

*Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520'DE  $\delta$ - AMİNOLEVULİNİK ASİT  
DEHİDRATAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şengül AKSAN

Danışman  
Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ekim 2006

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520'DE  $\delta$ - AMİNOLEVULİNİK ASİT  
DEHİDRATAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Şengül AKSAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman  
Prof. Dr. Muhsin KONUK

AFYON  
2006

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520'DE $\delta$ - AMİNOLEVULİNİK ASİT DEHİDRATAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Şengül AKSAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu çalışmada, nebularin olarak adlandırılan bir pürin ribosit antibiyotiği sentezleyen *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520,  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD)'ının, amonyum sülfat ile çökeltmesi ve Sefakril S-200'de jel filtrasyon tekniği sonucunda 90.76 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. İncelenen verilere uygun olarak, enzimin tek polipeptidten oluştuğu ve moleküler ağırlığının 34.8 kDa olduğu SDS-PAGE yöntemi ile saptanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 45 °C, ve optimum pH 'sı 8 olarak belirlenmiştir. Bazı ağır metallerin; Pb<sup>2+</sup> %61, Mg<sup>2+</sup> %26, Co<sup>2+</sup> %20, Fe<sup>3+</sup> %51, Mn<sup>2+</sup> %26, Zn<sup>2+</sup> %36 oranlarında inhibe ettiği ve ilginç olarak, Ni<sup>+2</sup>'nin enzim aktivitesini 15% arttırdığı saptanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinde,  $V_{max}$  30.3  $\mu$ mol PBG/saat/mg protein ve  $K_m$  değeri 1.21 mmol/reaksiyon karışım bulunmuştur.

2006, 64 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** ALAD, enzim karakterizasyonu, Streptomycete, *Streptomyces yokosukanensis*, saflaştırma,

## ABSTRACT

### MSc Thesis

ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF  
 $\delta$ -AMINOLEVULINIC ACID DEHYDRATASE FROM *Streptomyces*  
*yokosukanensis* ATCC 25520

Şengül AKSAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin KONUK

In this study,  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) from *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520, producer of an unusual purine riboside antibiotic called nebularine, was purified and characterized. Purification procedures involved with ammonium sulphate precipitation and following gel filtration techniques by use of Sephacryl S-200. After Gel filtration a 90.76-fold purification was obtained. According to the data obtained from investigation, the enzyme was found to be a single polypeptide having molecular mass around 34.8 kDa. This was determined by SDS-PAGE. Its optimal temperature around 45 °C, and optimal pH was found to be 8. Some heavy metals inhibited its activity ratio of Pb<sup>2+</sup> %61, Mg<sup>2+</sup> %26, Co<sup>2+</sup> %20, Fe<sup>3+</sup> %51, Mn<sup>2+</sup> %26, Zn<sup>2+</sup> %36. Surprisingly, Ni<sup>2+</sup> increased its activity up to 15%. In Lineweaver-Burk plot,  $V_{max}$  was found as 30.3  $\mu$ mol PBG/h/mg of protein and  $K_m$  value 1.21 mmol/reaction mixture.

**2006, 64 pages**

**Key words:** ALAD, enzyme characterization, Streptomycete, *Streptomyces yokosukanensis*, purification.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	a
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ağır Metallerden Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı.....	4
2.2. Streptomyces.....	5
2.2.1. Streptomyces'in taksonomisi.....	9
2.2.2. Actinomycete'lerin bakterilere benzer özellikleri.....	9
2.2.3. Pigmentasyon.....	11
2.3. ALAD Enzimi.....	15
2.3.1. ALAD'ın metabolizmadaki rolü.....	15
2.3.2. ALAD'ların sınıflandırılmaları.....	17
2.3.3. ALAD'ın kurşun ile etkileşimi ve kimyasal kirlilik indikatörü olarak önemi.....	18
2.3.4. Heme Sentez Basamakları.....	22
2.3.5. Tetrapirrol pigmentler.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. ALAD aktivitesinin tayini.....	34
3.2.1.1. Homojenatın hazırlanması.....	34
3.2.1.2. Protein miktar tayinleri.....	34
3.2.1.3. Aktivite tayini.....	35
3.2.2. <i>Streptomyces yokosukanensis</i> ATCC 25520 ALAD'ının biyokimyasal özelliklerinin saptanması.....	35
3.2.2.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.....	35
3.2.2.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	35
3.2.2.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	36
3.2.2.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi.....	36
3.2.2.5. Farklı ağır metallerin ALAD üzerine etkisi.....	36
3.2.3. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması.....	37
3.2.3.1. Ham ekstrenin hazırlanması.....	37
3.2.3.2. Amonyum sülfat ile çökeltme.....	37
3.2.3.3. Amonyum sülfat ve düşük moleküler ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması.....	38
3.2.3.4. Jel geçirgenlik kromatografisi.....	38

3.2.3.5. Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi .....	39
3.2.3.6. Jellerin Fotoğraflanması.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. <i>Streptomyces yokosukanensis</i> ATCC 25520 ALAD'ının biyokimyasal özelliklerinin saptanması.....	42
4.1.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.....	42
4.1.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi .....	43
4.1.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	44
4.1.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi .....	45
4.1.5. Farklı ağır metallerin ALAD üzerine etkisi .....	47
4.2. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması.....	48
4.2.1. Amonyum sülfat ile çökeltme .....	48
4.2.2. Jel geçirgenlik kromatografisi.....	48
4.2.4. SDS-PAJE ve molekül ağırlığının tespiti.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	51
KAYNAKLAR .....	55
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	64

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ALAD</b>	:5-Aminolevulinik Asit Dehidrataz
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	:Gümüş nitrat
<b>ALA</b>	:Aminolevulinik Asit
<b>APS</b>	:Amonyum persülfat
<b>°C</b>	:Santigrad derece
<b>DNA</b>	:Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EC</b>	:Enzim klassifikasyonu
<b>EDTA</b>	:Etilen Tetra Asetik Asit
<b>EEC</b>	:European Economic Community
<b>g</b>	:Gram
<b>GABA</b>	:Gama amino bütirik asit
<b>Gr (+)</b>	:Gram pozitif
<b>Gr (-)</b>	:Gram negatif
<b>GSH</b>	:Glutatyon
<b>GSI</b>	:Glutatyon S-transferaz
<b>heme</b>	:Heme
<b>lt</b>	:Litre
<b>LC<sub>50</sub></b>	:Letal konsantrasyon 50
<b>kDa</b>	:Kilodalton
<b>µl</b>	:Mikrolitre
<b>mg</b>	:Miligram
<b>ml</b>	:Mililitre
<b>mm</b>	:Milimetre
<b>mM</b>	:Milimolar
<b>mol</b>	:Molekül
<b>ng</b>	:Nanogram
<b>nm</b>	:Nanometre
<b>nmol</b>	:Nanomol
<b>mmol</b>	:Mikromol
<b>PLA</b>	:Piridoksal adlimin
<b>PLP</b>	:Piridoksal fosfat
<b>PBG</b>	:Porfobilinojen
<b>PBGS</b>	:Porfobilinojen Sentaz
<b>RNA</b>	:Ribo Nükleik Asit
<b>SDS-PAGE</b>	:Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SH</b>	:Sülfidril
<b>TCA</b>	:Trikloro asetik asit
<b>TEMED</b>	:Tetra Metil Etilen Daimin
<b>δ</b>	:Delta
<b>µg</b>	:Mikrogram
<b>µl</b>	:Mikrolitre
<b>µmol</b>	:Mikromol
<b>µM</b>	:Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>sayfa</u>
2.1. Streptomyces havasal miselyumu.....	5
2.2. a) Tek tek bulunan bakteri hücreleri .....	6
b) Sıvı besi yerinde üretilmiş <i>S. coelicolor</i> hif yapısı .....	6
2.3. a) Pürüzsüz bir Streptomyces kolonisi.....	7
b) Dallanma yapmamış havasal miselyum.....	7
2.4. a) Pamuksu <i>S. colicolor</i> kolonisi.....	7
b) Dallanmış havasal miselyum.....	7
2.5. a) Farklı renklerdeki Streptomyces kolonileri.....	8
b) Sentezlenen bir antibiyotik.....	8
2.6. İki farklı Streptomyces'teki konidia oluşturan iki farklı hif yapısı.....	10
2.7. Streptomyces'lere ait farklı yüzeyler ile kaplı konidia spor çeşitleri.....	10
2.8. a, b ) Spordan hif oluşumu, c) Germ tüpü oluşturan sporlar oklar ile işaretlenmiştir.....	11
2.9. Streptomyces'in hayat döngüsü .....	12
2.10. Havasal miselyum ve üzerinde spor oluşumu.....	13
2.11. Spor oluşturmuş bir hif ve ortama dağılan sporlar.....	13
2.12. Streptomyces kolonisinin enine kesiti. Morfolojik ve fizyolojik değişimin gözlenmesi.....	14
2.13. Mavi renkli antibiyotik actinorhodini sentezleyen <i>S. coelicolor</i> 'un mutanti renksizdir.....	14
2.14. ALA'nın sentezi .....	15
2.15. ALA'dan porfobilinojen oluşumu.....	16
2.16. Hem biyosentezinde ALAD'ın yeri .....	17
2.17. Kurşunun bloke ettiği hemoglobin sentez kademeleri.....	21
2.18. Heme c yapısı.....	22
2.19. ALA'nın meydana gelişi.....	22
2.20. Piridoksal fosfat (PLP) nin yapısı .....	23
2.21. Glisin amino gruplarının PLA'nın aldehiti ile schiff base ile bağlanması.....	23
2.22. PBG sentaz, ALA dehidretazlar ile ALA'dan porfobilinojen (PBG) pirol halkası oluşumu.....	24
2.23. ALA'ya iki lizin residueli aktif bölgedeki katyonlara bağlanması.....	24
2.24. Porfobilinojen, ALA, GABA ve pirol yapıları.....	25
2.25. Dipirometan açık yapısı.....	25
2.26. Hidroksimetilbilane genel yapısı.....	26
2.27. Üroporfirinojen sentaz 3 ün genel yapısı.....	26
2.28. Üroporfobilinojen III sentetazın halkayı kapatması.....	27
2.29. Hidroksimetilbilaneyinin Üroporfirinojen 3 sentez ile makrosiklik üroporfobilinojen III'e dönüştürülmesi.....	27
2.30. Üroporfirinojen 3 .....	27
2.31. Üroporfobilinojen III'ün protoporfirin IX'a dönüşümü.....	28



2.32. Protoporfirin IX'e Fe <sup>++</sup> enzimdeki korunmuş histidin residuellerine bağlanması.....	28
4.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.....	42
4.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	43
4.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	44
4.4. Farklı substrat konsantrasyonlarında enzime ait kinetik eğri.....	45
4.5. Hazırlanan standartta farklı PBG konsantrasyonları gözlenmesi.....	46
4.6. Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesinin değişimi..... (Michaelis-Menten hız grafiği).....	46
4.7. ALAD enziminin Kinetik analizi (Lineweaver-Burk grafiği).....	47
4.8. Farklı ağır metallerin ALAD aktivitesi üzerine etkisi.....	48
4.9. SDS-PAGE ve izole edilen enzimin molekuler kütle determinasyonu.....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>sayfa</u>
4.1. Farklı Pb konsantrasyonları nın ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. ....	42
4.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi. ....	43
4.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. ....	44
4.4. Farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesinin ölçümü. ....	45
4.5. Farklı ağır metallerin ALAD enzimi üzerine inhibisyon etkisi. ....	47
4.6. Enzimin saflaştırma basamakları ve bulunan değerler. ....	49

## 1.GİRİŞ

Kimya endüstrisinin hızla gelişimi sonucunda, gerek günlük yaşantımızda gerekse tarım ve endüstride birçok kimyasal madde kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler, bugünkü çağdaş yaşamın vazgeçilmez gereksinimleridir. Çeşitli nedenlerle gerek doğrudan maruz kalma veya kullanılmaları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosistemlere zararlı olabilen bu kimyasal maddelerin, pek çoğunun biyolojik etkileri bugün bile hala tam olarak bilinmemektedir. Kullanıma yeni sunulan maddelerin ayrıntılı olarak tek tek ele alınıp, toksik etkilerinin araştırılarak kanserojenik ve mutajenik potansiyellerinin belirlenmesi, insan sağlığı açısından son derece önem taşımaktadır (Ciğerci 2005).

Kimyasallarla yüz yüze gelmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan birincisi; diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi; endüstriyel kimyasallar, pestisitler, saç boyaları, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi bileşiklerle karşılaşmamızdır (Chadzynski 1986).

Ancak günümüzde endüstriyel gelişme, kentleşme ve modern tarımın yaygınlaşması doğadaki ağır metal yükünü önemli oranda arttırmaktadır.

Kurşun, biyolojik sistemlerin her ortamda karşılaşılabildikleri, metabolik işlevi olmayan eser bir elementtir. Bu metal kablo, lehim ve boya üretiminin yanı sıra akü imalatı ile çini ve seramik yapımında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Karataş ve Kalay 2002).

Kurşunun global dağılımı ile birlikte onun biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri düşünüldüğünde en tehlikeli çevresel toksik maddelerden biri olduğu söylenebilir. Yerkabuğu üzerindeki kurşunun geçmişte  $16\mu\text{g/g}$  olmasına karşın günümüzde özellikle topraktaki kurşun endüstriyel aktiviteler sonucunda büyük ölçüde artmıştır. Kurşun günümüzde toprakta  $5000\mu\text{g/g}$ 'ın, tatlı suda  $10\mu\text{g/g}$ 'ın ve havada  $10\mu\text{g/g}$ 'ın üzerine çıktığı bildirilmiştir (Pang et al. 1995). Kurşun üzerine yapılan ekotoksikoloji çalışmaları geleneksel olarak kurşuna maruz kalma yollarını, ara dozları ve sağlık üzerine zararlı etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Pang

et al. 1995). Kurşunun organik ve inorganik formlardan biotransformasyonu ve biyolojik kazanımı ile ilgili sorularda gün geçtikçe önem kazanmasına rağmen, ekosistemde kurşun dağılımı ve miktarına hangi faktörlerin etki ettiği hakkında çok az bilgi vardır (Wong et al. 1975).

Yapılan çalışmalarda doğal ortamdaki toksik metal Pb'nin kontrolünde mikrobiyal biyofilm oluşturan organizmaların önemli rol oynadığı görülmektedir. Biyofilm oluşumu ile toksik metallerin film üzerinde biyoakümülyasyonunun gerçekleşmesi ekofizyolojik etkileri ve biyolojik kazanımı izlemede fırsat sağlar. Bu açıdan bakıldığında ALAD aktivitesi insanlarda ve bazı akuatik ökaryotik canlılarda kurşuna maruz kalmada biyomarkır olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır (Xie et al. 1998; Fleming et. al. 1998). ALAD 128-kD olan metaloproteindir ve heme sentezinin ilk basamağında görev alır (Tanaka et al. 1995). Birkaç bakterinin ALAD sistemleri açıklanmış ve farklı türlerde ALAD'ın metal komponentinin farklı olduğu görülmüştür. Örneğin insan, mayalar ve *Escherichia coli* ALAD aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duyarken *Bradyrhizobium japonicum* magnezyuma ihtiyaç duyar. Aynı zamanda ALAD'ın toksik metallere hassasiyeti metal'in kofaktör olarak kullanılıp kullanılmamasına bağlıdır (Chauhan et al. 1997). ALAD'ın genetik polimorfizmi insanda yapılmıştır (Wetmur 1994). ALAD polimorfizmindeki evrimsel orjin henüz tanımlanamamasına rağmen bilinen bu iki ALAD alellerinin dağılımında türe özgü faktörler ve coğrafik faktörler etkili olmaktadır (Fleming et al. 1998). Aynı zamanda yapılan çalışmalar yüksek kurşun içeren ortamlarda bulunan organizmaların beslenmesinde (gelişiminde) ALAD genlerindeki çoğul kopyaların etkili olduğunu göstermiştir. ALAD genlerindeki evrimden, zor çevre koşullarının etkili olduğu varsayılmaktadır. Özellikle jeokimyasal ve antropojenik faktörlerin eşlik ettiği durumlarda kimyasal yapıdaki dinamik kaymalarda, ekolojik sistemdeki birçok bakteri popülasyonları, toksik bileşiklerin fizyolojik durumunu belirten ve biyokazanımını gösteren indikatörlerdir.

Son yıllarda kirliliğin işareti olarak görülen biyokimyasal tepkilerle bağlantılı olan diğer ölümcül sonuçları araştırmak için gittikçe artan bir ilgi vardır. Bunlar arasında ALAD'ın ( $\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz) seçici olarak

inhibisyonu, hem insan hemde diğer canlı türlerinde kurşuna maruz kalmanın önemli bir göstergesidir (Ciğerci 2005).

Bu çalışmada *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 üzerine kurşun nitratin etkisi araştırılmıştır. Bakteriyel ALAD'ın kurşun tarafından inhibisyon gösterdiği duyarlılığı ortaya çıkarmak amacı ile bu enzimin kurşun ile olan *in vitro* etkileşimi araştırılmıştır.

Çalışmamızda *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520'nin bir toprak bakterisi olması nedeni ile bakteriyel ALAD'ın ağır metal kirliliğinde, özellikle de kurşun kirliliğinde biyosensör olarak kullanılıp kullanılmayacağını saptanması ve bu enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ağır Metallerden Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı

Kurşun, mavi grimsi renkte ağır bir metaldir. Erime noktası 327 °C, kaynama noktası 1744 °C'dir. Kurşun bileşikleri organik ve anorganik kurşun bileşikleri şeklindedir. Organik kurşun bileşiklerinden tetra etil kurşun, lipofilik özellikte olup toksikolojik açıdan önem taşır. Anorganik kurşun tuzları ise kurşun kromat, kurşun asetat, kurşun karbonat, kurşun klorür ve kurşun nitrattır. Anorganik kurşun tuzlarından kurşun asetat ve kurşun nitrat suda çözüldüğü halde kurşun sülfat suda çözünmez. Kurşun klorür soğuk suda az, sıcak suda çok çözünür. Bütün kurşun tuzları sodyum hidroksitte tamamen çözünürler. Anorganik kurşun tuzlarından biri olan kurşun asetat aynı zamanda insektisit yapımında da kullanılmaktadır. Sudaki çözünürlükleri az, örtme kabiliyetleri fazla ve çeşitli renklere sahip olan kurşun bileşikleri yağlı boya endüstrisinde pigment olarak kullanılır. Kurşun akümülatörlerin, çelik ve demirlerin korozyona karşı korunması için yapılan yağlı boyaların, patlayıcı maddelerin, saç boyalarının yapımında ve ipeğe ağırlık vermede kullanılırken, bazı formları da zirai mücadelede ve fotoğrafçılıkta oldukça önemlidir. Erime derecesi düşük, yumuşak ve işlenmesi kolay bir metal olan kurşun eski çağlardan beri kullanıldığı için, kurşun zehirlenmelerinin de geçmişi çok eskilere dayanmaktadır. Doğadaki kurşun genellikle, sarı, parlak, sülfürlü formlarda maden yatağı oluşturmakta ve kolayca elde edilebilmektedir (Vural 1984).

