T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Escherichia coli* SOYLARINDA PENİSİLİN ASİLAZ EKSPRESYONUNUN AKILCI TASARIM İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

ÖZLEM AKKAYA

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Escherchia coli* SOYLARINDA PENİSİLİN ASİLAZ EKSPRESYONUNUN AKILCI TASARIM İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

ÖZLEM AKKAYA

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE

2012

DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.06.2012....tarih ve 2012/22 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/07/2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan ....Özlem AKKAYA.....'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE : PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

ÜYE : PROF. DR. ELİF ERHAN

ÜYE : PROF. DR. AYŞEGÜL TOPAL SARIKAYA

ÜYE : YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... .../... ... .../20... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: REKOMBİNANT *E. coli* SOYLARINDA PENİSİLİN G ASİLAZ EKSPRESYONUNUN AKILCI TASARIM İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

YAZARIN ADI: ÖZLEM AKKAYA

Penisilin asilaz (PA) yarı sentetik antibiyotiklerin üretimi sürecinde penisilin G'den 6-aminopenisillanik asit üretmede kullanılan endüstriyel olarak önemli bir enzimdir. *E. coli*'nin periplazmasında PA'nın olgunlaşması için translokasyon ve periplazmik işlenme/katlanma adımlarını içeren prokaryotik proteinlerde pek görülmeyen bir takım translasyon sonrası basamaklar gereklidir. Enzimin üretimi *pac* geni ekspresyonunun çeşitli adımlarıyla ilgili tamamlanmamış genetik bilgi nedeniyle hala sınırlı olduğundan, PA üretimini artıracak etkili ekspresyon stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir.

Bakterilerde translasyonun başlaması genellikle translasyonun hız-sınırlayıcı basamağı olarak göz önünde tutulmakta olup, bir genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde temel bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada *pac* geni translasyona başlama bölgesinde (TIR) tercih edilen nükleotit tipi ve pozisyonlarını belirlemek amacıyla bu bölgeye bazı mutasyonlar yerleştirilmiştir. Mutasyonların oluşturulmasında PCR mutagenez yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen mutantların tamamı 26 °C'ta yaban tipe görece daha yüksek bir enzim aktivitesi verirken; 37 °C'ta *pac* mRNA'sının sıcaklığa duyarlı translasyonu değişmemiştir. Bu sonuç *pac* geni yaban tipi dizisinin maksimum ekspresyonu sağlamadığına ve translasyona başlama bölgesinin nükleotit içeriğinde yapılacak değişikliklerin aktif PA üretimini iyileştirilebileceğine dikkat çekmiştir. Uyarımlı ve konstitütif olarak gerçekleştirilen ekspresyon çalışmalarında, enzim aktivitesi sadece IPTG uyarımlı koşullarda ve *pac*3.5-kb fragmanını taşıyan klonları içeren rekombinant soyların kullanıldığı durumda elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada beklenmedik bir şekilde daha önce bildirilenlerin aksine PA'nın periplazmaya taşınması için sadece Twin arginin translokasyon yolağına gereksinim duymadığı da gösterilmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: IMPROVEMENT OF PENICILLIN G ACYLASE EXPRESSION BY RATIONAL DESIGN IN RECOMBINANT *Escherichia coli* STRAINS

NAME OF THE AUTHOR: ÖZLEM AKKAYA

Penicillin G acylase is an industrially important enzyme for production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin G during the manufacturing of semisynthetic antibiotics. Formation of mature PA in the periplasm of *E. coli* involves a series of post-translational steps including translocation and periplasmic processing/folding steps, which are unique for prokaryotic proteins. Production of PA is still limited mainly due to the incomplete genetic information existing on various steps of *pac* gene expression and therefore, it is important to develop efficent expression strategies in order to enhance PA production.

Initiation of translation in bacteria is generally considered as a rate-limiting step of translation and it has main role on determination of the overall expression level of a gene. In this work, some mutations are introduced into translation initiation region (TIR) of *pac* gene in order to identify the prefered nucleotides and positions in this region. Mutations were performed by PCR-mutagenesis. All of the mutants gave higher level of enzyme activity in comparison to wild-type sequence at 26 °C while no change occured in the temperature-sensitive translation of *pac* mRNA at 37 °C. This result indicates that wild-type *pac* gene sequence does not give maximum level of gene expression and alteration of the nucleotide context of TIR of *pac* gene could improve the active enzyme production. Enzyme activity was only found in strains that contain clones carrying *pac* gene in 3.5-kb fragment with IPTG induction conditions in expression studies that were carried out constitutively and by induction. Unexpectedly, our study also revealed that translocation of PA, in contrast to earlier reports, did not require only the Twin-arginine translocation pathway for its transport into the periplasm.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama beraber başladığım ancak üzücü bir şekilde beraber sonlandıramadığım danışmanım merhume Prof. Dr. Füsun GÜMÜŞEL'e, tavsiyeleri, yönlendirmeleri ve bu uzun yolculukta hayata bakışımı değiştirdiği için,

Tez çalışmam süresince bana yardımcı ve destek olan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever ÖZTÜRK'e, tavsiyeleri ve tüm paylaşımları için,

Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya tezimi bitirme aşamasında gösterdiği ilgi ve cesaretlendirme için,

Tez izleme jürimdeki hocalarım Prof. Dr. Elif ERHAN ve Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e, tüm doktora sürecim boyunca gösterdikleri hoşgörü, destek ve anlayış için,

Laboratuvar arkadaşlarım Serda, Nagihan, Hüseyin, Irmak ve Merve'ye, yardımları ve anlayışları için,

Tezimin yazım aşamasında laboratuvarımıza katılan, Fulya, Gamze ve Levent'e destekleri, güler yüzleri ve arkadaşlıkları için,

Bölümdeki tüm arkadaşlarıma ve özellikle Hülya, Veysel, Emrah ve Tuğrul'a gerektiğinde gösterdikleri yardımseverlikleri için, teşekkür ederim.

Son olarak bana her şeyden önce dürüstlüğü, merhameti ve insan olabilmenin erdemini öğreten aileme, tez sürem boyunca ümidimi kaybettiğim tüm zamanlarda verdiği sonsuz destekten dolayı teşekkür ederim. Siz olmasaydınız bu tezi bitirmeyi asla başaramazdım. Özellikle hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak sonsuz sevgi, ilgi ve desteği ile hep yanımda olan canım anneme teşekkür ediyor, bu tezi anneme ve babamın anısına ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET iv

SUMMARY v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER DİZİNİ vii

ŞEKİLLER DİZİNİ xii

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xviii

1 GİRİŞ 1

1.1 Gram-negatif bakteri, *Esherichia coli*'de rekombinant protein üretimi 1

1.2 Bakteriyel Translasyon 2

1.2.1 Başlama Fazı 3

1.2.2 Uzama fazı 5

1.2.3 Sonlanma ve yeniden döngü fazları 7

1.3 mRNA'da translasyona başlama bölgeleri ve gen ekspresyonu 8

1.3.1 Shine-Dalgarno dizisi 10

1.3.2 SD-AUG arasındaki bölge 11

1.3.3 Translasyona başlama kodonu AUG'yi takip eden bölge 12

1.3.3.1 AUG başlama kodonunu takip eden bölgenin kodon içeriği 13

1.3.4 mRNA'nın ikincil yapısı 16

1.3.5 Ribozomal protein S1 için mRNA bağlanma bölgesi 17

1.4 Bakterilerde Protein Taşınması 17

1.4.1 Sitoplazmik Membrandaki Taşıma Sistemleri 20

1.4.1.1 Sinyal dizi 20

1.4.1.2 SecB-bağımlı yolak 21

1.4.1.3 SRP yolağı 23

1.4.1.4 TAT yolağı 24

1.5 Penisilin Asilaz (PA) 27

1.5.1 PA'nın Yapı ve İşlevi 29

1.5.2 Enzimin katalitik mekanizması 33

1.5.3 *pac* geninin ekspresyonu ve regülasyonu 33

1.5.4 Penisilin asilazın endüstriyel önemi 38

1.5.5 PA'nın fazla miktarda üretimi için stratejiler 39

1.6 Tezin Amacı 41

2 GEREÇ VE YÖNTEMLER 43

2.1 GEREÇLER 43

2.1.1 Kimyasallar 43

2.1.1.1 Kullanılan kitler ve enzimler 43

2.1.2 Besiyerleri 43

2.1.3 Tampon ve solüsyonlar 44

2.1.4 Antibiyotikler 50

2.1.5 Bakteriyel soylar ve plazmitler 50

2.2 YÖNTEMLER 57

2.2.1 Bakteriyel üreme koşulları 57

2.2.2 Plazmit DNA izolasyonu 57

2.2.2.1 Maksiprep plazmit DNA izolasyonu 57

2.2.2.2 Alkali Liziz Yöntemi ile miniprep plazmit DNA izolasyonu 58

2.2.2.3 Kaynatma ile lizis yöntemi ile miniprep plazmit DNA izolasyonu 58

2.2.2.4 Wizard® plazmit miniprep kit. kullanarak plazmit DNA izolasyonu 59

2.2.3 PCR-temelli mutagenez 59

2.2.3.1 Primer tasarımı ve sentezi 60

2.2.3.2 PCR koşulları ve reaksiyonlar 60

2.2.4 Restriksiyon endonükleaz kesimi 62

2.2.5 Agaroz jel elektroforezi 62

2.2.6 Agaroz jelden DNA izolasyonu 63

2.2.7 Ligasyon 63

2.2.8 Transformasyon 64

2.2.8.1 TSS yöntemi ile kompetant hücre hazırlanması 64

2.2.8.2 DNA'nın kompetan hücrelere transferi 64

2.2.9 Klon adaylarının seçimi ve doğrulanması 65

2.2.10 *pac* geninin klonlanması ve mutasyonların TIR içine PCR aracılığıyla yerleştirilmesi 65

2.2.10.1 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinin *tac* promotor temelli bir vektöre klonlanması 69

2.2.11 Rekombinant protein ekspresyonu 69

2.2.12 Protein analizi 70

2.2.12.1 SDS-PAGE 70

2.2.12.1.1 SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması 70

2.2.12.1.2 Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi 71

2.2.12.2 Western Blot 72

2.2.13 Enzim aktivitesinin belirlenmesi 73

2.2.13.1 Hücre özütünün hazırlanması 73

2.2.14 PA aktivite testi 74

2.2.14.1 PDAB yöntemi ile aktivite testi 74

2.2.14.1.1 6-APA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması 75

2.2.14.2 *Serratia marcescens* kullanılarak aktivite testi 75

3 BULGULAR 77

3.1 2.6 kb-*pac* geninin PCR ile çoğaltılarak pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörlerine klonlanması 79

3.2 *pac* geninin 3' ucundaki 0.9 kb'lık bölgenin PCR ile çoğaltılarak pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörlerine klonlanması 81

3.3 PCR-temelli mutagenez çalışmaları 82

3.3.1 PCR aracılığıyla *pac* geni TIR bölgesine mutasyonların yerleştirilmesi 82

3.3.1.1 PCR koşullarının optimizasyonu 82

3.3.1.2 Mutajenik *pac* fragmanlarının pUCpac2.6'ya klonlanması 83

3.3.2 Mutajenik *pac* fragmanlarının $pUC19_{lac}^{-}$, pUC19-900 ve $pUC19_{lac}^{-}$-900 vektörlerine klonlanması 85

3.3.3 Mutasyonların dizi analizi ile doğrulanması 87

3.3.4 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan pUC varyantlarının Tat^{+} ve Tat^{-} soylara aktarılması 89

3.3.5 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinin pMMB208 vektörüne klonlanması 89

3.3.6 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan pMMB208 varyantlarının Tat^{+} ve Tat^{-} soylara aktarılması 90

3.3.7 Üreme eğrisi 91

3.4 Gen ekspresyonu çalışmaları 94

3.4.1 Mutasyonların Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri 95

3.4.1.1 *pac* geni SD ve SD-ATG aralığında yapılan mutasyonların gen ekspresyonu üzerine etkisinin pUC klonlarında incelenmesi 103

3.4.1.2 DR bölgesinin *pac* geni ekspresyonu üzerine etkilerinin pUC klonlarında incelenmesi 104

3.4.1.3 *pac* geni ekspresyonu ve öncül enzimin translokasyonu üzerine TIR'da yapılan mutasyonların etkilerinin pMMB klonlarında incelenmesi 105

3.4.2 Hücre dışı enzim aktivitesinin belirlenmesi 107

3.4.2.1 Enzim aktivitesinin PDAB yöntemi ile belirlenmesi 107

3.4.2.2 *Serratia marcescens* yöntemi ile enzim aktivitesinin belirlenmesi 109

3.5 Mutantların protein analizi 109

3.5.1 Mutantların SDS-PAGE ve Western blot profilleri 110

4 TARTIŞMA VE SONUÇ 113

4.1 pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$-temelli klonlarda PA Aktivitesi 115

4.2 Translasyona Başlama Bölgesi (TIR) 117

4.2.1 SD Bölgesi Mutasyonu 119

4.2.2 SD-AUG Bölgesi Mutasyonu 124

4.2.3 DR bölgesi Mutasyonları 127

4.2.3.1 +2 Kodon Mutasyonu 130

4.2.3.2 +4 Kodon Mutasyonu 134

4.2.4 Sıcaklığın Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 135

4.3 Sinyal Peptit Mutasyonlarının öncül enzimin ekresyonu üzerine etkisi 136

KAYNAKLAR 147

ÖZGEÇMİŞ 174

EK-1 Mutation in the translation initiation region of the *pac* gene resulting in increased levels of activity of penicillin G acylase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1	Prokaryotlarda translasyona başlama yolağı	5
1.2	Bakteriyel translasyona başlama bölgesinin (TIR) şematik gösterimi	9
1.3	Bir Gram-negatif bakterinin genel görünüşü ve yeni sentezlenen proteinlerin yerleşim tercihleri	18
1.4	Sinyal peptitler	21
1.5	*Esherichia coli* Sec- ve Tat translokazlarının şematik gösterimi	26
1.6	PA'nın katalizlediği reaksiyonlar	28
1.7	*E. coli*'de PA'nın sentezi ve işlenmesi	30
1.8	PA'nın ikincil yapısal elementlerini gösteren şekil	32
1.9	PA enziminin kristal yapısı	33
1.10	*pac* yapısal geni	34
1.11	*pac* geninin genetik organizasyonu ve *E. coli*'de PA sentezi için gerekli olan genetik adımlar	35
1.12	*E. coli* W ATCC 11105 *pac* geninin 5' kodlayıcı olmayan bölgesinin dizisi	36
1.13	Tat sinyal peptitlerinin örnekleri	38
2.1	pUC19 vektör haritası	55
2.2	pMMB207 vektör haritası	56
2.3	pUCpac2.6OA4-7 ve pUC-PACOA4-7 klonlarının oluşturulmasında izlenen klonlama stratejisinin şematik gösterimi	68

Şekil **Sayfa**

2.4 PDAB (p-dimetilamino-benzaldehit)'ın 6-APA ile 415 nm'de gerçekleştirdiği Schift baz reaksiyonu 74

3.1 900 bp'lik bölgeyi tek yerden kesen enzimler 78

3.2 pUCpac2.6 ve pUC_{lac}^{-}-pac2.6 klon adaylarının seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 80

3.3 900 bp'lik fragmanın pUC19 üzerine klonlanmasını gösteren agaroz jel elektroforezi 81

3.4 PCR4, PCR5, PCR6 ve PCR7 için PCR optimizasyon çalışmasının sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi 83

3.5 Mut6 mutasyonuna ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 84

3.6 Mut4 ve Mut6 mutantlarına ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 85

3.7 Mut5 ve Mut7 mutantlarına ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 85

3.8 *Nco*I enzimiyle kesilmiş Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7'e ait pUC_{lac}^{-}-pac2.6, pUC-PACOA ve pUC_{lac}^{-}-PACOA klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 86

3.9 Klonlama stratejisini gösteren agaroz jel elektroforezi 87

3.10 Mut4-*pac*3.5/pUC19 (pUC-PACOA4) klonunun taşıdığı Mut4 mutasyonunun gösterimi 88

3.11 Mut5-*pac*3.5/pUC19 (pUC-PACOA5) klonunun taşıdığı Mut5 mutasyonunun gösterimi 88

3.12 Mut6-*pac*2.6/$pUC19_{lac}^{-}$ (pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA6) klonunun taşıdığı Mut6 mutasyonunun gösterimi 88

Şekil **Sayfa**

3.13 Mut7-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$ (pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA7) klonunun taşıdığı Mut7 mutasyonunun gösterimi 89

3.14 *Eco*RI-*Hind*III restriksiyon endonükleazlarıyla kesilmiş pMMB klon adaylarının agaroz jel elektroforezi 90

3.15 Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımlı koşullardaki üreme eğrisi 92

3.16 Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC19$_{lac}^{-}$ klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımlı koşullardaki üreme eğrisi 93

3.17 *pac*$_{wt}$, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını taşıyan *E. coli* JM109, MC4100 ve DADE soylarının üreme eğrisi 94

3.18 Mut4 ve Mut5 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımsız koşullarda, 26 ºC'ta ve 46. saatte verdikleri aktivite değerleri 96

3.19 Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımsız koşullarda, 26 ºC'ta ve 46. saatte verdikleri aktivite değerleri 97

3.20 Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerinin uyarımlı koşullarda verdikleri aktivite değerleri 98

3.21 Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarının uyarımsız koşullardaki üreme eğrileri ve aktivite grafiği 99

Şekil **Sayfa**

3.22 Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarının uyarımlı koşullardaki üreme eğrileri ve aktivite grafiği 100

3.23 pUC-PACOA4-7/JM109 ve pac_{wt}/JM109 soylarının değişik IPTG konsantrasyonlarıyla farklı zamanlarda uyarımları sonucunda elde edilen aktivite grafiği 101

3.24 pUC-PACOA4-7/JM109 soylarının farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarıldığı koşullarda elde edilen aktivite grafiği 102

3.25 Uyarımlı koşullarda 26 ºC'ta 200 rpm çalkalama ile büyütülen pUC-PACOA4-7/JM109 soylarına ait kültürün 20. ve 46. saat örneklerinin aktivite grafiği 103

3.26 S_{pac}/JM109 ve pUC-PACOA4-7/JM109 soylarından elde edilen PA aktivite grafiği 105

3.27 pac_{wt}, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını içeren soyların (*E. coli* MC4100 ve DADE) PA aktivite grafiği 107

3.28 pac_{wt}, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını içeren MC4100, JM109, B1LKO, JARV15 ve DADE soylarının 26 ºC'ta, uyarımlı koşullarda ve kültürün 20. saatinde verdikleri hücre dışı PA aktiviteleri ve OD_{600} değerleri 108

3.29 pMMB208/JM109'un yanı sıra, pac_{wt}, Mut6 ve Mut7'nin pMMB klonlarını içeren *E. coli* JM109, MC4100, JARV15, BILKO ve DADE soylarına ait kültürlerin 10. saatinden alınan besiyeri üst sıvısı örneklerinin *S. marcescens* ile aktivite testi 109

3.30 26 ºC'ta, 0.1 mM IPTG varlığında kültürün 20. saatine kadar büyütülen *pac* ve pac_{lac}^{-} mutantlarını taşıyan *E. coli* JM109 soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin SDS-PAGE analizi 110

Şekil **Sayfa**

3.31 37 °C'ta 20 saat 0.1 mM IPTG uyarımı ile büyütülen pUC-PACOA klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin SDS-PAGE ve Western blot analizi 111

3.32 pac_{wt}, Mut6 ve Mut7'nin pMMB klonlarını içeren, 0.1 mM IPTG ile 26 °C'ta 20 saat büyütülen yaban tipi *E. coli* MC4100 ve *E. coli* DADE soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin Western blot analizi 112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

1.1. *E. coli* K12 ve B soylarında nadir kodon kullanımı 14

2.1. Kullanılan restriksiyon enzimler ve tamponları 43

2.2. Bakteriyel soylar ve plazmitler 51

2.3. Primer dizileri 56

2.4. Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinde SD, SD-ATG arası ve DR bölgelerinin nükleotit dizileri 66

2.5. SDS-PAGE jel içeriği 71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
6-APA	6-aminopenisillanik asit
Ap^r	Ampisilin direnci
APS	Amonyum persülfat
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin trifosfat
bp	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Cm^r	Kloramfenikol direnci
CRP	cAMP reseptör protein
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
DR	Translasyona başlama kodonunu takip eden bölge
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
IF-1,2,3	Başlama faktörleri
IPTG	İzopropil thio-β-D-galaktozid
kbp	Kilobaz çifti
(k)b	(kilo) baz
(k)Da	(kilo) Dalton
Lys	Lizin
M	Molar

ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Haberci RNA
NaAc	Sodyum asetat
ºC	Derece santigrat
OD	Optik yoğunluk
PA	Penisilin asilaz
PAA	Fenilasetik asit
pac	Penisilin asilaz yapısal geni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAB	Para-dimetilaminobenzaldehit
Pen G	Penisilin G
RBS	Ribozoma bağlanma bölgesi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakika başına rotasyon
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
S	Sedimentasyon katsayısı
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sec	Genel sekresyon yolağı
SRP	Sinyal tanıma partikülü
Tat	Twin-arjinin hedefli translokaz
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TIR	Translasyona başlama bölgesi
U	Ünite
V	Volt

1 GİRİŞ

1.1 Gram-negatif bakteri, *Esherichia coli*'de rekombinant protein üretimi

Bakteriyel ekspresyon sistemleri birçok prokaryotik ve ökaryotik proteinin üretimi için tercih edilmektedir. Bunun temel nedeni, bakterilerin maliyet açısından uygun olmaları, genetiklerinin iyi-karakterize edilmiş olması ve birçok farklı bakteriyel ekspresyon sisteminin varlığıdır. Rekombinant ekspresyon için mevcut konakçılar arasında, *Esherichia coli* (*E. coli*), istisnai bir pozisyona sahip olup, rekombinant protein üretimi için halen en yaygın olarak kullanılan konakçıdır. İyi bilinen genetik yapısı onun genetik mühendisliği, metabolizma mühendisliği ve protein mühendisliği tekniklerini içeren çeşitli uygulamalar için kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca hızlı üreme oranı ve kültivasyon teknolojisinin kolaylığı da *E. coli*'yi endüstriyel uygulamalar için elverişli hale getirmektedir (Yin ve ark., 2007).

Diğer yandan rekombinant protein üretimi için *E. coli* kullanıldığında, karşılaşılan en büyük problem, proteinlerin besiyeri ortamına etkili bir biçimde salınmasını sağlayan sekresyon sistemlerinin olmamasıdır. Dolayısıyla bu organizmada mevcut tüm rekombinant ekspresyon teknolojisine karşın; başarılı protein üretimi halen sıklıkla ilgilenilen gen için en uygun ekspresyon sisteminin seçimine ve optimizasyonuna dayanmaktadır. Verilen herhangi bir rekombinant gen için tek bir optimal sistem yoktur. *E. coli*'de rekombinant protein üretimini maksimum hale getirmek için yapılan en önemli uygulamalar optimal promotorun seçimi ya da dizaynı, transkripsiyonu düzenleme mühendisliği, rekombinant gen kopya sayısının ayarlanması, 5' translasyonu yapılmayan bölgenin ve translasyona başlama bölgesinin mühendisliği, mRNA ömrünün artırılması, özgün hücresel kompartmanlara taşınma, ideal üretimi yapan konakçının seçimi ve dizaynı ile

fermentasyon koşullarının optimizasyonudur (Baneyx, 1999; Sørensen ve Mortensen 2005; Choi ve ark., 2006).

1.2 Bakteriyel Translasyon

Translasyon karmaşık, çok adımlı, çok sayıda bileşenden oluşan ve sıkı bir şekilde kontrol edilen bir süreç olarak değerlendirilmektedir (Laursen ve ark., 2005). Bu süreçte mRNA'daki kodonların dizisi bir polipeptit zincirinin sentezini yönlendirmekte olup, bir mRNA molekülündeki genetik bilgiyi amino asit dizisine dönüştüren organel olarak ribozom en önemli rolü oynamaktadır (Marquez ve ark., 2002). Ribozom, bütün türlerde iki alt üniteden oluşan büyük bir ribonükleoprotein partiküldür. Bakterilerde alt üniteler 30S ve 50S olarak belirlenmiş olup, bu alt üniteler birlikte 70S ribozomu oluşturur. Küçük alt ünite 16S rRNA ve 21 proteinin her birine ait tek bir kopyayı içerirken; büyük alt ünite 23S rRNA, 5S rRNA ve 34 protein içerir. Her bir alt ünite, gelen aminoaçillenmiş tRNA'yı kabul eden A (aminoaçil), ilk sentezlenen peptit zinciriyle tRNA'yı tutan P (peptidil) ve ribozomdan ayrılmadan önce deasetillenmiş tRNA'yı tutan E (exit) olmak üzere, tRNA için üç bağlanma alanına sahiptir (Ramakrishnan, 2008).

30S alt ünite mRNA ve tRNA'nın antikodon "stem-loop"larına bağlanarak, okuma sürecinde kodon ve antikodon arasında gözlenen baz eşleşmesi aracılığıyla translasyonun doğruluğuna katkıda bulunur. 50S alt ünite tRNA'nın akseptör kollarına bağlanır ve A alanına tRNA üzerinde gelen amino asit ile P-alanındaki tRNA'ya tutunmuş ilk sentezlenen peptit zinciri arasında peptit bağı oluşumunu katalizler. Her iki alt ünite de bir seferde bir kodon olmak üzere tRNA'lar ve mRNA'nın ribozom boyunca devam eden çok düzenli hareketi için gereklidir. Translasyon sadece ribozomları değil, birçoğu ribozomlar tarafından aktive edilen GTPaz'lar olan ilave protein faktörleri de içerir (Ramakrishnan, 2002).

Protein biyosentezinde mRNA, çeşitli protein faktörler, tRNA'lar, birçok protein ve ribozom rol oynar. Polipeptit sentezinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar, bu sürecin yüksek bir hızda ve doğrulukta devam etmesi için gerekli

enerjiyi sağlayan ATP ve GTP'nin hidrolizi yardımıyla başarılır (Ninio, 1975). Translasyonel süreç 4 fazdan oluşmaktadır: başlama, uzama, sonlanma ve geri dönüşüm.

1.2.1 Başlama Fazı

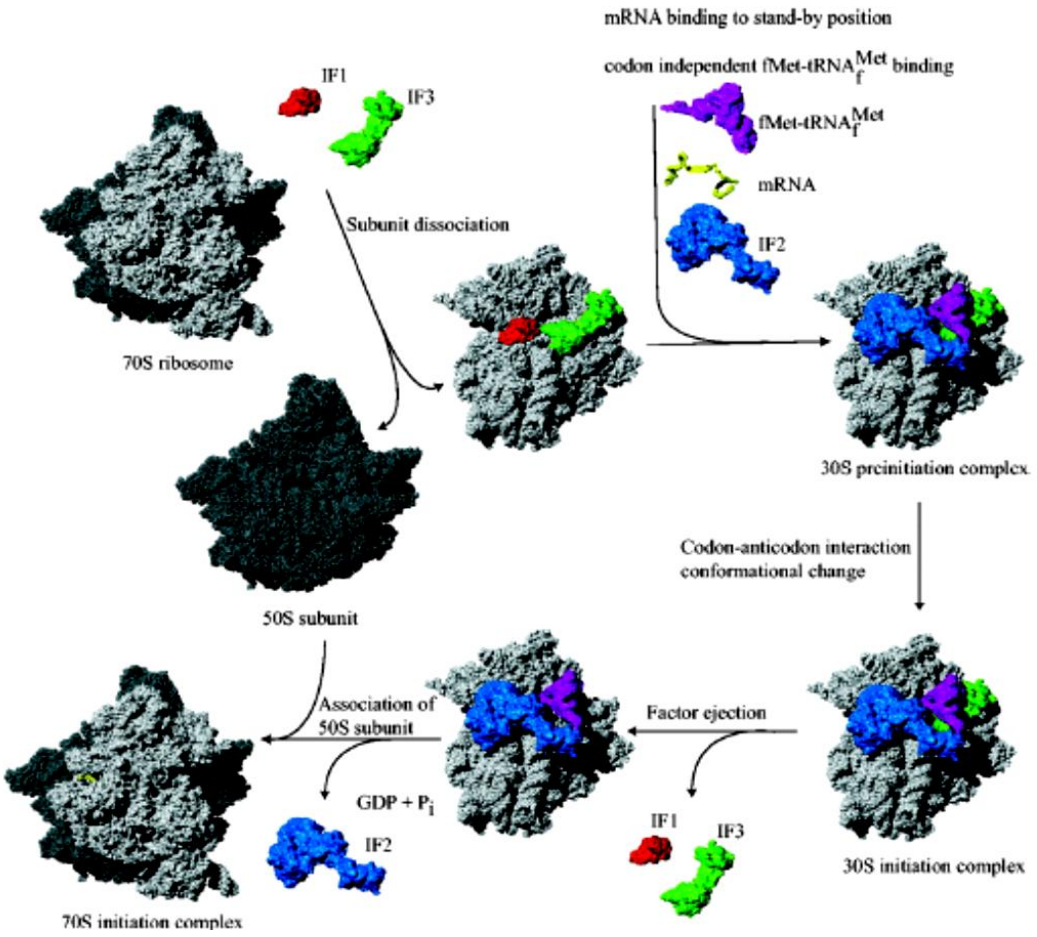
Bakteriyel protein sentezinin başlaması, üç başlama faktörü (IF1, IF2, IF3)'nün yardımıyla 30S ribozomal alt ünite tarafından başlatıcı bir tRNA ($tRNA_f^{Met}$) ve bir mRNA translasyona başlama bölgesinin seçimini gereksinir. Başlama translasyonun hız sınırlayıcı adımı olup; ribozom-başlatıcı tRNA-mRNA üçlü kompleksinin oluşumu, mRNA'nın ribozoma bağlanma bölgesi (RBS) ile bu bölgeyi çevreleyen dizi ve yapısal motiflerden etkilenir (Gualerzi ve Pon, 1990).

Standart translasyona başlama bölgesinin temel elementleri, AUG (%83), GUG (%14) ve UUG (%3) başlama üçlüsünü içermekte olup; bakteriyel genlerin translasyona başlamasında çoğunlukla bu başlama kodonları kullanılmaktadır (Blattner ve ark., 1997). Başlama adımını etkileyen en iyi tanımlanmış element Shine-Dalgarno (SD) dizisi olarak isimlendirilen ve 16S rRNA'nın 3' ucuna tamamlayıcı pürince-zengin nükleotitlerdir (Shine ve Dalgarno 1974). SD dizisi başlama kodonundan çeşitli uzunluklardaki bir ara bölge (spacer) ile ayrılmaktadır (Gualerzi ve Pon, 1990; McCarthy ve Brimacombe, 1994). fMet-tRNA, bakterilerde başlama için kullanılır. Bu tRNA'nın diğer tRNA'lardan yapıca farklı olduğu bildirilmiştir (Gillum ve ark., 1975). Başlama süreci IF1, IF2 ve IF3 olmak üzere üç başlama faktörünü içerir (Gualerzi and Pon, 1990).

IF3'ün güçlü bir şekilde 30S alt ünitesine bağlandığı ve 50S alt ünitesiyle etkileşimi önlediği bilinmektedir. Aynı zamanda IF3 ribozomun P-bölgesine diğer tRNA'ların bağlanmasını kararsız kılarak başlangıç tRNA'sının ($tRNA^{fMet}$) seçimine yardım eder (Hartz ve ark., 1990). IF3, fMet-tRNA'nın kodon-antikodon tanımasının doğruluğunu ve kinetiğini de etkiler (O'Connor ve ark., 2001).

IF2'nin başlama kompleksinin oluşumunda bir taşıyıcı olarak iş gördüğü düşünülmektedir (Mayer ve ark., 2003). IF2, formil-metionil grubunu tanır ve dolayısıyla sadece fMet-tRNA ile bir kompleks oluşturarak başlama kompleksinin özgüllüğünü artırır (Hartz ve ark., 1989). Yeri doğrudan belirlenmemiştir fakat P-bölgesindeki başlangıç tRNA'sının amino açil ucuna bağlandığı ve IF1 ile etkileşim kurduğu bilindiğinden, IF2'nin A-bölgesine IF1 ile birlikte bağlandığı bir model önerilmektedir (Roll-Mecak ve ark., 2000). Bununla birlikte IF1 ve IF2'in antikodon loop, antikodon stem, D-loop ve tRNA'ya bağlı A-bölgesinin D-stemini taklit ettiği modeller yeni yapısal bilgiler ve son zamanlardaki biyokimyasal verilerin ışığında geçerli değildir (Laursen ve ark., 2005).

IF1'in rolü, öncül-başlama kompleksini oluşturmak için 30S alt ünitelerin yerine 70S ribozomlar kullanıldığında anlaşılmaya başlamıştır. IF1, IF2 ve IF3'ün 30S alt ünitesine daha etkili bağlanmasını teşvik eder ve IF2 ile birlikte P-bölgesinde başlamanın doğru yerleşimini sağlar (Simonetti ve ark., 2008). IF1'in ribozomal A-bölgesindeki yeri, bu bölgeye aminoaçil-tRNA'ların erken kabulünü engellemesi aracılığıyla, başlamanın doğruluğunda işlevsel bir rol oynayabileceğini de önermektedir (Boelens and Gualerzi., 2002) (Şekil 1.1). Gerçekte yıllardır devam eden çalışmalara karşın; bu faktörlerin rolünün ne olduğu ve başlangıcı oluşturan olayların sıralaması hala tartışmalıdır.



Şekil 1.1. Prokaryotlarda translasyona başlama yolağı. 30S ve 50S alt üniteler sırasıyla açık ve koyu gri olarak gösterilmiştir. Translasyona başlama faktörleri IF1, IF2, IF3, mRNA ve fMet-tRNA sırasıyla kırmızı, mavi, yeşil, sarı ve mor olarak gösterilmiştir (Laursen ve ark., 2005).

1.2.2 Uzama fazı

Peptit zincirinin uzaması (Wilson ve Noller, 1998) protein sentezinin merkezini oluşturur. Uzama döngüsü doğrudan iki temel protein uzama faktörü EF-Tu ve EF-G'yi gereksinir. Uzama fazı ribozomal P-bölgesi ile boş bir A-bölgesini kaplayan bir peptidil-tRNA ile başlar. Bu A bölgesi daha sonra Watson modeline (Watson and Crick, 1953) göre mRNA'daki kodona tamamlayıcı anti-kodona sahip bir aminoaçil-tRNA (aa-tRNA) ile doldurulur. EF-Tu, GTP ve aminoaçillenmiş tRNA ile birlikte üçlü bir kompleks oluşturarak, tRNA'yı ribozomal A-bölgesine yönlendirir.

Kodon-antikodon baz eşleşmesinin yapısal olarak tanınması, kodu okuma (decoding) sürecinin sadece bir özelliğidir. tRNA'nın seçimi, amino açillenmiş tRNA'yı kodu okuma bölgesine hatayı düzeltme basamağına izin verecek uygun bir açıda sunan bir GTP molekülü ile aktivasyondan sonra, EF-Tu üçlü kompleksinin bağlanmasıyla başlar (Stark, 1997). EF-Tu.GTP.aa-tRNA (üçlü kompleks), tRNA ile mRNA'nın kodon/antikodon etkileşimi ve muhtemelen ribozom tarafından A-bölgesinde stabilize edilir. Dolayısıyla kodon-antikodon etkileşimi EF-Tu'nun G domainine iletilen bir aktivasyon sinyali yaratarak, GTP hidrolizini takiben ribozom.EF-Tu.aa-tRNA.GTP kompleksinin GTPaz ile aktivite edilmiş basamağının oluşumuna götürür.

Bunun sonucu olarak, EF-Tu'nun konformasyonu bir GTP'li formdan, aa-tRNA ve ribozom için büyük oranda daha az afiniteye sahip olan bir GDP'li forma değişir. Sonrasında aa-tRNA EF-Tu.GDP'den serbest kalır, A-bölgesine yerleşir ve EF-Tu.GDP ribozomdan ayrılırken peptidiltranferaz reaksiyonunda yer alır (Rodnina, 2000). EF-Ts EF-Tu.GDP'ye bağlandığında GDP molekülü serbest kalır. Bu nedenle sitoplazmadaki GTP'nin konsantrasyonu GDP'ninkinden çok daha yüksek olup; GTP tercihen EF-Tu'daki boş bir nükleotit bölgesine bağlanacaktır (Liljas, 2004).

Sonuçta bu olay A-bölgesindeki tRNA'ların aminoaçil ucunun EF-Tu'dan serbest kalmasına neden olur ve CCA-ucunu 'yerleşme' adı verilen bir süreç içinde 50S alt ünitesinin peptidil transfer merkezine hareketlendirir (Valle ve ark., 2003). Bu faz P-bölgesindeki tRNA'dan peptit zincirinin A-bölgesindeki tRNA'nın amino asitine transferini içeren bir peptit bağı oluşumu için kurucudur. Peptidil transferaz tarafından katalizlenen bu reaksiyon 50S alt ünitesinin bir enzimatik aktivitesidir. A-bölgesindeki tRNA'nın aminoaçil ucu peptidil transferaz merkezine girdiğinde, hızlı ve kendiliğinden bir biçimde peptit bağı oluşumu meydana gelir (Pape ve ark., 1998).

Katalitik RNA'nın keşfinden (Zaug ve ark., 1983) ve peptidil transferazdaki 23S RNA'nın rolü için önerilen biyokimyasal kanıttan (Green ve Noller, 1997) sonra ribozomal RNA'nın peptidil transferini katalizlediği kabul edilmiştir. Peptidil

transferini takiben, ribozom P-bölgesinde deasetilllenmiş bir tRNA'ya ve A-bölgesinde bir peptidil tRNA'ya sahiptir. tRNA'lar ve mRNA'nın bir sonraki kodona transferi aynı zamanda bir GTPaz olan EF-G tarafından kolaylaştırılır.

E. coli ribozomları üzerindeki üçüncü bir tRNA bağlanma bölgesi, deasetillenmiş tRNA molekülüne özgül olan E-bölgesidir. E-bölgesi, tRNA'nın ribozomdan ayrılmadan önceki son bulunma yeri olarak keşfedilmiş ve kabul edilmiştir (Lill ve ark., 1984; Rheinberger, 1980). Daha önce önerilenlerin aksine, E-bölgesindeki tRNA'nın her iki ribozomal alt üniteyle etkileşimde ortaya çıkarılmıştır (Yusupov ve ark., 2001). tRNA'nın E-bölgesine transferi nedeniyle, E-bölgesinde deasetillenmiş tRNA, P-bölgesinde peptidil tRNA taşıyan ve boş bir A-bölgesine olan sahip olan ribozom, uzama süresince bir sonraki kodonu okumak için, gelecek üçlü kompleksi almaya hazırdır (Ramakrishnan, 2002).

1.2.3 Sonlanma ve yeniden döngü fazları

Polipeptit zincirinin sentezi bir dur kodonu (UAA, UAG ya da UGA) A bölgesine gelip yerleşinceye kadar devam eder. Sonlanma faktörleri (Release factors, RFs) olarak adlandırılan protein faktörler, ribozomdan sentezlenen polipeptit zincirinin serbest kalmasından ve bir sonraki başlama süreci için ribozomların tekrar kazanılmasından sorumludur. Bakterilerde RF1, RF2 ve RF3 olmak üzere üç sonlanma faktörü bulunmaktadır. RF1, UAG ve UAA ile RF2, UAA ve UGA dur kodonlarına yanıttır (Kisselev ve ark., 2003). Bu protein faktörlerinden biri ya da diğerinin eylemi ribozom üzerindeki tRNA ve polipeptit arasındaki ester bağının hidrolizine götürür ve tamamlanmış polipeptitin serbest kalmasını sağlar (Ehrenberg ve ark., 2000). RF3'ün ribozomdan serbest kalma faktörleri RF1 ya da RF2'nin uzaklaştırılmasını katalizlediği keşfedilmekle birlikte; RF3 kendi başına kodon özgüllüğünden yoksundur (Freistroffer ve ark., 1997).

RF3, GTPaz aktivitesine sahiptir (Freistroffer ve ark., 1997). Bu yüzden, RF3'ün fonksiyonunun bir kısmı RF1 ya da RF2'nin yeniden döngüsünü katalizlemek ve serbest faktörlerin yeterli düzeyini sürdürmektedir (Kisselev ve

Buckingham, 2000). RF3 işlevinin diğer yönü ise sonlanmadan sonra ribozomun yeniden döngüsüne geçişini yani sonlanma sonrası aşamayı hızlandırmaktır. Bu süreç ribozoma A-bölgesinde RF1 ya da RF2 ile çakışan ribozom recyling faktörün (RRF) bağlanmasını gereksinir (Pavlov ve ark., 1997).

mRNA'ya bağlı bileşenlerin yeniden döndüğü yerde, yeniden döngü süreci için EF-G ile birlikte RRF gereklidir (Janosi ve ark., 1996). Yeniden döngü süreci, protein sentezinin rastgele bir şekilde yeniden başlamasını önleyecektir (Janosi ve ark., 1998). Üçüncü bir protein, başlama faktörü IF3, 70S ribozomun alt ünitelere ayrılmasında gerekli bir faktör olarak izole edilmiştir (Karimi ve ark., 1999). Ayrıca, ribozom-RRF.EF-G kompleksi içindeki GTP hidrolizinin mRNA ve tRNA'dan tam bir 70S ribozomun ayrılmasına yol açtığı gösterilmiştir (Kaji ve ark., 2001).

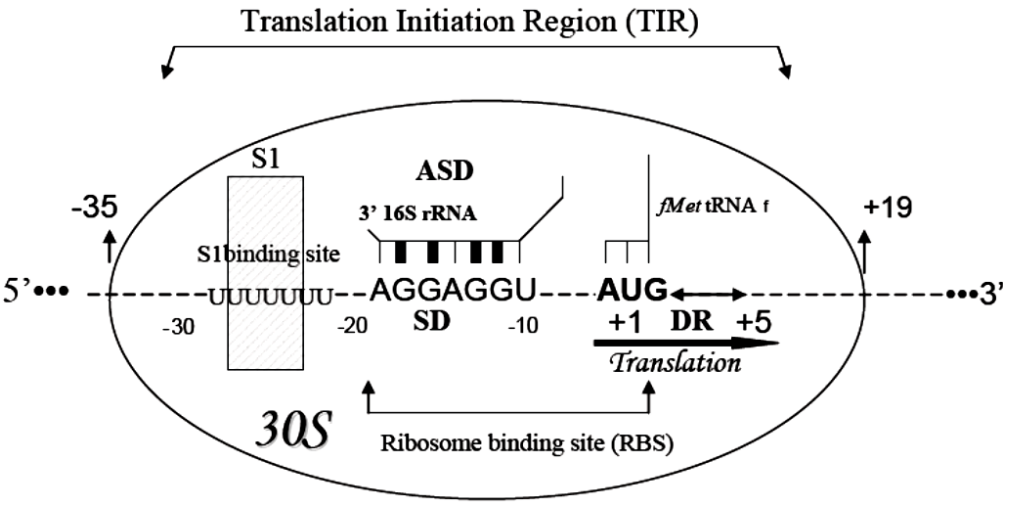
1.3 mRNA'da translasyona başlama bölgeleri ve gen ekspresyonu

Translasyonun başlaması genellikle translasyonun hız-sınırlayıcı adımı olarak göz önünde tutulmaktadır (Draper, 1996). Başlama kodonunu çevreleyen ~40 baz'lık bölgedeki nükleotitlerin rastgele olmayan dağılımı (Berezovsky ve ark., 1999) mRNA'ların kodlayıcı bölgelerinin önünde translasyonun başlaması için bir seri sinyal taşıdığına işaret etmektedir (Dreyfus, 1988). Farklı mRNA molekülleri için elde edilen değişen oranlardaki translasyon etkinliğinin baskın bir biçimde bu bölgenin eşsiz yapısal özelliğinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Makrides 1996).

Prokaryotik translasyona başlama bölgesi (**T**ranslation **i**ntiation **r**egion, TIR), genel olarak ribozoma bağlanma bölgesi (**r**ibosome-**b**inding **s**ite, RBS) olarak bildirilen RBS'yi ve RBS'nin 5' ve 3' sınırlarından öteye uzanan bazları içerir (Gualerzi ve ark., 2000). RBS'in en kısa tanımlaması, Shine-Dalgarno bölgesi, başlama kodonu ve bunlar arasındaki bazları içeren bir bölge olduğudur (McCarthy ve Gualerzi, 1990). Standart başlama kodonundan (AUG, GUG ya da UUG) sonra gelen bölge (**d**ownstream **r**egion, DR) ise translasyon ve gen ekspresyonunda güçlü

bir etkiye sahip 5-7 kodon içeren dar bir penceredir (Gonzalez de Valdiva ve Isaksson, 2004; Looman ve ark., 1987; Stenström ve ark., 2001a) (Şekil 1.2).

Gerçekleştirilen çalışmalarda yüksek oranda translasyonu yapılan mRNA'ların şu dizi elemanlarından bir kısmını ya da tümünü içerdiği belirlenmiştir: 1) 16S rRNA'nın (ASD)'nın 3' ucundaki diziye (…ACCUCCUUA-3') çok ya da az tamamlayıcı bir Shine-Dalgarno (SD) dizisi (Shine and Dalgarno 1974), 2) translasyona başlama kodonu AUG (*E. coli*'de başlama kodonunun AUG olma sıklığı %83, GUG için %14, ve UUG için %3'tür (Ma ve ark. 2002), 3) S1 ribozomal protein ile etkileşim kuran bir pirimidin bölgesi (Boni ve ark., 1991), 4) başlama kodonunun yukarısındaki (O'Connor ve ark., 1999) ya da aşağısındaki (Sprengart ve ark., 1996) baza-özgü artırıcı elementler ve 5) mRNA ikincil yapısı. İlave olarak, bu dizi elemanları arasındaki mesafe de önem taşımaktadır. Örneğin SD dizisi ve başlama kodonu arasındaki mesafe translasyonun verimi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir (Ringquist ve ark., 1992; Chen ve ark., 1994).



Şekil 1.2. Bakteriyel translasyona başlama bölgesinin (TIR) şematik gösterimi (Boni ve ark., 1991; Gonzalez de Valdivia ve Isakkson, 2004; McCarthy ve Gualerzi, 1990; McCarthy ve Brimacombe, 1994; Stenström ve ark., 2001a; Stenström ve ark., 2001b).

1.3.1 Shine-Dalgarno dizisi

Prokaryotik haberci RNA görünüşe göre **S**hine-**D**algarno (SD) olarak isimlendirilen bir dizi vasıtasıyla ribozom tarafından tanınmaktadır. Bu dizi bakterilerin mRNA'sında bol miktarda bulunurken, ökaryotlarda yoktur.

Korunmuş, pürince zengin SD bölgesi, Shine ve Dalgarno tarafından tarif edilmiş olup (Shine and Dalgarno, 1974) translasyona başlama bölgesi içinde yer almaktadır (Schneider ve ark., 1986). Yapılan deneysel çalışmalar ile SD'nin varlığı, *E. coli*'de (Hui ve de Boer, 1987; Shine ve Dalgarno, 1974) diğer bakterilerde ve hatta arkealarda ispatlanmıştır (Osada ve ark., 1999). Bu dizi başlama kodonunun yukarısına yerleşmiş olup; 16S rRNA'nın 3' ucuna yakın bir diziye tamamlayıcıdır. mRNA'nın SD dizisi ve 16S rRNA'nın anti-SD dizisi arasındaki etkileşim, rRNA genlerini kodlayan plazmitteki anti-SD dizisinin (1535-1540) yönlendirilmiş mutagenezi aracılığıyla doğrulanmıştır (Hui and de Boer, 1987). X-ray kristallografik çalışmalardan elde edilen veri, SD ve anti-SD dizileri arasındaki etkileşimin, 30S ribozomal alt ünite üzerindeki platformun başı ve arkası arasında yer alan büyük bir yarığa yerleşmiş olduğunu göstermiştir (Yusupova ve ark., 2001).

SD dizileri, anti-SD dizisini tamamlayıcı dizinin farklı alt dizileri olabilir. Bununla birlikte en fazla kullanılan SD dizileri GGAGG çekirdeğinin küçük varyasyonları şeklindedir (Schurr ve ark., 1993). SD sinyalinin gücü genellikle onun tanınabilirliği, uzunluğu ve başlama kodonu ile arasındaki mesafeye bağlıdır (Ringquist ve ark., 1992). *E. coli* anti-SD bölgesinin CCUCC çekirdeği ile güçlü bir etkileşim için optimal mesafe yaklaşık 7-9 nükleotit olup, bu uzaklık muhtemelen okuma bölgesinin çekirdeğindeki başlama kodonunun daha sonraki yerleşimi için en ideal mesafeyi yansıtmaktadır (La Teana ve ark., 1995).

SD etkileşimi için 3 temel fonksiyon belirlenmiştir: 1) Translasyonel başlangıç alanının yakınındaki 30S alt ünitesine tutunarak, fMet-tRNA ile bir kodon-antikodon etkileşiminin oluşma ihtimalini optimize eder (Calogero ve ark., 1988; Hartz ve ark., 1991b), 2) mRNA'ya, ribozomların mevcut ribozom bağlanma alanlarına yerleşimi

için gerekli olan yeterli bilgiyi sağlar, 3) ribozomların mRNA içinde tesadüfen ya da düzenleme amaçlı oluşabilecek ikincil yapılara karşı yarışma yeteneğini arttırır. Bu üç fonksiyon doğrudan SD etkileşiminin tek iplikli ribozoma bağlanma alanları için bir tercihe sahip olması gerçeğinden doğar (de Smit ve van Duin, 1994a).

SD etkileşiminin bildirilen diğer iki özelliği, onun bir ribozomal afinite elementi olma kavramı ile uyumludur. İlki, güçlü bir SD etkileşiminin ribozoma translasyonel bir başlama alanına bağlanma esnasında, translasyonel bir represör ile yarışmada yardımcı olabilmesidir (Springer ve ark., 1990). Ayrıca aracı rRNA'lar arasındaki serbest ribozomların sınırlı havuzu için olan yarışta, SD dizisinin çok önemli bir rol oynayabileceği önerilmektedir. Buna göre SD dizileri ribozomal peptidil-tRNA bağlanma yerine yakın bir bölgede başlama üçlüsünün yüksek konsantrasyonda olmasını sağlayabilir (Calogero ve ark., 1988). Dolayısıyla mRNA'ya tutunmuş SD dizisinin işlevinin, geçici olarak potansiyel bir başlama üçlüsünün kinetik seçimine izin vermek olduğu da bildirilmiştir (Gualerzi and Pon, 1990).

SD dizileri için önerilen bir diğer işlev ise: bir translasyona başlama bölgesinde Shine-Dalgarno tamamlayıcılığı ve RNA heliks kararlılığının birlikte evrimidir. Bu bulgular SD etkileşiminin bir translasyona başlama bölgesi içindeki yapıyı eritmede ribozoma yardım ettiği ile ilgili daha önce bildirilen modeli desteklemektedir (Olsthoorn ve ark., 1995). Bununla birlikte SD dizisinin uzunluğunun translasyon düzeyiyle ne kadar ilişkili olduğu değişebilmekte olup (Lee ve ark. 1996), SD dizisi tamamen eksik (Boni ve ark. 1991) ve lidersiz (Moll ve ark. 2002) doğal mRNA'ların varlığı, TIR içindeki diğer elementlerin önemine dikkat çekmektedir.

1.3.2 SD-AUG arasındaki bölge

Başlama kodonu ve SD arasındaki bölgenin (spacer) uzunluğu belli bir ölçüde translasyon verimini etkileyebilmektedir. Bir SD motifine sahip genler arasında, ribozom translasyonun başlaması için SD dizisi ve başlama kodonu arasında mükemmel bir mesafeye gereksinim duymaz. Buna rağmen, SD AUG'den 4

nükleotit ötede yer aldığında ya da 13 nükleotit kadar uzağa yerleştirildiğinde, gen ekspresyonu belirgin bir biçimde azalmaktadır (Chen ve ark., 1994; Kozak, 1999; Ringquist ve ark., 1992). Aradaki mesafe özellikle SD dizisi kısa olduğunda önemli bir etkiye sahiptir (Gualerzi ve Pon., 1990).

Dolayısıyla, görünüşe göre SD motifi ve başlama kodonu arasında optimal bir mesafeye gereksinim duyan yapısal sınırlamalar mevcuttur. SD dizisi genellikle başlama kodonunun 7-12 nükleotit yukarısında bulunur (Ma ve ark., 2002; Schurr ve ark., 1993; Osada ve ark., 1999). En uygun mesafe tahminen başlama kodunu ve fMet-tRNA'ya ait antikodonun ribozom üzerindeki yakınlığına bağlıdır (Hartz ve ark., 1991a; Ringquist ve ark., 1992). Ayrıca bu bölgenin nükleotit dizisinin de translasyon verimini etkilediği gösterilmiştir (Gold ve ark., 1981; de Boer ve ark., 1983). Scherer ve ark (1980) tarafından optimal bir ribozom bağlanma alanı için önerilen dizi, SD-AUG arasındaki mesafede G ya da C rezidülerinin eksik ve A/T rezidülerinin baskın olması aracılığıyla tanımlanmaktadır.

1.3.3 Translasyona başlama kodonu AUG'yi takip eden bölge (Downstream region)

Bakterilerde, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik haberci mRNA'ların translasyonunu uyaran başlama kodonunun kendisi ve onun yukarısındaki SD dizisinin yanı sıra birçok translasyonu artırıcı element bildirilmiştir (McCarthy ve Brimacombe, 1994; Shine ve Dalgarno, 1974). Bu elementlere ilave olarak başlama kodonunun aşağısındaki translasyonu artırıcı bir bölge, liderli mRNA'nın translasyonunu etkileyen bir translasyonel 'cis-acting element' olarak tarif edilmekte olup, translasyonun başlama etkinliğinde önemli bu alan (Gualerzi ve ark., 2000) "**d**ownstream **b**ox" (DB) ya da "**d**ownstream **r**egion" (DR) olarak isimlendirilmiştir (Stenström ve ark., 2001a; Stenström ve ark., 2001b).

DR orijinal olarak 16S rRNA'nın heliks 44'ü içindeki 1469-1483 nükleotitlerine tamamlayıcı yaklaşık 8-13 nükleotitlik translasyonu artırıcı bir eleman olarak tarif edilmiştir (Etchegaray and Inouye, 1999; Faxen ve ark., 1991;

Sprengart ve ark., 1990). DR'nin etkisini açıklamaya yönelik olarak birçok farklı araştırmacı tarafından: bu bölgedeki kodon kullanımının etkisi (Bulmer, 1988), bu bölgenin ikincil yapıyla olan ilişkisi (de Smit ve van Duin, 1994), mRNA kararlılığına etkisi (Kuroda ve Maliga., 2001a), bu bölgedeki peptidil-tRNA düşmesi (Karimi ve Ehrenberg, 1996; Dinçbaş ve ark., 1999) ya da bu bölgenin 16S rRNA'ya tamamlayıcı bağlanması (Sprengart ve ark., 1990; Faxen ve ark., 1991; Hartz ve ark., 1991; Etchegaray ve Inouye, 1999) gibi olası işlevlerinin vurgulandığı birçok farklı öneri getirilmiştir. Bununla birlikte DR elementlerinin lidersiz mRNA'nın translasyonunu etkilemediğini bildiren deneysel çalışmalar da mevcuttur (Resch ve ark., 1996). Farklı izo-kodonlar içeren DR'nin, benzer bir protein oluşturmasına karşın, gen ekspresyonunda önemli farklılıklar göstermesi, bu bölgenin gen ekspresyonu üzerine etkisinin proteindeki kodlanmış amino asit dizisinden ziyade mRNA'daki baz dizisinden kaynaklandığına işaret etmektedir (Stenstrom ve Isaksson, 2002).

1.3.3.1 AUG başlama kodonunu takip eden bölgenin (DR) kodon içeriği

Her bir aminoasit birden fazla kodon tarafından kodlanır ve her bir organizma 61 mevcut kodonun kullanımı için kendi tercihine sahiptir. Hücre içindeki tRNA popülasyonu mRNA popülasyonunun kodon tercihi ile ilişkilidir (Dong ve ark., 1996). Yüksek oranda eksprese edilen genler hücrenin bol miktarda tRNA'ya sahip olduğu kodonları içermeye eğilimli iken; düşük düzeylerde eksprese edilen genler düşük oranda kullanılan ya da nadir kodonları içermeye eğilimlidir (Çizelge 1.1). Genel olarak optimal olmayan kodonlar etkin olmayan kodon-antikodon etkileşimlerine ve/veya düşük hücre içi tRNA konsantrasyonlarına dayanılarak tanımlanır.

Çizelge 1.1. *E. coli* K12 ve B soylarında nadir kodon kullanımı (Nakamura ve ark., 2000).

Rare codons	Amino acid	Frequency (K12)	Frequency (B)
AGG	Arg	0.11	0.21
AGA	Arg	0.20	0.24
CGA	Arg	0.35	0.24
CUA	Leu	0.39	0.34
AUA	Ile	0.43	0.50
UGU	Cys	0.51	0.42
CCC	Pro	0.54	0.24
CGG	Arg	0.54	0.50
UGC	Cys	0.64	0.58
ACA	Thr	0.70	0.61
CCU	Pro	0.70	0.58
UCA	Ser	0.71	0.61
GGA	Gly	0.79	0.82
CCA	Pro	0.84	0.74
UCC	Ser	0.86	0.80
AGU	Ser	0.87	0.90
UCG	Ser	0.89	1.14

Okuyucu aminoaçil-tRNA'nın az sayıda bulunmasından dolayı, nadir kodonların varlığı onların okunmasında translasyonel güçlüğe yol açabilir ve ribozom uygun tRNA için beklerken yavaşlayıp duraklayabilir. Bu şekilde duraklamış ribozom translasyon için alternatif yollar üretebilir (Del Tito ve ark., 1995; Gallant ve Lindsley, 1998). Ribozomun duraklaması uygun olmayan aminoaçil-tRNA türlerinin bağlanması, çerçeve kayması, tmRNA eylemi ve peptidil-tRNA'nın serbest kalması gibi translasyonel hatalara yol açabilir (Ivanov ve ark., 2002; Menninger, 1976). Bu nedenle doğada etkili bir şekilde translasyonu yapılan kodonlar için doğal bir seçim vardır ve genellikle düşük oranda kullanılan ya da nadir kodonların varlığından sakınılmaktadır (Faxén ve ark., 1991).

+2 pozisyonundaki kodon değişikliklerinin gen ekspresyonunu 15-20 kat etkileyebileceği bulunmuş olup, *E. coli*'de +2'de AAA, en genel ve ekspresyonu en fazla teşvik edici kodon olarak belirlenmiştir (Looman ve ark., 1987; Stenstrom ve ark, 2001). +2 kodonunun gen ekspresyonu üzerine etkisi sonraki üçlü tarafından da

modüle edilebilmektedir (Stenstrom ve ark., 2001; Stenstrom ve Isaksson, 2002). Ayrıca ardışık NGG kodonlarının +2 ila +5 pozisyonlarında yer aldığında peptidil-tRNA düşmesini tetikleyebildiği gösterilmiştir (Gonzalez de Valdivia ve Isaksson, 2005).

Bununla birlikte mRNA'nın başlangıç kodlayıcı bölgesindeki kodon kullanımının sıklıkla genin diğer kısımlarından farklı olduğu bilinmektedir (Bulmer, 1988). Birçok araştırmacı maksimum gen ekspresyonunun başlama kodonunun aşağısındaki bölgenin kodon içeriğine bağlı olduğunu ve dolayısıyla başlama kodonunu takip eden DR'nin translasyonun başlama etkinliği üzerine başlama kodonunun doğasından bağımsız hareket edebileceğini önermektedir. Bu nedenle gen ekspresyon düzeyi mRNA'nın başlama bölgelerindeki kodon kullanımıyla ilişkilidir (Gonzalez de Valdivia ve Isaksson, 2004; Stenstrom ve Isaksson, 2002).

