KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scytalidium thermophilum KATALAZ-FENOL OKSİDAZ ENZİMİ ANA KANAL YAPISININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

MELİS ZENGİN

KOCAELİ 2016

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scytalidium thermophilum KATALAZ-FENOL OKSİDAZ ENZİMİ ANA KANAL YAPISININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

MELİS ZENGİN

Yrd.Doç.Dr. Sevgi TÜRKER KAYA
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Yrd.Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Yrd.Doç.Dr. Nuray VAROL
Jüri Üyesi, Afyon Kocatepe Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 06.06.2016

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Katalazlar (EC 1.11.1.6), doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Antioksidan metalloenzimler grubuna dahil olup çoğunlukla tetramer halindedirler. Fenol oksidazlar ise bakır içeren proteinler grubuna dahil olur birçok canlıda bulunurlar. Yakın bir geçmişte yayınlanan ilk bulgulara göre, *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen katalaz enzimi hidrojen peroksit ya da herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan bir oksidaz aktivitesine sahiptir. Bu çalışmada, ana kanal üzerinde gerçekleştirilen mutasyonlar ve bu mutasyonlar sonucu elde edilen varyantların saflaştırılması, biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması enzimoloji ve enzim mühendisliği alanında özgün uygulamaların gerçekleştirilmesi anlamında yararlı bilgiler sunacaktır.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi Türker Kaya'ya, tezimin birçok aşamasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarımın deneysel aşamasında bilimsel tecrübeleri ile bana katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü Karakuş'a, bu çalışmayı gerçekleştirirken laboratuvarında çalışmama müsade eden Sayın Doç. Dr. Özlem Aksoy ve Yrd. Doç. Dr. Yonca Avcı Duman'a, yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Sinem Balcı, Günce Göç ve Arzu Sertel'e ve Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğumu düşündüğüm, fakat burada teşekkürden daha fazlasını öneremeyeceğim, hayatımın her döneminde yanımda olan benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anne ve babama, tanıdığım günden bu yana hayatımın en önemli parçası olarak varlığını her an hissettiren nişanlıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 113Z744 no'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

Haziran - 2016 Melis ZENGİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR vii
ÖZET viii
ABSTRACT ix
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1.Proteinler 4
1.2. Enzimler 6
1.2.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler 7
1.2.1.1. Enzim konsantrasyonun etkisi 7
1.2.1.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi 8
1.2.1.3. Sıcaklığın etkisi 8
1.2.1.4. pH etkisi 8
1.2.1.5. Zamanın etkisi 8
1.2.1.6. Reaksiyon ürünlerinin etkisi 8
1.2.2. Katalazlar 9
1.2.2.1. Katalazaların sınıflandırıması 10
1.2.2.2. Katalazların canlılar için önemi 11
1.2.2.3. Katalazların yapısal analizi 12
1.2.3. Fenol oksidazlar 15
1.2.4. Katalaz ve fenol oksidaz enzimlerinin çift işlevliliği 17
1.3. Termofilik Bir Mantar Olan *Scytalidium thermophilum* 18
1.3.1. *S. thermophilum* fungusununn taksonomik sınıflandırılması 20
1.3.2. Katalaz-fenol oksidazı (CATPO) 20
1.4. Protein Üretimi 21
1.4.1. Rekombinant protein üretimi 21
1.4.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (=PZR) 22
1.5. Protein Saflaştırma 23
1.5.1. Protein saflaştırma yöntemleri 25
1.5.1.1. Ön saflaştırma yöntemleri 25
1.5.1.2. Tam saflaştırma yöntemleri 26
1.5.2. Elektroforez uygulamaları 28
2. MALZEME VE YÖNTEM 30
2.1. Plazmid, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması 30
2.2. Primer Tasarımı 30
2.3. QuikChange Bölge Yönelimli Mutasyon 31
2.4. *E. coli* XL-1 Blue, BL21(DE3) star Suşlarından $RbCl_2$ Çöktürme Yöntemi ile Kompetan (Alıcı Uyumlu) Hücre Eldesi 33
2.5. Transformasyon 34
2.6. Plazmid İzolasyonu 34

2.7. Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflığının Tespiti 35
2.8. Agaroz Jel Elekroforezi 35
2.9. CATPO Varyantlarının Üretimi 36
2.10. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması 36
2.11. SDS-PAGE Jel Elektroforez Analizi 38
2.12. Görünür UV Spektrum Analizi 38
2.13. Enzim Aktivite Tayini 38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 41
3.1. *Scytalidium catpo* Geni Üzerinde Bölge Yönelimli Mutagenez Çalışmaları 41
3.2. Farklı CATPO Varyantlarına Ait Plazmidlerin *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu 46
3.3. Farklı CATPO Varyantlarının Rekombinant Üretimi 47
3.4. Rekombinant wtCATPO ve Varyantlarının Saflaştırılması 48
3.4. Görünür Bölge Spektrum Analizi 57
3.5. Rekombinant wtCATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Aktivitelerinin Karşılaştırılması 60
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 64
KAYNAKLAR 66
EKLER 72
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 82
ÖZGEÇMİŞ 83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir polipeptidin amino asit yapısı 6
Şekil 1.2. Proteinlerde yaygın olan 20 amino asit ve yapıları 7
Şekil 1.3. *E.coli* HPII Katalaz monomerinin üç boyutlu yapısı 14
Şekil 1.4. '*b*' (a) ve '*d*' (b) tipi 'Hem' grubunun yapısı..... 15
Şekil 1.5. *Neurospora crassa* katalazı..... 16
Şekil 1.6. Tirozinaz ve katekol oksidaz tarafından katalizlenen fenol oksidaz reaksiyonu..... 17
Şekil 1.7. Memeli katalaz enzimi tarafından gerçekleştirilen üç olası reaksiyon..... 19
Şekil 1.8. *Scytalidium thermophilum*..... 20
Şekil 1.9. Rekombinant protein üretimi aşamaları 23
Şekil 1.10. Tirozinaz ve katekol oksidaz tarafından katalizlenen fenol oksidaz reaksiyonu..... 24
Şekil 1.11. Protein saflaştırmada takip edilen genel bir protokol şeması..... 25
Şekil 1.12. Basit bir kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar 28
Şekil 2.1. QuikChange Bölge Yönelimli Mutasyon Kiti işlem Basamakları genel görünümü..... 34
Şekil 2.2. Örnekte bulunan DNA konsantrasyonunun hesaplanması..... 36
Şekil 2.3. Katalaz (a) ve fenol oksidaz (b) enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler 40
Şekil 3.1. Bölge Yönelimli Mutasyon sonucu elde edilen farklı CATPO varyantlarından izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü 43
Şekil 3.2. Mutantlara ait plazmid DNA'ların wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile CLUSTALW2 programı kullanılarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları..... 47
Şekil 3.3. 7 farklı nokta mutasyonu taşıyan plazmid DNA'nın *E. coli* BL21 (DE3)star hücrelerinde transformasyon sonuçları 48
Şekil 3.4. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan wtCATPO varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 49
Şekil 3.5. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484A varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 50
Şekil 3.6. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484D varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 51
Şekil 3.7. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484I varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 52
Şekil 3.8. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188A varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 53
Şekil 3.9. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188F varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 54
Şekil 3.10. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188D varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 55
Şekil 3.11. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188I varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü 56

Şekil 3.12. Rekombinant wtCATPO ve E484A, E484D, T188A, T188D ve T188F mutant proteinlerine ait UV-Görünür bölge spektrumlarının karşılaştırılması…….....60

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. *S. thermophilum* fungusunun sınıflandırılması 21
Tablo 1.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması..... 29
Tablo 2.1. Bölge yönelimli mutasyonlarda kullanılmak üzere tasarlanan oligonükleotitler..... 32
Tablo 2.2. PZR tekniğinde kullanılan reaksiyon karışımı..... 33
Tablo 2.3. Takip edilen PZR döngüsü..... 33
Tablo 2.4. Deneylerde kullanılan cihazlar..... 41
Tablo 3.1. Sekans dizilemede kullanılan ileri (Forward) CATPO primerleri 43
Tablo 3.2. Farklı CATPO varyantlarına ait plazmid DNA miktarları..... 44
Tablo 3.3. wtCATPO varyantlarının protein miktarı 58

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

Abs	:	Absorbans Değeri
bp	:	Baz Çifti
cm	:	Santimetre
g	:	Gram
kDa	:	Kilo Dalton (Atomik kütle birimi)
L	:	Litre
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
M	:	Molar
nm	:	Nanometre
^{o}C	:	Santigrat derece
V	:	Volt

Kısaltmalar

APS	:	Amonyum Persülfat
BSA	:	Bovine Serum Albumin (Sığır albümini)
dNTP	:	Deoksinükleozit Trifosfat
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
E.C.	:	Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HCl	:	Hidroklorik Asit
$MgCl_2$	:	Magnezyum Klorür
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
pH	:	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	:	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
TBA	:	Tris Borat EDTA
TEMED	:	Tetramethylethylenediiamine
UV	:	Ultra Viyole

Scytalidium thermophilum KATALAZ-FENOL OKSİDAZ ENZİMİ ANA KANAL YAPISININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Scytalidium thermophilum hidrojen peroksit (H_2O_2)'in su ve oksijene parçalanmasını gerçekleştiren ve H_2O_2'nin yokluğunda ise çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonunu sağlayan fenol oksidaz etkinliği olan bir katalaz üretir (CATPO). Bu çalışma ile *Scytalidium* atalazının aktif bölgeye uzanan ana kanal girişinde yer alan amino asit kalıntılarının katalitik mekanizmadaki rollerinin araştırılması hedeflendi. Ana kanal, ürünlerin serbest bırakılması ve substrat akışının katalitik bölgeye ulaşmasında başlıca role sahiptir. Ana kanalın katalaz aktivitesi üzerindeki rolünü araştırmak üzere Glu484 ve Thr188 amino asitleri üzerinde mutasyonlar gerçekleştirilerek CATPO varyantları üretildi. Toplamda CATPO'ya ait 7 mutant varyantı oluşturuldu. Bu amino asitlerdeki mutasyonlar sonucunda kanalın daraltılması ve/veya genişletilmesi hedef alınarak, kanalın boyutunun değiştirilmesi ve ayrıca ana kanalın üst kısmında hidrofobik bölgede solvent akışının değiştirilmesi hedeflendi. Spektrokopik çalışmalar E484D ve T188A varyantlarının *d* tipi hem grubu içerdiğini E484A, E484I, T188D, T188F ve T188I varyantlarının ise *b* tipi hem grubu içerdiğini gösterdi. Ayrıca, E484A, E484I, T188D, T188F ve T188I varyantlarının katalitik aktivitelerinde düşüş gözlenmiştir (sırasıyla % 64, % 99, % 80, %79 ve % 99 olmak üzere). Diğer taraftan E484D varyantında katalaz aktivitesinin yabanıl tipe göre, % 90 oranında korunduğu tespit edildi. T188I hariç diğer varyantların oksidaz aktivitelerinde düşüş gözlendi. En ilginç sonuç ise T188I varyantından elde edilmiştir. Katalaz aktivitesi tamamen inhibe olurken fenol oksidaz aktivitesi yabanıl tip enzime oranla önemli ölçüde bir değişiklik göstermediği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Ana Kanal, CATPO, Katalaz, *Scytalidium thermophilum.*

THE ROLE of *Scytalidium thermophilum* CATALASE-PHENOL OXIDASE ENZYME to INVESTIGATE CATALYTIC ACTIVITY OF THE MAIN CHANNEL STRUCTURE

ABSTRACT

Scytalidium thermophilum produces a catalase with phenol oxidase activity (CATPO) that catalyses the dismutation of hydrogen peroxide (H_2O_2) to dioxygen and water and also oxidizes several phenolic compounds in the absence of hydrogen peroxide. The goal of this study is to investigate the main channel which connects the deeply buried active site to the exterior of the enzyme. The main channel has been identified as potential routes for substrate flow and product release. To investigate the catalytic role of upper side of structure on catalase activity, CATPO variants with mutations on Glu484 and Thr188 were produced. Totally, 7 mutant variants of CATPO have been generated. Mutations in these residues changed the dimensions of the channel, both enlarging and constricting it and also changed the solvent occupancy in the hydrophobic, upper section of the main channel. Spectroscopic studies have revealed that E484D and T188A have haem *d* and E484A, E484I, T188D, T188F and T188I have haem *b*. Dramatical decrease in catalytic activity was observed in CATPO variants including E484A, E484I, T188D, T188F and T188I (64%, 99%, 80%, 73% and 99%, respectively). On the other hand, E484D variant exhibited 90% of wild type catalase activity. The most suprising result was obtained from T188I mutant where catalase activity was totally inhibited whereas phenol oxidase activity was not significantly changed in compared to the wild type enzyme.

Key words: Main Channel, CATPO, Catalase, *Scytalidium thermophilum*.

GİRİŞ

Enzimler, genel olarak protein yapıda moleküllerdir ve canlı organizmalar tarafından üretilmektedirler. Özgün moleküller olan enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek biyolojik tepkimelerde katalizör görevi görürler. Böylece, denge konumunu değiştirmeden tepkimenin hızını arttırırlar. Günümüzde enzimler gıda, ilaç, tekstil, su arıtma tesisleri ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstriyel alanda ve ayrıca analitik amaçlar için kullanılmaktadır (Kıran ve diğ., 2006).

Termofilik mantarlar 45 ila 65ºC arasında üreyebilen ve sıcaklığa en fazla dayanabilen ökaryotik canlılardır. Bu tip mantarların ürettikleri enzimler, ısıya, denatürasyona ve proteolize karşı direnç göstermeleri açısından endüstriyel öneme sahiptirler. Bunlardan biri olan katalaz enzimi (EC 1.11.1.6), doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Başlıca görevi, hücrelerdeki fazla hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak onun zararlı etkilerinden hücreyi korumaktır (Kurakov, 2001; Chelikani, 2004).

Katalazlar, antioksidan metalloenzimler grubuna dahil olup çoğunlukla tetramer yapıddırlar. Monomerleri birbirine benzemekle birlikte 60-90 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptirler. Her bir monomer ayrıca yapısında ferriprotoporfirin içerirler. Günümüze kadar 14 farklı monofonksiyonel katalazın kristal yapısı belirlenmiştir. Bunlar arasında sığır karaciğerinden (BLC) (Fita, 1986; Murthy, 1981) elde edilen katalazın yanı sıra *Escherichia coli* (Bravo, 1995; 1999), *Enterococcus faecalis* (Hakansson, 2004), *Neurospora crassa* (Díaz, 2004) *Exiguobacterium oxidotolerans* (Hara, 2007; Díaz, 2012), *Helicobacter pylori* (Loewen, 2004),ve *Penicillium vitale* (Vainshtein, 1981; 1986) gibi birçok mikroorganizmadan elde edilen katalazlar yer almaktadır. Bunların üç boyutlu yapıları incelendiğinde hepsinde aktif bölgenin oldukça korunmuş halde olduğu gözlenmiştir. Buna göre, 'Hem' paketi olarak da adlandırılan aktif bölgedeki ferriprotoporfirin yapısı molekülde iyice gömülmüş halde bulunmakta ve molekül yüzeyinden 20 Å uzaktadır.

Fenol oksidazlar ise bakır içeren proteinler grubuna dahil olup bakterilerden memelilere kadar bir çok canlıda bulunurlar. Genel olarak substrat özgüllüğü ve aktivitesine bağlı olarak fenol oksidazları lakkazlar ve katekol oksidaz/tirozinazlar olarak sınıflandırılabilirler. Her iki grup kendi içlerinde oldukça fazla çeşitlilik göstermekle beraber genel olarak, lakkazlar dört bakır atomu, katekol oksidaz/tirosinazlar ise iki bakır atomunu bünyelerinde barındırırlar. Bakır atomları tüm fenol oksidazlarda aktivite açısından gereklidir. Mikrobiyel fenol oksidazlar genellikle savunma amaçlı üretilir ve sadece fenolik madde eşliğinde değil, savunmayı gerektiren çok sayıda çevresel faktör ile üretilebilirler. Fenol oksidazların fenolleri oksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif kinonlar, genellikle, hızla polimerize olurlar. Katekol oksidazlar/tirozinazlar, bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve moleküler oksijeni kullanarak *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler aktif bölgelerinde binüklear bakır bulundururlar. Mantarlarda bulunan katekol oksidazlar hücre zarına bağlı olarak değil suda çözünür durumda serbest olarak bulunurlar.

Yakın bir geçmişte yayınlanan ilk bulgulara göre, *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen katalaz enzimi hidrojen peroksit ya da herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan bir oksidaz aktivitesine sahiptir (Sutay Kocabas, 2008; Yuzugullu, 2013). Literatürde memeli katalaz-oksidazı adı altında bu tür bir katalaz enzimine dair tek bir yayın bulunabilmiştir (Vetrano, 2005). Bu yayında, bu tür bir bulgunun bir 'ilk' olduğu vurgulanmakta ancak fenol oksidaz aktivite mekanizmasının bilinmediği belirtilmektedir. Buradan, çift aktiviteli katalaz/fenol oksidaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır. Ancak enzimin oksidatif mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmada, *S. thermophilum* katalazı (CATPO)'nın aktivite mekanizmasının daha detaylı incelenmesi üzerine substratı olan hidrojen peroksit (H_2O_2)'in aktif bölgeye ulaşmasında önemli rol oynadığı düşünülen ve ana kanal üzerinde bulunan Thr188 ve Glu484 amino asitleri hedef alınarak mutasyon çalışmaları yapıldı. Bu mutasyonlar sonucu elde edilen farklı katalaz varyantlarının saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması hedeflendi.

Ana kanal üzerinde gerçekleştirilen mutasyonların eldesinde Bölge Yönelimli Mutasyon tekniği kullanıldı. Bu mutasyonların doğruluğu sekans analizi ile teyit edildi. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez) tekniği kullanılarak proteinlerin profili analiz edilirken, FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) yardımı ile proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirildi.

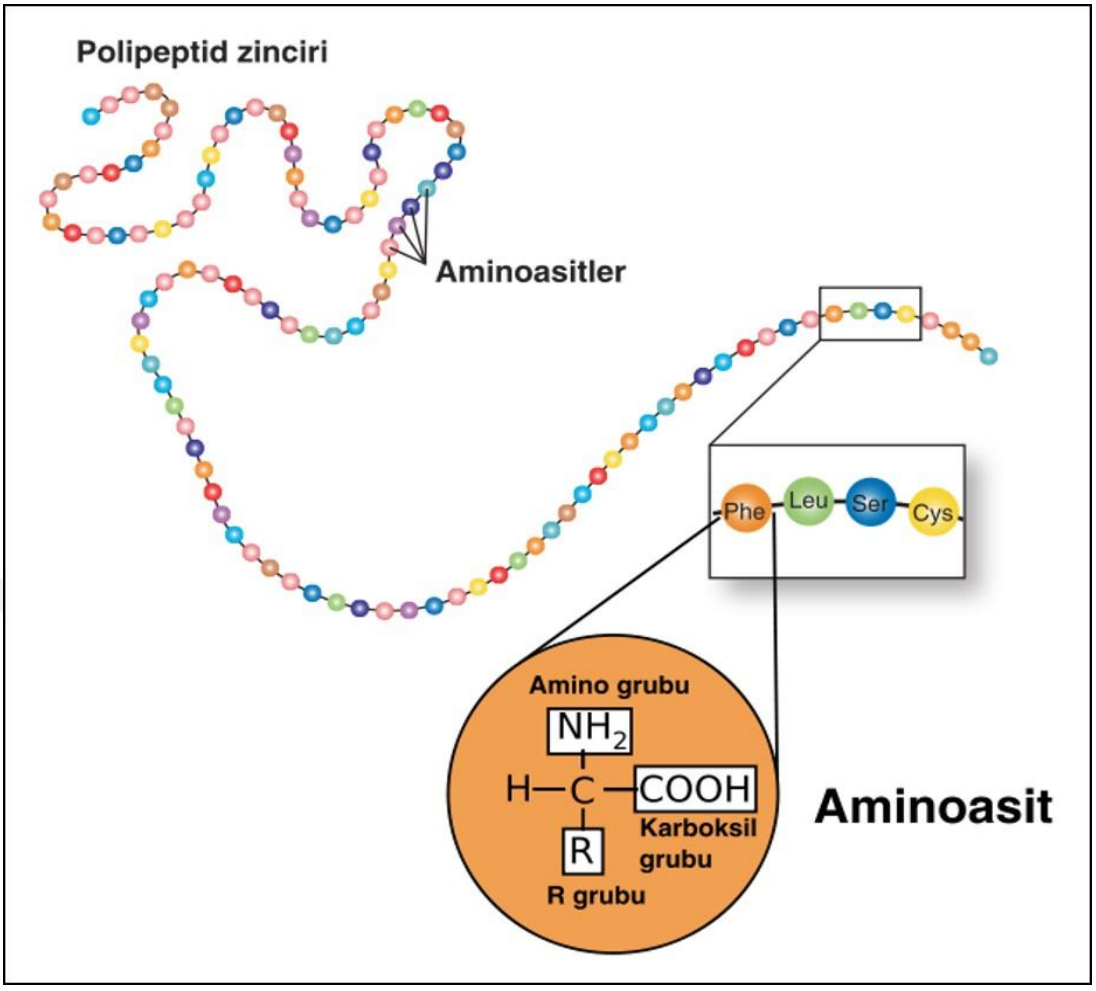
Enzimoloji açısından henüz çok yaygın bir olgu olmayan çift aktivitenin daha ayrıntılı olarak araştırılmasının, özelinde katalazlar ve oksidazlar, genelinde ise enzim mühendisliği alanında özgün uygulamaların geliştirilmesi anlamında da yararlı bilgiler sunacağına ve oksidatif aktivitenin katalitik mekanizmadaki rolünün anlaşılmasına ışık tutacağına inanılmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Proteinler

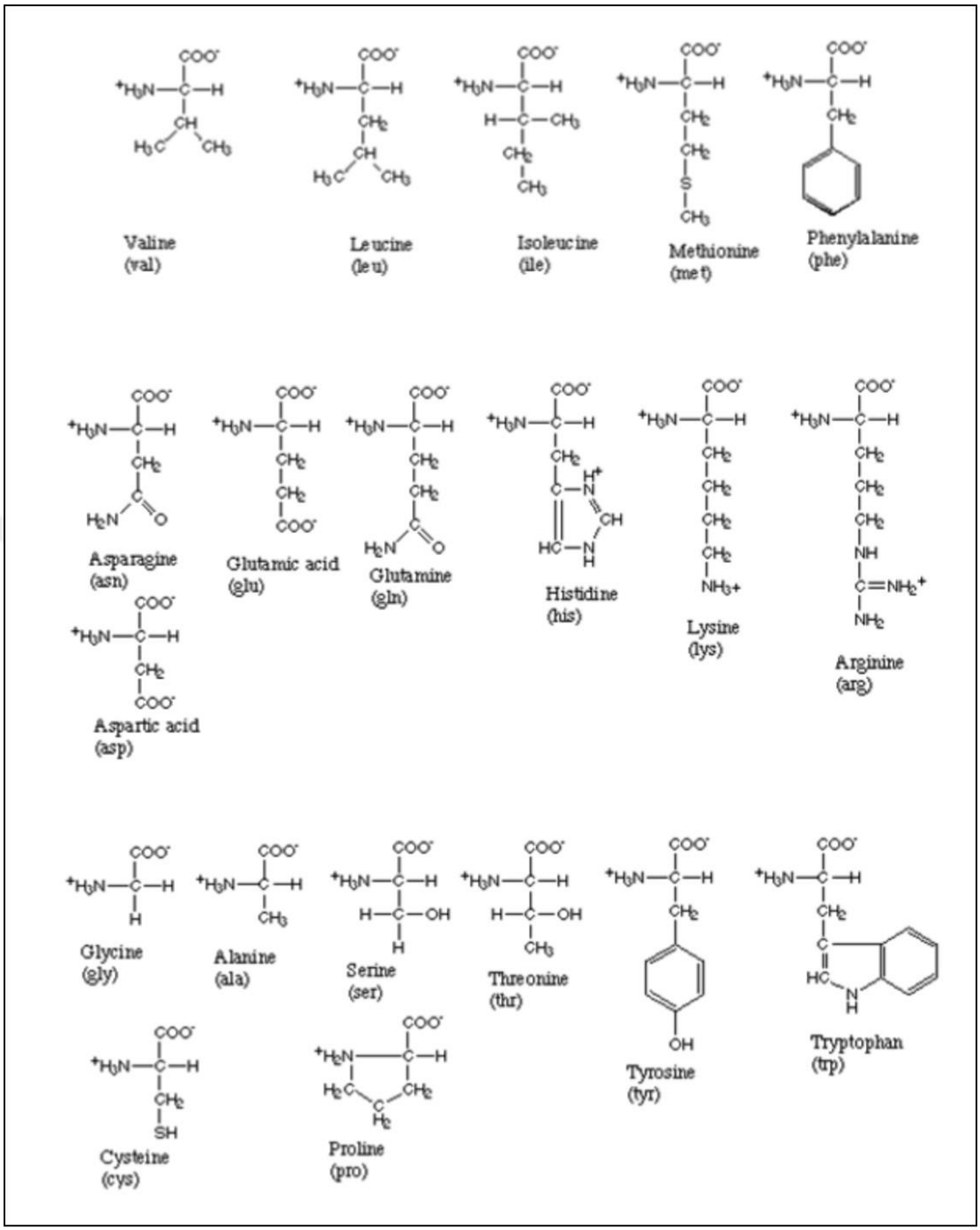
Tüm canlı organizmalarda bulunan proteinler, bilinen en karmaşık yapılı makromoleküllerdir. Başta katalizör görevi olmak üzere, yapısal destek, oksijen ve elektron taşıma, depolama, hareket ve yabancı maddelere karşı savunma gibi çok önemli biyolojik fonksiyonlar proteinler tarafından gerçekleştirilir. Bu makromoleküller canlı organizmalarda, kovalent ya da kovalent olmayan bağlar ile lipitler, karbohidratlar, nükleik asitler, fosfat grupları, flavinler, Fe/Hem grupları ve metal iyonları gibi diğer moleküllere bağlı halde bulunabilirler. Proteinlerin lipidler ile meydana getirdikleri kompleks yapı lipoprotein, karbohidrat ile oluşturdukları kompleks ise glikoprotein olarak adlandırılır. Bunların yanında, proteinlerin bir veya daha fazla metal iyonu ile meydana getirdikleri kompleks metalloprotein olarak isimlendirilir (Berg ve diğ., 2002; Whitford, 2005).