Kurşunun biyolojik varlığı ile ilgili sorular ve inorganikten organik şekillere biyolojik geçişi uzun zamandır önemli olarak görülmesine rağmen, ekosistemlerde kurşunun dağılımı ve potansiyelini etkileyen bu faktörler hakkında bilgi eksikliği vardır (Wong et al. 1975).

Okyanuslar gerek suyu ve çözülmüş gazları buharlaştırmak suretiyle, gerekse atmosferin bileşenlerini çözerek bunlardan yağmur ve toz şeklinde birikimlere yer vermek suretiyle sürekli olarak atmosferle alışveriş halinde olan

bir rezerve sahiptir. Sanayi kaynaklı kurşundan ve özellikle benzindeki kurşundan ortaya çıkan kirlilik bütün atmosfere ve oradan da okyanusa kadar uzanmaktadır. Bugün büyük şehirlerde vücuda alınan kurşunun esas kaynağını motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Kurşun egzoz gazları ile inorganik aerosol şeklinde, çok ince partiküller halinde havaya dağılmaktadır. Böylece günde ortalama 0,5 mg kurşun vücuda alınmaktadır (İmre 1988).

Hellawell'in sınıflandırmasına göre kurşun EEC (European Economic Community)'nin gri listesine alınarak, çevre ve su kirliliğinde çok önemli bir toksik madde olduğu bildirilmiştir (Hellawell 1986).

## 2.2. Streptomyces

Streptomyces cinsi Actinomycetes'lere dahildir. Miselyal (Şekil 2.1), çok hücreli, prokaryot toprak bakterileridir. Toprakta sayıları çok fazla olduğu için toprak mikrobiyal popülasyonunun önemli bir kısmını oluşturur. Toprağın özelliğine göre pH, organik ve anorganik madde miktarına göre farklı Streptomyces popülasyonları oluşur

Actinomyceteler toprak, göl, deniz, kanalizasyon çamuru ve bazı böceklerin iç organlarında bulunurlar (Redavut böceği *Rhodrius proliksus* ). Termofilik türleri de vardır (60 C° de bulunur) (Korcan 1995).



Şekil 2.1. Streptomyces havasal miselyumu (İnt. Kyn. 1)

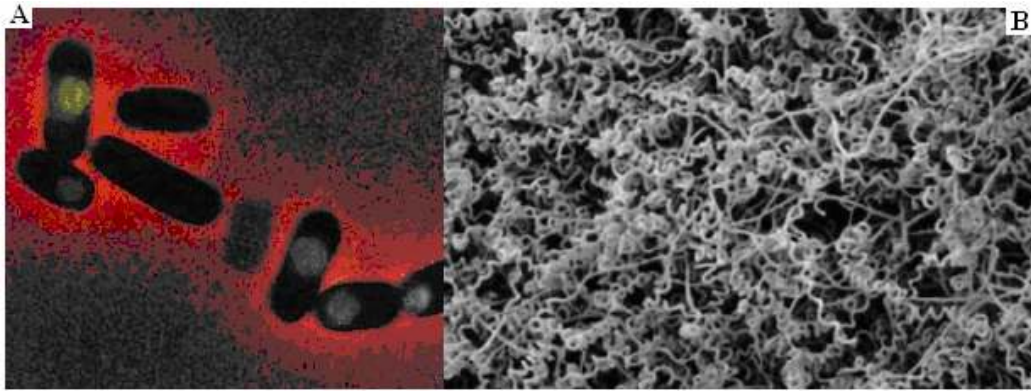
Toprak ısladığı zaman oluşan karakteristik toprak kokusunu Actinomycete'lerin salgıladığı uçucu madde verir (Korcan 1995).

Gram pozitif olan *Streptomyces* in peptidoglukan hücre duvarının temel elementi L-diaminopimelik asittir (LDAP). Ve bu özelliği ile diğer bakterilerden farklıdır.

*Streptomyces* üyeleri aerob ve kemoorganotroftur. Oksidatif tipte metabolizmaya sahiptirler. Actinomycete'ler katalaz pozitifler ve genellikle nitratı nitrite indirgerler. Adenini, eskulini, kazeini, jelatini, hipoksantini, nişastayı ve L-tyrosini degrade ederler (Korcan 1995).

Çok miktarda organik maddeyi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Optimum gelişme pH'sı 6.5-8.0 dir. Optimum gelişme sıcaklığı 25-35 C° dir (int. Kyn. 5). DNA'sı doğrusaldır (8.667.507 bp). Diğer bakterilere nazaran yüksek oranda G+C (% 55-75) sahiptirler (Hopwood et al. 2002, Redenbach et al. 1996).

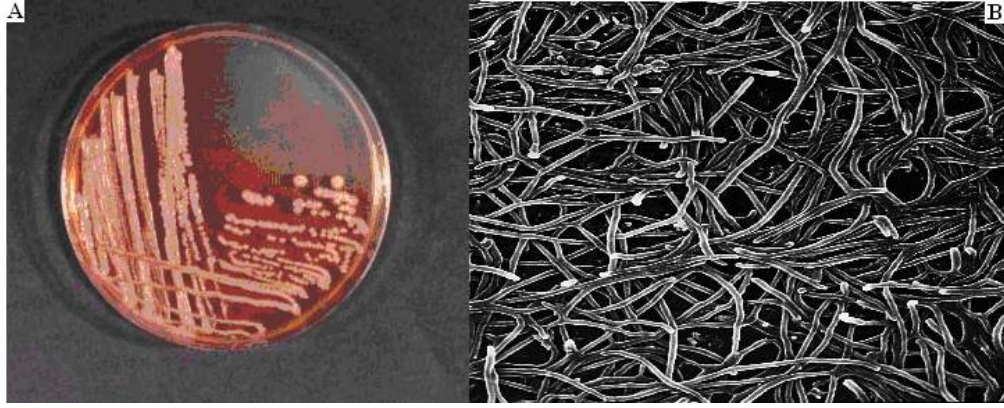
Koloniler bakterilerden farklı olarak tek tek hücre ya da hücre gruplarından oluşmazlar. Havasal ve vejetatif hiften oluşan örümcek ağı benzeri bir görüntüsü vardır (Şekil 2.2).



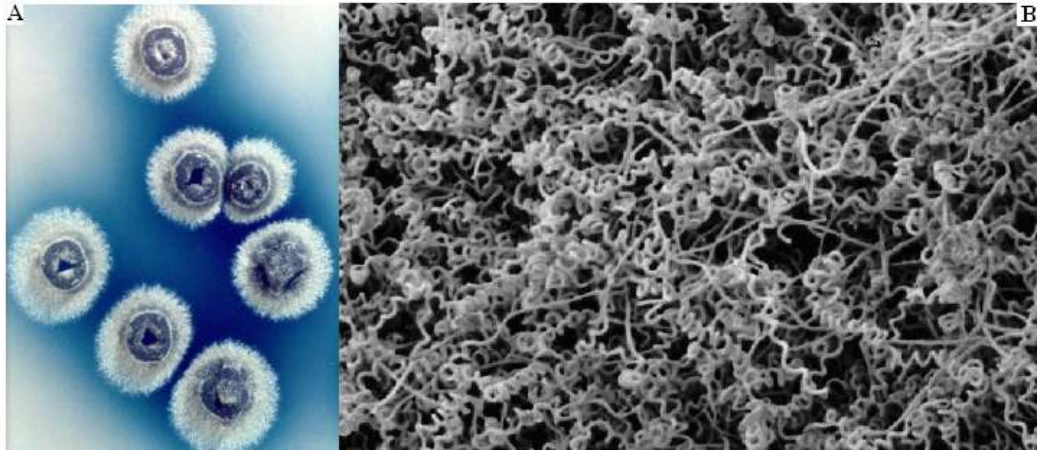
Şekil 2.2. a) Tek tek bulunan bakteri hücreleri (İnt. Kyn. 2).  
b) Sıvı besi yerinde üretilmiş *S. coelicolor* hif yapısı.



Koloniler ilk başta pürüzsüz görünüştedir. Çünkü havasal hifler dallanma yapmamıştır. Havasal miselin dallanması ile granüllü, pamuksu, pudramsı, ve kadifemsi şekilde koloniler oluşur (Şekil 2.3-2.4), (Korcan 1995).

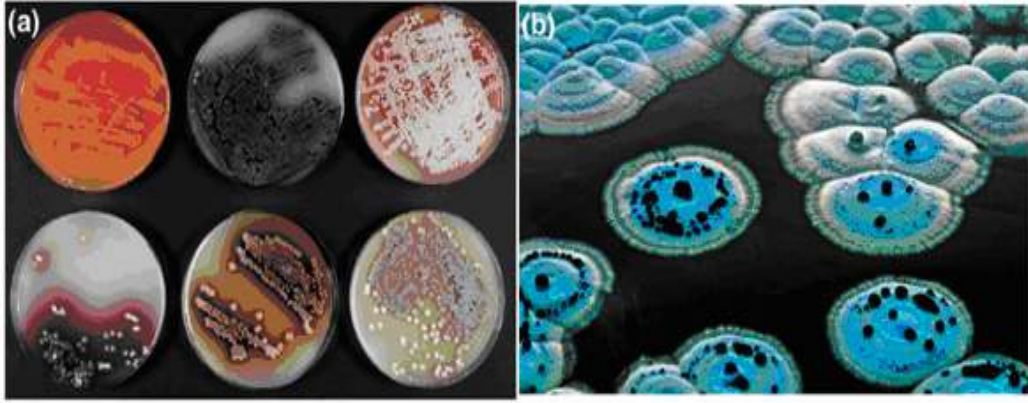


Şekil 2.3. a) Pürüzsüz bir Streptomyces kolonisi,  
b) Dallanma yapmamış havasal miselyum (İnt. Kyn. 3-4).



Şekil 2.4. a) Pamuksu *S. colicolor* kolonisi,  
b) Dallanmış havasal miselyum (İnt. Kyn. 3-4).

Koloniler genellikle havasal hifin tepe kısmı tüylenince oluşur (Thompson et al. 98-99). Ve türe özgü renk meydana getirirler.(Redenbach et al. 1996) Bu renkler gri, beyaz, sarı, sarı-yeşil, lila, mavi, kırmızı, turuncu ve kahverengi gibi birçok renk verir (Şekil 2.5), (Chater 1998). Koloninin renk vermesi sekonder metabolit sentezinin görsel kaynağıdır (Thompson et al. 2002).



Şekil 2.5. a) Farklı renklerdeki Streptomyces kolonileri  
b) Sentezlenen bir antibiyotik (Chater 1998).

Streptomyces'ler olumsuz çevre koşullarından (bakteri, fungus) kurtulmak için morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşırlar. Ve çok çeşitli, ilginç, yararlı maddeler ve sekonder metabolit, anti-bakteriyel, anti-viral, anti-algal, anti-fungal ve anti-tümoral, bileşimleri sentezlerler (İnt. kyn. 5, Thompson et al. 98-99).

Ortamdaki bakteri ve fungusları elimine etmek için onların hücre duvarlarındaki murain tabakasını parçalayan hidrolazları ve hücre duvarı oluşum mekanizmasını bloke eden birtakım maddeleri sentezlerler.

Bu sekonder metabolitler; eczacılıkta, immün cevap modülatörleri, farklı enzim inhibitörleri, herbisitler, insektisitler ve anti parazitik bileşimlerin yapımında kullanılırlar. Ve ekonomik ve ticari açıdan çok önemlidirler (Thompson et al. 2002).

Doğadaki antibiyotiklerin yaklaşık %80'ini Actinomycetes'ler ve bunun yaklaşık %70'ini de Streptomyces'ler üretir. Diğer antibiyotiklerin 4'ü fungus'lardan penisilin, fumagillin, variotitin ve griseofulin; 3 tanesini bakterilerden basitrasin, polimiksin ve tirotrisin elde edilir ve tedavi amaçlı kullanılır (Korcan 1995).

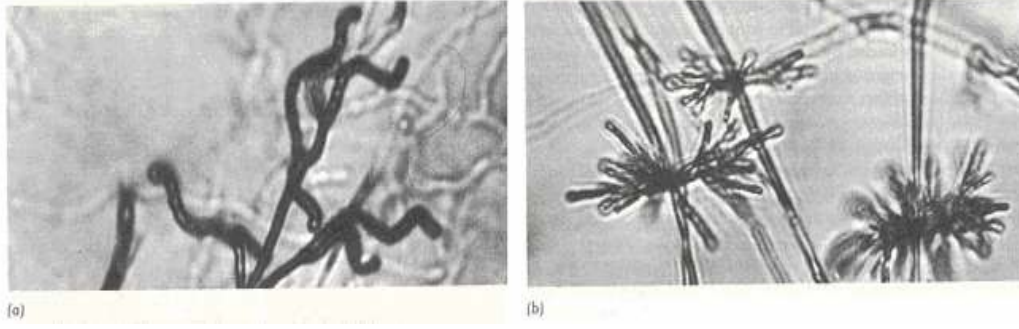
### **2.2.1. Streptomyces'in taksonomisi**

Streptomyces cinsi Actinomycete ailesine ait olan 4 cinsten Streptomyces, Actinomyces, Nocordia ve Mykobacterium'dan biridir. İlk başta bu canlıların sistematüğini oluşturmakta güçlük çekildi. Çünkü bu canlılar bakteri ve fungus gruplarına benzer özellikler gösteriyorlardı. Actinomycete'lere bakteri ve funguslar arası geçiş grubu olarak bakılmış ise de ileri düzeyde yapılan testler ile ortaya çıkarılan özellikler Actinomycete'lerin bakteri olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Korcan 1995).

### **2.2.2. Actinomycete'lerin bakterilere benzer özellikleri**

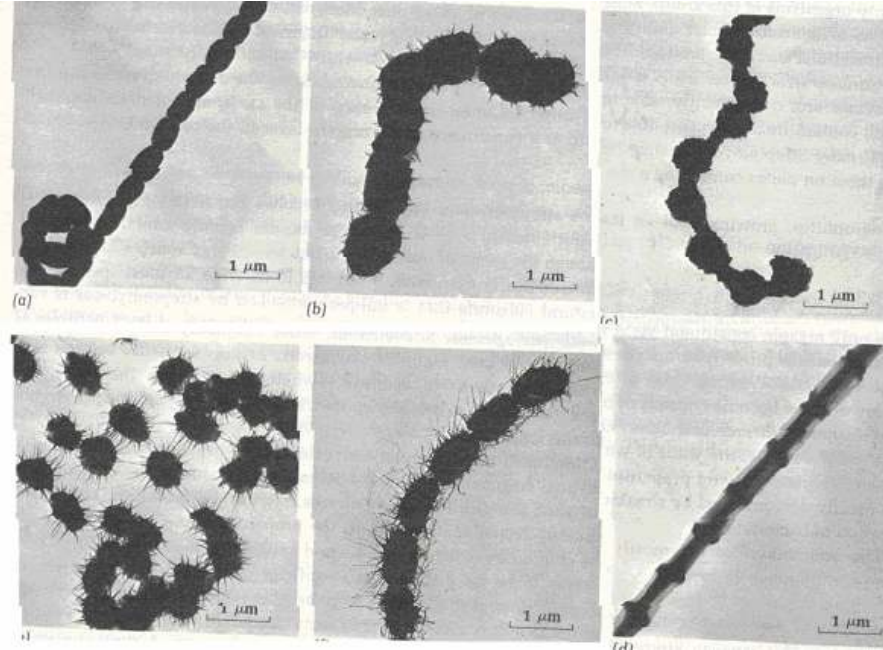
Bakterilerin duyarlı oldukları antibiyotiklere duyarlıdırlar. Bakterileri etkileyen fajlardan etkilenirler. Bakteriler gibi gerçek bir nükleus yapısına sahip değildirler. Bazı türleri (özellikle Actinomyces ve Nocordia türleri) bazı bakterilerle (özellikle Lactobacillus ve Cornebacterium ) ile yakın ilişki içindedir. Miselyum ve spor çapları (özellikleri) bakterilerinkine benzer. Kural olarak septa içermezler. Fungus miselyum ve sporlarında olan kitin, bakteriyel hücrelerde olduğu gibi Actinomycet hücre maddelerinde de yoktur. Bakterilere benzer olarak Actinomycete'ler kural olarak asitlere duyarlıdırlar (Korcan 1995).

Streptomyces'lerin ayırt edici karakterlerinden biri de havasal miselyumdur. Havasal miselyumun spor taşıyan hiflerinin organizasyonunun modeli değişmez ve ayırt edici bir karakterdir (Korcan 1995). Bu miselyumların verdiği renklere göre Nippon'un 9000 renk çizelgesine göre standardize edilirler (Korcan 1995, Lo et al. 2002). Böylece Streptomyces genusu birçok alt gruba ayrılır. İki farklı hif düzenlemesi gösterir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İki farklı Streptomyces'teki konidia oluşturan iki farklı hif yapısı.

Diğer birçok kullanışlı ayırt edici karakter elektron mikroskobu çalışmaları ile elde edilmiştir. Konidia sporun yüzey yapısı ve şekli ile karakterize edilmişlerdir. Bazı türlerin konidia sporu pürüzsüz yüzeye sahip iken diğerleri kıvrık, saçlı ve çıkıntılı yüzeylerle örtülüdürler (Şekil 2.7).