Chen ve Inoue tarafından (1994) önerilen 'minor-codon-modulator' hipotezi ile AGA, AGG, CUA, UCA, AGU, ACA, GGA, CCC ve AUA'nın *E. coli* genlerinde ilk 25 kodon içinde tercihen kullanılan minör kodonlar olduğu bildirilmiştir. Bir genin başlangıç kısmında böyle minör kodonların tercih edilmesi, translasyonun erken sonlanması aracılığıyla gen ekspresyonunu değiştirebilmekte ve dolayısıyla mRNA'nın büyük bir kısmının gereksiz translasyonundan kaçınılmaktadır.

Diğer yandan nadir kodonların protein biyogenezi üzerine olan potansiyel pozitif etkileri de bilinmektedir (Makhoul ve ark., 2002; Thanaraj ve Argos, 1996). Dikkat çekici iki çalışmada izole edilen nadir kodonların ya daha yüksek düzeyde ekspresyon vermeleri (artan mRNA kararlılığı nedeniyle) (Nackley ve ark., 2006) ya da doğal konformasyonu değiştirmeleri nedeniyle (birlikte translasyonel katlanmanın modifikasyonundan türevlenen) (Kimchi-Sarfaty ve ark., 2007) protein aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar nadir kodon kümelerinin: mRNA kararlılığı, katlanma, sekresyon ve partner proteinler ile etkileşim gibi birçok yönden gen ekspresyonunda etkin olabileceğini göstermiştir (Clarke ve Clark, 2008). Örneğin salgılanan ve salgılanmayan proteinler 5' ucunda farklı bir kodon tercihine sahip olabilmekte, salgılanan proteinlerin sinyal dizilerinde optimal olmayan

kodonlara yönelik bir eğilim bulunmaktadır. Buna göre optimal-olmayan kodonların salgılanan proteinlerin katlanmasını kolaylaştırmak için translasyonel durma noktaları sağlayarak protein taşınmasında yeni ve önemli bir rol oynayabileceği önerilmektedir (Zalucki ve ark., 2007).

1.3.4 mRNA'nın ikincil yapısı

Translasyonun başlaması için birincil dizinin yanı sıra diğer önemli bir belirleyici mRNA molekülünün yapısıdır. mRNA'nın yapısı 30S ribozomal alt ünitenin bağlanmasına izin vermesi ya da inhibe etmesi aracılığıyla translasyonun etkinliğini belirler (de Smit ve van Duin 1994). Başlama kodonuna yakın bir bölgede "stem-loop"lar ya da "pseudo-knot"lar oluşturan güçlü mRNA ikincil yapıları ribozomal duraklamaya, çerçeve kaymasına ya da düşmeye neden olabilir (Gallant ve ark., 2003).

Translasyonun başlama etkinliğini maksimuma çıkarmak ve mRNA ikincil yapısını minimuma indirgemek için birçok farklı strateji denenmiştir. Başlama bölgesinde yapılan rastgele bir değişiklik sonucu elde edilen kütüphane tarandığında, translasyonel gücünde 10-kat farklılık gösteren mutantlarla karşılaşılmıştır (Simmons ve Yansura 1996). Lider dizi adenin ve timin nükleotitlerince zenginleştirildiğinde bazı genlerin ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Chen ve ark. 1994). SD dizisinin aşağısındaki ve yukarısındaki pozisyonların mutasyona uğratılmasının, ikincil yapıların oluşumunu baskılandığı ve dolayısıyla translasyonel etkinliği artırdığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2001). Translasyonu artırıcı elementler rekombinant ekspresyonun iyileştirilmesi için kullanılabilir. Bunun bir örneği *E. coli atpE* genine ait SD dizisinin yukarısındaki U-zengin bölgedir (McCarthy ve ark., 1985). Bu 30 bp'lik bölge insan interlökin-2 ve interferon β genlerinin fazla miktarda ekspresyonu için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (McCarthy ve ark., 1986).

1.3.5 Ribozomal protein S1 için mRNA bağlanma bölgesi

SD dizisine ilave olarak translasyonun ilk basamağında ribozomların başlama alanına gelip yerleşmesindeki muhtemel rolleri nedeniyle, translasyon etkinliği üzerinde dikkate değer bir pozitif etkiye sahip olan DR dışındaki diğer mRNA *cis* elementler, mRNA'da translasyonu yapılmayan liderler içine yerleşmiştir (Gualerzi ve ark., 2000; McCarthy and Gualerzi, 1990; McCarthy and Brimacombe, 1994).

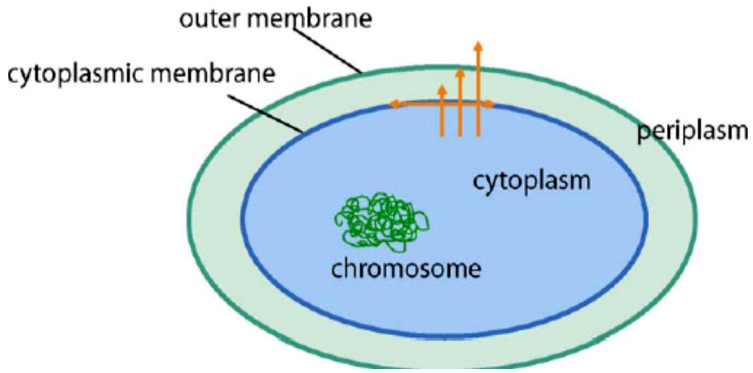
mRNA 5' UTR (translasyonu yapılmayan mRNA bölgeleri) içindeki translasyonu artırıcı bu element (Şekil 1.2), mRNA'ya bağlanan ribozomal protein S1 için bir hedef olarak rol oynamaktadır (Boni ve ark., 1991). S1'in Shine-Dalgarno dizisinin hemen yukarısındaki mRNA'da yer alan 11 nükleotit ile doğrudan etkileşimine yönelik kanıtlar, mRNA'nın 5' bölgesinin tanınmasında bu proteinin rolünü açıklamaktadır (Sengupta ve ark., 2001). Sadece serbest S1 değil 30S alt ünitesi içindeki S1'de bu tanımada rol oynayabilmektedir. Ribozomal S1 ve IF3 translasyona başlama kompleksleri ve onların liderli mRNA ile kararlı ilişkisinde vazgeçilmez görülürken (Boni ve ark.,1991); aksine, lidersiz mRNA'larda S1 görünüşe göre translasyona başlama süresince IF3 tarafından ortaya konulan kararsızlaştırıcı etkiye katkıda bulunmaktadır (Moll ve ark., 2002).

1.4 Bakterilerde Protein Taşınması

Proteinlerin biyolojik membranlara karşı taşınması hücre yaşamının en temel özelliklerinden biridir. Membrandan taşınmaya yönelecek proteinler, normalde sinyal peptitler olarak isimlendirilen ve proteini membrandaki özgül bir taşıma kompleksine yönlendiren amino-uçlarındaki sinyal dizilerle birlikte sentezlenir. Sinyal dizi taşıma olayı sırasında bir süre sonra taşınan proteinden ayrılır.

Bütün bakteriler bir lipid tabakası tarafından çevrilmiş bir sitoplazmaya sahiptir. İlave olarak Gram-pozitif bakteriler kalın bir peptidoglikan tabakası tarafından korunurken; Gram-negatif bakteriler ise çok daha ince ve daha farklı yapılaşmış bir peptidoglikan tabakası ile asimetrik bir lipid-tabakası tarafından

oluşturulan ekstra bir dış membrana sahiptir. Sitoplazmik membran ve dış membran arasında kalan boşluk periplazma olarak adlandırılır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Bir Gram-negatif bakterinin genel görünüşü ve yeni sentezlenen proteinlerin yerleşim tercihleri. Oklar bakteri membranının içini ve dışını işaret etmekte olup; peptidoglikan tabaka membranlar arasındaki boşluğa yerleşmiştir. Turuncu oklar bir proteinin takip edebildiği farklı rotaları işaret etmektedir (Strauch, 2007).

Birçok bakteri degradatif enzimler, toksinler ve diğer patojenik faktörler gibi proteinleri hücre dışı ortama salgılar (Fernandez ve Berenguer, 2000). Gram-negatif bakterilerde ise salgılanan proteinler hücre zarının esasen kompozisyonu ve işlevi açısından iki farklı membran ile karşılaşmak zorundadır (Koebnik ve ark., 2000). Buna göre ribozomdan çıkan protein farklı rotaları takip edebilir ve farklı yerlere varabilir. Eğer protein sitoplazmaya yönlendirilmemişse, periplazmik yüzeye mi yoksa hücre dışı yüzeye mi yerleşeceğine bağlı olarak iç veya dış membrana ya da bu membranlardan biri veya her ikisine doğru yönelebilir.

Tip I, II, III, IV ve V sekresyon yolakları Gram-negatif bakteriler arasında oldukça yaygın olup; mekanizmaları önemli oranda farklıdır. Farklılıklarına karşın, bu sistemler genelde hücre zarının bariyer işlevinden ödün vermeksizin sekresyonu teşvik etmeye ve kendilerine ait substratları özgül bir biçimde tanımaya gereksinim duyarlar (Koster ve ark., 2000). Tip I ve tip II, çoğunlukla *E. coli* K-12 ve B soylarında rekombinant protein sekresyonu için kullanılan mekanizmalardır. Tip III sekresyon yolağı ise birçok patojenik Gram-negatif bakteri için karakteristiktir

(Cornelis ve Van Gijsegem, 2000). Tip IV sekresyon genellikle bakteriyel konjugasyon sistemlerinde bulunan yolakları kapsar (Pallen ve ark., 2003). Tip V ise ototransporter ve iki-partner sekresyon sistemlerini içerir (Pallen ve ark., 2003). Bunun dışında besiyeri ortamına protein sekresyonu, periplazmik içeriğin sızıntısı aracılığıyla da meydana gelebilir ve bu nedenle sekresyon daima spesifik taşıma mekanizmaları aracılığıyla olmak zorunda değildir.

E. coli'de protein sekresyonu kompleks bir süreç olup (Economou, 1999; Pugsley, 1993), rekombinant proteinlerin sekresyonuyla ilgili teşebbüslerde birçok problem ile karşılaşılmaktadır. Bunlardan sıklıkla en fazla görüleni iç membrana karşı tamamlanmamış translokasyon (Baneyx, 1999), taşıma sisteminin yetersiz kapasitesi (Mergulhao ve Monteiro, 2004; Mergulhao ve ark., 2004a; Rosenberg, 1998) ve proteolitik degredasyondur (Huang ve ark., 2001). *E. coli*'de birçok faktör rekombinant bir proteinin sekresyonunu etkileyebilir. Protein büyüklüğünün sekresyon etkinliğini etkileyebildiği (Koster ve ark., 2000) ve büyük sitoplazmik proteinlerin taşınmasının fiziksel olarak mümkün olmadığı (Baneyx, 1999; Feilmeier ve ark., 2000) bildirilmiştir. Lider peptitin (Khokhlova and Nesmeyanov, 2004) ve hedef proteinin (Kajava ve ark., 2000) amino asit kompozisyonu da önemlidir.

Heterolog proteinlerin yüksek düzeyde sekresyonu için optimal bir translasyon oranı vardır (Simmons ve Yansura, 1996) ve sekresyon daha yüksek oranlarda şiddetli bir biçimde düşebilmektedir. Bu etki muhtemelen *E. coli* taşıma makinasının sınırlı sekresyon kapasitesinin bir sonucudur (Rosenberg, 1998). Bu kapasitenin üstüne çıkıldığında, eksprese edilen rekombinant proteinin fazlası genellikle inklüzyon cisimciklerinin içinde birikmektedir (Mergulhao ve Monteiro, 2004; Mergulhao ve ark., 2004). Bu nedenle translasyonun, ekspresyon düzeyini optimize eden ve promotor gücü ile genin kopya sayısını dikkatli bir şekilde dengeleyen bir hızda sürdürülmesi önemlidir (Mergulhao ve ark., 2003a, b).

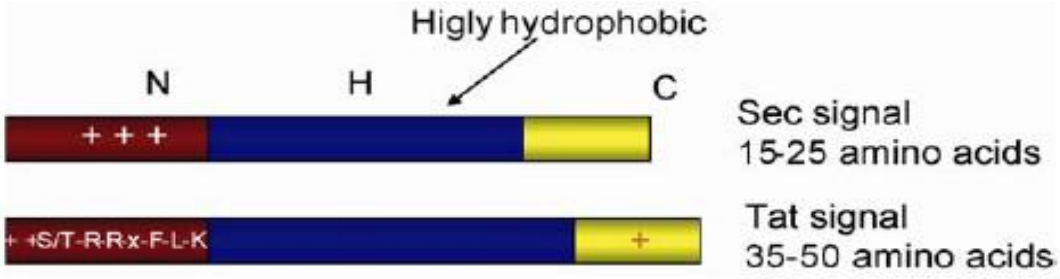
E. coli tarafından çok sayıda doğal proteini salgılamak için tercih edilen TipI ve TipII sekresyon mekanizmaları aynı zamanda rekombinant protein üretimi için de büyük oranda kullanılmaktadır. Tip II sekresyon mekanizması genel salgılama yolağı

olup; bakteriyel sitoplazmik membrana karşı sekresyonda SecB-bağımlı yolak, Tat yolağı ve sinyal tanıma partikülü (SRP) olmak üzere genellikle 3 yolak etkindir (Şekil 1.5).

1.4.1 Sitoplazmik Membrandaki Taşıma Sistemleri

1.4.1.1 Sinyal dizi

Bir membrana karşı taşınan birçok protein N-ucunda bir sinyal peptite sahip bir öncül olarak sentezlenir. Sinyal peptitler evrimsel olarak iyi korunmuş N-terminal uzantılardır. Bir sinyal peptit 3 farklı bölgeye sahiptir (Şekil 1.4). N bölgesi pozitif bir yük taşırken; hidrofobik H-bölgesi merkezi ve sinyal peptitin en uzun parçasını oluşturur. Tat sinyal peptitlerinin H-bölgesi daha az hidrofobik bir karaktere sahiptir ve tipik olarak Sec sinyal peptitlerine görece daha uzundur. Tat sinyal peptitlerinin N-terminal pozitif yüklü bölgesi S/T-**R**-**R**-x-F-x-K korunmuş dizisi ile karakterize edici iki arjinin amino asiti içerir. Sec ve Tat sinyal peptitlerinin her ikisinde de C-bölgesi sinyal peptidaz tip I tarafından tanınan sinyal peptidaz kesim bölgesi taşır (Paetzel ve ark. 2002). Genellikle, Tat sinyal peptitleri Sec'den kaçış dizisi (Sec avoidance sequence) olarak tarif edilen bir bölge içinde bir lizin ya da arjinin rezidüsü içerir (Blaudeck ve ark., 2003). Daha pozitif yüklü bir C-bölgesine ve olgun proteinin başlangıç kısmına sahip bir sinyal dizi, Sec yolağına yönelmemek için daha yüksek şansa sahiptir (Tullman-Ercek ve ark., 2007).



Şekil 1.4. Sinyal peptitler. Sec ve Tat sinyal peptitleri arasındaki karşılaştırma. N, H ve C bölgesi belirtilmiştir. Bir Tat sinyal peptitinin C-bölgesi içindeki pozitif yük, Sec'den kaçış sinyali olarak işaretlenmiştir (Tullmann, 2006).

1.4.1.2 SecB-bağımlı yolak

Sec sistemi prokaryotlar ve ökaryotlar tarafından proteinleri sitoplazma içindeki sentezlendikleri yerden sitoplazmik ya da endoplazmik retikulum (ER) membranına karşı taşımada kullanılır. *E. coli*'de salgılanan proteinler ve membran proteinlerinin büyük bir çoğunluğu translokaz olarak adlandırılan multimerik bir enzim kompleksinin yardımıyla iç membrana yerleşmekte ya da iç membrana karşı taşınmaktadır (Osborne ve ark., 2005). Bu enzim kompleksinin çekirdeği, iç membranda yüksek oranda korunmuş bir protein-iletici kanal oluşturan SecY, SecE ve SecG proteinleri tarafından oluşturulur (SecYEG), ve ATPaz SecA motor proteini (Economou ve ark., 1994), periferal olarak sitoplazmik taraftan bu SecYEG kompleksine bağlanır (Hartl ve ark., 1990). Diğer bileşenlerin (SecD, SecF, YajC) rolü tam olarak anlaşılamamakla birlikte; söz konusu Sec bileşenlerinin düzenlenmesinde gerekli olabilecekleri önerilmektedir (Economou ve ark, 1994; Hartl ve ark, 1990).

Protein substratlar translasyonla eş zamanlı ya da translasyon sonrasında taşınırlar. *E. coli* iç membran proteinleri SRP tarafından translasyonla eş zamanlı taşınmaya yönlendirilirken; periplazmik, dış membran ya da salgılanan proteinler SecB tarafından translasyon sonrası taşınmaya yönlendirilir (Luirink ve ark 1994). Sec yolağında, salgılanan proteinlerin ribozomla ilişkili ilk sentezlenen zincirleri, ribozomlara bağlı tetikleyici faktöre bağlanır. Bu ilişki öncül protein ribozomdan

ayrılıncaya kadar sürdürülür. Böylece SRP bileşenlerinin ilk sentezlenen zincire translasyonla eş zamanlı bağlanması önlenir (Maier ve ark., 2003). SecB yolağı aynı zamanda rekombinant protein üretimi için kullanılan en genel yolaktır.

E. coli SecB proteini, salgılanan proteinlerin biyogenezinde gerekli sitoplazmik bir şaperondur (Laskowska ve ark., 2004). SecB homogları Gram-negatif bakterilerde bulunmakla birlikte; Gram-pozitif bakteriler, arkealar ve ökaryotlarda yoktur. Daha önceki çalışmalar SecB'nin galaktoz bağlayıcı protein, maltoz bağlayıcı protein, OmpA, OmpF, OppA ve PhoE'nin etkili translokasyonu için gerekli olduğunu; β-laktamaz, PhoA ve riboz bağlayıcı proteinin translokasyonunun ise SecB'den bağımsız olduğunu göstermiştir (Marani ve ark., 2006; Laskowska ve ark., 2004; Peltier ve ark., 2002; Bessonneau ve ark., 2002; Traxler ve ark., 1996). Salgılanan proteinler öncül proteinle etkileşime geçerek onun erken katlanmasını önleyen (Khokhlova ve Nesmeyanov, 2003) ve SecA'ya yönlendiren SecB şaperonu aracılığıyla translokasyona yeterli safhada tutulur (de Gier ve Luirink, 2001).

Öncül proteinin varlığında, SecB SecA'ya bağlanır (Fekkes ve ark., 1998), dolayısıyla serbest kalan öncül protein SecA'ya transfer edilir (Fekkes ve Driessen, 1999). SecA'nın öncül proteine bağlanması onu spesifik olarak tanıyan sinyal peptit aracılığıyla kolaylaştırılır (Kebir ve Kendall, 2002). Bu noktada SecA SecYEG kompleksinin SecY alt ünitesine bağlanır. SecA üzerindeki iki ATP-bağlanma alanından birine ATP'nin bağlanması SecB'nin membrandan ayrılmasına neden olur (van der Wolk ve ark., 1998). Sec bileşenlerinin nasıl işlevsel bir translokon oluşturduğu üzerine bir fikir birliği bulunmamakta olup (Pugsley ve ark., 2004), monomerik (Yahr ve Wickner, 2000), dimerik (Tziatzios ve ark., 2004) ve oligomerik (Manting ve ark., 2000) translokonlar önerilmektedir.

Öncül proteinin membrana-bağlı SecA'ya bağlanması yaklaşık 20 amino asitin translokasyonu ile sonuçlanırken, sonrasında ATP'nin SecA'ya bağlanması, SecA'nın membrana yerleşmesini ve ilave 15-20 amino asitin daha translokasyonunu teşvik eder. ATP hidrolizi, SecA'dan öncül proteinin translokasyon kanalına bırakılmasını sağlar (Driessen ve ark., 1998). ADP serbest kalır ve SecA sitozolik

SecA ile değiş-tokuş olabileceği yerde membrandan çıkar. SecA'nın membrana yerleşmesi ve çıkmasını takip eden çok sayıdaki döngüsü translokaz kanalı aracılığıyla protein translokasyonunu teşvik eder (de Keyzer ve ark., 2003b; Economou, 1999). Proton-itme gücü (proton-motive force, PMF) öncül proteinin translokazdan geçişini, yarı yoldayken SecA'nın yokluğunda sağlayabilir (Nishiyama ve ark., 1999). PMF'nin translokasyonu sürdürme mekanizması bilinmemekle birlikte; protein translokasyonunun başlama fazına yardımcı olduğu (Mori and Ito, 2003) ve SecA'nın membrandan çıkmasını hızlandırdığı önerilmektedir (Nishiyama ve ark., 1999; van der Wolk ve ark., 1998). Bu sistemde ATP ve GTP'ye ilave olarak PMF'in her iki bileşeni, ΔpH ve ΔΨ translokasyon için gereklidir.

Sec sistemi rekombinant protein üretimi için geniş oranda kullanılmasına rağmen, ciddi bir engeli vardır. Bu sistem katlanmış proteinleri taşıyamaz ve bu yüzden taşıma büyük oranda translasyon sonrası olup, sitoplazma içinde hızlı katlanan proteinlerin sekresyonu sorun yaratır. Bu durumda proteinler SRP ya da TAT yolaklarına yönlendirilmelidir.

1.4.1.3 SRP yolağı

E. coli SRP, 4.5S RNA ve protein Ffh olmak üzere iki esas bileşenden oluşan bir ribonükleoprotein komplekstir. Sinyal tanıma partikül (SRP) yolağı, *E. coli* tarafından birincil olarak iç membran proteinlerinin yönlendirilmesi için kullanılır (Economou, 1999). Bu sistem Mtla-OmpA füzyonları (Neumann-Haefelin ve ark., 2000), MalF-LacZ füzyonları (Tian ve ark., 2000), maltoz-binding protein, kloramfenikol asetil transferaz (Lee ve Bernstein, 2001; Peterson ve ark., 2003) ve hemoglobin proteaz (Sijbrandi ve ark., 2003) gibi birçok rekombinant proteinin sekresyonunda keşfedilmiştir.

SRP yolağı çok sayıda protein ve bir RNA molekülü içerir. SRP, substratlarını hidrofobik bir sinyal dizinin varlığı aracılığıyla tanır (bu yüzden sinyal tanıma partikülü adını almıştır). Yüksek oranda hidrofobik bir merkezi çekirdeğe sahip olan N-terminal bir sinyal dizinin tetikleyici faktör (SecB sisteminde yer alan) bağlanma

alanının eksikliği ile birlikte varolması (Patzelt ve ark., 2001), ilk sentezlenen zincirin Ffh'a translasyonla eş zamanlı olarak bağlanmasıyla sonuçlanır (Beck ve ark., 2000). Öncül protein ve Ffh arasındaki üretici bir etkileşim için 4.5S RNA gereklidir (Herskovits ve ark., 2000). SRP ve sinyal dizi arasındaki etkileşimin ilk sentezlenen zincirin hidrofobisitesine bağlı olduğu ve bu nedenle sinyal dizisi daha fazla hidrofobik olan öncül proteinlerin translokasyonunun daha yüksek etkinlikte yapıldığı önerilmiştir (Fekkes ve Driessen, 1999). SRP'nin tetikleyici faktörün bağlanma bölgesiyle örtüşen bir alanda ribozoma bağlandığı gösterilmiştir (Gu ve ark., 2003). Buna göre ilk sentezlenen peptidin özelliğine bağlı olarak SRP ya da tetikleyici faktörün bağlanması stabilize edilmekte, dolayısıyla peptidin membrana SRP yolağı aracılığıyla mı ya da translasyon sonrasında SecB yolağı tarafından mı yöneleceği belirlenmektedir (Gu ve ark., 2003).

Rekombinant protein üretiminde, SRP'ye yönelme sinyal dizinin hidrofobisitesi değiştirilerek başarılabilir (Peterson ve ark., 2003). Bu olay hedef proteinin sitoplazma içinde çok hızlı katlandığı durumlarda, SecB-bağımlı sistem ile sekresyon için uyumsuz bir konformasyona adaptasyonda avantajlıdır (Lee ve Bernstein, 2001).

1.4.1.4 TAT yolağı

Birçok bakteri Sec sisteminden oldukça farklı ikinci bir genel protein taşıma yolağına daha sahiptir (Berks, 1996; Santini ve ark., 1998; Weiner ve ark., 1998). Sec-bağımsız bu yolak, öncüllerin iki ardışık ve değişmez arginin rezidüsü içeren, karakteristik bir dizi motifine sahip sinyal peptitleri aracılığıyla bu yolağa yönelmeleri nedeniyle, Tat (twin-arginine translocation) sistem olarak adlandırılır. Tat yolağı bakterilerde yaklaşık 15 yıl (Berks 1996), bitkilerin tilakoid membranında ise 20 yıl önce (Cline ve ark. 1992) keşfedilmiştir. Tat poru aracılığıyla protein translokasyonunun detaylı mekanizması hakkındaki bilgi sınırlıdır. Tat yolağı katlanmış proteinleri iç membrana karşı (Stanley ve ark., 2000) ATP'den bağımsız olarak (Yahr ve Wickner, 2001) ve transmembran proton itici güç kullanarak (de Leeuw ve ark., 2002) taşıyabilir.

Bu yolak, birçok bakteride, arkealarda ve bitkilerin kloroplastlarında oldukça korunmuştur. Bununla birlikte çoğunlukla ökaryot mitokondrisinde korunmamış olup sadece birkaç protozoa mitokondriyal genomunda Tat bileşenlerini kodlamaktadır. Tat yolağı antikor fragmanları (De Lisa ve ark., 2003); glukoz-fruktoz oksidoredüktaz (Blaudeck ve ark., 2001), riboz bağlayıcı protein (Pradel ve ark., 2003), alkalin fosfataz (Masip ve ark., 2004) ve Yeşil Floresans Protein (Barrent ve ark., 2003) olmak üzere birçok rekombinant proteinin sekresyonunda kullanılır.

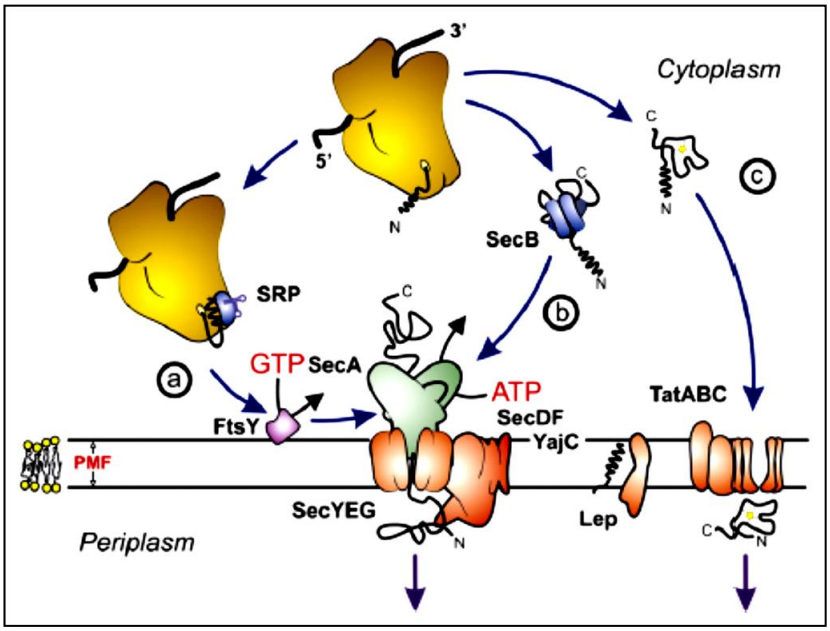
Pek çok durumda bu yolağın substratları olan proteinler sitoplazmada bulunan çok sayıdaki kofaktörden birine bağlandığı ve bu sayede taşınmadan önce katlandığı için; bakteriyel Tat yolağı orijinal olarak taşınmadan önce sitoplazmadaki kofaktör moleküllerini bağlayan proteinleri taşıma yeteneği aracılığıyla tanınır (Berks, 1996). Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalar Tat sisteminin proteinlerin diğer tiplerinin taşınması için de eşdeğer öneme sahip olduğunu göstermiştir (Dilks ve ark., 2003).

Gram-negatif bakterilerde, Tat sistem temelde minimal olarak TatABC alt ünitelerinden oluşmakla beraber; aynı zamanda tatABC operonunun dışındaki bir monosistronik gen tarafından kodlanan bir TatE alt ünitesini de içermektedir. Fakat bu alt ünite minor öneme sahip bir TatA paraloğu olduğu görülmektedir (Sargent ve ark., 1999). TatABC genleri operonda dördüncü bir gen TatD ile birlikte bulunsa da; TatD'nin DNAaz aktivitesi içeren ve translokasyonda gerekli olmayan sitoplazmik bir protein olduğu gösterilmiştir (Wexler ve ark., 2000).

Mevcut modelde TatA homo-oligomerizasyon aracılığıyla por-oluşturan alt ünite olarak tanımlanırken; TatB TatC ile sıkı bir kompleks oluşturmakta (Bolhuis ve ark., 2001) ve TatBC substratı tanıyan ve taşıyan araç olarak tanımlanmaktadır. Polipeptit substratlar, lider peptit dizilerinde RR-motifine sahip öncül proteinler olarak sentezlenirler. Bu proteinler translokasyona hedef olmadan ve taşınmadan önce uygun konformasyonu alacak şekilde katlanırlar (Feilmeier ve ark., 2000). Katlanmamış proteinler tanımlanmamış bir kalite kontrol mekanizması aracılığıyla TatBC reseptör kompleksi tarafından geri çevrilirler (Barrett ve ark., 2005). Substratlar sitoplazmik membrana yönelerek, tam olarak bilinmeyen bir sıralamayla

fosfolipidler ve TatBC reseptör kompleksi ile ilişki kurarlar (Palmer ve Berks, 2003). Sinyal peptitin bağlanması meydana geldiğinde proton itici güç (PMF) TatBC kompleksi ve TatA oligomerleri arasındaki ayrılmayı teşvik eder. PMF aynı zamanda TatA oligomerlerinin oluşumu için de gereklidir (Fröbel ve ark., 2011). Katlanmış öncül protein daha sonra TatA kanalına transfer edilerek lider peptit kesilir. Translokasyonu takiben TatA, TatBC kompleksinden ayrılır (Palmer ve ark., 2004).

Tat yolağı aracılığıyla taşınmanın Sec yolağından daha az etkili ve daha yavaş olduğu gösterilmiştir (Santini ve ark., 1998). İlave olarak bu yolak vasıtasıyla translokasyon, yüksek düzeyde enerji sarfiyatı nedeniyle sekresyon için aşırı olabilmekte ve bu da doğasında var olan düşük kapasiteyi açıklamaktadır (De Lisa ve ark., 2004). Bu dezavantajlarına karşın; Tat yolağı SecB ya da SRP yolaklarına benzemeksizin katlanmış proteinleri iç membrana karşı taşıyabilme kapasitesine sahiptir (De Lisa ve ark., 2003).



Şekil 1.5. *Esherichia coli* Sec- ve Tat translokazlarının şematik gösterimi. a) translasyonla eş zamanlı, b) translasyon sonrası hedeflenen rotalar ve Sec-translokaz aracılığıyla katlanamayan proteinlerin translokasyonu. c) Tat translokaz aracılığıyla katlanmış öncül proteinlerin translokasyonu (Natale ve ark., 2008).

Ayrıca bu sekresyon yolakları dışında uygulanan bir takım stratejiler ile *E. coli*'de hücre dışına salgılama (extracellular secretion) mümkün olabilmektedir. *E. coli*'de hücre dışına sekresyon; saflaştırma ve sonraki süreçleri basitleştirmesi, daha az proteoliziz, iyileştirilmiş protein katlanması ve disülfit bağı oluşumu, salgılanan proteinlerin artan çözünürlüğü ve biyoaktivitesi ile ekspres edilen polipeptitin N-ucunun gerçekliği açısından avantajlıdır (Gottesman, 1996).

Dış membranın geçirgenliğini artırmak için uygulanan stratejiler mekaniksel (ultrasonik), kimyasal (magnezyum, kalsiyum, EDTA, glisin ve Triton X-100) ve enzimatik (lizozim) muameleleri içermektedir (Choi ve Lee, 2004). Hücre dışına salgılama çeşitli fiziksel ve kimyasal parametreler (sıcaklık, kültür ortamının içeriği, pH ve havalandırma) ya da membran bileşenlerinin üremeyle-eşleşen etkilerinin avantajı dikkate alınarak (Rinas and Hoffmann, 2004) artırılabilir. Rekombinant protein üretimi membran üzerindeki geçirgenliği uyarabilir (Pugsley ve ark., 1997), onun seçici geçirgenliğini artırarak (Slos ve ark., 1994) sızıntıyı kolaylaştırabilir. Rekombinant protein sekresyonu için sızıntı yapan soyların kullanılması da (Örn. dış membran bileşenlerinin sentezinde bozukluk gösteren mutantlar) diğer bir uygulamadır.

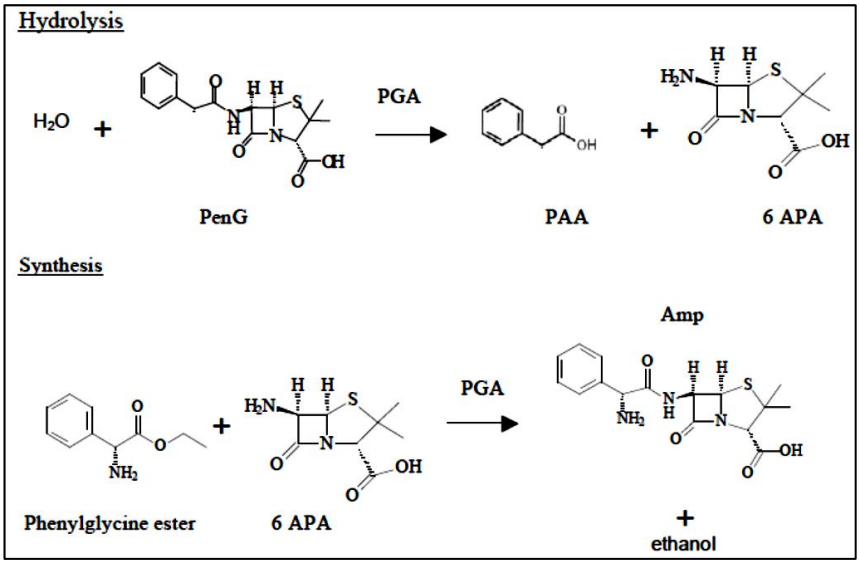
1.5 Penisilin Asilaz (PA)

Penisilinler yıllık üretimleri ve reçetelerde kullanım sıklıkları nedeniyle, giderek artan miktardaki alternatif antimikrobiyallerin varlığına karşın, en önemli antibiyotiklerdir (Penalva ve ark., 1998). Bu antibiyotiklerin aşırı kullanımı patojenlerde dirençlilik gelişimine yol açmakta ve dirençlilik probleminin üstesinden gelebilmek için daha yeni yarı-sentetik antibiyotikler üretilmektedir. Penisilin asilazlar, penisilinlerin yarı-sentetik penisilinlerin büyük bir kısmının yapıldığı β-laktam nukleusu olan 6-APA'ya hidrolizini katalizleyen enzimler olarak kullanılır.

Penisilin asilazlar substrat özgüllüğüne dayanılarak üç gruba ayrılmıştır: Tip I enzimler tercihen penisilin V'yi, tip II enzimler birincil olarak penisilin G'yi ve tip III enzimler ise ampisilini hidroliz ederler. Günümüze kadar endüstriyel olarak

kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu *E. coli* soyları ATCC 9637 ve ATCC 11105'den izole edilen tip II enzimlerdir.

Penisilin G asilaz (PA, benzilpenisilin asilaz, penisilin amidaz, penamidaz, açil transferaz, penisilin parçalayıcı ya da sentezleyici enzim, benzil penisilin amidohidrolaz, EC 3.5.1.11) yarı-sentetik β-laktam antibiyotiklerin üretimi için kullanılan değerli bir biyokatalisttir. PA endüstriyel olarak önemli bir ara form olan 6-amino-penisillanik asiti (6-APA) ve fenilasetik asiti üretmek için penisilin G'yi hidroliz etmede kullanılır. Aynı zamanda 6-APA ile fenilglisin ya da hidroksifenilglisin etil esteri kullanılarak yarı sentetik β-laktam türevleri ampisilin ve amoksisilinin sentezini katalizlemek için de kullanılmaktadır (Ulijn ve ark., 2002; Goncalves ve ark., 2002) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PA'nın katalizlediği reaksiyonlar. PAA: Fenilasetik asit, 6-APA: 6-amino-penisillanik asit, PenG: Penisilin G, Amp: Ampisilin.

PA, *E. coli* (Cole, 1969), *Kluyvera citrophila* (Barbero, 1986), *Providencia rettgeri* (Klei, 1995) ve *Alcaligenes faecalis* (Verhaert, 1997) gibi gram-negatif bakterilerde periplazmik yüzeyde birikirken; *Arthrobacter viscosus* (Ohashi, 1989) ve *Bacillus megaterium* (Chiang, 1967) gibi gram-pozitif bakterilerde hücre dışına salınmaktadır. Bunların yanı sıra son zamanlarda *Bacillus sp*. soyuna ait hücre içi bir PA'nın varlığı da bildirilmiştir (Rajendhran, 2002).

Maya, mantar, gram negatif ve pozitif bakterileri içeren mikrobial dünyada yaygın olan bu enzimin *in vivo*'daki rolü ise henüz kesinlik kazanmamış olup, *E. coli*'de *in vivo* ekspresyonunun hem sıcaklık ve hem de fenilasetik asit tarafından düzenlenmesi ve *pac* geninin 4-hidroksifenilasetik asit kümesine yakın olması (Prieto ve ark., 1996) nedeniyle, enzimin organizmaların 'serbest-yaşayan' formlarında, karbon kaynağı olarak aromatik bileşiklerin asimilasyonu için gerekli olabileceği üzerinde durulmaktadır (Valle ve ark., 1991).

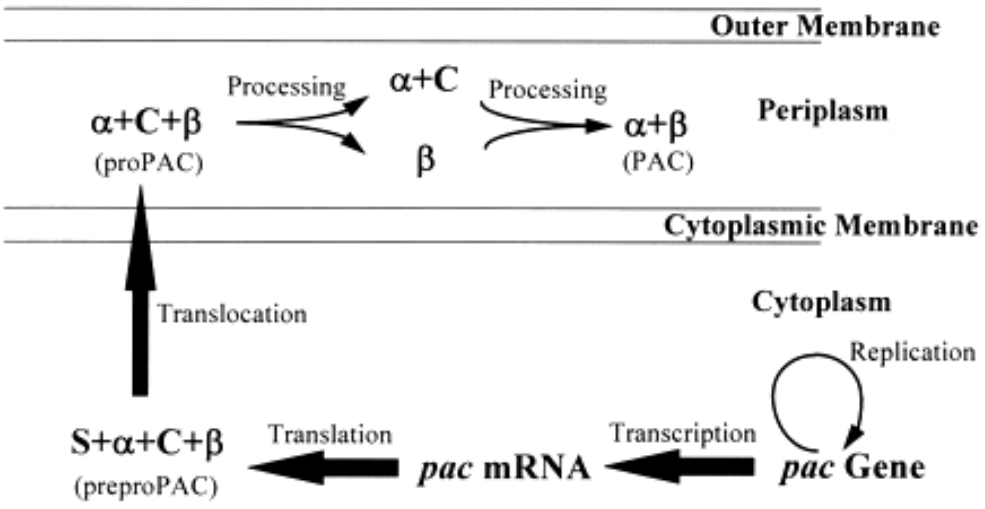
1.5.1 PA'nın Yapı ve İşlevi

E. coli'ye ait PA, iki alt üniteden (α- ve β- alt tüniteleri, sırasıyla 24 ve 63 kDa) oluşan periplazmik heterodimerik bir enzimdir (Lee ve ark., 2000). Olgun enzim periplazmada yer almakta olup, PA'nın oluşumu translokasyon ile periplazmik işlenme/katlanma adımlarını da içeren bir seri translasyon sonrası basamağı gereksinmektedir (Sizmann ve ark., 1990). *E. coli* ATCC11105'e ait *pac* yapısal geni bir sinyal peptit (S), α alt ünitesi (α), birleştirici peptit (C) ve β alt ünitesi (β) olmak üzere yaklaşık 95 kDa'luk öncül bir polipeptidi (preproPA) kodlamaktadır.

Öncül enzim periplazmik yüzeye taşınarak, periplazmada birleştirici peptidi uzaklaştırmak ve olgun enzimi üretmek için otokatalitik olarak işlenir (Kasche ve ark., 1999). Periplazmik işlenme mekanizması, ilk olarak proPA'nın kesimi için (bağlayıcı peptit ve β-alt ünitesi arasındaki kesim yerinden) molekül içi otoproteolizizi, sonrasında ise iki ya da üç adımdan oluşan ardışık C-terminal proteolitik işlenme aracılığıyla α-alt ünitesinden birleştirici peptidin uzaklaştırılmasını içermektedir (Kashe ve ark., 1999; Sizmann ve ark., 1990, Chou ve ark., 2000). Proteolitik kesim alanları Ala-235-Ala236 ve Thr-289-Ser-290 çiftleri arasına yerleşmiştir (Oh ve ark., 1987).

Buna göre, sinyal peptit preproPA'nın periplazmaya taşınmasını yönlendirmekte ve translokasyondan sonra PA öncülünün diğer bir tipini (proPA, 92 kDa) oluşturacak şekilde uzaklaştırılmaktadır. Periplazmik işlenmeyi birleştirici peptidin atılması izlemekte ve iki alt ünite (α, 24 kDa ve β, 63 kDa) olgun PA'nın

oluşumu için hazır hale gelmektedir (Şekil 1.7). α ve β alt ünitelerinden oluşan olgun PA'da her iki alt ünitenin de enzimatik aktivite için gerekli olduğu ispatlanmıştır (Bock ve ark., 1983). Bu çeşit bir olgunlaşma süreci viral proteinlerin ya da ökaryotik polipeptit hormonların oluşumunda görülmekte olup; nadiren bakterilerde bulunmaktadır. Bununla birlikte her bir işlenme adımı süresince gerekli olan enzimler ve bunların hücre içindeki yerleşimi halen tam olarak tanımlanmamıştır (Şekil 1.7).



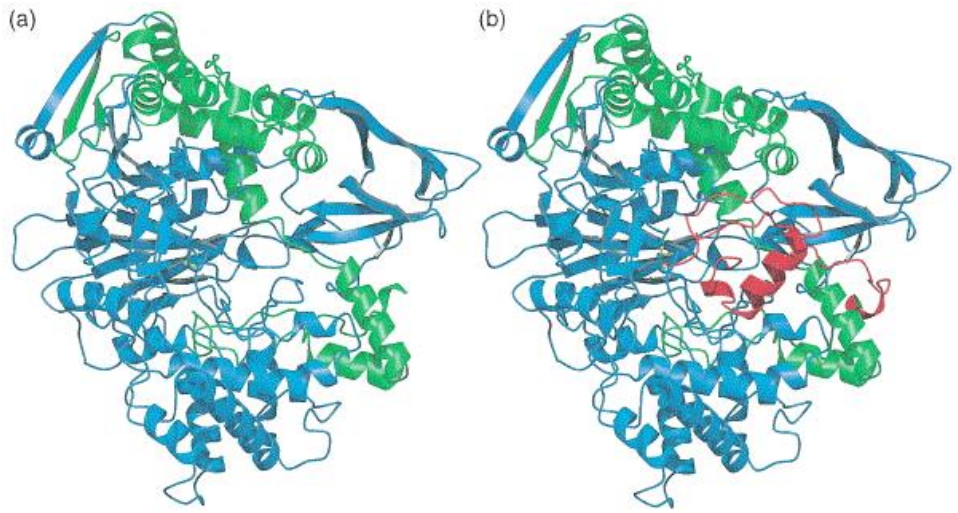
Şekil 1.7. *E. coli*'de PA'nın sentezi ve işlenmesi (Chou ve ark., 1999).

E. coli penisilin asilaz geninin yapısı ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda 26 amino asit uzunluğundaki sinyal peptitin periplazmaya translokasyon için gerekli olduğu ve taşınma sonrası Ala26-Glu27 arasından kesildiği önerilmiştir. Sinyal peptit uzun bir hidrofobik bölge, proteaz kesim yerinden hemen önce yüklü olmayan aminoasitler ve lider peptitlerin amino ucuna özgü üç adet pozitif yüklü amino asit içermektedir. PA'nın işlenmesi ökaryotik preprohormonların örneğin, insülinin işlenmesine analog olmakla birlikte; ökaryotlarda kesim yerlerinin sıklıkla dibazik rezidüler arasında yer alması nedeniyle, kesim yerlerinin özgüllüğü açısından, tipik ökaryotik prohormon kesiminden farklılık göstermektedir (Bruns ve ark., 1985).

In vitro'da PA alt birimlerinin yeniden katlanmasına yönelik çalışmalar, heterodimer katlanması süresince α-alt biriminin anahtar bir rol oynadığını

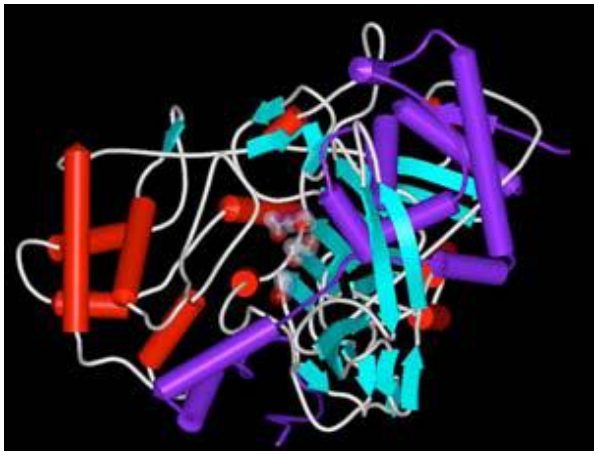
düşündürmüştür. Ancak protein alt birimlerinin sitoplazmada ayrı ayrı ekspres edildiği durumda, işlevsel enzimin başarılı bir şekilde oluşması (Burtscher ve Schumacher, 1992), aynı polipeptit öncülü içindeki α-alt biriminin varlığının, β-alt biriminin katlanmasına yardım için gerekli olmadığına işaret etmiştir (Flores ve ark., 2004). Kinetik ve biyokimyasal çalışmalar PA enziminin en yüksek özgül aktiviteyi fenilasetil yan zinciri için gösterdiğini, penisilin yan zinciri için özgüllüğün küçük alt üniteye yerleştiğini ve büyük alt birimin enzimin katalitik aktivitesinde anahtar rol oynayan bir fenilmetan-sülfonil florid (PMSF)-duyarlı serin rezidüsüne sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Daumy ve ark., 1985). Endopeptitin ise *in vivo*'da protein katlanması için gerekli olabileceği önerilmektedir (Schumacher ve ark., 1986). Yapılan deneylerle endopeptitin boyunun işlenme ve katlanmanın doğru bir biçimde gerçekleşmesi için önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Sizmann ve ark., 1990).

PA, Ntn katlanması olarak bilinen iki anti-paralel β tabakasıyla dört katmanlı bir α+β yapısı içinde katalitik rezidü olarak (bu durumda, β-Serin1) aktivite gösteren N-terminal bir nükleofilden oluşan **N**-terminal-**n**ukleofil hidrolazlar ailesine aittir (Brannigan ve ark., 1995) (Şekil 1.8). PA'nın kristal yapısı, enzimin dimerik, öncül ve substrat-bağlı formları için bilinmektedir (Duggleby ve ark., 1995; Done ve ark., 1998; Alkema ve ark, 2000; Hewitt ve ark., 2000; McVey ve ark., 2001) (Şekil 1.9)



Şekil 1.8. PA'nın ikincil yapısal elementlerini, α-heliksler ve β-tabakalarını gösteren şekli. a) Olgun enzim (McVey, 1999). b) Öncül: A domain yeşil, B domain mavi ve birleştirici peptit kırmızı renktedir. N-terminal nükleofilik serin rezidüsü sarı bir top olarak gösterilmiştir (BOBSCRIPT, Esnouf, 1997).

Katalitik serinin sisteine modifiye edilmesi (Choi ve ark., 1992) enzimi inaktif hale getirirken; treonin, arginin, glisin ya da alanin (McVey, 1999) ile yer değiştirmesi enzimin *in vivo* işlenmesini önlemektedir (Choi ve ark., 1992). Bu nedenle yapılan çalışmalarla Ser290'nın *E. coli* W'yi de içeren birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteride kesinlikle, Lys299'un ise çoğunlukla korunmuş olduğu gösterilmiştir. Lys299 ve Ser290, PA öncülünün otokatalitik işlenmesinde kritik öneme sahip rezidülerdir. Bu iki birbirine yakın rezidünün periplazmada otokatalitik işlenmenin pH bağımlı aktivasyonundan sorumlu en muhtemel adaylar olabileceği üzerinde durulmaktadır (Lee ve ark., 2000).



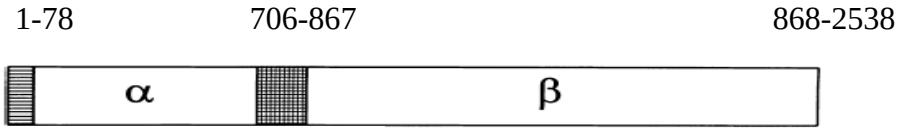
Şekil 1.9. PA enziminin kristal yapısı (Hewitt ve ark., 2000).

1.5.2 Enzimin katalitik mekanizması

PA'nın katalitik mekanizması aktif merkezdeki serinin, βS1, substratın amid ya da ester bağının karbonil karbonu üzerine nükleofilik atağı ile başlar ve bir oksianyon tetrahedral geçiş durumunun oluşumuyla sonuçlanır (Alkema ve ark., 2002, 2003). Oluşan bu oksianyon, oksianyon boşluğundaki rezidüler (Asn241:B, Gln23:B) ile ara formun negatif yüklü oksijeninin hidrojen bağı ve Ala69:B'nin peptit çatısı aracılığıyla stabilize edilir (McVey ve ark., 2001; Alkema ve ark., 2003). Geçiş durumunun bozulması açil-enzimin oluşumuyla sonuçlanır ve beraberinde ilk ürün fenilasetik asit aktif merkezden serbest kalır (Alkema ve ark., 2000). Açil-enzim ara formu daha sonra su tarafından hidrofilik bir atak ile hidroliz edilir ve benzer bir geçiş safhası aracılığıyla ikinci ürün, 6-aminopenisillanik asit (6-APA), aktif merkezden serbest kalarak, enzim yeniden üretilir (Alkema ve ark., 2002, 2003).

1.5.3 *pac* geninin ekspresyonu ve regülasyonu

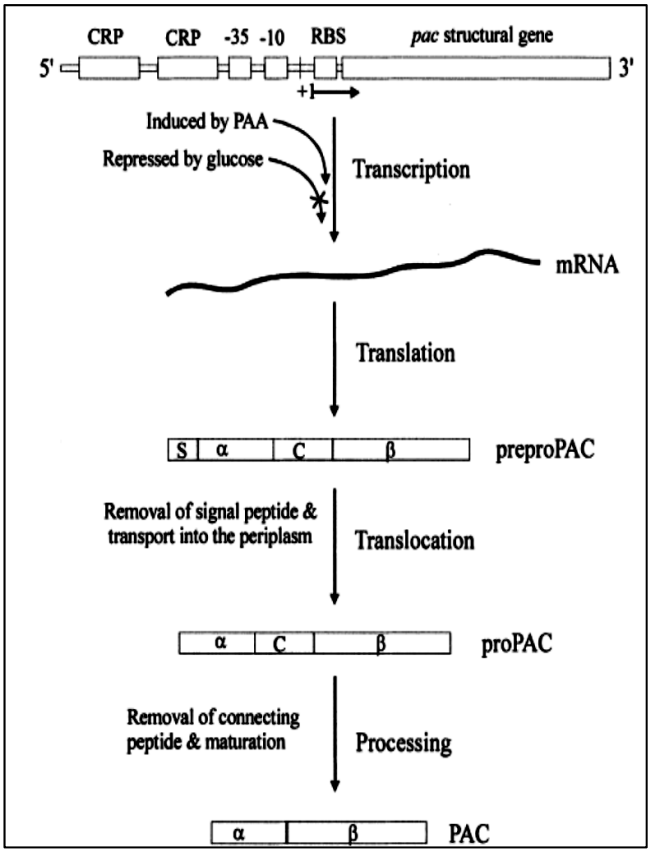
Penisilin asilaz yapısal geni (*pac*) 846 amino asiti şifreleyen 2538 nükleotitten oluşmaktadır (Schumacher ve ark., 1986). 1-78. nükleotitler sinyal peptit, 79-705. nükleotitler alfa alt birimi, 706-867. nükleotitler bağlayıcı peptit ve 868-2538. nükleotitler beta alt biriminin sentezi için kalıp oluşturur (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. *pac* yapısal geni

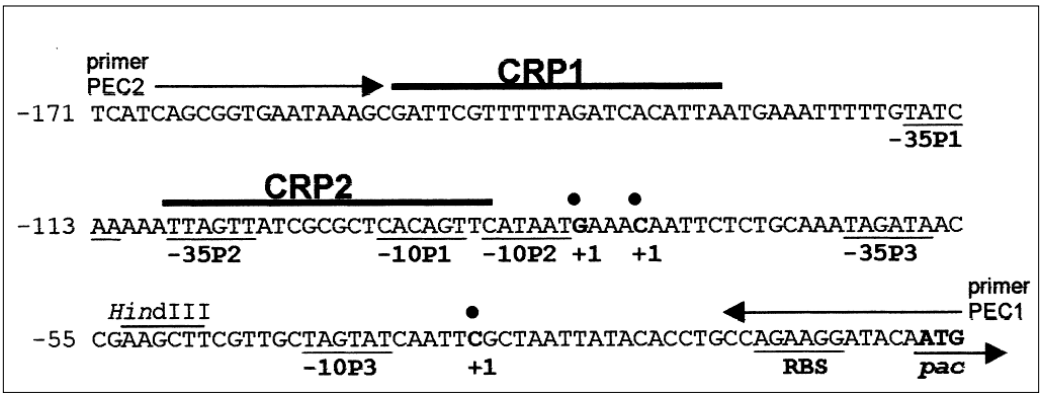
E. coli'de *pac* geninin ekspresyonunda birçok düzenleyici mekanizma rol oynamaktadır: sıcaklık baskısı, glukoz tarafından katabolit represyon, oksijen aracılığıyla represyon ve fenilasetik asit (PAA) tarafından uyarılma (Grafkova and Sobotkova, 2002) (Şekil 1.11). *E. coli* yaban-tipi soylarda *pac* geninin ekspresyonu PAA tarafından uyarılır ve glukoz tarafından baskılanırken; bu iki faktör transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu etkiliyor olarak gözükmektedir (Merino ve ark., 1992).

pac geni için işlevsel bir promotor, transkripsiyon başlangıç alanı ve iki varsayılan CRP bağlanma bölgesinin varlığı ilk kez Valle ve ark. (1986) tarafından rapor edilmiş, ilk ATG kodonundan 30 bp yukarıda genin transkripsiyona başlama noktası tanımlanmıştır. Bu bölgenin analizi transkripsiyonel düzenlemede gerekli olabilecek varsayılan iki CRP-cAMP bağlanma alanının ve üç palindromik dizinin tanımlanmasına izin vermiş olup, yapısal genin 34 bp yukarısında önerilen işlevsel bir promotorun varlığı doğrulanmıştır (Valle ve ark., 1986). Daha sonra Robas ve Branlant tarafından, Valle ve ark'nın saptadığı başlangıç alanının 2 nükleotit aşağısında farklı bir başlangıç alanı tanımlanmış (Robas ve ark., 1993), ayrıca Oh ve ark. (1987) tarafından da bu gen için Valle ve ark'nın tarif ettiği bölgeye görece daha aşağıda yer alan alternatif bir promotorun varlığı önerilmiştir.



Şekil 1.11. *pac* geninin genetik organizasyonu ve *E. coli*'de PA sentezi için gerekli olan genetik adımlar (Rajendhran ve Gunasekaran, 2004).

Katabolit represyon *pac* yapısal geninin yukarısına yerleşmiş, varsayılan CRP bağlanma alanlarının varlığıyla açıklanmaktadır (Valle ve ark., 1986). Daha sonra başka araştırmacılar tarafından da (Roa ve Garcia, 1999) genin 5' ucunda kodlayıcı olmayan yaklaşık 170 bp uzunluğundaki bölgede yer alan olası iki CRP bağlanma alanının, katabolit represyon aracılığıyla promotor düzenlenmesinde etkili olduğu önerilmiştir (Şekil 1.12). Diğer bir çalışmada ise 150 bp uzunluğundaki bir DNA segmentinin *E. coli pac* geninin transkripsiyonunun CRP ve PAA tarafından düzenlenmesi için esas olduğu bildirilmiştir (Radoja ve ark., 1999). *pac*'daki yerleşim, doğal olarak meydana gelmiş ardışık CRP-bağlanma alanlarının görüldüğü birkaç örnekten sadece biridir (Scott ve ark., 1995).



Şekil 1.12. *E. coli* W ATCC 11105 *pac* geninin 5' kodlayıcı olmayan bölgesinin dizisi. CRP1 ve CRP2, varsayılan CRP bağlanma bölgelerini işaret etmektedir. P1, P2 ve P3 promotorlarının -35 ve -10 bölgeleri altı çizili olarak gösterilmiştir. Koyu yazılmış ATG, *pac* geninin translasyona başlama kodonunu göstermektedir. RBS, ribozom bağlanma bölgesinin yerini gösterir. +1 ise promotorların transkripsiyona başlama bölgelerini temsil etmektedir (Roa ve Garcia, 1999).

PA üretimi besiyerinde %0.2 PAA varlığında uyarılırken, glukoz varlığında ve 30 °C'ın üzerindeki üreme sıcaklıklarında baskılanır (Meevootisom ve ark., 1987; Oh ve ark., 1987). PAA uyarımının *pac* transkripsiyonu için gerekli olduğu ispatlanmıştır ancak PAA düzenleme mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir (Dai ve ark., 2001).

PA genellikle optimal sıcaklık aralığı olan 24-30 °C'ta üretilirken 37 °C'ta üretilmez. Bu nedenle PA üretimi için bakteri kültürleri düşük bir sıcaklıkta (30 °C'tan az) gerçekleştirilir. Sıcaklığın bu dikkat çekici etkisi enzimin inaktivasyonu nedeniyle değildir, çünkü enzimin aktivitesi için optimal sıcaklık yaklaşık olarak 50 °C'tır (Savidge ve ark., 1975). Aktif enzim üretiminde sıcaklığa-duyarlı proteolitik işlenme göz önünde tutulmaktadır (Oh ve ark., 1987). Anti-β alt ünitesi serumu ile yapılan Western blot analizi 37 °C'ta *pac* geninin transkripsiyonunun ve translasyonunun yapıldığını fakat öncül polipeptidin doğru olmayan bir biçimde katlanmaya başladığını, daha sonra da aktif PA formuna işlenemediğini doğrulamaktadır (Dai ve ark., 2001). Pen G'nin enzimatik hidrolizi için penisilin G'nin pH, sıcaklık ve konsantrasyonunun etkisi etkileşimli olarak çalışıldığında,

optimum koşulların pH 8, 28 °C ve %12 (w/v) PenG konsantrasyonu olduğu bulunmuştur (Ghassempour, 2002).

Ayrıca *pac* operonunun, transkripsiyonel düzeyde *pac* yapısal geni içindeki yaklaşık 2 kb'lık bir bölgeye, *pac* geni transkripsiyon yönüne ters biçimde yerleşmiş olduğu düşünülen ve düzenleyici bir *pacR* geni tarafından kodlanan, 86 amino asitlik *pac*'a özgü baskılayıcı bir protein tarafından negatif olarak kontrol edildiği de önerilmektedir (Jiang ve ark., 1997). Bu baskılayıcı proteinin oto-kontrol özelliğine sahip olduğu varsayılmakta; *pacR* transkripsiyonunu sıcaklık, PAA ve farklı *E. coli* soylarına göre değişebilen oranlarda etkileyebilmektedir (Dai ve ark., 2001). Bununla birlikte promotorsuz bir *lacZ*, *pac* geni promotoru ile füzyona uğratıldığında, β-galaktozidaz ekspresyonu PAA tarafından uyarılmaya başlar (Rao ve ark., 1999). Bu sonuç *pac* geninin bütünsel olarak varlığının PAA ile uyarım için esas olmadığını önermekte ve *pac* yapısal geni içindeki *pacR*'nin varlığını reddetmektedir.

