KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scytalidium thermophilum KATALAZI YANAL KANALININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

SİNEM BALCI

KOCAELİ 2016

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scytalidium thermophilum KATALAZI YANAL KANALININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

SİNEM BALCI

Yrd. Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Yrd. Doç. Dr. Yonca AVCI DUMAN		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜL		
Jüri Üyesi,	**İstanbul Bilgi Üniversitesi**	.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.12.2016

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum*, hücre dışı bir katalaz enzimi (CATPO) üretmektedir. Büyümeye paralel olarak üretilen katalaz enzimi genel fonksiyonu (hidrojen peroksitin moleküler oksijene dönüştürülmesi) yanında herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadan difenolik bileşikleri okside edebilme (oksidaz aktivitesi) yeteneğine sahiptir. Katalazlar hakkında çok sayıda literatür bilgisi mevcut olmasına rağmen ikincil oksidaz aktivitesinin katalitik mekanizmadaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, katalitik aktivitede önemli olduğu düşünülen yanal kanal üzerindeki amino asitler üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen farklı CATPO varyantlarının biyokimyasal karakterizasyonu ve kristalografi analizi yapılarak enzim üzerindeki değişiklikler kaydedilmiştir. Yapılan çalışmanın ileride enzimoloji ve enzim mühendisliği alanında özgün uygulamaların gerçekleştirilmesine ışık tutacağı ve X ışını kristalografi çalışmalarının ülkemizde de yaygınlaşmasında katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans öğrenimim süresince her türlü desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, bilimin sınır tanımadığını gösteren saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü Karakuş'a, öğrenimim boyunca bilimsel tecrübeleri ile katkı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Yonca Avcı Duman'a, çalışmalarımın gerçekleşmesi için laboratuvarında çalışma fırsatı veren Doç. Dr. Özlem Aksoy'a ve tez savunma jüri üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Özgür Gül hocama teşekkür ederim. Büyük desteği ve tecrübeleriyle Hamburg Üniversitesi'nde kristalografi çalışmalarımı gerçekleştirmeme olanak sağlayan, laboratuvarını ve evini benimle paylaşan Prof. Arwen Pearson ve grubuna, Hamburg Üniversitesi'nde çalışmalarımı gerçekleştirmem için maddi destek sağlayan COST (Europen Cooperation in Science and Technology) Action CM1306 başkanı Dr. Fraser MacMillan ve burs komisyon üyelerine, yardımlarını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Melis Zengin, Günce Göç, Arzu Sertel ve Semih Işık'a teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürden daha fazlasını hakeden gösterdikleri büyük sabır, sevgi ve verdikleri her türlü destekleri için biricik ailem babam Hüseyin Balcı, annem Çiğdem Balcı ve kızkardeşim Elif Balcı'ya, hayatım boyunca ne olursa olsun her zaman yanımda olan hayatımın en önemli parçası erkek arkadaşım Yağızhan Ünver'e ve eşi benzeri bulunmayan yegane dostlarım Ceren Çalışkan, Nurbanu Bayar, Ceren Pala, Gözde Ağseren'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu) 113Z744 no'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmamda verdikleri maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a şükranlarımı sunarım.

Aralık - 2016 Sinem BALCI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR vii
ÖZET ix
ABSTRACT x
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Katalazlar (E.C. 1.11.1.6) 4
1.1.1. Katalaz kofaktörleri 6
1.1.2. Katalazların üç boyutlu yapısı 8
1.1.3. Katalaz enzimlerinin endüstriyel kullanımı 12
1.2. Fenol Oksidazlar 13
1.2.1. Fenol oksidaz ve katalaz enzimlerinin çift işlevliliği 14
1.3. Termofilik Mantarlar 14
1.3.1. *Scytalidium thermophilum* 15
1.3.2. *S. thermophilum* katalaz-fenol oksidazı (CATPO) 15
2. MALZEME VE YÖNTEM 18
2.1. Malzemeler 18
2.1.1. Kimyasallar ve enzimler 18
2.1.2. Mikroorganizmalar 18
2.2. Yöntem 18
2.2.1. Plazmid, mikroorganizma ve kültür hazırlanması 18
2.2.2. Primer tasarımı 19
2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu 20
2.2.4. Nükleik asitlerin agaroz jel elektroforezi ile analizi 21
2.2.5. Nükleik asit konsantrasyon tespiti ve saflık ölçümü 22
2.2.6. Kompetan hücrelere transformasyon 22
2.2.7. Plazmid DNA izolasyonu 23
2.2.8. Rekombinant proteinlerin üretimi 23
2.2.9. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması 24
2.2.10. Rekombinant proteinlerin karakterizasyonu 26
2.2.10.1. SDS-PAGE jel elektroforez analizi 26
2.2.10.2. Ultraviyole (UV) görünür spektrum analizi 26
2.2.10.3. Protein miktar tayini 26
2.2.10.4. Enzim aktivite tayini 27
2.2.10.5. X ışını kristalografi analizi 27
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 32
3.1. Bölge Yönelimli Mutasyon ile CATPO Varyantlarının Oluşturulması 32
3.2. CATPO Varyantlarının Rekombinant Üretimi 37
3.3. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması 39
3.4. CATPO Varyantlarının UV Görünür Bölge Spektrumları 56

3.5. CATPO Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Karşılaştırılması 59
3.6. CATPO Varyantlarının X Işını Kristalografi Analizi 62
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 66
KAYNAKLAR 69
EKLER 74
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 86
ÖZGEÇMİŞ 87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. (a) "b" tipi hem grubu ve (b) "d" tipi hem grubunun yapısı 8
Şekil 1.2. X ışını kristalografisinde 3 boyutlu görüntü eldesi 9
Şekil 1.3. *E. coli* HPII Katalazının üç boyutlu yapısı 10
Şekil 1.4. *S. thermophilum* katalazının hem grubu ve kanalları 12
Şekil 1.5. *S. thermophilum* mantarı 15
Şekil 2.1. Örnekteki DNA konsantrasyon hesaplaması 22
Şekil 2.2. pH 5,0-5,6 arası ve PEG400'ün farklı farklı konsantrasyonlarında %6-16 (v/v) hazırlanan kristal büyütme solüsyon içerikleri 29
Şekil 2.3. pH 5,8-6,4 arası ve PEG400'ün farklı konsantrasyonlarında %6-16 (v/v) hazırlanankristal büyütme solüsyon içerikleri 30
Şekil 2.4. Asılı damla buhar difüzyon yöntemi 31
Şekil 3.1. QuikChange sonucu elde edilen CATPO varyantlarından izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü 34
Şekil 3.2. CATPO varyantları plazmid DNA'larının wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile BioEdit programı kullanarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları 36
Şekil 3.3. 16 farklı CATPO varyantının nokta mutasyon sonrasında plazmid DNA'larının *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerine transformasyon sonuçları 38
Şekil 3.4. Farklı CATPO varyantlarının çamur haline getirilmiş hücrelerinin karşılaştırılması 39
Şekil 3.5. His-Bağlı Hi-Trap HP kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant wtCATPO proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 40
Şekil 3.6. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 41
Şekil 3.7. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228C varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 42
Şekil 3.8. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 43
Şekil 3.9. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228G varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 44
Şekil 3.10. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228I varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 45
Şekil 3.11. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V228S varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 46
Şekil 3.12. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan E316F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 47
Şekil 3.13. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan E316H varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. 48
Şekil 3.14. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan H246W varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. 49

Şekil 3.15. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan I313F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 50
Şekil 3.16. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan I314F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 51
Şekil 3.17. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan L321A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 52
Şekil 3.18. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant P158W proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 53
Şekil 3.19. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant Q293W proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 54
Şekil 3.20. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V536A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 55
Şekil 3.21. His-Bağlı HisTrap HP kolon kullanılarak saflaştırılan V536W varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü 56
Şekil 3.22. Yanal kanal CATPO varyantlarının UV görünür bölge spektrum analizlerinin karşılaştırılması 59
Şekil 3.23. X ışını kristalografisinden elde edilen elektron yoğunluk haritası 64
Şekil 3.24. CATPO (a), V228C (b) ve V228I (c) varyantlarına ait yanal kanalların üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması 65
Şekil A.1. pET-28aHis6TEVCATPO,ekspresyon vektör haritası 75
Şekil C.1. Protein ölçümü için gerekli olan, Bradford metodundaki standart BSA eğrisi..... 83

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Tasarlanan oligonükleotitler ve değiştirilen bazlar 20
Tablo 2.2. PZR yönteminde kullanılan karışım 21
Tablo 2.3. PZR döngüsü 21
Tablo 3.1. Farklı mutasyonları taşıyan plazmidlerin DNA miktarları 35
Tablo 3.2. CATPO varyantlarına ait "hem" içeriğinin spektroskopik karakterizasyonu 58
Tablo 3.3. Yanal kanal CATPO varyantlarının spesifik aktivitelerinin ve "hem" tiplerinin karşılaştırılması 60
Tablo 3.4. X ışınına maruz bırakılan varyantlara ait kristalografik veri tablosu 63

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

Å	:	Angstrom
K	:	Kelvin
^{o}C	:	Santigrat Derece
V	:	Volt

Kısaltmalar

ABTS	:	2, 2'-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonik asit
Asn	:	Asparajin
Asp	:	Aspartik Asit
BSA	:	Bovine Serum Albumin (Sığır Albümini)
$CaCl_2$	:	Kalsiyum Klorür
Cys	:	Sistein
dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksinükleozit Trifosfat
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Gln	:	Glutamin
Glu	:	Glutamik Asit
H_2O	:	Su
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
HCl	:	Hidroklorik Asit
His	:	Histidin
HPII	:	Hydroperoxidase (Hidroperoksidaz)
Ile	:	Izolösin
IPTG	:	Isopropil β-D-1-thiogalaktopiranosit
kbç	:	Kilo Baz Çifti
KCl	:	Potasyum Klorür
LB Broth	:	Luria-Bertani Broth
LBA	:	Luria-Bertani Agar
L-Dopa	:	3, 4-dihidroksifenilalanin
Leu	:	Lösin
MA	:	Molekül Ağırlığı
MOPS	:	4-Morfolinpropansulfonik asit
NaCl	:	Sodium chloride (Sodyum Klorür)
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OD	:	Optical Density (Optik Yoğunluk)
PDB	:	Protein Data Bank (Protein Veri Bankası)
PEG	:	Polyethlyene glycol (Polietilen Glikol)
pH	:	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
Phe	:	Fenil Alanin
pI	:	Isoelectronic Point (İzoelektronik Nokta)

Pro	:	Prolin
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
$RbCl_2$	:	Rubidyum Klorür
Rpm	:	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	:	Tetrametiletilendiamin
Trp	:	Triptofan
Tyr	:	Tirozin
UV	:	Ultra Viyole
Val	:	Valin
wtCATPO	:	Wild Type Catalase-Phenol Oxidase (Yabanil Tip Katalaz-Fenol Oksidaz)

Scytalidium thermophilum KATALAZI YANAL KANALININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Katalazlar en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Katalaz enziminin en önemli görevi hidrojen peroksiti, oksijen ve suya parçalamasıdır. Katalazlar filogenetik olarak üç gruba ayrılırlar. Bunlar; hem/demir içeren monofonksiyonel katalazlar, katalaz-peroksidazlar ve mangan içeren katalazlardır. *Scytalidium thermophilum*, hem/demir grubu içeren monofonksiyonel katalaz ailesine dâhil olan, hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalanmasının yanısıra hidrojen peroksit yokluğunda herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadan farklı özellikte fenolik bileşikleri okside etme yeteneğine sahip CATPO olarak isimlendirilen bir enzim üretmektedir. Katalaz üzerinde yapılan çalışmalarda aktif bölgeye uzanan üç kanalın varlığından söz edilmektedir. Bu kanalların görevleri, aktif bölgeye çeşitli substratların ve ürünlerin giriş-çıkışını sağlamaktır. Bu çalışmadaki amaç, üç kanaldan biri olan yanal kanalın katalitik aktivitedeki rolünü araştırmak üzere mutasyon çalışmaları gerçekleştirmek ve yapılan değişikliklerin spektroskopik ve yapısal olarak değerlendirilmesidir. Bu amaçla toplam 16 farklı CATPO mutasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan spektroskopik çalışmalar sonucunda, yanal kanal girişinde bulunan Val228'in "hem" oksidasyonunda rol oynadığı ve katalaz aktiviteyi önemli ölçüde negatif yönde etkilediği gözlenmiştir. Yanal kanalın iç kısmında yapılan değişiklikler ise katalaz aktivite yerine ikincil fenol oksidaz aktiviteyi etkilemiş olup, oksidatif aktivite kanal çapının daralmasıyla azalmıştır.

Anahtar kelimeler: CATPO, Fenol Oksidaz, Katalaz, *Scytalidium thermophilum*, Yanal Kanal.

INVESTIGATION OF LATERAL CHANNEL IN CATALYTIC ACTIVITY OF *Scytalidium thermophilum* CATALASE

ABSTRACT

Catalases are one of most studied groups of enzymes. Their main function is the decomposition of hydrogen peroxide into oxygen and water. Catalases are phylogenetically grouped into three families. These are the monofunctional heme-containing catalases, the catalase-peroxidases and the manganese catalases. *Scytalidium thermophilum* produces a monofunctional-like heme-containing catalase named as CATPO that exhibits oxidase activity in the the absence of hydrogen peroxide or any other cofactor used additional to its main function. Studies on catalase enzyme structure indicated the presence of three channels connecting the protein surface to the active site. These channels are proposed to be the routes by which the various substrates and products enter and exit the active site. The aims of this study are to perform mutation and analyze the resultant changes spectroscopically and structurally in order to investigate the role of the lateral channel in catalytic activity. For this reason, 16 mutant variants of CATPO have been generated in total. The spectroscopic studies revealed that Val228, presented in the entrance of lateral channel, plays a role in heme oxidation and significantly affects the catalytic activity in a negative maner. On the other hand, modifications in the interior of the lateral channel residues have effect on phenol oxidase activity rather than catalase and this secondary oxidative activity decreases with reducing channel diameter.

Key words: CATPO, Phenol Oxidase, Catalase, *Scytalidium thermophilum*, Lateral Channel.

GİRİŞ

Ökaryotik organizmalar arasında yer alan termofilik mantarlar 45 ila 65ºC arasında üreyebilen ve sıcaklığa en fazla dayanabilen canlılardır. Termofilik mantarların ürettikleri enzimler sıcaklığa karşı dirençli oldukları için denatürasyon ve proteoliz gibi olumsuz durumlardan etkilenmezler. Böylece endüstride ve birçok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadırlar.

Doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim olan katalaz enzimi (EC 1.11.1.6) oksidoredüktazlar sınıfına ait olup antioksidan metalloenzimler grubuna dahildir. Katalaz enziminin en önemli görevi, hücre için zararlı olan hidrojen peroksidin (H_2O_2) su ve moleküler oksijene parçalanmasını sağlayarak hücreyi korumaktır (Kurakov, 2001; Chelikani ve diğ., 2004). Başlıca görevi dışında, ortamda uygun organik elektron vericisi bulunduğunda peroksidatif aktivite de gösterebildiği gözlenmiştir. Gözlemlenen bu ikincil aktivite, peroksit yıkımıyla gerçekleşen metanol, etanol, formik asit ve ya fenol gibi organik bileşiklerin oksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Enzimdeki ikincil aktivite, hidrojen peroksit seviyesinin oldukça düşük olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır (Nicholls ve diğ., 2001).

Termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* büyümeye paralel olarak bir katalaz enzimi üretmektedir ve bu enzim hidrojen peroksit ya da herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan bir oksidaz aktivitesine sahiptir (Yuzugullu ve diğ., 2013). Literatürde katalaz enziminde gözlenen bu ikincil aktivite olgusu günümüzde hızla yaygınlaşmakta olup memeli hücreleri (Vetrano ve diğ., 2005) başta olmak üzere *Bacillus pumilus* (Sangar ve diğ., 2012), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*'dan (Teng ve diğ., 2016) izole edilen katalazlarda da tanımlanmıştır. Buradan çift aktiviteli katalaz/fenol oksidaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği hatta insan hücrelerinde de bulunabileceği anlaşılmaktadır. Ancak enzimin oksidatif mekanizmasının katalitik aktivitedeki rolü henüz tam olarak karakterize edilmemiştir.

S. thermophilum katalaz (CATPO) enzimi yaklaşık 320 kDa molekül ağırlığında ve her bir monomeri benzer olan tetramerik bir enzimdir. Daha önceden yapılan amino asit dizilim çalışmaları ile 'monofonksiyonel büyük katalazlar' ailesinden olduğu anlaşılmaktadır (Sutay Kocabas ve diğ., 2008). *Scytalidium* katalaz geni (catpo) daha önceden Novo Nordisk tarafından klonlanmış (US Patent no: 5571719), ancak bu patent içinde enzimin fenol oksidaz aktivite özelliğine dair bir bilgi yer almamıştır. Nitekim saflaştırılmış enzim ile yapılan biyodönüşüm çalışmalarında enzimin kafeik asit, katekin, katekol ve klorojenik asit gibi ortho pozisyonunda iki hidroksil grubu bulunduran fenolik maddeler üzerinde oksidatif etki gösterdiği anlaşılmıştır (Koclar Avci ve diğ., 2013). Çift aktiviteli bu enzimin ayrıca üç boyutlu yapısı belirlenmiş ve rekombinant ekspresyon sistemi geliştirilerek bölge yönelimli mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinin aynı aktif bölge ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Yuzugullu ve diğ., 2013).

Yakın zamanda oksidatif substratların *S. thermophilum* katalazının aktif bölgeye yönelmesinde ana kanalı kullanıp kullanmadıklarının araştırılması üzerine ana kanal üzerinde bulunan Thr188 ve Glu484 amino asitleri değişikliğe uğratılmış ve oksidaz aktiviteleri spektroskopik olarak analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen farklı CATPO varyantlarının katalaz aktivitelerinde yabanil tip enzime göre %60 ve üzeri düşüş gözlenirken, oksidaz aktivitede önemli oranda azalma ve ya artış gözlenmemiştir. Ana kanal üzerinde yapılan bu çalışmada, H_2O_2'in aktif bölgeye bu kanal üzerinden ulaştığı doğrulanmıştır, ancak oksidaz subtratların aktif merkeze ulaşabilmesi için alternatif bir yol izleyebileceği önerilmiştir (Zengin, 2016).

S. thermophilum katalazının (CATPO) oksidaz mekanizması hakkında daha detaylı bilgi sahibi olabilmek için ve fenolik maddelerin aktif merkeze nasıl ulaştığının yanıtlarını bulmak amacıyla bu tez çalışmasında odak noktası yanal kanal ve bu kanal üzerinde bulunan katalitik mekanizmada önemli olduğu düşünülen amino asitler üzerine çevrilmiştir. Bu nedenle, çalışmada yanal kanalda oksidatif aktivitede rolü olabilecek amino asit kalıntıları (Pro158, His246, Gln293, Glu316, Val228, Ile313, Ile314, Leu321, Val536) hedef alınarak mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, elde edilen farklı katalaz varyantlarının biyokimyasal karakterleri karşılaştırılmış ve iki varyantın üç boyutlu yapıları belirlenmiştir.

Yanal kanal üzerinde gerçekleştirilen mutasyonların elde edilmesinde Bölge Yönelimli Mutasyon tekniği kullanıldı. Elde edilen mutasyonların doğruluğu sekans analizi ile teyit edildi. Proteinlerin profil analizi SDS PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez) tekniği kullanılarak yapıldı. Proteinlerin saflaştırılması FPLC (Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi) ile gerçekleştirildi. Saflaştırılan proteinlerin üç boyutlu yapısını incelemek için X ışını kristalografisi kullanıldı. X ışını kristalografisinden elde edilen edilen veriler bilgisayar ortamında CCP4 ve Coot programları kullanılarak proteinlerin üç boyutlu profilleri çıkarıldı.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Katalazlar (E.C. 1.11.1.6)

Katalaz terimi, ilk defa 1901 yılında araştırmacı Loew tarafından hidrojen peroksidi parçalayan enzim olarak tanımlanmıştır (Chelikani ve diğ., 2004). Katalaz enziminin doğada yaygın olarak bulunması, substratı hidrojen peroksidin (H_2O_2) ucuz olması ve aktivitesinin kolay ölçülebilir olması sebebiyle günümüzde birçok bilim adamı katalaz enzimi ile çalışmaya başlamıştır. Oksijenli solunum yapan hemen tüm canlılarda katalaz enzimi bulunmaktadır (Mate ve diğ., 2001). Katalaz enziminin en önemli görevi, hücre için zararlı bileşik olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) parçalayarak su ve oksijene dönüşmesini sağlamaktır Denklem (1.1) (Kurakov, 2001; Chelikani, 2004).

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

Katalazlarda katalitik reaksiyon iki ayrı basamakta gerçekleşmektedir (Chelikani ve diğ., 2004). Katalitik döngünün ilk basamağında; hidrojen peroksit, ferrik enzimi (hem grubunu) oksiferril formuna Bileşik I çevirir ve su (H_2O) açığa çıkar Denklem (1.2). Ortamda bulunan ikinci hidrojen peroksit molekülü ise, ilk basamakta oluşan Bileşik I'i indirgeyerek enzimin tekrar orijinal formuna dönüşmesini sağlar ve ürün olarak su ve moleküler oksijen açığa çıkar Denklem (1.3) (Nicholls, 2001; Switala ve Loewen, 2002).

$$\text{Enzim (Por–Fe}^{III}\text{)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Bileşik I (Por}^{+\bullet}\text{–Fe}^{IV}\text{=O)} + H_2O \qquad (1.2)$$

$$\text{Bileşik I (Por}^{+\bullet}\text{–Fe}^{IV}\text{=O)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Enzim (Por–Fe}^{III}\text{)} + H_2O + O_2 \qquad (1.3)$$

Ayrıca, ortamda uygun organik elektron vericinin olmasıyla ve hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumda Bileşik I indirgenerek Bileşik II oluşur Denklem (1.4.). Bileşik II'nin oluşması enzimin inaktif olmasına neden olabilir (Nicholls, 2001).