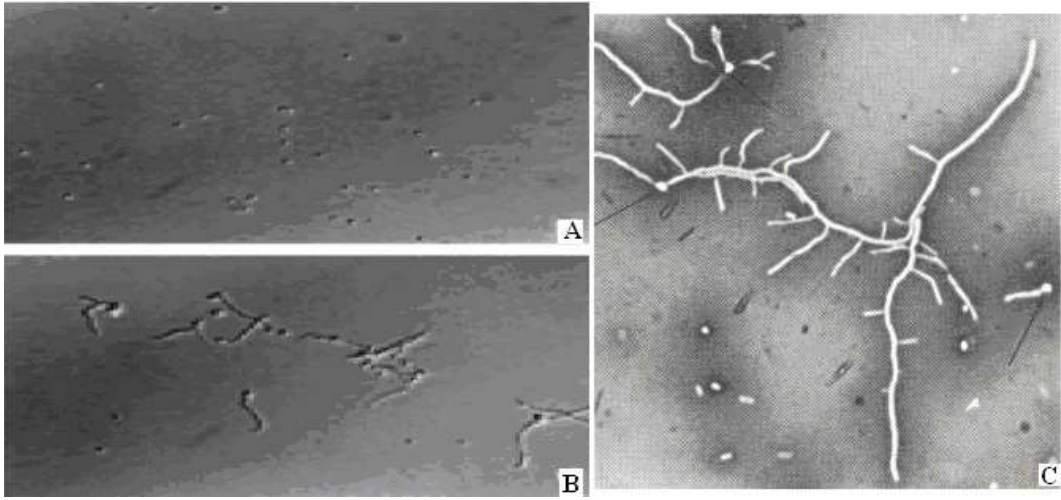
Şekil 2.7. Streptomyces'lere ait farklı yüzeyler ile kaplı konidia spor çeşitleri.

- a) *S. cacaoi* pürüzsüz yüzey.
- b) *S. hirsutus* sipinli(bükümlü) yüzey.
- c) *S. griseoplanus* siğilli yüzey.
- d) *S. aureofaciens*.
- e) *S. fasciculatus*.
- f) *S. flavoviridis* saçlı yüzey.



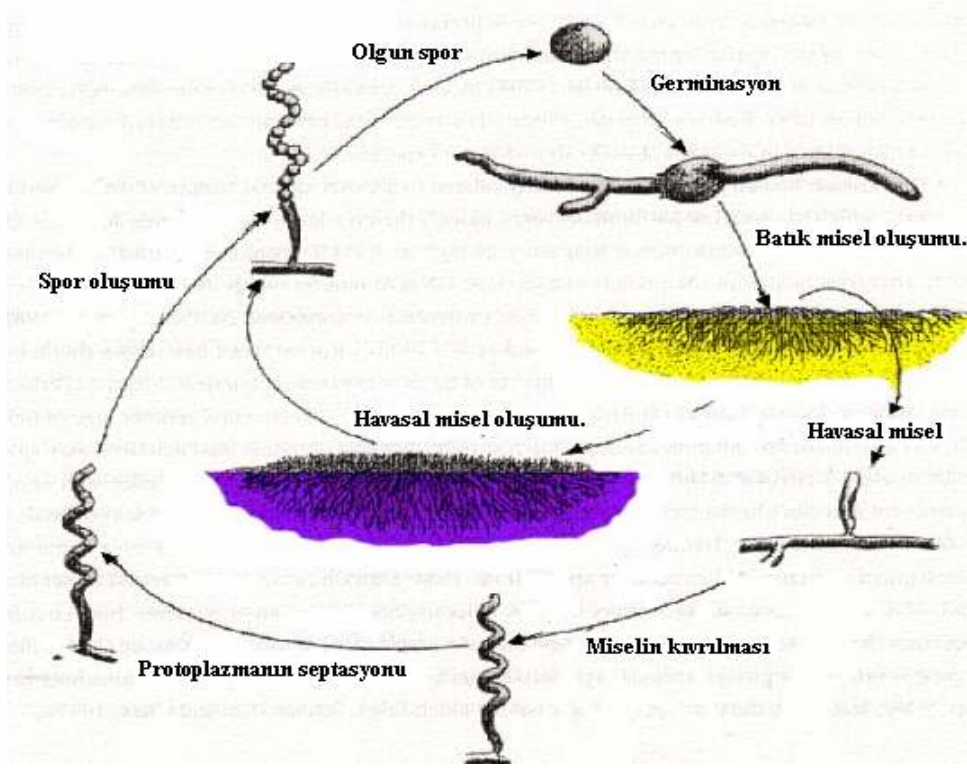
### 2.2.3. Pigmentasyon

Streptomyces'ler germinasyon ve vejetatif misel gelişimi, pigmentasyon, sekonder metabolit üretimi ve sonuçta spor morfogenezisi olmak üzere bir seri düzenlenmiş gelişme süreci geçirir (Süsstrunk et al. 1998). Germinasyonun ilk aşamasında henüz tanımlanmamış sinyaller spor içine su girişini başlatır. Bunu takiben spor büyüklüğü artar, parlaklığı kaybolur ve germ tüpü oluşur (Süsstrunk et al. 1998, Derouaux et al. 2004). Bir spordan 3-4 adet hif gelişebilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. a, b ) Spordan hif oluşumu, c)Germ tüpü oluşturan sporlar oklar ile işaretlenmiştir (Derouaux et al. 2003)

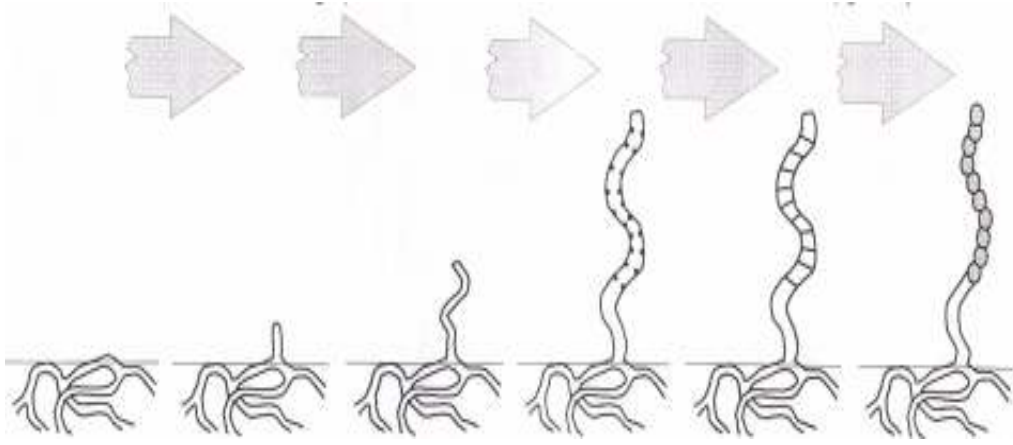
Kromozom replikasyonunu hücre bölünmesinin takip ettiği tek hücreli bakterilerin aksine Streptomyces genomları dallanmış filamentler içinde birlikte kalır böylelikle ara bağlantıları olan miselyal koloniler oluşur (Süsstrunk et al. 1998). Spor germinasyonu ile başlayan morfolojik değişimden sonra batık (vejetatif) misel oluşur. Bu miseller koloninin beslenmesi ve havasal miselin oluşumundan sorumludur. Bu miseller kısa, uzun dallanmış, kıvrık veya eğri olabilirler. Daha sonra bu substrat miseli üzerinde havai miseller oluşmaya ve dikleşmeye başlarlar (Şekil 2.9), (Korcan 1995). İlk havai misel pürüzsüz yüzeye sahiptir.



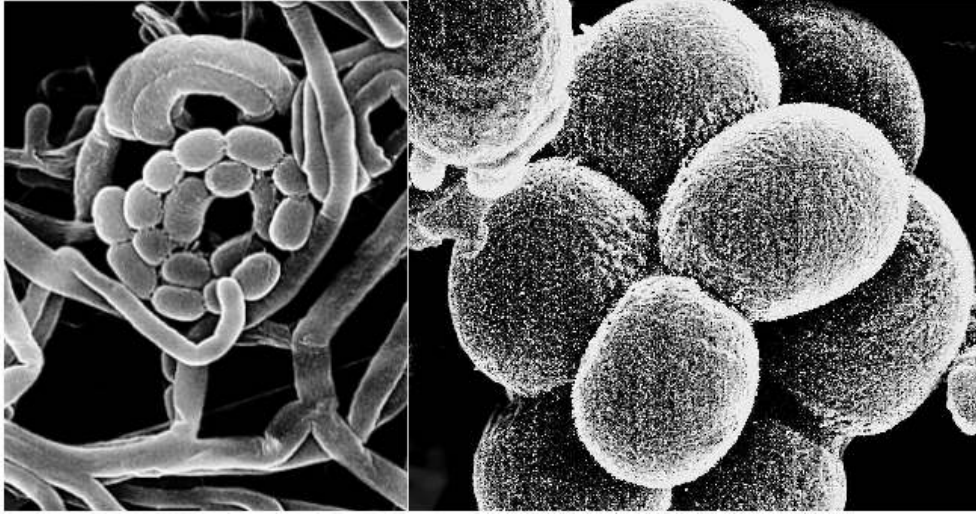
Şekil 2.9. Streptomyces'in hayat döngüsü (İnt. Kyn. 6).

Havasal misel oluşumunu ve gelişimini 6 gen ve 3 morfojenetik protein, reseptör benzeri protein, cevap düzenleyiciler ve sigma faktörünün karışık ilişkisi ile gerçekleştirir (Chater 1998). 3 morfojenetik protein havasal hifin dikleşmesini sağlar (Hopwood et al. 2002). Havasal hifin sertleşmesi ve uzamasından sonra tek genomlu sporları vermek için her hif septasyona uğrar (Dyson 2000).

Havasal misel sporları vermek için protoplazmanın hücre çeperi içinde aşağı yukarı aynı büyüklükte parçalanır. Streptomyces genusunda spor oluşumu havasal misel veren hifin her yerinde septasyonun aynı anda başladığı saptanmıştır (Şekil 2.10). Spor formasyonu ve sekonder metabolit çeşitliliğini meydana getirir (Şekil 2.11). *Streptomyces griseus* sporlarının depo maddesi olarak disakkarit trehaloz bulundurduğu ve yüksek derecede enzim aktivitesi içerdiği saptanmıştır (Korcan 1995).



Şekil 2.10. Havasal miselyum ve üzerinde spor oluşumu (Dyson 2000).



Şekil 2.11. Spor oluşturmuş bir hif ve ortama dağılan sporları (Streptomyces:hyphal magic).

Bu morfolojik farklılıklara paralel olarak, fizyolojik farklılık süreci oluşur (Şekil 2.12). Pigmentasyon ve sekonder metabolizma bu fizyolojik farklılık esnasında meydana gelir (İnt. Kay. 6).



Şekil 2.12. Streptomyces kolonisinin enine kesiti. Morfolojik ve fizyolojik değişimin gözlenmesi (Streptomyces: hyphal magic).

*S.coelicolor*'un havasal misel üzerinde spor oluşturmayan (bald) mutantları ile yapılan bir başka çalışmada havasal misel oluşturamayan mutantlarda pigmentasyonun olmadığı buna bağlı olarak actinorhodin, undecylprodigiosin, kalsiyum bağımlı antibiyotik (CDP) ve methylenomycin sentezinin bozulduğu gözlenmiştir (Şekil 2.13), (Thompson et al. 98-99).



Şekil 2.13. Mavi renkli antibiyotik actinorhodini sentezleyen *S. coelicolor*'un mutanti renksizdir (İnt. kyn. 5).

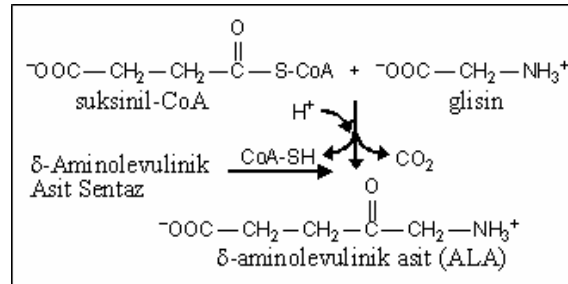


## 2.3. ALAD Enzimi

### 2.3.1. ALAD'ın metabolizmadaki rolü

Canlı hücre içinde klorofillerin ve demir porfirinlerin nasıl sentez edildiği kesin olarak gösterilememiştir. Fakat yapılan pek çok araştırmadan elde edilen kanıya göre bir aminoasit olan glisin ile Krebs çemberinin ara ürünlerinden olan suksinil CoA birleşerek  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoasit verir. Sonra bir kofaktör olan piridoksal fosfat,  $\delta$ -aminolevulinik asit sentetaz enzimi ve ışık ile  $\delta$ -aminolevulinik asit meydana gelir (Gibson et al. 1958).

Diğer bir ismi de porfobilinojen sentaz (PBGS) olan ALAD (EC 4.2.1.24), monopirol porfobilinojeni (PBG) oluşturmak için 2 molekül aminolevulinik asitin (ALA) asimetrik bir kondensasyonunu gerçekleştiren tüm modifiye tetrapirollerin biyosentezinde ilk adımı katalize eder (Şekil 2.14), (Jordan 1989).

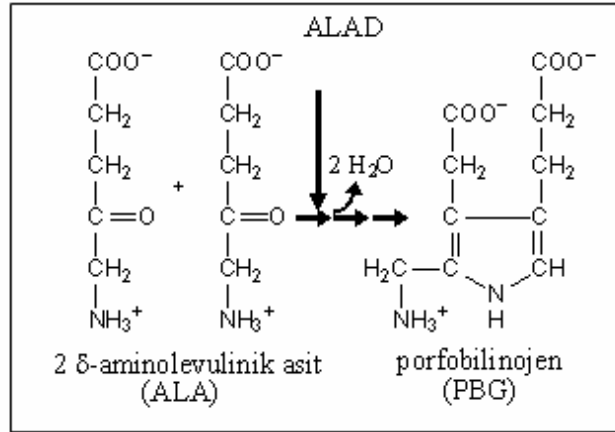


Şekil 2.14. ALA'nın sentezi

ALAD'lar, sığır karaciğeri (Gibson et al. 1958), insan eritrositleri (Anderson et al. 1979), *Rhodospseudomonas capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* (Nandi and Shemin 1968-1973), *Escherichia coli* (Spencer and Jordan 1993), (Milchel and Jaffe 1993), *Spinacia oleracea* (Liedgens 1983, Schneider and Liedgens 1981) *Pisum sativum* ve *Saccharomyces cerevisiae* (Jordan 1989), gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir.

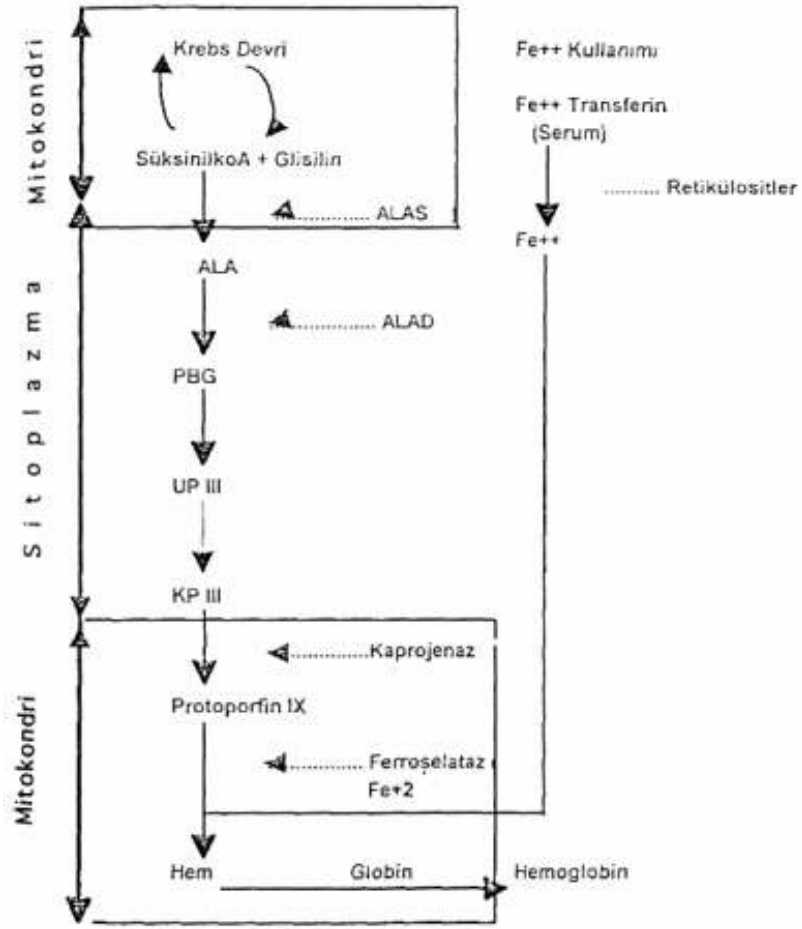
Tüm ALAD'ların temel katalitik özellikleri birbirine benzer olmasına rağmen enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve tiol hassaslığı ile farklı organizmalardan saflaştırılmış enzimler arasında farklılıklar gözlenmiştir (Jordan 1989).

Porfobilinojen tüm porfirinlerin ön maddesidir. Hem bitkilerin fotosentez yapıcı pigmenti olan klorofil ve hem de hayvanlarda hemoglobinin bir demir protoporfirini olan “heme” canlı hücreler içinde ortak bir yol aracılığı ile sentez edilmektedir Şekil (2.15). İnsektisidler ve ağır metaller gibi birçok bileşik ALAD'ı inhibe ederek porfobilinojenin dolayısıyla hemoglobinin ve diğer hemoproteinlerin oluşumunu engellemektedir (Şekil 2.16). Tetrapirrol yolunun bu son ürünleri, elektron transportundan fotosenteze kadar metabolizmanın birçok noktasında karmaşık şekilde yer alır .



Şekil 2.15. ALA'dan porfobilinojen oluşumu.

40 yılı aşkın çalışmalar tetrapirrol türevli bileşiklerin sentezine neden olan biyokimyasal olayların karakterizasyonu ile sonuçlanmıştır. Bugün reaksiyon mekanizması ve biyosentetik vasıtaların bilinmeyen çok az aşamaları kalmıştır (Jordan 1989).



Şekil 2.16. Hem biyosentezinde ALAD'ın yeri (Çiğerci 2005).

### 2.3.2. ALAD'ların sınıflandırılmaları

Değişik kaynaklardan elde edilen bu enzim moleküler ağırlığı, optimum pH'sı, metal gereksinimi ve EDTA'ya olan hassasiyetleri bakımından iki sınıfta gruplandırılmıştır (Cheh and Neilands 1976).