Proteinler, özgül konformasyonda katlanmış bir veya birden fazla polipeptid zincirinden oluşurlar. Bir polipeptit zinciri, özgül dizilimle birbirlerine bağlanan farklı yan zincirlere sahip amino asitleri içermektedir. Bu amino asitlerin bir arada tutulması aralarında oluşan peptid bağları ile mümkün olur. Zincirde bulunan her bir amino asit "rezidü" olarak isimlendirilir. Proteinlerin yapı taşı olarak kabul edilen amino asitler, merkez karbon atomuna (C) bağlı bir hidrojen atomu, bir amino grubu (NH_2) ve bir karboksil grubu (COOH) içerir (Şekil 1.1.). Amino asit dizileri amino grubundan (N terminal uç) karnoksil grubuna (C terminal uç) doğru okunur (Berg ve diğ., 2002; Whitford, 2005).



Şekil 1.1. Bir polipeptidin amino asit yapısı (URL-1)

Genetik kod tarafından belirlenen 20 farklı yan zincir ve dolayısıyla 20 farklı amino asit bulunmaktadır (Şekil 1.2.). Yan zincirlerin yapısına bağlı olarak amino asitler genellikle üç gruba ayrılırlar. İlk grup apolar yan zincire sahip olan Alanin (Ala), Valin (Val), İzolösin (Ile), Fenilalanin (Phe), Prolin (Pro) ve Metiyonin (Met); ikinci grup dört yüke sahip Aspartik asit (Asp), Glutamik asit (Glu) ve Lizin (Lys); üçüncü grup ise polar yan zincire sahip Serin (Ser), Treonin (Thr), Sistein (Cys), Asparajin (Asn), Glutamin (Gln), Histidin (His), Tirozin (Tyr) ve Triptofan (Trp) amino asitlerini içermektedir. Glisin (Gly) yan zincirinde sadece bir hidrojen atomu içermekte ve bu nedenle 20 amino asit içerisinde en basit yapıya sahip amino asit olarak tanımlanmaktadır. Glisin sahip olduğu bir takım özellikler nedeni ile birinci gruba veya dördüncü gruba dahil edilebilir (Branden ve Tooze, 1991).



Şekil 1.2. Proteinlerde yaygın olan 20 amino asit ve yapıları (URL-2)

1.2. Enzimler

Enzimler reaksiyonların çoğunu hızlandıran, genelde protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik

faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bütün bu reaksiyonların tümü enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple "yaşam" çok sayıda enzim reaksiyonunun bir araya gelmesinden ibaret bir sistem olarak tanımlanabilir. Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, "substrat" denir. Enzimler üzerine yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilme yapılmaktadır. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden biri katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzimler sayesinde birkaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir. Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Örneğin, katalaz enzimi için turnover sayısı = 4×10^7 s^{-1}'dir. Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25 °C'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite ise 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

1.2.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler arasında enzim konsantrasyonu, substrat miktarı, sıcaklık, pH, zaman ve reaksiyon sonucu oluşan ürünler gelmektedir.

1.2.1.1. Enzim konsantrasyonun etkisi

Enzim reaksiyonunun hızı, genel olarak, enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Substrat konsantrasyonu sabit tutulup enzim konsantrasyonu artırıldığında substratın

tamamı enzim-substrat kompleksi oluşturana kadar reaksiyon hızı artmaktadır. Substrat tükendiği anda ise enzim reaksiyonu sabitlenir (Seriner, 2010).

1.2.1.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Bundan sonra substrat konsantrasyonunun artması ile reaksiyon hızı değişmez (Seriner, 2010).

1.2.1.3. Sıcaklığın etkisi

Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklık ile artar. Sıcaklığın her 10°C artması ile reaksiyon hızı ortalama iki kat artar. *In vitro* enzim reaksiyonları çoğu zaman 37 – 40°C'de yapılır. Bu sıcaklıkta reaksiyon hızı oda sıcaklığındakine oranla dört kat daha fazladır. Fakat belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra, enzimler denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir (Seriner, 2010).

1.2.1.4. pH etkisi

Enzimin reaksiyon hızı ortamın pH'sına bağlıdır. Belirli bir pH alanında enzimin etkisi en fazladır. Bu pH'ya enzimin optimum pH'sı denir. Optimum pH'nın aşağısında ya da yukarısında reaksiyon hızı daha azdır. Belirli bir pH'dan sonra da enzim tamamen etkisiz kalır (Seriner, 2010).

1.2.1.5. Zamanın etkisi

Yapılan araştırmalar enzimlerin optimum sıcaklıklarının ve optimum pH'larının zamana bağlı olduğunu göstermektedir (Seriner, 2010).

1.2.1.6. Reaksiyon ürünlerinin etkisi

In vitro enzim reaksiyonu devam ettikçe reaksiyon ürünleri enzimi inhibe ettikleri için enzim reaksiyonun hızı azalır. Bu inhibisyona sebep, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substratı andırmaları ve enzime substrattan daha fazla bağlanmalarıdır. Reaksiyon ürünü, enzim proteini ile substratın birleştiği yerin dışında

bir yerde birleşebilirler. Allosterik yere bağlanan madde, enzimin etkili bölgesinde biçimsel bir değişiklik gösterebilir. Bunun sonucu olarak, enzim proteininin şeklinin bozulması dolayısıyla enzimin substrat ile birleşmesi substratın yapısına, konsantrasyonuna veya diğer faktörlere bağlı olarak inhibisyona neden olur. Bu etkiye de allosterik etki denir (Seriner, 2010).

1.2.2. Katalazlar

Katalazlar (EC 1.11.1.6), doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Başlıca görevleri, Denklem (1.1)'de gerçekleştiği gibi hücrelerdeki fazla hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak onun zararlı etkilerinden hücreyi korumaktır (Kurakov, 2001; Chelikani, 2004). Katalazlar tarafından hidrojen peroksidin yıkımı iki ayrı basamakta gerçekleştirilir (Chelikani, 2004). İlk basamakta birinci hidrojen peroksit enzimdeki 'Hem' grubunu oksiferril formuna (Bileşik I=Cpd I) çevirir Denklem (1.2) (Nicholls, 2001; Switala ve Loewen, 2002). İkinci hidrojen peroksit molekülü ise ilk basamakta oluşan bileşiği tekrar indirgeyip enzimin orijinal formuna dönüşmesinde ve su ile oksijenin oluşumunda görev alır. Denklem (1.3);

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \quad (1.1)$$

$$\text{Enz (Por–Fe}^{III}\text{)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Cpd I (Por}^{+\bullet}\text{–Fe}^{IV}\text{=O)} + H_2O \quad (1.2)$$

$$\text{Cpd I (Por}^{+\bullet}\text{–Fe}^{IV}\text{=O)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Enz (Por–Fe}^{III}\text{)} + H_2O + O_2 \quad (1.3)$$

Katalazalar ayrıca ortamda uygun organik elektron vericinin bulunmasıyla ve hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumda peroksidaz aktivitesi de gösterebilmektedirler Denklem (1.4) (Nicholls, 2001);

$$\text{Cpd I (Por}^{+\bullet}\text{–Fe}^{IV}\text{=O)} + AH_2 \rightarrow \text{Cpd II (Por-Fe}^{IV}\text{-OH)} + OH^- \quad (1.4)$$

$$\text{Cpd II (Por-Fe}^{IV}\text{-OH)} + AH_2 \rightarrow \text{Enzim (Por-Fe}^{III}\text{)} \quad (1.5)$$

1.2.2.1. Katalazaların sınıflandırıması

Katalazları genel olarak üç gruba ayrılabilir: monofonksiyonel 'Fe/Hem' (heme, haem) grubu içeren katalazlar, katalaz-peroksidazlar, demir/hem içermeyip Mangan içeren katalazlar (Mate, 2001; Nicholls, 2001).

'Fe/Hem' grubu içeren monofonksiyonel katalazlar (Hidrojen peroksit oksidoredüktazlar, E.C. 1.11.1.6) katalaz ailesinin en yaygın grubunu oluşturmaktadır (Switala ve Loewen, 2002; Chelikani ve diğ., 2004). Bu gruptaki katalazlar, hidrojen peroksitin yıkımını iki ayrı basamakta gerçekleştirirler. Tetramerik bir yapıya sahip olan bu enzimler, monomerleri 75-80 kDa ve 55-69 kDa arasında değişen iki alt gruba ayrılırlar. Bu iki gruptaki katalazlar arasında en temel fark 'Hem' grubunun karakteristik yapısından kaynaklanmaktadır. Kristal yapıları şimdiye kadar karakterize edilmiş olan hemen hemen tüm küçük alt üniteli katalazların '*b'* tipi 'Hem' grubu ihtiva ettikleri ve ayrıca NAD(P)H bağanma bölgesi içerdikleri bilinmektedir (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky, 2008). Buna karşılık, büyük alt üniteli katalazlarda ise '*d'* tipi 'Hem' grubu bulunduğu ve bu tip enzimlerin yüksek sıcaklığa ve proteolize karşı önemli derecede dayanıklı oldukları keşfedilmiştir (Chelikani ve diğ., 2004).

Katalaz-peroksidazlar, 'Hem' içeren ve monofonksiyonel katalazlara benzeyen enzimlerdir. Genellikle 120-340 kDa arasında molekül ağırlıklarına sahip homodimer moleküllerdir. Bu grubun üyeleri katalitik aktiviteye ek olarak peroksidatif aktivitede sergilemektedir (Nicholls ve diğ., 2001). Canlı organizmalardan bakterilerde, arkebakterilerde ve funguslarda bulunurlar. Katalaz peroksidazlar bitki peroksidazları ile sekans benzerliği göstermektedirler. Triptofan amino asidinin fenilalanine dönüştürülmesi sonucunda baskın olan katalaz aktivitesinin peroksidaz aktivitesine dönüştüğü gözlemlenmiştir (Chelikani ve diğ., 2003; Klotz ve Loewen, 2003). Fakat monofonksiyonel katalazlarda böyle bir benzerlik görülmemektedir (Chelikani ve diğ., 2003; Klotz ve Loewen, 2003). Katalaz peroksidazların karakteristik özelliği; düşük R_z (Demir miktarı belirleyici) değeri ve çift fonksiyonlu katalitik yeteneğe sahip olmasıdır. Monofonksiyonel katalazalara göre daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı oldukları bilinmektedir (Zámocký ve Koller, 1999). Ayrıca tipik katalazların aksine keskin bir pH piki göstermektedir (Loewen, 1997). Dimer ya da tetramer olarak aktiftirler ve monomer başına 0.5 'Hem' '*b*' içermektedirler. Bunun sonucunda katalaz

peroksidazların bir gen çoğaltılması sonucu veya füzyon yoluyla ortaya çıkmış olabileceği öne sürülmüştür (Nicholls ve diğ., 2001; Chelikani ve diğ., 2003; Klotz ve Loewen 2003).

Mangan (Mn) içeren enzimler yalancı katalazlar olarak da tanımlanabilir. Bu tip katalazlar 'Hem' içeren katalazlara göre daha az yaygındırlar; şimdiye kadar sadece *Lactobacillus plantarum*, *Thermus thermophilus* ve *Thermoleophilum album*'dan izole edilen katalazlar karakterize edilmiştir (Chelikani ve diğ., 2004; Stich, 2010).

Bu tip katalazların katalitik döngüsünde, H_2O_2'nin Mn^{2+}–Mn^{2+} ile reaksiyona girdiğinde oksidan gibi davrandığı Denklem (1.6), Mn^{3+}–Mn^{3+} ile reaksiyona girdiğinde ise indirgen olarak davrandığı bulunmuştur Denklem (1.6) (Chelikani ve diğ., 2004; Christianson, 1997);

$$H_2O_2 + Mn^{2+} – Mn^{2+} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + Mn^{3+} – Mn^{3+} \quad (1.6)$$

$$H_2O_2 + Mn^{3+} – Mn^{3+} \rightarrow Mn^{2+} – Mn^{2+} + 2H^+ + O_2 \quad (1.7)$$

Reaksiyon 5 ve 6 'Hem' içeren katalazlarda gerçekleşen reaksiyon 2 ve 3'e eşdeğer gösterilmektedir. 'Hem' içeren ve 'Hem' içermeyen katalazların reaksiyonları arasında iki belirgin farklılık bulunmaktadır. Birincisi, reaktif ara madde (Cpd I), 'Hem' içermeyen katalazların oksidasyonu boyunca üretilmez. İkincisi ise su ürünleri 'Hem' içeren katalazlarda Denklem (1.2) ve (1.3) sırasında oluşurken, 'Hem' içermeyen katalazlarda Denklem (1.6) sonucu ortaya çıkar (Chelikani ve diğ., 2004). 'Hem' içermeyen katalazların katalitik mekanizması üzerine araştırmalar halen devam etmektedir.

1.2.2.2. Katalazların canlılar için önemi

Katalazlar hücre ömrünü etkileyen antioksidan enzimlerden biridir. Bu özellikleri, oksidatif stres varlığında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ile hücrenin baş edebilmesi esnasındaki katkılarından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar, katalaz üreten hücrelerde, katalazdan yoksun olanlara göre, hidrojen peroksit varlığında hücre ömrünün uzadığını göstermiştir (Volkert, 1994). Bunun yanı sıra, katalazlar aerobik solunum yapan canlıların durağan fazda uzun süre yaşamlarını sürdürebilmelerini de sağlarlar (Loewen, 2004). Katalazın ayrıca bakteriyel virülans

sırasında önemli bir etken olduğu belirtilmektedir. Örneğin, *Staphylococcus aureus* patojeni, farelerin periton kesesinde yaşayabilmesi için katalaza ihtiyaç duyar (Das ve Bishayi, 2010).

Hidrojen peroksitin uzaklaştırılması, hücre ömrünü uzatma ve virülans gibi özelliklerinin yanı sıra katalazlar etanol ve metanol metabolizmasında da rol alırlar (Mate ve diğ., 2001; Comporti ve diğ., 2010).

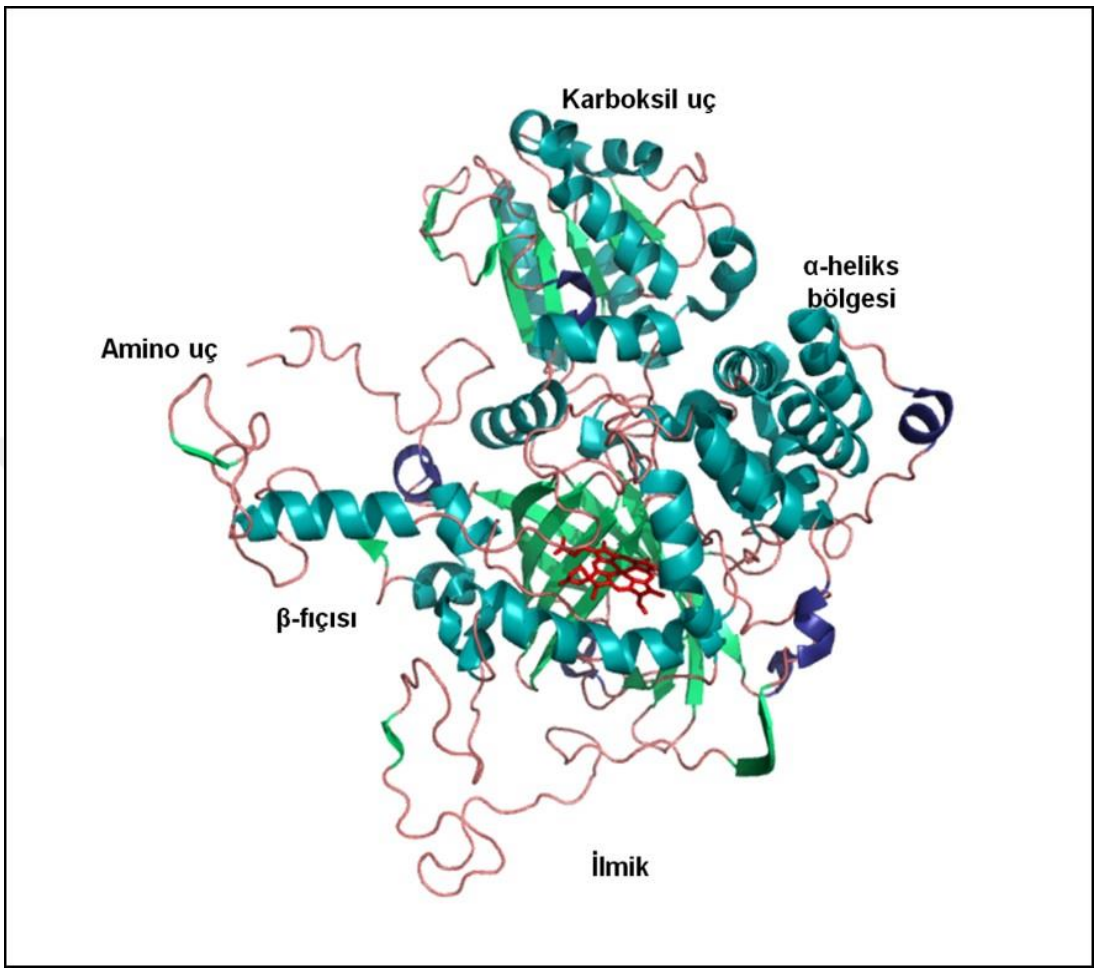
Ayrıca, katalazların hidrojen peroksiti mikromolar seviyelerin altına indirerek hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimini tetikleyip büyümeyi kısmen uyarabildikleri savunulmuştur (Gough, 2011; Takebe ve diğ., 2011). Bütün bunlar göz önüne alındığında, katalazın sinyal iletimi, detoksifikasyon, antioksidan mekanizmasına katkı ya da henüz bilinemeyen önemli birçok biyolojik rolünün olabileceği anlaşılmaktadır.

1.2.2.3. Katalazların yapısal analizi

Katalaz enzimi kristali elde edilen ilk enzimlerdendir. Günümüze kadar kristal yapısı belirlenmiş olan monofonksiyonel katalazların üç boyutlu yapıları incelendiğinde hemen hemen hepsinin büyük ölçüde korunmuş olan "β-fıçı" içeren bir çekirdek yapısı bulundurdukları gözlenmiştir. Enzimin her bir alt birimi beş farklı bölgeden oluşmaktadır: Amino ucu, sekiz adet anti-paralel sıralanmış β-ipliklerinin oluşturduğu β-fıçısı, uzun ilmik kısmı, α-heliks bölgesi ve karboksil ucu olmak üzere (Şekil 1.3.).

Amino uç kısmının uzunluğu katalazlar arasında oldukça değişkendir. Örneğin *Proteus mirabilis* katalazında (Gouet, 1995) bu kısım 53 amino asitten oluşurken HPII (Hidrojen peroksidaz II) katalazında (Bravo, 1999) ise 127 amino asitten oluşmaktadır. Bu bölgede monomerler arası etkileşim oldukça yoğun olup enzimin moleküler stabilitesinden sorumludur. İkinci kısım olan β-fıçısı, katalazların karakteristik özelliğini oluşturmaktadır. Bu bölgenin ilk yarısını oluşturan amino asitler "Hem" grubunun distal kısmını oluşturmakta iken ikinci yarısı ise özellikle küçük katalazlarda NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat)'nin bağlanma bölgesine denk gelmektedir. Proteindeki uzun ilmik yapı, β-fıçısı ile α-heliks bölgesini bağlamaktadır. Bu bölgede ikincil yapılara rastlanmaz. Karboksil uç kısmı ise katalazlarda uzunluk bakımından farklılık göstermekle birlikte bu farklılığın enzimin

yüksek sıcaklık ya da proteoliz gibi etkenlere karşı dayanıklılığını belirlediği öne sürülmektedir (Mate ve diğ., 2001).

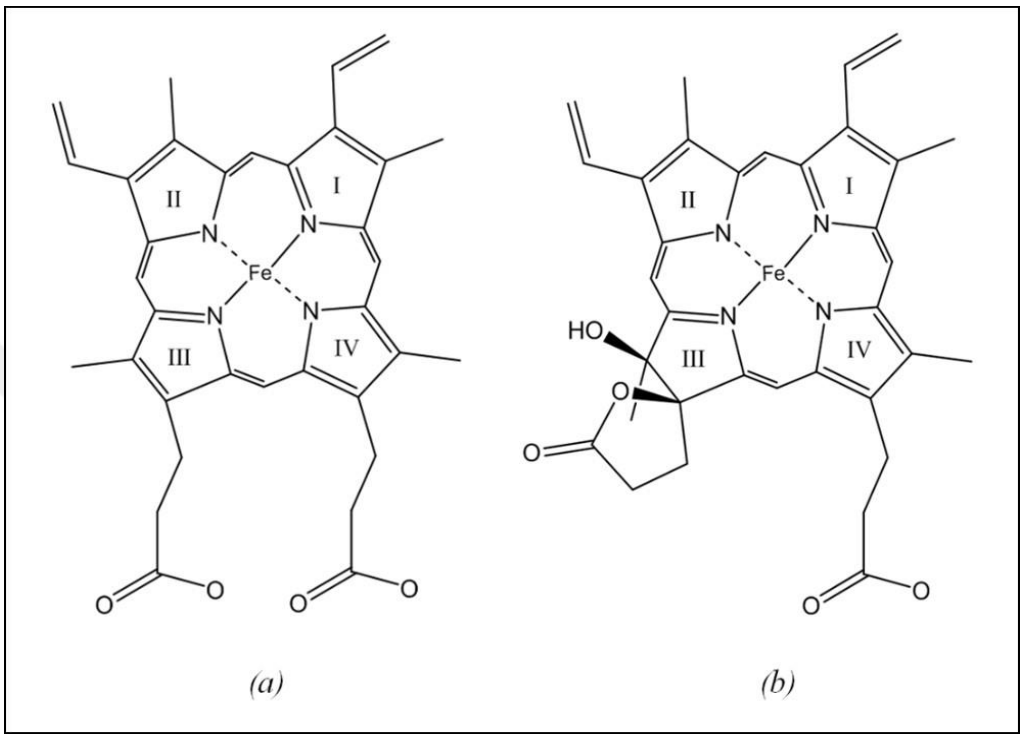


Şekil 1.3. *E. coli* HPII Katalaz monomerinin üç boyutlu yapısı, PDB Kodu: 1GGE

Katalazların üç boyutlu yapıları incelendiğinde hepsinde aktif bölgenin oldukça korunmuş halde olduğu gözlenmiştir. Buna göre, 'Hem' paketi olarak da adlandırılan aktif bölgedeki ferriprotoporfirin yapısı molekülde iyice gömülmüş halde bulunmakta ve molekül yüzeyinden yaklaşık 20 Å uzaktadır (Chelikani, 2003).

Monofonksiyonel katalazların aktif bölgelerinde bulunan 'Hem' grubu iki tiptedir: *'b*' tipi (kovalent bağlı olmayan demir içeren protoporfirin IX) veya '*d*' tipi olmak üzere (protoporfirinin okside formu) (Şekil 1.4.). '*d*' tipi 'Hem' (Haem *d*) grubu içeren monofonksiyonel katalazlar genelde büyük alt üniteli birimlerden oluşmakta ve UV spektrumlarında 590 ve 715 nm'de maximum absorbsiyon vermektedirler. '*b*' tipi 'Hem' (Haem *b*) grubu içeren monofonksiyonel katalazların ise çoğunlukla küçük alt

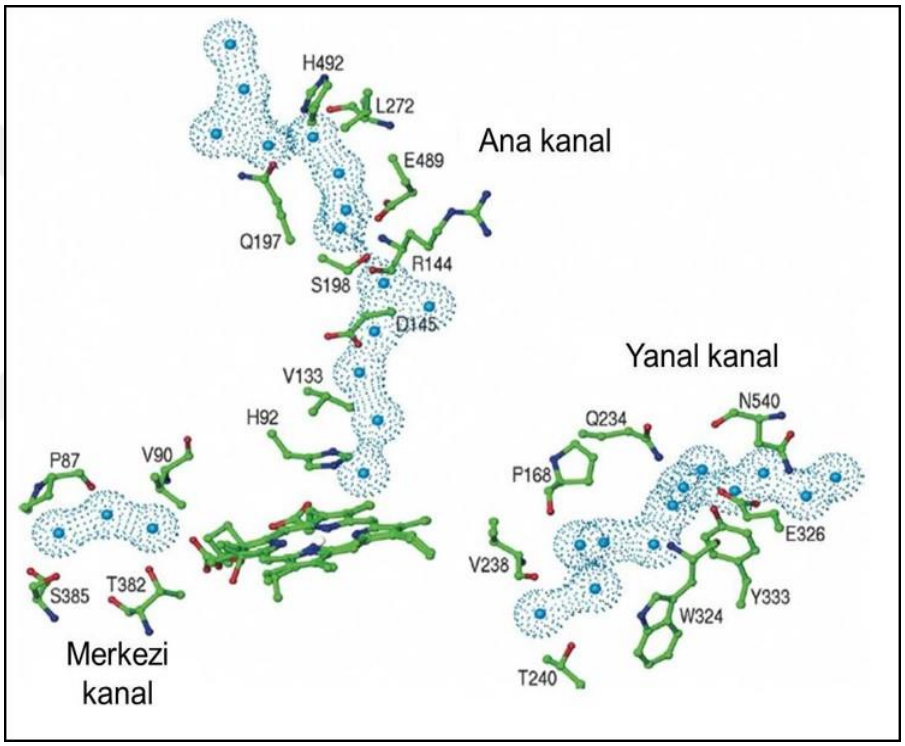
üniteli birimlerden oluştuğu ve UV spektrumlarında 530 ve 630 nm'de maximum absorpsiyon verdikleri bilinmektedir (Loewen ve Switala, 1986). Her iki 'Hem' grubundan en az birini taşıyan katalaz enzimleri 406 nm'de Soret bandı vermekte ve R_z (A406/A280) değerleri 1 olarak belirlenmiştir (Zamocky ve Koller, 1999).



