

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN
DNA POLİMERAZ I'İN KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Cemal SANDALLI

NİSAN 2007

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN
DNA POLİMERAZ I'İN KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Cemal SANDALLI

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor”**

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Enstitüye Verildiği Tarih : 10.04.2007

Tezin Savunma Tarihi : 19.04.2007

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Edip KEHA
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Betül KIRDAR
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKCI

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2007

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Suşundan DNA Polimeraz I’in Klonlanması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma TUBİTAK-105T216 nolu proje ile ve K.T.Ü Bilimsel Araştırma Fonu–2005.111.04.1 nolu projeden sağlanan destek ile Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, konunun seçilmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, yüksek biyolog Hakan KARAOĞLU’na, Arş. Gör. Aykut SAĞLAM’a, Arş. Gör. Serdar ÜLKER’e ve tüm K.T.Ü. Trabzon Fen Edebiyat Fakültesi ve Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümleri çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Aynı zamanda bu çalışmayı yapabilmem için desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Fakülte Dekanım Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU’na ve değerli Bölüm Başkanım sayın Yrd. Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ’e teşekkürlerimi sunarım.

Erasmus-Socrates öğrenci değişim programı kapsamında laboratuvarında bulunduğum ve DNA polimeraz I geninin bir kısmının nükleotit sırasını belirlemem için desteklerini gördüğüm Belçika-Gent Üniversitesinden Prof. Dr. Marc CLAEYSSSENS’e ve Dr. Karl RUMBOLD’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın enzime ait biyokimyasal karakterizasyonun yapılabilmesi için gerekli desteği esirgemeyen New Jersey Medicine and Dentistry Üniversitesi, Biyokimya Bölümünden Prof Dr. Mukund J. MODAK’a ve laboratuvar ekibinden Dr. Kamalendra SINGH’a, Dr. Amit KETKAR’a ve Pinky KUKRETTI’ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik hayatım boyunca onların maddi ve manevi destekleri ile bu günlere geldiğim sevgili aileme ve yoğun çalışma dönemimin en yoğun zamanlarında maddi ve manevi her konuda yanımda olan sevgili eşim Aytül SANDALLI’ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Cemal SANDALLI

Trabzon 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. DNA Polimeraz Familyaları.....	3
1.2.1. A Familyası DNA Polimerazlar.....	3
1.2.2. B Familyası DNA Polimerazlar.....	3
1.2.3. C Familyası NA Polimerazlar (<i>PolD</i>).....	4
1.2.4. D Familyası DNA Polimerazlar.....	4
1.2.5. X Familyası DNA Polimerazlar.....	5
1.2.6. Y Familyası DNA Polimerazlar	5
1.3. Üç Boyutlu Yapı Yönünden DNA Polimeraz I Enzimleri.....	6
1.3.1. 5'→3' Ekzonükleaz Domein “Enzimin N-Ucu”.....	7
1.3.2. 3'→5' Ekzonükleaz Bölge “Enzimin N-ucu ile C-Ucu Arası Kısım”.....	8
1.3.3. 5'→3' Polimeraz Bölge “Enzimin C-Ucu”.....	9
1.4. DNA Sentez Mekanizması	11
1.4.1. Polimereaz Enzimin DNA'ya Bağlanması	11
1.4.2. Enzimin Nükleotiti Bağlaması	13
1.5. DNA Polimerazlar İçin İki-Metal-İyon Mekanizması/Nükleofilik Atak.....	15
1.6. DNA Polimeraz Enzimlerinin Hata Yapma Oranı (Fidelity).....	17
1.7. DNA Polimeraz I Familyası Enzimlerin dNTP ve ddNTP İlgisindeki Farklılığın Mekanizması.....	19
1.8. Prokaryotik DNA Polymerase I'in Evolusyonu, Yapısı ve Nükleotit Seçme Mekanizması.....	21
1.9. Polimeraz I Enziminin Aktif Bölgesinin Üç Boyutlu Yapısı.....	22

1.10.	Termofilik Mikroorganizmaların Orijini.....	23
1.11.	Endüstriyel Termofilik Organizmalar.....	24
1.12.	Endüstriyel Termofilik Enzimler.....	24
1.13.	Amaç ve Önemi.....	27
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyeri ve Vektörler.....	28
2.2.	Çözeltiler ve Tamponlar.....	29
2.3.	Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri ve Genel Özellikleri.....	29
2.4.	Kompetant Hücre Hazırlanması	30
2.5.	Pol I Geninin Tüm Nükleotit Sırasının Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar.....	30
2.5.1.	Gene Ait Korunmuş Bölgenin Klonlanması.....	30
2.5.2.	Genomik DNA İzolasyonu.....	30
2.5.3.	Ters PZR İçin DNA Örneklerinin Hazırlanması.....	31
2.5.4.	Gene Ait İlgili Kısımların Ters PZR ile Çoğaltılması	32
2.5.5.	Ters PZR ile Çoğaltılan Fragmentlerin Baz Sırasının Belirlenmesi.....	33
2.5.6.	Ters PZR ile Elde Edilen Polimeraz I'e Ait Sekansların Birleştirilmesi.....	34
2.6.	<i>Gca</i> TK4 DNA Polimeraz I Enzimine Ait Amino asit Sıranın Bilinen Diğer DNA Polimeraz I Enzimleri ile Karşılaştırılarak İncelenmesi.....	34
2.7.	DNA Polimeraz I Geninin Ekspresyonu.....	35
2.7.1.	PZR ile Genin Çoğaltılması.....	35
2.7.2.	Genin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	36
2.7.3.	Genin pET-15b Vektörüne Klonlanması.....	36
2.7.4.	Genin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonunun Gözlenmesi	37
2.8.	DNA Polimeraz I'in Saflaştırılması.....	37
2.8.1.	DEAE-Selüloz Kromatografi.....	38
2.8.2.	BioRex 70 Katyonik Kromatografi.....	39
2.8.3.	DNA Polimeraz I Enzimini İçeren Fraksiyonların Konsantre Edilmesi ve Protein Miktarının Belirlenmesi.....	39
2.9.	Mutant Proteinlerin Hazırlanması.....	40
2.10.	Enzim Substratların Hazırlanması.....	41
2.10.1.	Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Primerlerin Sentezlenmesi.....	41
2.10.2.	Substratların Radyoaktif Olarak 5' Ucundan İşaretlenmesi.....	42
2.10.3.	Tek İplik DNA'nın 3'-ucundan İşaretlenmesi	43

2.10.4.	Çift Zincir DNA Substratların Hazırlanması.....	44
2.10.5.	Substratlara Ait Derişimler.....	46
2.11.	<i>Gca</i> TK4 DNA Polimeraz I Enziminin Karakterizasyonu.....	47
2.11.1.	pI Değerinin Belirlenmesi.....	47
2.11.2.	Özgöl Aktivitenin Belirlenmesi.....	47
2.11.3.	Primer Uzatma Deneyi.....	48
2.11.4.	Optimum Bir ve İki Değerli Katyon Derişiminin Belirlenmesi.....	48
2.11.5.	pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi	49
2.11.6.	Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi.....	49
2.11.7.	Enzimin Isıl Kararlılığının Belirlenmesi.....	50
2.11.8.	Özgöl K_D DNA Değerinin Belirlenmesi.....	50
2.11.9.	K_D^{dNTP} ve K_{pol} Değerinin Presteady Kinetik ile Belirlenmesi.....	51
2.11.10.	RNA-Bağımlı DNA Polimeraz Aktivitesinin Araştırılması.....	52
2.11.11.	Hata Yapma Oranının (Fidelity) Belirlenmesi.....	52
2.12.	<i>Gca</i> TK4 DNA pol I'in 3'→5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması....	53
2.12.1.	3'-OH Uçta Tek Baz Hatalı Eşleşmiş Çift Zincir DNA Substrat Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitenin Araştırılması.....	53
2.12.2.	Tek Zinzir DNA Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitenin Araştırılması....	53
2.13.	<i>Gca</i> TK4 DNA Pol I'in 5'→3' Nükleaz Aktivitenin Araştırılması.....	54
2.13.1.	5'→3' Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi	54
2.13.2.	5' Nükleaz Kesim Profilinin Aralık ve Çentikli DNA İle Belirlenmesi.....	54
2.13.3.	Primerin 3' unda Eşleşmemiş Tek Bazın Varlığında 5' Nükleaz Aktivitesi	55
2.13.4.	5'→3' Özgöl Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	55
2.14.	Enzimin DIG-dUTP'yi Kullanabilme Özelliğinin Araştırılması.....	55
2.14.1.	DIG-dUTP'yi Kullanabilirliğinin Sentetik DNA ile Gösterilmesi.....	56
1.14.2.	Primer 3'-Ucunun DIG-dUTP ile Doldurulması.....	56
2.15.	<i>Gca</i> TK4 DNA Pol I'in ddNTP İlgisinin Belirlenmesi.....	56
2.15.1.	Enzimin Üç dNTP ve Bir ddNTP Varlığında ddNTP'ye İlgisi.....	56
2.15.2.	Sabit dNTP (50µM) ve Değişik ddNTP Derişiminde ddNTP'ye İlgisi.....	57
2.15.3.	Sabit ddNTP (700 µM) ve Değişik dNTP Derişiminde ddNTP'ye İlgisi.....	58
2.16.	F721Y Mutantı Protein ile ddNTP'ye İlgisinin İncelenmesi.....	58
2.16.1.	Sabit dNTP (50 µM) ve Yüksek ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisi.....	58

2.16.2.	Sabit dNTP (120 μ M) ve Düşük ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisinin Araştırılması.....	59
2.18.	Enzimin Zincir Uzaklaştırma (Strand Displacement) Özelliğinin İncelenmesi.....	59
3.	BULGULAR.....	60
3.1.	Genin Klonlanması.....	60
3.1.1.	Ters PZR İle Genin 3' Kısmının Tamamlanması.....	60
3.1.2.	Genin 5' Kısmının Ters PZR İle 585. Nükleotide Kadar Tamamlanması.....	61
3.1.3.	Genin Başlangıç Kodonuna Kadar Nükleotit Sırasının Belirlenmesi.....	61
3.2.	Diğer Polimeraz I Ailesine Ait Enzimlerle Karşılaştırılması.....	62
3.3.	DNA Polimeraz I Geninin Ekspresyonu.....	65
3.3.1.	Genin pET-15b Vektörüne Klonlanması.....	65
3.3.2.	p <i>Gca</i> Pol-I Vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Gözlenmesi.....	65
3.4.	<i>Gca</i> TK4 DNA Polimeraz I'in Saflaştırılması.....	66
3.5.	Mutant Proteinlerin Hazırlanması.....	67
3.6.	Karakterizasyona Ait Bulgular.....	68
3.6.1.	Enzimin pI Değerinin Belirlenmesi.....	68
3.6.2.	Enzimin Özgül Aktivitesinin Belirlenmesi.....	68
3.6.3.	Optimum Bir ve İki Değerli İyon Derişiminin Belirlenmesi.....	69
3.6.4.	Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	71
3.6.5.	Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi.....	71
3.6.6.	Isıl Kararlılığının Belirlenmesi.....	72
3.6.7.	K_D DNA (Dissociation veya Binding rate) Değerinin Belirlenmesi.....	73
3.6.8.	K_D^{dNTP} ve k_{pol} Değerinin Presteady Kinetik İle Hesaplanması.....	73
3.6.9.	RNA-Bağımlı DNA Polimeraz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	75
3.6.10.	Enzimin Hata Yapma Oranının Belirlenmesi.....	76
3.6.11.	3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	78
3.7.	5' Nükleaz Aktivitesinin Karakterize Edilmesi.....	81
3.7.1.	Enzimin 5' Nükleaz Kesim Profilinin Araştırılması.....	82
3.7.2.	3' Primer Uçta Eşleşmemiş Bir Baz Varlığının Enzimin 5' Nükleaz Aktivitesine Etkisi.....	84
3.7.3.	Özgül 5' Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	85
3.8.	DIG-dUTP İle Enzimin Sentez Aktivitesinin Belirlenmesi.....	85

3.8.1.	Dana Timus DNA Kullanarak Aktivitenin Belirlenmesi.....	81
3.8.2.	Sentetik DNA Kullanılarak	86
3.8.3.	Enzimin Son Nükleotiti Ekleme Özelliğinin Belirlenmesi.....	87
3.9.	ddNTP'ye İlginin Belirlenmesi.....	89
3.9.1.	Yaban Tip Enzimin ddNTP İlgisinin İncelenmesi.....	89
3.9.2.	F712Y Mutantı Protein ile ddNTP'ye İlgisinin Araştırılması.....	90
3.9.3.	Sabit dNTP (120 µM) ve Düşük ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisinin Araştırılması.....	91
3.10.	Enzime Ait Zincir Uzaklaştırma Aktivitesinin Araştırılması.....	92
4.	TARTIŞMA.....	94
5.	SONUÇLAR.....	101
6.	ÖNERİLER.....	103
7.	KAYNAKLAR.....	104

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada, *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 (*Gca* TK4) suşundan DNA polimeraz I geni (DNA pol I) klonlandı ve *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilerek bazı biyokimyasal ve fiziksel özellikleri incelendi. *Gca* TK4 DNA polimeraz I genine ait tüm nükleotit sırası dejenerat primerler ve ters PZR reaksiyonu ile tamamlandı ve genin stop kodonu ile birlikte 2637 bç olduğu belirlendi. Amino asit sırası bakımından diğer *Bacillus* ve *Geobacillus* DNA polimeraz I enzimlerine %89 benzer olduğu bulundu. 5'→3' nükleaz ve polimeraz aktivitesi için korunmuş amino asitlere sahip olduğu, 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi için gerekli korunmuş amino asitlere ise sahip olmadığı belirlendi. Gen pET15b vektörüne klonlanarak, *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edildi ve protein sıcaklık uygulaması DEAE-selüloz ve BioRex 70 katyonik kromatografi ile saflaştırıldı. Rekombinant enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığının 55–60 °C, optimum pH'sının ise 7,5 ile 9,0 arasında olduğu tespit edildi. Enzimin 70 °C üzerindeki sıcaklıklarda 5 dakika bekletilme sonucu aktivitesini kaybettiği belirlendi. DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanarak DNA sentez aktivitesi gösterebildiği ve kalıp/primer kompleksinde, kalıp zincir üzerindeki son nükleotiti ekleyerek 3' ucuna ait boşlukları doldurabildiği belirlendi. DNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için Mg^{+2} metal iyonuna (7 mM), RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için Mn^{+2} metal iyonuna (6 mM) ihtiyaç duymaktadır. Mg^{+2} ile özgül aktivitesi 495,000 ünite/mg olarak hesaplandı. K_D DNA değeri 0,192 nM, K_D^{dNTP} değeri ise 21,64 μ M olarak belirlendi. K_{pol} değeri ise 24,99 s^{-1} olarak belirlendi. Hem çift zincir DNA hemde tek iplik DNA ile herhangi bir 3'→5' ekzonükleaz aktivitesinin olmadığı, sarkık tek iplik 5' uç taşıyan DNA örnekleri ile 5' nükleaz aktivitesinin K_D değerinin 2,35 nM olduğu, enzimin çoğunlukla 5' sarkık ucu ve sarkık ucun başladığı noktada eşleşme yapmış iki nükleotit arasından kesim yaptığı belirlendi. *Gca* TK4 DNA pol I yaban tip enzimin ddNTP'ye duyarlı olmadığı ancak 712 numaralı Fenilalanin amino asiti Tirozin amino asitine dönüştürüldüğünde elde edilen mutant enzimin dNTP'ye olan ilgisinin nerede ise tamamen ddNTP'ye dönüştüğü belirlendi. Enzimin zincir uzaklaştırma aktivitesine sahip olduğu ve 721 numaralı Tirozin amino asiti Fenilalanin amino asitine dönüştürüldüğünde ise aktivitenin arttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Gca* TK4, DNA polimeraz, Mutasyon, Karakterizasyon

SUMMARY

Cloning and Characterization of the DNA Polymerase I from Thermophilic *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4

In this study, DNA polymerase I gene (DNAPOL) of a thermophilic *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 (*Gca* TK4) strain, was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), and then some biochemical and physical properties of the protein were investigated. The whole sequences of DNA pol I gene was determined by degenerate primers and inverse PCR. The gene with stop codon are 2637 bp (878 amino acids). In amino acid level, it has 80–90% homology to DNA pol gene of *Bacillus* and *Geobacillus*. While the enzyme has conserved amino acids for 5' nuclease and polymerase activity, it doesn't have conserved aminoacids for 3'→5' nuclease activity. The gene was cloned into pET15b vector and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain. The enzyme was purified with heat treatment and chromatography for biochemical characterization. It was found that enzyme shows optimal activity at 55–60°C and pH between 7.5–9.0 (Tris-HCl, 50 mM). Incubation at above 70°C for 5 minutes, it loses its activity above 70°C. Enzyme can use DIG-dUTP as a regular dNTP and synthesize the DNA. It can also add the last nucleotide on DNA. Enzyme needs Mg^{+2} (7 mM) ions and Mn^{+2} (6 mM) ions for DNA-dependent and RNA-dependent DNA polymerase activity respectively. Specific activity of the enzyme is 495,000 unites/mg with Mg^{+2} ions. K_D^{DNA} and K_D^{dNTP} are 0.192 nM and 21.64 μ M respectively. K_{pol} is 24.99 s⁻¹. It doesn't have any 3'→5' exonuclease activity with mismatch and single strand DNA. It has 5'→3' nuclease activity on 5' overhang DNA with specific activity of 2,35 nM. It can cut the overhang part of the DNA or between the two match nucleotide at the overhang part. It is not sensitive to ddNTP but when we changed the phenilalanine–712 to tyrosine enzyme mostly recognizes ddNTP instead of dNTP. Enzyme has strand displacement activity, especially by mutant enzyme with fenilalanine–721 instead of tyrosine721.

Key Words: *Gca* TK4, DNA polymerase, Mutant, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>E.coli</i> DNA polimeraz I enziminin Klenow Fragmentine ait yapı.	6
Şekil 2. DNA'nın yapısına göre polimeraz ve ekzonükleaz bölge ile olan ilişkisi..	9
Şekil 3. <i>Taq</i> polimeraz I ve <i>E. coli</i> DNA polimeraz I Klenow fragmentinin superpozisyonu.....	10
Şekil.4. Tek bir nükleotitin ilavesi esnasında gerçekleşen adımlar.....	11
Şekil 5. <i>Bst</i> DNA pol I (Kiefer vd., 1998), <i>Taq</i> DNA pol I (Li vd., 1998) ve T7 polimerazın (Doublet vd., 1998) aktif bölgesi.....	12
Şekil 6. <i>Taq</i> DNA polimeraz I enziminin içindeki 6 korunmuş bölgenin kapalı ve açık yapısı	13
Şekil.7. dNTP bağlanma esnasında görülen yapısal değişimler.....	14
Şekil 8. Nükleotit trifosfatın DNA'ya eklenmesindeki iki metal iyon mekanizması.....	16
Şekil 9. Farklı DNA polimeraz ailelerine ait tek baz değişimi ve delesyon hata oranlarının şematize gösterilmesi.....	18
Şekil 10. A familyası DNA polimerazlarında dNTP ve ribozu tanımaktan sorumlu olan amino asitler arasındaki ilişkiyi gösteren model.....	20
Şekil 11. Familya I'e ait DNA polimeraz enzimlerinin polimeraz bölgesinde yer alan korunmuş amino asitler.....	23
Şekil 12. Ters PZR'nun genel şemasının <i>Hinf</i> I ve <i>Cla</i> I için gösterilmesi.....	33
Şekil 13. <i>Gca</i> TK4 DNA polimeraz I enziminin saflaştırılmasında izlenen basamaklar.....	38
Şekil 14. Adenozin 5'-tri fosfatın (ATP) genel yapısı.....	42
Şekil 15. 3' ucunun işaretlenmesinde kullanılan 61-mer ve 14-mer DNA'nın hibridize olmuş durumu.....	43
Şekil 16. Deoksiguanozin 5'-tri fosfatın (dGTP) genel yapısı.....	43
Şekil 17. <i>Gca</i> TK4 DNA polimeraz I'e ait nükleotit sırası.....	61
Şekil 18. <i>Gca</i> TK4 DNA pol I'in diğer DNA polimeraz I enzimleri ile amino asit düzeyinde karşılaştırılması.....	62
Şekil 19. DNA pol I geninin %1,2'lik agaroz jel analizi.....	65
Şekil 20. <i>E. coli</i> BL21'e klonlanan <i>Gca</i> TK4 DNA pol I'in gen anlatım profilinin %8'lik SDS-PAGE'de analizi.....	66

Şekil 21.	<i>Gca</i> TK4 DNA polimeraz I enziminin saflaştırılma profilinin %8'lik SDS-PAGE'de analizi.....	67
Şekil 22.	2D jel elektroforezi ile proteinin pI değerinin belirlenmesi.....	68
Şekil 23.	Mg ⁺² derişiminin enzim aktivitesine etkisi.....	69
Şekil 24.	Mn ⁺² derişiminin enzim aktivitesine etkisi.....	70
Şekil 25.	Tek değerli iyon derişiminin (NaCl ve KCl) enzim aktivitesine etkisi.....	70
Şekil 26.	Enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi.....	71
Şekil 27.	Enzimin ısı kararlılığını üre-PAGE'de analizi.....	72
Şekil 28.	Enzimin DNA'ya bağlanmasının %6'lık PAGE'de analizi.....	73
Şekil 29.	K _D ^{dNTP} 'nin üre-PAGE ile analizi.....	74
Şekil 30.	Zamana bağlı ürün oluşumu.....	75
Şekil 31.	RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesinin üre-PAGE ile analizi	76
Şekil 32.	Enzimin hata yapma oranının sıcaklığa bağlı değişimin Üre-PAGE ile analizi.....	77
Şekil 33.	Üç dNTP'nin varlığında enzimin hata yapma oranının Üre-PAGE ile analizi.....	78
Şekil 34.	Çift zincir 3'→5' ucu hatalı eşleşmiş nükleotit varlığında 3' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi.....	79
Şekil 35.	Tek iplik DNA kullanılarak 3'→5' ekzonükleaz aktivitenin üre-PAGE analizi.....	80
Şekil 36.	DNA_56/14/38 (B) ve DNA_56/14/42 (A) ile 5' nükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi.....	82
Şekil 37.	Enzimin 5' nükleaz kesim profilinin üre-PAGE'de analizi	83
Şekil 38.	Primere ait 3' ucunda eşleşmemiş nükleotitin 5' nükleaz aktivitesi üzerine etkisinin üre-PAGE'de analizi.....	84
Şekil 39.	Özgöl 5' nükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi ile belirlenmesi	85
Şekil 40.	DIG-dUTP ve dana timus DNA ile enzimin aktivitesinin gösterilmesi	86
Şekil 41.	Sentetik DNA ve DIG-dUTP ile enzimin aktivitesinin üre-PAGE analizi..	87
Şekil 42.	Enzimin son nükleotiti ekleyebilme özelliğinin üre-PAGE ile analizi.....	88
Şekil 43.	50 µM dNTP ve 150 µM herbir ddNTP derişiminde ddNTP'ye ilgisinin üre-PAGE analizi.....	89
Şekil 44.	50 µM dNTP ve değişik ddNTP derişimlerinde ddNTP'ye ilgisinin üre-PAGE'de analizi.....	90
Şekil 45.	F712Y mutanıtı <i>Gca</i> TK4 DNA polimeraz I enziminin ddNTP ilgisinin üre-PAGE'de analizi.....	91
Şekil 46.	Sabit dNTP ve düşük ddNTP derişiminde ddNTP'ye ilginin üre-PAGE'de analizi.....	92

Şekil 47. Zincir uzaklaştırma aktivitesinin üre-PAGE’de analizi.....	93
--	----

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. DNA Polimeraz sınıfları.....	2
Tablo 2. DNA polimeraz I'e ait 5' nükleaz bölgede yer alan korunmuş amino asitler	8
Tablo 3. Ticari olarak kullanılan termofilik DNA polimeraz enzimleri.....	26
Tablo 4. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları.....	29
Tablo 5. Pol I genine ait nükleotit sırasın belirlenmesinde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve primerleri.....	31
Tablo 6. Benzerlik çalışmalarında kullanılan mikorganizmalara ait GenBank bilgileri.....	34
Tablo 7. Mutasyon çalışmalarında kullanılan primerler ve kullanım amaçları.....	40
Tablo 8. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tek iplik DNA'lar.....	41
Tablo 9. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan DNA'lara ait eşleşmeler.....	44
Tablo 10. Çift iplik DNA substratlarına ait derişim bilgileri.....	46
Tablo 11. Optimum Na, K, Mg ⁺² ve Mn ⁺² değerinin belirlenmesinde kullanılan mono ve di katyonik iyonlarına ait derişimler.....	48
Tablo 12. Optimum pH değerinin belirlenmesinde kullanılan pH aralıkları.....	49
Tablo 13. Reaksiyon bileşenleri ve zamana ait bilgiler.....	51
Tablo 14. Bir ddNTP ve üç dNTP derişimlerine ait bilgiler.....	57
Tablo 15. Sabit dNTP ve değişik ddNTP derişimlerine ait bilgiler.....	57
Tablo 16. Sabit ddNTP ve değişik dNTP derişimlerine ait bilgiler.....	58
Tablo 17. <i>Gca</i> TK4 polimeraz I geninin tüm nükleotit sırasının belirlenmesinde kullanılan restriksiyon endonükleaz, primerler ve PZR'de çoğaltılan fragmentin büyüklüğü	60
Tablo 18. 5' nükleaz bölgesinde yer alan korunmuş amino asitler.....	81

SEMBOLLER DİZİNİ

aa	: Amino asit
amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
atm	: Atmosfer
ATP	: Adenozin trifosfat
Asp	: Aspartik asit
Arg	: Arjinin
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumin
<i>BstI</i>	: <i>Bacillus stearothermophilus</i>
CaCl	: Kalsiyum klörür
C	: Derece
CTP	: Sitidin trifosfat
D	: Glutamik asit
dCTP	: deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deokasiguanozin trifosfat
ddATP	: Dideoksiadenin trifosfat
dd H ₂ O	: Çift distile su
ddCTP	: Dideoksisitidin trifosfat
ddGTP	: Dideoksiguanidin trifosfat
ddNTP	: Dideoksinükleotit trifosfat
DDT	: Ditiyotriol
ddTTP	: Dideoksitimidin trifosfat
DIG	: Dogoksigenin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozit trifosfat
dUTP	: Deoksiurasil trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E	: Aspartik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit

E-DNA	: Enzim-DNA
Exo	: Ekzonükleaz
gDNA	: Genomik DNA
Gly	: Glisin
Glu	: Glutamik asit
<i>Gka</i>	: <i>Geobacillus kaustophilus</i>
Ile	: İzolösin
IPTG	: İzopropiltiyo- β -galaktozid
K	: Potasyum
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
K_D^{dNTP}	: Optimum dNTP konsantrasyonunun yarısı
KF	: Klenow fragmenti
k_{kat}	: Dönüşüm sayısı
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
K_{pol}	: Polimerizasyon hızı
L	: Litre
LB	: Lauria-Bertani
LBA	: Lauria-Bertani agar
Lys	: Lizin
M	: Molar
Mg	: Magnezyum
mL	: Mililitre
Mn	: Manganez
<i>Mtb</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klörür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaPPi	: Sodyumpyrophosphat
NRA	: Radyo aktif olmayan
OD	: Optik yoğunluk
PAGE	: Poliakrilamidjelelektroforezi
<i>Pfu</i>	: <i>Pyrococcus furiosus</i>

Phe	: Fenilalanin
pol	: Polimeraz
PPi	: Pirofosfats
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<i>Pwo</i>	: <i>Pyrococcus woesei</i>
RA	: Radyoaktif
RE	: Restriksiyon enzimi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	: Ribonükleik asit
[S]	: Substrat konsantrasyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TBE	: Tris-borik asit-etilendiamintetraasetik asit
TCA	: Tri-kloro asetik asit
TdT	: Terminaldeoksinükleotidiltransferaz
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
<i>Tfi</i>	: <i>Thermus filiformis</i>
<i>Tfl</i>	: <i>Thermus flavus</i>
TP	: Kalıp-primer
TLS	: Translezyon sentez
Tm	: Erime sıcaklığı
<i>Tma</i>	: <i>Thermotoga maritima</i>
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
Tyr	: Tirozin
<i>Tth</i>	: <i>Thermus thermophilus</i>
Val	: Valin
Vent	: <i>Thermococcus litoralis</i>
V_{maks}	: Maksimum hız
Zn	: Çinko
X-Gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktozid
Å	: Angstrom
α	: Alfa

β	: Beta
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
η	: Eta
ϕ	: Fi
γ	: Gama
ι	: Iota
κ	: Kappa
λ	: Lamda
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ϵ	: Molar absorblama katsayısı
σ	: Sigma
θ	: Teta
ξ	: Zeta
3HdTT	: Tirişim

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

DNA Polimerazlar “polinükleotit polimeraz” olarak adlandırılan daha geniş bir enzim sınıfının içinde yer alırlar ve canlılarda genetik materyalin sentezini gerçekleştirerek nesilden nesile tam olarak geçmesini sağlarlar. Ancak DNA manipulasyonlarında *in vitro* kullanılabilirliğinin keşfedilmesinden sonra bu enzimler moleküler biyoloji çalışmalarının vazgeçilmezi olmuşlardır. Bu enzimler sentez için DNA’yı kalıp olarak kullanırlar ve kalıba uygun nükleotitlerin ilavesini katalizleyerek DNA’nın duplikasyonunu sağlarlar.

DNA’nın tamirinde birçok enzim görev alırken DNA’nın sentezi sadece DNA polimeraz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Mirzahi ve Anderson, 1998). İlk tanımlanan polimeraz enzimi, *E. coli* DNA Polimeraz I’dir ve 1956 yılında Kornberg ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. *E. coli*’ye ait diğer iki polimeraz olan DNA Polimeraz II ve DNA Polimeraz III’ün izolasyonu 15 yıl sürmüştür ve DNA Polimeraz III’ün DNA Polimeraz I’den farklı olduğu ve *E. coli*’de DNA’nın önemli kısmının replikasyonunu gerçekleştirdiği bulunmuştur. Daha sonraları DNA polimerazlar ökaryotlardan, arkae bakterilerden, virüslerden ve plazmitlerden izole edilmiştir.

Özellikle son yıllarda birçok mikroorganizmanın genom sekansının belirlenmesi sonucunda çok sayıda yeni DNA polimeraz keşfedilmiştir. Bu DNA polimerazlar sadece DNA’nın replikasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda DNA’nın tamirini ve rekombinasyonunu da gerçekleştirmektedirler. Ayrıca genel bir üç boyutlu çalışma yapısını ve nükleotitlerin eklenmesi ve uzaklaştırılmasında genel bir mekanizmayı paylaşmak, yapısı bilinen tüm DNA polimerazların karakteristiğidir. Amino asit sırası benzerlikleri ve yapısal analizler temel alınarak DNA polimerazlar 6 ailede sınıflandırılır (Tablo 1) (Braithwaite ve Ito., 1993; Cann vd., 1999; Ito ve Braithwaite, 1991; Ohmori ve vd., 2001).

Bütün ökaryotik ve prokaryotik DNA polimerazlar aynı sentez aktivitesini gösterirler. Buna ilaveten bazı DNA polimerazlar ikinci ve üçüncü bir aktivite gösterebilirler. Bu aktivite, 3’→5’ ekzonükleaz aktivitesi (proofreading aktivite) ve 5’→3’ nükleaz aktivitesi veya her ikisi birden olabilir.

Tablo 1. DNA polimeraz sınıfları

A (pol I) Familyası	Fonksiyonu
<i>E. coli</i> pol I	Bakteri DNA tamiri ve boşlukların doldurulması
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Bakteri DNA'sının replikasyonu
T7 DNA polimeraz	Bakteriyofaj replikasyonu
İnsan pol θ	Mitokondriyal DNA replikasyonu
İnsan pol γ	DNA çapraz bağların tamiri
B (α -benzeri) Familyası	
Hücrel olanlar	
İnsan pol α	α Priming leading/lagging strand
İnsan pol δ	İnsan genomunun replikasyonu
İnsan pol ϵ	İnsan genomunun replikasyonu
İnsan pol ξ	Bypass sentezi
Bakteriyel/Viral olanlar	
<i>E. coli</i> pol II	Tamir
T4 DNA polimeraz	Faj replikasyonu
RB69 DNA polimeraz	Faj replikasyonu
Vaccinia DNA polimeraz	Virus replikasyonu
Herpes simplex DNA polimeraz	Virus replikasyonu
Adenovirus DNA polimeraz	Virus replikasyonu
ϕ 29 DNA polimeraz	Faj replikasyonu
pGKL1	Plazmit replikasyonu
C Familyası	
<i>E. coli</i> pol III	<i>E. coli</i> genomunun replikasyonu
<i>B. subtilis</i> pol III	<i>B. subtilis</i> genomunun replikasyonu
D Familyası	
DNA pol D	Euryarchaeot'ların replikasyonu
X Familyası	
Human DNA polymerase β	Baz kesip-çıkarma
Human pol λ	Mayoz esnasında DNA'nın tamiri
Human pol μ	Hücrel hipermutasyon
Human pol σ	Kardeş kromatitlerin yapışması
Human terminal deoxynucleotidyl	Antijen-alıcı çeşitlilik
Transferase (TdT)	
Y (<i>UmuC/DinB/RevIp/Rad30</i>) Familyası	
<i>E. coli</i> pol IV (<i>DinB</i>)	Bypass sentez/amaçlanmayan mutasyonlar
<i>E. coli</i> pol V (<i>UmuDC</i>)	SOS lezyon tamiri ve amaçlanmayan mutasyonlar
Human pol κ	Bypass sentez
Human pol η (<i>XPV</i>)	Hatasız translezyon sentezi
Yeast pol η (<i>Rad30</i>)	Hatasız translezyon sentezi
Human pol ι	Hata meyilli translezyon sentezi
Human Rev1	Abazik bölge sentezi

1.2. DNA Polimeraz Familyaları

1.2.1. A Familyası DNA Polimerazlar

E. coli DNA polimeraz I'e benzeyen polimerazlar, familya A DNA Polimerazlar olarak isimlendirilirler ve aynı zamanda pol I familyası olarak da bilinirler. Familya A, en çok çalışılan DNA polimeraz enzimlerini kapsamaktadır ve ilk tanımlanan DNA polimeraz I (*E. coli* DNA polimeraz I) bu familyaya aittir. Ayrıca Klenow fragmenti (5' nükleaz bölgenin uzaklaştırılması sonrası 3' ekzonükleaz ve polimeraz kısmın tamamı) ilk olarak bu familya DNA polimerazlarında tanımlanmıştır. İlk kristal yapı çalışmaları ve enzim substrat ilişkisi *E. coli* DNA polimeraz I'de gösterilmiştir. Daha sonraları tanımlanan ve küt uç DNA ile kompleks yapmış *Taq* DNA polimeraz I'in kristal yapısı enzimin aktif bölgesinin tanımlanmasını sağlamış ve *E. coli* DNA polimeraz I ile aynı düzende olduğu gösterilmiştir. Yine bu familyaya ait olan T7 DNA polimeraz I ve *Bacillus stearothermophilus* DNA polimeraz I ile primer-kalıp DNA ve nükleotitlerin varlığında yapılan kristallendirme çalışmaları polimerizasyon esnasındaki bir DNA polimeraz enziminin çalışma şeklinin belirlenmesini sağlamıştır.

1.2.2. B Familyası DNA Polimerazlar

Bu familya DNA polimerazları, Polimeraz II olarak adlandırılmaktadır. B familyasına ait DNA polimerazların çoğu ökaryotik polimerazlar olan DNA polimeraz α , δ , ϵ , ve ζ ile arkea bakterilere ait olan replikatif DNA polimerazları kapsar (Hopfner ve vd., 1999). Ayrıca son zamanlarda üç boyutlu yapısı tam olarak aydınlatılan bazı bakteri ve bakteriyofaj DNA polimerazları da bu familya içinde yer alır (Wang vd., 1997) ve bunların en iyi bilinenleri T4, Phi29 ve RB69 bakteriyofajına ait olan polimerazlardır. B familyasına ait DNA polimerazlar sentez esnasında çift zincir DNA'yı açarken aynı zamanda kalıp üzerinden sentez fonksiyonunu da yürütmektedir. Bu familyada yer alan DNA polimeraz enzimlerinin en önemli özelliği ekstre şartlar altında dahi fevkalade yüksek doğrulukta DNA replikasyonunu gerçekleştirebilmeleridir. Çoğu B familyası DNA polimerazlar çok güçlü bir 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye sahiptir (DNA polimeraz α ve ζ hariç).

Bu familyaya ait DNA polimeraz enzimleri amino asit düzeyinde N-uçtan C-uca doğru incelendiğinde, C-uçta yer alan polimeraz bölgesine ilaveten 3'→5' ekzonükleaz bölgesine ve henüz fonksiyonu bilinmeyen bir N-uç bölgesine sahip olduğu

gözükmektedir. Ekzonükleaz ve palm bölgeleri, A familyası polimerazlarla aynı genel yapıya sahip olup, polimeraz ve nükleaz aktivite için benzer metal esaslı mekanizmayı kullanırlar. Fingers ve thumb bölgeleri ise diğer polimeraz familyaları ile benzerlik göstermemektedir (Wang vd., 1997).

Sekans benzerliği ve kristal çalışmaları B familyası DNA polimerazların nükleotit transferi için gerekli olan üç adet korunmuş karboksilik amino asit taşıdığını göstermektedir. *Thermococcus gorgonarius*'de bu korunmuş amino asitlerden E578 ve E580, Mg⁺² ve Zn⁺² için bağlanma özelliği gösterirken, diğer karboksilik amino asit olan Asp404, dNTP'nin fosfatına bağlanma ve katalizleme özelliği gösterir (Hopfner vd., 1999).

1.2.3. C Familyası DNA Polimerazlar

C familyası DNA Polimerazlar hücre içinde genetik materyalin replikasyonunu gerçekleştiren esas enzimlerdir. Kendi içinde sınıf-I (*E. coli* DNA Polimeraz C-tipi), sınıf-II (*Bacillus subtilis* DNA Polimeraz C-tipi) ve sınıf-III (*Cyanobacteria* pol C-tipi) şeklinde en az üç farklı sınıfa ayrılırlar. Şu ana kadar tanımlanan bazı bakterilere ait C familyası polimerazlara ait enzimlerin moleküler ağırlıkları: *Aquifex* dnaE= 133.200 kDa (Deckert vd., 1998), *Bacillus subtilis* E1 = 125.384 kDa (Kunst vd., 1997), *E. coli* dnaE = 129.903 kDa (Tomasiewicz ve McHenry, 1987) ve *Mycobacterium tuberculosis* DnaE2 = 116.483.67 (Helena vd., 2003). Bu familya polimerazları 3' ekzonükleaz aktivitesi için 3 adet korunmuş bölgeye sahiptir (Exo I, Exo II, Exo III). Ancak 3' ekzonükleaz bölge IIIC motifi HxAxxD şeklindedir ve DNA polimeraz A ve B'de yaygın olan YxxxD motifinden farklıdır (Barnes vd., 1995; Huang vd., 1997; Ito ve Braithwaite, 1998).

1.2.4. D Familyası DNA Polimerazlar (PolD)

D familyası DNA Polimerazlar, polimerizasyon ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olan yeni bir DNA polimeraz familyasıdır. 3'→5' ekzonükleaz bölgeye sahip olması yüksek doğrulukta DNA sentezi yapmasına yardımcı olur ve bu bölge üzerinde 3'→5' ekzonükleaz bölge için korunmuş üç adet motife sahiptir. 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye ilaveten çok güçlü ve prosesitivitesi bir DNA polimeraz aktivitesi gösterirler. D familyasına ait DNA polimeraz enzimi daha çok arkaebakterilerde bulunur (Cann vd., 1998; Uemori vd., 1997; Shen vd., 2001).

Bu familyaya ait DNA polimerazlarda polimerizasyon, enzimin C-terminal kısmında yer alan katalitik amino asitler tarafından gerçekleştirilmesine rağmen birçok yönü henüz aydınlatılmamıştır. Çok güçlü bir 3'→5' ekzonükleaz bölgeye sahip olmasına rağmen diğer DNA polimeraz enzimlerinin bu aktivite için sahip olduğu korunmuş amino asitlerin hiç birine benzer amino asitlere sahip değildir. Ayrıca polimerizasyon aktivitesi içinde diğer polimerazların sahip olduğu genel motiflere sahip değildir ve magnezyum yerine manganez metal iyon olarak kullanıldığında daha güçlü aktivite göstermektedir. Şu ana kadar 12 arkaebakteri türünde bu familyaya ait DNA polimeraz enzimi tanımlanmıştır: *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermoplasma volcanium*, *T. acidophilum*, *Methanopyrus kandleri*, and *Halobacterium* sp. NRC01 (Yulong vd., 2004).

1.2.5. X Familyası DNA Polimerazlar

X familyasına ait DNA Polimeraz enzimleri virüslere ve ökaryotik DNA polimerazlara ait DNA polimeraz enzimlerini kapsar ve baz kesip çıkarma şeklinde DNA'nın tamirini gerçekleştirir. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda bu enzimin düşük doğruluk ile DNA'nın sentezini gerçekleştirdiğini göstermiştir. Bu familya DNA polimerazları metal iyon olarak Mg^{+2} yerine Mn^{+2} 'yi kullanarak aktivite gösterirler. Bu familya DNA polimerazları içerisinde insan polimeraz β , λ , pol μ ve terminal deoksiribonukleotidil transferaz ile maya Pol4 enzimi yer almaktadır (Hubscher vd., 2002).

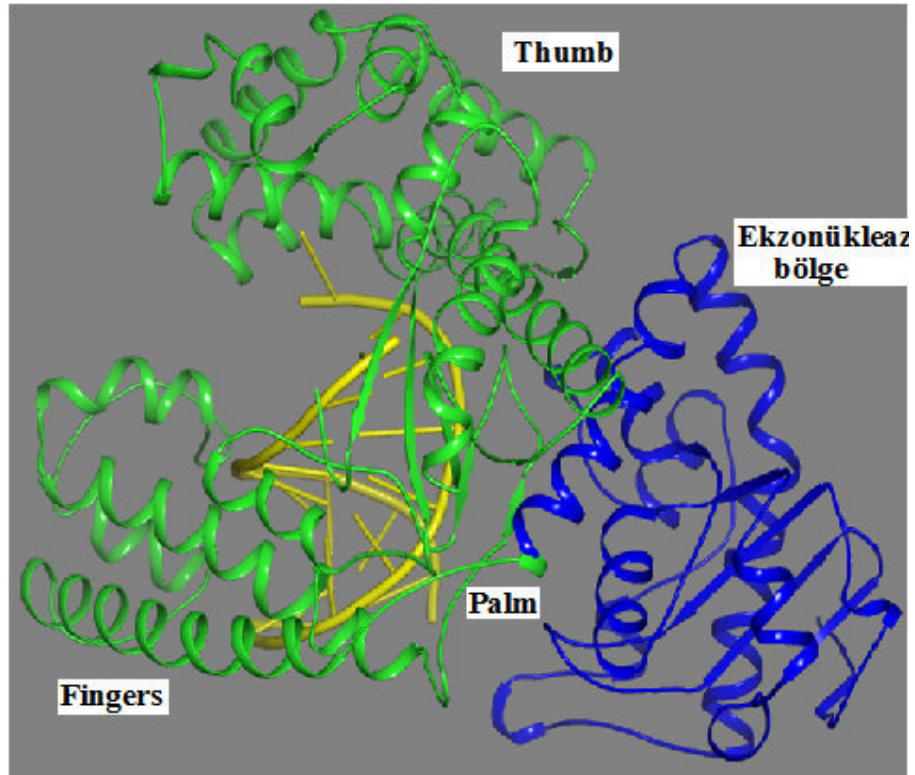
1.2.6. Y Familyası DNA Polimerazlar

Y familyasına ait DNA Polimerazlar, diğer DNA polimerazlar gibi kalıba bağlı olarak DNA sentezini gerçekleştirirler ancak bu familyaya ait DNA polimeraz enzimleri bilinen DNA polimeraz enzimleri ile amino asit seviyesinde hiçbir sekans benzerliği göstermezler. Yüksek hata oranı ve düşük prosesiviti ile normal DNA'nın sentezini gerçekleştirirken, zarar görmüş kalıp zincir üzerinden de senteze devam edebilirler (Wei, 2005). Bu familya DNA polimerazlarına ait ilk ipuçları maya Rev-1 proteininde gözlenen dCMP-spesifik nükleotit transferaz aktivitesi ile başladı (Nelson vd., 1996). Daha sonra maya Rev-1'ine homolog *E. coli* Rev-1b proteininde aynı aktivitenin gözlenmesi ve

bununla beraber UmuC ve DinB proteinlerinin DNA polimeraz aktivitesine sahip olması bu yeni polimeraz familyasının oluşmasını sağlamıştır. En önemli özelliklerinden birisi translezyon DNA sentezi gerçekleştirebilmeleridir.

1.3. Üç Boyutlu Yapı Yönünden DNA Polimeraz I Enzimleri

DNA polimeraz I enzimleri, herbiri farklı bir katalitik aktivite gösteren üç alt bölgeden oluşurlar ve genel bir üç boyutlu yapı yönünden ortak bir yapıyı paylaşırlar. Protein üzerinde bu bölgeler N-ucundan C-ucuna doğru belli bir sırada yer alırlar. Bunlar: N-ucunda 5' nükleaz, C-ucunda polimeraz ve N-uç ve C-uç arasında ise 3'→5' ekzonükleaz aktivitesinden sorumlu bölgeler şeklindedir (Şekil 1).