Bileşik I ($Por^{+\bullet}$–Fe^{IV}=O) + AH_2 → Bileşik II (Por-Fe^{IV}-OH) + OH^- (1.4)

Bileşik II (Por-Fe^{IV}-OH) + AH_2 → Enzim (Por-Fe^{III}) (1.5)

Katalaz, canlılar için oldukça önemli bir enzimdir. H_2O_2, katalaz enzimi tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan "hidroksil" radikalinin öncülü olarak davranır ve bu serbest radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur. Serbest radikallerin birikmesi hücre ömrünün kısalmasına sebep olduğundan katalaz enziminin antioksidan işlevi önem taşımaktadır. Aerobik solunum yapan organizmaların durağan fazda daha uzun yaşamalarını da sağlamaktadır. Hücreler durağan faza girdikleri zaman katalaz enzimi yüksek düzeyde salgılanır ve organizmanın hidrojen peroksit ya da ortamın anerobik olma gibi olumsuz koşullardan etkilenmesini önler (Loewen ve diğ., 2004). Ayrıca katalazın hücreler arası sinyal iletiminde de rol aldığı düşünülmektedir (Burdon, 1995; Khan ve Wilson, 1995; Mueller ve diğ., 1997). Katalaz enziminin detoksifikasyon özelliği, antioksidan olması, sinyal iletiminde rol alması, etanol ve metanol metabolizmasındaki katkıları bakımından endüstride geniş kullanım alanına sahiptir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Katalazlar genel olarak; monofonksiyonel katalazlar, katalaz-peroksidazlar, mangan içeren katalazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Loewen ve diğ., 2015). Aktif bölgelerinde ‘hem’ grubu bulunduran monofonksiyonel katazlar, katalazların en yaygın grubunu oluşturmaktadır (Switala ve Loewen, 2002; Chelikani ve diğ., 2004). Monofonksiyonel katalazlar tetramerik yapıdadırlar. Bu yapının monomerleri 75-80 kDa ve 55-60 kDa olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Bu monomerler arasındaki en temel fark, aktif bölgelerinde bulunan prostetik grubun çeşididir. Ayrıca küçük üniteli katazlarda, bir NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky, 2008). Bu bağlanma bölgesi, katalaz aktivitesinde rol oynamamasına karşın katalitik döngüde enzim formunun korunmasını sağlamaktadır (Kirkman ve diğ., 1984; Cattani ve diğ., 1994). Büyük alt üniteli katalazlarda ise Bileşik II oluşmadığı için NAD(P)H bağlanma bölgesinin olmadığı rapor edilmiştir (Cattani ve diğ., 1994). Büyük alt üniteli katalazlarda bu bağlanma bölgesi yerine ekstra C-terminal (karboksil uç) bölgesinin var olduğu belirtilmiştir. Bu bölgenin enzim sıcaklık ve denatüre edici ajanlara karşı korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Mate ve

dığ., 2001). Katalaz-peroksidazlar, monofonksiyonel katazlar gibi aktif bölgelerinde ‘hem’ grubu içeren katazlardır. Yaklaşık ağırlığı 120-340 kDa arasında farklılık gösteren homodimer yapılı enzimlerdir. Bu enzim grubu, katalazların tipik katalitik aktivitesine ek olarak; hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumlarda peroksidatif aktivite de göstermektedir (Nicholls ve diğ., 2001). Ancak bu enzim grubu hakkında henüz detaylı bir bilgi yoktur, çünkü enzimlere uygun peroksidatif substrat bulunamamıştır. Dolayısıyla enzimlerin peroksidatif reaksiyonları belirlenememiştir (Chelihani ve diğ., 2004; Zamocy ve diğ., 2008). Katalaz peroksidazların diğer katalazlardan farkı; çift fonksiyonlu katalitik yeteneği olması, monofonksiyonel katalazlara göre yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılık göstermesi ve düşük R_z (Demir miktarı belirleyici) değeri göstermeleridir (Zámocký ve Koller, 1999).

Diğer bir katalaz grubu olan mangan içeren katalazlar, enzimin aktif bölgesinde ‘hem’ grubu yerine ‘mangan’ içermektedir. Bu sebepten bu katalaz sınıfına "yalancı katalazlar" da denilmektedir. Mangan içeren katalazların molekül ağırlıkları 170-210 kDa arasında farklılık göstermektedir (Zámocký ve Koller, 1999).

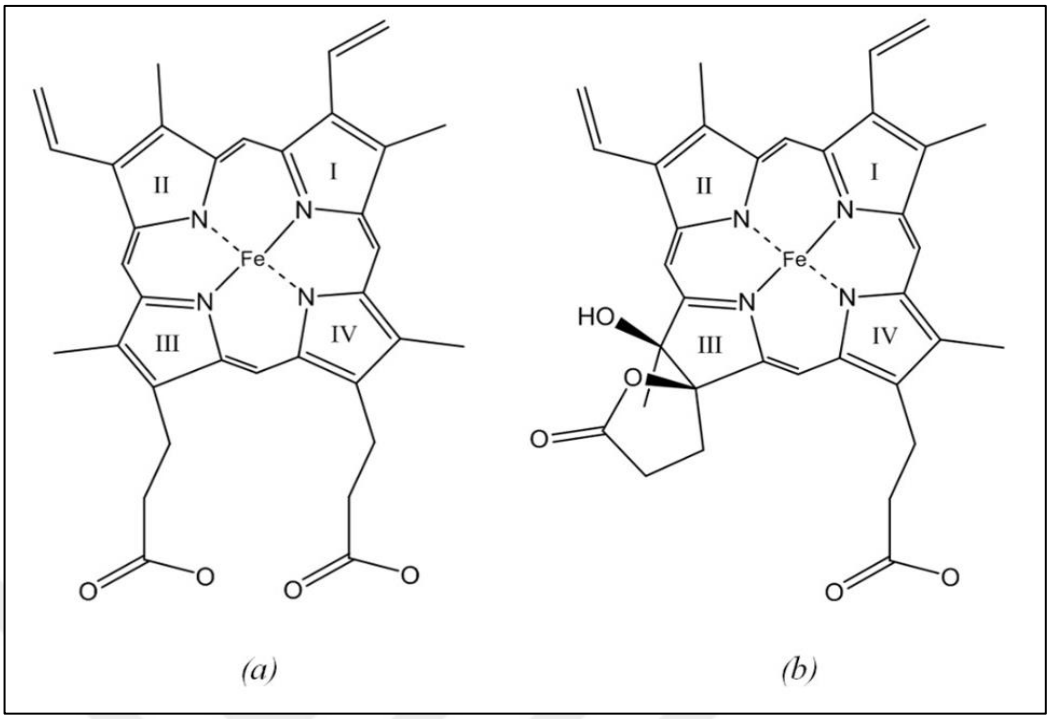
Canlılarda bu katalaz gruplarından bir tanesi ya da farklı tipte birkaç katalaz grubu aynı organizmada bulunabilir. Örneğin; bakteriler arasında *Mycobacterium* cinsinde sadece katalaz-peroksidazlar bulunurken, *Escherichia coli*’de hem monofonksiyonel katalaz (HPII) hem de katalaz-peroksidaz (HPI) bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* ise monofonksiyonel, katalaz-peroksidaz ve mangan içeren katalaz grubundan üç tanesini de bulundurmaktadır (Nicholls ve diğ., 2001; Loewen ve diğ., 2015).

1.1.1.Katalaz kofaktörleri

Katalaz enziminde bulunan prostetik grup, ilk olarak 1935 yılında araştırmacı Stern tarafından at karaciğer katalazından izole edilmiştir. Bu prostetik grup, bir demir atomu ve porfirin halkası içeren protohem olarak da tanımlanabilir (Stern, 1935).

Hem prostetik grubu; ‘hem’ grubu içeren katalazlarda, moleküler yüzeyden yaklaşık 20 Å uzaklıkta, protein içine gömülü halde bulunmaktadır (Chelikani ve diğ., 2003). Farklı organizmalardan elde edilen katalaz enzimlerinin, hem grupları farklılık gösterebilir (Yüzügüllü, 2010). Örneğin sığır katalazında b tipi hem grubu

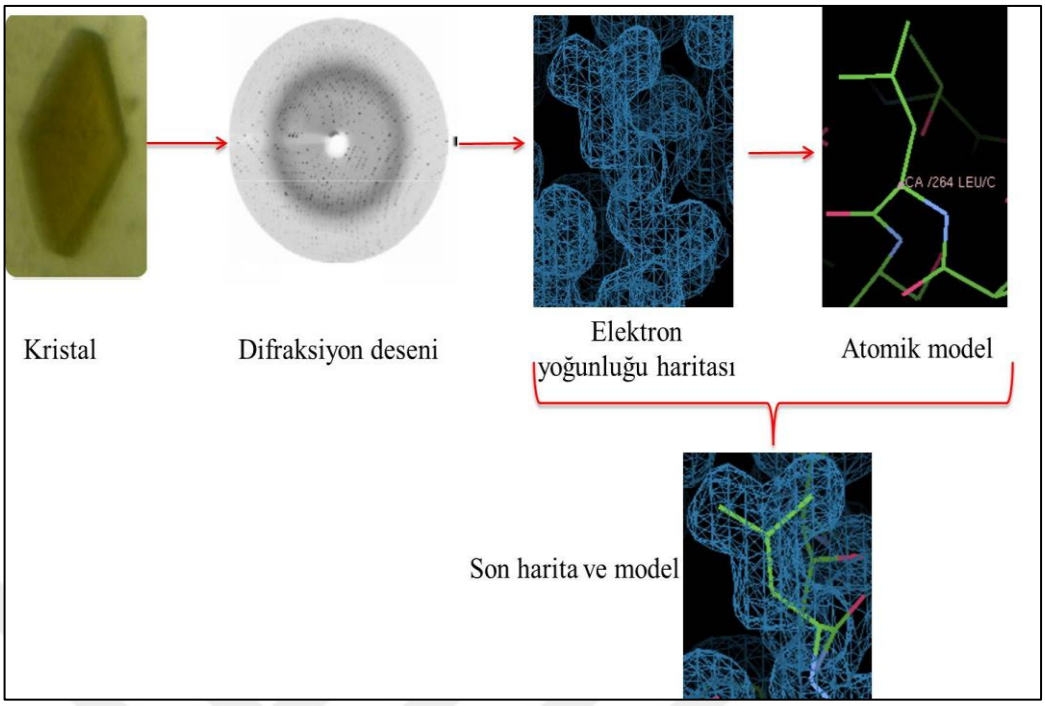
bulunurken, *E. coli* ve *S. thermophilum* katalazlarında d tipi hem grubu bulunmaktadır. Ayrıca küçük alt üniteli katalazlar genellikle b tipi hem grubu içerirken, büyük alt üniteli katalazlar d tipi hem grubu içermektedir (Mate ve diğ., 2001). d tipi hem grubunun, III. pirol halkasının oksidaz reaksiyonu sonucu cis-hidrosipirolakton halkanın oluşmasıyla meydana geldiği rapor edilmiştir (Koclar Avci, 2011). Yani b tipi Hem grubunun oksitlenmesi sonucu d tipi Hem grubu oluştuğu düşünülmektedir. b tipi hem grubunda ise III. pirol halkasına alifatik zincir grubu bağlıdır (Şekil 1.1). d tipi hem grubundaki lakton halkası ve hidroksil grubu prostetik grubun, b tipi hem grubuna göre prostetik grubun daha asitmetrik olmasını sağlamaktadır (Murshudov ve diğ., 1996). Hem b'nin hem d'ye dönüşümü, *E. coli* katalazı ile çalışılmış ve *E. coli* HPII katalazında gözlenen hem oksidasyonunun HPII'nın kendisi tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu oluştuğu rapor edilmiştir (Timkovich ve Bondoc, 1990). 1993 yılında Loewen ve arkadaşları ise hem dönüşümünün (oksidasyonun) hidrojen peroksit yokluğuna bağlı olduğunu açıklamıştır.



Şekil 1.1. (a) "b" tipi hem grubu ve (b) "d" tipi hem grubunun yapısı (Yuzugullu ve diğ., 2013)

1.1.2. Katalazların üç boyutlu yapısı

Bir molekülün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri o molekülün üç boyutlu yapısı ile aydınlatılır. Atom ve moleküller gibi çok küçük yapılar, ancak uygun radyasyon ve nanometre boyutunda dalgaboyuna sahip X ışınları sayesinde görülebilir. Moleküllerin üç boyutlu yapılarının elde edilmesinde; X ışını kristalografisi, elektron ve nötron difraksiyonu ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi gibi deneysel teknikler kullanılmaktadır. Ancak çok büyük yapılı ve çok küçük yapılı proteinlerin tayini en iyi X ışını yöntemi ile gerçekleşmektedir. Protein molekülünün birincil yapısı biyokimyasal yöntemlerle belirlenirken, ikincil ve üçüncül yapısı protein içindeki atomların bilgisini veren X ışını kristalografisi ile belirlenmektedir. X ışını kristalografisi, DNA'nın çift sarmal yapısının belirlenmesinde, ilaçların hedef proteinle etkileşimlerini incelemek üzere farmakoloji gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. X ışını kristalografisinin temel adımları (Şekil 1.2.) gösterilmektedir.



Şekil 1.2. X ışını kristalografisinde 3 boyutlu görüntü eldesi

Katalazlar, X ışını protein kristalografisi kullanılarak üç boyutlu yapısı çıkartılan ilk enzimlerden biridir (Yüzügüllü, 2010). Günümüze kadar 16 farklı monofonksiyonel katalazın kristal yapısı belirlenmiştir. Bunlar arasında sığır karaciğerinden (BLC) (Fita ve diğ., 1986; Murthy ve diğ., 1981) elde edilen katalazın yanı sıra *Escherichia coli* (Bravo ve diğ., 1995, 1999), *Enterococcus faecalis* (Hakansson ve diğ., 2004), *Neurospora crassa* (Díaz ve diğ., 2004), *Exiguobacterium oxidotolerans* (Hara ve diğ., 2007; Díaz ve diğ., 2012), *Helicobacter pylori* (Loewen ve diğ., 2004), *Micrococcus lysodeikticus* (Murshudov ve diğ., 1992, 2002), *Penicillium vitale* (Vainshtein ve diğ., 1981, 1986), *Pichia angusta* (Peña-Soler ve diğ., 2011), *Proteus mirabilis* (Gouet ve diğ., 1995), *Pseudomonas syringae* (Carpena ve diğ., 2003), *Scytalidium thermophilum* (Yuzugullu ve diğ., 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (Maté ve diğ., 1999) ve *Vibrio salmonicida* (Riise ve diğ., 2007) gibi birçok mikroorganizmadan elde edilen katalazlar yer almaktadır.

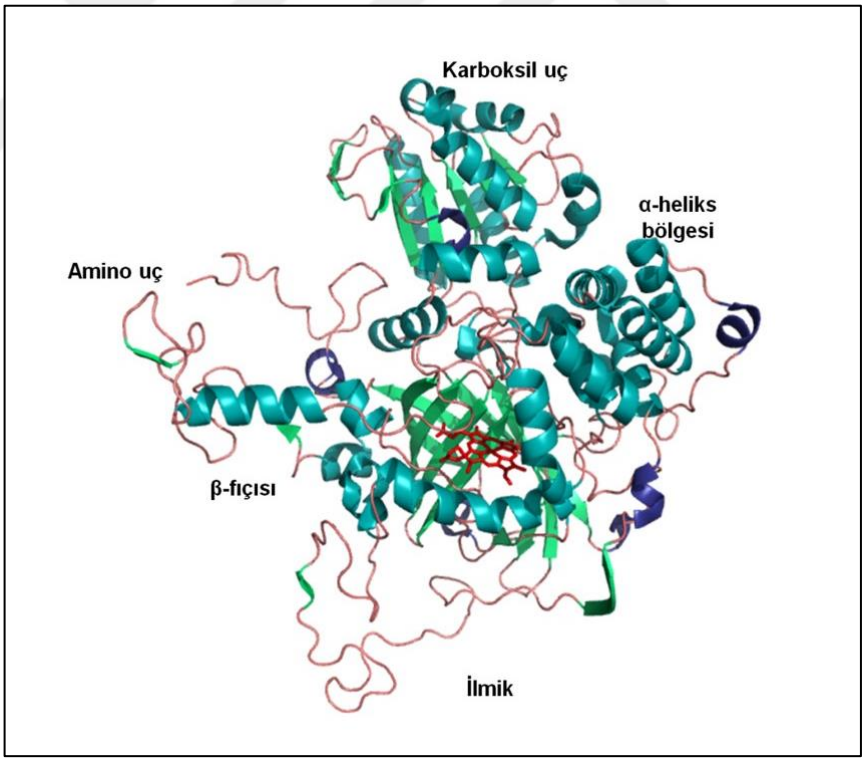
Hemen tüm katazların X ışını kristalografisinden elde edilen kristal yapısı incelendiğinde beş önemli bölgeden oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 1.3.).

Bunlar;

a. β-fıçısı,

b. Amino uç,
c. Karboksil uç,
d. Uzun ilmik kısmı,
e. α-heliks bölgesi.

Katalazların karakteristik özelliğini "β-fıçı" kısmı sağlamaktadır. "β-fıçı"sını oluşturan aminoasitlerin yarısı 'hem' grubunun distal kısmını oluştururken, aminoasitlerin diğer kısmı küçük katalazlarda NAD(P)H bağlanma bölgesine denk gelmektedir. Amino uç kısmında monomerler arası etkileşim oldukça yoğun olduğundan bu kısmın enzimin moleküler stabilitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Karboksil uç kısmı enzimin proteolize ve yüksek sıcaklığa dayanıklılığını temsil etmektedir. Uzun ilmik kısmı ise proteinin β-fıçı ve α-heliks bölgelerini bağlamaktadır. Bu bölgede ikincil yapılar bulunmamaktadır. Son olarak, α-heliks bölgesi enzimin ikincil yapısını oluşturmaktadır (Mate ve diğ., 2001).



Şekil 1.3. *E. coli* HPII Katalazının üç boyutlu yapısı, (Diaz ve diğ., 2004)

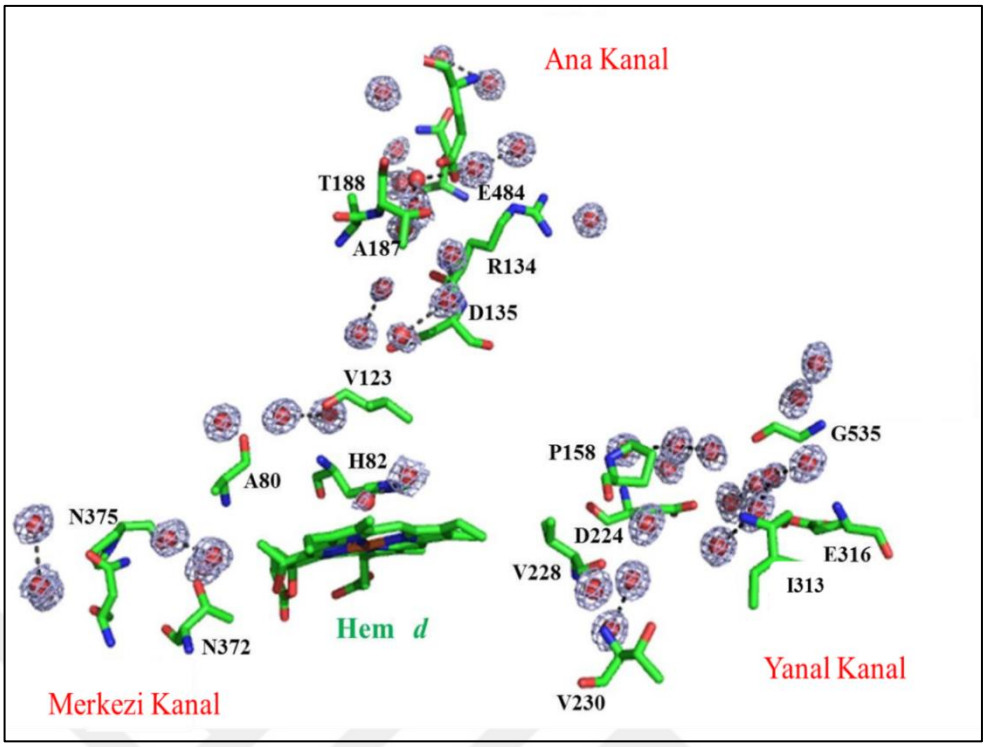
Katalazlarda, aktif merkez (hem grubu) proteinde gömülü bir şekilde bulunur (Loewen, 1997; Mate ve diğ., 2001). Katalaz enzim araştırmaları sonucu, protein yüzünden oldukça uzakta bulunan aktif merkeze ulaşan üç kanalın varlığı

keşfedilmiştir (Şekil 1.4). Bu kanallar sırasıyla ana kanal, yanal kanal ve merkezi kanal olarak adlandırılmaktadır. Ana kanal, enzimin aktif merkezine yukarıdan dik olarak uzanan yaklaşık 55Å uzunluğunda olup, substratların aktif merkeze ulaşmasında başlıca role sahiptir (Mate ve diğ., 2001; Switala ve Loewen, 2002). Ana kanal üzerinde aktif merkeze yakın olan aminoasitler genellikle hidrofobik özelliktedir. Ana kanal üzerinde bulunan *S. thermophilum* katalazındaki Val123 (Val169, *E. coli* HPII), Asp135 (Asp181, *E. coli* HPII), Tyr369 (Tyr415, *E. coli* HPII), His82 (His128, *E. coli* HPII) ve Asn155 (Asn201, *E. coli* HPII) amino asitleri hemen hemen tüm katalazlarda korunmuş olarak bulunurlar (Chelikani ve diğ., 2003).

Bu amino asitler arasından valin (Val169, *E. coli*) ve aspartatın (Asp181, *E. coli*), substratın aktif merkeze ulaşmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Chelikani ve diğ., 2003). Yine bu kanal üzerinde bulunan ve aktif merkeze (hem grubuna) yakın mesafede bulunan tirozin (Tyr415, *E. coli*), histidin (His128, *E. coli*) ve asparajin (Asn201, *E. coli*) aminoasitlerinin enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Histidinin ayrıca, 'hem' prostetik grubun sentezinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Chelikani ve diğ., 2003).

Diğer bir kanal olan yanal kanal, enzimin yan yüzeyinden başlayarak hem bölgesinin (aktif merkez) alt kısmına doğru uzanmaktadır (Şekil 1.4). Yanal kanalın uzunluğu yaklaşık 30Å'tur ve küçük alt üniteli katalazlarda gözlenen NAD(P)H bağlanma bölgesi burada yer almaktadır (Mate ve diğ., 2001). Yanal kanalın katalitik reaksiyon mekanizmasındaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir (Diaz ve diğ., 2004). Ancak reaksiyon ürünü olan su molekülünün enzimi terk ederken bu kanalı kullandığı varsayılmaktadır (Sevinç ve diğ., 1999).

Enzimin üçüncü kanalı olan merkezi kanal ise, hem grubuna yukarıdan ancak enzimin ortasından hem grubuna doğru uzanmaktadır (Chelikani ve diğ., 2004). Bu kanal ile ilgili literatürde detaylı bilgi yoktur.



Şekil 1.4. *S. thermophilum* katalazının hem grubu ve kanalları, PDB kodu: 4AUM

Ana kanal, substratların aktif merkeze ulaşmasında her ne kadar önemli rol taşısa da reaksiyon ürünlerin ve moleküler oksijenin ana kanaldan çıkışı için oldukça dar ve uzundur. Merkezi kanalın hidrofilik olması, su moleküllerin bulunduğu yere doğru uzanmasını sağlamaktadır. Böylece reaksiyon ürünü olan moleküler oksijenin merkezi kanaldan çıkışı gerçekleşebilir. Ancak aktif merkezlerinde b tipi hem grubu bulunduran tüm katalazlarda oksijen molekülünün, merkezi kanal yerine ana kanalda bulunduğu gözlemlenmiştir. (Kalko ve diğ., 2001; Diaz ve diğ., 2004).