E. coli'de birçok protein Sec translokaz aracılığıyla iç membrandan taşınmaktadır. Aktif PA oluşumunun SecB şaperonunu gereksindiği bildirilmiştir. SecB'nin fazla miktarda ekspresyonu aktif PA üretimini artırmaz ancak sitoplazmadaki inklüzyon cisimciklerinin oluşumunu azaltır. Bu nedenle SecB şaperonunun etkili bir şekilde preproPA'yı periplazmaya taşıdığı gösterilmiştir (Chou ve ark., 1999). *E. coli* preproPA'sının sinyal dizisi bir asparajin tarafından ayrılmış iki arjinin rezidüsü taşır ve bu nedenle bilinen Tat tanıma motifine benzemez (Şekil 1.12). Bununla birlikte Ignatova ve ark (2002) tarafından yapılan bir çalışmayla, *E. coli* preproPA'sının periplazmaya taşınmasının Tat-bağımlı bir yolakla gerçekleştiği önerilmiştir.

```
MTNKISSSDNLSNAVSATDDNASRTPNLTRRALVGGGVGLAAAGALASGLQ          Gfo
          MNNEETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAATSLGLGAGMAPKIAWA       HyaA
                MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATAAQA    TorA
                      MDVSRRQFFKICAGGMAGTTVAALGFAPKQALA       FdnG
                      MSLSRRQFIQASGIALCAGAVPLKASA             SufI
             MKTKIPDAVLAAEVSRRGLVKTTAIGGLAMASSALTLPFSRIAHA    DmsA
                       MKNRNRMIVNCVTASLMYYWSLPALA             ppPA
                        SRRxFLK
                       consensus
```

Şekil 1.13. Tat sinyal peptitlerinin örnekleri. Gfo, *Zymomonas mobilis*'ten glukoz-fruktoz oksidoredüktaz. Diğer sinyal dizilerin tümü *E.coli* proteinlerinden türevlenmiştir: HyaA, hidrojenaz I'in küçük alt ünitesi; TorA, trimetilamin *N*-oksit redüktaz; FdnG, format dehidrojenaz-N'in katalitik alt ünitesi; SufI, bilinmeyen fonksiyona sahip bir protein; DmsA, dimetilsülfoksit redüktazın katalitik alt ünitesi; ppPA, prepropenisilin asilaz. Rezidüler, koyu harfle gösterilen korunmuş twin-arginin motifiyle kıyaslanmıştır. h-bölgesinin altı çizilmiş (Palmer and Berks, 2003).

1.5.4 Penisilin asilazın endüstriyel önemi

Penisilinler, dünya antibiyotik marketi değerlendirildiğinde; yaklaşık %19'luk payı oluşturmakta olup; bakteriyel hücre duvarı üzerine üstün inhibe edici eylemleri, geniş bir spektrumda antibakteriyel aktivite göstermeleri, düşük toksisiteleri ve çeşitli bakteriyel soylara karşı üstün etkileri ile en yaygın kullanılan β-laktam antibiyotiklerdir. Bununla birlikte, bu antibakteriyellerin aşırı kullanımı, dirençli patojenlerin gelişimine izin verir. Halen, dirençlilik probleminin üstesinden gelmek için en etkili metotlardan birisi, yeni yarı sentetik antibiyotiklerin kullanımıdır. Bu yeni yarı sentetik antibiyotikler, daha az yan etkiye, azaltılmış bir toksisiteye, patojenlere karşı daha büyük seçiciliğe, daha geniş antimikrobiyal etkiye ve iyileştirilmiş farmakolojik özelliklere sahiptir.

Yeni yarı sentetik penisilinlerin birçoğu, esas olarak doğal benzil penisilinin enzimatik veya kimyasal deasilasyonu (Chisti and Moo-Young, 1991) aracılığıyla ortaya çıkan 6-aminopenisilanik asitten (6-APA) oluşur. 6-APA üretmek için kimyasal metotlar çevresel açıdan sorumluluk ister. Çünkü piridin, fosfor pentaklorid ve nitrosilklorid gibi zararlı kimyasalların kullanımını gereksinir (Matsumotko,

1993). Aksine, enzimatik değişim bölgesel- ve stereo-spesifik olup, reaksiyon koşulları ılımlıdır. Kimyasal ve enzimatik işlemler aracılığıyla 6-APA üretiminin maliyeti kıyaslandığında, enzimatik süreç en azından %9 daha ucuzdur (Anon, 1992). Eğer enzimatik hidroliz sonucu elde edilen 6-APA üretimi, fermentasyon aracılığıyla penisilin G üretimiyle bütünleştirilirse, daha yüksek (%20) kazanç sağlanabilir.

6-APA için SCRIP (1987) tarafından tahmin edilen talep 2000 yılında 7000 ton'dur. 6-APA'nın ücreti, yarı-sentetik penisilinlerin üretim maliyetini etkilemekte olup, 6-APA üretim teknolojisini iyileştirmeye yönelik sürekli bir çaba söz konusudur. İyileştirilmiş özgüllüğü, aktivitesi, saflığı ve kararlılığı ile pahalı olmayan enzim katalistlerinin mevcut olması, 6-APA ve yarı-sentetik penisilinlerin üretim masrafı ile immolize enzim maliyetini azaltabilir. İmmobilize edilmiş penisilin G asilaz esas olarak bu süreç için gerekli olup, dünya çapında 6-APA üretiminin %88'ini sağlarken, geriye kalan kısım immobilize penisilin V asilaz tarafından üretilmektedir (Vandamme, 1998). Penisilin V'nin maliyetinin penisilin G'den yaklaşık olarak %10-15 daha yüksek olması nedeniyle (Shewale ve ark., 1997), 6-APA üretimi için substrat olarak penisilin G tercih edilmekte olup; penisilin asilazın immobilizasyonu için adsorpsiyon, fiber entrapment, mikroenkapsülasyon, çapraz bağlama, birlikte polimerizasyon ve kovalent bağlanma gibi metotlar kullanılmaktadır (Shewale and Sivaraman, 1989).

1.5.5 PA'nın fazla miktarda üretimi için stratejiler

pac genini taşıyan soyların üretimini artırmak için geleneksel mutasyon teknikleri başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Rastgele mutagenezi takiben PA'yı fazla miktarda üreten soyların taraması gerçekleştirilmiştir. *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitroguanidin (MMNG) muamelesi sonrası *Serratia marcescens* yayma tekniği kullanılarak oluşan inhibisyon zonunun büyüklüğüne dayalı bir tarama yapılmış ve *E. coli* ATCC 11105 soyundan 4 kat daha fazla PA üreten bir mutant izole edilmiştir (Erarslan ve ark., 1991). Bunun yanı sıra penisilin G'ye aşırı duyarlılığa dayanılarak birçok mutant soy izole edilmiş ve ana soya görece daha yüksek aktivite veren

soy/soylar belirlenmiştir. Diğer bir uygulama ise katabolit represyona dirençli mutantları oluşturmak için kültür ortamına glukoz eklenmesi ve daha yüksek PA üretiminin elde edilmesidir (Shewale ve ark., 1989).

Ancak *pac* geninin kesin ve doğrudan bir biçimde klonlanması ve ekspresyonu rekombinant DNA teknolojisi sayesinde olmuştur. En doğrudan strateji gen dozajını artırmaya yönelik olarak *pac* genlerinin çok kopyalı plazmit vektörlerine klonlanmasıdır. *E. coli* (Oh ve ark., 1987; Chou ve ark., 1999; Gümüşel ve ark, 2001), *A. viscosus* (Ohashi ve ark., 1989), *P. rettgeri* (Daumy ve ark., 1985), *K. citrophila* (Barbero ve ark., 1986), *B. megaterium* (Meevootisom ve ark., 1987, Martin ve ark., 1995) ve *A. faecalis* (Verhaert ve ark., 1997)'den *pac* genleri başarılı bir şekilde klonlanmıştır.

Çeşitli kaynaklar arasından *E. coli* PA'sı en iyi tanımlanmış ve endüstriyel uygulamalar için en genel kullanılanlardan biri olup; üretimi için yeni teknolojilerin geliştirilmesinin gerekliliği önemle vurgulanmaktadır. Bunun nedeni PA üretiminin bazı faktörler tarafından sınırlandırılmasıdır: 1) PA'nın sentezi için düşük sıcaklığın tercih edilmesi nedeniyle, kültürleme genellikle bakteri hücre üremesi için optimal olmayabilecek düşük bir sıcaklıkta (30 °C'tan az) gerçekleştirilir. 2) Uyarım amacıyla, bakteri kültürünün büyütüldüğü besiyerine genellikle asiditeyi uyarması nedeniyle hücre üremesini inhibe etmeye eğimli fenilasetik asit (PAA) eklenir. 3) Yine birçok *E. coli* kültürü için etkili bir enerji sağlayıcı olarak hizmet eden glukozun eklenmesinden; PA'nın sentezi glukoz tarafından katabolit represyona meyilli olduğundan sakınılır. 4) Uygun bir konakçı/vektör sisteminin kullanılması kompleks translasyon sonrası adımlar nedeniyle PA üretiminde çoğunlukla kritiktir. 5) *E. coli* PA'sının fazla miktarda üretimi proteinin toksik etkisi nedeniyle hücre fizyolojisi ve üremeyi negatif olarak etkiler. 6) Klonlamada kullanılacak *pac* operonunun DNA fragmanının seçimi rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak aktif PA üretilmesinde kritiktir.

E. coli'nin *pac* geninin transkripsiyonu *pac* düzenleyici bölgesindeki belli DNA bazları nedeniyle, *pac* mRNA'sının translasyonu ise ribozoma bağlanma

bölgesi (RBS) ve başlama kodonu arasındaki sadece 4 bazlık kısa mesafe nedeniyle sınırlıdır. *pac* geninin güçlü promotorların kontrolü altına yerleştirilmesi ve RBS ile başlama kodonu arasındaki mesafenin değiştirilmesi transkripsiyon ve translasyon etkinliğini iyileştirmekte, sonuçta PA üretimi önemli oranda artmaktadır (Chou ve ark., 1999).

PA üretimi translasyon sonrası düzeyde ise birbiri ile yarışan iki süreç tarafından kontrol edilmektir: preproPA'nın hücre içi proteolizizi ile PA'nın aktif translokasyonu ve olgunlaşması. Sentezlenen pre-pro-enzimin %80'den fazlasının sitoplazmada meydana gelen hücre içi proteoliziz tarafından kaybolabileceği gösterilmiştir (Ignatova ve ark. 2000). *E. coli*'de PA'nın fazla miktarda üretimi sırasında karşılaşılan bir diğer önemli problem ise PA öncüllerini içeren ve esas olarak periplazmaya yerleşmiş inklüzyon cisimciklerinin oluşumudur (Scherrer ve ark., 1994; Sriubolmas ve ark., 1997). Hücrenin taşıma kapasitesinin artması ya da hücre içi proteoliziz oranının azalması PA ürününü ciddi oranda artırabilmektedir (Ignatova ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarla, dışarıdan DegP eklenmesinin önemli ölçüde periplazmik proPA inklüzyon cisimciklerinin miktarını azalttığı, hücre fizyolojisini iyileştirdiği ve *E. coli*'de rekombinant PA üretimini artırdığı ispatlanmıştır (Lin ve ark., 2001; Pan ve ark., 2003). Dolayısıyla etkin bir PA üretimi için, gen ekspresyon adımları (transkripsiyon, translasyon ve translasyon-sonrası modifikasyon) süresince her bir adımın etkinliğinin iyileştirilmesine ilave olarak dengelenmiş bir protein sentez akış hızının sağlanması önemlidir.

1.6 Tezin Amacı

Esherichia coli halen biyomedikal sektöründe proteinlerin gen ekspresyonu için faydalı bir konakçı olmayı sürdürmektedir. *E. coli*'nin moleküler biyolojisi oldukça temel ve biyoteknolojik amaçlı kullanıma elverişli olmasına karşın; translasyon sürecinin ilk aşamalarının çalışılması translasyon mekanizması ve gen ekspresyonunun başlangıcının daha iyi anlaşılması açısından çok önemlidir.

Bakterilerde gen ekspresyon düzeyi, hücre içi mRNA konsantrasyonu ve kararlılığı, ikincil yapı, tRNA havuzu, kodon içeriği ve ribozom translasyon kompleksi aracılığıyla bu kodonların translasyonunun etkinliği gibi birçok faktörün birlikteliği neticesinde ortaya çıkar. Daha önce yapılan çalışmalar translasyon etkinliği ve gen ekspresyonu üzerine bütün bu faktörlerin önemini göstermiştir. Bu çalışmada SD bölgesi, SD ve AUG başlama kodonu arasındaki ara bölge (spacer region) ve başlama kodonunun hemen aşağısındaki bölgenin (downstream region) kodon içeriğine odaklanarak, bu bölgelerin penisilin asilaz gen ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Buna göre tez çalışmasında temel olarak şunlar analiz edilmiştir:

- Penisilin asilaz geninde birbiriyle örtüştüğü varsayılan iki SD bölgesinden birinin elimine edilerek, daha kısa bir SD motifi varlığının,
- Literatüre göre normalden daha kısa olan AUG başlama kodonu ve SD arasındaki mesafenin kodon içeriğinin AT'ce zenginleştirilerek uzatılmasının,
- Daha önceki çalışmalara dayanılarak *E. coli* gen ekspresyonunda önemli olduğu ifade edilen ve tercihen AAA olan ikinci kodonun, daha az kullanılan nadir bir kodon AGA'ya değiştirilmesinin,
- +4 pozisyonundaki arjinin rezidüsünün lizine değiştirilerek başlama kodonundan hemen sonraki bölgenin (DR) kodon içeriğinin A'ca zenginleştirilmesinin,

  gen ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi ve,
- Özellikle *pac* geni sinyal dizisinde yapılan mutasyonların, PA'nın translokasyonu üzerine etkisinin irdelenmesi,
- *pac* geninin TIR bölgesine PCR aracılığıyla yerleştirilen mutasyonların PA üretimi üzerine etkilerinin yaban ve -35 bölgesi mutasyona uğratılmış P_{lac} taşıyan yüksek kopya sayılı pUC19/pUC19$_{lac}^{-}$ vektörlerinde, öncül enzimin taşınması üzerine etkilerinin ise düşük kopya sayılı pMMB208-temelli klonlarda değerlendirilmesi.

2 Gereç ve Yöntemler

2.1 GEREÇLER

2.1.1 Kimyasallar

2.1.1.1 Kullanılan kitler ve enzimler

DNA örneklerinin izolasyonu ve saflaştırılması için Promega Wizard PCR Preps kit (A7170) ve Wizard MiniPrep kit (A7100) kullanıldı. Dizi analizi çalışmalarında kullanılan materyaller, Beckman Coulter®'dan sağlandı.

Çizelge 2.1. Kullanılan restriksiyon enzimler ve tamponları

Kullanılan Enzimler	Tamponları
Hind III (40 U/µl)	Buffer B (Roche)
*Eco*RI (40 U/µl)	Buffer H (Roche)
*Eco*NI (10 U/µl)	Buffer R (MBI Fermentas)
Pst I (40 U/µl)	Buffer H (Roche)
*Hpa*I (10 U/µl)	Buffer A (Roche)
*Nco*I (10 U/µl)	Buffer H (Roche)
*Kpn*I (10 U/ µl)	Buffer L (Roche)
*Xba*I (10 U/ µl)	Buffer H (Roche)

2.1.2 Besiyerleri

Bakteri kültürlerinin büyütülmesi için aşağıdaki besiyerleri hazırlandı. Besiyerlerinin tümü otoklavda 121 °C'ta 20 dakika sterilize edilerek kullanıldı.

- **LB Besiyeri (1 lt)**
  (Luria-Bertani)

10 g Nutrient Broth (Difco, 234000); 5 g maya özütü (Merck, 1.03753); 8 g NaCl (Merck, 1.06400.1000); 0.52 g Tris base (Sigma, T-1503) distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

- **LB Agar Besiyeri (1 lt)**

10 g Nutrient Broth (Difco, 234000); 5 g maya özütü (Merck, 1.03753); 8 g NaCl (Merck, 1.06400.1000) 1 lt'ye su ile tamamlanır. 15 g agar (BD, 214010) eklenir.

- **Kazein Besiyeri (1 lt)**

8 g maya özütü (Merck, 1.03753); 4 g kazein hidrozilat (Gibco, 50014-026); 4.2 g K_2HPO4 (Merck, 1.05101.1000); 3 g KH_2PO_4 (Riedel, 04243) dH_2O ile 1 litreye tamamlanır.

- **Top agar (200 ml)**

2 g Nutrient broth, 1 g yeast extract, 1.6 g NaCl, 0.104 g Tris base 200 ml dH_2O içinde çözülerek 1.4 g agar eklenir.

2.1.3 Tampon ve solüsyonlar

- **TE buffer**

  10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

  0.1 mM EDTA (Sigma, E 5134)

- **TAE (50X)**

  242 g Tris baz (Sigma, T-1503)

  57.1 ml Glasiyel asetik asit (Merck, 1.00063)

  100 ml 0.5 M EDTA

Solüsyon kullanmadan önce dH_2O ile 1X'e seyreltilir.

- **2M Tris**

24.2 g Tris baz (Sigma, T-1503) 50 ml dH_2O ile çözülür. Konsantre HCl (Merck, 1.00314) eklenerek pH istenilen değere getirilir. Hacim dH_2O ile 100 ml'e tamamlanır. 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır ve +4 °C'ta saklanır.

- **Agaroz Jel yükleme boyası (6X)**

%0.15 Bromofenol Blue (Sigma, B-6131)

%30 Sukroz (Sigma, S-0389) veya gliserol (Riedel 15524)

dH_2O ile hazırlanır.

- **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

1 g etidyum bromür (Sigma, E-7637) 100 ml deiyonize suya eklenir. Manyetik karıştırıcıda birkaç saat karıştırılarak çözüldükten sonra filtre edilir. Koyu renkli bir şişede saklanır.

- **Maksiprep plazmit DNA izolasyonu için GET (50 ml)**

50 mM Glukoz (Sigma, S-8270)

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

dH_2O ile çözülerek, 121 °C'ta 20 dk. otoklav yapılır.

- **TENS**

0.5 mM EDTA

50 mM NaOH (Merck, 1.06462)

%0.25 SDS (Sigma, 5750)

40 mM Tris-HCl, pH 8.0

dH_2O ile çözülerek, 121 °C'ta 20 dk. otoklav yapılır.

- **STET**

  %8 sukroz

  %5 TritonX100 (Sigma, T8532)

  50 mM Tris-HCl, pH 8.0

  50 mM EDTA

- **3M NaAc, pH 5.2**

81.64 g NaAc.3H_2O (Riedel, 25022) 100 ml dH_2O içinde çözülür. Glasiyal asetik asit ile pH 5.2'e ayarlanarak, hacim 200 ml'e tamamlanır. 121 °C'ta 20 dk. otoklav yapılır.

- **Kompetan hücre hazırlamak için TSS**

  %85 LB

  %10 PEG 8000 (Sigma, P-2139)

  %5 DMSO (Sigma, D-5879)

  50 mM $MgCl_2$ (Merck, 1.05832)

Çözelti otoklavlanıp +4 °C'ta 2 haftaya kadar saklanabilir.

- **IPTG**

0.119 g IPTG (Fermentas, R0392) 5 ml dH_2O içinde çözülerek, 0.2 µM'lık filtreden geçirilir. -20 °C'ta saklanır.

- **%30 Akrilamit/%1 Bisakrilamit**

  30 g akrilamit (Sigma, A 8099)

  1 g bisakrilamit (Biorad, 161-0201)

70 ml dH_2O ile çözülerek, hacim 100 ml'e tamamlanıp Whatman 3MM filtre kağıdından süzülür. +4'ta ışığı geçirmeyen koyu renkli bir şişede saklanılır.

- **%10 APS (Amonyum persülfat)**

0.1 g amonyum persülfat (Biorad, 161-0700) 1 ml dH_2O ile çözülerek, -20 °C'ta saklanır.

- **SDS-PAGE örnek tamponu**

% 10 Gliserol (v/v)

2 mM EDTA

%1 2-mercaptoethanol (v/v) (Sigma, M-6250)

%1 SDS (w/v)

% 0.02 Bromophenol blue (w/v) (Sigma, B-6131)

50 mM Tris-HCl, pH 6.8

- **SDS yürütme tamponu (5x)**

15.1 g Tris baz, 72 g Glisin (Sigma, G 7126), 5 g SDS dH_2O içinde çözülerek; hacim 1lt'ye tamamlanır. 1x yürütme tamponu hazırlamak için 5x stok tamponundan 50 ml 450 ml dH_2O'ya eklenir.

- **SDS-PAGE jelleri için boyama çözeltisi**

Coomassie blue R250 (Sigma, B-7920) boyası, %45 (v/v) saf etanol, %45 (v/v) dH_2O and %10 (v/v) glasiyal asetik asit (Riedel, 27225) içinde %0.25 (w/v) Coomassie blue R250 içerir.

- **SDS-PAGE jelleri için arıtma çözeltisi**

%5 asetik asit, %50 etanol (Merck, 1.11727) içerir.

- **Western-blot transfer buffer**

  Tris Base 17.4 g (48 mM)

  Glisin 8.7 g (39 mM)

  SDS 1.11 g (% 0.037)

  %20 Metanol (600 ml) (Riedel, 32313)

Hacim 3 litreye tamamlanır.

- **Phosphate Buffered Saline (PBS)**

  8 g NaCl

  0.2 g KCl

  1.44 g Na_2HPO4

  0.24 g of KH_2PO

pH 7.4'e ayarlanarak dH_2O ile 1 litreye tamamlanır.

- **NaCl/Tris**

  150 mM NaCl

  50 mM Tris base

dH_2O ile hacim 500 ml'e tamamlanır.

- **Doyurma çözeltisi**

  % 5 BSA (Sigma, A7906)

  % 0.01 Antifoam A

% 0.02 NaN3 (Sigma, S-2002)

% 0.02 Tween 20 (Sigma, P-1379)

PBS ile çözülerek hacim 35 ml'e tamamlanır.

- **Anti-antikor çözeltisi**

%5 BSA (Sigma, A7906)

5 µl Anti-antikor (Sigma, Anti-Mouse IgG A3688)

Hacim NaCl/Tris çözeltisi ile 10 ml'e tamamlanır.

- **Alkalen Fosfataz Tamponu**

100 mM NaCl

5 mM $MgCl_2$

100 mM Tris base

pH 9.5'a ayarlanarak hacim dH_2O ile 100 ml' tamamlanır.

- **Lizozim (10 mg/ml)**

10 mg lizozim (Roche, 1 243 004) 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) içinde çözülerek, 0.2 µm'lık filtreden geçirilip, -20 °C'ta saklanır.

- **Tris-HCl/Gliserol Tampon**

25 ml 2 M Tris-HCl, pH 8.0 ve 0.575 ml %80 gliserol (10 mM) dH_2O ile 500 ml'e tamamlanır.

- **100 mM $CaCl_2$**

7.35 g $CaCl_2$ (Sigma C-3306) dH_2O içinde çözülerek hacim 500 ml'e tamamlanır. 121 °C'ta 20 dk. otoklav yapılır.

- **0.5 M EDTA, pH 8.0**

37.22 g EDTA 150 ml dH_2O içinde çözülür. NaOH kullanılarak pH 8.0'e ayarlanır. Hacim dH_2O ile 200 ml'e tamamlanır. 121 °C'ta 20 dk. otoklav yapılır.

- **50 mM Fosfat Tampon, pH 8.0**

50 mM KH_2PO_4 dH_2O içinde çözülerek pH 8.0'e ulaşıncaya kadar üzerine 50 mM K_2HPO_4 yavaşca eklenir.

- **Asetat Tampon**

240 ml asetik asit (Riedel, 27225) dH_2O ile 1200 ml'e tamamlanır. Diğer yandan, 1.2 g NaOH dH_2O içinde çözülerek 600 ml'e tamamlanır. Hazırlanan iki çözelti birleştirilerek karıştırılır.

- **p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) çözeltisi**

PDAB (Sigma, D-2004)'ın metanoldeki (Riedel, 32313) % 0.5 (ağırlık/hacim) çözeltisi taze olarak hazırlanır.

- **Penisilin G**

PenG solüsyonu, son konsantrasyonu 15 mM olacak şekilde 50 mM pH 8.0 potasyum fosfat tampon içerisinde çözülerek hazırlanır.

2.1.4 Antibiyotikler

- **Ampisilin (10 mg/ml)**

1 g ampisilin (Roche, 10 835 269 001) 100 ml distile su içinde çözülür. 0.2 µm'lık filtreden (Sartorious, 0102 1103) geçirilerek sterilize edilir. Alikotlar halinde -20 °C'ta saklanır.

- **Kloramfenikol (20 mg/ml)**

100 mg kloramfenikol (Sigma, C0378) 5 ml %100 etanol içinde çözülür. Alikotlar halinde ve ışıktan koruyarak -20 °C'ta saklanır.

2.1.5 Bakteriyel soylar ve plazmitler

Çalışmada kullanılan bakteriyel soylar Çizelge 2.2'de verildiği gibidir.

Çizelge 2.2. Bakteriyel soylar ve plazmitler

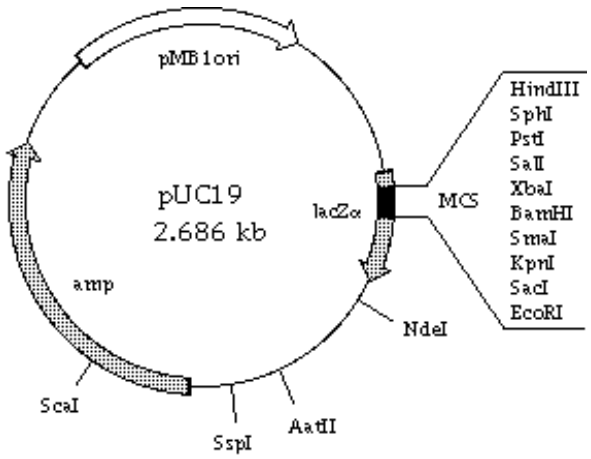
Soy, plazmit	Genotip	Referans/ Kaynak
Escherichia coli		
JM109	F' *traD36 proA*$^{+}$*B*$^{+}$ *lacI*^{q} Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14-gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17	Pharmacia
MC4100	F^{-} *araD139* Δ*lacU169 relA1 rpsL150 thi mot flb5301 deoC7 ptsF25 rbsR*	Dr. Albert Bolhuis
JARV15	(MC4100 Δ*tatA* Δ*tatE*)	Dr. AlbertBolhuis
B1LKO	(MC4100 Δ*tatC*)	Dr. Albert Bolhuis
DADE	(MC4100 Δ*tatABCDE*)	Dr. Albert Bolhuis
S. marcescens 27117		ATCC
Plazmit		
pUC19	Çok amaçlı klonlama vektörü, Ap^{r}	Vieira and Messing, 1985
pUC19$_{lac}^{-}$	-35 bölgesinde mutasyon taşıyan pUC19 vektörü, Ap^{r}	İşsever Öztürk, 2002
pUC*pac*2.6	2.6-kb *pac* geni *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında pUC19 üzerinde, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC$_{lac}^{-}$-*pac*2.6	2.6-kb *pac* geni *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında pUC19$_{lac}^{-}$ üzerinde, Ap^{r}	Bu çalışma
pMMB208	Ekspresyon vektörü, Cm^{r}	Dr. Michael Bagdasarian

*pac*9.5-pEMBL9^{+}	ATCC 11105 soyuna ait *pac* genini içeren 9.5 kb'lık fragmanı taşıyan vektör, Ap^{r}	Gümüşel ve ark., 2001
*pac*3.5/pUC19 (*pac*$_{wt}$)	Yaban tipi *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragmanı *Eco*RI-*Hind*III sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^{r}	Gümüşel ve ark., 2001
Spac/pUC19	SD-AUG arasındaki bölgede mutasyona sahip *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragmanı *Eco*RI-*Hind*III sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^{r}	İşsever Öztürk, 2002
pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA4	SD dizisi kısaltılmış ve SD-AUG arası değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan pUC19$_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA5	SD-AUG arası uzatılmış 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan pUC19$_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA6	SD-AUG arası ve 2. kodonu değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan taşıyan pUC19$_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC$_{lac}^{-}$ pac2.6-OA7	SD-AUG arası ve 4. kodonu değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan taşıyan pUC19$_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma

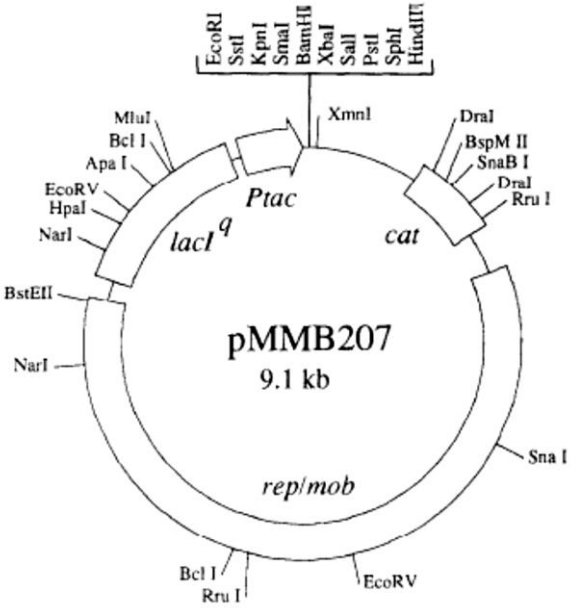
pUC_{lac}^{-}-PACOA4	SD dizisi kısaltılmış ve SD-AUG arası değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan $pUC19_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC_{lac}^{-}-PACOA5	SD-AUG arası uzatılmış *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan $pUC19_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC_{lac}^{-}-PACOA6	SD-AUG arası ve 2. kodonu değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan $pUC19_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUC_{lac}^{-}-PACOA7	SD-AUG arası ve 4. kodonu değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan $pUC19_{lac}^{-}$ türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUCpac2.6OA4	SD dizisi kısaltılmış ve SD-AUG arası değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^{r}	Bu çalışma
pUCpac2.6OA5	SD-AUG arası uzatılmış 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^{r}	Bu çalışma

pUCpac2.6OA6	SD-AUG arası ve 2. kodonu değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma
pUCpac2.6OA7	SD-AUG arası ve 4. kodonu değiştirilmiş 2.6-kb *pac* genini *Xba*I-*Kpn*I sitleri arasında taşıyan taşıyan pUC19 türevi	Bu çalışma
pUC-PACOA	Yaban tipi *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma
pUC-PACOA4	SD dizisi kısaltılmış ve SD-AUG arası değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma
pUC-PACOA5	SD-AUG arası uzatılmış *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma
pUC-PACOA6	SD-AUG arası ve 2. kodonu değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma
pUC-PACOA7	SD-AUG arası ve 4. kodonu değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5-kb fragmanı *Xba*I-*Eco*RI sitleri arasında taşıyan pUC19 türevi, Ap^r	Bu çalışma

pMMB-PACwt	pac_{wt}'a ait 3.5-kb'lık fragman *Eco*RI/*Hind*III sitlerinden pMMB208 üzerinde, Cm^r	Bu çalışma
pMMB-PACOA4	Mut4'ü taşıyan *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragman *Eco*RI/*Hind*III sitlerinden pMMB208 üzerinde, Cm^r	Bu çalışma
pMMB-PACOA5	Mut5'i taşıyan *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragman *Eco*RI/*Hind*III sitlerinden pMMB208 üzerinde, Cm^r	Bu çalışma
pMMB-PACOA6	Mut6'yı taşıyan *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragman *Eco*RI/*Hind*III sitlerinden pMMB208 üzerinde, Cm^r	Bu çalışma
pMMB-PACOA7	Mut7'yi taşıyan *pac* genini içeren 3.5-kb'lık fragman *Eco*RI/*Hind*III sitlerinden pMMB208 üzerinde, Cm^r	Bu çalışma



Şekil 2.1. pUC19 vektör haritası (Vieira and Messing, 1985).



Şekil 2.2. pMMB207 vektör haritası (Morales ve ark., 1991). pMMB208, pMMB207'den farklı olarak çoklu klonlama bölgesini *Hind*III siti *Ptac*'a yakın olacak şekilde içermektedir.

Çizelge 2.3. Primer dizileri

İsmi	**Dizisi (5'→3')**	**EKB**
PA6	5'-TACGCCTGCCAGAGGTAATTATATGAAAAATAGAAATCG -3'	*Eco*NI
PA7	5'-TACGCCTGCCAGAGGAAAAATTATATGAAAAATAGAAATCG-3'	*Eco*NI
PA8	5'-TACGCCTGCCAGAGGAAATTATATGAGAAATAGAAATCG-3'	*Eco*NI
PA9	5'-TACGCCTGCCAGAGGAAATTATATGAAAAATAAAAATCG-3'	*Eco*NI
PA10	5'-TACGCCATGGTGCCCACAAATATCAT-3'	*Nco*I
PA11	5'-TGCCGTCTAGACGTTGCTAGTATCAATTCG-3'	*Xba*I
PA12	5'-TCCGGGGTACCTTATCTCTGAACGTGCAACAC-3'	*Kpn*I
PA14	5'-TACGTGGTACCTTAAGCCCGAAAGCCCTCA-3'	*Kpn*I
PA16	5'-TACGTGAATTCCGGCGAAGTCTCCGTTG-3'	*Eco*RI

*EKB: Primerin içerdiği **E**nzim **K**esim **B**ölgesi

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Bakteriyel üreme koşulları

Sıvı kültürler -20 °C stoktan aşılanarak başlatıldı ve DNA izolasyonu için 37 °C'ta gece boyu 200 devir/dakika çalkalama ile uygun antibiyotik içeren LB besiyerinde büyütüldü. Ekspresyon çalışmaları için 100 ml ve 250 ml'lik erlenler kullanılarak, -20 °C'tan aşılanan kültürler 26 °C'ta 100 devir/dakika çalkalama ile uygun antibiyotik eklenmiş kazein besiyerinde büyütüldü.

2.2.2 Plazmit DNA izolasyonu

2.2.2.1 Maksiprep plazmit DNA izolasyonu

Maksiprep plazmit DNA izolasyonunun bir gün öncesinde 2 ml LB-ampisilin besiyerlerine -20 °C stoktan *E. coli* pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ kültürlerinden 20 µl eklenerek 37 °C'ta 220 devir/dakika'da çalkalanarak gün boyu çoğalmaya bırakıldı. Akşam büyüyen kültürün 500 µl'si, 50 ml LB-ampisilin besiyerine eklenerek, 37 °C'ta 220 devir/dakika çalkalama ile gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün, büyüyen 50 ml'lik kültür, 7000 devir/dakika'da 4 °C'ta 15' santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra, 1250 µl GET içinde çözülen pelete 5 mg lizozim eklenerek, oda ısısında 5 ' bekletildi. Daha sonra 2.5 ml 0.2 M NaOH, % 1 SDS eklenerek 5', 1875 µl 3M NaAc (pH 5.2, son konsantrasyonu 1 M) eklenerek 35' buzda inkübe edildi.

10 000 devir/dakika'da 10' santrifüj sonrası, ~ 5 ml üst sıvı yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 2 katı hacimde % 100 etanol (-20 °C) eklendi ve -20 °C'ta 15' bekletildi. Süre bitiminde 8000 devir/dakika'da 15' santrifüj edilen tüplerden üst sıvı atıldı ve pelet 500 µl TE içinde çözülerek eppendorf tüplerine 250'şer µl dağıtıldı. 65 °C'ta 5' inkübe edilen ve 1' kuvvetlice vortekslenen her bir tüpe 0.3 M son konsantrasyonda NaAc (pH 5.2) ve % 100 EtOH eklenerek -20 °C'ta 15-20 dakika bırakıldı. 13.000 devir/dakika'da 4 °C'ta 15' santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak, pelet % 100 EtOH ile yıkandı. Tekrar 13.000 devir/dakika'da 15'

santrifüjden sonra üst sıvı pastör pipeti ile çekilerek, pelet liyofilizatörde kurutuldu. Her bir tüpe ait pelet 50 µl dH_2O ile çözülerek tek bir tüpte toplandı. Tüpler tekrar 50 µl dH_2O ile yıkandı ve yıkama solüsyonu da aynı tüpe eklenerek, 65 °C'ta 5' inkübe edildi. Elde edilen DNA'nın 1 µl'si % 1'lik agaroz jele yüklenerek DNA miktarı kontrol edildi.

2.2.2.2 Alkali Liziz (TENS) Yöntemi ile miniprep plazmit DNA izolasyonu

Ampisilin içeren 2 ml LB besiyerine tek koloni aşılanarak 12-16 saat süreyle 37 °C'ta 200 devir/dakika çalkalama ile büyütüldü. ~1.5 ml büyümüş hücre kültürü eppendorf tüpe aktarılarak 4 °C'ta 13 000 devir/dakika'da 20 saniye santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst sıvı tüpte 50-100 µl besiyeri kalacak şekilde döküldü. Pelet tüpte kalan LB besiyeri içinde çalkalanarak çözüldü. Oluşan karışıma 300 µl TENS çözeltisi eklenerek kuvvetlice vortekslendi. Daha sonra 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) eklenerek 13 000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı temiz bir ependorf tüpüne aktarılarak, plazmit DNA kromozomal DNA ve hücre kalıntılarından arındırıldı. Elde edilen DNA çözeltisine 900 µl -20 °C'ta soğutulmuş %100 etanol eklenerek 15 dakika -20 °C'ta bekletildikten sonra, tüpler 13.000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı vakumla çekilip atıldıktan sonra DNA peleti 50 µl -20 °C'ta soğutulmuş %70 etanol ile yıkanarak 13.000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı vakumla alınarak, pelet liyofilizatörde kurutulduktan sonra 50 µl dH_2O ile çözülerek kullanıldı.

2.2.2.3 Kaynatma ile lizis (STET) yöntemi ile miniprep plazmit DNA izolasyonu

10 ml ampisilinli (10µg/ml) LB besiyeri tek koloni ile aşılanarak 37 °C'ta çalkalayıcılı inkübatörde gece boyu büyütüldü. Hücreler 4 °C'ta 4000 devir/dakikada 20 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı vakum ile çekilip atıldıktan sonra pellet 400 µl STET çözeltisi içinde çözüldü. Eppendorf tüpe aktarılan hücrelere spatül ucuyla az miktarda toz lizozim ya da 25 µl lizozim solüsyonu (10 mg/ml) eklendikten sonra, tüpler hemen vortesklenerek, kaynayan su banyosunda 45 saniye

bekletildi. Oda ısısında 13000 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edilen örnekteki kromozomal DNA ve hücre kalıntıları, steril bir kürdan ile alınarak atıldı. Plazmit DNA'ya 2.5 M amonyum asetat ve 1 ml izopropanol (-20 °C'ta soğutulmuş) eklenerek, -20 °C'ta 15-20 dk. bekletildikten sonra 13000 devir/dakikada, 4 °C'ta 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı vakumla çekildikten sonra liyofilizatörde kurutulan DNA peleti 50 µl dH_2O içinde çözüldü.

2.2.2.4 Wizard® plazmit miniprep kit. kullanarak plazmit DNA izolasyonu

Yüksek kopya sayılı pUC19 vektöründen türemiş plazmitleri içeren *E. coli* JM109 soyunun 5 ml'lik kültürü, düşük kopya sayılı pMMB208 vektöründen türemiş plazmitleri içeren *E. coli* soylarının ise 10 ml'lik kültürü, 37 °C'lık çalkalayıcı inkübatörde 12-16 saat süreyle büyütüldü. Elde edilen kültür 4°C'ta 4000 devir/dakika'da, 20 dakika süreyle çöktürüldü. Oluşan üst sıvı atılarak hücre peletinden DNA izolasyonu, miniprep plazmit DNA izolasyon kitindeki protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

2.2.3 PCR-temelli mutagenez

Yönlendirilmiş mutagenez proteinlerin yapı ve işlevlerini, protein katlanması ve enzim mekanizmasını analiz etmek için kullanılan çok güçlü bir araçtır (Botstein ve ark., 1985). Tez çalışmasında planlanan mutasyonların oluşturulması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) aracılığıyla yönlendirilmiş mutagenez yöntemi kullanıldı. PCR aracılığıyla yönlendirilmiş mutagenez yapmak üzere yayımlanmış birçok protokol bulunmaktadır (Barettino ve ark.,1994). Tez kapsamında hedeflenen mutasyonların gerçekleştirilmesi için Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından daha öncede uygulanmış bir yöntem kullanıldı (İşsever Öztürk, 2002). Bu metot iki aşamadan oluşmaktadır: İlk basamakta istenilen mutasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesim bölgesini taşıyan bir primer kullanılarak hedef genin bir bölümü PCR aracılığı ile çoğaltılır. İkinci basamakta ise ilgili mutasyonu ve her iki ucunda uygun kesim bölgelerini taşıyan PCR ürünü, genin bütününü taşıyan ve PCR ile çoğaltılan parçaya karşı gelen gen bölgesi çıkarılmış olan vektöre yerleştirilir.

2.2.3.1 Primer tasarımı ve sentezi

Mutajenik primerler istenilen mutasyonları taşıyacak şekilde Integrated DNA Technologies'e sentezlettirildi ve 100 nmol konsantrasyonda sağlandı.

Primer tasarımında aşağıdaki esaslar dikkate alındı:

a) Primerler 25-45 baz uzunluğundadır.
b) Nükleotit değişikliği primerin 5' ucuna ya da ortasına yerleştirildi. Uçtaki nükleotitler G ya da C olarak tercih edildi.
c) % GC yaklaşık olarak % 50'dir.
d) Erime sıcaklığı (Tm) 60 $^{\circ}$C'ın üzerindedir.
e) Primer ikincil yapılarının oluşumuna ve primer dimerleşmesine engel olmak için, 3' tamamlayıcı uçlara sahip primerlerden kaçınıldı.
f) Saflaştırılmış ve tuzlardan uzaklaştırılmış mutajenik primerler kullanıldı.

Bir mutajenik primer nükleotit dizisi, nükleotit yer değiştirmeleri, küçük eklemeler ya da çıkarmalar içerecek şekilde tasarlanabilir. Primerler sonuçta oluşacak PCR ürünlerine ekleneceğinden, yapılmak istenen değişiklik/değişikliklerde elde edilen üründe yer alacaktır. Tez çalışmasında istenilen mutasyonlar tasarlanan mutajenik primerler ile *pac* geni üzerine yerleştirilmiştir.

2.2.3.2 PCR koşulları ve reaksiyonlar

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), özgün bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. PCR'ın temel bileşenleri kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz, primerler, dNTP karışımı ve reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayacak uygun bir tampondur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak isimlendirilen üç aşamadan oluşur. Tez çalışmasında planlanan PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere öncelikle ilgili oligonükleotitler sentezlettirildi (Çizelge 2.3). Yapılan tüm PCR

çalışmalarında kalıp olarak *pac*9.5-pEMBL9$^+$ plazmit DNA'sı (Gümüşel ve ark., 2001) kullanıldı.

2.6 kb'lık *pac* genini çoğaltmak için: 40 ng kalıp DNA, 160 ng primer (PA11/PA12), 100 µM dNTP, 0.9 U *Taq* DNA polimeraz ile 1.5, 3 ve 5 mM $MgCl_2$ içeren tamponun kullanıldığı PCR reaksiyonları, 95 °C'ta 2' ön denatürasyonun ardından 94 °C'ta 1 dakika denatürasyon, 68 °C'ta 1 dakika tutunma ve 72 °C'ta 2.5 dakika sentez olmak üzere 30 döngü sonrasında 72 °C'ta 10 dakika sonlanma reaksiyonu olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.6 kb'lık *pac* geninden hemen sonra gelen 0.9 kb'lik fragmanı çoğaltmak için; 40 ng plazmit DNA'sı, 160 ng primer (PA14/PA16), 100 µM dNTP, 0.9 U *Taq* DNA polimeraz ile 1.5 mM, 3 mM ve 5 mM $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanıldı. PCR döngüleri, 95 °C'ta 2 dakika ön denatürasyondan sonra, 94 °C'ta 1 dakika denatürasyon, 62 °C'ta 1 dakika tutunma, 72 °C'ta 1 dakika sentez olmak üzere 30 döngü sonrasında, 72 °C'ta 10 dakika sonlanma reaksiyonu olacak şekilde düzenlendi.

pac geni TIR bölgesinde gerçekleştirilmesi planlanan 4 farklı mutasyon için, *pac* geni üzerinde *Eco*NI-*Nco*I restriksiyon enzimleri arasında kalan ve kullanılan primer çiftleri ile aşağıda belirtilen mutasyonların yerleştirileceği ~550 bp'lık bölge; Mut4 için primer PA6/PA10; Mut5 için primer PA7/PA10; Mut6 için primer PA8/PA10 ve Mut7 için PA9/PA10 primer çiftlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonları aracılığıyla çoğaltıldı.

- **Mut4:***pac* geninde birbiri ile örtüşen iki SD dizisinden (GAGG ve AGGA) AGGA değiştirildi.
- **Mut5:***pac* geninde SD-ATG arasındaki uzaklık 9 nükleotite artırıldı.
- **Mut6:***pac* geninin 2. kodonu Lizin Arjinine değiştirildi (K2R).
- **Mut7:** *pac* geninin 4. kodonu Arjinin Lizine değiştirildi (R4K).

PCR için reaksiyon koşullarını belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmasında; kalıp olarak 40 ng plazmit DNA'sı, 160 ng primer, 100 µM dNTP, 0.9 U *Taq* DNA polimeraz ile 1.5 mM, 3 mM ve 5 mM $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanıldı. PCR döngüleri, 95 °C'ta 2 dakika ön denatürasyondan sonra, 94 °C'ta 1 dakika denatürasyon, 64 °C'ta 1 dakika tutunma, 72 °C'ta 1 dakika sentez olmak üzere 4 döngü ve 94 °C'ta 30 saniye, 64 °C'ta 30 saniye, 72 °C'ta 1 dakika olmak üzere 25 döngü sonrasında 72 °C'ta 10 dakika sonlanma reaksiyonu olacak şekilde düzenlendi.

2.2.4 Restriksiyon endonükleaz kesimi

Klonlama çalışmalarında restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimlerin tümünde 1 µg DNA başına 3 ünite (U) restriksiyon endonükleaz kullanıldı. Enzim kesimleri için uygun son hacim ayarlanarak kesimler 37 °C'ta 1-2 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimlerinin listesi Çizelge 2.1'de gösterildiği gibidir.

Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonlarında, STET yöntemi ile izole edilen plazmit DNA'larının kullanıldığı durumda, inkübasyon süresi sonunda örneklere RNaz (0.5 µg/ml) eklenerek, 37 ºC'ta 15-20 dakika daha inkübe edildi. Daha sonra tüplere son konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde Na-asetat ve 2.5 hacim soğuk % 100 etanol (-20 °C) eklenerek, tuz-alkol çöktürmesi yapıldı. Tüpler sıvı azotta 1-2 dakika veya -20 °C'ta gece boyu ya da -80 °C'ta 30 dakika bırakıldıktan sonra, 13000 devir/dakikada 4 °C'ta 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı vakumla çekilip atıldıktan sonra, liyofilizatörde ~15-20 dakika kurutulan pelet uygun hacimde steril dH_2O içinde çözüldü.

2.2.5 Agaroz jel elektroforezi

DNA parçalarının moleküler ağırlıklarına göre analitik ve preparatif ayırımı %1'lik (0.5-10 kb için) ya da daha küçük parçalar için %2'lik agaroz ile hazırlanan jellerin kullanıldığı elektroforez çalışmalarında gerçekleştirildi.

Buna göre agaroz (Sigma, A-6013) jel konsantrasyonu % 1 ya da %2 olacak şekilde 1X Tris-asetik asit EDTA (TAE) tamponu içinde ısıtılarak eritildi. Eritilen agaroz 45-50 °C'a kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Jel, tarakları yerleştirilmiş elektroforez kasetine döküldükten sonra, 30-40 dakika süreyle polimerize olmaya bırakıldı. Daha sonra jelden taraklar çıkartılarak, kaset 1XTAE ve 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Örneklere jele yüklemeden önce 6x boya eklendi. Moleküler belirteç olarak *Hind*III ile kesilmiş λ DNA'sı kullanıldı. Analitik çalışmalar için elektroforez, ilgili fragmanların boyu da gözetilerek 80 V'da 30-60 dakika, klonlamaya yönelik hazırlık çalışmalarında ise 50 V'da ~1-2 saat süreyle gerçekleştirildi. Elektroforez sonunda gerekli görüldüğünde jelin fotoğrafı çekildi.

2.2.6 Agaroz jelden DNA izolasyonu

Agaroz jelden DNA izolasyonu Promega 'Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System' kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Klonlama çalışmalarında kullanılacak uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PCR ürünleri ve plazmit vektörler, belirteç olarak *Hind*III ile kesilmiş λ DNA'sı ile birlikte % 1'lik agaroz jele yüklendi ve istenilen DNA fragmanı diğer bantlardan ayrılıncaya kadar 50 V'da yürütüldükten sonra ilgilenilen fragmanı taşıyan jel parçası steril bir bistüri yardımıyla agaroz jelden kesilip çıkartıldı. DNA izolasyonu kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

2.2.7 Ligasyon

İstenilen mutasyonları taşıyan gen parçalarına (insert) ve bu gen parçalarının klonlanacağı uygun plazmit sistemlerine (vektör) ait DNA'ların agaroz jelden izolasyonu sonrasında, konsantrasyonları % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Ligasyon çalışmaları 150 ng plazmit (vektör) için pmol düzeyinde 10 kat gen parçası (insert) kullanılacak şekilde planlanıldı. Ligasyonlar 60 µl reaksiyon hacminde ve 1 ünite T4 DNA ligaz (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre enzim dışında kalan ligasyon bileşenleri tüpe konulduktan sonra, ligasyon materyali

37 °C'ta 10 dakika ve daha sonra 0 °C'ta 10 dakika inkübe edildi. 1 µl T4 DNA ligaz (1U/µl) eklenmesinin ardından ligasyon karışımı 0°C'ta 30 dakika ve ardından 16 °C'ta gece boyu bırakıldı. Ertesi gün ligasyon tüpleri 70 °C'ta 10 dakika inkübe edilerek ligazın inaktivasyonu sağlandı. Hazırlanan ligasyon karışımı transformasyon için kullanıldı.

2.2.8 Transformasyon

2.2.8.1 TSS yöntemi ile kompetant hücre hazırlanması

2 ml LB besiyeri kompetan yapılacak hücrenin -20 °C'taki stok kültürünün 20 µl'si ile bir gece önce aşılandı. 37 °C'ta 200 devir/dakikada çalkalanarak gece boyu büyütüldü. Ertesi gün kültürün 1 ml'si 500 ml'lik erlendeki 100 ml LB besiyerinin aşılanması için kullanıldı. Hücreler 37 °C'ta 200 devir/dakikada çalkalanarak, OD_{600}=0.5 oluncaya kadar büyütüldü. OD_{600}= 0.5'e ulaştığı zaman kültür buzda 20 dakika soğutuldu ve hücreler 4 °C'ta 10000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler buzda soğutulmuş 10 ml TSS içinde çözülerek transformasyona hazır hale getirildi. Hemen kullanılmayacak olan kompetan hücreler, daha sonraki kullanımlar için -80 °C'a kaldırıldı.

2.2.8.2 DNA'nın kompetan hücrelere transferi

Eppendorf tüplerine uygun hacimde (1-5 µl) ligasyon karışımı dağıtıldıktan sonra, hazırlanan kompetan hücreler (100-200 µl) bu tüplere eklendi ve tüpler 30-60 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 42 °C'ta 2 dakika ısı şoku uygulanan örneklerin her birisine 1 ml LB besiyeri eklenerek, çalkalamalı inkübatörde 37 °C'ta 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 10.000 devir/dakikada 2 dakika santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atıldıktan sonra dipte kalan besiyeri (~100 µl) içinde çözülen hücreler taze hazırlanmış ampisilin (100 µg/ml) ya da kloramfenikol (20 mg/ml) içeren LB petri kaplarına yayıldı ve 37 °C'ta gece boyu üremeye bırakıldı.

2.2.9 Klon adaylarının seçimi ve doğrulanması

Transformasyon sonrasında uygun antibiyotiği içeren LB petri kaplarında büyümüş kolonilerden ilk aşamada 10 koloni seçilerek, plazmit DNA'sı STET yöntemi ile izole edildi. Elde edilen DNA'ların uygun enzimler kullanılarak restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. Kesim sonucunda %1'lik agaroz jelde beklenen bantları gösteren klon adayları seçildi. Petrilerdeki koloniler uygun klon adayları bulununcaya kadar tarandı. Her bir mutasyon için seçilen en az iki klon adayı dizi analizi çalışmasına alındı.

Planlanan mutasyonların varlığı Beckman Coulter CEQ_{TM} 8000 Genetik Analiz Sistemi kullanılarak doğrulandı. Her bir dizi analizi reaksiyonu 20 µl'lik bir son hacim içinde son konsantrasyonu 6.4 pmol olan tek bir primer ile 0.5 µg kalıp DNA karışımını içerecek şekilde, DNA dizi analizi kitinde belirtilen protokole uygun olarak hazırlandı ve analiz edildi.

2.2.10 *pac* geninin klonlanması ve mutasyonların TIR içine PCR aracılığıyla yerleştirilmesi

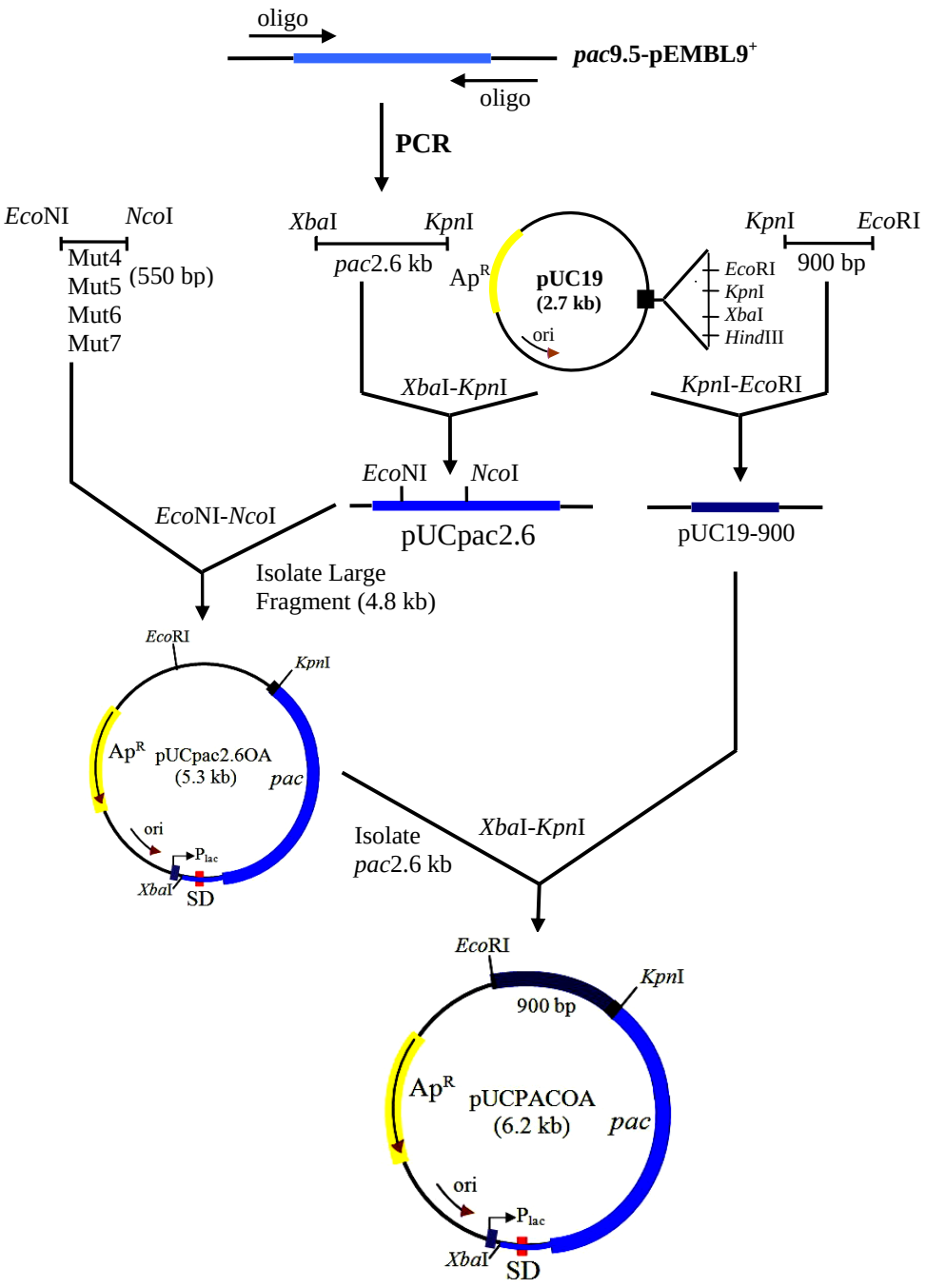
Plazmit *pac*9.5-pEMBL9$^+$ (Gümüşel ve ark., 2001), *pac* geninin translasyona başlama bölgesine Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutasyonlarını (Çizelge 2.4) yerleştirmek için kalıp olarak kullanıldı. Kullanılan primerler Çizelge 2.3'de verildi. Öncelikle 2.6 kb'lık *pac* geni ileri primer PA11 ve geri primer PA12 çifti kullanılarak *pac*9.5-pEMBL9$^+$ plazmitinden PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen fragman *Xba*I-*Kpn*I ile kesilerek agaroz jele yüklendi ve jelden izolasyon sonrası aynı restriksiyon enzimleriyle kesilmiş pUC19 ve pUC19$_{lac}^-$ vektörleriyle ligasyona uğratıldı (Şekil 2.3). Ligasyon materyali TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücrelerini transforme etmek üzere kullanıldı. Transformasyon sonucunda seçilen petrilerden alınan kolonilere ait miniprep plazmit DNA'ları STET yöntemi kullanılarak hazırlandı ve kontrol restriksiyon enzim kesimlerine alındı. Oluşturulan yeni plazmit pUCpac2.6 ve pUC$_{lac}^-$-pac2.6 olarak adlandırıldı.

Çizelge 2.4. Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinde SD, SD-ATG arası ve DR bölgelerinin nükleotit dizileri

SD	Ara bölge	Kodlayıcı bölge	Mutasyonlar	Kaynak
SD2 -10.....GAGGA SD1	TACA 4nt	ATG AAA AAT AGA AAT….. Met Lys Asn Arg Asn	→pac_{wt}	Gümüşel ve ark., 2001
SD2 -10…..GAGGA SD1	AATTAT 6nt	ATG AAA AAT AGA AAT….. Met Lys Asn Arg Asn	→S_{pac}	İşsever Öztürk, 2002
-10……GAGG SD1	TAATTAT 7 nt	ATG AAA AAT AGA AAT….. Met Lys Asn Arg Asn	→Mut4	Bu çalışma
SD2 -10.....GAGGA SD1	AAAATTAT 8 nt	ATG AAA AAT AGA AAT….. Met Lys Asn Arg Asn	→Mut5	Bu çalışma
SD2 -10.....GAGGA SD1	AATTAT 6 nt	ATG **AGA** AAT AGA AAT….. Met Arg Asn Arg Asn	→Mut6	Bu çalışma
SD2 -10.....GAGGA SD1	AATTAT 6 nt	ATG AAA AAT **AAA** AAT….. Met Lys Asn Lys Asn	→Mut7	Bu çalışma

Çizelge 2.4'de gösterilen mutasyonların *pac* genine yerleştirilmesi için *pac*9.5-pEMBL9^{+}'dan *pac* geninin içindeki 550-bp'lık bir bölge ileri primer PA6 (Mut4), PA7 (Mut5), PA8 (Mut6) ve PA9 (Mut7) ile tüm mutasyonlar için geri primer PA10 kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri *Eco*NI ve *Nco*I enzimleriyle kesilerek agaroz jele yüklendi. Jelden izole edilen fragmanlar pUCpac2.6 ve pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6 vektörlerinin *Eco*NI-*Nco*I kesimi sonucunda elde edilen ~4.8 kb'lık parçasıyla ligasyona uğratıldı. *E. coli* JM109 hücreleri ligasyon karşımıyla transforme edilerek, transformantların ampsilin içeren besiyerinden seçimi ve miniprep plazmit DNA'larının hazırlanmasından sonra, kontrol restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. Seçilen klonlara pUCpac2.6OA4, pUCpac2.6OA5, pUCpac2.6OA6, pUCpac2.6OA7 ve pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA4, pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA5, pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA6, and pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA7 adı verildi.