Şekil 1. *E. coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow Fragmentine ait yapı

Enzim 3'→5' ekzonükleaz bölge ile yeni sentezlenen DNA'da hataları kontrol eder ve hatalı girmiş nükleotitleri uzaklaştırarak doğrusu ile değiştirir. 5' nükleaz bölge ile yeni sentezlenen DNA'daki okazaki fragmentlerinin uzaklaştırılmasını katalizler. Bazı

polimeraz I enzimleri bu bölgelerden her ikisine sahip olsa da, katalitik amino asitler korunmamış ise 3'→5' ekzonükleaz aktivite göstermemektedir. Bilinen tüm DNA polimeraz enzimleri DNA'nin sentezini 5'→3' yönünde gerçekleştirir ve bu bölge enzimin C-ucunda yer alır.

1.3.1. 5'→3' Ekzonükleaz Bölge “Enzimin N-Ucu”

DNA polimeraz I'in 5' nükleaz bölgesi, prokaryotik ve ökaryotik nükleazların önemli bir sınıfının üyesidir. DNA tamir ve onarımında fonksiyon gösterirler. Özellikle de çift zincir DNA üzerinde, 5' hibridize olmamış sarkık tek zincir kısım bu enzim için özel substrattır. DNA polimeraz I enzimlerinin N-ucunda yer alan bu bölge, özellikle *in vivo*'da DNA replikasyonu sırasında Okazaki fargmentlerinden RNA-primerinin uzaklaştırılmasında ve DNA'nın kesip çıkarma tamir mekanizmasında zarar görmüş nükleotitlerin uzaklaştırılmasında önemli fonksiyona sahiptir (Kornberg ve Baker, 1992). Bir çok DNA polimeraz I enzimlerinde ve bazı bakteriyofajlarda da 5' nükleaz bölgesine homolog bölgeler bulunurken bazılarında ise ayrı bir polipeptid olarak bulunmaktadır (Gutman ve Minton, 1993; Xu vd., 1997). 5' nükleazlar orijinal olarak 5'→3' nükleaz olarak tanımlanmalarına rağmen daha doğru bir isimlendirme olarak “yapı-spesifik nükleazlar” olarak isimlendirilmektedirler ve genellikle çift zincir DNA'da 5' sarkık kısmın olduğu bölgede baz eşleşmesinin olduğu ilk iki nükleotit arasından kesim yaparlar (Lyamichev vd., 1993; Harrington ve Lieber, 1994; Bhagwat vd., 1997). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bakteriyel nükleazların 5' nükleaza ait kesim bölgesinde primerin üst kısmında yer alan bölgede 3' eşleşmemiş nükleotit için bağlanma bölgesinin olduğu belirtilmektedir (Lyamichev vd., 1999; Xu vd., 2000; Xu vd., 2001).

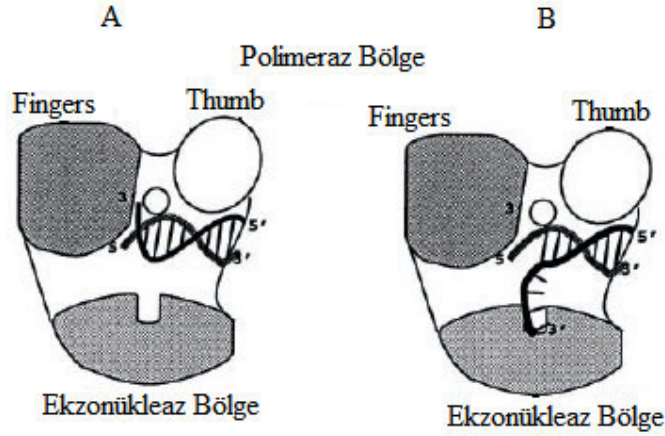
Sekans benzerlik çalışmaları bakteriyel ve bakteriyofaj 5' nükleazlarının çoğunun FEN-1 nükleaz familyasında korunmuş olan değişmez 9 adet karboksilat taşıdığını göstermiştir (Gutman ve Minton, 1993; Xu vd., 1997). Korunmuş karboksilatların sayısının çokluğu 5' nükleaz aktivitenin olasılığını yükseltmektedir. Bu korunmuş bölgeler Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. DNA polimeraz I'e ait 5' nükleaz bölgede yer alan korunmuş amino asitler

<i>E. coli</i> DNA Pol-I, 5' nükleaz bölgesine ait korunmuş sıra	47 Bakteriyal DNA polimeraz I'de benzerlik	11 Bakteriyel 5' nükleazda benzerlik	4 Faj nükleazda benzerlik
Asp13	47 Asp	11 Asp	Asp
Arg20	47 Arg	10 Arg, 1 Ala	1 Arg, 2 Gln, 1 Ser
Asp63	46 Asp, 1 Glu	11 Asp	Asp
Arg70	47 Arg	11 Arg	Arg
Tyr77	47 Tyr	11 Tyr	Tyr
Lys78	47 Lys	11 Lys	Lys
Arg81	47 Arg	11 Arg	Arg
Glu113	47 Glu	11 Glu	Glu
Asp115	47 Asp	11 Asp	Asp
Asp116	47 Asp	11 Asp	Asp
Asp138	47 Asp	11 Asp	Asp
Asp140	47 Asp	9 Asp, 2 Gly	Asp
Asp185	47 Asp	9 Asp, 1 Ile, 1 Val	Asp
Asp188	47 Asp	9 Asp, 2 Ser	Asp

1.3.2. 3'→5' Ekzonükleaz Bölge "Enzimin N-ucu ile C-Ucu Arası Kısım"

DNA polimeraz I enzimlerin N-ucu ile C-ucu arasındaki bölge 3'→5' ekzonükleaz bölge olarak adlandırılır. Bu bölgenin aktivitesi ile DNA polimeraz I enzimleri, DNA sentezi esnasında 3'-OH uca hatalı eşleşmiş nükleotitlerin uzaklaştırılmasını katalizleyerek DNA sentezin sonlanmasını önlemiş olurlar. Çift iplik DNA'nın 3' ucunda yer alan hatalı eşleşme, DNA'nın polimeraz bölge yerine ekzonükleaz bölgenin aktif kısmına bağlanmasını artırır. *E. coli* DNA polimeraz I'e ait Klenow fragmenti, 3'-OH ucunda hatalı eşleşmiş nükleotit içeren çift zincir DNA ile kristallendirildiğinde, hatalı eşleşme yapan zincire ait 3'-ucunun sarkık kısmının ekzonükleaz bölgenin aktif bölgesine bağlandığı belirlenmiştir (Şekil 2). Hatalı eşleşme polimerazın sentezini engellemekte ve DNA çift zincirinin ekzonükleaz bölgeye kaymasını sağlamaktadır. Bu da enzimin doğru sentez yapmasında polimeraz bölgenin rol oynadığını göstermektedir. 3' ekzonükleaz bölge tek iplik DNA'ya da bağlanabilir ve bağlanma hızı çift iplik DNA'ya bağlanan polimeraz bölgeden 10 kat daha hızlı gerçekleşir.

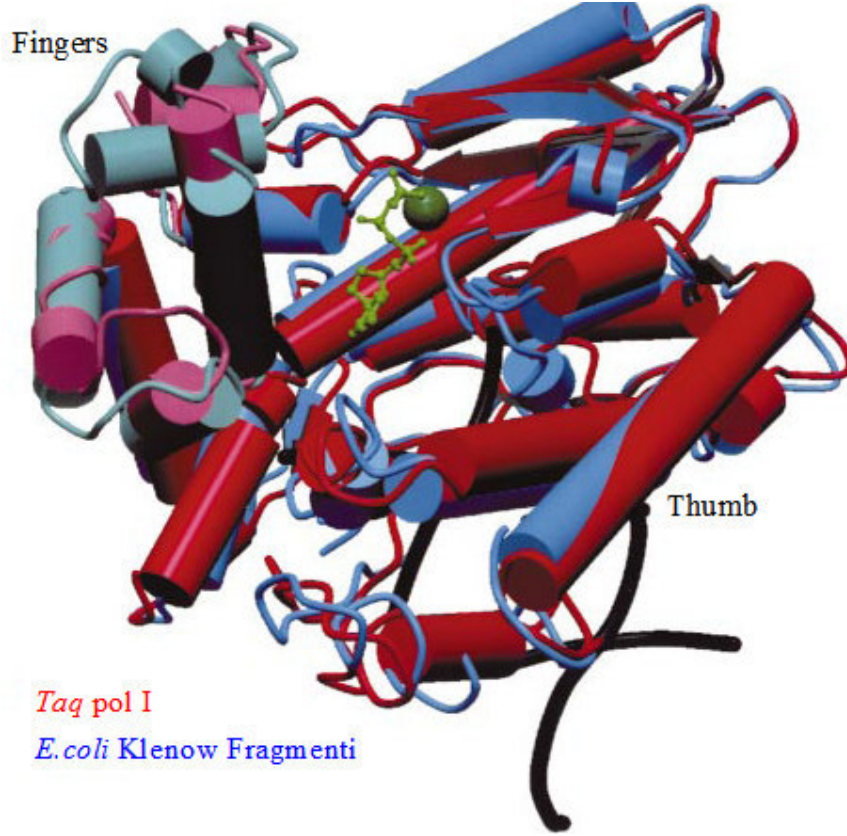


Şekil 2. DNA'nın yapısına göre polimeraz ve ekzonükleaz bölge ile olan ilişkisi. A: polimerizasyon esnasında B: ekzonükleaz aktivite esnasında

5'nükleaz bölge ile 5'→3' polimeraz bölge arasında bulunan 3'→5' ekzonükleaz bölge bu aktiviteyi gösterebilmesi için dört adet korunmuş amino asite ihtiyaç duyar. Bunlar D355, E357, D424 ve D501 numaralı amino asitlerdir ve bu amino asitlerden herhangi birinin mutasyonla değişmesi bu bölgenin aktivitesini etkiler (Wang vd., 1996). Özellikle *E. coli* DNA polimeraz I'de D424 nolu aspartik asit amino asiti alanin amino asitine dönüştürüldüğünde, 3'→5' ekzonükleaz bölge sentezlenen yeni zincirin 3'-OH ucunda oluşan hatalı nükleotitleri uzaklaştırma aktivitesini tamamen kaybeder.

1.3.3. 5'→3' Polimeraz Bölge "Enzimin C-Ucu"

Yapı analizi çalışmaları DNA polimeraz I enzimlerinin polimeraz bölgelerinin ortak bir yapıyı paylaştıklarını göstermektedir. Bu yapı sağ ele benzemektedir ve thumb (baş parmak), palm (avuç) ve fingers (parmaklar) kısımları olarak üçe ayrılmaktadır (Şekil 3). Palm kısmının yapısı bütün DNA polimerazlarda homolog olarak görünmesine rağmen fingers ve thumb kısmının yapısı DNA polimeraz familyalarında farklılık göstermektedir. Palm alt kısmı fosforil transferinde görev alır (Premal vd., 2001).



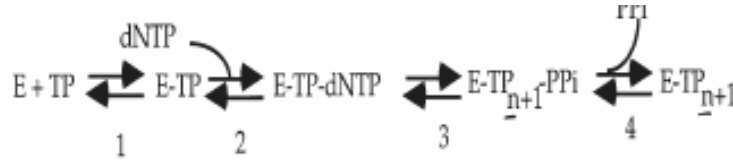
Şekil 3. *Taq* polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I Klenow fragmentinin superpozisyonu. Bu enzimlerin α -heliks ve β -zincir katlanmaları hemen hemen aynıdır. Fingers alt bölgenin farklılık arz etmesi bu kısmın esnek olduğunu göstermektedir. Diğer polimeraz I enzimlerinin superimpoz yapılarında benzer sonucu vermektedir

Thumb kısmı direkt olarak ekzonükleaz bölge ile ilişkidir ve tek zincir ekzonükleaz substratlar için bağlanma bölgesine sahiptir. Thumb bölge paralel ve antiparalel α -helikslerden ibaret olup herbir durumda en az bir α -heliks primer-kalıp ürünün küçük oyuğu boyunca önemli interaksiyonlar yapar. Thumb alt bölgesinin üst kısmındaki looplar DNA iskeleti ile önemli ve korunmuş interaksiyonlar yapar (Premal vd., 2001).

Fingers alt kısmı da DNA polimeraz familyalarında farklılık gösterir ve fingers alt kısmındaki herbir α -heliks primer-kalıp kompleksinin küt ucunda bulunur. Bu bölge korunmuş yan zincirler içerir. Gelen nükleotit trifosfat ile önemli interaksiyonlar sağlar (reverse transkriptaz familyasında fingers bölgesinde dNTP bağlayan α -heliksle sahip değildir ve bu fonksiyon β -hairpin tarafından yürütülür).

1.4. DNA Sentez Mekanizması

Bir çok DNA polimeraz için tek bir nükleotitin eklenmesi esnasında gerçekleşen adımlar ve her bir adımın hızı *Taq* pol I (Brandis vd., 1996), T7 DNA pol (Patel et al., 1991) ve *E. coli* pol I (Bryant vd., 1983; Kuchta vd., 1988) için belirlenmiştir. DNA sentezi esnasında birinci basamakta (Şekil 4–1) polimeraz enzimi (E) kalıp-primere (TP) bağlanır. İkinci basamakta (Şekil 4–2) uygun dNTP polimeraz-DNA kompleksine bağlanır. Üçüncü basamakta (Şekil 4–3) nükleofilik atak sonucu fosfodiester bağı oluşur. Dördüncü basamakta ise pirofosfat (PPi) serbest bırakılır.



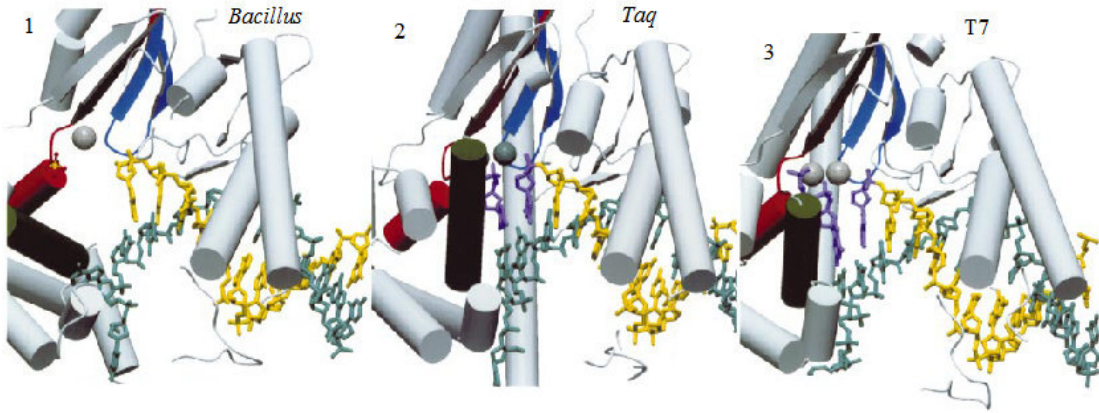
Şekil 4. Tek bir nükleotitin ilavesi esnasında gerçekleşen adımlar

Presteady kinetik çalışmaları enzimin, DNA'ya ve dNTP'ye bağlanmasının çok hızlı gerçekleştiğini ve bu esnada polimeraz enziminin en az dört önemli yapısal değişim geçirdiğini göstermektedir. İlk yapısal değişim enzimin DNA'ya bağlanması esnasında gerçekleşir. İkinci yapısal değişim sıraya uygun nükleotitin bağlanması ve bağlanmayı takiben gerçekleşen kimyasal katalizleme esnasında gerçekleşir. Bu adımı takiben PPi'nin serbest bırakılması esnasında üçüncü yapısal değişim gerçekleşir. Dördüncüsü ise nükleotit eklenmesi gerçekleştikten sonra primerin yeni 3'-OH ucuna enzimin translokasyonu esnasında gerçekleşir. Enzimin nükleotit ilavesinde çoklu yapısal değişim geçirmesi az hatalı sentez yapmas katkıda bulunmaktadır (Beckman ve Loeb, 1993).

1.4.1. Polimeraz Enzimin DNA'ya Bağlanması

Polimerizasyonun ilk adımında, polimeraz enzimi ile kalıp-primerin bir araya gelmesi yer alır. DNA polimerazlara ait kristal yapıları, DNA ile kompleks oluşumu esnasında thumb alt bölgesinin nerede ise tamamen DNA'nın etrafını sardığını göstermektedir (Şekil 5). Örneğin *Taq* polimeraz I'in thumb alt bölgesinde DNA'ya bağlanma esnasında iki önemli yapısal değişim gerçekleşir (Li vd., 1998). Birinci olarak thumb alt bölgesi palm alt bölgesine doğru döner ve ikinci olarakta thumb bölgesinin

ucunda yer alan korunmuş amino asitler ters yönde dönerler. Bu değişim yaklaşık 30 Å genişliğinde bir silindir şeklinde gerçekleşir ve nerede ise tamamen DNA'yı içine alır. Thumb alt bölgesi içindeki korunmuş amino asitler (bölge 1 içinde yer alırlar) DNA'nın küçük oyuğu boyunca DNA'yı sıkıca tutar (Patel vd., 1995).

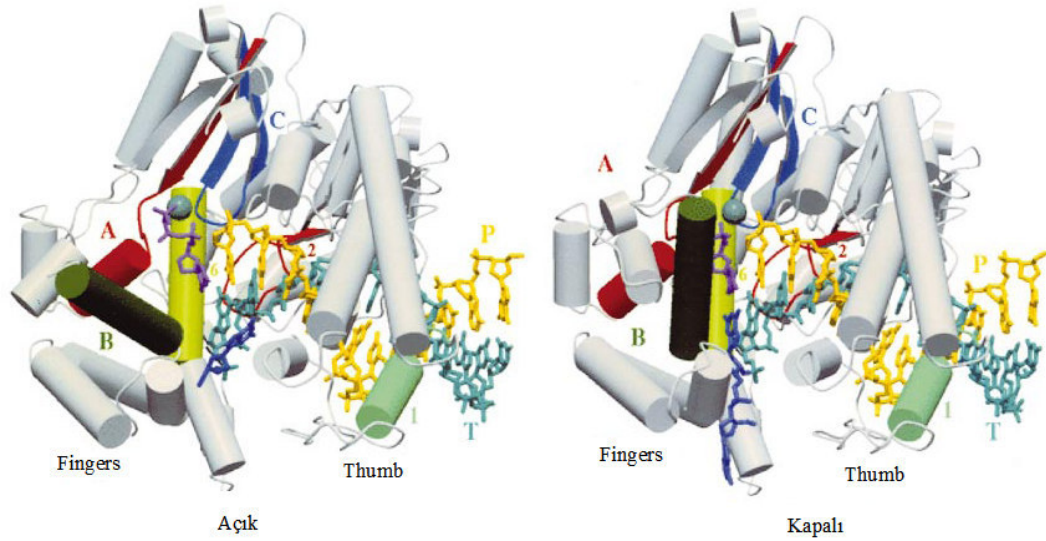


Şekil 5. *Bst* DNA pol I (Kiefer vd., 1998), *Taq* DNA pol I (Li vd., 1998) ve T7 polimerazın (Doublie vd., 1998) aktif bölgesi. Motif A (kırmızı), B (yeşil) ve C (mavi)'nin yerleşim düzeni farklı DNA polimerazlar içerisinde hemen hemen aynıdır. Bu enzimlerin herbiri DNA'ya bağlanma esnasında DNA'nın şeklini değiştirmektedir

Farklı DNA polimerazlarda, enzim ilk önce DNA iskeletinin şeker-fosfat kısmı ile ilişki kurar ve ilişki S-şeklindeki yapıya sahip DNA eğilimleri ile uyumlu haldedir. Enzim ve DNA arasındaki ikinci ilişki, palm alt bölgesi içinde yer alan korunmuş amino asitlerle (bölge 2 içinde) tek iplik kalıp DNA arasında gerçekleşir. DNA ve polimeraz enzim arasındaki üçüncü interaksiyon neticesinde kalıbın ilk bazı 90° den daha fazla döner ve bitişik kalıp ipliğe ait nükleotit ise 180° döner (sanki kalıp bazlar DNA heliks yörüngesinin dışına atılarak dNTP bağlanma bölgesinden uzaklaştırılmış gibi). Bu şekil bir DNA komformasyonel değişiminin, DNA polimerazlar için genel bir mekanizma olduğu görülmektedir.

1.4.2. Enzimin Nükleotiti Bağlaması

DNA polimeraz I'in yapısındaki ikinci yapısal değişim dNTP'yi bağlama esnasında gerçekleşir. Kalıp zincirdeki sıraya uygun olarak gelen nükleotitin varlığında en az üç değişim meydana gelir (Premal vd., 2001). Birinci yapısal değişim sonucu fingers bölgesi primerin 3' ucuna doğru döner ve kapalı bir yapı oluşur. İkinci olarak kalıba ait baz Y aksisine doğru 90° den daha fazla geri döner. Üçüncü olarak gelen nükleotitin baz kısmı kalıba ait baz ile Watson-Crick baz eşleşmesi yapar ve nükleotitin trifosfat kısmı, aktif bölgede yer alan katalitik amino asitler ile metal-iyon orijinli interaksiyonlar kurar (Şekil 6). Kalıbın sırasına uygun olarak gelen nükleotit ortamda düşük miktarda olduğunda polimeraz açık yapıdadır. Yüksek derişiminde ise kapalı bir üç boyutlu yapı gösterir (Li vd., 1998).

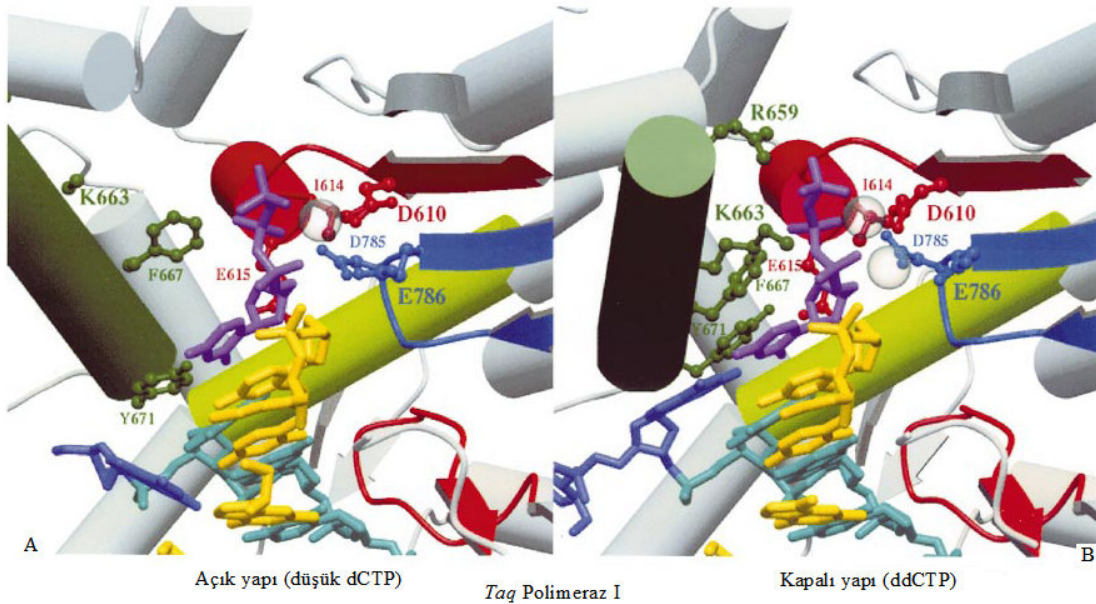


Şekil 6. *Taq* DNA polimeraz I enziminin içindeki 6 korunmuş bölgenin kapalı ve açık yapısı (Li vd., 1998). Kalıp zincir (cyan) T ile primer (sarı) P ile kalıp zincir üzerinde eşleşmenin olacağı baz mor renk ile, kalıba uygun gelen nükleotit mor pembe renk ile gösterilmiştir

Birinci bölge (açık yeşil) thumb alt bölgesi içinde yer alır ve DNA'nın küçük oyuğu ile ilişki kurar. İkinci bölge (turuncu) palm alt bölgesi içinde yer alır ve DNA'nın küçük oyuğuna yakın kısımda DNA ile ilişki kurar ve kalıp zincirin sıkıca sağlamlaşmasını sağlar. A motifi (kırmızı) metal bağlanmış olarak gelen nükleotit ile ilişki kurar. B motifi de (koyu yeşil) gelen nükleotit ile ilişki kurar fakat fingers alt bölgesinde yer alır. Nükleotit

bağlama adımında kapalı forma adapte olabilmek için yapısal değişim geçirir. Palm alt bölgesinde yer alan C motifi (mavi), A motifi ile devam eder ve bu motiflerin her ikisinde katboksilat içeren katalitik amino asitleri içerir. Altıncı bölge (sarı-yeşil) palm alt bölgesinde yer alır ve baz ayrılması noktasında yakın yerde kalıp zincir ile ilişki kurar.

Taq DNA polimeraz I ve *Bst* DNA polimeraz I ile yapılan kristallendirme çalışmaları, sıraya uygun olarak eklenecek dNTP'nin düşük yoğunluğunda DNA polimeraz enziminin kapalı bir üç boyutlu yapı sergilediği gösterilmiştir (Şekil 6). Bu durumda kalıba ait ilk baz heliks ekseninden 90°'den daha fazla uzaklaşır ve motif B'de yer alan korunmuş tirozin amino asiti (*Taq* Pol-I'de Tyr671 ve *Bst* DNA Pol-I'de Tyr712) çift zincir DNA'nın ilk baz eşleşmesinin olduğu kısmın üst kısmına gelecek şekilde pozisyon alır. Böylece kalıp zincire ait baz 671 nolu tirozin ile düzgün bir ilişki kurar. *Taq* DNA polimeraz I açık yapıda (Pol:DNA:dNTP) nükleotitin trifosfat kısmı ile asp610 ve asp785 nolu aspartik asit amino asitleri ile ilişki kurar.



Şekil 7. dNTP bağlanma esnasında görülen yapısal değişimler

Başlangıçta nükleotit (mor pembe) bağlanma esnasında kalıba ait baz (mor) heliks yörüngesinin dışına hareket eder ve böylece gelen nükleotit ile baz eşleşmesi yapamaz. Kalıp senteze uygun pozisyonu korunmuş Tyr657 amino asiti ile ilişki kurar (ki bu amino

asit dNTP ile hidrojen bağı kurar). Buna ilaveten motif B (O-heliks; yeşil) açık bir yapıya kendini ayarlar.

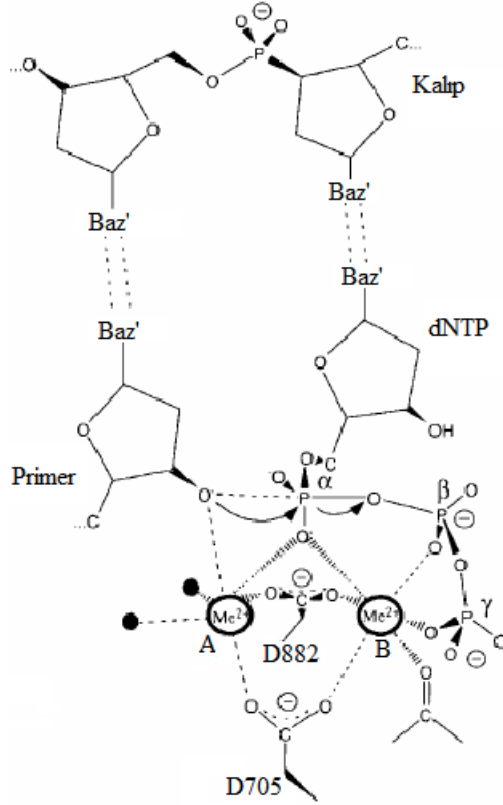
Gelen nükleotitin yüksek derişiminde DNA polimeraz enzimleri kapalı bir üç boyutlu yapı sergilerler (Şekil 7A ve Şekil 7B). Bu yapıda kalıba ait baz heliksin eksenine doğru 90°'den daha fazla kayar ve gelen nükleotit ile Watson-Crick baz eşleşmesi kurulur. Bununla beraber O-heliks'de yer alan 667 numaralı fenilalanin amino asiti, gelen nükleotit ile sıkı bir ilişki kurar ve fingers alt bölgesi nerede ise tamamen gelen nükleotiti içine alacak şekilde yapısal değişim geçirir. Bu yapısal değişim O-heliks üzerinde yer alan B motifine ait amino asitlerin pozisyonunu önemli ölçüde etkiler ve bununla eş zamanlı olarak O-heliks Asp610 ve Asp785 nolu aspartik asit amino asitlerinin katalitik yan zincirlerine doğru 40°'lik bir dönüş yapar. Bu yapısal değişimlerin devamında, gelen nükleotitin baz kısmı, motif B'de yer alan iki hidrofobik amino asite (Tyr671 ve Phe667) karşı yerleşir. Bununla beraber nükleotitin riboz kısmı 615 numaralı glutamik asitin alifatik kısmı ile 614 numaralı izolösin amino asitinin karşısına yerleşir. Böylece gelen nükleotitin baz ve riboz kısmı hidrofobik bir paket ile çevrelenmiş olur. dNTP'nin negatif yüklü trifosfat kısmı, motif A ve C'de yer alan iki asidik yan zincir ile (Asp610 ve Asp785) nükleotitin trifosfat grubu ile metal esaslı ilişki kurar.

Taq DNA polimeraz I'in açık ve kapalı yapısı, gelen nükleotitin trifosfat kısmının ilk aşamada metal koordinasyonu ile Asp610 ve Asp785'in katalitik kısımlarına yakın bağlandığını desteklemektedir. Ayrıca gelen nükleotit kalıba ait baza uygunsu/tamamlayıcı ise o zaman kalıp ile kuracağı hidrojen bağı dNTP'yi daha da stabilize edecektir. Uygun pozisyonda yer almak ve baz eşleşmesi, fingers alt bölgesinin O-heliks kısmının palm bölgesine daha yakın bir konuma gelmesini sağlayacaktır. Bu yapısal değişim, gelen nükleotitin baz ve riboz kısmı ile hidrofobik, trifosfat grubu ile de hidrofilik ilişkinin kurulmasıyla sonuçlanacaktır.

1.5. DNA Polimerazlar İçin İki Metal İyon Mekanizması /Nükleofilik Atak

Bugüne kadar kristal yapıları bilinen DNA polimerazlara ait superimpoz çalışmaları nükleotitin DNA'ya eklenmesinde iki metal iyon mekanizmasını desteklemektedir ve bu mekanizma tüm DNA polimerazlarda aynı şekilde gerçekleşmektedir (Şekil 8). DNA sentezi esnasında sıraya uygun olarak gelen dNTP'ye iki magnezyum iyonu eşlik etmektedir. Magnezyum iyonlarından bir tanesi nükleotidin fosfatına bağlanırken, ikincisi

DNA ve RNA polimerazlarda korunmuş olan aspartik asit amino asitlerine bağlanır. Aspartik aside bağlanan metal iyon primere ait 3'-OH'a düşük afinite gösterir ve buda primerin 3'-O⁻ kısmının nükleotitin α -fosfatına yönelmesini sağlar. Nükleotit üzerindeki metal iyonu pirofosfatın ayrılmasını kolaylaştırır ve her iki metal iyonu birlikte polimeraz yapısının stabilizesini sağlar (Thomas, 1998).



Şekil 8. Nükleotit trifosfatın DNA'ya eklenmesindeki iki metal iyon mekanizması

Farklı DNA polimerazların katalitik bölgeleri, karboksilik yan zincir taşıyan üç amino asit içerir (*Taq* DNA Polimeraz I'de bunlar Asp610, Asp785 ve Glu786'dır). *Taq* DNA polimeraz I'in ternary yapısı incelendiğinde bu amino asitlerden ikisinin (Asp610 ve Asp785) metal iyon bağladığı görülmektedir. Üçüncü karboksilik amino asitin rolü tam belli değildir. İki iyon mekanizmasında metal A iyonu 3'-OH, α -fosfat grubu, Asp610'un oksijen atomu, Asp785'in yan zinciri ve iki su molekülü ile birlikte koordineli hareket eder. Metal iyon B ise α -, β -, ve γ - fosfat grupları, Asp610 ve Asp785'in karboksilatı ve

Tyr611'in karbonil grubu ile koordineli hareket eder. Metal A'nın koordinasyonu neticesinde iki reaksiyon grubu (metal A ve B'ye ait koordinasyon grupları) nükleofilik 3'-OH ile nükleotitin α -fosfatı bir araya gelir ve fosfat transfer reaksiyonu kolaylaşır (Li vd., 1998).

1.6. DNA Polimeraz Enzimlerinin Hata Yapma Oranı (Fidelity)

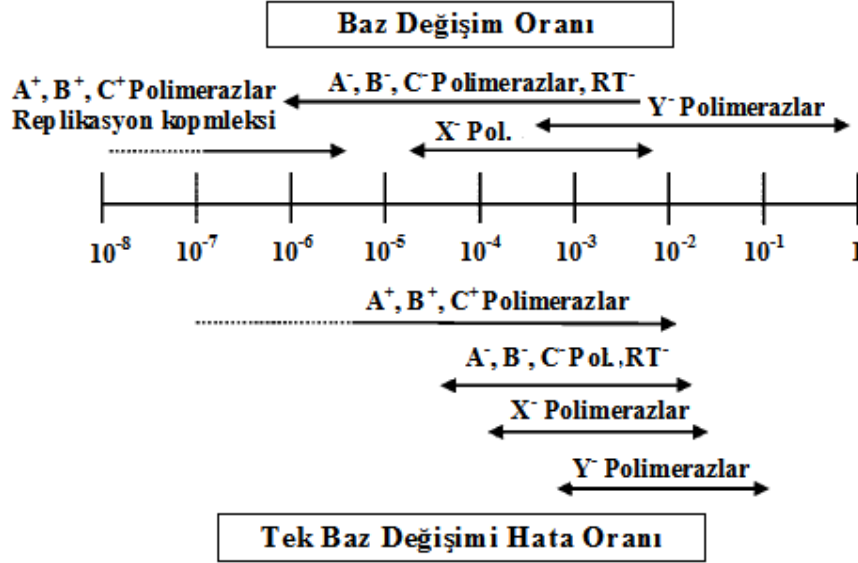
Watson ve Crick, çift zincir DNA'yı ilk kez tanımladıklarında "spesifik eşleşmenin genetik materyal için olası bir kopyalama mekanizmasını desteklediği dikkatimizden kaçmamıştır" ifadesini kullanmıştır (Watson ve Crick, 1953). Yüksek doğrulukta DNA sentezi, genetik bilginin birçok nesil boyunca taşınması, kanser ve sinir dejenerasyonu gibi hastalıklara neden olan mutasyonları önlediği için önemlidir. Düşük doğrulukta DNA sentezi ise, virüs ve mikroorganizmaların değişik çevresel ortamlara adapte olmalarında ve türlerin çeşitliliğinde hem önemlidir hemde faydalıdır.

Bakteriyofaj ve *E. coli* replikasyonu üzerinde yapılan çalışmalar baz değişim oranının 10^{-7} ve 10^{-8} arasında değiştiğini göstermiştir (Schaaper, 1993). Ökaryotik DNA replikasyonu da en az bu doğrulukta gerçekleşmektedir. Şekil 9'da farklı familyalara ait replikatif polimeraz enzimlerine ait hata oranları gösterilmektedir (Kunkel, 2004).

DNA replikasyonu esnasında hata oranı A (T7 polimeraz), B (T4 polimeraz, polimeraz δ ve polimeraz ϵ) ve C (polimeraz III) ailesine ait polimerazlar için 10^{-6} ile 10^{-8} arasındadır. Bu enzimlerin proof-reading mutantlarında bu oran 10^{-4} ve 10^{-6} 'dır ve baz değişim oranı daha yüksektir. Yanlış eşleşmiş nükleotitlerin varlığında nükleotitlerin kesilip çıkarılması, boşluğun doldurulması, A ve B ailesine ait polimerazlarda proof-reading aktivite sayesinde gerçekleştirilir. Tamir esnasında oluşan bir ya da birkaç nükleotitik boşluğun doldurulması gerekmektedir.

Tamirden kaçan lezyon bölgeleri büyük oranda replikasyonun doğruluğunu azaltırlar. Translezyon sentez (TLS) polimerazlar, çoğu replikatif polimerazların sentez aktivitesini engelleyen lezyonların ilerisinde senteze devam edebilirler (Goodman, 2002, Kunkel vd., 2003, Friedberg vd., 2002, Livneh, 2001). Polimeraz ζ (B ailesi) ve Y familyasına ait DNA polimerazlar (*E. coli* DNA polimeraz IV-V, polimeraz η , polimeraz ι ve polimeraz κ) bu tür enzimlerdir. Proof-reading aktivitesi olmayan enzimler yüksek hatalı polimerazlar olarak kabul edilir. Bu polimerazların hatalı baz eşleştirme ve baz değiştirme oranları 10^{-1} ile 10^{-3}

arası değişir. Örneğin polimeraz ϵ , kalıptaki dTTP nükleotiti ile dGTP'yi eşleştirmektedir ve hata oranı 1 olarak kabul edilir. Yani yüzde yüz hatalı sentez yapmaktadır.



Şekil 9. Farklı DNA polimeraz ailelerine ait tek baz değişimi ve delesyon hata oranlarının şematize gösterilmesi

Kristal çalışmaları polimerazların, DNA'ya bağlandığında kalıp/primer kompleksinin yeniden şekillendiğini ve kalıba ait nükleotitlerin iskeletlerinde 90° bir erimenin olduğunu göstermektedir. dNTP yokluğunda polimeraz açık konformasyondadır ve aktif bölge henüz toplanmamıştır (Friedberg, 2001; Beard ve Wilson, 2001; ve Garcia-Diaz vd., 2004). Sentez esnasında doğru nükleotitin enzime bağlanması polimeraz aktivitesinden sorumlu ilgili kısımların çok fazla değişmesini indükler. Değişim özellikle amino asit yan zincirlerinde ve DNA yapısında gerçekleşir. Neticede kapalı ternary kompleksi oluşur ve bu kompleks kalıp/primerin eşleşmiş 3'-ucunu çevreler. Aktif bölgenin bir kısmı ise sıraya uygun gelen nükleotitin α -fosfatı ile ilişki kurar ve 3'-OH ucuna doğru bir nükleofilik atak oluşur. Bu çerçeve içinde DNA polimeraz enzimlerinin fidelitesi için aşağıdaki fikirler uygun kabul edilmektedir: Watson ve Crick'inde ifade ettiği gibi, özel hidrojen bağ oluşumlarını sağlayan doğru baz eşleşmesi DNA sentezinin spesifikliğine katkıda bulunmaktadır. Baz-baz eşleşmesinin DNA'nın hatasız sentezlenmesine katkısı olduğu açıktır ancak bu katkı nispeten az ve polimeraz bağımlı olarak gerçekleşmektedir (Kool, 2002). 1970'lerin sonlarında, doğru ve yanlış baz eşleşmesi arasındaki serbest enerjideki farklılığın doğru nükleotitin seçilmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Loeb ve Kunkel,

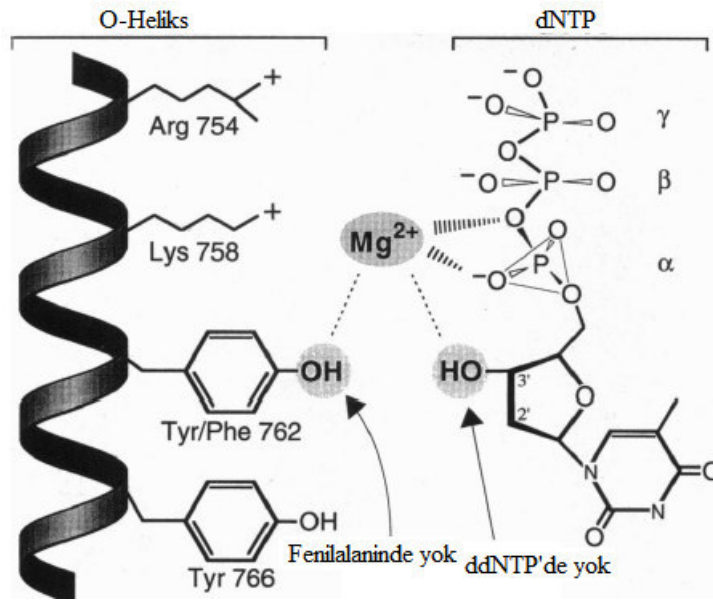
1982). Reaksiyon solusyonunda bu farklılık, 10 ile 100 tane doğru eşleşmiş nükleotit içerisinde tek bir hatalı eşleşmiş nükleotit için 0,2 ile 4 kcal/mol arasındadır. Çoğu polimeraz, doğru ve yanlış eşleşmiş baz çiftleri arasındaki serbest enerji farklılığı ile açıklanabilecekten çok daha fazla güvenilirliğe sahiptir. Örneğin bu tür enzimler doğru ve yanlış baz eşleşmesi arasındaki serbest enerji farklılıklarını aktif bölgeden suyu uzak tutarak artırır ve böylece entalpi farklılıklarını artırır ve entropi farklılıklarını azaltarak hatasız DNA sentezine katkıda bulunur (Petruska, 1988).

1.7. DNA Polimeraz I Familyası Enzimlerin dNTP ve ddNTP İlgisindeki Farklılığın Mekanizması

A familyasına ait DNA polimeraz enzimleri bazı özellikleri bakımından birbirinden farklıdır. Örneğin bu familya içinde yer alan T7 DNA polimeraz, *E. coli* DNA polimeraz I ve *Taq* DNA polimeraz I enzimleri ile karşılaştırıldığında T7 DNA polimeraz enziminin öncelikli fonksiyonunun bakteriyofaj genomunun sentezlemesini sağlamak olduğu gözlenir. Ancak *E. coli* DNA polimeraz I ve *Taq* DNA polimeraz I enzimlerin öncelikli fonksiyonu DNA'nın tamiri ve rekombinasyonudur. T7 DNA polimeraz 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahipken, *Taq* DNA polimeraz I 5'→3' nükleaz aktivitesine, *E. coli* DNA polimeraz I ise her iki aktiviteye de sahiptir. Bu tür enzimler arasında en önemli farklardan birisi, dideksinükleotit ve deksinükleotitleri birbirinden ayırt etmede gösterdikleri farklılıklardır. *E. coli* DNA polimeraz I (Atkinson vd., 1969, Tabor ve Richardson, 1987, Tabor ve Richardson, 1989) ve *Taq* DNA Polimeraz I (Innis, 1988) enzimleri deksinükleotitlerin (dNTP) DNA'ya ilavesini dideksinükleotitlerin (ddNTP) ilavesinden birkaçyüz ile birkaç bin kata kadar daha fazla bir oranda gerçekleştirir. T7 DNA polimeraz ise dideksinükleotitlerin (ddNTP) DNA'ya ilavesini bu iki enzimden çok daha etkili bir şekilde gerçekleştirir.

T7 DNA polimeraz, *E. coli* DNA polimeraz I ve *Taq* DNA polimeraz I ile yapılan kristallendirme çalışmalarında T7 DNA polimerazın 526. pozisyonundaki tirozin amino asidine karşılık olarak *E. coli* DNA polimeraz I (762. pozisyon) ve *Taq* DNA polimeraz I'de (667. pozisyon) fenilalanin amino asiti yer aldığını göstermiştir (Şekil 10). *E. coli* DNA polimeraz I ve *Taq* DNA polimeraz I enzimlerinde bu noktadaki amino asitler tirozin amino asidine dönüştürüldüğünde *E. coli* DNA polimeraz I'in yaban tipe oranla 250 kat daha fazla, *Taq* DNA polimeraz I ise 8000 kat daha fazla oranda dideksinükleotiti

birbirinden ayırt edebildiği, T7 DNA polimeraz enziminde aynı noktadaki tirozin amino asiti fenilalanine dönüştürüldüğünde ise ddNTP ilgisinin azaldığı gözlenmiştir (Tabor, ve Richardson, 1995). Ancak bununla beraber mutant enzimlerin yaban tipe oranla özgül aktiviteleri %25'e düşmüştür. Böylece O-heliks'de yer alan ve dNTP bağlanmasından sorumlu olan fenilalaninin dNTP ve ddNTP'leri birbirinden ayırt etmede kritik öneme sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 10. A familyası DNA polimerazlarında dNTP ve ribozu tanıtmaktan sorumlu olan amino asitler arasındaki ilişkiyi gösteren model (Ollis vd.,1995).

dNTP ve DNA'ya bağlanmadan sorumlu enzim boşluğuna bakan O-heliks üzerinde yer alan kritik fenilalanin/tirozin aminositinin, DNA polimeraz I familyasında dideoksi ve deoksinükleotitlerin birbirinden ayırt edilmesinden sorumlu olduğu belirlenmiştir. dCTP ve *E. coli* DNA polimeraz I ile yapılan kristallendirme çalışmaları, dCTP'nin 3'-OH grubuna en yakın aminositin fenilalanin olduğunu göstermiştir (Beese vd., 1993). Şekil 10'da görüldüğü gibi fenilalanin 3'-OH grubuna sahip değildir ve 3'-OH grubuna sahip olmayan ddNTP ile çok düşük aktivite vermektedir. Bu da 3'-OH gruplarından en az bir tanesinin su veya divalent iyon gibi ligandları bağlamak için gerekli olduğunu göstermektedir.