1.1.3. Katalaz enzimlerinin endüstriyel kullanımı

Katalaz enzimi, canlıların yaşamlarını devam ettirebilmesi için gerekli olan enzimlerden biridir. Canlı için zararlı olan hidrojen peroksidin yıkımını sağlayıp, onun zehir etkisinin vücuda dağılmasının önlenmesi başlıca görevlerindendir. Katalazın substratı olan hidrojen peroksidin endüstride kullanımın artması, ekonomik ve oldukça kararlı katalaz enzimlerinin üretilmesini gerekli kılmıştır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Bu enzim tekstilde ağartma endüstrisinde, gıda endüstrisinde, farmasötik endüstride, kağıt endüstrisinde, çevresel kirlenme çalışmalarında ve lens sularının temizliğinde, detoksifikasyon sistemlerinde, immobilizasyonda, enzimatik polimerizasyon işlemleri gibi farklı bir çok alanda kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015). Örneğin; tekstilde ağartma işlemi sırasında pamukta bulunan doğal renk pigmentlerinin hidrojen peroksit kullanılarak uzaklaştırılır. Ham pamukta kalan hidrojen peroksit ise yıkamayla uzaklaştırılsada ortamda kalan hidrojen peroksit çevre açısından zararlı olacağından katalaz enzimi kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Diğer yandan, gıda sektöründe özellikle soğuk sterilizasyonda kullanılan hidrojen peroksitin sütün işlenmesi sırasında ortamdan uzaklaştırılması gereklidir ve bunun için katalaz enzimi kullanılır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Günümüzde birçok firma (Merck, Novodis, Sigma, Innovadex) katalaz enzimini ticari olarak üretmektedir. Bu tip katalazların eldesi başlıca mikroorganizmalar olan *Aspergillus niger* ve *Micrococcus lysodeikticus*'tur (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

1.2. Fenol Oksidazlar

Fenol oksidazlar, moleküler oksijen varlığında farklı fenolik maddeleri katalizleyen enzimlerdir. Fenol oksidazlar genellikle savunma amacıyla üretilir ve sadece fenolik madde varlığında değil, savunmayı gerektirecek çeşitli stres koşullarında çok sayıda üretilebilirler. Genel olarak lakkaz, tirozinaz ve katekol/oksidaz olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Lakkazlar (p-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; E.C. 1.10.3.2), genellikle bitki ve mantar yapılarında bulunurken hayvan hücrelerinde bulunmazlar. Bünyelerinde aktivite açısından önemli olan dört adet bakır atomu bulundururlar. Tirozinazlar (monofenol monooksijenaz; E.C. 1.14.18.1), o-difenollerin oksidasyonu ile o-kinonların oluşmasını sağlar (Marusek ve diğ., 2006). Katekol oksidazlar ise genellikle bitkilerde bulunmakta olup o-difenollerin oksidasyonu ile o-kinonların oluşmasını sağlar ve bu oksidasyonu gerçekleştirebilmek için moleküler oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu enzim grubu melanin sentezinde kilit rol oynar. Aktif merkezinde bakır iyonları bulunur. Üç farklı sınıfa ayrılan fenol oksidazlar, bakterilerden memeli hücrelerine kadar birçok canlıda bulunmakta ve çeşitlilik göstermektedirler (Sanchez-Amat ve Solano, 1997).

1.2.1. Fenol oksidaz ve katalaz enzimlerinin çift işlevliliği

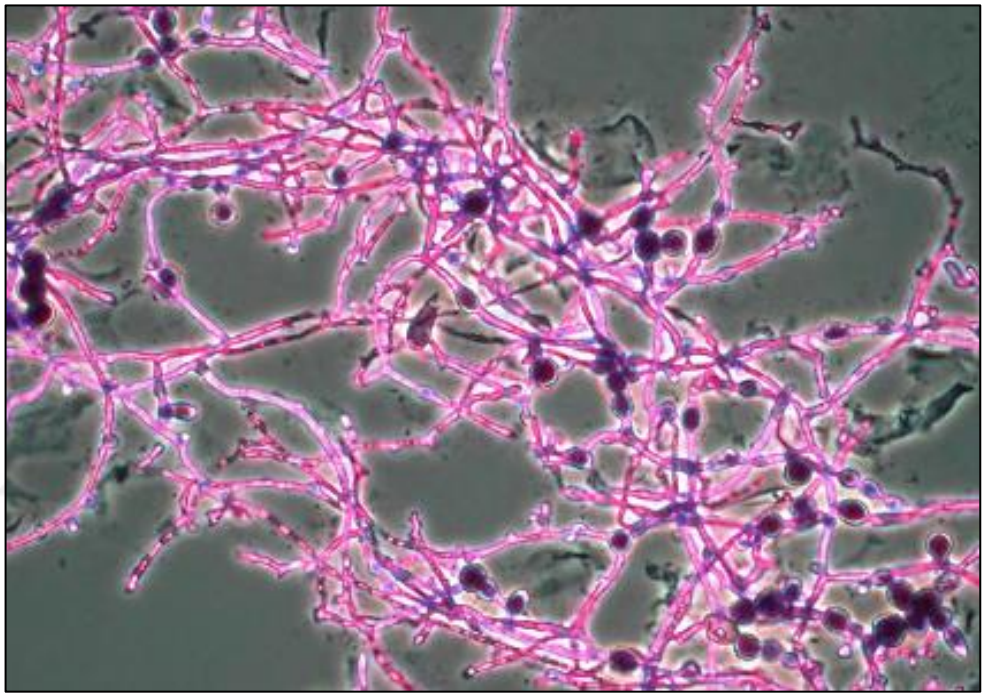
Bölüm 1.1'de belirtildiği üzere katalaz enziminin başlıca görevi hidrojen peroksitin yıkımını sağlamaktır. Bunun yanında hidrojen peroksit varlığında düşük molekül ağırlıklı metanol, etanol gibi alkollerin oksidasyonunu da gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca katalaz enziminin bu özelliklerine ek olarak, hidrojen peroksit yokluğunda veya ortamda çok az bulunduğunda oksidaz aktivitesi gösterdiği de gözlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma, memeli hücrelerinde katalaz aktivitesinin yanında oksidaz aktivitesinin de görüldüğü ilk katalaz enzimi olarak literatürde yerini almıştır. Gözlemlenen bu oksidaz aktivitenin reaksiyon sırasında Bileşik II'nin oluşmasını sağladığı ve sonrasında porfirin halkasının bir elektron alarak enzimin tekrar dinlenme formuna geri döndüğü varsayılmaktadır (Vetrano ve diğ., 2005). Yakın bir geçmişte, termofilik mantar olan *S. thermophilum* organizması üzerindeki çalışmalarda, organizmanın hücre dışı bir fenol oksidaz enzimi ürettiği düşünülmüştür. Ancak bu hücre dışı fenol oksidaz enziminin sekans analizi, enzimin oksidaz aktivitesine sahip çift aktiviteli bir katalaz enzimi olduğunu göstermiş ve enzim Katalaz- Fenol oksidaz anlamına gelen CATPO olarak adlandırılmıştır (Ögel ve diğ., 2006; Kocabas ve diğ., 2008). Mantar katalazı üzerinde gerçekleştirilen bu çalışma detaylı olarak karakterize edilen ilk çift aktiviteli katalaz-fenol oksidaz enzimidir. İnsan, sığır ya da *C. glutamicum* ve *A. niger* gibi mikroorganizmalardan elde edilmiş ticari katalazlarda da oksidaz aktivitenin varlığı gösterilmiş ve bu tip bir ikincil aktivitenin düşük seviyelerde de olsa birçok katalazda olabileceği vurgulanmıştır (Yuzugullu ve diğ., 2013).

1.3. Termofilik Mantarlar

Optimum gelişme sıcaklıkları 50 ila 70°C arasında gözlenen mikroorganizmalar termofilik olarak adlandırılırlar. Termofilik mantarlar, 20°C'den 61°C'ye kadar geniş sıcaklık aralığında üreyebilmektedirler. Endüstrideki uygulamalarda termostabil enzim kaynağı olarak kullanılan termofilik mantarlar, ısıya karşı dirençli oldukları için bir çok bilim adamı tarafından çalışılmaktadır (Ögel ve diğ., 2001).

1.3.1. *Scytalidium thermophilum*

Termofilik mantar olan *Scytalidium thermophilum* (Şekil 1.5), optimum gelişme sıcaklığı 45 ila 50°C arasında olan bir küftür. Bu organizma, yemeklik mantar olan *Agaricus bisporus*'un üretilmesinde verim arttırıcı olarak kullanılmaktadır. *S. thermophilum*'un bu özelliği, ortamda bulunan amonyak konsantrasyonunu azaltarak miselyum büyümesini teşvik etmesinden ileri gelir. Besin maddelerini immobilize ederek mantar miselyumları için uygun ortam oluştururlar (Wiegant ve diğ., 1992).



Şekil 1.5. *S. thermophilum* mantarı

1.3.2. *S. thermophilum* katalaz-fenol oksidazı (CATPO)

Önceki bölümlerde belirtildiği üzere, yayınlanan ilk bulgulara göre, *S. thermophilum*'un fenolik maddeler varlığında hücre dışı bir fenol oksidaz enzimi ürettiği gözlemlenmiştir (Ögel ve diğ., 2006). Öncelikle oluşan bu enzim, bilinen hiç bir fenol oksidaz sınıfına dâhil edilememiştir. Berka (1998) tarafından lakkaz fenol oksidazların molekül ağılığının 75-80 kDa olması ve pI 5,1 olması nedeniyle, *S. thermophilum* enzimi lakkaz grubuna benzetilmiştir. Ancak 2006 yılında araştırmacı Ögel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hücre dışında üretilen enzimin fenol oksidaz sınıfından hangi enzime benzediğini anlamak amacıyla substrat olarak katekol, L- DOPA, ABTS ve *p*-hidrokinon, gibi çeşitli fenolik maddeler kullanılmış

ve sonuç olarak *S. thermophilum*'un tipik bir lakkaz özelliği olan ABTS'yi oksitlemediği gözlenmiştir (Ögel ve diğ., 2006). Buna göre, *S. thermophilum* tarafından üretilen enzimin lakkaz grubu yerine katekol oksidaz ya da trizonaz sınıfına dâhil edilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu enzimin, sıcaklığa dayanıklı DMSO (dimetil sülfoksit) ve etanol organik çözücülerde kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. 2008 yılında *S. thermophilum* enzimi üzerine yapılan diğer bir çalışmada, hücre dışı fenol oksidaz enziminin aslında oksidaz aktivitesine sahip bir katalaz enzimi olduğu keşfedilmiştir (Sutay Kocabaş ve diğ., 2008). Katalazların bu özelliğinin diğer katalazlarda da olup olmadığını anlamak için farklı kaynaklardan (insan eritrositleri, sığır karaciğeri, *A. niger* ve *C. glutamicum*) üretilen katalaz enzimleri ile *S. thermophilum* katalazı karşılaştırılmıştır (Yuzugullu ve diğ., 2013). Yapılan bu karşılaştırmada 4 kaynaktan alınan katalaz enziminde katalaz aktivitesine ek olarak fenol oksidaz aktivitesi de görüldüğü rapor edilmiştir. 2013 yılında Koclar Avcı ve arkadaşları tarafından, enzimin oksidaz aktivitesini anlayabilmek amacıyla 14 farklı fenolik madde (katekol, hidrokinon, gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, kumarik asit, klorojenik asit, katekin, resorsinol, resveratrol, mirisetin vb.) substrat olarak kullanılmış ve *S. thermophilum* katalazının basit yapılı fenol olan katekol dışında, polifenolik maddelerin bazılarını da oksitlediği rapor edilmiştir (Koclar Avci ve diğ., 2013). Termofilik bir mantardan elde edilen bu katalazın, kararlı yapıda olması, tek aşamada hem hidrojen peroksiti (katalaz aktivitesi) hem de oksijeni ortamdan uzaklaştırabilecek (oksidaz aktivitesi) özellikte olması, maliyeti düşük ve yüksek verimli katalazların üretilmesi gerektiğini düşündürmüştür. Bunun üzerine Yüzügüllü ve arkadaşları tarafından 2013 yılında, *S. thermophilum* katalazı (CATPO) için rekombinant ekspresyon sistemi geliştirilmiş ve mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular katalaz ve oksidaz aktivitelerinin aynı aktif bölgede gerçekleştiğine işaret etmiştir. Yapısal değişiklikleri gözlemlemek amacıyla üç boyutlu yapı analiz çalışmaları yapılmış, enzimin kristal yapısı 1.4Å'da belirlenmiştir. Ayrıca ana kanalda bulunan farklı CATPO varyantlarına ait kristal yapıları da çözülmüş olup mutasyon sonuçları bu sayede yapısal olarak da değerlendirilmiştir. Ana kanal üzerinde bulunan His82, Asn155, Val123, Phe160 amino asitleri farklı özellikteki amino asitlere dönüştürülmüş ve katalitik aktivitede önemli rollere sahip olduğu görülmüştür (Yuzugullu ve diğ., 2013).

Bu tez çalışmasında ise, termofilik bir mantar olan *S. thermophilum* katalazının (CATPO) ikincil oksidaz aktivitesinin katalitik mekanizmadaki rolünün aydınlatılması amacıyla katalaz enzimi üzerinde bulunan yanal kanal üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kimyasallar ve enzimler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar, markörler ve enzimler Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Invitrogen (İngiltere), Bio-Rad (Amerika) firmalarından temin edildi. Plazmid DNA izolasyonunu gerçekleştirmek üzere QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)'dan satın alındı. Sindirim enzimi olarak DpnI (NEB, İngiltere) kullanıldı. Selüloz membranlar (Millipore, Amerika), solüsyonların filtre ile sterilizasyonunu sağlamak için kullanıldı. FPLC saflaştırma sistemi (AKTAPrime) ve saflaştırma kolonu, GE Healthcare (Amerikada)'dan satın alındı. Konsantre proteinleri elde etmek için santrifüj tüpleri Amicon (Amerika)'dan temin edildi. Saflaştırılan proteinlerin spektroskopik ölçümleri Cary 60 (Agilent, Amerika) ile gerçekleştirildi. X ışını kristalizasyonu için gerekli olan kimyasallar ve cihazlar Hamburg Üniversitesi (Almanya)'de temin edildi ve kristaller ait difraksiyon verilerin toplanması ESRF'da (European Synchrotron Radiation Facility, Fransa) gerçekleştirildi.

2.1.2. Mikroorganizmalar

CATPO varyantlarını elde etmek için; *E. coli* XL1-Blue ve BL21 (DE3) star suşları kullanıldı. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar EK D'de verilmektedir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Plazmid, mikroorganizma ve kültür hazırlanması

Bu tez çalışmasında daha önceden hazırlanmış ve pET28a-CATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013) olarak adlandırılmış; catpo geninin yanı sıra Histidin etiketi (altı adet histidin aminoasitinden oluşan) içeren bir rekombinant plazmid kullanıldı (EK A).

S. thermophilum catpo genini transfer etmek için kullanılan *E. coli* XL-1 Blue ve BL21(DE3) star hücreleri farklı petrilerde, bir gece katı besiyerinde (Luria Broth Agar, LBA) büyütüldü. Kültürlerden alınan hücreler, sıvı besiyerlerine (LB) (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) aktarıldı. LB besiyerine aktarılan hücreler, 37°C'de yaklaşık 3 saat inkübe edildi ve saatte bir 595 nm'de optik yoğunluk değerleri (OD) ölçüldü. OD değeri yaklaşık 0,4 olduğunda, LB besiyerinde büyüyen kültürler 50 ml'lik falkon tüplerde 5 dk buz üzerinde bekletildi. Buzda bekletilen hücreler, 4°C ve 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkondaki hücrelerin süpernatan kısmı atılıp, pelet 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 çözdürüldü. Daha sonra çözdürülen örnek, 4°C ve 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Örneğin pelet kısmı 2 ml Tfb2 (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, %15 (v/v) gliserol, pH 6,5) içinde çözdürülüp, 50 µl olacak şekilde ependorf tüplerine konuldu. Hazırlanan hücreler sıvı azotta dondurularak -80ºC'de muhafaza edilmek üzere saklandı.

2.2.2. Primer tasarımı

Primer tasarımı yapılırken baz uzunluğunun 28-34 baz arasında olmasına ve primer erime sıcaklığının (Tm) 78°C ya da daha yüksek olmasına özen gösterildi. Primerlerin en az %40 oranında GC baz çifti içermesine ve GC bazı ile başlayıp-sonlanmasına dikkat edildi. Arzu edilen mutasyonları içeren primerler, catpo sekansının her iki ucundan da yaklaşık 10-15 bazlık bir kısmı içerecek şekilde bulunmaktadır (EK B). Bu doğrultuda hazırlanan, istenen mutasyonları içeren primerler Sacem (Bursa) ve Sentegen (Ankara) firmalarından satın alındı (Tablo 2.1).

Tasarlanan primerlerden stok hazırlamak için; öncelikle primerler 1 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi. Satın alınan primerleri içeren tüplere firma tarafından temin edilen bilgi formuna göre distile su ilave edildi. Daha sonra 100 µM'lık stokları hazırlanarak -20°C'ye kaldırıldı.

Tablo 2.1. Tasarlanan oligonükleotitler ve değiştirilen bazlar

Mutant	Sekans Değişikliği	Oligonükleotit[a]
V228A	GTT→GCT	5'- GCACATGGACGGCTTCGGT**GCT**CACACTTTCCGTTTC
V228C	GTT→TGC	5'-GCACATGGACGGCTTCGGT**TGC**CACACTTTCCGTTTC
V228F	GTT→TTC	5'-GCACATGGACGGCTTCGGT**TTC**CACACTTTCCGTTTC
V228G	GTT→GGT	5'-GCACATGGACGGCTTCGGT**GGT**CACACTTTCCGTTTC
V228I	GTT→ATC	5'-GCACATGGACGGCTTCGGT**ATC**CACACTTTCCGTTTC
V228S	GTT→AGC	5'-GCACATGGACGGCTTCGGT**AGC**CACACTTTCCGTTTC
E316F	GAA→TTC	5'-CCGACCAAAATCATCCCG**TTC**GAATACGCTCCGCTGACC
E316H	GAA→CAC	5'-CCGACCAAAATCATCCCG**CAC**GAATACGCTCCGCTGACC
H246W	CAC→TGG	5'-CTGATCAAATGG**TGG**TTCAAATCTCGTCAGGGTAAAGCTAGTCTGG
I313F	ATC→TTC	5'-GGACCCGACCAAA**TTC**ATCCCGGAAGAATACGC
I314F	ATC→TTC	5'-GGACCCGACCAAAATC**TTC**CCGGAAGAATACGC
L321A	CTG→GCG	5'-CCGGAAGAATACGCTCCG**GCG**ACCAAACTGGGTCTG
P158W	CCG→TGG	5'-CGTTGGTAACAACATC**TGG**GTTTTCTTCATCCAGGACGC
Q293W	CAG→TGG	5'-GGGACGTATGCGTA**TGG**ATCGTTGACGAATCTCAGGC
V536A	GTT→GCG	5'-CAAAACCGCTGGT**GCG**TCTATCGTTGGTTCTGG
V536W	GTT→TGG	5'-CAAAACCGCTGGT**TGG**TCTATCGTTGGTTCTGGTCCG

[a]Mutasyona uğratılmış kodonlar kırmızı renk ile belirtilmiştir

2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

Katalaz (catpo) geninin zıt zincirindeki her bir tamamlayıcı oligonükleotit primeri, KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya) kullanılarak 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi ile çoğalımı gerçekleştirildi. Yöntemde kullanılan reaksiyon karışımı ve döngüsü Tablo 2.2 ve Tablo 2.3'de verilmiştir. Toplamda gerçekleştirilen 25 döngü ile istenilen mutasyonu içeren çentikli plazmidlerin ortaya çıkması sağlandı. PZR yönteminden elde edilen ürün, restriksiyon enzimlerinden biri olan, metillenmiş veya yarı metillenmiş DNA'ları tanıyan DpnI (NEB, İngiltere) enzimi ile muamele edilerek parental DNA taşıyan yani mutasyonu geçekleşmemiş plazmidler PZR ürününden uzaklaştırıldı. İstenilen mutasyon bölgelerini içeren sentezlenmiş DNA, dizi analizi ile doğrulandıktan sonra *E. coli* XL-1 Blue kompetan hücresine aktarılmak üzere hazırlandı.

Tablo 2.2. PZR yönteminde kullanılan karışım (Yüzügüllü, 2010; Zengin, 2016)

PZR Bileşenleri	**Miktar**	**Konsantrasyon**
KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X
KOD Hot Start DNA polimerazı	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. PZR döngüsü (Yüzügüllü, 2010; Zengin, 2016)

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	-

%0,8 w/v'lik agaroz jel hazırlanılarak, 5'er µl PZR ürünlerinden alınan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve DNA miktarları ölçüldü.

2.2.4. Nükleik asitlerin agaroz jel elektroforezi ile analizi

PZR ürünlerini görüntülemek için Agaroz Jel Elektroforez yöntemi kullanıldı. 0,8 gram tartılan agaroz (%0,8 w/v'lik), 100 ml 1X Tris Asetat-EDTA (TAE) solüsyonu içerisine eklendi ve homojen karışım elde etmek için mikrodalga fırında ısıtıldı. Homojen karışım elde edildiğinde agaroz jel üzerinde DNA bantlarını görüntülemeye olanak veren SYBR Safe boyası (Invitrogen, İngiltere) son konsantrasyonu 1g/ml olacak şekilde ilave edildi ve çalkalandı. Hazırlanan solüsyon elektroforez sistemi içerisine yavaşça döküldü ve solüsyon içerisinde polimerizasyon gerçekleşmesi için bekletildi. Jel donduktan sonra, üstünü tamamen örtecek şekilde tanka 1X TAE

tamponu eklendi. Örnekler yükleme tamponuna (6X; NEB, İngiltere) 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Örneklerin yanında olan başka bir kuyucuğa 6 µl markör (1 kb DNA, NEB, İngiltere) ilave edildi. Örnekler 100 V'da 60 dk yürütüldü. Elektroforez bitiminde DNA'ların görüntülenmesi için UV ışık kullanıldı.

2.2.5. Nükleik asit konsantrasyon tespiti ve saflık ölçümü

Örneklerin içerdikleri DNA miktarlarını öğrenmek ve saflığını ölçmek için UV spektroskopisi ve Qubit 2,0 Florometre (Amerika) kiti kullanıldı. Örneklerin DNA saflığı, UV spektrofotometresinde 260 nm ve 280 nm değerlerinde yapılan ölçümlerin karşılaştırılması ile yapıldı. DNA örneklerinin A260/A280 oranı 1,7-2,0 arasında olmasına dikkat edildi. DNA konsantrasyonu için 260 nm'de alınan değer kullanıldı (Şekil 2.1).

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

Şekil 2.1. Örnekteki DNA konsantrasyon hesaplaması (Zengin, 2016)

2.2.6. Kompetan hücrelere transformasyon

Saflığı ve miktarı elektroforetik ve spektrofotometrik yöntemlerle doğrulanan PZR ürününde istenilen mutasyonun gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla *E. coli* organizmasının kompetan özelliği olan XL-1 Blue hücrelerine transforme edildi. -80°C'de muhafaza edilen hücreler buz içine konularak, 50 µl hücre içeren ependorf tüplerine 3 µl (1-10 ng DNA içerecek şekilde) ilave edildi. Hücreler 30 dk buzda bekledikten sonra 1 dk 42°C'lik sıcak su banyosunda inkübe edildi. Sıcak su banyosundan alınan hücreler tekrar buzda 2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 450 µl LB besiyeri eklenerek 37°C'de 1 saat çalkalamalı inkübatör ile hücrelerin büyümesi sağlandı. Büyüyen hücreler 8000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatan kısmından 400 µl atıldı. Geriye kalan 100 µl içerisinde çöken hücreler yavaşça pipetleme yöntemiyle çözdürüldü ve 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerine yayma yöntemi ile inoküle edildi. İnoküle edilen hücreler 37°C'lik etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı (Yüzügüllü, 2010).

2.2.7. Plazmid DNA izolasyonu

Transformasyonu gerçekleşmiş olan rekombinant hücrelerden, tek koloni seçilerek plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirmek için LB besiyerine, kanamisin (50 µg/ml) antibiyotiği varlığında, 37°C ve 200 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen hücrelerden plazmid DNA izolasyonu yapmak için Alkalin-SDS Plazmid Miniprep yöntemine dayanan QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Buna göre, 10 ml'lik LB besiyerinde 1 gece inkübasyona bırakılan hücreler, 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatan kısmı atılarak 250 µl "Buffer P1" içerisinde pelet çözdürüldü. Çözdürülen hücreler küçük ependorf tüplere aktarıldı. Üzerine 250 µl "Buffer P2" eklendi ve hücreler berraklaşıncaya kadar ependorflar ters düz edildi. Daha sonra 350 µl "Buffer N3" eklendi ve tekrar ependorflar ters düz edilerek karıştırılması sağlandı. 13000 rpm'de 10 dk sonra supernatant kısmı elüsyon kolonuna konuldu ve örnekler 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolondan geçen kısım atıldı. Kolon daha sonra, 0,5 ml "Buffer PB" ile yıkandı ve 1 dk santrifüj edildi. Kolondan geçen kısım atıldıktan sonra 0,75 ml "Buffer PE" solüsyonu eklenerek kolon yıkandı ve tekrar 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen kısım atıldı ve kolon 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere aktarıldı. Daha önceden 70ºC'de su banyosunda inkübe edilmiş kolona ddH_2O'dan 50 µl alınarak kolona ilave edildi. 1 dk bekletildikten 1 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolondan izole edilen plazmid DNA'lar yeniden 1,5 ml'lik steril ependorflara aktarıldı. Örnekler sekans dizi analizi yapılmak üzere Medsantek Laboratuvarı'na (İstanbul) gönderildi.