ALAD'ların I. Sınıfı, memeli ve kuşlardakini içeren sınıftır ve moleküler ağırlığı 260.000–285.000 kDa arasında olup, sekiz benzer alt birimden oluşmuştur (Gibbs et al. 1985). Bu sınıf enzimin optimum pH'sı, 6.3–7.1 arasındadır.  $K_m$  değeri de ALA için 0.1–0.4 mmol arasındadır. Maksimal aktivite için sülfidril bileşiklerine (SH) ve  $Zn^{+2}$ 'ye ihtiyaç göstermektedir (Cheh and Neilands 1976, Gibbs et al. 1985).

Memeli ALAD aktivitesinin hem *in vitro* hem de *in vivo*'da, kurşun tarafından çeşitli dokularda (kan, karaciğer, böbrek, beyin ve kemik iliği) inhibe edildiği gösterilmiştir (Doyle and Schimke 1969, Buchet 1976, Granick et al. 1973, Silbelgerd 1982).

Farklı hayvan türlerinden saflaştırılan enzimin, benzer fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra benzer immünolojik özgüllüğünün de olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bu sonuçlardan, memeli enziminin evrimsel süreç içinde yüksek oranda korunduğu anlaşılmaktadır (Chang 1984, Sassa 1982).

II. sınıf ALAD'lar ise temel olarak bakteri ve mayalarda bulunan tiptir. Bakteriyel enzimin optimum pH'sı 8–8.5 (Jordan 1989), arasında olup, maksimum aktivite için  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $K^{+2}$  gibi katyonlara ihtiyaç göstermektedir (Nandi and Shemin 1973, Cheh and Neilands 1976, Shemin 1972, Van 1971).  $Zn^{+2}$  ile aktivasyon göstermemektedir. *Rhodopseudomonas capsulata*'dan elde edilen enzim diğer bakteriyel ALAD'lara benzer olmasına rağmen aktivasyon için metalik katyonlara ihtiyaç duymazlar ve EDTA tarafından inhibe edilmezler (Nandi and Shemin 1973). Mayalardan izole edilen enzim, çinko metalo enzimine benzerlik gösterir, EDTA'ya duyarlıdır ve optimum pH aralığı 9.5–9.7'dir. Bu pH memelilerde belirtilenden biraz daha yüksektir (Clara De Barreiro 1967). Ispanak ve diğer bitkilerdeki enzim ise  $Mg^{+2}$  ile aktive olup, EDTA'ya duyarlıdır. Daha az yüksek optimum pH'ya ihtiyaç duyarlar (Leidgens 1983).

### **2.3.3. ALAD'ın kurşun ile etkileşimi ve kimyasal kirlilik indikatörü olarak önemi**

$\delta$ -Aminolevulinik asit dehidratazın kurşun ile seçici inhibisyonu, kimyasal kirliliğin önemli bir biyolojik belirleyicisidir. Kurşuna ve çeşitli kimyasallara maruz kalmada ALAD aktivitesinin belirlenmesi bu enzimin kullanışlı bir biomarker olabileceğini göstermiştir.

Hodson (1976) akarsudaki 13 µg/lit kurşun nitratin gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 4 haftalık bir uygulamadan sonra kırmızı kan hücresi delta-ALAD aktivitesini anlamlı bir derecede azalttığını bulmuştur (Şekil 2.15).

Kutlu ve Sümer (1998) *Gammarus pulex* için kurşun asetatın 96 saatlik uygulaması sonucunda LC<sub>50</sub> değerini 0.394 mg/lit olarak bulmuşlardır. Bu değer uygulanarak ALAD inhibisyonunun zamana bağlı olarak arttığını ve paralel olarak organizmada kurşun miktarının arttığını tespit etmişlerdir. *Gammarus pulex* ALAD'ının optimum aktivitesi pH 8 civarında, sıcaklık 37°C olarak bulmuş ve enzimin ısıya duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Kinetik analizler sonucu  $K_m$  değerini 0.043–0.058 mmol ALA ve  $V_{max}$  değerini 17.6 nmol PBG/saat/mg protein olarak bulmuşlardır.

Yetişkin kara kurbağalarına (*Bufo arenarum*) vücut ağırlığına bağlı olarak 10, 25, 50 ve 100 mg/kg kurşun asetat enjekte edilmiş ve 7 gün sonra kan parametrelerine bakılmıştır. Kanda kurşununun artışına bağlı olarak ALAD aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Arrieta et al. 2000).

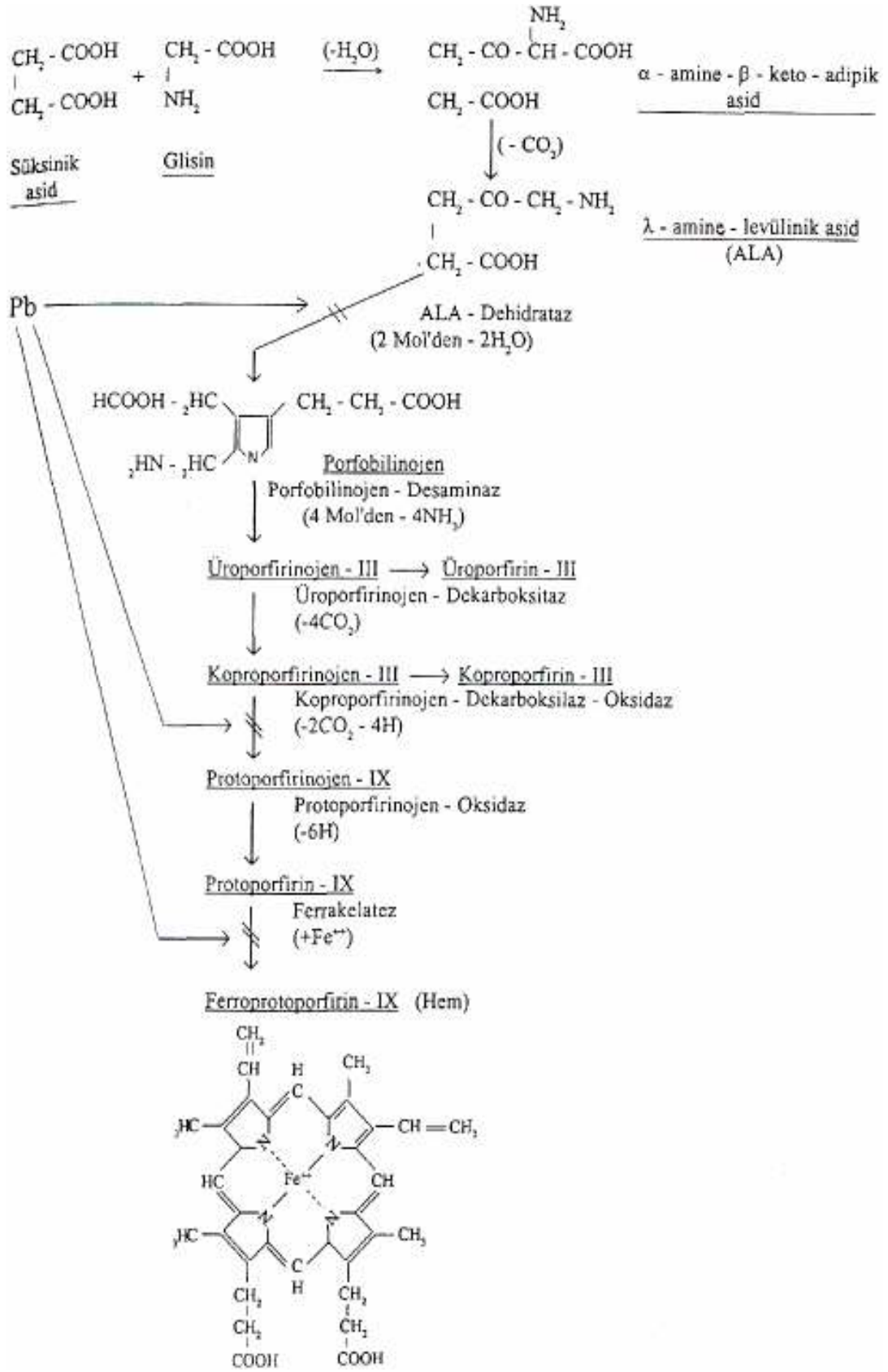
Peixoto ve ark (2004) genç ratların yetişkinlere göre ağır metallere karşı daha duyarlı olduklarını göstermişlerdir. 1–6, 8–13, 17–21 günlük ratların beyin, böbrek ve karaciğer ALAD aktiviteleri LC<sub>50</sub> değerleri, CdCl<sub>2</sub> için 0–200 µM, HgCl<sub>2</sub> için 0–600 µM, Pb asetat için 0–50 µM arasındaki metal ları kullanarak belirlemişlerdir. Sonuçlar serebral ALAD aktivitesinin Cd<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup>,ye göre kurşun asetata karşı daha duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine hepatik dokudaki ALAD en çok HgCl<sub>2</sub>'ye karşı koymuştur. Kurşun ve kadmiyum civaya göre renal enzim aktivitesini daha da düşürmüştür.

*Pseudomonas putida* ve *P. aeruginosa* türleriyle yapılan bir çalışmada kurşununun artışına paralel olarak ALAD aktivitesinde bir inhibisyonun olduğu bulunmuştur. Yine bu çalışma bu türlerdeki ALAD aktivitesinin, Pb<sup>+2</sup>,ye maruz kalmanın bir biyomarkörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Ogunseitan et al. 2000)

Jain ve Gadre (2004) yeşillenme esnasında mısır yapraklarına verilen *in vivo* sodyum arsenatın ALAD aktivitesi üzerinde inhibe edici etki olduğunu göstermişlerdir.

Ağır metallerin kırmızıturp yapraklarında ALAD aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan elementler içerisinde  $Cd^{+2}$ 'nin bu bitki için en yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. ALAD aktivitesindeki %50 inhibisyon için *in vitro* değerler  $Cd^{+2}$  0.39 mM,  $Zn^{+2}$  0.39 mM,  $Hg^{+2}$  2.29 mM,  $Pb^{+2}$  1.38 olarak bulunmuştur. *In vivo*da  $Cd^{+2}$  %40,  $Zn^{+2}$  %26,  $Hg^{+2}$  %34,  $Pb^{+2}$  %15 oranında ALAD'ı inhibe etmiştir (Morsch et al. 2002).

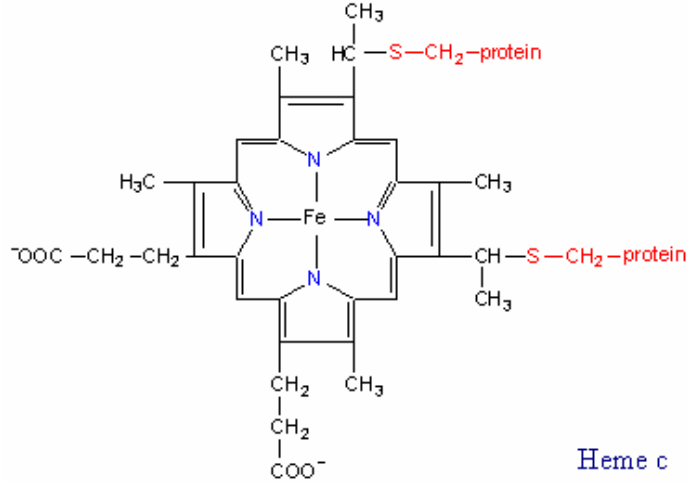
*In vitro* çalışmalar, hemoglobin sentezi yolundaki bazı enzimlerin kurşunla inhibe olduğunu göstermiştir (Şekil 2.5) (Rossi 1990).



Şekil 2.17. Kurşunun bloke ettiği heme sentez kademeleri (Rossi 1990).

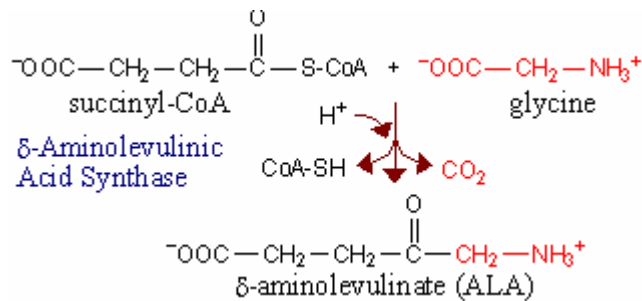
### 2.3.4. Heme Sentez Basamakları

Heme sitogromların, myoglobin ve hemoglobinin prostetik grubudur. Sitogrom c deki heme (Şekil.2.18) da gösterilmiştir. Heme asimetrik bir moleküldür.



Şekil 2.18. Heme c yapısı.

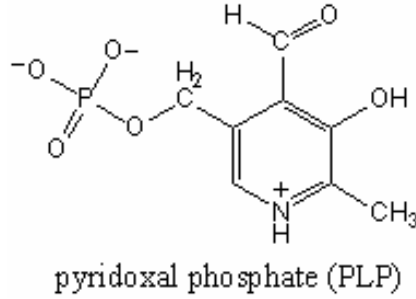
Heme sentezi Glisin ve suksinil CoA'nın kondensasyonu ile başlar bu arada dekarboksilasyon olur ve ALA meydana gelir (Şekil 2.19).  $\delta$ -Aminolevulinat sentetaz (ALA Sentetaz) enziminin miktarı gen transkripsiyonu ile kontrol edilir. Heme feedback inhibitörüdür ve birçok hücrede ALA sentetaz geninin transkripsiyonunu baskılar.



Şekil 2.19. Suksinil CoA'nın kondensasyonu ile başlayan dekarboksilasyon ile ALA meydana gelir.

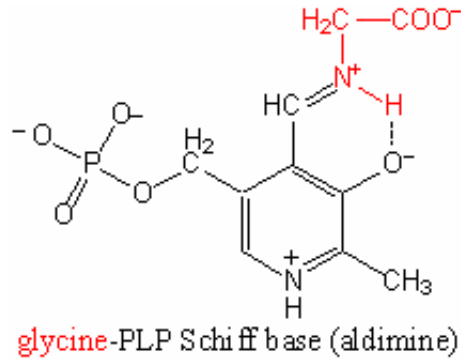


$\delta$ -Aminolevulinat sentezinde piridoksal fosfat (PLP) koenzim olarak görev yapar (Şekil 2.20). Enzim evrimsel olarak transamilaz ile ilişkilidir.



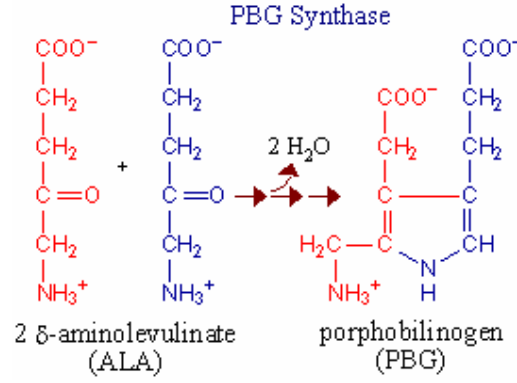
Şekil.2.20. Piridoksal fosfat (PLP) nin yapısı

Suksinil CoA ile kondensasyon gerçekleşirken glisinin amino grupları PLA'nın aldehiti ile schiff base ile bağlanır (Şekil.2.21).

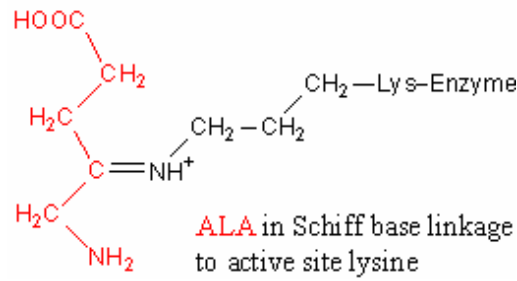


Şekil.2.21. Glisinin amino gruplarının PLA'nın aldehiti ile schiff base ile bağlanması.

Porfobilinojen sentaz (PBG sentaz, ALA dehidretaz) iki molekül ALA'nın kondensasyonunu katalizler ve porfobilinojen (PBG) pirol halkası oluşur (Şekil 2.22). Bu aşamada iki lizin residuelli aktif bölgedeki katyonlara bağlanır (Şekil.2.23). Memelilerde bu katyon Zn'dur.



Şekil 2.22. PBG sentaz, ALA dehidretazlar ile ALA'dan porfobilinojen (PBG) pirol halkası oluşumu.



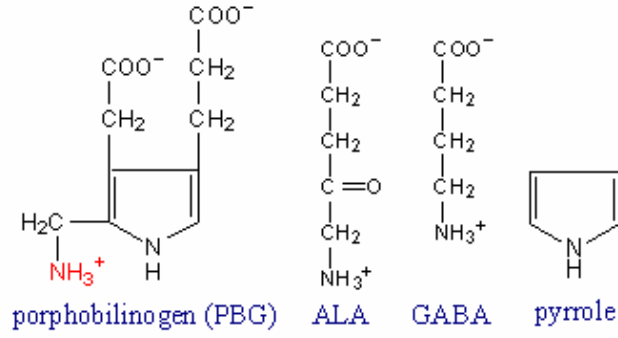
Şekil 2.23. ALA'ya iki lizin residueli aktif bölgedeki katyonların bağlanması.

Her bir ALA substratı aktif bölgeden bağlanırken, bunların keto grupları iki lizin residuelinin birinin yan zincir amino gruplarına ulaşır ve schiff base oluşur. ALA amino grupları ile koordine olmuş metal iyonları tarafından C-C ve C-N kondensasyon reaksiyonu ile schiff base bağları ileler.

Memelilerde porfobilinojen sentaz homo-oktomerik olup Zn için bağlanma bölgeleri vardır. Bu bölgeler aynı zamanda  $Pb^{++}$  bağlayabilen sistein ligantları içerir.

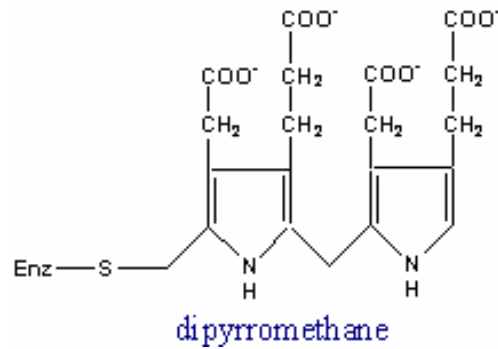
Porfobilinojen sentazın Pb ile inhibisyonu sonucunda kandaki ALA miktarı yükselir. Aynı zamanda Pb zehirlenmesi bazı nörolojik etkilerde sebep olur ve ALA beyin için toksiktir. Bunun nedeni ALA'nın nörotransmitter Gama amino butirik asit'e (GABA) benzer yapıda olmasıdır (Şekil 2.24). Bunun yanı

sıra ALA otoksidasyonunda oksijen radikalleri meydana gelir. PBG pirol halkasında içine olan ilk ortadaki ara yoldur.