Şekil 1.4. '*b*' (a) ve '*d*' (b) tipi 'Hem' grubunun yapısı (Yüzügüllü, 2013a)

Katalazlar üzerinde yapılan çalışmalar enzim yüzeyinden aktif bölgeye uzanan üç kanalın varlığını göstermektedir (Şekil 1.5.). Bu kanallardan biri ana kanal olarak adlandırılmakta olup katalitik merkeze yukarıdan (distal kısımdan) dik olarak uzanmakta ve hidrojen peroksitin katalitik bölgeye ulaşmasında başlıca role sahiptir (Switala ve Loewen, 2002; Chelikani, 2003). Bu kanalın uzunluğu *y.* 55 Å'dur; 'Hem' bölgesine yakın olan kısmında daha çok hidrofobik amino asit kalıntıları yer almaktadır. Bu amino asitler arasında Valin (Val169, *E. coli*) ve Aspartatın (Asp181, *E. coli*), substratın aktif bölgeye ulaşmasından sorumlu oldukları varsayılmaktadır (Chelikani, 2003). Valinin özellikle ana kanalın daralmasını sağlayarak H_2O ve H_2O_2'den daha büyük moleküllerin (örneğin fenolik maddeler) aktif bölgeye ulaşmasını engellediği gözlenmiştir (Chelikani, 2003). Ayrıca yine bu kanal üzerinde 'Hem' grubuna yakın mesafede bulunan Tirozin (Tyr415, *E. coli*), Histidin (His128, *E. coli*) ve Asparajin (Asn201, *E. coli*) ise enzimin katalitik aktivitesi için gereklidir.

Diğer bir kanal ise *y*. 30 Å uzunluğunda, proteinin yan yüzeyinden başlayarak 'Hem' grubunun alt kısmına (proksimal) doğru uzanmaktadır. Bu kanalın katalitik mekanizmadaki rolü, gerek aktif bölgeye proksimal kısımdan yaklaşması gerekse substratın distal kısma nasıl geçebileceği sorusu yanıtlanamadığından henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak reaksiyon ürünlerinden biri olan su molekülünün proteini terk ederken bu kanalı kullanabileceği öne sürülmektedir (Sevinç, 1999). Son olarak, merkezi kanal olarak adlandırılan kanal ana kanal gibi 'Hem' grubuna yukarıdan ancak tetramer yapının ortasındaki boşluktan yaklaşmaktadır. Merkezi kanal hakkında detaylı bir bilgi literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 1.5. *Neurospora crassa* katalazı, PDB kodu: 1MHS (Diaz, 2004)

1.2.3. Fenol oksidazlar

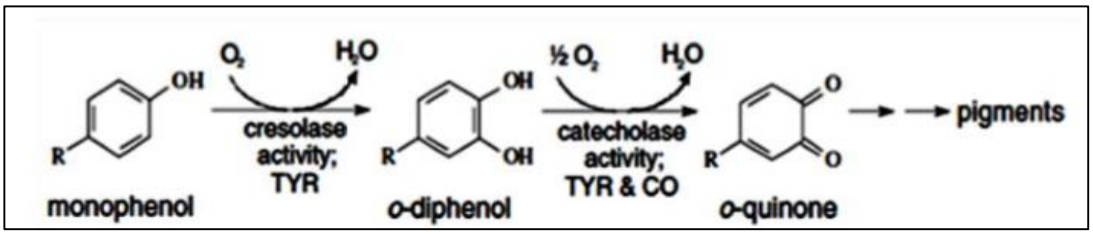
Fenol oksidazlar bakır içeren proteinler grubuna dahil olup bakterilerden memelilere kadar birçok canlıda bulunurlar. Moleküler oksijen varlığında çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonundan sorumludurlar. Mikrobiyel fenol oksidazlar genellikle savunma amaçlı üretilir ve sadece fenolik madde eşliğinde değil, savunmayı gerektiren çok sayıda çevresel faktör ile üretilebilirler. Fenol oksidazların fenolleri oksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif kinonlar genellikle hızla polimerize olurlar.

Genel olarak substrat özgüllüğü ve aktivitesine bağlı olarak fenol oksidazları lakkazlar ve katekol oksidaz/tirozinazlar olarak sınıflandırabilir. Her iki grup ta kendi içlerinde oldukça fazla çeşitlilik göstermekle beraber genel olarak, lakkazlar dört bakır atomu, katekol oksidaz/tirosinazlar ise iki bakır atomunu bünyelerinde barındırırlar. Bakır atomları tüm fenol oksidazlarda aktivite açısından gereklidir.

Lakkazlar, (*p*-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; E.C. 1.10.3.2) çoklu bakır atomu içeren oksidazların bir üyesidir ve spektroskopik olarak üç farklı bakır merkezine sahiptirler (Tip 1, 2 ve 3). Bu enzimler *p*- ve *o*- difenolik bileşiklerin geniş bir kısmını okside ederler (Sanchez-Amat ve Solano, 1997).

Katekol oksidazlar, (*o*-difenol oksidoredüktaz; EC 1.10.3.1) bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve moleküler oksijeni kullanarak *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu gerçekleştirmektedirler (Şekil 1.6.). Bu enzimler aktif bölgelerinde binüklear bakır bulundururlar. Mantarlarda bulunan katekol oksidazlar hücre zarına bağlı olarak değil suda çözünür durumda serbest olarak bulunurlar. Katekol oksidazlar oksidasyon için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Optimum olarak çalıştıkları pH değerleri 5 ila 7 olarak belirlenmiştir (Mayer ve Harel, 1979).

Tirozinazlar, (monofenol monooksijenaz; E.C. 1.14.18.1) monofenollerin hikroksilasyonunu (Cresolase aktivitesi) ve *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu katalizler (Katekol oksidaz aktivitesi). Oluşan kinonlar kendi kendine polimerize olarak yüksek molekül ağırlıklı kahverengi/siyah melanin pigmentlerinin ortaya çıkmasında rol alırlar (Marusek ve diğ., 2006).



Şekil 1.6. Tirozinaz ve katekol oksidaz tarafından katalizlenen fenol oksidaz reaksiyonu (Marusek ve diğ., 2006)

1.2.4. Katalaz ve fenol oksidaz enzimlerinin çift işlevliliği

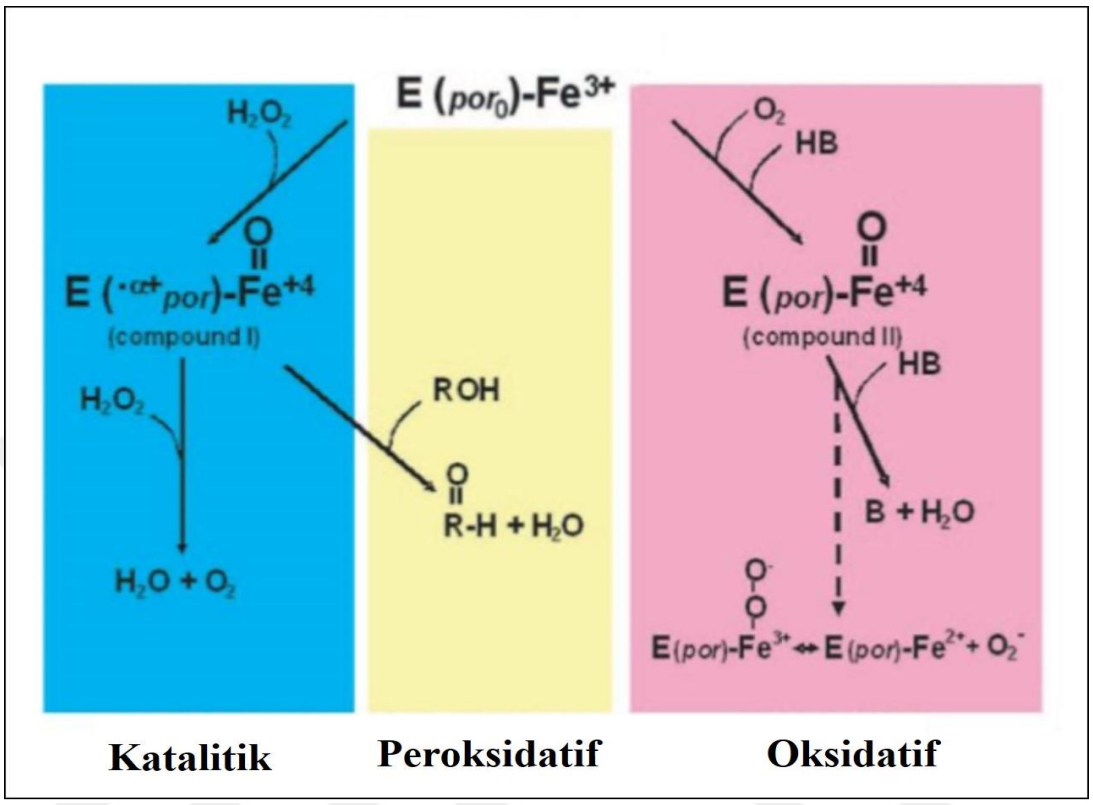
Katalaz ve fenol oksidaz enzimlerinin aktivitelerinin tek bir enzimde varlığını gösteren raporlar mevcuttur (Vetrano ve diğ., 2005). Başka bir deyişle bazı katalazların ilave bir oksidaz aktivitesine sahip olduğu veya bazı oksidazların aynı zamanda katalaz aktivitesi gösterdikleri gözlenmiştir. Bu katalaz-oksidaz birlikteliğinin, polifenol oksidasyonunun bir sonucu olarak hidrojen peroksitin serbest bırakılması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Akagawa ve diğ., 2003). Fenol oksidasyonu ile hidrojen peroksit üretimi Aoshima ve Ayebe (2007) tarafından rapor edilmiştir. Gerçekleştirdikleri çalışmada çay ve kahve gibi içeceklerde, kapakları açıldıktan hemen sonra oksijen girişi ile hidrojen peroksit seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

Hidrojen peroksit varlığında katalaz aktivitesi sergileyen tirozinaz enzimi ilk olarak Jolley (1974) tarafından mantarlarda rapor edilmiştir. Çift aktiviteye sahip bu tirozinaz enzimi daha sonra Garcia-Molina (2005) ve Yamazakive (2004) tarafından da incelenmiştir.

Literatürde oksidaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilen ilk katalaz enzimi memeli katalazıdır. Bu enzimin H_2O_2 yokluğunda veya H_2O_2 seviyesi düşük olduğunda oksidaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Vetrano ve diğ., 2005; Kirkman ve Gaetani, 2006). Memeli katalazında gözlenen muhtemel reaksiyon mekanizmaları Şekil 1.7.'te gösterilmiştir (Vetrano ve diğ., 2005).

Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi katalaz enziminin temel fonksiyonu H_2O_2'i su ve oksijene parçalamaktır (Katalitik aktivite). Ayrıca katalazların, H_2O_2 varlığında, düşük molekül ağırlıklı alkolleri okside edebildiği bilinmektedir (Peroksidatif aktivite). Peroksidatif aktivite, katalazın katalitik döngüsünde ortaya çıkan Bileşik I (=Cpd I) reaksiyon ara ürünü üzerinden alkollerin okside edilmesi sırasında ortaya çıkmaktadır. Hidrojen peroksit yokluğunda gözlenen oksidatif aktivitenin varlığı ise Vetrano ve diğ., tarafından ortaya konulmuştur. Bu oksidaz reaksiyonunun katalazdaki 'Hem' grubu ile benzidin (HB) gibi kuvvetli bir indirgeyici madde arasında gerçekleştiği ve reaksiyonda kullanılan moleküler oksijenin Bileşik II (=Cpd II) olarak adlandırılan ara bileşiğin oluşumunu desteklediği öne sürülmüştür. Daha sonra, elektron transferi ile substrat oksidasyonu gerçekleşerek enzimin dinlenme haline geri

döndüğü önerilmektedir (Vetrano ve diğ., 2005). Oksidatif reaksiyonu sırasında süperoksit (O_2^-) radikali gibi serbest radikallerin oluşumu gözlenebilmektedir.



Şekil 1.7. Memeli katalaz enzimi tarafından gerçekleştirilen üç olası reaksiyon (Vetrano ve diğ., 2005)

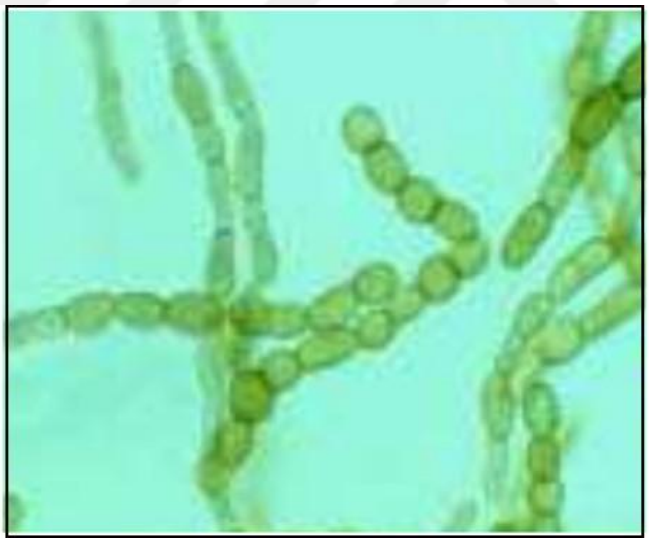
Yakın bir geçmişte yayınlanan ilk bulgular, termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum*'un hücre-dışı fenol oksidaz enziminin aslında oksidaz aktivitesine sahip bir katalaz olduğunu vurgulamış ve bu enzim CATPO olarak isimlendirilmiştir (Kocabas ve diğ., 2008). CATPO enzimi detaylı olarak karakterize edilen ilk çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazdır.

1.3. Termofilik Bir Mantar Olan *Scytalidium thermophilum*

Termofilik mantarlar yeryüzünde bulunan ökaryotik canlılar içinde ısıya en fazla dayanıklı olanlarıdır. Optimum büyüme sıcaklıkları genellikle 45°C, üreyebildikleri en yüksek sıcaklık ise genellikle 65°C'dir. Termotolerant mantarların aksine, termofilik mantarlar 20°C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişemezler (Cooney ve Emerson, 1964).

Lignoselülozik biyokütlenin doğal geri kazanımı sürecinde ve kompostlama gibi işlemler esnasında meydana gelen biyolojik faaliyetlerin sonucu olarak ısınan ortamlar termofilik mantarların yaşam alanlarının başında gelmektedir. Bu nedenle termofilik mantarlar özellikle lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında rol oynayan enzimler açısından oldukça zengindirler. Bu enzimlerin en önemli özellikleri termostabil olmaları ve çoğunlukla nötral ve alkalin pH da aktivite göstermeleridir (Tuomela, 2000). Ayrıca denatürasyona ve proteolize karşı direnç de gösterirler. Özellikleri itibarı ile termofilik mantarların mezofilik mantarlardan evrimleştikleri düşünülmektedir (Feofilova ve Tereshina, 1999). Bu açıdan, kendi ekolojik nişleri içinde, ortamdaki ısınma sürecini aşmış ve buna adapte olabilmiş ökaryotik canlılar olarak termofilik mantarlar araştırılması gereken organizmalardır.

S. thermophilum katalaz (CATPO) enziminin çeşitli fenolleri okside edebildiği ortam sıvısı ile yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. *Scytalidium thermophilum* (URL-3)

1.3.1. *S. thermophilum* fungusununn taksonomik sınıflandırılması

S. thermophilum mantarının taksonomik olarak sınıflandırılması Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. *S. thermophilum* fungusunun sınıflandırılması (Straatsma ve diğ., 1994)

Takson	Bilimsel Sınıflandırma
Alem	*Fungi*
Şube	*Ascomycota*
Altşube	*Pezizomycotina*
Sınıf	*Leotiomycetes*
Takım	*Helotiales*
Aile	*Incertea sedis*
Cins	*Scytalidium*
Tür	*S. thermophilum*

1.3.2. Katalaz-fenol oksidazı (CATPO)

S. thermophilum'un katalaz-fenol oksidaz enzimi (CATPO) 320 kDa ağırlığında ve 'Hem' grubu içeren tetramerik bir yapıya sahiptir. Katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri için optimum pH değeri 7 olup enzimin izoelektirk noktası (pI) 5 olarak bulunmuştur (Kocabas ve diğ., 2008; Ögel ve diğ., 2006).

Enzimin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Kodon-optimize edilmiş *catpo* geni klonlanmış ve *E.coli*'ye aktarılarak ifade edilmiştir. Doğal ve rekombinant *S.thermophilum'*un kristal yapıları, 2.7 ve 1.4 Å çözünürlüklerde belirlenmiştir (Yüzügüllü, 2012). CATPO'nun, her alt birim başına 698 amino asitten oluşan homotetramer yapısı ortaya çıkarılmıştır ve bu yapının *Penicillium vitale*'ye katalazına benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Katalaz ve oksidaz aktivitelerinin aynı aktif bölgede gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmak amacıyla çeşitli mutasyonlar yapılmıştır. CATPO enzimi afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, enzimin çift aktivite gösterdiği bulunmuş ve her iki aktivitenin de 'Hem' bölgesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Enzimin oksidaz aktivitesinin mekanizması ile ilgili net bir bilgi henüz elde edilememiştir.

1.4. Protein Üretimi

Protein üretimi, bir proteinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini incelemek için gerçekleştirilmesi gereken ilk basamaktır. Proteinler rekombinant yoldan üretilebildikleri gibi direk olarak canlı organizmalardan (bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar) elde edilebilirler. Günümüzde protein üretimi için iki alternatif yaklaşım bulunmaktadır: direkt olarak organizmanın doku veya hücresinden izole edilmesi veya *E. coli* gibi konak hücrelere ekspresyonu gerçekleştirilip rekombinant yoldan yüksek miktarda protein üretilmesi (Sutay, 2007).

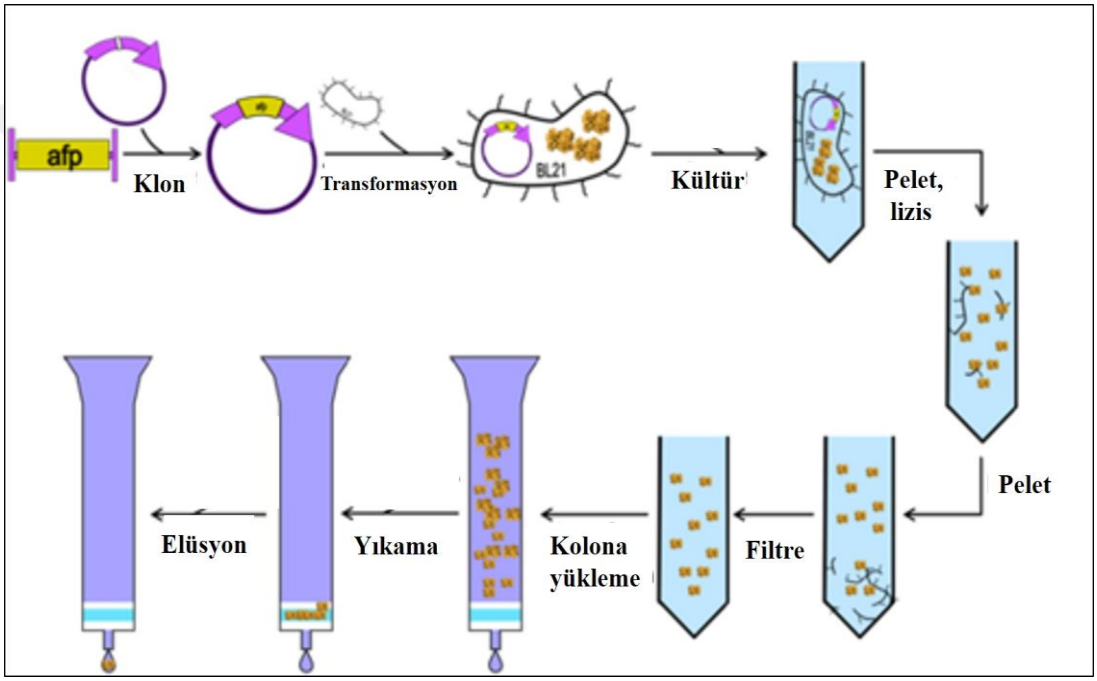
Fonksiyonel çalışmalar için düşük miktarlarda (1 ng ya da 1 pmol'den az) proteinler yeterli kabul edilirken, yapısal çalışmalar daha yüksek miktarlarda protein üretimi gerektirmektedir. Protein ekspresyonunun konak hücre içerisinde gerçekleştirilmesi bu nedenle yapısal analizler için avantaj sağlamaktadır (Whitford, 2005).

Mikroorganizma üretimi (ya da kültür ortamı) için çeşitli besin maddeleri test edilerek büyüme ortamlarına uygun prosedürler tasarlanmıştır. Farklı mikroorganizmalar farklı kültür koşullarına ihtiyaç duymaktadır. Bu yüzden her büyüme ortamı spesifik bir mikroorganizmanın üretimini tetiklerken ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların üretimini baskılar (Wistreich and Lechtman, 1980). Besin ortamına ilave olarak, sıcaklık, pH, su ve oksijen gereksinimi mikroorganizmaların büyümesi ve üretimini etkileyen önemli faktörler arasındadırlar (Brock and Madigan, 1988).

1.4.1. Rekombinant protein üretimi

Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine gen klonlaması adı verilmektedir. Gen klonlama rekombinant DNA teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasıdır (Arda, 2000; Kuk ve Erensoy, 2008). Klonlamada vektör olarak; virus ve bakteriler, bakteriyofajlar, plazmitler nadir olarak da kozmid ve mayalar kullanılmaktadır.

Hedeflenen DNA için taşıyıcı roldeki küçük ve sirküler yapılı moleküllere **vektör** adı verilir. Organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesi klonlamanın temelini oluşturur. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA'nın yerleştirilmesiyle oluşturulan moleküle rekombinant DNA adı verilmektedir ve bu molekülün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA'da replike olan klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir. Klonlanan DNA transforme edilen hücrelerden saflaştırılarak doğrulanır (Sambrook, 1989) (Şekil 1.9.).

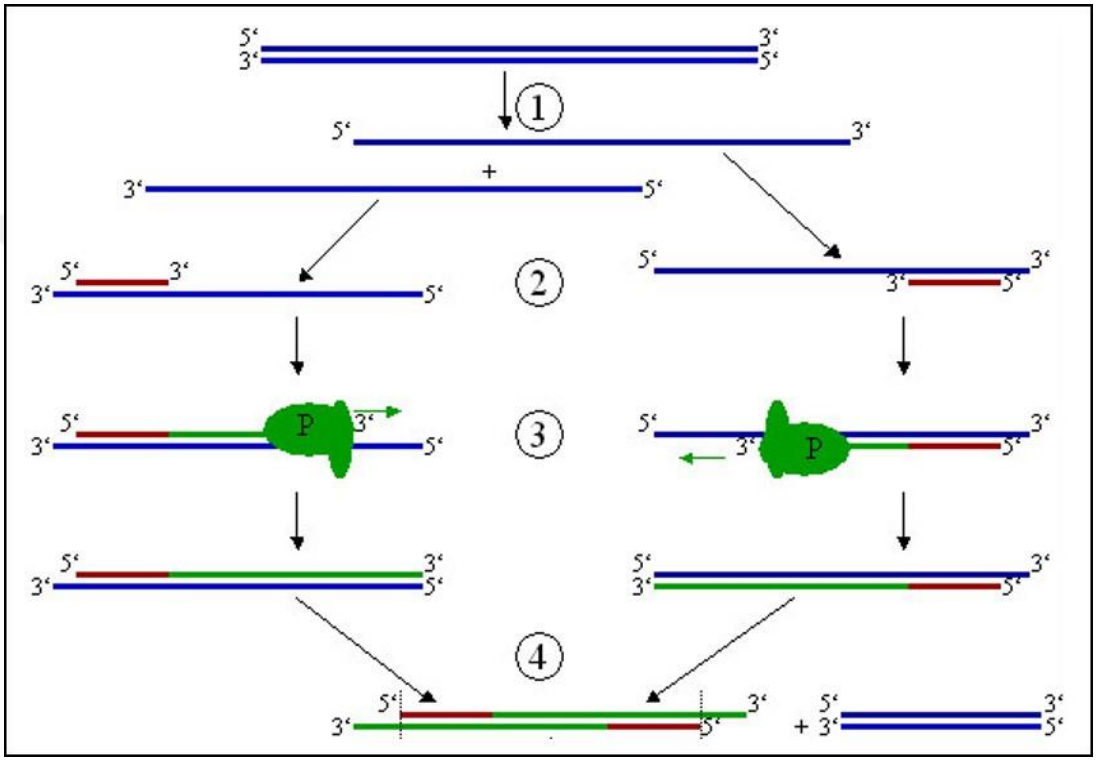


Şekil 1.9. Rekombinant protein üretim aşamaları (URL-4)

1.4.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (=PZR)

1983 yılında keşfedilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), hedef bir DNA parçasının laboratuvar koşullarında çoğaltılmasına izin vermektedir. PZR sırasında çoğaltılmak edilmek istenen DNA bölgesinin yanlarında bulunan DNA dizilimlerine tamamlayıcı primer olarak isimlendirilen kısa oligonükleotidler kullanılır. Hedef DNA ve iki primere ek olarak reaksiyon için gerekli diğer bileşenler olan; DNA polimeraz, deoksinükleotidler, tampon çözelti, $MgCl_2$ (magnezyum klorür) ilavesi sonrasında her biri üç aşamadan oluşan; denatürasyon, bağlanma ve polimerizasyon döngülerin tekrarı ile reaksiyon tamamlanır. Denatürasyon aşamasında 94^{o}C'de çift zincirli DNA

molekülleri birbirinden ayrılırlar. Bağlanma aşamasında primerlerde bulunan nükleotid içeriğine bağlı olarak sahip olacakları erime sıcaklığı (T_m) civarında bir sıcaklıkta, primerler hedef DNA yakınlarına bağlanır. Polimerizasyon aşamasında ise 72^oC'de çalışan bir DNA polimeraz aktivitesi ile hedef bölgenin kopyası zincir karşısına primerin bağlanma bölgesinden itibaren 5' yönden 3' yöne doğru sentezlenir (Şekil 1.10.).



