye ayırabiliriz (9). Bunlardan pasif demetilasyon, DNA replikasyonu sırasında yeni oluşan DNA'nın metillenerek DNA'daki 5-mC oranını korumaktan sorumlu olan DNA metiltransferazların (DNMT1) pasifleşerek, metillenmiş DNA nükleotid oranının seyreltilmesi ile meydana gelir. Aktif demetilasyon ise, bir ya da birden fazla enzim kullanılarak 5-mC'in farklı mekanizmalarla farklı moleküllere dönüştürülerek metil grubunun uzaklaştırılması ile gerçekleşir. Pasif demetilasyon mekanizması aktif demetilasyon mekanizmasına göre daha basit ve sade iken, aktif demetilasyondaki metil grubunun fizyolojik şartlar altında, kimyasal olarak kararlı olan C-C kovalent bağının nasıl kırıldığının açıklanması mekanizmasının ne kadar komplike olduğunu göstermektedir.

2009 yılında Science dergisinde yayınlanan bir makalede TET (Ten-Eleven-Translokasyon) protein ailesi olarak adlandırılan ve 3 proteinden oluşan (TET 1-2-3) TET enzimlerinin hem kültür hücrelerinde hem de laboratuvar şartlarında 5-mC'i 5-hidroksimetilsitozin'e (5-hmC) çevirdiği gösterilmiştir (16). Bu çalışma, DNA demetilasyon mekanizma araştırmaları alanında birçok yeni çalışmanın önünü açmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, TET enzimlerinin α -ketoglutarat ve demir +2 iyonunu kofaktör olarak kullanan dioksijenazlar ailesine ait bir enzim grubundan olduğu anlaşılmıştır. TET enzimleri varlığında ardı ardına gerçekleşen 3 oksidasyon reaksiyonu ile 5-mC önce 5-hmC'e daha sonra ise 5-formilsitozin (5-fC) ara ürününden 5-karboksisitozine (5-caC) çevrilmektedir (9,17). Oluşan ara ürünlerden 5-fC ve 5-caC, timin DNA glikozilaz (TDG) enzimi varlığında BER (base eksizyon repair) DNA tamir yoluyla ile tekrar sitozine dönüştürülerek 5-mC'in aktif demetilasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olur.

2.2. DNA Metilasyonunda Anormallikler ve İlişkili Hastalıklar

2.2.1 Epigenetik ve Kanser

İdeal bir tedavi yöntemi bulmak için uğraşılan kanser çok eski zamanlardan beri var olan ve hücrelerin anormal büyümesi ile ilişkili bir hastalıktır. Tıp alanındaki teknolojik gelişmelere ve tedavi metodlarının yaygınlaşmasına rağmen, kanser tedavisi için ideal bir yöntem hala bulunamamıştır. Bu yöntemler arasında olan cerrahi yöntemler ile oluşan tümörlerin alınması sağlansa bile tümörlerin hepsinin tam olarak

temizlendiğinden emin olunamamaktadır (18). Kemoterapi uygulamaları ise sadece tümörlü hücrelerin değil sağlıklı hücrelerin de gelişimini durdurduğu ya da ölümüne sebebiyet verdiği için ideal bir yöntem değildir. Epigenetik ile kanser arasında bir ilişki olduğunun ortaya çıkması ve kanser tedavisinde etkili bir yöntemin olmayışı, epigenetik çalışmaların yaygınlaşmasına ve kansere neden olan epigenetik mekanizmalarının araştırılmasına ağırlık verilmiştir.

Epigenetik hatalar sonucunda kanserle ilişkili olan genlerin ifadelerinde meydana gelen değişiklikler, bu genlerin ya susturulmasına ya da aşırı aktivite göstermesine neden olarak kanser gelişimine sebep olurlar (20). Hipermetilasyon ve hipometilasyon kanserle ilişkili olan epigenetik bozuklukların başında gelmektedir. Hipermetilasyonda DNA normalden fazla metilasyona uğrayarak, özellikle tumor baskılayıcı genlerin susturulması ile kanser oluşumuna sebebiyet verirken, hipometilasyonda ise onkogenlerin aktivasyonu sonucu kanser oluşumu gözlenir. Hipermetilasyon daha çok CpG adacıklarında ve promotor bölgelerde görülürken, hipometilasyona özellikle transkripsiyon kontrol sekanslarında daha sık rastlanır. Aslında kanserli hastalarda genomun genelinde hipermetilasyondan çok hipometilasyona rastlanır ki bu da hipermetilasyonun genomun spesifik yerlerinde, hipometilasyonun ise genomun genelinde daha baskın olduğu anlamına gelir (21).

Yapılan araştırmalar sonucunda, meme, karaciğer akciğer, pankreas ve prostat kanserli hastalardaki 5-hmC miktarının normal insanlarınkine göre çok daha düşük seviyelerde olduğunu anlaşılmıştır. Bu bulguyla örtüşür nitelikte, 5-hmC seviyesi düşük olan kanserli hastalarda TET gen ekspresyonu da düşük çıkmıştır. TET2 geninin mutasyona uğraması sonucunda da TET2 geni susturulmuş ve 5-hmC seviyesinde belirgin düşüşler gözlenmiştir (17).

Yapılan bu çalışmalar epigenetik markırların kanserin tedavisi yanında teşhisi için de kullanılabileceğini göstermiştir. Özellikle promotor bölgelerdeki hipermetilasyon seviyesi ve global genomik DNA hipometilasyon miktarı kanserleşmiş ya da henüz kanserleşmemiş hücreleri teşhis etmede önemli bir parametre olarak kullanılabilmektedir.

2.2.2. Epigenetik ve Diyabet

Diyabet pankreastan salgılanan insulin miktarına ve/veya etkisine bağıli hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Tip 1, Tip 2 ve gestasyonel diyabet gibi çeşitleri vardır. Diyabetli hastaların büyük çoğunluğu Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalardır. Tip 1 diyabet genetik faktörlere bağıli olarak insulin hormonunun salgılandığı pankreas B hücrelerinin otoimmün yıkımları sonucunda ortaya çıkan insulin yetersizliğine bağıli diyabet çeşididir. Tip 2 diyabet ise daha çok sonradan ortaya çıkan ve genelde beslenme alışkanlıkları, yetersiz egzersiz, yaşlanma, stres, kullanılan ilaçlar, hiperlipidemi, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık öyküsü gibi risk faktörlerini barındıran diyabet çeşididir (22).

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de her geçen yıl diyabetik hasta sayısı artmaktadır. Diyabetin hem yaşam kalitesini ciddi anlamda düşürmesi hem de yüksek maliyet içeren tedavisi yeni araştırmaların önünü açmıştır. Daha önce bahsedildiği gibi diyabetin hem genetik faktörlerle hem de çevresel faktörlerle ilişki bir hastalık olması, bu mekanizmaların epigenetik modifikasyonlar ile olabileceğini göstermiştir.

Epigenetik ile diyabet arasındaki ilişkiyi ve özellikle de DNA metilasyonu ile olan ilişkisini gösteren çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde, Stefan M. ve arkadaşları monozigot dokuz ayrı ikiz çiftinin lenfosit hücrelerinin DNA metilasyon haritasını çıkararak Tip 1 diyabet ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Bu deneyler sonucunda, sağlıklı monozigot bireylerle, Tip 1 diyabet olan monozigot bireyler arasında 88 CpG bölgesinde metilasyon farklılıkları tespit etmişlerdir (23). Yapılan bir diğer çalışmada ise, Volkmar M. ve arkadaşları, Tip 2 diyabet hastalarının diyabete sebep olan pankreatik adacıklarının DNA metilasyon haritası çıkarılıp sağlıklı kişilerinki ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda 254 genin promotor bölgelerindeki 276 CpG adacıkları incelenmiş ve sağlıklı bireylerle diyabetli bireyler arasında anlamlı metilasyon değışiklikleri tespit edilmiştir (24).

2.2.3 Epigenetik ve Alzheimer

Son yıllarda önem kazanan ve birçok hastalıkla ilişkili olduğu anlaşılan epigenetik modifikasyonların nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkili olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (4,19). Nörodejeneratif hastalıklar, nöronların yapı ve fonksiyonlarının bozulması sonucunda ölümlerinin gerçekleştiği hastalıklardır.

Alzheimer, Parkinson ve Huntington nörodejeneratif hastalıklara örnek olarak verilebilir.

Alzheimer Hastalığı (AD) en yaygın bunama hastalığı olup 65 yaş üstünde %11, 85 yaş ve üstünde ise %32 oranında görülmektedir (25). Genel belirtileri arasında giderek artan yeni öğrenilen şeyleri hatırlama zorluğu olarak karşımıza çıkmaktadır. İlerleyen vakalarda ölümcül olabilen bu hastalık, Amerika'da ölüm nedenleri arasında altıncı sırada gelmektedir. Alzheimer'a sebep olan etkenler hala net olarak ortaya konamazken, tedavi için önerilen net bir yöntem de ne yazık ki bulunmamaktadır. DNA metilasyonu ile Alzheimer hastalığının araştırıldığı çalışmalar ikiye ayrılır. Bunlardan birincisi global DNA metilasyon modifikasyonları ve ikincisi ise gen spesifik DNA metilasyon modifikasyonlarıdır. Alzheimer hastalarının global DNA metilasyon modifikasyonlarının normal bireylerdekine nazaran çok düşük olduğu bir çok çalışmada ortaya konmuştur. Bu sonuç benzer şekilde diğer bir çok hastalıkta da olduğu gibi global hipometilasyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmacılar aynı zamanda Alzheimer'la ilişkili olan birçok gen üzerinde de metilasyon modifikasyonlarını araştırmaktadırlar. Bu çalışmalarda daha çok gen ekspresyonunun DNA metilasyonu ile kontrol edildiği promotor bölgeleri üzerinde çalışmışlardır. Gen spesifik DNA metilasyon çalışmalarında herhangi bir hipermetilasyona rastlanılmamıştır (25).

2.3. TET Enzimleri ve Yeni Epigenetik İşaretler

TET protein ailesi (TET1, TET2, TET3) α -ketoglutarat ve demir +2 iyonunu kofaktör olarak kullanan dioksijenazlar grubundandır ve hem in vivo hem in vitro ortamlarda 5-mC'i 5-hmC üzerinden tekrar sitozine çevirebilen enzimlerdir. Demir bağlayan katalitik alt birimin yanında TET1 ve TET3, CXXC bölgesine de sahiptir. Bu bölge TET1 ve TET3'ün DNA'ya bağlanma bölgesi olarak işlev görür. TET proteinleri dokuya özgü ekspresyon özelliği içerirler. TET1 ağırlıklı olarak Embriyonik kök hücrelerinde ifade edilirken, TET2 ve TET3 her yerde ifade edilebilen proteinlerdir. İlginç bir şekilde 5-mC seviyesi genel olarak sabit iken 5-hmC yoğunluğu beyin belirli hücre tiplerinde en fazla olmak üzere dokular arasında farklılıklar gösterir. Yine 5-hmC embriyonik kök hücrelerde fazla iken farklılaşma zamanında seviyesi düşer. 5-hmC'e benzer şekilde 5-mC de gen cisimciklerinde yoğun bir şekilde bulunur. Bunun yanında 5-mC ve 5-hmC'in farklı yoğunluklarda bulundukları yerler de gözlemlenmiştir. 5-hmC tekrarlayan bölgeler olan heterokromatik bölgelerde nadiren bulunur ki bu bölgeler

yoğun 5-mC miktarları ile bilinirler. Yine benzer şekilde bu sefer 5-hmC promotor bölgelerde bol miktarda bulunurken, 5-mC bu bölgelerde neredeyse tükenmiş haldedir (27). Bu örnekler gösteriyor ki, demetilasyonda görevli enzimler olan TET enzimlerinin katalizlediği ve üç basamakla oluşan ara ürünlerden özellikle 5-mC ve 5-hmC'in tek başlarına birer epigenetik işaret olma ihtimalleri oldukça fazladır. Bu araştırmaların birinde, Christine Guo Lian ve arkadaşları 5-hmC seviyesindeki düşüşün Melanom için önemli bir epigenetik işaret olduğunu göstermişlerdir (28).

2.3.1 TET Enzimlerinin Vitamin C ile Regülasyonu

Askorbik asit ya da vitamin C demire bağımlı olmayan dioksijenazlarda aktif demir +2 durumunu koruyan indirgeyici ajan olarak bilinmektedir (29). Bunun yanında vitamin C in vitro TET oksidatif reaksiyonlarda da demir indirgeyici olmasına rağmen TET aktivitesi için gerekli değildir. Ancak yapılan araştırmalarda C vitamininin TET enzimlerinin oksidasyon aktivitelerini ve dolayısı ile DNA demetilasyonunu arttırdığını göstermiştir (30). Diğer indirgeyici ajanlar olan DTT ve glutatyon böyle bir etki göstermemiştir. Biyokimyasal araştırmalar vitamin C'nin seçici olarak fare TET2 katalitik domainin C terminali ile etkileşerek TET1 aktivitesini allosterik olarak etkileyebileceğini önermiştir (17).

2.4. Enzimler ve Enzim Kinetiğini Etkileyen Faktörler

Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen biyokimyasal olayları hızlandıran ve çoğu zaman protein yapıdaki biyolojik katalizörlerdir (31). Hücre içerisinde meydana gelen hemen hemen bütün metabolik süreçler enzime ihtiyaç duyarlar. Enzimlerin özgünlüğü kendilerine özgü üç boyutlu yapılarından kaynaklanmaktadır. Enzimin etki ettiği maddeye substrat ve substratın enzime bağlandığı bölgeye de aktif merkez adı verilir. Enzimlerin çok azı tek başlarına aktivite gösterirlerken, bir çoğu aktivite gösterebilmelerine olanak sağlayan eşsiz üç boyutlu yapılarına ancak başka moleküllere bağlanarak ulaşırlar. Genellikle metal iyonları (Cu^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} ve Mg^{+2} gibi) olan bu moleküllere kofaktör denir.

Enzim reaksiyon hızını etkileyen bazı faktörler vardır. Ortamda yeterli miktarda substrat bulunması halinde enzim konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını artırır. Aynı şekilde, enzim konsantrasyonu sabit iken artan substrat konsantrasyonu da enzimin tamamını enzim – substrat kompleksi oluşturana kadar reaksiyon hızını artırır. Sıcaklık artışı da genel olarak reaksiyon hızını arttıran faktörler arasındadır. Yalnız

belirli bir sıcaklık artışından sonra protein yapıdaki enzimin denatürasyonu söz konusu olacağı için her bir enzimin reaksiyon hızının maksimum olduğu bir optimum sıcaklık vardır. Ortamın pH'ı da reaksiyon hızını etkileyen faktörlerdendir. Aynen sıcaklık faktöründe olduğu gibi her bir enzim için optimum pH vardır. Bu pH değerinin altında veya üstünde enzim reaksiyon hızı azalma gösterir.

Enzimatik reaksiyonların şartlarını değiştirerek reaksiyon hızına etkisinin incelendiği bilime enzim kinetiği denir (32). Yapılan enzimatik çalışmalar sonucunda enzimin katalitik mekanizması, metabolizmadaki rolü, aktivitesi ve enzimin nasıl inhibisyona uğratılacağı hakkında bilgiler elde edilebilir. Enzim inhibisyonu için en çok tercih edilen yöntemlerden birisi, enzimin yapısını bozmadan substrata benzeyen ve enzimin aktif bölgesine bağlanan bir molekülün substrat ile yarışmalı olarak enzime bağlandığı ve enzimin aktivasyonun engellendiği yöntemdir. Bu yüzden bu yöntem yarışmalı inhibisyon 'competitive inhibition' denmiştir. Bir diğer inhibisyon çeşidi ise geri beslemeli inhibisyon 'feedback inhibition' dur. Bu yöntemde inhibitör ile substratın yapılarının benzer olması gerekmemektedir. İnhibitör enzimde substratın bağlandığı aktif merkez yerine ikinci bir bağlanma bölgesine bağlanarak enzimin 3 boyutlu yapısının bozulmasını sağlayarak substratın enzime bağlanmasını engeller. İlaçların çoğu enzimlerin aktivitelerini düşüren birer inhibitördür (33). Bu açıdan da enzim kinetiği ve mekanizması ile ilgili çalışmalar yeni ilaç keşfi gibi konularda yol göstericidir.

2.4.1 TET Enzimlerinin Mekanizma ve Kinetiklerinin İncelenmesinin Önemi

TET proteinlerinin işlevinin bulunması sonucunda aktif DNA demetilasyonu hakkında yeni ve önemli bilgiler edindik. Her ne kadar bu konuda yapılan ilk çalışmalarda 5-hidroksimetilsitozinin, oksidatif demetilasyon sürecinde sadece bir ara ürün olduğu sanılsa da, bu yeni modifiye baz özellikle mitoz-sonrası nöronal Purkinje hücrelerinde neredeyse 5-metilsitozin seviyesinin %50'si oranında bulunmuştur (14, 34). Embriyonik kök hücrelerde de 5-hidroksimetilsitozin yüksek seviyelerde tespit edilmiştir (35). Yeni araştırmalar başka hücre çeşitlerinde de 5-hidroksimetilsitozin oranlarının yüksekliğini göstermektedir. Bu çalışmalar, 5-hidroksimetilsitozinin sadece bir ara ürün olmayıp epigenetik düzenlemede rol oynayan ve 6. baz olarak da isimlendirilebilecek önemli bir molekül olduğunu göstermektedir (36). Bunun yanında diğer oksidatif ürünler 5-

formilsitozin ve 5-karboksilsitozin de birçok hücrede tesbiti yapılabilecek düzeylerde gözlemlenmiştir (26).

