

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
FOSFOTRANSASET LAZIN REKOMBİNANT
ÜRETİM VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

**MERAL AMANVERMEZ KARABAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2015**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
FOSFOTRANSASET LAZİN REKOMBİNANT
ÜRETİM VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU

MERAL AMANVERMEZ KARABA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANI MANI
DOÇ. DR. ALİ TÜRKAN

GEBZE
2015

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

GEOBAC LLUS KAUSTOPH LUS
PHOSPHOTRANSACETYLASE: RECOMBINANT
PRODUCTION AND BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION

MERAL AMANVERMEZ KARABA
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR AL TÜRKAN

GEBZE
2015

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/06/2015 tarih ve 2015/36 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/09/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Meral AMANVERMEZ KARABAŞ'ın tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ali TURKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

Ali Turkan
Melek Özkan
A. Tanrıseven

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Geobacillus kaustophilus bakterisinin genomunda bulunan, dizisi bilinen Pta'larabenzlerlik gösterdi inden fosfotransasetilaz geni (*EutD*) oldu u tahmin edilen (GK3415, KEGG Database) ~1000 bç'lik gen, uygun primerler kullanılarak PCR yöntemiyle ço altılıp, *pET28a(+)* vektöründeki *NdeI* ve *EcoRI* klonlama bölgelerine aktarıldı. DNA dizini analize gönderilerek belirlendi. *EutD* genini içeren *pET28a(+)* vektörü, *E. coli*BL21 (DE3) hücrelerine transfer edilip, IPTG ile indüklenerek ekspresyonu sa landı, Ni-NTA afinite kolonu ile safla tırıldı. Rekombinant proteinin Pta aktivitesi 100-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein olarak ölçüldü. Optimum sıcaklık 30-35⁰C ve optimum pH de eri 7.5 bulundu.

Karakterizasyon çalı maları sonucunda da Pta'ın ileri reaksiyon substratları, asetil-fosfat ve CoA için K_m ve k_{cat} de erleri sırasıyla 284 μM , 153 s^{-1} ve 207 μM , 171 s^{-1} ; geri reaksiyon substratları, fosfat ve asetil-CoA için K_m ve k_{cat} de erleri sırasıyla 3.5mM ve 39 s^{-1} ve 93 μM ve 23 s^{-1} olarak bulundu. Aktivite üzerine bazı iyonların ve hücre enerji metabolizmasında önemli rol oynayan bazı metabolitlerin etkileri de incelendi. K^+ ve NH_4^+ iyonları Pta aktivitesini arttırırken, Na^+ iyonunun inhibe etti i görüldü. ATP ve -ketoglutarat, Pta aktivitesini inhibe ederken, pirüvat ve NADH aktiviteye etki etmemektedir. Farklı tamponda ve pH de erlerinde -ketoglutarat ve ATP etkisi ayrıca incelendi. ATP inhibisyonu farklı tampon ve pH de erlerinde farklılık göstermemektedir. -Ketoglutarat ise HEPES (pH7.5) ve MOPS (pH 7.5) tampon çözeltilerinde %30 oranında inhibe ederken, Tris-HCl (pH 7.5) tampon çözeltisinde %90 oranında inhibe etti i görülmü tür; Tris-HCl tamponu pH 8.0 ise %30 oranında inhibe etmektedir. Negatif yüklü α -ketoglutaratın Pta'da ba landı ı bölgedeki rezidülerin pozitif yükleri ile elektrostatik etkile ti ini ve artan pH ile nötr hale geçerek ba lanmanın zayıfladı ını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *G. kaustophilus*, fosfotransasetilaz, *eutD* geni, kinetik analiz, -ketoglutarat, karakterizasyon.

SUMMARY

The *eutD* gene in the genome of *Geobacillus kaustophilus* GK3415 was amplified using PCR with appropriate primers. The PCR product was subcloned into the *Nde*I and *Eco*RI cloning sites of *pET28a(+)* expression vector. DNA sequence was confirmed by DNA sequencing. The *pET28a(+)* vector containing the *eutD* gene was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. The over expression of there combinant protein was achieved by IPTG induction, was purified using Ni-NTA affinity column. Pta showed moderate activity (100-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). The optimum pH, temperature were 7.5, 30-35 $^{\circ}\text{C}$, respectively.

The kinetic parameters of there combinant Pta were determined in the forward direction, the K_m , k_{cat} values for acetyl-phosphate, CoA were 284 μM , 153 s^{-1} and 207 μM , 171 s^{-1} , respectively. In there verse direction, the K_m , k_{cat} values for phosphate, acetyl-CoA were 3.5 mM, 39 s^{-1} and 93 μM , 23 s^{-1} respectively. Effects of some ions, some metabolites, playing central role in cellular energy metabolism have been in vestigated. K^+ , NH_4^+ ions enhance the Pta activity, whereas Na^+ ion was inhibitory. The enzyme was significantly inhibited by ATP, α -ketoglutarate but not markedly affected by pyruvate, NADH. The inhibition by α -ketoglutarate was 30% in HEPES, MOPS buffers (pH7.5) and 90% in Tris-HCl buffer (pH 7.5); the inhibition was 30% when the pH of Tris-HCl was 8.0. These results indicate that some positive residues on Pta are involved in the inter action with α -ketoglutarate, a negatively charged molecule, that with increasing pH, the inter action decreases due to loss of the charge on the positive residues.

Key Words: *G. kaustophilus*, phosphotransacetylase, *eutD* gene, kinetic analysis, α -ketoglutarate, characterization.

TE EKKÜR

Öncelikli olarak bu tez çalı masını yapma olana ını bana veren, gerekli alt yapıyı sa layan, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren, deste ini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalı manın olu masının yolunu açan saygı de er danı man hocam Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a sonsuz te ekkür ederim.

Ayrıca tez savunmamda jüri üyeli imi yapan Prof. Dr. Melek ÖZKAN'ave Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN desteklerinden dolayı çok ükranlarımı sunarım.

Ayrıca Prof. Dr.Ayhan ÇEL K ve çok de erli laboratuvar arkada larıma da vermi oldukları desteklerden ve yardımlardan dolayı herbirine tek tek te ekkür ederim.Tez çalı mamda yardım, bilgi ve deste ini esirgemeyen her pes edi imde tekrar beni motive eden, umut ve azim a ılayan arkada ım Kübra EK LER'e ayrıca minnetlerimi sunarım.

Son olarak da beni bugünlere kadar getiren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, attı ım her adımda arkamda olan aileme, göstermi oldu u fedakarlıklar ve sabrından ötürü sevgili e ime ve en umutsuz anlarımda gülücük sesleri ve ı ıl ı ıl bakan gözleri ile bana güç veren hayatımın anlamları ya am kayna ım çocuklarıma sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

Ç NDEK LER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TE EKKÜR	vii
Ç NDEK LER	viii
S MGELER ve KISALTMALAR D Z N	x
EK LLER D Z N	xi
TABLolar D Z N	xiii
1. G R	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve çeri i	3
2. KONU LE LG L ÇALI MALAR	4
2.1. Asetat Metabolizması	4
2.1.1. Asetat Olu um Evreleri	6
2.1.2. Asetat Metabolizmasında Pta Enziminin Önemi	8
2.1.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Pta Enzimi ve Kar ıla tırılması	10
2.2. Pta Enzimi	13
2.2.1. Yapı Fonksiyon Çalı maları	13
2.2.2. Kinetik Çalı maları	17
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri	20
3.2. Metot	20
3.2.1. <i>G. kaustophilus</i> Bakterisindeki <i>EutD</i> Geninin Klonlanması	20
3.2.2. Rekombinant <i>E.coli</i> Kolonilerinin Seçimi ve Kontrolü	25
3.2.3. Protein Ekspresyonu ve Safla tırılması	26
3.2.4. Karakterizasyon Çalı maları	27

4. SONUÇ	32
4.1. <i>G. kaustophilusEutD</i> Geninin Klonlanması	32
4.2. <i>pET28a-GkPta</i> Plazmitin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu, KoloniPCR ve Endonükleaz Analizleri	33
4.3. Klonlanan <i>G. kaustophilusEutD</i> Geninin DNA Dizi Analiz Sonucu ve Amino Asit Sekuansının Diğer <i>Pta</i> Dizileri ile Karşılaştırılması	35
4.3.1. Dizi Analiz Sonucu	35
4.3.2. <i>G.kaustophilusPta</i> Dizisinin Diğer <i>Pta</i> Dizileri ile Karşılaştırılması	38
4.4. Protein Ekspresyonu ve Saflaştırılması	39
4.4.1. <i>Pta</i> Ekspresyonu	39
4.4.2. Protein Saflaştırılması	39
4.5. Karakterizasyon Çalışmaları	41
4.5.1. Enzim Konsantrasyonunun Bağımlı Hızına Etkisi	41
4.5.2. İleri ve Geri Reaksiyonlar için Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	42
4.5.3. pH'ın Aktiviteye Etkisi	46
4.5.4. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi	47
4.5.5. Farklı İyonların Aktiviteye Etkisi	48
4.5.6. Bazı Metabolitlerin İleri ve Geri Reaksiyonlarda Aktiviteye Etkisi	50
4.5.7. Tamponların ATP ve α -Ketoglutarat inhibitörüne Etkisi	54
5. GENEL DEĞERLENDİRME	59
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	71
EKLER	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
<i>ackA</i>	: Asetat kinaz geni
<i>fruR</i>	: Fruktözrepressor geni
<i>pckA</i>	: Fosfoenolpiruvatkarboksilaz geni
<i>pflB</i>	: Piruvat format liyaz geni
<i>pNPP</i>	: <i>p</i> -nitrofenil palmitat
<i>ppsA</i>	: Fosfoenolpiruvatsentetaz geni
<i>Pta</i>	: Fosfotransasetilaz geni
<i>Taq</i>	: Thermusaquaticus
ADP	: Adenozindifosfat
AMP	: Adenozinmonofosfat
ATP	: Adenozintrifosfat
bp	: Baz çifti
CoA	: Koenzim A
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAD	: Flavinadenindinükleotit
His-tag	: Histidin kuyruğu
IPTG	: izopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozid
kDa	: Kilodalton
KGDH	: 2-ketoglutarat dehidrogenaz
LB	: Luria-BertaniBroth
NAD	: NikotinamidadeninNükleotit
PCR	: Polimer Zincir Reaksiyonu
PEP:PTS	: Fosfoenolpiruvat: karbonhidrat fosfotransferaz sistemi
PMSF	: Fenil metil sülfonil florit
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat akrilamid jel elektroforezi
TCA	: Trikarboksilik asit
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil propan 1,3-diol

EK LER D Z N

<u>ekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Asetil-CoA merkez metabolizmanın dönüm noktasında yer alan yüksek enerjili ara ürün.	4
2.2: Asetat asimilasyonundaki metabolik yollar.	5
2.3: Merkez metabolik yollar.	7
2.4: Pta çıkartılma sonrası <i>E. coli</i> 'de metabolik a da meydana gelen de i iklikler.	8
2.5: Asetatın dönü üm yolları.	9
2.6: <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın <i>M. thermophila</i> , <i>S. Pyogens</i> ve <i>B. subtilis</i> Pta'larıyla dizi uyumu.	11
2.7: <i>B. subtilis</i> 'ten elde edilen <i>eutD</i> geninin yapısı.	13
2.8: <i>EutD</i> gen monomerinin aktif bölgesi.	15
2.9: <i>M. thermophila</i> bakterisinden elde edilen Pta'nın katalizledi i reaksiyon için Lewendon ve arkadaş ları tarafından önerilen katalitik mekanizma.	16
3.1: Klonlama vektörü <i>pET28a(+)</i> 'nin vektör haritası.	23
4.1: <i>G. kaustophilus</i> <i>eutD</i> geninin <i>pET28a (+)</i> vektörüne klonlama a amaları.	32
4.2: <i>G. kaustophilus</i> <i>eutD</i> genine ait PCR ürünü ve <i>pET-28a(+)</i> vektörü agaroz jel (%1) analiz sonucu.	33
4.3: <i>G. kaustophilus</i> <i>eutD</i> genine ait koloni PCR ürünlerinin görüntülenmesi.	34
4.4: <i>pET28a(+)</i> -GkPtaplazmiti ve <i>pET28a(+)</i> -GkPtaplazmitinin <i>EcoRI</i> ve <i>NdeI</i> endonükleazlarla kesim ürünlerinin agaroz jel (%1) analiz sonucu.	35
4.5: Dizi analizi sonucu belirlenen Pta aminoasit dizisi.	36
4.6: <i>KEGG</i> veribankasında verilen <i>G. kaustophilus</i> Pta aminoasit dizisi (GK3415) ile <i>G. kaustophilus</i> genomundan klonladığımız Pta aminoasit dizisinin (Gkpta) karşılaştırılması.	37

4.7:	<i>B. subtilis</i> , <i>M. thermophila</i> , <i>S. pyogenes</i> Pta aminoasit dizileri ile <i>G. kaustophilus</i> bakterisinden elde etti imiz Pta aminoasit dizisinin kar ıla tırılması.	38
4.8:	<i>E.coli</i> BL21 (DE3) hücrelerindeki ekspresyonu gerçekle en <i>G. kaustophilus</i> Ptageninin SDS-PAGE jelinde görüntüsü.	39
4.9:	<i>E.coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinden Pta enziminin Ni-NTA ile safla tırılmasının SDS-PAGE jelinde görüntüsü.	40
4.10:	Safla turlan His ₆ -Pta'nın SDS-PAGE görüntüsü.	40
4.11:	Enzim miktarına ba lı olarak aktivite ba langıç hız grafi i.	42
4.12:	Asetil fosfat konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin ileri reaksiyon spesifik aktivitesi.	43
4.13:	CoA konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin ileri reaksiyon spesifik aktivitesi.	44
4.14:	norganik fosfat konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin geri reaksiyon spesifik aktivitesi.	44
4.15:	Ac-CoA konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin geri reaksiyon spesifik aktivitesi.	45
4.16:	pH'inPta aktivitesine etkisi.	46
4.17:	Sıcaklı ın Pta aktivitesine etkisi.	48
4.18:	Farklı iyonlarınPta aktivitesine etkisi.	49
4.19:	NaCl'ünKCl varlı ında ve yoklu unda Pta aktivitesine etkisi.	50
4.20:	NADH'inPta aktivitesine etkisi.	51
4.21:	Pirüvat'inPta aktivitesine etkisi.	52
4.22:	-Ketoglutarat'inPta aktivitesine etkisi.	53
4.23:	ATP'ninPta aktivitesine etkisi.	54
4.24:	-Ketoglutarat'inPta aktivitesine HEPES, MOPS ve Tris ortamında etkisi.	55
4.25:	-Ketoglutarat'inPta aktivitesine farklı pH'lardaTris tamponundaki etkisi.	56
4.26:	ATP'ninPta aktivitesine HEPES, MOPS ve TRIS ortamında etkisi.	57
4.27:	ATP'ninPta aktivitesine farklı pH'lardaTris tamponundaki etkisi.	58

TABLÖLAR D Z N

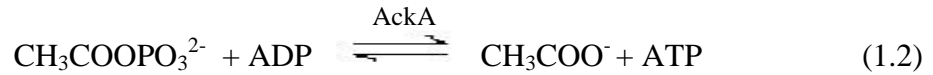
<u>Tablo No:</u>		<u>Sayfa</u>
2.1:	Farklı kaynaklardan elde edilen Pta'ın özelliklerinin karıla tırılması.	12
3.1:	<i>EutD</i> geninin ço altılması için hazırlanan PCR reaksiyonu bile enleri.	21
3.2:	<i>EutD</i> geninin ço altılması için uygulanan PCR programı.	21
3.3:	<i>EutD</i> geni kesim reaksiyonu bile enleri.	22
3.4:	<i>pET28a(+)</i> vektörünün kesim reaksiyonu bile enleri.	24
3.5:	<i>pET28a(+)</i> vektörü ile <i>eutD</i> geninin ligasyon reaksiyon bile enleri.	24
4.1:	<i>G. kaustophilus</i> Pta için kinetik parametreleri.	45

1. G R

Fosfotransasetilaz (Pta, EC 2.3.1.8), asetat kinazla (AckA) birlikte bakterilerde ATP sentezi ve asetil-CoA'nın asetata dönüümünde önemli rol oynar [Latimer et al., 1993]. Pta, asetil-CoA'dan asetil grubunun taınımını geri dönüümlü olarak katalizler ve bunun sonucunda asetilfosfat ile CoA olur (1.1) [Matsuyama et al., 1994], [Shin et al., 1999]. Asetil-CoA (Ac-CoA) bütün anabolik proseslere do rudan katılan metabolik bir ara üründür [Wolfe, 2005].



Asetil-fosfat ve ADP, asetat kinaz tarafından asetat ve ATP'ye çevrilebilir (1.2) [Matsuyama et al., 1994], [Shin et al., 1999].



Fosfotransasetilaz enzimi bakteri ve arkea domainine ait birçok mikroorganizmadan izole edilip, biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Aerobik ve anaerobik bakterilerin metabolizmalarında ve anaerobik karbon döngüsünde bu enzimin önemli rol oynadığı bilinmektedir [Iyer et al., 2004], [Lawrence et al., 2006], [Matsuyama et al., 1994].

Bugüne kadar yapılan çalışmaları, Pta'nın farklı mikroorganizmalardan elde edilen iki türünün olduğunu ortaya çıkarmıştır: PtaI ve PtaII. PtaI, *eutD* geniyle kodlanmıştır ve yaklaşık 350 rezidüye sahiptir, PtaII *pta* geniyle kodlanmıştır ve yaklaşık 700 rezidüden oluşmaktadır [Lundie and Ferry, 1989], [Campos-Bermudez et al., 2010]. Bazı mikroorganizmalar bu genlerin her ikisini de içermektedir. PtaII'nin C-terminal domaini katalitik domainidir ve PtaI ile yüksek homoloji göstermektedir. PtaII'nin N-terminal domaini regülatör domainidir. Bu sayede NADH, ATP ve pirüvat gibi allosterik efektörlerin aktiviteye etkisinde rol oynar [Brinsmade and Escalante-Semerena, 2007], [Campos-Bermudez et al., 2010]. PtaI sınıfından olan *B. subtilis* Pta, adenin nükleotidleri, ATP, AMP ve ADP tarafından inhibe edilirken pirüvat ve NADH tarafından inhibe edilmediği görülmüştür [Thomas

and Hoch, 1973]. Yıldız ve arkadaşları üropatojen olan *Staphylococcus saprophyticus* bakterisi genomundan klonlayıp rekombinant olarak elde ettikleri PtaI için -ketoglutaratın allosterik bir inhibitör olduğunu rapor etmişlerdir [Yıldız vd., 2012].