Şekil 2.24. Porfobilinojen, ALA, GABA ve pirol yapıları.

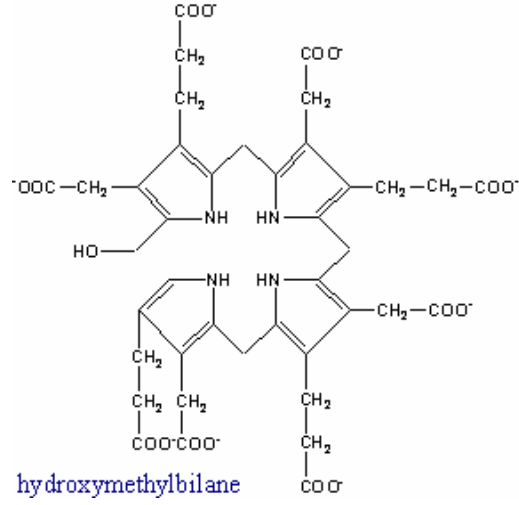
Porfirin halkası dört molekül PBG'nin kondensasyonu ile şekillenir. Pofobilinojen deaminaz PBG kondensasyonu katalizler. Amino gruplarının eliminasyonu ile her bir basamak başlar. Porfobilinojen deaminaz 1 dipirometan prostatik grubuna sahiptir ve sistin S den geçerek aktif bölge ile bağlantılıdır (Şekil 2.25). Enzim, prostatik gruba iki molekül PBG'nin kondensasyonunu katalizler.



Şekil 2.25. Dipirometan acık yapısı.

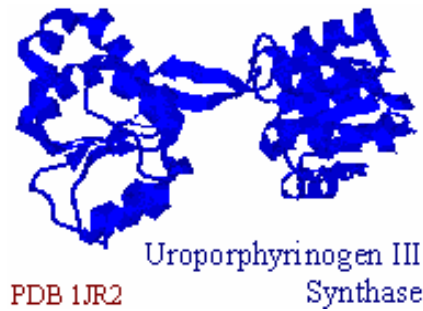
Porfobilinojen deaminaz üç bölge ile organizedir. Esnek olduğu tahmin edilen ara bölge aktif bölge yarığında poliprolün oluşumunu sağlayabilir.

Dipirometandaki bağların hidrolizi ile serbest hidroksimetilbilane meydana gelir (Şekil 2.26).

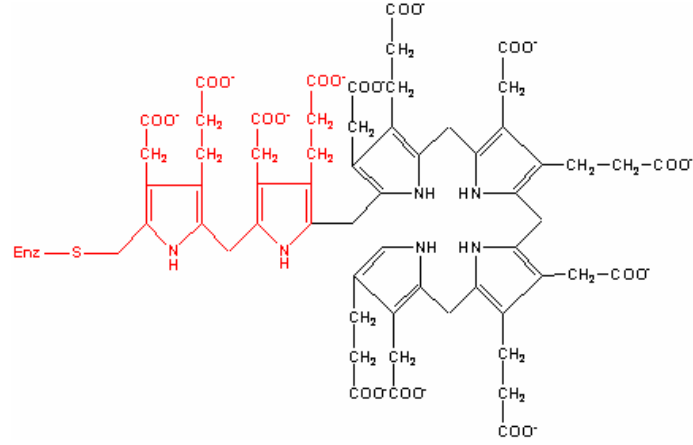


Şekil 2.26. Hidroksimetilbilane genel yapısı.

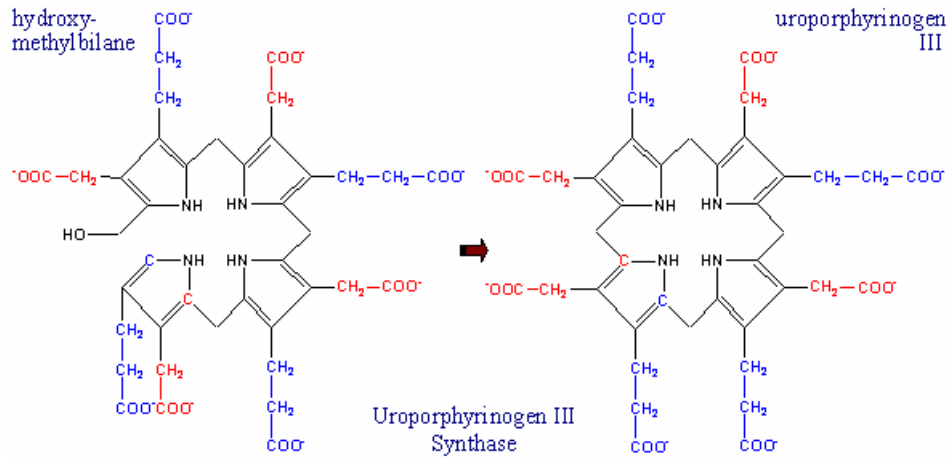
Üroporfobilinojen III sentaz (Şekil 2.27) lineer tetrapirrol hidroksimetilbilane halkasını kapatır (Şekil 2.28, Şekil 2.29) ve asimetrik tetrapirrol oluşumunda pirrol halkasının bir kolu olan makrosiklik üroporfobilinojen III'ü meydana getirir (Şekil 2.30). Üroporfobilinojen III vitamin B12, klorofil ve heme'in öncül maddesidir.



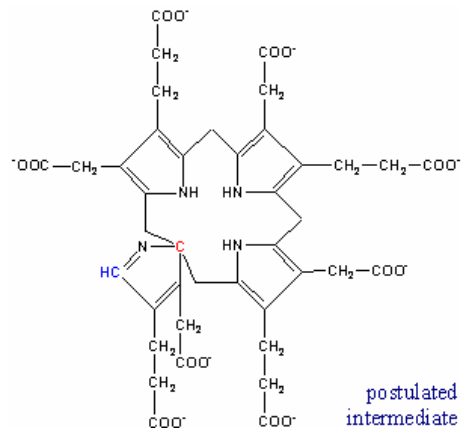
Şekil 2.27. Üroporfirinojen sentaz 3 ün genel yapısı.



Şekil 2.28. Üroporfobilinojen III sentetazın halkayı kapatması.



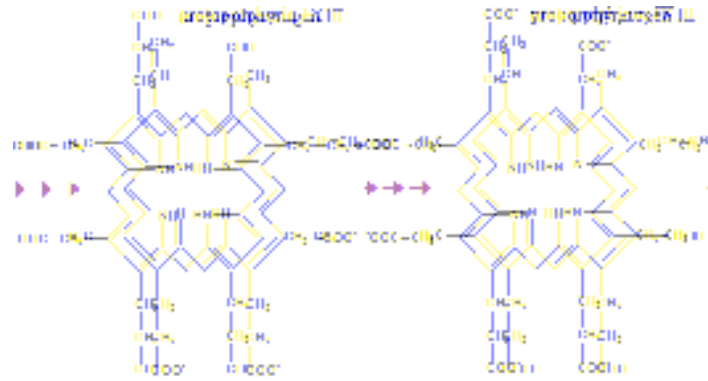
Şekil 2.29. Hidroksimetilbilaneyinin Üroporfirinojen 3 sentez ile makrosiklik üroporfobilinojen III'e dönüştürülmesi.



Şekil 2.30. Üroporfirinojen 3

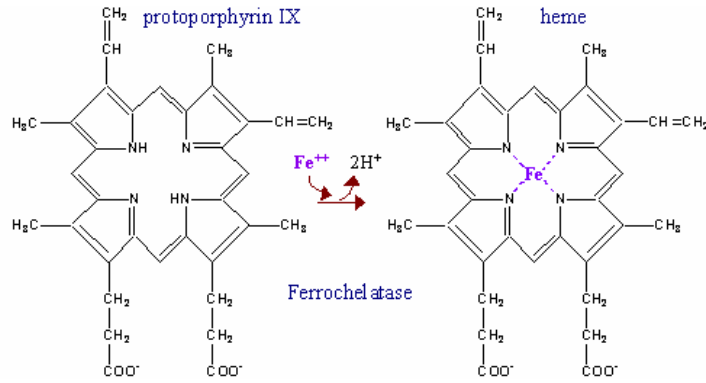
Üroporfobilinojen III'ün protoporfirin IX'a dönüşümü birkaç adımda olur (Şekil 2.31). Bunlar;

- 1- 4- asetil yan zincirlerinin dekarboksilasyonu ile metil grupları oluşur.
- 2- 4- propiyonil yan zincirlerinin ikisinde oksidatif dekarboksilasyonu ile vinil grupları oluşur.
- 3- Daha fazla çift bağ oluşumu için oksidasyon, protoporfirinojen oksidaz tarafından katalizlenir.



Şekil 2.31. Üroporfobilinojen III'ün protoporfirin IX'a dönüşümü

Protoporfirin IX'a  $Fe^{+2}$  eklenerek ferrokatalaz oluşur.  $Fe^{+2}$  enzimdeki korunmuş histidin residuellerine bağlanabilir (Şekil 2.32).



Şekil 2.32. Protoporfirin IX'e  $Fe^{+2}$  enzimdeki korunmuş histidin residuellerine bağlanması.

### 2.3.5. Tetrapireol pigmentler

Tetrapireol pigmentler metabolizmanın önemli katılımcılarından (Jaffe 2003). Tetrapireoller kanı kırmızı, yaprakları yeşil yapan pigmentlerdir. Örneğin, kofaktör F<sub>430</sub> metagenezde, klorofil fotosentezde, heme aerobik e- transportunda ve detoksifikasyonda fonksiyon gösterir (Jaffe 2003). Tüm biyolojik Tetrapireollerin (örneğin porfirin, klorofil, vitamin B<sub>12</sub>) prekürsörleri monopireoldür.

Tetrapireol biosentezi bakteriler, bitkiler ve diğer yüksek organizmalar için gereklidir ve hayvanlar aleminde PBGS'lerin kurşun ile inhibisyonu görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar insanlarda, hayvanlarda ve bakterilerdeki PBGS'lerin kurşun, Mg ve Zn'nin rolünü belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Porfobilinojen sentaz (PBGS) aynı zamanda  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz olarak da bilinir (Jaffe 2003).

Porfobilinojen'in 4 molekülü her bir Tetrapireol çekirdeğini şekiller ve farklı ara yollar izlenerek farklı kofaktörler meydana getirir. Bu özelleşmiş ara yollarda Fe (heme'de), Ni (F<sub>430</sub>'da), Co (B<sub>12</sub>'de) ve Mg (klorofilde) gibi spesifik metal iyonları Tetrapireollerin merkezine girer ve aynı zamanda kimyasal modifikasyonlarda da gerçekleşir.

ALA substrat molekülü asetik asit ve propanoik asit yan zincirleri içermelerine göre A ve P, ALA bölgelerine ayrılır. PBGS'deki metal iyonları birçok PBGS'de bulunan allosterik olan aktif bölgelere yerleşirler. Aktif bölge metal iyonları çinko, magnezyum ve potasyum arasında değişebilir (Jaffe 2003).

PBGS enzimleri aktivite bölgesinde Zn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve potasyum içerdiği bilinen tek enzim ailesidir. Zn<sup>+2</sup> ligasyon geometrisi ya da küresel ligandların ilk koordinasyonu için önemli bir ayırım olmaksızın yumuşak geçiş elementidir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### **Deney materyalinin sağlanması ve laboratuvar ortamında yetiştirilmesi**

*Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520'nin. ATCC, Maryland, USA'den temin edilen spor süspansiyonlarından canlandırılması Hopwood'a (1984) göre yapılmıştır. Malt ektstak broth içerisine 0.5 ml spor süspansiyonu ekilmiş ve 27 °C'de 7 günde koloni üremesi sağlanmıştır (Incubator ES 110). Sporlanma ve pigmentasyon her gün izlenmiş; sporlanmanın 2 gün, pigmentasyonun 3 gün sonunda gerçekleştiği belirlenmiştir.

Fluka (marka) malt ekstrakt broth ve agar (71757). Otoklavda 15 dk ve 121 °C de sterilize edilerek ortam çalışmamızda Streptomycete sporlarının canlanma ve büyüme ortamı olarak kullanılmıştır.

5-Aminolevulinik asit hidroklorit (Fluka 08340). 0.168 gr tartılarak 10 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

L-Glutatyon reduced (Sigma-Aldrich G4251-1G)dan 0.184 gr tartılarak 2 ml distile su içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

0.1 molarlık Fosfat tamponu:  $K_2HPO_4$  (Fluka 60355) 4.8776 gr ve  $KH_2PO_4$  (Fluka 04243) 9.4392 gr alınarak toplam hacim 1 lt'ye tamamlanmış ve pH 6, 8-7.2 ayarlanmıştır.

%10'luk  $HgCl_2$  li TCA çözeltisi TCA (Riel-de Haen 27242) 10 gr ve  $HgCl_2$  (Fluka 83366) 2.715 gr tartılarak toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak elde edilmiştir.

%5 lik TCA çözeltisi; TCA (Riel-de Haen 27242)'dan 5 gr alınarak 100 ml distile su içerisinde çözümlenerek elde edilmiştir.



Ehrlich-Ayıracı: DAB (Fluka 39080) 1 gr, asetik asit (Carlo Erba 302011) 30 ml, %70'lik perklorik asit (Riel-de Haen 30755) 16 ml alınmış ve hacim 50 ml'ye asetik asit ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda kurşun nitrat  $[Pb(NO_3)_2]$  çözeltilerinin hazırlanması: 1000  $\mu M$   $[Pb(NO_3)_2]$  0.3312 gr alınmış ve distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. Aynı yöntem ile 750  $\mu M$ , 500  $\mu M$ , 250  $\mu M$ , 100  $\mu M$  ve 50  $\mu M$  lik solüsyonlar hazırlanmıştır.

Farklı ağır metal konsantrasyonları  $Fe^{+3}$  (Sigma F-7134) 1000  $\mu M$  0.0405 gr,  $Mn^{+2}$  (Fluka 63555) 0.042 gr,  $Mg^{+2}$  (Fluka63145) 0.061 gr,  $Ni^{+2}$  (Riel-de Haen 13621) 0.0725 gr,  $Zn^{+2}$  (Riel-de Haen 14455) 0.0717 gr ve  $Co^{+2}$  (Aldrich 20, 218-5) 0.0598 gr tartılarak ayrı kablarda toplam hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Farklı pH konsantrasyonlarının hazırlanması:

1) Sitrat fosfat tamponu (0.1 M).

A) 2.88 gr sitrik asit ( Rie-del Haen 27102) tartılarak distile su ile 150 ml'ye tamamlanmıştır.

B) 8.047 gr dibazik sodyum fosfat (Fluka 60355) tartılarak distile su ile 150 ml'ye tamamlanmıştır.

	A	B	Distile su
pH 3	19.90 ml	5.10 ml	25 ml
pH 4	15.14 ml	9.65 ml	25 ml
pH 5	12.15 ml	12.85 ml	25 ml
pH 6	8.95 ml	16.05 ml	25 ml
pH 7	3.25 ml	21.80 ml	25 ml

2) Tris-HCL Tamponu (0.1 M).

A) 2.42 gr Trisma Base (SIGMA T-6066) tartılmış distile su ile toplam hacim 100 ml ye tamamlanmıştır.

B) 0.88 ml HCL (SIGMA 7020) alınarak 50 mlye tamamlanmıştır.

	A	B
pH 8	50 ml	5 ml
pH 9	50 ml	26.8 ml

Farklı molaritede substrat konsantrasyonlarının hazırlanması:

**0.1 M ALAD için**

0.168 gr ALA tartılarak 10 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

- 1) 5  $\mu$ l  $0.05 \times 10^{-2}$
- 2) 10  $\mu$ l  $0.1 \times 10^{-2}$
- 3) 50  $\mu$ l  $0.5 \times 10^{-2}$
- 4) 150  $\mu$ l  $1.5 \times 10^{-2}$
- 5) 300  $\mu$ l  $3 \times 10^{-2}$

**0.5 M ALA için**

0.084 gr ALA tartılarak 1 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

- 1) 100  $\mu$ l  $5 \times 10^{-2}$
- 2) 200  $\mu$ l  $10 \times 10^{-2}$
- 3) 300  $\mu$ l  $15 \times 10^{-2}$
- 4) 350  $\mu$ l  $17.5 \times 10^{-2}$

Amonyum sülfat ile çökeltme aşamasında amonyum sülfat (SIGMA ultra A2939) kullanılmıştır.

Jel geçirgenlik kromatografisi için sefakril 200 (S 200) jel ortamı kullanılmıştır.

Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler.

**A)** Monomer (akrilamid/bis SIGMA A 3449) çözeltisi (%30T, %2.7 C<sub>bis</sub>).

**B)** Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, pH 8.8).

**C)** %10 SDS (SIGMA L-4390).

**D)** %10 amonyum persülfat (A 3678).

**E)** Ayırma jeli yüzey çözeltisi (0.375 M Tris, 0.1 SDS, pH 8.8).

**F)** Örnek uygulama tamponu ( 0.125 M Tris, %0.1 SDS, pH 8.8)

**G)** Tank tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 8.3.

**H)** Akrilamid (Sigma A3553).

### ***%7.5'lik ayırma jeli***

Monomer (A)	7.5 ml
Tampon (B)	7.5 ml
%10 SDS(D)	0.3 ml
H <sub>2</sub> O	13.5 ml
TEMED (SIGMA T 9281)	15 µl
APS (E)	300 µl

Proteinlerin boyanması için gerekli kimyasallar:

***Fiksasyon (Sabitleme):*** Fiksasyon çözeltisi etanol (Tereos-Sda Brabant 11 rue Pasteur 02390 Origny-Sainte-Benoite/France) (%50), glasiyal asetik asit (%12) ve 0.5 ml formaldehit (Sigma 31, 311-4) (%37) ile hazırlanmıştır.

***Yıkama:*** Yıkama çözeltisi %50'lik etil alkoldür.

***Ön-uygulama:*** Çözeltisi, sodyum tiyosülfat (Sigma S1648), 5H<sub>2</sub>O (0.2 g/lt)'dir.

***Durulama:*** Distile sudur.

***Sabitleme:*** Sabitleme çözeltisi AgNO<sub>3</sub> (2 g/lt) ve 0.75 ml formaldehit (%37) dir.

***Geliştirme:*** Geliştirme çözeltisi, sodyum karbonat (Riedel-deHaen 13418) (60 g/lt), 0.5 ml formaldehit (%37) ve sodyum tiyosülfat.5H<sub>2</sub>O (4 mg/lt) içerir.