Polimeraz A familyasında yer alan enzimlerden T7 DNA polimerazı, T3 DNA polimerazı, maya mitokondri DNA polimerazı ile *Mycobacterium tuberculosis* ve

Mycobacterium labrae DNA polimerazları fenilalanin pozisyonunda doğal olarak tirozin taşımaktadırlar (Braithwaite ve Ito, 1993; Astatke vd., 1995). Mitokondri DNA polimeraz, dideoksinükleotitlerin DNA'ya ilavesini etkili bir şekilde katalizler. Ayrıca ddNTP'ler AIDS'e karşı terapötik ajan olarak kullanılır, çünkü HIV-revers transkriptaz etkili bir şekilde ddNTP'lerin katalizini gerçekleştirir (Prasad vd., 1991; ve Boyer vd., 1994). Ancak yüksek miktarda kullanıldığında mitokondri DNA'sının replikasyonunu inhibe ettiğinden toksik etki göstermektedir (Chen ve Cheng, 1992).

1.8. Prokaryotik DNA Polimeraz I'in Evolusyonu, Yapısı ve Nükleotit Seçme Mekanizması

Prokaryotik türler çok değişik çevrelerde yaşamalarına rağmen, en az 1 milyar yıldır prokaryotik DNA polimeraz I'e ait amino asit sekansı fevkalade korunmuş olarak kalmıştır (Gutman vd., 1993). Farklı türlere ait DNA polimeraz I geni yaklaşık 3000 baz civarında olup 1000 amino asit civarında tek bir polipeptid zinciri sentezlemektedir. Bir türdeki DNA polimeraz I geninin inaktive edilmesi sonucu oluşan letal etkinin bir başka türe ait DNA polimeraz I tarafından yürütülmesi; farklı prokaryotik organizmalarda polimeraz I enziminin benzer bir mekanizma ile çalıştığını desteklemektedir (Suzuki vd., 1996; Patel ve Loeb., 2000).

Polimeraz I familyası, DNA polimerazlarının çalışma mekanizmasını anlamak için prototip olarak kullanılır. *E. coli* DNA polimeraz I, ilk keşfedilen polimerazdır ve öncelikle *in vivo* fonksiyonu; DNA tamiri, rekombinasyon ve replikasyon esnasında oluşan DNA boşluklarını doldurmaktır (Kornberg ve Baker, 1992). Prokaryotik polimeraz I enzimleri aynı polipeptid üzerinde yerleşmiş iki farklı fonksiyonel bölgeye sahiptir. Bunlardan 5'→3' polimeraz bölge, polipeptidin C-terminal kısmında yer alırken, 5' nükleaz bölgesi N-terminal kısmında yer almaktadır.

Polimeraz I, 5' nükleaz aktivitesi ile yeni sentezlenen DNA'nın RNA kısmını uzaklaştırırken, 5'→3' polimeraz aktivitesi uzaklaştırılan RNA'nın yerini DNA ile doldurur. *E. coli* DNA polimeraz I, ilave bir 3'→5' ekzonükleaz bölgesine sahiptir ve bu ekzonükleaz bölgesi ile DNA'daki replikasyon hatalarını düzeltir. Bu bölge, 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi için gerekli olan korunmuş üç adet motif içermektedir (ExoI, ExoII ve Exo III) ve bu motifler *Bacillus*, *Thermus*, *Mycobacterium* ve *Rickettsia* gibi bakteri cinslerine ait türlerde mevcut değildir.

1.9. Polimeraz I Enziminin Aktif Bölgesinin Üç Boyutlu Yapısı

Polimeraz I familyası içinde yer alan *Taq* polimeraz I, *E. coli* polimeraz I ve *Bacillus* polimeraz I-büyük fragmentinin yüksek çözünürlükte kristal yapıları belirlenmiştir (Steitz, 1999). Bu polimerazlara ait kristal yapıların morfolojisi yarı-açık sağ ele benzemektedir ve üç farklı alt bölgeye sahiptir. Bu alt bölgeler: fingers alt bölgesi (tek zincir kalıp DNA ile ve sıraya uygun gelen nükleotit ile ilişki kurar), palm (katalitik amino asitleri içerir ve ayrıca gelen nükleotit ile ilişki kurar) ve thumb alt bölgesidir (çift zincir DNA'ya bağlanır). Polimeraz I familyası içinde yer alan *Taq* polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I amino asit düzeyinde çok az benzerlik göstermelerine rağmen benzer bir üç boyutlu yapıya sahiptirler. Bu, farklı DNA polimeraz I enzimleri arasında geniş bir sekans farklılığının olduğunu ve buna rağmen yine de aynı bir katlanma modeli ile katlandığını göstermektedir. Farklı organizmalardaki polimeraz I'lerin ortak bir yapıya sahip olması, nükleotit ilavesinde ortak bir mekanizmaya sahip olduklarını göstermektedir.

C-ucu bölgesine ait amino asit benzerliğinin incelenmesi farklı türlerdeki bu bölgenin fonksiyonu hakkında bilgi verecektir. Bu bölge altı adet korunmuş motif taşımaktadır. Bu motifler A-B-C ve motif 1-2-3 şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 11). DNA veya nükleotit ile birlikte kristallendirilmiş polimeraz I enzimlerinde, bu altı motifin herbirinin önemli bir rolünün olduğu gözlenmektedir. 1. motif/bölge1 thumb alt bölgesi içinde yer alır ve DNA'ya bağlanma esnasında DNA'nın büyük oluğuna bağlanır. 2. motif/bölge'deki amino asitler (NPNGAVTGRATHAFP NLA) palm alt bölgesi içinde yer alır ve kalıba ait DNA ipliği ile ilişki kurarak kalıbın sabitleşmesini sağlar. 6. bölge içindeki amino asitler kalıbın ilk bazı ile ilişki kurar ve bunun sonucu olarak heliksin yörüngesi 90°'den daha fazla dönerek gelen nükleotit ile baz eşleşmesi yapamaz. Bölge 3, 4 ve 5 içindeki amino asitler sırası ile A, B ve C motifi içerisinde yer alır ve sıraya uygun olarak gelen dNTP'ye yakın bir noktada yerleşmişlerdir. Böylece DNA polimeraz aktif bölgesi içerisindeki dNTP-bağlama yarığı oluşmuş olur.

	<u>MOTIF A</u>	<u>MOTIF B</u>	<u>MOTIF C</u>
THERMUS AQUATICUS	LLVALDYSQIELR	RRAAKTINFGVLY	LLQVHDELVLLE
THERMUS THERMOPHILUS	ALVALDYSQIELR	RRAAKTVNFGVLY	LLQVHDELLLE
THERMUS FILIFORMIS	LLLAADYSQIELR	RRAAKTVNFGVLY	LLQVHDELVLLE
DEINOCOCCUS RADIODURANS	TLIAADYSQIELR	RRAAKTVNFGVLY	LLQVHDELLIE
ESCHERICHIA COLI	VIVSADYSQIELR	RRSAKAINFGLIY	IMQVHDELVFE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE	SIVAADYSQIELR	RRNAKAINFGLIY	IMQVHDELVFE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	VLLSSDYSQIELR	RRNAKAVNFGVVY	LLQVHDEIVLE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	ELMTADYSQIEMR	RRRVKAMSYGLAY	LLQVHDELLFE
MYCOBACTERIUM LAPRAE	ELMTADYSQIEMR	RRRVKAMSYGLAY	LLQVHDELLFE
TREPONEMA PALLIDUM	ELISADYTQIELV	RRIAKTINFGIVY	LLQVHDELIFE
CHLAMYDIA TRACHOMATIS	YFLAADYSQIELR	RYQAKAVNFGLVY	LLQIHDELLFE
BORIELA BURGENDORFERI	IFISADYSQIELA	RRIAKSINFGIY	LLQVHDEMLIE
HELICOBACTER PYROLI	CLLGVDYSQIELR	RSIAKSINFGLVY	LLQVHDELIFE
LACTOCOCCUS LACTIS	LLLSSDYSQIELR	RRNAKAVNFGVVY	LLQVHDEIILD
MYTHELOBACTERIUM	KLISADYSQIELR	RRRAKTINFGIY	LLQVHDELVFE
RHODOTHERMUS OBAMENSIS	KLLSADYVQIELR	RRRAKMNFGIY	LLQVHDELVFE
RICKETTSIA PROWAZEKII	KLISADYSQIELR	RRKAKAINFGIY	ILQIHDELLFE
STREPTOMYCES COELICOLOR	SLMTADYSQIELR	RRKIKAMSYGLAY	LLQVHDEIVLE
BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS	LIFAADYSQIELR	RRQAKAVNFGIVY	LLQVHDELILE
SYNECHOCYSTIS SP	LLVSADYSQIELR	RNLGKTINFGVIY	LLQVHDELIFE
AQUIFEX AEOLICUS	TFVISDFSQIELR	RQLAKAINFGLIY	VNLVHDEIVVE
APSE-1 DNA pol	klvisdlsniegr	rqigkvmelglgy	ivtvhdeiise
T7 DNA pol	vqagidasglelr	rdsnaktfiygfly	mawvhdeiqvg
T5 DNA pol	rviawdlttaevy	rqaakaitfgily	vmlvhdsvvai
	xhhhhDhxxhEhx	RpxxKxxxhGhhY	hhxhHDxhxxx

Şekil 11. Familia I'e ait DNA polimeraz enzimlerinin polimeraz bölgesinde yer alan korunmuş amino asitler

Motif B fingers alt bölgesi içerisinde yerleşmiş iken A ve C motifleri palm alt bölgesi içerisinde yerleşmiş olup A, B, RT ve X polimeraz familyalarına ait polimerazlar içinde yapısal olarak korunmuştur. Motif A çoğunlukla hidrofobik amino asitler içerir ve bir tane β -strand ile başlayıp bir tane α -helix ile devam eder.

1.10. Termofilik Mikroorganizmaların Orijini

Termofilik mikroorganizmaların orijini ve evolusyonu yıllardır birçok bilimsel grubun çözmeye çalıştığı bir konudur (Brock, 1986). İki temel hipotez geliştirilmiştir: Birincisine göre ilk hücrel organizma yüksek sıcaklığa sahip çevrelerde oluşmuştur (canlı teorisine sıcaklık orijini). İkincisine göre ise yaşam ılımlı sıcaklıklarda başladı ve termofilik organizmalar sıcak çevrelere adapte oldular (adaptasyon teorisi). Şu anda mevcut “evrensel yaşam ağacı” na göre (çoğunlukla rRNA sekans benzerliğine göre yapılmaktadır) en derin yaşam kolunda hipertermofilik organizmalar yer almaktadır

(Stetter, 1996; Woese, 1990). Bu da yaşam teorisinin sıcak orijinini desteklemektedir. Ayrıca evrensel hayat ağacı Eubacteria'ların Archaea'lerden sonra var olduğunu desteklemektedir.

1.11. Endüstriyel Termofilik Organizmalar

Termofilik organizmaların, hücresel yapıları da (enzim, protein ve nükleik asit) termostabildir ve besin, kağıt endüstrisi, deterjan, ilaç toksik atıkların uzaklaştırılması ve biyoteknoloji gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadırlar (Demirijan vd., 2001). Birçok termofilik organizmadan elde edilen ısı kararlı enzimler, organizmanın optimum gelişme sıcaklığından daha da ısı kararlıdırlar (Saboto vd., 1999). Bu tür enzimler, mikroorganizmalardan fermentasyon koşullarının optimize edilmesi ile elde edilebildiği gibi, rekombinant DNA teknolojisi ile hızlı gelişen mezofilik mikroorganizmalara klonlanarak da elde edilebilmektedirler. Bu tür mikroorganizmalardan hipertermofilik olanlarda (*Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* ve *Methanopyrus*) *in situ* sıcaklık, buldukları çevreye bağlı olarak 80 ila 115 °C arasında olabilmektedir (Huber ve Stetter, 1998). Bakteriler içerisinde ise *Thermotoga maritima* (90°C) ve *Aquifex pyrophilus* (95°C) en yüksek büyüme sıcaklığına sahiptir (Herbert ve Sharp, 1992).

Termofilik organizmaların sahip olduğu termostabil enzimler denatürasyona ve proteolize karşı dirençlidirler (Kumar ve Nussinov, 2001). Bu organizmalar tarafından üretilen çaperonlar denatürasyon sonrası proteinin eski haline yeniden katlanmasını sağlayarak eski fonksiyonunu tekrar kazanmasını sağlar (Everly ve Alberto, 2000). Termofilik organizmaların hücre membranları doymuş yağ asitlerinden yapılmıştır ve bu da hücre için hidrofobik bir çevre oluşturarak yüksek sıcaklıklarda canlı kalabilmesini sağlamaktadır (Herbert ve Sharp, 1992). Ayrıca bu organizmalar ters-DNA giraz'a sahiptir ve bu enzim DNA'ya pozitif süper halkalar kazandırarak DNA'nın erime sıcaklığını yükseltir (Lopez vd., 1999).

1.12. Endüstriyel Termofilik Enzimler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro* şartlarda DNA'yı çoğaltabilme özelliğinden dolayı, genetik mühendislikte çok büyük bir ilerleme katedilmesini sağlamıştır. Bu yöntemde ard arda üç basamak sürekli birbirini takip etmektedir. Bunlar:

DNA'nın denatürasyonu veya erimesi (90-95°C'de), primerin DNA'ya bağlanması (~55°C) ve DNA sentezi veya primer uzaması (~70°C)'dir (Mullis vd., 1986; Erlich vd., 1988; Saiki vd., 1988). Bu yöntemdeki en büyük gelişmeyi, DNA zincirinin sentezini gerçekleştiren termostabil DNA polimeraz enzimlerinin elde edilmesi sağlamıştır (Mullis and Faloona, 1987).

PZR uygulamasının ilk zamanlarında *E. coli*'den izole edilen DNA polimeraz I enzimi kullanılmıştır (Mullis vd., 1986; Erlich vd., 1988). Bu enzim, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması için uygulanan sıcaklıkta aktivitesini kaybettiği için her bir denatürasyon ve primer hibridizasyonu adımından sonra tekrardan eklenmesi gerekmektedir. Bu da PZR'da zaman kaybına ve ekonomik kayıplara yol açmaktaydı. İlk tanımlanan termofilik DNA polimeraz I enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilmesi ile bu sorun çözülmüştür (Chien vd., 1976; Kaledin vd., 1980).

Thermus aquaticus'dan izole edilen *Taq* DNA polimeraz I'den başka, DNA polimeraz geni ve enzimi karakterize edilen diğer termofilik öbakteriler, *Bacillus stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*) (Phang ve vd., 1995), *Bacillus caldotenax* (Uemori ve vd., 1993), *Thermus filiformis* (Jung ve vd., 1997)'e ait DNA polimeraz enzimleridir.

Ayrıca son zamanlarda daha yüksek sıcaklıklara ve daha ekstrem yaşam şartlarına adapte olabilen arkeabakterilerin DNA polimeraz I ve diğer enzimleri üzerindeki çalışmaların sayısı artmıştır ve bunlardan *Pyrococcus abyssi* (Gueguen vd., 2001), *Pyrobaculum islandicum* (Kahler ve Antranikian, 2000), *Thermococcus sp.* TY (Niehaus vd., 1997), *Pyrococcus furiosus* (Uemori vd., 1997), *Sulfolobus solfataricus* (Rossi vd., 1986) ve *Thermococcus litoralis* (Kong vd., 1993) türlerine ait DNA polimeraz genleri ve enzimleri karakterize edilmiştir. Tanımlanan bu enzimlerin PZR'da kullanışlılığı ayrıca incelenmiş ve bazıları ticari olarak kullanılabilir hale getirilmiştir (Tablo 3).

En ayrıntılı çalışılanlar ve PZR reaksiyonlarında kullanılanlardan bazıları şunlardır: *Bst* DNA polimeraz I; *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edilmiştir ve 5'→3' DNA sentezi ile zayıf 5' nükleaz aktivitesine sahiptir. 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi göstermeyen büyük fragment klonlanarak elde edilen ürün sekans belirleme çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek GC içeriğine sahip DNA örneklerinin sekans edilmesinde diğer DNA polimeraz I'lere oranla daha güvenilir sonuç vermektedir ve bu açıdan baz dizisi belirleme reaksiyonlarında tercih edilmektedir. Ayrıca nanogram miktardaki DNA örneklerinden baz dizisi yapmaya imkan sağlar (Kostichka vd., 1991).

Tablo 3. Ticari olarak kullanılan termofilik DNA polimeraz enzimleri

Polimerazlar	Elde edildiği organizmalar	Referanslar
<i>Bst</i> I pol	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Mead vd., 1991
Deep Vent Pol	<i>Pyrococcus</i> sp. GB-D	Cline vd., 1996
<i>Pfu</i> pol	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Lundberg vd., 1991
<i>Pwo</i> pol	<i>Pyrococcus woesei</i>	Frey ve Suppman, 1995
<i>Taq</i> pol I	<i>Thermus aquaticus</i>	Jones ve Foulkes, 1989
<i>Tfi</i> pol	<i>Thermus filiformis</i>	Perler vd., 1996
<i>Tfl</i> pol	<i>Thermus flavus</i>	Kaledin vd., 1980
<i>Tth</i> pol	<i>Thermus thermophilus</i>	Myers ve Gelfand, 1991 Pantazaki vd., 2002
<i>Tma</i> pol	<i>Thermotoga maritima</i>	Bost vd., 1994
Vent pol	<i>Thermococcus litoralis</i>	Perler vd., 1996

Pfu DNA polimeraz, hipertermofilik arkaebakter *Prococcus furiosus*'dan elde edilmiştir ve 5'→3' polimerizasyon aktivitesi ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. 70-80°C aralığında DNA'nın sentezini *Taq* DNA polimeraz I'e oranla daha hatasız bir şekilde gerçekleştirmektedir (Lundberg vd., 1991).

Vent_R ve Vent_R (exo⁻) DNA polimerazlar, arkaebakter *Themococcus litoralis*'den izole edilmiştir. Vent_R 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye sahiptir ve bu özelliği sayesinde *Taq* DNA polimerazdan 5 ile 15 kat daha güvenilir sonuç vermektedir. Vent_R (exo-) ise 3'→5' ekzonükleaz bölge yüksek sıcaklıklarda dideoksi dizi analizi çalışmalarını kolaylaştırmak ve yüksek DNA amplifiye özelliği kazandırmak için uzaklaştırılmıştır. DNA'nın amplifiye edilmesi ve yüksek sıcaklıklarda dideoksi dizi analizi için kullanılmaktadır (Mattila vd., 1991; Kong vd., 1993; Perler vd., 1992).

Deep Vent_R ve Deep Vent_R (exo⁻) DNA polimerazlar, arkaebakter *Prococcus species* GB-D'den izole edilmiştir. 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye sahiptir ve yüksek sıcaklıklarda Vent_R DNA polimerazdan daha stabildir. Deep Vent_R (exo⁻) 3'→5' ekzonükleaz bölgenin uzaklaştırılmasıyla elde edilmiştir ve daha çok DNA dizi analizi çalışmalarında tercih edilmektedir (Xu vd., 1993; Jannasch vd., 1992)

9^oN_M DNA polimeraz, termofilik deniz arkebakterilerinden *Thermococcus* sp.'den (suş 9^oN-7) izole edilmiştir ve 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye sahiptir. 95°C sıcaklıkta 6,7 saat yarılanma ömrüne sahiptir. DNA'nın amplifikasyonu ve SNP analizlerinde kullanım için uygundur (Southworth vd., 1996).

1.13. Amaç ve Önemi

Son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yeni termofilik bakteriler tanımlanmıştır (Belduz vd., 2003; Canakci vd., 2004). Tanımlana bu yeni türlerde bazı enzimlerin karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Colak vd., 2005; Canakci vd., 2007; Sağlam vd., 2007).

Şu ana kadar termofilik Eubacteria ve Arkebakteri'leri içine alan bakterilere ait 50'den fazla DNA polimeraz geni klonlanmış ve çalışılmıştır. Fakat Türkiye'de yeni termofilik bakterilere ait DNA polimeraz I enzimi üzerinde yürütülen bir çalışma bulunmamaktadır. Isı kararlı DNA polimeraz enzimleri kullanıma girdikten sonra PZR metodu; genlerin amplifikasyonunda, DNA dizi analizlerinde ve klinik teşhisde temel ve vazgeçilmez bir metod olmuştur. 1998 yılı itibari ile yıllık ortalama 300 milyon dolarlık bir endüstrinin temelini oluşturmaktadır. Ancak maalesef ülkemiz bu büyük payda üretici olmaktan öte tüketici bir paya sahip. Bu durum dikkate alındığında diğer tüm alanlarda olduğu gibi bu alanda da var olan boşluğu dolduracak çalışmalara bir an önce başlanmalıdır. Yukarıda belirtilen hedefler kapsamında yürütülen bu çalışmada, *Gca* TK4'e ait DNA polimeraz I geninin tüm nükleotit sırasının sekans edilerek belirlenmesi ilk amacı oluşturmaktadır. İkinci olarak sekans sırası belirlenen DNA polimeraz I geninin pET-15b ekspresyon vektörüne ligasyonu ve *E. coli* BL21 hücrelerinde ekspres edilmesini amaçlanmaktadır. Üçüncü olarak rekombinant enzim *E. coli* BL21 hücrelerinden purifikasyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu amaçlanmaktadır. Dördüncü olarak DNA polimeraz I enzimlerinin bazı aktivitelerinden sorumlu olan amino asitlerin nokta mutasyonlar ile değiştirilmesi ve elde edilen mutant enzimlerde mutasyonların etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Son olarak ise enzimin moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyeri ve Vektörler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir: bovine serum albumin (BSA) (Sigma), DTT (USB), β -merkaptoetanol (Sigma), agaroz (Sigma), akrilamid (Sigma), bisakrilamid (Sigma), amonyum persülfat (BioRad), asetik asit (Sigma), formaldehit (Sigma), glasiyel asetik asit (Sigma), gliserol (Sigma), glisin (BioRad), glukoz (Merck), dNTP (Fermentas), brom fenol mavisi (BioRad), coomassie brillant blue-R 250 (BioRad), coomassie brillant blue G (Bio Rad), etidyum bromür (BioRad), ksilen siyanol (BioRad), ampisilin (USB), izopropanol, metanol (Sigma), etanol (Sigma), TEMED (BioRad), BioRex 70 katyonik rezin (BioRad), DEAE52-cellulose rezin (Amersham Pharmacia), Superdex G200 (Sigma), ürea (Fluka), SDS (Merck), NaCl (Fluka), KCl (Merck), MgCl₂ (Merck), MnCl₂ (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), calf tymus DNA (Sigma), Agar (Merck), DIG-11-dUTP (Roche).

Çalışma kapsamında kullanılan enzimler aşağıdaki gibidir: lizozim (Sigma), RNase A (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), *Pfu* Turbo DNA polimeraz (Stratagene), *EcoRI* (Fermentas), *PstI* (New England Biolabs), *ClaI* (Sigma), *HinfI* (Fermentas), *Sau3AI* (Fermentas) ve *PspGI* (New England Biolabs), *NcoI* (New England Biolabs), *BamHI* (New England Biolabs), *DpnI* (Roche), T4 kinaz (Invitrogen), T4 DNA ligaz (Fermentas).

Çalışmada kullanılan LB besiyerleri Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) hazırlandı. LB (Lauria-Bertain) besiyeri 5 gr maya özütü, 10 gr tripton ve 5 g NaCl 1 litrede suda çözülerek hazırlandı. LBA ise 1 litre LB besiyerine 16 g agar ilavesi ile hazırlanmıştır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kitler ve vektörlere ait bilgiler şu şekildedir. Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), pGEM-T Easy Vector TA Cloning Kit (Promega), BioRad Protein Assays Kit (BioRad), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ve QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche), pGEM-T easy vektor (Promega), pET-15b (Novagen).

Çalışmada kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler şu şekildedir. Diyaliz membranı ve Whatman 3 MM paper (Whatman).

2.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları

Tampon adı	Tampon bileşenleri
Pellet Yıkama Tamponu	0.2 M NaCl ve 10 mM Tris-HCl (pH:8.0)
10X Enzim Seyreltme Tamponu	500 mM Tris-HCl (pH: 8.8), 10 mM DDT (Dithiothreitol), %20 gliserol, 1 M NaCl
10X Polimeraz Aktivite Tamponu	500 mM Tris (pH:8.0), 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA
10X Annealing Tampon	500 mM Tris-HCl (pH: 7.8) ve 1000 mM KCl
5X TBE Tamponu	54 gr Tris, 27,5 gr Borik asit ve 3,36 gr Na ₂ EDTA 1 litre ddH ₂ O’da çözülür ve filtre edilerek kullanılır
%50 TCA	500 gr TCA 727 ml ddH ₂ O’da çözülür ve 22,2 gr NaPPI eklenerek hazırlanır. %5’lik hazırlanarak kullanılır
2X Reaksiyon Sonlandırma Boyası	% 95 formamide, % 0,05 bromophenolblue, % 0,05 xylene cyanol, 20 mM EDTA pH:8,0

2.3. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri ve Genel Özellikleri

Bu tez kapsamında DNA polimeraz I geni klonlanan ve enzimatik olarak karakterize edilen *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 (*G. cal* TK4) bakterisi ile *E. coli* K12 JM101 (F’ *traD36 proA⁺B⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi*) ve *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (F-, *ompT*, *hds_B(r_B-, r_B-)*, *dmc*, *gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r) suşları KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalına ait stoktan temin edildi. *E. coli* K12 JM101 PZR ürünlerini taşıyan vektörlerin transformasyonu için kullanıldı. *E. coli* BL21 (DE3)pLysS ise rekombinant DNA polimeraz I geninin ekspresyonu için kullanıldı. *E. coli* DNA polimeraz I ile Klenow fragmentini ekspres eden *E. coli* suşu JM378 ile *Mtb* DNA polimeraz I enzimini ekspres eden *E. coli* suşu BL21(DE3)pLys New Jersey Medical School (Biyokimya Bölümü) stok kültüründen temin edildi.

2.4. Kompetant Hücre Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* JM101 ve BL21(DE3)pLysS suşlarına ait komponent hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı (Maniatis vd.,1989). Öze ile 3 mL LB besiyerine 1 gece önceden tek bir koloni seçilerek ekim yapıldı. Sıvı kültür gece boyunca 37 °C’de 200 rpm’de sallanarak büyütüldü. Hazırlanan gece kültürü 600 nm’de ölçülerek yoğunluğu belirlendi ve 0,1 olacak şekilde tekrar 30 ml LB yeni besiyerine ekim yapıldı. Optik yoğunluk 600 nm’de 0,4–0,6 arasına ulaşınca hücreler 4 °C’de 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 10 mL soğuk 0,1 M CaCl₂ ilave edilerek çözüldü ve 30 dakika buz içinde bekletildi. Sonrasında 4 °C’de 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve pellet 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltilisinde süspansiyon edilerek 200 µL hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanıldı.

2.5. Pol I Geninin Tüm Nükleotit Sırasının Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar

2.5.1. Gene Ait Korunmuş Bölgenin Klonlanması

Gca TK4 DNA polimeraz I genine ait korunmuş bölge daha önce KTÜ Trabzon Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülen doktora tezi kapsamında tanımlanmıştır (Dülger, 2003). Bu amaçla daha önce tanımlanan termofilik DNA polimerazlara ait sekans bilgilerinde yararlanılmış ve iki adet primer sentezletilmiştir: TK4Pol-DegF2 (5’-CCB AAY YTS CAR AAC ATH CC-3’) ve TK4Pol-DegR2 (5’-KAS NAK YTC RTC RTG NAC YTG-3’). Bu primerler ile elde edilen 638 baz çiftlik korunmuş bölgeye ait sekans bilgileri bu tez kapsamında genin geri kalan kısmının tamamlanmasında referans olarak kullanılmıştır (Dülger, 2003).

2.5.2. Genomik DNA İzolasyonu

Gca TK4 DNA polimeraz I genine ait korunmuş bölgeden hareketle genin geri kalan kısmını tamamlamak için “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega)” kullanılarak yüksek saflıkta DNA izole edildi. Öncelikle termofilik bir bakteri olan *Gca* TK4, stok kültürden LBA katı besiyerine yayma ekim yapıldı ve bir gece boyunca 55°C’de

inkübe edilerek büyütüldü. DNA izolasyonu tek bir koloniden başlatılan 5 ml gece kültüründen yapıldı ve DNA izolasyonu için üretici firmanın belirttiği protokol takip edildi. Genomik DNA'nın yoğunluğu 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliğinden yararlanılarak belirlendi ve kalitesi %8'lik agaroz jelde yürütülerek gözlemlendi ve çalışmalarda kullanmak üzere -20°C'de saklandı.

2.5.3. Ters PZR İçin DNA Örneklerinin Hazırlanması

Gca TK4 polimeraz I genine ait kalan nükleotit sırası Tablo 5'deki restriksiyon endonükleazlar ve primer çiftleri kullanılarak ters PZR yöntemi ile belirlendi.

Tablo 5. Pol I genine ait nükleotit sırasının belirlenmesinde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve primerleri

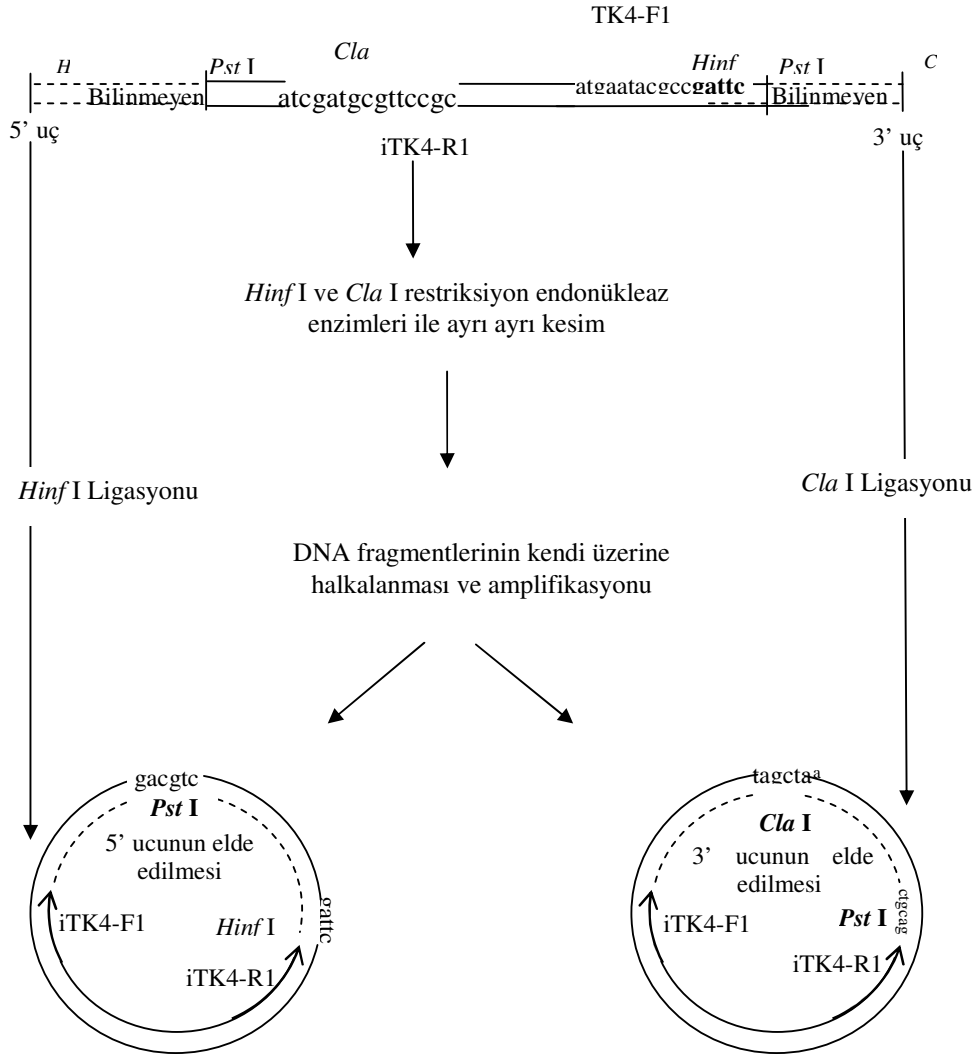
Restriksiyon endonükleazlar	Primerler	Primerlere ait nükleotit sıraları
<i>Cla</i> I	iTK4-F1	5'-CGGCGATGAATACGCCGATTC-3'
	iTK4-R1	5'-CGTGGCGAAACGCATCGAT-3'
<i>Hin</i> FI	iTK4-F1	5'-CGGCGATGAATACGCCGATTC-3'
	iTK4-R1	5'-CGTGGCGAAACGCATCGAT-3'
Sau3AI	iTK4-F2	5'-CTGGCGGGACAAGAGTTTAAAC-3'
	iTK4-R2	5'-GACATCAACCTTTACGCCGGT-3'
<i>Hin</i> FI	iTK4-F3	5'-AGGGCATTGAGCTGCGTGG-3'
	iTK4-R3	5'-TCCATTTTAGCGCAACGATC-3'
<i>Psp</i> GI	iTK4-F4	5'-GCGAATGAACACGGCCACTTC-3'
	iTK4-R4	5'-CTTCGACAACGAGCGCCGACC-3'
	Pol Deg 1	5'-ATGAGRTTTRAAAAAARCTM-3'

Bu amaçla 2,5 µg *Gca* TK4 genomik DNA'si 40 µl hacimde 10 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi ve herbir enzim için spesifik tampon kullanılarak 37°C'de 2 saat inkübe edilerek kesildi (*Psp*GI için kesim reaksiyonu 75°C'de gerçekleştirildi). Tablo 1'de çalışma kapsamında kullanılan tüm restriksiyon enzimleri ve bu enzimlerle birlikte kullanılan primerler gözükmektedir. Kesim ürünleri 80°C'de 20 dakika tutularak (*Psp*GI hariç, etanol çöktürmesi ile restriksiyon endonükleaz uzaklaştırıldı) restriksiyon endonükleazlar ısı ile denatüre edildi. Kesim ürünleri % 1,2'lik agaroz jelde yürütülerek

DNA'nin kesimi doğrulandı. 10 ünite T4 DNA ligaz (Biolab, New England) ile toplam 400 µl hacimde self ligasyon reaksiyonu başlatıldı ve kesim ürünlerinin kendi üzerine katlanması sağlandı. Self ligasyon reaksiyonu 16°C'de 16 saat olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası self-ligasyon olan DNA ürünleri etanol presipitasyonu ile enzimlerden temizlendi ve 40 µl steril distile suda çözülerek ters PZR reaksiyonlarında kullanıldı (Samborok, 1989).

2.5.4. Gene Ait İlgili Kısımların Ters PZR ile Çoğaltılması

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim sonrası kendi üzerine halkalanması sağlanan DNA fragmentleri Tablo 5'de belirtilen primer çiftleri ile PZR'da (Personal Cycler, Biometra) çoğaltıldı. PZR reaksiyonları 50 µl hacimde ve 100 ng halkasal *Gca* TK4 genomik DNA, 300 ng herbir primer, 5 mM MgCl₂, 200 µM herbir dNTP, 5 µl 10X *Taq* DNA polimeraz I tamponu, 2 ünite *Taq* polimeraz I (Fermentas) kullanılarak gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu tüm primer çiftleri için aynı koşullarda gerçekleştirildi: 94°C 5 dakika ilk denatürasyon ve sonrasında 30 döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika sentez. Son sentez 72°C'de 5 dakika olarak yapıldı. PZR reaksiyonu sonrası amplifiye edilen *Gca* TK4 polimeraz I genine ait fragmentler %1,4'lük agaroz jelde yürütülerek gözlemlendi. Markır olarak 100 baz DNA ladder (Fermentas) kullanıldı. PZR'lar sırası ile önce *Hinf*I ve *Cla*I için, sonrasında da 5' ucun tamamlanması için *Sau*3AI, *Hinf*I, *Psp*GI restriksiyon endonükleazları ile kesim sonrası oluşan self-hibridize fragmentler için yapıldı. Ters PZR'a ait yöntemin *Cla*-I ve *Hinf*-I restriksiyon enzimleri için şematize edilmiş hali Şekil 12'deki gibidir.



Şekil 12. Ters PZR'nun genel şemasının *Hinfl* I ve *Cla* I için gösterilmesi

2.5.5. Ters PZR ile Çoğaltılan Fragmentlerin Baz Sırasının Belirlenmesi

Baz sırasının belirlenmesi için PZR ürünlerinin pGEM-T easy vektörüne (Promega) ligasyonu sağlandı ve bu amaçla üretici firmaya ait protokol takip edildi. Ligasyon ürünleri daha önceden hazırlanan *E. coli* JM101 komponent hücrelerine transforme edildi (Maniatis vd.,1989). PZR ürününü taşıyan plazmiti içeren hücreler 1 mM IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli (50 µg/ml) LBA petrilere yayma ekim ile ekildi ve mavi-beyaz renk oluşumuna bakılarak hücreler ayrıldı. Belli sayıda beyaz hücreden plazmit izole edildi (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) ve *Eco*RI restriksiyon

endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütüldü. Kontrol olarak PZR ürünü kullanıldı ve PZR ürünü ile aynı parçayı veren plazmitler pozitif kontrol kabul edildi ve baz dizin analizi Macrogen Inc.'de (Güney Kore) yaptırıldı. Ters PZR ile çoğaltılan tüm parçaların baz sıralarının belirlenmesinde aynı yol takip edildi.

2.5.6. Ters PZR ile Elde Edilen Polimeraz I'e Ait Sekansların Birleştirilmesi

Ters PZR ile elde edilen sekanslara ait çakışma bölgeleri Blast programı (URL-1, 2005) kullanılarak belirlendi. Üst üste çakışan kısımlar alt alta getirilerek birleştirildi ve gene ait tam uzunlukta sekans elde edildi. Nükleotit sırası, ExPasy programı (URL-2, 2005) kullanılarak amino asit sırasına dönüştürüldü. Enzime ait amino asit sırası elde edildikten sonra ExPasy programı ile enzimin teorik moleküler ağırlığı ve pI değeri belirlendi ve teorik değer ile karşılaştırıldı.

2.6. *Gca* TK4 DNA Polimeraz I Enzimine Ait Amino asit Sıranın Bilinen Diğer DNA Polimeraz I Enzimleri ile Karşılaştırılarak İncelenmesi

Daha önceden aminosit sırası bilinen ve enzimatik özellikleri aydınlatılan *E. coli* DNA polimeraz I (Andrea vd., 1990; Andrea vd., 1992; Dana vd., 1996; Yang vd., 2001; Wai-Chung vd., 2002; Kamalendra vd., 2003) *Mtb* DNA polimeraz I (Cindy vd., 2002), *Bst* DNA polimeraz I (James vd., 1997; Kostichka vd., 1991; Lu vd., 1991; Uemori vd., 1993; ve Phang vd., 1995) ve *Taq* DNA polimeraz I'e (Tabor ve Richardson, 1995) ait özelliklerden yararlanılarak enzimin sahip olabileceği özellikler araştırıldı (Tablo 6).

Tablo 6. Benzerlik çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalara ait GenBank bilgileri

Enzimler	GenBank Numarası	Kaynak
<i>E. coli</i> Pol I	1DPI	Joyce vd., 1982
<i>Taq</i> Pol I	P19821	Lawyer vd., 1989
<i>Mtb</i> Pol I	E70767	Cole vd., 1998
<i>Bst</i> Pol I	AAB52611	Aliotta vd., 1996
<i>Gka</i> Pol I	YP_148583	Takami vd., 2004
<i>Gca</i> TK4 Pol I	DQ340803	Bu çalışma

Enzimlere ait Genbank numaraları Tablo 6'daki gibidir ve ClustalW programı kullanılarak amino asit seviyesinde *Gca* TK4 DNA polimeraz I ve bu enzimler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu sayede enzimin sahip olabileceği bazı özellikler önceden tahmin edilmeye çalışılmıştır.

2.7. DNA Polimeraz I Geninin Ekspresyonu

2.7.1. PZR ile Genin Çoğaltılması

Ters PZR ile tüm sırası tamamlanan *Gca* TK4 pol I geni restriksiyon endonükleazlar açısından incelendiğinde *Nco*I ve *Bam*HI restriksiyon endonükleazları için kesim bölgesine sahip olmadığı gözlemlendi. Bu açıdan ekspresyon için pET-15b vektörünün *Nco*I ve *Bam*HI bölgesine klonlanması kararlaştırıldı. Tüm genin PZR'da amplifikasyonu için iki adet primer sentezletti: DNA-*Nco*I-F_5'-CCATGGGGTTGAAAAAAGCTAGTATTTG-3' ve DNA-*Bam*HI-R_5'-GGATCCTTACTTTGCGTCATACCATGTTGG-3'. Primerlerin 5' uçlarına ilgili restriksiyon endonükleazlar için kesim bölgesi ilave edildi (altı çizili bölgeler). *Gca* TK4 DNA polimeraz I genini tam uzunlukta çoğaltmak için PZR reaksiyonu, 50 µl hacimde: 1X *Taq* polimeraz tampon, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM herbir dNTP, 300 ng herbir primer, 50 ng *Gca* TK4 genomik DNA ve 2 ünite High Fidelity *Taq* pol I enzimi (Fermentas) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon, termal cycluslarda (Biometra) aşağıdaki program kullanılarak yapıldı:

1. Ön denatürasyon	95°C'de	5 dakika,
2. Ayrılma	95°C'de	1 dakika,
3. Primer bağlanma	58°C'de	1 dakika,
4. Uzama	72°C'de	4 dakika ve
5. Son uzama	72°C'de	10 dakika.

2-3 ve 4. basamaklar 30 kez tekrar edildi. PZR ürünü %1'lik agaroz jelde standart olarak 1 kb DNA ladder standart kullanılarak yürütüldü ve büyüklüğü doğrulandı.

2.7.2. Genin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Elde edilen PZR ürünü, pGEM-T Easy klonlama vektörüne (Promega) aktarıldı. Ligasyon reaksiyonu toplam 10 µl hacimde 1 µl pGEM-T, 5 µl ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 3 µl PZR ürünü kullanılarak 16°C'de 16 saat olarak gerçekleştirildi. Daha sonra PZR ürünü taşıyan pGEM-T easy vektörü, *E. coli* JM101 kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Samborok, 1987). Daha sonra hücreler IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli petrilerde mavi-beyaz renk oluşumuna bakılarak ayrıldı. Belli sayıda beyaz hücreden plazmit izole edildi ve *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi, PZR ürünü ile yan yana %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü ve pozitif olanlar belirlendi. Pozitif olanlardan tekrar kesim yapılarak *Gca* TK4 DNA I genine ait parça %1'lik agaroz jelden QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) kullanılarak temizlendi ve ekspresyon vektörüne aktarılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.7.3. Genin pET-15b Vektörüne Klonlanması

DNA polimeraz I geni ekspresyon için pET-15b vektörünün *NcoI* ve *BamHI* bölgesine klonlandı. Ekspresyon vektörünü içeren *E. coli* hücresi 5 ml LB besiyerinde büyütülerek plazmit izole edildi (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega). 10 µg plazmid DNA, 50 µl hacimde *BamHI* tamponu kullanılarak kesildi. Kesim için 10 unite *NcoI* ve 10 unite *BamHI* kullanıldı ve kesim reaksiyonu 37°C'de gece boyunca yapıldı. Kesim sonrası plazmit %1 lik jelde yürütülerek, jelden QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) kullanılarak temizlendi.

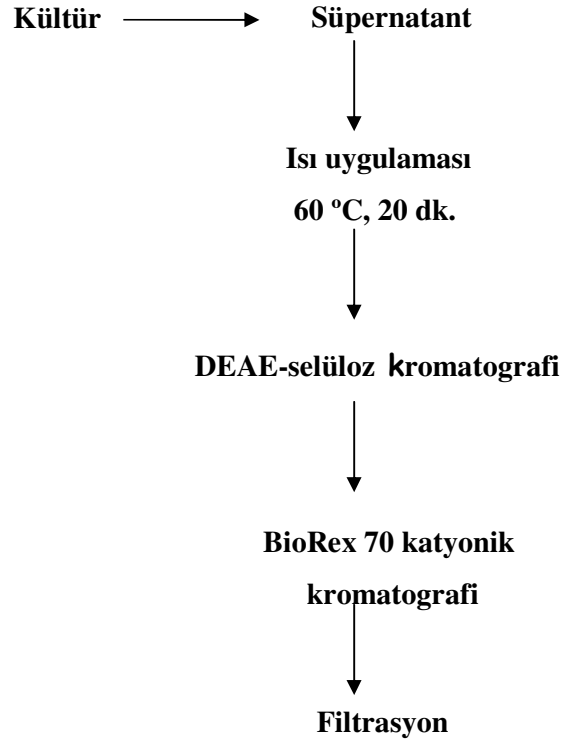
Her iki enzimle kesilmiş gen ürünü ve vektörün ligasyonu, toplam 10 µl hacimde yapıldı. Ligasyon reaksiyonu 1 µl T4 DNA ligaz tamponu (10X'den), 1µl T4 DNA ligaz (10 unite/µl), 2 µl ekspresyon vektörü ve 5 µl gen ürünü kullanılarak 16°C'de 16 saat olarak gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası plazmit, *E. coli* JM101 hücrelerine transforme edildi. Belli sayıda koloniden tekrar plazmit izole edildi, *NcoI* ve *BamHI* kesimi ile doğrulandı ve pozitif olanlardan bir tanesi seçilerek ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine aktarıldı (Maniatis vd.,1989).