2.6 kb'lık *pac* geninin hemen aşağısındaki 0.9 kb'lık bir fragmanın PA aktivitesini iyileştirdiği bilinmekte olup (Gümüşel ve ark., 2001), bu fragman *pac*9.5-pEMBL9^{+} plazmitinden ileri primer PA14 ve geri primer PA16 kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünü pUC19 ve pUC19$_{lac}^{-}$ vektörlerinin *Kpn*I-*Eco*RI sitlerine klonlanarak, pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^{-}$-900 plazmitleri oluşturuldu. Daha sonra pUCpac2.6'dan yaban tipi ve pUCpac2.6OA4-7 plazmitlerinden ilgilenilen mutasyonları taşıyan 2.6 kb'lık *pac* genleri *Xba*I-*Kpn*I sitlerinden pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^{-}$-900'e klonlanarak, pUC-PACOA, pUC-PACOA4, pUC-PACOA5, pUC-PACOA6 ve pUC-PACOA7 olarak isimlendirilen plazmitler oluşturuldu (Şekil 2.3). Oluşturulan tüm klonlar dizi analizi ile doğrulandı.



Şekil 2.3. pUCpac2.6, pUCpac2.6OA4, pUCpac2.6OA5, pUCpac2.6OA6, pUCpac2.6OA7 ve pUC-PACOA, pUC-PACOA4, pUC-PACOA5, pUC-PACOA6 ve pUC-PACOA7 klonlarının oluşturulmasında izlenen klonlama stratejisinin şematik gösterimi.

2.2.10.1 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinin *tac* promotor temelli bir vektöre klonlanması

E. coli yaban tipi MC4100 ve çeşitli Tat genleri delesyona uğratılmış Tat$^-$ soyların (JARV15, BILKO, DADE), yaban tipi ve mutant *pac* genlerini içeren 3.5 kb'lık farklı fragmanları taşıyan yüksek kopya sayılı pUC19 plazmitleriyle transformasyonunda karşılaşılan plazmit kararsızlığı problemi nedeniyle; bu 3.5 kb'lık fragmanlar pac_{wt} ve pUC-PACOA4-7 plazmitlerinden *Eco*RI-*Hind*III enzimleriyle kesilerek çıkarıldı ve bir *tac* promotorunun kontrolü altındaki düşük kopya sayılı plazmit pMMB208'e (Morales ve ark., 1991) yeniden klonlandı. Oluşturulan plazmitler pMMB-PACwt, pMMB-PACOA4, pMMB-PACOA5, pMMB-PACOA6 ve pMMB-PACOA7 olarak adlandırıldı.

2.2.11 Rekombinant protein ekspresyonu

Klonlama sonucu elde edilen ve dizi analizi ile istenilen mutasyonları taşıdığı belirlenen klonlar, yaban tipi klon ve klonlamaların gerçekleştirilmesinde vektör olarak kullanılan, üzerinde gen taşımayan plazmit ile birlikte konstitütif ve uyarımlı gen ekspresyon çalışmalarına alındı. Ekspresyon çalışmalarında farklı sıcaklıklar (26 ve 37 °C) ve IPTG konsantrasyonları (25, 50, 75 ve 100 µM) denendi. En iyi PA aktivitesi veren koşullar belirlenerek, kültürleme çalışmaları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Ekspresyon çalışmalarında, ana kültürü başlatmadan önce, daha iyi bir üreme sağlamak amacıyla, iki ön kültürleme yapıldı. -20 ºC'tan alınan bakteri stoğunun 20 µl'sinin ampisilin içeren (100 µg/ µl) 2 ml kazein besiyerine aşılanması ile başlatılan I. ön kültür 26 ºC'ta 100 devir/dakika çalkalama ile gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi gün büyümüş I. ön kültürün 100 µl'si 100 ml'lik erlendeki ampisilinli 10 ml kazein besiyerine aşılanarak, kültür yine 26 ºC'ta (veya 37 °C'ta) 100 devir/dakika çalkalama ile gece boyu büyütüldü. Bir sonraki gün ise 1/3 havalandırma ile, 33 ml ampisilinli kazein besiyeri, 5/100 oranında II. ön kültür ile aşılanarak, 26 ºC'ta 100 devir/dakika çalkalama ile OD_{600}= 0.6-0.8 oluncaya kadar üremeye bırakıldı. IPTG

uyarımlı ekspresyon çalışmalarında, $0D_{600}$ değerleri bu seviyeye ulaştığında 100 mM IPTG (son konsantrasyonu 100 µM) ile uyarım gerçekleştirildi. Ekspresyon çalışmalarının başlangıcında IPTG ile uyarımın hemen öncesi, uyarım sonrası 3. saat, 5. saat, kültürün 20. saati, 30. saati, 46. saati ve 55. saatlerinde SDS-PAGE ve aktivite için örnek alınarak, üreme ve aktivite takibi gerçekleştirildi. Ekspresyon çalışmalarına en iyi aktivite veren koşullarda devam edildi.

Aktivite için cam tüplere alınan 10 ml kültür örneği, 4000 devir/dakika'da 4 °C'ta 20 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst sıvı vakumla çekilip atıldıktan sonra hücre peleti aktivite testinden önce en az bir gece -20 °C'ta bekletildi. Diğer yandan alınan örneklerin OD_{600} değerleri spektrofotometrede ölçülerek belirlendikten sonra SDS-PAGE örnekleri OD_{600}=0.3 için 500 µl hücre olacak şekilde ayrıldı. Örnekler 10 000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra, pelet SDS-PAGE'de kullanılmak üzere -20 °C'ta saklandı.

2.2.12 Protein analizi

2.2.12.1 SDS-PAGE

2.2.12.1.1 SDS-PAGE jelinin hazırlanması

SDS-PAGE (Laemmli, 1970) proteinin büyüklüğünün belirlenmesi, proteinin tanımlanması ve sonraki blotlama uygulamaları gibi, protein analizinde birçok kullanıma sahip bir yöntemdir. Jeller Çizelge 2.5'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 2.5. SDS-PAGE jel içeriği

%12	**Ayırma Jeli**	**Derişim jeli**
H2O (µl)	750	1050
Akrilamit/bisakrilamid (ml) (30:1)	3	0.39
0.75 M Tris-HCl/%0.2 SDS, pH 8.8 (ml)	3.75	-
0.25M Tris-HCl/%0.2 SDS, pH 6.8 (ml)	-	1.5
TEMED (µl)	6	3
% 10 Amonyum persülfat (APS) (µl)	90	60

APS ve TEMED akrilamidi polimerize etmek için karışıma daima en son eklendi. Jeller Miniprotean II (Biorad) dikey elektroforez sistemi kullanılarak yapıldı. Ayırma jeli hava kabarcığı oluşumundan sakınılarak APS ve TEMED eklenmesinden hemen sonra iki cam arasına dikkatli bir şekilde döküldü. Jelin üzeri yüzeyi örtmek ve hava ile temasını kesmek amacıyla izopropanol ile kapatılarak polimerleşmeye bırakıldı. Yaklaşık 50 dakika sonra, jelin polimerleşmesi tamamlanınca üzerindeki izopropanol dökülerek, jelin yüzeyi dH_2O ile yıkandı. Kalan su Whatmann 3MM filtre kağıdı ile alındı. Sonrasında hazırlanan derişim jeli polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine dökülerek, 10 kuyuluk bir plastik tarak hızla kuyulara yerleştirildi. Derişim jelinin polimerleşmesi için 50 dakika beklendi.

2.2.12.1.2 Örnek hazırlanması ve jele yüklenmesi

SDS-PAGE'de kullanılacak ekspresyon çalışmasından alınan örnekler yüklemeden önce 45 µl örnek yükleme tamponu içinde çözülerek 95 °C'ta 5 dakika kaynatıldı. Jelin üzerindeki tarak çıkarıldıktan sonra, kuyular 1x SDS-PAGE yürütme tamponu ile yıkanarak temizlendi. Jeller, her bir kuyuya örneklerden 20 µl ve bir kuyuda daima bir moleküler ağırlık belirteci olacak şekilde yüklendi. Blotlama çalışmalarında, jellerden biri SDS-PAGE sonrası boyama reaksiyonunda, diğeri ise işaretleme reaksiyonunda kullanılmak üzere 2 adet birbirine eş SDS-PAGE jeli hazırlandı.

Jeli taşıyan sistem elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, tank 1xSDS-PAGE yürütme tamponuyla dolduruldu. Jeller önde yürüyen boya ayırma jeline erişinceye kadar 100 V'da yürütüldükten sonra, elektroforez 200 V'da sürdürüldü. Jelden bromofenol blue çıktıktan sonra, elektroforez 20 dakika daha sürdürülerek tamamlandı. Jelin üst kısmındaki derişim jeli kesip atıldıktan ve bir köşesi işaretlendikten sonra, jel boyama çözeltisi içine alındı. Yaklaşık 60 dakika çalkanarak boyanan jel daha sonra arıtma çözeltisine aktarılarak, boyası arınıncaya kadar birkaç kez yıkandı. Kurutmak için, Whatmann 3MM kağıdı üzerine alınan jelin üstü şeffaf film ile kaplandı ve vakumlu kurutucuda 80 °C'ta 1 saat kurutuldu.

2.2.12.2 Western Blot

Bu yöntemde, nitroselüloz bir membran (0.45 µm, Sartorius) jel üzerine yerleştirilerek elektroblot yöntemi ile protein bantlarının nitroselüloz membrana aktarımı gerçekleştirildi (Towbin ve ark., 1979). Filtre kağıtları ve süngerler transfer öncesinde bir süre oda sıcaklığında transfer tamponunda bekletilerek ıslatıldı. Jel ve filtre sandviç yöntemi ile elektroblot kasetine (Biorad) yerleştirildi. Transfer için sırasıyla; elektroblot sistemine ait kasetin şeffaf tarafına önce transfer tamponunda ıslatılmış süngerlerden biri yerleştirildi.

Jelden biraz büyük kesilmiş ve transfer tamponunda ıslatılmış 3 adet Whatman 3MM kağıdı süngerin üzerine konuldu. Daha önce tamponda ıslatılmış nitroselüloz filtre Whatmanların üzerine yerleştirildi. Elektroforez sonrası edinilen SDS-PAGE jel, filtre üzerine aktarılarak, varsa jel ve filtre arasındaki hava kabarcıkları çıkarıldı. Jelin üstü yine 3 adet transfer tamponunda ıslatılmış Whatman 3MM kağıdı ile kapatıldı. İkinci sünger de transfer tamponunda ıslatıldıktan sonra en üste yerleştirildi ve kaset kapatıldı. Kaset, transfer cihazına jel negatif, membran pozitif yönde kalacak şekilde yerleştirildi. Manyetik karıştırıcının üzerine yerleştirilen tank, Western blot transfer tamponu ile doldurulduktan sonra 30 V'da 4 °C'ta gece boyu karıştırılarak transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrası çıkarılan jel transfer etkinliğini kontrol etmek amacıyla, boyama çözeltisine alınırken, filtre kuyuların

yönünü belirleyebilmek için ucundan kesilerek işaretlendi ve 1 saat oda sıcaklığında kurutuldu.

Daha sonra filtre hazırlanan 35 ml doyurma çözeltisinin 25 ml'ine alınarak 37 °C'ta 1 saat yavaşca çalkalandı. Kalan 10 ml doyurma çözeltisi cam petri kabına konularak, poliklonal antikor (Kaynak F. Gümüşel, Tübitak-MAM) eklendi ve bu karışıma aktarılan filtre 37 °C'ta 2 saat çalkalandı. Süre sonunda 3 kez 10 dakika 50 ml PBS ile yıkanan filtre, 50 ml 150 mM NaCl+50 mM Tris, pH 7.5 çözeltisinin içine alınarak 37 °C'ta 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından filtre anti-antikor çözeltisine (1/30000 dilüsyon) alınarak 37 °C'ta 1 saat daha çalkalandı. Daha sonra 50 ml 150 mM NaCl+50 mM Tris, pH 7.5 çözeltisi içinde 3 kez 10 dakika 37 °C'ta yavaşça çalkalanarak yıkanan filtre NBT-BCIP (Roche, 11 681 451 001) solüsyonundan 100 µl içeren 10 ml alkalen fosfataz tamponu içine konuldu. Bu karışımda oda sıcaklığında yaklaşık 2-3 dakika protein bantlar gözleninceye kadar karıştırıldı ve 50 ml PBS+200 µl 0.5 M EDTA içinde yıkanarak, temiz bir filtre kağıdı üzerinde kurutuldu.

2.2.13 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

2.2.13.1 Hücre özütünün hazırlanması

Ekspresyon çalışması esnasında alınıp, çöktürülerek -20 °C'ta muhafaza edilen 10 ml'lik hücre kültürlerine ait peletler, 1 ml (kültür hacminin 1/10'u olacak şekilde) 100 mM $CaCl_2$ (soğuk) içinde çözüldü. 1 saat buzda bekletildi. 7000 devir/dakikada 30 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Pelet 1100 µl 100 mM Tris-HCl, 10 mM gliserol pH 8.0 içinde çözülerek, 55 µl 10 mg/ml lizozim (son konsantrasyonu 0.5 mg/ml) eklendi. Örnekler buzda 15 dakika orbitral karıştırıcıda hafifçe çalkalanarak karıştırıldı. 2,31 µl 0,5 M EDTA, pH 8.0 (son konsantrasyonu 1mM) eklenen örnekler buzda 45 dk daha karıştırılmaya devam edildi. Sonrasında 42 °C'ta 1 dakika bekletilerek şoka uğratılan hücreler sonikatörde parçalandı. Sonikasyon işlemi 15 sn vuruş 20 sn duruş olarak 64 mikronda ~1-2 dakika sürede gerçekleştirildi.

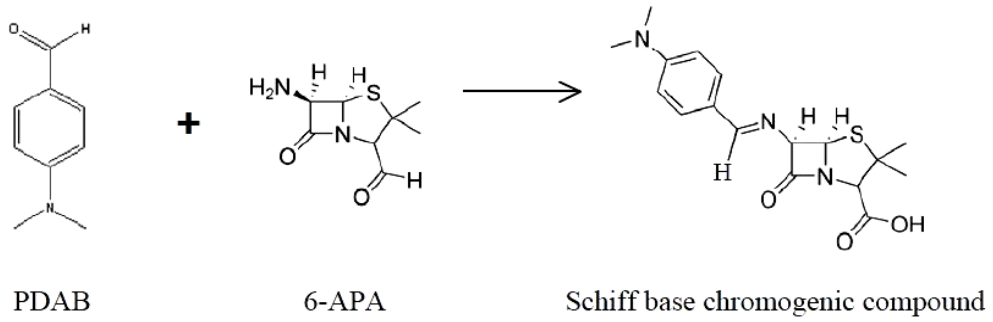
Sonikasyon sonrasında örnekler 10 000 devir/dakikada 30 dk santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak aktivite testine geçildi.

Besiyerinde enzim aktivitesine bakıldığı durumda ise; büyümüş kültürlerden alınan 10 ml örnek çöktürüldükten sonra, üst sıvıdan 1 ml alınarak eppendorf tüpte santrifüjlendi ve süpernatantın 100 µl'si aktivite testinde kullanıldı.

2.2.14 PA aktivite testi

2.2.14.1 PDAB yöntemi ile aktivite testi

PA enzim aktivitesi Balasingham (1972)'a göre ölçüldü. 10 ml'lik kapaklı cam tüp içinde 487.5 µl 15 mM penisilin G çözeltisi ve sonikasyon sonrası elde edilen total hücre proteininden 12.5 µl hafifçe vortekslenip karıştırıldıktan sonra, tüpler 40 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyon 3 ml asetat tamponu eklenerek durduruldu ve karışıma 500 µl PDAB (p-dimetilaminobenzaldehit) çözeltisi eklendi. Şekil 2.4'de gösterildiği gibi penisilin G'nin hidroliz ürünlerinden 6-APA, PDAB ile reaksiyona girerek A_{415}'de ölçülebilen renkli bir shift baz oluşturur. Enzim içermeyen bir blank ve saf PA'nın kontrol olarak kullanıldığı aktivite testinde, PA aktivitesi oluşan bu renk reaksiyonunun 415 nm dalga boyunda okunmasıyla ölçüldü.



Şekil 2.4. PDAB (p-dimetilamino-benzaldehit), 6-APA ile reaksiyona girerek 415 nm'de gözlenebilen bir Schift baz oluşturur.

Bir ünite enzim aktivitesi, 40 °C'ta pH 8.0'de 15 mM PenG'den dakikada 1 µmol 6-APA üretebilen enzim miktarı olarak kabul edildi.

2.2.14.1.1 6-APA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

10 mg 6-APA, 10 ml 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda çözüldü. 75 mg PDAB ise 15 ml metanolde çözüldü. Her sette 11 tüp ve 1. tüp blank olmak üzere, 2 set deney tüpü hazırlandı. Tüplere son konsantrasyonları 0.1-1.0 mg/ml olacak şekilde, 50 µl'lik artışlarla sırasıyla, 50–500 µl aralığında 6-APA (1mg/ml) eklendi. Toplam hacim dH_2O ile 500 µl'ye tamamlanarak tüpler vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 3 ml asetat tampon eklenerek reaksiyon durduruldu. Tüplere 500 µl PDAB solüsyonu eklenerek vortekslendi. Oluşan sarı renk spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda ölçüldü. Her iki set için bulunan aktivite değerlerinin ortalaması alınarak 6-APA kalibrasyon eğrisi çizildi ve eğrinin eğim değeri hesaplandı. Bu değer aktivite çalışmalarında, örneklerin aktivitelerini hesaplamak için aşağıdaki formüle göre kullanıldı.

$$\text{Aktivite (U/ml/dk)} = \frac{\dfrac{A_{415}}{\text{Eğim}} \times \dfrac{1000}{216.28\ (g/mol)} \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Zamanı (dakika)}}$$

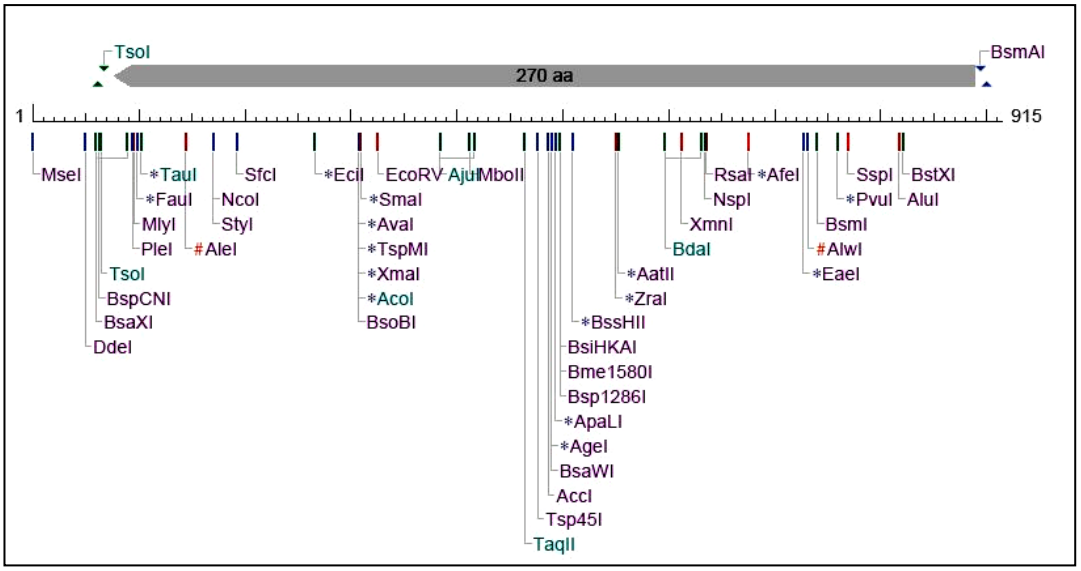
2.2.14.2 *Serratia marcescens* kullanılarak aktivite testi

Ekspresyon çalışmasına alınan pac_{wt} ve mutant klonların PA aktivitesi *Serratia marcescens* ATCC 2717 soyu aracılığıyla da test edildi (Meevootisom ve ark., 1983). LB agar petri kaplarının yüzeyine 40 µl IPTG (100 mM) içeren 80 µl LB karışımı yayılarak kurutuldu. Büyüyen kültürlerin 2'şer mikrolitresi, hazırlanan bu LB-agar petri kaplarında ayrı bölmelere damlatıldı. Kültürler gece boyu 26 ºC'ta büyütüldükten sonra üzerlerine 3 ml H-top agar (*Serratia marcescens*'in gece boyu büyütülmüş kültüründen 15 µl, son konsantrasyonu 100 µM IPTG ve 4 mg/ml PenG içeren) yayılarak 26 ºC'ta 10-12 saat daha üremeye bırakıldı. *S. marcescens* penisilin

G'ye dirençli olup; onun hidroliz ürünü 6-APA'ya duyarlıdır. Bu nedenle PA'yı üreten soylarda, PA'nın penisilin G'yi 6-APA'ya parçalaması nedeniyle petride belirgin bir zon oluşur ve *S. marcescens*'in üremesi bölgesel olarak inhibe edilmiş olur. Yaban tipi klon ve mutantlara ait kültürlerin farklı saatlerinden (5 ve 10. saatler) alınan örneklerle yapılan bu analizle pMMB-temelli klonlarda hücre dışı PA aktivitesinin varlığı petri düzeyinde gösterilmiş oldu.

3 BULGULAR

Tez çalışmasının başlangıcında *pac* geni TIR bölgesine planlanan mutasyonları yerleştirmek için *pac*3.5-pUC19 plazmiti ve ucunda *Eco*NI kesim yerini taşıyan ileri primerler (Çizelge 2.3) ile *Bgl*II restriksiyon enzim bölgesini taşıyan geri primer kullanıldı. PCR mutagenez sonrasındaki klonlama çalışmalarında, elde edilen transformantlar arasından klon adaylarının ön seçimi için yapılan restriksiyon enzim (*Bgl*II) kesimlerinde agaroz jelde beklenenden farklı bantlar görüldü. *Bgl*II enzimiyle karşılaşılan bu kesim problemi nedeniyle, onun yerine *Nco*I kesim sitini içeren yeni bir geri primer, primer PA10 sentezlettirilerek; tasarlanan mutasyonları taşıyacak *pac* geninden ~550 bp'lik bölgenin PCR ile çoğaltılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarına başlandı. PCR optimizasyon çalışmaları sonrasında optimal koşullarda büyük ölçekte çoğaltılan mutajenik fragmanlar pUC19 üzerindeki *pac*3.5'a yerleştirildi. *pac* geninin dizisi bilinen ~2.6 kb'lık bölgesine ait restriksiyon haritasına göre, *Nco*I enziminin gen üzerinde tek bir kesim bölgesi bulunmaktadır. Ancak klon adaylarının seçimi için *Nco*I ile yapılan kontrol restriksiyon enzim kesimlerinde iki farklı bantın görülmesi, *pac* genini de içeren 3.5 kb büyüklüğündeki genomik parçanın genden geriye kalan ~0.9 kb'lık bölgesinde bu enzime ait kesim yerinin bulunabileceğine işaret etmiştir. Bu amaçla öncelikle ~0.9 kb'lık bölgenin dizi analizi yapılarak, restriksiyon enzim haritası çıkarılmıştır. Beklenildiği gibi *Nco*I enziminin 2.6 kb'lık *pac* geninin yanı sıra, 900 bp'lik bölge içinde de kesim yeri bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 900 bp'lik bölgeyi tek yerden kesen enzimler.

Bu bulgu planlanan klonlama stratejisi için sorun yarattığından; *pac*3.5-pUC19 (pac_{wt})'u oluşturan 2.6 kb'lık *pac* yapısal geni ile genin 3′ ucundaki 900 bp'lik fragmanın ayrı ayrı ve birlikte pUC19 vektörü üzerinde yer alacağı yeni bir klonlama stratejisi geliştirilmiştir. Bunun nedeni Enzim Moleküler Genetiği Grubu'nun daha önce yapmış olduğu deneysel çalışmalardan; pac_{wt} genindeki 2.6-kb'den hemen sonra gelen bu 900 bp'lik parçanın pac_{wt}'ın aktivitesinde *pac*2.6-kb'yi taşıyan klonlara görece iyileşme sağladığının bilinmesidir (Gümüşel ve ark., 2001). Diğer yandan P_{lac} -35 bölgesi değişikliği taşıyan pUC19 vektörü üzerindeki *pac* klonlarının yaban tipe göreceli IPTG ile uyarım sonucunda daha iyi aktivite verdiği belirlenmiştir (İşsever Öztürk, 2002). Bu veriler nedeniyle pUC19 *lac* promotorunda yapılan söz konusu değişikliğin *pac* geni ekspresyonu üzerine etkisi, bu çalışmada oluşturulan klonlar özelinde de irdelenmiştir. Bu amaçla öncelikle *pac*9.5-pEMBL9$^+$ plazmit DNA'sının (Gümüşel ve ark., 2001) kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 2.6-kb'lık *pac* geni pUC19 ve pUC19$_{lac}^-$ vektörleri üzerine klonlanarak pac2.6-pUC19 (pUCpac2.6), pac2.6-pUC19$_{lac}^-$ (pUC$_{lac}^-$-pac2.6) oluşturulmuştur.

Aynı zamanda PCR ile çoğaltılan 900 bp'lık fragmanın pUC19 ve pUC19$_{lac}^-$ vektörleri üzerine klonlanmasıyla pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^-$-900 plazmitleri de elde

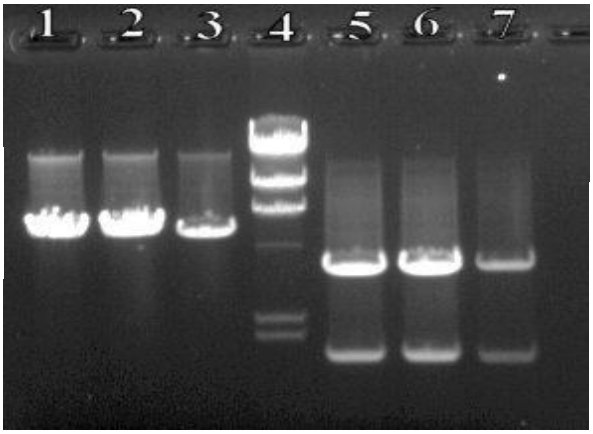
edilmiştir. Bu klonların oluşturulmasından sonra, *pac* geninde yapılması ön görülen her bir mutasyona ait mutajenik gen fragmanı PCR aracılığıyla çoğaltılarak pUC19 vektörü üzerinde taşınan 2.6 kb'lık *pac* genine yerleştirilmiştir (Şekil 2.3). Daha sonra istenen mutasyonları taşıyan mutajenik 2.6-kb'lık *pac* genleri $pUC19_{lac}^{-}$, pUC19-900 ve $pUC19_{lac}^{-}$-900 vektörleri üzerine aktarılarak, planlanan mutasyonların farklı büyüklükte fragmanlar (2.6 kb ve 3.5 kb) içinde farklı vektörler üzerinde yer aldığı varyantları oluşturulmuş (Çizelge 2.2), elde edilen klonlar gen ekspresyonu çalışmalarına alınmıştır.

3.1 2.6 kb-*pac* geninin PCR ile çoğaltılarak pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörlerine klonlanması

Tez çalışmasında PCR temelli mutagenez ve klonlama çalışmaları için *pac* genini de içeren yaklaşık 9.5 kb'lık genomik parçayı taşıyan *pac*9.5-$pEMBL9^{+}$ vektörü (Gümüşel *ve ark.*, 2001) temel biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır. Klonlanma için yapılacak büyük ölçekte üretim öncesinde her bir PCR reaksiyonu için optimal PCR koşullar belirlenmiştir.

Buna göre 2.6-kb *pac* geninin PCR ile çoğaltımında yöntem kısmında (2.2.3.2) belirtilen miktarlarda kullanılan kalıp DNA, primerler (PA11-PA12), dNTP ve enzimin yanı sıra, 3 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunun optimal koşulları sağladığı bulunmuştur. Klonlama amaçlı olarak 2.6 kb'lık *pac* geni belirtilen PCR koşullarında büyük ölçekte çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra her bir PCR tüpüne 0.45 ünite *Taq* DNA polimeraz eklenerek, tüpler 72 °C'ta 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Elde edilen PCR ürününden 5 µl alınarak agaroz jele yüklenmiş ve miktar tayini yapılmıştır. PCR ürünü primerlerin uçlarında taşınan *Xba*I-*Kpn*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ (İşsever Öztürk, 2002) vektörleri üzerine klonlanmıştır. Ligasyon materyalinin yarısı TSS yöntemi kullanılarak taze hazırlanmış JM109 kompetan hücrelerinin transformasyonunda kullanılmıştır.

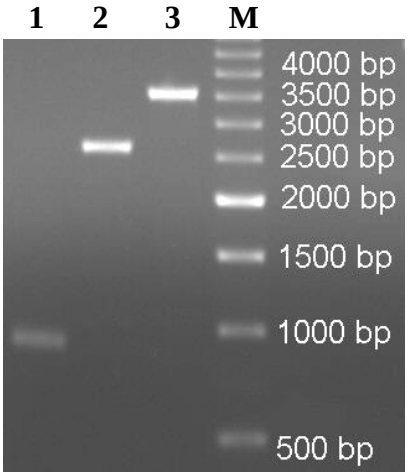
Transformasyon sonucu pUCpac2.6 ve pUC_{lac}^{-}-pac2.6 ait klon adaylarının taranması için; petri tabaklarından alınan koloniler (toplam 34 koloni), STET yöntemi ile plazmit miniprep DNA'larının eldesi için kullanılmıştır. Hazırlanan miniprep DNA'lar *Kpn*I enzimi ile kesilmiş ve agaroz jelde beklenen fragmanın boyu, yani 5.3 kb ile uyumlu gerçek klon adaylarının varlığı araştırılmıştır (Şekil 3.2). İncelenen adaylar arasından pUCpac2.6'a ait 2 [(*pac*2.6-pUC19 (1-2) ve (1-6)]; pUC_{lac}^{-}-pac2.6'a (*pac*2.6-$pUC19_{lac}^{-}$) ait 1 aday, gerçek klon adayı olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ üzerine klonlanan 2.6 kb'lık parçanın *pac* geni olduğunu doğrulamak üzere; pUCpac2.6 ve pUC_{lac}^{-}-pac2.6 plazmitleri ayrıca geni iki yerden kesen (837 ve 2532) *Hpa*I enzimiyle de kesilmiştir. Kesim sonucunda beklenen parça büyüklükleriyle uyumlu fragmanların eldesiyle, *pac* geninin varlığı seçilen klonlarda doğrulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. pUCpac2.6 ve pUC_{lac}^{-}-pac2.6 klon adaylarının seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi. 1) *pac*2.6-pUC19 (1-2)/*Kpn*I kesim, 2) *pac*2.6-pUC19 (1-6)/*Kpn*I kesim, 3) *pac*2.6-$pUC19_{lac}^{-}$/*Kpn*I kesim, 4) λ/*Hind*III belirteç (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp) 5) *pac*2.6-pUC19 (1-2)/*Hpa*I kesim, 6) *pac*2.6-pUC19 (1-6)/*Hpa*I kesim, 7) *pac*2.6-$pUC19_{lac}^{-}$/*Hpa*I kesim.

3.2 *pac* geninin 3' ucundaki 0.9 kb'lık bölgenin PCR ile çoğaltılarak pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörlerine klonlanması

3.5 kb büyüklüğündeki genomik parçayı yaşıyan pac_{wt}'da *pac* geninden geriye kalan genin 3' ucundaki ~0.9 kb'lık bölge, yapılan optimizasyon çalışması sonrasında Yöntem kısmında (2.2.3.2) belirtilen miktarlarda kalıp DNA, primerler (PA14-PA16), dNTP ve enzimin yanı sıra, 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. 0.9 kb'lık PCR ürünü (insert), *Kpn*I-*Eco*RI enzimleriyle kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörleriyle birlikte agaroz jele yüklenmiş ve jelden izole edilmiştir. Jelden izole edilen insert ve vektörler miktarları belirlendikten sonra ligasyona uğratılarak, ligasyon materyalinin yarısı JM109 kompetan hücrelerin transformasyonunda kullanılmıştır. Transformasyon sonrası petrilerden seçilen klon adayları *Kpn*I-*Eco*RI kesimine alınarak jelde değerlendirilmiş ve dizi analizi sonrasında doğrulanan klonlar adayları pUC19-900 ile $pUC19_{lac}^{-}$-900 olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 900 bp'lik fragmanın pUC19 üzerine klonlanmasını gösteren agaroz jel elektroforezi. 1) 900 bp'lik fragman, 2) pUC19, 3) pUC19-900

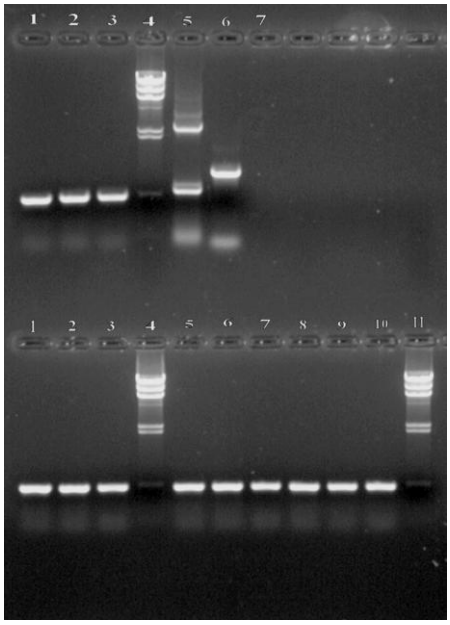
3.3 PCR-temelli mutagenez çalışmaları

SD dizisi ve/veya SD-ATG arasındaki bölgede (Mut4, Mut5) ve SD-ATG arasındaki bölgenin yanı sıra DR'de (Mut6, Mut7) oluşturulacak mutasyonların aktif PA üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla öncelikle planlanan mutasyonlar *pac* geni TIR bölgesine PCR aracılığıyla ayrı ayrı yerleştirilmiştir. Çizelge 2.3'de dizisi verilen primerler kullanılarak yapılan PCR-temelli yönlendirilmiş mutagenez için ilk aşamada PCR koşulları optimize edilmiş, daha sonra optimize edilen PCR koşullarında klonlama amaçlı büyük ölçekte üretim gerçekleştirilmiştir. Sentezlettirilen primerler 5' uçlarında PCR ürünlerinin vektör sistemleri üzerindeki *pac* genlerinin ilgili bölümlerine aktarımını sağlayacak restriksiyon enzim kesim bölgelerini içermektedir (Çizelge 2.3). Oluşturulan klonların restriksiyon enzim kesimleriyle ön seçilimleri yapılırken; *pac* geninde planlanan mutasyonların varlığı dizi analizi çalışmalarıyla doğrulanmıştır (Bölüm 3.3.3).

3.3.1 PCR aracılığıyla *pac* geni TIR bölgesine mutasyonların yerleştirilmesi

3.3.1.1 PCR koşullarının optimizasyonu

pac geni üzerinde *Eco*NI-*Nco*I restriksiyon enzimleri arasında kalan ve kullanılan primer çiftleri ile Mut4 (PCR4 için primer PA6/PA10), Mut5 (PCR5 için primer PA7/PA10), Mut6 (PCR6 için primer PA8/PA10) ve Mut7 (PCR7 için primer PA9/PA10) mutasyonlarının (Çizelge 2.4) yerleştirileceği ~550 bp'lık bölge; kalıp olarak *pac*9.5-pEMBL9$^+$ plazmit DNA'sının kullanıldığı PCR reaksiyonları aracılığıyla çoğaltılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmalarının ürünleri agaroz jelde değerlendirilmiş ve 4 farklı PCR için yapılan büyük ölçekte üretim reaksiyonlarının Yöntem kısmında (2.2.3.2) belirtilen miktarlarda kullanılan kalıp DNA, primer, dNTP ve enzimin yanı sıra, 1.5 mM $MgCl_2$ içeren tampon kullanılarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir (Şekil 3.4).

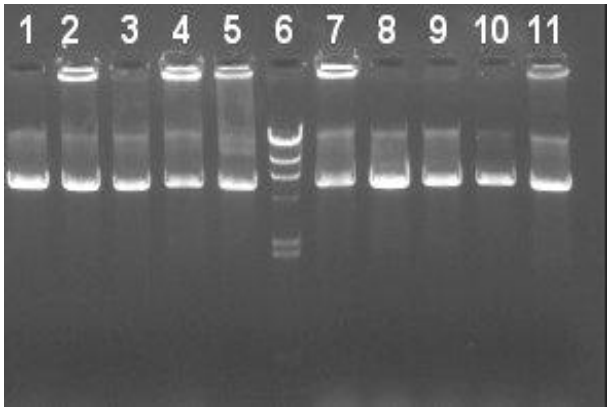


Şekil 3.4. PCR4, PCR5, PCR6 ve PCR7 için PCR optimizasyon çalışmasının sonuçlarını gösteren agaroz jel elektroforezi. Jelin altı: 1) PCR 4-1 (1.5 mM $MgCl_2$), 2) PCR 4-2 (3 mM $MgCl_2$), 3) PCR 4-3 (5 mM $MgCl_2$); 4) λ/*Hind*III belirteç (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp) , 5) PCR 5-1 (1.5 mM $MgCl_2$), 6) PCR 5-2 (3 mM $MgCl_2$), 7) PCR 5-3 (5 mM $MgCl_2$), 8) PCR 6-1 (1.5 mM $MgCl_2$), 9) PCR 6-2 (3 mM $MgCl_2$), 10) PCR 6-3 (5 mM $MgCl_2$), 11) λ/*Hind*III belirteç. Jelin üstü: 1) PCR 7-1 (1.5 mM $MgCl_2$), 2) PCR 7-2 (3 mM $MgCl_2$), 3) PCR 7-3 (5 mM $MgCl_2$), 4) λ/*Hind*III belirteç.

3.3.1.2 Mutajenik *pac* fragmanlarının pUCpac2.6'ya klonlanması

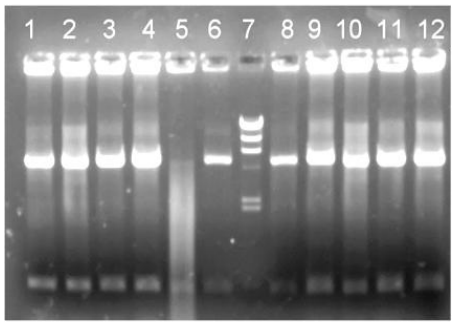
Optimal PCR koşulları belirlendikten sonra, istenen mutasyonları taşıyan ilgili fragmanların klonlanlama amaçlı daha büyük ölçekte üretimi yapılarak *Eco*NI-*Nco*I enzimleriyle kesilip agaroz jelden izole edilmiş ve aynı muameleden geçmiş pUCpac2.6 vektörüyle ligasyona uğratılmıştır (Şekil 2.3). Ligasyon materyali *E. coli* JM109 kompetan hücrelerin transformasyonunda kullanılmıştır. Transformasyon sonrası petrilerden seçilen 68 transformanta ait plazmit DNA izole edilerek, *Hind*III enzimiyle kesilmiştir. Mutasyonları taşıyan fragmanların pUCpac2.6'ya yerleştirilmesi durumunda; beklenen jelde ~5.3 kb büyüklüğünde tek bir bandın gözlenmesidir. Yapılan kesim sonucunda agaroz jel görüntüsüne göre bu büyüklükte bant veren Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 için klon adayları belirlenmiştir. Şekil 3.5'de Mut6'ya ait seçilen klon adayları (6-1, 6-2, 6-3, 6-4, 6-6, 6-7, 6-8, 6-9, 6-14)

görülmektedir. Mut4, Mut5 ve Mut7 için de klonlanan fragmanları taşıması durumunda pUCpac2.6 ile aynı büyüklükte (~5.3 kb) tek bir bant vermesi beklenen klon adayları, agaroz jelde değerlendirilerek, her bir mutasyon için Şekil 3.5'dekine benzer bir profil veren adaylardan ikisi dizi analizi çalışmasına alınmıştır.



Şekil 3.5. Mut6 mutasyonuna ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi. 1) 6-1, 2) 6-2, 3) 6-3, 4) 6-4, 5) pUCpac2.6/*Hind*III kesim, 6) λ/*Hind*III belirteç (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp), 7) 6-6, 8) 6-7, 9) 6-8, 10) 6-9, 11) 6-14

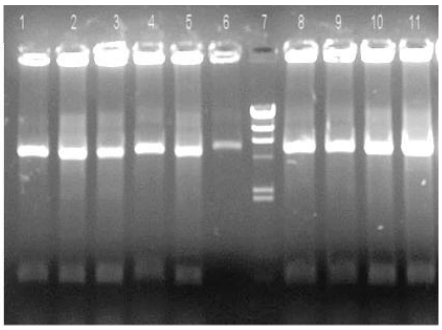
Seçilen klon adayları daha sonra Mut 4, 5, 6 ve 7 için bu mutasyonların *pac*2.6 kb'ye yerleştirildiği enzim bölgeleri olan *Eco*NI-*Nco*I kesimine alınmıştır. Agaroz jelde beklenenle uyumlu olarak 4.8 kb ve ~550 bp büyüklüğünde iki bant gözlenmiştir. Böylece Mut4 (pUCpac2.6OA4), Mut5 (pUCpac2.6OA5), Mut6 (pUCpac2.6OA6) ve Mut7 (pUCpac2.6OA7) için Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilen uygun klon adaylarından ikisi seçilerek dizi analizi çalışmasına alınmıştır.



Şekil 3.6. Mut4 ve Mut6 mutantlarına ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi. 1) 4-4, 2) 4-5, 3) 6-1, 4) 6-2, 5) 6-3, 6) pUCpac2.6, 7) λ/*Hind*III kesim (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp), 8) 6-4, 9) 6-5, 10) 6-6, 11) 6-7, 12) 6-8/*Eco*NI-*Nco*I kesimi

←4.8 kb→

←550 bp→



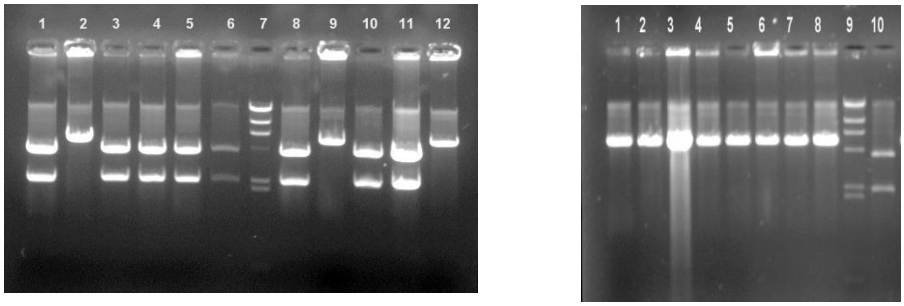
Şekil 3.7. Mut5 ve Mut7 mutantlarına ait klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi 1) 5-1, 2) 5-2, 3) 5-3, 4) 5-4, 5) pUCpac2.6, 6) 5-5, 7) λ/*Hind*III kesim (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp), 8) 7-1, 9) 7-2, 10) 7-3, 11) 7-4 /*Eco*NI-*Nco*I kesimi

3.3.2 Mutajenik *pac* fragmanlarının pUC19$_{lac}^{-}$, pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^{-}$-900 vektörlerine klonlanması

Planlanan tüm mutasyonların (Mut4-7), pUC19$_{lac}^{-}$, pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^{-}$-900 vektörlerine yerleştirilmesi için; öncelikle ilgili mutasyonları taşıyan pUCpac2.6OA4-7 klonları *Xba*I-*Kpn*I enzimleriyle kesilerek; mutajenik 2.6-kb *pac* geni fragmanları jelden izole edilmiştir. Sonrasında vektör olarak kullanılacak pUC19$_{lac}^{-}$, pUC19-900 ve pUC19$_{lac}^{-}$-900 plazmitleri *Xba*I-*Kpn*I enzimleriyle kesilerek, jelden izole edilen fragmanları hazırlanan insertler ile daha önce belirtilen koşullarda ligasyona uğratılmıştır. Ligasyon karışımının yarısı *E. coli* JM109 kompetan hücrelerin transformasyonunda kullanılarak, transformasyon sonucunda seçilen 46 transformanta ait miniprep DNA hazırlanmış ve kontrol restriksiyon enzim kesimine alınmıştır. Kesim sonrası uygun büyüklüğe sahip klon adaylarının doğruluğu agaroz jelde değerlendirilmiştir.

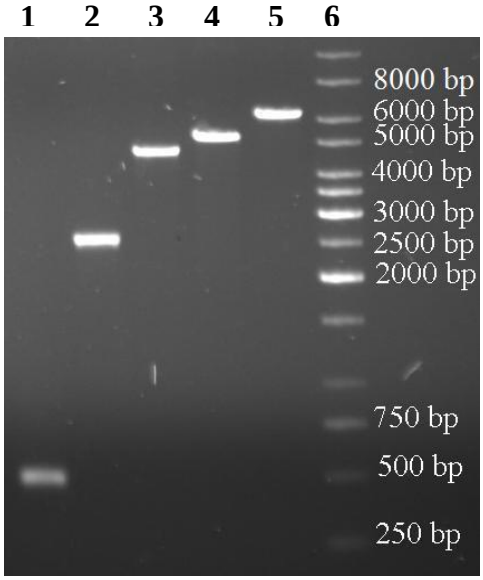
Yapılan *Nco*I kesimi sonrasında, mutajenik 2.6-kb *pac* genini taşıyan pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7 klon adayları jelde gösterdikleri ~5.3 kb büyüklüğündeki tek bir banta (Şekil 3.8-B), pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 ve pUC-PACOA4-7'a ait klon adayları ise, bu enzimin hem *pac* geni hem de 900 bp'lık fragman üzerinde kesim yerinin bulunması nedeniyle; 3.5-kb'lık parçayı taşıyan pac_{wt}'a benzer olarak jelde gösterdikleri 2.2 kb ve 3.9 kb'lık iki banta (Şekil 3.8-A) dayanılarak klon adayları olarak seçilmiştir. Şekil 3.8-A'da gösterilen pUC-PACOA4-7 klonlarından Mut4 için (4-1), Mut5 için (5-1), Mut6 için 6-1, Mut7 için (7-1), pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klonlarından Mut4 için (4-6), Mut5 için (5-5), Mut6 için (6-2) ve Mut7 için (7-4, şekilde yok) doğru klon adayları olarak seçilmiştir. Şekil 3.8-B'de gösterilen mutasyonları taşıyan pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7 klon adaylarından Mut4 için (4-1, 4-2), Mut5 için (5-1, 5-2), Mut6 için (6-1, 6-2) ve Mut7 için (7-1, 7-2) seçilmiştir. *Nco*I kesimi ile seçilen tüm bu klon adayları ayrıca *pac*2.6-kb genini iki yerden kesen *Hpa*I enzimiyle yapılan kesim sonucunda da doğrulanmıştır. Bu klonlamalarla eş zamanlı olarak yaban tipi 2.6-kb *pac* geni de pUCpac2.6 klonundan *Xba*I-*Kpn*I enzimleriyle kesilmiş ve pUC19-900 ve $pUC19_{lac}^{-}$-900 vektörleri üzerine klonlanarak, pUC-PACOA ve pUC_{lac}^{-}-PACOA plazmitleri oluşturulmuştur.

A **B**



Şekil 3.8. *Nco*I enzimiyle kesilmiş Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7'e ait pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7, pUC-PACOA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klon adaylarının ön seçimine yönelik yapılan agaroz jel elektroforezi. **A)** pUC-PACOA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klon adaylarının seçilmesi 1) 4-1, 2) 4-2, 3) 5-1, 4) 6-1, 5) 7-1, 6) pac_{wt}, 7) λ/*Hind*III belirteç (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp) , 8) 4-6, 9) 4-7, 10) 5-5, 11) 6-2, 12) 6-3, 12) 7-2. **B)** Mut4-7 mutasyonlarını taşıyan pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA klon adaylarının seçilmesi 1) 4-1, 2) 4-2, 3) 5-1, 4) 5-2, 5) 6-1, 6) 6-2, 7) 7-1, 8) 7-2, 9) λ/*Hind*III belirteç (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp), 10) pac_{wt}

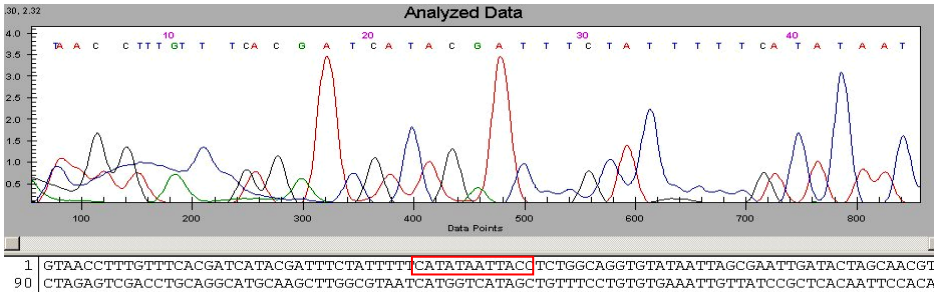
pUCpac2.6OA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7 ile pUC-PACOA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klonlarının Şekil 2.3'de şematize edilen ve daha önce açıklanan klonlama stratejisi basamaklarına göre oluşturulması Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



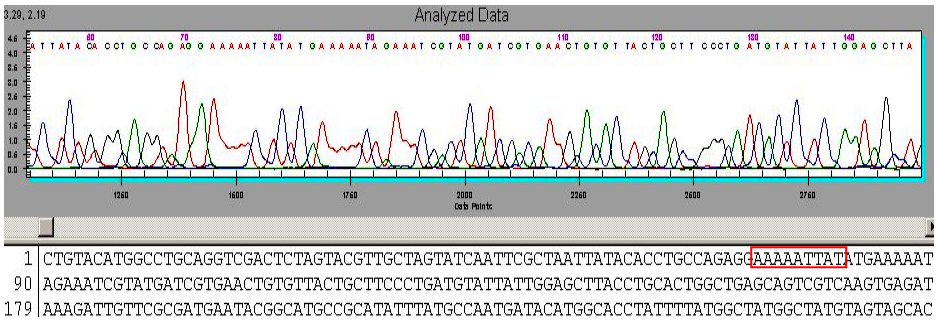
Şekil 3.9. Klonlama stratejisini gösteren agaroz jel elektroforezi. 1) Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının ayrı ayrı yerleştirildiği 550 bp'lik PCR ürünü fragman, 2) 2.6-kb *pac* geni, 3) pUCpac2.6'dan 550 bp'lik fragman çıkarıldıktan sonra geriye kalan 4.8 kb'lık büyük fragman, 4) Mutasyonlara ait pUCpac2.6OA4-7 klonları (5.3 kb), 5) pUC-PACOA4-7 klonları (6.2 kb).

3.3.3 Mutasyonların dizi analizi ile doğrulanması

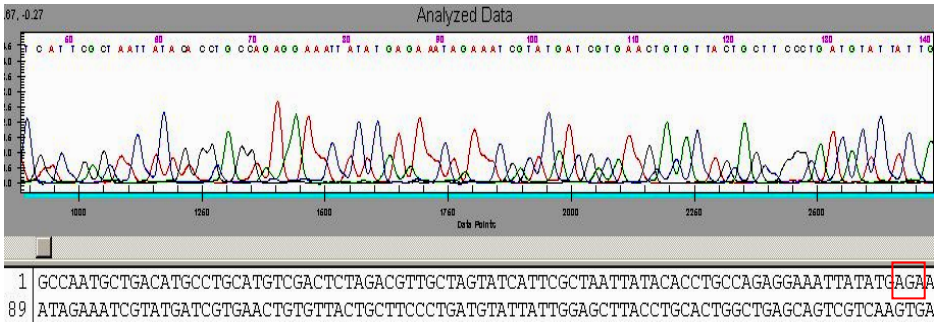
Yaban tipi *pac* genini taşıyan pUCpac2.6, pUC_{lac}^{-}-pac2.6, pUC-PACOA ve pUC_{lac}^{-}-PACOA klonlarıyla, mutajenik *pac* genini taşıyan pUCpac2.6OA4-7, pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7, pUC-PACOA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klonlarında Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının varlığı yapılan dizi analizi çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Bu dizi analizlerinden bazılarına ait sonuçlar Şekil 3.10, 3.11, 3.12 ve 3.13'de verilmiştir.



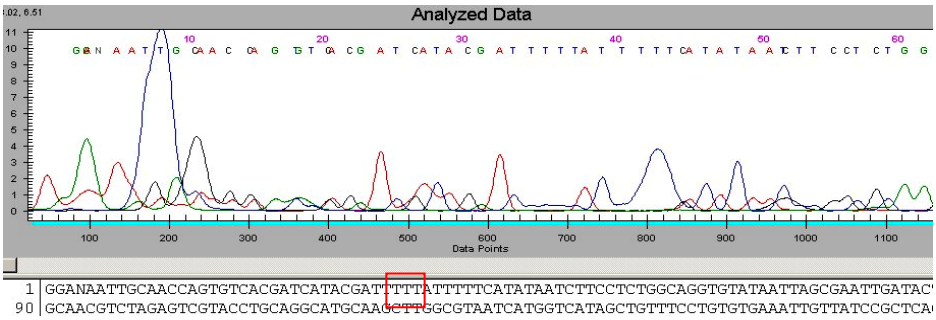
Şekil 3.10. Mut4-*pac*3.5/pUC19 (pUC-PACOA4) klonunun taşıdığı Mut4 mutasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Mut5-*pac*3.5/pUC19 (pUC-PACOA5) klonunun taşıdığı Mut5 mutasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Mut6-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$ (pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA6) klonunun taşıdığı Mut6 mutasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Mut7-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$ (pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA7) klonunun taşıdığı Mut7 mutasyonu gösterilmiştir.

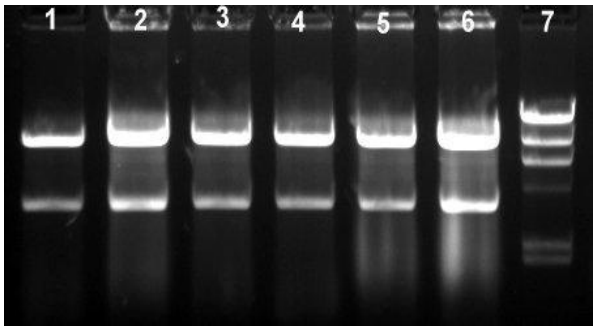
3.3.4 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan pUC varyantlarının Tat^{+} ve Tat^{-} soylara aktarılması

pac geni TIR bölgesinde ve özellikle sinyal dizisinde yapılan mutasyonların PA'nın sekresyonu üzerine etkisini irdelemek için yaban tipi *E. coli* MC4100 ve Tat^{-} (B1LKO, JARV15 ve DADE) soyların yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan pUC-PACOA klonlarıyla transformasyonu denenmiştir. Ancak yaban ve mutajenik *pac* genlerini taşıyan pUC-temelli plazmitler bu soylarda kararlılık göstermemiş ve transformasyon sonucu elde edilen kolonilerin plazmit DNA'ları restriksiyon enzim kesimine alınarak agaroz jelde değerlendirildiğinde; *pac* geninin tamamının ya da bir kısmının delesyonu veya plazmitin kaybı gözlenmiştir. Yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan fragmanların düşük kopya sayılı pMMB208 (Morales ve ark., 1991) vektörüne klonlanmasıyla *E. coli* MC4100 ve Tat^{-} soylarında yüksek kopya sayılı pUC klonlarıyla karşılaşılan kararsızlık probleminin üstesinden gelinmiştir.

3.3.5 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerinin pMMB208 vektörüne klonlanması

pac genini taşıyan 3.5-kb'lık fragman *pac*$_{wt}$, pUC-PACOA, pUC-PACOA4, pUC-PACOA5, pUC-PACOA6 ve pUC-PACOA7 klonlarından *Eco*RI/*Hind*III enzimleriyle kesilerek alınmış ve ayrı ayrı düşük kopya sayılı pMMB208 vektörü üzerindeki *tac* promotorunun kontrolü altına yerleştirilmiştir.

Ligasyon materyali *E. coli* JM109'a ait kompetan hücreleri transforme etmede kullanılmıştır. Transformantlar kloramfenikol içeren LB petri tabaklarından seçilmiştir. Transformantların miniprep plazmit DNA'ları izole edilerek *Eco*RI-*Hind*III enzimleriyle kesilmiş, klonlanan 3.5 kb'lık fragmanı taşıyabilecek büyüklüğe sahip adaylar agaroz jelde değerlendirilerek, klon adayları olarak seçilmiştir (Şekil 3.14). Oluşturulan klonlar pMMB-PACwt, pMMB-PACOA, pMMB-PACOA4, pMMB-PACOA5, pMMB-PACOA6 ve pMMB-PACOA7 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.14. *Eco*RI-*Hind*III restriksiyon endonükleazlarıyla kesilmiş pMMB klon adaylarının agaroz jel elektroforezi. 1) pMMB-PACOA4, 2) pMMB-PACOA5, 3) pMMB-PACOA6, 4) pMMB-PACOA7, 5) pMMB-PACOA, 6) pMMB-PACwt'ın *Eco*RI-*Hind*III kesimi, 7) λ/*Hind*III kesim (23.1, 9.4, 6.6, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kbp).