Bu çalışmalar ışığında, modifiye sitozin türevlerinin insan genomundaki varlığıyla epigenetik açıdan önemli fizyolojik olayların düzenlenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (14). Bu açıdan, 5-metilsitozinin TET proteinleri tarafından demetilasyonunun ayrıntılı biyokimyasal ve kinetik mekanizması, fizyolojik koşullardaki substrat ve oksijen konsantrasyonlarında enzimin kinetik olarak nasıl işlediği, işleme tabii tutulan 3 substratın protein tarafından seçicilikleri gibi bilgiler bu epigenetik regülasyonun daha ayrıntılı bilinmesi açısından önemlidir. Ayrıca tek bir enzimin hangi mekanizmayla aynı substratı 3 kere oksidasyona tabi tuttuğu, hangi ürünün nasıl ve hangi aşamada biriktirilerek hücre içi derişiminin artırıldığı, göreceli ürün miktarlarının nasıl regüle edildiği de cevaplanması gereken önemli sorular arasındadır. Bu soruların yanıtlanması in vivo çalışmaların yanında, saflaştırılmış enzim ile çözelti içerisinde detaylı mekanistik ve kinetik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Enzimoloji teknikleri kullanılarak yapılacak bu çalışmalar yüksek miktarda aktif protein eldesini gerektirmektedir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar genellikle TET enzimlerinin eldesi için rekombinant memeli ekspresyon sistemlerini kullanmıştır (35, 37). Bu sistemler her ne kadar uygun aktiflikte enzim oluştursa da miktar olarak yeterli değildir. Bakteriyel rekombinant ekspresyon sistemleri ise yüksek miktarda protein eldesine olanak vermekle beraber, aktif protein eldesi için bazı parametrelerin optimizasyonunu gerektirmektedir. Bu tezin amacı, TET proteininin rekombinant olarak E. Coli içerisinde ifadesi ve saflaştırılmasıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Protein Eldesi için Gen Dizaynı

Rekombinant protein eldesi ve saflaştırılması işlemlerinde en önemli basamaklardan bir tanesi de konak hücre ve buna uygun vektör seçimidir. Araştırma konumuz olan TET1-CD proteinini rekombinant olarak üretebilmek için faredeki TET proteinin katalitik kısmını kodlayan DNA dizisi (1367-2039 nolu amino asitler) E.coli bakterisine göre kodon optimizasyonu yapılarak Genscript firmasından pET28 vektörü içerisine konulmuş şekilde hazır olarak alındı. Toz halinde kurutulmuş olarak elimize ulaşan plazmid DNA'sı, steril ultra saf suda süspansiyon edilerek çözülmüştür. TET1 geninin pET28 plazmidinde ekspresyonu yanında SUMO vektörü içerisine konulmuş formu da SUMO-TET1 füzyon protein ekspresyonu için kullanılmıştır.

3.2. LB-Agar Tabağı Hazırlanması

LB laboratuvar ortamında bakteri kültürü hazırlamak için yaygın olarak kullanılan besince zengin bir medyadır. LB'ye agar eklemek, bakterilerin üzerinde büyürken agarı sindirmeden sadece içerisindeki LB ile beslenebileceği bir jel ortamı oluşmasına olanak sağlar. Bu jele kanamaysın antibiyotiklerinin eklenmesi ise sadece kanamaysın direnci olan bakterilerin üremesine ve kontaminasyon sonucu oluşabilecek herhangi başka bir bakteri kolonisinin büyümesini engelleyecektir.

LB-agar tabağı hazırlamak için önceden karıştırılmış LB agar toz karışımı (5 gr NaCl, 5 gr tripton, 2.5 gr maya ve 7.5 gr agar) ile 500 ml distile su bir erlenmayer flask içerisinde karıştırılır. Karışımın tamamının çözülmesi şart değildir. Ancak otoklavlama sırasında cam üzerinde kalan tozlar karamelize olabilir. Daha sonra erlenmayer flaskın ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp, otoklav bandı ile etiketlenir ve 20 dk. kadar sıvı otoklav ayarında otoklavlanır. Otoklavdan alınan çözelti yaklaşık 50 C'ye kadar soğuması beklenir ve 500 ul kadar kanamaysın eklemesi yapıldıktan sonra steril bir ortamda ve alev altında herbir tabağa yaklaşık 20 ml çözelti dökülür. Tabakların kapakları kapatılıp jelleşene kadar yaklaşık 45 dakika bekletilir. Daha sonra tabaklar ters çevrilip birkaç saat daha bekledikten sonra tabaklar etiketlenip parafilm ile kapatıldıktan 4 C'de saklanır.

3.3. Kompetent Hücre Hazırlanması ve Transformasyon

E.coli (BL21DE3) bakteri hücreleri kimyasal olarak kompetent hale getirmek için öncelikle LB-agar petri tabağı üzerine yayılarak 37 C de hücreler gece boyu büyütüldü. Daha sonra agar tabağındaki bakteri kolonilerinden homojenliği sağlamak için tek bir koloni dikkatlice seçildi ve 50 ml'lik falkon tüp içerisindeki 5 ml LB (Luria Bertani) çözeltisi içerisine konuldu. 37 C de gece boyu inkübasyona bırakılan hücreler daha sonra 10 dakika kadar buz üzerinde tutuldu ve santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlandı. Süpernatant atıldı ve hücreler tekrar 10 ml'lik 0.1M CaCl çözeltisi ile süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen hücreler 20 dakika kadar daha buz üzerinde bekletilerek tekrar santrifüj edildi ve bu sefer 5 ml'lik 0.1 M CaCl ve %15'lik Gliserol çözeltisi ile süspansiyon edilerek hücreler kompetent hale getirilmiş oldu. Kompetent hücreler -80 C'de saklandı.

Kimyasal olarak kompetent hale getirilen 50 ul *E.coli* (BL21DE3) bakteri hücrelerine 1 ul SUMO ekspresyon vektörü içerisinde TET1-CD genini taşıyan plazmid eklendi ve karışım 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 42 C de 50 saniye bekletilerek ekspresyon vektörünün hücre içerisine "heat-shock" ile transformasyonu sağlandı. Daha sonra transforme olan bakteri hücreleri 5 ml'lik kanamaysın antibiyotiği içeren LB-Kan petri tabağı üzerinde yayılarak 15-16 saat 37 C'de büyütüldü ve petri tabağı üzerindeki kolonilerden homojenliği sağlamak için tek bir koloni seçilip LB (Luria Bertani) sıvı medya içerisine konup hücreler gece boyu 37 C de büyümeye bırakıldı. Buraya kadar ki bütün aşamalarda kontaminasyonu ve istenmeyen hücre büyümesini engellemek için kanamaysın antibiyotiği 40 ug/ml konsantrasyonunda bütün kültür besiyerlerine eklendi. Böylece ortam sadece kanamaysın dirençli bakterilerin üremesine uygun hale getirildi. Elde edilen hücre yoğunluğu yüksek kültürler 1:100 oranında seyreltilerek antibiyotik içeren taze sıvı medya içerisine alındı. Protein katlanması için yüksek miktar proteine ihtiyaç duyulan durumlarda 1 L'lik sıvı LB besiyere 10 ml yüksek bakteri yoğunluklu solüsyon transfer edilmiştir. Bu yeni kültürler daha sonra optimum verim elde etmek için optik density (OD) 600 nm'deki absorbans değeri 0.6-0.8 arası olunca IPTG (Isopropyl B-D-1-thiogalactopyranoside) eklenerek istenilen TET1-CD protein üretimi indüklenmiş oldu.

3.4. Bakteri Hücrelerinde Rekombinant Protein Ekspresyonu

IPTG ile indüklenme sonrası 37 °C de 3-4 saat veya 20 °C de 18-20 saat inkübasyonda bekletilen bakteri hücreleri, 5000 g de 30 dakika soğutmalı santrifüj kullanılarak 4 °C de çöktürüldü. Süpernatant atılarak, çöken kısımda çalışmalara devam edildi. Daha sonra çöken hücreler lizis tamponuyla süspansiyon edildi. Lizis tampon, Tris tamponuna, lizozom, DNAaz, EDTA, DTT ve proteaz inhibitörleri belirli oranlarda karıştırılarak hazırlandı. Hücrelerin tam olarak parçalanarak hücre içeriğinin dışarı çıkabilmesi için falkon tüp içerisindeki lizat buz dolu beher içerisine yerleştirildikten sonra sonikatörde %20 Amplitude ve pulse on 0,5 sn pulse off 2 sn olacak şekilde yaklaşık 5 dakika tutuldu. Lizat daha sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C de 5000 rpm de 2 saat santrifüj edilerek çözünmeyen kısımların çökmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra elde etmek istediğimiz proteinin çöken kısımda mı yoksa çözünür kısımda mı olduğunu anlamak için SDS PAGE’de yürütme yaparak proteinimizin çözünen kısımda olduğuna kanaat getirdik.

3.5 Lizis Çözeltisinin Hazırlanması

20 ml Lizis çözeltisi hazırlamak için kullanılan kimyasallar aşağıdadır.

20 ml 50 mM Tris pH:7,8

20 ul EDTA 0,5 mM

40 ul Proteaz inhibitörü

5 mg lizozom

1 ul DNAaz 10 ul 1M DTT

0,1 M NaCl

%5 Gliserol

20mM İmidazol

Hücrelerin Lizis Edilerek Protein Eldesi ve Protein Saflaştırmasının Deterjan Varlığında (Triton X-100) Yapılması: Proteinin en azından bir kısmının doğru katlanma ihtimali varsayılarak bu kısmın çözünür olarak kalması için yapılan bazı protein eldesi prosedürlerinde denemelerde kullanılmıştır. Triton X-100, yeni ekspres edilen hücrelerin parçalanması için hazırlanan lizis tamponunun içine eklenmiştir. Hazırlanan bu tampon çözelti aşağıdaki komponentleri içermektedir.

Lizis Tamponu

50 mM Tris-HCl (pH 7.8)

M NaCl

% 5 gliserol

20 mM imidazol (aktivitenin direk ölçüleceği lizatlara eklenmemiştir)

0.25 mg/ml lizozom

1 ul DNAase (aktivitenin direk ölçüleceği lizatlara eklenmemiştir)

0.5 mM DTT

0.5 mM EDTA (aktivitenin direk ölçüleceği lizatlara eklenmemiştir)

proteaz inhibitör kokteyl

0.5 % Triton X-100

Çöktürülen hücreler hazırlanan lizis tamponu ile buz üzerinde pipetleme yoluyla süspansiyon edilmiştir (20 ml hücre kültüründen elde edilen hücre miktarı için yaklaşık 5 ml lizis tamponu kullanılmıştır). İyiye homojen hale getirilen hücre süspansiyonunun tamamen parçalanması (lizis olması) için sonikasyon metodu kullanılmıştır. Bu metotta, lizis tampon çözeltisi ile süspansiyon edilen hücreler (5-20 ml arası), toplam 2-3 dakikalık süre ile buz üzerinde sonike edilmiştir. Sonikasyon hücre süspansiyonunun çok ısınmaması için kesintili olarak yapılmıştır. Ayrıca lizis tamponu içerisinde kullanılan lizozomda bu inkübasyonlar öncesinde ve esnasında bakteri hücre duvarlarının enzimatik olarak parçalanmasını sağlamaktadır. Sonikasyon sonucunda viskozitesi azalan ve homojen/akışkan bir kıvama kavuşan hücre lizatı santrifüj edilerek (5000 g'de yaklaşık 90 dakika) çözünen proteinlerin çözünmeyen hücre parçacıklarından (parçalanmayan hücreler, organeller, çöken proteinler gibi) ayrılması sağlanmıştır. Lizis sırasında her aşamada elde edilen örnekler bir sonraki aşamadaki SDS-PAGE analizi için -80 °C'de saklanmıştır.

3.6 Protein Saflaştırılması

Bu aşamada elde edilen protein karışımından istenilen SUMO-TET1-CD proteinin ayrılması için saflaştırma işlemi yapıldı. Bunun için kullandığımız vektörün özelliği olarak proteinimizin N terminal ucuna bağlı 6 adet histidin aminoasidinin olması ve metallere afinitesinin yüksek olması nedeniyle GE Healthcare firmasından sipariş edilen 5 ml'lik Nikel Affinite kolonu kullanıldı. Protein karışımını kolondan geçirirmeden önce kolon hazır hale getirildi. Öncelikle kolon içerisindeki bakteri üremesini engellemek

için konulan etanolden kurtulmak için kolondan 5 ml'lik şırınga ile 4 defa saf su geçirildi. Daha sonra Tris pH: 7.8, 100 mM NaCl, %20 Gliserol, 20 mM İmidazol ve 1 mM DTT tampon çözeltisi ile de 4 defa yıkandı. Böylece kolon protein karışımının bulunduğu aynı çözelti ile doldurulmuş oldu. Daha sonra ise protein karışımı nikel affinity kolondan geçirildi. Normalde 6 histidinli TET proteinin metal affinitesi yüksek olduğundan kolondaki nikel tamamen bağlanması beklenir. Dolayısı ile toplama işlemine bu aşamada gerek yoktur. Ancak proteinimizin tamamen bağlandığından emin olmak için 'flow through'dan da 1 ml kadar jelde yürütmek için toplandı. Daha sonra kolona bağlanması muhtemel istenmeyen diğer moleküllerden kurtulmak için kolon tekrar tampon çözelti ile yıkandı. En son ise kolon 250 mM imidazol içeren tampon çözelti ile yıkanırken kolondan çıkan çözelti 12 adet 1 ml'lik ependorf tüplere toplandı. Böylece imidazol ile kolona bağlanan proteinlerin yer değiştirmesi sağlandı ve kolona bağlanan proteinler toplanmış oldu. Kolonun bir sonraki kullanıma hazır olması için imidazolden temizlenmesi gerekir. Bunun için de kolon saf su ile iyice yıkanarak kolon içerisindeki imidazol çözeltisinin konsantrasyonu düşürülerek aradaki elektrostatik bağlar zayıflatılır ve kolondan ayrılması sağlanır. Tekrar kullanım için kolon etanol çözeltisi ile yıkanıp saklanır.

Elde edilen 12 adet 1 ml'lik ependorf tüplerdeki çözeltilerin protein içeren fraksiyonlarının tespiti için Bradford reaktifi kullanıldı. Bradford reaktifi proteinlerle kompleks oluşturarak mavi renk vermektedir. Mavi rengin koyuluğu protein miktarı ile doğru orantılıdır.

3.7 Protein Denatürasyonu

Ekspresyon sonrası çökmüş halde (inklüzyon cisimciği) elde edilmiş TET1 proteini 8 M üre içeren denatürasyon tamponu içerisinde olabildiğince çözöldü (pipetleme ve hafif çalkalama yardımıyla). Daha sonra çözelti 5000 g'de santrifüj edilerek çözünmeyen hücre artıklarının ayrılması sağlandı. Bu santrifüj sonrası elde ettiğimiz süpernatant 8 M üre içerisinde denatüre şekilde çözünür hale gelmiş TET1 proteinimizi ve diğer çökmüş bakteriyel proteinleri içermektedir.

3.7.1 Tekrar Katlama Metodu

Tekrar katlama (refolding) prosedürü farklı yollardan yapılabilir (38). Aşağıda TET1 proteini için uyguladığımız iki farklı metodun ayrıntıları mevcuttur. Bu metodlardan ilki

çok az miktar proteinle yapılması sonucu başarılı olmamış ama ikinci metod uygulanarak proteinin başarıyla katlanması sağlanmıştır.

3.7.2 Seyreltme Metodu

Bu metod dahilinde, denatüre edilmiş ve daha sonra Ni-afinite kolonuyla denatüre koşullarda saflaştırılmış proteinimiz, yüksek hacimde üre içermeyen tampon çözelti içerisine yavaş bir şekilde transfer edilerek TET1 proteinimizin katlanması sağlanmıştır. Bu metodu uygularken kullandığımız toplam protein miktarı çok az olduğu için (50 ml besiyerinden elde edilmiş inklüzyon cisimciği), işlemler sırası oluşan kayıpları da düşündüğümüzde elimizde aktivite ölçebilecek kadar yüksek miktarda protein kalmamıştır.

3.7.3 Diyaliz Metodu

Bir L'lik besiyerinden protein ekspresyonu yapıldıktan sonra hücreler lizis tamponu eklenmesi ve yukarıda anlatıldığı gibi sonikasyon yoluyla parçalanarak, daha sonra elde edilen lizat 5000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve çözünen kısım ile çöken (inklüzyon cisimciği) kısmın ayrışması sağlanmıştır. Yine yukarıda anlatıldığı gibi inklüzyon cisimciği 8 M üre içerisinde denatüre edilmiştir. Daha sonra elde edilen yaklaşık 5 ml'lik denatüre olmuş protein karışımı Ni-afinite kolonuna yüklenerek denatüre koşullarda protein saflaştırması yapılmış ve saf olarak TET1 proteinimiz elde edilmiştir. Saflaştırma aşamasında kullanılan bütün çözeltiler 8 M üre içermektedir ki bu da proteinlerin her aşamada çözünür kalmasını sağlamaktadır. Kolona histidin-etiketinden bağlanan TET1 proteinimize 250 mM imidazol eklenerek elüsyon yapılmıştır. Elüsyon sonucu toplanan 1.5 ml'lik fraksiyonlardan 2-4 arası fraksiyonlar TET1 proteinimizi içermektedir. Proteinimizin elüsyonu sahip olduğu hafif sarımtırak renkten de anlaşılmaktadır. Ayrıca protein olan fraksiyonların teyit edilmesi için Bradford çözeltisiyle protein analizi yapılmış, daha sonra da SDS-PAGE jeli yürütülmüştür. Proteinimizi içeren fraksiyonlar birleştirildikten sonra tekrar katlama aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada 8 M üre içerisindeki saf protein önce 5 M üre içeren çözeltiye karşı diyaliz membranı içerisinde diyaliz edilmiştir (yaklaşık 10 ml çözelti diyaliz membranına transfer edilmiş daha sonra ise 250 ml 5 M üre içeren çözeltiye konulmuştur). Çözelti geçişinin tam sağlanması ve homojenizasyon için yaklaşık 3-4 saat veya gece boyu 4 °C'de beklenilmiştir. Daha sonra diyaliz membranı sırasıyla 2 M üre ve 0 M üre içeren tampon çözeltilere koyularak protein çözeltisinin yavaş yavaş

üreden arındırılması ve proteinin de tekrar katlanması sağlanmıştır. Üre içermeyen çözeltiyle yapılan diyaliz sonrası protein çökmemiş ve şeffaf bir çözelti olarak kalmıştır ki bu durum proteinin başarılı bir şekilde katlandığına işarettir. Bu metod iki kere uygulanmıştır. Aşağıda denatürasyon ve katlama sırasında kullanılan tampon çözeltilerin ayrıntıları vardır:

Denatürasyon çözeltisi: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 M üre, 5 mM DTT

Tekrar katlama (Refolding) Çözeltisi: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% gliserol, 2 mM askorbik asit, 1 mM CaCl₂ (5 M, 2 M ve 0 M üre ile beraber)

Tekrar katlama çözeltilerinde proteinin 3 boyutlu yapısını almasına yardımcı maddeler literatürde çokça kullanılmaktadır. NaCl, CaCl₂ ve gliserol bunlardandır. Tekrar katlama işleminden sonra protein aktivite tamponu olan 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) ve 0.1 M NaCl içeren tampon çözelti içerisine alınmıştır (santrifüj filtrelerde tampon değişimi – buffer exchange- yoluyla)

3.8. Katlanmış Proteinden Histidin Etiketinin Kopartılması

Tekrar katlanma sonucu elde ettiğimiz proteini Thrombin Cleavage Kit ile birlikte gelen thrombin-agarose parçalarıyla kitle belirtilen koşullarda muamele ettik. Kısaca, yaklaşık 1 ml'lik ve toplamda 1 mg civarında katlanmış protein agarose-thrombin parçacıklarıyla (beads) karıştırıldı. Üzerine kitle beraber gelen reaksiyon tamponu da eklendi. Daha sonra bu karışım oda sıcaklığında hafif çalkalanmaya başlandı. Ancak yaklaşık 1.5 saat sonra çözelti içerisinde çökmüş proteinler görüldü ve bu aşamada reaksiyon durdurularak örnek, analiz için -80 °C'de saklandı. Ertesi gün reaksiyon karışımı santrifüj edilerek agarose-thrombin parçacıkları ve çökmüş kısım süpernatandan ayrıldı. Elde edilen bu süpernatandan aktivite analizi yapıldı.