2.7.4. Genin *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonunun Gözlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I genini içeren plazmidin transforme edildiği *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerinden rastgele belli sayıda koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyonun araştırılması iki farklı şekilde yapıldı. İlk önce seçilen kolonilerle beraber *E. coli* BL21 (DE3)Lys kendisi ve sadece pET-15b vektörünü içeren *E. coli* BL21 (DE3)Lys birlikte indüklendi. Bununla beraber rastgele seçilen bir koloni 8 saat inkübe edildikten sonra tekrardan iki tüpe yeniden ekildi ve 3 saat inkübe edildikten sonra tüplerden bir tanesi IPTG ile indüklenerek, diğeri ise indüklenmeden 3 saat daha büyütüldü. Sonrasında hücreler santrifuj ile çökeltilerek her ml'si 2 mg lizozim içeren 50 mM Tris-HCl (7.0) ve 1 mM DTT'den oluşan tamponda çözülerek sonikatör ile patlatıldı. 20 dakika 60°C'de bekletildikten sonra 12.500 rpm'de 20 dakika santrifuj edilerek pellet uzaklaştırıldı. Süpernatant %8'lik SDS-PAGE'de yürütülerek sonuçlar gözlemlendi. SDS-PAGE analizi Maniatis ve arkadaşlarına göre (Maniatis vd.,1989) yapıldı.

2.8. DNA Polimeraz I'in Saflaştırılması

Proteinin saflaştırılması, iki ayrı metod modifiye edilerek gerçekleştirildi ve ısı uygulaması, DEAE-selüloz (Uemori vd., 1993) ve BioRex 70 katyonik kromatografi (Engelke vd., 1990) kullanılarak yapıldı (Şekil 13). Ekspresyonun gözlemlendiği bir *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücresi seçilerek 50 ml gece kültüründe büyütüldü. Sonrasında iki litre 50 µg/ml ampicilin içeren taze besiyerine OD₆₀₀'da 0,1 olacak yoğunlukta seyreltilerek yeniden ekildi. OD₆₀₀'da hücre yoğunluğu 0,6 olana kadar hücreler büyütüldü ve son hacim 1 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklendi. İnkübasyona 4 saat daha devam edildi ve sonrasında protein izolasyonu ve ekspresyonun gözlenmesi yukardaki 2.7.4 nolu başlıktaki adımlar takip edilerek belirlendi.



Şekil 13. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin saflaştırılmasında izlenen basamaklar

2.8.1. DEAE-Selüloz Kromatografi

Isı uygulaması ve santrifüleme sonrası elde edilen protein örneği DEAE-selüloz kolonundan geçirilerek *E. coli*'ye ait az sayıda protein ile protein örneğindeki genomik DNA uzaklaştırıldı. Örnekler yüklenmeden önce kolon 300 ml tampon ile (50 mM Tris-HCl (pH:7,5) ve 600 mM NaCl) yıkanarak rejenere edildi. Sonrasında tekrar 300 ml 50 mM Tris-HCl (pH:7,5), 2 mM 2-Merkaptoetanol, %10 gliserol içeren tamponla yıkanarak dengelendi. Protein örneği iki katı kadar 50 mM Tris-HCl (pH:7,5) ve 1 mM DTT'den oluşan tanponu ile seyreltilerek kolona yüklendi. Kolon 50 ml yükleme tomponu ile yıkandı. Sonrasında 50 mM'dan 450 mM'a kadar her seferinde 10 ml tampon (50 mM Tris-HCl, pH:7,5 ve NaCl) ile yıkandı. Daha sonra herbir fraksiyon ayrı ayrı %8'lik SDS-PAGE yüklenerek *Gca* TK4 polimeraz I'i içeren franksiyonlar belirlendi.

2.8.2. BioRex 70 Katyonik Kromotografi

DEAE-selüloz sonrası *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimini içeren fraksiyon 50 mM Tris-HCl (pH:7,5) ve 1 mM DTT içeren tamponda gece boyunca diyaliz edildi ve tuzlardan uzaklaştırıldı. Sonrasında yine aynı tampon ile aktive edilmiş BioRex 70 kolonuna aynı tampon ile iki kat seyreltilerek yüklendi. İlk yüklenen örnek toplandı ve tekrardan kolondan geçirildi. Sonrasında kolon 50 mM NaCl içeren 50 ml aynı tampon ile yıkandı. Sonrasında ayrı ayrı 100 mM, 200 mM ve 300 mM NaCl ile yıkanarak *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi elüt edildi. Toplanan her fraksiyon ayrı ayrı jele yüklenerek enzimi saf olarak içeren fraksiyonlar belirlendi. Saf olarak elde edilen enzimin DNA polimeraz I olduğu mass spektrofotometre analizi ile doğrulandı (Proteomix Laboratory of New Jersey Medicine and Dentistry University).

2.8.3. DNA Polimeraz I Enzimini İçeren Fraksiyonların Konsantre Edilmesi ve Protein Miktarının Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I enzimini içeren fraksiyonlar belirlendikten sonra hepsi bir tüpe toplandı ve 30 kDa'dan küçük proteinlerin geçmesine müsait filtreler kullanılarak (Filtron, Filtron Technology Corporation) santrifüjleme ile konsantre edildi. Protein miktarı üç farklı şekilde belirlendi. İlk olarak nanodrop'da (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer) enzimin içinde yer aldığı tampon kör olarak kullanılarak 2 µl enzim çözeltisinin sahip olduğu saf enzim miktarı belirlendi. İkinci olarak saf enzimin yoğunluğu BSA standart eğrisi baz alınarak spektrofotometrik (HITACHI, U-200 Spectrophotometer) olarak belirlendi. BSA standart eğrisinin kalitesinin %98 ve üzerinde olmasına dikkat edildi. Üçüncü olarak ise farklı miktarlarda *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi, BSA eğrisinde kullanılan yoğunluklar baz alınarak SDS-PAGE'de birlikte yürütüldü ve nanodrop ve spektrofotometrik sonuçlar ile karşılaştırıldı. Son olarak enzimi içeren protein çözeltisi 50 mM Tris-HCl (pH:7,5), 1 mM DTT, 50 mM NaCl ve %25 gliserol içeren çözeltide gece boyunca bekletilerek diyaliz edildi ve -20°C de saklandı.

2.9. Mutant Proteinlerin Hazırlanması

Gca TK4 DNA polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I mutasyonları, PZR ve *DpnI* restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Mutasyon çalışmalarında kullanılan primerler ve kullanım amaçları Tablo 7’de verilmiştir. Primerler üzerinde koyu gösterilen altı çizili nükleotitler mutasyonun yapıldığı yeri göstermektedir.

Tablo 7. Mutasyon çalışmalarında kullanılan primerler ve kullanım amaçları

Primer ismi ve kullanım amacı	Primere ait sekans bilgileri
TK4-Y721F (tirozin amino asitinin fenilalanin amino asitine dönüştürülmesi)	F_5’-CGG CAT CAG CGACTTCGGGCTGTCAC-3’ R_5’-GTGACAGCCCCGAAGTCGCTGATGCCG-3’
TK4-Y721A (tirozin amino asitinin alanin amino asitine dönüştürülmesi)	F_5’-CGG CAT CAG CGACGCC GGG CTG TCAC-3’ R_5’-GTGACAGCCCCGGCGTCGCTGATGCCG-3’
TK4-F712Y (fenilalanin amino asitinin tirozin amino asitine dönüştürülmesi)	F_5’-CGAAAGCGGTGAACTATGGCATTGTTTACGG-3’ R_5’-CCGTAAACAATGCCATAGTTCACCGCTTTTCG-3’
<i>E.coli</i> -D424A (aspartik amino asitinin alanin amino asitine dönüştürülmesi)	F_5’-GGCAAAACCTGAAATACGCTCGCGGTATTCTGGC-3’ R_5’-GCCAGAATACCGCGAGCGTATTTTCAGGTTTTGCC-3’

Herbir primer planlanan mutasyon için özel bir kodona sahiptir. Bu tekniğin en önemli noktası yüksek doğrulukta DNA sentezini gerçekleştiren *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) Turbo DNA polimeraz enzimin (Stratagene) kullanılmasıdır. Yabancı tip geni taşıyan vektör Tablo 7’deki primerler ile ters yönde çoğaltıldı. Reaksiyon 300 ng primer, 20 ng kalıp DNA, 200 µM dNTP ve 2,5 ünite *Pfu* DNA polimeraz kullanılarak yapıldı ve PZR reaksiyonu 95°C’de 30 sn ilk denatürasyon ve sonrasında 18 döngü: 95°C’de 30 sn denatürasyon, 55°C’de 1 dakika hibridizasyon ve 68°C’de 20 dakika sentez şeklinde gerçekleştirildi. Son sentez 68°C’de 20 dakika olarak yapıldı. PZR ürünü %1’lik agaroz jelde gözlendikten sonra toplam hacim 50 µl’de 10 ünite *DpnI* ile 1X *DpnI* tamponunda iki saat kesildi. Kesim sonrası elde edilen PZR ürünü *E. coli* DH5α hücrelerine standart

kalsiyum klorür metodu kullanılarak transforme edildi ve 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar besiyerine ekildi. 3 adet koloniden plazmit izole edildi ve mutasyonlar dizin analizi ile doğrulandı. Mutant plazmit, *E. coli* BL21 (DE3)pLysS ekspresyon hücresine aktarılarak bir koloni seçildi ve ekspresyon *Gca* TK4 DNA polimeraz I için gerçekleştirilen adımlar takip edilerek belirlendi. Daha sonra ekspresyonun gözlendiği bir hücreden mutant enzim yaban tip enzimdeki adımlar takip edilerek saflaştırıldı ve mutasyon yönünden incelendi.

2.10. Enzim Substratların Hazırlanması

2.10.1. Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Primerlerin Sentezletilmesi

Enzimin biyokimyasal karakterizasyonu için sentetik primerler sentezletildi (New Jersey Medical School, Molecular Resource Facility). Enzimin herbir farklı alt bölgesinin karakterizasyonu için farklı nükleotit dizilimine sahip primeler dizayn edildi (Tablo 8).

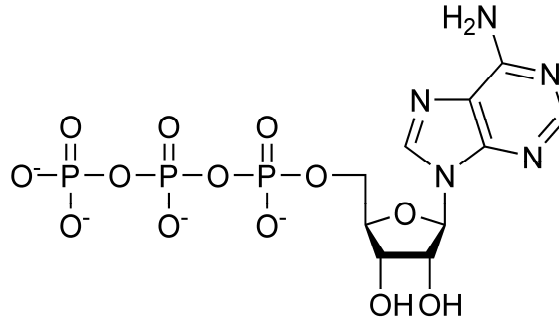
Tablo 8. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tek iplik DNA'lar

Primer adı	Primer sekans bilgileri
32 – mer kalıp DNA:	3' – GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT –5'
28 – mer kalıp DNA:	3' – GCAATCGGTGAGGCGCCATATTGCGCGT –5'
61 – mer kalıp DNA:	3' – CAATCGGTGAGGCTTCACGGACCATGAATTCCACGTCC CCCC CACGTGGAATTCATGGTCC –5'
14 – mer primer DNA:	5' – CGTTAGCCACTCCG –3
15 – mer primer DNA:	5' – CGTTAGCCACTCCGT –3'
14 – mer 3' -OH hatalı DNA:	5' – CGTTAGCCACTCCT –3'
14 – mer bloklayıcı DNA:	5' – CGGTATAACGCGCA –3'
15A -kalıp DNA:	5' – AGCAATCGGTGAGGC –3'
16AA -kalıp DNA:	5' – AAGCAATCGGTGAGGC –3'
18 – mer flap DNA:	5' – TTATCGGTATAACGCGCA –3'
33p16p – mer kalıp DNA:	5' – TGCGCGTTATACGGCACCCTGGAGTGGCTAACG –3'
16p – mer primer DNA:	5' – CGTTAGCCACTCCAGG –3'
32- mer kalıp RNA:	3' – GCAAUCGGUGAGGUCCACGGCAUAUUGCGCGU –5'
38-mer bloklayıcı DNA:	5' – CGGTATAACGCGCACGATCCGAACTTACCGCTCACGGT –3'
42-mer flap DNA:	5' – TTATCGGTATAACGCGCACGATCCGAACTTACCGCTCA CGGT –3'
56-mer kalıp DNA:	3' – GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGTGCTAGGCTT GAATGGCGAGTGCCA –5'

Enzimin RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için RNA nükleotitleri içeren kalıp zincir sentezletildi. Sentetik 14-mer DNA primer ile hibridize edilerek RNA-bağımlı DNA polimeraz I aktivitesinin incelenmesinde kullanıldı. Diğer primerler DNA-bağımlı DNA polimeraz enzimlerinin çok yönlü karakterizasyonunda kullanıldı.

2.10.2. Substratların Radyoaktif Olarak 5' Ucundan İşaretlenmesi

Tez kapsamında 14-mer polimeraz, 14-mer bloklayıcı ve 18-mer flap tek zincir DNA'lar (Tablo 8) 5'-ucundan T4 polinükleotit kinaz ve $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Şekil 14) kullanılarak işaretlendi.



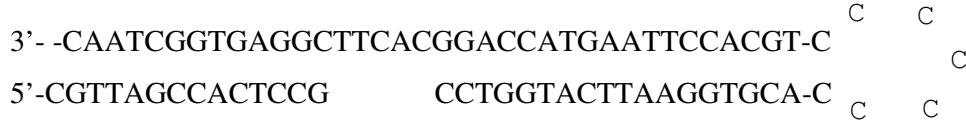
Şekil 14. Adenozin 5'-tri fosfatın (ATP) genel yapısı

İşaretleme reaksiyonu toplam 30 μl hacimde ve 6 μl 5X T4 polinükleotit kinaz tamponu, 10 μM tek zincir DNA, 100 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ve 10 unite T4 polinükleotit kinaz (InvitroGene) kullanılarak 37°C'de 1 saat olarak gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 95°C'de 5 dakika tutularak T4 polinükleotit kinaz enzimi inaktive edildi. Örnekler liyofilizatörde (Heto vacuum centrifuge, ATR Company) 10 μl hacime kadar konsantre edilerek 7 M üre içeren %16'lık akrilamid jele yüklendi ve 3 saat (35 volt) yürütüldü. Otoradyografi ile DNA'ların jeldeki pozisyonları belirlendi ve bistüri ile bu bantlar kesilerek 1 ml 0,5 M amonyumsülfat içeren falkon tüplerine aktarıldı. Saflaştırma için Maxam ve Gilbert yöntemi (1980) takip edildi. Özetle: 37°C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi ve jeldeki primerlerin tampon çözeltiye geçmesi sağlandı. Tampon çözeltiye difüze olan tek iplik işaretli DNA, NAPTM 10 Columns (SephadexTM G-25 DNA Grade, GE Healthcare) kullanılarak saflaştırıldı. Önce kolon 15 ml saf su kullanılarak yıkandı ve 1 ml örnek yüklenerek yine 1 ml fraksiyon toplandı. Sonrasında iki

kez 750 µl saf su ile ayrı ayrı 750 µl hacimde toplandı. İşaretli DNA örneğinin hangi tüplerde olduğu Model 3 Survey Meter (Ludlum Measurements) kullanılarak belirlendi. Bu örnek liyofilizatörde 100 µl hacime konsantre edilerek enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlandı.

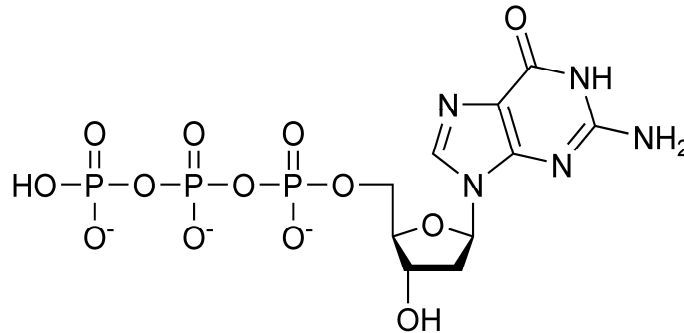
2.10.3. Tek İplik DNA'nın 3'-ucundan İşaretlenmesi

Bu amaçla 38-mer, 42-mer ve 61-mer uzunluğunda tek iplik DNA'lar işaretlenmiştir. Örnek olarak 5'-ucundan kendi üzerine hibridize olabilen 61-mer DNA tek iplik DNA (Şekil 15) örneği [α - 32 P]dGTP ile (Şekil 16) 3'-ucundan işaretlenmesi verilmiştir. Diğer DNA örnekleride benzer şekilde işaretlenmiştir.



Şekil 15. 3' ucunun işaretlenmesinde kullanılan 61-mer ve 14-mer DNA'nın hibridize olmuş durumu

Reaksiyon öncesi 14-mer primerin 61-mer kalıp zincire hibridizasyonu sağlandı. Bu şekilde 14-mer primerin 5'-ucundaki başlangıç dCTP nükleotiti, 61-mer kalıp ile hibridize olmadığından sarkık uç sağladı ve bu sarkık uç radyoaktif [α - 32 P]dGTP (Şekil 16) ile doldurularak kalıbın radyoaktif olarak işaretlenmesi sağlandı.



Şekil 16. Deoksiguanozin 5'-tri fosfatın (dGTP) genel yapısı

İşaretleme reaksiyonu toplam 30 µl hacimde ve 6 µl 10X *E. coli* DNA polimeraz I tamponu, 10 µM 61mer/14-mer DNA, 100 µCi [α - 32 P]dGTP ve 10 unite *E. coli* Klenow Fragmenti (exo-) kullanılarak 37 °C'de 1 saat olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası radyoaktif işaretli 62-mer kalıp DNA'nın purifikasyonu tek iplik DNA'nın purifikasyonundaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi.

2.10.4. Çift Zincir DNA Substratların Hazırlanması

1X annealing tampon kullanılarak, kalıp tek zincir DNA ile primer tek iplik DNA, Tablo 9'da belirtilen kombinasyonlarda karıştırılarak çift zincir DNA substratları hazırlandı. Reaksiyon karışımı ısıtıcıda 95°C'de 5 dakika bekletilerek var olan tüm spesifik olmayan eşleşmelerin erimesi sağlandı. Sonra yavaş yavaş soğutularak kalıp iplik ile primerin hibridize olması sağlandı. Hazırlanan çift zincir DNA örneklerine ait son derişimler Tablo 9'daki gibidir.

Tablo 9. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan DNA'lara ait eşleşmeler

DNA eşleşmeleri	DNA iplikçiklerine ait eşleşmeler (ilk rakamsal ifade kalıp zincir, ikincir rakamsal ifade primer zinciri ve üçüncü rakamsal ifade bloklayıcı DNA'yı ifade eder)
61/14 self DNA	$3' \text{-GCAATCGGTGAGGCTTCACGGACCATGAATTCCACGT-C} \begin{matrix} C & C \\ & C \end{matrix}$ $5' \text{-CGTTAGCCACTCCG-3'} \quad 5' \text{-CCTGGTACTTAAGGTGCA-C} \begin{matrix} C & C \end{matrix}$
32/14/14 Bloklayıcı DNA	$3' \text{-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT -5'}$ $5' \text{-CGTTAGCCACTCCG} \begin{matrix} \\ n+1 \end{matrix} 5' \text{-CGGTATAACGCGCA -3'}$
32/14/18 flap DNA	<p><u>32/14/18 Flap DNA</u></p> $3' \text{-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT -5'}$ $5' \text{-CGTTAGCCACTCCG-3'} \quad \text{CGGTATAACGCGCA -3'}$ $5' \text{-T-T-A-T-}$

Tablo 9'un devamı

28/14/14 Bloklayıcı DNA	<u>28/14/14 Bloklayıcı DNA</u> 3'-GCAATCGGTGAGGC GCCATATTGCGCGT - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG CGGTATAACGCGCA - 3' 3' 5' Çentik bölge
28/18 flap DNA	3'-GCAATCGGTGAGGC GCCATATTGCGCGT - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG CGGTATAACGCGCA - 3' 5', T', T', A', T' Çentik bölge
32/14 DNA	n n+1 ↓ ↙ 3'-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG 3'
15A/14 DNA	3'-GCAATCGGTGAGGCA - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG 3' n+1
16A/14 DNA	3'-GCAATCGGTGAGGCAA - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG 3' n+1 n+2
33p16/16 DNA	5' - TGC GCGTTATACGGCACCCCTGGAGTGGCTAACG - 3' 3' - GGACCTGACCGATTGC - 5'
32RNA/14D NA	3'-GCAAUCGGUGAGGUCCACGGCAUAUUGCGCGU-5' 5'-CGTTAGCCACTCCAGG - 3'
32/14-3' OH hatalı eşleşmiş	3'-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT - 5' 5'-CGTTAGCCACTCC T-3'
28/15/14 DNA	<u>28/15/14</u> 3'-GCAATCGGTGAGGC GCCATATTGCGCGT - 5' 5'-CGTTAGCCACTCCG CGGTATAACGCGCA - 3' T, 3'
56/14/48 DNA	3'-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGTGCTAGGCTTGAATGGCGAGTGCCA-5' 5'-CGTTAGCCACTCCG 3' CGGTATAACGCGCACGATCCGAACTTACCCTCACGGT -3' 5', T', T', A', T'
56/14/38 DNA	3'-GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGTGCTAGGCTTGAATGGCGAGTGCCA-5' 5'-CGTTAGCCACTCCG 3' CGGTATAACGCGCACGATCCGAACTTACCCTCACGGT -3' 3' 5'

2.10.5. Substratlara Ait Derişimler

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak çift zincir DNA'ların derişimleri radyoaktif olarak işaretli DNA'lar ve radyoaktif olarak işaretli olmayan DNA rnekleri için farklı farklı hazırlandı. Tablo 10'da radyoaktif ve radyoaktif olmayan DNA'lara ait derişimler görünmektedir.

Tablo 10. Çift iplik DNA substratlarına ait derişim bilgileri. RA: radyoaktif rnek, NRA: radyoaktif olmayan örnek

Çift iplik DNA'lar	Derişimler (nM)
32/14* (RA)	30 nM
32/14 (radyoaktif değil; NRA)	600 nM
33p16/16 (NRA)	20 μ M
32RNA/14DNA (RA)	30 nM
32/14*/14 veya 32/14/14* (RA)	30 nM
32/14/14 (NRA)	600 nM
32/14*/18 veya 32/14/18* (RA)	30 nM
32/14/18 (NRA)	600 nM
28/14*/18 veya 28/14/18* (RA)	30 nM
28/14/18 (NRA)	600 nM
28/14*/18 veya 28/14/18* (RA)	30 nM
28/15/18*	30 nM
28/14/18 (NRA)	600 nM
8/14*/14 (RA)	30 nM
28/14/14 (NRA)	600 nM
61/14* Self-ligasyon DNA (RA)	30 nM
15/14* (RA)	30 nM
16/14* (RA)	30 nM
32/14_3'-OH hatalı eşleşmiş	30 nM

2.11. *Gca* TK4 DNA Polimeraz I Enziminin Karakterizasyonu

2.11.1. pI Değerinin Belirlenmesi

Enzime ait pI değeri 2-D jel elektroforezinde (Bio-Rad Protean IEF System) belirlendi. 3 µg *Gca* TK4 DNA polimeraz I oda şartlarında rehidrasyon tamponunda 1 saat inkübe edildi (6 M üre, 2 M Tioüre, 2% CHAPS, 1% DTT, pH 5–8 ampholytes) ve ilk boyutsal ayırım için ReadyStrip IPG strips jelde (11 cm/pH 3–10) yürütüldü. SDS-PAGE'de yürütülmeden önce SDS-PAGE'in herbir kuyucuğu tampon A (6 M üre, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 20% gliserol, 2% SDS, 20 mg/mL DTT) ile hareketli tabla üzerinde 15 dakika dengelendi. Sonrasında 15 dakika tekrar tampon B'de (6 M üre, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 20% gliserol, 2% SDS, 25 mg/mL iodoacetamide) dengelendi. Kuyucuklara yüklendi ve önceden hazırlanmış 12% akrilamid jelde (Bio-Rad) yürütüldü. Akabinde hemen fiksasyon solüsyonuna (10% metanol, 7% asetik asit) jel alınarak fikse edildi ve 1 saat Sypro Ruby ile boyandı. Gece boyunca boyama sonrası jel 10% metanol ve 7% asetik asit çözeltisine aktarılarak boya kısmen uzaklaştırıldı. Jel Typhon 9410 görüntüleme sisteminde (Amersham Biosciences, UK) 200 nm çözünürlükte taranarak görüntülendi.

2.11.2. Özgül Aktivitenin Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'e ait özgül aktivite TCA (Trikloroasetikasit) yöntemi kullanılarak belirlendi. Substrat olarak 33p16/16 sentetik DNA kullanıldı (Tablo 9). Reaksiyon toplam 50 µl hacimde 1X DNA polimeraz tamponu, 2 µM DNA, 6 mM MgCl₂, 50 µM dNTP (2500 pmol), 0,5 µCi ³HdTTP (5,7 pmol) ve 10 nM enzim kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon tüpleri 60°C de ayrı ayrı 10 dakika inkübe edildi ve bu süre sonunda 5 ml buz gibi soğuk TCA eklenerek reaksiyonlar sonlandırıldı. Reaksiyon çözeltisi Whatman GF/B filtrelerine emdirilerek 5 kez buz gibi soğuk %5'lik TCA (her seferinde 10 ml ile), 5 kez buz gibi soğuk su (her seferinde 10 ml ile) ve 1 kez de buz gibi soğuk 5 ml etanol ile yıkandı. Sonrasında 65°C'lik inkübatörde 20 dakika bekletilerek filtrelerin kurutulması sağlandı. Sonrasında filtreler 2 ml toluin (%10 di sodyum piro fosfat) içeren scintillation tüplerine alındı. Enzimatik sentez sonrası kalıp DNA'ya eklenen radyoaktif ³HdTTP'nin miktarı scintillation'da (Packard Instrument Company) ölçülerek cpm'leri (her dakikadaki sayım) belirlendi. Kontrol olarak *E. coli* DNA polimeraz I

(3'→5' ekzonükleaz negatif) kullanıldı. Özgül aktivite 30 dakikada 10 nmol DNA'nin sentezini gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlandı (Neerja vd., 1996).

2.11.3. Primer Uzatma Deneyi

32/14 sentetik DNA, primer uzatma deneyinde substrat olarak kullanıldı (Tablo 9). Reaksiyon 6 µl toplam hacimde 1X polimeraz tampon, 50 µM herbir dNTP ve 50 nM *Gca* TK4 Pol I kullanılarak 7 farklı reaksiyon zamanında yapıldı (reaksiyon süreleri: 0, 15, 30, 45, 60, 120 ve 300 saniye). Reaksiyonlar 2X sonlandırma boyasından (Tablo 4) 6 µl eklenerek sonlandırıldı ve 6 µl reaksiyon alınarak 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70 derecede bir gece bekletilerek sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda 200 nm çözünürlükte taranarak gözlendi.

2.11.4. Optimum Bir ve İki Değerlikli Katyon Değişiminin Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'nin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini belirlemeye yönelik olarak sentetik 33p16p/16 DNA kalıp olarak kullanıldı ve optimum mono ve dikovalent katyon miktarı TCA yöntemi ile belirlendi. Na⁺ ve K⁺ monovalent, Mg⁺² ve Mn⁺² dikatyon olarak kullanıldı. Reaksiyonlar toplam 50 µl hacimde ve Na, K, Mg⁺² ve Mn⁺² için Tablo 11 de gösterilen değişimler kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 11. Optimum Na, K, Mg⁺² ve Mn⁺² değerinin belirlenmesinde kullanılan mono ve di katyonik iyonlara ait değişimler

	MgCl ₂	MnCl ₂	NaCl	KCl
Değişim (mM)	1	0.5	20	20
	2	1	40	40
	3	2	60	60
	4	3	80	80
	5	4	100	100
	6	5	120	120
	7	6	140	140
	8	7	160	160
	9	8	180	180
	10	9	200	200
	11	10		
	12			

Reaksiyonlar 2 dakika 55°C inkübe edildikten sonra 20 µl EDTA (500 mM) eklenerek sonlandırıldı. Herbir reaksiyon tüpünün içerdiği cpm'ler, özgül aktivitenin belirlenmesinde izlenen adımlar takip edilerek belirlendi. Monovalent iyonlar için deneyler 2 mM Mg⁺² iyonu kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler, GraphPad Prism paket programı kullanılarak grafiğe dönüştürüldü ve en fazla cpm'in elde edildiği değerler optimum miktar olarak kabul edildi.

2.11.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

Sentetik 33p16p/16 DNA kalıp olarak kullanılarak pH'nın *Gca* TK4 polimeraz I üzerine etkisi belirlendi. pH için Tris-HCl ve Glisin-NaOH kullanılarak Tablo 12'deki pH değerleri hazırlandı. Herbir tampon aralığı için *Gca* TK4 DNA polimeraz I tamponu ayrı ayrı hazırlandı. Reaksiyonlar ve enzim aktivitesi sonucu gözlenebilen cpm, hazırlanan bu polimeraz tamponları kullanılarak özgül aktivitenin belirlenmesinde olduğu gibi ayrı ayrı gerçekleştirildi ve en fazla cpm'in elde edildiği pH değeri belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 12. Optimum pH değerinin belirlenmesinde kullanılan pH aralıkları

Tamponlar	pH aralıkları							
Tris-HCl	7.2	7.6	8.0	8.4	8.8	9.2		
Glisin-NaOH					8.8	9.2	9.6	10.0

2.11.6. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı TCA yöntemi ile belirlendi. Reaksiyonlar, 30 °C'den 85 °C'ye kadar aralıklarda her seferinde sıcaklık 5 °C artırılarak 5 dakika süre ile yapıldı. Bu süre sonunda reaksiyonların sonlandırılması ve herbir derecede gözlenen enzim aktivitesinin belirlenmesi, özgül aktivitenin belirlenmesinde olduğu gibi gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre grafikler, GraphPad Prism paket programı kullanılarak grafiğe dönüştürüldü ve en fazla cpm'in elde edildiği sıcaklık aralığı, optimum sıcaklık olarak kabul edildi.

2.11.7. Enzimin Isıl Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimin ısı kararlılığı TCA yöntemi ve üre-PAGE ile belirlendi. Enzim 55 °C'den 85 °C'ye kadar sıcaklık aralıklarında 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerinde 10 dakika bekletilerek soğutuldu. Daha sonra bu enzim TCA ve standart 6 µl enzim aktivite deneylerinde (ürea-PAGE) kullanıldı. TCA yönteminde 2 µM DNA (33p16p/16p) kullanılarak deneyler gerçekleştirildi ve enzimin aktivitesi özgül aktivitenin belirlenmesinde izlenen adımlar takip edilerek belirlendi. Üre-PAGE jelde ise 100 nM DNA (32/14) kullanıldı ve primer uzatma deneyindeki basamaklar takip edilerek reaksiyonlar gerçekleştirildi. Üre-PAGE analizi ile elde edilen sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda 200 nm çözünürlükte taranarak gözlendi.

2.11.8. Özgül K_D DNA Değerinin Belirlenmesi

Gca TK4 pol I'in DNA'ya olan ilgi derecesini (afinite) bulmak için Joyce ve tarafından geliştirilen jel-shift (jel kayması) deneyi yapıldı (Astatke vd., 1995). Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde, 1X polimeraz tampon, 6 mM Mg⁺², 32/14-DNA (50–100 pg: [γ -³²P]ATP ile 5' ucundan işaretli) ve değişik yoğunluklarda *Gca* TK4 DNA polimeraz I (3,125 ng, 6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng ve 100 ng) kullanılarak yapıldı. Sonrasında reaksiyon tüpleri 8 dakika buz üzerinde bekletilerek polimeraz enziminin DNA'ya bağlanması sağlandı. Reaksiyonlar 2X sonlandırma boyası kullanılarak sonlandırıldı ve örnekler vakit kaybetmeden +4 derecede %6'luk doğal akrilamid jele yüklenerek 15 dakika yürütüldü. Sonrasında jel Phosphore Storage (fosfor görüntüleme kaseti) kasetine aktarıldı ve -70 derecede bir gece bekletilerek fosforun kasete expose olması (yansıması) sağlandı. Kaset üzerindeki fosfor, fosfor görüntüleme ile belirlendi (Typhoon 9400 scanner) ve miktarı ImageQuant software (Amersham Biosciences) kullanılarak belirlendi. Herbir sutunda oluşan enzim-DNA kompleksi miktarı ile enzimle kompleks oluşturmayan serbest işaretli DNA'nın miktarı belirlendi. Bu oranlar $K_{D,DNA}$ oranının belirlenmesi için kullanıldı. Oranlar, GraphPad Prism software'de nonlinear regression analizi (hyperbola) ile grafiğe dönüştürüldü.

2.11.9. K_D^{dNTP} ve K_{pol} Değerinin Presteady Kinetik ile Belirlenmesi

Bu amaçla 32/14 sentetik DNA kalıp olarak kullanıldı ve tek bir dATP'nin kalıba eklenmesi ölçülerek enzime ait K_D^{dNTP} ve K_{pol} değeri belirlendi. Kalıp zincir üzerindeki bir sonraki nükleotit (15. pozisyondaki nükleotit) dTTP'dir. Dolayısı ile enzim sadece bir dATP nükleotiti ekleyebilecek ve sentez ve reaksiyon karışımında bir sonraki nükleotit olmadığından sentez sonlanacaktır. Reaksiyonlar toplam hacim 56,7 μ l'de 50 nM *Gca* TK4 DNA polimeraz I, 100 nM DNA, 1X polimeraz tamponu, 6 mM MgCl₂ ve 2 μ M'dan 100 μ M'a kadar altı farklı dATP derişimi kullanılarak 5 milisaniyeden 2000 milisaniyeye kadar 10 farklı sürede (Tablo 13) gerçekleştirildi. Reaksiyonlar KinTek RFQ-3 Rapid Chemical Quench (KinTek Instruments, State College, PA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 13. Reaksiyon bileşenleri ve zamana ait bilgiler

Süre (milisaniye)	dATP Derişimi (μ M)	Enzim (nM) ve DNA miktarı (nM)
5	2	Herbir reaksiyon için 100 nM DNA ve 50 nM enzim
10	5	
25	10	
50	25	
100	50	
250	100	
500		
750		
1000		
2000		

Reaksiyonlar belirlenen süreler sonunda otomatik olarak makine tarafından 32 μ l 150 mM EDTA eklenerek sonlandırıldı. 8 μ l reaksiyondan alınarak 4 μ l 2X sonlandırma boyası ile karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika bekletildi. 8 μ l'si alınarak 8 molar ürea-%16 lik PAGE'de 35 volt'da 3,5 saat yürütüldü. Sonrasında jel fosfor görüntüleme kasetine aktarılarak gece boyunca -20 °C'de bekletildi ve fosforun fosfor görüntüleme kasetlerine yansımaları sağlandı. Kasetler, fosfor görüntüleme tarayıcısında taranarak (Typhoon 9400 scanner) bantların pozisyonları belirlendi. Aktivite öncesi ve sonrası radyoaktivite

ImageQuant software (Amersham Biosciences) kullanılarak belirlendi. Hesaplamalar $a/a+b \times dATP$ (μM) formülü kullanılarak yapıldı. a: oluşan ürün miktarı, b ise kalan substrat miktarını simgelemektedir. Veriler GraphPad Prisma paket programı kullanılarak grafiğe dönüştürüldü ve K_D^{dNTP} değeri bu grafik ve program ile hesaplandı.

2.11.10. RNA-Bağımlı DNA Polimeraz Aktivitesinin Araştırılması

Enzime ait RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları kullanılarak iki farklı metal iyonu varlığında araştırıldı. Reaksiyonlar toplam 6 μl hacimde ve 1X polimeraz tamponu, 50 μM herbir dNTP, 5 nM ^{32}P -işaretli 32/14 sentetik heteropolimerik RNA/DNA, 6 mM $MgCl_2$ ve $MnCl_2$ ve 50 nM *Gca* TK4 pol I kullanılarak gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak aynı yoğunlukta HIV-Reverse transkriptaz enzimi ve negatif kontrol olarak da *E. coli* KF kullanıldı. Reaksiyonlar HIV-Reverse transkriptaz ve *E. coli* KF için 37°C'de, *Gca* TK4 polimeraz I için 60°C'de 1 dakika ve 5 dakika (HIV-RT için 0,5 ve 1 dakika) olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar enzim ilavesi ile başlatıldı ve inkübasyon sonrası 6 μl 2X sonlandırma boyası ilave edilerek sonlandırıldı ve 6 μl reaksiyon örneği 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70 derecede bir gece bekletilerek sonuçlar gözlemlendi.

2.11.11. Hata Yapma Oranının (Fidelity) Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'in hata yapma oranı primer uzatma deneyi kullanılarak iki farklı şekilde belirlendi (Preston vd., 1988). ^{32}P -işaretli 32/14 sentetik heteropolimerik DNA substrat olarak kullanıldı. Kontrol olarak *Mtb* DNA polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I KF kullanıldı. Reaksiyonlar herbir enzimin 50 nM derişiminde gerçekleştirildi. Birinci olarak reaksiyon 1X polimeraz tampon, 6 mM $MgCl_2$, 250 nM 32/14 sentetik DNA ve 50 μM tek bir nükleotit (herbir reaksiyon sadece tek bir dNTP içerdiği) kullanılarak yapıldı. İkinci olarak ise, 3 dNTP (dATP, dTTP ve dGTP) kullanılarak enzimin hata yapma oranı incelendi. Her iki durumda da reaksiyon önce radyoaktif olarak işaretli olmayan DNA ile iki dakika reaksiyona tabi tutuldu ve sonrasında radyoaktif işaretli DNA eklendi ve reaksiyona 2 dakika daha devam edildi. Böylece herhangi bir nükleotit kontaminasyonu varsa radyoaktif işaretli olmayan DNA ile sentez esnasında enzim tarafından kullanılmış oldu. Reaksiyonlar *Mtb* DNA polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I için 37°C'de *Gca*

TK4 pol I için 60°C'de gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 6 µl 2X sonlandırma boyası ile sonlandırıldı ve 6 µl reaksiyon örneği 8 M üre-%16'luk PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve radyoaktif ürünlerin pozisyonları fosfor görüntüleme sisteminde (PhosphorImager) (Typhoon9400) görüntüledi.

2.12. *Gca* TK4 DNA pol I'in 3'→5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

2.12.1. 3'-OH Uçta Tek Baz Hatalı Eşleşmiş Çift Zincir DNA Substrat Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitenin Araştırılması

Primere ait 3'-OH uç kısmında hatalı eşleşmiş nükleotit içeren çift zincir DNA, substrat olarak kullanılarak enzimin çift zincir üzerinde 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldı. 14-mer uzunluğunda ve 3'-OH ucunda hatalı tek nükleotit taşıyan primer 32-mer uzunluğunda kalıba hibridize edilerek 32/14-tek hatalı nükleotit substrat oluşturuldu (Tablo 9). Reaksiyon toplam 6 µl hacimde şu bileşenlerden oluştu: 1X polimeraz tamponu, 1 nM DNA, 6 mM Mg⁺², 100 nM *Gca* TK4 pol I ve aynı enzim yoğunluğunda negatif kontrol olarak *E. coli* DNA polimeraz I Exo-, pozitif kontrol olarak ise, *E. coli* DNA polimeraz I kullanıldı. Reaksiyonlar *Gca* TK4 pol I için 37 ve 60°C'de, *E. coli* DNA polimeraz I için 37°C'de 1, 5 ve 10 dakika olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 6 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 6 µl reaksiyon örneği 8 M üre-%16'luk PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70°C'de bir gece bekletilerek sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlemlendi.

2.12.2. Tek Zincir DNA Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitenin Araştırılması

3'-ekzonükleaz aktivitesi 14-mer, 18-mer ve 33-mer uzunluğunda tek iplik DNA substrat olarak kullanılarak araştırıldı. Substrat DNA'lar 5' ucundan ³²γATP ile radyoaktif olarak işaretlendi. Reaksiyon toplam 6 µl hacimde şu bileşenler kullanılarak gerçekleştirildi: 1X polimeraz tamponu, 1 nM DNA (tek zincir), 6 mM Mg⁺², 100 nM *Gca* TK4 polimeraz I ve *E. coli* DNA pol I (D424A mutan) kullanıldı. Reaksiyon *Gca* TK4 pol I için 37 ve 60°C'de DNA polimeraz I için 37°C'de 1 dakika ve 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 6 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 6 µl reaksiyon örneği 8 M üre-%16'luk PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70 derecede bir gece bekletilerek sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak

gözlendi. 5'- ucundan işaretli primerin degradesyonu 3' ekzonükleaz aktivitesinin varlığını gösterdi.

2.13. *Gca* TK4 DNA Pol I'in 5'→3' Nükleaz Aktivitenin Araştırılması

2.13.1. 5'→3' Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'e ait 5' nükleaz aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları iki farklı şekilde yapıldı. İlk olarak 3' radyoaktif olarak işaretli 38-mer ve 42-mer uzunlukta primerlerin 56-mer kalıba hibridize olması ile elde edilen sentetik DNA kullanılarak araştırıldı. Reaksiyonlar 1X polimeraz tampon, 6 mM MgCl₂, 50 µM dNTP, 10 nM sentetik DNA ve 100 nM enzim kullanılarak yapıldı ve *E. coli* DNA polimeraz I pozitif kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon süresi *Gca* TK4 DNA polimeraz I için 1 ve 5 dakika, *E. coli* DNA polimeraz I için 1 dakika olarak gerçekleştirildi. İkinci olarak 61-mer uzunluğunda ve loop yapısı taşıyan DNA substrat olarak kullanılmak 5 ve 10 dakika sürelerde reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 6 µl sonlandırma çözeltisi eklenerek sonlandırıldı ve %16'lık 8 M üre jelde yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarılarak -70 derecede bir gece bekletildi ve sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlendi. 3'-ucundan işaretli primerin degradesyonu 5' nükleaz aktivitenin varlığını gösterdi.

2.13.2. 5' Nükleaz Kesim Profilinin Aralık ve Çentikli DNA ile Belirlenmesi

5' ucundan radyoaktif olarak işaretli sarkık uç (32/14/18 ve 28/14/18) ve bloklayıcı DNA (32/14/14 ve 28/14/18) kullanılarak enzimin 5' nükleaz kesim profili araştırıldı. Kontrol olarak *E. coli* DNA polimeraz I enzimi kullanıldı. Reaksiyonlar 1X polimeraz tampon, 6 mM MgCl₂, 100 nM sentetik DNA ve 100 nM enzimle toplam iki dakika reaksiyon süresi kullanılarak yapıldı. dNTP'nin eklendiği reaksiyonlarda dNTP miktarı 50 µM olarak kullanıldı. Reaksiyonlar 6 µl sonlandırma çözeltisi eklenerek sonlandırıldı ve 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarılarak -70°C'de bir gece bekletildi ve sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlendi. 5'-ucundan işaretli primerin degradesyon şekli 5' nükleaz aktivitenin kesim profilini gösterdi.

2.13.3. Primerin 3' unda Eşleşmemiş Tek Bazın Varlığında 5' Nükleaz Aktivitesi

5' ucundan işaretli 28/15/18 DNA substrat kullanılarak primerin kalıp ile eşleşmemiş son nükleotitin (15. nükleotit) 5' nükleaz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırıldı. 28/14/18 ve *E. coli* DNA polimeraz I kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon 1X polimeraz tampon, 6 mM MgCl₂, 10 nM DNA ve 100 nM herbir enzim kullanılarak farklı sürelerde (10–20–40 saniye, 1–2–5–10 dakika) yapıldı. Reaksiyonlarda dNTP kullanılmadı. Reaksiyonlar 6 µl sonlandırma çözeltisi eklenerek sonlandırıldı ve 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarılarak -70°C'de bir gece bekletildi ve sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlemlendi. 5' ucundan işaretli primerin degradesyonu 5' nükleaz aktivitesinin varlığını gösterdi.

2.13.4. 5'→3' Özgül Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'in özgül 5' nükleaz aktivitesi sentetik DNA (28/14/18) kullanılarak araştırıldı (Tablo 9). Reaksiyon 1X polimeraz tampon, 6 mM MgCl₂, 50 nM enzim ve 3 nM DNA kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar dNTP kullanılmadan 10 farklı zamanda gerçekleştirildi; 5 sn, 10 sn, 20 sn, 30 sn, 40 sn, 50 sn, 60 sn, 120 sn, 300 sn ve 600 sn. Bu süre sonrasında reaksiyonlar 6 µl sonlandırma çözeltisi eklenerek sonlandırıldı ve 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70°C'de bir gece bekletildi ve sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlemlendi. Oluşan ürün ve kalan ürün hesaplanarak veriler değerlendirildi ve GraphPad Prism 3.0 programı kullanılarak enzime ait özgül 5' nükleaz aktivite belirlendi. Kontrol olarak *E. coli* DNA polimeraz I kullanıldı.

2.14. Enzimin DIG-dUTP'yi Kullanabilme Özelliğinin Araştırılması

Gca TK4 DNA polimeraz I'in DIG-dUTP'yi kullanarak DNA sentezi yapabilme özelliği aktive edilmiş dana timus (calf thymus) DNA kullanılarak araştırıldı. Reaksiyon toplam 50 µl hacimde ve 4 farklı sıcaklıkta (45, 50, 55 ve 60°C) gerçekleştirildi. Reaksiyon 1 µg dana timus DNA, 200 µM herbir dNTP, 200 µM DIG-dUTP, 1X polimeraz tampon ve 5 µg *Gca* TK4 DNA polimerazın varlığında 30 dakika olarak gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi sonrası DNA'ya eklenen DIG-dUTP, DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche

Applied Science) kullanılarak immunofloresan olarak üretici firmaya ait protokol takip edilerek belirlendi.