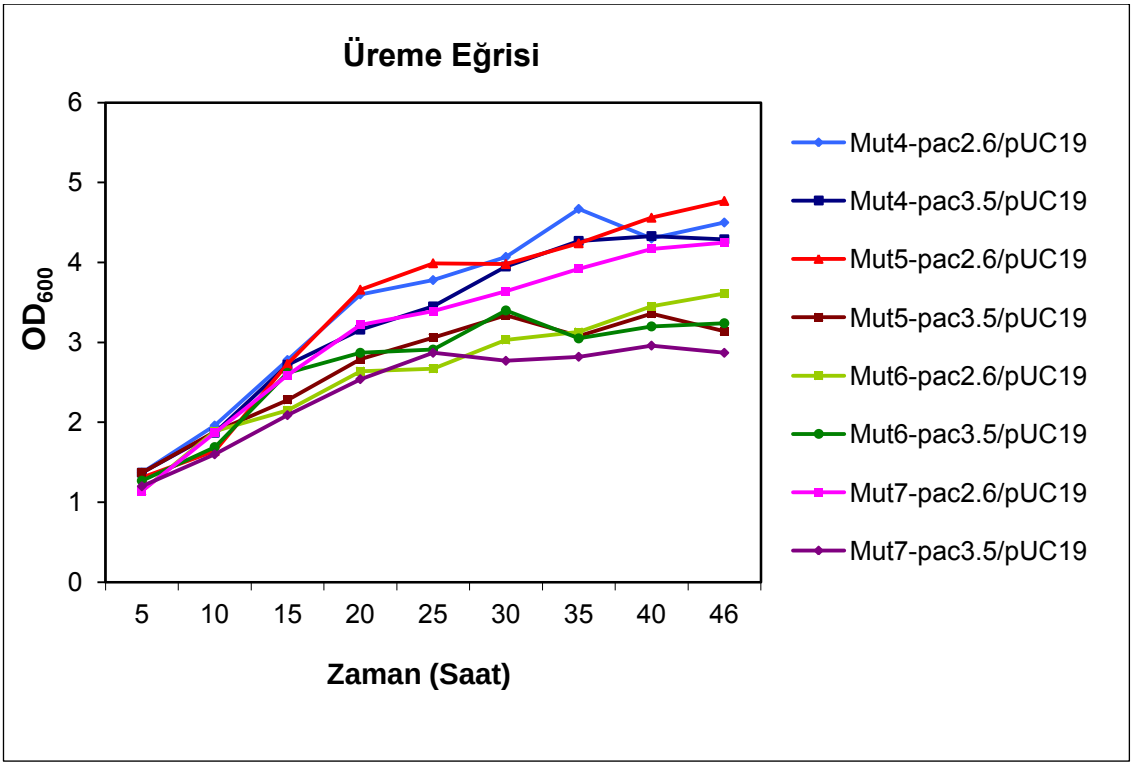
3.3.6 Yaban tipi ve mutant *pac* genlerini taşıyan pMMB208 varyantlarının Tat^+ ve Tat^- soylara aktarılması

pac geni TIR bölgesinde yapılan mutasyonların PA'nın translokasyonu üzerine etkisini araştırmak için, kompetan hücreleri hazırlanan yaban tipi *E. coli* MC4100 ve Tat^- B1LKO, JARV15, DADE soyları yaban tipi (pMMB-PACwt) ve mutant *pac* genlerini taşıyan pMMB208 vektörleriyle (pMMB-PACOA4, pMMB-PACOA5, pMMB-PACOA6, pMMB-PACOA7) transforme edilmiştir. Transformantlar kloramfenikol içeren LB petri tabaklarından seçilmiştir. Elde edilen transformantların miniprep DNA'ları izole edilerek *Eco*RI/*Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş, yaban ve mutajenik *pac* genlerini taşıyan pMMB-temelli plazmitlerin bu soylardaki varlığı agaroz jel üzerinde değerlendirilmiştir. Klon

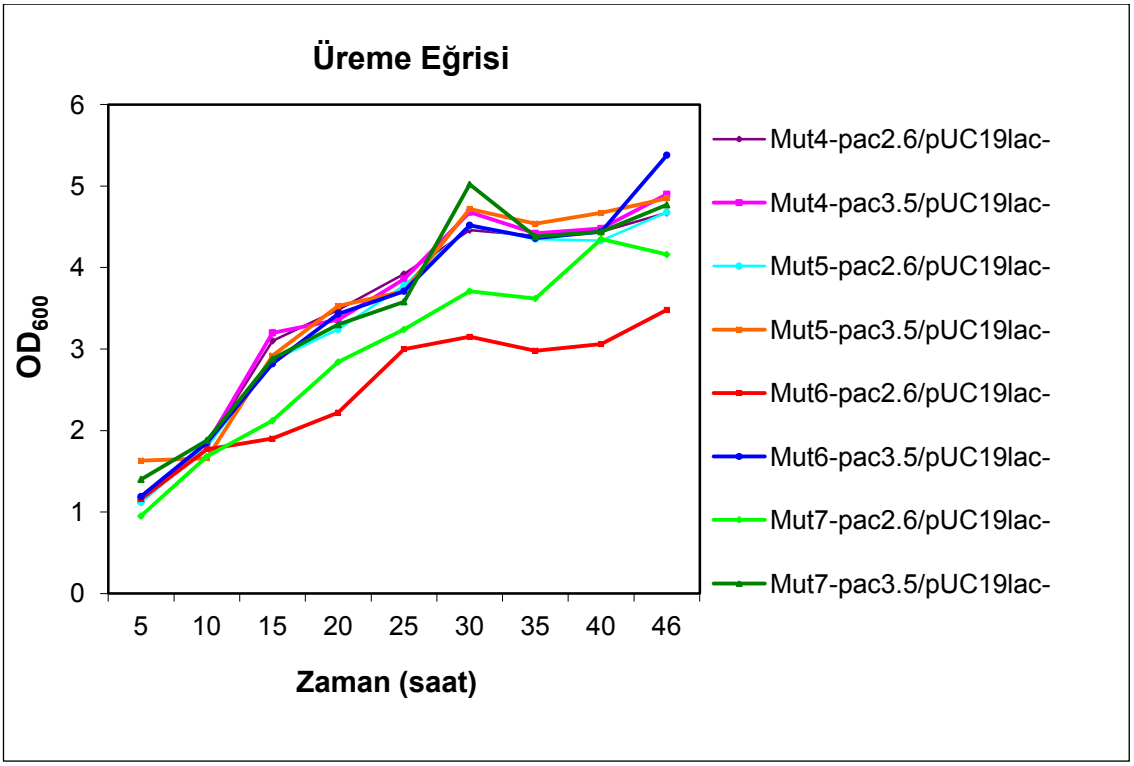
adaylarının jel profilleri Şekil 3.14 ile benzerlik göstermektedir. Farklı soylar içinde yer alan pMMB varyantlarına ait ekpresyon çalışmalarında eş zamanlı olarak ancak belli sayıda kültür inkübatörde büyütülebileceğinden öncelikli olarak pMMB-PACwt ile birlikte sinyal dizi mutasyonlarını taşıyan pMMB-PACOA6, pMMB-PACOA7 klonlarının ekspresyon çalışmalarına alınmasına karar verilmiştir.

3.3.7 Üreme eğrisi

pUCpac2.6OA4-7, pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7, pUC-PACOA4-7 ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 klonlarını taşıyan *E. coli* JM109 soyunun üreme davranışını izlemek için, bu soylara ait üreme eğrisi oluşturulmuştur. Her bir soy için ~85 ml kültür OD_{600}=0.6-0.8 aralığında 100 µM IPTG ile uyarılarak, 26 °C'ta (Yöntemler 2.2.1) 46 saat büyütülmüş ve düzenli aralıklarla örnek alınmıştır. Örneklerin absorbansı 600 nm'de okunmuş, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da gösterildiği üzere bir üreme eğrisi çizilmiştir. Üreme oranının *E. coli*'de PA üretimini etkilemediği bilinmekte olup (Chou ve ark., 1999); soylar için aktiviteden bağımsız olarak genelde birbirine benzer bir üreme davranışı izlenmiştir.

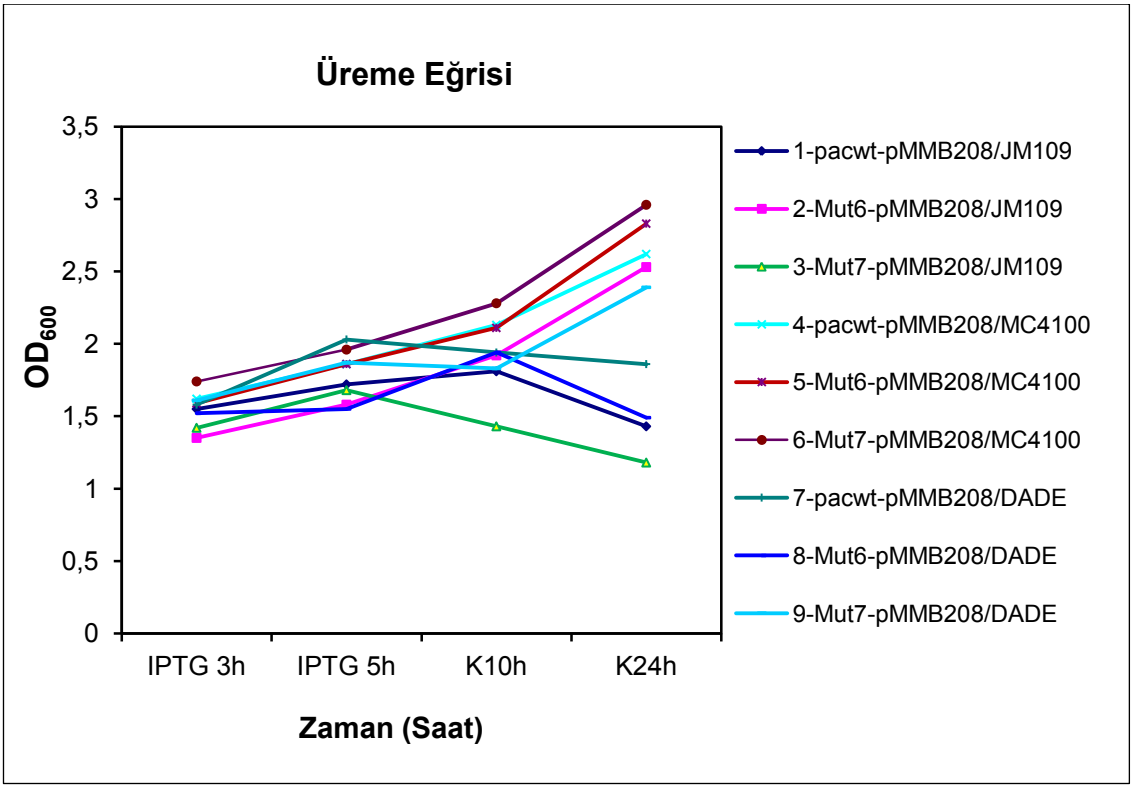


Şekil 3.15. Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımlı koşullardaki üreme eğrisi. Kültürler 26 °C'ta 46 saat büyütüldü. Her 5 saatte bir örnek alınarak, absorbans değerleri 600 nm'de okundu ve zamana karşı grafiklendirildi.



Şekil 3.16. Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan $pUC19_{lac}^{-}$ klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımlı koşullardaki üreme eğrisi. Kültürler 26 °C'ta 46 saat büyütüldü. Her 5 saatte bir örnek alınarak, absorbans değerleri 600 nm'de okundu ve zamana karşı grafiklendirildi.

Diğer yandan pMMB klonlarının *E. coli* JM109 soyunun yanı sıra, Tat^{-} (DADE) ve onun yaban tipi MC4100 soylarındaki üreme oranları da incelenmiştir. Genel olarak pMMB klonlarını taşıyan MC4100 soyları daha hızlı bir üreme göstermiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. *pac*$_{wt}$, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını taşıyan *E. coli* JM109, MC4100 ve DADE soylarının üreme eğrisi. Kültürler 26 °C'ta 24 saat büyütüldü. 100 µM IPTG uyarımından sonraki 3. ve 5. saat ile kültürün 10. ve 24. saatlerinde örnek alınarak, 600 nm'de okunan absorbans değerleri zamana karşı grafiklendirildi. İncelenen soya göre değişebilmekle birlikte; IPTG 3h, kültürün ~5. saatine, IPTG 5h ise kültürün ~7-9 saatine denk gelmektedir.

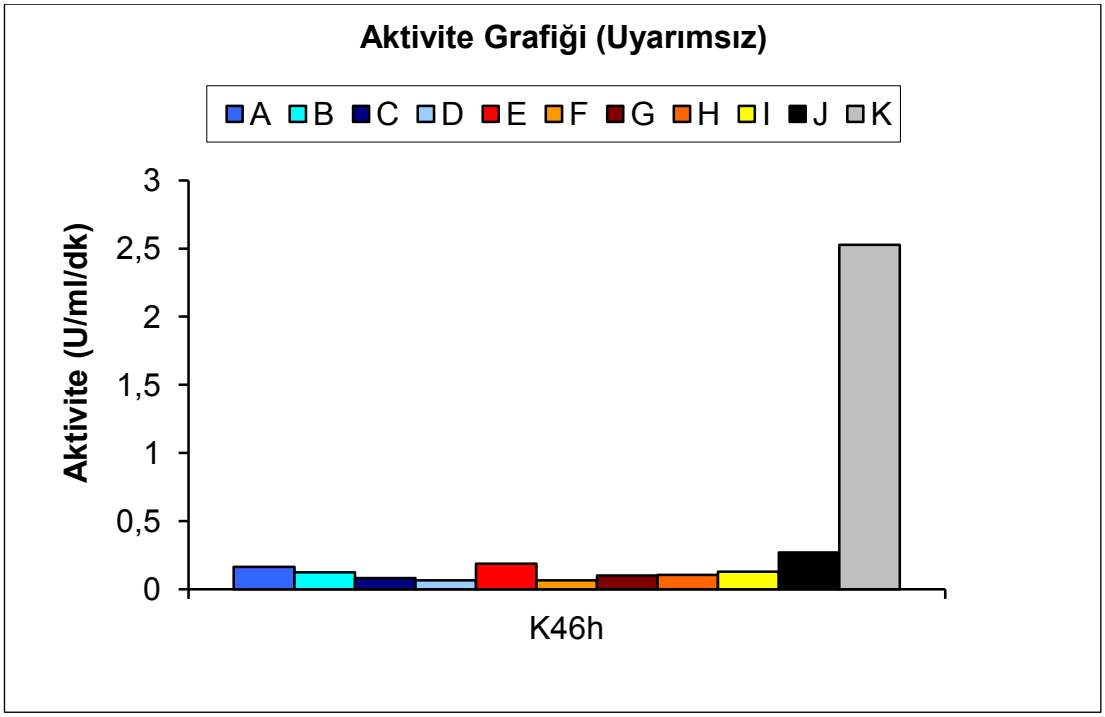
3.4 Gen ekspresyonu çalışmaları

Tez çalışmasında TIR bölgesinde yapılan mutasyonların *pac* geni ekspresyonu üzerine etkisi aktivite düzeyinde irdelenmiştir. Bu amaçla öncelikle yaban tipi ve mutant *pac* genlerini içeren pUC varyantlarını (pUCpac2.6OA4-7, pUC$_{lac}^{-}$-pac2.6OA4-7, pUC-PACOA4-7, pUC$_{lac}^{-}$-PACOA4-7) taşıyan rekombinant *E. coli* JM109 soyları flask düzeyinde ekspresyon çalışmasına alınmıştır. Ekspresyon çalışmaları Yöntem bölümü 2.2.11'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş, aktivite deneylerinde her defasında saflaştırılmış penisilin asilaz enzimi (İşsever Öztürk, 2008) kontrol olarak kullanılmıştır.

Daha önce oluşturulmuş *pac* klonlarıyla (İşsever Öztürk, 2002) uyarımsız koşullarda en iyi aktivite değeri 46. saatte alındığından, ekspresyon çalışmalarına başlarken kültürler uyarımlı ve uyarımsız koşullarda 46 saat büyütülmüştür. Ancak 46 saat sonunda uyarımsız kültürlerden aktivite elde edilememesi ve uyarımlı kültürlerin aktivitesinde ise 20. saatten sonra düşüş görülmesi nedeniyle, sonraki yapılan tüm ekspresyon çalışmaları sadece IPTG uyarımlı koşullarda ve kültürlerin 20 saat inkübasyonuyla sürdürülmüştür. Ekspresyon çalışmalarında farklı IPTG uyarım koşulları ve çalkalama hızları denenmiştir. Özellikle klonların uyarımlı ve uyarımsız kültür koşullardaki aktivitelerinin ön değerlendirmesinde aynı koşullarda kültüre alınmış S_{pac}, $P2S_{pac}lac^{-}$ gibi iyi aktivite verdiği bilinen soylar (İşsever Öztürk, 2002) ile *pac* genini taşımayan vektör pUC19 referans olarak kullanılmıştır. Yapılan her ekspresyon çalışması sırasında SDS-PAGE ve aktivite testi için örnek alınarak irdelenmiştir.

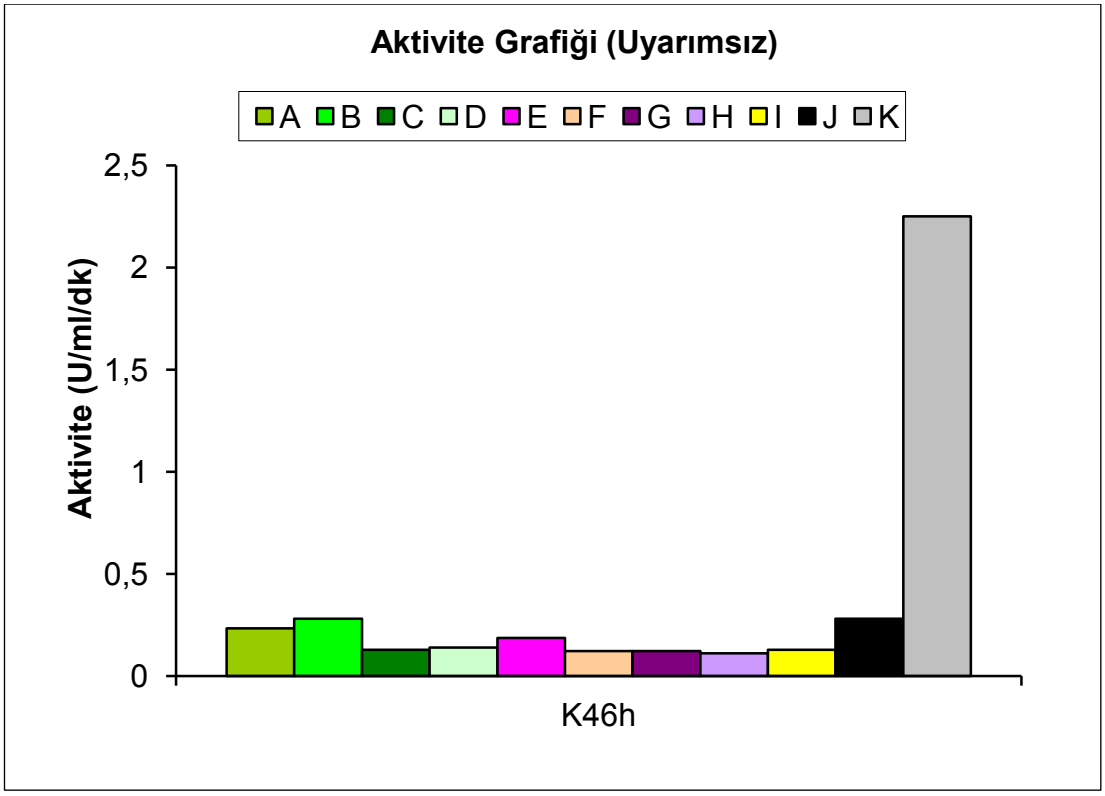
3.4.1 Mutasyonların Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Yapılan ekspresyon çalışmalarında 3.4 kısmında sözü edildiği üzere IPTG uyarımlı ve uyarımsız koşulların yanı sıra, farklı sıcaklıkların (26 ºC ve 37 °C) da *pac* geni ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir. pUCpac2.6OA4-7 (Mut4-*pac*2.6/pUC19, Mut5-*pac*2.6/pUC19, Mut6-*pac*2.6/pUC19, Mut7-*pac*2.6/pUC19) pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA4-7 (Mut4-*pac*2.6/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut5-*pac*2.6/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut6-*pac*2.6/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut7-*pac*2.6/$pUC19_{lac}^{-}$), pUC-PACOA4-7 (Mut4-*pac*3.5/pUC19, Mut5-*pac*3.5/pUC19, Mut6-*pac*3.5/pUC19, Mut7-*pac*3.5/pUC19) ve pUC_{lac}^{-}-PACOA4-7 (Mut4-*pac*3.5/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut5-*pac*3.5/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut6-*pac*3.5/$pUC19_{lac}^{-}$, Mut7-*pac*3.5/$pUC19_{lac}^{-}$) klonları *E. coli* JM109 soyu içinde, $P2Spac_{lac}^{-}$ ile karşılaştırmalı olarak uyarımsız koşullarda ve 26 ºC'ta yapılan ekspresyon çalışmasına alındığında; kültürün 46. saatinde dikkate değer bir PA aktivitesi elde edilmemiştir (Şekil 3.18 ve 3.19). Benzer bir biçimde tez çalışmasında oluşturulan klonlardan hiç birisi 37 ºC'ta incelenen kültürün 20 ve/veya 46. saat örnekleri için PA aktivitesi vermemiştir.



Şekil 3.18. Mut4 ve Mut5 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımsız koşullarda, 26 ºC'ta ve 46. saatte verdikleri aktivite değerleri.

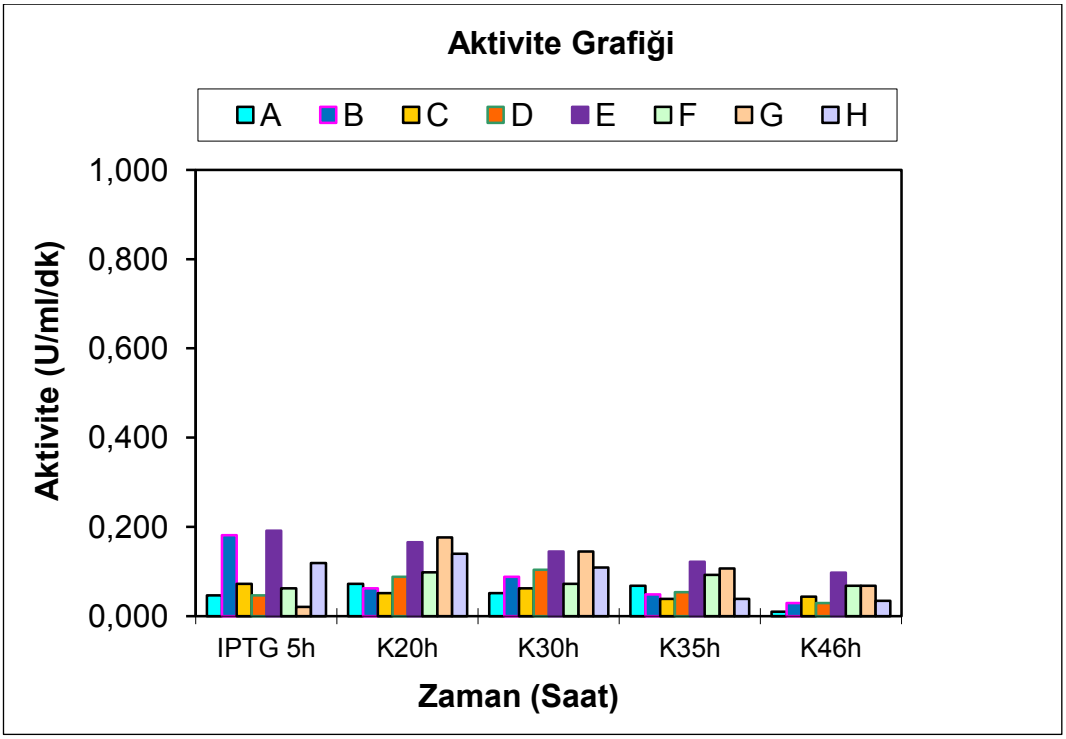
A. Mut4-*pac*2.6/pUC19
B. Mut4-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
C. Mut4-*pac*3.5/pUC19
D. Mut4-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
E. Mut5-*pac*2.6/pUC19
F. Mut5-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
G. Mut5-*pac*3.5/pUC19
H. Mut5-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
İ. *pac*2.6/pUC19
J. *pac*3.5/pUC19
K. P2Spac$_{lac}^{-}$



Şekil 3.19. Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının yer aldığı *pac*2.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerine ait kültürlerin uyarımsız koşullarda, 26 ºC'ta ve 46. saatte verdikleri aktivite değerleri.

A. Mut6-*pac*2.6/pUC19
B. Mut6-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
C. Mut6-*pac*3.5/pUC19
D. Mut6-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
E. Mut7-*pac*2.6/pUC19
F. Mut7-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
G. Mut7-*pac*3.5/pUC19
H. Mut7-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
İ. *pac*2.6/pUC19
J. *pac*3.5/pUC19
K. P2Spac$_{lac}^{-}$

2.6-kb ya da 3.5-kb'lık mutajenik *pac* fragmanını pUC19$_{lac}^{-}$ vektörü üzerinde taşıyan klonların, IPTG ile uyarım sonrası 5. saat (IPTG 5h) ile kültürün 20, 30, 35 ve 46. saatlerinden alınan örneklerinin aktivite testlerinde, belirgin bir PA aktivitesi gözlenmemiştir (Şekil 3.20).

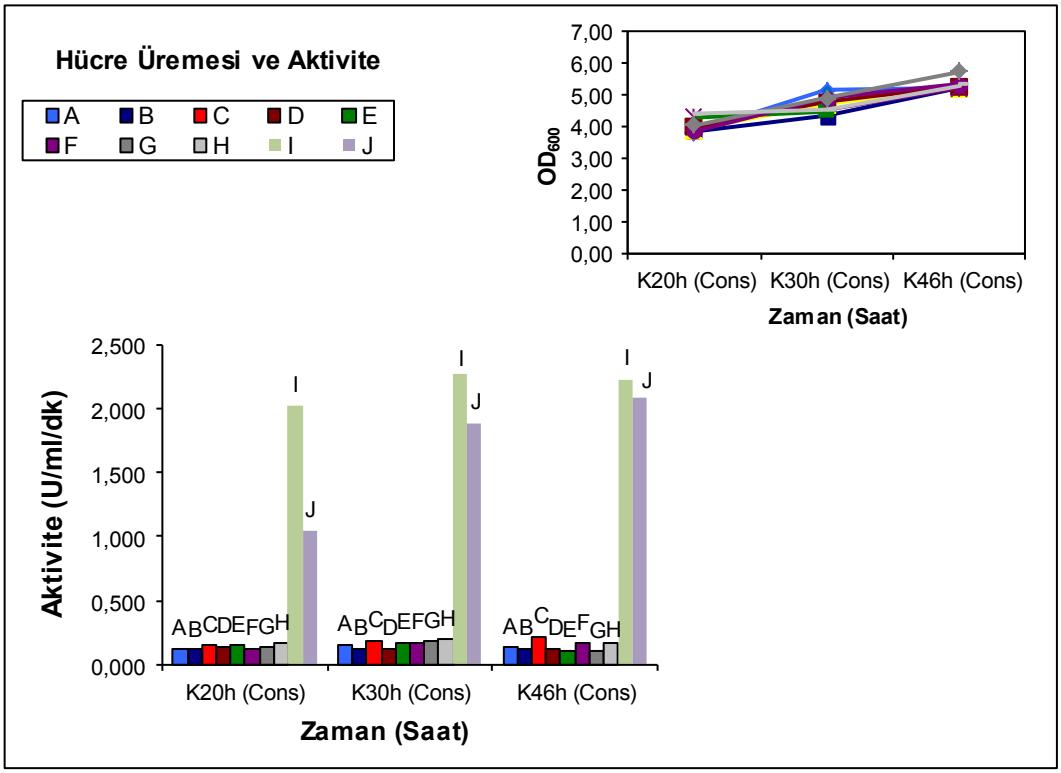


Şekil 3.20. Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının yer aldığı *pac2*.6-kb ve 3.5-kb'lık fragmanları taşıyan pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 hücrelerinin uyarımlı koşullarda verdikleri aktivite değerleri. 26 °C'ta büyütülen kültürlerin aktiviteleri IPTG uyarımından sonraki 5. saat ile kültürün 46. saati aralığında izlenmiştir.

A. Mut4-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
B. Mut4-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
C. Mut5-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
D. Mut5-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
E. Mut6-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
F. Mut6-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$
G. Mut7-*pac*2.6/pUC19$_{lac}^{-}$
H. Mut7-*pac*3.5/pUC19$_{lac}^{-}$

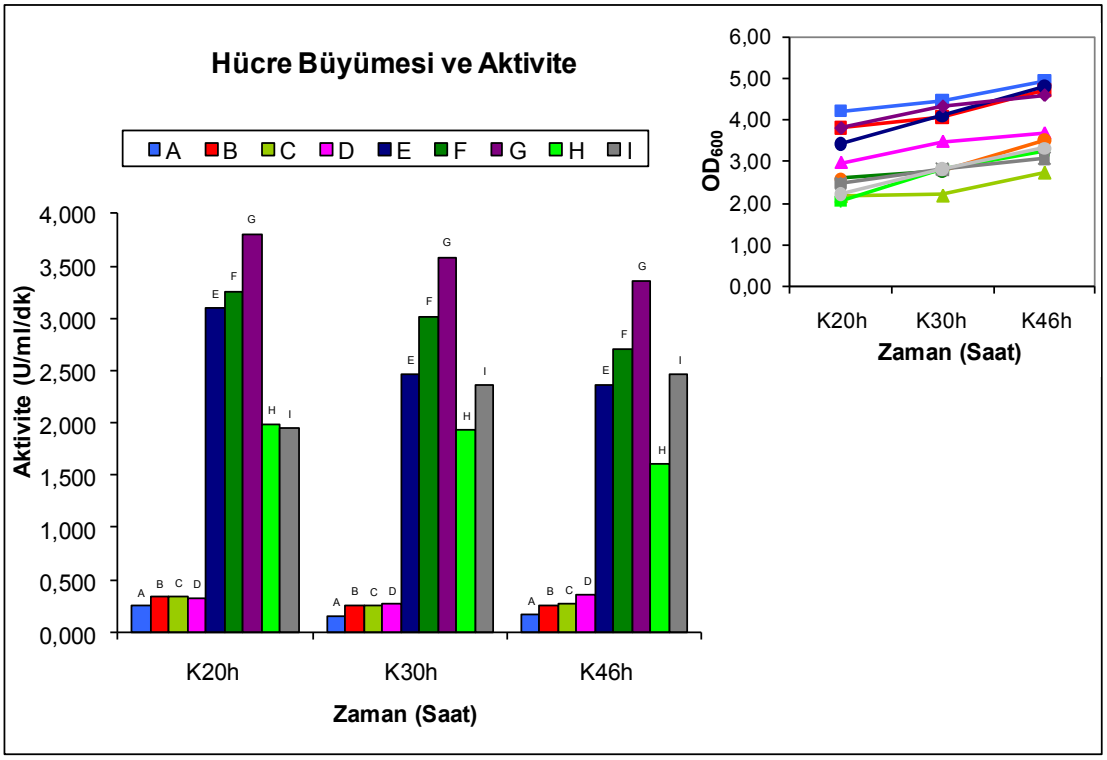
pUCpac2.6OA4-7 ve pUC-PACOA4-7 klonları uyarımlı ve uyarımsız koşullarda ekspresyon çalışmasına alınmış, daha önce yaban tipe kıyasla iyi aktivite verdiği belirlenen P2S$_{pac}$ ve/veya P2S$_{pac}$lac^{-} (SD-ATG aralığı arttırılmış ve promotoru değiştirilmiş *pac* genini içeren 3.5kb'lık fragman sırasıyla pUC19 ve pUC19$_{lac}^{-}$ vektörleri üzerinde, İşsever Öztürk, 2002) klonlarıyla karşılaştırmalı olarak kültürün 20, 30 ve 46. saatleri için aktivite değerleri karşılaştırılmıştır. Yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda incelenen klonlardan önemli bir PA aktivitesi elde edilmezken

(Şekil 3.21); uyarımlı koşullarda en iyi sonucu pUC-PACOA4-7 soyları ve kültürün 20. saatinde vermiştir (Şekil 3.22). pUC-PACOA4-7 klonlarıyla pUCpac2.6OA4-7 klonlarının aktiviteleri arasındaki bu farklılık, daha önce Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yapılmış ekspresyon çalışmalarında gözlenen ve fazladan 900 baz çifti içeren 3.5-kb'lık pac_{wt} geninin, 2.6-kb'lık *pac* genine görece daha olumlu bir ekspresyon verdiği yönündeki çalışma sonuçlarıyla uyumludur.



Şekil 3.21. Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarının uyarımsız koşullardaki üreme eğrileri ve aktivite grafiği. 26 ºC'ta büyütülen kültürler 46. saate kadar izlenmiştir.

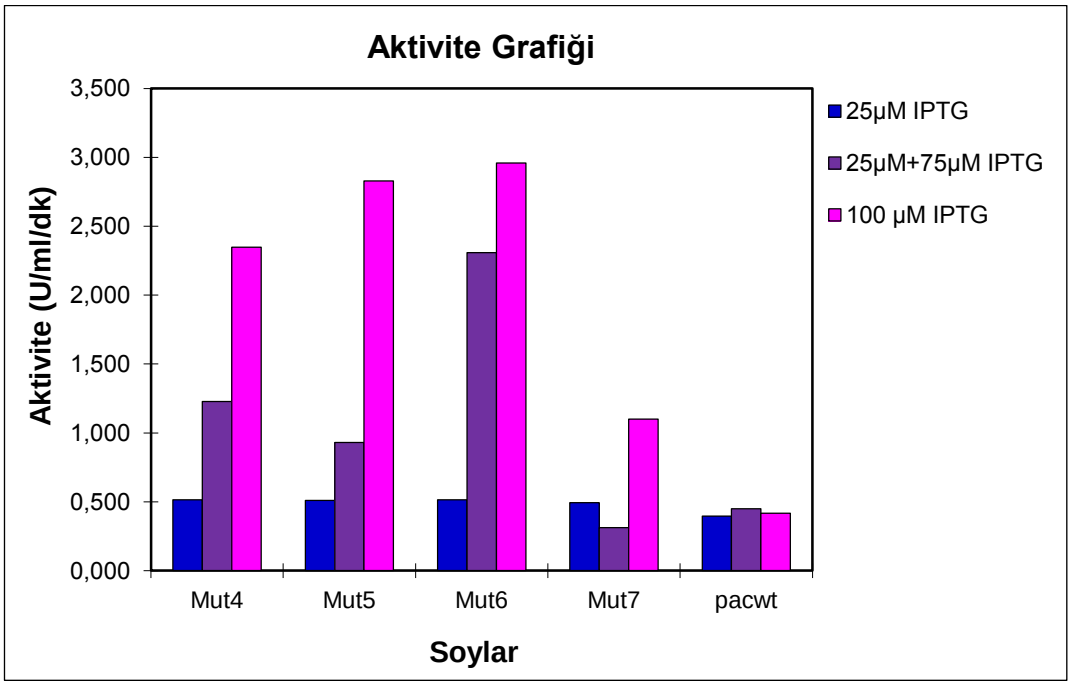
A. Mut4-*pac*2.6/pUC19
B. Mut4-*pac*3.5/pUC19
C. Mut5-*pac*2.6/pUC19
D. Mut5-*pac*3.5/pUC19
E. Mut6-*pac*2.6/pUC19
F. Mut6-*pac*3.5/pUC19
G. Mut7-*pac*2.6/pUC19
H. Mut7-*pac*3.5/pUC19
İ. P2Spac
J. $P2Spac_{lac}^{-}$



Şekil 3.22. Mut4-7 mutasyonlarının yer aldığı pUC klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarının uyarımlı koşullardaki üreme eğrileri ve aktivite grafikleri. 26 ºC'ta büyütülen kültürler 46. saate kadar izlenmiştir. **A)**Mut4-pac2.6/pUC19, **B)**Mut5-pac2.6/pUC19, **C)**Mut6-pac2.6/pUC19, **D)**Mut7-pac2.6/pUC19, **E)**Mut4-pac3.5/pUC19, **F)**Mut5-pac3.5/pUC19, **G)**Mut6-pac3.5/pUC19, **H)**Mut7-pac3.5/pUC19, **I)**P2S*pac*

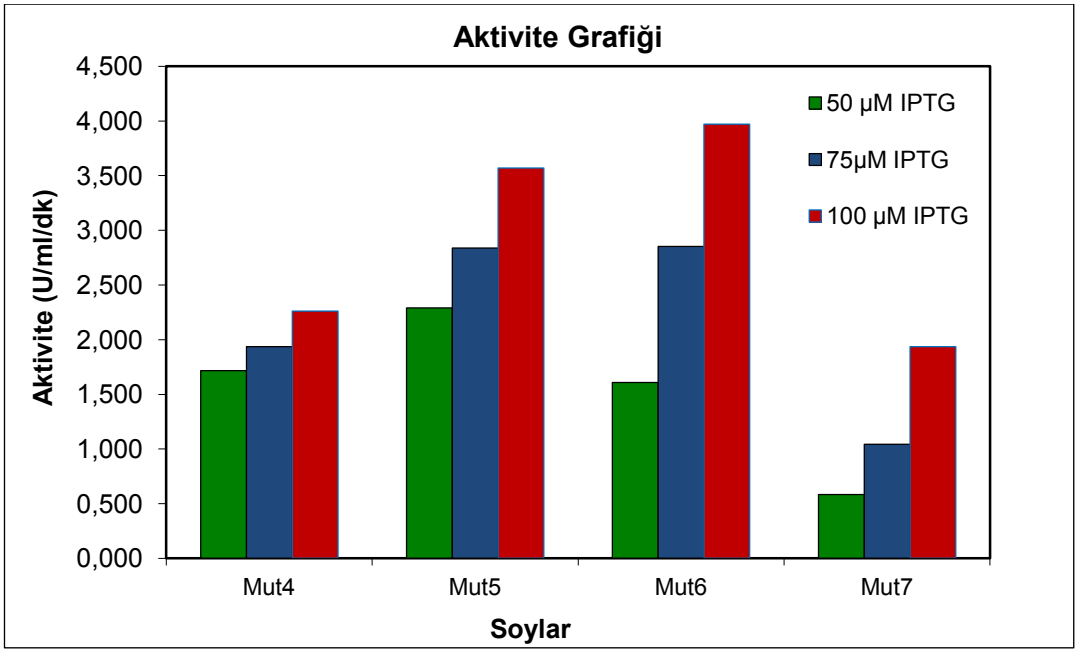
Yapılan ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alındığında; en fazla PA aktivitesini Mut4-, Mut5-, Mut6- ve Mut7-*pac*3.5/JM109 klonlarının (pUC-PACOA4-7) 26 °C'ta, uyarımlı koşullarda ve kültürün 20. saatinde vermesi nedeniyle; ekspresyon deneylerine bu klonlarla devam edilmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ekspresyon çalışmalarında ayrıca besiyerine farklı konsantrasyonlarda eklenen uyarıcının (IPTG), incelenen soyların ekspresyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle OD_{600}=0.6-0.8 aralığında, kültürlerin 25µM IPTG ile uyarıldığı bir ekspresyon çalışması yapılmış, incelenen klonlar 25µM IPTG ile uyarıldıklarında önemli bir aktivite değeri vermemiştir. Bunun üzerine pac_{wt} ile Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutantları için, besiyerine

inkübasyonun başlangıcında 25 µM IPTG'nin eklendiği, sonrasında OD_{600}=0.6-0.8 aralığındayken kültüre 75 µM IPTG'nin daha ilave edildiği ve kontrol olarak kültürlerin OD_{600}= 0.6-0.8 aralığına geldiğinde 0.1 µM IPTG ile uyarıldığı üç farklı kültür başlatılarak, kültürler kazein besiyerinde 26 ºC'ta ve 100 rpm çalkalama ile 20 saat inkübe edilmiştir. Aktivite testinin sonuçları Şekil 3.23'te verilmiştir.



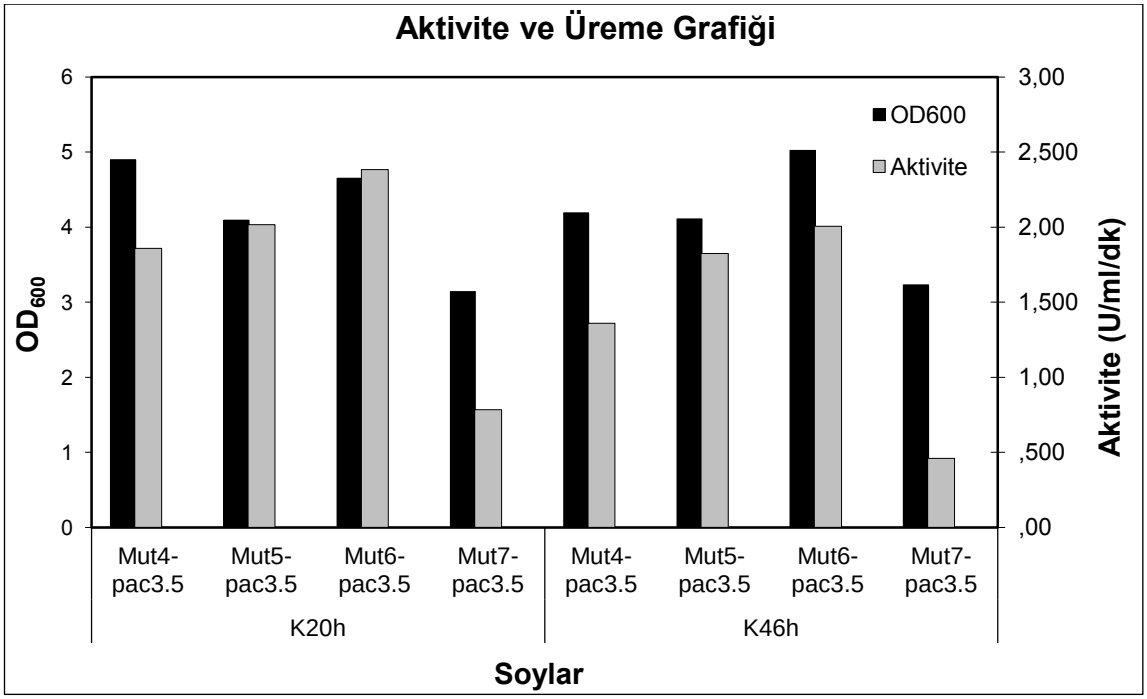
Şekil 3.23. pUC-PACOA4-7/JM109 ve pac_{wt}/JM109 soylarının değişik IPTG konsantrasyonlarıyla farklı zamanlarda uyarımları sonucunda elde edilen aktivite grafiği. Kültürler 26 ºC'ta 100 rpm çalkalama ile 20 saat inkübe edilmiştir.

Denenen koşullar içinde en iyi PA aktivitesi, mutantların OD_{600}=0.6-0.8 aralığında son konsantrasyonu 100µM olacak şekilde IPTG ile uyarıldıkları kültürlerinden elde edilmiştir. Mutantların OD_{600}=0.6-0.8 aralığında 50, 75 ve 100 µM IPTG olmak üzere 3 farklı IPTG konsantrasyonuyla uyarıldıkları ekspresyon çalışması sonucunda da 100 µM IPTG ile uyarımın yine en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. pUC-PACOA4-7/JM109 soylarının farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarıldığı koşullarda elde edilen aktivite grafiği. Kültürler 26 ºC'ta 100 rpm çalkalama ile 20 saat inkübe edilmiştir.

Ayrıca çalkalama hızının etkisini irdeleyebilmek amacıyla; yapılan ekspresyon çalışmalarında kullanılan koşulların (1/3 havalandırma, kazein besiyeri, 26 ºC) sabit tutulduğu; ancak çalkalama hızının 200 rpm'e çıkarıldığı bir çalışma denenmiştir. Çalkalama hızının önceki ekspresyon çalışmalarına görece 2 katına çıkarılmasıyla orantılı bir hücre üreme artışı izlenmemiş ve daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumlu olarak aktivitede belirgin bir iyileşme görülmemiştir (Şekil 3.25). Buna göre gerçekleştirilen tüm ekspresyon çalışmaları dikkate alındığında klonlar en iyi aktivite değerini kültürlerin OD_{600}=0.6-0.8 aralığında 100 µM IPTG ile uyarıldığı ve 26 °C'ta 100 rpm çalkalama ile büyütüldüğü koşullarda vermiştir. Kültürün 20. saatinden 46. saatine geçildiğinde ise üremenin halen sürdüğü ancak PA aktivitesinde bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.25. Uyarımlı koşullarda 26 ºC'ta 200 rpm çalkalama ile büyütülen pUC-PACOA4-7/JM109 soylarına ait kültürün 20. ve 46. saat örneklerinin aktivite grafiği.

3.4.1.1 *pac* geni SD ve SD-ATG aralığında yapılan mutasyonların gen ekspresyonu üzerine etkisinin pUC klonlarında incelenmesi

pac geninin birbiriyle örtüşen iki SD dizisini içeren bir SD motifine sahip olduğu öngörülmüş olup (Keilmann ve ark., 1999), tez çalışmasında SD motifinin bu yapısının ve/veya SD-ATG aralığındaki mesafenin PA üretimi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmış ve Çizelge 2.4'de verilen mutasyonları taşıyan plazmitler oluşturulmuştur.

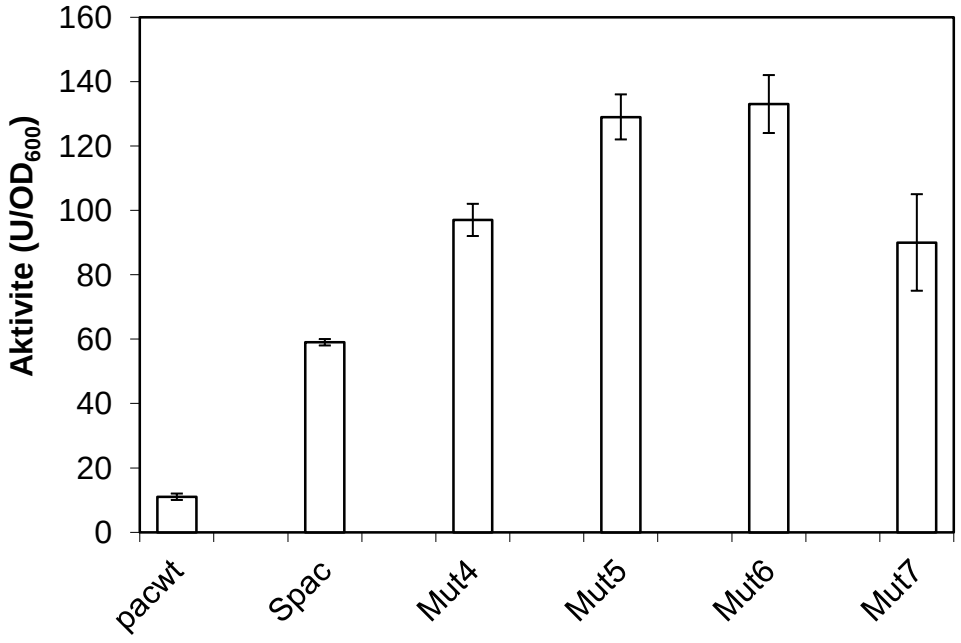
pac geninde SD1/SD2 ribozom bağlanma bölgesi ve ATG başlama kodonu arasındaki mesafe 4/5 nükleotit olup, normalden daha kısadır (Ma ve ark., 2002). Daha önce bu bölgenin içeriği AT'ce zenginleştirilip 6/7 nükleotite uzatıldığında, *pac* geni ekspresyonun yaban tipe göreceli 2.1 kez iyileştiği bildirilmiştir (S_{pac}, İşsever Öztürk, 2002). Bu çalışmada SD-ATG aralığı A'ca zenginleştirilerek 8 nükleotite çıkarılmış (Mut5, Çizelge 2.4) ve aktivitede yaban tipe göreceli 12-kat iyileşme elde edilmiştir (Şekil 3.26).

Diğer yandan tez çalışmasında *pac* geni SD motifindeki SD2 dizisinin önemini araştırmak için, SD-ATG aralığı S_{pac}'la benzer olan ama başlama kodonunun yukarısındaki GAGG**A** dizisindeki ikinci A'nın T'ye değiştirildiği bir mutant oluşturulmuştur (Mut4, Çizelge 2.4). Elde edilen Mut4 ile aktif PA üretiminin S_{pac}'a görece %61 artması (Şekil 3.26), tam bir SD dizisinin varlığının protein sentez düzeyini azalttığını göstermiştir. Mutasyonlar için sözkonusu aktivite değerleri sadece 26 °C'ta elde edilmiş, 37 °C'ta yapılan ekspresyon çalışmalarında klonlar PA aktivitesi vermemiştir. Bu sonuç *pac* geni ekspresyonunun sıcaklığa duyarlı olduğuna ilişkin daha önceki bulgularla uyumludur (Keilmann ve ark., 1993).

3.4.1.2 DR bölgesinin *pac* geni ekspresyonu üzerine etkilerinin pUC klonlarında incelenmesi

Genin kodlayıcı bölgesinin başlangıç tarafındaki özellikle ilk 5 kodonun translasyonun başlamasını etkileyebildiği, örneğin mRNA'nın ikincil yapısını değiştirdiği bilinmektedir. Tez çalışmasında DR bölgesinin *pac*'ın ekspresyonu üzerine etkisini inceleyebilmek için, her ikisi de S_{pac} ile aynı SD-ATG aralığına sahip ve ikinci kodon lizinin (AAA), arginine (AGA) değiştirildiği Mut6 (K2R) ile dördüncü kodon argininin (AGA) lizine (AAA) değiştirildiği Mut7 (R4K) mutasyonları oluşturulmuştur (Çizelge 2.4). Yapılan mutasyonlar sinyal peptitin amino asit yükünü değiştirmemiştir, fakat her iki mutasyon da sinyal peptitte yer alması nedeniyle PA'nın translokasyonunu etkileyebilecek bir pozisyondadır. +2 kodonundaki mutasyon ikinci kodon pozisyonu için *E. coli*'de en çok tercih edilen lizinin nadir bir kodon olan arginine değişimiyle sonuçlanmıştır. +4 kodonunda yapılan değişiklikle ise bir yandan DR bölgesinin içeriği A'ca zenginleştirilirken; diğer yandan PA'nın periplazmaya translokasyonunu yönlendirdiği önerilen (Ignatova ve ark., 2002) tipik olmayan Tat motifinin korunmuş arginin rezidüsü lizine değiştirilmiştir. Şekil 3.26'da gösterildiği gibi aktif PA üretimi S_{pac}'a görece Mut6 ile 2 kat; +4 kodonunda yapılan değişiklikle ise (Mut7) ~%65 oranında artmıştır. Her iki tip mutasyon sonucunda da yaban tip diziye (pac_{wt}) görece PA aktivitesi dikkat çekici bir şekilde iyileşmiştir. S_{pac}, Mut4 ve Mut5'e benzer olarak

Mut6 ve Mut7 içinde sözü edilen PA aktivitesi yalnızca 26 °C'ta yapılan ekspresyon çalışmalarından elde edilmiş, 37 °C'ta PA aktivitesi bulunmamıştır.



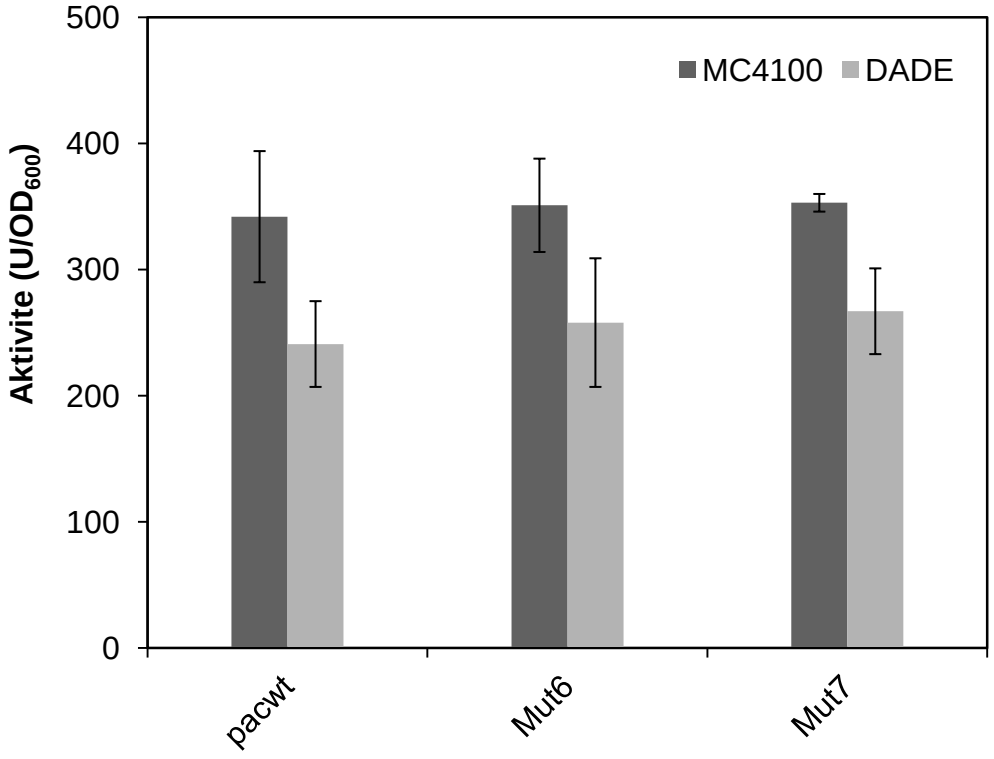
Şekil 3.26. S*pac*/JM109 ve pUC-PACOA4-7/JM109 soylarından elde edilen PA aktivite grafiği. Soylar 26 °C'ta 20 saat büyütüldükten sonra PA aktivitesi belirlenmiştir (Grafik, en az üç deneyin ortalamasını göstermektedir).

3.4.1.3 *pac* geni ekspresyonu ve öncül enzimin translokasyonu üzerine TIR'da yapılan mutasyonların etkilerinin pMMB klonlarında incelenmesi

TIR'da yapılan mutasyonların gen ekspresyonunun yanı sıra protein sekresyonunu da etkileyebileceği bilinmektedir (Simmons & Yansura, 1996). Literatürde özellikle sinyal dizide yapılan mutasyonların proteinlerin sekresyonu üzerine etkileri bildirildiğinden (Zalucki ve ark., 2007), oluşturulan mutantlarda translokasyonun izlenmesi amacıyla, Tat$^-$ *E. coli* soyları (JARV15, BILKO ve DADE) ile onların yaban tipi soyu *E. coli* MC4100 pac_{wt} ve Mut4-7 klonlarıyla transforme edilmiştir. Ancak bölüm 3.3.4'de belirtildiği üzere *pac* genini taşıyan pUC19 türevlerinin bu soylarda kararsızlık göstermesi nedeniyle, mutasyonların PA translokasyonu üzerine etkisinin irdelenmesi için oluşturulan düşük kopya sayılı

pMMB208-temelli klonlar kullanılmıştır. Bu klonlar ile pUC19 türevlerini taşıyan soyların aktiviteleri kıyaslandığında, pMMB klonları için total PA aktivitesinde dikkat çekici bir artış bulunmuştur (Şekil 3.27). Bu sonucun pMMB klonlarını taşıyan *E. coli* JM109 soyu için de geçerli olması artan ekspresyon düzeyinin *E. coli* soyundan bağımsız olarak kullanılan vektörle ilişkili olduğuna işaret etmiştir. Dahası bu klonlar ile maksimum PA üretimine, en iyi aktiviteyi kültürün 20. saatinde veren pUC-türevli klonlara kıyasla daha hızlı erişildiği belirlenmiştir (IPTG uyarımından 5 saat sonra).

pMMB-klonlarıyla IPTG uyarımından 5 saat sonra ve kültürün 20. saatinde alınan örneklerin aktivite değerleri arasında önemli bir farklılık olmadığından, pUC-temelli klonlarla karşılaştırma açısından Şekil 3.27'de kültürün 20. saatindeki pMMB klonlarının aktivite/OD_{600} değerleri verilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde yaban ve mutantlara ait pMMB varyantlarının PA aktivitesinde çok önemli bir farklılık görülmemiştir (Şekil 3.27). Diğer önemli bir bulgu ise; pMMB varyantlarının pUC klonlarından farklı olarak hücre dışı PA aktivitesi göstermesidir. Bu sonuç hem besiyeri üst sıvısından alınan örneklerle yapılan PDAB aktivite testi (Şekil 3.28) ile hem de *S. marcencens* kullanılarak petri düzeyinde gerçekleştirilen testlerle (Şekil 3.29) belirlenmiştir.

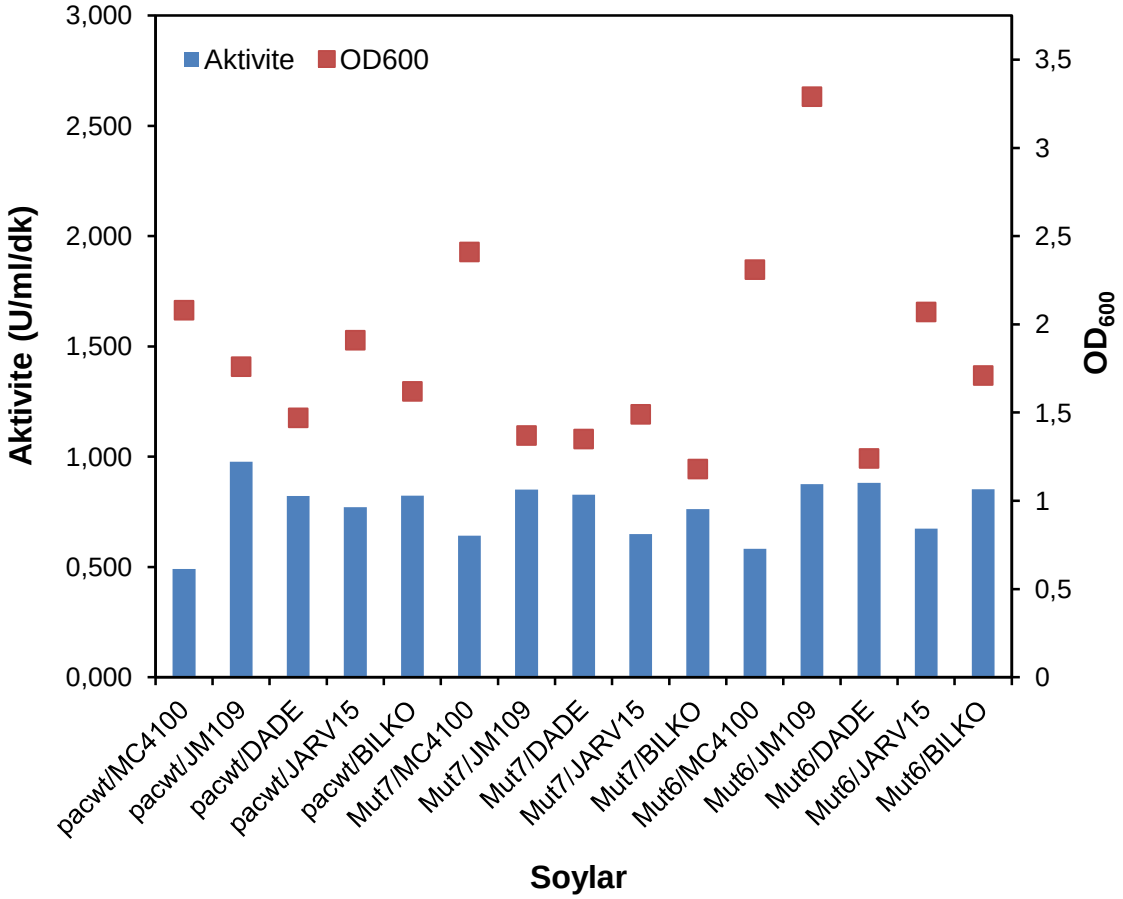


Şekil 3.27. *pac*$_{wt}$, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını içeren soyların (*E. coli* MC4100 ve DADE) PA aktivite grafiği. Soylar 26 ºC'ta 20 saat IPTG uyarımlı koşullar altında büyütüldükten sonra aktiviteleri belirlenmiştir (Grafik, en az üç deneyin ortalamasını göstermektedir).

3.4.2 Hücre dışı enzim aktivitesinin belirlenmesi

3.4.2.1 Enzim aktivitesinin PDAB yöntemi ile belirlenmesi

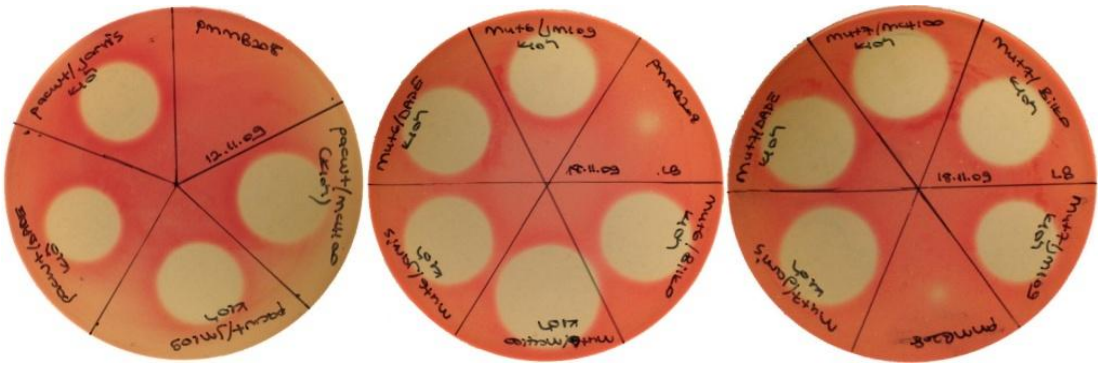
Hücre dışı PA aktivitesine, kültürün 20. saatine ait besiyeri üst sıvısından alınan örneğin santrifüjlenmesi sonrasında elde edilen süpernatandan 100 mikrolitre kullanılarak bakılmıştır. Klonların yaban tip *E. coli* MC4100 ve JM109 soylarındaki hücre dışı PA aktivite değerleri, Tat$^-$ JARV15, BILKO ve DADE soylarındaki aktiviteleriyle kıyaslandığında çok büyük bir farklılık göstermemiştir (Şekil 3.28). Buna göre sinyal peptitte yer alan Mut6 ve Mut7 mutasyonlarının enzimin sekresyonu açısından önemli bir fark yaratmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.28. *pac*$_{wt}$, Mut6 ve Mut7'ye ait pMMB klonlarını içeren MC4100, JM109, B1LKO, JARV15 ve DADE soylarının 26 ºC'ta, uyarımlı koşullarda ve kültürün 20. saatinde verdikleri hücre dışı PA aktiviteleri ve OD_{600} değerleri.