2.2.8. Rekombinant proteinlerin üretimi

Mutasyon içerdiği doğrulanan plazmid DNA'lar, daha sonra *E. coli* organizmasının kompetan özelliği olan BL21(DE3) star suşlarına transforme edildi. Hücre stokların hazırlanmasında öncelikle, LBA besiyerinde büyüyen mutasyon hücrelerinden tek kolonu alarak aktifleştirmek üzere LB besiyerine inoküle edildi. Daha sonra hücre kültürleri içinde, %80 w/v gliserol içeren kryo tüplerine aktarılarak -80°C'ye kaldırıldı.

Elde edilen farklı CATPO varyantlarını üretmek için, -80°C'ye kaldırılan stok kültürden steril çubuk yardımıyla, 10 ml LB besiyerine ekimi yapıldı. 37°C ve 200

rpm'e ayarlanan inkübatörde bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen 10 ml'lik hücreler daha önceden hazırlanmış 50 µg/ml kanamisin içeren 1 litrelik LB besiyerine aktarılarak 37°C ve 200 rpm ayarlı çalkalamalı inkübatörde 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. 595 nm'de OD değeri yaklaşık 0,6 ile 0,8 arasında bir değer verdiğinde besiyerine son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek 30°C'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler, 9000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve peletler daha sonra protein saflaştırılmasında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi (Zengin, 2016).

2.2.9. Rekombinant proteinlerin saflaştırılması

Rekombinant yabanıl tip CATPO (wt) ve 16 farklı CATPO varyantına (V228A, V228C, V228F, V228G, V228I, V228S, E316F, E316H, H246W, I313F, I314F, P158W, Q293W, V536A, V536W) saflaştırılmada kullanılmak üzere lizis işlemi yapıldı. -80°C'de muhafaza edilen farklı mutasyonları taşıyan hücrelerden oluşmuş peletler, içerisine 1mg/ml lizozim, 5µl benzonaz endonükleaz, 1:4 oranında hazırlanmış proteaz inhibitör tablet (EDTA içermeyen) ilave edilen 100ml'lik liziz solüsyonunda (50 mM Na-HEPES, %25 (w/v) sükroz, %1 (v/v) Triton X-100, 5 mM $MgCl_2x6H_20$, pH 8) çözdürülerek 3 saat boyunca liziz işlemine maruz bırakıldı. Lizis işlemi tamamlandıktan sonra hücreler 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatan kısmı alınarak bir gece boyunca saflaştırma sırasında kullanılan bağlama tamponuna karşı (0,5 M NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7,4) diyaliz yapıldı.

Bu çalışmada, Histidin etiketli rekombinant proteinlerin tek basamakta hızlı bir şekilde saflaşmasını sağlayan afinite kromatografisi kullanıldı. Afinite kromatografisi, hedef proteinin kolona tutunmuş haldeki liganda bağlandıktan sonra kolondan geri kazanamına dayanır. Kolona bağlanması için kullanılan ligand, Histidin etiketli rekombinant proteinler için Ni^{+2} iyonu olup, kolondan geri kazanımda ise imidazol kullanılır.

Histidin etiketli proteinler (wtCATPO, V228A, V228C, V228F, V228G, V228I, V228S, E316F, E316H, H246W, I313F, I314F, P158W, Q293W, V536A ve V536W), kolon (HiTrap, 5ml) içerisindeki Ni^{+2} iyonu katyonuna bağlanması karışımda bulunan diğer proteinlerin kolona bağlanmadan imidazol (20-40 mM) ve

NaCl (500 mM) içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi (20 mM, pH 7,4) ile uzaklaştırılması ve böylece hedef alınan proteinin daha yüksek miktarda imidazol içeren yine aynı tampon çözeltisi ile kolondan geri kazanımı sağlandı.

Saflaştırma sırasında 5ml'lik HiTrap kolonu ACTA Prime Plus Kromatografi cihazına (GE Healthcare, Amerika) bağlandı. Cihazda akış hızı 1,5 ml/dk olarak ayarlandı, tüm solüsyonlar ve kullanılacak proteini içeren diyalizörneği 0,22 μm'lik filtrelerden geçirildi ve cihazda hava kabarcığı olmaması için solüsyonlar degaze edildi. Cihazın bilgisayarla bağlantısı gerçekleştirildikten sonra, cihazdaki bağlama (A) ve elüsyon (B) tamponlarının geçtiği tüpler önce %20'lik (v/v) etanol içeren solüsyonla daha sonra distile su ile 4 dk 10 ml akış hızında yıkandı. Kolon cihaza takıldı ve 1,5 ml akış hızında 10 dk distile su ile kolon yıkandı. Histidin etiketli proteinlerin kolona bağlanabilmesi için kolon 2 ml (0,1 M) Ni^{+2} ile yüklendi. Fazla nikeli kolondan uzaklaştırmak için kolon 10 dk distile sudan geçirildi. Kolon 17 dk boyunca bağlama tamponu ile yıkandı. Bağlama tamponu içeren kolona, lizis işlemi uygulanarak hücrelerden arındırılmış ve istenilen proteini içeren diyaliz örneğinin, yaklaşık 100 dk 1,5 ml akış hızında yüklenmesi sağlandı. Protein kolona yüklendikten sonra, kolon yıkama tamponundan geçirilerek bağlanmayan veya zayıf bağlanan proteinler ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra istenilen proteini izole etmek için kolon elüsyon tamponundan geçirildi. Saflaştırma sonucunda istenilen proteinler tüplerde toplandı ve proteinin içinde bulunduğu ortamdan tuz (NaCl) ve imidazolü uzaklaştırmak için pH 7,4 olan 20 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisinde bir gece diyalize bırakıldı. Diyaliz tamponundan alınan proteinler konsantre edilmek için Milipore'un Amicon Ultra-15 santrifüj tüplerine transfer edildi ve 10000 rpm'de 30 dk santrifüj yapıldı. Afinite kromatografisi kullanılarak elde edilen proteinlerin saflığı SDS-PAGE elektroforezi ile kontrol edildikten sonra biyokimyasal karakterizasyon ve kristalografi çalışmalarında kullanılmak üzere -80ºC'ye sıvı azotla dondurularak kaldırıldı.

2.2.10. Rekombinant proteinlerin karakterizasyonu

2.2.10.1. SDS-PAGE jel elektroforez analizi

Afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan hedef proteinler, saflaştırma işleminin doğrulanması için SDS-PAGE Jel Elektroforez Analizine maruz bırakıldı. Bu analiz için, Bio-Rad Mini-Protean (Amerika) sistemi kullanıldı.

SDS PAGE Elektroforez jeli için; %5 (v/v) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %0,1 SDS, %5 Akrilamid ve TEMED) ve %15 (v/v) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %0,1 SDS, %15 Akrilamid ve TEMED) hazırlandı (Laemmli, 1970). Proteinleri denatüre etmek için, proteinler indirgeme ajanı (merkaptoetanol) ile birlikte 90°C su banyosunda 10 dk bekletildi. Protein molekül ağırlıklarını belirlemek için markör olarak BioRad Low Range, 6,5-200 kDa (161-0304) kullanıldı. Örnekler elektroforez sistemine yüklendikten sonra 150 V'da 60 dk yürütüldü. Yürütülen jel Coomassie Brillant Blue (CBB) boyası ile boyandı ve protein bantları gözlemlendi.

2.2.10.2. Ultraviyole (UV) görünür spektrum analizi

Saflaştırılan örneklerin "hem" tiplerini belirlemek üzere, görünür UV spektrum analizi yapıldı. Çalışmalar, oda sıcaklığında Cary 60 UV Visible Sepektrofotometre (Agilent, Amerika) cihazı ile yapıldı. Yabanıl tip (wt) CATPO ile farklı CATPO varyantlarının absorbsiyon spektra ölçümleri 200-900 nm aralığında yapıldı. Örneklerin analizi, pH 7 olan sodyum fosfat tamponu (100 mM) ile seyreltilerek, 1 cm kuvarz küvetler yardımı ile gerçekleştirildi.

2.2.10.3. Protein miktar tayini

Saflaştırılan örneklerin protein ölçümleri Bradford metodu kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının verdiği absorbanslara (465-595 nm) bakılmaktadır. Standart protein olarak BSA (Sığır Serum Albumin) kullanıldı.

1000 µl Bradford boyasına 20 µl BSA solüsyonu (2 mg/ml) eklendi. 10 dk oda sıcaklığında gerçekleşen inkübasyon sonrasında 595 nm'de absorbansı ölçüldü. Elde

edilen verilere göre standart protein grafiği çizildi ve saf protein örneklerin miktar tayini bu grafikten hesaplandı (EK C).

2.2.10.4. Enzim aktivite tayini

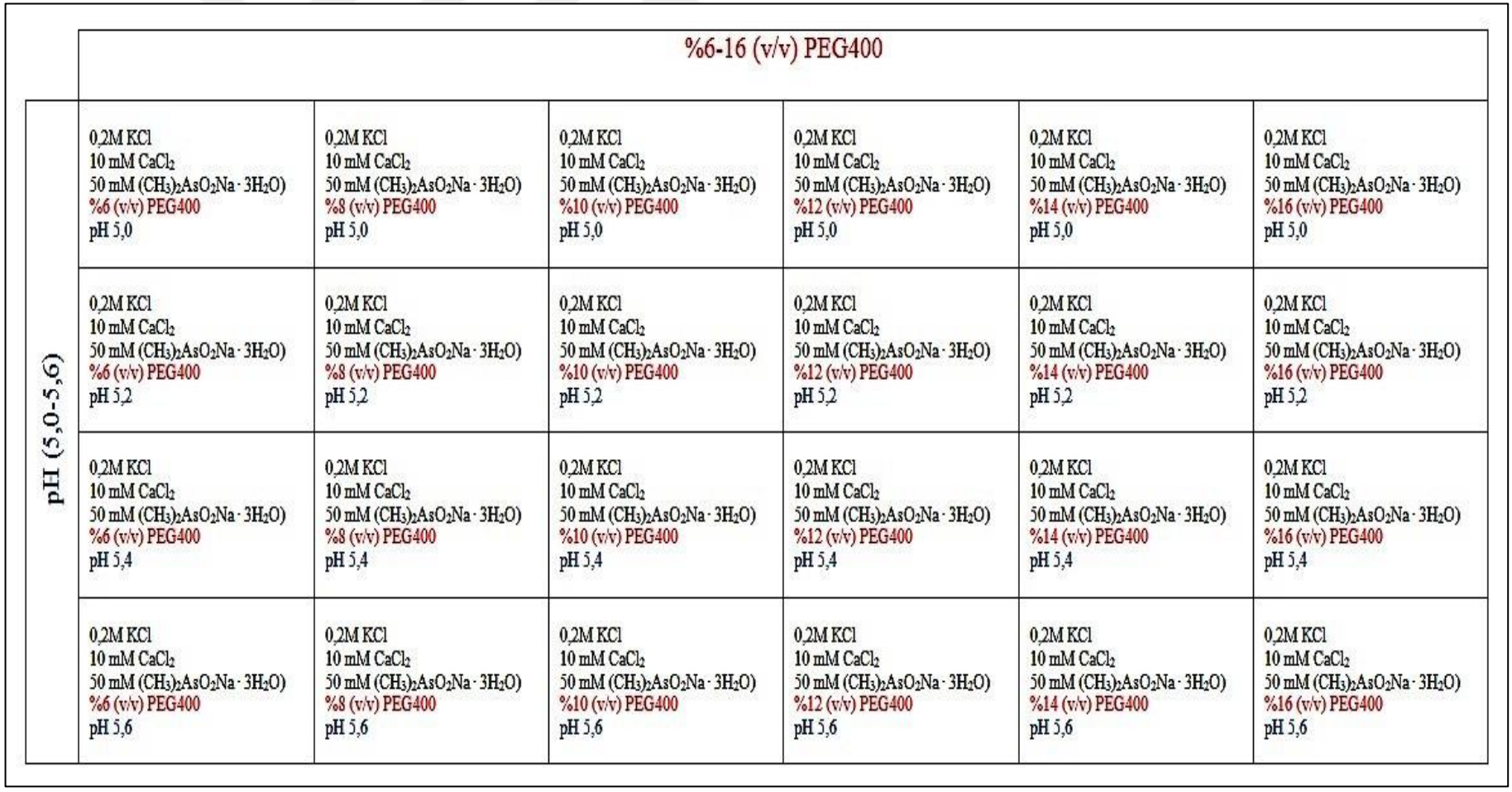
Yabanil tip CATPO ile varyantlarının katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktiviteleri spektrofotometre cihazı (Cary 60, Agilent) ile ölçüldü. CAT aktivitesi için, reaksiyon karışımı olarak 10 mM H_2O_2, 100 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponu ve toplam hacim 1 ml olacak şekilde seyreltilmiş enzim kullanıldı. Daha önceden 60°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda, substrat solüsyonu (tampon çözeltisinde hazırlanan H_2O_2) 1 dk inkübe edildi. İnkübe edilen solüsyon plastik UV küvete (Brand, Almanya) aktarıldı ve enzim eklendikten sonra 240 nm'de ölçümü gerçekleştirildi. 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 tanımlanmıştır.

PO aktivitesi için, 100 mM katekol, 100 mM (pH 7,0) sodyum fosfat ve toplam hacmi 1 ml olacak şekilde seyreltimiş enzim kullanıldı. Daha önceden 60°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda, 2 ml 100 mM (pH 7) sodyum fosfat tampon çözeltisi 2 dk inkübe edildi. İnkübe edilen solüsyona daha önceden tartılan katekol (100 mM) eklenerek substratın çözdürülmesi sağlandı. Katekol oksidasyon ürününün enzim eklendikten sonraki 420 nm'de soğurma (absorbans) değişimi ölçüldü. 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 gelmektedir.

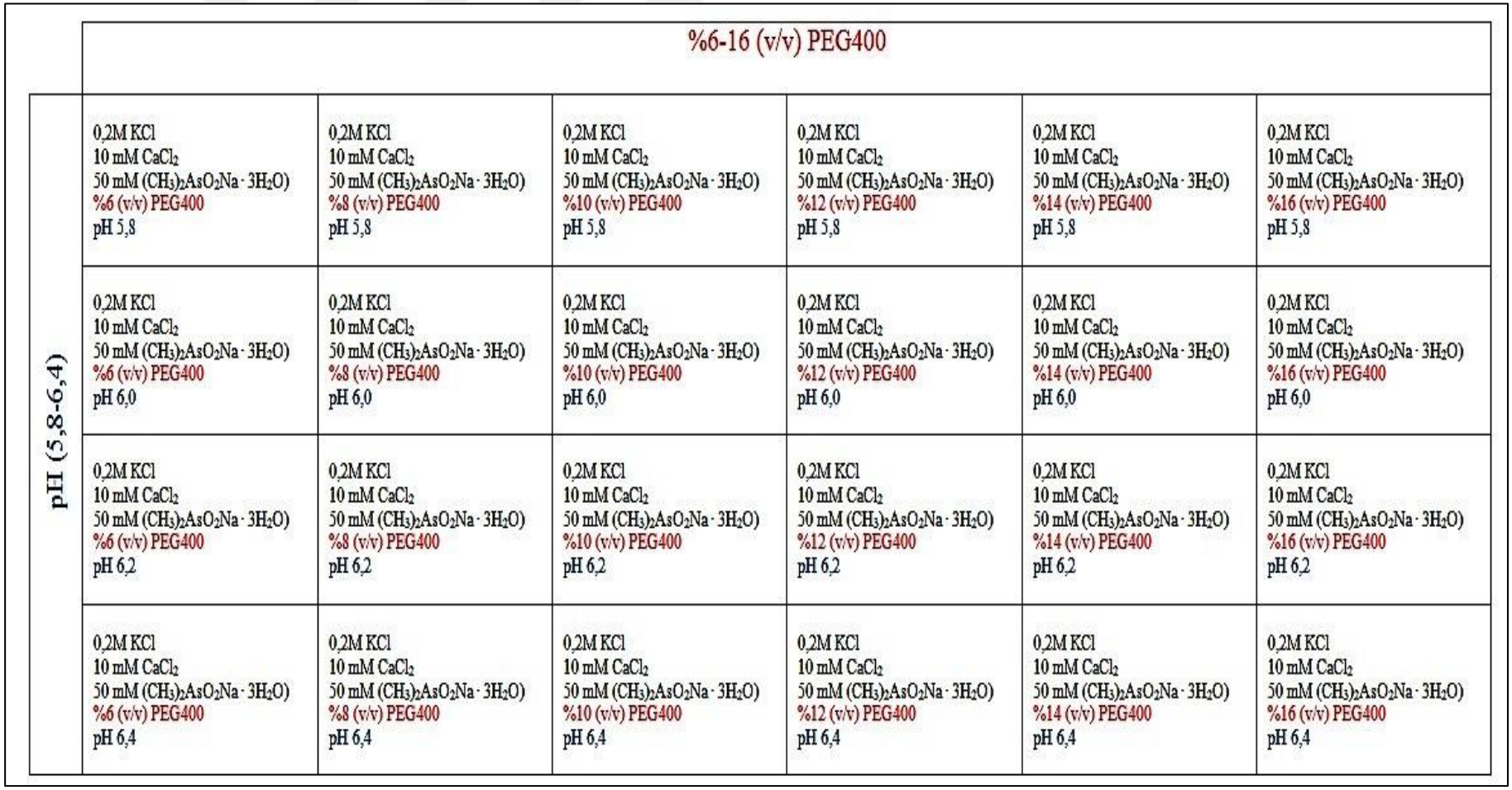
2.2.10.5. X ışını kristalografi analizi

Daha önceden gerçekleştirilen CATPO kristal optimizasyonu çalışmaları sonucu en iyi elde edilen kristalografi yöntemi ile solüsyonlar kullanıldı (Yuzugullu ve diğ., 2013). Bu çalışmada CATPO varyantlarından üç boyutlu görüntü elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan kristalografi tekniklerinden, asılı damla buhar difüzyon yöntemi kullanıldı (Şekil 2.2).

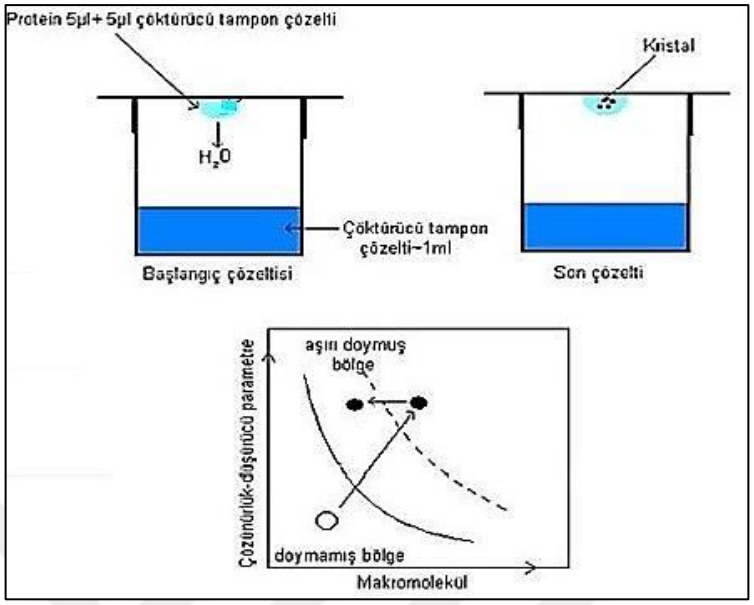
Buna göre, kristal elde edebilmek için 24 kuyucuk içeren kristal büyütme kaplarına 0,2 M potasyum klorür (KCl), 10 mM kalsiyum klorür ($CaCl_2$), 50 mM sodyum kakodilat trihidrat ($(CH_3)_2AsO_2Na$ x $3H_2O$) ve %6-16 (v/v) PEG 400 (pH 5,0- 6,4) solüsyonları eklendi (Şekil 2.2&2.3). Protein çözeltisi 10 mg/ml olacak şekilde seyreltilerek, farklı solüsyon içeren her bir kuyucuğun üzerine asılı kalacak şekilde yerleştirildi (Şekil 2.4). Kuyucuklardaki solüsyon ile asılı olan damlacık arasında reaksiyon dengesi buhar difüzyon yoluyla ulaşır. Süper-doyum noktasına gelindiğinde, pH ve sıcaklık gibi parametreler doğru ise, damlacık içinde protein kristallerinin oluşması beklenir.



Şekil 2.2. pH 5,0-5,6 arası ve Peg400'ün farklı farklı konsantrasyonlarında %6-16 (v/v) hazırlanan kristal büyütme solüsyon içerikleri



Şekil 2.3. pH 5,8-6,4 arası ve PEG400'ün farklı konsantrasyonlarında %6-16 (v/v) hazırlananKristal büyütme solüsyon içerikleri



Şekil 2.4. Asılı damla buhar difüzyon yöntemi

Hazırlanan kristal büyütme kapları, 18°C'ye ayarlanan etüvde inkübasyona bırakıldı ve hergün mikroskop altında kristal oluşumu takip edildi.

Oluşan kristaller, mikroskop altında ucunda naylon iplik bulunan yapıya hapsedildi. Damlacık içerisinden yakalanan kristaller, parçalanmamasına dikkat edilerek, koruyucu ajanlardan biri olan % 40'lık (v/v) PEG 400'de sıvı azot ile donduruldu.

Dondurulan CATPO varyantı kristalleri X ışınına maruz bırakıldı (ESRF: European Synchrotron Radiation Facility, Fransa).