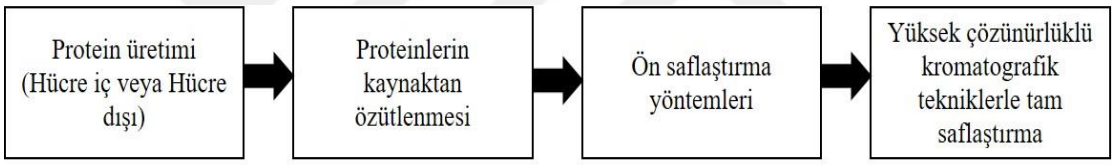
Şekil 1.10. PZR yöntemindeki aşamaların şematik olarak gösterimi. 1. Denatürasyon, 2. Bağlanma, 3. Uzama, 4. İlk döngü tamamlandıktan sonra, P: Taq DNA polimeraz (Deveci, 2012)

1.5. Protein Saflaştırma

Tüm organizmalarda karmaşık fonksiyonlar ve metabolik tepkimelerin çoğu proteinlerce gerçekleştirilmektedir. İlgi duyulan bir proteinin işlevi, yapısı ve diğer proteinlerle etkileşiminin karakterizasyonu için protein saflaştırması şarttır. Bir proteinin amino asit kompozisyonu ve dizisinin aydınlatılması öncelikle ilgili proteinin saf olmasını gerektirir. Saf bir protein, karmaşık bir karışımdan tek bir protein türünün izole edilmesi sonunda elde edilmektedir. Saflaştırma sürecinin çeşitli adımları sonucunda, protein içinde hapsolduğu ortamdan kurtarılmakta, karışımda bulunan protein ve protein olmayan kısımlar birbirinden ayrılarak istenen protein tüm

diğer proteinlerden ayrıştırılmaktadır. Başlangıç malzemesi genelde bir biyolojik doku veya mikrobiyal kültür olabilmektedir. İlk bakışta, genellikle farklı birçok protein içeren bir hücre ya da doku homojenatından bir proteinin saflaştırılması zor bir iş gibi görülebilir. Ancak uygulamada, bir proteinin saflaştırılması için ortalama sadece dört farklı ayırma adımına ihtiyaç vardır. Her bir protein saflaştırma süreci, ilgili proteine özgün olmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Endüstriyel ve klinik uygulamalar ya da akademik çalışmalar için proteinlerin elde edildiği kaynaklar oldukça farklılık göstermektedir. Protein kaynaklarının başlıca gruplarını mikroorganizmalar, bitkiler, hayvan dokuları ve rekombinant proteinler oluşturmaktadır. Protein kaynaklarının bu kadar farklı ve çeşitli olmasına rağmen, bu kaynaklardan elde edilen proteinler ister doğal isterse rekombinant olsunlar genellikle benzer saflaştırma protokolleri ve teknikleri ile saflaştırılmaktadır (Şekil 1.11.) (Tuncer, 2008).



Şekil 1.11. Protein saflaştırmada takip edilen genel bir protokol şeması (Tuncer, 2008)

Protein saflaştırma süreci para, zaman, çaba ve değerli ekipmanların kullanımını gerektirmektedir. Saflaştırma stratejisinin doğru tasarımı, proteinin molekül ağırlığı, izoelektrik noktası, hidrofobisite özelliği, karbonhidrat varlığı, substratlara ilgisi ve metal iyonlarına duyarlılığı hakkında bilgi edinilmesinde yardımcı olabilmektedir. Protein saflaştırma çalışmasından başarı elde edebilmenin anahtarı, en uygun tekniğin seçimine, seçilen tekniğin geliştirilmesine, verimi arttırmak ve saflaştırma sürecinin basamak sayısını en aza indirmek için seçilen tekniklerin mantıklı bir şekilde kullanılmasına bağlı olmaktadır (Roe, 2006).

Protein saflaştırılmasındaki amacı ikiye ayırmak mümkündür. Hedef proteinin saflaştırılması endüstriyel kullanım amacıyla yapılacaksa yüksek miktarda, kararlı, iyi karakterize edilmiş, düşük maliyette, saflık oranı yüksek olmayan preparatlara ihtiyaç duyulmaktadır. Burada saflaştırma basamakların sayısı, yöntemin süresi, son ürünün maliyeti ve verimliliği gibi konular birinci derecede önem teşkil etmektedir. Şayet

protein saflaştırma, proteinin yapısal, işlevsel gibi özelliklerinin belirlenmesini içeren akademik bir amaçla yapılacaksa, mümkün olduğunca yüksek saflıkta homojen proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır (Roe, 2006).

1.5.1. Protein saflaştırma yöntemleri

1.5.1.1. Ön saflaştırma yöntemleri

Proteinlerin ekstraksiyonu ve çöktürülmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon gibi teknikler ucuz, çabuk ve basit bir şekilde herhangi bir proteinden kirletici bileşeni (hücre organeli, lipit, safsızlıklar, proteinler gibi) kısmen ayırarak (kısmi saflaştırma) proteini konsantre hale getiren ön ayırma teknikleridir (Tuncer, 2008).

Saflaştırma işleminin ilk adımı, proteinlerin kaynaklarından özütlenmesi (ekstraksiyonu) ile başlamaktadır. Hedef proteinin hücre içi (bitki ve hayvan dokuları, bakteri, maya ve bitki hücreleri) ya da hücre dışı (mikroorganizmaların fermantasyonu veya hayvan hücre kültürleri ile üretilen proteinlerin çoğu) kaynaklı olmasına göre ekstraksiyon işlemi değişiklik göstermektedir. Hücre dışına salınan hedef proteinlere genelde filtrasyon ya da santrifüjleme teknikleri ile ulaşılırken, hücre içindeki proteinlere ulaşmak için doku ve hücre parçalama yöntemleri (ozmotik şok, deterjan ve enzimle parçalama, bıçak ve elle homojenizasyon gibi) kullanılmaktadır (Roe, 2006).

Ham protein özütlerinden hedef proteinin çöktürülmesi; nötral tuzlar, organik çözücüler ve yüksek moleküler kütleli organik polimerler gibi ajanlar kullanılarak veya protein solüsyonunun denatürasyonu ile başarılabilmektedir. Protein saflaştırmasında yaygın olarak kullanılan ilk adım, amonyum sülfat gibi yüksek çözünürlüklü bir tuz ile proteinlerin çökeltilmesidir. Bu işlemde, çözeltiye giderek artan miktarda amonyum sülfat eklenir. Çözeltiye eklenen amonyum sülfat bir proteinin yüzeyinde bulunan hidrofobik grupları saran su tabakasını uzaklaştırır. Böylece protein-su etkileşimleri ortadan kalkar ve hidrofobik grupların etkileşmesi sonucunda çökelme meydana gelmektedir (Tuncer, 2008).

Diyaliz ise, yarı geçirgen bir zardan proteinlerin geçişine izin vermeden tuz ve su gibi küçük moleküllerin uzaklaştırılması ya da bir sonraki aşamada etkili bir şekilde verim

almak için saflaştırma adımından sonra tamponun değiştirilmesi amacıyla sıkça kullanılmaktadır (Roe, 2006).

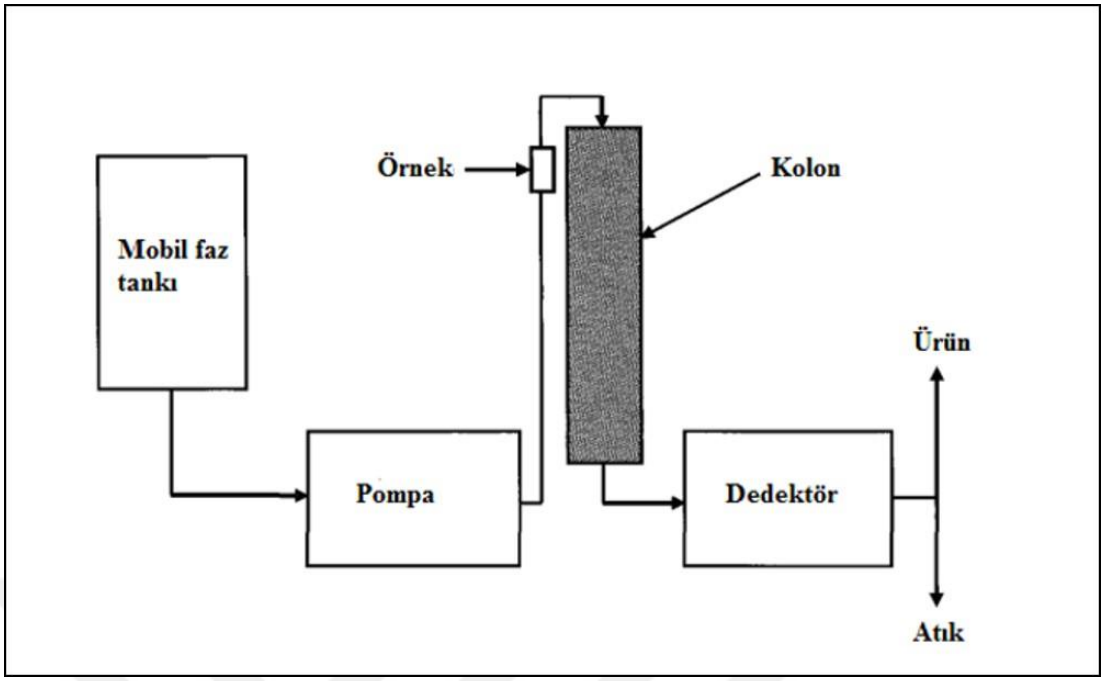
Su ve diğer küçük moleküllerin, santrifüjleme ya da yüksek basınç gibi transmembran gücü ile yarı geçirgen bir zardan geçirilerek proteinlerin konsantre edilmesi, ultrafiltrasyon tekniği olarak tanımlanmaktadır (Roe, 2006).

1.5.1.2. Tam saflaştırma yöntemleri

Hedef proteinin daha yüksek oranlarda saflaştırılması ve en sonunda da homojen saflıkta elde edilebilmesi için yüksek çözünürlüklü, daha ekonomik, kapasitesi yüksek ve yüksek verimlilikte ürün veren kromatografik tekniklerin kullanılması gerekmektedir.

Kelime anlamıyla kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adı olarak tanımlanmaktadır. Kolon kromatografide sabit faz, metal ya da cam kolon içinde paketlenmiştir. Analit karışımı ve mobil faz (elüent), bir pompalama sistemi ile kolon boyunca geçirilmektedir. Sabit faz (matris), kolonun iç duvarına ince bir film tabakası şeklinde kaplanan küçük parçacıklardan oluşmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Bir kromatografik sistem; bir kolon, hareketli faz tankı, pompa, örnek enjektörü, detektör ve bazen bir fraksiyon toplayıcısından oluşmaktadır (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. Basit bir kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar (Tuncer, 2008)

Analizde etkin olan mekanizmalara göre çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Birbirlerinden farklı yöntemler olsalar da kromatografik yöntemlerde genellikle ayrımı yapılacak karışım; bir hareketli ve bir de sâbit faz ile etkileştirilerek bileşenlerine ayrılır. Bu nedenle kromatografı kısaca, sabit ve hareketli fazların yarışı olarak özetlenebilir. Bu yarışta, sabit faza konulan karışım; üzerinden hareketli faz geçirilirken, bu iki faz ile farklı şekil ve miktarlarda fiziksel ve kimyasal etkileşimlere girer. Bu etkileşimler sonucunda karışımdaki bileşenler, hareketli faz tarafından sürüklenirken sabit faz tarafından tutulmaya çalışılır, böylece karışımdaki bileşenler sabit fazı farklı sürelerde terk ederler ve birbirinden ayrılmış olurlar.

Kromatografik yöntemler sınıflandırılırken genellikle hareketli fazda kullanılan malzemenin türüne göre ana gruplara ayrılır ve bu grupların alt türleri belirlenirken de sabit fazın türü dikkate alınır. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması özet olarak Tablo 1.2'de gösterilmektedir.

Tablo 1.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Yöntem	Hareketli Faz Tipi	Sabit Faz Tipi	Sabit Fazı Tutma Yöntemi
Gaz-Sıvı Kromatografi	Gaz	Sıvı	Bir tüp içindeki poröz katı üzerinde veya kapiler bir tüpün iç cidarı üzerinde adsorblanır
Gaz-Katı Kromatografi	Gaz	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Dağıtma Kromatografisi	Sıvı	Sıvı	Bir kolon (tüp) içindeki poröz bir katı üzerinde adsorblanır
Adsorbsiyon Kromatografisi	Sıvı	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Kağıt Kromatografisi	Sıvı	Sıvı	Kalın bir kağıdın gözenekleri içinde tutulur
İnce Tabaka Kromatografisi	Sıvı	Sıvı-Katı	Bir cam levhadaki ince toz halindeki katı üzerinde tutulur
Jel Kromatografisi	Sıvı	Sıvı	Polimerik bir katının lifleri arasında tutulur
İyon Değiştime Kromatografisi	Sıvı	Katı	Bir kolondaki (tüp) iyon değiştirici reçine üzerinde tutulur

1.5.2. Elektroforez uygulamaları

Elektroforez terimi, bir elektriksel alanın etkisi altında yüklü bir parçacığın hareketini açıklamaktadır. Amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi pek çok önemli biyolojik moleküller verilen herhangi bir pH değerinde, çözelti içinde elektriksel yüklü anyon (-) veya katyon (+) oluşturabilecek iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Bu yüklü parçacıklar sahip olduğu net yüke bağlı olarak, bir elektriksel alan altında anot ya da katoda göç ederler. Elektroforez işlemleri, ayrılacak moleküllerin iyonizasyon durumunu sürekli korumak amacıyla uygun bir tampon içerisinde gerçekleştirilmektedir. pH'daki herhangi bir değişiklik, toplam yükün ve ayrılacak moleküllerin hareketliliğinin (elektriksel alandaki göç hızı) değişmesine neden olmaktadır. Akrilamid jel kullanılarak yapılan elektroforez, PAGE olarak kısaltılan poliakrilamid jel elektroforezi olarak adlandırılmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), protein karışımlarının nitel olarak analizi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu metot proteinlerin büyüklüğüne göre ayrılmasına dayandığı için, saflaştırılmış bir proteinin görüntülenmesi ve molekül ağırlığının belirlenmesi için oldukça kullanışlıdır. SDS

(CH_3-(CH_2)10-CH_2OSO_3-Na^+) anyonik bir deterjandır. Örnekler, SDS ve β-merkaptoetanol içeren örnek tamponu ile birlikte 5 dakika boyunca kaynatılır (Wilson ve Walker, 2010). Güçlü bir şekilde bağlı SDS ve β-merkaptoetanol proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfit köprülerini kırarak proteini denatüre ederler. Böylece karışımdaki her bir protein tamamen denatüre olarak, polipeptit zinciri boyunca bir dizi negatif yüklü SDS molekülü ile tersiyer yapı açılarak düz bir çubuk şeklini alır. Protein zinciri herhangi bir dönüş hareketi ile katlanabilir eğilimindedir; ancak denatürasyon sonucunda protein zincirinin farklı bölgelerinde oluşan negatif yükler arasındaki itme nedeniyle tersiyer sarmal yapıdan, çubuk şeklinde düz bir konformasyona dönüşerek bu yapıda kalır (Roe, 2006).

Elektroforez sonrasında proteinler, jele bağlanmayan fakat proteinlere bağlanan coomassie mavisi ya da gümüş nitrat gibi bir boyama metodu ile bant şeklinde görünür hale getirilmektedir (Roe, 2006).

Deniz yosunundan ekstrakte edilen doğal bir koloit olan agaroz; galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz ünitelerinin ardışık olarak yer aldığı agarobioz ünitelerinin tekrarlanmasından oluşan ve moleküler kütlesi 12.000 Da olan lineer bir polisakkarittir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Teknik basit, hızlı ve diğer prosedürlerle ayrıştırılamayan DNA fragmanlarını çözebilme yeteneğindedir. Ayrıca DNA'nın jeldeki konumunu, düşük konsantrasyonlarda floresan veren etidyum bromid ile boyayarak belirlemek mümkün olmaktadır (Sambrook ve diğ., 1989).

Jel elektroforezi nükleik asitlerin ve proteinlerin ayrılması için kullanılan bir tekniktir. Makromoleküllerin ayrılması iki değişkene bağlıdır: yük ve kütle. DNA gibi biyolojik bir örnek bir tampon çözeltiye karıştırıldığı ve jele uygulandığı zaman iki değişken birlikte rol oynar. Bir elektrottan gelen elektrik akımı, makromolekülleri iterken aynı anda diğer elektrot molekülleri kendine doğru çeker. Jeldeki sürtünme kaynaklı ayrım gücü molekülleri büyüklüklerine göre ayırarak 'moleküler elek' görevi yapar. Elektrik alanı altında hareket oranları şu faktörlere bağlıdır: alanın gücü, moleküllerin büyüklüğü ve şekli, örneklerin göreceli hidrofobisitesi ve moleküllerin içinde hareket ettiği iyonik kuvvet ve sıcaklık.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Plazmid, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması

Bu çalışmada termofilik bir mantar olan *S. thermophilum*, daha önceden hazırlanan ve pET28a-CATPO (Yüzügüllü, 2013b) olarak adlandırılan, Histidin etiketi (altı adet histidinden oluşan) içeren bir rekombinant plazmid (EK-1) kullanıldı.

Farklı CATPO varyantlarının eldesinde *E. coli* XL1-Blue (Agilent, Amerika) ve BL21 (DE3) star (Agilent, Amerika) suşları kullanılmış olup bu suşlar Luria Broth (LB) besiyerinde (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) ve uygun antibiyotik varlığında (50 µg/ml kanamisin), 37 ºC'de bir gece orta düzeyde çalkalanarak (200 rpm) büyütüldü.

2.2. Primer Tasarımı

İstenilen nokta mutasyonlarının yaratılmasında QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kiti (Qiagen, Almanya) üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanıldı. Sacem (Bursa) ve Sentegen (Ankara) firmalarından satın alınan oligonükleotitler Tablo 2.1.'de listelenmektedir. 28 ila 34 baz uzunluğunda tasarlanan primerler için erime sıcaklığı (T_m) 78 °C ya da daha yüksek olarak belirlendi. Arzu edilen mutasyonları içeren primerler, *catpo* sekansının her iki ucundan da yaklaşık 10-15 bazlık bir kısmı içerecek şekilde bulunmaktadır. Primerlerin en az %40 oranında ′GC′ çifti içermesi ve ′GC′ ile başlayıp yine ′GC′ sona ermesine dikkat edildi. Mutasyonların doğrulanması için gerekli olan DNA dizi analizi işlemi MedSanTek Laboratuvar (İstanbul) tarafından hizmet alımı şeklinde yaptırıldı.

Tablo 2.1. Bölge yönelimli mutasyonlarda kullanılmak üzere tasarlanan oligonükleotitler (Mutasyona uğratılan kodonlar kırmızı renkte belirtilmiştir)

Mutant	Sekans Değişikliği	Oligonükleotit
T188A	ACC→GCC	5'- CCCGCAGGCTGCT**GCC**GCTCACGACTCTGCTTGGG
T188D	ACC→GAC	5'- CCCGCAGGCTGCT**GAC**GCTCACGACTCTGCTTGGG
T188F	ACC→TTC	5'-CCCGCAGGCTGCT**TTC**GCTCACGACTCTGCTTGGG
T188I	ACC→ATC	5'-CCCGCAGGCTGCT**ATC**GCTCACGACTCTGCTTGGG
E484D	GAA→GAC	5'- CCTGGTTAACGCTATGCGTTTC**GAC**ATCTCTCTGGTTAAATCTG
E484I	GAA→ATC	5'- CCTGGTTAACGCTATGCGTTTC**ATC**ATCTCTCTGGTTAAATCTG
E484A	GAA→GCA	5'- CCTGGTTAACGCTATGCGTTTC**GCA**ATCTCTCTGGTTAAATCTG

2.3. QuikChange Bölge Yönelimli Mutasyon

Proteini kodlayan *catpo* geni zıt zincirindeki her bir tamamlayıcı oligonükleotit primeri, KOD Hot Start DNA polimeraz (Merck, Almanya) enzimi kullanılarak 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) boyunca çoğaltıldı. Bu sırada oligonükleotitler sıcaklık döngüsü boyunca uzayarak, arzu edilen mutasyonu içeren çentikli plazmidlerin ortaya çıkması teşvik edildi. Sıcaklık döngüsünü takiben, PZR ürünü olan Dpn*I* (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimi ile muamele edildi. Dpn*I* enzimi metillenmiş veya yarı-metillenmiş DNA'ları tanıyan bir endonükleazdır. PZR sonrası reaksiyon ortamında mutasyona uğramamış plazmid DNA'sının parçalanarak sadece arzu edilen mutasyonu içeren plazmid DNA'yı seçmek için kullanıldı (Şekil 2.1.). *E. coli* suşundan izole edilen ve polimeraz zincir reaksiyona girmeyen ana plazmid DNA metil takılmış halde bulunduğundan Dpn*I* enzimi tarafından parçalanmakta; böylece ortamda endonükleaz ile muamele sonrası sadece istenilen amino asit değişimini içeren plazmid DNA'sı kalmaktadır. Mutasyon içeren yeni sentezlenmiş rekombinant plazmid DNA daha sonra *E.coli* XL-1 Blue kompetan hücresine aktarılmak üzere hazır hale getirildi.

Bölge yönelimli mutasyon çalışmaları için Tablo 2.1'de verilen PZR reaksiyon karışımı ve Tablo 2.2'de verilen PZR koşulları uygulandı.

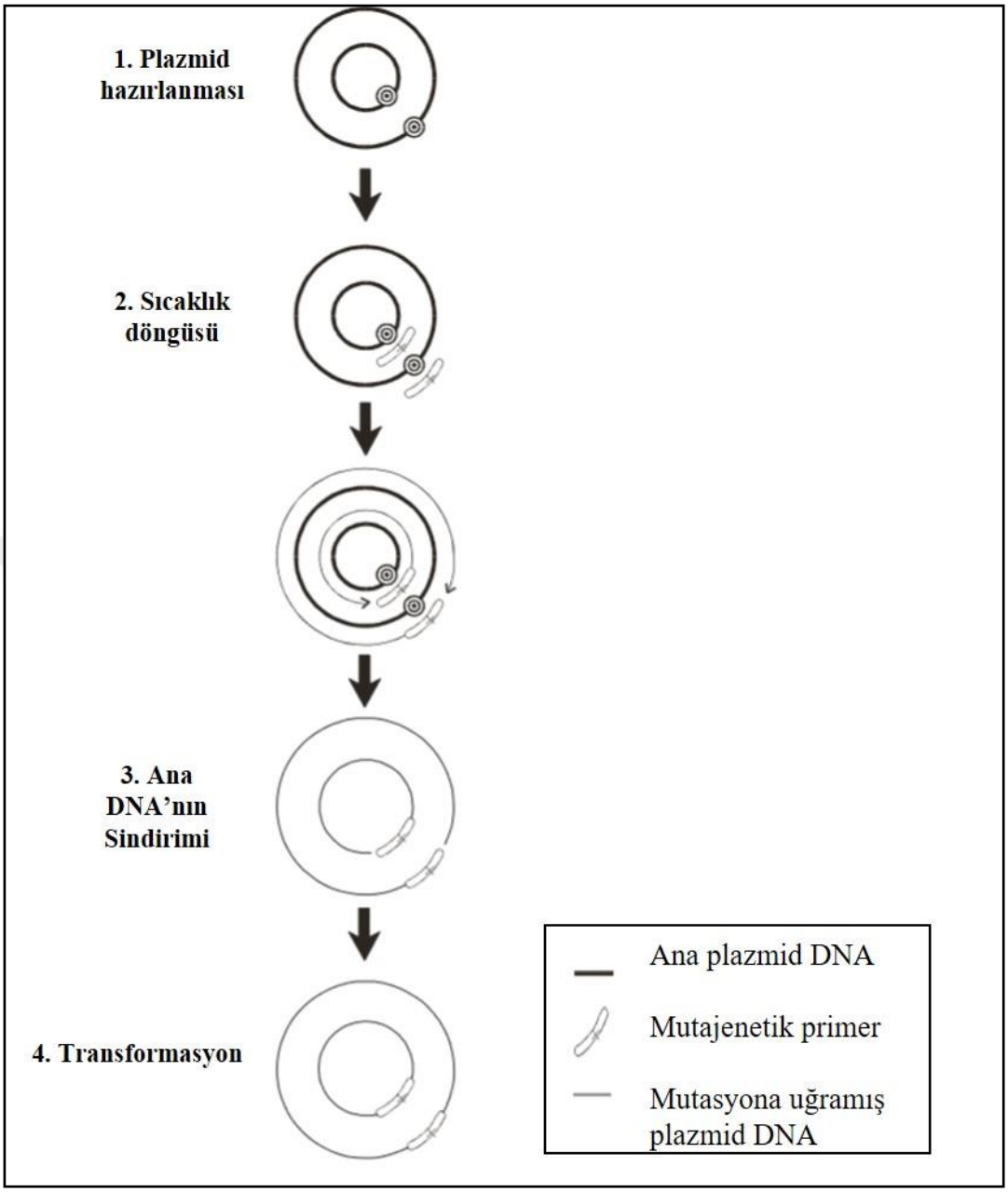
PZR ürünlerinden, 5'er µL örnek kullanılarak % 0,8 w/v'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

Tablo 2.2. PZR tekniğinde kullanılan reaksiyon karışımı (Yüzügüllü, 2010)

PZR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözelti	5 µl	10X
DNA KOD Hot Start polimeraz	1 µl	1 U/µl
Plazmid DNA	1 µl	90 ng/µl
İleri (forward) primer	1.5 µl	10 µM
Geri (reverse) primer	1.5 µl	10 µM
$MgSO_4$	3 µl	25 mM
dNTP	5 µl	2 mM
Steril ddH_2O	32 µl	-
Toplam	50 µl	-

Tablo 2.3. Takip edilen PZR döngüsü

PZR Aşaması	Sıcaklık (^oC)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	25
Bağlanma	55-65	30 saniye	25
Uzama	68	8 dakika	25
Son Uzama	68	10 dakika	1
Saklama	4	Süresiz	-



Şekil 2.1. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kiti işlem basamakları genel görünümü (Stratagene)

2.4. *E. coli* XL-1 Blue, BL21(DE3) star Suşlarından $RbCl_2$ Çöktürme Yöntemi ile Kompetan (Alıcı Uyumlu) Hücre Eldesi

Bir gece katı besiyerinde (Luria Broth Agar, LBA) büyütülen kültürler sıvı besiyerlerine (LB) (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) inoküle edildi. Ardından 37°C'de yaklaşık 3 saat inkübe edildi ve 30 dakikada bir 595 nm'de optik yoğunluk değerleri (OD) ölçüldü. OD yaklaşık 0,4 olduğunda kültürler 50 ml'lik falkon tüplerde 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübe edilen kültürler daha sonra 4

°C'de 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatan atılıp kalan pellet kısmı 20 ml Tfb1 (3 mM potasyum asetat, 100 mM $RbCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM MnCl, %15 (v/v) gliserol, pH 5.8) solüsyonu içinde çözdürüldükten sonra 4 °C'de 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kalan pellet kısmı 2 ml Tfb2 (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, %15 (v/v) gliserol, pH 6.5) içinde çözdürüldü. Elde edilen hücreler sıvı azotta dondurulduktan sonra -80 ºC'de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

2.5. Transformasyon

Transformasyon aşamasında kullanılan hücreler *E. coli*'nin kompetan özelliği kazandırılmış XL-1 Blue ve BL21(DE3) star suşlarıdır. -80°C'den çıkartılan hücreler buz üzerinde eritilip hücrelerin ısısı yükselmeden 50 µl hücre kültürüne 3 µl PZR ürünü olan farklı tipte plazmid örnekleri (yaklaşık 1-10 ng DNA içerecek şekilde) eklendi. 30 dk buzda inkübe edildikten sonra 1 dk 42 °C'deki su banyosunda inkübasyona maruz bırakıldı. 2 dk buz inkübasyonunun ardından 450 µl LB besiyeri eklendi. 37°C'de 1 saat çalkalamalı inkübasyon ile kültürler çoğaltıldıktan sonra 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve LB besiyeri içeren süpernatan kısmından 400 µl atılarak hücreler geri kalan 100 µl içinde tekrar süspanse edildi ve sonrasında 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerine yayma yöntemi ile inoküle edildi (Yüzügüllü, 2013b).