2.14.1. DIG-dUTP'yi Kullanabilirliğinin Sentetik DNA ile Gösterilmesi

32/14 sentetik DNA ve 2 dNTP (dATP ve dCTP) ile DIG-dUTP'nin 50 µM derişiminde reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlar standart 6 µl hacimde ve 20 nM enzim konsantrasyonunda, iki farklı sürede (1 dakika ve 10 dakika) gerçekleştirildi. Kontrol olarak *E. coli* KF ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 6 µl sonlandırma çözeltisi eklenerek sonlandırıldı. 6 µl reaksiyon alınarak 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70 derecede bir gece bekletilerek sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlemlendi.

2.14.2. Primer 3'-Ucunun DIG-dUTP ile Doldurulması

In vitro şartlarda enzimin son nükleotiti ekleme özelliği 15/14 ve 16/14 sentetik DNA'lar kullanılarak araştırıldı. Kontrol olarak *E. coli* KF ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. Reaksiyonlar 10 nM sentetik DNA ve 50 nM herbir enzim kullanılarak *Gca* TK4 için 55°C'de, *E. coli* KF ve *Mtb* DNA polimeraz I için 37°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Bu süre sonunda reaksiyonlar 6 µl sonlandırma boyası ile sonlandırılarak 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve -70°C'de bir gece bekletilerek sonuçlar Typhoon 9400 tarayıcıda taranarak gözlemlendi.

2.15. *Gca* TK4 DNA Pol I'in ddNTP İlgisinin Belirlenmesi

2.15.1. Enzimin Üç dNTP ve Bir ddNTP Varlığında ddNTP'ye İlgi

ddNTP'ye duyarlılığı ddATP, ddTTP, ddCTP ve ddGTP kullanılarak araştırıldı. Kontrol olarak ddNTP'ye çok duyarlı olan *Mtb* DNA polimeraz I ve daha az duyarlı olan *E. coli* Klenow Fragmenti kullanıldı. Reaksiyon 6 µl toplam hacimde 100 nM 32/14 sentetik DNA (Tablo 9), 1X DNA polimeraz tamponu, 10 nM herbir enzim, 6 mM MgCl₂ ve 50 µM herbir dNTP ile ayrı ayrı herbir ddNTP'nin 150 µM olduğu derişimlerde yapıldı. Herbir ddNTP için reaksiyon şartları Tablo 14'deki gibi gerçekleştirildi. Normal polimeraz

deneyi pozitif kontrol olarak kullanıldı. İki dakika herbir enzim için uygun sıcaklıkta reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlar eşit hacim 2X stop solüsyon ile sonlandırıldıktan sonra 8 M üre-%16' lik PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve radyoaktif ürünlerin pozisyonları fosfor görüntüleme sisteminde (Thyphon9400) belirlendi.

Tablo 14. Bir ddNTP ve üç dNTP derişimlerine ait bilgiler

Tepkimelerdeki ddNTP ve dNTP derişimleri			
ddATP için tepkimedeki nükleotit derişimleri	ddCTP için tepkimedeki nükleotit derişimleri	ddTTP için tepkimedeki nükleotit derişimleri	ddGTP için tepkimedeki nükleotit derişimleri
150 µM ddATP	150 µM ddCTP	150 µM ddTTP	150 µM ddGTP
50 µM dTTP	50 µM dTTP	50 µM dATP	50 µM dTTP
50 µM dCTP	50 µM dATP	50 µM dCTP	50 µM dCTP
50 µM dGTP	50 µM dGTP	50 µM dGTP	50 µM dATP

2.15.2. Sabit dNTP (50µM) ve Değişik ddNTP Derişiminde ddNTP'ye İlgî

DNA polimeraz I enzimleri, ddNTP'ye ve hatta herbir ddNTP'ye farklı oranda ilgi gösterirler. Enzimin bu özelliği Tablo 15'de belirtilen dNTP ve ddNTP derişimleri kullanılarak araştırıldı. Reaksiyonlar 15 dakika süre ile 55°C'de pimer uzatma deneyindeki gibi yapıldı.

Tablo 15. Sabit dNTP ve değişik ddNTP derişimlerine ait bilgiler

Sabit dNTP derişimi	50 µM (dört dNTP'nin herbiri için aynı derişim)			
	<u>ddATP</u>	<u>ddCTP</u>	<u>ddTTP</u>	<u>ddGTP</u>
Değişik derişimlerde kullanılan ddNTP miktarı (Herbir ddNTP için 6 farklı derişim kullanıldı)	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM
	400 µM	400 µM	400 µM	400 µM
	500 µM	500 µM	500 µM	500 µM
	600 µM	600 µM	600 µM	600 µM
	700 µM	700 µM	700 µM	700 µM

2.15.3. Sabit ddNTP (700 µM) ve Değişik dNTP Derişiminde ddNTP'ye İlgisi

Bir önceki başlıkta yapılan deney sabit ddNTP (700 µM) derişiminde Tablo 16'daki dNTP derişimleri kullanılarak reaksiyonlar pimer uzatma deneyindeki gibi yapıldı.

Tablo 16. Sabit ddNTP ve değişik dNTP derişimlerine ait bilgiler

Sabit ddNTP Derişimi	700µM (dört ddNTP'nin herbiri için aynı derişim)			
Değişik derişimlerde kullanılan dNTP miktarı (Herbir ddNTP için 4 farklı derişim kullanıldı)	<u>ddATP</u>	<u>ddCTP</u>	<u>ddTTP</u>	<u>ddATP</u>
	ve	ve	ve	ve
	<u>4 dNTP</u>	<u>4 dNTP</u>	<u>4 dNTP</u>	<u>4 dNTP</u>
	5 µM	5 µM	5 µM	5 µM
	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM
	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM
	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM

2.16. F721Y Mutantı Protein ile ddNTP'ye İlgisinin İncelenmesi

2.16.1. Sabit dNTP (50 µM) ve Yüksek ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisi

Gca TK4 DNA polimeraz I enzimin ddNTP'ye ilgisini arttırmak için 712 fenilalanin amino asiti tirozin amino asitine dönüştürülerek ddNTP'ye ilgi deneyleri tekrar edildi. Reaksiyon dört dNTP'nin 50 µM ve herbir ddNTP'nin 50 µM'dan 500 µM'a kadar değişen derişimlerinde 10 nM DNA ve 100 nM enzim kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 6 dakika 55°C'de bekletildikten sonra 6 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı ve 6 µl reaksiyon örneği 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve radyoaktif ürünlerin pozisyonları fosfor görüntüleme sisteminde (Thyphon9400) belirlendi.

2.16.2. Sabit dNTP (120 µM) ve Düşük ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisinin Araştırılması

Bir önceki basamaktaki deneyler herbir ddNTP ile tekrar yapıldı. dNTP derişimi 120 µM olarak kullanıldı ve ddNTP derişimi ise herbir ddNTP için dört farklı derişiminde (6 µM, 12 µM, 20 µM ve 40 µM) yapıldı. Reaksiyonlar 15 dakika 55°C'de bekletildikten sonra 6 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı ve 6 µl reaksiyon örneği % 16'lık poliakrilamid jelde yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve radyoaktif ürünlerin pozisyonları fosfor görüntüleme sisteminde (Thyphon 9400) görüntülendi.

2.17. Enzimin Zincir Uzaklaştırma (Strand Displacement) Özelliğinin İncelenmesi

Kalıp zincir üzerinde ilerlerken sentezi engelleyen blocker (bloklayıcı) veya flap DNA'yı enzimin uzaklaştırma özelliği 32/14*/14 DNA (Bloklayıcı DNA) ve 32/14*/18 DNA (sarkık uç engelleyici DNA) kullanılarak araştırıldı. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin bu özelliği bloklayıcı DNA ve flap DNA kullanılarak araştırıldı. Ayrıca enzimin zincir uzaklaştırma aktivitesinden sorumlu olabileceği düşünülen 721 numaralı tirozin amino asiti fenilalanine dönüştürülerek elde edilen Y721F mutant proteini ile de aynı deneyler yapıldı (Kamalendra vd., 2007). Pozitif kontrol olarak *E. coli* DNA Klenow Fragmenti ve negatif kontrol olarak ise *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. Reaksiyon 1X polimeraz tampon, 6 mM MgCl₂, 100 nM DNA ve 50 nM herbir enzim kullanılarak 30 saniye ve 2 dakika olarak herbir enzim için uygun sıcaklıklarda (*Gca* TK4 DNA polimeraz I için 55°C'de *E. coli* ve *Mtb* için 37°C'de) gerçekleştirildi. 32/14* DNA normal deney koşullarında polimeraz aktivitesini göstermek için kullanıldı. Reaksiyonlar 6 dakika 55°C'de bekletildikten sonra 6 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı ve 6 µl reaksiyon örneği % 16'lık poliakrilamid jelde yürütülerek fosfor görüntüleme kasetine aktarıldı ve radyoaktif ürünlerin pozisyonları fosfor görüntüleme sisteminde (Thyphon9400) görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. Genin Klonlanması

Gen ekspresyonu ve karakterizasyonu çalışmalarında öncelikle karakterize edilecek genin tüm nükleotit sırasının belirlenmesi ve sonrasında uygun bir ekspresyon vektörüne klonlanması gelir. Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada ilk basamak olarak *Gca* TK4 DNA pol I genine ait tüm baz dizisi belirlendi. Bu doğrultuda gene ait bilinen 638 baz çiftlik bölgeden hareketle genin 3' ucuna ve 5' ucuna ait bilinmeyen nükleotit sırası ters PZR ve dejenere primerler kullanılarak belirlendi (Tablo 18).

Tablo 17. *Gca* TK4 polimeraz I geninin tüm nükleotit sırasının belirlenmesinde kullanılan restriksiyon endonükleazlar, primerler ve PZR'de çoğaltılan fragmentlerin büyüklüğü

Restriksiyon endonükleazlar	Primerler	Amplifikasyon ürünü
<i>Cla</i> I	iTK4-F1/iTK4-R1	970 bç
<i>Hin</i> FI	iTK4-F1/iTK4-R1	565 bç
<i>Sau</i> 3AI	iTK4-F2/iTK4-R2	321 bç
<i>Hin</i> FI	iTK4-F3/iTK4-R3	158 bç
<i>Psp</i> GI	iTK4-F4	496 bç

3.1.1. Ters PZR ile Genin 3' Kısımının Tamamlanması

iTK4-F1 ve iTK4-R1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile genin son kısmının yakalanması hedeflendi. Bu amaçla daha önceden bilinen gen sırasına ait sekans restriksiyon endonükleazlar yönünden incelendi ve *Cla*I restriksiyon enziminin kullanılması kararlaştırıldı. *G. caldxylosylitycus* TK4 genomik DNA'sı *Cl* I restriksiyon enzimi ile kesildi. Oluşan fragmentlerin halkalaşabilenlerinin T4 DNA ligaz ile uçlarının yapışması sağlandı. Elde edilen halkasal DNA'lar ters PZR'da kalıp DNA olarak kullanıldı. PZR sonrası yaklaşık 970 baz çiftlik fragment elde edildi

(Tablo 18). Bu fragmentin nükleotit sırası belirlendiğinde elde edilen 970 baz çiftlik sıranın 95 nükleotitlik kısmının *Gca* TK4 DNA polimeraz I geninin 3' ucunun kısmına ait olduğu belirlendi. Bu sıranın ilavesi ile gene ait 3' ucunun tüm baz dizilimi belirlendi.

3.1.2. Genin 5' Kısmının Ters PZR ile 585. Nükleotide Kadar Tamamlanması

Sırası ile *Hinf*I, *Sau*3AI, *Hinf*I ve *Psp*GI restriksiyon enzimleri ile kesilen genomik DNA'lar, DNA polimeraz I geninin 5' ucunu belirlemek için ters PZR'da kullanıldı. Bu enzimler ile Tablo 17'deki büyüklükteki yeni gen sıraları elde edildi ve gen 585. nükleotide kadar tanımlandı. Bu sayede gene ait 2049 baz çiftlik kısım tamamlandı.

3.1.3. Genin Başlangıç Kodonuna Kadar Nükleotit Sırasının Belirlenmesi

585. nükleotide kadar olan gene ait dizi ters PZR ile tamamlandıktan sonra, kalan kısım *G. kaustophilus*, *G. stearothermophilus*, *B.caldotenax* ve *B. caldolyticus* DNA pol I genlerinin başlangıç bölgelerinden yararlanılarak dizayn edilen Pol Deg 1 primeri ile çoğaltıldı. Elde edilen bu dizi, ters PZR ile elde edilen dizi ile birleştirilince stop kodonu ile birlikte toplam 2637 baz çiftlik *Gca* TK4 DNA pol I geni tamamlandı (Şekil 17).

```

ATGAGGTTGAAAAAAAAAGCTAGTATTGATTGATGGAAACAGCGTTGCCTATCGCGCTTTTTTTT
CGCTGCCGCTTTTACATAACGATAAAGGGATTCATACGAATGCTGTATATGGCTTTACGATGAT
GCTGATGAAAATTTAGAAAGAAAGAAAAACCGACACATATGCTTGTTCCTTTGATGCCGGGAAA
ACGACGTTCCGCCACAAAACGTTTACCGAATATAAAGGAGGGCGGCAGCAAACGCCTCCGGAA
TTATCGGAGCAATTTCCGTTGCTTAGAGAGTTGCTTCAGGCATACCAAATCTGCTCCTATGAGTT
GAAAAATTAAGAAGCGGACGATATTATCGGCACGCTGTCAGCAAAGGCCGAAAAAGAGGGATT
TGAGGTTAAAAATCATCTCTGGCGACCGCGATTTGACGCAGCTTGCCTCTGATCATGTGACGTA
GATATTACAAAAAAGGCATTAAGCTGACGTCGAATCGTATACGCCGAAACGGTGCGGGAGAAA
TATGGACTGACGCCGGAACAAATTATTGATTTAAAAGGATTAATGGGCGACAAGTCGGATAAT
ATTCCAGGAGTGCCTGGCATTGGCGAGAAAACGGCGGTAAAGCTGTTAAAACAATTCGGTTTCG
GTGAAAAACATATTGGCATCCATCGAGCAAATCAATGGGAACAAACTAAAGGAGAATTTAGAG
AAGTACCGTGATTTGGCGCTGATGAGCAAGCAGCTGGCGACCATTTCCCGCGATGCGCCGATCG
AGCTCTCATTGGAGGATATCGAATACCACGGGCAAGATGTTGACAAAGTCATCGCTTTATTTAA
AGAGCTTGGGTTAATTCGCTTCTTGACAAAGTAGCTCCGCAAAACGAAAAAAGAAGAGGCGGT
ACTGCCAAACATCGATTATACGATCGTCGAGGAAGTAAGCGAGTCGGTGCTCGCCGATCGGTCG
CGCTCGTTGTGCAAGTGCTGGAATCCAATTATCATAAAGCGCCGATTTTAGGGTTTTCGCTAG
CGAATGAACAGGCACTTCTTTATCCGCACCGATACCGCCCTGTATCGCCGTTGTTTACCGCC
TGGCTCGAAGATGAAACAAAGAAAAAAGCGTTTTTGACGAAAGCGGGCGATCGTTGCGCTA
AAATGGAAGGGCATTGAGCTGCGTGGAATCGAGTTTGATTTATTAATCGCCTCGTATTTATTAA
ATCCATCGCAATCGACGGAAGATGTCGCTTCGGTGGCAAAAACGAAGCAATATATGGCTGTGC
AATCCGATGAAGCCGTATACGGCAAAGGCGCCAAACAAACCGTGCCGGAAGAAAAGGCGCTG
GCCGAGCATCTTGTGCGCAAAGCGGCGCCATCCGCGCTTTAGAAAAAGAGTTTATACACGATT

```

Şekil 17. *Gca* TK4 DNA polimeraz I'e ait nükleotit sırası

Şekil 17'nin devamı

```
TGCAAGAAAATGAACAATACGCTTTATTTACCGATTGGAATTGCCGCTGTCTTCGATTCTCGCT
GAAATGGAATTTACCGGCGTAAAGGTTGATGTCGAGCGCTTAAAAGAGATGGGAGAAGAATTG
ACCGAGCAGCTCCGTGCCGTGGAGCAGGAAATTTACGAACTGGCGGGACAAGAGTTTAAACATT
AATTCGCCAAAACAATTGGGGGTTATTTTATTTGAAAAGCTGCAGCTGCCTGTATTGAAAAAAA
CAAAAACCGGATACTCCACATCGGCGGATGTATTGGAGAAGCTGGCGCCTCAGCACGAAAATTG
TCGAGAAAATTTTACATTACCGCCAGTTAGGAAAACCTGCAGTCGACCTATATTGAAGGATTGCT
AAAAGTAGTGCATTGCGACACCCACAAAGTGCACACCATTTTTAATCAGGCGCTGACGCAAAC
GGGGCGGCTAAGCTCCACGGAGCCGAACCTGCAAAAACATTCCGATCCGTTTAGAGGAAGGGCG
GAAAATTCGCCAGGCGTTTCGTTCCGTCCAAGCCGGATTGGGTCATTTTTTCCGCCGATTATTCGC
AAATTGAGCTGCGCGTGCTTGCCCATATTGCCAATGATGAAAATTTAATCGATGCGTTTTGCCA
CGATTTAGATATTCATACGAAAACGGCGATGGATATTTCCACGTCACAGCCGATGAAGTGACG
CCAAACATCGCAGGCAGGCGAAAGCGGTGAACCTTTGGCATTGTTTACGGCATCAGCGACTAC
GGGCTGCACAAAATTTAAACATCCCACGAAAAGAGGCAGCGGAATTTATCCGCCGGTATTTTG
AAAATTTTCCGGCGTTAAGCAGTATATGGAAAACATCGTCCAAGAAGCGAAGCAAAAAGGAT
ATGTCACGACGCTGTTGCACCCGCCGCTATTTGCCGGACATTACGAGCCGCAACTTCAACCT
GCGCAGCTTTGCCGAACGGACGGCGATGAATACGCCGATTCAAGGAAGCGCCGCCGATATTAT
TAAAAGGCGATGATTGATTTGGCGGATCGGCTAAAGCAAGAAAAGCTGCAAGCGCGGATGCT
GCTGCAAGTCCATGACGAACTCATTTTGAAGCGCCGAAAAGAAGAAGTAAAGCGGCTGCAGCA
AATTGTTCTGAAGTGATGAAAATGCGATACAGTTAAAAGTGCCGCTTAAAGTCGATTATCAT
TATGGACCAACATGGTATGACGCAAAGTAA
```

3.2. Diğer Polimeraz I Ailesine Ait Enzimlerle Karşılaştırılması

Gca TK4 DNA polimeraz I geninin tüm nükleotit sırası belirlendikten sonra bu sıra Expsy programı (URL-2) kullanılarak amino asit sırasına dönüştürüldü. Daha sonra *Mtb* DNA pol I, *Taq* DNA pol I, *Bst* DNA pol I, *Gka* DNA pol I ve *E. coli* DNA pol I kullanılarak benzerlik Clustal W programında araştırıldı (Şekil 18).

```
Mtb MVTASAPSEDRAKPTLMLLDGNSLAFRAFYALPAENFKTRGGLTNAVYGFAMLINLL 60
Taq ---MAMLPLFE-PKGRVLLVDGHHLAYRTFFAL--KGLTTSRGEVQAVYGFAXSLLKAL 54
Bst -----MLKNKLVLDGNSVAYRAFFALP--LLHNDKGIHTNAVYGFMMLNKIL 47
Gka -----MRLKKKLVLDGSSVAYRAFFALP--LLHNDKGIHTNAVYGFMMLNKIL 48
TK4 -----MRLKKKLVLDGNSVAYRAFFALP--LLHNDKGIHTNAVYGFMMLMKIL 48
Eco -----MVQIPQNPLILVDGSSYLRYAYHAFP--PLTNSAGEPTGAMYGVNLMLRSLI 50

Mtb RDEAPTHIAAAFVSRQTFRLQRYPEYKANKSSTPDEFAGQIDITKEVLGALGITVLSEP 120
Taq KEDG-DVVVVVFAKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLEVP 113
Bst AEEQPTHILVAFDAGKTTFRHETFQDYKGGRQQTPELSEQFPLVRELLKAYRIPAYELD 107
Gka AEEEPHMLVAFDAGKTTFRHEAFQEYKGGRQQTPELSEQFPLRELLRAYRIPAYELE 108
TK4 EEEKPTHMLVAFDAGKTTFRHKTFTFYKGGRQQTPELSEQFPLRELLQAYQICSYELE 108
Eco MQYKPTHAAVVFDAKGTFRDELFEHYKSHRPPMPDDLRAQIEPLHAMVKAMGLPLLAVS 110
```

Şekil 18. *Gca* TK4 DNA pol I'in diğer DNA polimeraz I enzimleri ile amino asit düzeyinde karşılaştırılması. Kırmızı bölgeler: 5' nükleaz bölgede yer alan korunmuş amino asitler, yeşil bölgeler: 3'→5' ekzonükleaz bölgede yer alan amino asitler, mavi bölgeler: polimeraz bölgede yer alan A motifine ait amino asitler, sarı bölgeler: polimeraz bölgede yer alan B motifine ait amino asitler, pembe bölgeler: polimeraz bölgede yer alan C motifine ait amino asitler

Şekil 18'in devamı

Mtb GFEADDLIATLATQAENEGYRVLVVTGDRDIALQLVSDDVTVLYPRKGVSELTRFTPEAVV 180
Taq GFEADDVLATLAKRAEKEGYEVRILTAARDLYQLLSERIAILHP----EGYLITPAWLY 168
Bst HYEADDIIGTMAARAEREGFAVKVISGDRDLTQLASPOVTVEITKKGITDIESYTPETVV 167
Gka NYEADDIIGTLAARAEQEGFEVKVISGDRDLTQLASPHVTVDITKKGITDIEPYTPETVR 168
TK4 NYEADDIIGTLSAKAEKEGFEVKIISGDRDLTQLASDHVTVDITKKGITDVESYTPETVR 168
Eco GVEADDVIGTLAREAEKAGRPVLISTGDKDMAQLVTPNITLINT---MTNTILGPEEVV 166

Mtb EKYGLTPRQYPDFAALRGDPSDNLPGIPGVGEKTAAKWIAEYGSLSRLVDNVDVAVRG--- 237
Taq EKYGLRPEQWVDYRALAGDPSDNIPGVKIGEKTAQRLIREWGSLENLFQHLDDQVKP--- 225
Bst EKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDNIPGVPGIGKKTAVKLLKQFGTVENVLASIDEIKGE-- 225
Gka EKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDNIPGVPGIGKKTAVKLLRQFGTVENVLASIDEIKGE-- 226
TK4 EKYGLTPEQIIDLKGLMGDKSDNIPGVPGIGKKTAVKLLKQFGSVENILASIEQINGN-- 226
Eco NKYGVPPELIIDFLALMGDSSDNIPGVPGVGEKTAQALLQGLGGLDTLYAEPEKIAGLSF 226

Mtb ----KVGDALRANLASVVRNRELTDLVRDVPLAQTPDTRLRLQPWRDHIHRLFDDLEFRV 293
Taq ----SLREKLQAGMEALALSRKLSQVHTDLPLEVDFGRRRTP--NLEGLRAFLELLEF-- 277
Bst ----KLKENLRQYRDLALLSKQLAAICRDAPVELTLDDIVYKGEDREKVVVLFQELGFQS 281
Gka ----KLKETLRQHREMAALLSKKLAAIRRDAPVELSLDDIVYQGEDREKVVVLFKELGFQS 282
TK4 ----KLKENLEKYRDLALMSKQLATISRDAPIELSLEDIEYHGQDVVKVIALFKELGFNS 282
Eco RGAKTMAAKLEQNKEVAYLSYQLATIKTDVELELTCEQLEVVQPAAEELLGLFKKYEFKR 286

Mtb LRDRLFD---TLAAAGGPEVDEGFDVRRGALAPGTVRQWLAE----- 332
Taq --GSLH---EFGLEGP----- 290
Bst FLDKMAV---QTDEGEKPLAGMDFAIADSVTDEMLADK----- 316
Gka FLEKMES---PSSEEEKPLAKMAFTLADRVTEMLADK----- 317
TK4 LLDKVAP---QTKKEEAVLPNIDYTIIVEEVSESVLADR----- 317
Eco WTADVEAGKWLQAKGAKPAAKPQETSVADEAPEVTATVISYDNYVTILDEETLKAWIAKL 346

Mtb -----HAGDGRAGLTVVGTGLPHGGDATAMAVAAADGEG-AYLDT--ATLTPDDDAALA 384
Taq -----KAAEEAPWPPPEG-AFLGF--SFSRPEPMWAEEL 320
Bst -----AALVVEVVDNYHHAPIVGIALANERGRFFLRP--ETAVADP--KFL 359
Gka -----AALVVEVVEENYHDAPIVGIAVVNEHGRFFLRP--ETALADP--QFV 360
TK4 -----SALVVEVLESNYHKAPILGFALANEHGHFFIRT--DTALSSP--LFT 360
Eco EKAPVFAFDITETDSDLNISANLVGLSFAIEPGVAAYIPVAHDYLDAPDQISRERALELLK 406

Mtb AWLADPAKPKALHEAKAAVHDLAGRGWTLEGVT--SDTALAAYLVRPGQRSFTLDDLSLR 442
Taq LALAG-AWEGRLHRAQDPLRGLR----DLKGVRGILAKDLAVLALREGLDFPEDDPMLL 375
Bst AWLGDETKKKSMTFDSKRAAVALNGKGIELAGVGVVFDLLLAAYLLDPAQ---AAGDVAAV 416
Gka AWLGDETKKKSMTFDSKRAAVALKWKGIELC--GVSFDLLLAAYLLDPAQ---GVDDVAAA 415
TK4 AWLEDETKKKSMTFDSKRAAVALKWKGIELR--GIEFDLLIASYLLNPSQ---STEDVASV 415
Eco PLEDEKALKVGNLKYDRGILANYGIELR--GIAFDTMLESYILNSVAGRHDMSLAER 464

Mtb YLRRELRAETPQQQLSLLDDD--DTDAETIQTTILRARAVIDLADALDAELARID--STA 499
Taq AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEW--TEDAG--ERALLAERLFQTLKERLKGEER----LLW 427
Bst AKMHQYEAVRSDEAVYGGKAKRTVPDEPTLAEQLVRKAAAIAWALEEPLMDELRRNE-QDR 475
Gka AKMKQYEAVRPDEAVYGGKAKRAVPDEPVLAEHLVRKAAAIAWELERPFLEDELRRNE-QDR 474
TK4 AKTKQYMAVQSDEAVYGGKAKQTVPEEKALAEHLVRKAAAIRALEKEFIHDLQENE-QYA 474
Eco WLKHKTITFEEIAGKGNQLTFNQIALEEAGRYAAEDADVTLQLHLKMWPDQLKHKGPLN 524

Mtb LLGEMELPVQRVLAKMESAGIAVDLPLMTELQSQFGDQIRDAEAAAYGVIGKQINLGSPK 559
Taq LYEEVEKPLSRVLARMEATGVRLDVAYLQALSLEVEAEVRQLEEEVFRLAGHPFNLSRD 487
Bst LLTELEHALAGILANMEFTGVKVDTKRLEQMGAEELTEQLQAVERRIYELAGQEFNINSPK 535
Gka LLVELEQPLSSILAEMEFTAGVKVDTKRLEQMGKELAEQLGTVEQRIYELAGQEFNINSPK 534
TK4 LFTDLELPLSSILAEMEFTGVKVDVERLKEMGEELTEQLRAVEQEYIYELAGQEFNINSPK 534
Eco VFENIEMPLVPVLSRIERNVGVKIDPKVLHNSHEELTLRLAELEKKAHEIAGEEFNLSSTK 584

Şekil 18'in devamı

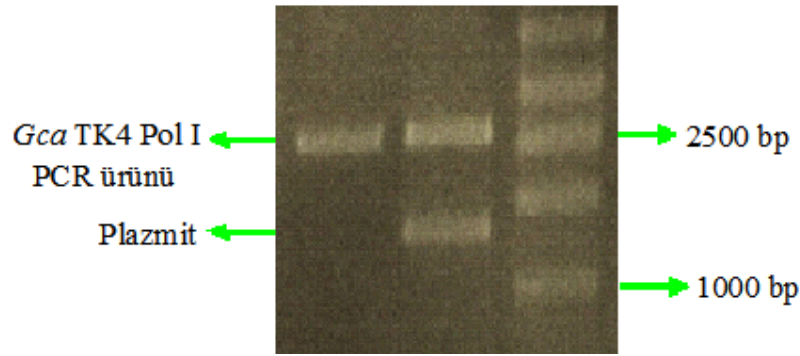
Mtb	QLQVVLFDLGLMPKT-KRTKTG-YTTDADALQSLFDKTGHPFLQHLLAHRDVTRLKVTVD	617
Taq	QLERVLFDLGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALR--EAHPVDRILQYRELTKLKNTYI	545
Bst	QLGTVLFDKQLPVL-KTKKTG-YSTSADVLEKLAP--HHEIVEHILHYRQLGKQLQSTYI	591
Gka	QLGVILFEKLQLPVL-KTKKTG-YSTSADVLEKLAP--YHEIVENILHYRQLGKQLQSTYI	590
TK4	QLGVILFEKLQLPVL-KTKKTG-YSTSADVLEKLAP--QHEIVEKILHYRQLGKQLQSTYI	590
Eco	QLQTILFEKQGIKPL-KKTPGGAPSTSEEVLEELAL--DYPLPKVILEYRGLAKLKSTYT	641
Mtb	GLLQAVAA--DGRIHTTFNQTI AATGRSSSTEPNLQNIPIRTDAGRRI RDAFVVG DGYAE	675
Taq	DPLPALVHPKTGR LHTRFNQTATATGRSSSDPNLQNIPIVRTPLGQRIRRAFVAEEG-WV	604
Bst	EGLLKVVHPVTGKVHTMFNQALTQTGRSSVEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSDPDL	651
Gka	EGLLKVVPRDTHKVHTIFNQALTQTGRSSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSSEDWL	650
TK4	EGLLKVVHCDTHKVHTIFNQALTQTGRSSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSKPDWV	650
Eco	DKLPLMINPKTRGVHTSYHQAVTATGRSSSDPNLQNIPIVRNEEGRRIRQAFIAPED-YV	700
Mtb	LMTADYSQIEMR IMAHLSGDEGLIEAFNTGEDLHSFVASRAFGVPIDEVTGELRRRVKAM	735
Taq	LVVLDYSQIELR VLAHLSGDENLIRVFQEGRDIHTQTASWFMFVSPEGVDPLMRRAAKTI	664
Bst	IFAADYSQIELR VLAHIAEDDNLIEAFRRWLDIHTKTAMDIFHVSEEDVTANMRRQAKAV	711
Gka	IFAADYSQIELR VLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQVSEDEVTPNMRRQAKAV	710
TK4	IFSADYSQIELR VLAHIANDENLIDAFRDLDIHTKTAMDIFHVTADEVTPNMRRQAKAV	710
Eco	IVSADYSQIELR IMAHLSRDKGLLTAF AEGKDIHRATAAEVGLPLET VTS EQRRSAKAI	760
Mtb	SYGLAYGLSAYGLSQQLKISTEEANEQMDAYFARFGVVRDYLRVVERARKDGYTSTVLG	795
Taq	NFGVLYGMSAHRLSGELSIPYEEAVAFIERYFQSYPKVRAWIEGLEEGRRRGYVETLFG	724
Bst	NFGIVYGISDYGLAQNLNITRKEAAEFIERYFASFPGVKQYMDNIVQEAKQKGYVTLLH	771
Gka	NFGIVYGISDYGLAQNLNISRKEAAEFIERYFESFPGVKRYMENIVQEAKQKGYVTLLH	770
TK4	NFGIVYGISDYGLSQNLNIPRKEAAEFIRRYFEIFPGVKQYMENIVQEAKQKGYVTLLH	770
Eco	NFGLIYGMSAFGLARQLNIPRKEAQKYM DLYFERYPGVLEYMERTRAQAKEQGYVETLDG	820
Mtb	RRRYLPELDSSNRQVREAAERAALNAPIQGSAA DI IKVAMIQVDKALNEAQLASRM LLOV	855
Taq	RRRYVPLDNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA DLMKMLAMVRLFPRL--QELGARM LLOV	782
Bst	RRRYLPDITSRNFNVRTFAERTAMNTPIQGSAA DI IKKAMIDL SVS VREERLQARLLLOV	831
Gka	RRRYLPDITSRNFNVRSFAERMAMNTPIQGSAA DI IKKAMIDL NARLKEERLQARLLLOV	830
TK4	RRRYLPDITSRNFLRSFAERTAMNTPIQGSAA DI IKKAMIDL ADRLKQEKLQARMLLOV	830
Eco	RRLYLPDIKSSNGARRAAAERAA INAPMQGTAA DI IKRAMIAVDAWLQAEQPRVRMIMOV	880
Mtb	HDELLFEIAPGERERVEALVRDKMGGAYPLDVPLEVS VGYGRSWDAAA H	904
Taq	HDELVLEAPKDRAERVAALAKEVMG VWP LQVPLEVEVGLGEDWLSAKE	831
Bst	HDELILEAPKEEIGRLCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGPTWYDAK-	879
Gka	HDELILEAPKEEMERLCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGSTWYDAK-	878
TK4	HDELILEAPKEEVKRLQQIVPEVMENAIQLKVPLKVDYHYGPTWYDAK-	878
Eco	HDELVFEVHKDDVDAVAKQIHQLMENC TRLDVPLLVEVGS GENWDQAH-	928

Yukarda belirtilen DNA polimeraz I enzimlerine benzerliği araştırıldığında *Gca* TK4 DNA polimeraz'ın *I Bst* DNA pol I'e %89, *Gka* (*Geobacillus kaustophilus*) DNA pol I'e %89, *Mtb* DNA pol I'e %59, *Taq* DNA pol I'e %59 ve *E. coli* DNA pol I'e %57 oranında benzerlik göstermektedir.

3.3. DNA Polimeraz I Geninin Ekspresyonu

3.3.1. Genin pET-15b Vektörüne Klonlanması

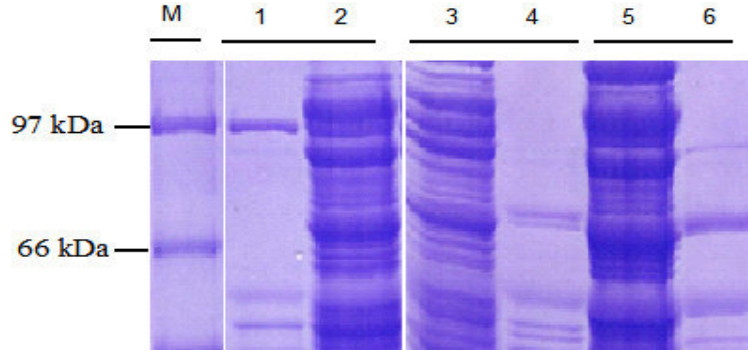
DNA polimeraz I geni, *G. caldxylosylitycus* TK4 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PZR'da çoğaltıldı. PZR sonucu "dur" kodonu ile birlikte toplam 2637 bp'lik genin tamamı çoğaltıldı (Şekil 19) ve pET-15b ekspresyon vektörünün *NcoI* ve *BamHI* bölgesine klonlandı. *Gca* TK4 DNA pol I geninin klonlandığı pET-15b vektörü, pGca pol-I olarak adlandırıldı ve ekspresyon için *E. coli* BL21(DE3)pLysS hüresine kalsiyum klorür metodu ile aktarıldı. Aynı zamanda hiçbir gen içermeyen pET-15b vektörde *E. coli* BL21(DE3)pLysS hüresine kalsiyum klorür yöntemi kullanılarak aktarıldı. Stok kültürü yapılarak -20 °C'de saklandı.



Şekil 19. DNA pol I geninin %1,2'lik agaroz jel analizi

3.3.2. pGcaPol-I Vektörünün *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Gözlenmesi

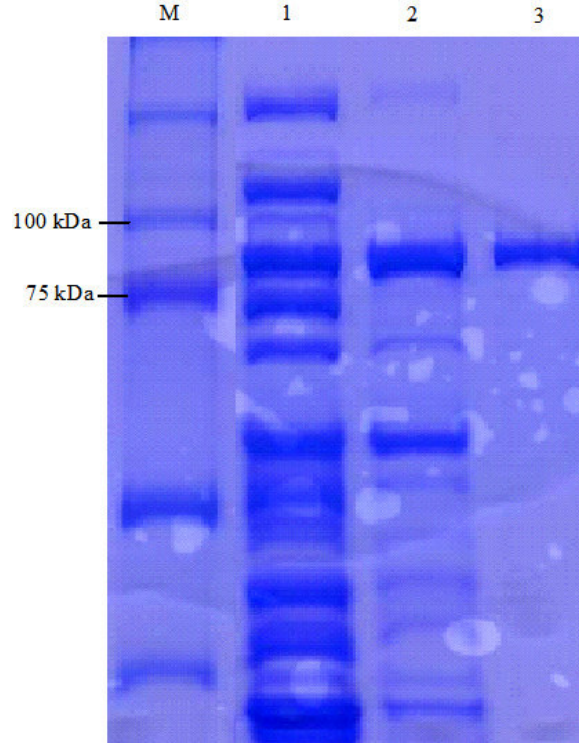
Ekspresyon, *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinde gerçekleştirildi. İki farklı şekilde gözlenerek doğrulandı. Gece kültüründen, OD₆₀₀'da 0,1 yoğunlukta olacak şekilde taze besiyerine ekilen hücreler 3 saat büyütüldükten sonra 1 mM IPTG ile indüklendiğinde *Gca* TK4 DNA pol I'in *E. coli* BL 21'de ekspresyonu için yeterli olduğu gözlemlendi. İndükleme sonrası hücreler 4 saat daha büyütülerek protein izole edildi. *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in *E. coli* BL21(DE3)pLysS içinde bol miktarda üretildiğini göstermektedir (Şekil 20).



Şekil 20. *E. coli* BL21'e klonlanan *Gca* TK4 DNA pol I'in gen anlatım profilinin %8'lik SDS-PAGE'de analizi. M: markır, 1: ısı uygulaması sonrası pGcPol ekspresyonu, 2: pGcPol ekspresyonu (ısı uygulaması yok), 3: *E. coli* BL21 hücre ekstraktı, 4: ısı uygulaması sonrası *E. coli* BL21 hücre ekstraktı, 5: *E. coli* BL21/pET-15b hücre ekstraktı, 6: ısı uygulaması sonrası *E. coli* BL21/pET-15b hücre ekstraktı

3.4. *Gca* TK4 DNA Polimeraz I'in Saflaştırılması

Toplam iki litre besiyeri dört tane iki litrelik erlen mayere 500 mL olacak şekilde bölünerek rekombinant enzim üretildi ve enzimin saflaştırılması üç basamakta gerçekleştirildi (modifiye edilmiş Uemori vd., 1993 ve Engelke vd., 1990 metoduna göre): Isı uygulaması (60°C su banyosunda 20 dakika), DEAE-selüloz ve BioRex 70 katyonik kromatografisi. 60°C'de 10 dakika bekletme ve sonrasında 12,500 rpm'de 20 dakika santrifüj ile *E. coli*'ye ait proteinlerin bir çoğu uzaklaştırıldı. DEAE-selüloz kromatografisi ile protein örneğindeki DNA ortamdan uzaklaştırıldı. BioRex 70 katyonik kromatografisi sonrası tüm kontaminant proteinler uzaklaştırıldı (Şekil 21). Saflaştırma esnasında tüm basamaklar %8'lik SDS-PAGE ile takip edildi ve saf olarak elde edilen *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in moleküler ağırlığının (~97 kDa) teorik olarak hesap edilen moleküler ağırlık ile (99,600 Da) uyumlu olduğu belirlendi.



Şekil 21. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin saflaştırılma profilinin %8'lik SDS-PAGE'de analizi. M; markır, 1; ısı uygulaması sonrası, 2; DEAE-selüloz sonrası ve 3; BioRex 70 kromatografi sonrası

Saf protein ürünününün *Gca* TK4 DNA pol I enzimi olduğu kütle spektroskopisi analizi ile doğrulandı ve *Bacillus* cinsi DNA polimeraz I enzimlerine %90 oranında benzer olduğu belirlendi. Protein yoğunluğu üç farklı şekilde hesaplandı ve iki litre besiyerinden toplam 3,2 mg *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi saf olarak elde edildi.

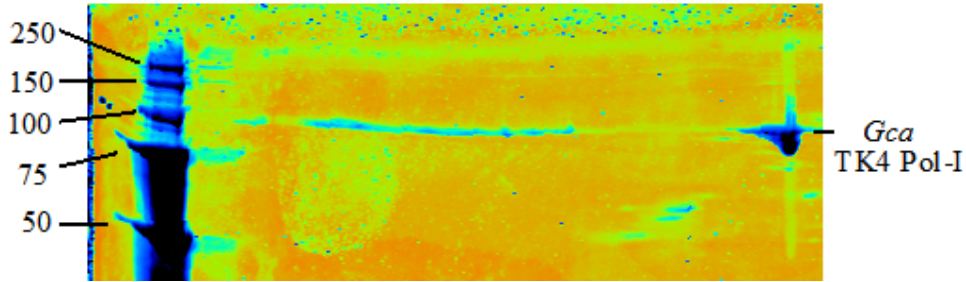
3.5. Mutant Proteinlerin Hazırlanması

Gca TK4 DNA polimeraz I enziminin ddNTP ilgisi ve zincir uzaklaştırma aktivitesini daha da iyi karakterize etmek için mutasyonlar yapıldı. Bu amaç doğrultusunda ddNTP ilgisi için 712 numaralı fenilalanin amino asiti tirozin amino asitine, zincir uzaklaştırma aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 721 numaralı tirozin amino asiti fenilalanine dönüştürüldü (Tablo 7). Mutant enzimlere ait proteinler (*E. coli* DNA pol I D424A dahil) *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin hazırlanışındaki basamaklar takip edilerek saflaştırıldı ve mutasyon yönünden incelenerek mutasyonun etkisi araştırıldı.

3.6. Karakterizasyona Ait Bulgular

3.6.1. Enzimin pI Değerinin Belirlenmesi

Proteinin asidik ve bazik amino asit miktarının nispi oranı pI değeri ile ifade edilir ve *Gca* TK4 enzimin pI değeri 2D jel elektroforezi kullanılarak saptandı. İlk önce izoelektrik fokuslama ile enzimin izoelektrik noktası belirlendi. Bunun için 3 ile 10 arası pI değerini belirlemek için kullanılan izoelektrik jelde protein örneği yürütüldü ve birinci boyutsal ayırım gerçekleştirildi. İkinci boyutsal ayırım için, ilk boyutsal ayırımın yapıldığı jel, SDS-PAGE'e yüklenerek ikinci boyutsal olarak ayırım sağlandı. Protein örnekle beraber markır da birlikte yürütüldü. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin jeldeki pozisyonu jel boyanarak belirlendi ve markır ile karşılaştırıldığında uygun büyüklükte olduğu belirlendi. Jelin iki ucu arası mesafe belirlendiğinde *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin pI değerinin 6,1 olduğu belirlendi (Şekil 22). Bu değer amino asit sırası kullanılarak belirlenen 5,7 pI değeri ile uyumlu olduğu bulundu.



Şekil 22. 2D jel elektroforezi ile proteinin pI değerinin belirlenmesi

3.6.2. Enzimin Özgül Aktivitesinin Belirlenmesi

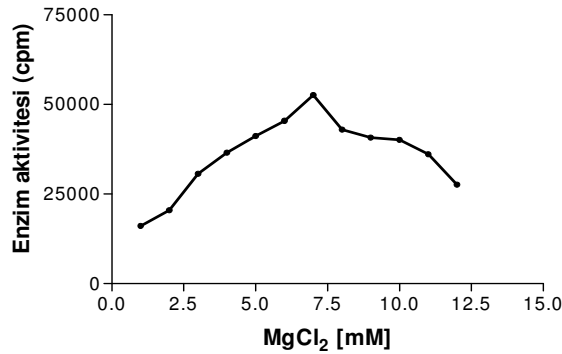
Primer uzatma deneyi ile enzimin aktif olduğu gösterildikten sonra *Gca* TK4 DNA pol I'e ait özgül aktivite, 33p16p/16p (Tablo 9) sentetik DNA'nın substrat olarak kullanıldığı TCA yöntemi ile belirlendi. Özgül aktiviteyi belirlemek için gerçekleştirilen reaksiyonlar her seferinde en az üç kez iki farklı zamanda saflaştırılan *Gca* TK4 enzim örneği kullanılarak yapıldı. 30 dakika da 10 nmol dNTP'nin ilavesini gerçekleştiren enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı. İlk saflaştırma sonucu elde edilen enzim örneği ile

ortalama 41430'lük cpm elde edilirken ikinci saflaştırma ile elde edilen enzim örneği ile 36280 cpm elde edildi. Reaksiyon karışımının 5 µl'sindeki radyoaktivite miktarı cpm olarak belirlendi ve bu değer baz alınarak özgül aktivite hesaplandı. Her iki saflaştırma ile elde edilen enzim örneği ile özgül aktivite ayrı ayrı hesaplandı. Birinci enzim örneği ile özgül aktivite hesaplandığında enzimin 1 mg saf *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin 513.914 üniteye eşit olduğu belirlendi. İkinci enzim örneği ile özgül aktivitenin 475.116 ünite/mg olduğu belirlendi. Ortalama alındığında ise özgül aktivitenin 494.515 ünite/mg (± 19.399) olduğu belirlendi.