X ışını cihazından elde edilen veriler bilgisayar ortamında; kristale ait elektron yoğunluk haritasının hesaplanması için "COOT" (Emsley ve Cowtan, 2004); kristalin uzay grubunun belirlenmesi, monomerleri hakkında bilginin elde edilmesi ve kullanılan modele göre verinin düzenlenmesi için "CCP4" ve üç boyutlu protein yapı tayini için "PyMol" programları kullanıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bölge Yönelimli Mutasyon ile CATPO Varyantlarının Oluşturulması

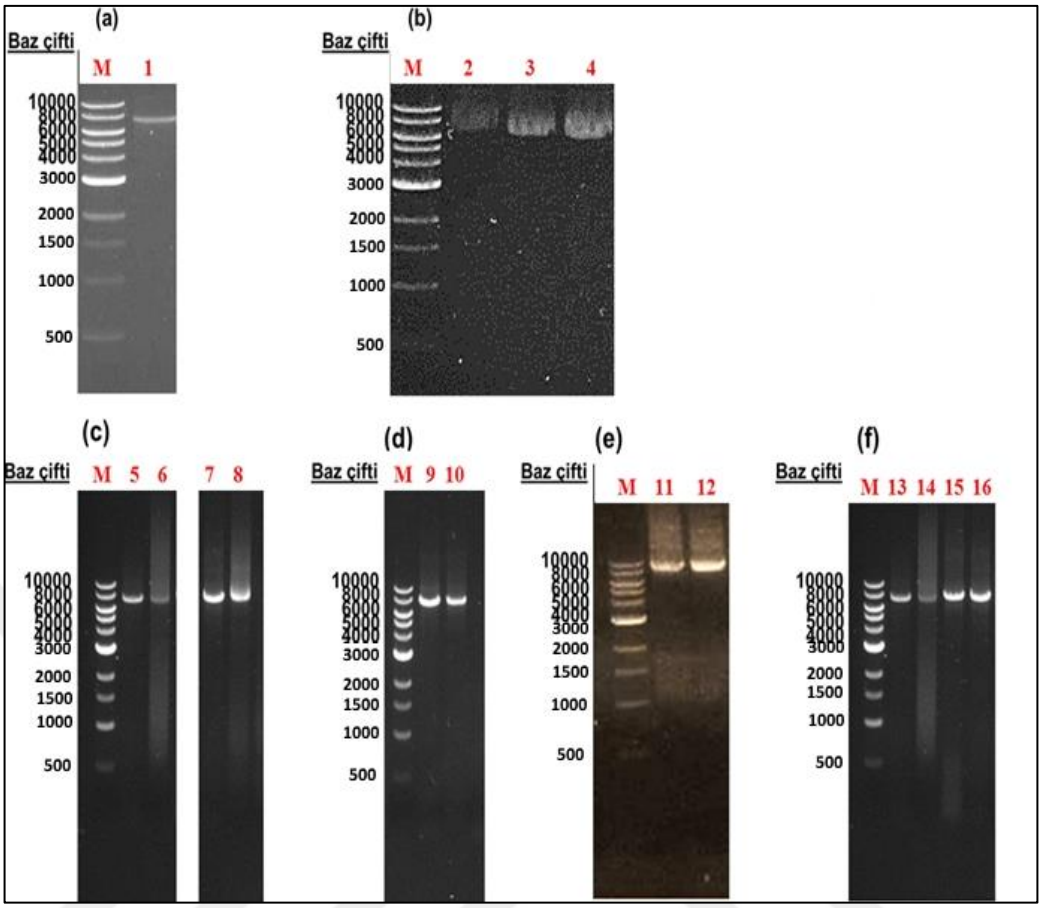
S. thermophilum katalazı (CATPO) mofonksiyonel katalazlar grubundandır. Bu tip enzimlerde ana kanal ile ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur (Chelikani ve diğ., 2004; Yuzugullu, 2013; Zengin, 2016). Bu çalışmalarda ana kanalın substratın aktif merkeze ulaşımından sorumlu olduğu belirtilmiştir. Diğer yandan reaksiyon ürünlerinin enzimden uzaklaşırken izlediği yol hakkında kesin bilgiler bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalar reaksiyon ürününden biri olan su moleküllerin yanal kanalı kullandığı yönündedir (Sevinç ve diğ., 1999). Bu bilgiler ışığında, oksidaz aktivitesine sahip olan CATPO enziminde fenolik maddeler gibi büyük yapılı moleküllerin oldukça uzun ve dar olan ana kanaldan geçmesinin zor olabileceğinin düşünülmesi çalışmaların yanal kanal üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu sebeple yapılan bu çalışmada, yeterince çalışılmamış olan yanal kanal varyantlarının oluşturulması hedef alındı.

İstenilen nokta mutasyonlarının (Tablo 3.1) gerçekleştirilmesinde Quikchange bölge yönelimli mutasyon kiti kullanıldı. Üretici firmanın talimatı doğrultusunda oligonükleotitler, KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya) enzimi ve $MgSO_4$ kullanılarak catpo geni Bölüm 2.2.3'de açıklanan şekilde mutasyona uğratıldı. Mutasyona uğratılan catpo genini taşıyan plazmid restriksiyon enzimi olan DpnI enzimi ile muamele edilerek mutasyon içermeyen plazmidler ortamdan uzaklaştırıldı.

Quikchange bölge yönelimli mutasyon için yürütülen PZR sonucu yüksek verimde ürün elde etmek için optimize edilmesi gereken parametrelerin başında primerlerin hedef DNA'ya tutunması için kullanılacak "bağlanma sıcaklığı" gelir. Bu sıcaklık, primerlerin erime sıcaklığı (Tm) temel alınarak seçilebilir. Bu yüzden, birçok kez kullanılan prosedürde, başlangıç bağlanma sıcaklığı 54^oC olarak kullanılır (uzunluğu 20 bç ya da daha uzun olan birçok primer için). Spesifik olmayan ürünler

oluşturulduğunda sıcaklığın arttırılması, eğer reaksiyon istenileni veriyorsa (sadece istenilen ürün sentezlenmiş ise) aynı sıcaklıkta devam edilmesi önerilir. DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması için genellikle 55 ila 65°C sıcaklıklar kullanılmaktadır (Bardakcı ve Yenidünya, 2010). Böylelikle en iyi DNA bağlanma sıcaklığını bulmak için optimizasyon deneyleri yapılmaktadır.

QuikChange reaksiyonları sırasında primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması (primer eşleşmesi) için 55°C ila 63°C arası farklı sıcaklıklar denendi. Baz uzunluğu 7,5 kbç olması beklenen bantlar agaroz jeli ile gözlemlendi (Şekil 3.2). Bunlardan V228S (Sentegen) mutasyonu için optimum bağlanma sıcaklığı 53°C; E316F (Sentegen), E316H (Sentegen), L321A (Sentegen) ve V536A (Sentegen) mutasyonu için optimum bağlanma sıcaklığı 55-60°C; V228G (Sacem) için 55,9°C; V228F (Sentegen) için 56°C; H246W (Sentegen), P158W (Sentegen), Q293W (Sentegen), I313F (Sacem), I314F (Sentegen), V228A (Sentegen), V228I (Sentegen), V228C (Sentegen) ve V536W (Sentegen), için 63°C olarak belirlendi.



Şekil 3.1. (a-f) QuikChange sonucu elde edilen CATPO varyantlarından izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü. M, DNA marker (10 kbç, NEB); 1, V228G; 2, V228A; 3, V228I; 4, V228C; 5, V228S; 6, V228F; 7, V536A; 8, L321A; 9, I313F; 10, I314F; 11, E316F; 12, E316H; 13, P158W; 14, Q293W; 15, H246W; 16, V536W

Farklı mutasyonları taşıyan plazmid DNA'lar Bölüm 2.2.5'de açıklandığı gibi ölçüldü (Tablo 3.1) ve elde edilen farklı CATPO varyantlarında arzu edilen mutasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, hizmet alımı olarak sekans dizileme işlemiyle doğrulandı (Şekil 3.2.). Buna göre en yüksek DNA miktarı I314F örneğinde gözlemlenirken, en düşük DNA miktarı ise I313F örneğinde gözlemlendi. I313F, L321A ve P158W hariç hemen tüm CATPO varyantlarından sekans dizilimi için yeterli miktarda (≥ 80 ng/µL) plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Düşük DNA miktarının protokol kaynaklı olduğu düşünülmekle birlikte sekans analiz sonuçları istenilen saflıkta elde edildiği için protokol optimizasyonu yapılmasına gerek kalmadı.

Tablo 3.1. Farklı mutasyonları taşıyan plazmidlerin DNA miktarları

Mutant	DNA miktarı (ng/µl)
V228A	81,6
V228C	157
V228F	86
V228G	112
V228I	103
V228S	84,8
E316F	70,7
E316H	72,1
H246W	88,9
I313F	20
I314F	142
L321A	61,5
P158W	67,4
Q293W	109
V536A	123
V536W	114



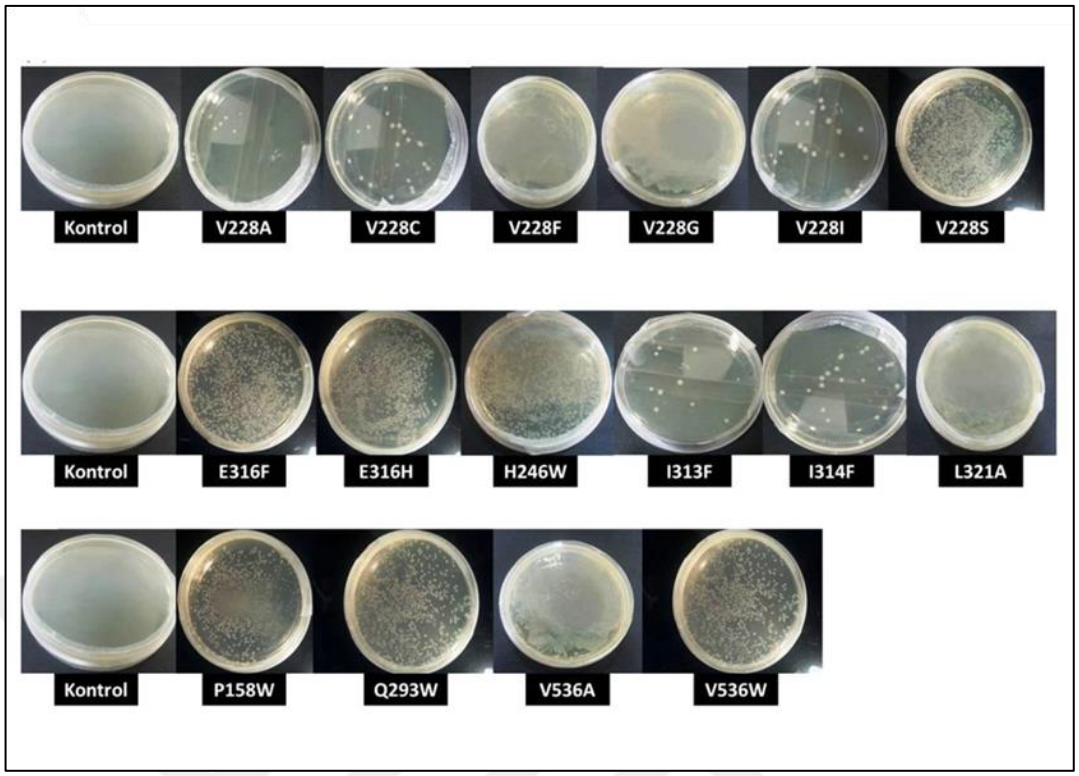
Şekil 3.2. CATPO varyantları plazmid DNA'larının wtCATPO'ya ait plazmid DNA ile BioEdit programı kullanarak oluşturulan dizi eşleştirme sonuçları

3.2. CATPO Varyantlarının Rekombinant Üretimi

İfade vektörleri, seçilen bir proteinin birçok kopyasını konak hücrede üretmek için düzenlenmiş olan vektörlerdir. pET, *E. coli* konak hücresinde kullanılan bir ifade vektörüdür. Bu vektörü kullanmak için ifade edilecek olan gen, T7 promotoru ve *lac* operonu içeren vektörün tanıma dizisi içine klonlanır. Rekombinant plazmid konak hücreye sokulduktan sonra, ortama laktoz yerine geçen Isopropil β-D-1-tiogalaktopiranosit (IPTG) eklenerek protein üretimi (ifadesi) uyarılır. IPTG, baskılayıcı proteini lac operatöründen uzaklaştırarak, bakteri kromozomundaki T7 RNA polimeraz genini aktif hale getirir. T7 RNA polimeraz, T7 promotoruna bağlanır ve proteinin yüksek miktarda sentezlenmesini sağlar (Klug ve diğ., 2011).

Farklı CATPO varyantlarının rekombinant üretimini oluşturmak üzere kullanılan *E. coli* BL21 (DE3) star suşlarında, T7 RNA polimeraz için promotor bölgesi bulunmaktadır. T7 RNA polimeraz enzimi bakteri hücresinde protein sentezini engelleyerek hücredeki katalaz üretimini baskılar. Dolayısıyla, besiortamına IPTG eklenmesi sonrasında sadece rekombinant plazmidi taşıyan hücrelerden katalaz üretimi gerçekleştirilmiş olunur.

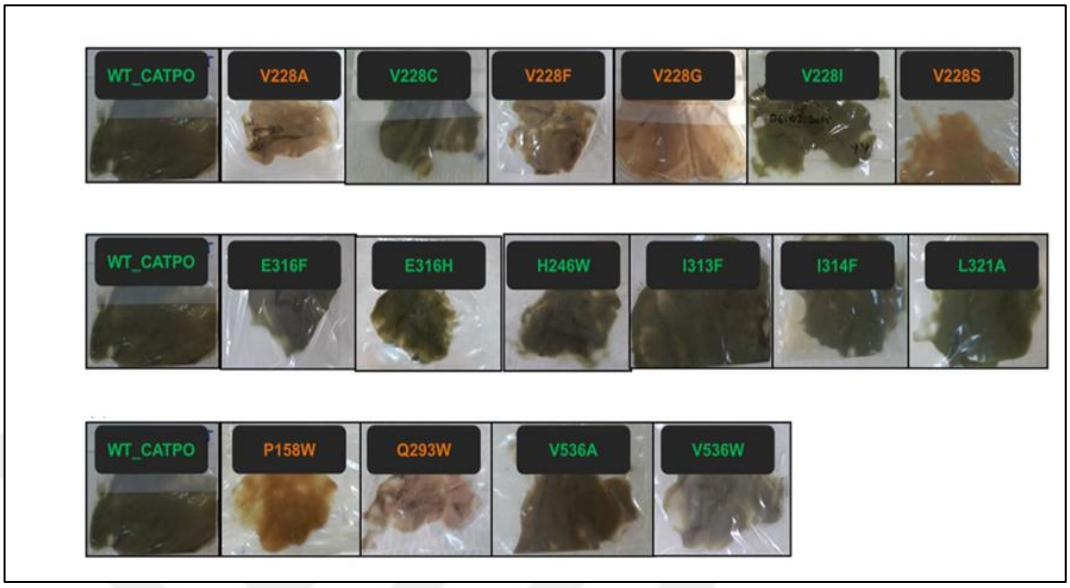
Buna göre, mutasyonu doğrulanan plazmid DNA'lar *E. coli* BL21 (DE3) star hücrelerine transforme edildi (Şekil 3.3). Negatif ve pozitif kontrolleri başarılı olan transformasyonlardan, her bir CATPO varyantı için petride büyüyen kolonilerden birer tane tek koloni seçilerek ayrı ayrı çoğaltıldı. Tek koloniden çoğaltılan hücre kültürleri, -80°C'de rekombinant CATPO enzim üretiminde kullanılmak için muhafaza edildi.



Şekil 3.3. 16 farklı CATPO varyantının nokta mutasyon sonrasında plazmid DNA'larının *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerine transformasyon sonuçları

16 farklı CATPO varyantının rekombinant üretimi, Bölüm 2.2.8'de açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Proteinlerin üretimi sırasında literatürden elde edilen bilgilerden yararlanıldı. Buna göre, d tipi hem grubu içeren HPII *E. coli* katalazı durağan fazda ifade edilmektedir (Loewen, 1996). Ayrıca *S. thermophilum* katalazının rekombinant üretimi için en iyi koşulun, IPTG (0,1 mM) varlığında ve düşük havalandırma (120 rpm) ile 30^{o}C'de büyüyen hücrelerde olduğu gözlemlenmiştir (Yüzügüllü, 2010). Bu bilgiler ışığında, 16 farklı CATPO varyantının rekombinant üretimi 120 rpm ve 30^{o}C'de gerçekleştirildi ve elde edilen çamurlar protein saflaştırılmasında kullanılmak üzere -80^{o}C'de tutuldu. -80^{o}C'deki çamur halindeki hücrelerden V228C, V228I, E316F, E316H, H246W, I313F, I314F, L321A, V536A ve V536W mutasyonlarını taşıyan hücreler yeşil renkli gözlenirken; V228A, V228F, V228G, V228S, P158W ve Q293W proteinlerini üreten hücrelerin ise "süt kahvesi" renginde oldukları gözlemlendi (Şekil 3.4). Bu durum daha önce gerçekleştirilen araştırmalarda elde edilen bulgularla uyumludur. Nitekim d tipi 'hem' grubu bulunduran katalazların hücre rengi yeşil iken, b tipi 'hem' grubu bulunduran katalazların hücre renginin ise süt kahvesi olduğu rapor edilmiştir (Zengin, 2016).

Hücrelerde gözlemlenen renk farkının, enzimin aktif bölgesinde bulunan "Hem" grubunun değişmesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.



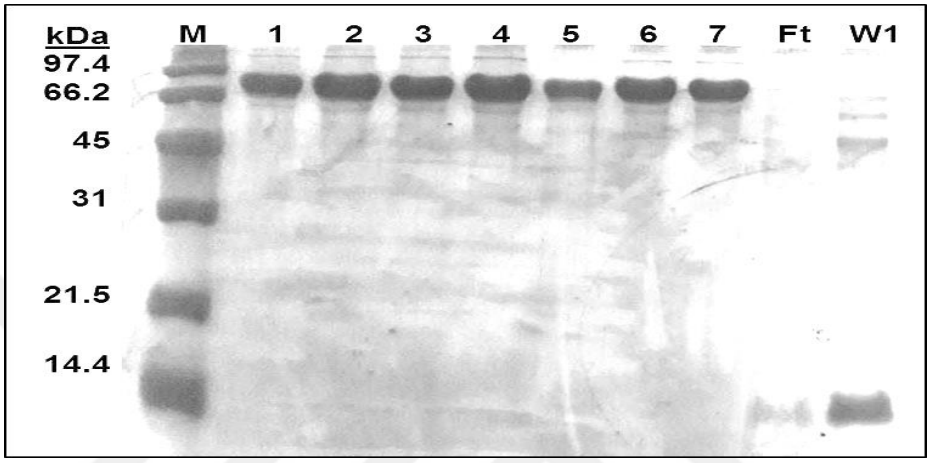
Şekil 3.4. Farklı CATPO varyantlarının çamur haline getirilmiş hücrelerinin karşılaştırılması

3.3. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması

16 farklı wtCATPO ve varyantının (V228A, V228C, V228F, V228G, V228I, V228S, I313F, I314F, L321A, E316F, E316H, P158W, H246W, Q293W, V536A ve V536W) saflaştırılması afinite kromatografisi yöntemi ile Bölüm 2.2.9'da açıklanan şekilde yapıldı. Kromatografi sırasında dolgu maddesi olarak 'Sepharose' içeren ve Histidin etiketli rekombinant proteinlerin saflaştırılması için uygun olan hazır His-Bağlı Hi-Trap HP kolon (GE Healthcare, Amerika) kullanıldı. Kullanılan yöntem, saflaştırılması istenilen proteinlerin yapılarında bulunan His amino asidinden dolayı bu yapıya spesifik olarak bağlanabilen Ni^{+2} iyonunu taşıyan dolgu maddesine bağlanmalarına dayanır. Elüsyon koşullarının uygunluğuna göre absorbe olan biyolojik aktif protein kolondan elüe edilir (Zengin, 2016). Çalışmada kullanılan tüm rekombinant CATPO varyantları Histidin içermektedir. Bu nedenle proteinlerin kolon rezininden elüsyonu 0,5 M tuz ve aynı miktarda imidazol içeren 20mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponu ile gerçekleştirildi.

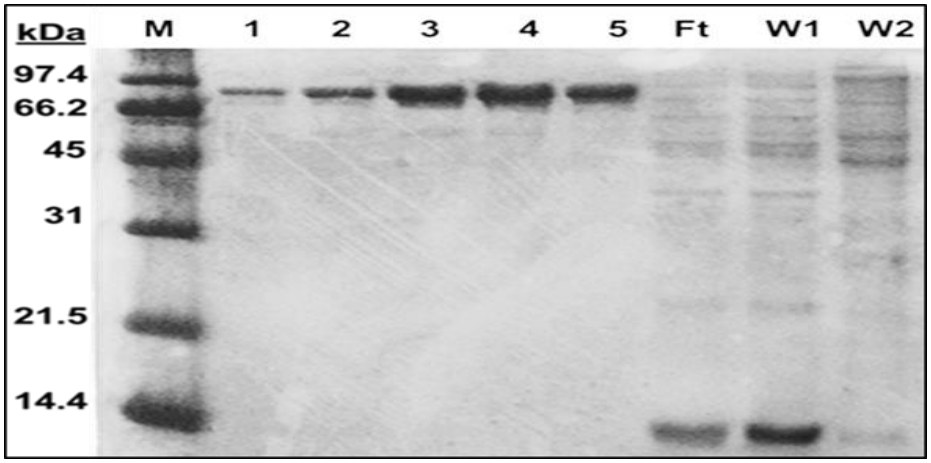
Rekombinant wtCATPO proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-

PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.5, 395-455 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf wtCATPO proteini içeren fraksiyonlar içerdikleri imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



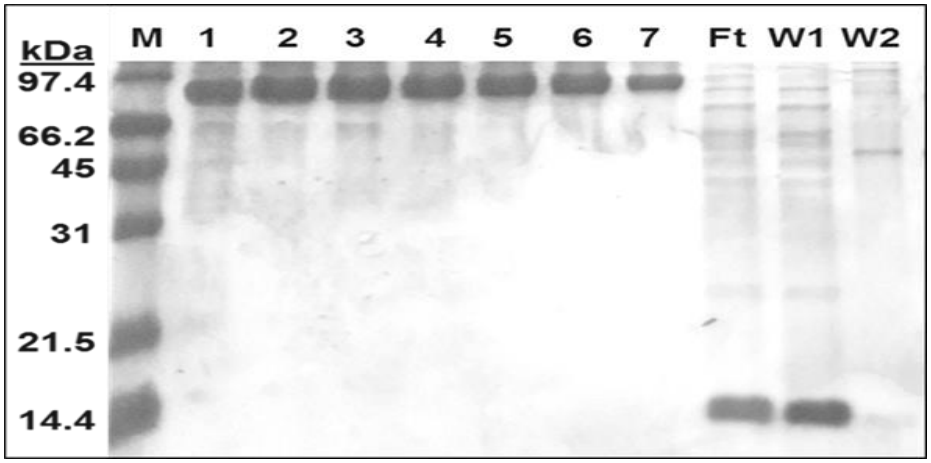
Şekil 3.5. His-Bağlı Hi-Trap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant wtCATPO proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-7. sıra arası, 395-455 mM imidazole içeren 30. ve 36. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228A proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.6, 380 ila 420 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanılarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228A proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



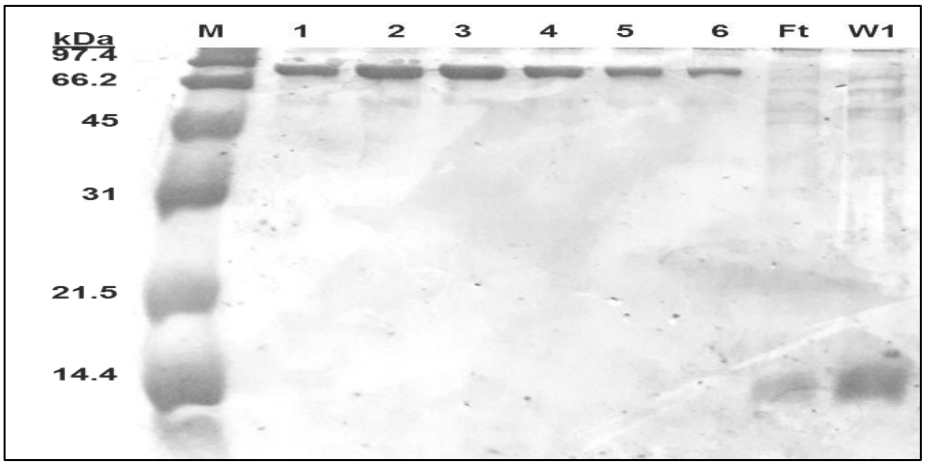
Şekil 3.6. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-5. Sıra arası, 380-420 mM imidazol içeren 28.-32. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228C proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.7, 420-480 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228C proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