***Durdurma:*** Durdurma çözeltisi metanol (%50) ve glasiyal asetik asit (%12) ile hazırlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. ALAD aktivitesinin tayini**

#### **3.2.1.1. Homojenatin hazırlanması**

Erlen içerisindeki 100 ml malt ekstrakt broth içinde oluşan hif süzülerek besi yerinden ayrılmış ve yaş ağırlığı tartılmıştır.

Daha sonra 0.1 M'lik K-fosfat tamponu (pH 7) ile 3 kez yıkanmıştır. Yaş ağırlık gr başına 1.5 ml 0.1 M'lik K-fosfat tamponu ile buz içerisinde porselen havanda ezilerek homojenize edilmiş ve 3 dk sonikatörde homojenizasyonu sağlanmıştır (Bandelin sonopuls 2070).

Homojenizasyon işleminden sonra soğutmalı santrifuj makinesinde +4 °C'de 20 dk 12500 rpm'de santrifüj edilmiştir (Bench-Top Centrifuge NF 800 R). ALAD aktivitesi için enzim kaynağı olarak süpernatantlar kullanılmıştır.

Bir enzim birimi yukarıda belirtilen koşullar altında bir saatte bir  $\mu\text{mol}$  PBG oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgül aktivitesi ise  $\mu\text{mol PBG} / \text{saat} / \text{mg/ml}$  protein olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.1.2. Protein miktar tayinleri**

Protein miktarının belirlenmesi için Bradford (1976) metodu kullanılmıştır. Her bir tüpe 2,5 ml protein assay solüsyonu (1ml protein dye reagent, 4 ml distile su) eklenmiştir. Kör tüpüne 50  $\mu\text{l}$  sodyum klorid solüsyonu eklenmiştir. Standart için 50  $\mu\text{l}$  protein standart solüsyonu, test için de 50  $\mu\text{l}$  bakteri süspansiyonu eklenmiştir. 2 dakika sonunda protein miktarını (mg/ml) belirlemek için (Jenway 6305) spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Bradford (1976)'a göre değerlendirilmiştir.

### 3.2.1.3. Aktivite tayini

Reaksiyon karışımında 100 µl 0.1 M fosfat tamponu (pH 7), 3.3 mM ALA (300 µl), süpernatana (300 µl) ve 0.3 M redükte glutatyon (50 µl) bulunmaktadır. Karışımın bulunduğu tüpler proteinlerin oksitlenmesinin önlenmesi amacı ile azot gazı ile muamele edildikten sonra, 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 0.75ml 0.1M HgCl<sub>2</sub>'lü %10'luk TCA (Trikloro asetik asit) ile durdurulduktan sonra, 8000 g'de Santrifuj edilerek 0.5 ml süpernatana 1 ml %5 lik TCA ve 1.5 ml modifiye Ehrlich ayıracı (1gr DAB {4-Dimethylamino benzaldehid}, 30 ml asetik asit, 16 ml %70 perklorik asit, hacim 50 ml'ye asetik asit ile tamamlanmıştır.) ilave edilerek 5 dak sonra 555 nm de Jenway 6305 spektrofotometrede absorbanslar okunmuştur (Kutlu ve Sümer 1998).

### 3.2.2. *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının biyokimyasal özelliklerinin saptanması

#### 3.2.2.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi

Farklı kurşun konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini ölçmek için içinde 50 µl 0.1 M fosfat tamponu (pH 7), 3.3 mM ALA (300 µl), süpernatana (300 µl), 0.3 M redükte glutatyon (50 µl) ve 50 µl farklı Pb (0, 50, 100, 250, 500 µM) konsantrasyonları bulunan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Tüm karışımın 37 °C'de 1 saat inkübasyonundan sonra, ALAD aktivitesi belirlenmiştir.

#### 3.2.2.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için reaksiyon karışımında 100 µl 0.1 M fosfat tamponu (pH 7) içinde 3.3 mM ALA (300 µl), süpernatana (300 µl) ve 0.3 M redükte glutatyon (50 µl) bulunmaktadır. Karışımlar başlangıç sıcaklık derecesi 20 °C olarak belirlenip 20 °C, 30 °C, 37 °C,

45 °C, ve 60 °C sıcaklıklara 1 saat bırakıldıktan sonra ALAD aktivitesi belirlenmiştir.

### 3.2.2.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımına 3.3 mM ALA (300 µl), süpernatant (300 µl), 0.3 M redükte glutatyon (50 µl), 100 µl (0.1 M ) Tris-HCL ve sitrat-fosfat tamponu kullanılarak pH ları 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak elde edilen tamponlar uygulanarak bu pH larda 1 saat tutulan protein ekstresinden ALAD aktivitesi belirlenmiştir.

### 3.2.2.4. ALAD enzimin aktivitesinin kinetik analizi

*Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis-Menten grafiği ile Line Weaver-Burke grafiğinde gösterilmiştir.

### 3.2.2.5. Farklı ağır metallerin ALAD üzerine etkisi

Farklı ağır metallerin ALAD üzerine etkisini ölçmek için  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{+3}$  ün 1000 µM konsantrasyonları kullanılmıştır. ALAD aktivitesi tayininde deney tüplerine 1000 µM yoğunluktaki ekstraksiyonları hazırlanmış farklı ağır metal konsantrasyonlarından sırasıyla 50 µl  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{+3}$ , ağır metal bulunmayan kontrol grubuna 200 µl fosfat tamponu eklenmiş ve herbirine 150 µl protein örneği ve 50 µl R-Glutatyon ve 300 µl ALA eklenerek azot gazına tabi tutulmuş daha sonra 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra tüm örneklerin üzerine reaksiyon durdurucu  $HgCl_2$  içeren %10'luk TCA (trikloroasetik asit)'den 750 ml eklenerek 10 dakika 8000 g'de santrifuj edilmiş ve ağır metallerin ALAD üzerindeki etkisini görmek için 555 nm dalga boyunda (Jenway 6305) spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır.

### **3.2.3. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması**

#### **3.2.3.1. Ham ekstrenin hazırlanması**

Erlen içerisindeki 100 ml malt ekstrakt broth içinde oluşan hif süzülerek besi yerinden ayrılmış ve yaş ağırlığı tartılmıştır.

Daha sonra 0.1 M'lik fosfat tamponu (pH 7) ile 3 kez yıkanmıştır. Yaş ağırlık gr başına 1.5 ml 0.1 M'lik fosfat tamponu ile buz içerisindeki porselen havanda ezilerek homojenize edilmiş ve 3 dk sonikatörde homojenizasyonu sağlanmıştır.

Homojenizasyondan sonra soğutmalı santrifuj makinesinde +4 °C'de 20 dk 12500 rpm'de santrifuj edilmiştir. ALAD aktivitesi için enzim kaynağı olarak süpernatantlar kullanılmıştır.

#### **3.2.3.2. Amonyum sülfat ile çöktürme**

Tuz ile çöktürme proteinlerin konsantre edilmesi ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin bir araya gelmelerine ve çözültiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözültideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözültide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>] kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla anılır.

ALAD enziminin saflaştırılmasında bu teknik kullanılmıştır. Ham enzim preparasyonu %25 doyum için 2.72 gr katı amonyum sülfat ilave edilmiştir. 60 dk 4 °C de karıştırıldıktan sonra 15.000 g'de 4 °C'de, 10 dk santrifuj edilmiş ve çöken proteinler toplanmıştır. Süpernatant 2.92 gr amonyum sülfatla %50 doyuma getirildikten sonra tekrar 60 dk 4 °C de karıştırılmış 15.000 g'de 4 °C de, 10dk

santrifuj edilmiş ve çöken proteinler toplanmıştır. Aynı purosedür %75 (3.22gr amonyum sülfat) ve %100'lük (3.52gr amonyum sülfat) doyumlar için tekrarlanmıştır. Proteinler 0.1 M K-Fosfat tamponu (pH 7) içerisinde çözdürülmüştür (Konuk 1993).

### **3.2.3.3. Amomyum sülfat ve düşük moleküler ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması**

Proteinlerden amomyum sülfat ve düşük moleküler ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması için diyaliz yöntemi uygulanmıştır. Diyaliz membrana alınan her bir protein fraksiyonu 1 gece 0.1 M K-fosfat tamponunda bekletilmiştir. Membrandan difüze olmayan materyal jel filtrasyonunda kullanılmıştır (Konuk 1993).

### **3.2.3.4. Jel geçirgenlik kromatografisi**

Dekstran esaslı materyalleri kullanarak makro molekülleri molekül büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktadır. İşlem temel olarak, proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde ve protein çözeltilerinin tuz derişimlerinin düşürülmesinde kullanılır. Çalışma prensibi oldukça basittir. Kolon küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli taneciklerin arsından geçerek kolondan hızla ilerlerler; küçük moleküller ise gözenek içerisinde difüzlenir ve molekül küçüldükçe artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar.

Bu çalışmada moleküler ağırlığı ayırım aralığı, 5.000-250.000 Da olan sefakril 200 (S 200) jel ortamı kullanılmıştır. Jel +4 °C de 0.03 M, pH 7 K-fosfat tamponunda 1 gece bekletilerek şişirilmiştir. Yine +4 °C de kolona (1.6X31.5 cm) paketlenmiştir. Kolon akış hızı 10 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Aynı tampon ve akış hızı ile örnek uygulanmış ve fraksiyonlar (3 ml) toplanmıştır (Coleman 1966).



### 3.2.3.5. Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE), polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden aniyonik bir deterjandır. Ayrıca moleküller negatif bir yük de kazandırmaktadır. SDS-PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine imkan vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir. Ayrıca bu tip bir ayrışımın sonuçlarını matematiksel olarak değerlendirerek molekül ağırlığını belirlemek de mümkündür. Bu çalışmada kesikli SDS jel elektroforezi tekniklerinden biri olan Laemmli (1970)'nin tanımladığı yöntem kullanılmıştır.

Karışım jel kasetine dökülerek tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon bittikten sonra, tarak bir taraftan başlayarak ve kuyucuklar bozulmadan yavaşça kaldırılmıştır. Eşit hacimde protein örnek ile örnek uygulama tamponu bir eppendorf tüpünde karıştırılmıştır. Referans olarak kullanılacak standart protein karışımı (Sigma M4038, Wide molecular weight range) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulama tamponunda hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm tüpler 2-10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Jel kaseti içi tank tamponuyla dolu elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Örnekler ve standart protein karışımı (15 ul) jeldeki ceplere yüklenmiştir.

Laemmli'nin SDS- PAGE jel elektroforez tekniği kullanılmıştır (1970). Elektroforez, Apollo instrumentation 73.1010V cihazı ile yapılmıştır. Sistem güç kaynağına bağlanarak proteinler 30 mA da 1 saat yürütülmüştür.

Proteinlerin boyanması Blum ve arkadaşları (1987)'na göre yapılmıştır:

**a) Fiksasyon (Sabitleme):** Fiksasyon çözeltisi metanol (%50), glasiyal asetik asit (%12) ve 0.5 ml formaldehit (%37) ile hazırlanmıştır. Ayrıştırılmış proteinlerin difüzyonunu önlemek, yabancı maddeleri uzaklaştırmak ve boyanan jelde temiz bir zemin hazırlamak için bu aşama oldukça önemlidir. Jeller en az 1 saat veya 1 gece fikse edilmiştir; ancak birkaç gün sabitleme çözeltisinde tutulduğunda da gümüş boyamanın kalitesi olumsuz etkilenmemiştir.

**b) Yıkama:** Yıkama çözeltisi %50'lik etil alkoldür. Ön-uygulama basamağında, sodyum tiyosülfatın asit kararsızlığı nedeniyle asetik asitin uzaklaştırılması için önemlidir. Yıkama işlemi, 3 kez 20'şer dakika uygulanmıştır. 1 mm kalınlıktaki jelin deformasyonunu önlemek için son 20 dakikada %30'luk etanol kullanılabilir. Ayrıca, jeller birkaç saat için %50'lik etanolde bekletilebilir.

**c) Ön-uygulama:** Çözeltisi, sodyum tiyosülfat  $5H_2O$  (0.2 g/lit)'dir. Boyama zeminindeki artışı engellemek için uygulama fazla uzun sürmemiş, tam 1 dakika bekletilmiştir. Jeldeki tiyosülfatın kalıntıları duyarlılığı teşvik eder ve yüksek zıtlık oluşturur.

**d) Durulama:** Jel yüzeyindeki fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak ve  $AgNO_3$  ile yüzey boyamasını sağlamak için 3 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanmıştır.

**e) Sabitleme:** Sabitleme çözeltisi  $AgNO_3$  (2 g/lit) ve 0.75 ml formaldehit (%37) olup; 20 dakika uygulanmıştır. Bu çözeltide var olan formaldehit (HCOH), yüksek hassasiyet ve gümüş boyamada iyi bir zıtlık için zorunludur; fakat boyanan zeminde artış sağlamaz. Gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) sabitlendikten sonra sodyum tiyosülfat ile yapılan ön uygulamadan dolayı bazen jellerde az da olsa sarımtıraklık görülür. Bu durum, hassaslığı veya zeminin boyanmasını engellemez.

**f) Durulama:**  $AgNO_3$  ile sabitlenen jelin yüzeyindeki fazla  $AgNO_3$ 'ü ve sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak için 2 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanmıştır.

**g) Geliştirme:** Geliştirme çözeltisi, sodyum karbonat (60 g/lit), 0.5 ml formaldehit (%37) ve sodyum tiyosülfat  $5H_2O$  (4 mg/lit) içerir. Protein benekleri yaklaşık 10 dakikada gelişir. Bu süreç, sarımtırak zeminin oluşması ile yavaşlamaktadır. Yüksek kalitede gümüş boyamaya neden olur. Geliştirme çözeltisi, jel ile temas

eder etmez silik kahverengi benekler görülür. Bu, çabuk ve etkin sallama ile gerçekleştirilir. Çözeltinin rengi, serbest tiyosülfatın kaybolmasından dolayı birkaç dakika sonra kahverengiye dönüşür. Bu durumda çözelti hemen eski yerini alır. Protein beneklerinin gelişim hızı bantlardaki protein çeşidine bağlıdır. Örneğin, geliştirme çözeltisi uygulandıktan yaklaşık 30 saniye sonra 500 ng protein bandı, yaklaşık iki dakika sonra 50 ng protein bandı ortaya çıkmaktadır.

**h) Yıkama:** Uygulama, 2 kez 2'şer dakika distile su ile gerçekleştirilmiştir. Fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırır ve durdurma çözeltisinde ayrıştırmayı gerçekleştirecek zemin boyanmasını sağlar.

**i) Durdurma:** Durdurma çözeltisi metanol (%50) ve glasiyal asetik asit (%12) ile hazırlanmış 10 dakika uygulanmıştır. Çözeltinin sıcaklığını 25 °C'nin aşağısında tutmak, yoğunluk ve bantların rengindeki değişimleri en aza indirmek için önemlidir.

**j) Yıkama:** Yıkama çözeltisi %50'lik metanoldür ve 10 dakikadan fazla uygulanmıştır. Glasiyal asetik asidi uzaklaştırmak için gereklidir. Bir taraftan gelişimdeki azalmayı yarıda keser, diğer taraftan koyu kahverengi veya siyah renkli protein beneklerinin gelişimini hızlandırır.

Proteinleri boyama aşamalarının tamamı, oda sıcaklığında ve sallayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Boyamanın her aşamasında şeffaf eldivenler kullanılmış ve her bir aşamada değiştirilmiştir. Boyama bitiminde jeller +4 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.3.6. Jellerin Fotoğraflanması

Jeller boyandıktan hemen sonra Uvitec-UV uliminator sisteminde, Fine Pix 19 fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Jeller, çekim sırasında UV-illüminatörün aydınlatma kısmına konulan özel filtre üzerine yerleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

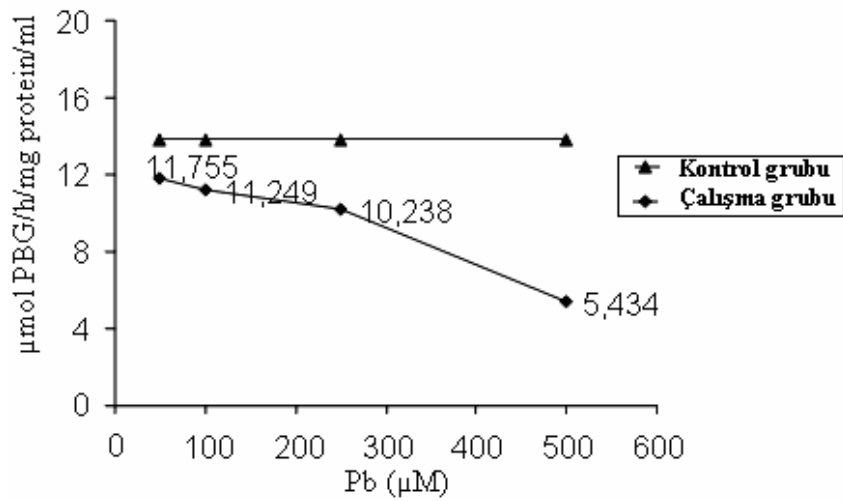
### 4.1. *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının biyokimyasal özelliklerinin saptanması

#### 4.1.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi

Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisini ölçmek için Pb'nin 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları uygulanarak aktiviteleri saptanmıştır (Çizelge 4.1), (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.

Pb konsantrasyonu	PBG	% İnhibisyon	Spesifik Aktivite $\mu\text{mol PBG/h/mg/protein}$
Standart	8.79		13.77
50 $\mu\text{M}$	7.5	15	11.755
100 $\mu\text{M}$	7.177	18	11.249
250 $\mu\text{M}$	6.532	26	10.238
500 $\mu\text{M}$	3.467	61	5.434



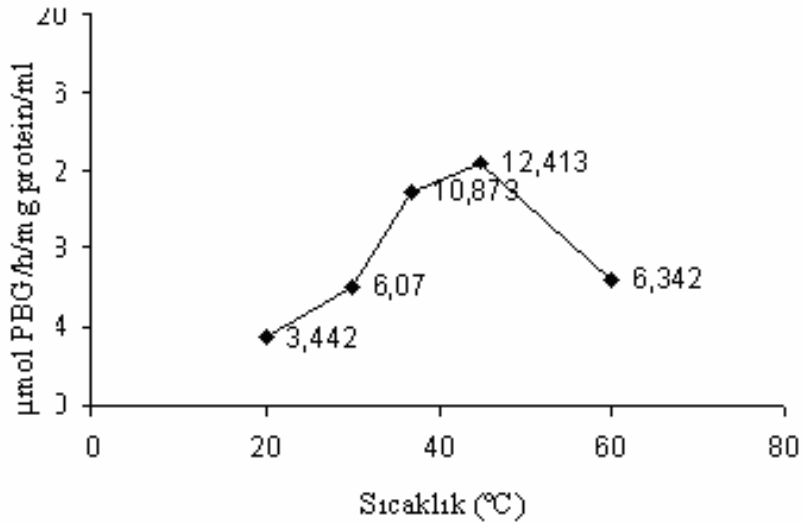
Şekil 4.1. Farklı Pb konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.