Bugüne kadar, *Myceliophthora thermophila*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes* PtaI'in kristal yapıları aydınlatılmış ve bunların homodimer yapıda oldukları ve benzer katlanma gösterdikleri belirtilmiştir [Iyer et al., 2004], [Xu et al., 2004]. Her üç kristal yapıda α -heliks/ β plakaları ile muhtemelen substrat bağlama bölgesini oluşturarak homodimer bir yapı içermektedir [Becker et al., 2009], [Khyami-Horani et al., 1996]. Üç boyutlu yapıları belirlenen bu Pta'lar diğer Pta'lar için bir model teşkil etmekte ve yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarında rezidülerin yerlerini tahmin etmede kullanılmaktadır.

Pta aktivitesinin, bazı patojenik bakterilerin virülans etkisi için önemli rol oynadığı bilinmektedir. Welch ve arkadaşları Pta-Ack A yolunun, tahminen asetil-fosfat ve asetil-CoA üzerinden, patojen *E. coli* CFT073'ün farelerin idrar yollarında kolonize olması ve patojenik etki göstermesinde rol oynadıklarını rapor etmişlerdir [Anfora et al., 2008]. Asetil-fosfatın global sinyal fonksiyonuna sahip olduğu ve 100'den fazla genin ekspresyonunda etkili olduğu gösterilmiştir [Wolfe, 2005]. Farmakolojik alanda özellikle *Staphylococcus aureus* gibi antibiyotik direnci bulunan patojenik bakterilerin yaygın faaliyetlerinde önemli yer tutan Pta, bu bakterilere karşı ilaç geliştirmede hedef olarak seçilmektedir [Morya et al., 2012]. Bu laboratuvarında, diğer bir üropatojen olan *S. saprophyticus* bakterisinden PtaI geni (*eutD*) klonlanıp, *E. coli*'de rekombinant olarak üretilip biyokimyasal özellikleri ve kinetik mekanizması aydınlatılmıştır [Yıldız, 2011].

Geobacillus (eski ismi *Bacilli*) çok çeşitli alt türleri olan ve bazı alt türleri ekstrem koşullarda (çöllerde, çok sıcak termal sularda, kutuplarda, okyanus diblerinde) yaşayabilen bir bakteri sınıfıdır. Bu hücreler ekstrem iklim koşullarına adapte oldukları için, onlardan elde edilen enzimler de geniş aralıkta, ekstrem koşullarda olağan özellikler gösterir [Alkan et al., 1997], [Bora et al., 2008]. *G. kaustophilus*, Pasifik Okyanusu'nun en derin çukuru olan Mariana Trench'in dib noktasından alınan tortu (sediment) örneklerinden izole edilmiştir; optimal büyüme sıcaklığı 60 °C olarak belirlenmiş olup, 74 °C'ye kadar büyüme gösterebilmektedir [www.ncbi.nlm.nih.gov]. *Geobacillus* sınıfına ait türler için yapılan çalışmalar

neticesinde geni pH aralı ında (pH 2-12), geni sıcaklık aralı ında (5-78 °C) ve geni tuz oranında (%0-30) ya ayabildikleri görülmü tür [Takami et al., 2004].

Bu özelliklerinden dolayı bu bakterilerden elde edilen enzimler biyoteknolojik alanda kullanılabilir potansiyele sahiptirler.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve eri i

Bu tez çalı masında, *G. kaustophilus* genomundan PtaI'i kodlayan *eutD* geninin klonlanıp, enzimin *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesi ve biyokimyasal özelliklerinin aydınlatılması amaçlanmı tür.

Literatürde *G. kaustophilus* Pta üzerine yapılmı herhangi bir çalı ma henüz yoktur. *G. kaustophilus* Pta'nın karakterizasyonunun belirlenmesi ile literatürdeki bo lu un doldurulması ve sonraki çalı malara ı ık tutması yönünden katkısı olacaktır. Özellikle proteinlerde yapı ve fonksiyon çalı maları, daha sonra olası tıbbi alanda kullanımına açıklık getirilebilecek çalı malara temel te kil etmektedir.

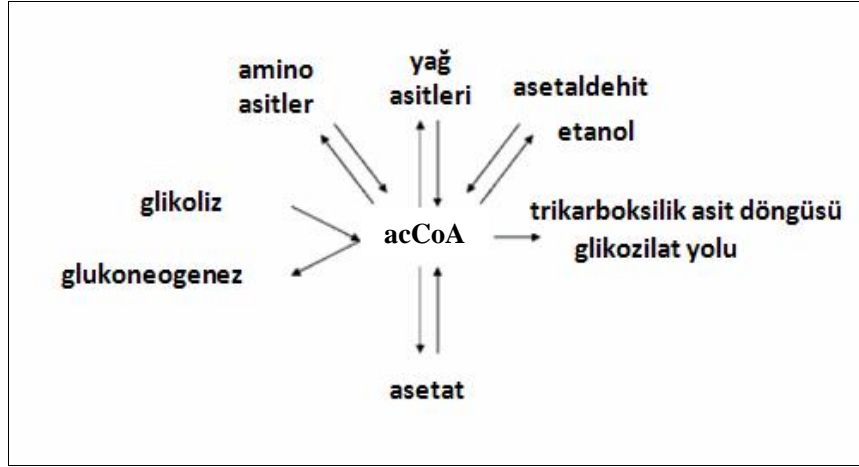
Laboratuvarımızda Pta, pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi (PDC) aktivite ölçümlerinde, asetil-CoA/CoA rejenerasyonunda kullanılmaktadır. Daha önce, bu deneylerde S GMA'dan satın aldı ımız Pta kullanılmaktaydı. Ancak bu enzim hem pahalı hem de aktivitesinin dü ük olması sebebiyle ekonomik de ildi. Rekombinant olarak elde etti imiz Pta bu ba lamda çok daha ekonomik olmaktadır. Ayrıca, asetil-CoA/CoA rejenerasyonu gerektiren di er biyoteknolojik alanlarda da kullanım potansiyeli vardır.

Bu alı mada, *G. kaustophilus* bakterisinde bulunan dizi benzerli i sebebi ile Fosfotransasetilaz geni (*EutD*) oldu u tahmin edilen gen, *pET28a(+)* vektörüne aktarılarak klonlanmı , Ni-afiniti kolonu ile safla tırlmı ve K_m , k_{cat} de erleri hesaplanmı , optimum pH ve sıcaklık de erleri bulunarak e itli tuzların ve metabolitlerin aktiviteye olan etkileri izlenerek karakterize edilmi tür.

2. KONU LE LG L ÇALI MALAR

2.1. Asetat Metabolizması

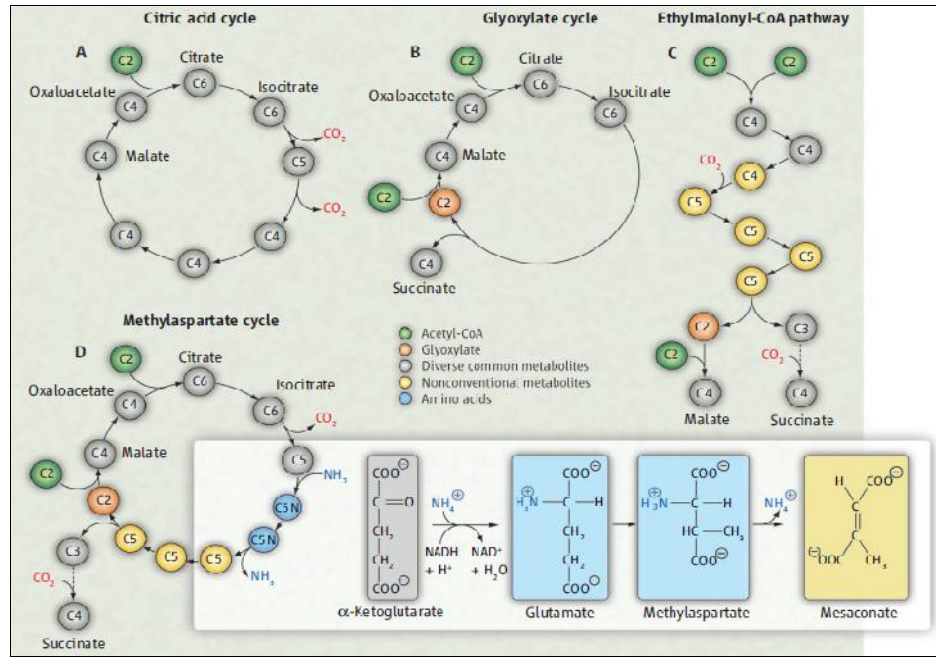
Asetat Metabolizması bile enleri ve ara ürünleri 1940'ların ba larında ke fedilmi ve 1950 yılından sonra karakterize çalı maları ba lanmı tır. Günümüzde asetil-CoA olarak bilinen aktive edilmi asetatin merkez metabolizmanın dönüm noktasında yer alan yüksek enerjili ara ürün oldu u bilinmektedir (ekil 2.1) [Barnard et al., 2004], [Bentley, 2004], [Kennedy, 2001], [Semenza, 2001], [Wolfe, 2005].



ekil 2.1: Asetil-CoA merkez metabolizmanın dönüm noktasında yer alan yüksek enerjili ara ürün.

1990'ların ba larında asetat metabolizması yeniden ilgi oda ı olmu tur. Bu cezbedici alanda daha çok asetil-fosfat üzerine yo unla ılmı tır. Asetil-fosfat, asetat birikim yolunun global sinyal fonksiyonuna sahip yüksek enerjili ara ürünüdür [McCleary et al., 1993], [Wanner, 1993], [Wolfe, 2005]. Günümüz çalı maları gösteriyor ki; asetil-fosfat, nitrojen özümsemesi, ozmoregulasyon, kamçı biogenezi, pilus toplaması, kapsül biyosentezi, biofilm geli tirme ve patojenezinde etkili oldu u kadar, çe itli düzenleyici hücresel i levlerde de önemli görevlere sahiptir [Bang et al., 2000], [Bang et al., 2002], [Heyde et al., 2000], [Liu et al., 2001], [Ninfa et al., 2000], [Pericone et al., 2003], [Prohinar et al., 2002], [Wolfe et al., 2003].

Asetil-CoA, sitrik asit döngüsü ve glukoz sentezi ba ta olmak üzere sisteme karbon sa layan önemli bir metabolik moleküldür. Eksikli i veya yetersizli inde tüm metabolik faaliyetler zarar görür [Kornberg et al., 1957]. Bitki ve bazı bakteriler, mantarlar ve omurgasızlar sitrik asit döngüsünün farklı formlarını kullanarak önemli reaksiyonlarında kullanılmak üzere asetil-CoA kullanırlar. Bunun için ekil 2.2’de kullanılan yollar gösterilmi tir [Ensign, 2011]. Böylece her canlı zor çevresel artlarda dahi ya amsal faaliyetlerini sürdürmek için bu enerji yollarından kendi için uygun olanını tercih eder [Khomyakova et al., 2011], [Ensign, 2011].



ekil 2.2: Asetat asimilasyonundaki metabolik yollar. Birden fazla enzim içeren adımlar ve ara basamaklar kesikli oklar ile gösterilmi tir. (D) Geni letilmi bölge azotlu bile ikler içeren reaksiyonları gösterir.

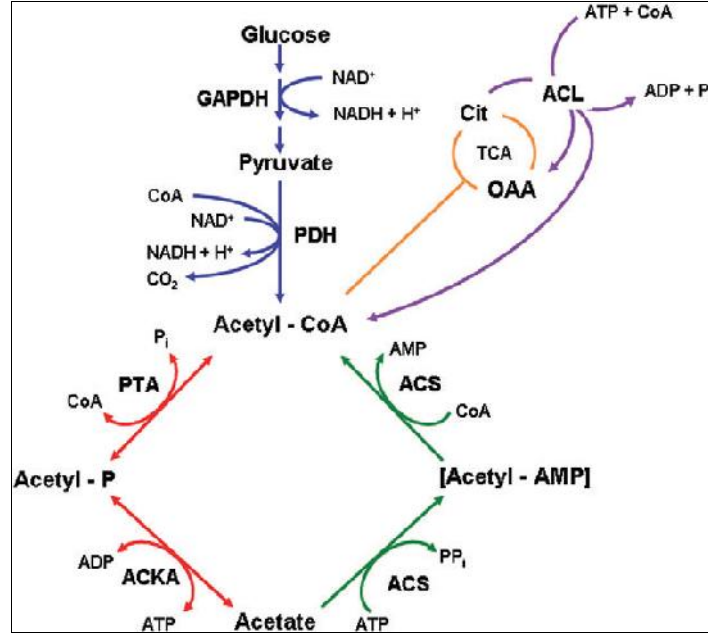
S. enterica'da asetat/propionat kinaz ve Pta aktiviteleri, etanolamin ve 1,2-propanediol katabolizması ile ili kilidir [Clark and Cronan, 1996], [Palacios, 2003], [Brinsmade, 2004]. Halofilik mikroorganizmalardan Archaea metilaspartat döngüsünde amonyak bile iklerini kullanarak zor çevresel artlara uyum sa lamaktadır [Ensign, 2011].

2.1.1. Asetat Oluşum Evreleri

Hücrenin çevreye asetat salgılaması olarak bilinen asetojenez, pirüvatı asetil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli olan CoA'nın geri dönüşümü ve glikoliz tarafından tüketilen NAD⁺'in yeniden üretilmesi gerektirir.

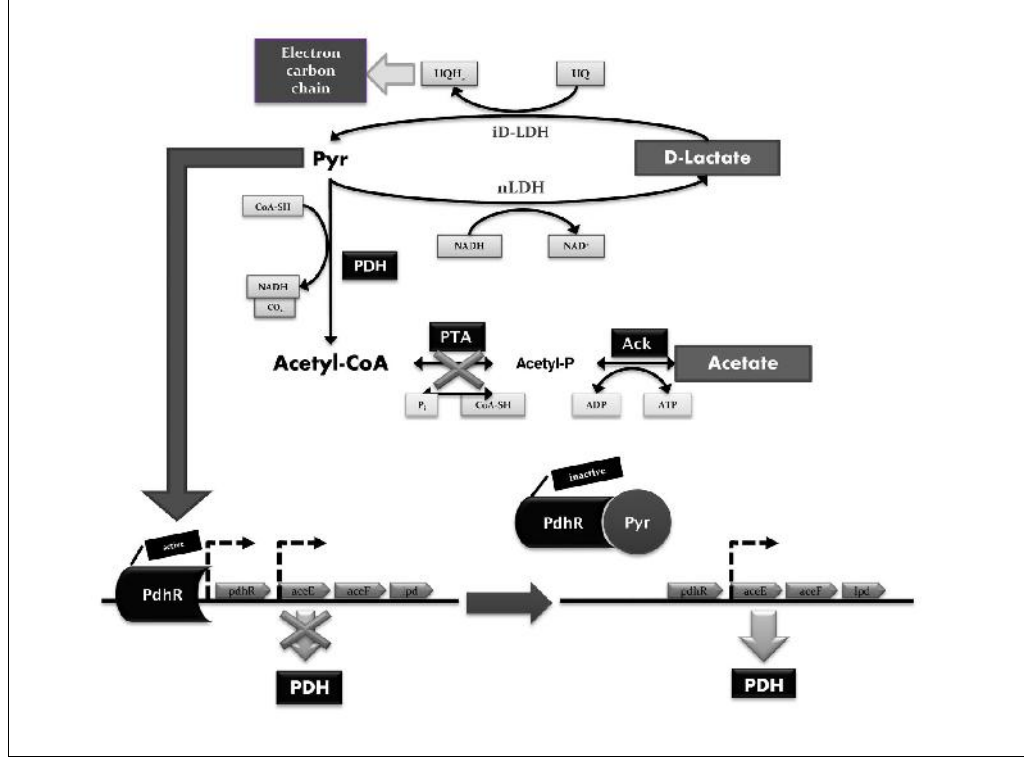
Asetojenez; bütün TCA döngüsü tamamlanmadıkça zaman zaman, hücredeki karbon akışı, hücrenin veya diğer merkez metabolik yolların kapasitesini aştıkça zaman zaman olur [Chang et al., 1999], [el-Mansi and Holms, 1989], [Farmer and Liao, 1997], [Holms, 1996], [Holms, 1986], [Kessler and Knappe, 1996], [Lee, 1996], [Majewski and Domach, 1990], [Rossman et al., 1991], [Varma and Paulson, 1994], [Xu et al., 1999]. Böylece, asetat salgılaması, karıkkasit fermentasyonu boyunca anaerobik şekilde olur [Bock and Sawers, 1996]. Bunun yanı sıra asetojenez, hücre; solunumunu inhibe eden, aerobik glukoz varlığında olur [Holms, 1996], [Holms, 1986], bu davranışa Crabtree etkisi denmektedir [Crabtree, 1929], [Doelle et al., 1982], [Luli and Strohl, 1990], [Rinas et al., 1989]. Asetojenez, "yüksek akış" metabolizmanın bir sonucu olarak düşünülse de, son zamanlarda yayınlanan çalışmalarda, asetat salınımının; TCA döngüsünün 2-ketoglutarat dehidrogenaz (KGDH) tarafından, daha yüksek hücre yoğunluğuna daha hızlı ulaşmaya izin verdiği için olduğu rapor edilmektedir [El-Mansi, 2004].

Asetat yıkımı *E. coli*'de Pta (asetil-CoA: Pi asetiltransferaz; EC 2.3.1.8) [Matsuyama et al., 1994] ve AckA (ATP: asetat fosfotransferaz; EC 2.7.2.1) [Lee et al., 1990] enzimleri tarafından katalizlenmektedir. AckA, asetil-fosfat ve ADP'yi, asetat ve ATP'ye geri dönüşümlü olarak katalizlerken; Pta, asetil-CoA ve inorganik fosfatı, asetil-fosfat ve CoA-SH'a geri dönüşümlü olarak katalizlemektedir (ekil 2.3) [Rose et al., 1954], [Wolfe, 2008], [I. Hu et al, 2010]. Bu sonucu olarakta; asetat yıkımı karbon ve fosforları enerji metabolizması ile bir araya getirmektedir [Wanner, 1992], [Wanner, 1996]. Bu yolak propionil-CoA ve propionat arasında dönüşümü de sağlar [Rose et al., 1954].



ekil 2.3: Merkez metabolik yollar. Glikoliz metabolizması (mavi), NAD⁺ ba ımlı bir ekilde glukoz asetil-CoA dönü üümü. PTA-AckA yolu (kırmızı), asetat ba kala ması gerektirir. Enzim PTA (phosphotransacetylase) asetil-CoA ve inorganik fosfatı (Pi) CoA dönü türür ve yüksek enerjili asetil fosfat ara yolunu olu turur. Enzim ACKA (asetat kinaz) asetil- P ve ADP kullanarak asetat ve ATP dönü türür. Asetat hücre yapısında serbestçe yayılır. Asetat asimilasyon (ye il) yüksek afiniteli ACS enzim (asetil -CoA sentetaz) gerektirir. Asetil-CoA takviyesi NAD⁺ ba ımlı trikarboksilik asit (TCA) döngüsü (turuncu). ATP-sitrat liyaz (ACL) ile ATP ve CoA kullanılarak TCA döngüsü içinde sitrat oksaloasetat (OAA), ADP, Pi ve asetil-CoA dönü türür (mor). GAPDH, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz, PDH, pirüvat dehidrogenaz.