3.9. Protein Karakterizasyonu

Protein saflaştırma işleminden hemen sonra elde edilen proteinin özelliklerinin belirlenebilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

3.9.1 SDS PAGE

Bu yöntem proteinlerin moleköl ağırlığına dayanan bir tayin yöntemidir. Elde etmek istediğimiz SUMO-TET1-CD proteinin moleköl ağırlığının yaklaşık 90 kDa olduğu bilinmektedir. Öyleyse saflaştırdığımız proteini SDS PAGE yöntemi ile jel üzerinde yürüttüğümüzde bir protein merdiven standardı 'ladder' yardımı ile saflaştırdığımız proteinin elde etmek istediğimiz protein olup olmadığını kalitatif olarak anlayabileceğimiz gibi elde edilen bantın kalınlığı da kantitatif olarak bir değer ifade eder.

Yürütölmek istenen protein örnekleri 2X-jel yükleme tamponu (metilen mavisi, DTT ve gliserol içeren tampon çözelti) ile eşit hacimde karıştırıldıktan sonra 95 °C'lik hot-plate üzerinde 1-2 dakika inkübe edilmiş ve santrifüj edildikten sonra bu örneklerin süpernatantları jel kuyucuklarına 10'ar ul olacak şekilde yüklenmiştir. Daha sonra örnekler 110 V'da yaklaşık 2-3 saat yürütölmüştür. Bunu takiben jel alınarak önce Coomassie mavisi içeren boyama çözeltisiyle (Coomassie staining solution-metanol, glasiyel asetik asit ve coomassie blue R250) muamele edilerek proteinler boyanmış, bunu takiben ise "destain" çözeltisiyle (metanol ve glasiyel asetik asit) jelin arka planındaki boyanın sökölerek proteinlerin bantlar şeklinde görünür olması sağlanmıştır. Elde edilen jellerin son halleri görüntöleme cihazı vasıtasıyla fotoğraflanmıştır.

3.9.1.1. SDS PAGE Jel Hazırlama

10 ml %12'lik yürütme jeli hazırlamak için aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır.

1,5 M Tris pH:8,8 2,6 ml

Saf su 3,2 ml

%10 SDS 0,1 ml

%10 Amonyum persulfat 100 ul

Acrylamid/Bis-acrylamid %30 4 ml

TEMED 10 ul

Yukarıdaki kimyasallar dikkatli bir şekilde falcon tüpde karıştırıldı. Acrylamid ve TEMED polimerleşmeyi başlatacağı için en son eklendi ve hemen jel hazırlama düzeneğindeki iki cam arasına pipet yardımı ile dikkatlice enjekte edildi. Daha sonra hem jelin üzerinde oluşması muhtemel kabarcıklardan kurtulmak hem de jelin üst kısmının düz ve pürüzsüz olması için üzeri isopropanol ile kaplandı. Polimerleşme

tamamlandıktan sonra isopropanol döküldü ve jelin üst kısmı bir filtre kağıdı yardımı ile tamamen isopropanolden temizlendi. Yürütme jeli hazırlandıktan sonra yükleme jeli hazırlandı ve kuyucukların oluşması için taraklar yerleştirildikten sonra iki cam arasına pipet yardımı ile yükleme jeli enjekte edildi. Bir müddet bekledikten sonra jelleşmenin tamamlanmasının ardından taraklar çıkarılarak jelin kullanıma hazır hale getirilmesi sağlandı.

3.9.1.2. Yükleme Jeli Hazırlama

%4'lük 5 ml yükleme jeli için aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır.

Saf su 3 ml

0,5 M Tris –HCl pH:6,8 1,25 ml

%10 SDS 0,05 ml

%30 Acrylamid/Bisacrylamid 0,67 ml

%10 Amonyum persulfat 0,05 ml

TEMED 0,005 ml

3.9.2. Konsantrasyon Hesaplama

Protein konsantrasyon tayini için spektrofotometrik olarak Bradford ve BCA (Bikinkoninik asit) yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler çözünür proteinlerin çözelti içerisindeki konsantrasyonları ölçülerek yapılmaktadır ve bilinen konsantrasyonlardaki protein çözeltileri ile hazırlanan standart kalibrasyon grafikleri kullanılarak bilinmeyen örneğin konsantrasyonu bulunur.

3.9.3. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktarının Spektrofotometrik Tayini

Bu tayin yönteminde reaktif olarak Bikinkoninik asit (BCA) kullanılır (39). Tayin kitinde bulunan A reaktifi (NaCl, bikinkoninik asit, Sodyum karbonat, sodium bikarbonat, sodium tartrat ve sodium hidroksit) ve B reaktifi (CuSO₄) 50:1 oranında toplam çözelti 210 ul olacak şekilde karıştırılarak BCA reaktif çözeltisi hazırlandı. Standart protein çözeltisi olarak BSA (bovine-sığır-serum albumin) kullanılmıştır. BCA kitinde bulunan 2mg/ml konsantrasyondaki BSA çözeltisi pipetleme hatalarını en aza indirmek için 100 ul/ml ye seyreltilmiştir. Bunun için 950 ul tampon (20 mM Pipes tamponu, 100 mM NaCl) ile 50 ul standart karıştırılarak son hacim 1 ml yapılmıştır. Standart eğriyi çizebilmek için konsantrasyonlarını bildiğimiz beş standart çözelti iki

ayrı stoktan hazırlandı. Standart çözeltilerin son konsantrasyonları sırası ile 25, 50, 100, 200 ve 300 ul/ml olacak şekilde hazırlandı. Örneklerimiz ise 2 ayrı kaynaktan 5 farklı örnek olacak şekilde aşağıdaki miktarlarda tampon çözelti ile karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler, 800 ul BCA reaktifi ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 562 nm'deki absorbanslar ölçüldü.

Tablo 3.1. BCA reaktifi varlığında örneklerin 562 ve 800 nm'deki absorbansları

	Örnek (ul)	Tampon Çözelti (ul)	562 nm'deki Absorbans	800 nm'deki Absorbans
1	20	80	1.839	0.168
2	100	0	2.650	0.116
3	20	80	0.824	0.168
4	100	0	2.107	0.133
5	0	100	0.081	0.184

Tablo 3.2. Standart BSA konsantrasyonlarının 562 ve 800 nm'deki Absorbansları

	Standart BSA Konsantrasyonu	Hacim (ul)	Tampon Çözelti (ul)	562 nm'deki Absorbans	800 nm'deki Absorbans
1	100 ug/ml	25	75	0.168	0.186
2	100 ug/ml	50	50	0.241	0.185
3	2 mg/ml	5	95	0.436	0.177
4	2 mg/ml	10	90	0.692	0.178
5	2 mg/ml	15	85	0.910	0.176
6	Blank	0	100	0.081	0.184

3.9.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Spektrofotometrik Tayini

Yine BCA yönteminde olduğu gibi konsantrasyonu bilinen BSA çözeltilerinin konsantrasyon - absorbans grafiği çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen protein çözeltilerinin konsantrasyonları hesaplanır (40). Son hacimleri 100 ul olacak şekilde hazırlanan standart çözeltiler ve örnekler, 800 ul Bradford reaktifi ile karıştırıldıktan sonra 595 nm'deki absorbansları ölçüldü. Standart çözeltilerin 100 ul son hacimdeki konsantrasyonları sırası ile 25, 50, 100, 200, 300, 800 ul/ml olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.3. Örneklerin 595 nm'deki ve 800 nm'deki Absorbansları

	Örnekler (ul)	Tampon (ul)	595 nm'deki Absorbans	800 nm'deki Absorbans
1	25	75	1.776	0.119
2	100	0	2.458	0.148
3	25	75	1.255	0.128
4	100	0	1.841	0.119

Tablo 3.4. Standart BSA konsantrasyonu elde edebilmek için kullanılan tampon çözelti hacimleri

	Standart BSA Konsantrasyonu	Hacim (ul)	Tampon Çözelti (ul)
1	100 ug/ml	25	75
2	100 ug/ml	50	50
3	2mg/ml	5	95
4	2mg/ml	10	90
5	2mg/ml	15	85
6	2mg/ml	40	60
7	-	0	100

3.10. Aktivite Analiz Reaksiyonları

Aktivite analiz reaksiyonlarında 6-mer'lik DNA oligosu (CGmCGCG) kullanılmıştır. TET1 enziminin bu substrat ile aktif oluşu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (41). Eğer 20 ve daha uzun diziler kullanılırsa nükleaz ve fosfataz enzimleriyle DNA'yı nükleozidlere parçalamamız gerekmektedir. Substratın küçük bir DNA oligomeri olması, ürünlerin herhangi bir muameleye maruz bırakmadan HPLC ile direk analizine imkan tanımaktadır. Genel olarak bir aktivite analiz reaksiyonu enzim olarak lizat örnekleri veya saflaştırılmış protein örneği, substrat olarak 60 uM metillenmiş 6-mer'lik DNA oligosu (CGmCGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-ketoglutarat, 200 uM ferrous (Fe II) demir, 2 mM DTT ve 1 mM ATP içermektedir. Bu reaksiyon karışımı, 1-2 saat veya gece-boyu 37 °C'de inkübe edildikten sonra ya HPLC analizi için ya da süksinik asit analizi için aşağıda belirtildiği üzere hazırlanmıştır. Enzimatik reaksiyon için toplam hacim 50 ul olup bunun yaklaşık 25 ul'sini lizat veya saflaştırılmış protein oluşturmuştur. Bütün aktivite analiz reaksiyonlarında kontrol olarak enzim içermeyen

kontrol, substrat içermeyen kontrol ve bazı analizlerde de alfa-ketoglutarat içermeyen kontrol reaksiyonları da hazırlanmıştır. Bu şekilde reaksiyon komponentlerinden kaynaklanan pikler de tespit edilmiştir.

3.10.1 HPLC Metodu ile Aktivite Analizi

HPLC (Yüksek performans sıvı kromatografisi) küçük molekülleri ayırmakta ve tanımlamakta kullanılan en yaygın metodlardan birisidir. Bu metodun prensibi bir kolon içerisinde geçen sıvı madde karışımının kolon içerisinde paketlenmiş moleküllerle etkileşerek farklı zamanlarda kolondan çıkışlarına yani ayrılmalarına dayanır. En yaygın olarak kullanılan ve bizim de kullandığımız türü “reverse-phase” olarak adlandırılan türüdür. “Reverse-phase” HPLC’de kolonumuz hidrofobik maddeyle paketlenmiştir (genelde 18 karbondan oluşan zincirler-C18 kolonu). Bu nedenle hidrofobik maddeler kolon içerisindeki matriks (stationary phase) ile daha çok etkileşip geç gelirken, hidrofilik maddeler ise daha hızlı gelmekte ve bu şekilde ayrışma olmaktadır. Bunun yanında “stationary phase” kadar kolon içerisinden devamlı geçirilen “mobile phase” de maddelerin gelme zamanının (elution time) belirlenmesi açısından önemlidir. Genelde elüsyon su bazlı tampon çözeltilerle başlar ve çok hidrofilik maddelerin kolondan geçmesi sağlanırken, zamanla metanol veya asetonitril gibi bir organik çözücünün oranı artırılarak hidrofobik moleküllerin de “mobile-phase” ile etkileşerek kolondan geçmesi sağlanır.

3.10.1.1. HPLC Örneklerinin Hazırlanması

Aktivite analiz reaksiyonları tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımına hacminin 3 katı metanol eklenerek karışımda bulunan proteinin çökmesi sağlandı (50 ul reaksiyon karışımına 150 ul metanol). Daha sonra 15 dakika yüksek hızda santrifüj (13.2 g) yardımıyla çöken proteinler çöktürülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan süpernatant alınarak üzerine 200 ul saf su eklendi ve yaklaşık 400 ul’lik hacime ulaşan çözelti HPLC şişelerine (vial) transfer edildi. HPLC şişeleri oto örnekleyiciye yerleştirildi.

3.10.1.2. HPLC Cihazının Hazırlanarak Örneklerin Yürütülmesi

HPLC analizlerinde Agilent 1260 Infinity HPLC cihazı kullanıldı. HPLC kolonu olarak ise Ace marka C18 HPLC kolonu (i.d. 4.6 mm, 25 cm uzunluk, 5 µm particle size) kullanıldı. Öncelikle uygun HPLC ayırıştırma metodu tasarlamak için DNA substratı (6 nükleotidli substrat) HPLC’ye yüklenerek, literatürde de yapılan benzer analizler

ışığında, kromatogramlar incelendi. Mobil-faz olarak amonyum asetat tamponu (pH 5) ve metanol karışımı kullanıldı. Absorbans 260 ve 275 nm’lerde takip edildi ve ayrıca full spektrum da kaydedildi. Son olarak aşağıda belirtilen metodun uygunluğuna karar verildi ve takip edilen analizlerde bu metod kullanıldı.

HPLC Analiz Metodu

1-4 dakika – % 100 Amonyum asetat

4-35 dakika - %100 ‘den % 70’e gradient amonyum asetat, % 0’dan %30’a metanol

35-36 dakika - %70’den %15’e amonyum asetat, %30’dan %85’e metanol

36-41 dakika - %15 amonyum asetat, %85 metanol sabit

41-42 dakika - %15’den % 0’a amonyum asetat, %85’den %100’e metanol

42-47 dakika - %100 metanol

3.10.2. Süksinik Asit Metodu ile Aktivite Kontrolü

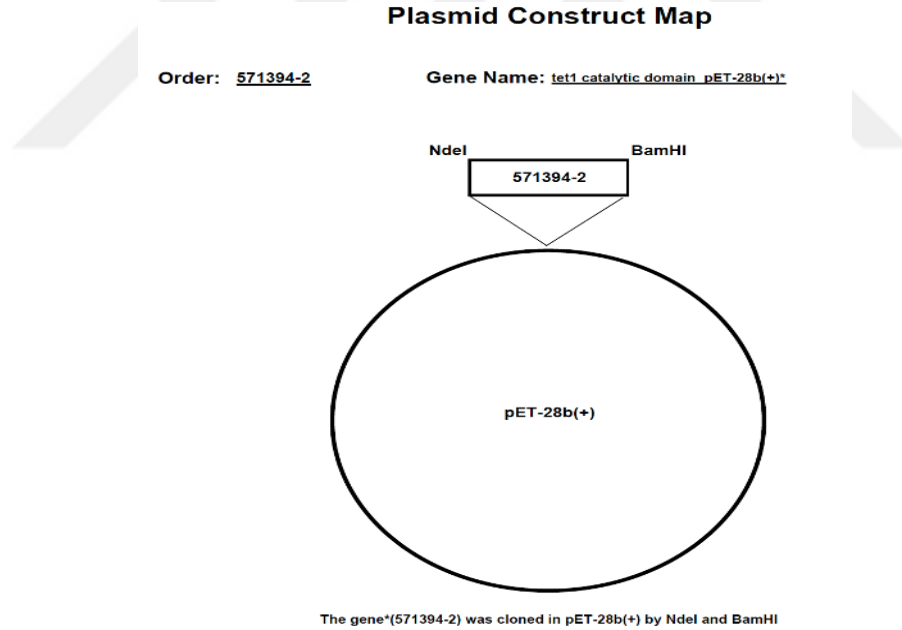
Süksinik Asit metodu uygulanması kolay ve hızlı sonuç verdiği için özellikle saflastırılmış proteinin aktifliğinin çabuk bir şekilde belirlenmesi için tercih edilmiştir (42). Süksinik asit tayini için piyasada bulunan ve spektrofotometrik bir metot olduğu için kullanımı kolay olan süksinik asit tayin kiti kullanılmıştır. Bu tayin yöntemi ile reaksiyon sonucunda yan ürün olarak oluşan süksinik asit tayin edilmektedir. Bunun için reaksiyonda oluşan NAD’ın 340 nm’de absorbansı ölçülmektedir.

4. BULGULAR

4.1. TET1 Proteini Katalitik Bölgesinin Standart Yöntemlerle Rekombinant Yoldan *E.coli* İçerisinde İfadesi ve Protein Saflaştırılması

4.1.1. Proteini Sentezleyen DNA Dizisini Taşıyan Plasmidin Ekspresyon Bakteri Hücresi İçerisine Transform Edilmesi

Literatür araştırmaları doğrultusunda TET1 proteininin fare homologunun katalitik bölgesini (1367-2039 nolu amino asitler) kodlayan genin, *E.Coli* hücrelerine uygun olarak kodon optimizasyonu da yapılmış ve pET28b ekspresyon vektörü (N-terminal his-tag içeren) içerisine aktarılmış şekilde gen sentez firmasından temin edilmiştir (Şekil 1). Plazmid başarılı bir şekilde, kimyasal yolla kompetent yapılmış BL21(DE3) hücrelerine transform edilmiştir. Transform edilen bakterilerin LB-Agar-Kanamaysın petri tabakları üzerinde düzgün koloniler oluşturmaları bunu teyit etmektedir (Sekil 2).



Şekil 4.1. pET28b vektörü içerisinde TET1 geni ve genin aktarılması için kullanılan restriksiyon enzimleri (Şekil gen sentez firmasından alınmıştır).