2.6. Plazmid İzolasyonu

Transformasyonu doğrulanmış rekombinant plazmidi içeren koloniler steril çubuk ile seçilerek plazmid DNA izolasyonunda kullanılmak üzere LB besiyerinde (%1 w/v tripton, %0.5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) ve uygun antibiyotik varlığında (50 µg/ml kanamisin), 37ºC'de bir gece orta düzeyde çalkalanarak (200 rpm) büyütüldü. Plazmid DNA'yı izole etmede Alkalin-SDS Plazmid Miniprep yöntemine dayanan QIAprep DNA izolasyon kiti kullanılarak (Qiagen, Almanya) firma tarafından önerilen basamaklar izlendi. Bu kapsamda; bir gece 37°C'de inkübe edilen 10 ml (LB) taze kültür 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatan atıldı. 250 µl "Buffer P1" eklenerek pellet çözdürüldü ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 250 µl "Buffer P2" eklendi ve örnek berraklaşıncaya kadar 4-6 kere ters düz edilerek karıştırıldı. Sonrasında 350 µl "Buffer N3" eklendi ve 4-6 kere ters düz edilerek

karıştırıldı. 13000 rpm'de 10 dk mikrosantrifüj yapıldıktan sonra süpernatan elüsyon kolonuna aktarıldı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Bu sırada kolondan geçen süzüntü atıldı. Kolon daha sonra, 0,5 mL "Buffer PB" eklenerek yıkandı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzüntü atıldıktan sonra 0,75 mL "Buffer PE" eklenerek kolon yıkandı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzüntü tekrar atıldı. Kolon daha sonra 1,5 ml'lik temiz eppendorf tüpe yerleştirildi ve kolona 50 µl ddH_2O (önceden 70ºC'de su banyosunda inkübe edilmiş) eklendi; 1 dk beklemenin ardından 1 dk santrifüj yapılarak plazmid süzüntüde elde edildi. Bu şekilde elde edilen plazmidler -20°C'de saklandı.

2.7. Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflığının Tespiti

Bölüm 2.6'da açıklanan şekilde izole edilen plazmid DNA örneklerinin miktarı ve saflığı hem UV spektroskopisi ile hem de Qubit 2.0 Fluorometer (Amerika) kiti kullanılarak belirlendi. Örnekte bulunan DNA konsantrasyonu Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu (µl/ml)} = (OD_{260}) \times \text{Dilüsyon faktörü} \times \frac{\text{(50 µl DNA/ml)}}{\text{(1 } OD_{260} \text{ birim)}}$$

Şekil 2.2. Örnekte bulunan DNA konsantrasyonunun hesaplanması

Örneklerin saflığı, spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasıyla belirlendi. A260/A280 oranı, örneklerin saflığı ile ilgili tahmini bir karşılaştırma olanağı sunmaktadır. Saf bir şekilde çökeltilen DNA örneklerinin A260/A280 oranı 1,7-2,0 arasında olmasına dikkat edildi.

2.8. Agaroz Jel Elekroforezi

Agaroz jel hazırlanması:

Plazmid DNA'ların yürütülmesinde hazırlanacak jel için tartılan agaroz, 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) içinde kaynatılarak çözüldükten sonra SYBR Safe (Invitrogen, İngiltere) ilave edilerek hazırlandı ve % 0,8'lik agaroz jel kullanıldı. Bunun için 0,8 g

agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TAE üzerine eklendi. Agaroz, mikrodalga fırında kaynatılarak solüsyon berraklaşıncaya kadar çözdürüldü. SYBR Safe (Invitrogen, İngiltere) son konsantrasyonu 1 g/ml olacak şekilde eklendi ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlandı. Solüsyonun biraz soğuması beklendikten sonra agaroz tabağına yavaşça döküldü ve polimerizasyon için beklemeye bırakıldı.

Örneklerin jele yüklenmesi:

Jel, 1X TAE tamponu içeren tanka yerleştirildikten sonra örnekler yükleme tamponu (6X; NEB, İngiltere) ile 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Başka bir kuyucuğa 6 µl markör (marker) (NEB, İngiltere) yüklendi ve elektroforez 100 V'da 60 dakika yürütüldü (Yüzügüllü, 2013b). Yürütme işleminin sonunda plazmid DNA'ların görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (UVP-GelDoc-It 310) UV ışık altında yapıldı. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekildi.

2.9. CATPO Varyantlarının Üretimi

İstenilen mutasyonu içeren plazmid DNA örnekleri *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerine aktarıldı ve tek koloniden çoğaltılan bakteri suşları LB besiyerinde aktifleştirildikten sonra, 121ºC'de 20 dk otoklavda daha önce steril edilmiş % 80 (v/v) gliserol eklenerek -80ºC'de muhafaza edildi. Stok kültürler daha sonra rekombinant yabanıl tip (wt) CATPO proteini ve varyantlarının üretiminde kullanıldı. Bu kapsamda bir gece 37°C'de inkübe edilen 10 ml (LB) taze kültür, 50 µg/ml kanamisin içeren 1 litrelik LB besiyerine transfer edildi. Ardından 37°C'de yaklaşık 2 saat inkübe edildi ve 30 dakikada bir 600 nm'de optik yoğunluk değerleri (OD) ölçüldü. OD yaklaşık 0,6-0,8 olduğunda besiyerine 0,1 mM IPTG ilave edilerek 30°C ve 120 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler inkübasyon sonrasında 9000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve protein saflaştırma denemelerinde kullanılmak üzere 80°C'ye kaldırıldı (Yüzügüllü, 2013b).

2.10. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması

Rekombinant yabanıl tip (wt) CATPO ve 7 farklı varyantının (E484A, E484D, E484I, T188F, T188A, T188D, T188I) saflaştırılmasında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilen hücreler buzda bir süre bekletildikten sonra 100 ml lizis tamponuna

(50 mM Na-HEPES, %25 (w/v) sükroz, %1 (v/v) Triton X-100, 5 mM $MgCl_2.6H_20$, 1 mg/ml lizozim, 5 µl omnicleave endonükleaz (Epicentre, Amerika), 1:4 oranında EDTA içermeyen proteaz inhibitör tablet, pH 8.0) transfer edilerek yaklaşık 3 saat lizis işlemine maruz bırakıldı. Hücreler daha sonra 10000 rpm'de çöktürülerek süpernatan kısmı bir gece boyunca bağlama tamponuna (0,5 M NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7.4) karşı diyaliz edildi ve saflaştırma aşamasında kullanılmak üzere hazır duruma getirildi.

Bu çalışmada, His-etiketli rekombinant proteinlerin, wtCATPO, E484A, E484D, E484I, T188F, T188A, T188D ve T188I tek basamakta saflaştırılmasına olanak veren afinite kromatografi tekniği kullanıldı. Bu yöntemde, His-etiketli protein, nikel kolon (ProtinoNi-NTA, 1 mL) içerisine tutuklanmış olan Ni^{+2} katyonuna bağlanmaktadır. Bağlanmamış proteinler kolondan İmidazol (20 mM) ve NaCl (500 mM) içeren Sodyum fostat tampon çözeltisi (20 mM, pH 7.4) geçirilerek yıkandıktan sonra, hedef protein yüksek miktarda imidazol içeren yine aynı tampon çözeltisi (elüsyon tamponu; 500 mM İmidazol ve 500 mM NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7.4) ile kolondan geri kazanılmaktadır. Bu amaca uygun olarak 1mL'lik Ni-NTA kolonu ACTA Prime Plus Kromatografi cihazına (GE Healthcare, Amerika) bağlandı. Takip edilen tüm basamaklarda akış hızı 1,5 ml/dk olarak belirlendi ve tüm solüsyonlar kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi, degaze edildi.

Kolon cihaza bağlandıktan sonra bağlama (A) ve elüsyon (B) tamponlarının uygulanacağı tüpler, çalışmaya başlamadan önce distile su ile 5 dk boyunca yıkandı. Bir sonraki basamakta kolon, bağlama tamponu ile 20 dk boyunca yüklenmeye maruz bırakıldı ve His etiketli proteinlerin kolona bağlanması için hazır hale getirildi. Lizis işlemi uygulanmış, hücrelerden arındırılmış ve kolona yüklemek için hazır hale getirilmiş, istenilen hedef proteini içeren diyaliz örneği, 1.5 ml/dk akış hızı ile kolona yüklendi. Kolona bağlanmamış veya zayıf bağlanmış proteinleri uzaklaştırmak için Ni-NTA kolonu yıkama tamponu ile 15 dk boyunca yıkama işlemine maruz bırakıldıktan sonra kolon bu sefer elüsyon tamponu ile muamele edilerek arzu edilen proteinin kolondan uzaklaştırılması gerçekleştirildi.

Afinite kromatografisi sonucunda saf proteini içeren franksiyonlar tek bir tüpte toplandı ve elde edilen saf protein solüsyonundan NaCl (tuz) ve imidazolü

uzaklaştırmak amacı ile bir gece 20 mM Sodyum fosfat (pH 7.4) tampon çözeltisine karşı diyaliz işlemi uygulandı. Bir sonraki basamakta 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde çözünür halde bulunan saf protein, konsantre edilmek üzere Milipore's Amicon Ultra-15 santrifüj tüplerine aktarıldı ve 30 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi. Konsantre edilmiş protein miktarı, Quick Start™ Bradford Protein prosedürüne göre belirlendi. Bu şekilde elde edilen saf proteinler ileride spektrofotometrik karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azot içinde dondurularak -80ºC'ye kaldırıldı.

2.11. SDS-PAGE Jel Elektroforez Analizi

SDS-PAGE, Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %5 yükleme jeli (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), %0,1 SDS, %5 Akrilamid ve TEMED) ve %15 ayırma jeli (375 mM Tris-HCl (pH 8.8), %0.1 SDS, %15 Akrilamid ve TEMED) hazırlanarak gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Örnekler indirgeme ajanı içeren yükleme tamponu ile 90°C'de 10 dakika kaynatıldı. Protein markör (marker)'ü olarak ProSieveTM (4,6-300 kDa) (00193837, Lonza, Amerika) kullanıldı. Elektroforez 150 V'da 60 dakika yürütülerek gerçekleştirildi. Yürütülen jeller Coomassie Brillant Blue (CBB) boyama ile boyandı.

2.12. Görünür UV Spektrum Analizi

Görünür UV spektrum çalışmalarını içeren biyokimyasal deneyler, oda sıcaklığında Cary 60 UV-Visible Spektrofotometre (Agilent, Amerika) cihazı ile gerçekleştirildi. Saflaştırılmış yabanıl tip ve mutant proteinlerin absorbsiyon spektra ölçümleri 200-900 nm aralığında, 100 mM sodyum fosfat (pH 7.0) tamponu içerisinde ve 1 cm quvartz küvet kullanılarak yapıldı.

2.13. Enzim Aktivite Tayini

Katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) deneyleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Katalaz aktivitesi Beers ve Sizer (1952)'ın tanımladığı metoda göre, hidrojen peroksitin kaybolduğu 240 nm'de ölçüldü. Reaksiyon karışımı 10 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu, 100 mM sodyum fosfat tampon (pH 7.0) çözeltisi ve toplam hacim 1 ml olacak şekilde seyreltilmiş enzimi içermektedir. Enzim

eklenmeden önce substrat solüsyonu, sıcaklığı dengelemek için sıcak su banyosunda (60°C) 1 dk inkübe edildi. Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızı ve hidrojen peroksitin yok olma katsayı (39,4 M^{-1} cm^{-1}) değeri kullanılarak belirlendi (Merle, 2007). Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol H_2O_2'in ayrışmasını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmış ve Şekil 2.3a'da gösterilmektedir.

Fenol oksidaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Buna göre, 2 ml'lik reaksiyon sıvısı, 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH:7.0) içinde hazırlandı. 100 mM katekol çözeltisinden 0.5 ml, ortam sıvısından 0.5 ml ve tampon çözeltisinden 1 ml ilave edilerek hazırlandı. 60ºC'de gerçekleşen reaksiyon sırasındaki katekol oksidasyon ürünü zamana karşı 420 nm'deki soğurma (absorbans) değişimi olarak belirlendi ve aktivite buna göre hesaplandı. Enzim aktivite değeri başlangıç reaksiyon hızı ve katekolün okside olma katsayısı olan 3450 M^{-1} cm^{-1} değeri kullanılarak belirlenmiştir (Ögel, 2006). 1 ünite aktivite, 1 nanomol katekolü 1 dakikada okside edebilen enzime karşılık gelmekte ve Şekil 2.3b'de gösterilmektedir.

$$\text{CAT aktivitesi (U/ml)} = \frac{(\Delta OD_{240}/\Delta t) \times (1/\varepsilon) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (1000)}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \times \text{Seyreltme faktörü} \quad \text{a}$$

$$\text{PO aktivitesi (U/ml)} = \frac{(\Delta OD_{420}/\Delta t) \times (1/\varepsilon) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (10^6)}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \times \text{Seyreltme faktörü} \quad \text{b}$$

Şekil 2.3. Katalaz (a) ve fenol oksidaz (b) enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler (Yüzügüllü, 2010)

Tablo 2.4. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve model
-80ºC Ultra Derin Dondurucu	WiseCryo
Buzdolabı	Arçelik,5243 NEB No-Frost
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Hassas Terazi	Scaltec SPB31
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Yatay Elektroforez	Cleaver, MSMINI10
Dikey Elektroforez	Biorad
Elektroforez Güç Kaynağı	Cleaver, CS-300
UV Kabin	Biosan UVC/T-AR
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-it imaging system
UV Visible Spektrofotometre	Agilent Cary-60
Ultra Santrifüj	Sigma 4-17K
Mini Santrifüj	Eppendorf 5418
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Sıvı azot tankı	MVE
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	New Brunswick Scientific Excella E24
pH metre	Inolab WTW cond 3401
Etüv	Nüve FN500
Buz Makinasi	Scotsman AF80

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

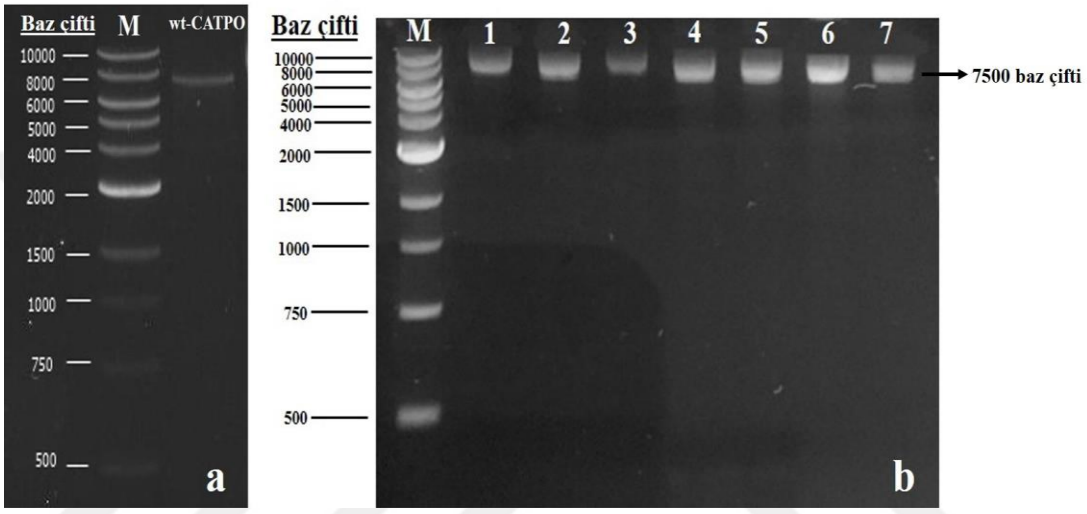
3.1. *Scytalidium catpo* Geni Üzerinde Bölge Yönelimli Mutagenez Çalışmaları

Gerçekleştirilen mutasyonlar ile, termofilik bir mantar olan *S. thermophilum* tarafından üretilen hücre-dışı katalaz (CATPO) enziminin ana kanal yapısının H_2O_2'nin aktif substratının merkeze erişimininde oynadığı olası rolün daha detaylı irdelenmesini hedeflemektedir. Bu doğrultuda wtCATPO'da, aktif bölgeye (Fe/Hem) distal kısımdan uzanan, ana kanalın girişinde bulunan ve H_2O_2'nin aktif bölgeye ulaşmasından sorumlu olduğu düşünülen Glu484 ve Thr188 amino asitleri üzerinde mutasyonlar gerçekleştirildi.

Glu484 (Glu530, *E. coli* HPII katalazı), kristalize edilmiş ve üç boyutlu yapısı belirlenen katalazlarda korunmuş olan amino asitlerden biridir. Aktif bölgeden yaklaşık 24,3 Å uzaklıkta yer almakta ve ana kanalın giriş kısmında bulunmaktadır. Ana kanalın özellikle hidrofilik amino asitlerce zengin olan bölümünde yer alarak yakınında bulunan Thr188 (Ser234, *E. coli* HPII katalazı) amino asidi ile hidrojen bağı oluşturduğu ve katalaz substratının (=H_2O_2) ana kanala girmesi için düzenli bir solvent zinciri meydana getirdikleri öne sürülmüştür. HPII katalazı ile yapılan çalışmalarda Glu484 kalıntısı daha küçük olan Ala (Alanin) amino asidine dönüştürüldüğünde 'Hem' tipinin '*d*' den '*b*' ye dönüştüğü gözlenmiştir (Jha, 2012). Aynı şekilde Thr188'in daha büyük bir amino asit olan Phe (fenil alanin) amino asidine dönüştürülmesi neticesinde ana kanalın daralarak substratın aktif bölgeye ulaşımı engelleneceğinden 'Hem' oksidasyonunun başarıyla gerçekleşmediği düşünülmektedir (Jha, 2012).

İstenilen nokta mutasyonlarının (Tablo 2.1) meydana getirilmesinde Quikchange Bölge Yönelimli mutasyon kiti kullnıldı. Buna göre, üretici firmanın (Qiagen) talimatı doğrultusunda hazırlanan mutajenik primerler (oligonükleotitler), KOD DNA polimeraz (Merck) enzimi ve $MgSO_4$ varlığında *catpo* geni Bölüm 2.3'de açıklanan şekilde mutasyona uğratıldı ve sonrasında Dpn*I* enzimi ile muamele edilerek mutasyon içermeyen plazmidlerin reaksiyon ortamından uzaklaştırılması sağlandı.

QuikChange reaksiyonları sırasında primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması (primer eşleşmesi) için 55 ila 65°C arası farklı sıcaklıklar denendi. 7,5 kbaz çifti uzunluğunda elde edilmesi beklenen bantlar agaroz jelde gözlendi. Bunlardan T188D (Sentegen) ve T188I (Sentegen) mutasyonu için primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı 55 ila 60°C; T188F (Sacem) ve E484A (Sacem) için 55,9°C; T188A (Sentegen) için 60°C; (Sentegen), E484I (Sentegen) ve E484D (Sentegen) için 63°C olarak belirlendi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. QuikChange sonucu elde edilen farklı CATPO varyantlarından izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü. (a) M, DNA marker (10 kbç, NEB); wtCATPO, (b) M, DNA marker (10 kbç, NEB); 1, E484A; 2, E484D; 3, E484I; 4, T188A; 5, T188D; 6, T188F; 7, T188I. Bağlanma sıcaklıkları 2 ve 7 için 55,9°C; 3 ve 4 için 63°C; 5 için 60°C; 6,8 için 55-60°C'dir

Tablo 3.1. Sekans dizilemede kullanılan ileri (forward) CATPO primerleri

Primer	Oligonükleotit
CATPO_F500	5'-CCGACGAAGGTAACTTCG-3'
CATPO_F700	5'-GTCACGGTATCCCGC-3'
CATPO_F1300	5'-CAGGCTAACCAGAAC-3'

Tablo 3.2. Farklı CATPO varyantlarına ait plazmid DNA miktarları. Bölüm 2.7'de açıklandığı şekilde ölçülmüştür

Mutant	DNA miktarı (ng/µl)
T188A	104
T188D	407
T188F	140
T188I	256
E484D	70,7
E484I	99,7
E484A	268

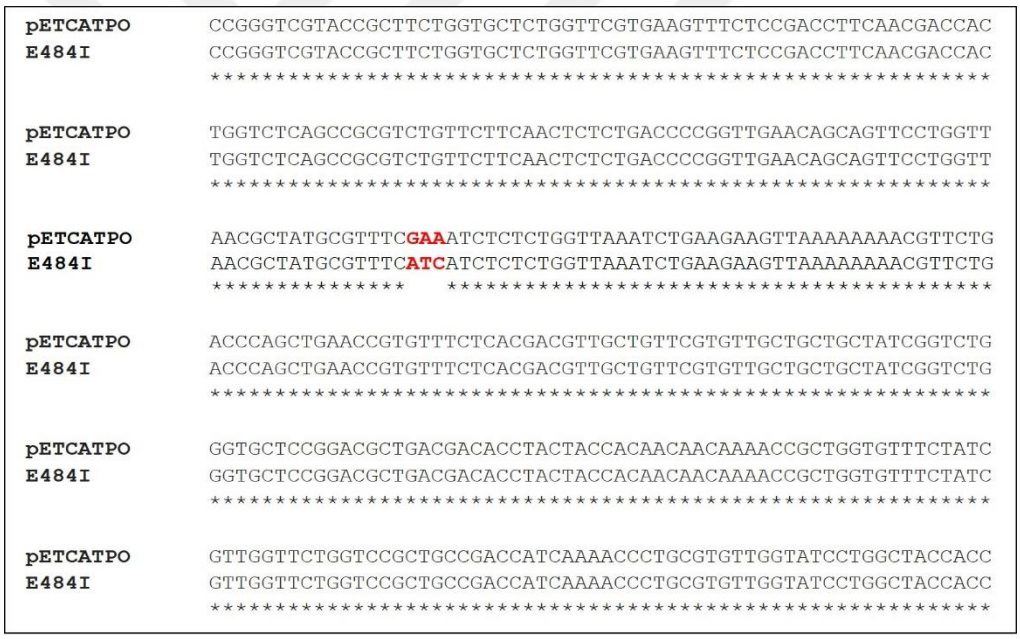
Farklı mutasyonları taşıyan rekombinant plazmidlerin DNA miktarları ölçüldü (Tablo 3.2.) ve sekans dizileme işlemi hizmet alımı ile yapılarak arzu edilen mutasyonların gerçekleşip gerçekleşmediği, CATPO primerleri kullanılarak doğrulandı (Tablo 3.1.).

wtCATPO'ya ait plazmid DNA sekansı (EK-D) ile yedi mutanta ait DNA sekansları CLUSTAL W2 programı kullanılarak karşılaştırıldı ve dizi eşleştirme sonuçları elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mutantlara ait plazmid DNA'ların wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile CLUSTALW2 programı kullanılarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları (Sırasıyla; E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I





Şekil 3.2. (Devam) Mutantlara ait plazmid DNA'ların wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile CLUSTALW2 programı kullanılarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları (Sırasıyla; E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I)



Şekil 3.2. (Devam) Mutantlara ait plazmid DNA'ların wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile CLUSTALW2 programı kullanılarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları (Sırasıyla; E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I)



Şekil 3.2. (Devam) Mutantlara ait plazmid DNA'ların wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile CLUSTALW2 programı kullanılarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları (Sırasıyla; E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I)

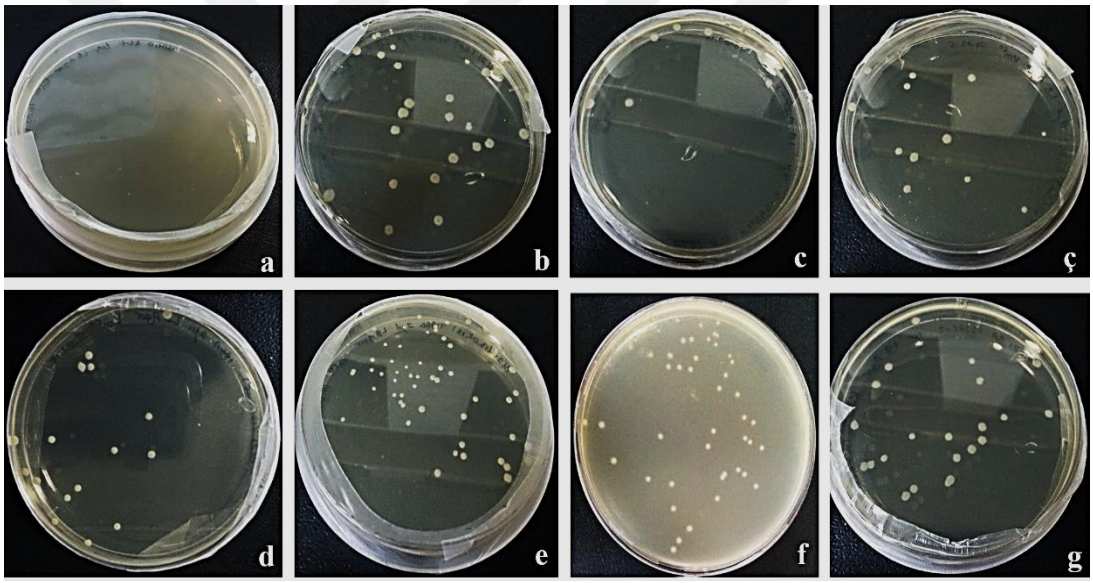
3.2. Farklı CATPO Varyantlarına Ait Plazmidlerin *E.coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

E. coli BL21(DE3) star suşları, protein verimini yükseltmek amacıyla T7 promotor tabanlı ekspresyon sistemi içerisinde geliştirilmiştir. Çünkü T7 RNA polimeraz, *E. coli* RNA polimerazından daha hızlı mRNA sentezlemektedir. Bunun sonucunda, ribozomlar tarafından korunmayan mRNA molekülü sentezlenmekte ve daha sonra iç kaynaklı RNaz'lar tarafından enzimatik olarak yıkıma uğratılmaktadır. Hücre içerisindeki transkripsiyon veriminin azalması protein veriminin azalmasına da neden olmaktadır. Fakat BL21(DE3) star suşları mRNA yıkımının ana kaynaklarından biri olan RNAaz E kodlayan gende bir mutasyon içermektedir. BL21(DE3) star hücreleri önemli ölçüde mRNA transkripsiyonunun stabilitesini arttırarak ve T7 promotor dayalı vektörlerden protein ekspresyon verimini artırmaktadır.