3.4.2.2 *Serratia marcescens* yöntemi ile enzim aktivitesinin belirlenmesi

A **B** **C**



Şekil 3.29. pMMB208/JM109'un yanı sıra, pac_{wt} (A), Mut6 (B) ve Mut7 (C)'nin pMMB klonlarını içeren *E. coli* JM109, MC4100, JARV15, BILKO ve DADE soylarına ait kültürlerin 10. saatinden alınan besiyeri üst sıvısı örneklerinin *S. marcescens* ile aktivite testi.

E. coli JM109, MC4100, JARV15, BILKO ve DADE soylarındaki pMMB klonlarının (pac_{wt}, Mut6, Mut7) aktivitesine PDAB yönteminin yanı sıra *Serratia marcescens* kullanılarak Yöntemler kısmında belirtildiği şekilde (2.2.14.2) petri düzeyinde bakılmıştır. *S. marcescens*'in üremesi dikkate alınarak kültürlerin 10. saat örnekleriyle çalışılmıştır. Şekil 3.29'da pac_{wt}, Mut6 ve Mut7'nin pMMB klonlarını taşıyan farklı soylara ait hücre dışı PA aktivitesi, petride oluşan zonlarla gösterilmiştir. Bu test kalitatif bir analiz olup, zonların büyüklüğü ile soyların gerçek aktivite oranları arasında mutlak bir uyum bulunmamaktadır (Meevitosom ve ark.,1983). Bununla birlikte incelenen tüm klonlarda hücre dışı PA aktivitesinin varlığı, bu testle de belirgin bir şekilde görülmektedir.

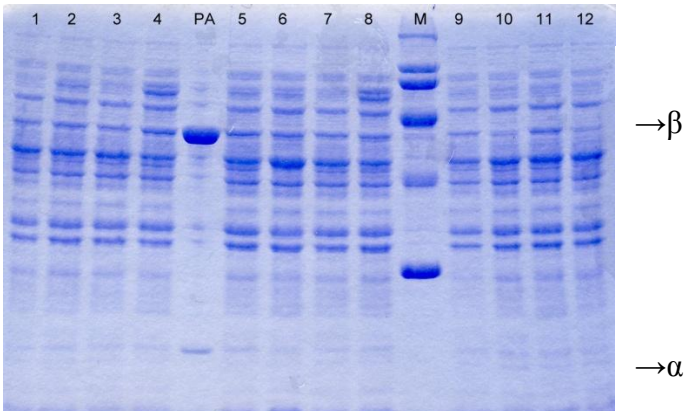
3.5 Mutantların protein analizi

Penisilin asilaz enzimini kodlayan *pac* geninin translasyona başlama bölgesinde farklı mutasyonlar taşıyan ve daha önce yapılan ekspresyon

çalışmalarıyla aktiviteleri irdelenen mutantların, bu ekspresyon çalışmalarından alınan örnekleriyle SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapıldı.

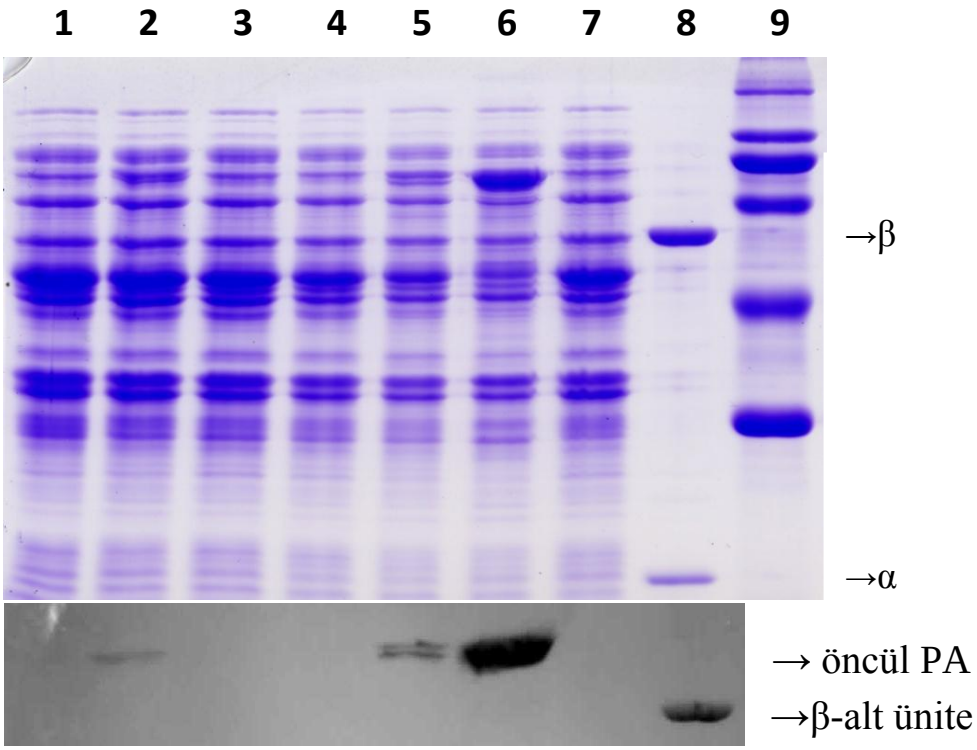
3.5.1 Mutantların SDS-PAGE ve Western blot profilleri

Yapılan ekspresyon çalışmaları sonrasında aktiviteleri incelenen pUCpac2.6OA4-7 ve pUC-PACOA4-7 klonlarının aynı zamanda SDS-PAGE analizleri de yapılmıştır. Tüm klonlarda belirgin bir biçimde PA'nın β-alt ünitesine ait bant görülmekte olup; Mut5 ve Mut7'nin pUC-PACOA klonlarında ayrıca daha fazla miktarda öncül protein birikimi gözlenmiştir (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. 26 ºC'ta, 0.1 mM IPTG varlığında kültürün 20. saatine kadar büyütülen *pac* ve pac_{lac}^{-} mutantlarını taşıyan *E. coli* JM109 soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin SDS-PAGE analizi. Her bir protein örneğinin eşit miktarı %12'lik SDS-PAGE jelde ayrıldı. 1) pUCpac2.6OA4, 2) pUC-PACOA4, 3) pUCpac2.6OA5, 4) pUC-PACOA5, 5) pUCpac2.6OA6, 6) pUC-PACOA6, 7) pUCpac2.6OA7, 8) pUC-PACOA7, 9) pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA6 10) pUC_{lac}^{-}-PACOA6, 11) pUC_{lac}^{-}-pac2.6OA7, 12) pUC_{lac}^{-}-PACOA7. Protein belirteç (205, 116, 97.4, 66, 45, 29 kDa).

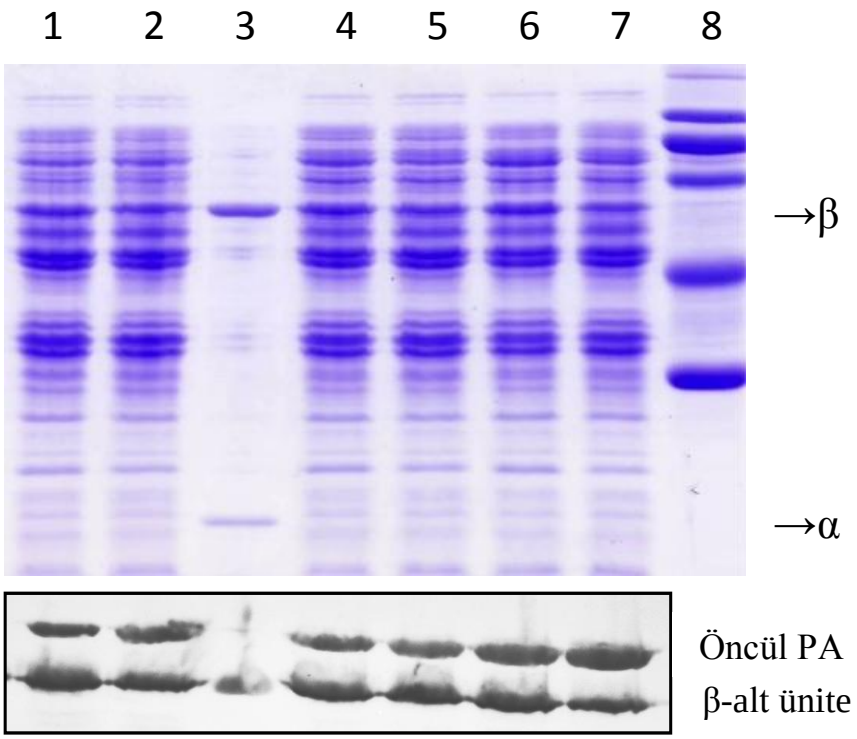
Ayrıca sıcaklığın *pac* geni ekspresyonu üzerine etkisini irdelemek için pUC-PACOA klonlarının 37 °C'ta büyütüldüğü ekspresyon çalışmasından alınan örneklerin SDS-PAGE ve Western blot profillerine de bakılmıştır. 37 ºC'ta aktif PA ürünü vermeyen mutantların Western blot membranında SDS-PAGE jeliyle uyumlu olarak öncül enzime ait bandın görülmesine karşın; enzimin işlenmesi sonucu oluşan β-alt birimine ait bant gözlenmemiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. 37 °C'ta 20 saat 0.1 mM IPTG uyarımı ile büyütülen pUC-PACOA klonlarını içeren *E. coli* JM109 soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin SDS-PAGE ve Western blot analizi. 1) pUC19, 2) pac_{wt}, 3) S_{pac}, 4) pUC-PACOA4, 5) pUC-PACOA5, 6) pUC-PACOA6, 7) pUC-PACOA7, 8) saf PA, 9) Protein belirteç (205, 116, 97.4, 66, 45, 29 kDa).

Özellikle sinyal peptit mutantlarının (Mut6 ve Mut7) Tat^- soydaki (DADE) total PA aktivitelerinin ana soy (MC4100) ile karşılaştırıldığında sadece yaklaşık %30 daha düşük olması (Şekil 3.27), Tat sisteminin yokluğunun PA'nın translokasyonu için elzem olmadığına işaret etmiştir. Bu sonuç öncül enzimi ve PA'nın β-alt ünitesini tanıyan poliklonal antikor (Kaynak F. Gümüşel, TÜBİTAK-MAM) kullanılarak yapılan Western blot analiziyle de doğrulanmıştır (Şekil 3.32). Şekilde PA'nın translokasyonu ve işlenmesi için belirleyici olan β-alt ünitesinin yaban ve mutantlarda benzer düzeylerde gözlenmesi, PA'nın translokasyonunun kaçınılmaz bir şekilde Tat-bağımlı olmadığını göstermiştir. Diğer yandan enzimin sinyal peptidinin 2. amino asitinde değişiklik içeren Mut6'ya ait örnekte pac_{wt}'a görece öncül ve işlenmiş β-alt ünitesi arasında miktarsal olarak belirgin bir farklılık olmaması (Şekil 3.32) ve bu klonların hücre dışı PA aktivite değerlerinin benzerlik

göstermesi (Şekil 3.28); +2 kodonda yapılan değişikliğin enzimin sekresyonu açısından önemli bir etki yaratmadığını göstermiştir.



Şekil 3.32. *pac*$_{wt}$, Mut6 ve Mut7'nin pMMB klonlarını içeren, 0.1 mM IPTG ile 26 °C'ta 20 saat büyütülen yaban tipi *E. coli* MC4100 ve *E. coli* DADE soylarına ait total hücre fraksiyonu örneklerinin Western blot analizi. Her bir kuyuya eşit miktarda hücre yüklendi. Birincil antikor olarak PA'ya karşı poliklonal bir antikor kullanıldı. 1) *E. coli* MC4100 (pMMB-PACwt), 2) *E. coli* DADE (pMMB-PACwt), 3) saf PA, 4) *E. coli* MC4100 (pMMB-PACOA7), 5) *E. coli* DADE (pMMB-PACOA7), 6) *E. coli* MC4100 (pMMB-PACOA6), 7) *E. coli* DADE (pMMB-PACOA6), 8) Protein belirteç (205, 116, 97.4, 66, 45, 29 kDa).

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Rekombinant penisilin asilazın üretimi transkripsiyon, translasyon ve translasyon sonrası adımlar gibi çeşitli gen ekspresyon basamakları tarafından sınırlandırılmaktadır. Literatürde *E. coli*'de mRNA translasyona başlama bölgesinin (TIR) dizisi için bir tercihin olduğu belirtilmiştir. Bu bölgenin dizisinde yapılan değişiklikler translasyona başlama etkinliğini ve sıcaklığa duyarlı gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir (Vimberg ve ark., 2007).

Tez çalışmasında penisilin asilaz geni (*pac*) translasyona başlama bölgesinde yapılan mutasyonların gen ekspresyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Planlanan mutasyonlar PCR aracılığıyla *pac* geni TIR bölgesine yerleştirilmiş, mutasyonların PA üretimi üzerine etkileri pUC-temelli klonlarda değerlendirilmiştir. Gen ekspresyonu IPTG varlığında uyarılmış, rekombinant soylardan konstitütif olarak PA üretimi elde edilmemiştir. Gen ekspresyon çalışmaları sonucunda yaban ve mutant *pac* genlerini içeren rekombinant soyların PA aktivite değerleri Bulgular kısmı Şekil 3.26'da toplu olarak gösterilmiştir.

Giriş kısımında belirtildiği üzere, *pac* mRNA'sı RBS ve başlama kodonu arasındaki sadece 4 bazlık mesafeyle *E. coli* genlerine görece daha kısa bir SD-AUG aralığına sahiptir. Bu aralığın uzunluğu ve nükleotit içeriği gen ekspresyonunu etkilediğinden; daha önce β-galaktozidaz mRNA'sının SD-AUG aralığı için uygulanan ve olumlu etki yarattığı bilinen nükleotit dizilimi gözetilerek (de Boer ve ark., 1983) PA aktivitesini iyileştiren S_{pac} mutasyonu tasarlanmıştır (İşsever Öztürk, 2002). Bu çalışmada ise S_{pac} mutantının SD-ATG aralığı dikkate alınarak oluşturulan mutantlarda bu aralık 6-8 nükleotite uzatılmış ve nükleotit içeriği değiştirilmiştir (Çizelge 2.4). Elde edilen Mut4, Mut5, Mut6 ve Mut7 mutantlarının yaban tipe görece PA aktivitelerindeki artış, bu bölgenin nükleotit içeriğinin gen ekspresyonu üzerindeki rolünü *pac* geni özelinde doğrulamıştır.

Diğer yandan *E. coli* genlerinde özellikle sıcaklığa bağlı olarak uzun veya kısa SD dizileri için bir tercih olduğu bilinmektedir (Vimberg ve ark., 2007). *pac* geni

birbiri ile örtüşen iki SD dizisine (GAGGA) sahip olup; SD dizisinin bu motifinin *pac* mRNA'sının sıcaklığa duyarlı translasyonunda rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir. Bu anlamda ribozomunun bağlanması olası SD dizilerinden biri SD2 (AGGA)'nin elimine edilerek TIR bölgesinde sadece anti-SD dizisiyle daha güçlü eşleşebileceği öngörülen, daha kısa bir SD dizisinin (GAGG) yer almasının gen ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi yapılan bir diğer çalışmadır. SD dizisi olarak sadece GAGG'nin bulunması (Mut4) PA üretimini olumlu yönde etkilerken; *pac* mRNA'sının sıcaklığa duyarlı translasyonunu değiştirmemiştir. Bu bulgu *pac* mRNA'sındaki mevcut SD dizileri arasında ribozom ile etkileşim için bir yarışın olabileceği ve bunun da translasyonel etkinlikte azalmaya yol açabileceği yönündeki düşünceleri doğrulamıştır.

Diğer yandan *pac* geninin DR (Downstream Region)'sinde yapılacak değişiklikler TIR'ın diğer elemanları olan başlama kodonu, SD dizisi ve SD-ATG aralığıyla etkileşimli olarak gen ekspresyonunu farklı düzeylerde etkileyebilmektedir. Özellikle başlama kodonundan sonraki ilk 5 nükleotitlik bölgenin A'ca zengin olmasının mRNA'nın translasyona başlama etkinliği üzerinde olumlu bir etki yarattığı bilinmektedir (Brock ve ark., 2007). Bunun yanı sıra DR'nin başlama kodonundan sonraki ilk elemanı olan +2 pozisyonu için kodon tercihi TIR'ın dizisine ve sentezlenen ürüne bağlı olarak değişebilmektedir. *pac* geni DR bölgesinde yer alan, sinyal dizi içindeki 2. ve 4. kodonun ayrı ayrı değiştirilmesi, bu çalışmada yapılan bir diğer mutasyondur. +2 pozisyonuna nadir bir arjinin kodonu yerleştirilirken, +4 pozisyonuna AAA lizin kodonu getirilmiştir. Daha sonra ilgili tartışma bölümlerinde açıklandığı üzere; bu değişiklikler sadece *pac*'ın ekspresyonu için değil; oluşan ürünün sekresyonu ve translokasyonu açısından da önem taşımakta olup; sinyal dizi mutasyonlarının penisilin asilaz ekspresyonu üzerine etkisi pUC klonlarıyla, enzimin sekresyonu üzerine etkisi ise pMMB klonlarıyla irdelenmiştir. Sinyal peptit mutasyonları PA üretiminde artış sağlarken; enzimin sekresyonunu etkilememiştir.

Giriş bölümünde belirtildiği gibi *pac* geninin PAA ile uyarıldığı ve CRP ile gen ekspresyonunun düzenlendiği bilinmektedir. Ancak bu çalışmada kullanılan

yaban ve mutant *pac* genlerinin tamamı, bu düzenleyicilerle etkileşim için gerekli olan bölgeleri taşımamaktadır. Bu nedenle tez kapsamında gerçekleştirilen ekspresyon çalışmalarında PAA ile uyarım ya da glukoz ile baskılanma gibi diğer düzenleme mekanizmalarının etkisi incelenmememiştir.

4.1 pUC19 ve pUC19$_{lac}^{-}$-temelli klonlarda PA Aktivitesi

Lac promotoru, transkripsiyonun başlaması için gerekli DNA dizi sinyallerini çalışmada yaratıcı bir model sistem olarak hizmet etmiş olup, 'promotor' terimi ilk kez bu sinyalleri içeren *lac* operonundaki DNA kısımlarının tarif edilmesi sırasında kullanılmıştır (Jacob ve ark., 1964). *Escherichia coli*'nin *lac* promotoru (P_{lac}), en iyi çalışılmış moleküler biyoloji sistemlerinden biridir (Dickson ve ark., 1975). Bu çalışmalardan kazanılan bilgi ve öngörü gen düzenlenmesi hakkındaki şu anda mevcut olan düşüncelerin büyük bir kısmını şekillendirmiştir. Yapılan bu çalışmalar ile RNA polimerazın tanıması için gerekli olan yaklaşık 50 bp'lik bir dizideki bakteriyel promotor yapısı ve söz konusu tanıma süresince özellikle önemli bir rol oynadığı gözlenen -10 ve -35 bölgeleri gibi özgül diziler hakkında genel bir bilgi elde edilmiştir (Sienbenlist ve ark., 1980; Reznikoff ve ark., 1978).

P_{lac}'ın -35 elementinin dizisi, *E. coli* promotorları için tanımlanan korunmuş diziyle mükemmel eşleşmese (TTTACA, korunmuş dizi TTGACA) ve -10 elementten 18 bp öteye yerleşmiş olsa da (genellikle korunmuş iki bölge arasındaki ideal uzaklık 17 bp olarak kabul edilir), P_{lac} promotorunun önemli bir elementi olup; daha önce yapılan bir çalışmayla promotorun 5' ucundaki TT'nin CC'ye değişiminin transkripsiyonu tümüyle ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. -35 ve -10 elementleri arasındaki bölgenin içeriği GC açısından zengin olup, bu bölge AT'ce zenginleştirilecek şekilde mutasyona uğratıldığında; elde edilen mutantın transkripsiyon düzeyi neredeyse %100 artarken; benzer TT→CC mutasyonu, promotorun artmış aktivitesini tamamen ortadan kaldırmıştır (Liu ve ark., 2004). Dolayısıyla P_{lac} -35 dizisinde yapılacak değişiklikler *lac* promotorunun aktivitesi açısından önem taşımaktadır.

Daha önce Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yapılan çalışmayla P_{lac} -35 dizisi GGATGT olacak şekilde değiştirilerek, P_{lac}^{-} vektörü oluşturulmuştur (İşsever Öztürk, 2002). Aynı çalışmada çeşitli *pac* geni promotor mutantlarının yanı sıra, SD-ATG arasındaki uzaklığın artırıldığı S_{pac} mutantının (Çizelge 2.4), $pUC19_{lac}^{-}$ vektörü üzerindeyken hem IPTG uyarımlı hem de uyarımsız koşullarda aktivite verdiği gözlenmiştir. P_{lac} promotoru -35 bölgesinde yapılan değişiklik sonrasında gen ekspresyonunun IPTG ile uyarılamaması beklenirken; belirgin bir uyarımın olması P_{lac} -35 bölgesindeki değişikliğin *lac* promotor kaynaklı gen ekspresyonunu etkilemediğini düşündürmüştür.

Tez çalışmasında *pac*3.5-pUC19 (pac_{wt})'u oluşturan 2.6 kb'lık *pac* yapısal geni ile bu genin 3′ ucunda yer alan 900 bp'lik fragmanın ayrı ayrı ve birlikte pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$ vektörleri üzerinde yer alacağı bir klonlama stratejisi uygulanmıştır. Böylece hem P_{lac} -35 bölgesindeki değişikliğin hem de klonlanan *pac* fragmanının büyüklüğünün aktivite üzerine etkisi bu klonlar özelinde irdelenmiştir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalar *pac* operonu DNA fragmanının seçiminin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak aktif PA üretilmesinde önemli olduğunu göstermiştir (Chou ve ark., 1999; Gümüşel ve ark., 2001).

Bu çalışmada yaban ve mutant (Mut4, Mut5, Mut6, Mut7) *pac* genlerini $pUC19_{lac}^{-}$ vektörü üzerinde taşıyan rekombinant *E. coli* JM109 soylarından uyarımsız ve IPTG uyarımlı koşullarda dikkate değer bir PA aktivitesi elde edilmemiştir (Şekil 3.18, 3.19 ve 3.20). Bu bulgu P_{lac} promotoru -35 bölgesindeki değişikliğin *lac* promotorunun aktivitesini etkilediğini göstermektedir. $pUC19_{lac}^{-}$ klonlarıyla PA aktivitesine ait önceki çalışmaya görece alınan farklı sonuçların, genin taşıdığı mutasyonlardan çok, geni bu vektör üzerine klonlanmada kullanılan sitlerin farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada yaban ve mutajenik 2.6-kb'lık *pac* genlerinin yaban ve mutant pUC19 vektörleri (pUC19 ve $pUC19_{lac}^{-}$) üzerinde taşındığı klonları içeren soylardan, herhangi bir PA aktivitesi elde edilmezken (Şekil 3.20 ve 3.21); 2.6-kb'lık mutajenik *pac* geninin yanı sıra 3′ ucunda 0.9 kb'lık parçayı da taşıyan 3.5-kb'lık fragmanlara

sahip pUC19 klonlarını içeren soyların PA aktivitesinde önemli bir artış gözlenmesi (Şekil 3.22), klonlanan *pac* operonu DNA fragmanının önemine birkez daha dikkat çekmiştir.

4.2 Translasyona Başlama Bölgesi (TIR)

Bir proteinin translasyon düzeyinin belirlenmesinde translasyona başlama bölgesi (TIR), temel belirleyicidir. Giriş kısmında belirtildiği gibi TIR, Shine-dalgarno dizisinin hemen yukarısından başlama kodonunun aşağısındaki yaklaşık 20 nükleotitlik bir bölgeyi kapsamaktadır. Bu dizide yapılacak küçük modifikasyonlar bile translasyonun başlama etkinliğini değiştirebilmekte, protein oluşturmaya giden yoldaki translasyon düzeyi ayarlanabilmektedir. Özellikle translasyonun başlangıcındaki kodon kullanımı, hem kodonun kendi içsel özelliği hem de 16S rRNA ile eşleşebilme yeteneği açısından translasyonun başlama hızını ayarlayabilmektedir (Faxén ve ark., 1991).

Yaban tipi *pac* geninin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak penisilin asilaz üretmede optimal özelliklere sahip olmadığı bilinmektedir (Rajendhran ve ark., 2003). Translasyona başlama basamağı gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir aşama olup; tez çalışmasında *pac*'ın TIR bölgesinde yapılan mutasyonların (Mut4, Mut5, Mut6, Mut7) gen ekspresyonu üzerine etkileri irdelenerek, bu bölgede translasyonun daha etkin başlamasını ve dolayısıyla daha fazla aktif PA oluşumunu sağlayabilecek iyileştirmelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Uyarımlı ve uyarımsız kültür koşullarında gerçekleştirilen ekspresyon çalışmalarından, sadece uyarımlı koşullarda değerlendirilebilecek bir PA aktivitesi elde edilmiştir. Daha sonra ekspresyon çalışmalarında uygulanacak en uygun inkübasyon süresi, sıcaklığı, çalkalama hızı ve IPTG uyarım konsantrasyonunu belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla IPTG uyarımından sonraki 5. saatte, kültürün 20, 30, 35. ve 46. saatlerinde örnek alınmış, çalkalama hızı olarak 100 ve 200 rpm, inkübasyon sıcaklığı olarak ise 26 ºC ve 37 ºC denenmiştir. En iyi PA üretimi kültürler kazein besiyerinde 100 rpm çalkalama ile 26

°C'ta 20 saat büyütüldüğünde elde edilmiştir. İnkübasyon süresi uzatıldığında (Şekil 3.22) ya da yüksek hızda çalkalama uygulandığında (Şekil 3.25) örneklerin aktivitelerinde düşme görülmüştür. Çalkama hızı arttıkça inklüzyon cisimcikleri daha fazla miktarda oluşabilmekte ve bu durum aktivitede azalmaya yol açabilmektedir. Kültivasyon süresi uzatıldığında ise, IPTG etkisinin giderek azalması nedeniyle, PA aktivitesinin ileri saat örneklerinde azalma göstermesi olasıdır. PA'nın üretimi transkripsiyon, translasyon ve post-translasyonel adımlar gibi çeşitli basamaklarda sınırlandırılabilmektedir. IPTG'nin eklenmesiyle *pac*'ın transkripsiyonel ve translasyonel etkinliğinin her ikisi de arttırılabilir. Ancak çok yüksek miktarda IPTG eklenmesi aktivitede daha ileri bir artışa neden olmazken; inklüzyon cisimcikleri oluşumuna yol açabilmektedir (Lin ve ark., 2001). Kullanılacak IPTG konsantrasyonunun ayarlanması ayrıca hücre üremesi açısından da önemlidir. Çünkü yapılan araştırmalarda çok fazla IPTG kullanımının sadece enzim üretimini azaltmadığı; rekombinant hücre için de toksik etki yaratarak aktivitede düşüşe neden olabileceği gösterilmiştir (Sriubolmas ve ark., 1997). Bu anlamda farklı IPTG konsantrasyonlarının değişik zamanlarda kullanıldığı ekspresyon çalışmaları (Şekil 3.23 ve 3.24) sonrasında kültürlere OD_{600}=0.6-0.8 aralığındayken uyarım amaçlı 100 µM IPTG eklenmesi tercih edilmiştir. Sıcaklığın *pac* ekspresyonu üzerine önemli bir etkisi olup, bu etki 4.2.4 kısmında ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Rekombinant soyların uyarımlı ve uyarımsız koşullardaki üreme özelliklerine bakıldığında; IPTG uyarımlı kültürlerin üremesinde, uyarımsız kültürlere görece genel olarak çok fazla bir farklılık izlenmemiştir (Şekil 3.21 ve 3.22). Ancak zaman zaman IPTG uyarımlı kültürlerin üremesinde gecikme olabilmektedir. Bu durum artan gen ekspresyonu nedeniyle olabileceği gibi; yukarıda sözü edildiği üzere IPTG uyarımlı hücrelerde oluşabilecek öncüllerin hücre üremesini etkilemesi nedeniyle de olabilir.

Aktif PA ürününün oluşabilmesi için, sentezlenen öncül preproPA'nın translokasyonu ve daha sonra periplazmada proteolitik olarak işlenmesi gerekmektedir. Olgun enzim α ve β olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır. Ekspresyon çalışmasından alınan örneklerin SDS-PAGE profillerinde öncül enzim

ile işlenmiş α ve β-alt birimlerine ait bantlar (Şekil 3.30) görülmektedir. Mutantlar arasından özellikle Mut5 ve Mut7'ye ait örneklerde daha fazla öncül birikimi gözlenmiştir.

Penisilin asilaz üretiminde dengelenmiş bir protein sentez akışının sürdürülmesi aktif enzimin oluşumu için belirleyicidir. Özellikle sentezlendikten sonra taşınan proteinlerde, protein oluşum mekanizması daha karmaşık olmaya başlamakta ve taşınmanın/periplazmik katlanmanın etkinliği aktif ürün oluşumu açısından önem taşımaktadır. Proteinin fazla miktarda üretildiği durumda sitoplazmik ve periplazmik öncüllerin her ikisinin de inklüzyon cisimcikleri oluşturması olasıdır. Bu yüzden rekombinant proteinlerin fazla miktarda üretimi için sadece transkripsiyonel ve/veya translasyonel etkinliğin artırılması değil; çeşitli gen ekspresyonu adımları süresince (transkripsiyon, translasyon ve translasyon sonrası işlenme) dengeli bir protein sentez akışının sürdürülmesi ve katlanma adımlarının polipeptit ara formlarının oluşumundan kaçınılacak uygun bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Gen ekspresyonu hızının ayarlanması açısından TIR bölgesinde yapılacak düzenlemeler son derece önemlidir. Bu çalışmada *pac* geni TIR bölgesinde gerçekleştirilen mutasyonlar PA üretimini olumlu etkilemiştir. Bunun yanı sıra *E. coli'*de rekombinant proteinleri fazla miktarda sentezlemenin bir diğer yolu sekresyon basamağını iyileştirmek ve proteinin hücre dışına salınmasını sağlamaktır (Chou ve ark., 2001). Tez kapsamında oluşturulan pMMB-temelli klonlarla hücre dışı PA aktivitesinin elde edilmesi ise, daha sonra vurgulanacağı üzere periplazmik bir enzim olan PA'nın fazla miktarda üretimi açısından önem taşımaktadır.

4.2.1 SD Bölgesi Mutasyonu

Penisilin asilazı kodlayan *pac* geni ribozoma bağlanma alanında (RBS), GAGGA dizisine sahiptir. Bu motifin 16S rRNA'nın 3′ ucu ile, birbiriyle örtüşen GAGG (SD1) ve AGGA (SD2) dizileri aracılığıyla ve iki farklı şekilde etkileşebileceği önerilmiştir (Keilmann ve ark., 1993). Tez çalışmasında bu iki SD dizisinden AGG**A**'daki ikinci 'A' bazı 'T' bazı ile yerdeğiştirilerek Mut4 mutantı oluşturulmuştur. Böylece Keilmann ve ark. (1993) tarafından PA için önerilen iki SD

dizisinden biri elimine edilmiş, geriye daha kısa ama literatüre göre (Kozak, 1983) anti-SD'nin 'CCUCC' merkezi ile eşleşmesi açısından translasyonu daha etkili başlatması olası bir SD dizisi (SD1) bırakılmıştır. Yaban tipi *pac* geni SD1'e görece 5 nt, SD2'ye görece ise 4nt'lik bir SD-ATG aralığına sahiptir. Buna göre oluşturulan Mut4 mutantı pac_{wt}'a görece A/T'ce zengin ve daha uzun (SD1 dikkate alındığında 7 nt) bir SD-ATG aralığı taşımaktadır (Çizelge 2.4). Bu aralıktaki baz dizilimi daha önce yapılan çalışmaların sonuçları dikkate alınarak ve tercihli olarak yerleştirilmiştir (De Boer ve Hui, 1990; İşsever Öztürk, 2002). Anti-SD dizisiyle daha güçlü bir etkileşim kurması olası ve başlama kodonundan daha optimal bir mesafede bulunan bir SD dizisine sahip Mut4 mutantı ile beklenen translasyona başlama etkinliğinin ve dolayısıyla PA üretiminin iyileştirilmesidir.

Birçok genin translasyonu için bir SD dizisinin varlığı zorunlu olmamakla birlikte (Jacques and Dreyfus, 1990), SD motifinin bulunması yine de etkin bir rol oynayabilmektedir. Nitekim Yusupova ve ark (2001) tarafından yapılan çalışmada SD etkileşiminin 16S rRNA elementleri ve ribozomal proteinler S11 ve S18 tarafından oluşturulan yarığa yerleşmiş bir heliks meydana getirdiği açıkça görülmüştür. Bu sonuçlar SD etkileşiminin translasyonun başlamasının önemli bir parçası olabileceğini desteklemektedir.

SD dizisi 16S rRNA'nın 3′ ucu ile değişebilen bir tamamlayıcılık gösterir. Tamamlayıcı dizinin uzunluğu ve translasyon etkinliği arasında kesin bir ilişki yoktur. Bununla birlikte tamamlayıcılığın 4 ila 8 bp'den 13 bp'e arttıkça, ekspresyon düzeyinde %50'lik bir azalmanın olduğu bildirilmiştir (de Boer ve ark., 1983b). SD uzunluğunun gen ekspresyonu üzerine etkisiyle ilgili birçok çalışma yayınlanmıştır: Komarova ve ark (2002), 10-nükleotitli AAGGAGGUGA, 8-nükleotitli AAGGAGGU ve 6-nükleotitli AAGGAG SD dizilerini karşılaştırdığında; reporter gen düzeyinde AAGGAG'nin en yüksek ekspresyonu verdiğini bulmuştur. Chen ve ark (1994) ise, GAGGU'nun UAAGG dizisinin 2-katı kadar aktif olduğunu bildirmiştir. Tez çalışmasında *pac* geninin 5-nükleotitli SD dizisi GAGGA'da ikinci A bazının T'ye değiştirilmesiyle oluşturulan 4-nükleotitli GAGG dizisine sahip Mut4 mutantı pac_{wt}'a görece 8-kat, S_{pac}'a görece ise ~2-kat daha iyi bir PA aktivitesi

vermiştir (Şekil 3.26). Mut4 mutantında birbiriyle örtüşen ve dolayısıyla ribozoma bağlanmak için birbiriyle yarışabilecek iki SD dizisinin olmaması, ribozomla etkileşim açısından avantaj sağlayabilir. Bunun yanı sıra Mut4'de daha kısa bir SD ve A/T'ce zengin daha uzun bir SD-ATG aralığının birlikteliği gen ekspresyonunu olumlu etkileyebilir. Yapılan değişikliğin öncül protein birikimini ve dolayısıyla inklüzyon cisimciği oluşumunu azaltarak, uygun bir şekilde katlanmış rekombinant enzim oluşumunu artırması da olasıdır.

Literatürde uzun SD dizilerinin ribozomun ilerleyişini bozarak translasyonel etkinliği azaltabileceği, ribozom bağlanma alanının boş kalmasını geciktirebileceği ve dolayısıyla translasyonu yavaşlatabileceği önerilmiştir (de Boer ve ark., 1983). Uzun ve kısa SD dizileri karşılaştırıldığında (Ringquist ve ark., 1992), etkileşimin uzatılmasının kendiliğinden maksimum ekspresyon düzeyini indirgemediği ancak; muhtemelen bu mutantların birçoğunda inhibe edici ikincil yapıların oluşması nedeniyle beklenenden daha az protein ürünü oluştuğu bulunmuştur (de Smit and van Duin, 1994).

Bakteriyofaj MS2'nin ceket-protein genine ait SD dizisinde yapılan değişiklik, bu bölgedeki mutasyonların ribozomal affiniteyi etkileyebileceğini göstermiştir. SD tamamlayıcılığındaki değişiklikliğin sadece ribozomun bağlanması moleküller arası baz-eşleşmesi tarafından kısıtlandığında translasyonu etkilediği bildirilmiştir. Güçlü bir SD etkileşimi, mRNA için ribozoma ekstra bir affinite sağlamakta ve bu sayede ikincil yapı nedeniyle olan inhibisyonu (kısmen) telafi etmektedir (de Smit and van Duin, 1994a). Bu durum molekül-içi ve moleküller-arası baz eşleşmesinin doğrudan bir yarış içinde olduğuyla ilgili hipotezi desteklemiştir (de Smit & van Duin, 1990b). SD'de bölgesinde yapılan baz yerdeğiştirmeleri sıklıkla mRNA ikincil yapısının kararlılığını değiştirdiği için güçlü bir SD etkileşiminin molekül içi mRNA ikincil yapılarının uygun olmayan etkilerini giderebilmesi mümkündür (de Smit ve van Duin, 1994a).

Bunun yanı sıra güçlü bir SD etkileşimi, bir translasyonel başlama alanına bağlanması için ribozoma translasyonel bir repressör ile yarışmada yardımcı

olabilmektedir. Bu nedenle SD dizisinin modifikasyonu, baskılanabilir ribozom bağlanma alanlarının kontrolünü modüle etmenin ilginç bir yolu olabilir. Bu anlamda Mut4 ile PA üretimi açısından elde edilen olumlu sonuç, yaban tipi *pac* geninde ribozoma bağlanmak için SD1 ve SD2 arasında yarış olabileceğini ve SD1'in anti-SD ile daha güçlü etkileşim kurma potansiyelinden dolayı SD2'nin anti-SD'ye bağlanması durumunda translasyon oranının düşebileceğini düşündürmektedir.

Yapılan istatistiksel çalışmalarda SD dizilerinin büyük bir çoğunluğunun anti-SD dizisinin merkezi ile etkileşimi gereksindiği belirlenmiştir. *E. coli* K-12'de yüksek oranda eksprese edilen genlerin SD dizileri orta düzeyde eksprese edilen genlerin SD dizileriyle kıyaslandığında; GGAG ve GAGG'ye daha yüksek sıklıkta (%16.7'ye karşın %24.7), AGGA'ya ise daha düşük (%7.8'e karşın %5) sıklıkta rastlanılmıştır (Ma ve ark., 2002). Bir genin başlangıç kodonunun yukarısındaki 20 baz ve anti-SD dizisi arasındaki bütün muhtemel eşleşmeler için hesaplanan serbest enerji değerleri (ΔG_{SD}), GGAG, GAGG ve AGGA için aynı (-4.4 kcal/mol) olmasına karşın; AGGA diğer iki diziye görece daha zayıf bir SD dizisi olarak görülmüştür. Bu yüzden yüksek oranda ekspres edilen genlerin anti-SD'ye daha yüksek bir affiniteye sahip, başlama kodonuna görece daha optimal bir mesafede yer alan ve anti-SD bölgesinin merkezi ile etkileşimi gereksinen bir SD dizisine sahip olmaya eğilimli olduğu belirlenmiştir. Böyle bir SD dizisinin translasyonun başlamasında daha yüksek etkinlikte bir rol oynaması muhtemel olup (Ma ve ark., 2002); bu sonuçlar dikkate alındığında *pac* geninde SD dizisi olarak GAGG'nin daha etkin bir rol oynayabileceği düşünülebilir.

Diğer yandan bir SD dizisinin etkinliğinin genellikle onun 16S rRNA'daki anti-SD dizisiyle baz-eşleşme potansiyeli ve başlama kodunundan olan uzaklığı tarafından belirlendiği bilindiğinden (Ringqusit ve ark., 1992; de Smit ve van Duin, 1994); Mut4'ün *pac*'ın ekspresyonunu artırıcı etkisi için alternatif bir açıklama ise, SD2'nin hiç kullanılmadığı, ancak yapılan mutasyonun sadece SD-ATG aralığının içeriğinde ve uzunluğunda bir değişikliğe yol açarak, örneğin mRNA ikincil yapısının kararlılığını değiştirerek translasyon oranını etkileyebileceği yönündedir.

Tez çalışmasında oluşturulan Mut4 mutasyonunun diğer bir önemi ise, sözkonusu değişikliğin *pac*'ın sıcaklık-duyarlı ekspresyonuna olan etkisinin incelenmesidir. Bunun nedeni daha önce yapılan bir araştırmada yüksek sıcaklıkta translasyonunun başlamasının geçici olarak inhibe edildiği mRNA'ların; başlangıç kodonunun 5'-tarafında 5'-GAGGAA-(N_{3-6})-AUG-3' dizisini içerdiğinin gösterilmesidir (Kuriki, Y., 1990). İlginç bir şekilde *pac* geni mRNA'sının 5'-ucunda da aynı dizi mevcuttur: 5'-GAGGAt-(N_3)-AUG-3'. Translasyon başlangıcında 16S rRNA'nın 3' kısmı, -GAGG (SD1)- ya da –AGGA (SD2)- dizilerine bağlanabilir. İki ayrı Shine-Dalgarno dizisinin varlığının *pac* mRNA'sının sıcaklığa duyarlı translasyonu üzerinde etkili olup olmadığı açık değildir. Tez çalışmasında daha önce açıklanan sebeplerden dolayı bu iki SD dizisinden SD2 elimine edilmiş ve Mut4 mutantı ile sadece SD1'in varlığının *pac* mRNA'sının sıcaklığa duyarlı translasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha sonra detaylı olarak belirtileceği üzere 37 °C'ta yapılan ekspresyon çalışmalarından alınan örneklerde aktif PA ürünü oluşmaması (Şekil 3.31), sadece SD1'in varlığının PA'nın sıcaklığa duyarlı ekspresyonunda değişiklik yaratmadığını göstermiştir.

İki RNA ipliği arasındaki baz eşleşmesinin serbest enerjisi sıcaklığa bağlıdır. Dolayısıyla SD'nin 16S rRNA'nın 3′ ucundaki anti-SD (aSD) dizisiyle baz eşleşmesinin gücü de sıcaklık bağımlıdır. Eğer bu etkileşimin optimal serbest enerjisi translasyonun etkinliğini belirliyorsa, daha düşük sıcaklıklarda daha kısa SD:aSD çiftleri tercih edilmelidir. Bu öngörüyü test etmek için yapılan deneysel çalışmalarda 37 ºC'ta en etkili SD dizisi AGGAGG ve 20 ºC'ta GGAGG olarak belirlenmiş, sıcaklık düşürüldüğünde optimal dizi tercihi daha kısa olan diziden yana olmuştur. Bu sonuç SD:aSD etkileşiminin belli bir optimal uzunluğunun etkili translasyon için gerekli olduğuna işaret ederken; aynı zamanda SD dizisi uzunluğunun gen ekspresyonunun sıcaklık-bağımlı düzenlenmesi için kullanılabileceğini de göstermiştir (Vimberg ve ark., 2007). Bu anlamda tez çalışmasında, kültürleri büyütmek için kullanılan 26 ºC'ta daha kısa bir SD dizisi taşıyan Mut4 mutantı ile pac_{wt}'a görece daha iyi bir aktivite değeri elde edilmesi, düşük sıcaklıkta daha güçlü bir SD:aSD etkileşimine sahip SD dizisinin tercih edildiği yönündeki yukarıda sözü edilen çalışma sonuçlarıyla uyumludur.

Yapılan çalışmalarda başlama kodonu ve SD arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Birçok gende AUG başlama kodonuyken; nadir olarak GUG ve UUG'de kullanılabilmektedir. Dahası AUG başlama kodununa sahip genler, GUG ya da UUG ile başlayan genlerden daha yüksek oranda SD dizisi taşımaya eğilimlidir. AUG'nin GUG ve UUG'den daha baskın olduğu dikkate alındığında; GUG ve UUG kodonlarının zayıf bir SD dizisiyle birlikte var olması; gen ekspresyonunu önemli ölçüde azaltabilmektedir. Bu nedenle SD dizisinin başlangıç kodonuyla uyumlu çalışarak; farklı genler için farklı ekspresyon düzeylerini sürdürmesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde incelikli bir kısmı oluşturmaktadır (Ma ve ark., 2002).

Diğer yandan başlama sinyallerinin tanınabilirliği, prokaryotlarda büyük bir çoğunluğunun translasyonel repressör fonksiyona sahip olduğu bilinen mRNA'ya bağlanan proteinler tarafından da etkilenebilmektedir. Örneğin, bakteriyofaj MS2 ceket proteini, faj tarafından kodlanan replikazın ribozom bağlanma alanına bağlanabilmekte ve onu fiziksel olarak bloke edebilmektedir. Birçok bakteriyel ribozomal protein de kendi mRNA'larının translasyona başlama alanlarını bloke ederek benzer bir şekilde kendi sentezlerini düzenleyebilmektedir (Voorma, 1996).

4.2.2 SD-AUG Bölgesi Mutasyonu

Bir SD motifine sahip genler arasında, ribozomun translasyona başlaması için SD dizisi ve başlama kodunu arasında mükemmel bir mesafeye gereksinimi yoktur. Ancak SD dizisi başlama kodonundan dört nükleotit kadar kısa ya da 13 nükleotit kadar uzak bir mesafeye yerleştiğinde gen ekspresyonu önemli oranda azalmaktadır (Chen ve ark., 1994; Ringquist ve ark., 1992). Bu nedenle görünüşe göre SD motifi ve başlama kodonu arasında optimal mesafe gereksinen yapısal kısıtlamalar mevcuttur. Deneysel çalışmalar göstermiştir ki; *E. coli* genleri için optimal SD-ATG aralığı 8-10 bazdır (Ringquist ve ark., 1992; Chen ve ark., 1994). Bu açıdan bakıldığında intergenik mesafeler, SD varlığıyla ilişkili olabilen prokaryotik genomların önemli bir özelliğidir (Ma ve ark., 2002).

SD-ATG arasındaki bölgede A ve T rezidülerinin baskın olması ile translasyonun etkin başlaması arasında güçlü bir ilişkinin olduğuna işaret eden çok sayıda çalışma mevcuttur (DeBoer ve ark., 1983; Hwang ve ark., 1990). Bunun nedenlerinden biri bu bölgenin translasyonun başlaması sırasında ATG kodonunun tanınmasını güçlü bir şekilde etkileyen özellikle başlama kodonuna yakın bir alandaki mRNA ikincil yapısında rol oynamasıdır (Botterman ve ark., 1987).

Chou ve ark (2000) tarafından SD-AUG arasındaki 4 nükleotitlik kısa mesafenin *pac* mRNA'sının translasyonunu sınırladığı ve oluşan çeşitli PA öncülleri tarafından translasyon sonrası taşınma ve işlenme basamaklarında sorun yaşandığı bildirilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasında daha önce Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından oluşturulmuş S_{pac} mutantı (İşsever Öztürk, 2002) ile elde edilen olumlu sonuçlar gözetilerek, S_{pac}'a görece SD-ATG aralığının iki adenin rezidüsü daha eklenerek A'ca zenginleştirilip 8 nükleotite uzatıldığı Mut5 mutantı geliştirilmiştir (Çizelge 2.4). Bu sayede daha uzun ve A'ca zengin bir nükleotit içeriğine sahip SD-AUG aralığının *pac* mRNA'sının translasyonu üzerine etkisi irdelenmiştir. Beklenildiği gibi, sözkonusu değişiklik *pac* geninin ekspresyonunu olumlu etkilemiş ve aktivitede yaban tipe görece 12-kat, S_{pac}'a görece ise ~2.5 katlık bir artış elde edilmiştir (Şekil 3.26).

Günümüze kadar çok sayıdaki çalışmada translasyonel etkinlik üzerine RBS'deki nükleotitlerin etkisi incelenmiştir (Kozak, 1986). Bu çalışmaların bir kısmında yapılan nokta mutasyonları ile bu bölgedeki her bir nükleotitin önemi incelenirken (Kim ve ark., 1985); bir kısım çalışmada ise bir dizi olarak nükleotit kombinasyonunun önemi araştırılmıştır. Sonuçlar SD-ATG aralığındaki nükleotit dizisinin tek başına bile translasyon düzeyini önemli oranda etkilediğini göstermiştir. Örneğin Min ve ark . (1988) tarafından yapılan çalışmada benzer SD dizilerine sahip -1, -2, -9 ve -12 mutantları ile -5 ve -16 mutantlarının ekspresyon düzeylerinde 4-katlık bir farklılık gözlenmiştir. De Boer ve ark (1983a; 1983b) tarafından da Shine-Dalgarno dizisini takip eden dört bazın translasyonel etkinliği en az 5-kat etkilediği bildirilmiştir. Matteucci ve Heyneker (1983) kimerik sığır büyüme hormonu mRNA'sının SD-AUG dizisi arasındaki bölge boyunca bir düzine mutasyon tarif

etmişler ve bu mutasyonlardan bazılarının ekspresyon seviyesini 10-kata kadar etkilediğini göstermişlerdir. Bu bulgulardan elde edilen sonuç, SD-AUG arasındaki bölgenin birincil dizisinin en azından kısmen mRNA'nın translasyonel etkinliğini belirleyen önemli bir bilgi içerdiğidir.

Bununla birlikte SD-AUG arasındaki bölgede yapılan mutasyonların etkileri mRNA'ya özgü olabilmekte, bu durum da farklı mRNA'larda bildirilen mutasyonların etkilerini açıklamayı ve karşılaştırmayı güçleştirmektedir. İlave olarak özel bir mutasyonun etkisi onun içeriğine ya da onu çevreleyen komşu bazlara bağlı olabilir. ATG'den önceki üç bazda ve muhtemelen tüm SD-ATG aralığı boyunca böyle bir içerik etkisinin rol oynadığından söz edilebilir. Buna göre -1 pozisyonundaki U ve -2 pozisyonundaki A rezidüsü her zaman olmasa da birçok durumda komşu bazlara bağlı olarak ekspresyon için tercih edilmektedir (Hui ve ark., 1984). Başlama kodonunun hemen öncesindeki baz (-1 pozisyonu) ve fMet-tRNA antikodonunun 3′ tarafına yakın 37 pozisyonunda bulunan baz arasındaki etkileşimin translasyonun etkili başlaması için *in vivo* ve *in vitro*'da önemli olduğu gösterilmiştir (Hui ve ark., 1984).

In vitro'da başlama kodununun 5′ tarafının hemen bitişiğindeki bazın (-1) 30S partiküller ve fMet-tRNA ile üçlü başlama komplekslerinin oluşma oranını etkilediği bildirilmiştir. A/U rezidü başlama kompleksinin oluşumunu bu pozisyondaki herhangi diğer bir bazdan daha fazla teşvik etmektedir. Bu çalışmalarda saflaştırılmış bileşenler ve kısa (3-7 baz uzunluğunda) AUG içeren sentetik oligonükleotitler kullanılmıştır. -1 pozisyonundaki U-rezidüsünün favorize etkisinin fMet-tRNA üzerindeki antikodonun 3′ tarafının hemen bitişiğindeki A rezidüsüyle 4-bp'lik bir kodon-antikodon etkileşimi oluşturması nedeniyle olabileceği önerilmektedir (Eckhardt ve Luhrmann, 1981; Ganoza ve ark., 1982; Hui ve ark., 1984).

Gerçekte AUG'nin 5′ ucuna komşu bazın etkisinin *in vitro* çalışmalar tarafından önerilenden daha karmaşık olduğu ortaya çıkartılmıştır (Eckhardt ve Luhrmann, 1981; Ganoza ve ark., 1982). Ribozomal RNA'ların ikincil yapı modelleri eşleşmemiş bölgelerdeki nükleotitlerin yaklaşık %40'nın A rezidüsü

olduğunu göstermiştir (Gutell ve ark., 1985). A/U-zengin dizilerin başlama kodonunun yukarısına (Dreyfus, 1988) ya da aşağısına (Qing ve ark., 2003) yerleştirildiğinde, translasyonu uyardığı bilinmektedir. RBS ikincil yapısı translasyonun başlaması için oldukça önemlidir. Başlama etkinliğinin yüksek adenin ve timin içeriği aracılığıyla iyileştirildiği bildirilmiş olup, A/U-zengin bölgelerin translasyona başlama bölgesinde ikincil yapıların oluşmasını önlediği ve bu sayede ribozomun bağlanmasını kolaylaştırdığı önerilmektedir (Laursen ve ark., 2002). Bunun yanı sıra muhtemelen SD- dizisi ve AUG'nin dışındaki ribozom bağlanma alanında oluşturulan mutasyonlar ribozomal proteinler ve mRNA arasındaki etkileşimi değiştirmekte ve bu etkileşimler de başlama sıklığını belirlemektedir.

4.2.3 DR bölgesi Mutasyonları

E. coli'de etkili translasyon ile adenince zengin bölgelerin ilişkisine ilk kez Dreyfus (1988) tarafından dikkat çekilmiş, adeninlerin eklenmesinin translasyon üzerine uyarıcı etkisi bildirilmiştir (Martin-Farmer ve ark., 1999). Başlama kodonunun hemen aşağısındaki bölgede (DR) yer alan adeninler mRNA-ribozom ilişkisini etkileyerek gen ekspresyonunda rol oynayabilir. TIR içindeki ikincil yapı ekspresyonu inhibe edebilirken; daha az yapısal daha açık bir TIR ekspresyonda artış sağlayabilir (de Smit and van Duni, 1990). Başlama kodonundan sonraki birkaç kodonun adenin içeriği muhtemelen başlama kodonu ve mRNA'nın diğer özellikleriyle birlikte translasyonel makinanın bir bileşenine bir tanıma motifi (dizi ve/veya yapısal) olarak hizmet edebilmekte ve bu anlamda ribozomun bağlanma gücüne önemli oranda katkıda bulunabilmektedir.

Daha önce yapılmış çalışmalar göstermiştir ki; başlama kodonunun hemen 3′ tarafına yerleşmiş olan DR, translasyonun başlaması ve/veya uzamanın başlangıcında gen ekspresyonunu etkilemektedir (Faxén ve ark., 1991; O'Connor ve ark., 1999; Stenström ve ark., 2001b). Örneğin sadece DR'nin 5 kodonu içinde yapılan bir varyasyon, AUG'nin başlangıç kodonu olduğu ve genden önce zayıf bir SD dizisinin bulunduğu durumda bile gen ekspresyonunu en düşükten hemen hemen 50 kat daha yüksek bir üst limite ulaştırmaktadır. Eğer genden önce güçlü bir SD dizisi geliyorsa,

ekspresyondaki iyileşme daha da yüksek olmaktadır. Güçlü bir SD dizisi, zayıf bir SD ile kıyaslandığında, başlama kodonu ve DR dizisine bağlı olarak gen ekspresyonunu 2-50 kez artırabilmektedir (Stenström ve Isaksson, 2002).

Birçok bakteriyel ve faj mRNA'sında başlama kodonunun aşağısına yerleşmiş translasyonu artırıcı bir element olarak DR göz önünde tutulmaktadır. DR'nin anti-DR olarak adlandırılan 16S rRNA'nın 1469-1483 nükleotitlerine tamamlayıcı olduğu önerilse de (Etchegaray ve ark., 1999), bu bölgenin doğrudan baz eşleşmesi yaparak 16S rRNA'nın anti-DR'si ile etkileşim kurmadığı da bildirilmiştir (Sato ve ark., 2001). Ancak önemli bir soru, başlama kodonunun aşağısındaki dizilerin translasyonun başlamasını nasıl teşvik ettiğidir?

Bu konuyla ilgili ihtimallerden birisi 16S rRNA anti-DR bölgesinin 30S alt ünitesinin 50S alt ünitesiyle ilişkisi için önemli olduğudur (Mitchell ve ark., 1992). Diğer ihtimaller ise, başlama kodonunu çevreleyen mRNA'nın ikincil yapısı ve ribozomal protein S1 gibi mRNA'ya bağlanan proteinler hakkındadır. Başlama kodonunun aşağısındaki dizilerin S1 ile mRNA'nın etkileşimini hızlandırdığı ve dolayısıyla başlama kompleksinin oluşumu aracılığıyla translasyon etkinliğini artırdığı önerilmektedir. Sonuçta başlama kodonuna yakın bir bölgedeki ufak bir yapısal değişiklik bile mRNA ve ribozomu uygun bir etkileşime götürebilmektedir. Bununla birlikte genel olarak başlama kompleksini oluşturmada, SD dışında başka hangi dizi ya da yapıların ribozoma avantaj sağladığı kesin olarak bilinmemektedir.

Sırasıyla başlama kodonunun yukarısındaki ve aşağısındaki SD ve DR dizileri, translasyonun başlama etkinliği üzerine birlikte hareket edebileceği gibi, birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı yüksek bir gen ekspresyonu da verebilir. Ancak bu etkinin sadece ikincil yapı nedeniyle ortaya çıktığını söylemek güçtür. Ribozom bağlanma alanındaki birçok mutasyonun herhangi bir mRNA ikincil yapısı içeriğinde yer almaksızın translasyonu etkileyebileceği gösterilmiştir (McCarthy ve ark., 1986; Looman ve ark., 1987). Dolayısıyla başlamanın etkinliği için, ribozom bağlanma alanının birincil yapısı, mRNA ikincil yapısından daha önemli olabilmektedir (Dreyfus, 1988).

Tez çalışmasında *pac* geninin DR bölgesinde yer alan 2. kodon (Mut6) ve 4. kodon (Mut7) sinyal peptidin amino asit yükünü değiştirmeyecek şekilde mutasyona uğratılmıştır. *pac* geninde 2. kodon pozisyonunda *E. coli* için en çok tercih edildiği bildirilen (Looman ve ark., 1987) AAA lizin kodonu yer almaktadır. Mut6 mutasyonu ile bu kodonun yerine nadir bir arjinin kodonu AGA yerleştirilmiştir. Mut7 mutasyonuyla ise, DR bölgesinin 5 kodonu içinde yer alan ve arjinini kodlayan 4. kodon AGA, 2. kodonda yapılan mutasyonun tersine bu bölgenin adenin içeriğini zenginleştirecek şekilde AAA lizin kodonuyla değiştirilmiştir. Aynı zamanda her iki mutant yaban tipe görece genin ekspresyonunu olumlu etkilediği bilinen (İşsever Öztürk, 2002) A/T'ce zengin 6 nükleotitlik bir SD-ATG aralığı taşımaktadır (Çizelge 2.4).

Oluşturulan Mut6 ve Mut7 mutasyonları hem *pac* geni TIR bölgesinin nükleotit içeriğini değiştirmesi ve bu anlamda TIR'ın ribozomla ilişkisini ve dolayısıyla translasyonun başlamasını etkileyebilmesi açısından; hem de sinyal dizide yer alması nedeniyle, öncül PA'nın sekresyonu/katlanması gibi translasyon sonrası aktif PA oluşumunda rol oynayan adımları etkileyebilecek bir pozisyonda bulunması sebebiyle önemlidir.

Daha önce yapılan çalışmalarla +2 ve +3 kodonlarının uygun kombinasyonları seçilerek verilen hedef bir proteinin ekpresyon düzeyinin ayarlanabileceği bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2007). Hui ve ark (1984) tarafından başlama kodonunu takip eden üç bazın β-galaktozidaz mRNA'sının translasyonel etkinliğini 20-katın üzerinde etkileyebildiği gösterilmiştir. Başlangıçtaki kodonların bu etkisi Gonzalez de Valdivia ve Isaksson (2004, 2005) tarafından işaret edildiği gibi, peptidil-tRNA'nın translasyonu yapan ribozomlardan düşme sıklığıyla ilişkili olabilir. Translasyonel ribozom kompleksinin translasyonu yapılan bir mRNA'nın başlangıç kısmında daha az kararlı olduğu bilindiğinden (Chen ve Inouye, 1990), mRNA'nın kodlayıcı bölgesinin çok başlangıcında kodon-bağımlı peptidil-tRNA düşmesi geniş bir aralıkta farklı ekspresyon düzeylerine götürebilmektedir. Bununla birlikte, başlangıçtaki kodonların kendiliğinden DR'nin ekspresyon düzeyini belirlemediği, bunun yerine verilen bir kodonun etkisinin hedef genlerin dizisinin tamamında yer

alan diğer faktörlerle kombinasyon halinde ortaya çıktığı da bilinmektedir (Ahn ve ark., 2007).