3.6.3. Optimum Bir ve İki Değerli İyon Derişiminin Belirlenmesi

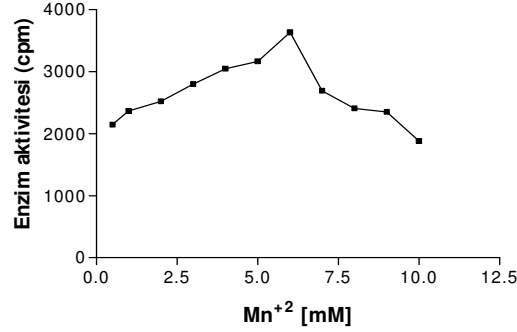
DNA polimeraz enzimlerinin özgül etkinlik değeri bir ve iki değerli iyon derişimine bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak bilinen tüm DNA polimerazlar magnezyum ve manganez iyonlarından bir tanesi ile aktivite göstermektedir. Bunlara ilaveten NaCl veya KCl'ye de ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla Mg^{+2} ve Mn^{+2} iki değerli iyon ve NaCl ve KCl tek değerli iyon kullanılarak TCA yöntemi ile reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzimin hangi iyon ile en yüksek aktivite verdiği araştırıldı.

1 mM'dan 12 mM'a kadar değişik derişimlerde Mg^{+2} iyonu kullanılarak özgül aktivitenin belirlenmesindeki gibi deneyler yapıldı. Reaksiyon sonrası DNA'ya eklenen 3HdTTP 'nin miktarı belirlendi ve en yüksek cpm'in elde edildiği Mg^{+2} iyon derişimi optimum değer olarak kabul edildi. Her bir Mg^{+2} iyon derişimi ile elde edilen cpm'ler değerlendirildiğinde en yüksek değer 7 mM Mg^{+2} iyon derişimi ile elde edildiği gözlemlendi (Şekil 23).



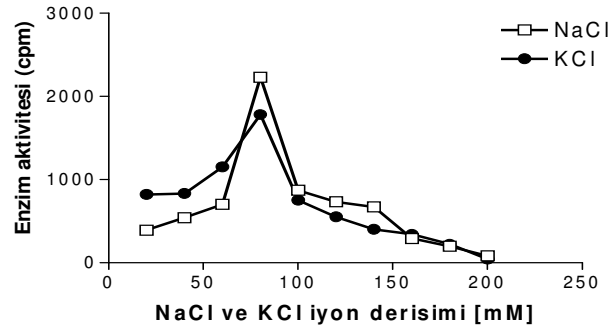
Şekil 23. Mg^{+2} derişiminin enzim aktivitesine etkisi

Aynı şekilde optimum Mn^{+2} iyon derişimi araştırıldığında optimum değerin 6 mM olduğu gözlemlendi (Şekil 24). Mn^{+2} iyonu ile daha düşük aktivite elde edildi ve bu da enzimin aktivite göstermek için ortamda Mg^{+2} iyonunun varlığına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.



Şekil 24. Mn^{+2} derişiminin enzim aktivitesine etkisi

DNA polimeraz enzimlerinin NaCl ve KCl iyonlarına bağı olarak aktivitesinde artış olabilmektedir. Bu amaçla bir değerlikli iyon olarak NaCl ve KCl kullanıldı ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum derişim araştırıldı. Ancak enzimin her durumda Mg^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyacağı için reaksiyonlar Tablo 11’de belirtilen KCl ve NaCl iyon derişimlerine ilaveten 2 mM Mg^{+2} iyon derişiminde gerçekleştirildi. Her iki iyonun varlığında da enzimin çok az bir aktivite gösterdiği gözlemlendi. Şekil 25’de gözlemlendiği gibi enzim tek değerli iyonlara ihtiyaç duymadan iki değerli iyonlarla yüksek aktivite göstermektedir.



Şekil 25. Tek değerli iyon derişiminin (NaCl ve KCl) enzim aktivitesine etkisi

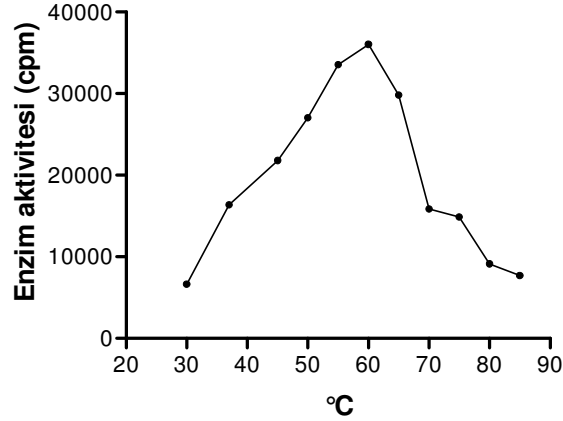
Böylece iki değerli iyonların tek değerli iyonlardan daha etkili olduğu ve enzimin en yüksek aktivite göstermek için gerekli olan iyonun iki değerli Mg^{+2} iyonu olduğu ve optimum derişim değerinin ise 7 mM olduğu gösterildi.

3.6.4. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Optimum pH değerinin belirlenmesi için pH 7,2 ile 10,0 arasında değişen tampon aralıkları kullanılarak deneyler yapıldı ve reaksiyon sonrası elde edilen cpm'ler scintillation aletinde ölçülerek belirlendi. Sonuçta *Gca* TK4 DNA pol I enziminin pH 7,4 ile 8,8 arasında geniş bir pH aralığında aktivitesinin değişmediği ve benzer cpm değerlerinin elde edildiği gözlemlendi.

3.6.5. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklık TCA yöntemi ile belirlendi ve reaksiyonlar özgül aktivitenin belirlenmesi için gerçekleştirilen adımlar takip edilerek yapıldı. En yüksek cpm değerinin elde edildiği sıcaklık optimum değer olarak kabul edildi. Reaksiyonlar neticesinde enzime ait optimum sıcaklığın 55–60°C arasında olduğu belirlendi (Şekil 26).

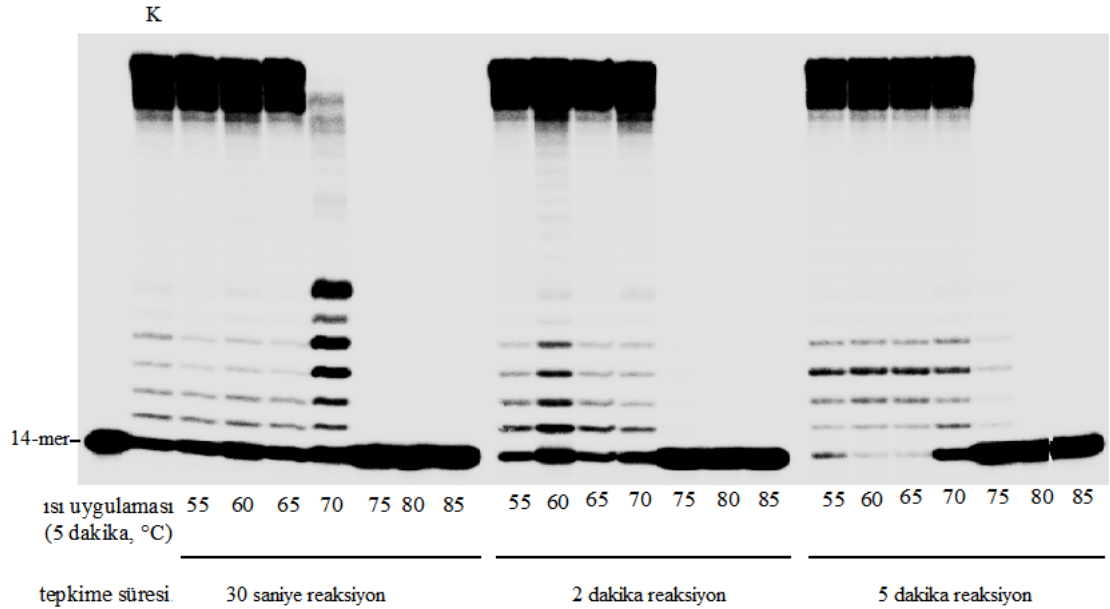


Şekil 26. Enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

3.6.6. Isıl Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimin ısı kararlılığı TCA ve üre-PAGE ile belirlendi. Reaksiyon öncesi enzim 55°C'den 85°C'ye kadar sıcaklıklarda 5 dakika bekletildi ve buz üzerinde 10 dakika soğutuldu. TCA yönteminde reaksiyon süresi 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Deneylemler sonrası 65°C'ye kadar sıcaklıklarda 5 dakika bekletilmenin enzimin aktivitesini önemli oranda etkilemediğini, ancak 70°C ve üzeri sıcaklıklarda enzimi bekletmenin önemli aktivite kaybına neden olduğunu görüldü. Özellikle 75, 80, 85°C sıcaklıklarda enzimin 5 dakika bekletilmesi sonucu aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlemlendi.

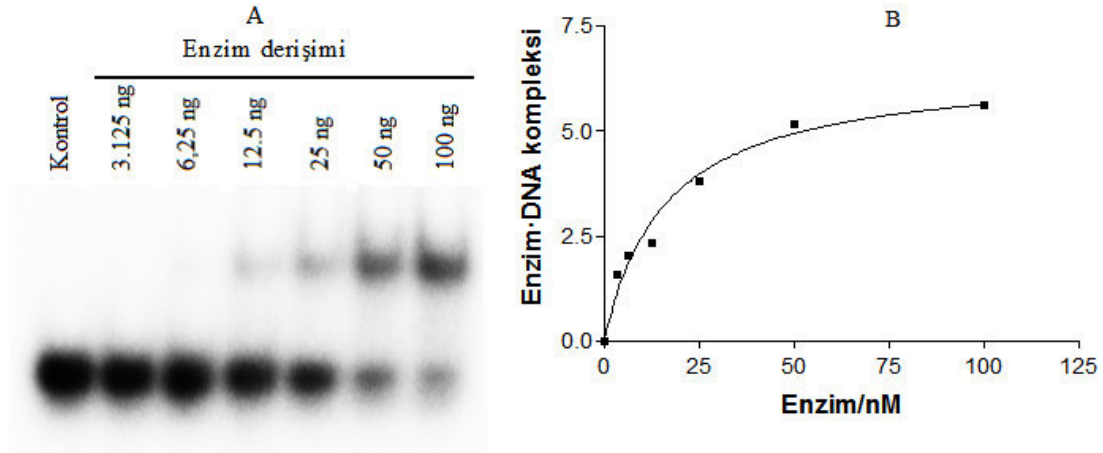
Benzer sonuçlar üre-PAGE deneylerinden de elde edildi. 65°C'ye kadar sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybetmediği ve üç farklı reaksiyon süresinin hepsinde kalıp/primer üzerinden senteze devam ederek primer uzamasını gerçekleştirebildiği gözlemlendi (Şekil 27). Ancak 70°C'de 5 dakika bekletme sonrası 30 saniye reaksiyon süresinin sentez için yeterli olmadığı en az iki dakika süreye ihtiyaç duyduğu gözlemlendi. 75, 80, 85°C sıcaklıklarda enzimin 5 dakika bekletilmesi neticesinde 5 dakika tepkime süresinin dahi yeterli olmadığı ve enzimin primer uzamasını gerçekleştiremediği gözlemlendi.



Şekil 27. Enzimin ısı kararlılığını üre-PAGE'de analizi. K: pozitif kontrol (ısı uygulaması yapılmamış enzim ile)

3.6.7. K_D DNA (Dissociation veya Binding rate) Değerinin Belirlenmesi

Polimerizasyon reaksiyonunda ilk basamak polimeraz enzimin DNA'ya bağlanmasıdır. Enzimin DNA'ya bağlanma ilgisini belirlemek için standart jel kayması (jel-shift) deneyi kullanıldı. Reaksiyon sonrası Enzim-DNA (E·DNA) kompleksi % 6'lık PAGE'de yürütülerek, oluşan E·DNA kompleksinin serbest DNA'dan farklı olarak yürüme şekli üre-PAGE jelde belirlendi. Reaksiyon örneklerinin 15 dakika doğal jelde yürütülmesi sonucu Typhoon tarayıcıda taranarak elde edilen görüntüsü Şekil 28'deki gibidir. Enzim derişimindeki artışa bağlı olarak E·DNA kompleksinin oluşumunda da bir artışın olduğu net olarak gözlemlendi. Ancak 50 ng'ın üzerinde ve 6.25 ng'ın altında fazla bir derişimin olmadığı gözlenmektedir. GraphPad-Prism3 paket programı kullanılarak K_D DNA belirlendiğinde bu değerinin 0.192 nM (+/- 0,37) olduğu gözlemlendi.

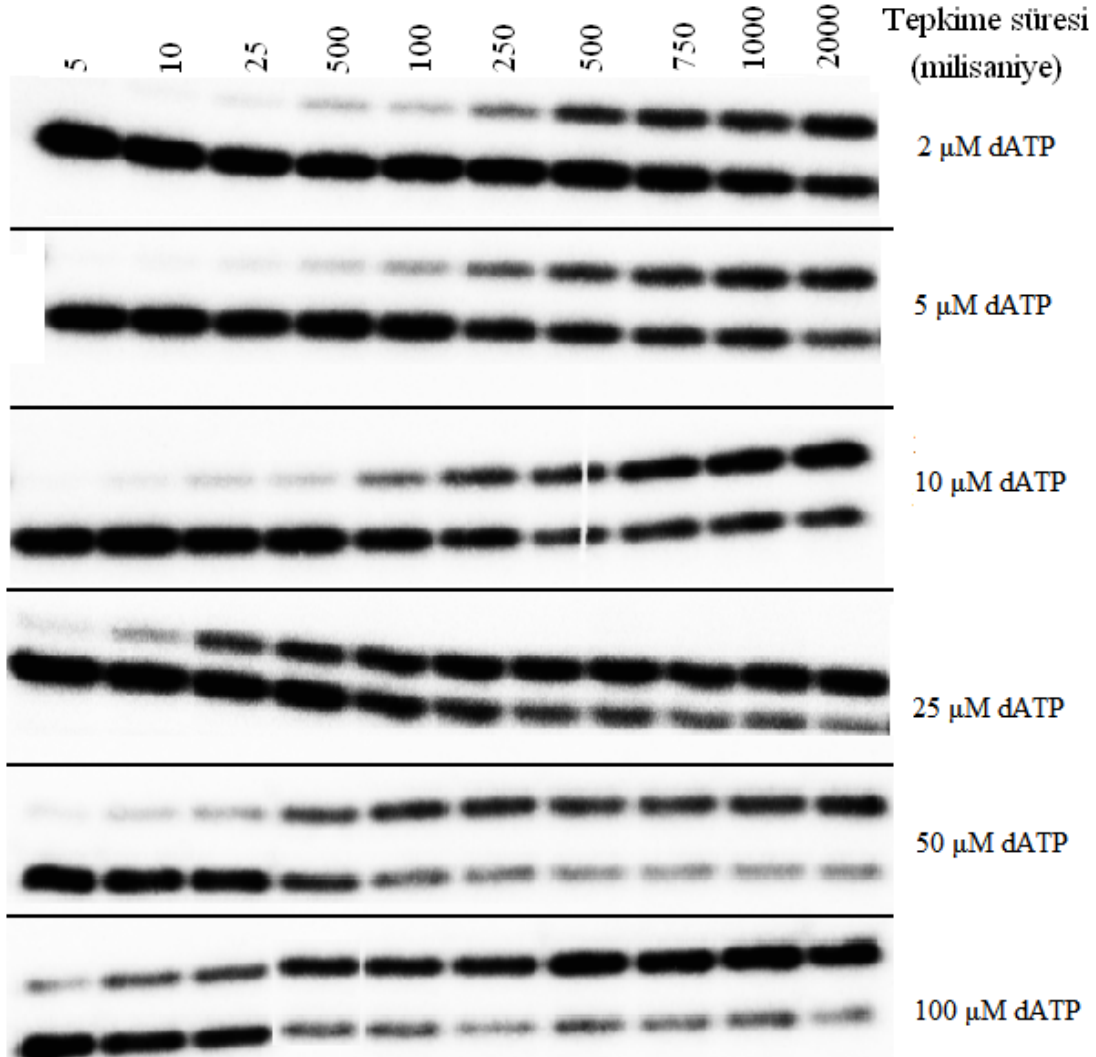


Şekil 28. Enzimin DNA'ya bağlanmasının %6'lık PAGE'de analizi (A), verilere ait grafik (B)

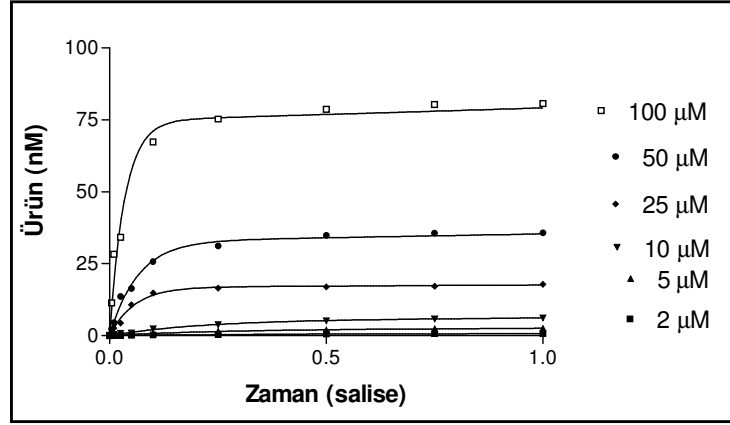
3.6.8. K_D^{dNTP} ve k_{pol} Değerinin Presteady Kinetik ile Hesaplanması

Enzimin K_D^{dNTP} (enzimin dNTP bağlama ve ayrılma sabiti) ve k_{pol} (polimerizasyon hızı) değerinin belirlenmesi, presteady kinetik ile sağlandı. Reaksiyonlar 100 nM sentetik 32/14DNA (14-mer primer 5' ucundan radyoaktif işaretli), 50 nM enzim ve 2 μ M'dan 100 μ M'a kadar değişen dNTP derişimlerinde yapıldı. Reaksiyonlar 150 mM EDTA ile sonlandırıldı ve 8 M üre-%16'lık PAGE'de yürütülerek gözlemlendi (Şekil 29). Kalan ürün ve

aktivite sonrası oluşan ürün miktarı ImageQuant 5,2 kullanılarak belirlendi ve PrismaGraph programında bu veriler değerlendirilerek K_D^{dNTP} ve k_{pol} değeri hesaplandı (Şekil 30). k_{pol} değeri $24,99 \text{ s}^{-1}$ bulunurken K_D^{dNTP} değeri $21,64 \text{ }\mu\text{M}$ olarak hesaplandı (maksimum K_D^{dNTP} değerinin yarısı).



Şekil 29. K_D^{dNTP} 'nin üre-PAGE ile analizi



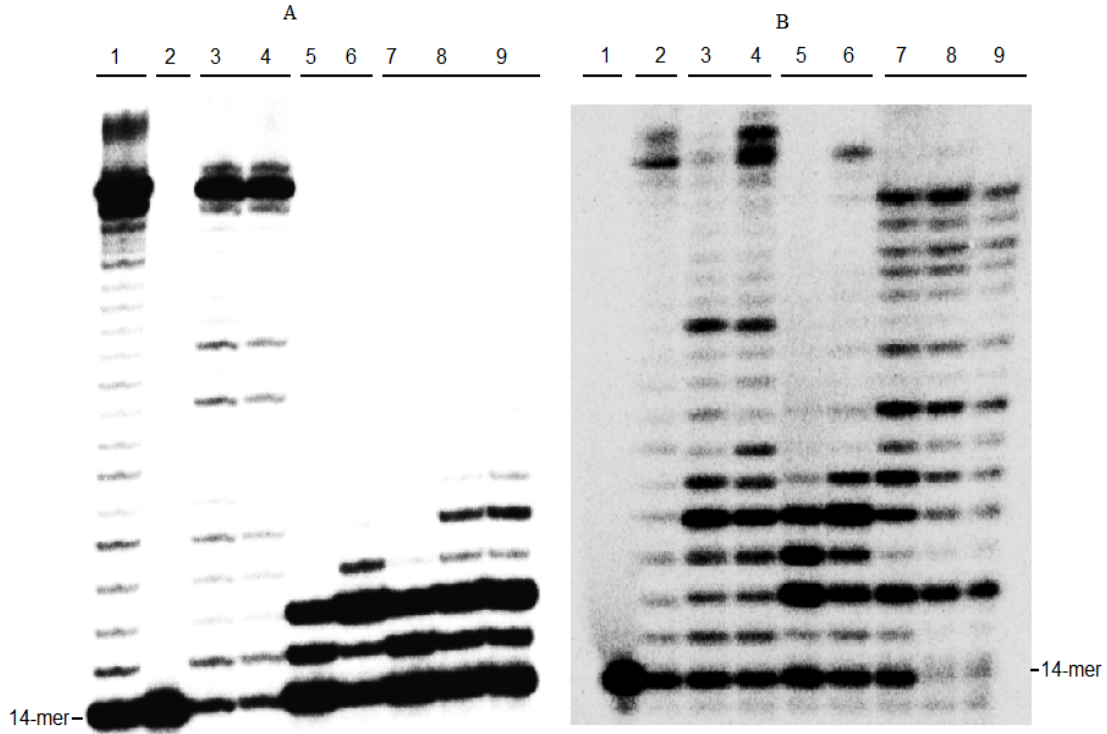
Şekil 30. Zamana bağlı ürün oluşumu

3.6.9. RNA-Bağımlı DNA Polimeraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Gca TK4 DNA polimeraz I'in RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi 32-mer RNA kalıbına hibridize olmuş 14-mer uzunluğundaki DNA kullanılarak araştırıldı. Kontrol olarak HIV-Revers transkriptaz ve *E. coli* Klenow Fragmenti kullanıldı. Zincir uzatma deneyi pozitif kontrol olarak yapıldı. Deneyler $MgCl_2$ ve $MnCl_2$ ile ayrı ayrı yapıldı. Reaksiyonlar $MgCl_2$ ile yapıldığında sadece HIV-Revers transkriptazın, kontrol reaksiyonundaki gibi (Şekil 31A- 3 ve 4 nolu sütunlar) 32-mer kalıbın tamamının sentezini gerçekleştirdiği gözlemlendi.

Gca TK4 ve *E. coli* Klenow Fragmenti için reaksiyon süresinin çok daha uzun tutulmasına rağmen her iki enzimin etkili olarak sadece iki nükleotit ilavesi gerçekleştirebildiği gözlemlendi (Şekil 31A-5 ve 7 nolu sütunlar *E. coli* Klenow Fragmenti, 9-9 nolu sütunlar *Gca* TK4 DNA polimeraz I).

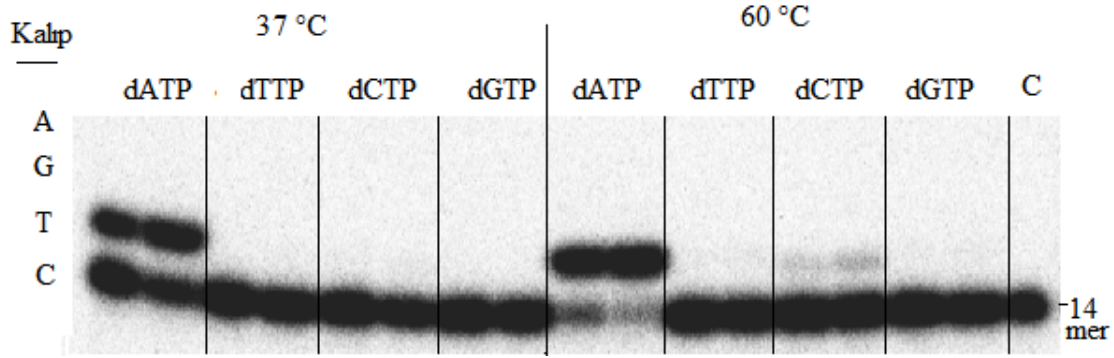
Aynı deneyler $MnCl_2$ ile yapıldığında, *Gca* TK4 DNA polimeraz I (Şekil 32B-7-8-9 nolu sütunlar) ve *E. coli* Klenow fragmentinin (Şekil 31B-5v3 6 nolu sütunlar), HIV-Revers transkriptaza benzer şekilde kalıbın sentezini tamamlayarak (Şekil 31B-3 ve 4 nolu sütunlar) RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi gösterdiği gözlemlendi. Bu da *Gca* TK4 enzimin $MnCl_2$ ile daha etkili bir RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesine sahip olmadığını göstermektedir.



Şekil 31. RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesinin üre-PAGE ile analizi. A: reaksiyon Mg^{+2} ile yapıldı, B: Reaksiyon Mn^{+2} iyonu ile yapıldı. 1: polimeraz deneyi, 2: 14-mer primerin pozisyonu, 3 ve 4: HIV Revers transkriptaz ile reaksiyon (0,5 ve 1 dk sırası ile), 5 ve 6: *E. coli* DNA polimeraz I Klenow Fragmenti (1 ve 5 dakika sırası ile), 7, 8 ve 9: *Gca* TK4 DNA polimeraz I (1, 5 ve 10 dakika sırası ile)

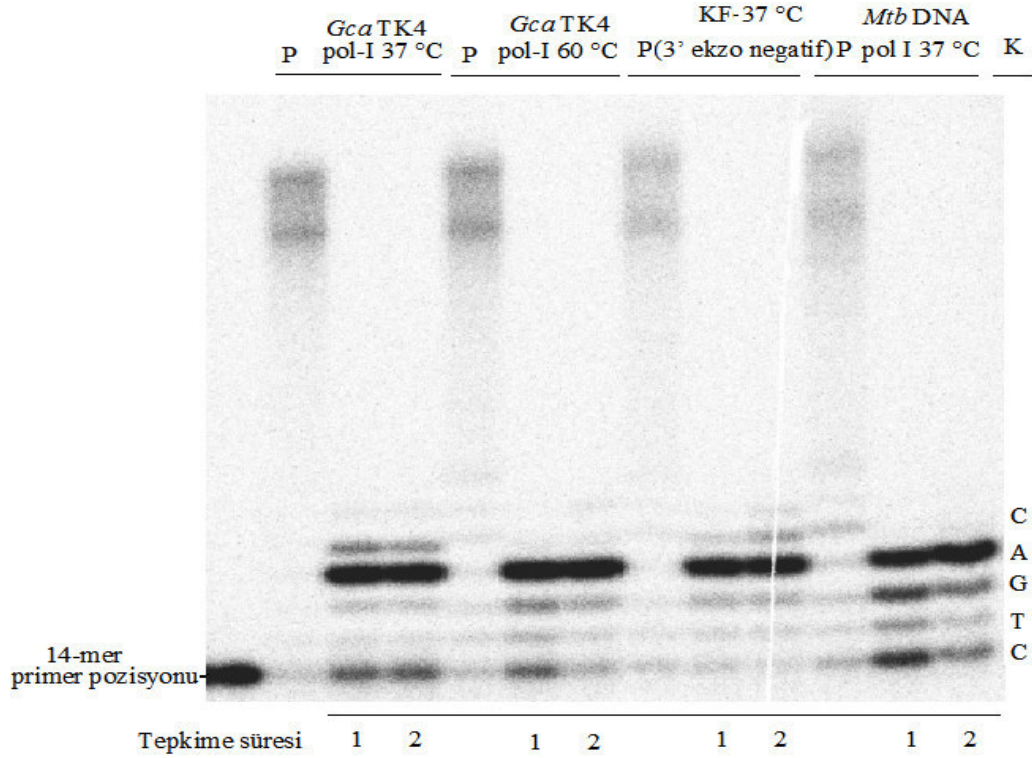
3.6.10. Enzimin Hata Yapma Oranının Belirlenmesi

Üre-PAGE'de herbir dNTP ile zincir uzatma deneyi iki farklı sıcaklıkta (37 ve 60 °C) yapılarak enzimin hata yapma oranı araştırıldı. Kalıptaki karşılığı baza uygun olarak gelen nükleotit dATP olduğunda enzimin nükleotit ilavesini katalizleyerek 14-mer'den 15-mer'e uzamasını kolaylıkla sağladığı gözlemlendi. Ancak aynı reaksiyon diğer üç nükleotit ile herbirinin ayrı ayrı kullanıldığı şartlarda yapıldığında sıcaklığa bağlı olarak sonucun değişebildiği gözlemlendi. dTTP ve dGTP ile her iki sıcaklıkta da enzimin hata yapmadığı ve dNTP ilavesini katalizleyemediği gözlemlendi (Şekil 32). Ancak sıraya uygun ikinci nükleotitin dCTP olduğu durumda enzimin 37 °C'de yine hata yapmadığı ancak 60 °C'de çok az hata yaptığı gözlemlendi. Bu oran hesaplandığında enzimin fidelitesinin 4×10^{-5} olduğu gözlemlendi. Yani *in vitro* şartlarda enzim her 40.000 nükleotit ilavesinde 1 nükleotiti yanlış eklemektedir.



Şekil 32. Enzimin hata yapma oranının sıcaklığa bağlı değişimin Üre-PAGE ile analizi

Aynı amaçla 3 dNTP'nin (dATP, dCTP ve dTTP) varlığında (kalıba ait ilk üç nükleotide karşılık gelmektedirler: dATP, dGTP ve dTTP) deneyler tekrar edildi ve reaksiyon ortamına sadece dGTP nükleotiti (kalıp zincir üzerindeki 4 nükleotit olan dCTP'ye karşılık gelmektedir ve ortama dGTP olmadığından sentez bu noktada sonlanacaktır) eklenmedi. Eğer *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin hata yapma oranı az ise, kalıba uygun olarak gelen üç nükleotit olan dATP, dGTP ve dTTP nükleotitlerini ekleyecek ve kalıp üzerinde dördüncü pozisyonda yer alan dCTP nükleotitine karşılık gelen dGTP reaksiyon ortamında olmadığı için sentez bu noktada duracaktır. Eğer *Gca* TK4 DNA polimeraz I yüksek hata oranı ile DNA'nın sentezini yapıyorsa, sentez bu noktada durmayacak ve kontrol reaksiyonundaki gibi (reaksiyon ortamında tüm nükleotitleri var) tüm kalıbın sentezini gerçekleştirecektir. Kontrol olarak *E. coli* Klenow Fragmenti ve yüksek doğrulukta DNA sentezi yapan *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. Reaksiyon sonuçları 8 M üre ve %16'lık PAGE'de analizi neticesinde (Şekil 33), tek nükleotit ile elde edilen sonuca benzer bir sonuç elde edildi.



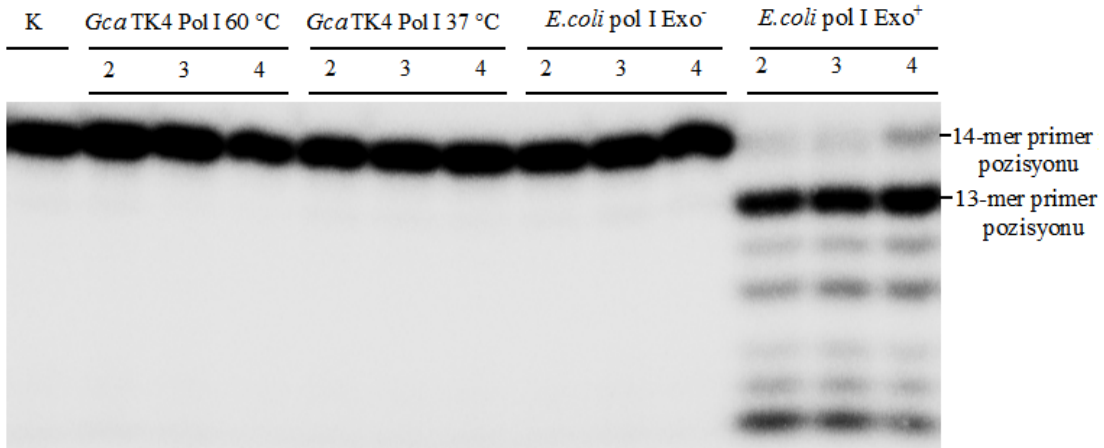
Şekil 33. Üç dNTP'nin varlığında enzimin hata yapma oranının Üre-PAGE ile analizi. K: kalıp zincire ait nükleotit sırası, P: pozitif kontrol (4 nükleotit ile reaksiyon), 1: 2 dakika reaksiyon, 2: aynı reaksiyonun tekrarı (1 nolu reaksiyon)

Her bir reaksiyon iki kez yapıldı ve *Gca* TK4 DNA polimeraz I için reaksiyonlar hem 37°C ve 60°C'de ayrı ayrı yapılırken *E.coli* Klenow Fragmenti ve *Mtb* DNA polimeraz I için 37°C'de yapıldı. Sonuçta enzimin 60°C'de *E.coli* Klenow Fragmentine benzer oranda hata yaptığı gözlemlendi. *Mtb* DNA polimeraz I'in ise hem *Gca* TK4 DNA polimeraz I hem de *E.coli* Klenow Fragmentinden daha yüksek doğrulukta DNA sentezi yapabildiği gözlemlendi. Sonuçta *Gca* TK4 DNA pol I ve *E. coli* DNA pol I enziminin hemen hemen benzer hata oranına sahip olduğu *Mtb* DNA pol I'in ise hata yapmadığı gözlemlendi. *Gca* TK4 DNA pol I'de sıcaklığa bağlı olarak hata oranının ise arttığı gözlemlendi.

3.6.11. 3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

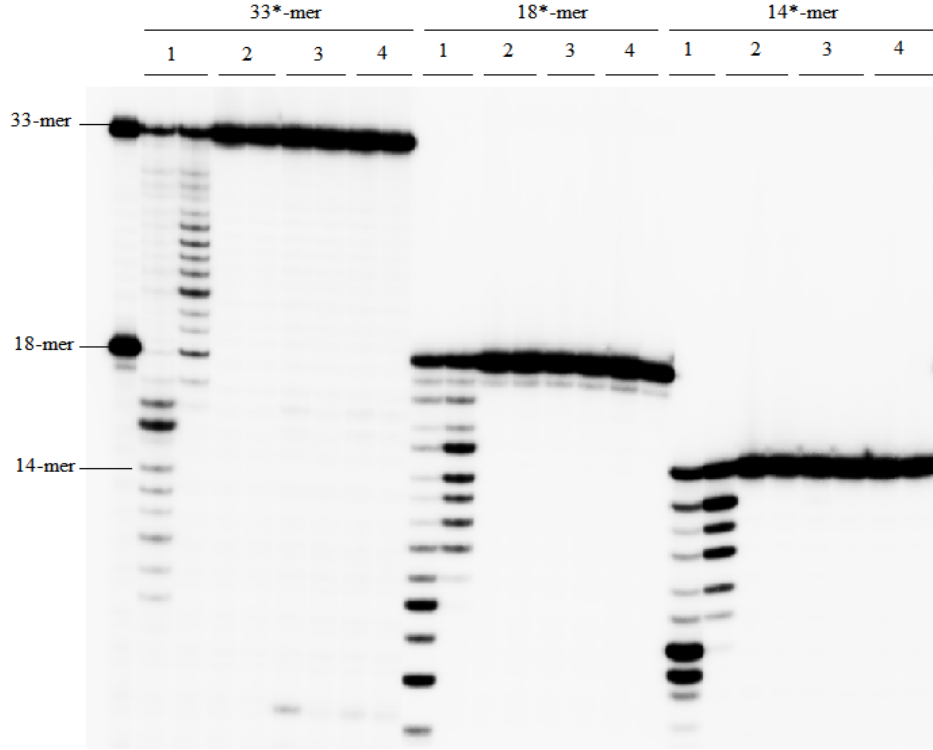
Enzimin çift zincir DNA üzerinde primere ait 3' uçta hatalı nükleotiti uzaklaştırma özelliği, kalıba hatalı olarak eşleşmiş 32/14* sentetik DNA kullanılarak araştırıldı. 15-mer

primer 5' ucundan radyoaktif olarak işaretlidir. *Gca* TK4 DNA pol I ile reaksiyonlar iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirildi ve her iki durumdada enzimin çift zincir DNA'da herhangi bir 3' bozunma gerçekleştirmediği belirlendi. Kontrol olarak *E. coli* DNA pol I yaban tip ve *E. coli* DNA pol I (3'→5' ekzonükleaz aktivitesi negatif) kullanıldı. *E. coli* DNA pol 3' ekzonükleaz negatif enzimin *Gca* TK4 ile benzer sonuç verdiği, yaban tip *E. coli* DNA pol I ise çift zincir DNA üzerinde bozunma yaptığı gözlemlendi (Şekil 34).



Şekil 34. Çift zincir 3'→5' ucu hatalı eşleşmiş nükelotit varlığında 3' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi. 2: 1 dk., 3: 5 dk. ve 4; 10 dk. reaksiyon, K: kontrol

Bu sonuca dayanarak enzimin çift zincir DNA üzerinde herhangi bir 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı ve 3'-OH uçta eşleşmemiş baz olduğu durumda bu nükleotiti uzaklaştıramadığı belirlendi (Şekil 34). Benzer şekilde tek iplik DNA kullanılarak 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldığında enzimin tek iplik DNA üzerinde de herhangi bir 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı gözlemlendi (Şekil 35).



Şekil 35. Tek iplik DNA kullanılarak 3'→5' ekzonükleaz aktivitenin üre-PAGE analizi. 1: yaban tip enzim *E. coli* Pol I, 2; *E. coli* DNA pol I 3'→5' ekzonükleaz mutant, 3; *Gca* TK4 Pol I 60°C'de, 4; *Gca* TK4 Pol I 37°C'de. Reaksiyonlar 1 dk. ve 5 dk.

Tek iplik zincirin uzunluğunun 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine etkisi olabilir diye değişik uzunluklarda tek iplik DNA kullanılarak deneyler yapıldığında aynı sonuçlar elde edildi. Dolayısı ile enzimin herhangi bir ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığına karar verildi. 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi için gerekli olan korunmuş amino asitler yönünden *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin amino asit sırası incelendiğinde enzimin bu korunmuş amino asitlerden herhangi birine sahip olmadığı gözlemlendi. *E. coli* DNA polimeraz I'de bu aktiviteye sahip olmak için korunmuş en az dört amino asit vardır (D355, E357, D424 ve D501) ve bu korunmuş amino asitlerin herbirisi 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi için önemlidir. *Gca* TK4 DNA pol I bu amino asitlere sahip olmadığından 3'→5' ekzonükleaz aktiviteyi gösterememektedir.

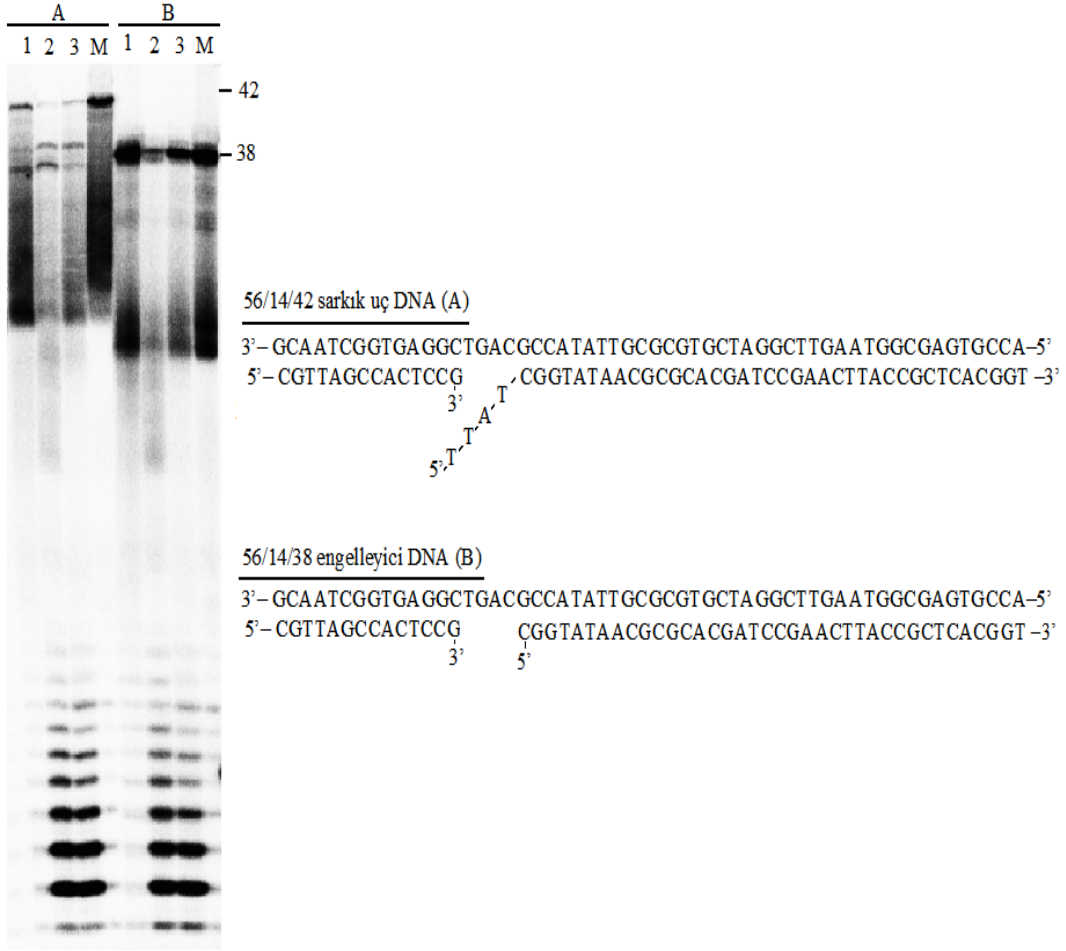
3.7. 5' Nükleaz Aktivitesinin Karakterize Edilmesi

DNA polimeraz I familyasına ait *E. coli* DNA polimeraz I ile yapılan çalışmalar neticesinde 5' nükleaz aktivitesinden sorumlu 13 adet korunmuş amino asit (Tablo 18) belirlenmiştir (Yang vd., 2000; Yang vd., 2001). *Gca* TK4 DNA polimeraz I, bu amino asitlerin hepsine sahiptir ve bu nedenle, *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in *E. coli* DNA polimeraz I enzimine benzer bir 5' nükleaz aktivitesi göstermesi beklenebilir. 5' nükleaz aktivitesi için enzimin polimeraz aktivitesi de gösterebileceği sarkık uç (56/14/38) ve engelleyici (56/14/42) DNA örnekleri kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Tablo 18. 5' nükleaz bölgesinde yer alan korunmuş amino asitler

	Korunmuş amino asit pozisyonları													
<i>E.coli</i>	D 13	R 20	D 63	R 70	Y 77	K 78	R 81	E 113	D 115	D 116	D 138	D 140	D 185	D 188
<i>Gca</i> TK4	11 D	18 R	61 D	67 R	74 Y	75 K	79 R	111 E	113 D	114 D	136 D	138 D	187 D	190 D

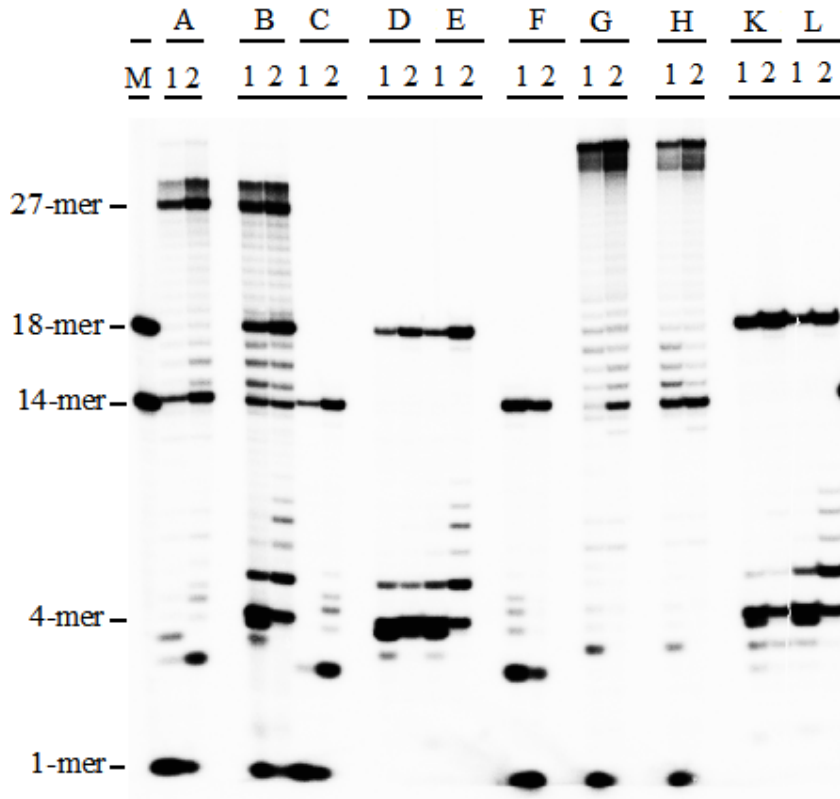
Sarkık uç ve engelleyici DNA'nın hidrolizi 5' nükleaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak kabul edildi (Şekil 36). Enzimin her iki sentetik DNA örneği ile de aktivite göstererek tek tek nükleotitlerinin kesimini katalizleyebildiği gözlemlendi. Sarkık uç taşıyan 56/14/42 şeklindeki DNA örneğinde enzimin öncelikle sarkık kısmı kestiği ve ilk etapta 38-mer DNA örneğinin ilk ürün olarak oluştuğu gözlenmektedir. Daha sonra ise substratın geri kalan kısmını tek tek keserek uzaklaştırdığı gözlenmektedir. Bu aşamadan sonraki kesim profilinin 56/14/38 DNA örneği üzerinden gerçekleşen kesim profi ile aynı olduğu gözükmemektedir. 61-14 self katlanmış çift zincir DNA örneği ile de 5' nükleaz aktivitesi araştırıldığında benzer sonuç elde edildi. Enzim 3'-OH uç doğrultusunda senteze devam ederken, engelleyici 5' uca rast geldiğinde, 5' uçtan kesim yaptığı belirlendi.