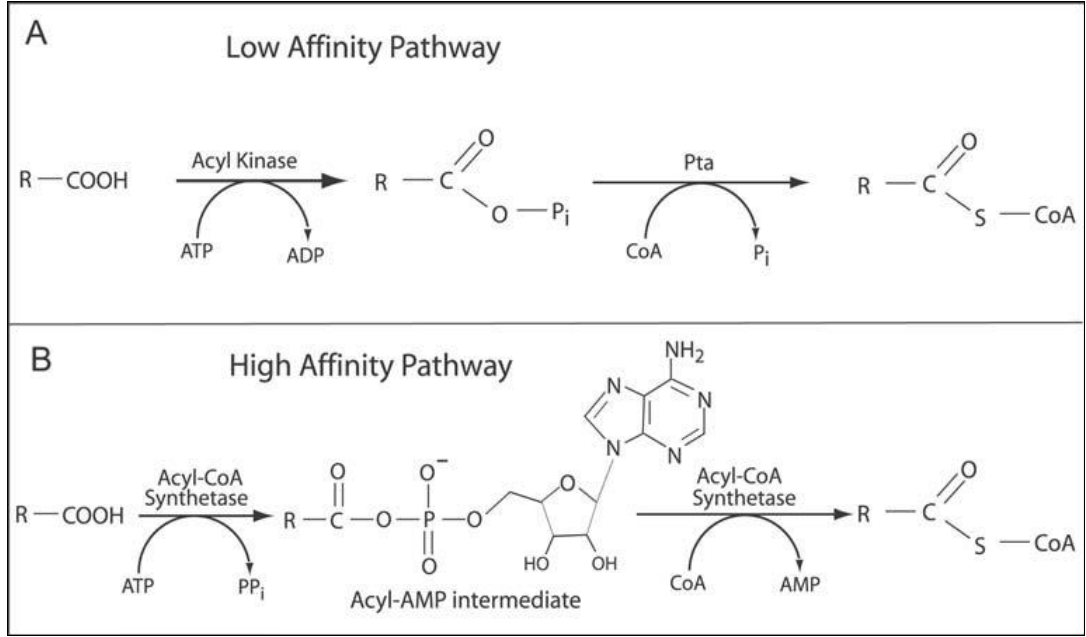
Metabolik sistemden Pta'nın çıkartılması ile yeni bir metabolik düzenlenme meydana gelir (ekil 2.4). Merkezi metabolizmasında ilgili genlerin ve enzim faaliyetlerinin analizi pirüvat/asetil-CoA birikimine neden olması ile bu düzenlenmelerin aydınlatılmasına ık tutmu tur. Genel olarak, gen ifadesi, enzim aktiviteleri ve metabolik verileri iyi ifade edilir. Ancak, düzenlenmeler tüm hücrelerde aynı sonuçları vermeyebilir. PDH (pirüvat dehidrogenaz) kompleksi, aynı operon içinde bulunan üç yapısal gen (aceEF, lpdA ve bir regülatör (pdhR) geni) tarafından kodlanır. Bu operon, karma ık transkripsiyonel bir düzenlemeye sahiptir [Cunningham et. al., 1998], [Spencer et.al., 1985]. PDH aktivitesi NADH [Hansen et. al., 1966] ve asetil-CoA [Schwartz et. al., 1970] düzenlenmesine ba lıdır. Pirüvat birikiminin bir sonucu olan asetil-CoA birikimi ile PDH kompleksi inhibe olur. PdhR'nin PDH operonun aceEF ve lpdA promoter gruplarına ba lanmasını önledi i bilinmektedir [Quail et. al., 1995], [Saier et al., 1996], [Castaño-Cerezo et al., 2009].



ekil 2.4: Pta çıkartılma sonrası *E. coli*'de metabolik a da meydana gelen de i iklikler. Pta çıkarılmasının sonucu olarak Laktat üretilir ve laktat dehidrogenaz, nLDH ve iDLDH birle ik etkisi ile ATP üretilir. Ayrıca, pirüüat birikimi sonucu PDH operon aktive olacaktır. Katılan enzimler Ack, asetat kinaz; PTA, phosphotransacetylase; PDH (aceEF; LPD) pirüvat dehidrogenaz gösterilmektedir.

2.1.2. Asetat Metabolizmasında Pta Enziminin Önemi

Do ada hemen hemen tüm canlılar metabolik i levlerinde asetatu kullanırlar. Do ada bol bulunan kısa zincirli bir ya asididir. Hayvan ve insanlarda sindirim yolunda ve toprakta asetat konsantrasyonu çok yüksek seviyelerde bulunabilir [Buckel, 1999], [Cummings et al., 1987]. Bütün hücreler asetatu metabolik i levlerinde kullanmadan önce aktive ederler. Prokaryotik hücreler asetatu asetil-CoA'a çevirmekte iki farklı yol izlemi lerdir (ekil 2.5) [Starai et al., 2004].



ekil 2.5: Asetatın dönü üm yolları. Dü ük afinite yolak >30 mM asetat konsantrasyonu; yüksek afinite yolak <10 mM asetat konsantrasyonu ifade eder.

Prokaryotlar, bu yolları kombine ederek, çevredeki asetatin konsantrasyonunu önemsemeden karbon ve enerji kayna ı olarak kullanmaktadırlar. Dü ük afiniteli yolakta asetate kinaz/fosfotransasetilaz enzimleri görev almaktadır. Asetatı asetil-fosfat ile asetil- CoA'ya aktive etmektedirler [Brown et al., 1977]. Ack/Pta sistemi çevrede yüksek konsantrasyonda asetate oldu u zaman (>30 mM) prokaryotlar tarafından kullanılmaktadır. Birçok bakteri, hücrede kullanılan ve aynı zamanda olu an CoA seviyelerini sabit tutmak ve elde ettikleri enerjiyi korumak için Ack/Pta'nın geri dönü ebilirli ini kullanmaktadırlar. Asetil-fosfat; enerjiyi korumak için yaygın olarak kullanılmasının yanında ayrıca, iki bile enli düzenleyici sistemlerde gen ekspresyonunun düzenlenmesine de yardımcı olmaktadır [McCleary et al., 1993], [McCleary et al., 1994], [Bentley, 2000], [Wolfe et al., 2003], [Wanner et al., 1992].

2.1.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Pta Enzimi ve Karşılaştırılması

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen Pta'lar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, Pta'nın iki farklı türünün olduğu ortaya çıkmıştır (PtaI ve PtaII). PtaI sınıfı *eutD* geniyle kodlanmıştır ve yaklaşık 350 rezidüye sahiptir. PtaII sınıfı ise *pta* geniyle kodlanmıştır ve yaklaşık 700 rezidüden meydana gelmiştir [Lundie and Ferry, 1989], [Campos-Bermudez et al., 2010]. Bazı mikroorganizmalar bu genlerden birini içerirken bazıları ise her ikisini de içermektedir. PtaII'nin C-terminal domaini katalitik domainidir ve aynı zamanda PtaI ile homoloji göstermektedir. Pta'nın N-terminal domaini regülatör domain olması sebebiyle NADH, ATP ve pirüvat gibi allosterik efektörlerin aktiviteye etkisinde rol oynar [Brinsmade and Escalante-Semerena, 2007], [Campos-Bermudez et al., 2010]. PtaI sınıfından olan *B. subtilis* adenin nükleotidleri, ATP, AMP ve ADP tarafından inhibe edilirken pirüvat ve NADH tarafından inhibe edilmediği rapor edilmiştir [Thomas and Hoch, 1973]. Yıldız ve arkadaşları üropatojen olan *S. saprophyticus* bakteri genomundan klonlayıp rekombinant olarak elde ettikleri PtaI'nin ATP tarafından inhibe edilirken pirüvat ve NADH tarafından inhibe edilmediği rapor etmişlerdir [Yıldız vd., 2012].

M. thermophila, *B. subtilis* ve *S. pyogenes* bakterilerinin sahip olduğu PtaI kristal yapıları aydınlatılmıştır. Fakat PtaII'nin kristal yapısı henüz netlik kazanmamıştır [Iyer et al., 2004], [Xu et al., 2005]. *B. subtilis* ve *S. pyogenes* genomları asetat kinaz (*ackA*) genine sahiptirler; fakat *pta* geni bulundurmazlar. *ackA* ve *eutD* genleri kromozomda uzak yerlerde bulunmaktadır [Presecan-Siedel et al., 1999], [Shin and Park, 1999]. Ayrıca *pta* geni *ackA* geniyle birlikte *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* kromozomlarında tek bir operon olarak yer almıştır [Brinsmade and Escalante-Semerena, 2004]. *S. enterica* ve *E. coli*'den klonlanıp karakterize edilen *eutD* geninin yüksek Pta aktivitesi bulunmaktadır [Brinsmade and Escalante-Semerena, 2004], [Iyer et al., 2004].

imdiye kadar PtaI kristal yapıları aydınlatılmış *B. subtilis*, *M. thermophila* ve *S. pyogenes*'in homodimer yapıda oldukları ve benzer katlanma yaptıkları görülmüştür. BLAST ara tirmalarına göre Pta üzerine yapılan çalı malardan biriside *S. Saprophyticus* Pta'dır. *S. saprophyticus* bakterisinden elde edilen Pta aminoasit dizisi ile *M. thermophila*, *S. pyogenes* ve *B. Subtilis* bakterilerinden elde edilen Pta'ların aminoasit dizileri kar ıla tırıldı ında sırası ile % 45, % 55, % 67 oranında dizi benzerli i gösterdi i tespit edilmiştir (ekil 2.6). Yapı ve fonksiyon için en yakın benzerli e sahip olan *B. subtilis* Pta'sıdır [Yıldız vd., 2012].

	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\alpha 2$	$\beta 2$	$\alpha 3$	
<i>S. saprophyticus</i>	---MTLLDVLQEKLTGKNVKIVLP	EGEDE	RVLEAATQLQGTDYVSPILLGNESNIKALAS			57
<i>B. subtilis</i>	--MADLFSTVQEKVAGKDVKIVFP	EGLDER	ILEAVSKLAGNKVNLNPIVIGNENEIQAKAK			58
<i>S. pyogenes</i>	MSIRSLFGLREKILGKNMKIVFP	EGNDE	RVVRAAARLKFEGLLEPIILGQSEEVVRLNLT			60
<i>M. thermophila</i>	--MVTFLKISERAKKLNKTIALP	ETEDI	RTLQAAKILERGIADIIVLVGNEADIKALAG			58
	$\beta 3$	$\beta 4$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	
<i>S. saprophyticus</i>	DKGLEISDLEIIDPETSSELKQELVTAFFVER	RKKGK	-ATEEQAQEMLKDVNYFGTMLVYTGK			116
<i>B. subtilis</i>	ELNLTLLGGVKIYDPHTYEGMEDLVQAFVER	RKKGK	-ATEEQARKALLDENYFGTMLVYKGL			117
<i>S. pyogenes</i>	KLGFADQDYTTIINPNEYADFDKMKAEAFVDI	RKKGK	-ATLEADADKMLRDVNYFGVMLVKMGL			119
<i>M. thermophila</i>	--DLDSLKAKIVDPKTYEKKDEYINAFYEL	RKHKGI	TLNAAEIMSDYVYFAVMMAKLGE			116
	$\beta 5$	$\alpha 7$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$	
<i>S. saprophyticus</i>	AEGLVSGAAHSTGDTV	VRPALQII	IKTKPGVSKTSGIFFMIK	----D--DKQYIFGDC	AINP	170
<i>B. subtilis</i>	ADGLVSGAAHSTADTV	VRPALQII	IKTKEGVKKTSGVFIMAR	----G--EEQYVVFADCA	INI	171
<i>S. pyogenes</i>	ADGMVSGAIHSTADTV	VRPALQII	IKTKPGISRTSGVFLMNR	----ENTSERVVFADCA	INI	175
<i>M. thermophila</i>	VDGVSVSGAAHSSSDTL	LRPAVQIV	TKAKGAALASAFFTII	SVPDCEYSGSDGTF	FLFADSGMVE	176
	$\alpha 8$	$\beta 9$	$\alpha 9$			
<i>S. saprophyticus</i>	TLEAQDLAEIAVESAK	SAKSF	GMSP-RVAMLSFS	TKGSAKS	DDVEKVATAVNLAQEKIEA	229
<i>B. subtilis</i>	APDSQDLAEIAIESANT	AKMFDIEP	-RVAMLSFS	TKGSAKS	DETEKVADAVKIAKEKAP-	229
<i>S. pyogenes</i>	DPTAQELAEIAVNTAE	TAKIFDIDP	-KIAMLSFS	TKGSGKAPQVDK	VREATEIAKGLNP-	233
<i>M. thermophila</i>	MPSVEDVANIAVISA	KTFELLVQDVP	KVAMLSYS	TKGSAKSKL	TEATTIASTKLAQELAP-	235
	$\alpha 10$	$\alpha 11$	$\beta 10$	$\alpha 12$		
<i>S. saprophyticus</i>	DHLEDVVVDGEFQ	FAAIVPEVAKK	KAPDAKIQQDANVVFVPSLEAGNIGYKIAQRLGEF			289
<i>B. subtilis</i>	----ELTLDGEFQ	FAAFVPSVAEKK	KAPDSEIKGDANVVFVPSLEAGNIGYKIAQRLGNF			285
<i>S. pyogenes</i>	----DLALDGEFQ	FAAFVPE	TAAIKAPDSAVAGQANTFIFPDLQSGNIGYKIAQRLGMF			289
<i>M. thermophila</i>	----DIAIDGELQ	VAIVPKVAAS	KAPGSPVAGKANVFI	FDPDLNCGNIA	YKIAQRLAKA	291
	$\beta 11$	$\beta 12$	$\beta 13$	$\alpha 13$		
<i>S. saprophyticus</i>	DAVGPIV	IQGLNSPVNDL	SRGCSKEDVYNLSIITAAQSLQ---			328
<i>B. subtilis</i>	EAVGPIV	IQGLNMPVNDL	SRGCNAEDVYNLALITAAQAL----			323
<i>S. pyogenes</i>	DAIGPIV	IQGLNKPVNDL	SRGSSAEDIYKLAIITAAQAIESQG			331
<i>M. thermophila</i>	EAVGPIV	IQGLAKPINDL	SRGCSDEDIVGVAVAITCVQAAAQDK			333

ekil 2.6: *S. saprophyticus* Pta'nın *M. thermophila*, *S. pyogens* ve *B. subtilis* Pta'larıyla dizi uyumu. Dizilerin üzerindeki mavi bar ve kırmızı oklar *B. subtilis* Pta'nın sırasıyla -heliks ve -plakası. Mor ve turuncu gösterilen rezidüleri Iyer ve arkadaşları tarafından yapılan 32 prokaryotik Pta dizisi boyunca sıralanmasına dayanan korunmuş rezidülerdir.

Farklı organizmalardan elde edilen Pta enziminin moleküler a ırlıkları, spesifik aktivite, K_m de erleri ile bazı metallere kar ı olan özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir [Lundie and Ferry, 1989].

Tablo 2.1: Farklı kaynaklardan elde edilen Pta'ın özelliklerinin karşılaştırılması.

Organizma	M _r (kDa)	Spesifik Aktivite (Unit/mg) ^a	K _m CoAS	K _m Ac-P _i	Metal Etkileri
<i>Bacillus subtilis</i>	90	1.371	0.096	0.480	K ⁺ , NH ₄ uyarır; Mn ²⁺ ve Ca ²⁺ inhibe eder.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NR ^b	8-12 ^c	NR ^b	NR ^b	K ⁺ uyarır; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>C. acidiurici</i>	63-75	710	NR ^b	NR ^b	Fe ²⁺ gerekli; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>C. kluyveri</i>	60	196	0.12	0.6-1.3	K ⁺ , NH ₄ gerekli; Na ⁺ , Li ⁺ inhibe eder.
<i>C. thermoacetica</i>	88 ^d	123	NR ^b	NR ^b	Mg ²⁺ uyarır; AsO ₄ ³⁻ birbirinden ayırır.
<i>E. coli</i>	120-150	333	0.32	3	(NH ₄) ₂ SO ₄ , KPO ₄ inhibe eder.
<i>Lactobacillus fermenti</i>	68	1.124	0.090	NR ^b	K ⁺ , NH ₄ , Rb ⁺ uyarır; Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ ve Li ⁺ inhibe eder.
<i>M. thermophila</i>	43-52	2.496	0.090	0.170	K ⁺ , NH ₄ gerekli; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>R. palustris</i>	55-57	32	0.15	4.70	K ⁺ , NH ₄ uyarır; Na ⁺ , Li ⁺ ve Mg ²⁺ inhibe eder.
<i>V. alcalescens</i>	75-85 ^e	812	NR ^b	NR ^b	Mg ²⁺ ve ATP ile inhibisyon geri çevrilir.

^a Bir unite, dakikada oluşan asetil-CoA'nın 1 μmol'üdür.

^b Değerler rapor edilmemiştir.

^c Bir ünite, dakikada oluşan 1 μmol asetil-CoA'dır, hücre ekstratındaki aktivite.

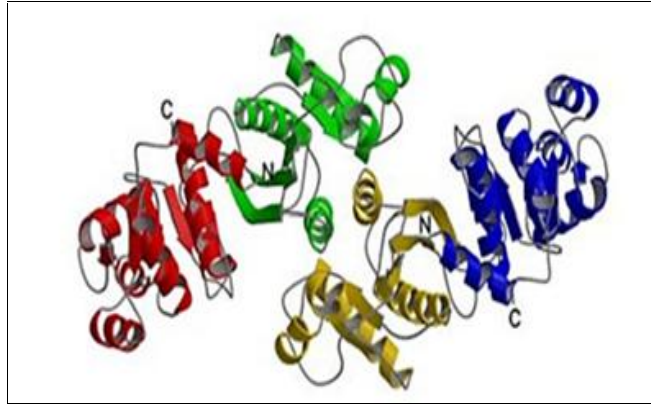
^d Alt ünite moleküler ağırlığı 22.000 Da homotetramer olarak saflaştırılmış enzim.