Şekil 4.2. TET1-CD plasmidi transform edilmiş BL21(DE3) hücrelerinin seçici olarak LB-Agar-Kanamaysın petri tabakları üzerinde koloni halini almaları

4.1.2. Rekombinant Protein Ekspresyonu, SDS-PAGE Jel Elektforez Analizi ve Protein Saflaştırması

Genimizi taşıyan plazmidin transform edildiği BL21(DE3) hücrelerinden (protein ekspresyonu için optimize edilmiş E.Coli hücreleri) IPTG indüksiyonu yardımıyla başarılı bir şekilde protein ekspresyonu yapılmıştır. Protein ekspresyonunun en verimli bir şekilde aktif protein vermesi için farklı ekspresyon koşulları denenmiştir (43). Aşağıdaki tabloda (Tablo 1) belirtildiği gibi değişik sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarını içeren 3 farklı protein ekspresyonu yapılmıştır. Değişik koşullar kullanmadaki amacımız proteinimizin çok miktarda ve aktif olarak sentezleneceği koşulları bulmaktır. Denenen bu ilk koşullar, yeni bir protein eldesi için literatürde yer etmiş standart koşullardır ve genellikle IPTG konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi parametrelerini içermektedir. Aşağıda belirtildiği gibi şu ana kadar istediğimiz seviyede protein ekspresyonu 1. Ekspresyonda gerçekleşmiştir ancak bu ekspresyonda da proteini çözen kısımda değil çöken kısımda tespit edebildik.

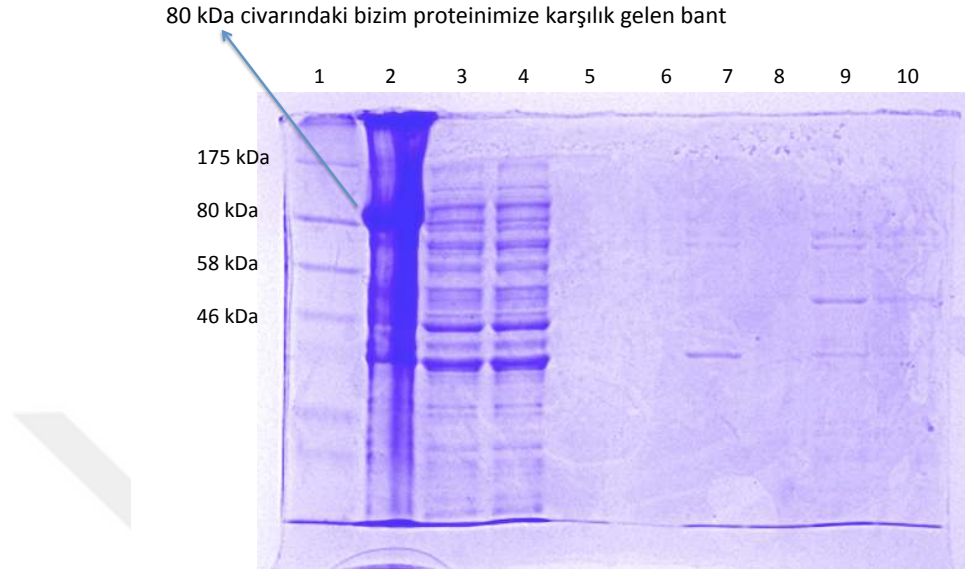
Tablo 4.1. Protein İfadesi Koşulları

	IPTG Konsantrasyonu	IPTG eklenmesinden sonra inkübasyona devam edilen sıcaklık	IPTG eklenmesinden sonra inkübasyona devam edilme süresi	Saflaştırılma yapıldı mı?
1. Ekspresyon	0.4 mM	37 °C	6 saat	Evet
2. Ekspresyon	0.15 mM ve 0.5 mM	20 °C	18-20 saat	Evet
3. Ekspresyon	0.3 mM	20 °C	18-20 saat	Hayır

Hücreler parçalandıktan (lizis yapıldıktan) ve/veya protein saflaştırıldıktan sonra proteinin ekspresyonunun tespit edilebilmesi için çeşitli aşamalardan elde edilmiş örnekler SDS-PAGE jeli üzerinde yürütülmüştür. Hücre lizatı prosedürü sırasında her aşamada elde edilen örnekler (hücre lizatı, çözünen hücre lizat kısmı, çöken hücre lizat kısmı, saflaştırma sonrası elde edilen kısım gibi) SDS-PAGE analizi için saklanmıştır. Yukarıda belirtilen her 3 ekspresyon sonucunda elde edilen lizat ve saflaştırma örnekleriyle jel yürütülmüştür. Jeller metot kısmında anlatıldığı gibi tarafımızdan hazırlanmış sodyum dodesil sülfat içeren %12'lik akrilamid jelleridir (mini-jel). Elde edilen jellerin son halleri görüntüleme cihazı vasıtasıyla fotoğraflanmıştır. Jel fotoğrafları ve her kolona karşılık gelen örneklerin detayları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

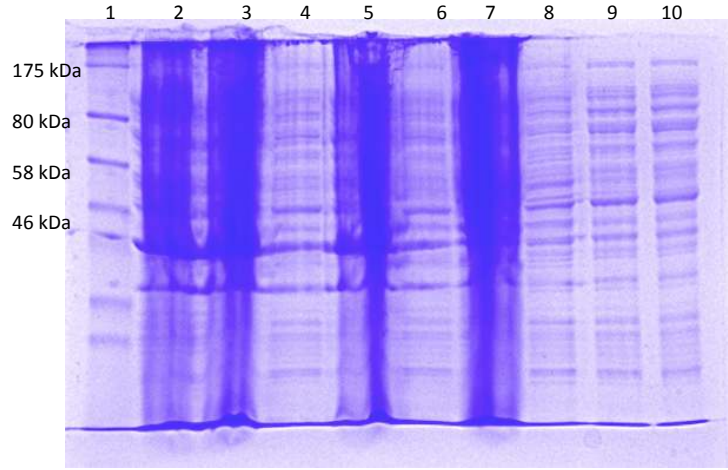
Birinci ekspresyon sonrası lizattan ve saflaştırılan kısımdan elde edilen örnekler ve bu örneklerin jel üzerindeki görüntüsü aşağıdaki gibidir (Şekil 3). Birinci ekspresyon sonrası elde edilen lizat nikel kolonu vasıtasıyla saflaştırılmıştır. Ayrıca saflaştırma (kolondan geçirme) sırasındaki aşamalarda elde edilen değişik örnekler de jele yüklenmiştir. Bu jel görüntüsünde 2 numaralı kolonda yer alan çökmüş hücre (cell pellet) örneğinde 80 kDa civarında koyu bir bant görünmektedir. Bizim proteinimizin ağırlığı da yaklaşık 77 kDa olduğu varsayıldığında bu bantın istediğimiz proteinin bakteri hücrelerinde rekombinant ekspresyonunu başarılı bir şekilde gösterdiği kuvvetli ihtimaldir. Ancak bu bant sadece çökmüş kısımda gözlenirken çözünür fraksiyonda aynı bant gözlenmemiştir (kolon 3). Proteinimizi çözünür fraksiyonda zayıf bir bant olarak bulunacağını düşünüp, kendi proteinimizi zenginleştirip lokal oranını artırmak ve jelde

görünür hale getirmek adına Nikel kolonunda saflaştırma yapılmış, ancak istenilen bant gözlenmemiştir (7-10 numaralı kolonlar).

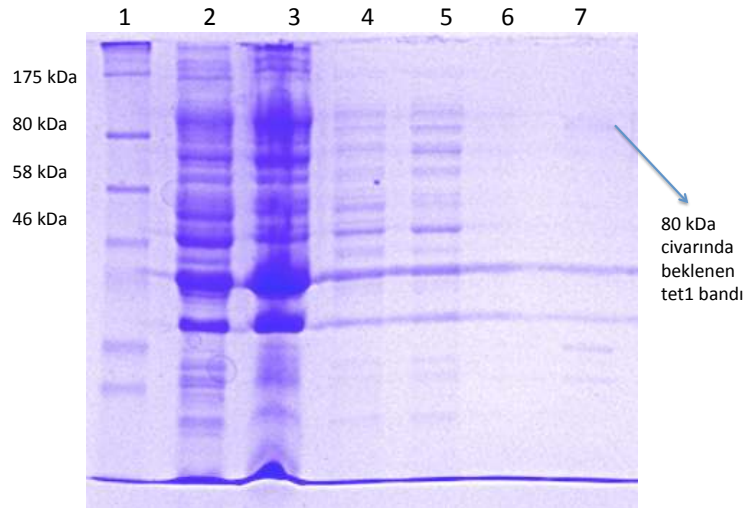


Şekil 4.3. Birinci ekspresyon sonucu elde edilen örnekler. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker (protein merdiveni), 2. çökmüş hücre (cell pellet), 3. Çözünmüş hücre (solubilized cell), 4. Nikel kolona yüklendikten sonra bağlanmadan geçen kısım (flow-through), 5. Kolonu yıkama esnasında başlangıçtaki flow-through, 6. Kolonu yıkama esnasında sonlara doğru gelen flow-through, 7. İmidazol elüsyonuyla gelen erken fraksiyon, 8. İmidazol elüsyonuyla gelen geç fraksiyon, 9. Fraksiyonların karıştırıldığı örnek (pool), 10. En son saflaştırılmış hali (konsantre edildikten sonra)

Birinci ekspresyonda proteinimiz çökmüş hücre artığı fraksiyonunda gözlemlendiği için, proteinin çözünür hale gelmesini sağlamak (doğru katlanmasını) adına bakteri inkübasyonu düşük sıcaklıkta denenmiştir (ikinci ekspresyon - 20 °C’de 16-18 saat). Bu metodla bakterilerin yavaş bir şekilde proteinin ifade etmesi sağlanmakta ve proteinin doğru katlanması için yeterli zaman verilmektedir. Literatürde yer alan birçok protein için bu metod çözünür ve aktif protein eldesi için başarılı olmuştur (43). Ancak ne lizat örneklerinde ne de saflaştırılmış örneklerde birinci ekspresyondaki gibi 80 kDa civarında bariz bir şekilde protein bandına rastlanmamıştır (Şekil 4). Ancak saflaştırılan örneklerde IPTG’siz kontrol (Kolon 6) ve IPTG eklenmiş örnek (Kolon 7) arasında fark olduğu ve IPTG eklenerek üretilen bakteriden saflaştırılan örnekte 80 kDa civarında zayıf da olsa bir bant gözükmemektedir (Şekil 5). Ancak yapılan süksinik asit aktivite analizi sonucu herhangi bir aktivite gözlenememiştir.



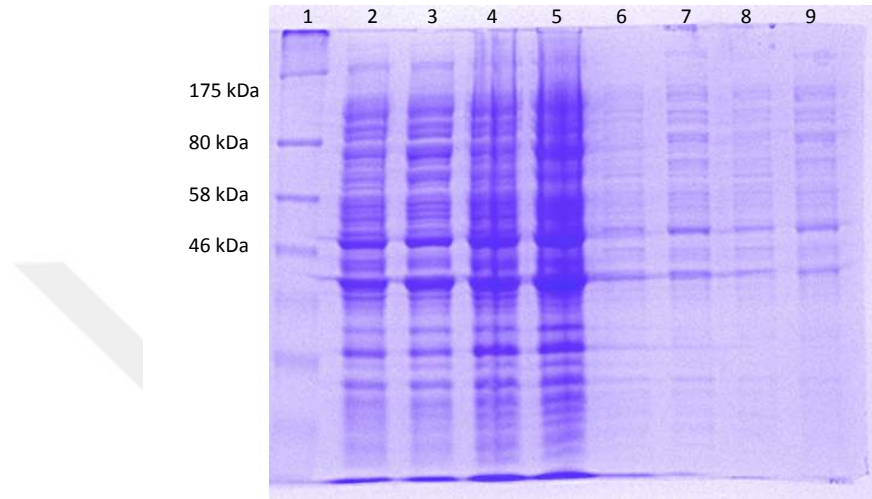
Şekil 4.4. İkinci ekspresyondan elde edilen örnekler. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. 0.15 mM IPTG ile üretilmiş bakteriden çökmüş hücre (cell pellet), 3. 0.15 mM IPTG ile üretilmiş bakteriden çözünür fraksiyon, 4. 0.5 mM IPTG ile üretilmiş bakteriden çökmüş hücre (cell pellet), 5. 0.5 mM IPTG ile üretilmiş bakteriden çözünür fraksiyon, 6. IPTG’siz üretilmiş bakteriden çökmüş hücre (cell pellet), 7. IPTG’siz üretilmiş bakteriden çözünür fraksiyon, 8. 3 numaralı ornekle aynı – fazla yükleme, 9. 5 numaralı ornekle aynı – fazla yükleme, 10. 7 numaralı ornekle aynı – fazla yükleme.



Şekil 4.5. İkinci Ekspresyondan elde edilen lizat örnekleri ve saflaştırılmış örneklerin yan yana yürütülmesi. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. IPTG’siz çökmüş hücre (cell pellet), 3. 0.5 mM IPTG - çökmüş hücre (cell pellet), 4. IPTG’siz çözünür fraksiyon, 5. 0.5 mM IPTG çözünür fraksiyon, 6. IPTG’siz saflaştırılmış örnek (kolon sonrası), 7. 0.5 mM IPTG - saflaştırılmış örnek (kolon sonrası)

Yapılan üçüncü ekspresyon denemesi 20 °C’de ve 0.3 mM IPTG ile yapılmıştır. Bu denemede özellikle lizis, yani hücre parçalanmasının daha efektif yapılmasına dikkat

edilmiştir (kullanılan donma-çözme yönteminde donma-çözme çevrimlerinin sayısı artırılmıştır). Bu denemede saflaştırma yapılmamıştır ama hücre lizat örneklerinde IPTG eklenen ve eklenmemiş örnekler arasında herhangi bir farklı bant gözlenmemiş ve 80 kDa civarında herhangi bir koyu bant tespit edilememiştir.



Şekil 4.6. Üçüncü ekspresyondan elde edilen örnekler. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. marker – protein merdiveni, 2. IPTG’siz bakterilerden tüm lizat (whole lysate), 3. 0.3 mM IPTG – tüm lizat (whole lysate), 4. IPTG’siz bakterilerden çökmüş hücre (cell pellet), 5. 0.3 mM IPTG – çökmüş hücre (cell pellet), 6. IPTG’siz bakterilerden çözünür fraksiyon, 7. 0.3 mM IPTG – çözünür fraksiyon, 8. 6 no’lu örneğin aynısı, 9. 7 no’lu örneğin aynısı.

4.2. Proteinin Aktifliğinin Süksinik Asit Metoduyla Kontrol Edilmesi

Protein elde edildikten sonra en önemli basamak proteinin aktif olup olmadığının kontrol edilmesidir. HPLC (yüksek performans sıvı kromatografisi) cihazı ile yapılan ölçümler özellikle kantitatif açıdan daha doğru sonuçlar vermekle beraber, daha uzun sürmekte ve masraflı olmaktadır. Literatürde alfa-Ketoglutarat (alfa-KG) üyesi proteinler için yaygın olan diğer bir analiz metodu ise bu enzimlerin yan ürün olarak oluşturduğu süksinik asitin tayin edilmesidir (42). Süksinik asit tayini için piyasada bulunan ve kullanımı kolay (spektrofotometrik metot) süksinik asit tayin kiti kullanılmıştır. Bu metod, dolaylı yoldan oluşan NAD’nin 340 nm’de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Kontrol olarak süksinik asit çözeltisi kullanılmakta ve buna göre standardizasyon da yapılabilmektedir. Her ne kadar bu metot direk olarak DNA demetilasyon aktivitesini bize vermeyecek olsa bile bu metot kullanılarak, elde edilen proteinin alfa-KG’yi dekarboksile edip etmediğini, yani proteinin doğru bir şekilde

katlanarak aktif olup olmadığını çok kısa bir sürede birçok örnek için test etmemize imkan vermektedir.

Bu metot yukarıda belirtilen SDS-PAGE analizinde (Şekil 5) istediğimiz ağırlıkta protein gösteren örneklerin saflaştırılmış hali (Nikel kolonu sonrası) için kullanılmış ama herhangi bir aktivite tespit edilememiştir. Kısaca, elde edilen saflaştırılmış protein örneği, substrat olarak 60 uM metillenmiş 6-mer'lik DNA oligosu (CGZGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-KG, 200 uM ferrous demir, 2 mM DTT ve 1 mM ATP ile 1-2 saat 37 C'de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı süksinik asit kiti komponentleriyle muamele edilmiştir. Enzimatik reaksiyon için toplam hacim 40 ul olup bunun 25 ul'sini saflaştırılmış enzim oluşturmuştur. Yapılan absorbans ölçümünde 340 nm'de tespit edilen absorbans değeri kontrol örnekleriyle neredeyse aynı değeri vermiştir.

TET1 proteinini deterjan yardımıyla çözünür hale getirme ve denatüre edip tekrar katlama yoluyla (denaturing/refolding) aktif enzim eldesi çalışmaları:

Birinci kısımda yapılan çalışmalarda değişik koşullarda protein ekspresyonu yapılmış, ancak her ne kadar protein ifadesi gözlense de, ifade edilen protein farklı ifade koşulları denenmesine rağmen hücrenin çöken kısmında kalmış (inklüzyon cisimciği) ve çözünen aktif protein elde edilememiştir. Bu nedenle, çöken proteinlerin çözünür ve aktif şekilde eldesine imkan veren iki farklı metot kullanılmıştır. Bunlardan ilki proteinler için uygun deterjan kullanarak proteinin çözünür fraksiyonda kalmasını sağlamak (44), ikincisi ise çökmüş proteini denatürasyon ajanları ile muamele edip çözmek ve daha sonra proteinin tekrar katlanmasını sağlamaktır (38).

4.2.1. Deterjan Yoluyla Proteinin Çözünür ve Aktif Hale Getirilmesi Çalışmaları

İlk uygulamada, çökmüş fraksiyonda bulunan proteinin en azından bir kısmının doğru katlanma ihtimali varsayılarak, bu kısmın çözünür tarafta kalması için lizis çözeltisinde deterjan kullanılmıştır. Denatüre etmeyen özellikteki deterjanlar literatürde çözünmeyen membran proteinlerinin solubilizasyonunda çokca kullanılmaktadır. Bunların en yaygınlarından olan Triton X-100 ifade edilen hücrelerin parçalanması için hazırlanan lizis tamponunun içine eklenmiştir (0.1 - 0.5 % oranında).