#### 4.1.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için sıcaklık derecesi 20 °C olarak belirlenip 20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C ve 60 °C'ler de enzim aktivitesi ölçülmüştür. 20 °C den itibaren enzim aktivitesinin arttığı 45 °C de maksimuma ulaştığı ve bu sıcaklık derecesinden sonra gittikçe düşerek enzim aktivitesinin kaybolduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2), (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.

°C	PBG	Spesifik Aktivite µmol PBG/h/mg/protein
20 °C	3.064	3.442
30 °C	5.403	6.07
37 °C	9.677	10.873
45 °C	11.048	12.413
60 °C	5.645	6.342



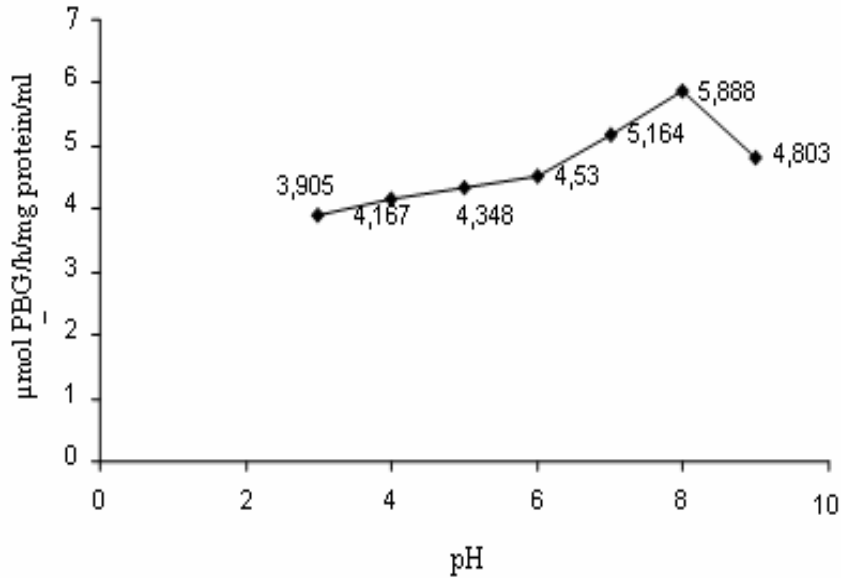
Şekil 4.2.ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.

#### 4.1.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için (0.1 M) Tris-HCL tamponları ve sitrat-fosfat tamponu kullanılarak enzimin optimum pH aralığı belirlenmiştir. pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 arasında taranmıştır. En yüksek aktiviteye pH 8 de rastlanmıştır (Çizelge 4.3), (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

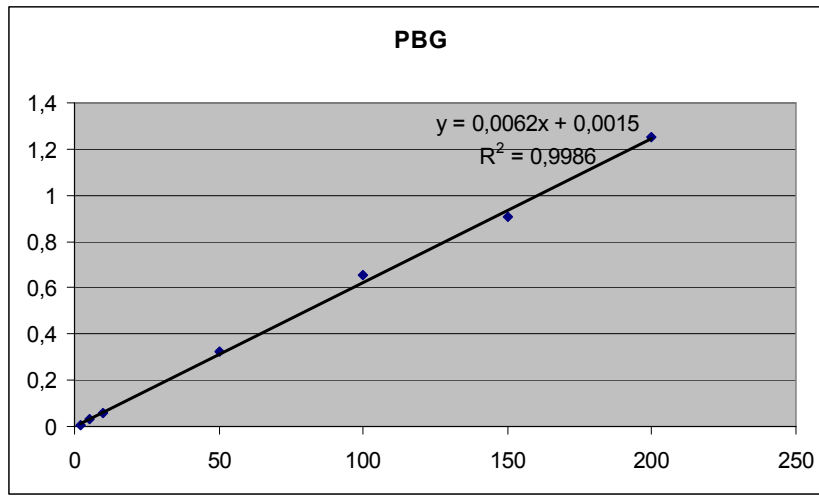
Sitrat-fosfat tamponu	pH	PBG	Spesifik Aktivite $\mu\text{mol PBG/h/mg/protein}$
Sitrat-fosfat tamponu	3	3.467	3.905
	4	3.709	4.167
	5	3.870	4.348
	6	4.032	4.530
	7	4.596	5.164
Tris-HCL	8	5.241	5.888
	9	4.275	4.803



Şekil 4.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

#### 4.1.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi

*Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek amacıyla değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzimin hızı ölçülmüş ve buna bağlı olarak bir kinetik eğri oluşturulmuştur (Şekil.4.4, Çizelge.4.4). Hazırlanan standartta farklı PBG konsantrasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.4. Farklı substrat konsantrasyonlarında enzime ait kinetik eğri.

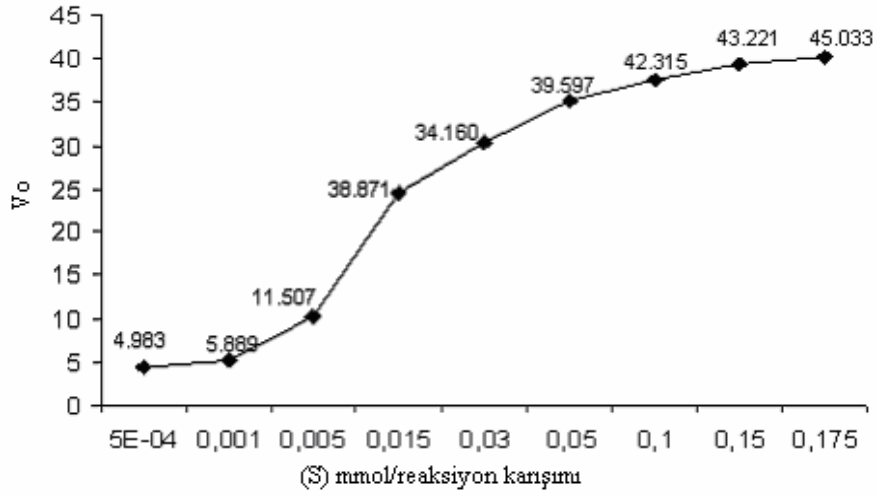
Çizelge 4.4. Farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesinin ölçümü. KE.

	Farklı substrat konsantrasyonları (M)	PBG	Spesifik Aktivite µmol PBG/h/mg/protein
1	$0.05 \times 10^{-2}$	4.435	4.983
2	$0.1 \times 10^{-2}$	5.242	5889
3	$0.5 \times 10^{-2}$	10.242	11.507
4	$1.5 \times 10^{-2}$	34.596	38.871
5	$3 \times 10^{-2}$	30.403	34.160
6	$5 \times 10^{-2}$	35.241	39.597
7	$10 \times 10^{-2}$	37.661	42.315
8	$15 \times 10^{-2}$	38.467	43.221
9	$17.5 \times 10^{-2}$	40.08	45.033



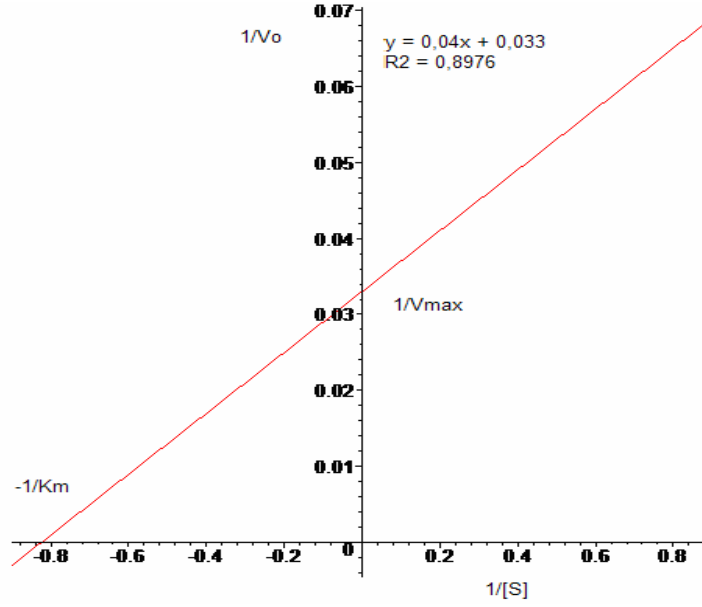
Şekil 4.5. Hazırlanan standartta farklı PBG konsantrasyonlarının gözlenmesi.

Michaelis-Menten hız grafiği çizildiğinde allosterik enzimlere özgü sigmoidal bir eğri gözlenmiştir ( Şekil 4.6). Aynı veriler ile Line Weaver-Burke grafiğide çizilerek  $V_{max}$  değeri 30.3  $\mu\text{mol PBG/saat/mg/ml}$  protein ve  $K_m$  değeri 1.21 mmol/reaksiyon karışımı olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesinin değişimi (Michaelis-Menten hız grafiği).





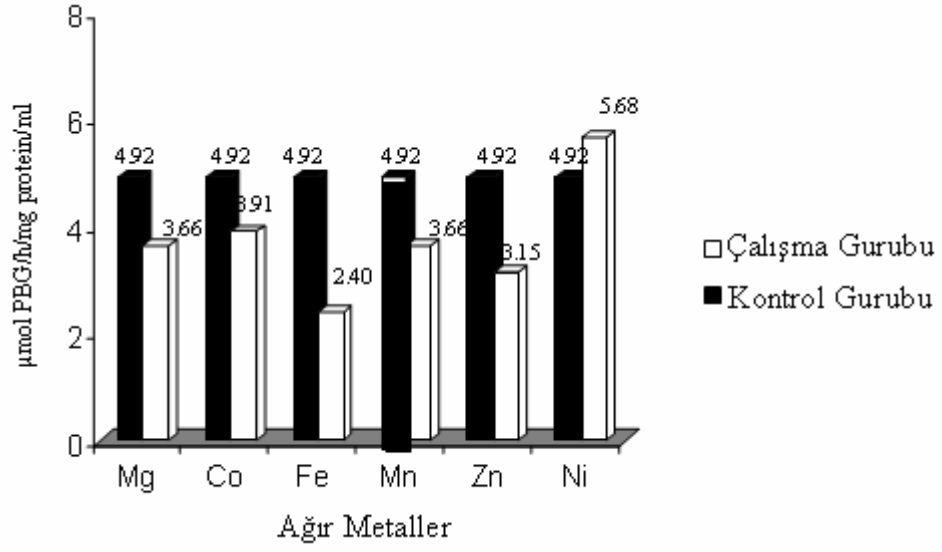
Şekil 4.7. ALAD aktivitesinin Kinetik analizi (Lineweaver-Burk grafiği).

#### 4.1.5. Farklı ağır metallerin ALAD üzerine etkisi

Kontrol gurubunun sonuçlarına göre ağır metallerden  $Mg^{2+}$  %26,  $Co^{2+}$  %20,  $Fe^{3+}$  %51,  $Mn^{2+}$  %26,  $Zn^{2+}$  %36 oranında ALAD aktivitesini azalttığı ve  $Ni^{2+}$ 'nin ise %15 oranında arttırdığı sonucuna bulunmuştur (Çizelge 4.5), (Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. Farklı ağır metallerin ALAD enzimi üzerine inhibisyon etkisi.

	PBG	% İnhisyon	Spesifik Aktivite $\mu\text{mol}$ PBG/h/mg/protein
<b>Standart</b>	3.145		4.929
<b><math>Mg^{+2}</math></b>	2.338	-26	3.664
<b><math>Co^{+2}</math></b>	2.5	-20	3.918
<b><math>Fe^{+3}</math></b>	1.532	-51	2.401
<b><math>Mn^{+2}</math></b>	2.338	-26	3.664
<b><math>Zn^{+2}</math></b>	2.016	-36	3.159
<b><math>Ni^{+2}</math></b>	3.629	+15	5.688



Şekil 4.8. Farklı ağır metallerin ALAD aktivitesi üzerine etkisi.

## 4.2. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması

### 4.2.1. Amonyum sülfat ile çöktürme

Her bir doyum süpernatantında enzim aktivitelerine bakılmış ve ezim için spesifik aktivite %100'lük amonyum sülfat çöktürmesindeki fraksiyonda tespit edilmiştir. Bu aktivite değerine göre enzimin 1.85 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir.

### 4.2.2. Jel geçirgenlik kromatografisi

Bu çalışmada moleküler ağırlığı ayırım aralığı, 5.000-250.000 Da olan sefakril 200 (S 200) jel ortamı kullanılmıştır. Jel +4 °C de 30 nM, pH 7 K-fosfat tamponunda 1 gece bekletilerek şişirilmiştir. Yine +4 °C de kolona ( 1.6x31.5 cm) paketlenmiştir. Kolon akış hızı 10 ml/saat olarak ayarlanmıştır. K-fosfat (30 mM, pH 7.0) tamponu ve aynı akış hızı ile örnek uygulanmış ve fraksiyonlar (3 ml) toplanmıştır (Coleman 1966).

1-17. fraksiyon aralıklarında protein pikleri tespit edilmiş ve en büyük pik 8 numaralı fraksiyonda gözlenmiştir. Bu fraksiyonlarda ALAD enzimi için

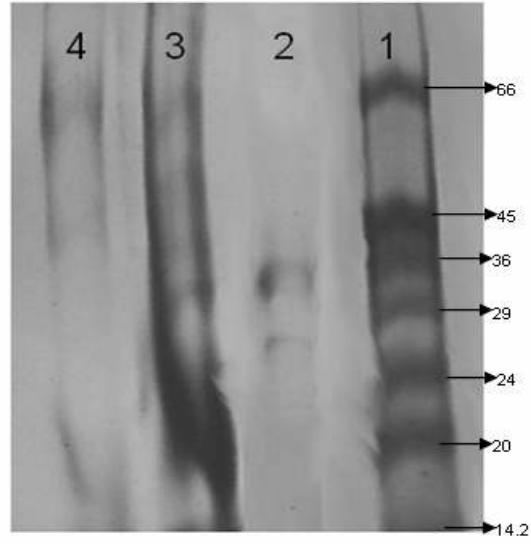
spesifik aktiviteye bakılmıştır. 8 numaralı fraksiyonun spesifik aktivitesine göre enzimin 90.76 kat saflaştırıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Enzimin saflaştırma basamakları ve bulunan değerler.

Adım	Total Protein (mg)	Total Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	İyileştirme (%)	Saflaştırma Derecesi
Homojenat	0.890	56.370	63.337	100	1
%100 [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] süpernatant	0.087	10.241	117.72	18,16	1,85
Kolon SepHadex G-200	0.007	40.241	5748.714	71,39	90,76

#### 4.2.4. SDS-PAGE ve molekül ağırlığının tespiti

SDS jel elektroforezi tekniklerinden biri olan Laemmli (1970)'nin tanımladığı yöntem kullanılmış olup %10'luk ayırma jeli ile örnek ayrıştırılmıştır. SDS-PAGE ile yapılan çalışmada kuyucuklarda sırası ile markır (Sigma, MW-SDS-70L), jel filtrasyonu sonucu elde edilen (8 numaralı fraksiyon) protein örneği, ham enzimik ekstrakt ve süpernatant kullanılmıştır. SDS jel elektroforezi sonucunda saflaştırılan *Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ının moleküler ağırlığı 34.800 Da olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9. SDS-PAGE ve izole edilen enzimin moleküler kütle determinasyonu.

- 1- Markır.
- 2- Jel filtrasyonu sonucundaki protein (8. fraksiyon).
- 3- Ham enzimik ekstrakt.
- 4- Süpernatın.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının biyokimyasal özellikleri araştırılarak, enzimin biyokimyasal karakterizasyonu belirlenmiş ve enzim saflaştırılmıştır.

Biyokimyasal karakterizasyonu belirlemek için yapılan deney koşulları altında, *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının maksimum aktivite gösterdiği inkübasyon sıcaklığı, 45 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.).

Bu değer *Bradyrhizobium japonikum*'da optimum 50-37 °C olarak bulunmuştur (Chauhan et al. 1997). Rat ve *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının 55 °C'de maksimum aktivite gösterdiği ispatlanmıştır (Sassa 1982, Ciğerci 2005). Kanal yayın balıkları ALAD'ının ısıya dayanıklı olduğu ve maksimum aktiviteye 65 °C'de ulaştığı gösterilmiştir (Conner and Fowler 1994). *Gammarus pulex* ALAD'ının ısıya duyarlı olduğu ve maksimum aktiviteyi 37 °C'de gösterdiği tespit edilmiştir (Kutlu ne Sümer 1998).

*Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının optimum pH'sı 8 olarak bulunmuştur. *Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ı *E. coli* ve bitkilerden elde edilen enzimlere benzer. Çünkü bunların enzimleri daha fazla optimum pH'ya sahiptirler. Maya enzimi için pH 9.8, *E. coli* için pH 8.5 ve bitkiler için pH 8 dir (Senior et al. 1996).

Bakteriyel enzimin optimum pH'sı 8–8.5, arasında olup, maksimum aktivite için  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $K^{+2}$  gibi katyonlara ihtiyaç göstermektedir. *Plasmodium falciparum* enziminin alkali olduğu optimum pH'sının 8.0-9.0 olduğu ve enzimin aktivasyon için herhangi bir metal iyonuna ihtiyaç duymadığı saptanmıştır (Shanmugham et al. 2004). Shioi ve arkadaşları (1988) *Erythrobacter* sp. OCh 114'nin optimum pH değerini 7.8 olarak saptamışlardır. *Bradyrhizobium japonikum*'da 9.5 gibi yüksek bir pH belirlenmiştir (Chauhan et al 1997). *E.coli* de ise optimum pH 6-8.5 olarak saptanmıştır (Senior et al.1996). *Rhodobacter capsulatus* ile yapılan bir çalışmada enzimin optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur (Bollivar et al 2004).