^e Alt ünite moleküler ağırlığı 32.000-40.000 Da olan dimer olarak saflaştırılan enzim.

2.2. Pta Enzimi

2.2.1. Yapı Fonksiyon Çalışmaları

Pta enzimlerinin kristalize edilme çalışmalarına 2001 yılında Xu ve arkadaşlarının *S. pyogenes* Pta enzimini kristalize etmesi ile başlanmıştır. Bunu 2003 yılında Iyer ve arkadaşlarının *M. thermophila* Pta enzimini kristalize etmesi izlemiştir. Kristalize edilen bu Pta enzimi üzerine 2005 yılında Lawrence ve arkadaşları tarafından yapı fonksiyon belirleme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada Pta enzimi için ilk kez çalışma mekanizması önerilmiştir (ekil 2.9). 2005 yılında Xu ve arkadaşları *B. subtilis*'ten elde ettikleri fosfotransasetilazı kristalize etmişler ve Pta'nın yapı, fonksiyon çalışmalarına ilk tutmuşlardır (ekil 2.7) [Xu et al., 2005].

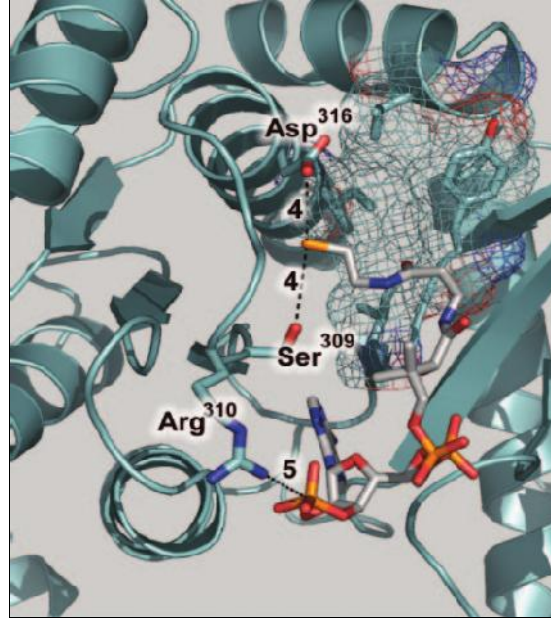


ekil 2.7: *B. subtilis*'ten elde edilen *eutD* geninin yapısı. *B. Subtilis*'ten elde edilen dimer Pta'nın yapısı. Monomerlerden biri **Kırmızı** renkli domain I ve **yeşil** renkli domain II diğer monomer domain I (**sarı**) ve domain II (**mavi**) ile gösterilmektedir.

1997 yılında, Madeline ve ekibi *M. thermophila*'dan elde ettikleri fosfotransasetilazın arginin ve sistein rezidüleri üzerine çalışmışlardır. Yapılan bu çalışmada dizide yer alan Cys¹⁵⁹, Cys²⁷⁷, Cys³¹², Cys³²⁵ rezidülerini alanin ile değiştirmişler ve enzim için kinetik parametrelerin takibini yapmışlardır. Bu çalışmada sonucunda enzim aktivitesi ve enzim kararlılığı için sadece Cys¹⁵⁹ rezidüsünün gerekli olduğu belirlenmiştir. Cys¹⁵⁹ rezidüsünün serin ile değiştirildiği zaman aktivitede önemli miktarda artış olduğu görülmüştür. Cys³¹² rezidüsünün kataliz için gerekli olmadığı ancak enzimin aktif bölgesinde yer aldığı belirtilmiştir.

Pta yapısında bulunan Arg²⁸, Arg⁸⁷, Arg¹³³, Arg²⁸⁷, Arg³¹⁰ rezidüleri glutamin ile yerleri değiştirilmi ve yapılan kinetik çalışmaları sonucunda Arg³¹⁰ rezidüsünün enzim aktivitesi için gerekli olduğu belirlenmiştir. Katalitik öneme sahip Arg³¹⁰ rezidüsünün Pta'nın aktif bölgesinde bulunarak asetil fosfatın fosfat grubuyla etkileşim içinde olduğu, metil grubunun ise Phe⁴, Leu⁵, Phe²⁹⁴, Ile²⁹⁷ ve Ile³²³ rezidüleri ile hidrofobik etkileşim içinde olduğu ifade edilmiştir [Iyer and Ferry, 2001]. Arg⁸⁷ rezidüsünün CoA'nın 3'-fosfatıyla tuz köprüsü oluştururken Arg¹³³ rezidüsünün CoA'nın 5'-fosfatıyla etkileşime girdiği vurgulanmıştır [Iyer and Ferry, 2001]. Arg⁸⁷ ve Arg¹³³ rezidüsünün CoA ile etkileşim içinde olduğu daha sonra yapılan çalışmalarda lizin, alanin, glutamik asit ve glutamin ile yer değiştirilmi ve her bir yer değiştirme sonunda yapılan kinetik analizler ile ispatlanmıştır [Iyer and Ferry, 2001].

Pta monomerinin ikincil yapı elemanları yan zincirleri ve aktif bölge rezidüleri şekil 2.8'de gösterilmiştir. Ser³⁰⁹ CoA sülfhidril gruptan 4Å uzakta bulunur ve bu nedenle madde katalizörü olarak katılmaz. CoA'nın katalitik bölgeye bağlanması muhtemeldir. Ser³⁰⁹, Arg³¹⁰, Asp³¹⁶ rezidüleri CoA çevresine yakın konumlanmaları sebebiyle katalitik potansiyel rezidüleri olduğu belirtilmiştir. Arg³¹⁰ tam olarak 32 pta dizisi ile korunmaktadır. R310Q mutasyonu ile katalitik bölgede rol oynadığı saptanmıştır. Ayrıca farklı yan zincirlerdeki yönelimler ile konformasyonel esneklikte de rol aldığı görülmektedir. Asetil fosfatın pozisyonunu optimize etmek ve CoA'nın karbonil gruplarına nükleofilik atak yapmaktadır. Ser³⁰⁹ doğrudan bağlayıcı görevinde değildir. Nükleofil olarak görev yapar ve hidrojen bağı oluşturur. Ancak yine de tam olarak fonksiyonu açıklanamıyor. Asp³¹⁶ katalitik olarak görev aldığı mutasyonlarla desteklenmiştir. CoA'nın tiyol grubuna girişimde bulunur. Tiyol grubu da doğrudan asetil fosfatın karbonil karbonuna atakta bulunur [Lawrence et al., 2005].

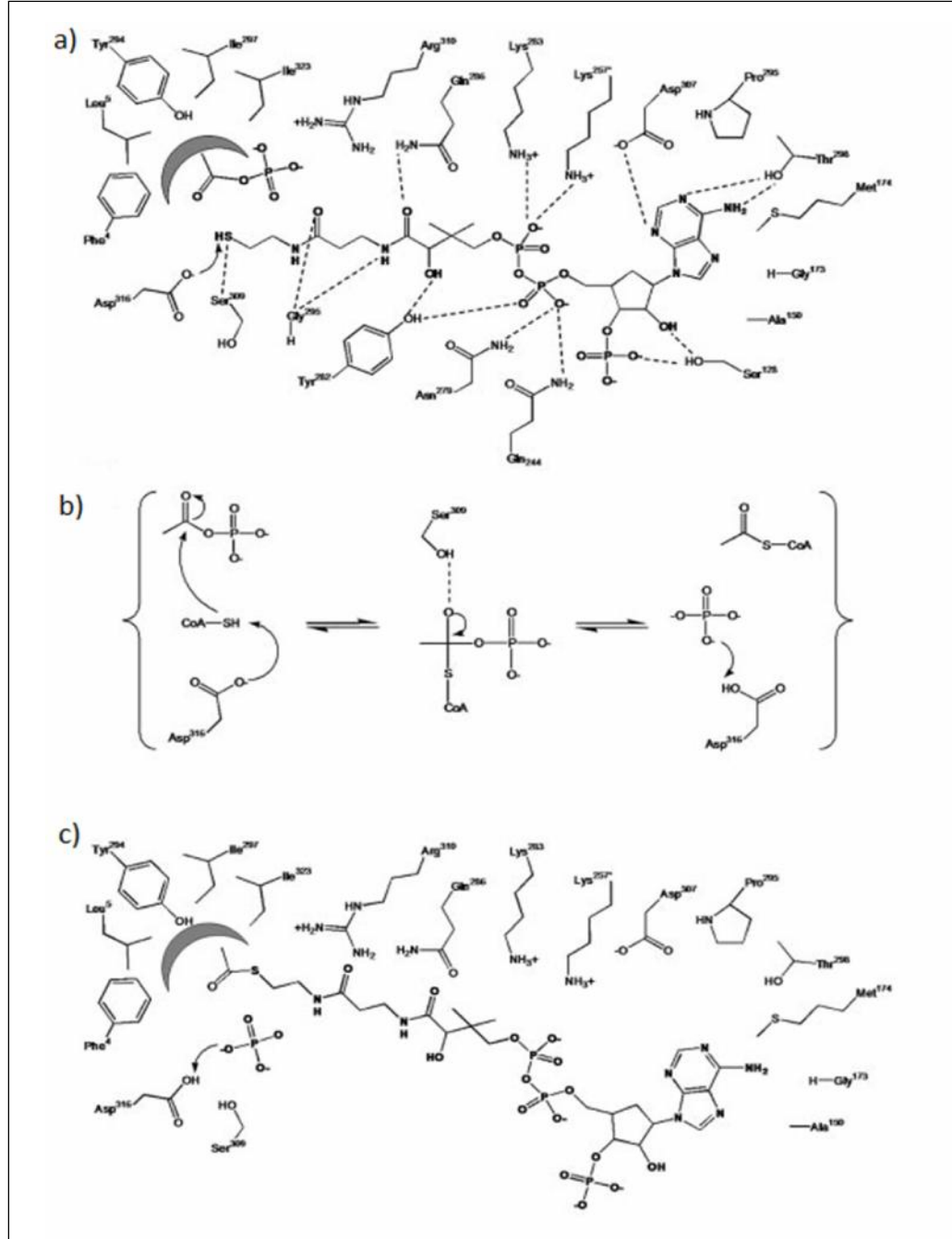


ekil 2.8: *EutD* gen monomerinin aktif bölgesi.

Fosfotransasetilaz için önerilen katalitik mekanizma aminoasitlerin yerlerinin de i tirilmesi sonucunda elde edilen kinetik bilgiler, enzimin kristal yapılarından elde edilen enzim aktif bölge bilgileri ve enzim için yapılan kinetik ve mekanizma çalı maları verileri kullanılmı tır.

ekil 2.9'da adenin halkası ile Asp³⁰⁷, Pro²⁹⁶, Gly¹⁷³, Ala¹⁵⁰ ve Ser¹⁷⁸ rezidülerinin olu turdu u grupta kalan CoA arasındaki katalitik ili ki ve enzim ile CoA arasındaki hidrojen ba ları görülmektedir. Öne sürülen bu mekanizma baz katalizli gerçekte mektedir. Asp³¹⁶ rezidüsünün CoA'nın sülfidril grubunun protonunu koparmasıyla asetil fosfatın karbonil karbonuna do rudan atak yapılması sa lanarak asetil-CoA olu umu gerçekte mektedir. Daha sonra olu an PO₄³⁻ iyonu Asp³¹⁶ rezidüsünden proton kopararak fosfatın negatif yüklerinden biri dengeye ula ır ve protonlanmaya hazır grup haline gelir [Lewendon et al., 1990], [Wu, 2003].

Yapılan çalı malar sonucunda tahmini Pta mekanizması olu turulmu tur. Genetik ve fiziksel çalı malar Pta'nın yaygın etkile imini göstermek için devam etmektedir. Ayrıca spesifik bölgedeki mutasyon çalı maları sürdürülmektedir [Canovas et al., 2009].



ekil 2.9: *M. thermophila* bakterisinden elde edilen Pta'nın katalizlediği reaksiyon için Lewendon ve arkadaşları tarafından önerilen katalitik mekanizma. a) Substratların enzimin aktif bölgesine bağlandığı andaki durumu. b) Negatif yüklü geçişi hali. c) Enzimin aktif bölgesine ürünlerin bağlandığı andaki durumu. Burada Lys²⁵⁷ ve Gln²⁴⁴ arasında meydana gelen hidrojen bağı kesikli çizgiyle gösterilmiştir.

2.2.2. Kinetik Çalışmaları

Kinetik çalışmaları ilk defa 1972 yılında Pelroy ve Whiley tarafından *Viellonella alcalescens*'ten elde edilen Pta üzerine yapılmıştır. *V. alcalescens*'ten elde edilen Pta'nın bütün substratları için Michaelis-Menten kinetik reaksiyonu geri dönüşümlü olarak kataliz ettiğini rapor etmiştir.

Pta tarafından katalizlenen geri reaksiyonun (asetil-CoA + fosfat → asetil-fosfat + CoA) hızının ileri reaksiyonun (asetil-fosfat + CoA → asetil-CoA + fosfat) hızından 6.5 kat daha fazla olduğunu gösterilmiştir. Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun substratları için görünür K_m değerlerini belirlemiştir. Geri reaksiyonun substratları olan asetil-CoA ve fosfat için görünür K_m değerleri sırasıyla 8.6 μ M ve 9.3 mM, ileri reaksiyonun substratları olan CoA ve asetil fosfat'ın görünür K_m değerleri ise sırasıyla 0.33 mM ve 0.59 mM olarak belirlemiştir.

Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun mekanizmasının ürün inhibisyonu deneyleri sonucunda random (rastgele) bi-bi mekanizmasıyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda enzimin adenozin trifosfat (ATP) ve adenozin difosfat (ADP) tarafından inhibe edildiği fakat pirüvat ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid'in (NAD^+) enzim aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığını vurgulanmıştır. Yapılan çalışmada ATP'nin inhibitör türü belirlenmiş ve asetil fosfat için yarı masız inhibitörken CoA için yarı malı inhibitör olduğu bildirilmiştir. ATP ve ADP'nin inhibisyon etkisinin $MgCl_2$ ilavesi ile ortadan kaldırıldığı rapor edilmiştir [Pelroy and Whiteley, 1972].

1973'te Thomas ve Hoch Pta'yı farklı bir organizma olan *B. subtilis*'ten saflaştırmaları ve enzimin moleküler ağırlığını 90 kDa olarak hesaplamışlardır. *B. subtilis*'ten saflaştırılan Pta'nın Mn^{2+} ve Ca^{2+} ile inhibe olurken, K^+ ve NH_4^+ ile aktive edildiği ifade edilmiştir. Pta'nın propiyonil-CoA ve butiril-CoA'yı substrat olarak kullandığını belirtmiş; fakat bu iki substrata olan ilginin asetil-CoA'ya olan ilgiden daha az olduğunu bulunmuştur. Yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda ATP, ADP ve AMP'nin enzimi inhibe ettiğini pirüvat ve indirgenmiş piridin nükleotidlerinin ise herhangi bir etkisinin olmadığını deneylerle ispatlanmıştır. Ayrıca palmitil-CoA'nın CoA için yarı malı inhibitör olduğu gösterilmiştir [Thomas and Hoch, 1973].

Lawrence ve Ferry 2005 yılında Pta'yı *M. thermophila*'dan klonlamış ve moleküler ağırlığını 71 kDa olarak belirlemiştir. Enzimin daha önce çözelti içinde

monomer halde bulundu u belirtilmesine ra men [Latimer and Ferry, 1993] yapılan bu çalı mada enzimin çözeltili içinde dimer halde bulundu u rapor edilmiştir. Pta'nın katalizledi i reaksiyonun mekanizmasını incelenmiş ve ba langıç hızları ölçümleri sonucu reaksiyonun mekanizmasının ping-pong olmadığı bulunmu tur. Yapılan çalı malar sonucunda bulunan Michaelis sabitleri asetil fosfat için 186 μM , CoA için 65 μM , asetil-CoA için 96 μM ve fosfat için 742 μM olarak belirlenmiştir. Ayrıca k_{cat} değeri 1500 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu değerler elde edilen diğer Pta'ların kinetik sabitleriyle benzerlik göstermektedir [Lawrence and Ferry, 2005].

Pta'nın katalizledi i reaksiyonun mekanizmasının random (rastgele) veya order (sıralı) olduğunu belirlemek için *M. thermophila*'dan elde edilen Pta ile ürün inhibisyonu deneyleri yapılmıştır. Deneyler substratlardan birinin konsantrasyonu do ygun ve do ygun olmayan konsantrasyonlarda sabit tutulup diğer substrat ve inhibitörün konsantrasyonu değiştirilerek yapılmıştır. Bu sonuçlar do rultusunda *M. thermophila* Pta'nın katalizledi i reaksiyonun mekanizmasının random (rastgele) bi-bi mekanizması olduğu bulunmu tur [Lawrence and Ferry, 2005].

Yıldız ve arkadaşları üropatojenik bir bakteri olan *S. saprophyticus* genomundan klonlayıp, *E. coli*'de rekombinant olarak ürettikleri PtaI'in kinetik mekanizmasını incelemi lerdir [Yıldız vd., 2012].

İmdiye kadar, sadece *E. coli* ve *S. enterica*'dan elde edilen PtaII'lerin NADH, ATP ve pirüvat tarafından düzenlendi i belirtilmiştir [Brinsmade and Escalante, 2007], [Compos et al., 2010].

İlk kez TCA döngüsünün hız belirleyici enzimlerinden biri olan -ketoglutarat dehidrogenaz kompleksinin (-KGDC) substratı olan -ketoglutarat'ın *S. saprophyticus* Pta aktivitesini ileri ve geri reaksiyonda allosterik olarak inhibe etti i görülmü tür. Ayrıca yapılan çalı malar sonucunda -ketoglutarat inhibisyonunun sigmoidal özellik gösterirken, ATP inhibisyonunun hiperbolik özellik gösterdi i görüldü [Yıldız vd., 2012], [Yıldız, 2011].