Tasarlanan pETCATPO, *E. coli* periplazması içerisinde eksprese edilmektedir ve ortama Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) eklenerek ifade edilmesi uyarılmaktadır. *E. coli*, sitoplazmasında iç kaynaklı katalaz üretmektedir (HPI ve HPII). Bu üretim CATPO'dan bağımsız olarak uyarılır. *S. thermophilum* CATPO'dan

saflaştırılan doğal enzim yeşil renklidir ve bu '*d*' tipi 'Hem' varlığının göstergesidir. BLAST analizlerinden elde edilen verilere göre *S. thermophilum* CATPO'ya yapısal olarak benzerlik gösteren *P. vitale* katalazı (PDB kodu: 2IUF) yine *E. coli* HPII katalazı (PDB kodu: 1GGE) ile ilişkilidir. Tüm bu katalazlar '*d*' tipi 'Hem' grubu içermektedir (Yüzügüllü. 2010).

İstenilen mutasyonları taşıdığı doğrulanan plazmid DNA'lar *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerine başarıyla transforme edildi (Şekil 3.3.) ve petri üzerinde büyüyen kolonilerden birer tane seçilerek tüm CATPO varyantlarını taşıyan hücreler ayrı ayrı çoğaltıldı. Transformasyon sırasında pozitif ve negatif kontroller yapıldı. Bir koloniden çoğaltılan kültür CATPO proteinlerinin üretiminde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi**.**



Şekil 3.3. 7 farklı nokta mutasyonu taşıyan plazmid DNA'nın *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerinde transformasyon sonuçları. (a) Kontrol, (b) E484A, (c) E484D, (ç) E484I, (d) T188A, (e) T188D, (f) T118F ve (g) T188I

3.3. Farklı CATPO Varyantlarının Rekombinant Üretimi

E.coli HPII katalazı '*d*' tipi 'Hem' grubu içermekte ve durağan faz süresince ifade edilmektedir. Bu yüzden, hücreler durağan faz süresince ve düşük havalandırma (120 rpm) ile büyütüldü. Fakat düşük oksijen içeren büyüme ortamlarında, *E.coli* '*b*' ve '*d*' tiplerinin karışımını üretmektedir. 'Hem' '*b*' içeren HPII'nun 'Hem' '*d*' ye dönüşümü hidrojen peroksit muamelesi ile olabilmektedir (Loewen ve diğ., 1993). Bu durum aynı

zamanda *E.coli* sitoplazması içinde uyarıldığında *S. thermophilum* CATPO için de muhtemeldir. Çünkü sıcaklık 30ºC'ye ve IPTG konsantrasyonu 0.1 mM'a düşürüldüğünde pET28a T7 promotoru kuvvetli bir uyarım gerçekleştirmektedir (Kimoto ve diğ., 2008).

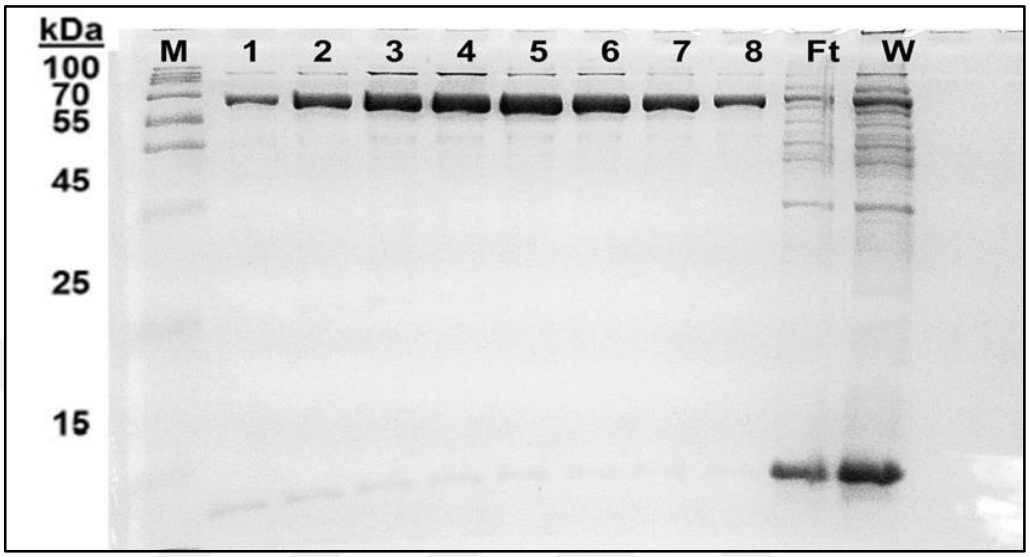
Yukarıda verilen katalaz ekspresyonu ile ilgili bilgiler göz önüne alındığında başlangıç ekspresyonu için 120 rpm'de üç farklı sıcaklık (20, 30 ve 37ºC) denenmiştir. Katalaz aktivite sonuçları bu üç sıcaklık içerisinde ve IPTG ilavesi sonucu, 30ºC'de protein ekspresyonunun diğer sıcaklıklardan daha yüksek olduğunu göstermiştir (Yüzügüllü. 2010).

7 farklı CATPO varyantının rekombinant üretimi Bölüm 2.9'da açıklandığı şekilde gerçekleştirildi ve hücreler ileride protein saflaştırılma aşamasına kadar -80 ºC'de saklandı. Çamur haline getirilen hücrelerden T188A ve E484D mutasyonu taşıyanlar "yeşil" renkli gözlenirken; T188I, T188F, T188D, E484A ve E484I proteinlerini üreten hücrelerin ise "süt kahvesi" renginde oldukları görüldü. Hücrelerin renklerinde görülen bu değişiklikler aktif bölgede bulunan ′Hem′ grubunun değiştiğini işaret etmektedir. Nitekim daha önce CATPO ile yapılan mutasyon denemelerinde '*d*' tipi ′Hem′ grubu içeren hücrelerin yeşil renkte, '*b'* tipi ′Hem′ taşıyan hücrelerin ise süt kahvesi renginde gözlendiği vurgulanmıştır (Yüzügüllü, 2013a).

3.4. Rekombinant wtCATPO ve Varyantlarının Saflaştırılması

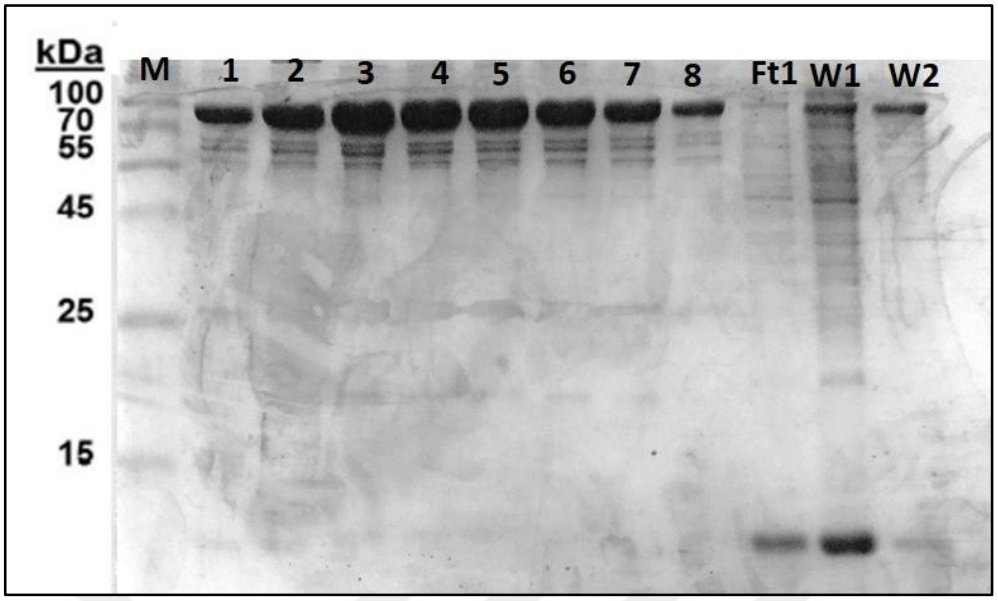
Rekombinant yabanıl tip (wt) CATPO ve yedi farklı varyantı (E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I) afinite kromatografi yöntemi ile tek basamakta saflaştırıldı. Ni^{+2} iyonu geçirilmiş His-bağlı Ni-NTA resini protein yüzeyinde bulunan histidin moleküllerini seçici olarak tutma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle çalışmada kullanılan tüm rekombinant CATPO varyantlarının, histidin içermeleri sebebiyle, kolon resininden elüsyonları NaCl (0.5 M) ve imidazol (25-500 mM) içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile mümkün olmuştur.

Rekombinant wtCATPO proteini kolondan, artan imidazol konsantrasyonunda (0,25-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.4.). Saf wtCATPO proteini 270-450 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



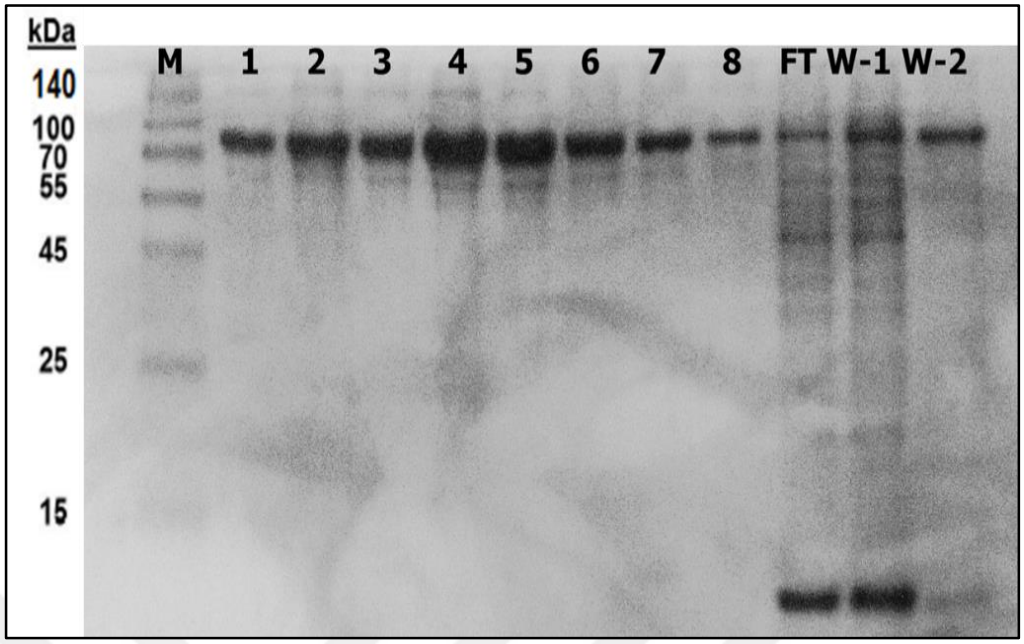
Şekil 3.4. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan wtCATPO varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieve, Lonza); *1-8*. Sıra arası, 270-450 mM imidazol içeren *15.-21.* fraksiyonlar, *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W*, 0,5 M NaCl ve 25 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım

E484A proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 - 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.5.). Saf E484A proteini 150-250 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



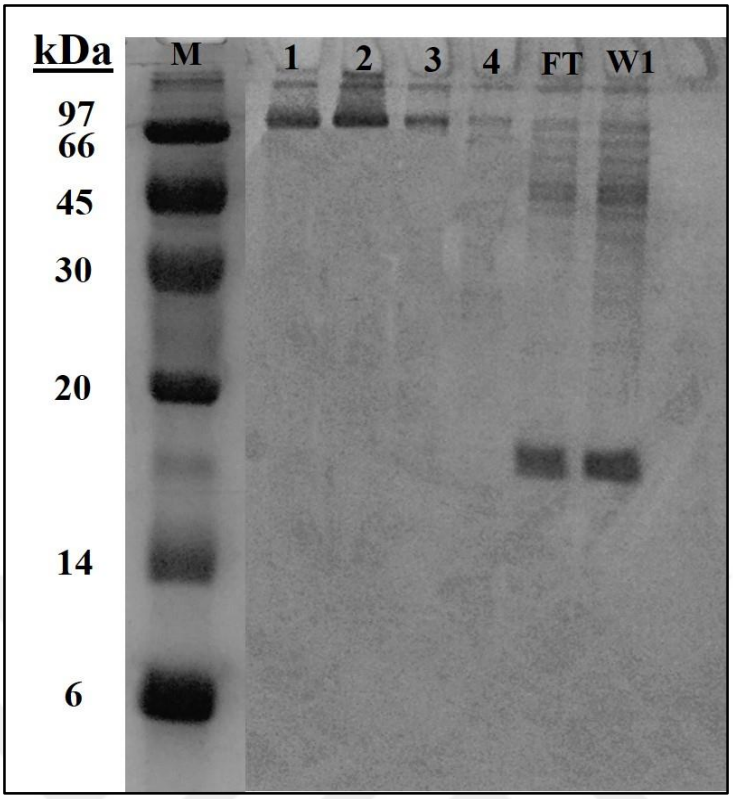
Şekil 3.5. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484A varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M,* protein markör (marker) (ProSieve, Lonza); *1.-8.* Sıra arası, 150-250 mM imidazol içeren *8.-15.* fraksiyonlar, *Ft,* kolona bağlanmadan geçen süzüntü ; *W1,* 0,5 M NaCl ve 45 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım; *W*2, 0,5 M NaCl ve 95 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanan kısım

E484D proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 – 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.6.). Saf E484D proteini 140-290 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



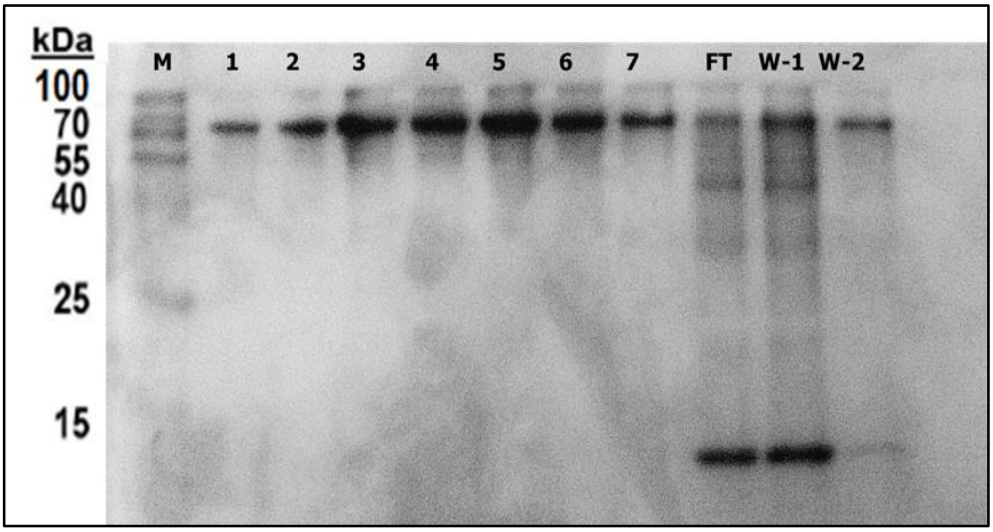
Şekil 3.6. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484D varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieve, Lonza); *1.-8.* Sıra arası, 160-290 mM imidazol içeren *9.-18.* fraksiyonlar, *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 45 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım; *W2*, 0,5 M NaCl ve 95 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanan kısım

E484I proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 - 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplanmış ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.7.). Saf E484I proteini 290-470 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edilmiştir.



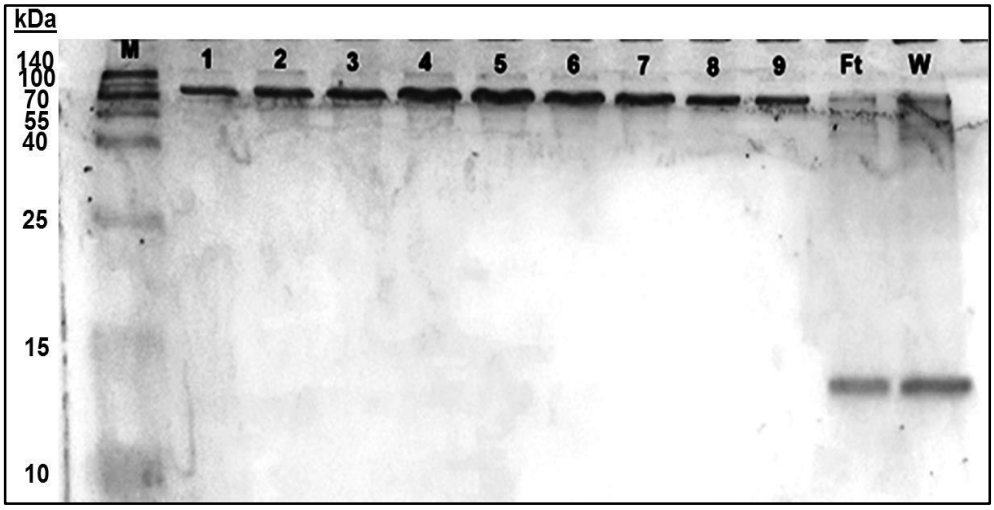
Şekil 3.7. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan E484I varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieve, Lonza); *1.-4.* Sıra arası, 290-470 mM imidazol içeren *24-27*. fraksiyonlar, *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 25 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım

T188A proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 – 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.8.). Saf T188A proteini 135-240 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



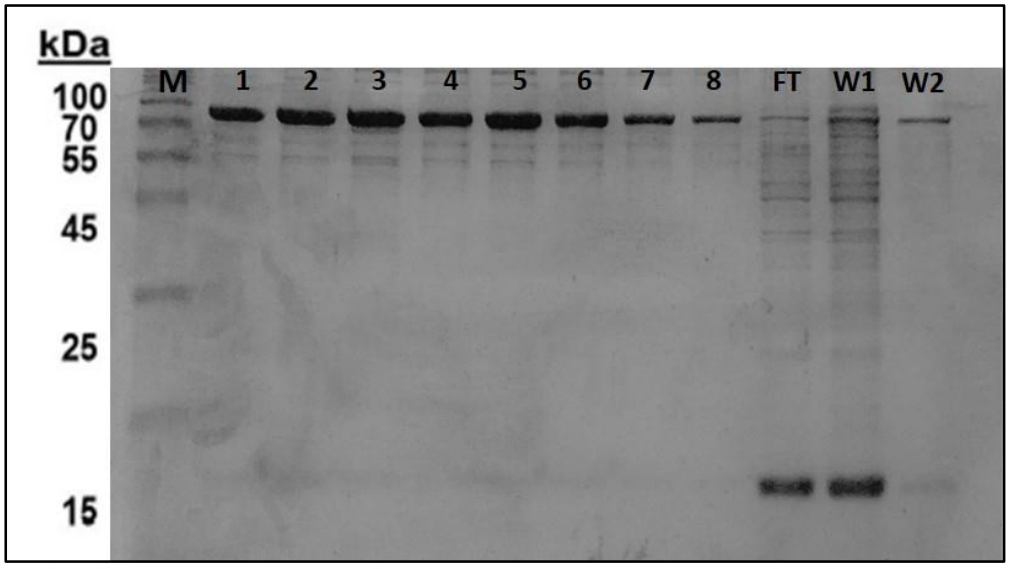
Şekil 3.8. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188A varyant proteinin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieve, Lonza); *1.-7.* Sıra arası, 135-240 mM imidazol içeren *7.-13.* fraksiyonlar, *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 45 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım; *W2*, 0,5 M NaCl ve 95 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanan kısım

T188F proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 – 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.9.). Saf T188F proteini 135-270 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



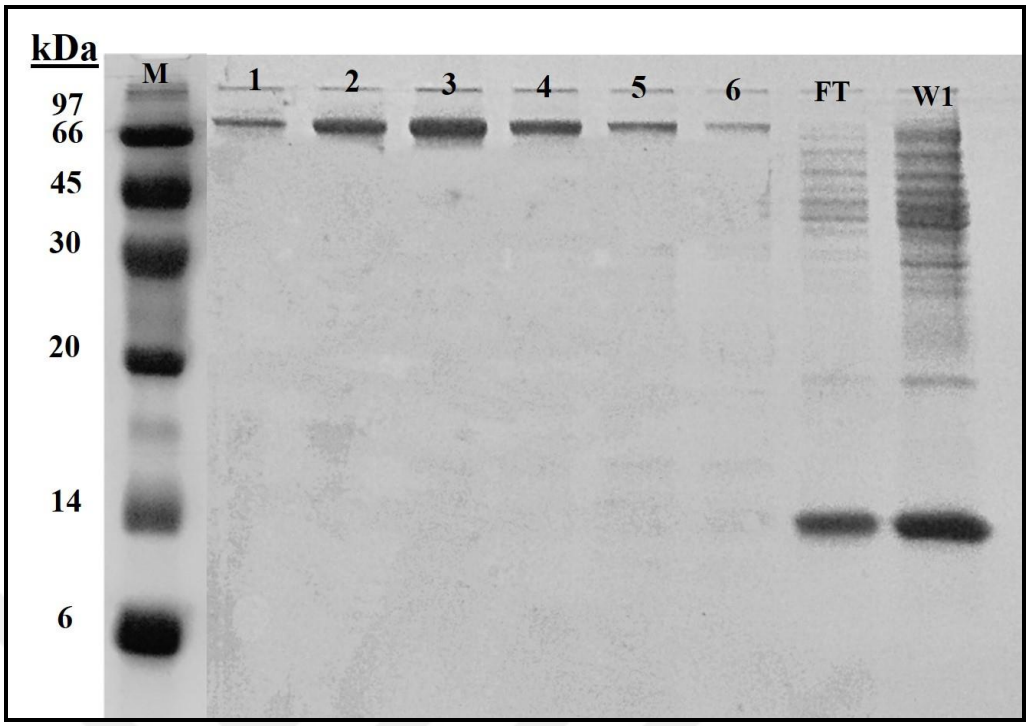
Şekil 3.9. Histidin bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieveTM, Lonza); *1.-9.* sıra arası, 135-270 mM imidazol içeren *7.-16.* Fraksiyonları; *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 45 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım; *W2*, 0,5 M NaCl , 95 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım

T188D proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 – 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.10.). Saf T188D proteini 150-255 mM İmidazol içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



Şekil 3.10. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188D varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (ProSieveTM, Lonza); *1.-8.* sıra arası, 150-255 mM imidazol içeren *8.-15.* Fraksiyonları; *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 45 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım; *W2*, 0,5 M NaCl ve 95 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım

T188I proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,1 – 0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.11.). Saf T188I proteini içeren fraksiyonlar toplanarak konsantre edildi.



Şekil 3.11. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan T188I varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. *M*, protein markör (marker) (Bio-Rad); *1.-4.* sıra arası, 290-340 mM imidazol içeren 2*3.-26.* Fraksiyonları; *Ft*, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; *W1*, 0,5 M NaCl ve 25 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanan kısım

wtCATPO ve yedi varyant, Ni-Afinite Kromatografi tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde saflaştırıldı ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azotta dondurulup -80°C'ye kaldırıldı.

Saflaştırma işlemi sırasında E484A, E484D, T188A, T188D ve T188F varyantları için 20 mM İmidazol içeren bağlama (Binding) tamponu kullanıldı. Elüsyon işlemi sırasında yüksek oranda protein kaybı gözlenmedi fakat T188I ve E484I varyantları için optimizasyon işlemi uygulandı. Bu iki varyantın saflaştırılmasında kullanılacak bağlama (Binding) tamponu içerisinde bulunan İmidazol konsantrasyonu 5, 10 ve 20 mM olarak denendi. Optimum İmidazol konsantrasyonu içeren Bağlama (Binding) tamponu bu denemeler sonucunda 1 mM olarak seçildi ve saflaştırma işlemi başarılı bir şekilde yapıldı.

Saflaştırma işlemi sırasında 10 mM ve 20 mM İmidazol içeren Bağlama (Binding) tamponu kullanıldığında elüsyon işlemi öncesi yıkama sırasında bir miktar protein kaybı olduğu SDS-PAGE sonucunda görüldü. 5 mM İmidazol içeren Bağlama

(Binding) tamponu kullanıldığında ise 10 ve 20 mM İmidazol içeren Bağlama (Binding) tamponuna göre yıkama solüsyonunda daha az protein kaybının gerçekleştiği gözlendi. wtCATPO ve tüm varyatlarının protein miktarı EK-C'de belirtildiği şekilde Bradford metodu kullanılarak ölçüldü ve Tablo 3.2.'de verildi. wtCATPO ve varyantlara ait saflaştırma verimini gösteren değerler ise Tablo 3.3.'de belirtildi.