4.2.2. Denatürasyon/Tekrar Katlama Yoluyla Aktif ve Çözünür Enzim Eldesi Çalışmaları

Proteini çözünür ve aktif olarak elde etmek için uygulanan ikinci metotta ise proteinin üre veya guanidin-HCl gibi bir denatüre edici ajan vasıtasıyla tamamen denatüre edilerek proteinin tekrar katlanmasının sağlanması amaçlanmıştır. Proteinler çöke bile 8M üre veya 6M Guanidin-HCl varlığında tamamen denatüre olarak solüsyon içerisinde çözünür hale gelirler. Elbette, bu formdaki protein 3 boyutlu yapısını kaybetmiş ve düz bir amino asit zinciri halinde bulunmaktadır. Bir sonraki aşama proteinin uygun koşullar altında tekrar katlanmasını ve katlandıktan sonra da denature edici ajan yokluğunda suda çözünür halde kalmasını sağlamaktır (38).

TET1 proteini 8 M üre içeren denatürasyon tamponu içerisinde olabildiğince çözöldü ve çözölti santrifüj edilerek çözünmeyen hücre artıklarının ayrılması sağlandı. Bu santrifüj sonrası elde ettiğimiz süpernatant 8 M üre içerisinde denatüre şekilde çözünür hale gelmiş TET1 proteinimizi ve diğör çökmüş bakteriyel proteinleri içermektedir. Aşağıda yer alan jel görüntüsünde de (Şekil 7) proteinimiz süpernatant kısmında net bir şekilde görölmektedir.

Tekrar katlama (refolding) prosedürü farklı yollardan yapılabilir (38). Bu metotlardan ilki olan seyreltme metodu, denememizin az miktar proteinle yapılması sonucu başarılı olmamış ama ikinci metod olan diyaliz uygulanarak proteinin başarıyla katlanması sağlanmıştır. Diyaliz metodunu uygularken yüksek miktarda protein eldesi için 1 L'lik besiyerden protein ekspresyonu yapıldı. Hücreler lizis tamponu eklenmesi ve sonikasyon yoluyla parçalandıktan sonra santrifüj yoluyla çözönen kısım ile çöken (inklüzyon cisimciğı) kısmın ayrışması sağlanmıştır. Çöken kısım (inklüzyon cisimciğı) 8 M üre içerisinde denatüre edilmiştir. Daha sonra elde edilen yaklaşık 5 ml'lik denatüre olmuş protein karışımı Ni-afinite kolonuna yüklenerek denatüre koşullarda protein saflaştırması yapılmış ve saf olarak TET1 proteinimiz elde edilmiştir (jel görüntüsü). Saflaştırma aşamasında kullanılan bütün çözöltüler 8 M üre içermektedir ki bu da proteinlerin her aşamada çözünür kalmasını sağlamaktadır. Kolona histidin-etiketinden bağlanan TET1 proteinimize 250 mM imidazol eklenerek elüsyon yapılmıştır. Proteinimizin elüsyonu sahip olduğı hafif sarımtırak renkten de anlaşılmaktadır. Ayrıca protein olan fraksiyonların teyit edilmesi için Bradford çözöltisiyle protein analizi yapılmış, daha sonra da SDS-PAGE jeli yürütölmüştür

(Yukarıda verilen SDS-PAGE görüntüleri). Daha sonra tekrar katlama aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada 8 M üre içerisindeki saf protein önce 5 M üre içeren çözeltiye karşı diyaliz membranı içerisinde diyaliz edilmiştir. Çözelti geçişinin tam sağlanması ve homojenizasyon için yaklaşık 3-4 saat veya gece boyu 4 C’de beklenilmiştir. Daha sonra diyaliz membranı sırasıyla 2 M üre içeren ve üre içermeyen tampon çözeltilere koyularak protein çözeltisinin yavaş yavaş üreden arındırılması ve proteinin de tekrar katlanması sağlanmıştır. Üre içermeyen çözeltiyle yapılan diyaliz sonrası protein çökmemiş ve şeffaf bir çözelti olarak kalmıştır ki bu durum proteinin başarılı bir şekilde katlandığına işarettir. Tekrar katlanma tampon çözeltisinde askorbik asit kullanılmıştır. Bunun sebebi ise yapılan bir literatür çalışmasında aynı zamanda TET1’in koenzimi olan askorbik asitin proteine bağlandığı zaman konformasyonel bir değişikliğe sebep olduğunun ifade edilmesidir (30). Bu nedenle bu maddenin varlığının katlanmaya yardımcı olabileceğini düşündük.

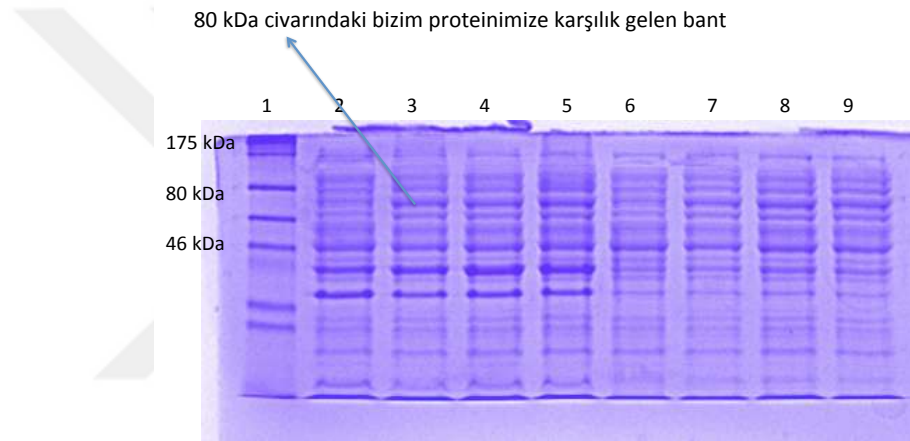
Aşağıdaki tabloda (Tablo 4.2.) uygulanan iki metodla farklı koşullardaki protein eldesi, saflaştırması ve aktivite analizlerinin özeti verilmektedir.

Tablo 4.2. Deterjan ve denatürasyon/tekrar katlama koşullarında protein eldesi. 1. ekspresyon 20 °C’de diğer ekspresyonlar ise 37 °C’de yapılmıştır. Bu kısımdaki protein ekspresyonunda hücre parçalanması için birinci kısımdaki donma/çözme döngüsü yerine sonikasyon kullanılmıştır.

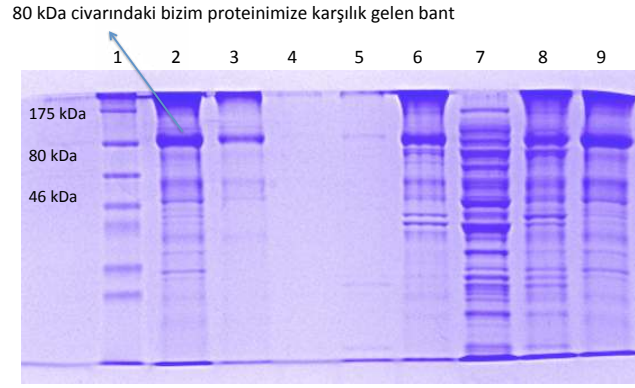
Ekspresyon	Koşullar:	Karakterizasyon uygulamaları:	Sonuçlar/Gözlemler
1. Ekspresyon (20 °C’de)	Lizis tamponuna % 0.5 Triton X-100 eklendi	-Jel yürütüldü -Saflaştırma yapıldı -HPLC ile aktivite analizi yapıldı	-Aktivite gözlenmedi
2. Ekspresyon	Lizis tamponuna % 0.4 Triton X-100 eklendi	-Jel yürütüldü -Lizattan HPLC yardımıyla direk aktivite analizi	-Aktivite gözlenmedi
3. Ekspresyon	Lizis tamponuna % 0.1 Triton X-100 eklendi	-Jel yürütüldü -Lizattan HPLC yardımıyla direk aktivite analizi -Denatürasyon/ Seyreltme yöntemiyle katlama	-Lizattan aktivite gözlenmedi -Katlanmış proteinden aktivite gözlenmedi
4. Ekspresyon / 1.kısım	1 L’lik besiyer hazırlandı Lizis tamponuna % 0.1 Triton X-100 eklendi	-Jel yürütüldü -Diyaliz metoduyla denatürasyon/katlama uygulandı	-Katlanmış proteinlerle HPLC yardımıyla aktivite analizi yapıldı -Katlanmış proteinlerle süksinik asit metoduyla aktivite analizi yapıldı -Aktivite gözlenmedi
4. ekspresyon / 2. kısım	1 L’lik besiyer hazırlandı Lizis tamponuna % 0.1 Triton X-100 eklendi	-Jel yürütüldü -Diyaliz metoduyla denatürasyon/katlama uygulandı -Thrombinle his-tag kesimi yapıldı	-Katlanmış ve thrombinle muamele edilmiş proteinlerle HPLC ve süksinik asit metoduyla aktivite analizi yapıldı -Süksinik asit metoduyla aktivite gözlenmedi

4.3. Protein Ekspresyonunun ve Protein Çözünürlüğünün SDS-PAGE Jel Elektroforez Yöntemiyle Tayini

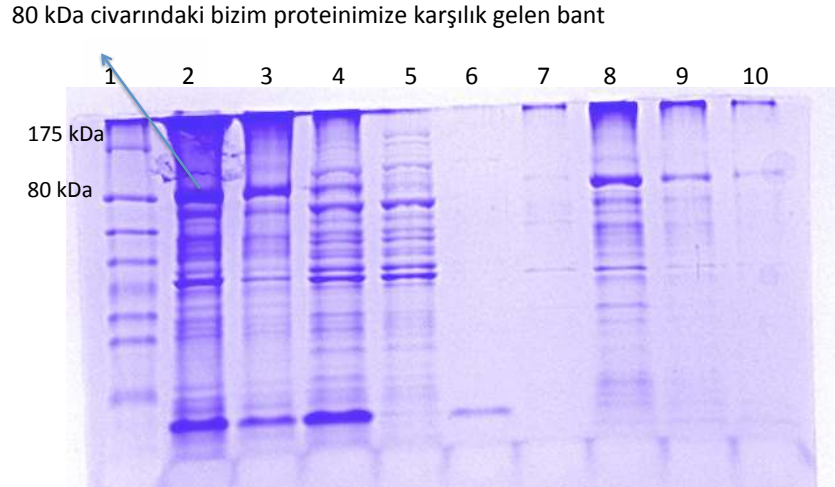
Hücreler lizis yapıldıktan ve/veya protein saflaştırıldıktan sonra proteinin ekspresyonunun ve hangi fraksiyonda olduğunun (çöken/çözünür) tespit edilebilmesi için çeşitli aşamalardan elde edilmiş örnekler SDS-PAGE jeli üzerinde yürütülmüştür. Hücre lizatı prosedürü sırasında her aşamada elde edilen örnekler (hücre lizatı, çözünen hücre lizat kısmı, çöken hücre lizat kısmı, saflaştırma sonrası elde edilen kısım gibi) SDS-PAGE analizi için saklanmıştır. Elde edilen jellerin son halleri görüntüleme cihazı vasıtasıyla fotoğraflanmıştır. Jel fotoğraflarının detayları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.7. Tablo 2’de yer alan birinci ekspresyondan elde edilen örnekler. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. Kontrol – bütün lizat, 3. Demir eklenmiş bütün lizat, 4. 0.2 mM IPTG bütün lizat, 5. 1.2 mM IPTG bütün lizat, 6. kontrol süpernatant, 7. Demir eklenmiş süpernatant, 8. 0.2 mM IPTG süpernatant, 9. 1.2 mM IPTG süpernatant. Hücre çoğaltılması IPTG’siz (kontrol), yüksek IPTG konsantrasyonu, düşük IPTG konsantrasyonu ve hücelere demir eklenmiş olarak 4 koşulda yapılmıştır.



Şekil 4.8. Tablo 2’de yer alan 4. ekspresyondan elde edilen örnekler (Kısım 1 - Denatüre koşullarda saflaştırma sonrası yürütülen SDS-PAGE jeli). Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. Denatüre koşullarda saflaştırma sonrası birleştirilmiş protein fraksiyonları (pool), 3. Fraksiyon 6, 4. Fraksiyon 1, 5. kolondan direk geçen (flowthrough) – yıkama esnasında, 6. kolondan direk geçen (flowthrough) – yükleme esnasında, 7. Lizat süpernatant, 8. Lizat çökelti – inklüzyon cisimciği, 9. İki numaralı örneğin aynısı (pool). Görüldüğü gibi denatüre koşullarda protein başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır ve 2 numaralı kolonda sadece 80 kDa civarındaki TET1 proteinimizin bandı baskındır. Ancak flowthrough ile beraber yükleme esnasında protein kaybı olduğu da görülmektedir (6 numaralı kolon).



Şekil 4.9. Tablo 2’de yer alan 4. ekspresyondan elde edilen örnekler (Kısım 2 - Denatüre koşullarda saflaştırma sonrası yürütülen SDS-PAGE jeli). Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. Bütün lizat çökeltisi (whole lysate pellet), 3. Ürede çözdükten sonra kalan çökelti, 4. Ürede çözünen kısım (kolona yüklenen), 5. kolondan direk geçen (flowthrough) – yıkama esnasında, 6. kolondan direk geçen (flowthrough) – yükleme esnasında, 7. fraksiyon 2, 8. fraksiyon 4, 9. fraksiyon 5, 10. fraksiyon 6. 8 numaralı kolonda yer alan ve saflaştırma sonucu elde edilen 4. elusyon fraksiyonunda protein bandımız baskın bant olarak gözükmemektedir. Diğer bantların da varlığı saflaştırmanın çok verimli olmadığını göstermektedir. Ancak tekrar katlama yapılacağı için saflık derecesine çok önem verilmemiştir. Ayrıca ürede çözdükten sonra kalan çökeltide

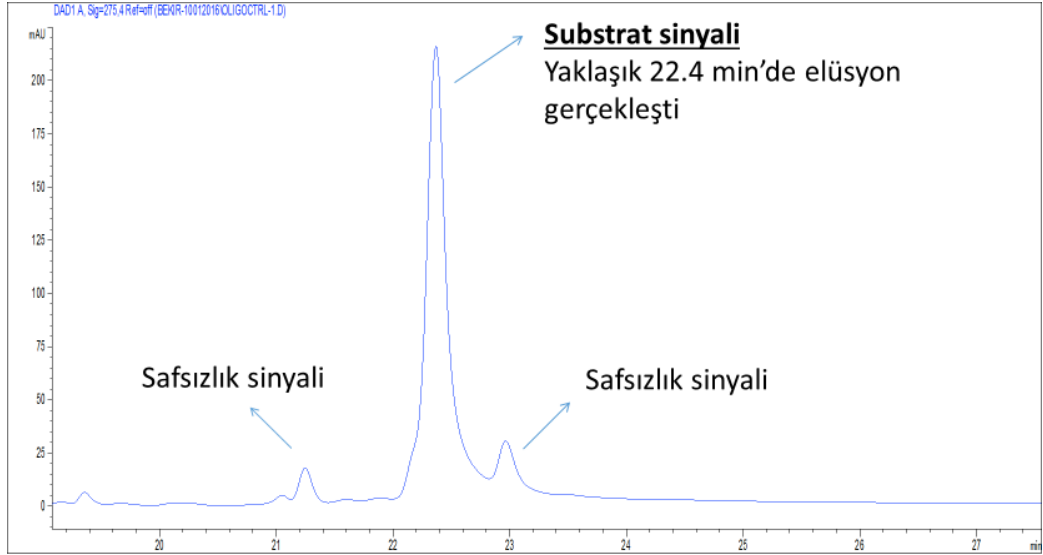
de (3 numaralı örnek) yoğun protein bandı gözlenmiştir ki bu da çözmenin çok verimli olmadığına işaret etmektedir.

4.4. Aktivite Analiz Reaksiyonları ve Ürün Analizi

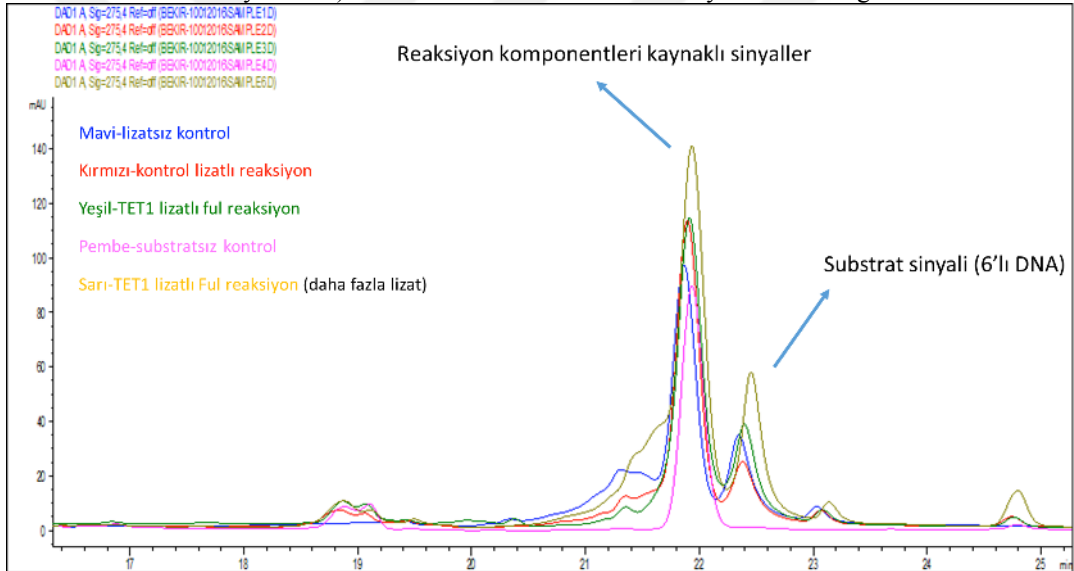
Bu kısımdaki çalışmalarımızda, elde edilen lizat direkt olarak aktivite analizinde kullanılmıştır. Her ne kadar suksinik asit aktivite ölçüm metodu lizat için uygun olmasa da, lizattan aktivite ölçümü HPLC cihazı ile yapılmıştır. HPLC ile direk olarak spesifik ürüne baktığımız için lizattan direk olarak aktivite analizine imkan vermektedir. Bu şekilde protein saflaştırmasına gerek kalmadan öncül bir analiz yapılabilmektedir. Ancak belli durumlarda protein saflaştırılması da yapılmıştır.