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan; Primerler Integrated DNA Technologies, restriksiyon enzimleri BioLabs Inc., ekspresyon vektörü *pET28a(+)* Merck, MOPS sodium salt (M9024), Sodium dodecyl sulfate (L4509), Agarose (A9539), Bradford reagent (SIB6916), Imidazole (I-0125), Potassium chloride (12636), Potassium phosphate (16H1604), Dithiothreitol, Asetyl phosphate (057K5317), Pyruvate (105K0723) ve -Ketoglutarate (105K5304) Sigmadan; ATP (00911EE) Sigma Aldrich, TEMED (1.10732), Triton X-100 (1.08603), Yeast extract granulated (1.03753.0500), Peptone (1.07213.1000), Acrylamide(8.00830.1000) ve Sodium chloride Merck'ten; 5,5'-Dithiobis (2-nitro benzoic acid) Alfa Aesar'dan, IPTG (12992) Qiagen, Asetyl-Coenzyme A trilithium salt Applichem'den; Tris-HCl (648317) Calbiochem'den, Acrylamide:N,N-methylene bis acrylamide (01706), Agar (05040), Kanamycin sulphate (60615), Peptone Fluka'dan; Coenzyme A Trilithium salt Calbiochem'den temin edilip çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

nolab WTW Series pH ölçer, Heidolph MR 3004 safety manyetik karıştırıcı, Varioklav Typ 300 Otoklav, Sartorius Basic marka tartı, Mikro 120 Hettich Zentrifugen santrifüj, Heidolph Promax 2020 GFL 1080 marka su banyosu, Excella E25 marka çalkalamalı inkübatör, New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U410 premium marka -80 °C dondurucu, Beckman Coulter Allegra 64R marka santrifüj, Indesit TN5 (TK) marka -20 °C soğutucu, Spectromax Plus 384 (Molecular Devices) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

Bu tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanmaları Ek-A'da verilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. *G. kaustophilus* Bakterisindeki *EutD* Geninin Klonlanması

3.2.1.1. Primer Dizaynı

G. kaustophilus bakterisinin KEGG Databas'de verilen *eutD* geninin DNA baz dizi sekansı dikkatli bir şekilde incelenerek, bakteri kromozomundan çoğaltılmak için kullanılacak primerlerin DNA baz dizileri belirlenmiştir. PCR ürününün vektöre ligasyonunu kolaylaştırmak amacıyla yapılacak olan primerlere 5' ucuna *NdeI* endonükleaz, 3' ucuna *EcoRI* endonükleazına ait tanıma dizileri (*NdeI* için, 5'-CATATG-3'; *EcoRI* için, 5'-GAATTC-3') ilave edilmiştir.

EcoRI ve *NdeI* endonükleazları; gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması ve vektör DNA üzerinde çoklu klonlama bölgesinde kesim yapan enzimlerden olmaları gibi önemli unsurlar göz önünde bulundurulmuş ve seçilmiştir.

Bu kriterler göz önünde bulundurulmuş ve dizayn edilen ve *G. kaustophilus* genomundan *eutD* genini çoğaltılmak için kullanılacak olan primer dizileri 5'- GAT TGG CAT ATG ACA ACC GAT TTA TTT ACG GCA-3' (ileri primer) ve 5'- TTC GCC GAA TTC TTA CTC CCC AAG CGA CTG -3' (geri primer) şeklindedir. Başlama ve sonlandırma kodonları bold olarak gösterilmiştir. Endonükleaz kesim enzim bölgeleri *NdeI* (ileri primer) ve *EcoRI* (geri primer) italik olarak gösterilmiştir.

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Deneyi

Reaksiyon hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenerek, stok kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla günlük kullanımlar için steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı. Günlük stoklar hazırlandıktan sonra mümkün olduğu kadar steril ortamlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde PCR reaksiyonu

hazırlandı. *EutD* geninin çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: *EutD* geninin çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.

Cinsi	Son Konsantrasyon (25µL)
Kalıp DNA	7.5 ng/ µL
ileri Primer	1 µM
Geri Primer	1 µM
dNTP Karışımı	1 µM
Reaksiyon Tamponu (Tag buffer)	1 µM
Tag DNA Polimeraz/MgCl ₂	1 u
Deiyonize Su	

0.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpünde Tablo 3.1 gibi hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan PCR cihazının örnek bloku üzerine yerleştirilerek program çalıştırıldı. PCR Thermal Cycler programı aşağıdaki Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: *EutD* geninin çoğaltılması için uygulanan PCR programı.

Program Grupları	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
1	95	5	1
2	94	0.5	5
	50	0.5	
	72	1.5	
3	94	0.5	25
	58	0.5	
	72	1	
4	72	5	1
5	4	60	1

%1'lik agaroz jelde *eutD* genine ait oldu unu dü ündü ümüz band gözlemlendi. Daha sonra DNA kesiminde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı (ekil 4.2).

3.2.1.3. *EutD* Geninin *EcoRI* ve *NdeI* Endonükleazlar le Kesimi

PCR reaksiyonu sırasında primerlerle birlikte *EcoRI* ve *NdeI* kesim bölgeleri de yerle tirilerek DNA'nın her iki ucunda yapı kan uç elde edildi. *EutD* geninin *NdeI* ve *EcoRI* endonükleazlar ile kesim reaksiyon bile enleri Tablo 3.3'de verilmi tir.

Tablo 3.3: *EutD* geni kesim reaksiyonu bile enleri.

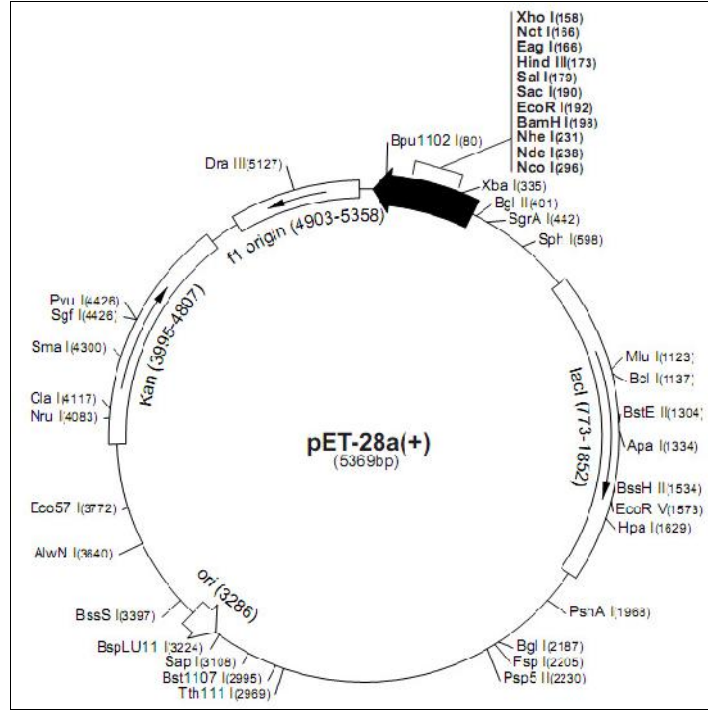
Cinsi	Son Konsantrasyon (50µL)
<i>Pta</i>	65 ng/ µL
Reaksiyon Tamponu (<i>EcoRI</i>)	1X
<i>NdeI</i>	0.25 u
<i>EcoRI</i>	0.5 u
Deiyonize Su	

Reaksiyon buz üzerinde hazırlandıktan sonra 37 °C'e ayarlanmı su banyosunda 3 saat bekletilerek çiftli kesim yapıldı.

Kesim ürününün izolasyonu için kesim reaksiyonun hepsi % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve jelden safla tırma yapıldı. Daha sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.1.4. *pET28a(+)* Klonlama Vektörünün zolasyonu

EutD geninin klonlanması için *pET28a(+)* klonlama vektörü kullanıldı. Bu vektörün seçilme nedeni, klonlama bölgesinin 5' ucunda His-Tag bölgesinin bulunmasıdır. Böylece, Ni-NTA kullanılarak protein safla tırılması sa lanmı olacaktır. Kullanılan *pET28a(+)*'a ait vektör haritası ekil 3.1'de gösterilmi tir.



ekil 3.1: Klonlama vektörü *pET28a(+)*'nin vektör haritası.

E.coli Top10 hücrelerinden *pET28a(+)* vektörünün izolasyonu için, LB/Kan plaklarından *pET28a(+)* içeren *E.coli* Top10 koloni seçimi yapıldı. Steril kürdanla seçilen koloni 5 mL LB/Kan sıvı besiyerine batırılarak, 37 °C'e ayarlanmış inkübatörde gece boyu büyümeye bırakıldı. Sabah büyüyen hücre kültüründen *pET28a(+)* klonlama vektörü plazmit izolasyon kiti (Sigma Aldrich) protokolü kullanılarak izole edildi.

izole edilen *pET28a(+)* klonlama vektörünün görüntülenmesi ve miktar tayini için %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu.

3.2.1.5. Klonlama Vektörünün *NdeI* ve *EcoRI* Endonüklazları ile Kesimi

izolasyonu yapılan ve miktarı belirlenen *pET28a(+)* vektörünün *NdeI* ve *EcoRI* endonükleazlar ile kesilerek düz zincir haline getirildi. Kesim reaksiyon bileşenleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4: pET28a(+) vektörünün kesim reaksiyonu bile enleri.

Cinsi	Son Konsantrasyon (50µL)
pET28a(+) vektörü	420 ng/ µL
Reaksiyon Tamponu (<i>EcoRI</i>)	1X
<i>NdeI</i>	0.25 u
<i>EcoRI</i>	0.5 u
Deiyonize Su	

Reaksiyon buz üzerinde hazırlandıktan sonra 37 °C'e ayarlanmış su banyosunda 3 saat bekletilerek çiftli kesim yapıldı.

Kesim ürününün izolasyonu için kesim reaksiyonun hepsi % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve jelden saf tırma yapıldı. Daha sonra ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.1.6. *EutD* Geninin pET28a(+) Vektörü ile Ligasyonu

EcoRI ve *NdeI* endonükleazları ile kesilen pET28a(+) klonlama vektörü ile *G. kaustophilus eutD* geni ligasyonu için Tablo 3.5 reaksiyon bile enleri hazırlandı.

Tablo 3.5: pET28a(+) vektörü ile *eutD* geninin ligasyon reaksiyon bile enleri.

Cinsi	Son Konsantrasyon (20 µL)
<i>Pta/EcoRI-NdeI</i>	149.2 ng/µL
pET28a(+)/ <i>EcoRI-NdeI</i>	50 ng/µL
T4 Ligaz Tamponu	1X
T4 Ligaz	0.5 u
Deiyonize Su	

Elde edilen ligasyon reaksiyonu 16 °C'de su banyosunda 1 gece inkübe edildi.

3.2.1.7. pET28a(+)-Pta Plazmitinin *E.coli* Top10 Bakterisine Transferi

E.coli Top 10 bakterisinden kompetant hücre hazırlandı (Ek-A). Transformasyon için, kompetent *E.coli* Top 10 bakterisi bulunduran mikrosantrifüj tüpü buz üzerine alındı. Ligasyon karışımı ilave edilerek hafifçe pipetlendi ve karışım homojen hale getirildi. Buz üzerinde en az 30 dk bekletildi. 42 °C'de 90 saniye tutuldu ve hemen tekrar buz üzerine alındı. Antibiyotik içermeyen LB sıvı besiyerleri eklenerek 37 °C'de 1 saat süreyle inkübatörde üretilti. Daha sonra konsantre edilerek 30 µg/mL kanamisin içeren LB agar plaklarına steril cam boncuk ile yayma yöntemiyle ekildi. 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre ertesi güne kadar üremeye bırakıldı.

3.2.2. Rekombinant *E.coli* Kolonilerinin Seçimi ve Kontrolü

3.2.2.1. Transformasyon Ürününün PCR Analizi ile Kontrolü

Transformasyon plağında gelişen kolonilerden steril kürdan yardımı ile seçildi. Tablo 3.1'deki reaksiyon bileşenlerinin bulunduğu PCR tüpüne kalıp DNA yerine steril kürdan ile seçilmiş koloni ilave edildi ve Tablo 3.2'deki PCR programı uygulandı. % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak görüntülendi (ekil 4.3).

3.2.2.2. Transformasyon Ürününün *EcoRI* ve *NdeI* Endonükleazlar ile Kesimi ve Kontrolü

Steril kürdanla seçilen kolonilerden agarose jelde istenen bandı veren koloni, LB/Kanamisin sıvı besiyerine ekilip, 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Zolasyonu yapılarak elde edilen plazmid *EcoRI* ve *NdeI* endonükleazlar ile Tablo 3.4'deki gibi kesime tabi tutuldu. %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak görüntülendi (ekil 4.4).

3.2.2.3. Dizi Analizi

DNA dizi analizi için konsantrasyonu 80 ng/μL olan *pET28a(+)*-Pta plazmit örneğinden dizi analizi için RefGen Firmasına (ANKARA) gönderildi (ekil4.5). *KEGG* veri bankasında verilen *G. kaustophilus eutD* gen dizisi (GK3415) ile *G. kaustophilus* genomundan klonladığımız *eutD* gen dizisinin (Gkpta) dizilerle karşılaştırması yapıldı (ekil 4.6). Ayrıca *B. subtilis*, *M. thermophila*, *S. pyogenes* aminoasit dizileri ile *G. kaustophilus* bakterisinden elde ettiğimiz aminoasit dizisinin karşılaştırılması yapıldı (ekil 4.7).

3.2.3. Protein Ekspresyonu ve Safı tırılması

3.2.3.1. Protein Ekspresyonu

pET28a(+)-Pta plazmit ekspresyonu için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildi. Son konsantrasyonunda 30 μg/mL kanamisin içeren LB mediumun üzerine *pET28a(+)*-Pta taşıyan BL21 (DE3) kolonilerinden seçilerek 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Kültürlerden alınan 10 mL, son konsantrasyonunda 30 μg/mL kanamisin içeren 1000 mL LB medium besiyerlerine ekilerek 180 rpm'de 30 °C'de sürekli takibi yapılarak OD₆₀₀ değeri 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. Son konsantrasyonu 0.25 mM olacak şekilde ekilde IPTG (izopropil-β-D-tiyogalaktozid) eklenerek indüklendi. Belirli aralıklar ile ekspresyonun kontrolü için örnek alındı ve buz üzerinde bekletildi. Santrifüjlendi (4000 rpm, 4°C, 10 dak.) ve hemen kullanılmayacak olan pelletler -80 °C'de saklandı.

Ekspresyon kontrolü için buz üzerinde beklettiğimiz örnekler %10'luk SDS-PAGE'de görüntülendi (ekil 4.9).

3.2.3.2. Protein Safla tırılması

Ekspresyonu gerçekle tti i gözlenen ve -80 °C’de pellet ekleinde saklanan hücrelerden alındı. Hücreyi parçalamak için sonikasyon i lemine hazırlandı.

Sonikasyon yapmadan önce hücre duvarının parçalanması için alınan ya pelete 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7.5 içeren tampon, lizozim (1 mg/1 g ya pelet) ve son konsantrasyonu 1 mM olacak ekleinde PMSF ilave edildi. A zı kapalı bir ekleinde 5 dakikada bir karı tırarak oda sıcaklı ında yakla ık yarım saat bekletildi. Yo unlu unu arttırmak için yarım saat buz üzerinde 5 dakikada bir karı tırılarak bekletildi. Kıvamın yo unlu u hücre çeperi parçalanmasının ne kadar iyi oldu unun bir göstergesi olarak referans alındı.

Sonikasyon i lemi “45 saniye parçalama 2 dakika buz üzerinde bekleme” olacak ekleinde 10 döngü ekleinde yapıldı. Yo un kıvamın bu i lem sonrasında kaybolması sonikasyon i leminin yeterli oldu unu göstergesi olarak kabul edildi. 3500 rpm’de 20 dakika santrifüjleme i lemi yapıldı. Hücre ekstratı içerisindeki olabilecek küçük kalıntıları uzakla tırmak amacıyla süzgeç kâ ıdından geçirildi.

Proteini safla tırmak amacı ile kullanılan içerisinde 2 ml rezin bulunan Ni-affinite kolonunu rejenere edildi (Ek-1) ve kolonu dengelemek amacı ile kolon 5 mM imidazol içeren tampon A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl) zeltisinden geçirildi. Dengelenen kolona örnek yüklendi ve tüm örnek kolondan geçmesi sa landı. 5 mM imidazol içeren tampon A zeltisi kullanılarak 1. yıkama i lemi yapıldı. Kolon ıkı ı falkonda toplandı. 20 mM imidazol içeren tampon A zeltisi kullanılarak 2. yıkama i lemi yapıldı. 200 mM imidazol içeren tampon A zeltisi kullanılarak 1’er ml ekleinde 20 fraksiyon olacak ekleinde yüksek saflıkta His₆-Pta protein elde edildi. Fraksiyonlar %10’luk SDS-PAGE ile analiz edildi (ekil 4.10). Bradford Metodu kullanılarak serum albumin (BSA) kullanılarak protein miktar analizi yapıldı (Ek-A).

Ayrıca His-tag trombin (Sigma-Aldrich, USA) ile kesilerek ortamdan uzakla tırıldı. Fakat protein aktivitesi önemli miktarda d t ü için His₆-Pta olarak karakterizasyon çalı malarına devam edildi.

3.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Elde ettiğimiz His₆-Pta aktivitesinin varlığını kontrol edebilmek için literatürdeki ölçüm standardı uygulandı [Lawrence et al.,2005].

3.2.4.1. İleri Reaksiyon ve Geri Reaksiyon Aktivite Tayini

İleri reaksiyon için; His₆-Pta aktivitesi, spektrofotometrik yöntemle 233 nm'de zamana karşı (toplam 120 sn) Asetil-CoA'nın oluşumu takip edilerek 25 °C'de Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle ölçüldü ($\epsilon_{233nm}=5,55 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Substratlar ve enzim tampon B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) içinde hazırlandı ve reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyon karışımının toplam hacmi 100 µL olacak şekilde tampon C (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT), 2 mM asetil-fosfat, 0.2 mM CoA ve 0.012 µg enzim kullanılarak aktivite ölçümleri takip edildi.

Geri reaksiyonu için; Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun (Asetil fosfat oluşumu) hızı 25 °C'de 412 nm'de ($\epsilon_{412nm}=136 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle takip edildi. Substratlar ve enzim tampon B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) içinde hazırlandı ve reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyon karışımının toplam hacmi 100 µL olacak şekilde tampon D (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl), 0.2 mM DTNB, 0.2 mM asetil-coenzim A (Ac-CoA), 4 mM inorganik fosfat (P_i) ve 0.012 µg enzim kullanılarak aktivite ölçümleri takip edildi.

3.2.4.2. Enzim Miktarının Ba langıç Hızına Etkisi

Enzim miktarını seri halde seyreltmek için enzim dilüsyon tamponu olarak 50 mM Tris-HCl pH 7.5 olarak hazırlandı. Enzimimiz bu hazırlanan tampon ile 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/70, 1/100, 1/125, 1/150, 1/200 oranlarında olacak şekilde seyreltildi. Reaksiyon bileşimi son konsantrasyonları 3 mM asetil-fosfat, 0.2 mM CoA olarak belirlendi. Enzim aktivite ölçümlerinde tampon C (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT) kullanıldı. 233 nm'de ölçümler alınarak veriler grafiğe aktarıldı (ekil 4.11).