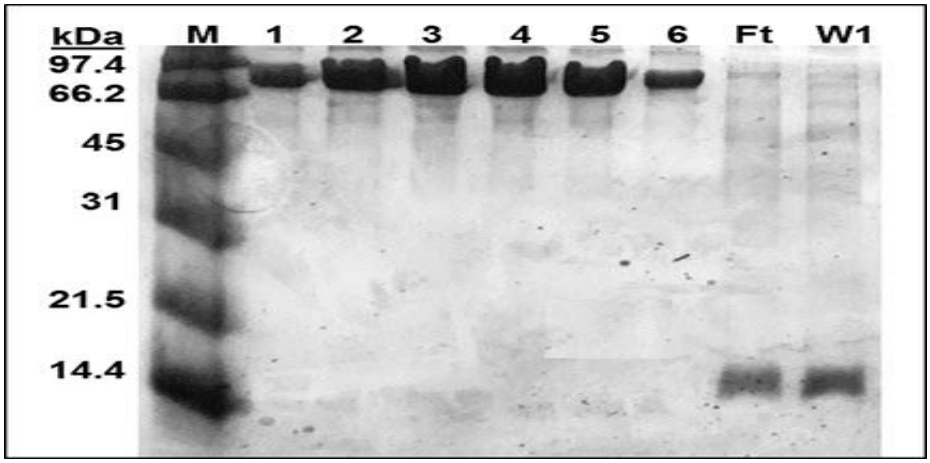
Şekil 3.7. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228C varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-7. Sıra arası, 420-480 mM imidazol içeren 32.-38. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228F proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.8, 400-450 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228F proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



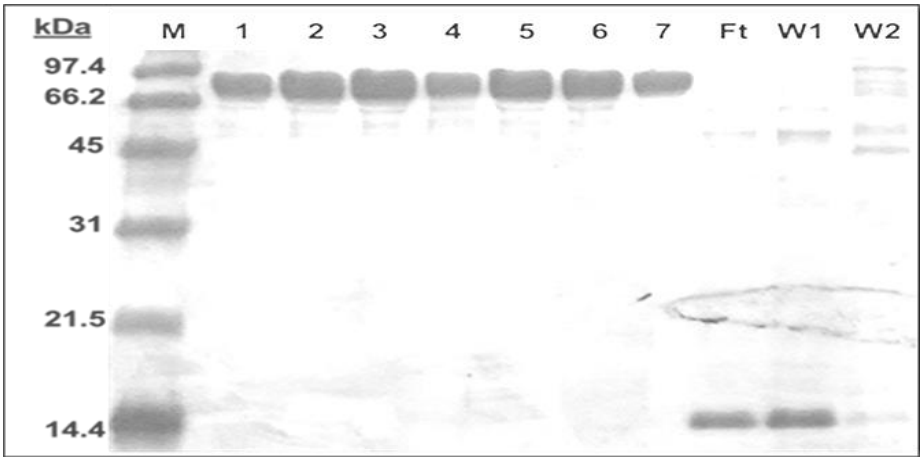
Şekil 3.8. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-6. Sıra arası, 400-450 mM imidazol içeren 31.-36. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228G proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.9, 405-465 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228G proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



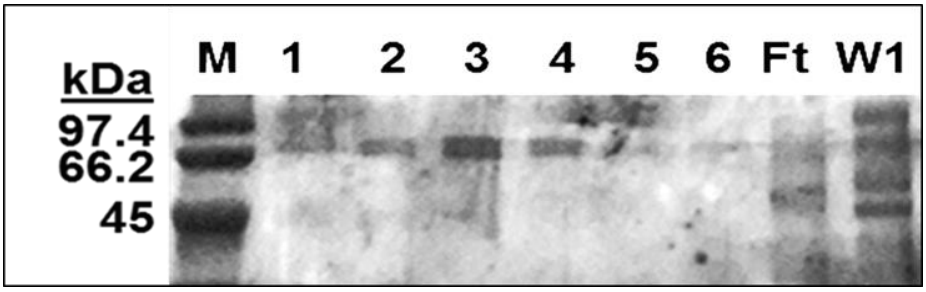
Şekil 3.9. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228G varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-6. Sıra arası, 405-465 mM imidazol içeren 31.-36. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228I proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.10, 440-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228I proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



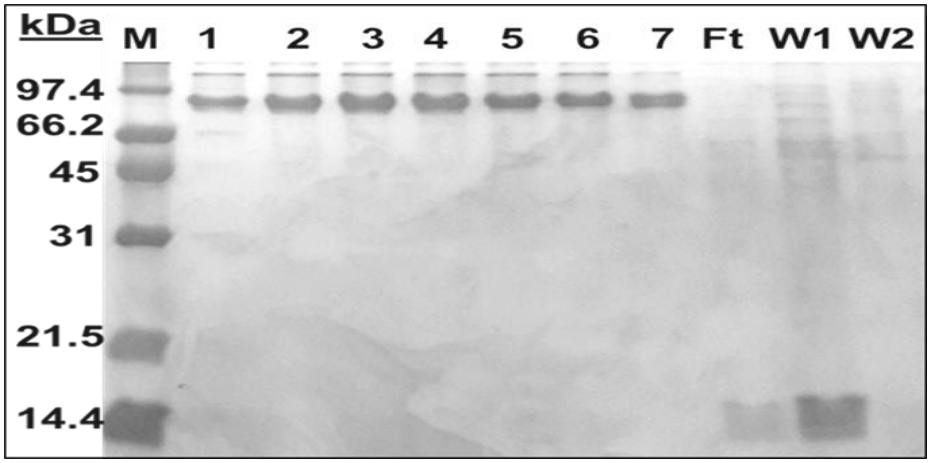
Şekil 3.10. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228I varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-7. Sıra arası, 440-500 mM imidazol içeren 34.-40. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V228S proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,01-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.11, 25-160 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V228S proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



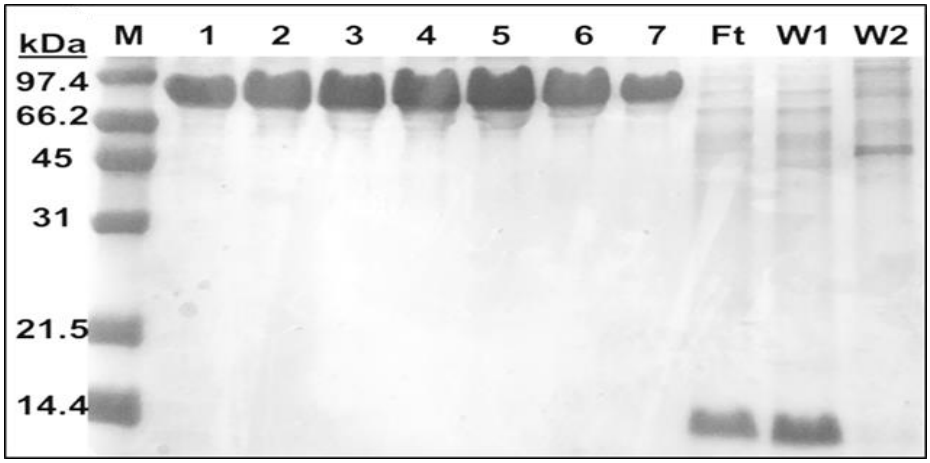
Şekil 3.11. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V228S varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-6. Sıra arası, 25-160 mM imidazol içeren fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 1 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant E316F proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.12, 400-490 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf E316F proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



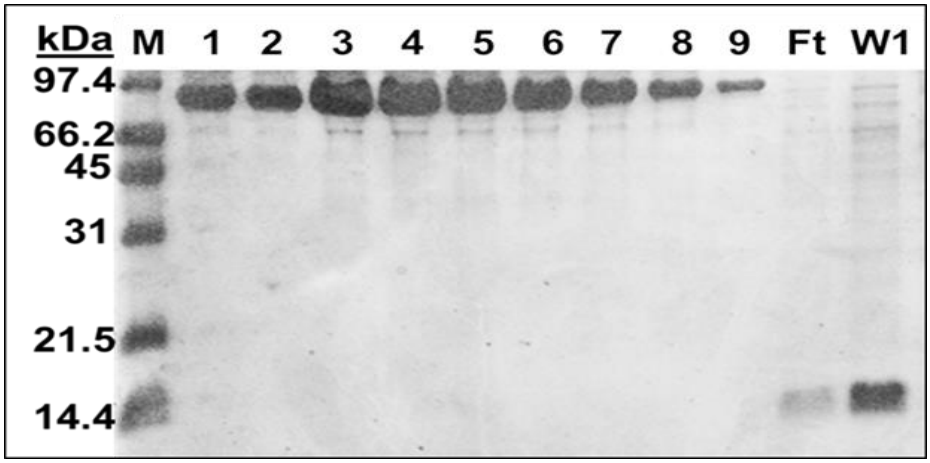
Şekil 3.12. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan E316F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-7. Sıra arası, 400-490 mM imidazol içeren 31.-37. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant E316H proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.13, 425-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf E316H proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



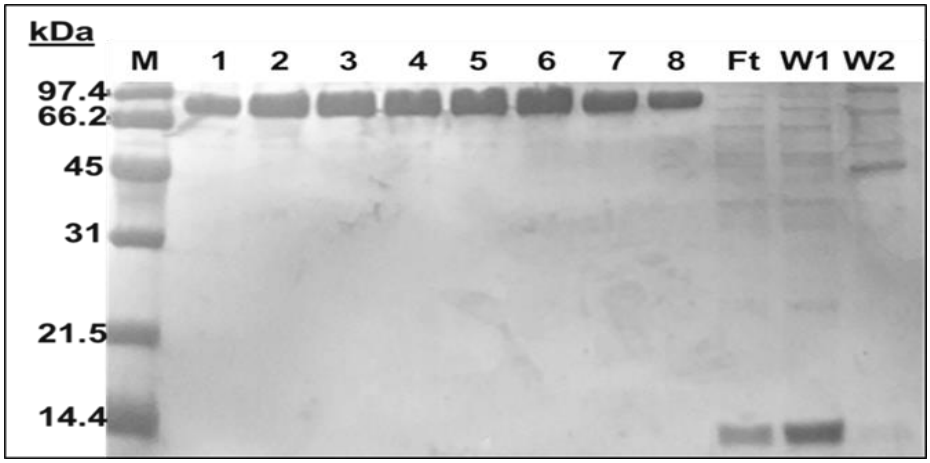
Şekil 3.13. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan E316H varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-7. Sıra arası, 425-500 mM imidazol içeren 34.-40. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant H246W proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.14, 395-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf H246W proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



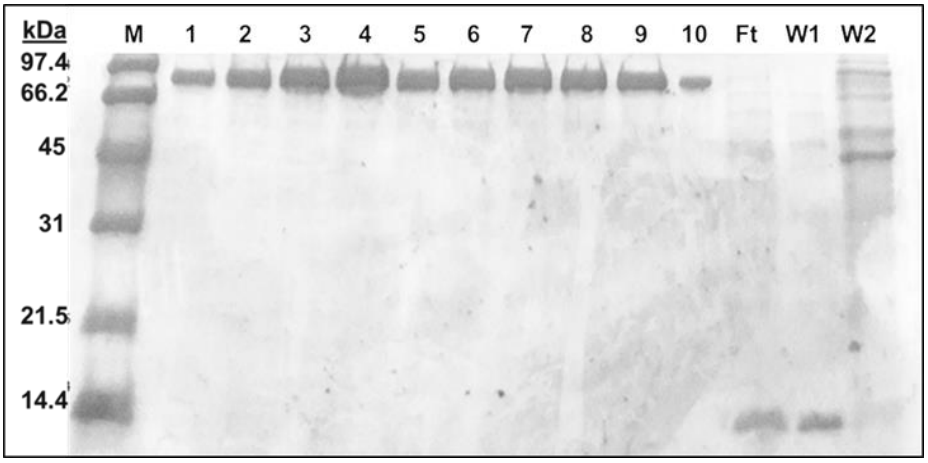
Şekil 3.14. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan H246W varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-9. Sıra arası, 395-500 mM imidazol içeren 31.-39. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant I313F proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.15, 420-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf I313F proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



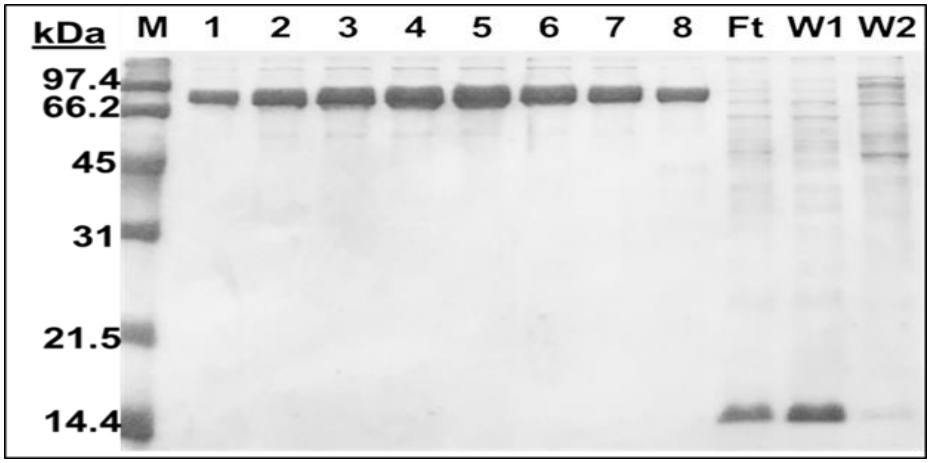
Şekil 3.15. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan I313F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-8. Sıra arası, 420-500 mM imidazol içeren 33.-40. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant I314F proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.16, 380-480 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf I314F proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



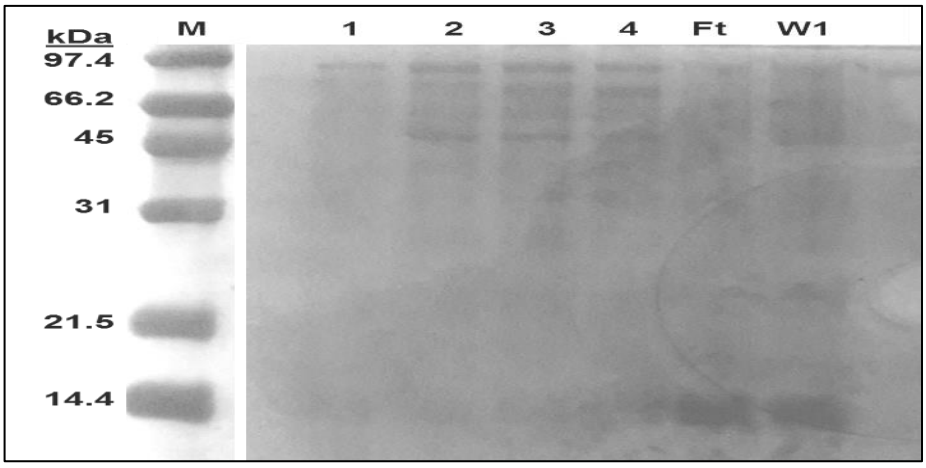
Şekil 3.16. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan I314F varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-10. Sıra arası, 380-480 mM imidazol içeren 29.-38. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant L321A proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.17, 420-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40 mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf L321A proteini içeren fraksiyonlar imidazol uzaklaştırılmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



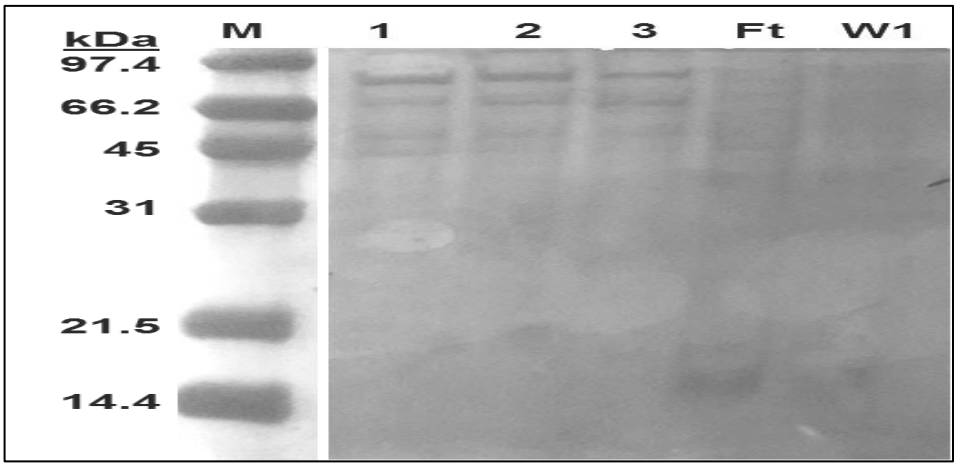
Şekil 3.17. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan L321A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-8. Sıra arası, 420-500 mM imidazol içeren 32.-39. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0.5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant P158W proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,001-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.18'de görüldüğü üzere toplanan fraksiyonlarda yüksek oranda safsızlık tespit edildi. Bunun üzerine birçok deneme (farklı kolon ve farklı tampon çözelti kullanımı, yıkama süresi değişikliği, vb.) yapıldı; ancak olumlu sonuç alınamadı. P158W varyantının saflaştırılamasında başarılı olunamama sebebi olarak, yapılan mutasyonun protein yapısını bozarak yanlış katlanmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Jha ve diğ., 2011).



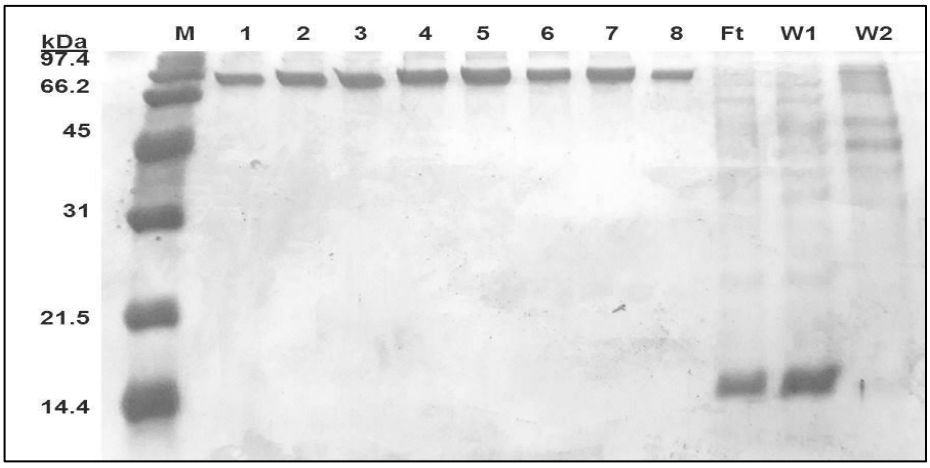
Şekil 3.18. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant P158W proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-4. sıra arası, 100-145 mM imidazole içeren fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W, 0,5 M NaCl ve 1 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Q293W proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,001–0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı ve her bir fraksiyon SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.19). Ancak Q293W proteini de birçok denemeye rağmen P158W gibi saf olarak elde edilemedi. Burada mutasyon sonucu görülen triptofan, glutamin amino asitinden yapısal olarak daha büyük olduğundan enzimin doğru bir şekilde katlanmasını engelleyerek doğal yapısını bozmuş olabileceği düşünülmektedir (Jha ve diğ., 2011).



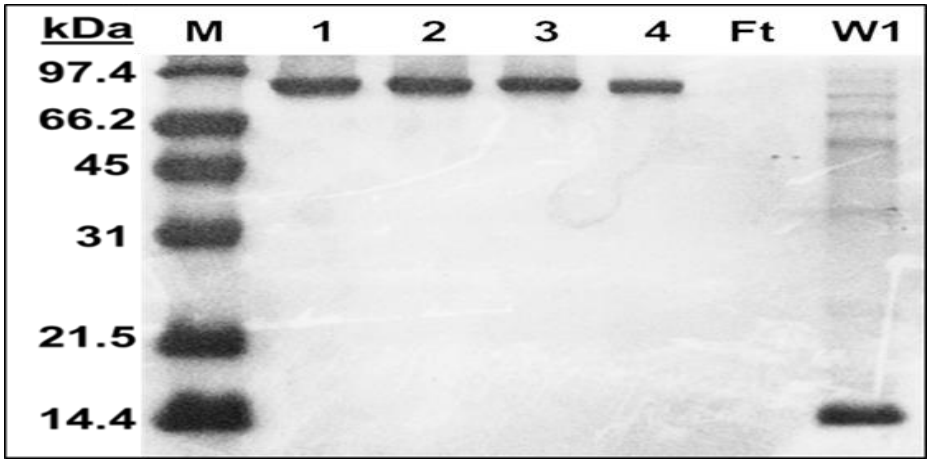
Şekil 3.19. His-Bağlı Ni-NTA kolon kullanılarak saflaştırılan rekombinant Q293W proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-3. sıra arası, 100-145 mM imidazole içeren fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W, 0,5 M NaCl ve 1 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V536A proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.20, 420-500 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. Yoğun halde üretilen proteinler için, kolonda yüksek imidazol (40mM) içeren tampon çözelti kullanarak iki basamak halinde yıkama işlemi yapıldı. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V536A proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



Şekil 3.20. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V536A varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-8. Sıra arası, 420-500 mM imidazol içeren 33.-40. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyon; W2, 0,5 M NaCl ve 40 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

Rekombinant V536W proteini kolondan artan imidazol konsantrasyonunda (0,04-0,5 M) ve 1 ml içeren fraksiyonlarda toplandı. Toplanan örneklerin her biri SDS-PAGE ile analiz edildi. Şekil 3.21, 445-470 mM imidazol içeren fraksiyonları kapsamaktadır. SDS-PAGE sonucuna göre, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 80 kDa ağırlığında saf halde bantlar verdiğinden bu fraksiyonlar birleştirildi. 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponunda elde edilen saf V536W proteini içeren fraksiyonlar imidazolu uzaklaştırmak üzere bir gece diyaliz edildi. İmidazolden arındırılan protein örneği konsantre edildi.



Şekil 3.21. His-Bağlı HisTrap HP (GE Healthcare, Amerika) kolon kullanılarak saflaştırılan V536W varyant proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (Biorad Low Range, Amerika); 1.-4. Sıra arası, 445-470 mM imidazol içeren 34.-37. fraksiyonlar; Ft, kolona bağlanmadan geçen süzüntü; W1, 0,5 M NaCl ve 20 mM imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanan fraksiyonu kapsamaktadır

3.4. CATPO Varyantlarının UV Görünür Bölge Spektrumları

Monofonksiyonel katalazların aktif bölgesinde bulunan "Hem" grubu; d tipi veya b tipi olmak üzere iki çeşittir. d tipi "Hem" grubu içeren büyük alt üniteli monofonksiyonel katalazlar UV spektrumlarında 590 ve 715 nm'de maksimum absorbans verirken; b tipi "Hem" grubu içeren küçük alt üniteli monofonksiyonel katalazların UV spektrumlarında 530 ve 630 nm'de maksimum absorbans verdikleri keşfedilmiştir (Loewen ve diğ., 1986). Hem grubundan en az birini bulunduran katalaz enzimlerinin 406 nm'de Soret bandı verdiği bilinmektedir ve bu prostetik grup miktarının bir ölçütü olan Rz (A_{406}/A_{280}) değeri genelde monofonksiyonel katalazlar için 1 olarak ölçülmektedir (Zamocky ve Koller, 1999).

Saflaştırılan wtCATPO ve 16 farklı varyantının, aktif bölgelerinde içerdikleri fonksiyonel "Hem" grubunun çeşidi ve yoğunluk derecelerini varyantlar arasında karşılaştırma üzerine 200-900 nm arasında UV görünür bölge spektrum analizleri gerçekleştirildi.

Yanal kanal üzerinde hedef olarak; kanal girişinde bulunan ve enzimin prostetik grubuna (Hem) yakın olan Val228 amino asidi ile kanalın iç kısımlarında ve protein

yüzeyine yakın olan amino asitler (Glu316, His246, Ile313, Ile314 ve Val536) seçildi.