Protein eldesi sonucu yapılan SDS-PAGE analizleri çok miktarda TET1 proteininin hücre artıkları ile beraber çöktüğünü göstermiştir (inklüzyon cismi). Her ne kadar proteinin önemli kısmı çökmüş olsa da lizat içerisinde bir miktar çözünmüş protein olabilir. Ayrıca yeni çalışmada kullanılan Triton X-100 bir miktar proteinin aktif şekilde çözeltide kalmasını sağlamış olabilir. Bu amaçla protein saflaştırması yapmadan direk lizat üzerinde aktivite analizleri yapılmaya başlanmıştır. Kısaca, elde edilen saflaştırılmış protein örneği, substrat olarak 60 uM metillenmiş 6-mer'lik DNA oligosu (CGmCGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-KG, 200 uM ferrous demir, 2 mM DTT ve 1 mM ATP ile 1-2 saat veya gece-boyu 37 °C'de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı ya HPLC analizi için ya da süksinik asit analizi için aşağıda belirtildiği üzere hazırlanmıştır. Kontrol reaksiyonları da hazırlanarak substrat ve reaksiyon komponentlerinden kaynaklanan HPLC kromatogram pikleri de tespit edilmiştir (Sekil 10 ve 11). Aktivite analiz reaksiyonları tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı metot kısmında anlatıldığı şekilde HPLC analizi için hazır hale getirilmiş ve örneklerin HPLC ayırıştırma ile analizi yapılmıştır. HPLC cihazı ile absorbans 260 ve 275 nm'lerde takip edilmiş ve ayrıca ful spektrum da kaydedilmiştir.

Analizler sonrası elde edilen HPLC kromatogramları aşağıda verilmiştir (Şekil 11). Ürün oluşumunu gösteren bir pik'e (sinyale) rastlanmamıştır. Substrat piki kromatogramlarda belirtilmiştir.



Şekil 4.10. Kontrol amacıyla hazırlanan oligo substratına ait HPLC kromatogramı (sadece 6-merlik DNA substratı HPLC cihazına yüklendi). X-ekseni dakika biriminden elüsyon zamanını göstermektedir.

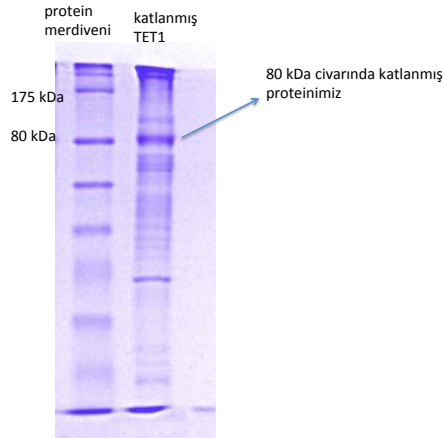


Şekil 4.11. Kontrol ve ful enzimatik reaksiyonlara ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması. Kontrol reaksiyonları ve ful reaksiyonlar arasında ürün oluşumunu gösterecek farklı bir sinyale rastlanmamıştır.

4.4.1. Tekrar Katlanmış (Refolded) Protein ile Aktivite Analizleri

Tekrar katlama sonucunda herhangi bir çökme olmamış ve protein çözünür şekilde elde edilmiştir. Asağıda verilen SDS-PAGE analizleri de bu tezimizi doğrulamaktadır (Şekil 12). Ama protein her ne kadar katlanıp çözelti içerisinde kalsa da hatalı katlandığı takdirde aktif olmayabilir. Bu nedenle tekrar katlanmış proteinle aktivite analizleri yapılmıştır. Bu amaçla elde edilen aktivite tamponu içerisindeki katlanmış protein, substrat olarak 60 uM metillenmiş 6-mer'lik DNA oligosu (CGmCGCG) veya 20-

merlik oligo, 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-ketoglutarat, 200 uM ferröz demir (Fe²⁺), 2 mM DTT ve 1 mM ATP ile 1-2 saat veya gece-boyu 37 °C’de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı ya HPLC analizi için ya da süksinik asit analizi için aşağıda belirtildiği üzere hazırlanmıştır. Yapılan aktivite analizlerine bir aktiviteye rastlanmamıştır. Her ne kadar protein katlanmış olsa da aktivite gözlenememesi proteinin doğru katlanmadığını veya aktiviteye engel başka bir sebebin varlığına işaret etmektedir.



Şekil 4.12. Tekrar katlama sonrası SDS-PAGE jeli (Tablo 2’de yar alan 4.ekspresyon, kısım 2). Suda çözünen katlanmış örneğimizde (denatüre edici ajan olmadan) saf bir halde TET1 bandı gözükmektedir. Bu durum katlanmanın başarıyla gerçekleştiğini teyit etmektedir.

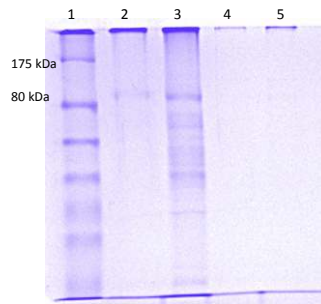
4.5. Katlanmış Proteinden Thrombin Vasıtasıyla Histidin-Etiketinin Kopartılması

Her ne kadar proteinimiz diyaliz metodu uygulandığında çökmeden katlanmış gözüксе de katlanmış protein ile yapılan analizlerde aktivite gözlenememiştir. Bunun nedenlerinden birisi proteinde saflaştırma amcıyla bulunan histidin-etiketi olabilir. Proteinimizin N-terminaline bağlı olan bu kısım (thrombin kesim dizisiyle beraber) eğer ki TET1’in aktif bölgesine yakın yer alıp aktif bölgeye substratların bağlanmasını engelleme, ürünün dışarıya salınımına engel olma gibi bir durum oluşturuyorsa, bu etiketin kesilmesi proteinimizi aktif hale getirebilir (Şekil 13 – sarı işaretli kısım histidin etiketini de içeren N-terminal eklentisini içermektedir). Genimizin dizaynında N-terminale bağlı olan histidin etiketi thrombin kesim dizisi aracılığıyla TET1’in katalitik dizisine bağlıdır. Bu şekilde thrombin enzimi kullanılarak histidin-etiketi proteinimizden ayrılabilir. Bu amaçla tekrar katlanma sonucu elde ettiğimiz proteini ”Thrombin Cleavage Kit”le birlikte gelen thrombin-agarose parçalarıyla kitte belirtilen koşullarda muamele ettik. Elde edilen proteinden aktivite analizi yapıldı. Her ne kadar

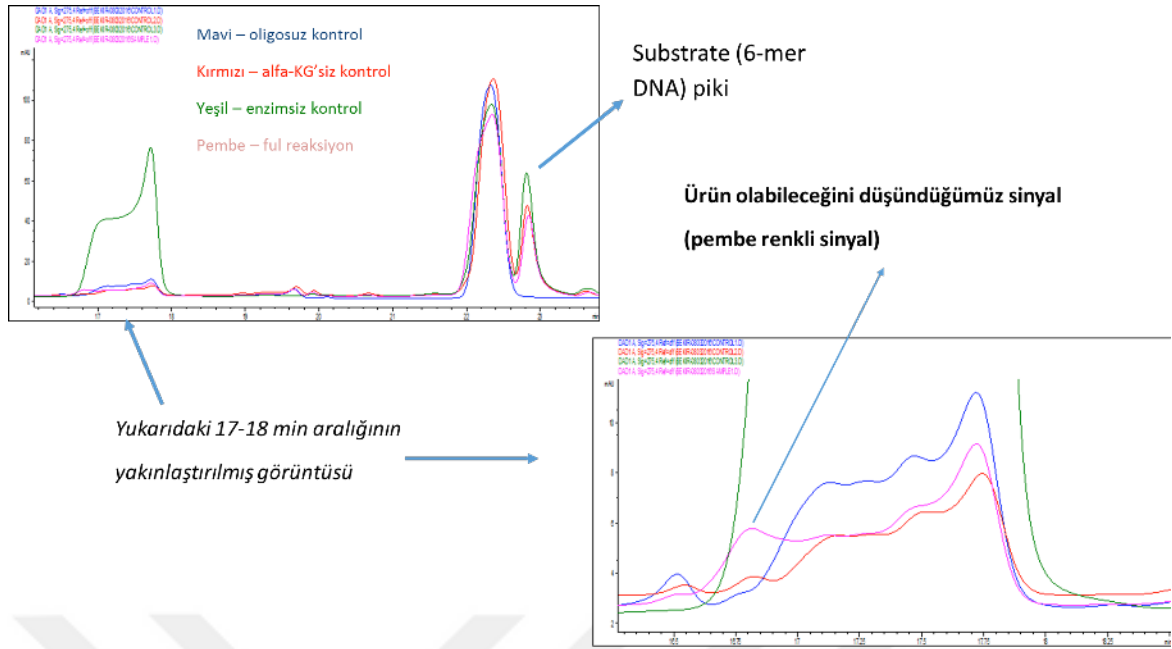
SDS-PAGE üzerinde protein bandı (Şekil 14) tespit edilemese de, küçük miktarda da olsa aktif proteinin olma ihtimaline karşın aktivite analizleri yapıldı. Süksinik asit metodu kullanılarak herhangi bir aktivite gözlenemedi, ancak HPLC analizinde ürün olabileceğini düşündüğümüz küçük de olsa bir pik'e rastlandı (Şekil 15). Bu sonuç bize denatürasyon/tekrar katlama metodunun detaylı şekilde optimizasyonu ile yüksek miktarda aktif protein elde edilebileceği konusunda ipucu sunmaktadır.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEAAPCDCDGGTQKEKGPYYTHLGAGPSVAAVRELM
 ETRFGQKGKAIRIEKIVFTGKEGKSSQGCPVAKWVIRRSGPPEKLIQVLRERVDHHCST
 AVIVVLILLWEGIPRLMADRLYKELTENLRYSYSGHPTDRRCTLNKKRTCTCQGIDPKTC
 GASFSFGCSWSMYFNGCKFGRSENPFRKRLAPNYPLHNYKRTGMSSEGSVDVKTGWI
 IPDRKTLISREEKQLEKNLQELATVLAPLYKQMAPVAYQNQVEYEEVAGDCRLGNEEG
 RPFSGVTCCMDFCASHKDIHNMHNGSTVVCTLIRADGRDTNCPEDQLHVLPLYRL
 ADTDEFGSVEGMKAKIKSGAIQVNGPTRKRRLRFTEPVPRCGKRAKMKQNHKSGSH
 NTKSFSSASSTSHLVKDESTDFCPLQASSAETSTCTYSKTASGGFAETSSILHCTMPGA
 HSGANAAAGECTGTVQPAEVAAPHQLPTADSPVHAEPLTSPSEQLTSNQSNQQLPL
 LSNSQKLASCQVEDERHPEADEPQHPEDDNLPLQLDEFWSDSEEIYADPSFGGVAIPI
 HGSVLIECARKELHATTSLRSPKRGVPFRVSLVFYQHKSLNKPNGHGF DINKIKCKCKKV
 TKKKPADRECPDVSPEANLSHQIPSRVASTLTRDNVTVSPYSLTHVAGPYNRWV
StopCodon

Şekil 4.13. TET1 katalitik birim amino asit dizisi. Sarı işaretli kesim N-terminal his-tag ve thrombin kesim lokasyonunu içeren eklenti göstermektedir.



Şekil 4.14. Tekrar katlama sonrası SDS-PAGE jeli (Tablo 2’de yer alan 4.ekspresyon, kısım 2). Thrombin ile muamele sonrası SDS-PAGE jeli üzerinde TET1 örnekleri. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. Thrombin öncesi katlanmış protein, 3. Thrombinle muamele sonrası çöken protein kısmı, 4. Thrombinle muamele sonrası çözünen (süpernatant) kısım, 5. Çözünen + çöken kısım. Yukarıda anlatıldığı gibi thrombin muamelesi sonucu proteinin önemli kısmı çökmüş ve süpernatanda bu koşullarda protein bandı gözlenmemiştir.



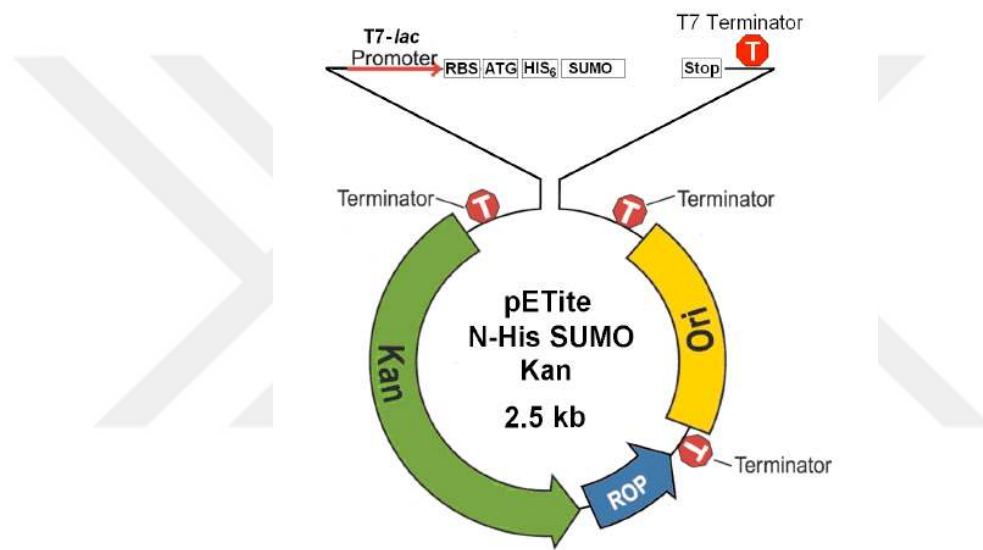
Şekil 4.15. Tekrar Katlama sonrası thrombinle muamele edilmiş enzim ile yapılan aktivite analizi. Kontrollerle karşılaştırıldığında ful enzimatik reaksiyonda küçük de olsa farklı bir sinyale rastlanmıştır. Bu sinyal TET1 enzimimiz tarafından hidroksile edilmiş metil sitozin türevi olabilir.

4.6. Aktif Enzim Elde Edilmesi Amacıyla SUMO Füzyon Proteinin Kullanılması

TET proteinimizi önceki kısımlarda uyguladığımız metodlarla yüksek aktiflikte elde edemediğimiz için alternatif olarak çözünürlüğü artırıcı bir proteinle füzyonlanmış halde ifade etmeyi düşündük. Literatürde çözünmeyen proteinlerin (inklüzion cisimciği oluşturan) çözünür şekilde bakteriyel ifadesi için geliştirilmiş çeşitli füzyon protein sistemleri bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlarından birisi ise SUMO proteiniyle yapılan füzyonlardır. SUMO yüz aminoasitten oluşan küçük bir proteindir ve mayadaki SMT3 gen ürününden türetilmiştir (45). SUMO vektörü üretilmesi istenilen hedef proteinin hem ekspresyonunu hem de çözünürlüğünü arttıran önemli bir etkidir. SUMO vektörünün bir başka özelliği olan N terminalindeki 6 adet histidin aminoasidi bulundurması da hedef proteinin tespiti ve saflaştırılması aşamasında büyük kolaylık sağlamıştır. İstenilmesi durumunda 6xHis-SUMO eklentisi SUMO proteaz ile tam olarak kesilebilmektedir. Bunun yanında vektörün kanamaysın dirençli olması protein üretimi esnasında her türlü kontaminasyonun engellenmesine olanak vermiştir. En önemlisi ise üretimi yapılacak olan TET enzimi ile kinetik çalışmalar yapılabilmesi için proteinin orjinal 3 boyutlu yapısında ve çözünür halde elde etmemizi sağlaması açısından SUMO vektörü seçilmiştir. Bunun yanında, her ne kadar detayları ve hangi miktarda protein elde edildiği belirtilmese de, SUMO proteiniyle

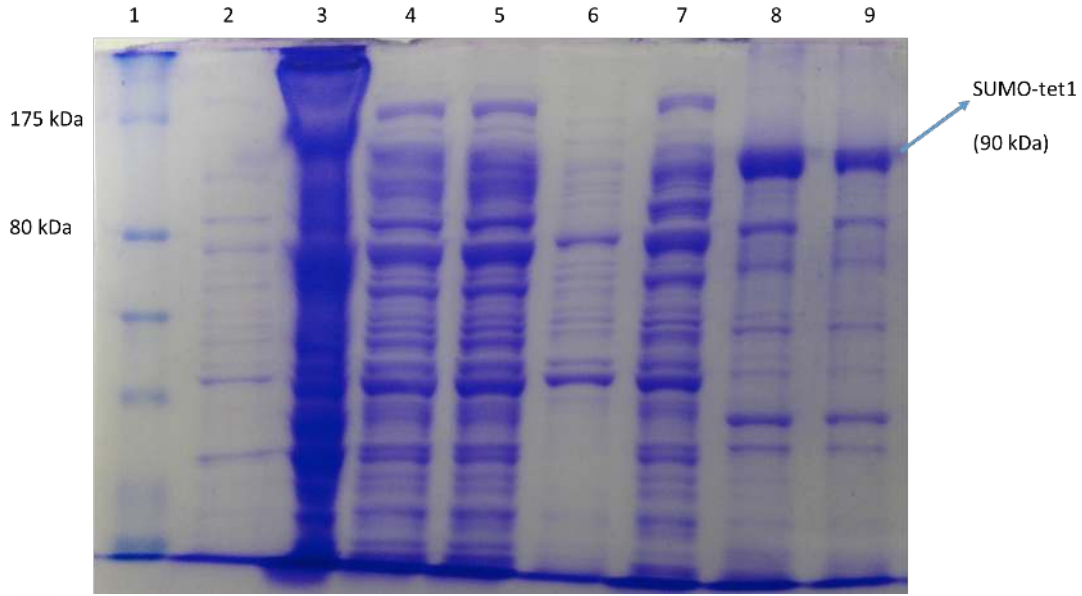
yapılan füzyon sonucu TET1 proteininin bakteriyel ekspresyonu ile aktif enzim elde edildiği yakın zamanda yayınlanan bir iki çalışmada ifade edilmistir.

SUMO-TET1 füzyon proteinin ekspresyonunu sağlayacak olan plasmid, laboratuvarımızdaki diğer bir yüksek lisans öğrencisi tarafından hazırlanmıştır. TET1 genimizi SUMO proteinini kodlayan gene C-terminalinden bağlı şekilde içeren bu SUMO ekspresyon vektörü, pET ekspresyon vektörüne benzer şekilde *E.coli* BL21(DE3) hücreleri içerisinde ifade edilmistir. Aynı zamanda C-terminalinde 6X-Histidin etiketi de bulunmaktadır (Şekil 16).