3.2.4.3. İleri ve Geri Reaksiyonlar için K_m Değerinin Belirlenmesi

Pta'nın substratlarına olan ilgi düzeyini belirlemek amacıyla ile K_m ve V_{max} değerleri belirlendi. İkinci substrat doygun konsantrasyonda sabit tutuldu, burada elde edilen K_m değerleri de ilk substrat için görünür K_m değerini vereceğinden deney koşulları buna göre hazırlandı.

G. kaustophilus Pta ileri reaksiyonu için koenzim A (CoA) ve asetil fosfat (Ac-P_i) olmak üzere iki substratı vardır. *Pta*'nın katalizlediği ileri reaksiyonun (asetil-CoA oluşumu) hızı 25 °C'de 233 nm'de asetil-CoA'nın oluşumu Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle takip edildi.

CoA konsantrasyonu 0.5 mM'da sabit tutulup, son konsantrasyonu 0.05-7 mM arasında değişen çeşitli derişimlerde asetil-fosfat hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 100 µL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon C kullanıldı. Reaksiyon enzim ilavesiyle başlatıldı. Reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun uygun sıcaklığa gelmesi için yaklaşık 3 dakika bekletildi ve 233 nm'de reaksiyon takip edildi (Şekil 4.12).

Asetil-fosfat konsantrasyonu 4 mM'da sabit tutulup, son konsantrasyonu 0.05-0.7 mM'a kadar çeşitli derişimlerde Co-A hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 100 µL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon C kullanıldı. Reaksiyon enzim ilavesiyle başlatıldı. Reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun uygun sıcaklığa gelmesi için yaklaşık üç dakika bekletildi ve 233 nm'de reaksiyon takip edildi (Şekil 4.13).

Pta'nın geri reaksiyonu için asetil-coenzim A (Ac-CoA) ve inorganik fosfat (P_i) olmak üzere iki substratı vardır. *Pta*'nın katalizlediği geri reaksiyonun (Asetil fosfat oluşumu) hızı 25 °C'de 412 nm'de ($\epsilon_{412nm}=136 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle takip edildi. Reaksiyon hazırlanırken substratlar ve enzim buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun uygun sıcaklığa gelmesi için yaklaşık 3 dakika bekletildi. Substratlardan birinin konsantrasyonu sabit tutulup diğerinin konsantrasyonu değiştirilerek reaksiyon takip edildi.

Inorganik P_i konsantrasyonuna bağlı *Pta* aktivitesi için, reaksiyon tamponu D (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl) tamponunda, enzim miktarı 0.012 µg olup, Ac-CoA ve DTNB konsantrasyonları sırasıyla 0.5 mM ve 0.2 mM'da sabit tutulup

0.5-50 mM arasında inorganik P_i konsantrasyonu de i tirilerek 25 °C’de takip edildi (ekil 4.14).

Ac-CoA konsantrasyonuna ba lı Pta aktivitesi için, reaksiyon tampon D tamponunda, enzim miktarı 0.012 µg olup, inorganik P_i ve DTNP miktarı sırasıyla 5 mM ve 0.2 mM’da sabit tutulup 0.025 mM’dan 10 mM’a kadar Ac-CoA miktarları de i tirilerek 25 °C’de izlendi (ekil 4.15).

3.2.4.4. pH’ın Aktiviteye Etkisi

pH etkisini incelemek için 50 mM asetat (pH 4.5-5.5 için), 50 mM MOPS (pH 6.3-7.0 için), 50 mM Tris (pH 7.3-9.0 için), 50 mM glisin (pH 9.5-10.0 için) tamponu kullanıldı. Reaksiyon 0.012 µg enzim, 0.2 mM CoA, 2 mM asetil-fosfat varlı ında 25 °C’de gerçekte tirildi (ekil 4.16).

3.2.4.5. Sıcaklı ın Aktiviteye Etkisi

Sıcaklı ın etkisini incelemek için 10 °C’den 80 °C’e kadar sıcaklık de i iminde enzim (0.012 µg) ve substrat miktarları (asetil-fosfat, 2 mM, CoA, 0.2 mM) sabit tutularak reaksiyon izlendi. Su banyosu kullanılarak istenilen sıcaklık de i imleri kontrol altında tutuldu (ekil 4.17).

3.2.4.6. Farklı Tuzların Aktiviteye Etkisi

KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂S₀₄, NaCl, K_xPO₄ tuzlarının Pta aktivitesine etkileri incelendi. Her tuz için 1 M stok solüsyonu hazırlandı (Ek-1). Reaksiyon bile imi son konsantrasyonları 2 mM asetil-fosfat, 0.2 mM CoA olarak belirlendi. Enzim aktivite ölçümlerinde 2 mM DTT içeren tampon B kullanıldı. Enzim ilavesi ile reaksiyon ba latıldı. Reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun 25 °C gelmesi için yakla ık 3 dakika bekletildi ve 233 nm’de reaksiyon takibi yapıldı. 5 mM’dan 100 mM’a kadar farklı tuz konsantrasyonları varlı ında aktivite de i imi incelendi (ekil 4.18).

3.2.4.7. Bazı Metabolitlerin İleri ve Geri Reaksiyonlarda Aktiviteye Etkisi

Substratlar, ATP, pirüvat, NADH ve α -ketoglutarat tampon D'de hazırlandı. Reaksiyonlar hazırlanırken substratlar ve metabolitler buz üzerinde tutuldu. Reaksiyon tamponu olarak tampon C kullanıldı. Reaksiyon 25 °C' de 233 nm'de reaksiyon takip edildi.

Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyon için CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da sabit tutuldu. Pta'nın katalizlediği geri reaksiyon için 0.2 mM DTNB, Ac-CoA ve P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 4 mM' da sabit tutulup 25 °C'de 412 nm'de reaksiyon takip edildi. Reaksiyon tamponu olarak tampon D kullanıldı. NADH konsantrasyonu 0, 0.5, 1, 2 ve 3 mM (ekil 4.19), pirüvat 0, 5, 10 ve 15 mM (ekil 4.20), α -ketoglutarat konsantrasyonu 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 ve 25 mM (ekil 4.21) ve ATP konsantrasyonu 0, 0.5, 1, 2 ve 3 mM (ekil 4.22) olarak değiştirilerek reaksiyon hacmi 100 μ L olarak sabitlendi. 5 μ L enzim (0.012 μ g/ μ L) kullanıldı.

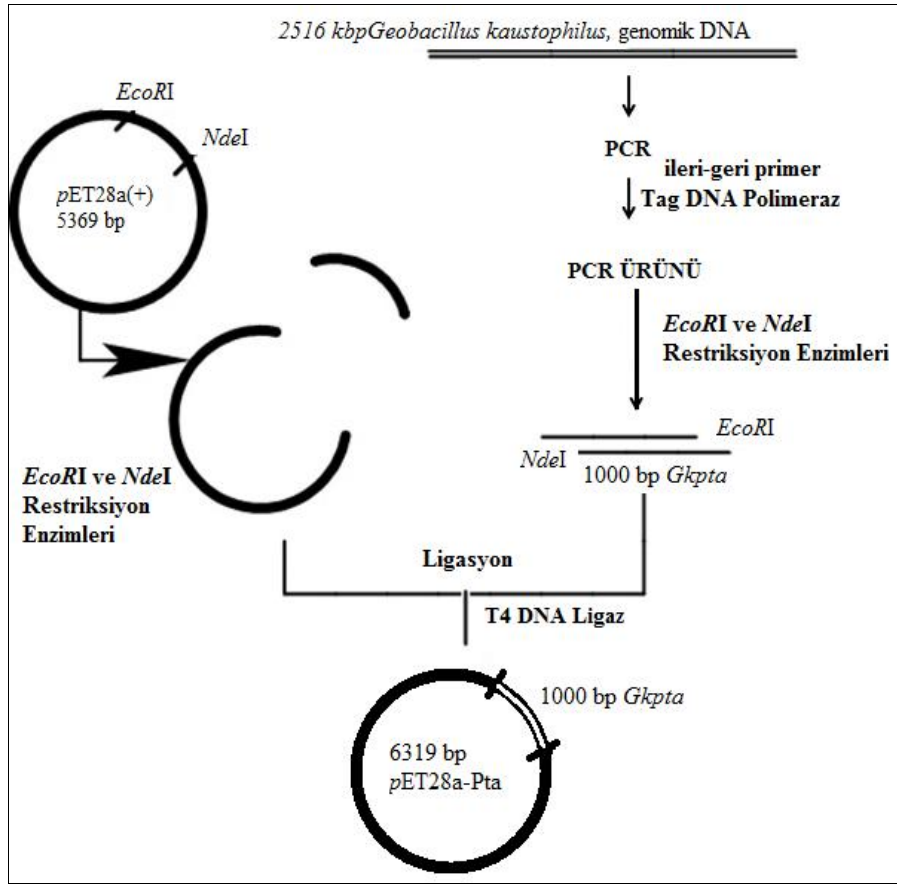
3.2.4.8. ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Tamponların Etkisi

Pta'nın inhibitörü olan α -ketoglutarat'ın (ekil 4.23) ve ATP'nin (ekil 4.24) Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5), HEPES (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) ve MOPS (50 mM MOPS, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) tamponlarında aktiviteye etkileri incelendi. CoA 200 μ M ve Ac-P_i 500 μ M'da konsantrasyonlarda sabit tutulup reaksiyon 25 °C'de 233 nm'de takip edildi. Ayrıca farklı pH değerlerindeki aynı tampon içindeki α -ketoglutarat'ın ve ATP'nin Pta inhibisyonuna etkisi incelendi.

4. SONUÇ

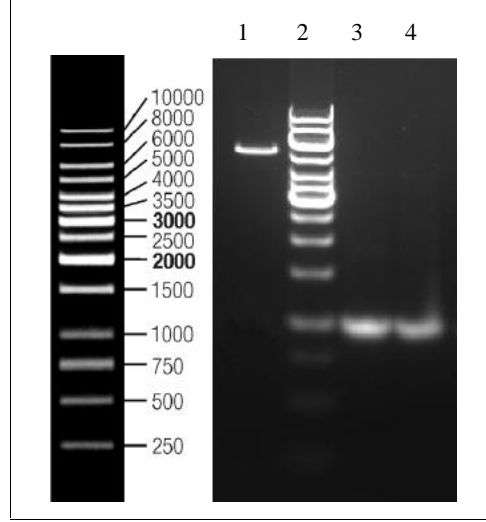
4.1. *G. kaustophilus* *EutD* Geninin Klonlanması

G. kaustophilus *eutD* geninin genomik DNA'dan PCR ile çoğaltılarak pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlama amaçları özetle ekil 4.1'de gösterilmiştir.



ekil 4.1: *G. kaustophilus* *eutD* geninin pET28a(+) vektörüne klonlama amaçları.

G. kaustophilus *eutD* genine ait PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörünün *NdeI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kesiminden elde edilen ürün agaroz jelde analiz edildi (ekil 4.2). ekil 4.2'den de görüleceği üzere, beklenildiği gibi, *eutD* geni için yaklaşık 1000 bp (baz çifti) bantı ve pET-28a(+) vektörü için de yaklaşık 5500 bp bantı elde edildi.

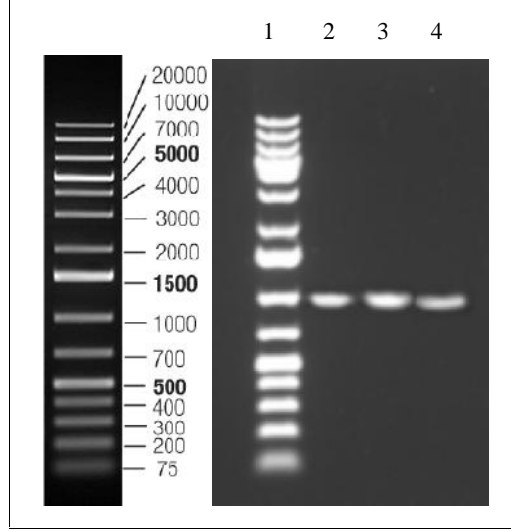


ekil 4.2: *G. kaustophilus eutD* genine ait PCR ürünü ve *pET-28a(+)* vektörü agaroz jel (%1) analiz sonucu. **1**, *pET28a(+)* vektörü; **2**, DNA belirteci; **3** ve **4**, PCR ürünü (*eutD* genine ait)

G. kaustophilus eutD genine ait PCR ürünü ve *pET-28a(+)* vektörü *NdeI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kesiminden sonra T4 Ligaz enzimi ile bölüm 3.2.1.6'da belirtildi i ekilde ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü, *E.coli* Top10 kompetent hücrelerine aktarıldı.

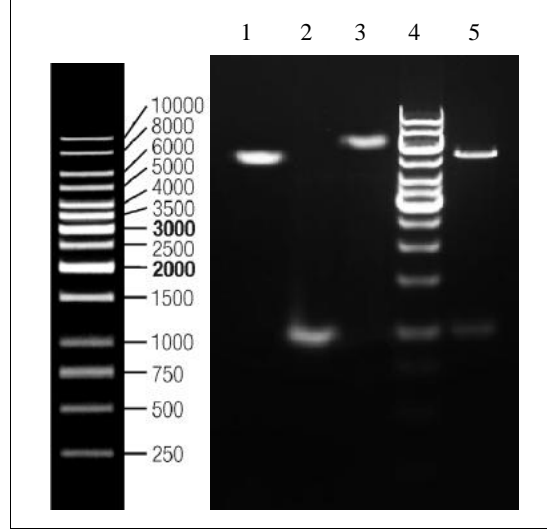
4.2. *pET28a-GkPta* Plazmitin *E. coli*'ye Transformasyonu, Koloni PCR ve Endonükleaz Analizleri

G. kaustophilus eutD geni içeren *pET28a* vektörü (*pET28a-GkPta*) *E.coli* Top 10 kompetent hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonunda elde edilen kolonilerden birkaç tane seçilerek koloni PCR yapıldı. Koloni PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde analiz edildi (ekil 4.3). ekil 4.3'den de görülece i üzere, beklenildi i gibi, *eutD* geni için yakla ık 1000 bç bantlar elde edildi.



ekil 4.3: *G. kaustophilus eutD* genine ait koloni PCR ürünlerinin görüntülenmesi. 1, DNA belirteci; 2-4, seçilen kolonilerin PCR ürünleri (*eutD* genleri).

Koloni PCR sonucu beklenen bantları veren kolonilerden 1 tane seçilerek kanamisin (30 µL/mL) içeren LB (Leuria Bertani) sıvı besiyerinde büyütüldü. zole edilen plazmit ürünü *NdeI* ve *EcoRI* endonükleazlarla kesime tabi tutuldu. *pET28a(+)* vektörün aynı endonükleazlarla kesim ürünü, *eutD* geni, *pET28a(+)-GkPta* plazmiti ve *pET28a(+)-GkPta* plazmiti kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde analiz edildi (ekil 4.4). ekil 4.4'de de görüldü ü üzere, *pET28a(+)-GkPta* plazmitinin teorik olarak 6000-6500 bç arasında olması beklenen bantı, yaklaşık olarak bu değerlerde elde edildi. *pET28a(+)-GkPta* plazmiti kesim ürünü de yaklaşık 1000 bç ve 5500 bç bantlar olmak üzere iki bant olarak elde edildi.



ekil 4.4: *pET28a(+)-GkPta* plazmitinin *EcoRI* ve *NdeI* endonükleazlarla kesim ürünlerinin agaroz jel (%1) analiz sonucu. 1, *pET28a(+)* vektörü; 2, *eutD* geni; 3, *pET28a(+)-GkPta* plazmiti; 4, DNA belirteci; 5, *pET28a(+)-GkPta* plazmitinin *EcoRI* ve *NdeI* endonükleazlarla kesim ürünü.

4.3. Klonlanan *G. kaustophilus EutD* Geninin DNA Dizi Analiz Sonucu ve Amino Asit Sekuansının Di er Pta Dizileri le Kar ıla tırılması

4.3.1. Dizi Analiz Sonucu

Klonladığımız *G. kaustophilus eutD* geninin sekuans analiz sonucu ekil 4.6'da verilmiştir. ekil 4.6'da görüldü ü gibi ilk 48 baz *pET28a(+)* vektörüne aittir. *EutD* genine ait kısım 49. bazdan itibaren başlamaktadır. Ayrıca, kodladığı amino asit dizisi alt kısımda verilmiştir. Dizi analiz sonucunda elde edilen dizi kromotogramları Ek-B'de gösterilmektedir.

CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	33
H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	
CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	ACA	ACC	GAT	TTA	TTT	66
P	R	G	S	H	M	T	T	D	L	F	
ACG	GCA	TTA	AAA	GCG	AAA	GTA	ACC	GGT	ACG	GGT	99
T	A	L	K	A	K	V	T	G	T	G	
CGA	AAA	ATC	GTG	TTT	CCC	GAG	GGA	ACC	GAT	GAC	132
R	K	I	V	F	P	E	G	T	D	D	
CGC	ATC	TTA	ACG	GCG	GCG	AGC	CGT	TTG	GCG	ACG	165
R	I	L	T	A	A	S	R	L	A	T	
GAG	CAA	GTG	CTG	CAG	CCG	ATC	GTC	CTT	GGC	GAT	198
E	Q	V	L	Q	P	I	V	L	G	D	
GAG	CAA	GCT	GTG	CGG	GTG	AAA	ACC	GCG	GCG	CAT	231
E	Q	A	V	R	V	K	T	A	A	H	
GGC	TTG	CCG	CTT	GAA	GGG	GTG	GAG	ATT	GTC	ACC	264
G	L	P	L	E	G	V	E	I	V	T	
CCG	CGC	CGC	TAT	GGC	GGG	TTT	GAT	GAG	CTG	GTT	297
P	R	R	Y	G	G	F	D	E	L	V	
TCG	GCG	TTT	GTG	GAG	CGG	CGC	AAA	GGG	AAA	GTG	330
S	A	F	V	E	R	R	K	G	K	V	
ACA	GAA	GAA	ACG	GCG	CGC	GAG	TTG	CTT	TTC	GAT	363
T	E	E	T	A	R	E	L	L	F	D	
GAA	AAC	TAT	TTC	GGT	ACG	ATG	CTC	GTT	TAT	ACG	396
E	N	Y	F	G	T	M	L	V	Y	T	
GGA	GCG	GCC	GAC	GGC	CTC	GTC	AGC	TGG	GCG	GCA	429
G	A	A	D	G	L	V	S	W	A	A	
CAT	TCG	ACG	GCG	GAT	ACG	GTC	CGA	CCA	GCC	TTG	462
H	S	T	A	D	T	V	R	P	A	L	
CAA	ATC	ATT	AAA	ACG	AAG	CCA	GGC	GTT	CGC	AAA	495
Q	I	I	K	T	K	P	G	V	R	K	
ACG	TCC	GGC	GTG	TTC	ATC	ATG	GTG	CGC	GGC	GAC	528
T	S	G	V	F	I	M	V	R	G	D	
GAA	AAA	TAT	GTG	TTT	GCC	GAT	TGC	GCC	ATC	AAC	561
E	K	Y	V	F	A	D	C	A	I	N	
ATT	GCT	CCT	AAC	AGC	CAA	GAT	TTG	GCT	GAA	ATT	594
I	A	P	N	S	Q	D	L	A	E	I	
GCG	GTC	GAG	AGC	GTG	CAG	ACG	GCG	AAA	ATG	TTC	627
A	V	E	S	V	Q	T	A	K	M	F	
GGC	CTT	AAG	CCG	CGC	GTG	GCG	CTG	TTA	AGC	TTT	660
G	L	K	P	R	V	A	L	L	S	F	
TCC	ACG	AAA	GGG	TCG	GCC	TCG	TCG	CCG	GAG	ACG	693
S	T	K	G	S	A	S	S	P	E	T	
GAA	AAA	GTC	GTT	GAG	GCG	GTG	CGG	TTG	GCG	AAG	726
E	K	V	V	E	A	V	R	L	A	K	
GAA	ATG	GCG	CCG	GAA	CTG	ATC	CTT	GAC	GGT	GAG	759
E	M	A	P	E	L	I	L	D	G	E	
TTT	CAA	TTT	GAC	GCC	GCG	TTT	GTG	CCA	GGG	GTG	792
F	Q	F	D	A	A	F	V	P	G	V	
GCG	AAA	AAG	AAA	GCG	CCG	GAC	TCG	GTC	ATT	CAA	825
A	K	K	K	A	P	D	S	V	I	Q	
GGG	GAC	GCA	AAT	GTC	TTT	ATT	TTC	CCG	AGC	CTT	858
G	D	A	N	V	F	I	F	P	S	L	
GAG	GCA	GGC	AAC	ATC	GGC	TAC	AAA	ATC	GCC	CAG	891
E	A	G	N	I	G	Y	K	I	A	Q	
CGC	CTC	GGC	GGT	TTT	GAA	GCA	GTC	GGC	CCG	ATT	924
R	L	G	G	F	E	A	V	G	P	I	
TTG	CAA	GGG	CTG	AAC	AAA	CCG	GTG	AAC	GAC	CTA	957
L	Q	G	L	N	K	P	V	N	D	L	
TCG	CGC	GGC	TGC	AGC	GCC	GAA	GAC	GCC	TAC	AAG	990
S	R	G	C	S	A	E	D	A	Y	K	
CTC	GCG	CTC	ATC	ACC	GCT	GCC	CAG	TCG	CTT	GGG	1023
L	A	L	I	T	A	A	Q	S	L	G	
GAG	TAA										1029
E	END										

ekil 4.5: Dizi analizi sonucu belirlenen Pta aminoasit dizisi. İlk 48 baz pET28a(+) vektöründeki His-tag aminoasit dizisine aittir. *G. kaustophilus eutD* genine ait kısım 49. bazdan itibaren başlamaktadır. Ayrıca, kodladığı 1 aminoasit dizisi alt kısımda verilmiştir.

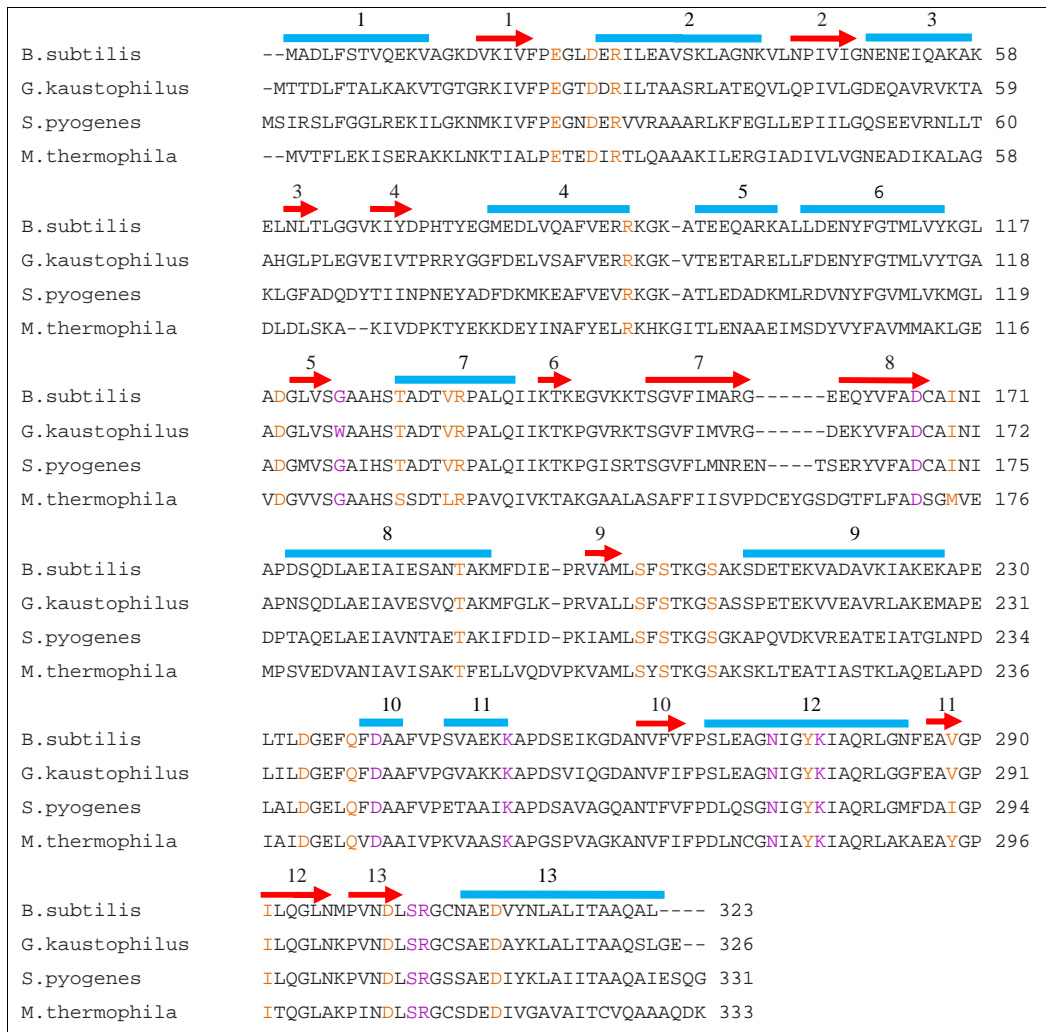
Bu sonuçlar, *KEGG* veri bankasında [<http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>] verilen *G. kaustophilus* genomundaki Pta aminoasit dizisi ile karşılaştırıldı. Leu⁶¹ rezidüsünün yerini histidin, Gly¹²⁵ rezidüsünün yerini triptofan, Glu²⁴⁷ rezidüsünün yerini ise glisin rezidüsünün aldığı görülmüştür (ekil 4.6). Üç boyutlu yapıda Leu⁶¹, az korunmuş -heliks-3 ile 3 arasındaki loop bölgesinde; Gly¹²⁵, yüksek korunmuş 5 ile -heliks7 arasındaki loop bölgesinde; Glu²⁴⁷, korunmamış -heliks-10 ile -heliks-11 arasındaki loop bölgesinde yer almaktadır. Leu⁶¹, Gly¹²⁵ ve Glu²⁴⁷ rezidülerinin fonksiyonları henüz bilinmemektedir.

GK3415	MTTDLFTALKAKVTGTGRKIVFPEGTDDRILTAASRLATEQVLRPIVLGDEQAIRVKAAA	60
Gkpta	MTTDLFTALKAKVTGTGRKIVFPEGTDDRILTAASRLATEQVLQPIVLGDEQAVRVKATA	60
	*****:*****:***:**	
GK3415	GLPLEGVEIVNPRRYGGFDELVSFAFVERRKGVTEETARELLFDENYFGTMLVYTGAAD	120
Gkpta	GLPLEGVEIVTPRRYGGFDELVSFAFVERRKGVTEETARELLFDENYFGTMLVYTGAAD	120
	*****.*****	
GK3415	GLVSAAHSTADTVRPALQIIKTKPGRKTSGVFIMVRGDEKYVFADCAINIAPNSQDLA	180
Gkpta	GLVSAAHSTADTVRPALQIIKTKPGRKTSGVFIMVRGDEKYVFADCAINIAPNSQDLA	180
	**** *****	
GK3415	EIAVESARTAKMFLKPRVALLSFSTKGSASSPETEKVVEAVRLAKEMAPDLILDGEFQF	240
Gkpta	EIAVESVQTAKMFLKPRVALLSFSTKGSASSPETEKVVEAVRLAKEMAPELILDGEFQF	240
	*****.:*****:*****	
GK3415	DAAFVPAVAKKAPDSVIQGDANVFI FPSLEAGNIGYKIAQRLGGFEAVGPILQGLNKPV	300
Gkpta	DAAFVPAVAKKAPDSVIQGDANVFI FPSLEAGNIGYKIAQRLGGFEAVGPILQGLNKPV	300
	***** *****	
GK3415	NDLSRGCSAEDAYKLALITAAQSLGE	326
Gkpta	NDLSRGCSAEDAYKLALITAAQSLGE	326

ekil 4.6: *KEGG* veri bankasında verilen *G. kaustophilus* Pta aminoasit dizisi (GK3415) ile *G. kaustophilus* genomundan klonladığımız Pta aminoasit dizisinin (Gkpta) karşılaştırılması.

4.3.2. *G. kaustophilus* Pta Dizisinin Di er Pta Dizileri ile Kar ıla tırılması

Kristal yapısı bilinen *B. subtilis*, *M. thermophila*, *S. pyogenes* bakterilerinden elde edilen Pta ile *G. kaustophilus* bakterisinden elde edilen Pta arasındaki dizi benzerliği CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignment programı ile incelenmiştir. Buna göre *G. kaustophilus* Pta dizisi, *B. subtilis* Pta ile % 73, *M. thermophila* Pta ile % 44, *S. pyogenes* Pta ile % 59 oranında dizi benzerliği göstermiştir. Yapı ve fonksiyon için en yakın benzerliğe sahip olan *B. subtilis* Pta'sıdır (ekil 4.7).

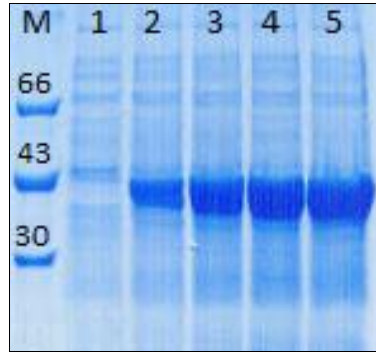


ekil 4.7: *B. subtilis*, *M. thermophila*, *S. pyogenes* Pta aminoasit dizileri ile *G. kaustophilus* bakterisinden elde etti imiz Pta aminoasit dizisinin kar ıla tırılması. Dizi üzerindeki mavi çizgiler ve kırmızı oklar *B. subtilis*'in ikinci yapı elementlerini (-helix ve -strand) gösterir, az ve yüksek korunmuş diziler sırası ile mor ve turuncu olarak i aretlenmiştir.

4.4. Protein Ekspresyonu ve Safla tırması

4.4.1. Pta Ekspresyonu

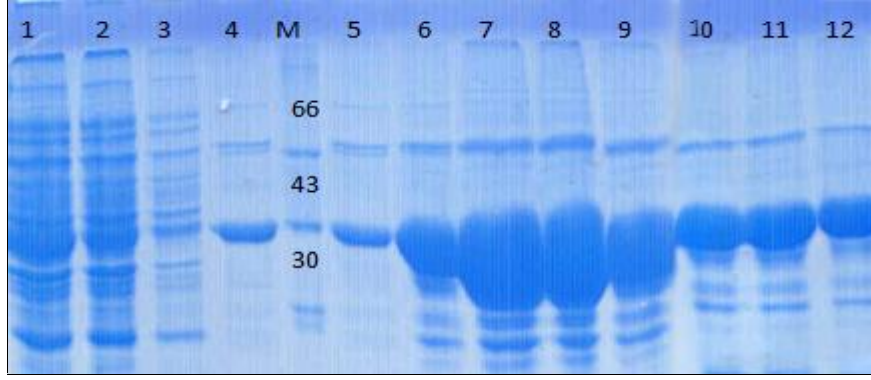
pET28a(+)-Pta vektörünü taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde Pta'nın zamanla kar ı ekspresyonu Bölüm 3.2.3.1'de bahsedildi i gibi takip edilerek gerekli olan optimum zaman belirlendi. ekil 4.8'den de görülece i gibi 30 °C'de IPTG ile indüklendi inde zamanla ekspresyonu artmakta ve 4 saatte maksimum düzeye ula maktadır.



ekil 4.8: *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerindeki ekspresyonu gerçekleştirilen *G. kaustophilus* Pta'nın SDS-PAGE jelinde görüntüsü. M, Belirteç , (66-43-30 kDa); 1, IPTG öncesi; 2, IPTG sonrası 1. saat; 3, IPTG sonrası 2. saat; 4, IPTG sonrası 3. saat; 5, IPTG sonrası 4. saat.

4.4.2. Protein Safla tırılması

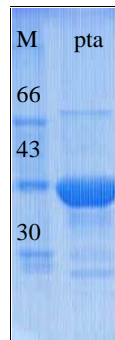
His-tag içeren rekombinant proteinlerin safla tırılması, sonikasyon i lemi ile hücre parçalandıktan sonra Ni-NTA afinite kolonu ile gerçekleştirildi. Elde edilen His₆-Pta SDS-PAGE ile analiz edildi (ekil 4.9). His-tag içeren rekombinant Pta'nın hesaplanan moleküler a ırlı ı 37422.3 Da'dur. Bu sonuçlara göre, hesaplanan ve SDS-PAGE jelden tahmin edilen moleküler a ırlıkları birbirine yakındır.



ekil 4.9: *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerinden Pta enziminin Ni-NTA afinite kolonu ile safla tırılmasının SDS-PAGE jelinde görüntüsü. **M**, protein belirteci, (66-43-30 kDa); **1**, kolon öncesi örnek; **2**, kolon sonrası örnek; **3**, 5 mM imidazol içeren tampon A ile yıkama sonrası örnek; **4**, 20 mM imidazol içeren tampon A ile yıkama sonrası örnek; **5-12**, 200 mM imidazol içeren tampon A ile sırasıyla toplanan örnekler.

Kullanımdan önce saflık düzeyi SDS-PAGE (%10) analizi ile kontrol edildi ve yaklaşık % 80 saflıkta olduğu görüldü (ekil 4.10).

Ayrıca His₆-Pta içerdiği His-tag kısmı trombin (Sigma-Aldrich, USA) ile kesilerek ortamdan uzakla tırlmaya çalışıldı. Fakat kesme işlemi sonrasında yapılan SDS-PAGE analizi Pta bandının kaybolduğunu gösterdi. Tahminimizce ticari trombin içinde kontamine proteazların bulunduğunu ve bu proteazların Pta'yı kestiği düşünülmektedir. Ayrıca aktivite ölçümlerinde protein aktivitesinin de önemli miktarda azaldığı gözlemlendi. İnden His₆-Pta ile karakterizasyon çalışmalarına devam edildi.



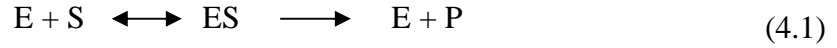
ekil 4.10: Safla tırılan His₆-Pta'nın SDS-PAGE jelindeki görüntüsü. **M**, protein belirteci (66-43-30 kDa); **pta**, His₆-Pta.

4.5. Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. Enzim Konsantrasyonunun Ba langıç Hızına Etkisi

Michaelis-Menten denkleminde ba langıç hızı, do ygun substrat konsantrasyonunda, enzim konsantrasyonu ile direkt orantılıdır. Dolayısıyla, kinetik çalış malarında, ilk önce, enzim miktarının ba langıç hızına etkisi belirlenip, kullanılacak enzim miktarı tayin edildi (ekil 4.12).

Michaelis-Menten Denklemi e itli i a ıda verilmi tir.

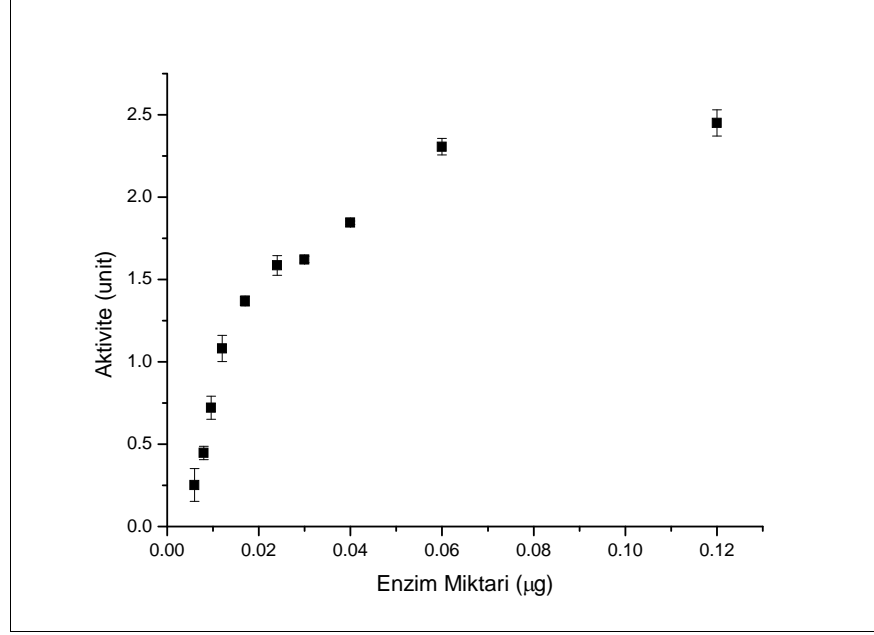


$$V = k_{cat} [ES] \quad (4.2)$$

$$v = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} = k_{cat} [E]_0 \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (4.3)$$

Bu denkleme göre ba langıç hızı substrat konsantrasyonunun yüksek oldu u durumlarda enzim konsantrasyonu ile do ru orantılıdır. Ancak, belli bir enzim konsantrasyonundan sonra bu do ru orantı kayboluyor. Yüksek enzim konsantrasyonunda substrat azalması (substrate depletion) hızlı gerçe kle ti inden dolayı ba langıç hızını ölçmek zorla maktadır. Michaelis-Menten denkleminde ölçülen ba langıç hızıdır. Ba langıç hız ölçümü, substrat azalmasının ba langıç substrat miktarının 0 ile %10'u kadar oldu u zaman gerçe kle ir. Daha fazla enzim ekledikçe aktivite ölçüm zaman diliminde substrat azalması daha hızlı gerçe kle ecektir.