SD dizisinin 16S rRNA üzerindeki anti-SD bölgesiyle etkileşerek, mRNA ve 30S alt ünite arasındaki ilk etkileşimi kurduğu, DR'deki bazı nükleotitlerin ise 16S rRNA üzerinde farklı bölgelerle baz çifti oluşturabildiği önerilmekte (Sergiev ve ark., 1997) olup; bu etkileşimler translasyon etkinliğinde rol oynabilmektedir. Ayrıca DR'nin bu etkisinin kodlanan amino asitlerden mi yoksa nükleotit dizisinden mi kaynaklandığını açıklamaya yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalarda aynı kodon ailesinden farklı kodonların gen ekspresyonunda büyük bir çeşitlilik ortaya çıkardığı bulunmuştur. Farklı izo-kodonlara dayalı, aynı proteini oluşturan DR'ler karşılaştırıldığında; gen ekspresyonunda 8-kata kadar farklılık görülebilmektedir. Bu izo-kodon etkisi güçlü bir şekilde gen ekspresyonu üzerine etkinin protein ürünü kodlayan amino asit dizisinden değil, mRNA'daki baz dizisinden kaynaklandığını önermektedir (Stenström ve Isaksson, 2002).

4.2.3.1 +2 Kodon Mutasyonu

+2 kodon başlama kodonunu takip eder ve 5-kodon uzunluğundaki DR dizisinin ilkini oluşturur. +2 kodon gen ekspresyonunu hemen hemen 20-kata kadar etkileyebilir (Stenström ve ark., 2001b). Bu pozisyonda lizin kodonu en yüksek ekspresyonu verirken (görece ekspresyon değeri 1.0), diğer +2 kodonlar örneğin AGU (0.5), AAU (0.7) ve ACC (0.3), AAA'dan daha düşük ekspresyon değerleriyle ilişkilendirilmiştir (Jin ve ark., 2006).

Tez çalışmasında oluşturulan Mut6 mutasyonu ile beklenen +2 pozisyonu için tercihli bir kodon olan lizin yerine arjinin getirildiğinde gen ekspresyonunda bir azalmanın görülmesidir. Fakat aksine PA'nın aktivitesinde S_{pac}'a görece 2-katlık, pac_{wt}'a görece ise 12-katlık bir artış belirlenmiştir (Şekil 3.26). Genelde yüksek sıklıkta kullanılan bir kodon ile yüksek translasyon etkinliği başarılır. Fakat ikinci kodon pozisyonundaki kodon eğiliminin diğer pozisyonlardaki kodon tercihlerinden farklı bir prosesle oluşturulduğu bilinmektedir (Kanaya ve ark., 1999). Bu yüzden

herhangi bir DR dizisi için en yüksek ekspresyonu vermede +2 kodon pozisyonunda AAA'nın olması gerekli değildir. +2 pozisyonundaki kodonun etkisinin, onu çevreleyen bölgenin nükleotit dizisine bağlı olduğu bildirilmiştir (Stenström ve ark., 2001). Bu anlamda her bir genom kendi ortamı, enerji kaynakları ve yaşam tarzına en uygun optimal düzeyde gen ekspresyonunu sağlayacak kodonları tercih etmektedir (Karlin ve ark., 2001).

Yapılan deneysel çalışmalarla kodon tercihinin istatistiksel önemi araştırılmıştır. Genellikle istatistiki olarak ikinci kodonda favori olan dizilerin *E. coli*'de translasyon etkinliği üzerine pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir (Sato ve ark., 2001). Birçok *E. coli* geninde yüksek sıklıkta tercih edilen bir ikinci kodon kullanılması aracılığıyla *lacZ* geninin ekspresyon düzeyi olumlu etkilenmiştir (Looman ve ark., 1987). Öyleyse neden ikinci kodon translasyon etkinliğini değiştirmektedir?

Translasyonda, başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere üç temel faz vardır. Eğer ikinci kodon başlama kodonundan ikinci kodona ya da ikinci kodondan üçüncü kodona uzama basamağını etkiliyorsa, bu pozisyonda optimal kodon kullanılmalıdır. Ancak ikinci pozisyondaki favori kodon daima optimal kodon değildir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla ikinci kodonun sadece translasyonun başlama basamağı için değil translasyon sonrası aktif protein oluşumuna giden yolda öncül proteinin sekresyonu ve katlanması için de önem taşıdığı belirlenmiştir (Zalucki ve ark., 2007; Zang ve ark., 2009). Bu nedenle *pac* geni +2 kodon pozisyonuna nadir bir kodon olan argininin yerleştirildiği Mut6 mutasyonu aktif ürün oluşumu için işlenme ve katlanma basamaklarına gereksinim duyan penisiliz asilaz açısından ayrı bir önem taşıyabilir.

Goldman ve ark. (1995) nadir kodonların eğer mRNA'ların 5′ ucuna yakın yerleştirilirse, *in vivo*'da translasyonel aktiviteyi azaltabileceğini fakat güçlü bir inhibe edici etki göstermeleri için, ardışık birçok nadir kodonun varlığının gerekli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte başlama kodonuna yakın bir kodondaki tek

bir nokta mutasyonunun bile translasyonel aktiviteyi değiştirebileceği bildirilmiştir (Stenström ve ark., 2001b). Mut6 mutasyonunu taşıyan *pac* geninde başlama kodonundan sonra gelen lizini kodlayan ikinci kodon AAA'nın arjinini kodlayan AGA'ya değiştirilmesiyle, gerçekte kodon içinde ikinci pozisyonda yer alan tek bir nükleotitte (A→G) değişiklik yapılmıştır. Ancak bu tek nükleotitlik değişim yaban tipe görece aktivitede 12-kat artış sağlamıştır (Şekil 3.26). Bu bulgu ikinci kodon içeriğinde yapılacak tek nükleotitlik bir değişikliğin bile gen ekspresyonunu ne derece güçlü etkileyebileceğini göstermesi açısından dikkat çekicidir.

Arjinin 6 kodon tarafından kodlanabilmektedir: CGU, CGC, CGA, CGG, AGA ve AGG. mRNA'daki arjinin minör kodonlarının sayısı ve pozisyonu, gen ekspresyonunu translasyonel aşamada düzenlemede, özellikle de üremenin geç fazında, önemli bir rol oynamaktadır. Bu anlamda minör kodonlar ile başlangıç kodonu arasındaki mesafe translasyonun başlama etkinliğinde çok önemlidir. Translasyon hızı minör kodonlarda yavaşlamakta ("AGA/AGG modulator hypothesis" ya da "minor codon modulator hypothesis") (Sorensen ve ark., 1989) ve ribozomun bu kodonları içeren bölgede daha yavaş hareket ettiği göz önünde tutulmaktadır (Chen and Inouye, 1990). Dolayısıyla minör kodon başlangıç kodonuna ne kadar yakınsa, ribozom da başlangıç kodununa o derece yakın bir bölgede duraksamakta ve bu durum hem translasyonun başlama hızını hem de kararlılığını etkilemektedir. Ayrıca sinyal dizilerdeki nadir kodonlardan oluşan bir kümenin translasyonu yeterli oranda ertelemesi aracılığıyla membranla etkileşimi kolaylaştırarak protein taşınmasının erken adımlarında bir rol oynayabileceği de bildirilmiştir (Burns ve ark., 1985).

2. kodon Lys (AAA)'nin Arg (AGA)'e değiştirilmesi (Mut6); *pac* geninde başlangıç kodonundan sonraki ilk 5 kodonda ardışık olmasa da (arada Asparajin amino asiti yer almaktadır) üç arjinin amino asitinin var olmasına neden olmaktadır. Arjinin minör kodonlarının başlama kodonuna yakın bir bölgede bu derece sıklıkta bulunması, daha önce yapılmış çalışmalar dikkate alındığında; translasyonun başlama hızını yavaşlatabilmektedir. Varenne ve ark. (1984) tarafından esas olarak bazı tRNA türlerinin kısıtlı oranda sağlanması nedeniyle mRNA boyunca translasyon

oranının değişebileceği ispatlanmıştır. Farklı tRNA türlerinin konsantrasyonlarının büyük oranda mRNA kümesi içindeki kodon kullanımına görece ve ilgili kodonların sıklığına oransal olduğu görülmektedir. Dolayısıyla duraklama mRNA boyunca nadir kullanılan kodonların pozisyonlarıyla ilişkili olmalıdır. 2000 prokaryotik mRNA boyunca yapılan nadir kodon dağılım analizi sonucunda, nadir kodonların translasyonel başlama alanları ve başlangıçtan itibaren yaklaşık 155 bp'lık bir bölge için güçlü bir tercihe sahip olduğu gösterilmiştir (Thanaraj ve Argos, 1996). Bu yerleşimin olası nedenlerinden biri Thanaraj ve Argos (1996) tarafından domain'ler ve ikincil yapılar için önerilen "rare-codon" hipotezi ile açıklanmıştır. Bu hipoteze göre nadir kodonların tekrarlanması translasyon oranını azaltmakta, translasyonda duraklama noktaları oluşturarak, protein domain'lerinin ve ikincil yapılarının doğal yapısal konformasyonuna katlanması için zaman kazandırmaktadır. Bu duraklamaların polipeptit zincirlerinin sentezleri süresince bazı bölgelerinin bağımsız olarak işlevsel açıdan yeterince katlanmasını sağlamak için evrimsel olarak ortaya çıkmış olabileceği de önerilmektedir (Purvis ve ark., 1987).

Yapısal biyologlar için bakterilerde fazla miktarda ekspresyonu yapılan proteinlerle çalışırken nadir kodonlar protein üretimini yavaşlatması ya da tamamen önlemesi nedeniyle sorun yaratabilmektedir. Fakat son zamanlarda yapılan bir çalışmayla bu yavaşlatıcı etkileri aracılığıyla nadir kodonların *in vivo*'da işlevsel bir avantaja sahip olabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009). Bu çalışmada translasyon sürecindeki duraklamaların önemli şaperonlar ya da kofaktörlerle karşılaşmada kompleks için vakit kazandırabileceği üzerinde durulmaktadır. Dolayısıyla bazı durumlarda nadir kodonlar katlanma sürecinin translasyon sürecini yakalamasına olanak sağlayabilmektedir (Marin, 2008). Yapılan çalışmalar nadir kodon kümelerinin protein ekspresyonu üzerindeki rolünün mRNA kararlılığı, katlanma, sekresyon ve partner proteinlerle etkileşim açısından ortaya çıkabileceğini önermektedir (Clarke ve ark., 2008).

Bu nedenle translasyona başlama bölgesinde ve özellikle başlama kodonuna çok yakın bir pozisyonda bir nadir kodonun tercih edilmesinin birden fazla açıklaması olabilir. Penisilin asilaz için aktif enzim oluşumunda translasyon sonrası

işlenme basamakları son derece önemli olduğundan; Mut6 mutasyonuyla +2 pozisyonunda böylesi bir nadir kodonun yer almasının, başlangıçta translasyon hızını yavaşlatarak preproPA birikimini azaltıp; daha fazla işlenmiş ve doğru konformasyonda katlanmış aktif enzim oluşumuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ancak enzimin üretimindeki bu iyileşmenin sadece +2 pozisyonunda nadir bir kodon kullanımına bağlı olmayıp, TIR bölgesinin değişen dizisinden ve/veya her iki faktöründen birlikteliğinden kaynaklanabilmesi de olasıdır. Nitekim *E. coli* dihidrofolat redüktaz geni (DHFR) ile yapılan deneysel çalışmalarla, başlama kodonundan sonraki bazda kodon ve baz eğilimleri göz önünde tutularak gerçekleştirilen mutasyonlarla *in vitro* ve *in vivo* translasyon sistemleri kullanılarak, bu pozisyonun translasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalar translasyon etkinliğindeki artışın tRNA ve amino asitin doğasından ziyade mRNA dizisinden kaynaklandığı göstermiştir (Sato ve ark., 2001). Bu açıdan değerlendirilecek olursa, +2 pozisyonunda oluşturulan mutasyonun (K2R, Mut6) PA üretimi üzerine olumlu etkisi, yapılan amino asit değişikliğinden çok sadece bu bölgenin kodon içeriğinin değişmesiyle de ilişkilendirilebilir.

4.2.3.2 +4 Kodon Mutasyonu

Tez çalışmasında oluşturulan Mut7 mutasyonuyla, A/T'ce zengin SD-AUG aralığına sahip ve ikinci kodondaki değişikliğin tersine DR bölgesinin +4 pozisyonundaki AGA arjinin kodonu yerine AAA lizin kodonunun getirildiği, A'ca daha zengin bir TIR bölgesine sahip bir *pac* geni oluşturulmuştur (Çizelge 2.4). Bu mutasyon ile hedeflenen genin translasyona başlama basamağının etkinleştirilmesidir. DR bölgesinin A'ca zenginleştirilmesinin gen ekspresyonu üzerine etkisi bölüm 4.2.3'de ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Dolayısıyla Mut7 mutantının yaban tipe görece 8-kat fazla aktivite vermesinin nedenlerinden biri, A'ca zengin DR nedeniyle genin translasyona başlama basamağının iyileştirilmesi olabilir. Ayrıca +4 kodonunda yapılan mutasyon Tat yolağının bir substratı olduğu önerilen PA'nın sinyal peptitindeki korunmuş tek arjinin rezidüsünü lizine değiştirmesi ve dolayısıyla öncül enzimin taşınmasını etkileyebilmesi açısında da ayrı bir öneme

sahiptir. Bu mutasyonun enzimin sekresyonu üzerine etkisi ise bölüm 4.3'te ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

4.2.4 Sıcaklığın Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Tez çalışmasında yaban ve mutantları (Mut4, Mut5, Mut6, Mut7) taşıyan soylar 26 ve 37 ºC olmak üzere iki farklı sıcaklıkta büyütülmüştür. 37 ºC'ta büyütülen kültürlerde aktif PA oluşmazken; örneklerin Western blot çalışmasında sadece öncül enzime ait bant görülmüş; işlenmiş enzimin β-bandı gözlenmemiştir (Şekil 3.31). Bu sonuç *E. coli* ATCC 11105'e ait penisilin asilaz sentezinin optimal olarak sadece 30 ºC'ın altındaki sıcaklıklarda gerçekleşip; 37 ºC ya da onun üzerinde aktif enzim oluşmadığıyla ilgili daha önce bildirilen deney sonuçlarıyla uyumludur (Sizmann ve ark., 1990). Yapılan çalışmalarda 40 ºC'ta inkübasyonun işlenemeyen bir öncüle götüren tipik olmayan bir konformasyona yol açtığı bildirilmiştir. *pac* geninin yüksek sıcaklıkta etkin bir şekilde transkribe edildiği ancak mRNA'nın translasyonunun bloke edildiği üzerinde durulmaktadır. Buna göre 40 ºC'ta büyüyen hücrelerde yüksek miktarda *pac* mRNA'sı üretilmekte ancak translasyon aşaması sıcaklığa duyarlı gözükmektedir (Keilmann ve ark., 1993).

Ayrıca Keilmann ve ark (1993) tarafından sinyal peptit taşımayan klonlarda genin 40 °C'ta etkili bir translasyonunun olabilmesi nedeniyle, yüksek sıcaklığın inhibe edici etkisinin sadece gen ürünü taşınmak zorunda olduğunda ortaya çıktığı da bildirilmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar *pac* mRNA'sının translasyona başlaması ve translokasyonu arasında sıkı bir ilişkinin bulunduğuna işaret etmektedir.

E. coli ATCC 11105'te translasyon ürününden aktif PA oluşumu: hücre içi proteoliziz ve inklüzyon cisimciği oluşumu, membrana taşınma, ppPA'nın olgunlaşması ve periplazmada PA'nın proteolizizi gibi birtakım translasyon sonrası süreçler tarafından kontrol edilir. Daha önce yapılan çalışmalarda sentezlenen pre-pro-enzimin %80'den fazlasının sitoplazmada meydana gelen hücre içi proteoliziz tarafından kaybolabildiği gösterilmiştir (Ignatova ve ark., 2000). PA'nın degradasyonunun araştırılmasında değişik sıcaklıklar (24, 26, 28, 30, 32, 34, 37 ºC)

test edilmiş, 32 ºC'a kadar olan sıcaklıklarda ppPA'nın hücre içi proteoliziz ya da membrandan taşınma ve aktif PA oluşumuna giden otoproteolitik işlenme süreçleri arasındaki yarışa tabi olduğu bulunmuştur. 32 ºC'ın üzerindeki sıcaklıklarda ise yeni sentezlenen ppPA'nın tamamı proteolitik olarak degrade olmuş ve aktif PA saptanamamıştır. Bu durumda hücre içi proteolizizin aktif PA ürününü sınırladığından söz edilmektedir. Bu bulgular PA üretiminin sıcaklık-bağımlı kontrolüne ilave bir açıklama getirmekte ve translasyonun sıcaklık duyarlılığı (Keilmann ve ark., 1993) ile birlikte aktif PA ürününün sıcaklıkla kontrolü için translasyon sonrası düzeyde taşınma ve/veya işlenmenin de aktif rol oynayacağı yeni bir açıklama sunmaktadır (Ignatova ve ark., 2000).

Her ne kadar Keilmann ve ark. (1993) SD-AUG arasındaki mesafenin 5 nükleotitten 6 ya da 8'e artırılmasının *pac* mRNA'sının translasyonu üzerine 40 ºC'taki blokasyonu hafiflettiğini ve özellikle aradaki uzaklığın 8 nükleotite uzatılmasının ürün oluşumunda artışa yol açtığını önerse de; bu çalışmada SD-AUG aralığının 6-8 nükleotite çıkarıldığı mutantların hiç birinde (Mut4, Mut5, Mut6, Mut7), 37 ºC'ta aktif enzim üretimi gibi benzer bir iyileşme gözlenmemiştir. Ayrıca aynı çalışmada *pac*'ın taşıdığı birbiriyle örtüşen olası iki SD dizisine sahip motifin *pac* mRNA'sının sıcaklığa hassas translasyonu için önem taşıyabileceği üzerinde durulmakla birlikte, 4.2.1 kısmında ayrıntılı olarak tartışıldığı üzere yalnızca SD2'nin varlığı, Mut4 mutantının 37 °C'taki sıcaklığa hassas ekspresyonunu değiştirmemiştir.

4.3 Sinyal Peptit Mutasyonlarının öncül enzimin sekresyonu üzerine etkisi

Tez çalışmasında pUC varyantları arasından SD-ATG aralığının yanı sıra sinyal dizisinde mutasyon taşıyan Mut6 ve Mut7'ye ait klonlar, oluşturulan mutasyonların PA'nın sekresyonu üzerine etkisini irdelemek amacıyla *E. coli* Tat^- JARV15, B1LKO, DADE ve onların yaban tipi soyu MC4100 ile bir diğer yaban soy *E. coli* JM109'a aktarılmıştır. Ancak pUC19 klonlarının bu soylarda kararsızlık

göstermesi nedeniyle, yaban tipi ve mutajenik *pac* genleri düşük kopya sayılı pMMB208 vektörü üzerine yeniden klonlanmıştır.

Klonlama sonrasında yapılan ekspresyon çalışmalarında pMMB klonlarıyla pUC klonlarına görece aktivitede ~3-4 katlık bir artış elde edilmiştir (Şekil 3.26 ve 3.27). pUC ve pMMB varyantlarının PA aktiviteleri arasındaki bu farklılık, üremeden kaynaklanmamaktadır. Çünkü *pac* geninin ekspresyonunun üreme ile ilişkili olmadığı bilinmekte olup, PA yavaş üreme safhası süresince bile sentezlenebilmektedir (Chou ve ark., 1999). Diğer yandan iki vektörün kopya sayıları birbirinden farklıdır ve pMMB208 *lac* promotoruna görece daha etkin olduğu bilinen *tac* promotorunu (de Boer ve ark., 1983) taşımaktadır. Öncül penisilin asilazın sentezlendikten sonra aktif enzim oluşumuna giden yolda translasyon sonrası karmaşık (taşınma, işlenme, katlanma gibi) süreçler geçirmesi nedeniyle; PA üretiminde uygun bir konakçı/vektör sisteminin kullanılması çok önemlidir.

Rekombinant protein üretimini iyileştirmek için güçlü ve sıkı kontrol edilen promotorların (ör, *tac* ve *rhaBAD*) kullanılması uygulanan stratejiler arasındadır. Bununla birlikte bu yöntem sıklıkla dengesiz bir protein akışına ve çözünemeyen inklüzyon cisimciklerinde ürünün agregasyonuna yol açabilmektedir. PA gibi periplazmik proteinler için, çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri sitoplazma ve periplazma içine yerleşmiş protein öncüllerden oluşur (Chou ve ark., 2000; Lin ve ark., 2001). Proteinin fazla miktarda ekspresyonu için düşük-kopya sayılı plazmitlerin kullanılmasıyla sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşması probleminin üstesinden gelinebilir. Periplazmik inklüzyon cisimciklerinin miktarını azaltmanın bir diğer yolu ise periplazmik proteazlarla birlikte ekspresyondur (Lin ve ark., 2001).

Dolayısıyla düşük kopya-sayılı pMMB varyantlarında inklüzyon cisimciklerinin azalması, PA sentezinde iyileşme sağlayabilir. Bununla birlikte *pac* mutantlarının PA aktivitesindeki yaban tipe görece artış, pMMB klonlarında gözlenmemiştir (Şekil 3.27). Bu sonucun kesin olmamakla birlikte pMMB208 vektörü üzerindeki daha etkin olan *tac* promotorundan kaynaklanabileceği

düşünülmektedir. Bu promotor ile yüksek düzeyde ekspresyon elde edildiğinden, *pac* geninin translasyona başlama bölgesinde yapılan mutasyonların, ekspresyon üzerine iyileştirici etkileri ancak daha zayıf *lac* promotoruna sahip pUC plazmitleriyle görülebilmektedir.

Ayrıca literatürde *pac* geninin farklı vektörler üzerindeki ekspresyonu sonucunda elde edilen farklı aktivite değerlerinin proteolitik degredasyon farkından kaynaklanabileceği üzerinde de durulmaktadır. Ancak bu çalışmada oluşturulan pUC ve pMMB-temelli klonların SDS-PAGE profillerinde, bu anlamda dikkat çekici bir farklılık görülmemiştir (Şekil 3.30 ve 3.32).

pMMB varyantlarıyla elde edilen bir diğer sonuç ise, pUC klonlarında gözlenmeyen hücre dışı PA aktivitesinin varlığıdır. Şekil 3.28'de gösterildiği gibi pMMB klonlarının tamamının konakçı olarak *E. coli* JM109, MC4100 ve Tat^- soyların (JARV15, B1LKO, DADE) kullanıldığı tüm durumlarda hücre dışı PA aktivitesi vermesi, bu aktivitenin soy bağımlı olmadığını düşündürmektedir. Literatürde Tat soylarının bozuk bir hücre kılıfı taşıdıkları için, hücre duvarı açısından uygulanan muamelelere daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Ize ve ark., 2003). Ancak besiyeri üst sıvısından aktivitenin pMMB klonlarını taşıyan yaban tip *E. coli* JM109 ve MC4100 soylarında da görülmesi, hücre dışı aktivitenin bu vektörle elde edilen fazla miktarda PA üretiminden kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Simmons ve Yansura (1996) tarafından yapılan çalışmayla promotor gücünden kaynaklı benzer bir sonucun ortaya çıkabileceği vurgulamıştır. *E. coli* alkalen fosfataz'ının sekresyonunda TIR'ın gücünün etkisi farklı plazmit serileri kullanılarak analiz edilmiş, ölçümler bazal düzeyde transkripsiyon koşulları altında yapıldığında; bu proteinin sekresyonu için translasyonun başlaması sınırlayıcı bir faktör olarak belirlenirken; promotorun tamamen uyarıldığı durumda, translasyonun başlaması sekresyon için sınırlayıcı bir faktör olmaktan çıkmıştır. *tac* gibi güçlü bir promotora sahip pMMB klonlarını taşıyan *E. coli* yaban tipi soylar MC4100 ve JM109'un hücre dışı PA aktiviteleri arasında önemli bir fark olmaması, benzer nedenle promotor kaynaklı olabilir.

Tez çalışmasında *pac* genine ait pUC19- ve pMMB-temelli klonları taşıyan rekombinant JM109 soylarının PA üretimleri ve sekresyonları arasında görülen bu farklılıklar, aynı zamanda rekombinant protein sentezi için kullanılacak vektörün promotor gücünün, ideal translasyon düzeyinin ayarlanması ve sonraki sekresyon basamağı için ne derece önemli olduğuna bir örnek teşkil etmektedir.

Yapılan çalışmalar genin fazla miktarda ekspresyonu sonucunda oluşan ürünün hücre dışına sızabileceğini göstermiştir (Mergulhão ve ark., 2005). Bu anlamda *E. coli*'de rekombinant proteinleri fazla miktarda üretmenin bir diğer yolu da onların hücre dışına salınmasıdır. Bu uygulama özellikle periplazmik proteinler için geçerli olup, birçok avantaj sağlamaktadır. Örneğin, hücre dışına salınan rekombinant proteinler bu sayede daha az hücre içi proteolizize uğrayabilmekte, seçici bir protein sekresyonunun daha sonraki protein saflaştırma basamaklarını kolaylaştırdığı da bilinmektedir (Lin et al., 2001). İlave olarak bölgesel protein konsantrasyonunun azaltılmasıyla inklüzyon cisimcikleri gibi çözünmeyen protein agregatlarının oluşumundan kaçınılabilmektedir. Bu yüzden oluşturulan pMMB klonlarıyla hücre dışı PA aktivitesinin elde edilmesi, periplazmik bir protein olan penisilin asilaz için ayrıca önem taşımaktadır. Bununla birlikte besiyeri üst sıvısından hem PDAB yöntemi hem de *S. marcescens* kullanılarak petri düzeyinde elde edilen hücre dışı PA aktivitesinin, hücre dışına sızıntı ve/veya diğer sekresyon yolakları kaynaklı olup olmadığının anlaşılmasına yönelik detaylı sekresyon çalışmalarının yapılmasına gereksinim vardır.

Daha önce *E. coli*'de PA'nın hücre dışı besiyeri ortamına salınması için farklı yöntemler uygulanmıştır. Bunlardan biri *E. coli*'de *pac* geninin *kil* geni (öldürücü protein) ile birlikte *tac* promotoru altında ekspresyonuyla, PA'nın besiyeri ortamına salınmasıdır (Ignatova ve ark., 2003). Diğer bir yöntemde ise *E. coli*'de BRP (bakteriosin salan protein) kullanılarak fazla miktarda üretilen penisilin asilazın hücre dışına salınması denenmiştir. *brp* geninin ekspresyonundan sonra *E. coli* hücre duvarı geçirgen olmaya başlamakta ve periplazmik proteinler bu sayede besiyeri ortamına serbest kalabilmektedir (van der Wal ve ark., 1995). Bu yöntemlerin dışında 1.4.1.4 kısmında belirtildiği gibi hücrenin dış membran geçirgenliğini

artırmaya yönelik uygulanan diğer yöntemler de mevcuttur. pMMB klonlarıyla tüm bu yöntemlere gereksinim duyulmaksızın hücre dışı PA aktivitesinin elde edilmesi dikkat çekicidir.

Bir membrana karşı proteinlerin taşınmasında sinyal peptit, izlenecek translokasyon yolağında belirleyici olması açısından önem taşımaktadır. *E. coli*'de genel sekresyon yolağı olarak genellikle Sec ya da Tat sistemi kullanılmaktadır. Tat yolağının Sec'den en büyük farkı korunmuş S**RR**XFLK motifi içine gömülmüş ardışık iki arjinin rezidüsü gereksinmesidir (Berks, 1996). Literatürde öncül PA'nın sekresyon yolağının belirlenmesine yönelik çok fazla çalışma bulunmamaktadır. ppPA'nın membrandan taşınmasının hangi mekanizma aracılığıyla olduğunu belirlemek amacıyla, Ignatova ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada *E. coli* ATCC 11105 kromozomal DNA'sı kullanılarak, başlangıç kodonunun yukarısındaki RBS dizisiyle birlikte çoğaltılan *pac* geni düşük kopya sayılı pMMB207 vektörünün (Morales ve ark., 1991) çoklu klonlama bölgesine klonlanmıştır. Oluşturulan klonda *pac* geni ekspresyonu Tat sistemi bileşenlerinden TatA ve TatE'nin olmadığı *E. coli* JARV15 ve yaban tipi MC4100 soylarında (Sargent ve ark., 1998) izlenmiş, mutasyon çalışmalarıyla da ppPA sinyal peptidindeki Tat sistemi için en uygun tanıma sinyalleri aranmıştır. Yapılan translokasyon deneyleri sonucunda ppPA'nın membrandan taşınmasının kaçınılmaz bir şekilde Tat-bağımlı olduğu bildirilmiştir (Ignatova ve ark., 2002).

Aslında PA sinyal peptidinin Tat motifi (RNRMIVN), korunmuş *E. coli* Tat motifinden S/TRRxFLK (Berks, 1996) oldukça farklıdır. Doğal Tat substratlarından sadece birkaçında iki arjinin rezidüsünden birinin eksik olduğu bulunmuştur. Örneğin ardışık arjinin rezidülerinden birinin yerinde lizinin yer aldığı bir Tat substratı olarak *Salmonella enterica* tetratiyonat redüktaz'ın TtrB alt ünitesi tarif edilmiştir. Bununla birlikte TtrB'de Tat motifi içindeki tek bir Arg rezidüsünün translokasyon için önemli olduğu gösterilmiş olup; bu rezidünün lizinle yerdeğiştirmesi taşınmayı önlemiştir (Hinsley ve ark., 2001). Dolayısıyla her ne kadar istisnai durumlar bulunsa da, genel olarak Tat translokasyon yolağını kullanan

sinyal peptitlerde korunmuş bir Tat motifinin olması, bu yolak aracılığıyla taşınma için bir gereklilik olarak görülmektedir.

Bu nedenle tez çalışmasında beklenen +4 pozisyonundaki Arg kodonunun Lys'e mutasyonu (R4K) ile PA'nın MKN**R**NR-dizisindeki Tat motifine ait korunmuş tek Arg rezidüsünün Lys ile yerdeğiştirmesi sonucunda preproPA'nın taşınmasının etkilenmesidir. Ancak şaşırtıcı bir şekilde öncülün periplazmaya taşınması, PA'nın Tat yolağının bir substratı olduğunu öngören çalışmanın (Ignatova ve ark., 2002) aksine; pMMB varyantlarını taşıyan ve Tat sisteminin bazı bileşenlerinden [ΔTatC (B1LKO), ΔTatAE (JARV15)] ya da tüm bileşenlerinden [ΔTatABCDE (DADE)] yoksun soylarda, yaban tipi soylara (*E. coli* JM109 ve MC4100) görece önemli oranda etkilenmemiştir . Her iki sinyal peptit mutantına ait (Mut6 ve Mut7) total ve besiyeri üst sıvısından alınan örneklerin aktif PA üretiminde yaban tipe (pac_{wt}) görece ciddi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.27 ve 3.28). Benzer sonuç pac_{wt}, Mut6 ve Mut7 mutantlarına ait Western blot profillerinde de izlenmiş olup, öncül birikimi ve aktif ürün oluşumu açısından pac_{wt} ve mutantlar arasında belirgin bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 3.32). Şayet Tat mutantları sentezi değil, işlenmeyi etkiliyor olsaydı, pac_{wt} ve mutantların öncül profilleri arasında bir farklılığın olmaması doğal karşılanabilirdi. Fakat yine de enzimin sadece Tat-bağımlı taşınması durumunda, işlenmiş ve olgun PA'ya ait β-bandının profilinde önemli bir değişikliğin olması beklenirdi. Bu bulgular PA'nın taşınmasının sadece Tat-bağımlı olmadığını göstermiştir.

Gerçekte Ignatova ve ark. (2002) yaptığı çalışmada sinyal peptidin MKNRN**R**-dizisindeki ikinci arjinin yerine lizin konulduğunda (R6K), taşınmanın etkilenmediğini bildirmiştir. Buna karşın; Tat-bağımlı bir taşınma gösteren *Zymomonas mobilis* GFOR (glukoz:fruktoz oksidoredüktaz)'deki benzer bir mutasyon, taşınmanın inhibisyonuyla sonuçlanmıştır (Weigert ve ark., 1997). Dolayısıyla önceki ve bu çalışmanın sonuçları dikkate alındığında; preproPA'nın Tat yolağı aracılığıyla taşınması, MKN**R**N**R** dizisinde ardışık olmayıp Arg-Asp-Arg motifi içinde yer alan iki Arg rezidüsünün değiştirilmesinden de etkilenmemiştir. Bu nedenle PA'nın taşınmasının tamamen Tat yolağına bağlı olmayıp, öncül enzimin

taşınmasında esas olarak *E. coli*'deki en genel taşıma sistemi olan Sec yolağının kullanması olasıdır (Natale et al. 2008). İlginç bir şekilde *E. coli* PA'sının *Pseudomonas aeruginosa*'da Tat yolağından bağımsız olarak taşınması da (Krzeslak ve ark., 2009), PA'nın Sec-bağımlı bir protein olabileceği yönündeki öngörüyü desteklemektedir.

Ignatova ve ark. (2003), preproPA'nın taşınmasının Tat-aracılığıyla olduğunu düşündüğü için ve Tat yolağı Sec sisteme görece daha yavaş bir taşıma gerçekleştirdiğinden (Berks ve ark., 2000; Clark ve ark., 1997) taşımayı hızlandırmak ve sitoplazmadaki öncül PA miktarını azaltmak amacıyla pre-pro-PA'nın orjinal sinyal dizisini Sec yolağının bir substratı olduğu bilinen OmpT sinyal peptit dizisiyle değiştirmiştir. Ancak bu değişikliğin etkisi farklı *E. coli* konakçılarında değişkenlik gösterdiğinden çalışmadan tutarlı bir sonuç elde edilememiştir. Dolayısıyla OmpT-PA füzyon deneyleri, hücre dışı protein üretimini artırmak için orjinal sinyal dizide yapılacak tek mutasyonları kullanmak yerine; sinyal peptidin tümüyle değiştirilmesinin uygun bir yöntem olmadığını da (Dupuis ve ark., 1997) doğrulamıştır.

Diğer yandan OmpT*pac* geni ile eş zamanlı olarak hücrenin Sec taşıma sisteminin bazı proteinleri birlikte ekspres edildiğinde; SecB ve SecF'nin fazla miktarda üretimi penisilin asilazın periplazmik aktivitesinde sırasıyla 3-kat ve 2-kat artışa götürmüştür (Ignatova ve ark., 2003). Daha önce Chou ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada Sec sistemi bileşenlerinden SecB'nin fazla miktarda üretiminin çözünürlüğü artırdığı ve enzim aktivitesinde artış olmamasına karşın; daha yüksek miktarda penisilin asilaz oluşturduğu bildirilmiştir. Buna göre aktif PA oluşumunda SecB şaperonunun işlevinin gerekli olduğu önerilmiştir (Chou ve ark., 1999). Sec bileşenlerinin fazla miktarda üretiminin PA aktivitesinde yarattığı bu artışda, PA'nın taşınmasında Sec sisteminin önemine işaret etmektedir. Bu nedenle öncül PA'nın hangi mekanizma ve/veya mekanizmalar aracılığıyla membrandan taşındığının tam olarak belirlenmesine yönelik daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Giriş kısmında belirtilen 2. kodonun enzimin sekresyonu üzerine etkisini irdeleyen son zamanlardaki çalışmalar göz önüne alınarak, tez çalışmasında *pac* geninin 2. kodonunda yapılan amino asit değişikliğinin preproPA'nın sekresyonu üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. Literatürde Sec sistemi tarafından taşınan proteinlere ait sinyal peptitlerde ikinci kodon pozisyonu için, kodlanan amino asitin pozitif yükünden bağımsız olarak, yüksek oranda translasyonu başlatan kodonlara ve özellikle AAA'ya güçlü bir eğilimin bulunduğu bildirilmiştir (Zalucki ve ark., 2007). Bu çalışmada Mut6 için elde edilen deneysel sonuçlar ikinci kodon pozisyonuna AGA'nın getirilmesinin gen ekspresyonunu olumlu etkilediğini ancak enzimin sekresyonunda yaban tipe görece bir fark yaratmadığını göstermekte olup; Sec yolağını kullanan diğer proteinler için belirtilen +2 pozisyonundaki tercihli AAA kullanımı PA için gözlenmemiştir. Bununla birlikte optimal olmayan kodonların *E. coli* genomunda en yüksek sıklıkla salgılanan proteinlerin sinyal dizisinde bulunduğu bilinmektedir (Power ve ark., 2004). Aynı bulguların Gram-pozitif bakteri *Streptomyces coelicolor* (Li ve ark., 2006) için de bulunması, translasyonel duraklamanın proteinlerin taşınmasının erken evresinde bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Maltoz bağlayıcı protein (MBP) (Zalucki ve ark., 2007) ve β-laktamazın (Zalucki ve ark., 2008) sinyal dizilerindeki kodon kullanımını optimize eden son zamanlardaki iki çalışma, bakterilerde sekresyon için kullanılan model sistemlerdir. Bu iki proteinin sinyal dizisindeki optimizasyonların daha düşük protein üretimiyle sonuçlanması; sinyal peptitteki optimal olmayan kodonların taşınma süresince salgılanan öncül proteinin doğru katlanmasını sağlayabilmek için seçildiğine işaret etmiştir. Bu çalışmalardan Sec-bağımlı proteinler için genel bir özelliğin, sitoplazmada öncül proteinin katlanmasının yavaşlatılması ve onun taşınmaya yeterli bir durumda korunması olduğu sonucuna varılmıştır (Zalucki ve ark., 2007). Dolayısıyla Sec yolağını kullanması olası penisilin asilaz için ikinci kodon pozisyonunda translasyonu yavaşlatabilecek optimal-olmayan bir kodonun tercih edilmesi bu anlamda şaşırtıcı olmamaktadır.

Translasyonel duraklama için iki rol önerilmiştir: İlki, translasyon süresince özgül polipeptit domainlerin katlanmasını kolaylaştırmak (Purvis ve ark., 1987; Thanaraj ve Argos, 1996), ikincisi ise prokaryotlarda membrana yerleşmeden önce

ya da membrana karşı taşınmadan evvel hücre membranıyla ilk sentezlenen sinyal peptidin etkileşimine izin vermesi aracılığıyla salgılanan proteinlerin yönelimini, kolaylaştırmaktadır. Her iki durumda da optimal-olmayan kodonların varlığı translasyonel duraklamayı etkilemekte ve salgılanan proteinin katlanmasını kolaylaştıran translasyonel bir duraklama yeri olarak protein taşınmasında yeni bir rol oynamaktadır (Zalucki ve ark., 2007). Bu kodonların proteinlerde özellikle sinyal peptidi kodlayan mRNA'nın 5′ ucunda yüksek miktarda bulunduğu bilinmektedir (Power ve ark., 2004). Bu durum için farklı nedenler önerilmiştir: Optimal olmayan kodonların genin başlangıcında artan kullanımı amino asit açlığı çeken hücrelerde başlama kompleksi oluşum oranını azaltabilmekte ve gen ekspresyonunu indirgeyebilmektedir (Chen ve ark., 1990). Alternatif bir açıklama ise artan düzeylerde optimal-olmayan kodon kullanımının muhtemelen başlama kodonunun aşağısındaki ikincil ribozom bağlanma alanlarının varlığıyla ya da ikincil yapının azaltılmasıyla ilişkili olması ve her iki durumda da translasyonun başlamasını etkileyebilmesi (Eyre-Walker ve ark., 1993) ya da ribozom trafiğini değiştirebilmesidir (Deana ve ark., 1996). Üçüncü bir açıklama ise optimal-olmayan kodonların mRNA'nın 5′ ucunda bulunmasının, translasyonel duraklama nedeniyle burada biriken ribozomlar tarafından mRNA'nın 5′ ucunun ribonükleotik degradasyondan korunmasını sağlayabileceğidir. Dolayısıyla özellikle genlerin 5′ ucunda optimal-olmayan kodon tercihinin nedenleriyle ilişkili değişik açıklamalar mevcuttur. Penisilin asilaz için +2 pozisyonunda optimal olmayan bir kodon (Arg) kullanımıyla elde edilen aktivitedeki bu artış, TIR'ın kendi özelliğinden kaynaklanabileceği gibi, yukarıda sözü edilen çalışmalar dikkate alındığında kesin olmamakla birlikte genin 5′ ucundaki artan optimal olmayan kodon kullanımının sağladığı avantajlar nedeniyle olabilir. Bu anlamda özellikle penisilin asilaz benzeri olgun formuna ulaşmak için translasyon sonrası taşınma ve katlanma gibi basamaklar geçiren proteinlerin sentezinin düzenlenmesi için optimal olmayan kodon kullanımının tercih edilmesi yeni ve önemli bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

SONUÇLAR:

Yaban tipi *pac* geninin TIR dizisinde yapılan çeşitli değişiklikler sonucunda oluşturulan rekombinant *pac* genlerinin ekspresyonlarından elde edilen bulgular aşağıda verildiği gibidir:

- Bu çalışmada pUC19 ve $pUC19_{lac^-}$ vektörleri üzerindeki yaban ve mutant *pac* genleri ekspresyonunun *lac* promotorunun kontrolü altında olduğu gözlenmiştir.
- Aktif PA oluşumunda, *pac* geninin klonlanan fragmanının büyüklüğünün önemi oluşturulan *pac*2.6-kb ve *pac*3.5-kb fragmanlarını taşıyan klonlarla bir kez daha doğrulanmıştır.
- Yaban tipi *pac* geni SD dizisine görece daha kısa bir SD motifinin yer aldığı mutantta (Mut4) gen ekspresyonunun iyileşmesi, yaban tipi *pac* geninin doğasında bulunan birbiriyle örtüşen yapıdaki iki SD dizisinin varlığının beklendiği gibi ekspresyon üzerine olumsuz bir etki yaratabileceğine işaret etmiştir.
- Yaban tipi *pac* mRNA'sının 4 nükleotitlik SD-AUG aralığının A/T'ce zenginleştirilerek 8 nükleotite artırılması (Mut5), gen ekspresyonunu iyileştirerek aktif PA üretiminde artış sağlamıştır.
- SD ve SD-AUG aralığında yapılan mutasyonlar 30 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda aktif PA ürünü oluşmasındaki translasyon ve translasyon sonrası basamaklarda yer aldığı düşünülen sınırlamaları ortadan kaldırmamıştır.
- *pac* geni DR bölgesinin içeriğinin A'ca zenginleştirilmesi (Mut7) gen ekspresyonunu olumlu etkilemiş, +2 kodon pozisyonunda nadir bir kodonun yer alması (Mut6) ekspresyonda dikkat çekici bir artış sağlarken; genel olarak TIR'da yapılan mutasyonlar enzimin sekresyonunda belirgin bir fark yaratmamıştır.
- *pac* geni TIR bölgesinin nükleotit dizisinde yapılan tüm değişikliklerin genin ekspresyonunu olumlu etkilemesiyle mRNA translasyona başlama bölgesinin gen ekspresyonu üzerine güçlü etkisi, aktif ürün oluşumunda translasyonun yanı sıra translasyon sonrası taşınma, işlenme ve katlanma gibi süreçlerin rol

oynadığı bir enzim olarak, penisilin asilaz modelinde doğrulanmıştır. Endüstriyel açıdan önemli bir enzim olan penisilin asilazda yapılan bu değişikliklerin aktif ürün oluşumundaki iyileştirici etkisi, benzer olgunlaşma basamaklarına sahip diğer enzimlerin üretimlerini iyileştirmek için de kullanılabilir.

- Diğer yandan bu çalışmada *pac* geni sinyal dizisinde yer alan ve daha önce Tat sekresyon yolağının korunmuş tek arjinin rezidüsü olduğu öngörülen arjinin amino asidinin lizine değiştirilmesi, öncül enzimin translokasyonunda belirgin bir değişiklik yaratmamış; PA'nın sekresyonunun sadece Tat-bağımlı bir yolak ile gerçekleşmediği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Ahn, J.H., Hwang, M.Y., Lee, K.H., Choi, C.Y., Kim, D.M. (2007) Use of signal sequences as an *in situ* removable sequence element to stimulate protein synthesis in cell-free extracts. Nucleic Acids Res, 35, 4, e21.

2. Alkema, W.B., de Vries, E., Floris, R and Janssen, D.B. (2003) Kinetics of enzyme acylation and deacylation in the penicillin acylase-catalyzed synthesis of beta-lactam antibiotics. Eur. J.Biochem, 270, 3675-3683.

3. Alkema, W.B., Dijkhuis, A.J., de Vries, E and Janssen, D.B. (2002) The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. Eur. J. Biochem, 269, 2093-2100.

4. Alkema, W.B., Hensgens, C.M., Kroezinga, E.H., de Vries, E., Floris, R., van der Laan, J.M., Dijkstra, B.W and Janssen, D.B. (2000) Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. Protein Eng, 13, 857-863.

5. Anon (1992) Technomarket Survey Report on Enzymes (Genetically Engineered and Immobilized), New Delhi: TIFAC, DST, 125-47.

6. Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., Lilly, M.D. (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 276, 250-256.

7. Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 10, 411-21.

8. Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R and Stunnenberg, H.G (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 22, 541-542.

9. Barrett, C.M., Mangels, D., Robinson, C. (2005) Mutations in subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or Tat complex structure. J. Mol. Biol, 347, 453-463.

10. Barrett, C.M, Ray, N., Thomas J.D., Robinson, C., Bolhuis, A. (2003) Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 304, 279-84.

11. Beck, K., Wu, L.F., Brunner, J., Muller, M. (2000) Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. EMBO J, 19, 134-43.

12. Berezovsky, I. N., Kilosanidze, G.T., Tumanyan, V.G., Kisselev, L.L. (1999) Amino acid composition of protein termini are biased in different manners. Protein Eng, 12, 23-30.

13. Berks, B. C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? Mol. Microbiol. 22, 393-404.

14. Bessonneau, P., Besson, V., Collinson, I and Duong, F. (2002) The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. EMBO J, 21, 995-1003.

15. Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M.,Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 277, 1453-1474.

16. Blaudeck, N., Sprenger, G.A., Freudl, R., Wiegert, T. (2001) Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation. J Bacteriol, 183, 604-10.

17. Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R and Sprenger, G.A. (2003). Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. J Bacteriol, 185**,** 2811-2819.

18. Bock, A., R. Wirth., G. Schmid., G. Schumacher., G. Lang and P. Bockel (1983). The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. FEMS Microbiol. Lett, 20, 141-144.

19. Boelens, R and Gualerzi, C.O. (2002) Structure and function of bacterial initiation factors. Curr. Protein Pept. Sci, 3, 107-119.

20. Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M and Robinson, C. (2001). TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. J Biol Chem 276, 20213-20219.

21. Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L and Tzareva, N.V. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. Nucleic Acids Res, 19, 155-162.

22. Botstein, D and Shortle, D. (1985). Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis. Science, 229, 1193-1201.

23. Botterman, J., Hofte, H and Zabeau, M. (1987) High-level expression of genes under control of cro translation initiation signals in *Escherichia coli*. J. Biotechnology, 6, 71-81.

24. Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G. (1995) A protein catalytic framework with an Nterminal nucleophile is capable of self-activation. Nature, 378, 416-9.

25. Brock, J.E., Paz, R.L., Cottle, P., Janssen, G.R. (2007) Naturally Occurring Adenines within mRNA Coding Sequences Affect Ribosome Binding and Expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 189, 2, 501-510.

26. Bruns, W., Hoppe, J ., Tsai, H., Brning, H.J., Maywald, F., Collins, J and Mayer, H. (1985) Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. J. Mol. Appl. Genet, 3, 36-44.

27. Bulmer, M. (1988) Codon usage and intragenic position. J. Theor. Biol, 133, 67-71.

28. Burtscher, H and Schumacher, G. (1992) Reconstitution *in vivo* of penicilin G acylase activity from separately expressed subunits. Eur. J. Biochem, 205, 77-83.

29. Calogero, R.A., Pon, C.L., Canonaco, M.A and Gualerzi, C.O (1988). Selection of the mRNA translation initiaton region by *Escherichia coli* ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6427-6431.

30. Chen, G.F and Inouye, M. (1994) Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli.* Genes and Development, 8, 2641-2652.

31. Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R and Jay, E. (1994) Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. Nucleic Acids Res, 22, 4953-4957.

32. Chen, G.F., M. Inouye. (1990) Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression: preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. Nucleic Acids Res, 18, 1465-1473.

33. Chen, H., L. Pomeroy-Cloney, M. Bjerknes, J. Tam and E. Jay (1994). "The influence of adenine-rich motifs in the 3' portion of the ribosome binding site on human IFN-gamma gene expression in *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. 240, 20-27.

34. Chiang, C. and Bennett, R.E. (1967). Purification and properties of penicillin acylases from *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol, 93, 302-308.

35. Chisti, Y., Moo-Young, M., in Biotechnology: The Science and the Business, Moses, V., Cape, R. E., eds (1991) Harwood Academic Publishers, New York, 167-209. Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture.

36. Choi, J.H, Lee, S.Y. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 64, 625-35.

37. Choi, J.H., K.C. Keum and S. Y. Lee (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chem. Eng. Sci 61, 876-885.

38. Choi, K.S., Kim, J.A., and Kang, H.S. (1992) Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicilin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. J. Bacteriol, 174, 6270-6276.

39. Chou, C.P., Tseng, J-H., Kuo, B-Y., Lai, K-M., Lin, M-I and Lin, H-K. (1999). Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli.* Biotechnol Prog, 15, 439-445.

40. Chou, C.P., Kuo, B-Y and Lin, W-J. (1999) "Optimization of the Host/Vector System and Culture Conditions for Production of Penicillin Acylase in *Escherichia coli*," Journal of Bioscience and Bioengineering, 88, 160-167.

41. Chou, C.P., Lin, W., Kuo, B., and Yu, C. (2000). Genetic strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli*. Enzyme Microb. Technol, 27, 766-773.

42. Chou, C.P., Tseng, J.H., Lin, M.I., Lin, H.K., Yu, C.C. (1999). Manipulation of carbon assimilation with respect to expression of the *pac* gene for improving production of penicillin acylase in *E. coli*. J. Biotechnol, 69, 27-38.

43. Clarke, T.F IV & Clark, P.L. (2008) Rare codons cluster. PLoS One 3, e3412.

44. Cline, K., Ettinger, W.F., and Theg, S.M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two lumenal proteins are transported in the absence of ATP. J Biol Chem, 267, 2688-2696.

45. Cole, M. (1969). Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. Biochem. J, 115, 733-739.

46. Cornelis, G.R., Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. Annu Rev Microbiol, 54, 735-74.

47. Dai, M., Zhu, Y., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G., and Jiang, W. (2001). Expression of penicillin G acylase from the cloned *pac* gene of *Escherichia coli* ATCC 11105. Effects of pacR and temperature. Eur. J. Biochem, 268, 1298-1303.

48. Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A.S., Apostolakos, D and Vinick, F.J. (1985). Experimental evolution of penicillin G acylase from *Escherichia coli* and *Proteus rettgeri*. J. Bacteriol, 163, 925-932.

49. De Boer and Hui (1990) Sequences within ribosome binding site affecting messenger RNA translatability and method to direct ribosomes to single messenger RNA species. Methods Enzymol, 185, 103-114.

50. De Boer, H.A, Comstock, L.J, Hui, A., Wong, E., Vasser, M. (1983) A hybrid promoter and portable Shine-Dalgarno regions of *Escherichia coli*. Biochem Soc Symp, 48, 233-244.

51. de Gier, J.W, Luirink, J. (2001) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli.* Mol Microbiol, 40, 314-22.

52. de Keyzer, J., van der Does, C., Kloosterman, T.G., Driessen, A.J. (2003b) Direct demonstration of ATP-dependent release of SecA from a translocating preprotein by surface plasmon resonance. J Biol Chem 278, 29581-6.

53. de Keyzer, J., van der Does, C and Driessen, A.J.M. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. Cell Mol. Life Sci, 60, 2034-2052.

54. de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Muller, M., Sargent, F., Palmer, T. and Berks, B.C. (2002). "Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes." J. Mol. Biol, 322, 1135-1146.

55. De Lisa, M.P, Tullman, D., Georgiou, G. (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 6115-20.

56. de Smit, M.H., van Duin, J. (1990b) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 87, 7668-7672.

57. de Smit, M.H., and van Duin, J. (1994a) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. J. Mol. Biol. 235, 173-184.

58. Deana, A., R. Ehrlich and C. Reiss (1996). Synonymous codon selection controls *in vivo* turnover and amount for mRNA in *Escherichia coli bla* and *ompA* genes. J. Bacteriol. 178**,** 2718-2720.

59. Del Tito, B.J Jr., Ward, J.M., Hodgson, J., Gershater, C.J., Edwards, H., Wysocki, L.A., Watson, F.A., Sathe, G., and Kane, J.F. (1995) Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 177, 7086-7091.

60. DeLisa, M. P., Lee, P., Palmer, T. and Georgiou, G. (2004). Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. J. Bacteriol, 186, 366-373.

61. DeLisa, M. P., Tullman, D. and Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 6115-6120.

62. Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E. and Pohlschroder, M. (2003). Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. J. Bacteriol, 185, 1478-1483.

63. Dinçbas, V., Heurgué-Hamard, V., Buckingham, R.H., Karimi, R., and Ehrenberg, M. (1999) Shutdown in protein synthesis due to the expression of mini-genes in bacteria. J. Mol. Biol, 291, 745-759.

64. Done, S.H., Brannigan, J.A., Moody, P.C., Hubbard, R.E. (1998) Ligand induced conformational change in penicillin acylase. J. Mol. Biol, 284, 463-75.

65. Dong, Nilsson and Kurland (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. J. Mol. Biol, 260, 649-663.

66. Draper, D.E. (1996) Translational Initiation. In *Escherichia coli and Salmonella thypharium, cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed). Washington DC, 902-908.

67. Dreyfus, M. (1988) What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on *Escherichia coli* mRNAs? J. Mol. Biol, 204, 79-94.

68. Driessen, A.J., Fekkes, P., van der Wolk, J.P (1998) The Sec system. Curr Opin Microbiol, 1, 216-22.

69. Duggleby, H.J., Tolley, S.C. (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. Nature, 373, 264-8.

70. Dupuis, L., Canaan, S., Rivière, M and Wicker-Planquart, C. (1997) Influence of various signal peptides on secretion of mammalian acidic lipases in baculovirus-insect cell system . Methods Enzymol, 284, 261-272.

71. Eckhardt, H and Luhrmann, R. (1981) Recognition by initiator transfer ribonucleic acid of a uridine 5' adjacent to the AUG codon: Different conformational states of formylatable methionine-accepting transfer ribonucleic acid at the ribosomal peptidyl site. Biochemistry 20, 2075-2080.

72. Economou A. (1999) Following the leader: Bacterial protein export through the Sec pathway Trends Microbiol, 7, 315-20.

73. Economou, A. and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. Cell, 78, 835-843.

74. Ehrenberg, M., Dincbas, V., Freistroffer, D., Heurgué-Hamard, V., Karimi, R., Pavlov, M., and Buckingham, R.H. (2000) Mechanism of Bacterial Translation Termination and Ribosome Recycling. In *In Ribosome, Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions.* Garret, R.A., Douthwaite, A., Lijas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B., Noller, H.F. (ed). Washington DC: American Society of Microbiology Press, 541-551.

75. Erarslan, A., Terzi, I., Guray, A., and Bermek, E. (1991) Purification and kinetics of penicillin G acylase from a mutant strain of *Escherichia coli* ATCC 11105. J. Chem. Technol. Biotechnol, 51, 27-40.

76. Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of Molscript that includes generally enhanced colouring capabilities J. Mol. Graph, 15, 132-134.

77. Etchegaray, J.P., and Inouye, M. (1999) Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem, 274, 10079-10085.

78. Eyre-Walker, A and Bulmer, M. (1993) Reduced synonymous substitution rate at the start of enterobacterial genes. Nucleic Acids Res. 21, 4599-4603.

79. Faxén, M., Plumbridge, J., and Isaksson, L.A. (1991) Codon choice and potential complementarity between mRNA downstream of the initiation codon and bases 1471-1480 in the 16S ribosomal RNA affects expression of *gln* S. Nucleic Acid Res, 19, 5247-5251.

80. Feilmeier, B.J, Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., Phillips, G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 182, 4068-76.

81. Fekkes, P., de Wit, J.G., van der Wolk, J.P., Kimsey H.H., Kumamoto, C.A., Driessen, A.J. (1998) Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. Mol Microbiol, 29, 1179-90.

82. Fekkes, P., Driessen, A.J. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. Microbiol Mol Biol Rev, 63, 161-73.

83. Fernandez, L.A., Berenguer, J. (2000) Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev, 24, 21-44.

84. Flores, G., Soberon, X and Osuna, J. (2004) Protein Science, 13, 1677-1683.

85. Freistroffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E.coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. EMBO J, 16, 4126-4133.

86. Fröbel, J., Rose, P and Müller, M. (2011) Early Contacts between Substrate Proteins and TatA Translocase Component in Twin-arginine Translocation. J. Biol. Chem, 286, 43679-43689.

87. Gallant, J.A., and Lindsley, D. (1998) Ribosomes can slide over and beyond "hungry" codons, resuming protein chain elongation many nucleotides downstream. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 95, 13771-13776.

88. Gallant, J., Bonthuis, P., Lindsley, D. (2003) Evidence that the bypassing ribosome travels through the coding gap. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 13430–13435.

89. Ganoza, M.C., Sullivan, P., Cunningham, C., Hader, P., Kofoid, E.C., and Neilson, T. (1982) Effect of bases contiguous to AUG on translation initiation. J. Biol. Chem, 257, 8228-8232.

90. Ghassempour, A., Vaezi, F., Salehpour, P., Nasiri-Aghdam, M., Adrangui, M.J. (2002) Monitoring of enzymatic hydrolysis of penicillin G by pyrolysis-negative ion mass spectrometry. Pharm Biomed Anal, 29, 569-78.

91. Gillum, A.M., Roe, B.A., Anandaraj, M.P., and RajBhandary, U.L. (1975) Nucleotide sequence of human placenta cytoplasmic initiator tRNA. Cell, 6, 407-413.

92. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.W. and Stormo, G. (1981) Translational initiation in prokaryotes. Annu. Rev. Microbiol, 35, 365-403.

93. Goldman, E., Rosenberg, A.H., Zubay, G., Studier F.W. (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only whenear the 5′ end of a message in *Escherichia coli.* J. Mol. Biol, 245, 467-473.

94. Goncalves, L.R.B., Sousa, R., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., Giordano, R.L.C and Giordano, R.C. (2002) Enzymatic synthesis of amoxicillin-Avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. Biotechnology and Bioengineering, 80, 622-631.

95. Gonzalez de Valdivia, E.I and Isaksson, L.A. (2004) A codon window in mRNA downstream of the initiation codon where NGG codons give strongly reduced gene expression in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 32, 5198-5205.

96. Gonzalez de Valdivia, E.I., and Isaksson, L.A. (2005) Abortive translation caused by peptidyl-tRNA drop-off at NGG codons in the early coding region of mRNA. FEBS J, 272, 5306-5316.

97. Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annu Rev Genet, 30, 465-506.

98. Grafkova, J., Sobotkova, L. (2002) Penicillin G acylase-synthesis, regulation, production. Ceska Slov Farm. 51, 6-10.

99. Green, R., and Noller, H.F. (1997) Ribosomes and translation. Annu. Rev. Biochem, 66, 679-716.

100. Gu, S-Q., Peske, F., Wieden, H-J., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2003) The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. RNA, 9, 566-73.

101. Gualerzi, C.O and Pon, C.L. (1990) Initiation of mRNA translation in prokaryotes. Biochem, 29, 5881-5889.

102. Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsic, J., and Pon, C.L. (2000) Translation Initiation in Bacteria. In *In The Ribosome, Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions.* Garret, R.A., Douthwaite, A.,Lijas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B., Noller, H.F. (ed). Washington DC: American Society of Microbiology Press, 477-494.

103. Gutell, R.R., Weiser, B., Woese, C.R., and Noller, H.F. (1985) Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 32, 155-216.

104. Gümüşel, F., İşsever Öztürk, S., Kiremit Korkut, N., Gelegen, Ç., Bermek, E. (2001) Cloning and expression of the penicilin acylase gene (*pac*) grom *E. coli* ATCC 11105. Enzyme and Microbiol Technology, 29, 499-505.

105. Gümüşel, F., Kiremit, N., İşsever, S., Oğras, T.T., Bermek, E. (1996) PCR cloning of the *pac* gene from E. coli ATCC 11105-Observations on the expression of a recombinant periplasmic protein. Biochem Mol Biol Int, 38, 315-324.

106. Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., and Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. Cell, 63, 269-279.

107. Hartz, D., Binkely, J., Hollingsworth, T., and Gold, L. (1990) Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiation tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. Genes & Development, 4, 1790-1800.

108. Hartz, D., McPheeters, D.S., and Gold, L. (1989) Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. Genes Dev, 3, 1899-1912.

109. Hartz, D., McPheeters, D.S. Green.L. and Gold, L. (1991a) Detection of *Escherichia coli* ribosome binding at translation initiation sites in the absence of tRNA. J. Mol. Biol, 218, 99-105.

110. Herskovits, A.A., Bochkareva, E.S., Bibi, E. (2000) New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. Mol Microbiol, 38, 927-39.

111. Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S., Dodson, G.G., Wilson, K.S. (2000) Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *E. coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. J Mol Biol, 302, 887-98.

112. Hinsley, A.O., Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C. (2001) A naturally occuring bacterial Tat signal peptide lacking one of the ‘invariant’ arginine residues of the consensus motif. FEBS Lett, 497, 45-49.

113. Huang, H.C., Sherman, M.Y., Kandror, O., Goldberg, A.L. (2001) The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 276, 3920-8.

114. Hui, A., and de Boer, H.A. (1987) Specialized ribosome system: Preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4762-4766.

115. Hui, A., Hayflick, J., Dinkelspiel, K and de Boer, H.A. (1984) Mutagenesis of the three bases preceding the start codon of the beta-galactosidase mRNA and its effect on translation in *Escherichia coli*. EMBO J, 3, 623-629.

116. Hwang, L.H.S., Chen, B.F., Lin, H.M., Soong, L.L., Jou, Y.S., Chang W.C, Liu, S.T. (1990) The striking effects of spacer and terminator sequences on the synthesis of porcine growth hormone in *Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 12, 335-340.

117. Ignatova, Z., Enfors, S., Hobbie, M., Taruttis, S., Vogt, C., and Kasche, V (2000). The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. Enzyme Microb.Technol, 26, 165-170.

118. Ignatova, Z., Hornle, C., Nurk, A., and Kasche, V (2002). Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. Biochem. Biophys. Res. Commun, 291, 146-149.

119. Ignatova, Z., Mahsunah, A., Georgieva, M. and Kasche, V. (2003) Improvement of post-translational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *E. coli* strains. Appl. Environ. Microbiol, 69, 1237-1245.

120. Ivanov, P.V., Zvereva, M.I., Shpanchenko, O.V., Dontsova, O.A., Bogdanov, A.A., Aglyamova, G.V., Lim, V.I., Teraoka, Y., and Nierhaus, K.H. (2002) How does tmRNA move through the ribosome? FEBS Lett, 514, 55-59.

121. Ize, B., Stanley, N., Buchanan, G and Palmer, T. (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. Mol Microbiol, 48, 1183-1193.

122. İşsever Öztürk, S. (2002) ‘Gen kontrol bölgelerinde yönlendirilmiş mutagenez ile yapılacak değişikliklerin ekspresyon üzerine etkilerinin penisilin asilaz (PA) modelinde incelenmesi ve ilgili klonda ekspresyonun gerçekleştiği promotorun belirlenmesi’, Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı.

123. İşsever Öztürk, S., Akdemir, H., Akbulut, N., Gümüşel, F (2008). Purification of recombinant penicillin acylases originated from the wild type or altered expression casettes and characterization of the enzyme. The International Enzyme Engineering Symposium, Kuşadası, Turkey, p.62.

124. Jacques, N., Dreyfus, M. (1990). Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. Mol. Microbiol, 4, 1063-1067.

125. Janosi, L., Hara, H., Zhang, S and Kaji, A. (1996) Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF): and important but overlooked step of protein synthesis. Adv. Biophys, 32, 121-201.

126. Janosi, L., Mottagui-Tabar, S., L.A, Isaksson., Sekine, Y., Ohtsubo, E., Zhang, S., Goon, S., Nelken, S., Shuda, M and Kaji, A. (1998) Evidence for *in vivo* ribosome recycling, the fourth step in protein biosynthesis. EMBO J, 17, 1141-1151.

127. Jiang, L., Wang, Y and Yang, S. (1997). Location of regulatory gene in penicillin G acylase operon (pacR) of *E. coli* D816. Genet. Anal, 14, 51-54.

128. Jiang, X., H. Nakano., T. Kigawa., T. Yabuki., S. Yokoyama., D. S. Clark and T. Yamane (2001). Dosage effect of minor arginyl- and isoleucyl-tRNAs on protein synthesis in an *Escherichia coli in vitro* coupled transcription/translation system. J. Biosci. Bioeng. 91, 53-57.

129. Jin, H., Zhao, Q., de Valdivia, E.I.G., Ardell, D.H., Stenström, M., Isaksson, L.A. (2006) Influences on gene expression *in vivo* by a Shine-Dalgarno sequence. Mol Microbiol, 60, 480-492.

130. Kajava, A.V., Zolov, S.N., Kalinin, A.E., Nesmeyanova, M.A. (2000) The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria. J Bacteriol, 182, 2163-9.

131. Kaji, A., Kiel, M.C., Hirokawa, G., Muto, A.R., Inokuchi, Y and Kaji, H. (2001) The fourth step of protein synthesis: disassembly of the post-termination complex is catalyzed by elongation factor G and ribosome recycling factor, RRF, a near perfec mimic of tRNA. In *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* Vol. 66, 515-529.

132. Kanaya, S., Yamada, Y., Kudo, Y., Ikemura, T. (1999) Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of Bacillus subtilis tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. Gene, 238, 143-155.

133. Karimi, R and Ehrenberg, M. (1996) Dissociation rates of peptidyl-tRNA from the P-site of *E. coli* ribosomes. EMBO J, 15, 1149-1154.

134. Karimi, R., Pavlov, M.Y., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. Mol. Cell, 3, 601-609.

135. Karlin, S., Mrazek, J., Campbell, A., and Kaiser, D (2001). Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. J. Bacteriol, 183, 5025-5040.

136. Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S., and Voelter, W. (1999) Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidasefrom *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 1433,76-86.

137. Kebir, M.O., Kendall, D.A. (2002) SecA specificity for different signal peptides. Biochemistry, 41, 5573-80.

138. Keilmann, C., Wanner, G., Böck, A. (1993) Molecular Basis of the exclusive low-temperature synthesis of an enzyme in *E. coli*: Penicillin acylase. Biol Chem Hoppe-Seyler 374, 983-992.

139. Khokhlova, O.V., Nesmeianova, M.A. (2003) Interaction of SecB and SecA with the N-terminal region of mature alkaline phosphatase on its secretion in *Escherichia coli.* Mol Biol (Mosk), 37, 712-8.

140. Kim, M.H and Ray, D.S. (1985) Mutational mechanisms by which an inactive replication origin of bacteriophage M13 is turned on are similar to mechanisms of activation of ras proto-oncogenes. J. Virol, 53, 871-878.

141. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M. (2007) A ‘‘silent’’ polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science, 315, 525-528.

142. Kisselev, L., and Buckingham, R.H. (2000) Translational termination comes of age. Trends Biochem. Sci, 25, 561-566.

143. Kisselev, L., Ehrenberg, M., and Frolova, L. (2003) Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? EMBO J, 22, 175-182.

144. Klei, H.E., Daumy, G.O., and Kelly, J.A. (1995). Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*. Protein Sci, 4, 433-441.

145. Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol Microbiol, 37, 239-53.

146. Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Supina, E.V., Boni, IV (2002). Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. Rna, 8, 1137-1147.

147. Koster, M., Bitter, W., Tommassen, J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. Int J Med Microbiol, 290, 325-31.

148. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell, 44, 283-292.

149. Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene, 234, 187-208.

150. Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. Microbial Rev, 47,1-45.

151. Krzeslak, J., Braun, P., Voulhoux, R., Cool, R.H., Quax, W.J. (2009) Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biotechnol, 142, 250-258.

152. Kuriki, Y (1990). A nucleotide sequence in the translation start signal region is involved in heat shock-induced translation arrest in *Escherichia coli.* FEBS Lett. 264, 121-124.

153. Kuroda, H., Maliga, P. (2001a) Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. Nucleic Acids Res, 29, 970-975.

154. La Teana, A., Gualerzi, C.O., Brimacombe, R. (1995) From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. RNA, 1, 772-782.

155. Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

156. Laskowska, E., Bohdanowicz, J., Kuczynska-Wisnik, D., Matuszewska, E., Kedzierska, S., and Taylor, A. (2004). Aggregation of heat-shock-denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker-proteins in *Escherichia coli* WT and grpE280 cells. Microbiology, 150, 247-259.

157. Laursen, B.S., H.P. Sorensen, K.K. Mortensen and H.U. Sperling-Petersen (2005). "Initiation of protein synthesis in bacteria." Microbiol. Mol. Biol. Rev, 69, 101-123.

158. Laursen, B.S., Steffensen, S., Hedegaard, J., Moreno, J.M., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U (2002). Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial infB gene. Genes Cells, 7, 901-910.

159. Lee, H.C., Bernstein, H.D. (2001) The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. Proc Natl Acad Sci USA, 98, 3471-6.

160. Lee, K., Holland-Staley, C.A., Cunningham, P.R. (1996). Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *Rna*, 2, 1270-1285.

161. Lee, H., Park, O.K., Kang, H.S. (2000). Identification of a new active site for autocatalytic processing of penicillin acylase precursor in *E. coli* ATCC11105. Biochem Biophys Res Commun. 272, 199-204.

162. Li, W., Ying, X., Guo, Y., Yu, Z., Zhou, X., Deng, Z., Kieser, H., Chater, K. F. and Tao, M. (2006) Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol, 188, 8368-8375.

163. Liljas, A. (2004) *Structural Aspects of Protein Synthesis.* Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

164. Lill, R., Robertson, J.M., and Wintermeyer, W. (1984) tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli.* Biochemistry, 23, 6710-6717.

165. Lin, W., Huang, S and Chou, C.P. (2001) DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng, 73, 484-492.

166. Lin, W.-J., S.-W. Huang, and C.P. Chou (2001). High-level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *Escherichia coli.* J. Chem. Technol. Biotechnol, 76, 1030-1037.

167. Liu, M., Tolstorukov, M., Zhurkin, V., Garges, S., Adhya, S. (2004) A mutant spacer sequence between -35 and -10 elements makes the P_{lac} promoter hyperactive and cAMP receptor protein-independent. Proc Natl Acad Sci USA, 101, 6911-6916.

168. Looman, A.C., Bodlaender, J., Comstock, L.J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H.A and van Knippenberg, P.H. (1987) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified *lacZ* gene in *Escherichia coli*. EMBO J, 6, 2489-2492.

169. Luirink, J and Dobberstein, B. (1994) Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. Mol Microbiol, 11, 9-13.

170. Ma, J., Campbell, A., Karlin, S. (2002) Correlations between Shine–Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. J Bacteriol, 184, 5733-5745.

171. Maier, R., B. Eckert., C. Scholz., H. Lilie., and F.X. Schmid (2003). Interaction of trigger factor with the ribosome. J. Mol. Biol. 326, 585-592.

172. Makhoul, C.H. and Trifonov, E.N. (2002) Distribution of rare triplets along mRNA and their relation to protein folding. J. Biomol. Struct. Dyn, 20, 413-420.

173. Makrides, S.C. (1996) Strategy for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev, 60, 512-538.

174. Manting, E.H, van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A., Driessen, A.J. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. EMBO J, 19, 852-61.

175. Marani, P., Wagner, S., Baars, L., Genevaux, P., de Gier, J. W., Nilsson, I., Casadio, R and von Heijne, G. (2006) Protein Sci, 15, 884-889.

176. Marin, M. (2008) Folding at the rhythm of the rare codon beat. Biotechnol J, 3, 1047-57.

177. Marquez, V., Wilson, D.N., and Nierhaus, K.H. (2002). Functions and interplay of the tRNA binding sites of the ribosome. Biochem. Soc. Trans. 30, 133-140.

178. Martin, L., Prieto, M.A., Cortes, E and Garcia, J.L. (1995). Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicilin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. FEMS Microbiol. Lett, 125, 287-292.

179. Martin-Farmer, J.A., and G.R. Janssen (1999). A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 31, 1025-1038.

180. Masip, L., Pan, J.L., Haldar, S., Penner-Hahn, J.E., De Lisa, M.P., Georgiou G, et al. (2004) An engineered pathway for the formation of protein disulfide bonds. Science, 303, 1185-9.

181. Matsumoto, K., (1993). Production of 6-APA, 7-ACA and 7-ADCA by immobilized penicillin and cephalosporin amidases. In Industrial application of immobilized biocatalysts. A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, Eds: 67-88. Marcel Dekker, Inc. New York.

182. Matteucci, M.D and Heyneker, H.L (1983) Targeted random mutagenesis: the use of ambiguously synthesized oligonucleotides to mutagenize sequences immediately 5' of an ATG initiation codon. Nucleic Acids Research, 4, 3113-3221.

183. Mayer, C., Köhrer, C., Kenny, E., Prusko, C., RajBhandary U.L. (2003). Anticodon sequence mutants of *Escherichia coli* initiator tRNA: effects of overproduction of aminoacyl-tRNA synthetases, methionyl-tRNA formyltransferase, and initiation factor 2 on activity in initiation. Biochemistry, 42, 4787-4799.

184. McCarthy, J.E.G., H.U. Schairer and W. Sebald. (1985) Translational initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli*: identification of an intercistronic sequence that enhances translation. EMBO. J, 4, 519-526.

185. McCarthy, J.E.G., W. Sebald, G. Gross and R. Lammers. (1986) Enhancement of translational efficiency by the *Escherichia coli atpE* translational initiation region: its fusion with two human genes. Gene, 41, 201-206.

186. McCarthy, J.E.G and Gualerzi, C.O. (1990) Translational control of procaryotic gene expression. Trends Genet, 78-85.

187. McCarthy, J.E.G and Brimacombe, R. (1994) Procaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. Trends Genet, 402-407.

188. McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J.A. (2001). Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. J Mol Biol. 313, 139-50.

189. McVey, C. (1999) Substrate specificity of penicillin G acylase. PhD thesis. University of York, UK.

190. Meevootisom, V., Somsuk, P., Prachaktam, R., Flegel, T.W. (1983) Simple screening method for isolation of penicilin acylase-producing bacteria. Appl Environ Microbiol, 46, 1227-1229.

191. Meevootisom, V and Saunders, J.R. (1987) Cloning and expression of penicillin acylase genes from over producing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium.* Appl. Microbiol. Biotechnol, 25, 372-373.

192. Menninger, J.R. (1976) Peptidyl transfer RNA dissociates during protein synthesis from ribosomes of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem, 251, 3392-3398.

193. Mergulha˜o, F., Monteiro, G., Larsson, G., Sandem, A., Farewell, A., Nystrom, T., et al. (2003a). Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters uspA and uspB. Appl Microbiol Biotechnol, 61, 495-501.

194. Mergulha˜o, F., Monteiro, G. (2004) Secretion capacity limitations of the Sec pathway in *Escherichia coli* J. Microb Biotechnol, 14, 128-33.

195. Mergulha˜o, F.J., Taipa, M.A., Cabral, J.M., Monteiro, G.A. (2004a) Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. J Biotechnol, 109, 31-43.

196. Mergulha˜o, F.J.M., Monteiro, G.A., Larsson, G., Bostrom, M., Farewell, A., Nystrom, T., et al. (2003b) Evaluation of inducible promoters on the secretion of a ZZ-Proinsulin fusion protein. Biotechnol Appl Biochem, 38, 87-93.

197. Mergulhao, F.J, Summers, D.K, Monteiro, G.A. (2005) Recombinant protein secretion is *Escherichia coli*. Biotechnol Adv, 23, 177-202.

198. Merino, E., Balbas, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F., Bolivar, F. (1992) Carbon regulation and the role in nature of *Escherichia coli* penicillin acylase (PAC) gene. Mol Microbiol, 6, 2175-2182.

199. Min, K.T., Kim, M.H and Lee, Dae-Sil. (1988) Search for the optimal sequence of the ribosome binding site by random oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Reseach, 16, 5075-5087.

200. Mitchell, P., Osswald, M., and Brimacombe, R. (1992) Identification of intermolecular RNA cross-links at the subunit interface of the *Escherichia coli* ribosome. Biochemistry, 31, 3004-3011.

201. Morales, V.M., Backman, A., Bagdasarian, M. (1991) A series of wide host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. Gene, 97, 39-47.

202. Mori, H., Ito, K. (2003) Biochemical characterization of a mutationally altered protein translocase: proton motive force stimulation of the initiation phase of translocation. J Bacteriol, 185, 405-12.

203. Nakamura, Y., T. Gojobori and T. Ikemura. (2000) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. Nucleic Acids Res, 28, 292.

204. Nackley, A.G., Shabalina, S.A., Tchivileva, I.E., Satterfield, K., Korchynskyi, O., et al. (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. Science, 314, 1930-1933.

205. Natale, P., Bruser, T., Driessen, A.J. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. Biochim Biophys Acta, 1778, 1735-1756.

206. Ninio, J. (1975) Kinetic amplification of enzyme discrimination. Biochimie, 57, 587-595.

207. Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K., Tokuda, H. (1999) Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive forcedependent stimulation of protein translocation. EMBO J, 18, 1049-58.

208. O'Connor, M., Asai, T., Squires, C.L and Dahlberg, A.E. (1999) Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8973-8978.

209. O'Connor, M., Gregory, S.T., Rajbhandary, U.L and Dahlberg, A.E. (2001) Altered discrimination of start codons and initiator tRNAs by mutant initiation factor 3. *Rna* 7, 969-978.

210. Oh, S.J., Kim, Y.C., Park, Y.W., Min, S. Y., Kim, I.S., and Kang, H. S. (1987) Complete nucleotide sequence of the penicilin G acylase gene and flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. Gene, 56, 87-97.

211. Ohashi, H., Katsuta, Y., Nagashima, M., Kamei, T., and Yano, M. (1989) Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicilin acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol, 55, 351-356.

212. Olsthoorn, R.C., Zoog, S., and van Duin, J. (1995) Coevulution of RNA helix stability and Shine-Dalgarno complementarity in a translational start region. Mol. Microbiol, 15, 333-339.

213. Osada, Y., R. Saito, and M. Tomita. (1999) Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5′ UTR for translation initiation in various prokaryotes. Bioinformatics, 15, 578-581.

214. Osborne, A.R, Rapoport, T.A, and van den Berg, B. (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu. Rev. Cell Dev, Biol, 21, 529-550.

215. Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C and Dalbey, R.E. (2002) Signal peptidases. Chemical reviews, 102, 4549-4580.

216. Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., Henderson, I.R. (2003) Genomic analysis of secretion systems. Curr Opin Microbiol, 6, 519-27.

217. Palmer, T., Berks, B.C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. Microbiology, 149, 547-56.

218. Palmer, T., Sargent, F., Berks, B.C. (2004) Light traffic: photo-crosslinking a novel transport system. Trends Biochem Sci, 29, 55-7.

219. Pan, K. L., Hsiao, H.C., Weng, C.L., Wu, M. S., and Chou, C.P. (2003) Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicilin acylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol, 185, 3020-3030.

220. Pape, T., Wintermeyer, W and Rodnina, M.V. (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. EMBO J, 17, 7490-7497.

221. Patzelt, H., Rudiger, S., Brehmer, D., Kramer, G., Vorderwulbecke, S., Schaffitzel, E., et al. (2001) Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 14244-9.

222. Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1997) Fast recycling of *E. coli* ribosomes requires both ribosome recycling factor (RRF) and release factor (RF3). EMBO J, 16, 4134-4141.

223. Peltier, J.B., Emanuelsson, O., Kalume, D.E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D.A., Soderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G., and van Wijk, K.J. (2002) Plant Cell, 14, 211-236.

224. Penalva, M.A., Rowlands, R.T and Turner, G. (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. Trends Biotechnol, 16, 483-489.

225. Peterson, J.H., Woolhead, C.A., Bernstein, H.D. (2003) Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle. J Biol Chem, 278, 46155-62.

226. Power, P.M., Jones, R.A., Beacham, I.R., Bucholtz, C., Jennings, M.P (2004) Whole genome analysis reveals a high incidence of non-optimal codons in secretory signal sequences of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322, 1038-1044.

227. Pradel, N., Santini, C.L., Ye, C.Y., Fevat, L., Gerard, F., Alami, M., et al (2003). Influence of tat mutations on the ribose-binding protein translocation in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 306, 786-91.

228. Pugsley, A.P., Francetic, O., Driessen, A.J., de Lorenzo, V. (2004) Getting out: protein traffic in prokaryotes. Mol Microbiol, 52, 3-11.

229. Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnet, N., Hardie, K. (1997) Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria-a review. Gene, 192, 13-9.

230. Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol Rev, 57, 50-108.

231. Purvis, I.J., Bettany, A.J., Santiago, T.C., Coggins, J.R., Duncan, K., Eason, R., Brown, A.J (1987) The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo*. A hypothesis. J. Mol. Biol. 193, 413-417.

232. Qing, G., Xia, B., Inouye, M. (2003) Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol, 6, 133-144.

233. Radoja, S., O. Francetic, N. Stojicevic, I. Moric, V. Glisin, and M. Konstantinovic. (1999) DNA region responsible for transcriptional regulation of the *Escherichia coli* penicillin amidase (*pac*) gene by CRP and PAA. Genet. Anal. 15, 235-238.

234. Rajendhran, J., Krishnakumar, V., and Gunasekaran, P. (2002). Optimization of a fermentation medium for the production of penicillin G acylase from *Bacillus sp*. Lett. Appl. Microbiol, 35, 523-527.

235. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. Cell, 108, 557-572.

236. Ramakrishnan, V. (2008) What we have learned from ribosome structures. (The Heatley Medal Lecture). Biochem Soc Trans, 36, 567-74.

237. Resch, A., Tedin, K., Grundling, A., Mundlein, A., and Bläsi, U. (1996) Downstream box-anti-downstream box interactions are dispensable for translation initiation of leaderless mRNAs. EMBO J, 15, 4740-4748.

238. Reznikoff, W. S., & Abelson, J. N. (1978) in The Operon (Miller, J. H., & Reznikoff, W. S., Eds.) pp 221-243, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

239. Rheinberger, H.J and K.H. Nierhaus. (1980) Simultaneous binding of the 3' tRNA molecules by the ribosome of *E.coli*. Biochem. Int. 1, 297-303.

240. Rinas, U., Hoffmann, F. (2004) Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Prog, 20, 679-87.

241. Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D and Gold, L. (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. Mol. Microbiol, 6, 1219-1229.

242. Roa, A., Garcia, J.L (1999) New insights into the regulation of the *pac* gene from *Escherichia coli* W ATCC 11105. FEMS Microbiol Lett, 177, 7-14.

243. Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G and Branlant, C. (1993) Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. Biotechnol. Bioeng, 41, 14-24.

244. Rodnina, M.V., Pape, T., Savelsbergh, A., Mohr, D., Matassova, NB., Wintermeyer, W. (2000) Mechanisms of Partial Reactions of the Elongation Cycle Catalyzed by Elongation Factors Tu and G. In *In Ribosome, Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions.* Garret, R.A., Douthwaite, A., Lijas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B., Noller, H.F. (ed). Washington DC: AmericanSociety of Microbiology Press, 301-317.

245. Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T.E and Burley, S.K. (2000) X-Ray structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding. Cell, 103, 781-792.

246. Rosenberg, H.F. (1998) Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. BioTechniques, 24, 188-91.

247. Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. and Wu, L. F. (1998) "A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." EMBO J. 17, 101-112.

248. Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C and Palmer, T. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. EMBO J, 17, 3640-3650.

249. Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Palmer, T. (1999) Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli* A distinct and pivotal role for the TatB protein. J Biol Chem, 274, 36073-82.

250. Sato, T., Terabe, M., Watanabe, H., Gojobori, T., Hori-Takemoto, C., Miura, K. (2001) Codon and base biases after the initiation codon of the open reading frames in the *Escherichia coli* genome and their influence on the translation efficiency. J. Biochem. (Tokyo), 129, 851-860.

251. Savidge, T.A and Cole, M. (1975) Penicillin acylase (bacterial). Methods Enzymol, 43, 705-721.

252. Scherer, G.F.E., Walkinshaw, M.D., Arnott, S and Morre, D.J. (1980) The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding sequences. Nucleic Acids Res, 8, 3895-3907.

253. Scherrer, S., Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G and Branlant, C (1994). Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *Escherichia coli* penicillin G amidase precursor polypeptide. Appl. Microbiol. Biotechnol, 42, 85-91.

254. Schneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L., Ehrenfeucht, A. (1986). Information content of binding sites on nucleotide sequences. J. Mol. Biol, 188, 415-431.

255. Schumacher, D., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P. and Böck, A. (1986) Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. Nucleic Acids Res, 14, 5713-5727.

256. Schurr, T., Nadir, E., Margalit, H. (1993) Identification and characterization of *E. coli* ribosomal binding sites by free energy computation. Nucleic Acids Res, 21, 4019-4023.

257. Scott, S., Busby, S and Beacham, I. (1995) Transcriptional co-activation at the *ansB* promoters: involvement of the activating regions of CRP and FNR when bound in tandem. Mol Microbiol, 18, 521-531.

258. SCRIP, (1987). 1171.28 cited from Shewale JG, Sivaraman H. Penicillin acylase: Enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. Process Biochem, 1989; 24, 146-54.

259. Sergiev, P., Lavrik, I., Wlasoff, V., Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Bogdanov, A., Brimacombe, R (1997). The path of mRNA through the bacterial ribosome; a site-directed cross-linking study with new photoreactive derivatives of guanosine and uridine. RNA, 3, 464-475.

260. Shewale, J.G and Sivaraman, H. (1989) Penicillin Acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. Process Biochem, 22, 146-153.

261. Shine, J and Dalgarno, L. (1974) The 3´- terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA, 71, 1342-1346.

262. Sienbenlist, U., Simpson, R. B. and Gilbert, W. (1980) Cell (Cambridge, Mass.) 20, 269.

263. Simmons, L. C. and D. G. Yansura. (1996) Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Nat. Biotechnol, 14, 629-634.

264. Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A.G., Fabbretti, A., Yusupov, M., Gualerzi, C.O., Klaholz, B.P. (2008) Structure of the 30S translation initiation complex. Nature, 455, 416-20.

265. Sizmann, D., Keilmann, C., Bock, A. (1990) Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *E. coli* ATCC 11105. Eur J Biochem, 192, 143-51.

266. Slos, P., Speck, D., Accart, N., Kolbe, H.V, Schubnel, D., Bouchon, B., et al. (1994) Recombinant cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*: high-level secretion, purification, and characterization. Protein Expr Purif, 5518-26.

267. Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J. Biotechnol, 115, 113-128.

268. Sorensen, M.A., C.G. Kurland and S. Pedersen (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 207, 365-377.

269. Sprengart, M.L., Fatscher, H.P and Fuchs, E. (1990) The initiation of translation in *E.coli*: apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA. Nucleic Acids Res, 18, 1719-1723.

270. Sprengart, M.L., Fuchs, E., and Porter, A.G. (1996) The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. EMBO J, 15, 665-674.

271. Sriubolmas, N., Panbangred, W., Sriurairatana, S and Meevootisom, V. (1997). Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. Appl. Microbiol. Biotechnol, 47, 373-378.

272. Stanley, N.R, Palmer, T., Berks, B.C. (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec independent protein targeting in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 275, 11591-6.

273. Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W and van Heel, M. (1997) Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. Nature, 389, 403-406.

274. Stenström, C.M., Jin, H., Major, L.L., Tate, W.P., and Isaksson, L.A. (2001a) Codon bias at the 3´-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. Gene, 263, 273-284.

275. Stenström, C.M., Holmgren, E., and Isaksson, L.A. (2001b) Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation. Gene, 273, 259-265.

276. Stenström, C.M and Isaksson, L.A. (2002) Influences on translation initiation and early elongation by the messenger RNA region flanking the initiation codon at the 3' side. Gene, 288, 1-8.

277. Strauch, Eva-Maria (2007). Characterization and Applications of the Twin-Arginine Transporter Pathway, PhD Thesis, The University of Texas.

278. Thanaraj, T.A and Argos, P. (1996) Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. Protein Sci, 5, 1973-1983.

279. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure, and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 76, 4350-4354.

280. Traxler, B and Murphy, C. (1996) Insertion of the polytopic membrane protein MalF is dependent on the bacterial secretion machinery. J Biol Chem, 271, 12394-12400.

281. Tullman-Ercek, D. (2006) Characterization and Engineering of the Twin-Arginine Translocation Pathway of *Escherichia coli*. PhD Thesis. The University of Texas at Austin.

282. Tullman-Ercek, D., DeLisa, M.P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T., and Georgiou, G. (2007) Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides. J Biol Chem, 282**,** 8309-8316.

283. Tziatzios, C., Schubert, D., Lotz, M., Gundogan, D., Betz, H., Schagger, H., et al. (2004) The bacterial protein-translocation complex: SecYEG dimers associate with one or two SecA molecules. J Mol Biol, 340, 513-24.

284. Ulijn, R.V., De Martin, L., Halling, P.J., Moore, B.D. and Janssen, A.E. (2002) Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics via direct condensation. J Biotechnol, 99, 215-222.

285. Valle, F., Gosset, G., Tenorio, B., Oliver, G and Bolivar, F. (1986) Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase gene. Gene, 50, 119-122.

286. Valle, F., Balbas, P., Merino, E and Bolivar, F. (1991) The role of penicillin amidases in nature and in industry. Trends Biochem. Sci, 16, 36-40.

287. Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M and Frank, J. (2003) Incorporation of aminoacyl tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. Nat Struct Biol, 10, 899-906.

288. Van der Wal, FJ., ten Hagen-Jounman, C.M., Oudega, B., Luirink, J (1995) Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*: extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE. Appl Microbiol Biotechnol, 44, 459-465.

289. van der Wolk, JP., Fekkes, P., Boorsma, A., Huie, J.L., Silhavy, T.J., Driessen, A.J. (1998) PrlA4 prevents the rejection of signal sequence

defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. EMBO J, 17, 3631-9.

290. Vandamme, E.J. (1988) In: Moo-Young M, editor. Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications. New York: Elsevier, 261.

291. Varenne, S., Buc, J., Lloubes, R. and Lazdunski, C. (1984) Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. J. Mol. Biol, 180, 549-576.

292. Verhaert, R. M.D., Duina, J.V and Quax, W.J. (1999) Processing and functional display of the 86 kDa heterodimeric penicillin G acylase on the surface of phage fd. Biochem. J, 342, 415-422.

293. Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors, and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18, and pUC19 vectors. Gene, 33, 103-119.

294. Vimberg, V., Tats, A., Remm, M., Tenson, T. (2007) Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. BMC Genomics, 8, 100.

295. Voorma, H.O. (1996) Control of translation initiation in prokaryotes. In Translational Control. Hershey, J.W.B., Mathews, M.B., and Sonenberg, N. (eds). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 759-777.

296. Watson, J.D & Crick, F.H.C. (1953) Molecule structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171, 737-738.

297. Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A. and Turner, R.J. (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. Cell 93, 93-101.

298. Wexler, M., Sargent, F., Jack, R.L., Stanley, N.R., Bogsch, E.G., Robinson, C, et al. (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. J Biol Chem, 275, 16717-22.

299. Wiegert, T., Sahm, H and Sprenger, G.A. (1997) Expression of the Zymomonas mobilis gfo gene for NADP-containing glucose: fructose oxidoreductase (GFOR) in I. Formation of enzymatically active preGFOR but lack of processing into a stable periplasmic protein. Eur. J. Biochem, 244, 107-112.

300. Wilson, K.S., Noller, H.F. (1998) Mapping the position of translational elongation factor EF- G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. Cell, 92, 131-139.

301. Yahr, T.L., Wickner, W.T. (2000) Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. EMBO J, 19, 4393-401.

302. Yahr, T.L and Wickner, W.T. (2001) Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. EMBO J, 20, 2472-2479.

303. Yin, J., G. Li., X. Ren and G. Herrler. (2007) Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. J. Biotechnol, 127, 335-347.

304. Yusupova, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. Science, 292, 883-896.

305. Zalucki, Y.M., Gittins, K.L., Jennings, M.P. (2008) Secretory signal sequence non-optimal codons are required for expression and export of beta-lactamase. Biochem Biophys Res Commun, 366, 135-141.

306. Zalucki, Y.M., Jennings, M.P. (2007) Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export. Biochem Biophys Res Commun, 355, 143-148.

307. Zaug, A.J., Grabowski, P.J and Cech, T.R. (1983) Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. Nature, 301, 578-583.

308. Zhang, J and Deutscher, M.P. (1992) A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2605-2609.

309. Zhang, G., Hubalewska, M and Ignatova, Z. (2009) Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. Nature Struct. Mol. Biol, 16, 274-280.

ÖZGEÇMİŞ

Özlem AKKAYA, 1977 yılında Erzurum'da doğdu. İlköğrenimini Kocaeli, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 1996 yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2000 yılında mezun oldu. 2000 yılı güz döneminde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümünde başladığı yüksek lisansını 2003 yılında tamamlayarak, aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü'nde doktora programına kayıt yaptırdı. 2001 yılından itibaren halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

World J Microbiol Biotechnol (2012) 28:2159–2164
DOI 10.1007/s11274-012-1021-6

ORIGINAL PAPER

Mutations in the translation initiation region of the *pac* gene resulting in increased levels of activity of penicillin G acylase

Özlem Akkaya · Saliha İşsever Öztürk · Albert Bolhuis · Füsun Gümüşel

Received: 1 December 2011 / Accepted: 1 February 2012 / Published online: 14 February 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Penicillin G acylase (PA) is an important enzyme used in the industrial production of b-lactam antibiotics. In this study, the effects of mutations in the translation initiation region of the *Escherichia coli pac* gene, encoding periplasmic PA, were examined. Several mutations led to increased amounts of PA activity, including those that lengthened the spacer region between the ribosome binding site and the ATG start codon, and those with altered codons on positions +2 and +4 relative to the start codon. These results indicated that the wild-type sequence of the *pac* gene does not provide maximum expression levels and that the strategies applied in this study can be used to improve production of PA in *E. coli*. Unexpectedly, our study also suggested that translocation of PA was, in contrast to earlier reports, shown not to require the Twin-arginine translocation pathway for transport into the periplasm.

Keywords Penicillin G acylase · *pac* gene · Translation initiation · Codon usage · Tat pathway

Introduction

Initiation of translation in bacteria is a major determinant of the levels of protein synthesis (Draper 1996). During formation of the translation initiation complex, mRNA and N-formyl-methionyl (fMet)-tRNA^{fMet} bind to ribosomes in a process depending on translation initiation factors (IF1, IF2 and IF3). The molecular interactions present in this translation initiation complex consist of base-pairing of the Shine-Dalgarno (SD) sequences on the mRNA with the anti-SD sequence present in the 16S rRNA gene, together with an interaction between the start codon and the anticodon of fMet-tRNA^{fMet} (Gualerzi et al. 2001).

In order to optimize translation initiation efficiency in bacteria, previous studies mainly focused on four components: (1) the start codon; (2) the SD-sequence; (3) the length and composition of the spacer between the start codon and the SD-sequence; and (4), the upstream and downstream regions flanking the initiation codon (Ma et al. 2002; Shine and Dalgarno 1974; Stenström et al. 2001a, b). Among these, the effectiveness of a SD sequence is determined by the base-pairing potential with the anti-SD sequence as well as the spacing from the ATG translational start codon (de Smit and van Duin 1994). The downstream region (4–5 codons) is also important for translation initiation, as codon usage may influence secondary structure and stability of mRNA (de Smit and van Duin 1990; Stenström et al. 2001a). The coding region of the mRNA directly following the start codon has a codon usage that differs from the rest of the gene sequence (Chen and Inouye 1990). Codon changes at +2 can alter gene expression by 15- to 20-fold (Looman et al. 1987; Stenström et al. 2001a), and the effect on gene expression can be modulated by subsequent codons as well (Stenström et al. 2001b). For instance, the overrepresentation of rare codons such as AGA and AGG among the first 25 codons of genes may alter the efficiency of translation and is important in regulation of protein synthesis (Chen and Inouye 1990).

Penicillin G acylase (PA) is an industrially important enzyme that is used to produce 6-aminopenicillanic acid

Ö. Akkaya (✉) · S. İ. Öztürk · F. Gümüşel
Department of Molecular Biology and Genetics, GYTE, Gebze Institute of Technology, 41400 Kocaeli, Turkey
e-mail: ozlem@gyte.edu.tr

A. Bolhuis
Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath BA2 AY, UK

(6-APA), the starting compound for the synthesis of semisynthetic penicillins (Elander 2003). The precursor is synthesized as an inactive 96-kDa pre-pro-PA, which contains a signal peptide at its N-terminus, mediating translocation into the periplasm through the Twin-arginine translocation (Tat) pathway (Ignatova et al. 2002). Translocated pro-PA is further processed into A (23 kDa) and B (63 kDa) chains by autoproteolytic reactions (Hewitt et al. 2000). Interestingly, the *E. coli pac* gene expression is temperature-sensitive and PA can be only synthesized at growth temperatures below 30°C (Keilmann et al. 1993).

The canonical Shine-Dalgarno sequence is AAGGAGG, while the sequence upstream of the *pac* gene is GAGGA. This sequence has thus two potential ribosome binding sites (RBS), being either GAGG (SD1) or AGGA (SD2), each of which is able to pair differently to the 3′ end of the 16S rRNA (Keilmann et al. 1993; Table 2). The spacing between the two potential SD sequences and the ATG initiation codon (4 or 5 nucleotides) is also shorter than the more typical 7–12 nucleotide spacing for *E. coli* genes (Ma et al. 2002). Here we analyzed the production of PA with a number of mutations in the translation initiation region of the *pac* gene. These included altering the spacer region between the RBS and the ATG initiation codon with a 6–8 nucleotide spacer, removal of SD2, and mutations in the region just downstream of the ATG start codon. Interestingly, several of these mutations led to increased production of PA.

Materials and methods

Chemicals

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, *Taq* DNA polymerase, isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG) and ampicillin were purchased from Roche or MBI Fermentas. Chloramphenicol was from Sigma-Aldrich. The oligonucleotides used were synthesized by Promega. The constructed plasmids were extracted using the Wizard *Plus* SV Miniprep DNA purification kit of Promega. The presence of the mutations was confirmed by sequencing, using a CEQTM 8000 Genetic Analytic System (Beckman Coulter).

Bacterial strains and plasmids

Escherichia coli strain JM109 (F′ *traD36 proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} *Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14*$^-$ *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*) was used for primary cloning and expression. The plasmid vectors pUC19 (Yanisch-Perron et al. 1985) and pMMB208 (Morales et al. 1991) were used for cloning. While the former carries the *lac* promoter, the latter carries the *tac* promoter. The *E. coli* strains MC4100 (F$^-$ *araD139 ΔlacU169 relA1 rpsL150 thi mot flb5301 deoC7 ptsF25 rbsR*) and DADE (MC4100Δ*tatABCDE*; Wexler et al. 2000) were also the host strains for pMMB208 constructs. For expression studies, strains were cultured at 26°C in casein medium (0.4% (w/v) casein, 0.8% (w/v) yeast extract, 0.42% (w/v) K_2HPO_4, 0.3% (w/v) KH_2PO_4) supplemented with ampicillin (100 µg/ml) or chloramphenicol (20 µg/ml) when appropriate.

Plasmid constructs

Plasmid *pac*9.5-pEMBL9$^+$ (Gümüşel et al. 1996) was used as the template to introduce mutations into the translation initiation region of the *pac* gene and the primers used in this study are shown in Table 1. Firstly, a fragment containing the 2.6-kb *pac* gene was PCR-amplified from the plasmid *pac*9.5-pEMBL9$^+$ using the primer pair of PA11 and PA12. Following amplification by *Taq* polymerase, the fragments were digested with *Xba*I-*Kpn*I and ligated into pUC19 to generate pUCpac2.6. To introduce the mutations shown in Table 2, a fragment containing a 550-bp region was amplified from *pac*9.5-pEMBL9$^+$ with primer pairs PA6/PA10 (Mut4), PA7/PA10 (Mut5), PA8/PA10 (Mut6) and PA9/PA10 (Mut7). These fragments were digested with *Eco*NI and *Nco*I and ligated into pUCpac2.6, creating pUCpac2.6OA4, pUCpac2.6OA5, pUCpac2.6OA6, and pUCpac2.6OA7, respectively. A 0.9 kb fragment downstream of the *pac* gene, which is required for good expression (Gümüşel et al. 1996, 2001), was amplified from *pac*9.5-pEMBL9$^+$ using primers PA14 and PA16. The resulting PCR product was cloned into the *Kpn*I and *Eco*NI sites of pUC19 to generate pUC19-900. Next, the

Table 1 Primers used in this study

List of oligonucleotides	
Primer	Oligonucleotide sequence
PA6	5′-TACGCCTGCCAGAGGTAATTATAT GAAAAATAGAAATCG-3′
PA7	5′-TACGCCTGCCAGAGGAAAAATTATATGAAAA ATAGAAATCG-3′
PA8	5′-TACGCCTGCCAGAGGAAATTATATGAGAAAT AGAAATCG-3′
PA9	5′-TACGCCTGCCAGAGGAAATTATATGAAAAAT AAAAATCG-3′
PA10	5′-TACGCCATGGTGCCCACAAATATCAT-3′
PA11	5′-TGCCGTCTAGACGTTGCTAGTATCAATTCG-3′
PA12	5′-TCCGGGGTACCTTATCTCTGAACGTGCAACAC-3′
PA14	5′-TACGTGGTACCTTAAGCCCGAAAGCCCTCA-3′
PA16	5′-TACGTGAATTCCGGCGAAGTCTCCGTTG-3′

Table 2 Nucleotide sequences of Shine-Dalgarno, spacer region and downstream region of the wt and mutant *pac* genes

SD	Spacer region	Coding region	Mutations	Source
SD2 -10.....GAGGA SD1	TACA 4nt	ATG AAA AAT AGA AAT..... Met Lys Asn Arg Asn	→pac_{wt}	Gumusel et al. (2001)
SD2 -10.....GAGGA SD1	AATTAT 6nt	ATG AAA AAT AGA AAT..... Met Lys Asn Arg Asn	→S_{pac}	Issever Ozturk (2002)
-10.....GAGG SD1	TAATTAT 7 nt	ATG AAA AAT AGA AAT..... Met Lys Asn Arg Asn	→Mut4	This study
SD2 -10.....GAGGA SD1	AAAATTAT 8 nt	ATG AAA AAT AGA AAT..... Met Lys Asn Arg Asn	→Mut5	This study
SD2 -10.....GAGGA SD1	AATTAT 6 nt	ATG **AGA** AAT AGA AAT..... Met Arg Asn Arg Asn	→Mut6	This study
SD2 -10.....GAGGA SD1	AATTAT 6 nt	ATG AAA AAT **AAA** AAT..... Met Lys Asn Lys Asn	→Mut7	This study

2.6 kb *Xba*I-*Kpn*I inserts from the pUCpac2.6OA plasmids were cloned into pUC19-900, resulting in the final constructs, which were named pUC-PACOA4, pUC-PACOA5, pUC-PACOA6 and pUC-PACOA7, respectively.

For expression in a low-copy number vector, *Eco*RI/*Hind*III fragments were re-cloned into pMMB208 (Morales et al. 1991) under the control of a *tac* promoter. These constructs were denoted pMMB-PACwt, pMMB-PACOA6 and pMMB-PACOA7. All pUC and pMMB constructs were verified by sequencing.

Expression and activity

To evaluate the enzymatic activity of PA, *E. coli* JM109 cells carrying the plasmids described above were grown in casein medium at 26°C or 37°C for 20 h. When the OD_{600} reached 0.6–0.8, 0.1 mM IPTG was added to induce expression. PA enzyme activity was measured as described by Balasingham et al. (1972). Standard assay conditions for enzyme activity assays were as follows: 0.0125 ml enzyme solution was added to 0.488 ml of 15 mM penicillin G in 50 mM phosphate buffer at pH 8.0 and the mixture was incubated at 40°C for 1 h. Activity was determined by measuring the absorption at 415 nm, and cell density was determined by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}). One unit is defined as the amount of enzyme required to produce one μmol of 6-APA per min, and activity was expressed as units per OD_{600}.

Western blotting

Proteins were resolved on 12% SDS-PAGE gels prepared according to Laemmli (1970). For blotting, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Sartorius, pore size 0.45 μm) and immunoblotting was performed according to Towbin et al. (1979), using a Mouse-polyclonal antibody against PA as primary antibody. The secondary antibody was alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG. Binding was visualized with 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate and Nitroblue Tetrazolium.

Results

Construction of mutations in the translation initiation region

Several plasmids containing mutations in the translation initiation region of the *pac* gene were constructed, and these are listed in Table 2. Even though growth rates were shown not to affect PA production in *E. coli* (Chou et al. 1999), we did determine those for all strains constructed. Significant differences in growth rates were however not observed (data not shown). All studies were performed with 0.1 mM IPTG for induction, which provided maximal production levels under the conditions tested (data not shown).

Effects of the SD and spacer region mutations on the expression of the *pac* gene

The first aim was to find out whether mutations in the SD sequence and/or spacer region had any effect on the production of active PA. To achieve these plasmids containing the mutations listed in Table 2 were constructed.

The spacer between the SD1/SD2 ribosome binding site and the ATG start codon is 4/5 nucleotides, which is shorter then normally found (Ma et al. 2002). To investigate the effect of altering this spacer, mutations were created with spacers of 6 (S_{pac}, namely Mut3 in this study) and 8 (Mut5) nucleotides (Table 2). Both mutations led to an increase in active PA production: approximately fivefold with a spacer of 6 nucleotides, and nearly 12-fold with a spacer of 8 nucleotides (Fig. 1).

To check the importance of a complete SD2, the second A in the GAGGA sequence upstream of the start codon in Mut3 was changed to a T (Mut4). As a result, production of active PA levels increased 61% (compare Mut3 with Mut4; Fig. 1). This suggests that the presence of an intact SD2 reduces protein synthesis levels. For the all mutations mentioned above, activity was only observed at 26°C and not at 37°C (not shown). This corroborated earlier findings that *pac* gene expression is temperature-sensitive (Keilmann et al. 1993).

Downstream region effects on *pac* gene expression

The first few codons in the coding region may also influence translation initiation, for instance, through changes in the secondary structure of the mRNA. The mutations that were introduced altered the codons at position +2 (K2R; Mut6) or +4 (R4K; Mut7); both mutations had the same spacer sequence as Mut3 (Table 2). The mutations did not alter the charge of the signal peptide, but it should be noted that Arg4 is part of the (atypical) Tat motif that has been proposed to direct translocation of PA to the periplasm (Ignatova et al. 2002). As shown in Fig. 1, production of active PA with the Mut6 (+2 codon) construct was twofold that of levels achieved with Mut3, while the change in PA activity was more moderate (~65% increase) when the codon at +4 (Mut7) was altered. In both cases, PA activity was markedly enhanced compared to the activity achieved with the wild-type (pac_{wt}) sequence. Similar to Mut3/4/5, PA activity was only observed at 26°C and not at 37°C.

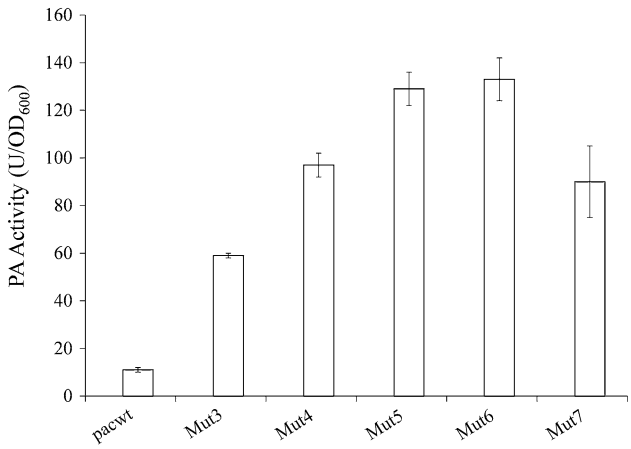


Fig. 1 PA activity in the total cell fractions of *E. coli* strains containing pUC19 constructs. Strains were grown for 20 h at 26°C, after which activity was determined (data represent the average of three experiments)

The Mut6 and Mut7 mutants had altered signal peptides. To verify that translocation was normal, Tat-deficient *E. coli* strain DADE and its parental strain *E. coli* MC4100 were transformed with the pac_{wt} (Gümüşel et al. 2001) and Mut6/7 constructs. However, the pUC19 derivatives carrying the *pac* gene were not stable in these strains, resulting in deletions of (parts of) the *pac* gene or loss of the entire plasmid (data not shown). This instability in *E. coli* MC4100 and DADE was alleviated by using the low-copy number vector pMMB208 (Morales et al. 1991) instead. With these constructs an increase in total PA activity was observed when compared to the activity of the strains carrying the pUC19 variants. This was also seen using *E. coli* JM109 with the pMMB constructs (not shown), indicating that the increased expression levels were due to the vector used and not the *E. coli* strain. Moreover, maximal PA production, corrected for biomass, was reached faster with strains carrying pMMB constructs compared to those carrying pUC constructs (5 and 20 h after IPTG induction, respectively; data not shown). There was no significant different in activity/OD600 between 5 and 20 h for the strains carrying pMMB constructs (data not shown). Surprisingly, when we compared pMMB constructs with pac_{wt} and Mut6/7 variants, we observed hardly any differences in PA activity (Fig. 2).

Unexpectedly, in the Tat-deficient strain, PA activity was only around 30% lower than found in the parental strain (Fig. 2), indicating the absence of a Tat-system did not have a major effect on translocation of PA. To verify this, samples were analyzed by Western blotting with an antibody that recognizes (pre)-pro-PA and the B subunit (but not the A subunit). As shown in Fig. 3, similar levels of the B subunit, which is indicative of translocation and processing of PA, were observed in all strains including in *E. coli* DADE. Thus, under the conditions tested PA does not appear to be translocated in a Tat-dependent manner.

Discussion

In the present study we show that a number of mutations in the translation initiation region of the *E. coli pac* gene led

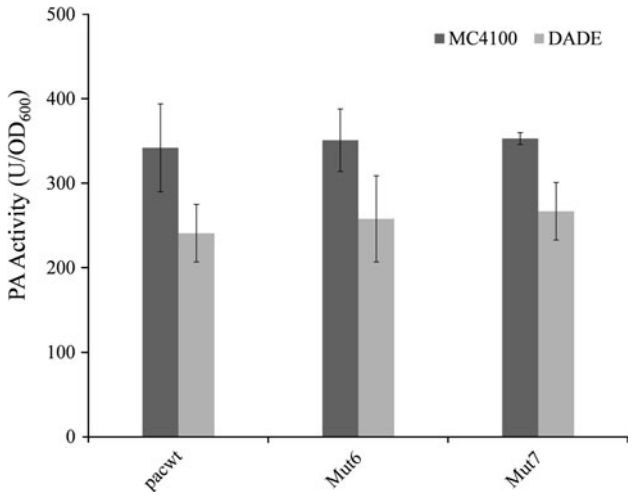


Fig. 2 PA activity in the total cell fractions of strains containing pMMB constructs, in *E. coli* MC4100 (*dark shaded bars*) and *E. coli* DADE (*light shaded bars*). Strains were grown for 20 h at 26°C, after which activity was determined (data represent the average of three experiments)

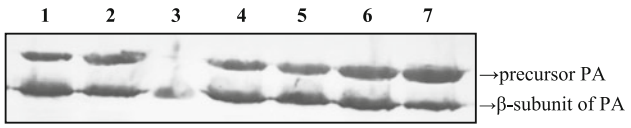


Fig. 3 Western blot analysis of total cell lysate from wild type *E. coli* MC4100 and *E. coli* DADE containing pMMB constructs with pac_{wt}, Mut6 or Mut7 (grown for 20 h at 26°C with 0.1 mM of IPTG). An equivalent number of cells was loaded in each lane. The primary antibody used was a polyclonal antibody against PA. *lane 1*, *E. coli* MC4100 (pMMB-PACwt); *lane 2*, *E. coli* DADE (pMMB-PACwt); *lane 3*, purified PA; *lane 4*, *E. coli* MC4100 (pMMB-PACOA7); *lane 5*, *E. coli* DADE (pMMB-PACOA7) *lane 6*, *E. coli* MC4100 (pMMB-PACOA6); *lane 7*, *E. coli* DADE (pMMB-PACOA6)

to increased PA activity. Firstly, the length of the spacer between the SD and the start codon is an important determinant, as PA activity increases markedly when the spacer is lengthened from 4 to 6 or 8 nucleotides. This is not unusual as it has been shown that the optimal spacer length between the SD motif and the initiation codon is between 7 and 12 nucleotides (Ma et al. 2002). Note that the mutated spacer sequences used in this study are enriched with A/T nucleotides, which could also have contributed to increased translation initiation (Hwang et al. 1990).

The sequence of the RBS of the *pac* gene is GAGGA, which can interact in two different ways with the 3′ end of the 16S rRNA sequence (Keilmann et al. 1993), with SD1 being GAGG and SD2 being AGGA. We investigated this by changing the second A into a T, which resulted in a further increase in PA activity. This suggests that there is a competition between SD1 and SD2, with binding to SD2 resulting in a lower rate of translation. That might be caused by a difference in spacer length if binding to either SD1 or SD2 is a determinant for efficient production. However, an alternative explanation is that SD2 is never used and that it is a change in the composition of the spacer that influences the rate of translation by, for instance, influencing the secondary structure of the mRNA (Laursen et al. 2002).

In addition to the RBS and spacer region between the AUG and SD sequence, the downstream region has also been shown to be involved in translation enhancement of *E. coli* gene expression (Stenström et al. 2001a; 2001b). Both Mut6 and Mut7 mutations, having altered nucleotides at codons +2 and +4, resulted in increased amounts of PA activity. There may be a number of reasons for this, such as the use of the rare AGA codon (Arg) in the second codon position for Mut6 (Chen and Inouye 1990; Zalucki et al. 2009), and the A-rich downstream region for Mut7 (Brock et al. 2007). However, we only determined the amount of active (thus secreted) PA, and a more detailed analysis will therefore be performed in a future study.

Improvement of the amount of PA activity in the mutants was not observed when the low copy number vector pMMB was used for expression of the *pac* gene. The reason for this is not clear, but it is conceivable that the level of expression achieved through the more efficient *tac* promoter (de Boer et al. 1983) on pMMB vectors could not be further improved through alterations in the translation initiation region of the *pac* gene, while such improvements could be seen with the weaker *lac* promoter on pUC plasmids.

Surprisingly, translocation of PA to the periplasm was not affected significantly in a strain that lacks all *tat* genes, while it had been suggested that PA is a substrate of the Tat pathway (Ignatova et al. 2002). Notably, the Tat motif in the PA signal peptide (RNRMIVN) is quite distinct from the consensus *E. coli* Tat motif S/TRRxFLK (Berks 1996). Only very few natural Tat substrates have been found lacking one of the two arginine residues, an example being the TtrB subunit of *Salmonella enterica* tetrathionate reductase. However, in the case of TtrB it was shown that the single Arg residue in the Tat motif is essential for translocation; even a conservative replacement (Lys) prevented transport (Hinsley et al. 2001). In the case of PA, replacing Arg6 with Lys (Ignatova et al. 2002) or Arg4 with a Lys (this study) did not affect transport. It thus seems more likely that PA does not rely fully (if at all) on the Tat pathway, but mainly uses the most common route for export in *E. coli*, the Sec pathway (Natale et al. 2008). Interestingly, *E. coli* PA is also transported independently of the Tat pathway in *Pseudomonas aeruginosa* (Krzeslak et al. 2009), which corroborates our suggestion that PA is a Sec-dependent protein.

Acknowledgments Regrettably, during preparation of this paper Prof Füsun Gümüşel passed away, and we dedicate this paper to her

memory. The authors would like to thank Prof. Michael Bagdasarian for plasmid pMMB208 used in this study. Additionally, we would like to thank our lab members for their assistance. This work was supported by the Research Fund of Gebze Institute of Technology (BAP, 2006-A4).

References

Balasingham K, Warburton D, Dunnill P, Lilly MD (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 276:250–256

Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? Mol Microbiol 22:393–404

Brock JE, Paz RL, Cottle P, Janssen GR (2007) Naturally occurring adenines within mRNA coding sequences affect ribosome binding and expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol 189:501–510

Chen GF, Inouye M (1990) Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. Nucleic Acids Res 18:1465–1473

Chou CP, Kuo B-Y, Lin W-J (1999) Optimization of the host/vector system and culture conditions for production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng 88:160–167

de Boer AH, Comstock JL, Vasser M (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. Proc Natl Acad Sci USA 80:21–25

de Smit MH, van Duin J (1990) Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 38:1–35

de Smit MH, van Duin J (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. J Mol Biol 235:173–184

Draper DE (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*, volume I: translational initiation, 2nd edn. ASM Press, Washington, DC, pp 902–908

Elander RP (2003) Industrial production of beta-lactam antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol 61:385–392

Gualerzi CO, Brandi L, Caserta E, Garofalo C, Lammi M, La Teana A, Petrelli D, Spurio R, Tomšic J, Pon CL (2001) Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 66:363–376

Gümüşel F, Kiremit N, Issever S, Ogras TT, Bermek E (1996) PCR-cloning of the *pac* gene from *E. coli* ATCC 11105-Observations on the expression of a recombinant periplasmic protein. Biochem Mol Biol Int 38:315–324

Gümüşel F, Ozturk SI, Korkut NK, Gelegen C, Bermek E (2001) Cloning and expression of the penicillin acylase gene (*pac*) from *E. coli* ATTCC 11105. Enzyme Microbl Tech 29:499–505

Hewitt L, Kasche V, Lummer K, Lewis RJ, Murshudov GN, Verma CS, Dodson GG, Wilson KS (2000) Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. J Mol Biol 302:887–898

Hinsley AO, Stanley NR, Palmer T, Berks BC (2001) A naturally occuring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus motif. FEBS Lett 497:45–49

Hwang LHS, Chen BF, Lin HM, Soong LL, Jou YS, Chang WC, Liu ST (1990) The striking effects of spacer and terminator sequences on the synthesis of porcine growth hormone in *Escherichia coli*. Biotechnol Lett 12:335–340

Ignatova Z, Hörnle C, Nurk A, Kasche V (2002) Unusual signal peptide directs penicillin acylase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. Biochem Biophys Res Commun 291: 146–149

Issever Ozturk S (2002) The Investigation of the effects of the modifications introduced by site-directed mutagenesis on the gene control region in the penicillin acylase (PA) model system and determination of the promotor from which gene expression directed. Dissertation, Istanbul University, Turkey

Keilmann C, Wanner G, Böck A (1993) Molecular Basis of the exclusive low-temperature synthesis of an enzyme in *E. coli*: Penicillin acylase. Biol Chem Hoppe-Seyler 374:983–992

Krzeslak J, Braun P, Voulhoux R, Cool RH, Quax WJ (2009) Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biotechnol 142:250–258

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685

Laursen BS, Steffensen S, Hedegaard J, Moreno JM, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU (2002) Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial *infB* gene. Genes Cells 7:901–910

Looman AC, Bodlaender J, Comstock LJ, Eaton D, Jhurani P, de Boer HA, van Knippenberg PH (1987) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified *lacZ* gene in *Escherichia coli*. EMBO J 6:2489–2492

Ma J, Campbell A, Karlin S (2002) Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. J Bacteriol 184:5733–5745

Morales VM, Backman A, Bagdasarian M (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. Gene 97:39–47

Natale P, Bruser T, Driessen AJ (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. Biochim Biophys Acta 1778: 1735–1756

Shine J, Dalgarno L (1974) The 3′-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc Natl Acad Sci USA 71:1342–1346

Stenström CM, Holmgren E, Isaksson LA (2001a) Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation. Gene 273:259–265

Stenström CM, Jin H, Major LL, Tate WP, Isaksson LA (2001b) Codon bias at the 3′-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. Gene 263:273–284

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure, and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350–4354

Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, Palmer T (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in Sec independent protein export. J Biol Chem 275:16717–16722

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors, and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18, and pUC19 vectors. Gene 33:103–119

Zalucki YM, Beacham IR, Jennings MP (2009) Biased codon usage in signal peptides: a role in protein export. Trends Microbiol 17: 146–150