Şekil 36. DNA_56/14/38 (B) ve DNA_56/14/42 (A) ile 5' nükleaz aktivitesinin üre-
PAGE analizi. 1: *E. coli* DNA polimeraz I (5 dk.), 2-3: *Gca* TK4 DNA
polimeraz I (1 dk. ve 5 dk.), M: markır

3.7.1. Enzimin 5' Nükleaz Kesim Profilinin Araştırılması

28/14/14 DNA substrat olarak kullanıldığında (sarkık DNA ve bloklayıcı DNA 5' ucundan radyoaktif olarak işaretlidir) ve deney dNTP kullanılarak yapıldığında enzimin zincir uzaklaştırma aktivitesi ile birlikte sentez aktivitesini de yürüttüğü ve buna ilaveten zincir uzaklaştırma aktivitesi sonrası oluşan 5' sarkık uçtan çoğunlukla tek nükleotit halinde kesim yaptığı gözlemlendi. Nadir de olsa 4 bazlık fragmentlerin kesimini de katalizlediği gözlemlendi. Benzer sonuçlar dNTP kullanılmadığında hem *Gca* TK4 DNA polimeraz I ile hem de *E. coli* DNA polimeraz I ile elde edildi (Şekil 37A ve C).

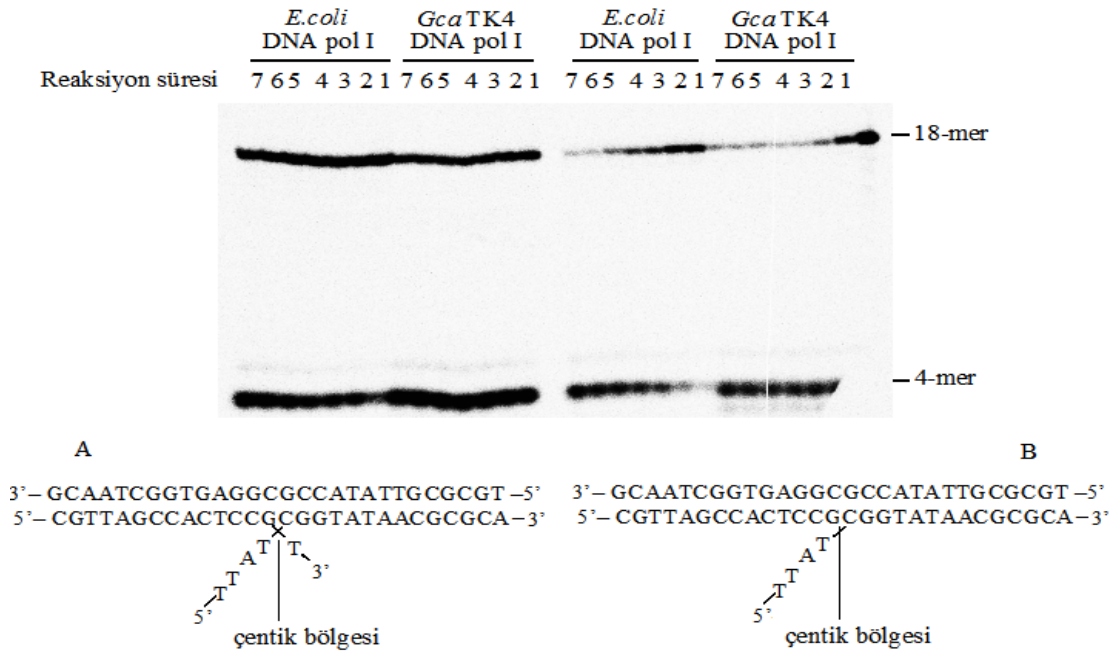


Şekil 37. Ezimin 5' nükleaz kesim profilinin üre-PAGE'de analizi. 1: *Gca* TK4 DNA polimeraz I, 2: *E. coli* DNA Polimeraz I, A: DNA_28/14*/14*_dNTP(+), B: DNA_28/14*/18*_dNTP(+), C: DNA_28/14/14*_dNTP(+), D: DNA_28/14/18*_dNTP(-), E: DNA_28/14/18*_dNTP(+), F: DNA_32/14/14*_dNTP(+), G: DNA_32/14*/14_dNTP(+), H: DNA_32/14*/18_dNTP(+), K: DNA_32/14/18*_dNTP(-), L: DNA_32/14/18*_dNTP(+). DNA örneklerine ait eşleşmeler Tablo 9'daki gibidir

28/14/18 DNA substrat olarak kullanıldığında (primer ve sarkık uç DNA, 5' ucundan radyoaktif olarak işaretlidir) ve dNTP kullanılarak yapıldığında enzimin öncelikle 4 nükleotitlik sarkık ucu kestiği ve buna ilaveten tek ve 5 nükleotitlik kesimler yapabildiği gözlemlendi (Şekil 37B). dNTP'nin kullanılmadığı ve primerin işaretli olmadığı durumlarda da benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 37D ve E). Benzer deneyler primer ve bloklayıcı DNA arasında boşluk bulunan DNA örnekleri (32/14/14 ve 32/14/18) kullanılarak yapıldığında benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 37F, G, H, K ve L).

3.7.2. 3' Primer Uçta Eşleşmemiş Bir Baz Varlığının Enzimin 5' Nükleaz Aktivitesine Etkisi

5' sarkık ucun önünde yer alan primere ait 3' uçtaki eşleşmemiş nükleotitin varlığının 5' nükleaz aktivitesine olumlu yönde etki yaptığı belirlenmiştir (Xu vd., 2001). Bu amaçla 3' ucunda eşleşmemiş nükleotit içeren substrat kullanılarak bu eşleşmemenin 5' nükleaz aktivitesi üzerine olan etkisi araştırıldı (Şekil 38 A). Kontrol olarak ise sadece 5' sarkık uç taşıyan DNA kullanıldı (Şekil 38 B) ve reaksiyonlar yedi farklı sürede yapıldı.

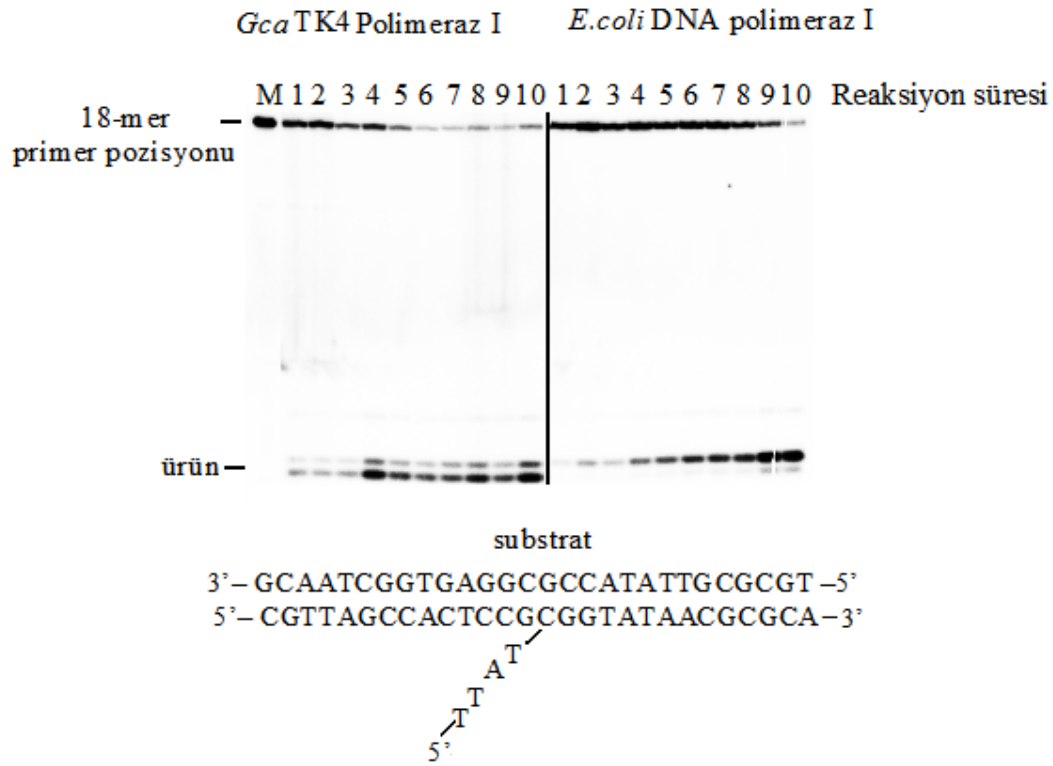


Şekil 38. Primere ait 3' ucunda eşleşmemiş nükleotitin 5' nükleaz aktivitesi üzerine etkisinin üre-PAGE'de analizi. A: 3' uçta eşleşmemiş baz içeren DNA, B: sadece 5' sarkık uç taşıyan DNA. 1: 10 sn., 2: 20 sn., 3: 40 sn., 4-5-6-7: sırası ile 1, 2, 5, 10 dk.

E. coli DNA polimeraz I pozitif kontrol olarak kullanılarak deneyler yapıldığında, her iki durumda her iki substrat ile de enzimlerin etkili bir şekilde kesim yaptığı gözlemlendi. Ancak substrat B ile enzimlerin daha yavaş aktivite gösterdiği gözlemlendi. Dolayısıyla primere ait 3' ucunda yer alan eşleşmemiş nükleotitin varlığında aynı reaksiyon daha yavaş katalizlenmektedir.

3.7.3. Özgül 5' Nükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzime ait özgül 5' nükleaz aktivitesi, 5' ucunda 4 nükleotitlik sarkık DNA taşıyan 28/14/18 sentetik DNA kullanılarak araştırıldı (Şekil 39). Kontrol olarak *E. coli* DNA polimeraz I kullanıldı. 4 nükleotitlik sarkık ucun degradasyonu sonucu oluşan üründen yararlanılarak özgül 5' nükleaz aktivitesi hesaplandı. *Gca* TK4 DNA pol I'in, *E. coli* DNA polimeraz I'den en az iki kat daha hızlı bir şekilde kesim reaksiyonunu katalizlediği gözlemlendi ve substrata olan ilgisinin 2.35 μ M olduğu belirlendi.



Şekil 39. Özgül 5' nükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi ile belirlenmesi. 1: 5 saniye, 2: 10 saniye, 3: 20 saniye, 4: 30 saniye, 5: 40 saniye, 6: 50 saniye, 7: 1 dakika, 8: 2 dakika, 9: 5 dakika, 10: 10 dakika, M: markır.

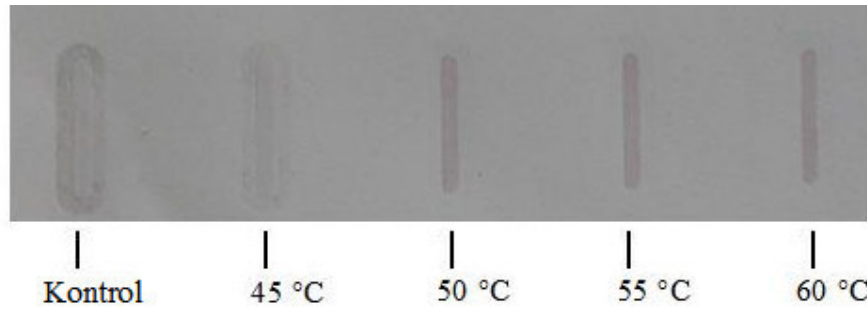
3.8. DIG-dUTP ile Enzimin Sentez Aktivitesinin Belirlenmesi

DNA polimeraz enzimleri normal dNTP'lerle beraber diğer dNTP analogları ile de sentez yapabilirler. Bu özellik DNA polimeraz enzimleri arasında farklılık gösterir. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin bu özelliği DIG-dUTP nükleotiti kullanılarak araştırıldı.

Kontrol olarak *E. coli* Klenow Fragmenti ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. Enzimlere ait bu özellik hem dana timus DNA hemde sentetik primerlerin eşleşmesi ile oluşturulan çift zincir DNA'lar kullanılarak incelendi.

3.8.1. Dana Timus DNA Kullanarak Aktivitenin Belirlenmesi

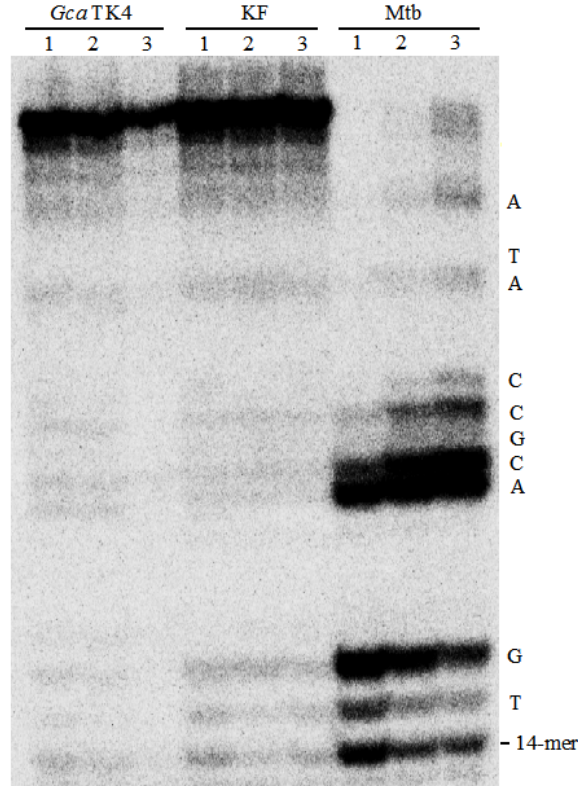
Gca TK4 DNA pol I enziminin DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanıp sentez yapma özelliği dana timus DNA kullanılarak incelendi. Enzim, 50, 55 ve 60°C'de yapılan reaksiyonlarda aktivite gösterdiği ve DIG-dUTP nükleotitini dana timus DNA'ya ekleyebildiği gözlemlendi. Aktivite sonrası DNA'ya eklenen DIG-dUTP, DIG Nucleic Acid Detection Kit kullanılarak belirlendi (Şekil 40).



Şekil 40. DIG-dUTP ve dana timus DNA ile enzimin aktivitesinin gösterilmesi

3.8.2. Sentetik DNA Kullanılarak

5' ucundan radyoaktif olarak işaretli 32/14 sentetik DNA kullanılarak enzimin DIG-dUTP ile aktivitesi araştırıldı. Reaksiyon sonucu enzim aktivitesi DIG Nucleic Acid Detection Kit yerine radyoaktivite yöntemi kullanılarak belirlendi. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanarak sentez yapabildiği görüldü. Kontrol olarak *E. coli* Klenow Fragmenti ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. *Gca* TK4 DNA polimeraz I ve *E. coli* Klenow Fragmenti DIG-dUTP ile benzer aktivite vermektedir. Ancak *Mtb* DNA pol I ise düşük aktivite göstermektedir. Şekil 41'te enzimin dATP ve dCTP eklemesi sonrası sıraya uygun olarak gelen dTTP'ye karşılık olarak DIG-dUTP'yi eklediği açıkça görünmektedir.

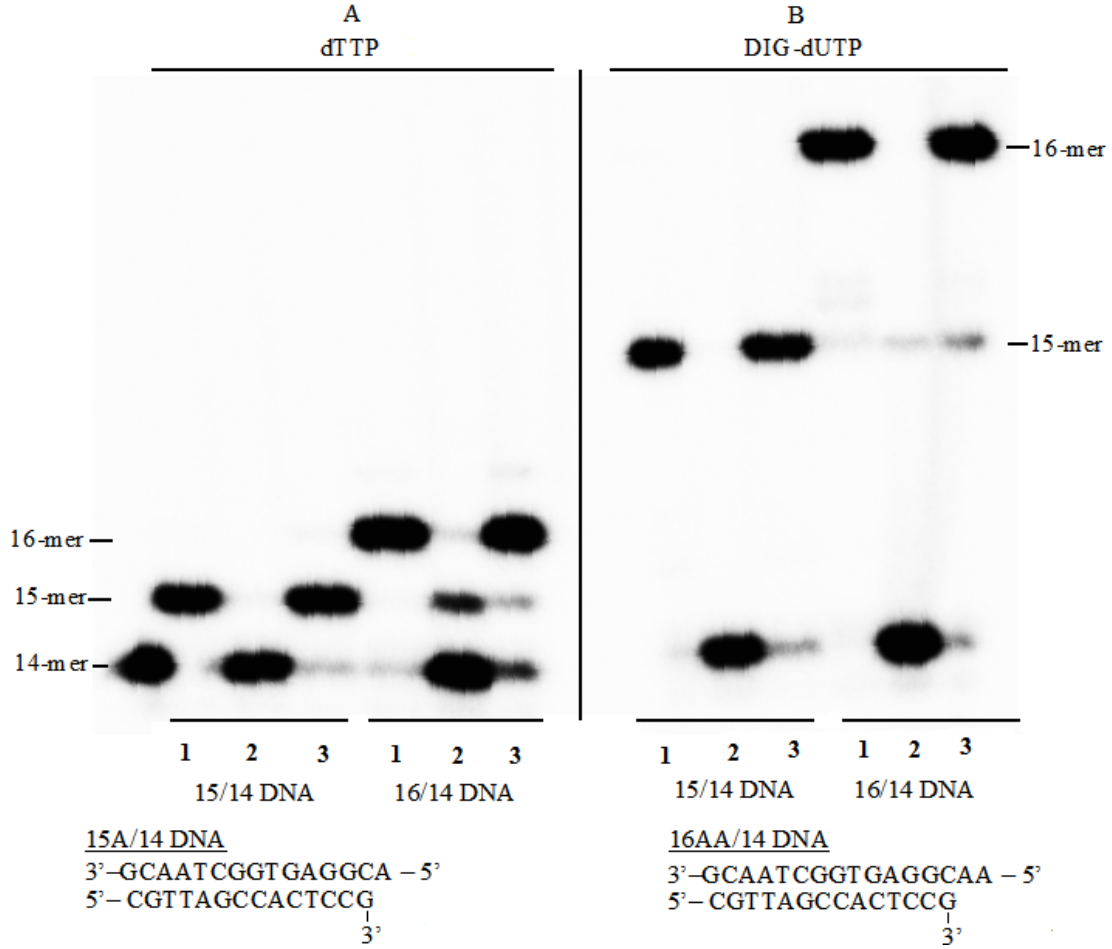


Şekil 41. Sentetik DNA ve DIG-dUTP ile enzimin aktivitesinin üre-PAGE analizi. 1; 1 dk. reaksiyon, 2; 5 dk. reaksiyon, 3; 10 dk. reaksiyon.

3.8.3. Enzimin Son Nükleotiti Ekleme Özelliğinin Belirlenmesi

Enzimin son nükleotiti ekleyebilme özelliği radyoaktif olarak işaretli 15/14 ve 16/14 sentetik DNA'lar kullanılarak araştırıldı. 15/14* sentetik DNA'da kalıp zincirin son nükleotiti dATP olduğundan enzim sadece dTTP nükleotiti veya DIG-dUTP ile sentez yapabilecektir. 16/14 sentetik DNA'da kalıp zincirin son iki nükleotiti dATP'dir ve enzim sadece dTTP nükleotiti veya DIG-dUTP ile sentez yapacak ve iki adet nükleotiti peş peşe ekleyecektir. 15/14 sentetik DNA ile hem *Gca* TK4 hemde Klenow Fragmenti benzer aktivite göstererek 14-mer primerin 15-mer'e uzamasını hem dTTP (Şekil 42A) hem de DIG-dUTP (Şekil 42B) ile sağlamıştır. Ancak *Mtb* DNA pol I bu aktiviteyi göstermemiştir. Aynı deney 16/14 sentetik DNA kullanılarak yapıldığında *Gca* TK4 ve Klenow Fragmenti aktivite göstererek iki nükleotiti peş peşe ekleyerek 14-mer primerin 16-mer'e uzamasını

sağlamıştır (Şekil 42A ve B). Ayrıca Klenow Fragmenti ve *Gca* TK4 enzimlerin peş peşe DIG-dUTP ekleyerek sentez yapabilmektedir. *Mtb* enzimi ise 16/14 sentetik DNA ile az da olsa aktivite göstermiştir.



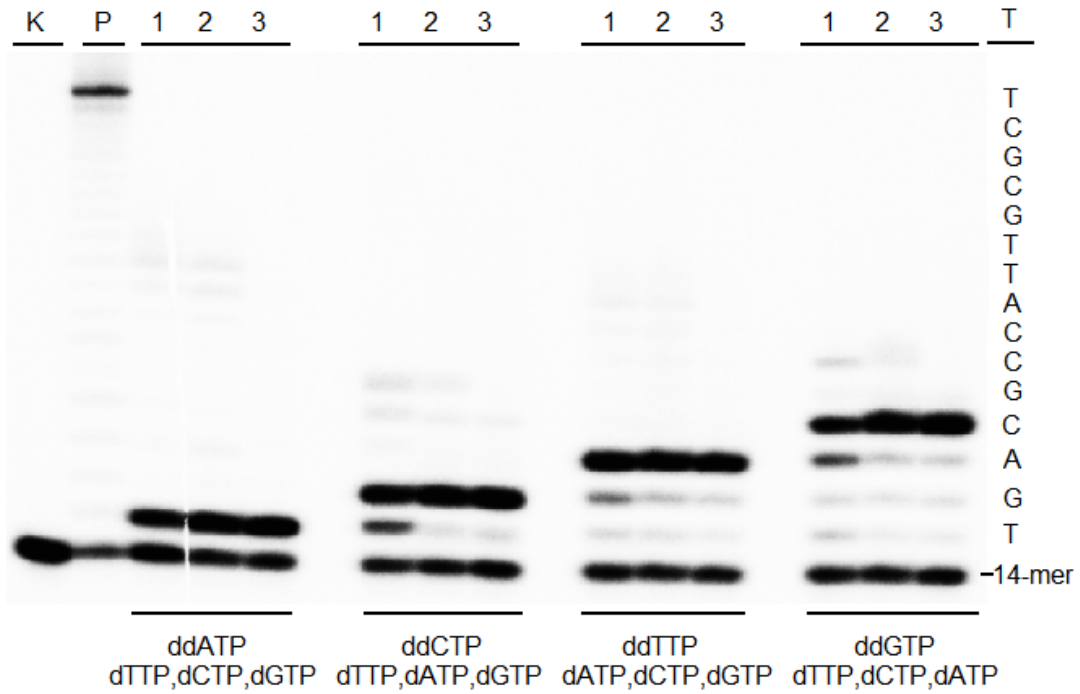
Şekil 42. Enzimin son nükleotiti ekleyebilme özelliğinin üre-PAGE ile analizi. 1; *Gca* TK4 DNA pol I, 2; *Mtb* DNA pol I, 3; KF. Reaksiyonlar dTTP ve DIG-dUTP ayrı ayrı kullanılarak hem 15/14 hem de 16/14 DNA substrat ile yapılmıştır

dTTP eklenmesi ile 14-mer'den 15-mer'e uzama ile DIG-dUTP eklenmesi ile 14-mer'den 15-mer'e uzama neticesinde her ikisinde farklı uzunlukta boşluğun oluşması dTTP ve DIG-dUTP'nin moleküler ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir. Bir DIG-dUTP molekülü yaklaşık üç dTTP molekülü büyüklüğündedir. Dolayısı ile her birinden tek bir tane eklenmesinde aradaki mesafe DIG-dUTP'de dTTP'den üç kat daha fazladır.

3.9. ddNTP'ye İlginin Belirlenmesi

3.9.1. Yaban Tip Enzimin ddNTP İlgisinin İncelenmesi

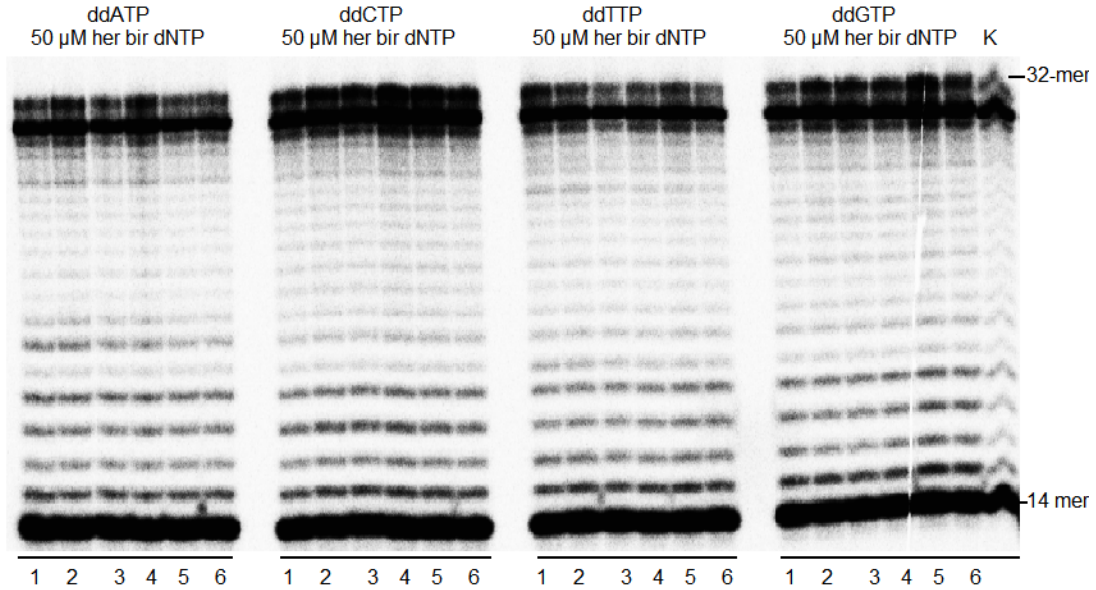
Gca TK4 DNA polimeraz I'in ddNTP'ye ilgisinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalar neticesinde yaban tip enzimin ddNTP'ye karşı çok az duyarlı olduğu belirlendi (Şekil 43). Özellikle reaksiyon ortamında ilgili dNTP yerine ddNTP formu varsa enzim ddNTP'yi tanımakta ve zincire eklemektedir. ddNTP'nin ilavesi sonrası ise reaksiyon sonlanmaktadır. Bu da ddNTP ilavesi ile zentezin sonlandığını ve enzimin ddNTP ile sonlanmış zincir üzerinde sentezi ilerletemediğini göstermektedir.



Şekil 43. 50 μ M dNTP ve 150 μ M herbir ddNTP derişiminde ddNTP'ye ilgisinin üre-PAGE analizi

ddNTP'ye ilgisinin belirlenmesi sonrası ddNTP'ye ilginin ne düzeyde olduğunu belirlemek için dNTP varlığında deneyler gerçekleştirildi. Bunun için sabit dNTP derişiminde, ddNTP derişimi herbir ddNTP için 14 kata (50 μ M dNTP ve 700 μ M ddNTP) kadar oranlarda deneyler yapıldı. Şekil 44'de görüldüğü gibi herbir ddNTP derişiminde enzimin sentez reaksiyonunu kontrol reaksiyonunda olduğu gibi (Şekil 44 P) tamamlayarak

32-merlik zincirin tamamını sentezlediği gözlemlendi. Bu da enzimin ddNTP'ye karşı ilgisinin zayıf olduğunu ve ortamda ddNTP ve dNTP birlikte bulunduğu zaman enzimin dNTP'yi kullanmayı çok çok daha fazla tercih ettiğini gösterdi.



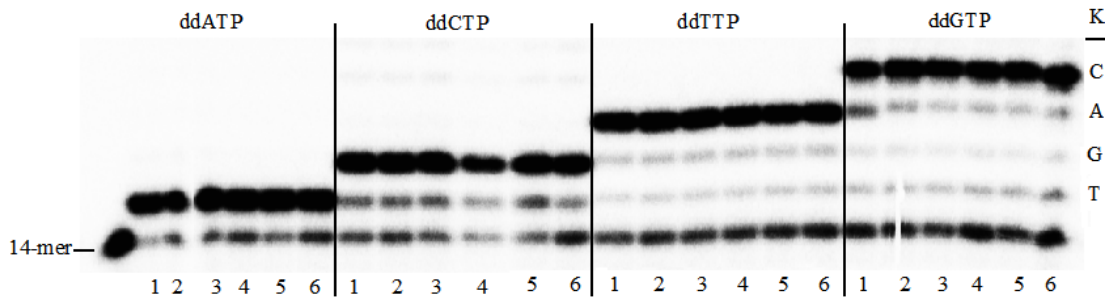
Şekil 44. 50 µM dNTP ve değişik ddNTP derişimlerinde ddNTP'ye ilgisinin üre-PAGE'de analizi. K: Kontrol, P: Polimerizasyon deneyi, 1: *Gca* TK4, 2: Klenow Fragmenti, 3: *Mtb* Pol I, T: kalıp zincire ait sekans

Özellikle Şekil 44'deki 6 nolu sütunda dNTP ve ddNTP arasındaki oran farkının 14-kat olmasına rağmen enzim dNTP'yi tercih ettiği gözükmektedir. Herbir ddNTP ile yapılan reaksiyonlar neticesinde enzimin tüm ddNTP ler için aynı oranda ilgiye sahip olduğu gözlemlendi.

3.9.2. F712Y Mutantı Protein ile ddNTP'ye İlginin Araştırılması

DNA polimeraz I enzimlerinin ddNTP'yi tanması sekans çalışmalarında kullanılmaları açısından önemlidir. DNA polimeraz enzimleri arasında ddNTP'ye olan ilgide farklılıklar vardır. T7 DNA polimeraz I ile yapılan çalışmalar, T7 DNA polimeraz enziminin 526 numaralı tirozin aminositinin reaksiyon ortamındaki ddNTP'nin tanınmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. *E. coli* DNA pol I ve *Taq* DNA pol I enzimlerinde bu amino asite karşılık gelen noktada fenilalanin amino asiti vardır ve bu

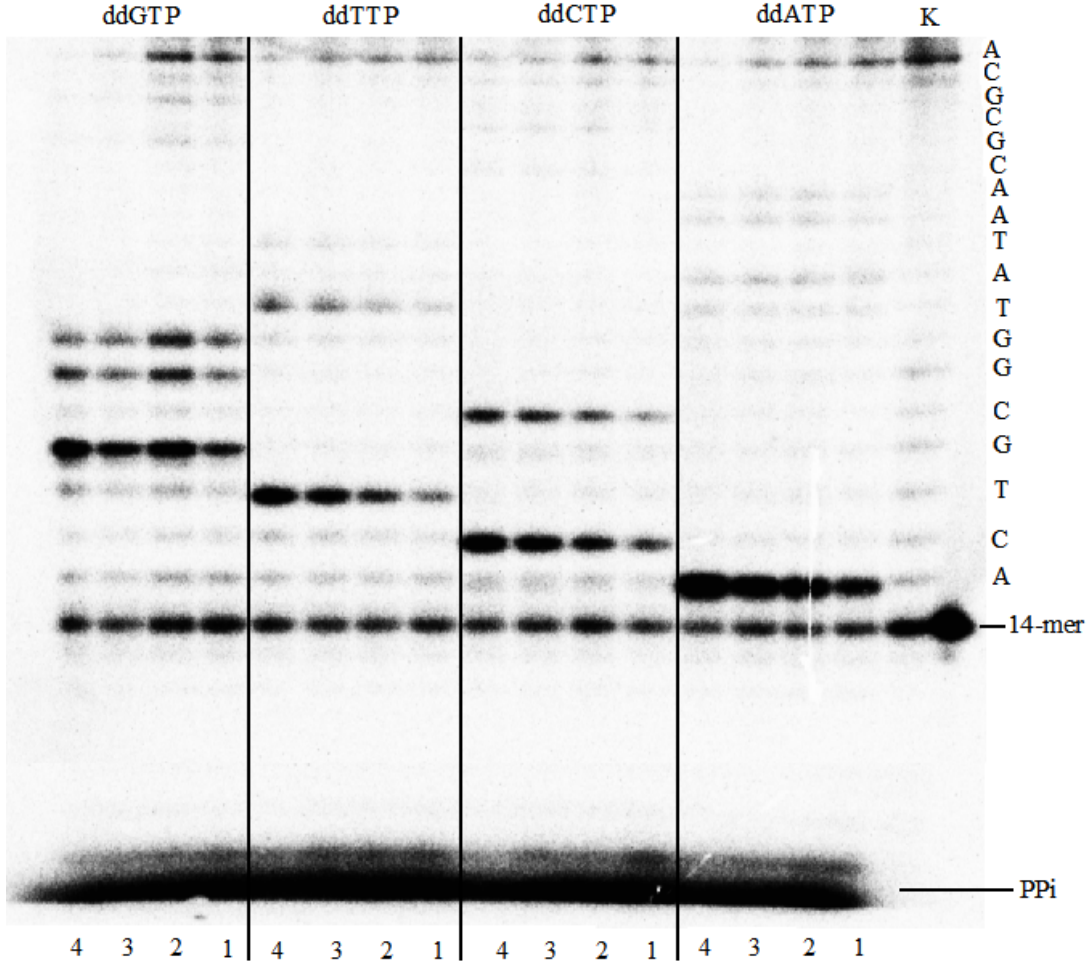
amino asit her iki enzimde de tirozin amino asitine dönüştürüldüğünde, *E. coli* DNA polimeraz I'in ddNTP'ye duyarlılığının 200 kat, *Taq* Pol I'in ise 8000 kat arttığı gösterilmiştir (Tabor ve Richardson, 1995). *Gca* TK4 pol I enziminde, T7 DNA polimeraz'da 576 nolu tirozin amino asite karşılık gelen noktada, 712 nolu fenilalanin amino asiti vardır ve bu amino asit tirozin amino asitine dönüştürülerek ddNTP'ye duyarlılık tekrar araştırıldı. Dört dNTP ve bir ddNTP'nin değişik derişimlerinde enzimin ortamda ilgili nükleotitin varlığında daima ddNTP nükleotitlerini tanıması dNTP'ye olan büyük ilginin mutasyon ile ddNTP'ye dönüştüğünü göstermiştir (Şekil 45).



Şekil 45. F712Y mutan *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin ddNTP ilgisinin üre-PAGE'de analizi. Reaksiyonlar 50 µM dNTP ve değişik derişimde ddNTP kullanılarak yapılmıştır: 1: 50 µM ddNTP, 2: 100 µM ddNTP, 3: 200 µM ddNTP, 4: 300 µM ddNTP, 5: 400 µM ddNTP ve 6: 500 µM ddNTP, K: kalıba ait sekans sırası

3.9.3. Sabit dNTP (120 µM) ve Düşük ddNTP Derişiminde Mutant Enzimin ddNTP'ye İlgisinin Araştırılması

dNTP'nin sabit derişimi (120 µM) ve ddNTP'nin düşük derişiminde (6 µM, 12 µM, 20 µM ve 40 µM) enzimin ddNTP'ye ilgisi ve bunun neticesinde sekans belirleme çalışmalarında kullanılabilirliği araştırıldı. Sonuçta dNTP'nin 120 µM olduğu şartlarda ddNTP'nin kullanılan dört farklı düşük derişiminde mutant enzimin ddNTP ile beraber dNTP'yi de tanıyabildiği gözlemlendi (Şekil 46). Sekans belirleme çalışmalarında 12 µM veya 20 µM ddNTP derişiminin uygun olduğu belirlendi.



Şekil 46. Sabit dNTP ve düşük ddNTP derişiminde ddNTP'ye ilginin üre-PAGE'de analizi. 1: 6 μ M ddNTP, 2: 12 μ M ddNTP, 3: 20 μ M ddNTP ve 4: 40 μ M ddNTP. K: kalıp zincire komplementer sıra

3.10. Enzime Ait Zincir Uzaklaştırma Aktivitesinin Araştırılması

DNA polimeraz I enzimleri *in vivo* şartlarda DNA replikasyonu esnasında okazaki fragmentlerinin uzaklaştırılmasından sorumludur ve bu aktiviteyi zincir uzaklaştırma fonksiyonu ile gerçekleştirir. Yapılan son çalışmalar *E. coli* DNA polimeraz I enziminde 771 numaralı fenilalanin amino asitinin bu aktivite üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermiştir. *Gca* TK4 DNA pol I enziminde bu amino asite karşılık gelen 721 numaralı amino asitin tirozin amino asiti olduğu gözlemlendi. *Gca* TK4 DNA pol I'in 721 numaralı tirozin amino asiti fenilalanine dönüştürülerek *Gca* TK4 DNA pol I'in zincir uzaklaştırma aktivitesi araştırıldı. *E. coli* DNA polimeraz I enzimi ise pozitif kontrol olarak kullanıldı.

4. TARTIŞMA

Doktora tez kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmanın tamamında, *Geobacillus calodoxylosilyticus* TK4 bakterisinin DNA polimeraz I enzimi üzerinde çalışılmıştır. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonunda, *E. coli* DNA polimeraz I, Klenow fragmenti, *Mycobacterium tuberculosis* DNA polimeraz I ve HIV-revers transkriptaz enzimleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Gca TK4 DNA polimeraz I'in korunmuş bölgesinden hareket ederek gene ait tüm nükleotit sırası belirlenmiştir. Bunun için ters PZR tekniği kullanılmış ve genin stop kodonu ile birlikte toplam 2637 baz çiftinden oluştuğu belirlenmiştir. *Bacillus* cinsine ait ait termofilik türlerin DNA polimeraz I genlerinin büyüklüğü çok az değişiklik gösterir. *Bacillus caldotenax* stop kodonu ile birlikte toplam 2634 nükleotitden oluşurken (Uemori vd., 19993), *Bacillus stearothermophilusta*'da 2631 nükleotitden oluşur (Riggs vd., 1996). Nükleotit sırası Expasy programından yararlanılarak amino asit sırasına dönüştürülüp BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki DNA polimerazlar ile karşılaştırıldığında, *Bacillus* türlerine ait DNA polimeraz I enzimlerine (*B. stearothermophilus*, *B. caldotenax*, *B. caldolyticus* ve *B. kaustophilus*) amino asit düzeyinde % 89 ve *Mtb* DNA pol I'e (*Mycobacterium tuberculosis*), *Taq* DNA pol I'e (*Thermus aquaticus*), *E. coli* DNA pol I'e sırası ile %59, %59, %57 oranlarında benzer olduğu gözlenmiştir.

Clustal W programı kullanılarak *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi, *E. coli*, *G. kaustophilus*, *G. stearothermophilus*, *M. tuberculosis* ve *T. aquaticus* DNA pol I enzimlerine ait amino asit sıraları ile karşılaştırıldı. Bu polimeraz I enzimlerinin tamamında özellikle 5' nükleaz aktivitesinden sorumlu amino asitlerin tamamı korunmuştur. 3'→5' ekzonükleaz aktivitesinden sorumlu bölgedeki korunmuş amino asitler yönünden 3'→5' bölge incelendiğinde, sadece *E. coli* DNA polimeraz I'in tüm korunmuş katalitik amino asitlere sahip olduğu belirlendi. *Mtb* DNA polimeraz I ise sadece *E. coli* DNA polimeraz I'in D355 nolu amino asitine karşılık gelen noktada aspartik asit amino asitini taşımakta iken diğer üç korunmuş amino asiti taşımamaktadır. Diğer dört *Bacillus*'a ait DNA polimeraz I enzimlerinin hiçbirisi bu dört korunmuş amino asitten herhangi birine sahip değildir. Buda *E. coli* DNA polimeraz I hariç diğer türlere ait DNA polimeraz I enzimlerinin neden çok yüksek 5' nükleaz aktivitesi gösterirken herhangi

bir 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi göstermemesine ışık tutmaktadır. 5'→3' polimeraz bölgedeki amino asitler tüm türler arasında yüksek oranda korumuştur.

DNA polimeraz I geninin tamamının pET15b'ye klonlanarak elde edilen rekombinant vektör, *E. coli* DL21(DE3) hücrelerine aktarıldı ve IPTG ile indüklenerek ekspresyon gözlemlendi. Ekspresyon ürününün *Gca* TK4 DNA polimeraz I olduğu ekspresyon bantı SDS-PAGE'den kesilip alındı ve kütle analizi ile doğrulandı. Enzim, ısı uygulaması, DEAE-selüloz ve BioRex 70 kromatografisi uygulaması ile saflaştırılarak karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlandı ve saflaştırma standart hale getirildi. Ekspres edilen proteinin aktif olduğu TCA deneyleri ile doğrulandı. Benzer şekilde mutant *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimleri hazırlanmıştır. *Mtb* DNA polimeraz I, afinity kromatografi ile (Cindy vd., 2002), *E. coli* DNA polimeraz I ve D424A mutant formu ile Klenow fragmenti ise amonyum sülfat ve Bio Rex 70 katyonik kromatografi ile (Joyce ve Victoria, 1995) hazırlandı. Her bir polimera için izlenen yol neticesinde yeterli miktarda enzim elde edilmiştir.

Gca TK4 DNA polimeraz I enziminin bazı amino asitlerinin fonksiyonunu aydınlatmak için enzim üzerinde F712Y ve Y721F mutasyonları yapıldı. *E. coli* DNA polimeraz I ise D424A mutasyonu ile 3'→5' ekzonükleaz negatif hale getirildi. Mutasyonlar dizin analizi ile doğrulandı ve sonrasında rekombinant enzimin eldesi için ekspresyon hücrelerine aktarıldı. Mutant enzimler, mutant olmayan orijinal formları ile karşılaştırılarak mutasyonların etkisi araştırıldı.

DNA polimeraz enzimleri aktivite gösterebilmek için Mg^{+2} iyonuna ihtiyaç duyarlar. Ancak Mn^{+2} iyonu ile de sentez aktivitesi gösterebilirler. Özellikle RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi gösterirken Mn^{+2} iyonunu daha çok tercih ederler. Ancak Mn^{+2} iyonu ile hata yapma oranı daha fazladır (Cadwell ve Joyce, 1992). *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi araştırılırken benzer bir sonuç elde edildi. Bu özelliğin araştırılmasında 32/14-RNA/DNA hibrit örneği kalıp olarak, HIV-RT pozitif kontrol ve *E. coli* Klenow fragmenti ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyonlar iki farklı metal iyon ile ayrı ayrı yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda DNA polimeraz I enzimlerinin Mn^{+2} iyonu ile daha yüksek sentez aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Harini vd., 2004). Deneylerin iki ayrı metal iyon ile yapılması neticesinde pozitif kontrol olarak kullanılan HIV-RT enziminin her iki metal iyon ile de yüksek oranda sentez aktivitesi gösterdiği ve 32-mer RNA kalıbı üzerinden DNA sentezlemeyi başarabildiği gözlemlendi. *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in ve Klenow fragmentinin ise Mg^{+2}

iyonu ile 5 kat ve 20 kat daha fazla reaksiyon süresi verilmesine rağmen etkili olarak iki nükleotiti ekleyebildiği gözlemlendi. Aynı reaksiyon Mn^{+2} ile yapıldığında ise her iki enzimin 32-mer RNA kalıbı üzerinde sentez aktivitesi göstererek DNA sentezi yapabildiği gösterildi. Dolayısı ile enzim DNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için Mg^{+2} metal iyonunu tercih ederken RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için Mn^{+2} metal iyonunu tercih etmektedir. Ayrıca monovalent iyonlar yönünden aktivite incelendiğinde bu iyonların aktivite üzerinde çok etkisinin olmadığı gözlemlendi.

Saf olarak elde edilen rekombinant *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında enzimin bazı biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Özellikle enzimin zincir uzaklaştırma ve ddNTP'ye olan ilgisi bu aktivitelerden sorumlu olduğu düşünülen Y721F (zincir uzaklaştırma) ve F712Y (ddNTP duyarlılığı) mutasyonları ile araştırıldı.

Enzimin en önemli fiziksel özelliği olarak optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve ısı kararlılığı incelendi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 30°C'den 70°C'ye kadar değişik sıcaklıklarda deneyler yapıldı ve en yüksek aktivite 55–60°C sıcaklıkta elde edildi. Isı kararlılığı için 55°C'den 85°C'ye kadar sıcaklıklarda 5 dakika bekletilerek buz üzerinde soğutulmuş enzim örnekleri kullanıldı. Özellikle bu enzim örnekleri ile üre-PAGE jel deneyleri yapıldığında 70°C sıcaklıkta enzimi 5 dakika bekletmenin aktivitesini ciddi oranda etkilediği sentez aktivitesi için daha fazla süreye ihtiyaç duyduğu gözlemlendi. Daha yüksek sıcaklıklar da ise aktivitenin tamamen inhibe edildiği gözlemlendi. Buna karşılık 60°C civarı sıcaklıklarda enzimin aktivitesini koruduğu belirlendi. Dolayısı ile rekombinant olarak elde edilen *Gca* TK4 DNA polimeraz I ile, bu enzimin elde edildiği *G. caldxylosilyticus* TK4 bakterisinin yaşama sıcaklığından (optimum 55–60°C civarı) farksız olduğu gözlemlendi. Belirlenen bu değerler derler diğer *Bacillus* türleri ile benzerlik göstermektedir (Uemori vd., 1993; Riggs vd., 1996).

DNA polimeraz I enzimlerinin *in vitro* şartlarda son nükleotiti ekleme özellikleri birbirinden farklıdır. *E. coli* DNA polimeraz I enzimi son nükleotiti etkili bir şekilde eklerken, *Taq* DNA polimeraz I enzimi son nükleotide ilaveten fazladan bir nükleotit daha ekleyebilmektedir. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin bu özelliği 15A/14 (kalıba ait son nükleotit eşleşmemiş dATP nükleotitidir ve enzim sentez aktivitesi ile dTTP ekleyebilir) ve 16AA/14 (kalıba ait son iki nükleotit eşleşmemiş dATP nükleotitidir ve enzim sentez aktivitesi ile iki dTTP nükleotitini peşpeşe ekleyebilir) sentetik DNA'lar kullanılarak incelendi. Reaksiyonlar hem dTTP hem de DIG-dUTP ile ayrı ayrı yapıldı.