Tablo 3.2. wtCATPO ve varyantların protein miktarı

Varyant	Protein miktarı (mg/ml)
wtCATPO	22,07
E484A	107,9
E484D	104,15
E484I	54,12
T188A	76,6
T188D	89,65
T188F	46,57
T188I	150,11

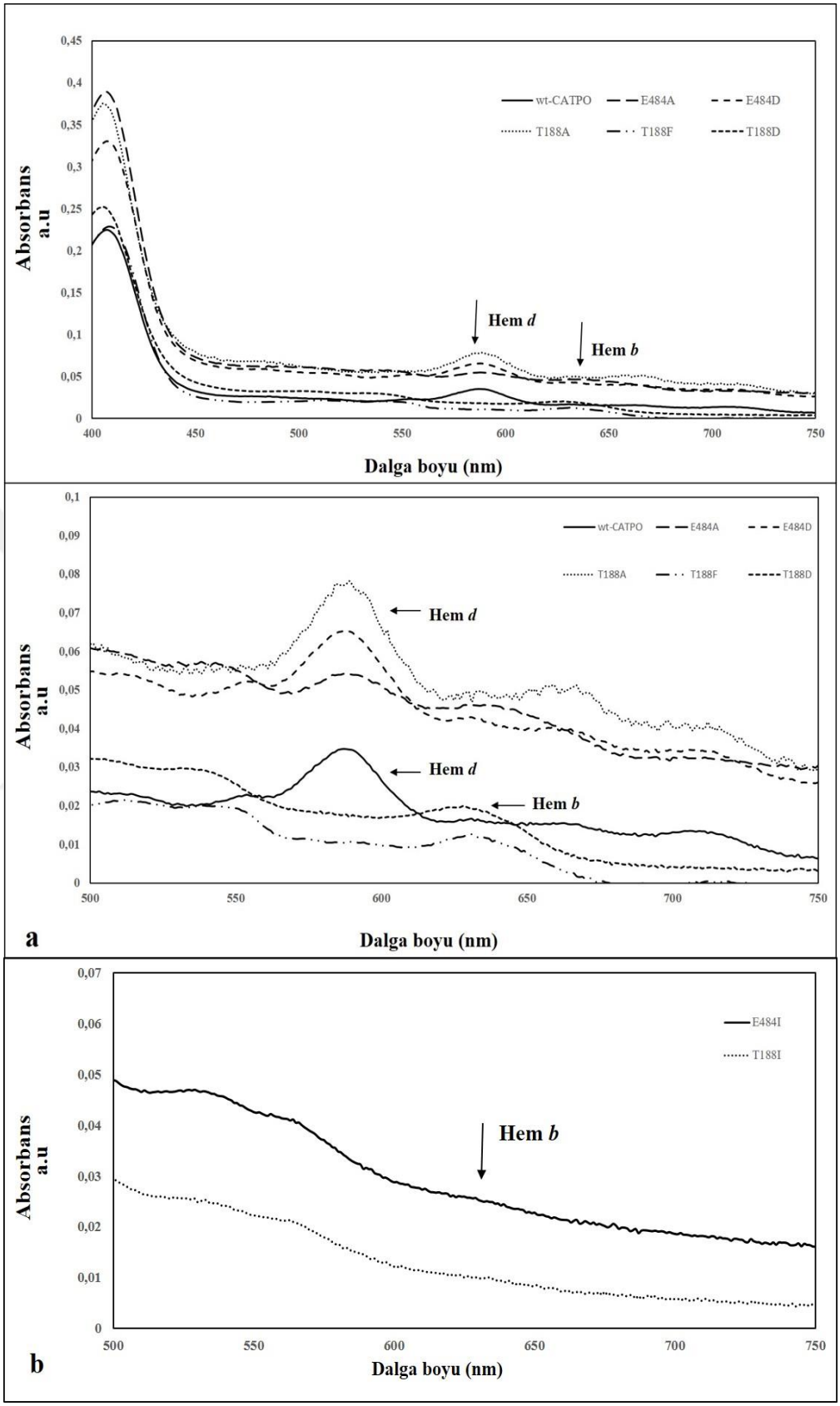
3.4. Görünür Bölge Spektrum Analizi

Saf haldeki rekombinant wtCATPO ile yedi varyantının (E484A, E484D, E484I, T188A, T188D, T188F ve T188I) içerdikleri 'Hem' fonksiyonel grubunun çeşidini ve miktarını incelemek ve bunları birbirleriyle karşılaştırmak amacıyla 200-900 nm arasında UV spektrum analizleri gerçekleştirildi (Şekil 3.12.).

Doğal CATPO'nun UV-Görünür spektrumu incelendiğinde 280, 406, 592 ve 691 nm de maksimum absorbsiyon gösterdiği bulunmuştur (Yüzügüllü, 2013b). Bu pikler incelendiğinde birinci pik (280 nm) örneğin protein içeriğini, ikinci pik (406 nm) örneğin Fe/Hem içeriğinin göstergesi olan Soret bandı vermektedir. Diğer iki pik ise (584 nm ve 691 nm) 'Hem' tipinin tanımlanmasından sorumludur. Bu sonuçlar *E. coli* HPII katalazı ile benzerlik göstermektedir. UV-Vis spektroskopiden elde edilen absorbsiyon pikleri 407, 590 ve 715 nm olarak verilmiştir (Loewen ve diğ., 1993). HPII katalazının '*d*' tipi 'Hem' grubu içerdiği ve yeşil renkli olduğu rapor edilmiştir

ve CATPO'nun '*d*' tipi 'Hem' grubu içerdiği spektroskopi çalışmaları sonucunda bulunmuştur (Yüzügüllü, 2013a).

Rekombinant wtCATPO (Şekil 3.12.) ve yedi mutant proteinin UV spektrumları incelendiğinde yedi proteinin de belirgin bir 'Hem' grubu içerdiği (Soret band, 406 nm) gözlendi. Bunlardan E484D ve T188A'nın '*d'* tipi 'Hem' içerdiği, E484A, E484I, T188I, T188D ve T188F proteinlerinin ise '*b'* tipi 'Hem' grubu içerdiği gözlendi (Şekil 3.12.). E484D ve T188A varyantının wtCATPO'ya benzer şekilde UV spektrumunda 406 ve 590 nm'de maksimum absorpsiyon gözlenirken; E484A, E484I, T188F, T188D ve T188F'de ise 'Hem' grubunun varlığını belirten 406 nm'de bir Soret bandı gözlendi; ancak '*d*' tipi 'Hem' grubu için karakteristik olan 590 nm'deki maksimum absorpsiyon bandının kaybolduğu ve bunun yerine '*b*' tipi 'Hem' içeren proteinlerde gözlenen 630 nm bandının ortaya çıktığı görüldü.



Şekil 3.12. (a) Rekombinant wtCATPO ve E484A, E484D, T188A, T188D ve T188F mutant proteinlerinin karşılaştırılması; (b) *'d'* ve *'b'* tipi 'Hem' gruplarına ait maksimum absorbsion değerleri (590 ve 630 nm) görülmektedir

HPII katalazı ile yapılan çalışmalarda Glu484 kalıntısı daha küçük olan Ala (alanin) amino asidine dönüştürüldüğünde 'Hem' tipinin *'d'* den '*b*' ye dönüştüğü gözlenmiştir (Jha, 2012). Aynı şekilde wtCATPO ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucu Glu484 amino asidinin Ala (alanin) amino asidine dönüştürülmesi sonucu elde edilen E484A mutantının da *'b'* tipi 'Hem' grubu içerdiği hem spektroskopik hem de kristalizasyon (Balcı, yayınlanmamış bulgu) çalışmaları sonucu gözlendi. Aynı özelliklerde yan zincire sahip olan Ile (izolösin) amino asidine dönüştürüldüğünde yine '*b'* tipi 'Hem' grubu içerdiği spektroskopik olarak gözlemlenirken, Glu484'ü asidik yan zincire sahip olan Asp (aspartik asit) amino asidine dönüştürülmesi sonucu ise '*d*' tipi 'Hem' grubunun değişmediği bulundu (Şekil 3.12a.).

Thr188'in daha büyük bir amino asit olan Phe (fenil alanin) amino asidine dönüştürülmesi neticesinde ana kanalın daralarak substratın aktif bölgeye ulaşımı engelleneceğinden 'Hem' oksidayonunun başarıyla gerçekleşmediği düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak T188F mutantının '*b*' tipi 'Hem' grubu içerdiği hem spektroskopik olarak hem de kristalizasyon çalışmaları sonucu kanıtlandı (Balcı, yayınlanmamış bulgu). Yine aynı şekilde Thr188 amino asidi yan zinciri polar olan Asp (aspartik asit) ve apolar olan Ile (izolösin) amino asitlerine dönüştürüldüğünde de *'b'* tipi 'Hem' grubu içerdiği spektroskopik olarak kanıtlandı (Şekil 3.12.).

Thr188'in daha küçük bir amino asit olan Ala (alanin) amino asidine dönüştürülmesi sonucu T188A mutantında '*d*' tipi 'Hem' grubunun varlığı gözlendi (Şekil 3.12a). Aktif bölgeden oldukça uzakta bulunan bu amino asidin daha küçük bir amino aside dönüştürülmesi sonucu ana kanalın açılması ve dolayısıyla aktif bölgede 'Hem' oksidasyonunu yani '*b*' tipi olan protoforfirin IX yapısının okside olarak '*d*' tipi 'hem' grubuna dönüşmesi olası gözükmektedir (Loewen, 1993).

3.5. Rekombinant wtCATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Oksidaz aktivitesine sahip *Scytalidium* katalazının (CATPO) substratı olan hidrojen peroksitin aktif bölgeye nasıl ulaştığının anlaşılması üzerine ana kanal üzerinde yer alan ve aktivitede önemli rolü olduğu düşünülen amino asitler değişikliğe uğratıldı. Bunlardan Glu484 ve Thr188, yukarıda açıklandığı gibi ana kanal üzerinde bulunmaktadırlar ve ana kanalın farklı karakterde olan hidrofilik ve hidrofobik

kısımları birbirine bağlayan bölgede yer almaları sebebiyle substratın aktif bölgeye yönlendirilmesinde kapı görevi üstlendikleri düşünülmektedir (Jha, 2012).

Glu484 tüm katalazlarda korunmuş bir amino asittir. Mutasyon çalışmaları sırasında daha kısa ancak aynı karakterde olan Asp484, apolar yapıdaki Ala484 ve alifatik yan zincire sahip Ile484'e Bölüm 2.2 ve 2.3'de açıklanan metotla dönüştürüldü.

Thr188 ise polar yapıda bir amino asittir ve asidik karaktere sahip Asp188, apolar yapıda olan Ala188, alifatik yan zincire sahip Ile188 ve aromatik özellik gösteren Phe188 amino asitlerine aynı yöntemle dönüştürüldü. Mutasyonu doğrulanan plazmid DNA'ları taşıyan koloniler seçilip rekombinant üretimleri ve sonrasında bu varyantların Ni-Afinite kromatografi yöntemi ile tek basamakta saflaştırılması gerçekleştiridi.

Saf proteinlerin katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktivite tayinleri 60°C sıcaklıkta Bölüm 2.13'te belirtilen şekilde gerçekleştirildi. wtCATPO ve yedi varyantının spesifik aktivite değerleri Tablo 3.3'de karşılaştırılmaktadır.

Tablo 3.3. Saflaştırılmış CATPO ve varyantlarının spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması

Varyant	Spesifik Aktivite		% Relatif akitive		
	Katalaz ($\mu mol\ ml^{-1}\ mg^{-1}$)	Fenol Oksidaz ($nmol\ ml^{-1}\ mg^{-1}$)	Katalaz	Fenol Oksidaz	Hem Tipi / R_z değeri
wtCATPO	18055 ± 1455	236 ± 8	100	100	*d* / 0,9
E484A	6525 ± 51	48 ± 2	36	20	*b* / 0,6
E484D	16204 ± 1880	134 ± 5,3	90	57	*d* / 0,8
E484I	167 ± 14	135 ± 3	1	57	*b* / 0,065
T188A	11840 ± 1304	71 ± 3.,2	65	30	*d* / 0,7
T188D	3606 ± 65	26.5 ± 1,7	20	11	*b* / 0,5
T188F	4930 ± 106	110 ± 9	27	47	*b* / 0,4
T188I	166 ± 3	223 ± 22	1	94	*b* / 0,3

Saflaştırılan mutant proteinlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında, Glu484Ala mutantı göz önüne alındığında, Glu484'ün daha küçük yan zincire sahip olan apolar yapıdaki Ala (Alanin) amino asidine dönüştürülmesi sonucu kanal girişinin açık olmasına rağmen aktif bölgeye substrat girişinin düşük miktarda olması ilk aşamada '*b*' tipi

oluşan ‘Hem’ grubunun ‘*d*’ tipine dönüşmesini gerçekleştirmemiş olarak gözükmektedir (Şekil 3.12.). Bu sebeple E484A mutantının katalaz aktivitesinde yaklaşık %64’lik bir düşüş gözlenirken, fenol oksidaz aktivitesinde ise bu gözle görülür niteliktedir (%80).

Glu484 amino asidinin aynı yapıda fakat daha küçük asidik yan zincire sahip Asp (Aspartik asit) amino asidine dönüştürülmesi sonucu ana kanalın açılması ve dolayısıyla aktif bölgede 'Hem' oksidasyonunu yani '*b*' tipi olan protoforfirin IX yapısının okside olarak '*d*' tipi 'hem' grubuna dönüştüğü (Şekil 3.12.) gözlendi. Yabanıl tip ile aynı ‘Hem’ tipine sahip olan E484D mutantının da katalaz aktivitesinin korunduğu (%90); ancak fenol oksidazın %43’lük bir aktivite kaybı gösterdiği bulundu.

Son olarak Glu484’in Ile (İzolösin) amino asidine dönüştürülmesi sonucunda, E484I mutantının ‘*b*’ tipi ‘Hem’ içerdiği spektroskopik olarak bulundu (Şekil 3.12.). Buna bağlı olarak katalaz aktivitesinde gözle görülür derecede düşüş gözlenirken (%1); fenol oksidaz aktivitesi ise wtCATPO enziminin yaklaşık %57’sine denk olduğu gözlendi (Tablo 3.2.).

Thr188 üzerinde gerçekleştirilen mutasyonlardan ilki apolar ve küçük yan zincire sahip Ala (Alanin) amino asididir. T188A varyantı yabanıl tip ile benzer olarak ‘*d*’ tipi ‘Hem’ grubu içerdiği spektroskopi çalışmaları sonucu gözlendi (Şekil 3.12.). Katalaz aktivitesinde %35’lik, fenol oksidaz aktivitesinde ise %70’lik bir düşüş gözlendi (Tablo 3.2.).

Thr188’in asidik yapıda yan zincire sahip Asp (Aspartik asit) amino asidine değiştirilmesi sonucunda ‘*b*’ tipi ‘Hem’ grubu içerdiği bulundu (Şekil 3.12.). Her iki aktivitede de gözle görülür bir düşüş gözlendi (Sırasıyla %80 ve %89 olmak üzere).

Thr188 de apolar yapıda ve daha büyük yan zincire sahip Phe (Fenil alanin) amino asidine dönüştürüldü. T188F varyantı ‘*b*’ tipi ‘Hem’ grubu içermektedir (Şekil 3.13). Katalaz aktivitesi 4930 U/mg, fenol oksidaz aktivitesi ise 110 U/mg bulundu. Aktivitelerde gözlenen düşüş ‘Hem’ tipinin değişmesi ile ilişkili gözükmektedir (Tablo 3.2.).

Son olarak Thr188 amino asidinin apolar yapıda ve daha büyük yan zincire sahip Ile (İzolösin) amino asidine değiştirilmesi sonucunda; '*b*' tipi 'Hem' grubu içerdiği (Şekil 3.12.) ve katalaz aktivitesinin 166 U/mg bulunurken, fenol oksidaz aktivitesi ise yaklaşık olarak yabanıl tip ile benzer bulundu, 223 U/mg. Buda fenolik substratların ana kanalı kullanarak aktif bölgeye ulaştığını gösterir niteliktedir (Tablo 3.2.).

Tüm CATPO varyantlarının spesifik (katalitik) aktiviteleri karşılaştırıldığında Glu484 ve Thr188'in önemli roller oynadığı gözlendi. Bu amino asitler farklı özelliklere sahip başka amino asit kalıntılarına dönüştürüldüklerinde aktivitelerde belirgin düşüşler kaçınılmazdır. İlginç olan sonuç ise Thr188'in Ile (İzolösin) amino asidine dönüştürülmesinde karşımıza çıkmaktadır. Katalaz aktivitesi bu değişimden dramatik bir şekilde etkilenirken oksidaz aktivitesinde herhangi bir belirgin değişiklik gözlenmedi. Bu da bize oksidaz substratlarının ana kanala alternatif bir yol izleyebileceklerini vurgulamaktadır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *S. thermophilum*-CATPO ana kanal yapısında bulunan Glu484 ve Thr188 amino asitleri üzerinde Quikchange tekniği kullanılarak çeşitli mutasyonlar gerçekleştirdi. Mutasyonu doğrulanan varyantların *E. coli* XL-1 Blue alıcı hücrelerine ve BL21(DE3) star ekspresyon suşlarına aktarımı yapıldı. Bu basamaktan sonra mutantlar 50 μg/ml kanamisin ve 0,1 mM IPTG ilave içeren 1 L Luria Broth (LB) besiyerinde 30^{o}C'de 120 rpm'de 24 saat büyütüldü. 10000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak süpernatandan ayrılıp saflaştırma için çöktürülen hücreler -80^{o}C'de saklandı.

Saflaştırma için -80^{o}C'de stoklanan varyantlar 100 ml lizis tamponu içerisinde 3 saat lizize maruz bırakıldıktan sonra 10000 rpm'de çöktürülerek süpernatan kısmı bir gece boyunca bağlama tamponuna (0.5 M NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7.4) karşı diyaliz edildi ve saflaştırma aşamasında kullanılmak üzere hazır duruma getirildi.

S. thermophilum-CATPO ve varyantları için yapılan saflaştırma için affinite kromatografi tekniği kulanıldı. Bu yöntemde, His-etiketli protein için ProtinNi-NTA, 1 mL'lik kolonlar kullanıldı. 1,5 ml/dk akış hızı ile E484A, E484D, T188A, T188D, T188F varyantları için 20 mM İmidazol içeren bağlama tamponu; E484I ve T188I için ise 5mM İmidazol içeren bağlama tamponu kullanıldı. Kolondan alınan protein örnekleri 1 ml fraksiyonlar halinde toplandı ve FPLC cihazında 280 nm'de absorbans veren fraksiyonlar seçilerek 20 mM sodyum fosfat (pH 7.4) tampon çözeltisine karşı diyaliz işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra fraksiyonlar 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek wtCATPO ve yedi varyantın protein miktarı ölçümü ve enzim aktivite tayini yapılmak için sıvı azotta dondurularak -80^{o}C'de saklandı.

100 mM sodyum fosfat pH 7.0 tampon çözeltisi ile, *S. thermophilum* katalaz enzimi için substrat olarak 10 mM H_2O_2 kullanılarak 240 nm'de, fenol oksidaz enzimi için substrat olarak ise katekol kullanılarak 420 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı.

Saflaştırma işlemi sonucunda wtCATPO'dan 22,07 mg/ml protein elde edilirken, varyantlardan ise yaklaşık 89,87 mg/ml protein elde edildi. Her bir mutantın UV-Vis spektrum verileri incelendiğinde wtCATPO ile aynı 'Hem' tipine sahip olan E484D ve T188A varyantlarının '*d*' tipi 'Hem' içerdiği gözlenirken, E484A, E484I, T188D, T188F ve T188I varyantlarının '*b*' tipi 'Hem' içerdiği gözlendi.

wtCATPO ve yedi varyantın katalitik aktiviteleri karşılaştırıldığında, '*b*' tipi 'Hem' grubu içeren E484A varyantında katalaz ve oksidaz aktivitelerinin her ikisinde de gözle görülür bir düşüş gözlendi. Bu düşüşün wtCATPO ile E484A varyantının 'Hem' tipinin farklılığından kaynaklandığı varsayıldı. Yine '*b*' tipi 'Hem' içeren E484I varyantında da katalaz aktivitsinde ciddi anlamda bir düşüş gözlendi, %1. Fenol oksidaz aktivitesi ise wtCATPO'ya göre %57 oranında korunduğu ölçüldü. wtCATPO ile aynı 'Hem' tipine sahip olan E484D varyantının katalaz aktivitesi yabanıl tipe göre %90, fenol okidaz aktivitesi ise %57 oranında bulundu. '*b*' tipi 'Hem' grubu içeren Thr188 mutantlarından T188D, T188F ve T188I varyantlarının katalaz aktivitelerinde gözle görülür bir düşüş gözlendi (Sırasıyla bunlar; %20, %27 ve %1). Aynı şekilde T188D ve T188F varyantlarının fenol oksidaz aktivitelerinde düşüş gözlenirken, (sırasıyla %11 ve %47), T188I varyantının fenol oksidaz aktivitesinin % 94 oranında korunduğu gözlendi. wtCATPO ile benzer olarak '*d*' tipi 'Hem' grubuna sahip olan T188A varyantının katalaz aktivitesi %65, fenol oksidaz aktivitesi ise yabanıl tip enziminin %30'una denk bir değerde olduğu bulundu.

Ana kanal üzerinde yapılan çalışmalarda H_2O_2'nin aktif bölgeye bu kanal üzerinden ulaştığı doğrulandı. Ancak oksidaz substratlarının alternatif bir yol izlediği düşünülmektedir. Bu nedenle oksidaz mekanizmasının daha detaylı çalışılması üzerine yanal kanal üzerinde bulunan amino asit kalıntıları üzerinde mutasyon çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

Akagawa M., Shigemitsu T., Suyama K., Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasiphysological conditions, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2003, **67**(12), 2632-2640.

Arda M., *Temel Mikrobiyoloji*, 358, Medisan Yayınevi, Ankara, 2000.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2002.

Bingöl G., *Biyokimya*, Güven matbaası, Ankara, 169-174, 1983.

Bravo J., Verdaguer N., Tormo J., Betzel C., Switala J., Loewen P. C., Fita I., Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*, *Structure*, 1995, **3**, 491–502.

Bravo J., Mate M. J., Schneider T., Switala J., Wilson K., Loewen P. C., Fita I., Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution, *Proteins*, 1994, **34**, 155–66.

Brock T. D., Madigan M. T., *Biology of Microorganisms, 5th Ed*., PrenticeHall Inc., New Jersey, USA, 1988.

Chelikani P., Fita I., Loewen P. C., Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**, 192–208.

Chelikani P., Carpena X., Fita I., Loewen P. C., *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 31290–31296.

Comporti M., Signorini C., Leoncini S., Gardi C., Ciccoli L., Giardini A., Vecchio D., Arezzini B., Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, *Genes Nutr*, 2010, **5**, 101-109.

Cooney D. G., Emerson R., *Thermophilic fungi*, W.H. Freeman & Comp., San Fransisco, 1964.

Das D., Bishayi B., Contribution of catalase and superoxide dismutase to the intracellular survival of clinic isolates of *Staphylacoccus aureus* in murine macrophages. *Ind J Microbiol*, 2010, **50**, 375-384.

Deveci A., Bazı Pestisitlerin Soya (*Glycine Max* (L.) Merrill Cv. May 5312) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2012, 335452.

Diaz A., Horjales E., Rudiño-Piñera E., Arreola R., Hansberg W., Unusual Cys-Tyr Covalent Bond in a Large Catalase, *Journal of Molecular Biology*, 2004, **342**, 971–985.

Diaz A., Loewen P. C., Fita I., Carpena X., Thirty years of heme catalases structural biology, *Archieves of Biochemstry and Biophysics*, 2012, **525**, 102–110.

Feofilova E. P., Tereshina V. M., Thermophilicity of mycelial fungi in the context of biochemical adaptation to thermal stress, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1999, **35**, 486– 494.

Fita I., Silva A. M., Murthy M. R. N., Rossmann M. G., The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution, *Acta Crystallogrophica-Section B: Structural Crystallogtraphy and Crystal Chemistry*, 1986, **42**, 497–515.

Gouet P., Jouve H. M., Dideberg O., Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH, *J Mol Biol*, 1995, **249**, 933-954.

Gough D. R., Cotter T. G., Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signaling molecule, *Cell Death Dis*, Doi: 10.1038/cddis.2011.96.

Güder S., *Scytalidium thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman, 2014, 343565.

Hakansson K. O., Brugna M., Tasse L., The three dimensional structure of catalase from Enterococcus faecalis, *Acta Crystallographica D*, 2004, **60**, 1374–1380.

Hara I., Ichise N., Kojima K., Kondo H., Ohgiya S., Matsuyama H., Yumoto I., Relationship between the size of the bottleneck 15 Å from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates, *Biochemistry*, 2007, **46**, 11–22.

Jha V., Chelikani P., Carpena X., Fita I., Loewen P. C., Influence of main channel structure on H(2)O(2) access to the heme cavity of catalase KatE of *Escherichia coli*, *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, 2012, **526**, 54–59.

Kıran Ö. E., Çömlekçioğlu U., Dostbil N., Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2006, **9**(1), 12-19.

Kimoto H., Matsuyama H., Yumoto I., Yoshimune K., Heme content of recombinant catalase from Psychrobacter sp. T-3 altered by host *Escherichia coli* cell growth conditions, *Protein Expression and Purification*, 2008, **59**, 357-359.

Kocabas D. S., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalasephenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407-415.

Klotz M. G., Loewen P. C., The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: Evidence for multiple lateral transfer of genes between Prokaryota and from Bacteria into Eukaryota, *Molecular Biology and Evolution*, 2003, **20**, 1098-1112.

Kuk S., ve Erensoy A., Gene Clonning, Selection of Plasmids and Application of Fasciola hepatica Cathepsin L1 Gene, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2008, **32**(1), 1622, 2008.

Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G., Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, **37**, 67-72.

Laemmli U. K., A factor preventing the majör head protein of bacteriophage T4 from random aggregation, *Journal of Molecular Biology*, 1970, **47**, 69-74.

Lehninger A. L., *Principles of Biochemistry*, Worth publisher, Acedemic pres, New York, 587-665, 1982.

Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of the American Chemical Society*, 1934, **56**(3), 658–666.