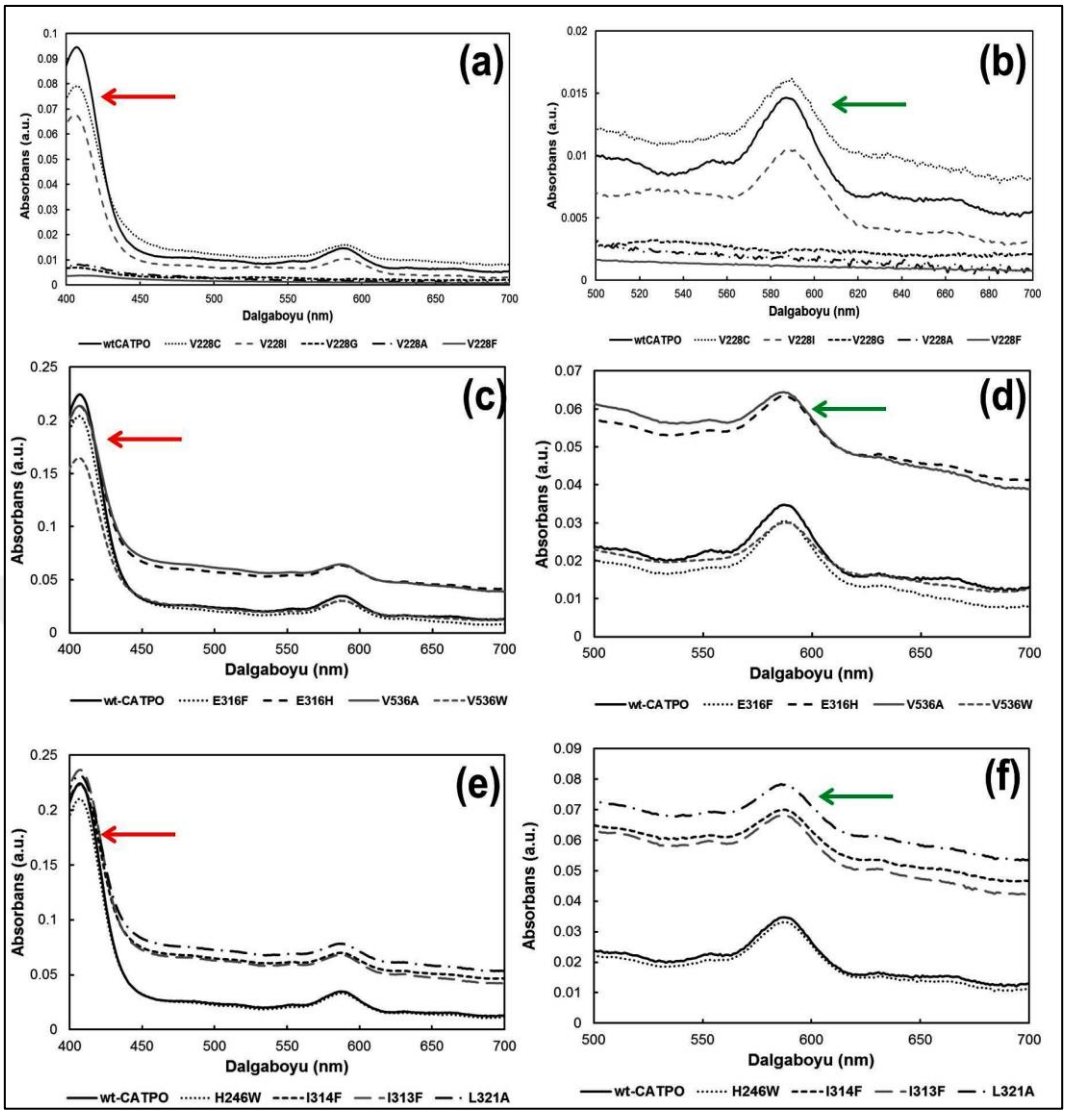
Büyük alt üniteli monofonksiyonel katalazların önemli bir kısmında yaklaşık %62 oranında korunmuş olarak bulunan Val228 amino asidinin "Hem" grubunun oluşumundaki rolünü araştırmak üzere, valin; kısa yan zincirli alanin ve glisin başta olmak üzere, izolösin, sistein, serin ve fenil alanine dönüşümleri gerçekleştirildi. Bunlardan V228C ve V228I'nın d tipi "Hem" grubu içerdiği gözlenmiş olup (Şekil 3.22a&b), bu bulgu yapılan kristalizasyon çalışmalarıyla da doğrulandı. *E. coli* (HPII) katalazında eşleniği isolösin (Jha ve diğ., 2011) olan Val228'in, bu amino aside dönüştürülmesi sonucu d tipi "Hem" grubunun gözlenmesi beklenen bir sonuçtur. Diğer yandan V228A, V228F, V228G ve V228S varyantlarında "Hem" grubu ile ilgili spektroskopik bir bulgu elde edilememiş olup bunun başlıca sebebinin proteinlerde gözlenen R_z değerlerinin yabanıl tipe (0,8) oranla çok düşük olmasından (≤0,1) kaynaklandığı düşünüldü (Tablo 3.2). Bu şekilde düşük R_z değeri gözlenmesinin başlıca sebepleri arasında 'Hem' miktarının ölçülebilir düzeyde olmaması ve ya protein safsızlığı sayılabilir (Jha ve diğ., 2011). SDS-PAGE analizleri (Şekil 3.5-3.21), protein safsızlığına işaret etmediğinden bu proteinlerde gözlenen muhtemel durumun prostetik grubun yeterli miktarda üretilmemesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Val228 mutasyonu sonucu "Hem" tipinde meydana gelen değişiklikler, aktif bölgeye yakın mesafede bulunan bu amino asidin protoporfirin IX oksidasyonunda rol oynadığını göstermektedir. Bu durumda, saf olarak elde edilemeyen Q293W ve P158W (Şekil 3.18 & 3.19) mutantlarının prostetik grubunun belirlenememesinin büyük ölçüde protein safsızlığından kaynaklı olduğu varsayılabilir (Jha ve diğ., 2011).

Yanal kanal üzerinde protein yüzeyine daha yakın olan bölgedeki amino asitlerde (E316F, E316H, L321A, I313F, I314F, H246W, V536A ve V536W) gerçekleştirilen mutasyon sonucu "Hem" tipinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmediği gibi tüm varyantlarda d tipi "Hem" grubu için karakteristik olan 590 nm'deki absorpsiyon bandı elde edildi (Şekil 3.22c-f). Yabanıl tip enzimde (wtCATPO) gözlenen R_z değerinin tüm varyantlarda benzer olduğu bulundu (Tablo 3.2). Bu durum, protein fonksiyonu için yeterli miktarda "Hem" sentezinin gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, yanal kanal üzerinde aktif bölgeden uzak mesafede bulunan bu amino asitlerin prostetik grubu (Hem) sentezi ile ilişkili olmaması beklenen bir bulgudur.

Tablo 3.2. CATPO varyantlarına ait "hem" içeriğinin spektroskopik karakterizasyonu

Variant	**Rz (A406/A280)**	**A590/A406**	**A715/A406**	**A535/A406**	**A630/A406**
WT	0,8	0,15	0,04	----	----
V228A	0,07	----	----	----	----
V228C	0,7	0,2	0,1	----	----
V228F	0,03	----	----	----	----
V228G	0,03	----	----	----	----
V228I	0,6	0,15	0,04	----	----
V228S	0,2	----	----	----	----
E316F	0,8	0,15	0,04	----	----
E316H	0,8	0,29	----	----	----
H246W	0,8	0,14	0,04	----	----
I313F	0,9	0,29	0,1	0,25	0,21
I314F	0,8	0,3	0,2	0,27	0,24
L321A	0,9	0,34	0,22	0,29	0,26
V536A	0,8	0,28	0,17	0,26	0,22
V536W	0,6	0,18	0,04	0,12	0,1



Şekil 3.22. (a-f) Yanal kanal CATPO varyantlarının UV görünür bölge spektrum analizlerinin karşılaştırılması. (a&b), Val228 varyantları; (c&d), E316F, E316H, V536A ve V536W; (e&f), H246W, I314F, I313F ve L321A proteinlerine ait spektrumlar wtCATPO ile karşılaştırılmıştır. Kırmızı ok, 406 nm'deki Soret Bandını; Yeşil ok ise d tipi 'Hem' grubuna ait 590 nm'deki maksimum absorpsiyonu göstermektedir

3.5. CATPO Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Yabanil tip CATPO ve varyantlarının katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktivite ölçümleri Bölüm 2.2.10.4'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. wtCATPO ve varyantlarının spesifik aktiviteleri Tablo 3.3'te karşılaştırıldı.

Tablo 3.3. Yanal kanal CATPO varyantlarının spesifik aktivitelerinin ve "hem" tiplerinin karşılaştırılması

Varyant	Spesifik aktivite		% WT aktivite		Hem tipi
	Katalaz aktivite (µmol/mg/min)	Fenol oksidaz aktivite (nmol/mg/min)	Katalaz	Fenol oksidaz	
wt_CATPO	18,713 ± 935	213 ± 5	100	100	d
V228A	1418 ± 292	321	8	151	*
V228C	4806 ± 668	202 ± 1	26	95	d
V228F	47 ± 17	164 ± 4	0,2	77	*
V228G	366 ± 34	17 ± 0,1	2	8	*
V228I	13,919 ±1236	92 ± 6	74	43	d
V228S	5 ± 1	119 ± 4	0,03	56	*
E316F	8877 ± 112	173 ± 2	47	81	d
E316H	14,521 ± 196	163 ± 2	78	77	d
H246W	12,076 ± 1005	33 ± 1	64	15	d
I313F	16,185 ± 482	232 ± 16	86	109	d
I314F	9973 ± 934	92 ± 7	53	43	d
V536A	13,478 ± 647	236 ± 6	72	111	d
V536W	13,867 ± 213	85 ± 7	74	40	d
L321A	8422 ± 551	107 ± 1	45	50	d

* Rz değerleri, Hem miktarının ölçülmesi için yeterli miktarda elde edilemediği için (≤0,1) Hem tipi belirlenememiştir.

Val228, aktif bölgede 'Hem' grubuna yakın mesafede bulunmakta (11 Å) ve katalazlar arasında yapısı korunmuş bir amino asit olarak gözlenmektedir. Yanal kanal ile ilgili çalışmaların literatürde sınırlı sayıda olması, Val228'in aktif bölgeye yakın olması, bu bölgenin küçük üniteli katalazlarda enzimin NADPH bağlanma bölgesine denk gelmesi ve NADPH'nin enzim üzerindeki koruyucu görevi düşünüldüğünde CATPO'da gözlenen oksidaz aktivitenin enzim üzerinde koruyucu bir rol üstlenip üstlenmediğinin anlaşılması üzerine Val228 kalıntısı üzerindeki mutasyon çalışmaları önem taşımaktadır.

Tablo 3.3'te görüldüğü üzere Val228 amino asidi üzerinde gerçekleşen mutasyonlar arasında, V228I hariç tüm mutantlarda katalaz aktivitede azalma gözlemlendi. Katalaz aktivitesindeki en düşük sonuçlar V228F (≥%99) ve V228S (≥%99) varyantlarında tespit edildi. Benzer bir durum, *E. coli* HPII katalazında gözlenmiş ve

aynı konumda bulunan amino asidin fenil alanin ve serine dönüştürülmeleri sonucu, protein katlanmasında gözlenen anormallik sebebiyle çözünür halde aktif proteinlerin elde edilememesi olarak yorumlamıştır (Pha ve diğ., 2011). Bu çalışmada proteinler çözünür halde üretilmiş; ancak, proteinlere ait "Hem" grubunun belirlenememesinin ya da saflaştırma sırasında karşılaşılan güçlüklerin bu proteinlerin doğru katlanmadıklarından kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla bu proteinlerde aktivite gözlemlenemedi.

Katalaz aktivitesindeki en az düşüş ise V228I mutantında gözlendi (%26). *E. coli* HPII katalazında valin yerine izolösinin bulunması (Jha ve diğ., 2011) aktivitenin çok etkilenmeyeceğini doğrulamaktadır. Diğer yandan Val228'in daha kısa zincirli alanin, glisin ve ya sisteine dönüşmesi aktivitede beklenenden ziyade düşüşe sebep olmuştur. Valinin daha kısa zincirli amino asitlere dönüştürülmesi sonucu yanal kanal girişinin açılarak aktivitenin artması beklenmekteydi. Ancak aktivitede %74-98 oranında azalma gözlemlendi. Bunun sebebi olarak daha önce öne sürülen "aktif bölgede bulunan Hem grubunun H_2O_2'in aktif merkezde kalma süresini uzatmak için evrimleştiği" teorisi düşünülebilir. Buna göre kanal girişinin açılması H_2O_2'in aktif bölgeden uzaklaşmasını, dolayısıyla düşük seviyede substrat bağlanmasına sebep olmuş ve katalitik aktiviteyi düşürmüş olabilir (Jha ve diğ., 2011). Val228 mutantlarının fenol oksidaz özelliklerini karşılaştırdığımızda ise tüm mutantlarda önemli bir değişiklik gözlemlenmedi (Tablo 3.3). Bu durum, amino asidin oksidaz aktivitede herhangi bir rolü olmadığına işaret etmektedir.

Yanal kanalın katalaz ve oksidaz aktivitelerindeki rolünü araştırmak üzere, kanal üzerinde protein yüzeyine yakın mesafede bulunan Glu316, His246, Ile313, Ile314, Val536 ve Leu321, aromatik ve(ya) alifatik yan zincire sahip amino asitlere dönüştürüldüler. E316F, E316H, H246W, I313F, I314F, V536A, V536W ve L321A varyantlarına dönüştürülen proteinlerin, kanal çapındaki değişikliklerin aktiviteler üzerindeki etkileri araştırıldı (Tablo 3.3). Buna göre, mutantlara ait katalaz aktivitelerinde önemli bir değişiklik kaydedilmedi. Diğer yandan, oksidaz aktivitesinin kanal çapının daralmasıyla azaldığı gözlemlendi. Oksidaz aktivitesindeki yabanıl tip proteine göre yaklaşık %85 oranındaki düşüş His246Trp (H246W) varyantında elde edildi. Buna göre, histidinin aromatik yapıda ancak daha büyük yan zincire sahip triptofana değiştirilmesi kanalı büyük ölçüde daraltarak

muhtemelen oksidatif substratların burada tutulmasını engellediği düşünülebilir. Yanal kanaldaki mutasyonlar sonucu oksidatif aktivitede önemli ölçüde artış belirlenmemiş olmasına rağmen wtCATPO enzimine göre kanal çapının daralmasına bağlı olarak daha düşük aktivitenin gözlenmesi ve son olarak katalaz aktivitesi ile aktif bölgede bulunan "Hem" tipinde herhangi bir değişiklik kaydedilmemesi (Tablo 3.3), burada bir inhibitör bağlanma bölgesinin varlığına işaret etmektedir.

3.6. CATPO Varyantlarının X Işını Kristalografi Analizi

Yanal kanal varyantlarında meydana gelen değişikliklerin yapısal boyutta incelenmesi üzerine, Hamburg Üniversitesi'nde X ışını kristalografi yöntemine başvuruldu. X ışını kristalografisi için varyantlar (V228A, V228C, V228I, V228A ve I313F) 48 kuyucuğu farklı solüsyon içeren kristal kaplarda asılı damla buhar difüzyon yöntemi kullanılarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu V228C ve V228I varyantların 0,2 M potasyum klorür (KCl), 10 mM kalsiyum klorür ($CaCl_2$), 50 mM sodyum kakodilat trihidrat ve %16 (v/v) PEG 400 (pH 5,0) solüsyonları bulunduran çözeltide kristalleri üretildi. Ancak V228A, V228G ve I313F varyantlarında yapılan tüm denemelere rağmen herhangi bir kristal oluşumu gözlemlenemedi. Üretilen kristaller %20'lik (v/v) PEG400'de dondurularak ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Fransa)'da X ışını kırımına maruz bırakıldı. V228C ve V228I varyantlarına ait difraksiyon verileri yaklaşık 1,4Å değerinde oldukça yüksek çözünürlükte toplandı (Tablo 3.4).

Difraksiyon verilerinin kalitesini o proteinden elde edilen çözünürlük belirler. 2,0Å ve altındaki değerler yüksek çözünürlük olarak kabul edilir. Buna bağlı olarak protein ve su molekülleri gayet iyi tanımlanır. Düşük çözünürlük ise 2,8Å veya üstü olarak kabul edilir. Düşük çözünürlükteki verilerde, su moleküllerin ve aminoasitlerin güvenilir bir şekilde tayini mümkün olamaz. Bu nedenle kristalden alınan her veri kullanılamaz. Verilerin yüksek çözünürlük değerlerinde olması gerekir ki bu da oldukça zordur.

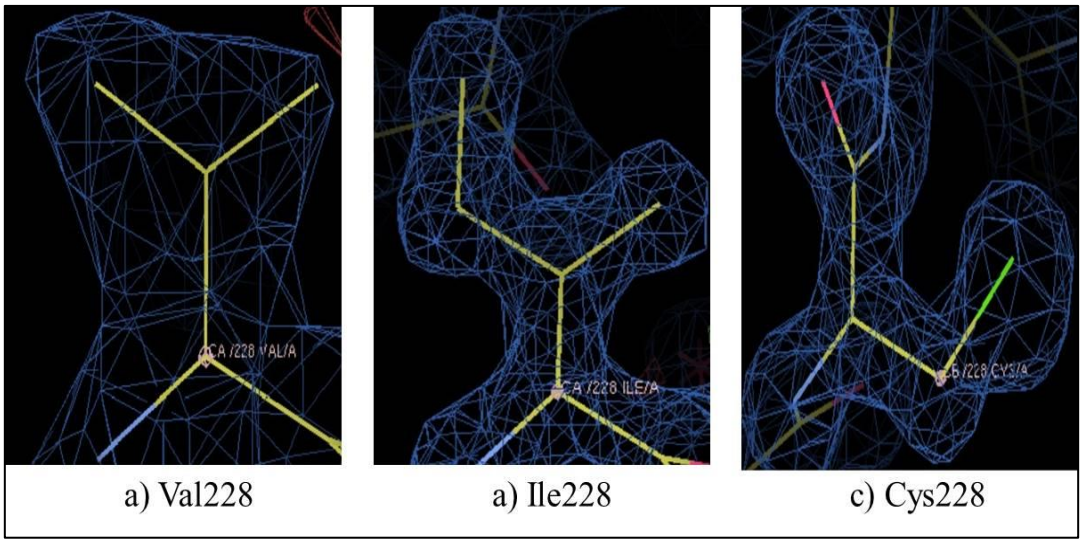
Mutant kristallerinde, aynı wtCATPO kristali gibi tetramerik yapı gözlemlendi. Uzay grubu C2 olan wtCATPO'dan (PDB: 4AUM) farklı olarak mutantların uzay grubu I2 olarak belirlendi (Tablo 3.4). Kristal verileri ve difraksiyonların iyileştirilmesi Ccp4 ve Coot programları kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.4. X ışınına maruz bırakılan varyantlara ait kristalografik veri tablosu

Varyant	**V228C**	**V228I**
a (Å)*	125,12	125,47
b (Å)*	121,08	120,25
c (Å)*	185,12	183,67
β*	102	102
Çözünürlük (Å)	1,42	1,41
Uzay Grubu	I 1 2 1	I 1 2 1
Hem tipi	d	d

*a,b,c, Birim hücre; β, birim hücre iç açısını göstermektedir

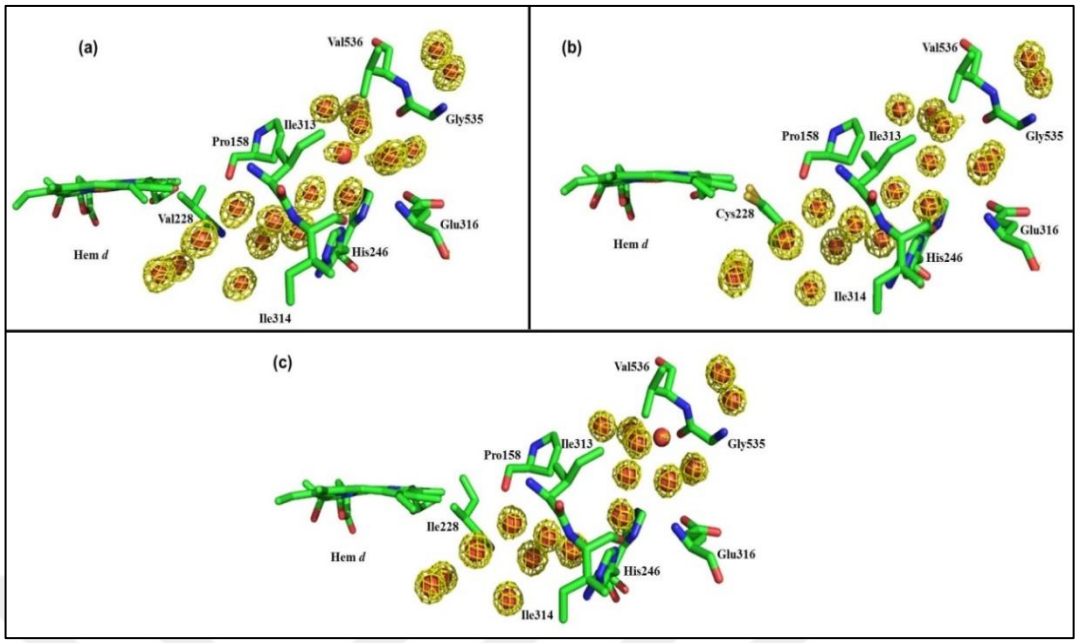
Elde edilen elektron yoğunluğu haritasında; dört alt ünitenin aktif bölgeleri (Hem grubu), enzimdeki 2680 amino asit kalıntıları ve yapı içerisindeki su molekülleri (2070 adet) belirlendi. Yanal kanal V228C ve V228I varyantların mutasyon çalışmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği X ışını kristalografisi ile desteklenmiştir (Şekil 3.23). Benzer şekilde CATPO varyantlarının UV görünür bölge spektrum analizi ile belirlenen "Hem" tipleri, elde edilen elektron yoğunluk harita analizi ile kanıtlanmıştır (Şekil 3.24). Buna göre, V228C ve V228I varyantları wtCATPO ile benzer d tipi "Hem" grubu taşımaktadırlar (Şekil 3.24).



Şekil 3.23. X ışını kristalografisinden elde edilen elektron yoğunluk haritası (a) wtCatpo'da 228.aminoasit valini temsil etmektedir; (b&c) Valin aminoasitinin izolösin ve sistein aminoasitlerine mutasyonu

V228C mutantı, wtCATPO ile karşılaştırıldığında solvent zincirinde dikkate değer bir değişim (azalma veya artış) görülmemektedir (Şekil 3.24). Benzer bir çalışmada, *E. coli* HPII katalazında aynı konumda bulunan amino asit sisteine dönüştürüldüğünde "Hem" ile sistein arasında bir kovalent bağı oluştuğu vurgulanmıştır. Ayrıca aktif bölgede d ve b tipi olmak üzere iki "Hem" tipini de bulunduğu rapor edilmiştir (Pha ve diğ., 2011). Ancak gerçekleştirilen bu çalışmada ise Val228Cys (V228C) yapısında aktif bölge ile bir bağ oluşumu gözlemlenmediği gibi "Hem" tipi wtCATPO ile aynı olan ve monofonksiyonel büyük alt üniteli çoğu katalazın bulundurduğu d tipi olmak üzere tek çeşit prostetik grubunun bulunduğu tespit edildi.

E. coli HPII katalazında izolösin yerine *Scytalidium*'da bulunan Val228 amino asiti, izolösine dönüştürüldüğünde yapılan spektrofotometrik çalışmalar sonucu tahmin edildiği gibi katalaz aktivitesinde dramatik bir düşüş gerçekleşmediği gözlemlenmişti. V228I mutantının üç boyutlu yapısı incelendiğinde solvent zincirinde wtCATPO ile herhangi bir değişikliğin kaydedilmemesi (Şekil 3.24), katalaz aktivitesinin azalmamasını doğrular niteliktedir.