Çalışmamızda *Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ının ALA için kinetik analizlere göre  $K_m$  değeri 1.21 mmol reaksiyon karışımı,  $V_{max}$  değeri 30.3  $\mu$ m PBG/saat/mg protein olarak bulunmuştur.  $K_m$  değerinin diğer literatür verilerine oranla yüksek olması enzimin substrata olan ilgisinin düşük olduğunu gösterir.

Borrvalho ve arkadaşlarının (1990) mayalar üzerinde yapmış oldukları çalışmada; enzimin sipesifik aktivitesini pH 9.4 te ve 37.5 derecede 16.2  $\mu$ mol PBG/saat/mg protein olarak saptamışlardır.  $K_m$  değeri 0.359 mmol olarak belirlenmiştir.

Ciğerci'nin (2005) yapmış olduğu çalışmada *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının kinetik çalışmalar sonucu  $K_m$  değeri 0.06 mmol/reaksiyon karışımı,  $V_{max}$  değeri 22.83 nmol PBG/saat/mg/ml protein olarak saptamıştır.

*Gammarus pulex* için  $K_m$  değeri 0.043-0.058 mmol/reaksiyon karışımı,  $V_{max}$  değeri 176.6 nmol PBG/saat/mg/ml protein olarak bulunmuştur (Kutlu ve Sümer 1998).

Kinetik çalışmalar sonucu çizilen Michaelis-Menten hız grafiğinde, enzimin sigmoidal bir eğri çizdiği saptanmıştır. Böyle bir eğri, enzimin allosterik olduğunu göstermektedir. Enzimin allosterik olduğu farklı canlılarda daha önce yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Kutlu ve Sümer. 1998, Ciğerci 2005, Conner and Fowler 1994).

*Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ına farklı ağır metaller uygulandığında kontrol gurubunun sonuçlarına göre ağır metallere Mg %26, Co %20, Fe %51, Mn %26, Zn %36, Pb %61 oranında ALAD aktivitesini azalttığı ve Ni'nin ise %15 oranında arttırdığı bulunmuştur.

*Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve mayada  $Pb^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  ağırmetal iyonları ile enzim aktivitesinin inhibisyona uğradığı belirlenmiştir (Frankenberg et al. 1999, Borrvalho et al. 1990). Ancak  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ 'nin enzim aktivitesini artırıcı etkisi *Gammarus pulex* (Kutlu ve Sümer 1998), *Palaemonetes turcorum* (Ciğerci 2005), maya (Clara De Barreiro

1967), *Plasmodium falciparum* (Dhanasekaran et al 2004, Bollivar et al 2004) ve *Mycobacterium phlei*'de (Yamaski 1971) gösterilmiştir. Çeşitli metal iyonlarının kofaktör olarak kullanılıp kullanılmaması nedeni ile enzim farklı metale karşı farklı inhibisyon ve aktivasyon değerleri göstermektedir. Kofaktör olarak kullanılan metal iyonlarında ortamdaki konsantrasyonları önemlidir. Konsantrasyon fazla ise metal iyonları belirli bir seviyeye kadar enzimi aktive etsede bir noktadan sonra inhibisyona neden olmaktadır.

Tüm ALAD'ların temel katalitik özellikleri birbirine benzer olmasına rağmen enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve sülfidril hassasiyetindeki farklılıklardan dolayı değişik organizmalardan saflaştırılmış enzimler arasında farklılıklar gözlenmiştir (Mohan and Hosetti 1997).

Saflaştırma çalışmalarımız sonucunda *Streptomyces yokosukanensis* ALAD'ının moleküler ağırlığı 34.800 Da olarak bulunmuştur.

ALAD'ların moleküler ağırlığı 250-340 kDa arasında dağılım gösterir. Memelilerden ve mayadan izole edilen enzimler her biri yaklaşık 37 kDa olan benzer 8 alt ünitelerden oluşur. Fakat yüksek yapılı bitkiler ve bakterilerden izole edilen ALAD'lar sırasıyla 50 ve 40 kDa olan 6 benzer alt ünitelerden heksamerik proteinlerdir (Boese et al. 1991).

*Palaemonetes turcorum* ile yapılan çalışmada saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı 237.6 kDa ve bir alt ünitesinin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak bulunmuştur (Ciğerci 2005).

*Rhodopseudomonas spheroides* ALAD'ının 300-400 kat saflaştırılması sağlanmış ve moleküler ağırlığı yaklaşık 250 kDa olarak belirlenmiştir (Nandi and Shemin 1968).

Rekombinant *Plasmodium falciparum* ALAD'ı moleküler ağırlığı 46 kDa olan 8 alt ünitelerden oluştuğu ve enzimin moleküler ağırlığının 345 kDa olduğu bulunmuştur (Dhanasekaran et al. 2004).

*Rhodobacter capsulatus* ile yapılan çalışmada enzimin hekzamer yapıda olduğu, bir alt ünitesinin ağırlığının 35.856 Da ve enzimin moleküler ağırlığı 220 kDa olarak bulunmuştur (Bollivar et al. 2004).

Sonuç olarak kurşuna maruz kalmada bir toprak bakterisi olan *Streptomyces yokosukanensis* ATCC 25520 ALAD'ının biyolojik bir indikatör olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Ancak enzimin kurşun inhibisyonuna hassaslığı konusunda diğer temel bilimsel verilerin dikkate alınması gerekmektedir. Türe özgü ALAD'lar daki; enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve sülfidril hassasiyeti gibi farklılıklar, kurşun ve enzim inhibisyonu arasındaki ilişkiyi değiştirebilir.

Farklı ALAD'lar için gözlemlenen farklılık ve benzerlikleri açıklamak için enzimin farklı organizmalarda karakterizasyonu ve saflaştırılması gerekmektedir. Bu çalışma prokaryot ve gram pozitif bir bakteri olan *Streptomyces yokosukanensis*'de yapılan ilk çalışma olup, yine diğer prokaryot test organizmaları ile çalışılarak desteklenmesi gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

Anderson, P.M., Desnick R.J. (1979) 'Purification and Properties of  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase from Human Erythrocytes', J. Biol. Chem., 254, 6924-6930.

Arrieta M.A., Peri S.I., Apartin C., Rosenberg C.E., Fink N.E. (2000) 'Blood lead concentration and aminolevulinic acid dehydratase activity in adult *Bufo arenarum*', Archives of Physiology and Biochemistry, 108, 275-280.

Blum H., Beier H. and Gross H.J. (1987) 'Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels', Electrophoresis, 8, 93-99

Boese Q.F., Spano A.J., Li, J., Timko M.P. (1991) 'Aminolevulinic acid dehydratase in pea', Journal of Biological Chem. 26,17060-17066

Bollivar D.W., Clauson C., Lighthall R., Forbes S., Kokona B., Fairman R., Kundrat L., Jaffe E.K. (2004) '*Rhodobacter capsulatus* porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer'. BMC Biochemistry, 5,17

Borralho LM, Ortiz CH, Panek AD, Mattoon JR. (1990) 'Purification of delta-aminolevulinate dehydratase from genetically engineered yeast'. Yeast.;6(4):319-30.

Bradford M.M. (1976) 'A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding' Analyt. Biochem., 72, 248

Buchet, J.P. (1976) 'Effect of some parameters of the heme biosynthetic pathway in rat tissue in vivo', Toxicology, 6, 21-34 .

Chadzynski L. (1986) 'Manual for The Identification and Abatement of Environmental Lead Hazards. Division of Maternal and Child Health', US Public Health Service, USA.

Chang, S.C. (1984) 'An immunological study of ALAD specificity consistent with phylogeny of species', *Biochem. Biophys. Acta*, 797, 297-301

Chater K F. (1998) 'Taking a genetic scalped to the *Streptomyces* colony. *Microbiology*' 114, 1465-1478

Chauhan S., Titus D.E., O'Brian M.R. (1997) 'Metals control activity and expression of the heme biosynthesis enzyme  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in *Bradyrhizobium japonicum*'. *The Journal of Biological Chemistry*. 179, 5516-5520.

Cheh A. and Neilands J. B. (1976) 'The aminolevulinate dehydratase: Molecular and environmental properties', *Struct. Bond.*, 29, 123-170

Çiğerci İ. H. (2005) '*Palaemonetes turcorum* (Holthuis, 1961) (Decapoda)'da  $\delta$ -Aminolevulinik Acid Dehidrataz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu' Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

Clara De Barreiro, O.L. (1967) '5-Aminolevulinate hydro-lyase from yeast isolation and purification', *Biochem. Biophys. Acta*, 139, 479-486.

Coleman D. L. (1966) 'Purification and properties of aminolevulinate dehydratase from tissues of two strains of mice', *J. Bio. Chem.*, 23, 5511-5517

Conner E.A., Fowler B.A. (1994) 'Biochemical and immunological properties of hepatic aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish'. *Aquatic Toxicology*. 28,37-52

Derouaux A., Halici S., Nothaft H., Neutelings T., Moutzourelis G., Dusart J., Titgemeyer F. And Rigali S. (2004) 'Deletion of cyclic AMP receptor protein Hologue Diminishes Germination and Affects Morphological Development of *Streptomyces coelicolor*' *Journal of Bacteriology*, 186(6) 1893-1897.

Dhanasekaran S, Chandra N. R, Chandrasekhar Sagar B. K, Rangarajan P. N., Padmanaban G. (2004) 'Delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Plasmodium falciparum*: indigenous versus imported', J Biol Chem. 20;279(8):6934-42.

Doyle D., Schimke T.R. (1969) 'The genetic and developmental regulation of hepatic ALAD in mice', The Journal of Biological Chemistry, 20, 5449-5459

Dyson P. (2000) 'Streptomyces, Genetics' Encyclopedia of Microbiology, Volume 4, 451-466.

Fleming D. E. B., Chettle D. R., Wetmur J. G., Desnick R. J., Robin J. P., Boulay D., Richard N. S., Gordon C. L., Webber C. E. (1998) 'Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers'. Environmental Research . 77, 49-61.

Frankenberg N, Hinz D. W., Jahn D. (1999) 'Production, purification, and characterization of a Mg<sup>2+</sup> responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*'. Biochemistry. 38(42):13968-75.

Gibbs P. N. B., Chaudhry A. G. and Jordan P. M. (1985) 'Purification and properties 5-Aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes', Biochem. J., 230, 25-34.

Gibson K. D., Laver W. G., Neuberger A. (1958) 'Initial Stages in the biosynthesis of Porphyrins', Biochem. J., 70:71.

Granick J. L. (1973) 'Studies in lead poisoning', Biochem. Med., 8, 149-159.

Hellawell J. (1986) 'Biological indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management', Elsevier Science, 186-195.

Hodson P. V. (1976) 'Delta-Amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead' J. Fish.Res.Board Can., 33, 268-271.

Hopwood DA, Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J. (2002) 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*' A3(2) Nature, 417(6885):141-7

İmre Z. (1988) 'Toksikoloji', İstanbul Üniversitesi Yayınları, 224-267, İstanbul.

Jaffe E. K. (2003) 'An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase'. Chem. Biol.;10(1):25-34.

Jain M., Gadre R. (2004) 'Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity by arsenic in excised etiolated maize leaf segments during greening', Journal of Plant Physiology, 161, 251-255,

Jordan P.M. (1989) 'Biosynthesis of Heme and Chlorophylls', 55-121, New York.

Karataş S., Kalay M. (2002) 'Tilapia zilli'nin Solungaç, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Kurşun Birikimi', Türk J. Vet.Anim.Sci., 26, 471-477.

Konuk M. (1993) 'Studies of the biosynthesis and properties of nebularine', Doktora Tezi, University College of Swansea, UK

Korcan E. (1995) 'Topraktan ve havadan izole edilen Actinomycete türlerinin anti mikrobial aktivitesinin belirlenmesi'. Osman Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi

Kutlu M., and Sümer S. (1998) 'Effects of Lead on the Activity of aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex*', Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60, 816-821.

Laemmli, U.K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227, 680-685.

Leidgens W. C. (1983) 'Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*', *J. Biochem.*, 135, 75-79.

Lo C W, Lai N S, Cheah H-Y., Wong N. K. I. and Ho C.C. (2002) 'Actinomycetes Isolated From Soil Samples From The Crocker Range Sabah' Asean Review of Biodiversity and Environmental conservation (ARBEC).1-7 <http://www.arbec.com.my/pdf/art21julysep02.pdf>

Milchel L.W., Jaffe E.K. (1993) 'Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II)', *Arch. Biochem. Biophys.*, 300, 169-177.

Mohan B. S. And Hosetti B. B. (1997) 'Potential Phytotoxicity of Lead and Cadmium to *Lemna minor* Grown in Sewage Stabilization Ponds', *Environmental Pollution*, 98, 233-238

Morsch V. M., Schetinger M. R. C., Martins A. F., Rocha J. B. T. (2002) 'Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves', *Biologia Plantarum*, 45, 85-89.

Nandi D. L., Shemin D. (1968) 'ALAD of *Rhodobacter sphaeroides*', *J. Biol. Chem.*, 243, 1224-1230.

Nandi D. L., Shemin D. (1973) 'ALAD of *Rhodospseudomonas capsulatus*', *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 305-311.

Ogunseitan O. A., Yang S., Ericson J. (2000) 'Microbial aminolevulinic acid dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments', *Soil Biology & Biochemistry*, 32. 1899-1906.

Pang D. J., Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. A., Cairns Jr. (1995) 'Lead in the environment'. (Eds) Handbook of ecotoxicology, Lewis, Boca Raton, FL, 336-392.

Peixoto N. C., Roza T., Pereira M. E. (2004) 'Sensitivity of ALAD of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue', Toxicology in Vitro, 18, 805-809.

Redenbach M., Kieser H. M., Denapaite D., Eichner D., Cullum J., Kinashi H. and Hopwood D. A. (1996) 'A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome' Mol. Microbiol. 27:77-96

Rossi E. (1990) 'Effect of occupational lead exposure on lymphocyte enzymes involved in heme biosynthesis', Clin. Chem., 36, 1980-1983.

Sassa S. (1982) 'Delta aminolevulinic acid dehydratase assay', Enzymes, 28, 133-145.

Schneider H. A. W., Liedgens W. (1981) 'An evolutionary tree based on monoclonal antibody recognized surface-features of a plastid enzyme (5-aminolevulinic acid dehydratase)', Z. Naturforsch, 36, 44-50.

Senior N. M., Brocklehurst K., Cooper J. B., Wood S. P., Erksine P., Shoolingin-Jordan P., Thomas P. G., Warren M. J. (1996) 'Comparative studies on the 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Pisum sativum*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*'. Biochem J. 320,410-412

Shemin D. (1972) 'Aminolevulinic acid dehydratase', Enzymes, 7, 323-337.

Shioi Y, Doi M, Tanabe K, Shimokawa K. (1988) 'Inhibition of porphyrin biosynthesis by exogenous 5-aminolevulinic acid in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. OCh 114'. Arch Biochem Biophys. 266(2):478-85.

Silbelgerd E. K. (1982) 'Neurotoxic aspects of porphyrinopaties lead and succinylacetone', *Environ. Res.*, 29, 459-471

Spencer P., Jordan P. M. (1995) 'Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*', *Biochem J.* 305 (1):151-8

Süsstrunk U., Pidoux J., Taubert S., Ullmann A., Thompson C. J, (1998) 'Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*' *Molecular Microbiology* 30(1): 33-46.

Tanaka T., Kakizono T., Nishikawa S., Watanabe K., Sasaki K., Nishino N., Nagai S. (1995) 'Screening of 5-aminolevulinic acid dehydratase inhibitors'. *Seibutsu-Kaishi* 73,13-19

Thompson C. J., Chiu M., Christiansen I., Dale G., Folcher M., Li X.-M., Morris R., Nguyen L., Orsaria L., Richter M., Taubert S., Tenor J., Süstrünk U., Violler P., Weihofen A. (1998-99) 'Differentiation in *Streptomyces* a procaryotik multicellular developmantal system', *Biozentrum: Biennial Report.* 1-6.

Thompson C J, Fink D, and Nguyen L D, (2002) 'Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence'. *Genome Biology*, 3(7):1020.

Van H. S. (1971) 'Quaternary structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Rhodobacter spheroides*', *Biochemistry*, 10, 4676-4682.

Vural N. (1984) 'Toksikoloji', *Ankara Üniversitesi Eczacilik Fakültesi Yayinlari*, 315-323, Ankara.

Wetmur J. G. (1994) 'Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden'. *Environmental Health Perspectives* 102, 215-219.

Wong P. T. S., Chau Y. K., Luxon P. L. (1975) 'Methylation of Lead in the Environment', *Nature*, 253-263.

Xie Y., Chiba M., Shinohara A., Watanabe H., Inaba Y. (1998) 'Studies on lead-binding protein and interactions between lead and selenium in the human erythrocytes'. *Industrial Health* 36, 234-239

Yamaski H. (1971) 'ALAD of Mycobacterium phlei', *Biochem. Biophys. Acta.* 227, 698 705.

### **İnternet adresleri**

1)) Sabah Grubb's web page streptomycetes soil microbiology Biol/cses 4684

2) [www.bacterien.org](http://www.bacterien.org), [www.bioserver.myongji.ac.kr/krka/kactserver.html](http://www.bioserver.myongji.ac.kr/krka/kactserver.html)

3) [www.Korea Actinomycetes Network](http://www.KoreaActinomycetesNetwork.com), [www.nih.go.jp/saj/index.cyi](http://www.nih.go.jp/saj/index.cyi)

4) [www.sanger.ac.uk/Projets/S\\_coelicolor](http://www.sanger.ac.uk/Projets/S_coelicolor)

5) [www.streptomycetes.org.uk/pathways/index.html](http://www.streptomycetes.org.uk/pathways/index.html)

6) [www.genome.jp/keyg/pathway.html](http://www.genome.jp/keyg/pathway.html), [www.hki\\_jena.de/nwg/3/hki\\_nwg3.htm](http://www.hki_jena.de/nwg/3/hki_nwg3.htm)



## TEŐEKKÖR

Tez çalıőmam esnasında beni yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. Muhsin KONUK'a, çalıőmalarımın her aşamasında deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım Yrd.Doç.Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ'ye ve Yrd.Doç.Dr. S. Elif KORCAN'a, yardımlarından dolayı Fatih AKSOY'a, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teőekkörü bir borç bilirim.

## ÖZGEÇMİŞ

31.01.1982 yılında Isparta'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Isparta'da tamamladı. 2000 yılında başladığı Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2004 yılında mezun oldu. Yabancı dili İngilizcedir.