Loewen P. C., Switala J., Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12, *Biochemistry and Cell Biology*, 1986, **64**, 638–646.

Loewen P. C., Switala J., von Ossowski I., Hillar, A., Christie A., Tattrie B., Nicholls P., Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to cis-heme d, *Biochemistry*, 1993, **32**, 10159–10164.

Loewen P. C., Carpena X., Rovira C., Ivancich A., Perez-Luque R., Haas R., Odenbreit S., Nicholls P., Fita I., Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution, *Biochemistry*, 2004, **43**, 3089–3103.

Loewen P. C., Catalase, *In: Encyclopedia of molecular biology*, Creighton T, J. Wiley & Sons, New York, 351-353, 1999.

Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J. K., Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, **100**, 108-123.

Mate M., Murshudov G., Bravo J., Melik-Adamyan W., Loewen P. C., Fita I., Heme-catalases, *In: Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, Scott R. A., J. Wiley & Sons Press, New York, 486-502, 2001.

Mayer A. M., Harel E. H., Polyphenol oxidase in plants, *Phytochemistry*, 1979, **18**,193-215.

Merle P. L., Sabourault C., Richier S., Allemand D. & Furla P. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, **42**, 236–246.

Murthy M. R. N., Reid T. J., Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M. G., Structure of beef liver catalase, *Journal of Molecular Biology*, 2001, **152**, 465–499, 59–64.

Nicholls P., Fita I., Loewen P. C., Enymology and structure of catalases, *Advances in Inorganic chemistry*, 2001, **51**, 51-106.

Ögel Z. B., Yarangümeli K., Dü H., Ifrij İ., Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production, *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **28**, 689–695.

Ögel Z. B., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir A. S., Production, Properties and Application to Biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**, 853–862.

Rochat T., Bermúdez-Humarán L., Gratadoux J. J., Fourage C., Hoebler C., Corthier G., Langella P., Antinflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganesedependant catalase on DSS-induced colitis in mice, *Microb Cell Fact*, 2007, **6**, 22.

Roe S., *Protein Purification Techniques*, Oxford University Pres, New York, 262, 2006.

Sambrook J., Fritsch E. F., ve Maniatis T., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Pres,* 2nd ed., New York, 1-186, 1989.

Sanchez-Amat A., Solano F., A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp* shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases, *Biochemical and Biophysical Research Comminications*, 1997, **240**, 787-792, 1997.

Seriner R., Katalaz Enziminin Hıyardan (*Cucımis sativus*) Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010, 266225.

Sevinc M. S., Mate M. J., Switala J., Fita I., Loewen P. C., Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli*, *Protein Science*, 1999, **8**, 490–498, 1999.

Stich T. A., Whittaker J. W., Britt R. D., Multifrequency EPR studies of Manganese catalases provide a complete description of proteinaceous nitrogen coordination, *J Phys Chem*, 2010, **114**, 14178-14188.

Straatsma G., Samson R. A., Olijnsma T. W., Op Den Camp H. J. M., Gerrits J. P. G., Van Griensven L. J. L. D., Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium, *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**, 454–458.

Sutay D., Purification, Characterization, Crystallization And Preliminary X-Ray Structure Determnation of *Scytalidium thermophilum* Bifunctional Catalase And Identification of Its Catechol Oxidase Activity, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 198742.

Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalasephenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407–415.

Switala J., Loewen P. C., Diversity of properties among catalases, *ABB Archieves of Biochemistry and Biophysisc*, 2002, **401**, 145–154.

Tekman S., Öner N., *Genel kimya*, I. cilt, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 335-367, 1986.

Tuncer M., *Protein Saflaştırma Kromatografik Teknikler*, Mersin Üniversitesi Yayınları, Mersin, 285, 2008.

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itavaara M., Biodegradation of lignin in a compost environment: a review, *Biosource Technology*, 2000, **72**, 169–183.

Vainshtein B. K., Melik-Adamyan W. R., Bajyuiu V. V., Vagiu A. A., Grcbcuko A. I., Borisov V. V., Bartels K. S., Fita I., Rossmann M. G., Three dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution, *Journal of Molecular Biolology*, 1986, **188**, 49–61.

Vainshtein B. K., Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I., Three dimensional structure of the enzyme catalase, *Nature*, 1981, **197**, 411–412.

Vetrano A. M., Heck D. E., Mariano T. M., Mishin V., Laskin D. L., Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(42): 35372-3538.

Volkert M. R., Loewen P. C., Switala J., Crowley D., Conley M., The _(argF-lacZ)205(U169) deletion greatly enhances resistance to hydrogen peroxide in stationary-phase *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 1994, **176**, 1297-1302.

Whitford D., *Proteins: Structure and Function*, 1st Ed., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 2005.

Wiegant W. M., Wery J., Buitenhuis E. T., De Bont J. A. M., Growthpromoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*, *Applied and Enviromental Microbiology*, 1992, 2654-2659.

Wilson K., ve Walker J., *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, Cambridge University Pres, 2010, 761, New York, USA.

Wiestreich G.A., Lechtman M.D., *Microbiology*, 3rd Ed., Macmillan Publishing Co., USA, 1980.

URL-1: Millard J., Madison Area Technical Collage, *The Biotechnology Project* http://matcmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter_2.htm, 2006 (Ziyaret tarihi: 12 Ekim 2015)

URL-2: Willmot C., *University of Leictester Department of Biochemistry*, http://www.le.ac.uk/by/teach/biochemweb/tutorials/michment2print.html, 2005 (Ziyaret tarihi: 20 Aralık 2015).

URL-3: http://www.revistaecosistemas.net/admin/Archivos/Imagenes.jpg, 2004 (Ziyaret tarihi: 12 Ocak 2016).

URL-4: http://igem.org (Ziyaret tarihi: 10 Aralık 2015)

Yüzügüllü Y., Functional and Structural Analysis of Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium thermophilum,* Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 255456.

Yuzugullu Y., Trinh C. H., Fairhurst L., Ogel Z. B., McPherson M. J., Pearson A. R., Investigating the active centre of the *S. Thermophilum*, *Acta Crystallographica Section F*, 2013a, **69**, 369−375,.

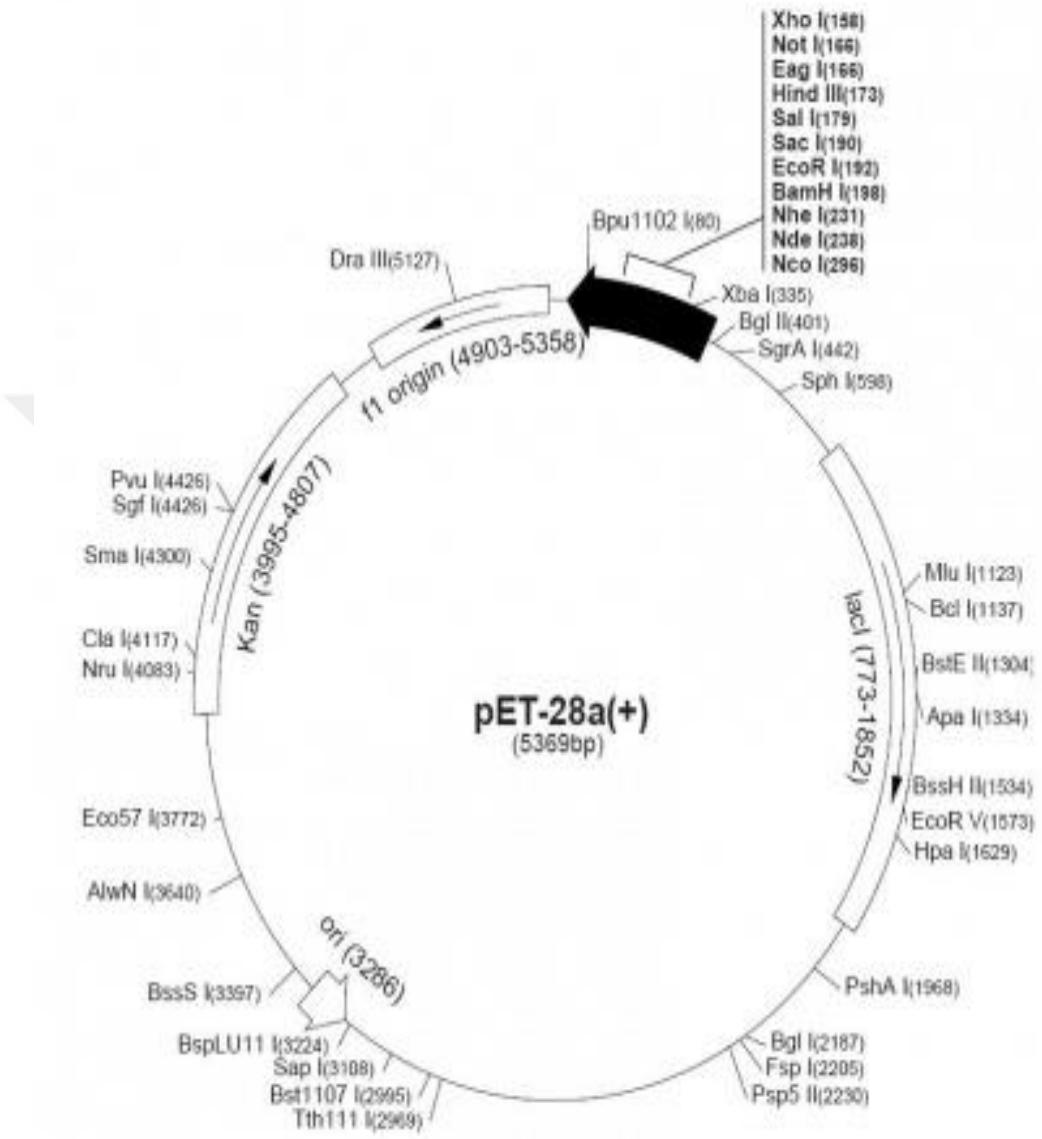
Yuzugullu Y., Trinh C. H., Smith M. A., Pearson A. R., Phillips S. E. V., Sutay Kocabas D., Bakir U., Ogel Z. B., McPherson M. J., Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *S. thermophilum, Acta Crystallographica Section D*, 2013b, **69**, 398−408.

Zamocky M., Koller F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 1999, **72**, 19−66.

EKLER

EK-A

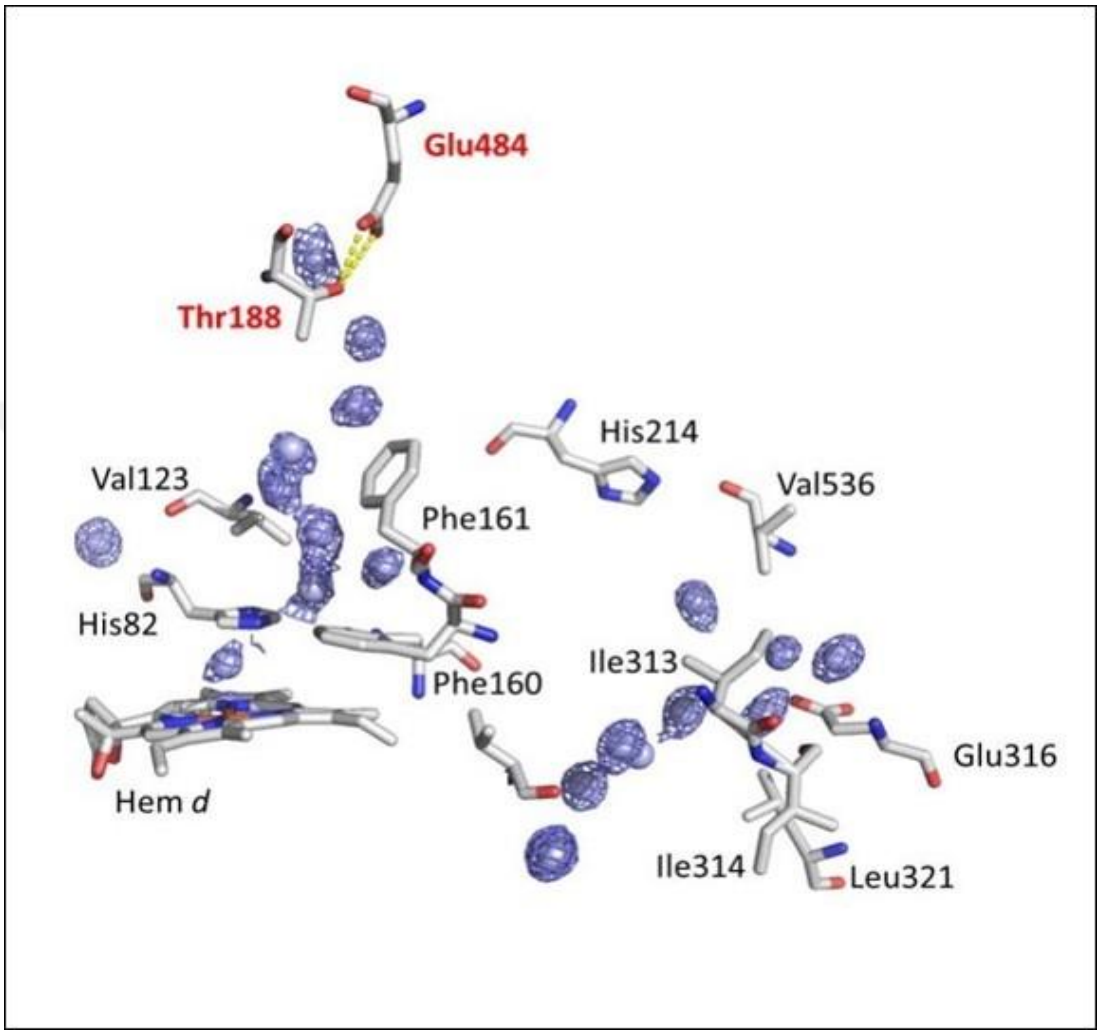
Rekombinant Plazmid Haritası (pET28a-CATPO)



Şekil A.1. pET28a CATPO, Rekombinant Plazmid Haritası

EK-B

Rekombinant CATPO Aktif Bölgesi ve Mutasyona Uğratılan Amino Asitler.(Glu484 ve Thr188) (Pdb kodu: 4aum) PyMOL ile çizilmiştir.



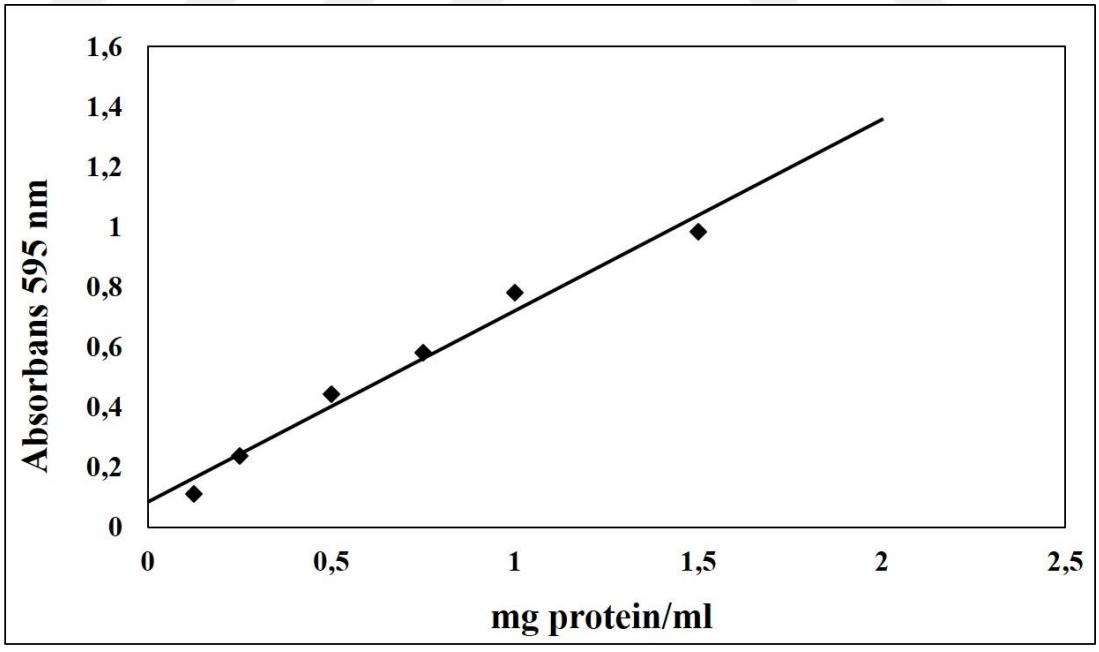
Şekil B.1. Rekombinant CATPO Aktif Bölgesi ve Mutasyona Uğratılan Amino Asitler

EK-C

Bradford Metodu ile Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı, Bradford (1976) tarafından tarif edildiği gibi sığır serum albümin (BSA) standart protein olarak kullanılarak belirlenmiştir. 1 mg/mL stok BSA 100 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7.0) çözdürülerek hazırlanmıştır. Stok çözelti yine aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0, 0,125, 0,25, 0,50, 0,75, 1, 1,5, 2 mg/mL konsantrasyonlarda standart protein çözeltiler hazırlandı. Protein miktarını ölçmek için, 1 ml'lik tüpler içerisine hazırlanan 7 farklı BSA konsantrasyonundan 20 µl konuldu ve üzerine 1 mL Bradford reaktifi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 595 nm'de ölçüm alındı (Şekil C.1..).

Tüp no	Standart/µl	Standart kaynağı	Dilüsyon/µl	Konsantrasyon(µg/ml)
1	70	2 mg/ml stok	0	2000
2	75	2 mg/ml stok	25	1500
3	70	2 mg/ml stok	70	1000
4	35	Tüp 2	35	750
5	70	Tüp 3	70	500
6	70	Tüp 5	70	250
7	70	Tüp 6	70	125
8	0	0	70	0



Şekil C.1. Bradford metodu için kullanılan standart BSA eğrisi

EK-D

Scytalidium thermophlium Katalaz-Fenol Oksidazının Amino Asit Sekansı

Scytalidium thermophlium geni 717 amino asitten oluşmaktadır. Kodlama bölgesindeki 19 amio asit (mor renkli) sinyal peptidi kodlar. Ana kanal üzerinde bulunan ve mutasyona uğratılan amino asitler; Thr188 (mavi), Glu484 (kırmızı).

MNRVTNLLAWAGAIGLAQATCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDDST
GYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARD
VHGFATRFYTDEGNFIVGNNIPVFFIQDAIQFFPDLIHSVKPRPDNEIPQAA**T**A
HDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGS
SKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWD
VCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETEQ
VMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIH
NNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASG
ALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRF**E**ISLVKSEEVKKNV
LTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIK
TLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTAD
ATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGK
SSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

EK-E

Büyüme Ortamı, Tamponlar ve Solüsyonların Hazırlanması

Agaroz Jel % 0,8 (w/v)

0,8 g agaroz tartılır ve 1X TAE içerisinde mikrodalgada ısıtılarak çözdürülür.

EDTA (0,5 M, pH 8)

7,3 g EDTA tartılır, 30 ml distile su içerisinde çözdürülür. Karıştırıcıda pH 8 olana kadar 1 M NaOH eklenir ve filtrefen geçirilir.

IPTG (1M)

2,4 g IPTG tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözdürülür. Filtreden geçirilerek 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -20^{o}C'de saklanır.

Luria Broth (1 L)

10 g Tripton
5g Yeast Ekstrakt
10 g NaCl
Son konsantrasyon 1 L olacak şekilde ayarlanır ve otoklavlandıktan sonra +4^{o}C'de saklanır.

Luria Broth Kanamisin Agar (1 L)

10 g Tripton
5g Yeast Ekstrakt
10 g NaCl
20 g Agar-agar
Son konsantrasyon 1 L olacak şekilde ayarlanır ve otoklavlanır. Büyüme ortamının sıcaklığı 55^{o}C'ye düştüğünde 50 µg/mL kanamisin eklenerek petri kaplarına dökülür ve +4^{o}C'de saklanır.

Lizis Tamponu (100 mL)

50 mM HEPES (Na Salt)
%25 Sükroz
%1 Triton-X 100
5 mM MgCl2.6H2O
Son konsantrasyon 100 ml olacak şekilde diistile du ilave edilir ve pH 8'e ayarlanır. 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan hemen önce 1mg/ml lizozim, 5 µL Benzonaz nükleaz ve 50 µL proteaz inhibitör eklenir.

EK-E (Devam)

NaOH (1M, 100 ml)

4 g NaOH tartılır 80 ml distile su içerisinde çözdürülür. Üzerine 100 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

Sodyum Fosfat Buffer (20 mM, 5 L, pH 7.4)

146 g NaCl
2,9 g Monobasic
21,7 g Dibasic
Son konsantrasyon 5 L olacak şekilde distile su eklenir ve pH 7.4 olana kadar 1 M NaOH ilave edilir.

Bağlama Tamponu (1 L, pH 7.4)

0,59 g monobasic
4,34 g dibasic
29,22 g NaCl
1,36 g İmidazol
Kimyasallar 600 ml distile su içerisinde çözdürülür. pH 7.4 olacak şekilde HCl ilave edilir ve son konsantrasyon 1 L'ye tamamlanır.

Yıkama Tamponu (1 L, pH 7.4)

0,59 g monobasic
4,34 g dibasic
29,22 g NaCl
34 g İmidazol
Kimyasallar 600 ml distile su içerisinde çözdürülür. pH 7.4 olacak şekilde HCl ilave edilir ve son konsantrasyon 1 L'ye tamamlanır.

10X Koşturma Tamponu 1 L (SDS)

30 g Tris Base
144 g Glisin
10 g SDS
800 ml distile su içerisinde çözdürülür. pH 8.3'e ayarlanır ve 1 L'ye tamamlanır. +4^{o}C'de saklanır.

EK-E (Devam)

50X TAE Koşturma Tamponu 1 L (Agaroz Jel)

242 g Tris base
57 ml Glasiyal Asetik Asit
100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
242 g Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürülür. 57 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ilave edilerek son konsantrasyon1 L'ye tamamlanır.

TFB 1

30 mM Potasyum asetat
10 mM $CaCl_2$
50 mM $MnCl_2$
100 mM RbCl
%15 (v/v) Glycerol
1 M asetik asit kullanılarak pH 5.8'e ayarlanır. Steril 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve +4^{o}C'de saklanır.

TFB 2

10 mM MOPS
75 mM $CaCl_2$
10 mM RbCl
%15 (v/v) Glycerol1 M KOH kullanılarak pH 6.5'a ayarlanır. Steril 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve +4^{o}C'de saklanır.

1,5 M Tris HCl Tampon, 100 ml (pH 8.8)

18,5 g Tris Base
0,4 g SDS
Tris base ve SDS 80 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 M HCl ile pH 8.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4^{o}C'de saklanır.

1 M Tris HCl Tampon 100 ml (pH 6.8)

10,2 g Tris Base
0,4 g SDS
Tris base ve SDS 80 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 M HCl ile pH 6.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4^{o}C'de saklanır.

%10 v/v APS (Amonyumpersülfat) Hazırlanışı

10 g APS tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80^{o}C'de muhafaza edilir.

Coomassie Blue Stain Hazırlanışı (1L)

450 ml Metanol
70 ml Asetik asit
480 ml Distile su
2,5 g Coomessie Blue
Coomessie Blue 450 ml metanol içerinde çözdürülür (1 gece). Asetik asit ve distile su eklenir ve 1 L'ye tamamlanır. Koyu renkli şişede +4^{o}C'de saklanır.

Destain Hazırlanışı (1L)

250 ml Metanol
150 ml Asetik Asit
675 ml Distile su
Metanol, asetik asit ve distile su şişede karıştırılır ve koyu renkli şişede +4^{o}C'de saklanır.

EK-F

SDS-PAGE PROTOKOLÜ

Stok Çözeltiler
1. Akrilamid/bis (%30)
2. 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
3. 1 M Tris-HCl, pH 6.8
4. %20 SDS
5. %10 Amonyum Persülfat (APS)
6. 10X Koşturma Tamponu (pH 8.3)

SDS Jel Çözeltilerinin Hazırlanması

1. Alt (Separating) Jel (%15)

%30 Akrilamid	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,25 ml
Saf su	1,175 ml
%20 SDS	0,025 ml
%10 APS	0,050 ml
TEMED (N,N-tetrametilen etilendiamin)	0,005 ml

2. Üst (Stacking) Jel (%5)

%30 Akrilamid	830 µl
1 M Tris-HCl, pH 6.8	630 µl
Saf su	3,4 ml
%20 SDS	25 µl
%10 APS	50 µl
TEMED(N,N-tetrametilen etilendiamin)	5 µl

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Yuzugullu Y., Trinh C., Smith M. A., Pearson A. R., Ogel Z. B., **Zengin M.**, McPherson M.J., Understanding the oxidative mechanism of catalase from *S. thermophilum, COST Action CM1306 2nd MC Meeting and WG Meeting*, Visegard, Hungary, 15-17 September 2014.

Yuzugullu Y., **Zengin M**., Balci S., Goc G., Avci Duman Y., Role of active site residues on catalytic activity of catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum, Procedia Social and Behavioral Sciences*, 2015, **195**, 1728-1735.

Yuzugullu Y., **Zengin M**., Balci S., Goc G., Avci Duman Y., Role of active site residues on catalytic activity of catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum, World Conference On Tecnology, Innovation and Enterpreneurship*, İstanbul, Türkiye, 28-30 Mayıs 2015.

Yuzugullu Y., **Zengin M**., Balci S., Goc G., Avci Duman Y., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz (CATPO) Yanal Kanalının Aktivitedeki Rolü, *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Konferansı,* Afyon, Türkiye, 21-24 Ağustos 2015.

Balcı S., Yüzügüllü Y., Göç G., **Zengin M.,** Avcı Duman Y., *Scytalidium* Katalazının Yanal Kanalı Üzerine Kristalografi Çalışmaları, *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi,* Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015.

Yuzugullu Y., Balci S., Goc G., **Zengin M.,** Avci Duman Y., Pearson A. R., Crystallographic Studies of Catalase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum, 2nd Meeting COST Action CM1306,* Lisbon, Portugal, 24-26 February 2016.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Kocaeli'nde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kocaeli'nde tamamladı. 2008 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Köseköy Meslek Yüksekokulu Fermentasyon Programı'ndan 2010 yılında ikincilik ile mezun oldu. 2010 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2013 yılında yine ikincilik mezun oldu. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.