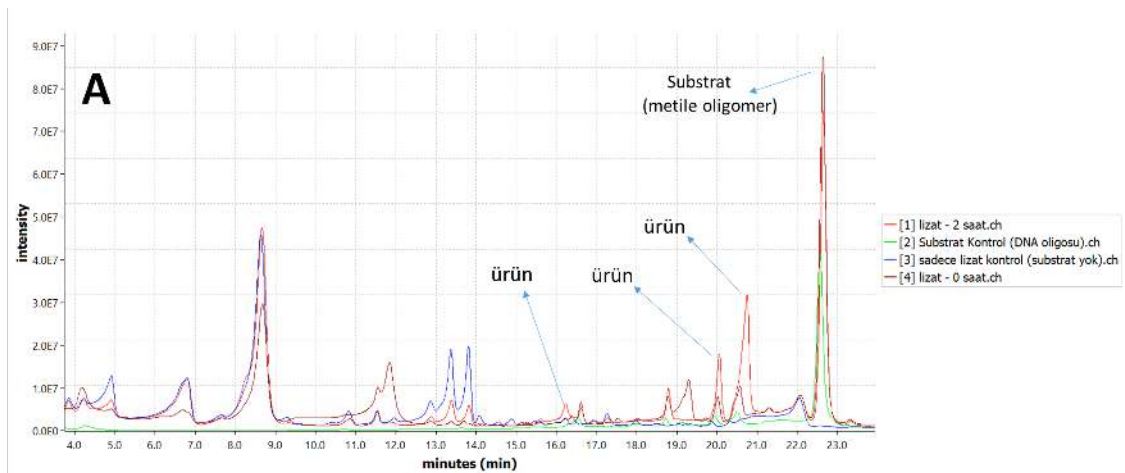
Şekil 4.16. SUMO ekspresyon vektörünün ayrıntıları ve genimizin takılacağı kesim.

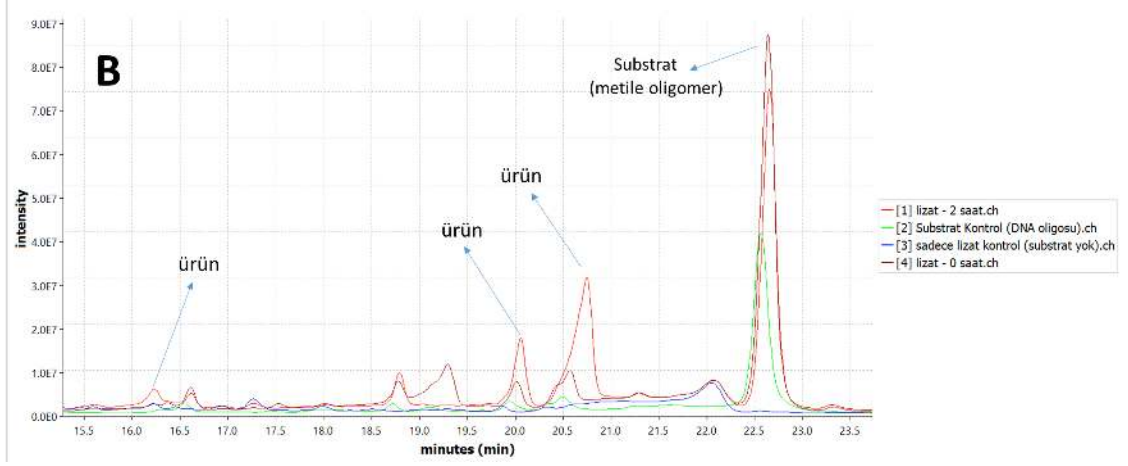
Bu plazmid, BL21(DE3) hücrelerine transform edildikten sonra protein ekspresyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Aşağıdaki jel örneğinde görüldüğü gibi çözünür fraksiyonda başarılı bir şekilde protein elde edilmiş ve Ni-afinite kolonunda saflaştırma da başarılı bir şekilde yapılmıştır.



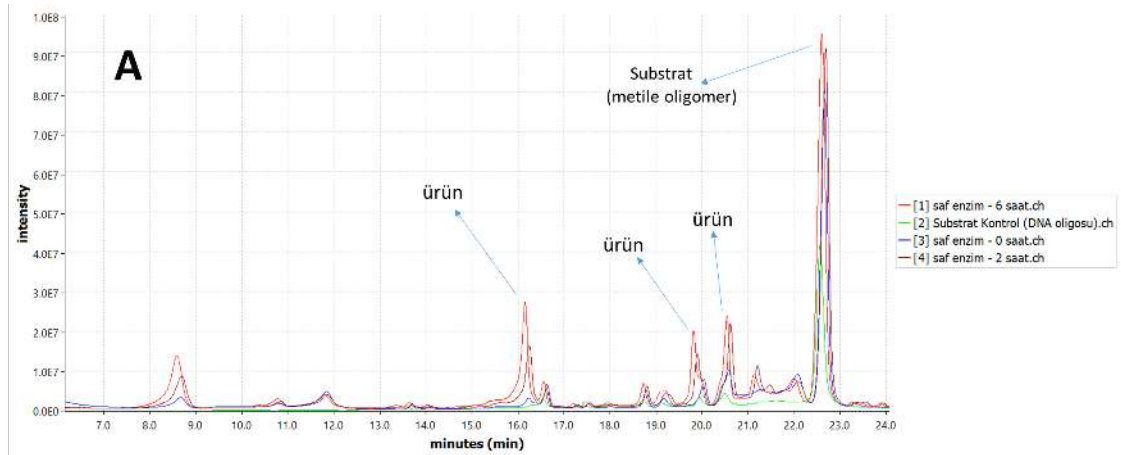
Şekil 4.17. SUMO-TET1 füzyon protein ekspresyonu ve saflaştırması sırasında alınan örneklerin SDS-PAGE jeli üzerinde yürütülmüş hali. Her kolon numarasına karşılık gelen örnekler şu şekildedir: 1. Marker – protein merdiveni, 2. IPTG indüksiyonu öncesi hücre lizati, 3. IPTG indüksiyonu sonrasında hücrelerin lizisi sonrası elde edilen çöken kısım (cell pellet), 4. IPTG indüksiyonu sonrasında hücrelerin lizisi sonrası elde edilen temiz süpernatant (clear lysate), 5. Kolondan direkt geçen (flowthrough) – yıkama esnasında, 6. Kolondan direkt geçen (flowthrough) – yükleme esnasında, 7. Saflaştırma işlemindeki erken elüsyon gösteren 4 numaralı fraksiyon (kontrol amaçlı), 8. Saf fraksiyonların kombine edilmiş hali (pool). Özellikle Ni-kolunu saflaştırması yüksek molekül ağırlıklı bölgede görülen koyu bant, SUMO-TET1 proteinimizin ağırlığı olan 90 kDa ile uyumludur ve proteinimizin başarıyla ifade edilip saflaştırıldığını göstermektedir.

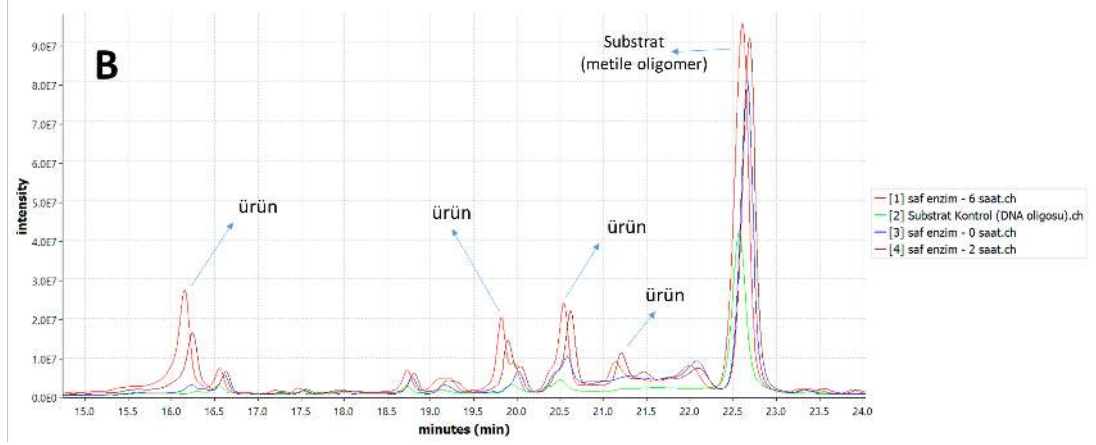
Çözünür şekilde SUMO-TET1 füzyon proteini eldesinden sonra aktivite analizlerine geçilmiştir. Önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde aktivite reaksiyonları hazırlanmış ve HPLC ile ürün analizi yapılmıştır. Aşağıda HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlar gösterilmiştir. Görülen yeni pikler aktif bir şekilde enzim elde edildiğini göstermektedir. Aktivite analiz reaksiyonlarının detayları şekillerin altındaki açıklamalarda verilmiştir.



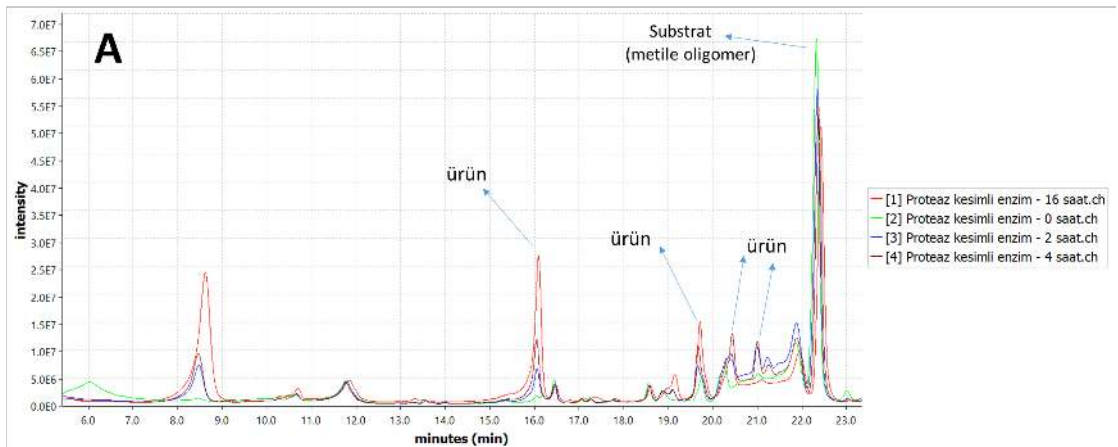


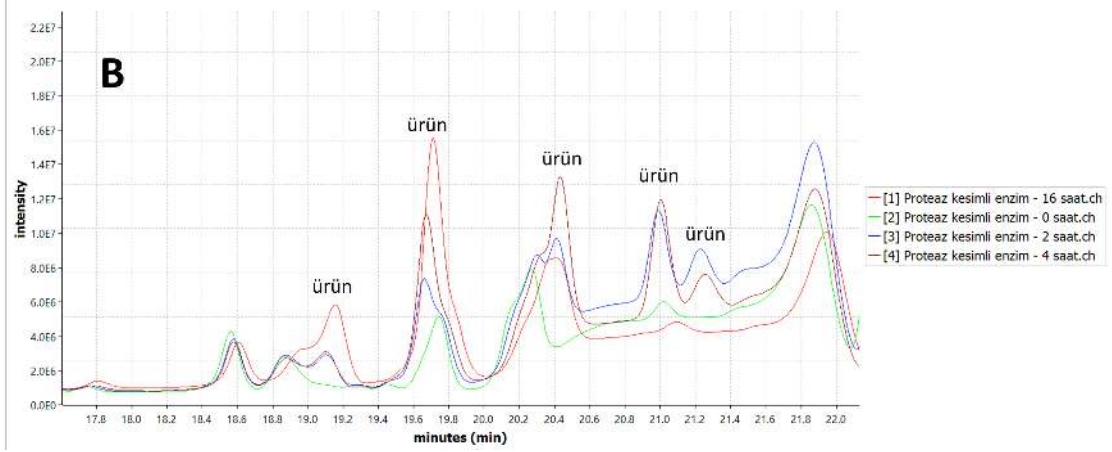
Şekil 4.18. SUMO-TET1 füzyon protein ekspresyonu yapılan hücrelerin parçalanması sonucu elde edilen lizat (süpernatant kısmı) ile yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları. A) 1 litrelik besiyerde hazırlanan çöktürülmüş hücreler 20 ml lizat tamponu içerisinde çözülmüş ve bu çözeltiden (santrifüj sonrası süpernatant kısmı) 15 ul'lık lizat her bir aktivite analiz reaksiyonuna eklenmiştir. Her bir reaksiyonun toplam hacmi 40 ul olup, ayrıca substrat olarak 30 uM metillenmiş 6-mer'lik çiftli sarmal DNA oligosu (CGmCGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-ketoglutarat, 200 uM ferrous demir (Fe-II), 2 mM DTT ve 1 mM ATP içermektedir. Reaksiyonlar kromatogramların yanında belirtilen zaman aralıklarında 37 °C'de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı 120 ul metanol ile muamele edilmiş ve toplam 100 ul HPLC cihazına yüklenmiştir. 0 saat şeklinde ifade edilen örneğe önce metanol daha sonra ise substrat eklenmiştir. Kullanılan tampon çözelti; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9 ve 100 mM NaCl içermektedir. Kromatogram üzerinde metile DNA oligomer substratı ve ürün olduğu düşünülen yeni sinyaller gösterilmiştir. Enzim reaksiyonunun 5-hmC, 5-fC ve 5-caC ürünleri (ara ürünleri) oluşturması ve ayrıca DNA oligomerinin tekli ve çiftli sarmal şeklinde çeşitli kombinasyonlarının oluşabileceği düşünüldüğünde birçok ürün sinyalinin oluşması beklenmektedir. B) Ürünlerin yoğun şekilde bulunduğu 15-23 dakika bölgesinin A kromatogramından büyütülmüş hali.





Şekil 4.19. Saflaştırılmış SUMO-TET1 füzyon protein ile yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları. A) 1 litrelik besiyerden ifade edilen SUMO-TET1 proteini saflaştırıldıktan sonra yaklaşık 5 ml’lik toplam saf protein hacminden 15 ul’lık kısmı her bir aktivite analiz reaksiyonuna eklenmiştir. Her bir reaksiyonun toplam hacmi 40 ul olup, ayrıca substrat olarak 30 uM metilenmiş 6-mer’lik çiftli sarmal DNA oligosu (CGmCGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-ketoglutarat, 200 uM ferrous demir (Fe-II), 2 mM DTT ve 1 mM ATP içermektedir. Reaksiyonlar kromatogram üzerinde belirtilen zaman aralıklarında 37 °C’de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı 120 ul metanol ile muamele edilmiş ve toplam 100 ul HPLC cihazına yüklenmiştir. 0 saat şeklinde ifade edilen örneğe önce metanol daha sonra ise substrat eklenmiştir. Kullanılan tampon çözelti; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9 ve 100 mM NaCl içermektedir. Kromatogram üzerinde metile DNA oligomer substratı ve ürün olduğu düşünülen yeni sinyaller gösterilmiştir. Enzim reaksiyonunun 5-hmC, 5-fC ve 5-caC ürünleri (ara ürünleri) oluşturması ve ayrıca DNA oligomerinin tekli ve çiftli sarmal şeklinde çeşitli kombinasyonlarının oluşabileceği düşünüldüğünde birçok ürün sinyalinin oluşması beklenmektedir B) Ürünlerin yoğun şekilde bulunduğu 15-23 dakika bölgesinin A kromatogramından büyütülmüş hali.





Şekil 4.20. SUMO-TET1 füzyon proteininden SUMO kısmının kesilmesi amacıyla saflaştırılmış SUMO-TET1 proteininin SUMO ekspres proteaz ile muamele edilmesi sonrası yapılan aktivite reaksiyonlarının HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramları (proteaz muamelesi sonrası kesim reaksiyonu karışımı direk olarak kullanılmış ve herhangi bir ayrıştırma yapılmamıştır). A) 1 litrelik besiyerden ifade edilen SUMO-TET1 proteini saflaştırıldıktan sonra yaklaşık 5 ml'lik toplam saf protein hacminden proteaz ile muamele edilmiş 15 ul'lik kısmı aktivite analiz reaksiyonlarına eklenmiştir. Her bir reaksiyonun toplam hacmi 40 ul olup, ayrıca substrat olarak 30 uM metillenmiş 6-mer'lik çiftli sarmal DNA oligosu (CGmCGCG), 2 mM askorbik asit, 2 mM alfa-ketoglutarat, 200 uM ferrous demir (Fe-II), 2 mM DTT ve 1 mM ATP içermektedir. Reaksiyonlar belirtilen zaman aralıklarında 37 °C'de inkübe edildikten sonra bu reaksiyon karışımı 120 ul metanol ile muamele edilmiş ve toplam 100 ul HPLC cihazına yüklenmiştir. Kullanılan tampon çözelti; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9 ve 100 mM NaCl içermektedir. Kromatogram üzerinde metile DNA oligomer substratı ve ürün olduğu düşünülen yeni sinyaller gösterilmiştir. Enzim reaksiyonunun 5-hmC, 5-fC ve 5-caC ürünleri (ara ürünleri) oluşturması ve ayrıca DNA oligomerinin tekli ve çiftli sarmal şeklinde çeşitli kombinasyonlarının oluşabileceği düşünüldüğünde birçok ürün sinyalinin oluşması beklenmektedir. B) Ürünlerin yoğun şekilde bulunduğu 18-22 dakika bölgesinin A kromatogramından büyütülmüş hali.