Kontrol olarak *E. coli* Klenow fragmenti ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanıldı. dTTP ile yapılan deneylerde *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimin her iki DNA örneği ile de aktivite gösterdiği ve etkili bir şekilde son nükleotitleri ekleyebildiği gözlemlendi. Benzer sonuç *E. coli* Klenow fragmenti ile de elde edildi. Ancak *Mtb* DNA polimeraz I enzimin tek eşleşmemiş nükleotitin varlığında aktivite gösteremediği ancak iki adet eşleşmemiş nükleotitin varlığında ise çok azda olsa aktivite gösterebildiği belirlendi. Aynı deney DIG-dUTP ile yapıldığında ise *Gca* TK4 DNA polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I Klenow fragmenti için tamamen aynı sonuç elde edildi. Ancak aynı reaksiyon şartları altında *Mtb* DNA polimeraz I'in DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanamadığı ve sentez yapamadığı belirlendi. 16/14 sentetik DNA substratı ile yapılan zincir uzatma deneyinde *Gca* TK4 DNA polimeraz I ve *E. coli* DNA polimeraz I Klenow fragmentinin polimeraz aktivitesi ile peş peşe DIG-dUTP ekleyerek zincirin uzamasını gerçekleştirebildiği belirlendi. Bu özelliği yönünden *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimi primerlerin 3' uçlarının işaretlenmesinde kullanılabilir. Özellikle 32/14 sentetik DNA ile yapılan deney sonucu enzimin DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullandığı ve uzayan zincirin iç kısımlarına ekleyebildiği gözlemlendi. Bu özelliği sayesinde primerlerin veya DNA fragmentlerinin iç kısımlarının (yeni sentezlenen zincirin orta bölgesinde dATP'ye karşılık gelen kısımların) işaretlenmesinde kullanılabilir.

Enzimin özgül aktivitesi ³HdTTP eklenmesine bağlı olarak scintillation aletinde belirlendi ve enzimin özgül aktivitesinin 495,000 ünite/mg olduğu belirlendi. Özgül aktivite değeri *E. coli* DNA polimeraz I Klenow fragmenti için 280,000 ünite/mg, *Bst* büyük fragmenti için 490,000 ünite/mg, *Taq* DNA polimeraz I için 490,000 ünite/mg (James, vd., 1996) ve *Mtb* DNA polimeraz I için ise 72,000 ünite/mg'dır (Cindy vd., 2002). Bu sonuç, *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin özgül aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Rekombinant enzimin kinetik değerlerinin ve optimum DNA bağlama (K_D) değerinin belirlenmesi için 1 nM DNA derişiminde, değişik enzim derişimleri kullanıldı ve bu değer 0,192 nM (+/-0.37) olduğu belirlendi. Bu değer *Mtb* DNA polimeraz I için 0,15 nM ve *E. coli* Klenow fragmenti için 0,14 nM'dır (Cindy vd., 2002). *Gca* TK4 DNA polimeraz I enzimine ait bu değer diğer enzimlerden az daha yüksek olması enzimin ideal DNA'ya bağlanabilmesi için diğerlerinden daha çok DNA'ya ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. 0,192 nM DNA derişiminde en etkili bir şekilde DNA'ya bağlanmanın gerçekleştiği ve daha yüksek DNA derişiminin bağlanma üzerine etkili olmadığı belirlendi.

K_D^{dNTP} ve K_{pol} değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar neticesinde K_D^{dNTP} değeri 21,64 μM olarak belirlendi. Bu değer maksimum dNTP bağlanma derişimine eşittir. Aynı şekilde K_{pol} değeri hesaplandığında, bu değer 24,99 s^{-1} olarak belirlendi. Dolayısı ile enzim saniyede 24,99 nükleotit (dakikada 1499 nükleotit) ekleyebilme özelliğine sahiptir.

DNA polimeraz I enzimlerinin tek bir polipeptit üzerinde enzimatik yönden üç farklı aktivite göstermesinden dolayı ve herbir aktivitesinin enzim üzerinde farklı bir bölgesinde yer alması, bu tür enzimlerin bu yönleri ile de karakterize edilmesini gerektirir. Bunlardan bir tanesi 5'→3' nükleaz aktivitesidir. Enzim bu katalitik özelliği ile DNA örneğindeki 5' eşleşmemiş nükleotitleri uzaklaştırır. Amino asit sekans benzerlikleri araştırılığında *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin, *E. coli* DNA polimeraz I enziminin 5' nükleaz aktivitesinden sorumlu olan tüm korunmuş amino asitlerine sahip olduğu gözlendi (Yang vd., 2001). Enzime ait bu özellik 38/14/14 bloklayıcı DNA ve 42/14/18 flap DNA kullanılarak araştırıldığında enzimin etkin bir şekilde 5' nükleaz aktivitesi gösterdiği ve bu değer (K_D) 2,35 nM olduğu belirlendi. Overhang DNA örnekleri ile yapılan kesim deneylerinde ise enzimin öncelikle sarkık kısmı kestiği ve bununla beraber sarkık kısmın olduğu noktada eşleşmiş iki nükleotitin arasından da kesim yapabildiği gözlendi. Primere ait 3' uçta eşleşmemiş nükleotitin ise aktivite üzerine önemli bir etkisi olmadığı gözlendi. Enzimin DNA üzerinde kendisi için substrat olan DNA kısmına bağlanma ilgisi 2,35 μM olarak hesaplandı.

DNA polimeraz I enzimleri, N uçta 5' nükleaz aktivitesinden sorumlu bölge ile C uçta polimeraz aktiviteden sorumlu kısım arasında 3'→5' ekzonükleaz bölgesine sahiptir. Polimeraz enzimleri bu özelliği ile kalıp/primer DNA kompleksinde primere ait 3' uçta eşleşmemiş nükleotitin uzaklaştırılmasını katalizler. Primere ait 3' uçta eşleşmemiş nükleotitin varlığı sentezin sonlanmasına neden olur ve uzaklaştırılmadığı müddetçe sentez devam etmez. Ayrıca enzim bu bölgesi ile birlikte tek zincir DNA üzerinden de 3'→5' yönünde nükleotitlerin uzaklaştırılmasını katalizler. *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin bu özelliği hem primere ait 3' uçta eşleşmemiş baz içeren çift zincir DNA ile hem de tek zincir DNA ile araştırıldığında enzimin, herhangi bir 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı gözlendi. Aminosit sırası incelendiğinde tüm polimeraz enzimlerinin orta kısmında 3'→5' ekzonükleaz bölge yer almaktadır, ancak her polimerazda bu bölge aktif değildir. Bunun nedeni araştırıldığında *E. coli* DNA polimeraz I'de bu bölgesinde yer alan dört adet korunmuş amino asitin (D355, E357, D424 ve D501) bu aktivite için hayati öneme sahip olduğu ortaya çıktı. Bu amino asitlerden herhangi birinde oluşacak mutasyon

bu aktivitenin tamamen kaybolmasına neden olmaktadır (Derbyshire vd., 1995). *Gca* TK4 DNA polimeraz I ise, bu korunmuş amino asitlerden sadece bir tanesine sahiptir (E323). Diğer korunmuş amino asitlere sahip olmamasından dolayı bu aktivite ile ilgili bölgesine sahip olmasına rağmen fonksiyonel olarak bu aktiviteyi göstermemektedir.

DNA polimeraz enzimleri arasında ddNTP'ye olan ilgide farklılıklar vardır. Örneğin *Mtb* DNA polimeraz I enziminin ddNTP'ye karşı ilgisi çok fazladır ve aynı reaksiyon ortamında dNTP veya ddNTP olduğu durumlarda ddNTP'yi çok etkili bir şekilde tanıyıp kalıba uygun olarak eklemektedir (Cindy vd., 2001). *Gca* TK4 DNA polimeraz I enziminin ddNTP'ye duyarlılığı iki farklı şekilde araştırıldı ve her iki durumda da enzimin ddNTP'ye ilgisinin çok zayıf olduğu belirlendi (Şekil 40 ve 41). Özellikle ddNTP'nin dNTP'den 14 kat kadar daha fazla kullanılmasına rağmen enzimin yine de dNTP'yi tanıyıp eklemesi ilgisinin dNTP yönünde olduğunu göstermiştir. T7 DNA polimeraz I ile yapılan çalışmalar, T7 DNA polimeraz enziminin 526 numaralı tirozin aminositinin ddNTP'nin tanınmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir. *E. coli* DNA pol I ve *Taq* DNA pol I enzimlerinde bu amino asite karşılık gelen noktada fenilalanin amino asiti vardır. Bu amino asit tirozin amino asitine dönüştürüldüğünde *E. coli* DNA polimeraz I ve *Taq* polimeraz I'in ddNTP duyarlılığının sırası ile 200 kat ve 8000 kat arttığı gözlenmiştir (Tabor ve Richardson, 1995). *Gca* TK4 pol I enziminde de aynı noktada 712 numaralı fenilalanin amino asiti tirozin amino asitine dönüştürülerek ddNTP'ye duyarlılık tekrar araştırıldığında dört dNTP ve bir ddNTP'nin değişik derişimlerinde enzimin ortamda ilgili nükleotitin varlığında dahi daima ddNTP nükleotitlerini tanıyıp sentez reaksiyonunda kullanması, dNTP'ye olan büyük ilginin mutasyon ile ddNTP'ye dönüştüğünü göstermiştir. Dolayısı ile enzim üzerindeki bu amino asitin dNTP ve ddNTP arasındaki ayırımından sorumlu olduğu söylenebilir.

Hata yapma oranı DNA polimeraz enzimleri için önemli bir kriterdir. Bu özellik DNA polimeraz familyaları içinde %100'den 10.000.000 milyonda 1'e kadar değişim göstermektedir (Thomas, 2004). *Gca* TK4 DNA polimeraz I için bu değer 60°C'de araştırıldığında 40,000 nükleotitte 1 nükleotit olarak belirlendi. Aynı reaksiyon 37°C'de yapıldığında ise hata oranının çok çok daha az olduğu belirlendi. Bu da sıcaklığın DNA polimeraz enzimlerinin fidelitesi üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Fideliti *E. coli* Klenow fragmenti ve *Mtb* DNA polimeraz I kullanılarak araştırıldığında ise 60°C'de *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in hata oranının *E. coli* DNA polimeraz I'e benzer olduğu, 37°C'de ise *Mtb* DNA polimeraz I'e benzer olduğu gözlemlendi.

DNA polimeraz I enzimleri *in vivo* şartlarda DNA replikasyonu esnasında Okazaki fragmentlerinin uzaklaştırılmasından sorumludur ve bu aktiviteyi zincir uzaklaştırma fonksiyonu ile gerçekleştirirler. *E. coli* DNA polimeraz I enziminde 771 numaralı fenilalanin amino asitinin bu aktivite üzerinde önemli etkisi olduğu gösterilmiştir (Kamalendra vd., 2007). *Gca* TK4 DNA pol I enziminde bu amino asite karşılık gelen 721 numaralı amino asitin tirozin amino asitine dönüştürülerek *Gca* TK4 DNA pol I'in zincir uzaklaştırma aktivitesi araştırıldı. *E. coli* DNA polimeraz I enzimi ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu özellik hem sarkık uç taşıyan DNA hem de bloklayıcı DNA kullanılarak yapıldığında *Gca* TK4 DNA pol I enziminin zincir uzaklaştırma aktivitesine sahip olduğu ve mutasyon neticesinde ise bu aktivitenin daha da arttığı gözlemlendi.

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan klonlanıp *E. coli*'de ekspres edilen DNA polimeraz I enziminin, DNA polimeraz I enzimlerinin genel özelliklerini paylaştığı belirlenmiştir. Diğer *Bacillus* DNA polimeraz enzimleri ile benzer ısı kararlılığı göstermiştir. 70°C ve üzeri sıcaklıklarda kararlılığını kaybetmesi PZR uygulamalarında kullanılabilirliğinin olmadığını göstermiştir. Ancak F712Y mutasyonlu *Gca* TK4 DNA polimeraz I'in ddNTP ilgisi arttığından manuel sekanslama çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanmasını ve son nükleotiti ekleyebilme özelliğinden dolayı özellikle primere ait 3' ucun DIG-dUTP veya diğer işaretli nükleotitlerle işaretlenmesinde kullanılabilir.

5. SONUÇLAR

Doktora tezi olarak hazırlanan ‘termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TT4 suşundan DNA polimeraz I’in klonlanması ve karakterizasyonu’ başlıklı çalışmasından şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. *Gca* TK4 bakterisinin DNA polimeraz I genine ait tüm nükleotit sırası belirlendi.
2. DNA polimeraz I geni pET-15b ekspresyon vektörüne klonlanarak T7 promotorunun altında ekspres edilerek proteine dönüştürüldü.
3. Rekombinant protein ısı uygulaması ve kromatografi yöntemleri ile saflaştırıldı, Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 55–60°C civarı, optimum metal iyonunun ise Mg^{+2} (7 mM) iyonu olduğu, 70°C ve üzeri sıcaklıklarda ise aktivitesini kaybettiği belirlendi.
4. DNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi için özgül aktivitesi 495,000 ünite/mg olarak belirlendi.
5. Enzim, DIG-dUTP ile DNA sentezi yapabilmekte ve kalıp DNA’ya son nükleotiti ekleyebilmektedir.
6. Mg^{+2} iyonu kullanıldığında enzimin, RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesi göstermekte, ancak Mn^{+2} iyonu kullanıldığında RNA kalıbı üzerinden DNA sentezi yapabilmektedir.
7. Enzimin herhangi bir 3’→5’ ekzonükleaz aktivitesi belirlenmemiştir.
8. 5’ nükleaz aktivite için tüm korunmuş amino asitlere sahiptir ve özellikle 5’ sarkık ucun kesimini katalizlemektedir. Bununla beraber sarkık ucun olduğu kısımda eşleşmiş iki nükleotit arasından da kesim yapabilmektedir.
9. ddNTP’ye ilgisinin ortamda aynı ddNTP’nin dNTP formu olduğunda çok az olduğu ancak ortamda ddNTP’nin dNTP formu yoksa ilginin ddNTP’ye çok fazla olduğu belirlendi. 712 numaralı fenialanin amino asitinin tirozine mutasyonu ile elde edilen mutant enzimde ise dNTP’ye olan ilginin dNTP’den tamamen ddNTP’ye dönüştüğü belirlendi.
10. F712Y mutasyonu ile ddNTP’ye ilgili hale getirilen enzimin sekans belirleme çalışmalarında kullanılabilmesi için 5’ nükleaz dömeinin tamamen uzaklaştırılması gerektiği veya mutasyonla bu bölgenin aktivitesinin ortadan kaldırılması gerektiği belirlendi.

11. Yaban tip enzimin zincir uzaklaştırma aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Özellikle 2007 yılında (Kamalendra vd. 2007) tanımlanan ve *E.coli*' den zincir değiştirme aktivitesinde sorumlu olduğu belirlenen 721 numaralı tirozin amino asiti fenilalanine dönüştürölünce elde edilen mutant enziminin bu aktiviteyi daha etkili gerçekleştirdiği belirlendi.

6. ÖNERİLER

20. yüzyılın ikinci yarısında özellikle moleküler tekniklerdeki ilerlemeye paralel olarak enzimlere ait özelliklerin belirlenmesinde de artış olmuş ve enzimler çok yönlü olarak incelenmişlerdir. Hem tanımlanan enzim sayısı ve çeşidinde artış olmuş, hem de günlük hayatta uygulama alanlarında artış olmuştur. Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler neticesinde hergün değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilaveten, var olan enzimlerin birçok yeni özellikleri ortaya çıkarılmaktadır. Bu enzimlerin en önemlilerinden biri olan termofilik DNA polimeraz enzimleri, moleküler alandaki ilerlemelere hız katmıştır. Bu çalışma, yeni bir tür olan *Geobacillus caldxylosilyticus*'ün (*Gca* TK4) TK4 suşunun DNA polimeraz I geninin bir vektöre klonlanıp *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmesi açısından önem arz etmektedir. İzlenen yol enzim üretimini daha kolay hale getirmiştir. Çünkü bu şekilde gen indüklenebilir bir promotörün altında olduğundan kolayca ekspres edilip, gen ürünü saf halde elde edilebilmektedir.

Termofilik DNA polimerazlar özellikle *in vitro* şartlarda DNA'nın kısmı olarak çoğaltılması ve DNA'nın sekans analizi için önemlidir. Termofilik olmayan diğer DNA polimeraz I enzimleri PZR reaksiyonlarında gen çoğaltmak amacı ile kullanılamaz ise de sekans belirleme çalışmalarında kullanılırlar. Dolayısı ile *Gca* TK4 suşundan izole edilen DNA polimeraz I enzimi *in vitro* manuel sekans çalışmalarında kullanılma potansiyeline.

Hibridizasyon çalışmalarında prob işaretlenmektedir ve probun iyi işaretlenmesi hibridizasyon çalışmalarında güzel sonuç almak açısından önem arz etmektedir. *Gca* TK4 suşundan izole edilen DNA polimeraz I enziminin DIG-dUTP'yi normal dNTP gibi kullanarak DNA üzerinden sentez yapabilmesi ve özellikle de son nükleotiti ekleyebilmesi prob işaretlemek için uygun bir enzim olduğunu göstermiştir.

Ayrıca yeni mutasyonlar ile enzimin sekans çalışmalarında kullanılışlığı daha ileri düzeyde araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Aliotta, J.M., Pelletier, J.J., Ware, J.L., Moran, L.S., Benner, J.S. and Kong, H., 1996. Thermostable Bst DNA Polymerase I Lacks a 3'-5' Proofreading Exonuclease Activity, Genet. Anal., 12, 185-195.
- Andrea H.P., Michael, E.D., Stephen, J.B., Nigel, D.F.G. and Catherine, M.J., 1992. Side Chains Involved in Catalysis of the Polymerase Reaction of DNA Polymerase I from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 267, 8417-8428.
- Andrea H.P., Thomas, A.S., Nigel, D.F.G. and Catherine M.J., 1990. Identification of Residues Critical for the Polymerase Activity of the Klenow Fragment of DNA Polymerase I from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 265, 14579-14591.
- Astatke, M., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M., 1995. Deoxynucleoside Triphosphate and Pyrophosphate Binding Sites in the Catalytically Component Ternary Complex for the Polymerase Reaction Catalyzed by DNA Polymerase I (Klenow Fragment), J. Biol. Chem., 270, 1945-1954.
- Atkinson, M.R., Deutscher, M.P., Kornberg, A., Russell, A.F. and Moffatt, J.G., 1969. Enzymic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXXIV. Termination of Chain Growth by a 2',3'-dideoxyribonucleotide, Biochemistry, 8, 4897-4904.
- Barnes, M.H., Spacciapoli, P., Li, D.H. and Brown, N.C., 1995. The 3'-5' exonuclease site of DNA Polymerase III from Gram Positive Bacteria: Definition of a Novel Motif Structure, Gene, 165, 45-50.
- Beard, W.A. and Wilson, S.H., 2001. DNA Lesion Bypass Polymerases Open Up, Structure, 9, 759-764.
- Beckman, R.A. and Loeb, L.A., 1993. Multi-stage Proofreading in DNA Replication, Quart. Rev. Biophys., 26, 225-331.
- Beese, L.S., Friedman, J.M. and Steitz, T.A., 1993. Crystal Structures of the Klenow Fragment of DNA Polymerase I Complexed with Deoxynucleoside Triphosphate and Pyrophosphate, Biochemistry, 32, 14095-14101.
- Belduz, A.O, Dulger, S. and Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1315-1320.
- Bhagwat, M., Hobbs, L.J. and Nossal, N.G., 1997. The 5'-Exonuclease Activity of Bacteriophage T4 RNase H Is Stimulated by the T4 Gene 32 Single-stranded DNA-Binding Protein, but Its Flap Endonuclease is Inhibited, J. Biol. Chem., 272, 28523-28530.

- Bost, D., Stoffel, S., Landre, P., Lawyer, F., Akers, J., Abramson, R. and Gelfand, D., 1994. Enzymatic Characterization of *Thermotoga maritima* DNA Polymerase and a Truncated Form, Ultra DNA Polymerase, FASEB J., A1395.
- Boyer, P.L., Tantillo, C., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Ding, J., Arnold, E. and Hughes, S.H., 1994. Sensitivity of Wild-Type Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase to Dideoxynucleotides Depends on Template Length; the Sensitivity of Drug-Resistant Mutants Does Not, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4882-4886.
- Brandis, J.W., Edwards, S.G. and Johnson, K.A., 1996. Slow Rate of Phosphodiester Bond Formation Accounts for the Strong Bias That *Taq* DNA Polymerase Shows Against 2',3'-dideoxynucleotide Terminators, Biochemistry, 35, 2189-2200.
- Braithwaite, D.K. and J. Ito., 1993. Compilation, Alignment, and Phylogenetic Relationships of DNA Polymerases, Nucleic Acids Res., 21, 787-802.
- Brock, T.D., 1986. Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, John Wiley and Sons, New York, 1-16.
- Bryant, F.R., Johnson, K.A. and Benkovic, S.J., 1983. Elementary Steps in the DNA Polymerase I Reaction Pathway, Biochemistry, 22, 3537-3546.
- Cadwell, R.C. and Joyce, G.F., 1992. Randomization of Genes by PZR Mutagenesis, PZR Methods Appl., 2, 28-33.
- Canakci, S., Belduz, A.O., Saha, B.C., Yasar, A., Ayaz, F.A. and Yayli, N., 2007. Purification and characterization of a highly thermostable alpha-L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4, Appl. Microbiol. Biotechnol., inpress.
- Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. and Ishino, Y., 1998. A Heterodimeric DNA Polymerase: Evidence That Members of Euryarchaeota Possess a Distinct DNA Polymerase, Proc. Natl Acad. Sci. USA., 95, 1425-14255.
- Cann, I.K. and Y, Ishino., 1999. Archaeal DNA Replication: Identifying the Pieces to Solve a Puzzle, Genetics, 152, 1249-1267.
- Chen, C. and Cheng, Y., 1992, The Role of Cytoplasmic Deoxycytidine Kinase in the Mitochondrial Effects of the Anti-Human Immunodeficiency Virus Compound, 2',3'-Dideoxycytidine, J. Biol. Chem., 267, 2856-2859.
- Chien, A., Edgar, D. and Trela, J., 1976. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophilic *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 127, 1550-1557.
- Cline, J., Braman, J. and Hogrefe, H., 1996. PZR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other DNA Polymerases, Nucleic Acids Res., 24, 3546-3551.

- Cindy, J.A., Kamalendra S. and Mukund J.M., 2002. DNA Polymerase I of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Biol. Chem., 277, 1653–1661.
- Colak, A., Sisik, D., Saglam, N., Guner, S., Canakci, S. and Belduz, A.O., 2005. Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2, Bioresour Technol., 96, 625-31.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, S., Squares, S., Sqaes, R., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G., 1998. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence, Nature, 393, 537-544.
- Dana, T.M., Mekbib A., Catherine M.J., and Thomas A.K., 1996. A Thumb Subdomain Mutant of the Large Fragment of *Escherichia coli* DNA Polymerase I with Reduced DNA Binding Affinity, Processivity and Frameshift Fidelity, J. Biol. Chem., 271, 24954–24961.
- Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J. and Swanson, R.V., 1998. The Complete Genome of the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*, Nature, 392, 353-358.
- Derbyshire, V., Pinsonneault, J.K., and Joyce, C.M., 1995. Structure-Function Analysis of 3'→5' Exonuclease of DNA Polymerases, Methods Enzymol., 262, 363-385.
- Demirijan, D., Moris-Varas, F. and Cassidy, C., 2001. Enzymes from Extremophiles, Curr. Opin. Chem. Boil., 5, 144–151.
- Doublet, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C. and Ellenberger, T., 1998. Crystal Structure of a Bacteriophage T7 DNA Replication Complex at 2.2 Å Resolution, Nature, 391, 251-258.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dulger, S., Demirbag, Z. and Belduz, A.O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1499-1503.
- Engelke, D.R., Krikos, A., Bruck, M.E. and Ginsburg, D., 1990. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*, Anal. Biochem., 91, 396-400.
- Erlich, H., Gelfand, D. and Saiki, R., 1988. Specific DNA Amplification Product Review, Nature, 33, 461–462.

- Everly, C. and Alberto, J., 2000. Stressors, Stress and Survival: Overview, Front. Biosci., 5, 780–786.
- Fatih, Ş.B., 2007. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Alüminyum Dirençlilik Geninin Belirlenmesi, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Frey, B. and Suppmann, B., 1995. Demonstration of the Expand PZR System's Greater Fidelity and Higher Yields with a LacI-Based Fidelity Assay, Biochemica, 2, 34–35.
- Friedberg, E.C., Fischhaber, P.L. and Kisker, C., 2001. Error-Prone DNA Polymerases Novel Structures and the Benefits of Infidelity, Cell, 107, 9–12.
- Friedberg, E.C., Wagner, R. and Radman, M., 2002. Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations, Science, 296, 1627–1630.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Pedersen, L., 2004. A Structural Solution for the DNA Polymerase λ -Dependent Repair of DNA Gaps with Minimal Homology, Mol. Cell, 13, 561–572.
- Goodman, M.F., 2002. Error-Prone DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes, Annu. Rev. Biochem., 71, 17–50.
- Gueguen, Y., Rolland, J.I., Lecompte, O., Azam, P., Romancer, G.L., Flament, D., Raffin, J.P. and Dietrich, J., 2001. Characterization of two DNA Polymerases from the Hyperthermophilic Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*, Eur. J. Biochem., 268, 5961–5969.
- Gutman, P.D., Fuchs, P., Ouyang, L. and Minton, K.W., 1993. Identification, Sequencing, and Targeted Mutagenesis of a DNA Polymerase Gene Required for the Extreme Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*, J. Bacteriol., 175, 3581–3590.
- Gutman, P.D. and Minton, K.W., 1993. Conserved Sites in the 5'-3' Exonuclease Domain of *Escherichia coli* DNA Polymerase, Nucleic Acids Res. 21, 4406–4407.
- Harini, S., Kate, G., Elizabeth, K.F., Mekbib, A., Po-Jen S., Jun, E.L., Gary, F.G., Moreland, D.G. and Peter, L.B., 2004. Thermophilic Bacterial DNA polymerases with Reverse-transcriptase Activity, Extremophiles, 8, 243–251.
- Harrington, J.J., and Lieber, M.R., 1994. The Characterization of a Mammalian DNA Structure-Specific Endonuclease, EMBO J. 13, 1235–1246.
- Helena, I.M.B., Michael, B.R., Clifton, E.B., and Valerie, M., 2003. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Cell, 113, 183–193.
- Herbert, R. and Sharp, R., 1992. Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles, Chapman and Hall, NY.

- Hopfner, K., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. and Angerer, B., 1999. Crystal Structure of a Thermostable Type B DNA Polymerase from *Thermococcus gorgonarius*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 3600–3605.
- Huang, Y., Braithwaite, D.K. and Ito, J., 1997. Evolution of dnaQ, the Gene Encoding the Editing 3' to 5' Exonuclease Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme in Gram-Negative Bacteria, FEBS Lett., 400, 94-98.
- Huber, H. and Stetter, K., 1998. Hyperthermophiles and Their Possible Potential in Biotechnology, J. Biotechnol., 64, 39–52.
- Hubscher, U., Maga, G. and Spadari, S., 2002. Eukaryotic DNA Polymerases, Annu Rev Biochem., 71, 133–163.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. and Brow, M.A.D., 1988. DNA Sequencing with *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 9436-9440.
- Ito, J. and Braithwaite, D. K., 1991. Compilation and Alignment of DNA Polymerase Sequences, Nucleic Acids Res., 19, 4045-405.
- Ito, J. and Braithwaite, D.K., 1998. RNase T is Related to dnaQ and Family C DNA Polymerases, Mol. Microbiol., 27, 235-236.
- Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., Molyneaux, S.J. and Langworthy, T.A., 1992. Comparative Physiological Studies on Hyperthermophilic Archaea Isolated from Deep-Sea Hot Vents with Emphasis on *Pyrococcus* Strain GB-D, Appl. Env. Microbiol., 58, 3472-3481.
- James, R.K., Chen, M., Connie, J.H., Scott, L.B., Holly, H.H., Jeffrey, C.B. and Lorena, S.B., 1997. Crystal Structure of a Thermostable *Bacillus* DNA Polymerase I Large Fragment at 2.1 Å Resolution, Structure, 5, 95-108.
- Jones, M. and Foulkes, N., 1989. Reverse Transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, Nucleic Acids Res., 17, 8387–8388.
- Joyce, C.M., Kelley, W.S. and Grindley, N.D., 1982. Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* polA Gene and Primary Structure of DNA Polymerase I, J. Biol. Chem., 257, 1958-1964.
- Jung, S.E., Choi, J.J., Kim, H.K. and Kwon, S.T., 1997. Cloning and Analysis of the DNA Polymerase-Encoding Gene from *Thermus filiformis*, Mol. Cells, 7, 769-776.
- Kahler, M. and Antranikian, G., 2000. Cloning and Characterization of a Family B DNA Polymerase from the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*, J. Bacteriol., 182, 655-663.

- Kaledin, A., Sliusarenko, A. and Gorodetski, S., 1980. Isolation and Properties of DNA Polymerase from Extreme Thermophilic Bacteria *Thermus aquaticus* YT-1, Biochimica, 45, 644–651.
- Kamalendra S., Aashish S., Smita S.P. and Mukund J.M., 2007. Participation of Fingers Subdomain of *E. coli* DNA Polymerase I in The Strand Displacement Synthesis of DNA, J. Biol. Chem., 282, 10594-10604.
- Kamalendra S. and Mukund J.M., 2003. Presence of 18-Å Long Hydrogen Bond Track in the Active Site of *Escherichia coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment), J. Biol. Chem., 278, 11289-11302.
- Kaushik, N., Pandey, V.N. and Modak, M.J., 1996. Significance of the O-Helix Residues of *Escherichia coli* DNA Polymerase I in DNA Synthesis: Dynamics of the dNTP Binding Pocket, Biochemistry, 35, 7256-7266.
- Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. and Beese, L. S., 1998. Visualizing DNA Replication in a Catalytically Active Bacillus DNA Polymerase Crystal, Nature, 391, 304-307.
- Kool, E.T., 2002. Active Site Tightness and Substrate Fit in DNA Replication, Annu. Rev. Biochem., 71, 191–219.
- Kong, H., Kucera, R.B., and Jack, W.E., 1993. Characterization of a DNA Polymerase from the Hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA Polymerase, Steady State Kinetics, Thermal Stability, Processivity, Strand Displacement, and Exonuclease Activities, J. Biol. Chem., 268, 1965-1975.
- Kornberg, A. ve Baker, T., 1992. DNA Replication, 2nd edit., W.H. Freeman and Co., New York.
- Kostichka, A.J., Luckey, J.M., John A., Mead, D.A., Smith, L.M. and Witney F.R., 1991. *Bst* DNA Polymerase Permits Rapid Sequence Analysis from Nanogram Amounts of Template, BioTechniques, 11, 76-87.
- Kuchta, R.D., Benkovic, P. and Benkovic, S.J., 1988. Kinetic Mechanism Whereby DNA Polymerase I (Klenow) Replicates DNA with High Fidelity, Biochemistry, 27, 6716-6725.
- Kumar, S. and Nussinov, R., 2001. How do Thermophilic proteins Deal with Heat? A Review, Cell. Mol. Life Sci., 58, 1216-1233.
- Kunkel, T.A., Pavlov, Y.I. and Benenek, K., 2003. Functions of Human DNA Polymerases η , κ , and ι Suggested by Their Properties, Including Fidelity with Undamaged DNA Templates, DNA Repair, 2, 135-149.
- Kunkel, T.A., 2004. DNA Replication Fidelity, J. Bio. Chem., 279. 16895-16898.

- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F. and Danchin, A., 1997. The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus subtilis*, Nature, 390, 249-256.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D.H., 1989. Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the DNA Polymerase Gene from *Thermus aquaticus*, J. Biol. Chem., 264, 6427-6437.
- Livneh, Z., 2001. DNA Damage Control by Novel DNA Polymerases: Translesion Replication and Mutagenesis, J. Biol. Chem., 276, 25639-25642.
- Li, Y., Korolev, S. and Waksman, G., 1998. Crystal Structures of Open and Closed Forms of Binary and Ternary Complexes of the Large Fragment of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase I: Structural Basis for Nucleotide Incorporation, EMBO J., 17, 7514-7525.
- Loeb, L.A. and Kunkel, T.A., 1982. Fidelity of DNA Synthesis, Annu. Rev. Biochem., 51, 429-457.
- Lopez, G., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: a Clue to Early Diversification of Life, J. Mol. Evol., 46, 439-452.
- Lu, Y.Y., Ye, S.Y. and Hong, G.F., 1991. Large Fragment of DNA Polymerase I from *Bacillus stearothermophilus* (Bst polymerase) is Stable at Ambient Temperature. BioTechniques, 11, 464-466.
- Lundberg, K., Shoemaker, D., Adams, M., Short, J., Sorge, J. and Marthur, E., 1991. High-Fidelity Amplification using a Thermostable Polymerase Isolated from *Pyrococcus furiosus*, Gene, 108, 1-6.
- Lyamichev, V., Brow, M.A.D. and Dahlberg, J.E., 1993. Structure-Specific Endonucleolytic Cleavage of Nucleic Acids by Eubacterial DNA Polymerases, Science, 260, 778-783.
- Lyamichev, V., Brow, M.A.D., Varvel, V.E., and Dahlberg, J.E., 1999. Comparison of the 5' Nuclease Activities of *Taq* DNA Polymerase and its Isolated Nuclease Domain, Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 6143-6148.
- Ohmori, H, Friedberg, E.C, Fuchs, R.P, Goodman, M.F, Hanaoka, F, Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C. and Wang, Z., 2001. The Y-family of DNA Polymerases, Mol. Cell, 8, 7-8.
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Zuong, N.G. and Steitz, T.A., 1985. Structure of the Large Fragment of *E. coli* DNA Polymerase I Complexed with dTMP, Nature, 313, 762-766.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T. and Pitkanen, K., 1991. Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA Polymerase an Extremely Heat Stable Enzyme with Proofreading Activity, Nucl. Acids Res., 19, 4967-4973.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W., 1980. Sequencing End-Labeled DNA with Base-Specific Chemical Cleavages. Methods Enzymol., 65, 499-560.
- Mead, D., McClary, J., Luckey, J., Kostichka, A., Witney, F. and Smith, L., 1991. *Bst* DNA Polymerase Permits Rapid Sequence Analysis from Nanogram Amounts of Template, Biotechniques, 11, 76-78.
- Mullis, K., Faloona, F., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: the Polymerase Chain Reaction, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 263-273.
- Myers, T. and Gelfand, D., 1991. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA Polymerase, Biochemistry, 30, 7661-7665.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C., 1996. Deoxycytidyl Transferase Activity of Yeast *REVI* Protein, Nature, 382, 729-731.
- Niehaus, F., Frey, B. and Antranikian, G., 1997. Cloning and Characterisation of a Thermostable α -DNA Polymerase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* sp. TY, Gene, 204, 153-158.
- Pantazaki, A., Prista, A. and Kyriakidis, D., 2002. Biotechnologically Relevant Enzymes from *Thermus thermophilus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 1-12.
- Patel, S.S., Wong, I. and Johnson, K.A., 1991. Presteady-State Kinetic Analysis of Processive DNA Replication Including Complete Characterization of an Exonuclease-Deficient Mutant, Biochemistry, 30, 511-525.
- Patel, P H., Jacobo-Molina, A., Ding, J., Tantillo, C., Clark, A. D. and Jr-Raag, R., 1995. Insights into DNA polymerization from Structure and Function Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase, Biochemistry, 34, 5351-5363.
- Patel, P.H. and Loeb, L.A., 2000a. DNA polymerase Active Site is Highly Mutable: Evolutionary Consequences, Proc. Natl Acad. Sci. USA., 97, 5095-5100.
- Perler, F.B., Comb, D.G., Jack, W.E., Moran, L.S., Qiang, B., Kucera, R.B., Benner, J., Slatko, B.E., Nwankwo, D.O., Hempstead, S.K., Carlow, C.K.S. and Jannasch H., 1992. Intervening Sequences in an Archaea DNA Polymerase Gene, Proc. Natl Acad. Sci. USA., 89, 5577-5581.
- Perler, F., Kumar, S. and Kong, H., 1996. Thermostable DNA Polymerases, Adv. Protein Chem., 48, 377-435.

- Petruska, J., Goodman, M.F., Boosalis, M.S., Sowers, L.C., Cheong, C. and Tinoco, I.J., 1988. Comparison between DNA Melting Thermodynamics and DNA Polymerase Fidelity, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 6252-6256.
- Phang, S.M., Teo, C.Y., Lo, E. and Wong T.W.V., 1995. Cloning and Complete Sequence of the DNA polymerase-Encoding Gene (*Bst* Pol I) and Characterisation of the Klenow-Like Fragment from *Bacillus stearothermophilus*, Gene, 163, 65-68.
- Prasad, V.R., Lowy, I., del los Santos, T., Chiang, L. and Goff, S.P., 1991, Isolation and Characterization of a Dideoxyguanosine Triphosphate-Resistant Mutant of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11363-11367.
- Premal, H.P., Motoshi, S., Elinor, A., Akeo, S. and Lawrence A.L., 2001. Prokaryotic DNA Polymerase I: Evolution, Structure, and 'Base Flipping' Mechanism for Nucleotide Selection, J. Mol. Biol., 308, 823-837.
- Preston, B.D., Poiesz, B.J. and Loeb, L.A., 1988. Fidelity of HIV-1 Reverse Transkriptase, Science, 242, 1168-1171.
- Rossi, M., Rella, R., Pensa, M., Bartolucci, S., De Rosa, M., Gambacorta A., Raia C.A. and Dell'Aversano O. N., 1986. Structure and Properties of a Thermophilic and Thermostable DNA Polymerase Isolated from *Sulfolobus solfataricus*, Syst. Appl. Biochem. 7, 337-341.
- Riggs, M.G., Tudor, S., Sivaram M. and McDonough, S.H., 1996. Construction of single amino acid substitution mutant of cloned *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase I which lack 5'→3' axonuclease activity, Biochem.et Biophy. Acta., 1307, 178-196.
- Saboto, D., Nucci, R., Rossi, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z. and Lakowicz, J., 1999. The B-Glycosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Enzyme Activity and Conformational Dynamics at Temperatures above 100°C, Biophys. Chem., 81, 23-31.
- Saglam, E.N., Colak A., Belduz, A.O., Canakci S., Karaoglu H. and Sandalli C., 2007. Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from *Anoxybacillus gonensis* G2, J. Biochem., inpress.
- Schaaper, R.M., 1993. Base Selection, Proofreading, and Mismatch Repair During DNA Replication in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 268, 23762-23765.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffe, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H., 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase, Science, 239, 487-491.

- Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawabayashi, Y. and Matsui, I., 2001. Invariant Asp1122 and Asp1124 are Essential Residues for Polymerization Catalysis of Family D DNA Polymerase from *Pyrococcus horikoshii*, J. Biol. Chem., 276, 27376-27383.
- Southworth, M.W., Kong, H., Kucera, R.B., Ware, J., Jannasch, H.W. and Perler, F.B., 1996. Cloning of Thermostable DNA Polymerases from Hyperthermophilic Marine Archaea with Emphasis on *Thermococcus sp.* 9°N-7 and Mutations Affecting 3'-5' Exonuclease Activity, PNAS., 93, 5281-5285.
- Steitz, T.A., 1999. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms, J. Biol. Chem., 274, 17395-17398.
- Stetter, K.O., 1996. In Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth (and Mars?), Ciba Foundation Symposium 202, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1-18.
- Suzuki, M., Baskin, D., Hood, L.E. and Loeb, L.A., 1996a. Random Mutagenesis of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase I: Concordance of Immutable Sites *in vivo* with the Crystal Structure, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 93, 9670-9675.
- Tabor, S. and Richardson, C.C., 1987. DNA Sequence Analysis with a Modified Bacteriophage T7 DNA Polymerase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4767-4771.
- Tabor, S. and Richardson, C.C., 1989. Effect of Manganese Ions on the Incorporation of Dideoxynucleotides by Bacteriophage T7 DNA Polymerase and *Escherichia coli* DNA Polymerase I, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 4076-4080.
- Tabor, S. and Richardson, C.C., 1995. A Single Residue in DNA Polymerases of the *Escherichia coli* DNA Polymerase I Family is Critical for Distinguishing Between Deoxy- and Dideoxyribonucleotides, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 92, 6339-6343.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G.J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S. and Uchiyama, I., 2004. Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*, Nucleic Acids Res., 32, 6292-6303.
- Thomas, A.K., 2004. DNA Replication Fidelity, J. Biol. Chem., 279, 16895-16898.
- Tomasiewicz, H.G. and McHenry, C.S., 1987. Sequence Analysis of the *Escherichia coli* dnaE Gene, J. Bacteriol., 169, 5735-5744.
- Steitz, T.A., 1998. A Mechanism for All Polymerases, Nature, 392, 231-232.
- Uemori, T., Ishino, Y., Fujita, K., Asada, K. and Kato, I., 1993. Cloning of the DNA Polymerase Gene of *Bacillus caldotenax* and Characterization of the Gene Product, J. Biochem., 113, 401-410.

- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H. and Ishino, Y., 1997. A Novel DNA Polymerase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*: Gene Cloning, Expression, and Characterization, Genes Cells, 2, 499-512.
- URL-1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Veri Tabanı, 14 Nisan 2005.
- URL-2: <http://www.expasy.org/>, Veri Tabanı, 20 Nisan 2005.
- URL-3: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, Veri Tabanı, 03 Kasım 2006.
- Wai-Chung, L., Elizabeth, H.Z.T., Olga P., Xiaojun C.S., Catherine M.J. and David P.M., 2002. 3'-5' Exonuclease of Klenow Fragment: Role of Amino Acid Residues within the Single-Stranded DNA Binding Region in Exonucleolysis and Duplex DNA Melting, Biochemistry, 41, 3943-3951.
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H. and Steitz, T.A., 1997. Crystal Structure of a pol α Family Replication DNA Polymerase from Bacteriophage RB69, Cell, 89, 1087-1099.
- Wang, J., Yu, P., Lin, T.C., Konigsberg, W.H. and Steitz, T.A., 1996. Crystal Structures of an NH₂-Terminal Fragment of T4 DNA Polymerase and its Complexes with Single-Stranded DNA and with Divalent Metal Ions, Biochemistry, 35, 8110-8119.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C., 1953. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid, Nature, 171, 737-738.
- Wei, Yang., 2005. Portraits of a Y-family DNA Polymerase, FEBS letters, 579, 868-872.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87, 4576-4579.
- Yang, X., Nigel D.F.G. and Catherine M.J., 2000. Coordination between the Polymerase and 5'-Nuclease Components of DNA Polymerase I of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 275, 20949-20955
- Yang, X., Olga P., Andres E.L., Nigel D.F.G. and Catherine M. J., 2001. Contacts between the 5' Nuclease of DNA Polymerase I and Its DNA Substrate, J. Biol. Chem., 276, 30167-30177.
- Yulong, S., Xiao-Feng, T., Hideshi, Y., Eriko, M. and Ikuo, M., 2004. A 21-Amino Acid Peptide from the Cysteine Cluster II of the Family D DNA Polymerase from *Pyrococcus horikoshii* Stimulates its Nuclease Activity which is Mre11-Like and Prefers Manganese Ion as the Cofactor, Nucleic Acids Res., 2004, 32, 158-168.
- Xu, Y., Derbyshire, V., Ng, K., Sun, X.C., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M., 1997. Biochemical and Mutational Studies of the 5'-3' Exonuclease of DNA Polymerase I of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 268, 284-302.

- Xu, Y., Grindley, N.D.F. and Joyce, C.M., 2000. Coordination between the Polymerase and 5' Nuclease Components of DNA Polymerase I of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 275, 20949-20955.
- Xu, Y., Olga P., Andres E. L., Nigel, D.F.G. and Joyce, C.M., 2001. Contacts between the 5' Nuclease of DNA Polymerase I and Its DNA Substrate, J. Biol. Chem., 276, 30167-30177.
- Xu, M-Q., Southworth, M.W., Mersha, F.B., Hornsta, L.J. and Perler, F.B., 1993. *In vitro* Protein Splicing of Purified Precursor and the Identification of a Branched Intermediate, Cell, 75, 1371-1377.

ÖZGEÇMİŞ

Cemal SANDALLI, 1977 yılında Rize’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rize’de tamamladı. 1998 yılında KSÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden “biyolog” ünvanı ile mezun oldu. 2002 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD’nda “Karayemiş Bitkisinin (*Laurocerasus officinalis* L.) RAPD tekniği ile moleküler Karakterizasyonu” tezi ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD’nda doktora eğitimine başladı. 01.10.2004–31.03.2005 tarihleri arasında Avrupa Birliği ERASMUS Öğrenci Değişimi Programı kapsamında Belçika’nın Ghent Üniversitesi, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Laboratory of Enzymology’de bulundu. 07.03.2006–08.02.2007 tarihleri arasında TÜBİTAK-BAYG (Bilim Adamı Yetiştirme Grubu) tarafından doktora eğitiminin tez döneminde olan öğrencilere verilen TÜBİTAK-A2 Bursunu kazanarak bu burs kapsamında 11 ay süre ile University of Medicine and Dentistry of New Jersey-USA, Department of Biochemistry’de bulundu. Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde 15.01.1999 tarihinden beri araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili ingilizcedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.