Şekil 3.24. CATPO (a), V228C (b) ve V228I (c) varyantlarına ait yanal kanalların üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması. Elektron yoğunluk haritaları sarı renkle gösterilmiştir. Yanal kanalda bulunan ve projede değişikliğe uğratılan diğer amino asitler Pro158, Ile313, Ile314, Val536, His246 ve Glu316 ayrıca gösterilmektedir

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Termofilik bir mantar olan *S. thermophilum*'un ürettiği hücre dışı katalaz enzimi (CATPO), aynı zamanda oksidaz aktivitesi de göstermektedir. Bu çalışmada, ikincil aktivite olarak adlandırılan oksidaz aktivitenin katalitik mekanizmadaki rolünü detaylı araştırmak üzere mutasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için enzimde yer alan ve oksidatif substratların aktif bölgeye ulaşmasından sorumlu olabileceği düşünülen yanal kanal amino asitlerinden (Val228, Glu316, His246, Ile313, Ile314, Val536, Leu321, Pro158, Gln293), Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile arzu edilen mutasyonu içeren çentikli plazmidlerin ortaya çıkması teşvik edildi. Mutasyonu içeren yeni sentezlenmiş plazmid DNA, *E. coli* XL-1 Blue kompetan hücresine aktarılmak için hazır hale getirildi. Transformasyonu doğrulanan rekombinant plazmidi içeren kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Başarılı bir şekilde gerçekleşen plazmid DNA izolasyonları doğrulanmak üzere DNA Sekans analizine gönderildi. Gelen sekans sonucuna göre Bioedit programıyla doğrulanan, yanal kanal üzerinde küçük alt üniteli katalazlarda NADPH bağlanma bölgesine denk gelen amino asitlerden toplam 16 tane olmak üzere farklı CATPO varyantı elde edildi; V228A, V228C, V228F, V228G, V228I, V228S, E316F, E316F, H246W, I313F, I314F, V536A, V536W, L321A, P158W ve Q923W. Olumlu sonuçlar doğrultusunda His etiketli rekombinant proteinler afinite kromatografi tekniği kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan proteinlerin saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlıklarını doğrulamak üzere SDS-PAGE elektroforez analizi yapıldı. Daha sonra proteinler biyokimyasal olarak karakterize edilirken (hem tipi varlığı, katalaz ve fenol oksidaz spesifik aktivite tayinleri) X ışını protein kristalografi yöntemiyle 2 varyantın üç boyutlu yapısı ortaya çıkarıldı.

Mutasyonu doğrulanan P158W ve Q293W varyantlarının saflaştırılması üzerine birçok deneme (farklı kolon ve farklı tampon çözelti kullanımı, yıkama süresi değişikliği, vb.) yapıldı ancak başarılı olunamadı. Bunun sebebi olarak oluşan yeni mutantların, enzimin doğal yapısında bozulmalara yol açtığı ve aktif protein için gerekli olan yeterli miktarda prostetik grup sentezini engellediği düşünüldü. Saf

protein eldesi başarılı olan varyantlardan V228C, V228I, E316H, E316F, H246W, I313F, I314F, V536A, V536W ve L321A'nın aktif bölgelerinde wtCATPO ile benzer "Hem" tipi (*d*) bulundurduğu gözlemlendi. Ancak V228A, V228F ve V228S varyantlarında spekstroskopik analiz sonucu "Hem" tipi belirlenemedi. Bunun sebebinin bu proteinlerde ölçülen "Hem" grubunun belirleyicisi olan R_z değerlerinin yabanıl tip enzimden çok daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Test edilen tüm varyantlara ait spektroskopik analiz sonuçları değerlendirildiğinde Val228 amino asidinin, "Hem" grubunun oksidasyonunda rol oynadığı kanısına varıldı.

wtCATPO ve saflaştırılması başarılı olan 14 varyantın katalitik aktiviteleri karşılaştırıldığında (Tablo 3.3), dramatik düşüşler V228A varyantında yabanıl tip enzime göre %82, V228G varyantında %88, V228F ve V228S varyantlarında ise %99 oranlarında daha düşük oldukları gözlemlendi. V228F ve V228S varyantlarına ait katalaz aktivitelerinde gözlenen azalmanın yanlış protein katlanması sebebiyle aktif olmayan proteinlerin üretilmesinden kaynaklı olabileceği düşünüldü. Katalitik aktivitedeki en az düşüş ise V228I amino asitinde (%26) gözlemlendi. Bu bulgunun bazı katalazlarda (örneğin, HPII) Valin yerine aynı pozisyonda İzolösin bulunduğunun rapor edilmesinden dolayı şaşırtıcı olmadığı sonucuna varıldı.

CATPO enziminde tanımlanan ikincil oksidaz aktivitenin yabanıl tip enzim ile test edilen tüm varyantlarda kıyaslanması sonucunda, en dramatik düşüş V228G varyantında (%92) gözlendi. Bu durum, aktif bölgeye uzanan yanal kanal girişinin açılarak burada oksidatif substratın düşük derişimlerde bulunmasının teşvik edildiği ve dolayısıyla aktivitede azalma gözlendiği şeklinde yorumlandı. Yanal kanal üzerinde Triptofan amino asidine dönüştürülen varyantlarda ya yeterli seviyede prostetik grubunun sentezlenemediği (P158W ve Q293 varyantlarında olduğu gibi) ya da oksidaz aktivitede kanal çapının daralmasına bağlı olarak meydana geldiği varsayılan önemli oranda tespit edilen bir düşüş gözlendi (H246W varyantında yabanıl tip CATPO'ya göre %85 oranında azalma ölçüldü).

Yapılan kristalografi çalışmaları sonucunda elde edilen V228C ve V228I varyantlarının kanaldaki konumları, etrafındaki amino asitlerle ya da su molekülleriyle yeni bir bağ yapıp aktif bölgeyi değiştirip değiştirmediği üç boyutlu görüntü ile sergilendi. Özellikle V228C varyantının kristal verisi incelendiğinde HPII

Katalazında bulunan I274C (V228C, *Scytalidium* katalazı) ile yapılan çalışmanın (Jha ve diğ., 2011) aksine aktif bölgede bulunan prostetik grup ile Cys228 arasında kovalent bağ oluşumu gözlenmedi. Bu çalışmada, *S. thermophilum* katalazı yanal kanalının gerek prostetik grubun biyosentezinde gerekse enzimin katalitik aktivitesinde rol oynadığı görüldü. Ancak mekanizmanın daha detaylı incelenmesi ve doğru tespitler yapılabilmesi için özellikle oksidaz ve katalaz aktivitelerinde önemli ölçüde azalmayla sonuçlanan mutasyonlar neticesinde oluşturulan varyantların X ışını kristalografisi çalışmaları ile yapısal analizlerinin gerçekleştirilmesi önerilebilir. Literatüre yeni giren katalazlarda gözlenen çift aktivite olgusunun *Scytalidium* haricinde başka canlılarda da gözlenmeye başlaması, bu özelliğin daha yaygın olabileceğini vurgulamakta ve bu tip enzimlerin disiplinler arası çoklu iş birliklerine ilham kaynağı olacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

Bardakcı F., Yenidünya A. F., *Moleküler Biyoloji*, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010.

Bravo J., Fita I., Ferrer J. C., Hillar A., Switala J., Loewen P. C., Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia coli*, *Protein Science*, 1997, **6**, 1016-1023.

Bravo J., Mate M. J., Schneider T., Switala J., Wilson K., Loewen P. C., Fita I., Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1,9Å resolution, *Proteins*, 1999, **34**, 155-66.

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.

Burdon R. H., Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, **18**, 775-794.

Carpena X., Soriano M., Klotz M. G., Duckworth H. W., Donald L. J., Melik-Adamyan W., Fita I., Loewen P. C., Structure of the clade 1 catalase *CatF* from *Pseudomonas syringae* at 1,7Å resolution, *Proteins*, 2003, **50**, 423-436.

Cattani L., Ferri A., The function of NADPH bound to catalase, *J Biol Res-Boll Soc It Biol Sper*, 1994, **70**, 75-82.

Chelikani P., Carpena X., Fita I., Loewen P. C., An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 31290-31296.

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

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.

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.

Díaz A., Horjales E., Rudin 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.

Emsley P., Cowtan K., Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallographica Section D*, 2004, **60**, 2126-2132.

Fita I., Silva A. M., Murthy M. R. N., Rossmann M. G., The refined structure of beef liver catalase at 2.5Å resolution, *Acta Crystallogrophica- Section B: Structural Crystallogtraphy and Crystal Chemistry*, 1986, **42**(5), 497-515.

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

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 15Å from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates, *Biochemistry*, 2007, **46**, 11-22.

Khan A. U., Wilson T., Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chemistry and Biology*, 1995, **2**, 437-445.

Kirkman H. N., Gaetani G.F., Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, **81**, 4343-4347.

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.

Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C. A., *Concepts of Genetics*, 8th ed., Pearson Education, New Jersey, 2011.

Koclar Avci G., Coruh N., Bolukbas U., Ögel ZB., Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase-phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum, Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**, 661-672.

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.

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 1.6Å resolution, *Biochemistry*, 2004, **43**, 3089-3103.

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., Villanueva J., Switala J., Donald L., Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: Substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy, *Proteins*, 2015, **83**, 853-866.

Loncar N., Fraaije M., Catalases as biocatalysis in technical applications: current state and perspective, *Appl. Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-015-6512-6.

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.

Maté M. J., Zamocky M., Nykyri L. M., Herzog C., Alzari P. M., Betzel C., Koller F., Fita I., Structure of catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Molecular Biology*, 1999, **286**, 135-149.

Mate M., Murshudov G., Bravo J., Melik-Adamyan W., Loewen P. C., Fita I., Heme-catalases, *In: Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2001, 486-502.

Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Borisov V. V., Vainshtein B. K., Fita I., Murthy M. R. N., Rossman M. G., Comparison of Beef Liver and *Penicillium vitale* Catalases, *Journal of Molecular Biology*, 1986, **188**, 63-72.

Mueller S., Riedel H., Stremmel W., Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations, *Analytical Biochemistry*, 1997, **245**, 55-60.

Murshudov G. N., Grebenko A. I., Barynin V., Dauter Z., Wilson K. S., Vainshtein B. K., Melik-Adamyan W., Bravo J., Ferra´n J. M., Ferrer J. C., Switala J., Loewen P. C., Fita I., Structure of the Heme d of *Penicillium vitale* and *Escherichia coli* Catalases, *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**, 8863-8868.

Murshudov G. N., Melik-Adamyan W. R., Grebenko A. I., Barynin V. V., Vagin A. A., Vainshtein B. K., Dauter Z., Wilson K., Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1,5Å resolution, *FEBS Letters*, 1992, **312**, 127-131.

Murthy M. R. N., Reid T. J., Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M. G., Structure of beef liver catalase, *Journal of Molecular Biology*, 1981, **152**, 465-499.

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.

Pha V., Louis S., Chelikani P., Carpena X., Donald L., Fita I., Loewen P., Modulation of Heme Orientation and Binding by a Single Residue in Catalase HPII of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 2011, **50**, 2101-2110.

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.

Sangar S., Pal M., Moon L. S., Jolly R. S., A catalase-peroxidase for oxidation of beta-lactams to their R-sulfoxides, *Bioresour Technol*., 2012, **115**, 102–110.

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.

Stern K. G., The Constitution of The Prosthetic Group of Catalase, *Nature*, 1935, **136**, 302.

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.

Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase phenol 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.

Teng X., Chen N., Xiao X., Identification of a Catalase-Phenol Oxidase in Betalain Biosynthesis in Red Amaranth (*Amaranthus cruentus*), *fronties in Plant Science*, DOI: 10.3389/fpls.2015.01228.

Timkovich R., Bondoc L. L., Diversity in the structure of heme, *Advances in Biophysical Chemistry*, 1990, **1**, 203-247.

URL-1: http://web.expasy.org/compute_pi/, (Ziyaret tarihi: 31 Ekim 2016).

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 2.0Å 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.

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.

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*, 2013, **69**, 369-375.

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.

Yüzügüllü Y., Ögel Z. B., Çift aktiviteli katalaz- fenol oksidazın ve diğer katazların gıda sanayisindeki önemi, *Gıda*, 2013, **38**, 111-118.

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*, 2013, **69**, 398-408.

Zamocky M., Furtmüller P. G, Obinger C., Evolution of Catalases from Bacteria to Humans, *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(9), 1527-1548.

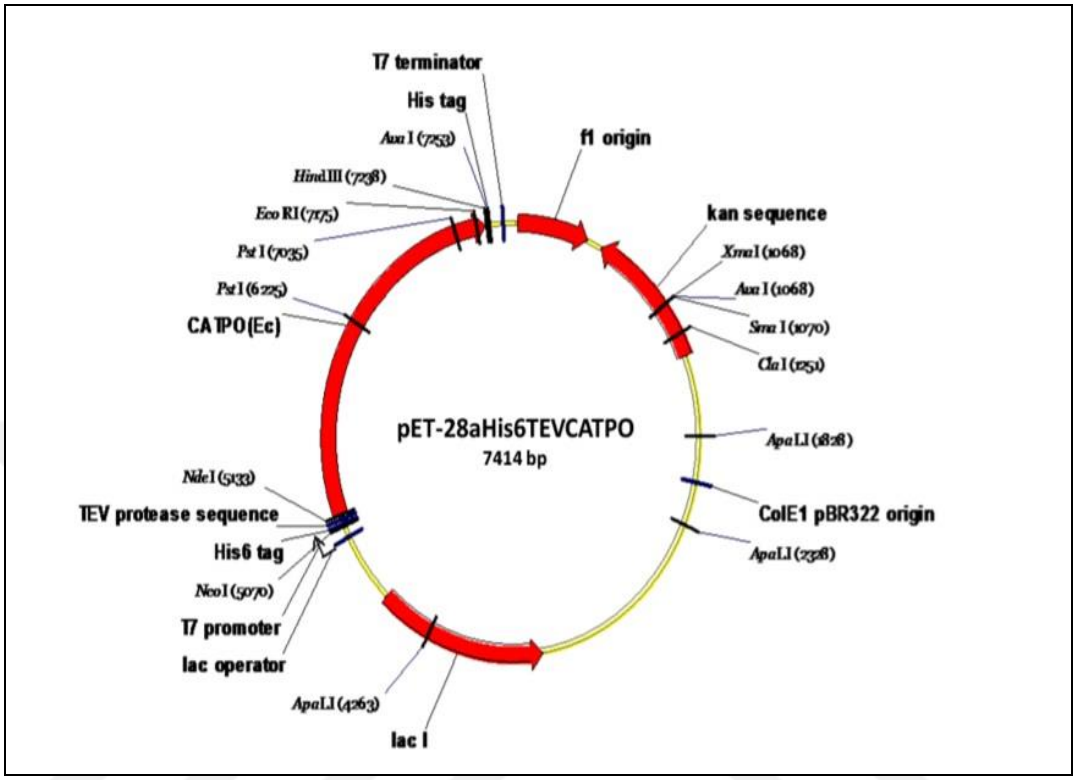
Zamocky M., Koller F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 1999, **72**, 19-66.

Zengin M., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz Enzimi Ana Kanal Yapısının Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 10122189.

EKLER

EK-A

pET-28aHis6TEVCATPO Ekspresyon vektör haritası



Şekil A.1. pET-28aHis6TEVCATPO,ekspresyon vektör haritası (Yüzügüllü, 2010)

EK-B

Yanal kanal üzerinde bulunan mutasyona uğratılmış aminoasit kırmızı olarak gösterilmektedir. CATPO varyantlarına ait tahmini molekül ağırlık ve pI değerleri, "http://web.expasy.org/compute_pi/" web sayfasından hesaplandı (URL-1).

rCATPO'nun V228A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGAHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79247,14 Da

rCATPO'nun V228S Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGSHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79263,13 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun V228F Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGFHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79323,17 Da

rCATPO'nun V228C Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGCHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79279,11 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun V228I Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGIHTFRFVKDD
GSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79289,18 Da

rCATPO'nun V228G Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGGHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79233,12 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun I313F Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKFIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAE
TEQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRV
PIHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTA
SGALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKK
NVLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPT
IKTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYST
ADATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCG
GKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79309,15 Da

rCATPO'nun I314F Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIFPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAE
TEQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRV
PIHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTA
SGALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKK
NVLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPT
IKTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYST
ADATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCG
GKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79309,15 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun L321A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPATKLGLLKLDRNPTNYFAE
TEQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRV
PIHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTA
SGALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKK
NVLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPT
IKTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYST
ADATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCG
GKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79233,12 Da

rCATPO'nun E316H Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPHEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAE
TEQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRV
PIHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTA
SGALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKK
NVLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPT
IKTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYST
ADATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCG
GKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,58 / 79283,18 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun E316FVaryantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPFEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,55 / 79293,19 Da

rCATPO'nun V536A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGASIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79247,14 Da

EK B (Devamı)

rCATPO'nun V536W Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWHFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPE
WDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAET
EQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVP
IHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTAS
GALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKN
VLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGWSIVGSGPLPTI
KTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTA
DATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGG
KSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,50 / 79362,18 Da

rCATPO'nun V536W Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi.

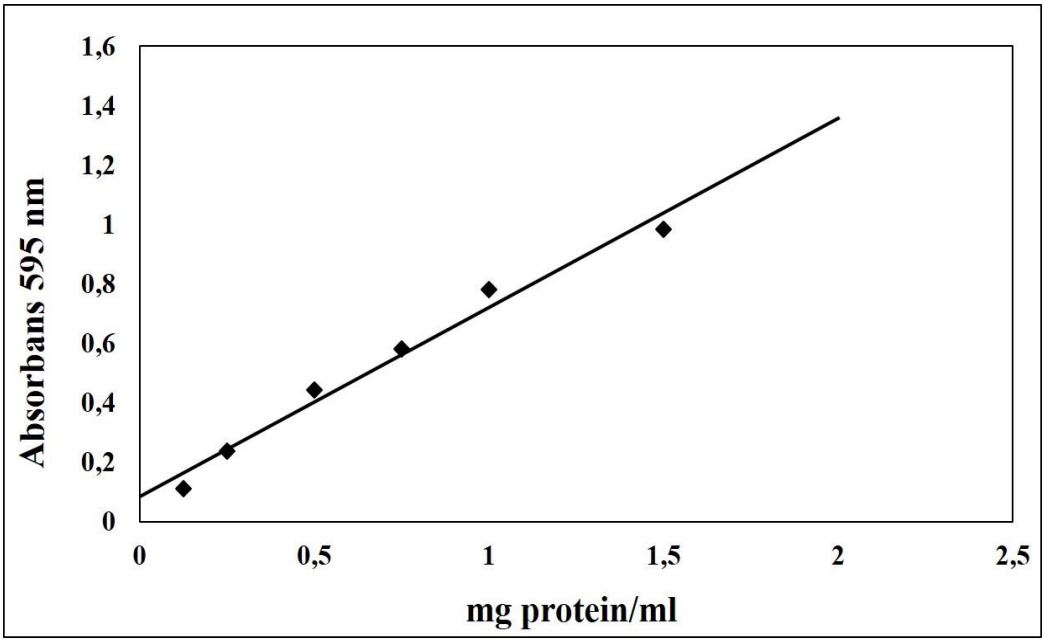
MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVD
DSTGYLTSDVGGPIQDQTSLKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAV
HARGAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADT
ARDVHGFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQA
ATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKD
DGSSKLIKWWFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGP
EWDVCVQIVDESQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAE
TEQVMFQPGHIVRGIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRV
PIHNNNRDGAGQMFIHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTA
SGALVREVSPTFNDHWSQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKK
NVLTQLNRVSHDVAVRVAAAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPT
IKTLRVGILATTSESSALDQAAQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYST
ADATGFDGVVVVDGAAALFASTASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCG
GKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEESVDMFVEEFEKGLATFRFTDRFALDS

pI/MA: 5,47 / 79324,19 Da

EK-C

Bradford Metodu ile Protein Miktarının Hesaplanması

Protein miktarı belirlenmesinde, strandart protein olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Hazırlanan stok BSA çözeltisi (2 mg/ml) 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. 1 ml'lik ependorflara hazırlanan farklı BSA konsantrasyonlarından 20 µl ve 1 ml Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometre kullanılarak 595 nm'de ölçüm yapıldı (Şekil C.1).



Şekil C.1. Protein ölçümü için gerekli olan, Bradford metodundaki standart BSA eğrisi

EK-D

Büyüme Ortamı ve Solüsyonların Hazırlanması

Luria Broth (1 litre)

10 g Tripton
5g Yeast Ekstrakt
10 g NaCl
Son konsantrasyon 1 litre olacak distile su ile tamamlanır ve steril olması için otoklavlanır.

Luria Broth Kanamisin Agar (1 litre)

10 g Tripton
5g Yeast Ekstrakt
10 g NaCl
20 g Agar-agar
Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır ve steril olması için otoklavlanır. Otoklavdan çıkan büyüme ortamı sıcaklığı yeteri kadar azaldığında ortama 50 µg/ml kanamisin eklenir.

EDTA (0,5 M, pH 8)

7,3 g tartılan EDTA, 30 ml distile su içerisinde çözdürülür. pH 8 olana kadar 1 M NaOH eklenir, 0,22 µm'lik filtreden geçirilir.

IPTG (1 M)

2,4 g tartılan IPTG, 10 ml distile su içerisinde çözdürülür ve filtreden geçirilir. Ependorflara1 ml olacak şekilde aktarılır ve -20^{o}C'de saklanılmak üzere kaldırılır.

Lizis Tamponu (100 ml)

50 mM HEPES (Na Salt)
%25 (w/v) Sükroz
%1 (v/v) Triton-X 100
5 mM $MgCl_2x6H_20$
Son konsantrasyon 100 ml olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 8'e ayarlanır. 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve 4^{o}C'de saklanır. Kullanmadan hemen önce 1 mg/ml lizozim tartılır, 5 µl Benzonaz nükleaz (Sigma) ve 50 µl proteaz inhibitör (EDTA içermeyen) tampona eklenir.

Sodyum Fosfat Tamponu (20 mM, 5 litre, pH 7,4)

146 g NaCl
2,9 g Monobasic
21,7 g Dibasic
Son konsantrasyon 5 litre olacak şekilde distile su eklenir ve pH 7,4 ayarlanıp 4^{o}C'de saklanır.

Bağlama Tamponu (1 litre, pH 7,4)

0,59 g Monobasic
4,34 g Dibasic
29,22 g NaCl
1,36 g İmidazol
Kimyasallar 500 ml distile su içerisinde çözdürülür karışım homojen olunca pH 7,4 olacak şekilde HCl ilave edilir ve son konsantrasyon 1 litreye tamamlanır. 4^{o}C'de saklanır.

Yıkama Tamponu (1 litre, pH 7,4)

0,59 g Monobasic
4,34 g Dibasic
29,22 g NaCl
34 g İmidazol
Kimyasallar 500 ml distile su içerisinde çözdürülür karışım homojen olunca pH 7,4 olacak şekilde HCl ilave edilir ve son konsantrasyon 1 litreye tamamlanır. 4^{o}C'de saklanır.

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre)

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

Destain Solüsyonu (1 litre)

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

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

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*, Lizbon, Portekiz, 24-26 Şubat 2016.

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., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz (CATPO) Yanal Kanalının Aktivitedeki Rolü, *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Konferansı*, Afyon, Türkiye, 21-24 Ağustos 2015.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İznik'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İznik'te tamamladı. 2010 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılında kazandığı COST Action CM1306 tarafından sağlanan STSM (Short Term Scientific Mission) bursu ile Hamburg Üniversitesi'nde ziyaretçi araştırmacı olarak 3 ay protein kristalografisi üzerine araştırma yaptı.