SUMO-TET1 füzyon proteininden lizat ve saflaştırılmış protein ile yapılan aktivite analizlerinin HPLC kromatogramları (Şekil 18 ve 19) incelendiğinde, beklediğimiz bölgede zamana bağlı yeni sinyallere rastlanmaktadır. Özellikle 16.2 dakika, 20.0 dakika ve 20.8 dakika civarında gözlenen ve zamana bağlı olarak artan sinyaller, yeni ürün ve ara ürün oluşumuna işaret etmektedir. Ayrıca şekil 19 ve 20'de, 21.0 ve 21.2 dakika civarında da küçük de olsa zamana bağlı oluşan iki sinyal göze çarpmaktadır. Bu iki sinyalin özelliği orta zaman aralığında maksimuma ulaşip geç zaman aralığında azalmalarıdır. Ayrıca bu şekilde zamana bağlı artıp azalma şekil 20'deki 20.4 dakika sinyalinde de açıkça görülmektedir (Özellikle şekil 20'deki 4 ve 16 saat kromatogramları karşılaştırıldığında). Bu durum bu sinyallerin 5-hmC ve 5-fC'e veya bunların oluşumunda yer alan geçici ara ürünlere ait olabileceğine işaret etmektedir. 16.0 ve 19.7 dakika civarındaki sinyaller ise sürekli artış göstermekte olduğundan 5-caC ve türevi olan son ürün yapılarına ait olma ihtimali yüksektir. Detaylı analizlerimiz bütün kromatogramlarda 8.5 dakika civarında gelen sinyalin lizat veya protein kaynaklı olduğunu göstermektedir. Her ne kadar TET1 reaksiyonunda iki ara ürün (5-hmC, 5-fC)

ve bir son ürün (5-caC) bekliyor olsak da, bazı kromatogramlarda 6'ya kadar yeni sinyal olduğu gözlenmiştir (Şekil 20). Bu sinyallerden bazıları ara ürün ve ürün oluşumu esnasında oluşabilecek geçici ara ürünler (5-hidroperoksi metilsitozin gibi) veya DNA oligomerinin tekli ve çiftli sarmal şeklinde çeşitli kombinasyonlarının oluşturabileceği moleküllerdir.

Her ne kadar yeni sinyallerin oluşumu TET1 aktivitesine işaret etse de, uzun reaksiyon sürelerine rağmen substrat tamamen tükenmemiş olmakla beraber ürün sinyalleri de düşük seviyede kalmıştır (Şekil 19). Düşük aktivitenin, SUMO proteinin TET1'e füzyonlanmış olmasından dolayı olabileceği düşünülerek, SUMO proteaz enzimi vasıtasıyla füzyon proteinin kesimi sağlanarak aktivite analizi tekrar yapılmıştır (Şekil 20). Ancak aktivite miktarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Aktivitenin bu şekilde düşük kalmasının başka nedenleri olabilir. Örneğin, saflaştırma sırasında aktif bölgeye bağlanan hücre kaynaklı DNA oligomerleri katalizi inhibe ediyor olabilir veya kullandığımız DNA oligomer substratındaki safsızlıklar inhibisyona yol açıyor olabilir. İdeal aktivitenin elde edilmesi bu tür olasılıkların göz önüne alınarak detaylı optimizasyon çalışmalarının yapılmasını gerektirmektedir. Ayrıca kütle spektroskopisi yardımıyla her bir sinyalin tam olarak hangi ara ürün veya ürüne karşılık geldiğinin analizi, üzerinde yoğunlaşılması gereken sinyaller hakkında önemli ipuçları sunarak optimizasyonu kolaylaştıracaktır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmamızda farklı koşullarda TET1 proteininin katalitik bölgesinin aktif ve çözünür bir şekilde ekspresyonuna çalıştık. TET proteini izoformları tıbbi açıdan önemli, epigenetik profili etkileyen ve yaklaşık 8 sene önceki keşfiyle de epigenetik konusuna bambaşka bir bakış açısı getirmiş olan enzimlerdir (14),(16). Bu açıdan bu enzimlerin mekanizma ve kinetikleri açısından incelenmeleri fizyolojik etkilerine ve çalışma prensiplerine ışık tutması açısından önem arz etmektedir. Bu şekilde bir inceleme, çözelti içerisinde saflaştırılmış enzim ile yapılacak çalışmalarla mümkündür. Bunun için ise yüksek miktarda aktif rekombinant protein eldesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, TET1 protein ekspresyonunun en verimli bir şekilde aktif protein vermesi için farklı ekspresyon koşulları denenmiştir. Yine Nikel kolonu ile protein saflaştırması metodu başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ancak üretilen protein çözünmeyen kısımda kaldığı ve/veya aktif olmadığı için aktif bir şekilde saf protein elde edilememiştir. Deterjan ekleme ve denatürasyon/katlama metodlarıyla yeni denemeler yapılmıştır. Her ne kadar deterjan eklemeye bir sonuç alınamasa da, denatüre edip tekrar katlama çalışır gözükmemektedir. Ancak enzimin katlandıktan sonra aktifliği henüz teyit edilememiştir. SDS-PAGE jel görüntüleri proteinimiz denatüre koşullarda başarıyla saflaştırıldığını ve katlandığını göstermektedir.

Yukarıda anlatıldığı üzere ekspresyon sonrası çökmüş halde (inklüzyon cisimciği) elde edilmiş TET1 proteini 8 M üre içerisinde çözüldükten sonra başarıyla katlanması sağlandı. Denatüre edilmiş 8 M üreli çözeltiden üre uzaklaştırılınca temiz ve şeffaf bir çözelti elde edildi ki bu durum proteinimizin katlandığını göstermektedir. Her ne kadar proteinin aktifliği henüz kesin olarak teyit edilemese de, thrombin ile kesim sonrası proteinimizin aktif olabileceğine dair bir sinyal HPLC’de gözlenmiştir.

Özellikle ”inklüzyon cisimciği” olarak protein ifadesi bakteri hücrelerinden yüksek miktarlarda protein eldesine imkan vermektedir (38). Bu çalışmamızda TET1 proteini katalitik bölgesinin ” inklüzyon cisimciği” kısmından denatürasyon/tekrar katlama yoluyla çözünür bir şekilde katlanabilmesinin gösterilmesi, bu enzimin çok miktarda elde edilmesi için literatürde olmayan önemli bir yöntem sunacaktır. Bunun için bu

yöntem üzerinde optimizasyon çalışmaları yapılarak tam aktif enzim eldesi çalışmalarına ağırlık verilmelidir. Özellikle proteinin önemli kısmının thrombin muamelesi sırasında çökmesi düşük aktivitenin sebebi olabilir. Diğer bir ihtimal de, proteinimizin histidin etiketi ve ona bağlı ekstra dizi tarafından kararlı halde tutulması ve bu dizi kesildiği anda proteinin çökmeye başlamasıdır. İleriki çalışmalarda özellikle protein denatürasyonu ve katlanmasının farklı aşamalarında thrombin muamalesinin yapılması ve bu aşamalarda proteinin katlanmasına yardım edecek askorbik asit gibi maddelerin eklenmesi de düşünülmelidir (30).

TET proteinimizi normal protein ifadesi, deterjan ve denatürasyon/tekrar katlama yollarıyla istediğimiz aktiflikte elde edemediğimiz için literatürde bu tür proteinleri ifade etmenin değişik yollarını araştırdık. En güçlü alternatif metodlardan birisi olan füzyon proteini oluşturmayı seçtik. Kısaca, bu metod çözünme problemi olan proteinlerin yüksek çözünürlükteki proteinlere bağlanmasıyla oluşturulan füzyon proteinine dayanmaktadır. Genellikle küçük boyutta ve suda çözünürlüğü yüksek olan bu füzyon proteinleri, ifade etmek istediğimiz proteine genetik yollardan bağlanarak bakteri içerisinde bitişik şekilde ifadeleri sağlanmaktadır. Literatürde çözünmeyen proteinlerin bakteriyel ifadesi için geliştirilmiş çeşitli füzyon protein sistemleri bulunmaktadır. SUMO proteiniyle yapılan füzyonlar en yaygın olan füzyon sistemlerinden biridir (45).

Çalışmalarımızda, SUMO-TET1 proteininin başarılı bir şekilde bakteri hücreleri içerisinde ifadesini gerçekleştirdik. Hücre lizati ve saflaştırılmış proteinle yaptığımız zamana bağlı aktivite reaksiyonlarını HPLC cihazı ile analiz ettiğimizde, kromatogramlar üzerinde ara ürün ve ürün oluşumuna işaret eden bir çok yeni sinyale rastladık. Önceki denemelerde görmediğimiz bu sinyaller, füzyon sistemimizin başarılı bir şekilde aktif TET1 ürettiğini göstermiştir. Özellikle bazı sinyallerin zamana bağlı artıp daha sonra azalmaları bu sinyallerin ara ürünlere ait olduğunu teyit etmektedir. Sinyallerin elüsyon zamanları ve substrat olan DNA oligomerinin elüsyon zamanı (5-mC içeren 6'li oligomer) önceki literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, bu sinyallerin en azından bir kısmının 5-hmC, 5-fC ara ürünleri ve 5-caC son ürününe ait olduğu net bir şekilde görülmektedir (41). Bazı analizlerde 5-6 farklı ürüne ait olabilecek sinyal görüldüğü olmuştur. Fazla miktarda sinyal görülmemesinin iki ana sebebi olabilir. Bunlardan birincisi, kararlı ara ürünler 5-hmC ve 5-fC ile son ürün 5-caC

oluşumunda geçici olarak oluşan başka ara ürünlerin varlığıdır. Mesela, 5-hmC oluşumu, 5-hidroperoksi metilsitozin ara ürünü üzerinden olabilir ki bu ara ürünün varlığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (46). İkinci sebep ise, substrat olarak kullandığımız 5-mC içeren DNA oligomeri reaksiyon koşullarında çift sarmaldır ve her iki sarmal da 5-mC içermektedir. Reaksiyon esnasında, sarmallardan birindeki 5-mC ile diğer sarmaldaki 5-mC farklı seviyelerde katalize uğramış olabilir. Ayrıca reaksiyon esnasında veya analize hazırlamada DNA substratın bir kısmı tekli sarmal halinde de bulunabilir. Bunların sonucu farklı sinyaller gözlemlemiş olabiliriz.

SUMO-TET1 füzyon protein ile aktiviteyi tespit etmiş olsak da, zamana bağlı aktivite seviyeleri tam olarak istediğimiz düzeyde değildi. Uzun zaman inkübasyonlarından sonra bile önemli miktarda substratın harcanmadan durduğunu tespit ettik. Bunun oluşumuna bir sebep olarak füzyon proteininin SUMO kısmının TET1 kısmının aktivitesini azaltabileceğini düşündük. Örneğin, SUMO kısmı TET1'in substrat giriş kısmını kapatıyor olabilir ve bu yüzden aktivitemiz düşük kalmış olabilir. Bu nedenle SUMO proteaz enzimiyle füzyon proteinin kesimini sağlayarak aktivite analizini denedik ancak aktivite miktarında önemli bir değişiklik gözlemlemedik. Bu şekilde düşük aktivite elde etmemizin başka sebepleri de olabilir. Proteinimizin inhibisyonuna neden olan moleküllerin reaksiyon içerisinde bulunması olası nedenlerdendir. DNA oligomer substratımızdaki herhangi bir safsızlık veya protein saflaştırma sırasında bakteri hücrelerinden gelen DNA parçalarının enzimin aktif merkezini doldurarak substrat girişini engellemesi bunlardan bazılarıdır. Ayrıca reaksiyonun diğer bileşenleri de hem safsızlık hem de konsantrasyon açısından optimize edilmelidir. İstenilen yüksek aktivitenin eldesi detaylı optimizasyon çalışmalarını gerektirmektedir. Örneğin, DNAaz enzimi kullanılarak olası inhibisyona yol açan DNA oligomerlerinin parçalanması, SUMO proteazla kesim sonrası tekrar protein saflaştırması yapılması, proteinin 3-boyutlu yapısının dairesel dikroizm gibi metodlarla kontrol edilmesi, daha çok saflaştırılmış substrat ve kosubstratların kullanılması bu optimizasyon aşamalarında denenmesi gereken basamaklardandır. Bunun yanında, kütle spektroskopisi yardımıyla HPLC kromatogramlarında gözlenen her bir sinyalin tam olarak hangi ara ürün veya ürüne karşılık geldiğinin analizi de önemlidir. Bu şekilde, aktivite ile ilişkili olmayan sinyallerin analizi yerine sadece ürün ve ara ürün olarak teyit ettiğimiz sinyallere yoğunlaşarak optimizasyon yapabiliriz. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, bu tür bir optimizasyonun yapılması için önemli bir zemin oluşturmaktadır. Bu şekilde yüksek

miktarda TET1 eldesi kolay ve standart bir metod haline getirilirse, TET enzimleri üzerine detaylı kinetik ve mekanistik çalışmaların yapılmasına olanak sağlayacak aktif rekombinant protein üretimi yapılmış olacaktır.



6. SONUÇ

Yüksek miktarda aktif rekombinant TET1 üretimi, epigenetik açıdan büyük önem arz eden ve DNA demetilaz enzimi olan TET proteinleri üzerinde detaylı kinetik ve mekanistik çalışmaların yapılması açısından gereklidir. Bu çalışmamızda, TET1 proteini katalitik bölgesinin rekombinant olarak bakteride üretimi için çeşitli metodlar denedik. İlk olarak kodon optimizasyonu yapılmış sentetik plazmid genimizi E.coli içerisinde farklı ekspresyon koşullarında ifade etmeye çalıştık. Ancak uygulanan koşulların bir kısmında protein ifadesi gözükse de, elde edilen protein suda çözünmedi ve hücre parçacıklarıyla çöken kısımda kaldı. Daha sonra deterjan kullanımı ve denatürasyon/tekrar katlama yolları ile protein ifadesine çalışıldı. Denatürasyon/tekrar katlama başarılı bir şekilde çözünür TET1 eldesine olanak verse de, elde edilen protein ile demetilasyon aktivitesi gözlenemedi.

Daha sonra ise çözünür ve aktif protein eldesi için SUMO-TET1 füzyonu kullanıldı. SUMO ve TET1 proteinlerinin bitişik bir şekilde ifade edildiği bu çalışmamızda başarılı bir şekilde aktif enzim elde ettik. Aktivite reaksiyonlarının analizleri net bir şekilde bu reaksiyonda beklenen çeşitli ara ürün ve ürünlerin oluşumunu gösterdi. Böylelikle bu çalışmamızda aktif rekombinant TET1 eldesini göstermiş olduk ve oluşan ürünlerin çeşitliliğinin analizi, aktivitenin artırılması gibi ileriki çalışmalar için zemin hazırlayan önemli bilgiler elde ettik.

KAYNAKLAR

1. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007;128(4):635–638.
2. Rogers J, Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD. The epigenetics of Alzheimer's disease - additional considerations. *Neurobiol. Aging* 2011;32(7):1196–1197.
3. Whayne TF. Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease. *Mol Biol Rep* 2015;42(4):765–776.
4. Lardenoije R, Iatrou A, Kenis G, Kompotis K, Steinbusch HWM, Mastroeni D, et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 2015;131:21–64.
5. Collins FS, Lander ES, Rogers J, Waterson RH. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931–945.
6. İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Derg* 2013;20(1):48–51.
7. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* 2012;23(8):853–859.
8. Bora G, Yurter H. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Derg* 2007;38:48–54.
9. Piccolo FM, Fisher AG. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol* 2014;24(2):136–143.
10. Stower H. Epigenetics: Dynamic DNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13(2):75.
11. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2333S–2335S.
12. Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J. Cell. Biochem.* 2009;108(1):43–51.
13. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31(2):89–97.
14. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA

- demethylation. *Nature* 2013;502(7472):472–479.
15. Brena RM, Costello JF. The role of the epigenome in human cancers. In: Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches (Fourth Edition). 2010. page 471–486.
 16. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 2009;324(5929):930–935.
 17. Lu X, Zhao BS, He C. TET family proteins: Oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases. *Chem. Rev.* 2015;115(6):2225–2239.
 18. Guan X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* 2015;5(5):402–418.
 19. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 2010;28(10):1057–1068.
 20. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009;1(2):239–259.
 21. Eser BE, Yazgan ÜC, Gürses SA, Aydın M. Diabetes Mellitus ve Epigenetik Mekanizmalar. *Dicle Med Journal/Dicle Tip Derg* 2016;43(2).
 22. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, Yi Z, Tomer Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun* 2014;50:33–37.
 23. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J* 2012;31(6):1405–1426.
 24. Tollefsbol TO. *Epigenetics in Human Disease*. Academic Press 2012.
 25. Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* 2013;5 (DEC).
 26. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. TET Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 2011;333(6047):1300–1303.
 27. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen J V., Cloos PAC, Rappsilber J, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 2011;473(7347):343–349.
 28. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of Melanoma. *Cell*

- 2012;150(6):1135–1146.
29. Camarena V, Wang G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(8):1645–1658.
 30. Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic acid enhances TET-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc* 2013;135(28):10396–10403.
 31. Bugg TDH. Enzymes : General Properties. *Encycl Life Sci* 2001;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0000709>
 32. Seibert E, Tracy TS. Fundamentals of enzyme kinetics. *Methods Mol Biol* 2014;1113:9–22.
 33. Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* 2005;44(15):5561–5571.
 34. Kriaucionis S, Heintz N. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science* 2009;324(5929):929–930.
 35. Ito S, Dalessio AC, Taranova O V., Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of TET proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466(7310):1129–1133.
 36. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 2011;29(1):68–75.
 37. Crawford DJ, Liu MY, Nabel CS, Cao XJ, Garcia BA, Kohli RM. TET2 Catalyzes Stepwise 5-Methylcytosine Oxidation by an Iterative and de novo Mechanism. *J Am Chem Soc* 2016;138(3):730–733.
 38. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005;99(4):303–310.
 39. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76–85.
 40. Hammond JB, Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1988;3:25–32.
 41. Kizaki S, Sugiyama H. CGmCGCG is a versatile substrate with which to evaluate TET protein activity. *Org Biomol Chem* 2014;12(1):104–107.
 42. Luo L, Pappalardi MB, Tummino PJ, Copeland RA, Fraser ME, Grzyska PK, et al. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-

- coupled detection of succinate formation. *Anal Biochem* 2006;353(1):69–74.
43. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* 2014;5(APR).
 44. Hjelmeland LM. Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzymol* 1990;182(C):253–264.
 45. Yin R, Mao S-Q, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic acid enhances TET-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc* 2013;135(28):10396–10403.
 46. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 2005;43(1):1–9.
 47. Madugundu GS, Cadet J, Wagner JR. Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA. *Nucleic Acids Res* 2014;42(11):7450–7460.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü kazanarak lisans eğitimi için Trabzon’a gitti. 2004 yılında mezun olduktan sonra kısa bir süre öğretmenlik yaptıktan sonra dil eğitimi için Amerika Birleşik Devletleri’nin yolunu tuttu. Yaklaşık sekiz yıl ABD’de kaldıktan sonra 2013 yılında Türkiye’ye dönüş yaptı. Halen Gaziantep’te ikamet etmekte olan Ali Pamuk, evli ve biri kız biri erkek olmak üzere iki çocuk babasıdır.