Enzim konsantrasyonunun ba langıç hızına etkisini görebilmek için yapılan deney sonucunda alınan ölçümler, enzim miktarı ve aktivite grafi i olu turularak de rlendirilmi tir (ekil 4.11). Bu grafikte de görüldü ü üzere yakla ık 0.02 µg yani 0.5 nM enzim konsantrasyonuna kadar ba langıç hızı lineer artmaktadır. Bu noktadan sonra enzim miktarıyla aktivite arasındaki lineer ili ki, bu deney artlarında da literatürde oldu u gibi kaybolmaktadır. Bu sonuçlara göre, aynı deney artlarında, ortamda enzim konsantrasyonu 0.25-0.5 nM olarak kullanılması uygun görüldü ve bundan sonraki deneylerde, aksi belirtilmedi i takdirde, bu miktar ile devam edildi.

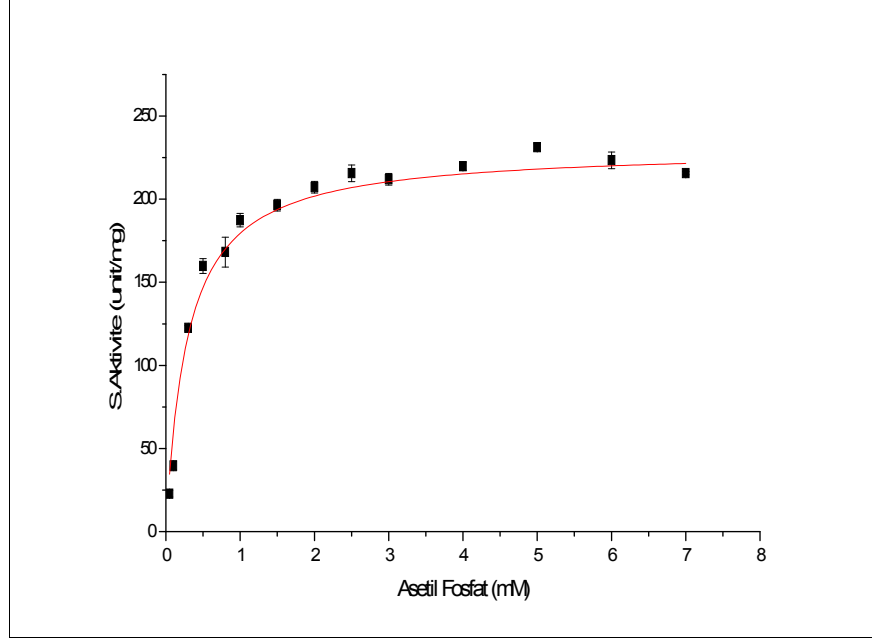


ekil 4.11: Enzim miktarına bağımlı olarak aktivite bağımlı hız grafiği. Reaksiyon bileşimi son konsantrasyonları 3 mM asetil-fosfat, 0.2 mM CoA olarak belirlendi. Reaksiyonlar 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT tampon ortamında 233 nm’de takip edildi.

4.5.2. İleri ve Geri Reaksiyonlar için Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

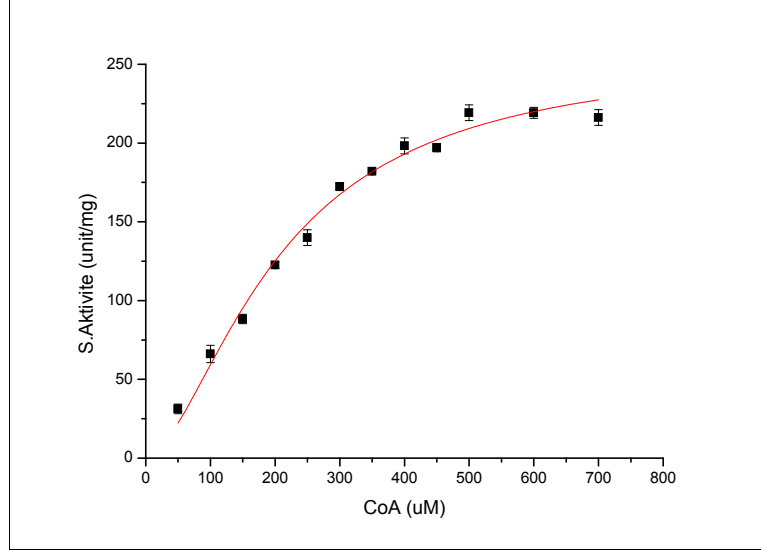
Pta’nın substratlarına olan ilgi düzeyini belirlemek amacı ile asetil-fosfat ve CoA substratlarına olan ilgisini gösteren K_m ve k_{cat} değerleri belirlendi. İkinci substrat doygun konsantrasyonda sabit tutuldu unda elde edilen K_m değerleri de iken substrat için görünür K_m değerini verir. Bu bağılamda deney koşulları hazırlandı.

Pta’nın asetil-fosfata karşı olan K_m ve k_{cat} değerleri Kısım 3.2.4.2’de belirtildiği gibi gerçekleştirilen ölçümler sonucundaki veriler ile oluşturulan ekil 4.12, Michaelis-Menten denklemine “nonlinear” fit edilerek, sırasıyla, 0.284 mM ve 230 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur. BRENDA database’de bilinen Pta’lar içerisinde asetil-fosfata karşı olan K_m değerleri 0.024-22.5 mM arasında değişmektedir. Pta enzimine en yakın dizi benzerliği gösteren *B. subtilis*’in asetil fosfata karşı olan K_m değeri 0.53 mM ve k_{cat}/K_m değeri $5.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur [Xu et al., 2005]. Yapılan ölçümler sonucunda *G. kaustophilus* Pta’nın asetil-fosfata karşı k_{cat}/K_m değeri de $5.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



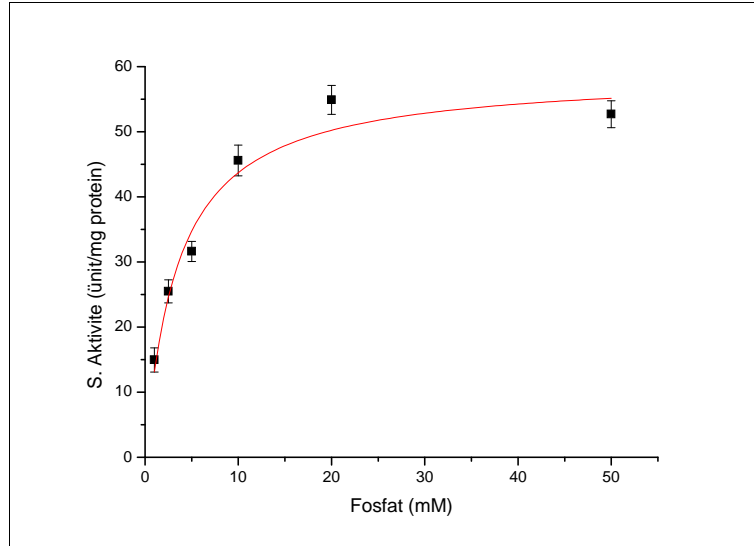
ekil 4.12: Asetil fosfat konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin ileri reaksiyon spesifik aktivitesi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT tamponunda, enzim miktarı 0.012 μg , CoA konsantrasyonu 0.5 mM'da sabit tutulup, asetil fosfat konsantrasyonu 0.05-7.0 mM aralı nda de i tirilerek 25 °C'de takip edildi. Veriler Hiperbol denkleme fit edilerek kinetik parametreler bulundu.

Pta'nın CoA için K_m ve V_{max} de erleri, ekil 4.13 Hill denkleminde "nonlinear" fit edilerek, sırasıyla, 207 μM ve 257 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak bulundu (Hill katsayısı, 1.6 ± 0.2). BRENDA database verilerine göre bilinen Pta'ların CoA'a olan K_m de erleri 30-1694 μM arasında de i mektedir. *B. subtilis* Pta'nın CoA için K_m de eri 1.3 μM ve k_{cat}/K_m de eri $1.27 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmu tur [Xu et al., 2005]. Yapımı oldu umuz ölçümler sonucunda *G. kaustophilus* Pta'nın CoA'ya kar ı olan k_{cat}/K_m de eri $8.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmı tır.



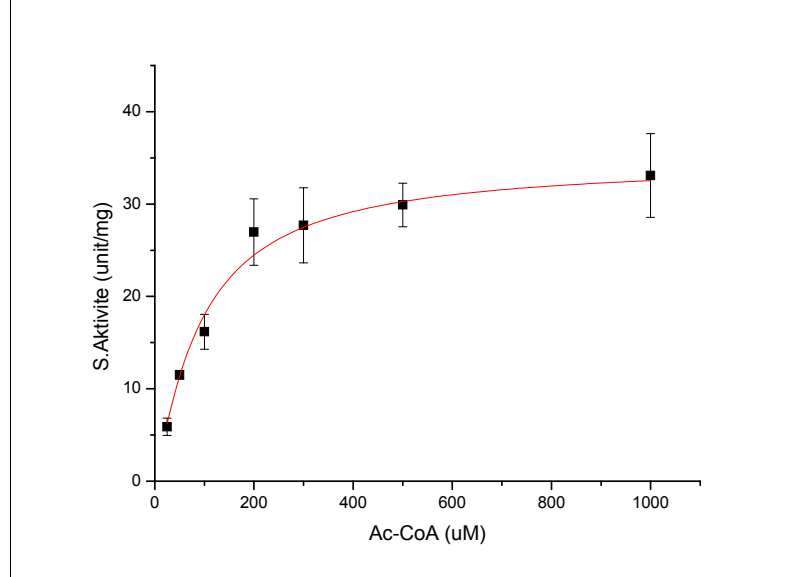
ekil 4.13: CoA konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin ileri reaksiyon spesifik aktivitesi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT tamponunda, enzim miktarı 0.012 μ g, asetil-fosfat konsantrasyonu 4 mM'da sabit tutulup 50-700 μ M arasında CoA konsantrasyonu de i tirilerek 25 $^{\circ}$ C'de takip edildi. Veriler Hill denkleme fit edilerek kinetik parametreler bulundu.

Pta'nın inorganik fosfata kar ı olan K_m ve V_{max} de erleri, ekil 4.14'teki veriler hiperbol denkleme nonlineer fit edilerek, sırasıyla, 3.5 mM ve 59 μ mol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak bulunmu tur.



ekil 4.14: norganik fosfat konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin geri reaksiyon spesifik aktivitesi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 0.2 mM DTNB tamponunda, enzim miktarı 0.012 μ g, Ac-CoA konsantrasyonu 0.5 mM'da sabit tutulup 0-50 mM arasında inorganik fosfat konsantrasyonu 25 $^{\circ}$ C'de de i tirilerek gerçekle tirildi. Hiperbol denkleme fit edilerek kinetik parametreler bulundu.

Pta'nın asetil-CoA'a karşı olan K_m ve V_{max} değerleri, ekil 4.15'teki verilerin Hill denkleminde nonlineer fit edilerek, sırasıyla, 0.093 mM ve $35 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak bulundu (Hill katsayısı, 1.2 ± 0.1).



ekil 4.15: Ac-CoA konsantrasyonuna ba lı Pta enziminin geri reaksiyon spesifik aktivitesi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 0.2 mM DTNB tamponunda, enzim miktarı 0.012 μg olup, KH_2PO_4 pH 7.5'ta iken konsantrasyonu 10 mM'da sabit tutulup 25-1000 μM arasında Ac-CoA konsantrasyonu de i tirilerek 25°C 'de gerçekle tirildi. Hill denkleme fit edilerek kinetik parametreler bulundu.

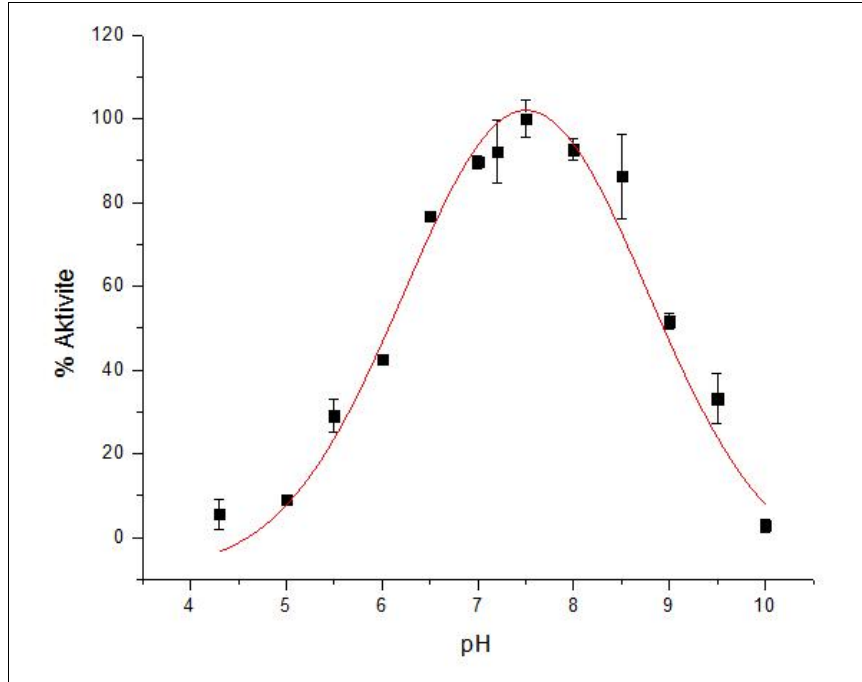
Elde edilen tüm de erler tablo 4.1'de toplandı. k_{cat} (s^{-1}) ve k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) de erleri hesaplanarak *G. kaustophilus* Pta enziminin substratlarına olan ilgisi belirlendi.

Tablo 4.1: *G. kaustophilus* Pta için kinetik parametreleri.

Substrat e itleri	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>leri reaksiyon</i>				
Asetil fosfat	0.284 ± 0.03	230 ± 4	153.3 ± 2.6	5.11×10^5
CoA	0.207 ± 0.016	257 ± 15	171.3 ± 9.9	8.56×10^5
<i>Geri reaksiyon</i>				
Fosfat	3.5 ± 0.7	59 ± 3.5	39.33 ± 2.3	1.12×10^4
Asetil CoA	0.093 ± 0.017	35 ± 3	23.33 ± 1.9	2.59×10^5

4.5.3. pH'm Aktiviteye Etkisi

Enzimin aktif bölgesi, substrat bağlanmasını ve reaksiyonun katalizlenmesini mümkün kılacak iyonik biçimde ya da iyonik gruplardan oluşacak bir konformasyon verecek bir şekilde olur mu? pH'daki değişimler bu iyonlaşabilen gruplarda ve dolayısıyla konformasyonel yapıda değişikliklere neden olarak katalizin hızını etkileyebilmektedir. Bunun dışında substrat molekülü de iyonlaşabilen gruplar içerebilir ya da substratın iyonlaşabilen ekli enzime bağlanarak katalize edilebilir. Bu da reaksiyonun hızını etkiler. Bu nedenle bu çalışmada, pH'ın Pta aktivitesine etkisi incelendi. Yapılan çalışmalar sonucunda *G. kaustophilus* Pta'nın aktivitesi için optimum pH 7.5 olarak belirlendi. (ekil 4.16). Enzim pH 7.0-8.0 aralığında yüksek aktivite gösterebilmektedir. pH 8.5 sonrasında aktivite büyük miktarda azalmaktadır. Dizi benzeri olan *B. subtilis* Pta için optimum pH değeri 7.5'dir [BRENDA database].

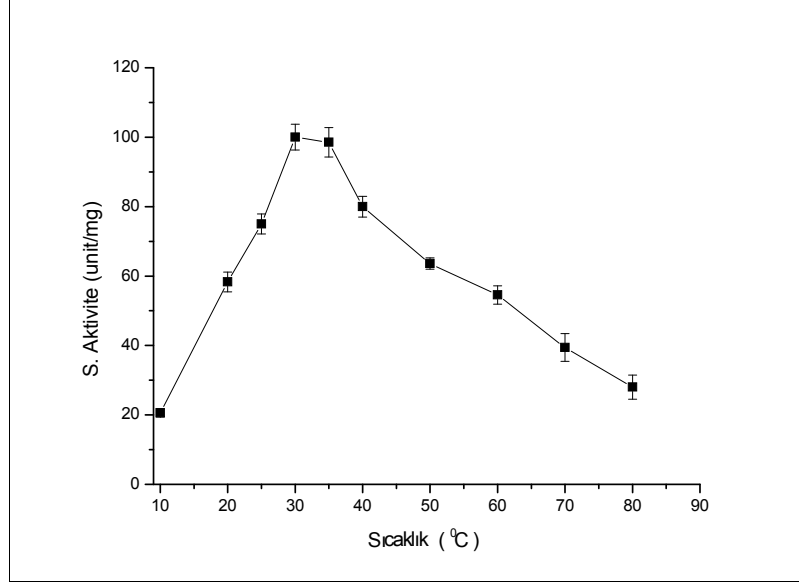


ekil 4.16: pH'm Pta aktivitesine etkisi. Kullanılan tamponlar: 50 mM asetat (pH 4.5-5.5), 50 mM MOPS (pH 6.3-7.0), 50 mM Tris (pH 7.3-9.0), 50 mM glisin (pH 9.5-10 için) tamponu kullanıldı. Reaksiyon 0.012 µg enzim, 0.2 mM CoA, 2 mM asetil-fosfat varlığında 25 °C'de izlendi. %100 aktivite değeri 220 unit/mg'dır.

4.5.4. Sıcaklı ın Aktiviteye Etkisi

Kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklı ın artması ile artar. Sıcaklıktaki artı reaktant moleküllere daha fazla kinetik enerji sa lar, bu da birim zamanda daha fazla sayıda üretken çarpı ma ile sonuçlanır. Enzim katalizli reaksiyonlar da benzer tarzda davranır. Ancak yüksek sıcaklıklarda enzimler denatürasyona u rar ve aktivitesini yitirir. Bu nedenle, her enzim için optimum sıcaklı ın belirlenmesi önem arz etmektedir.

Yapılan çalı malar sonucunda *G. kaustophilus* Pta'nın aktivitesi için optimum sıcaklı ı 30 - 35 °C olarak belirlendi (ekil 4.17). Enzimin aktivitesi 60 °C'den sonra büyük oranda azalmaktadır. Dizi benzeri *B. subtilis* Pta için sıcaklık çalı ılmamı tır, fakat termofilik bakteri *M. thermopila* için optimum sıcaklık de eri 45 °C olarak bildirilmi tir [BRENDA database]. Ayrıca *S. saprophyticus* Pta için optimum sıcaklık 30-35°C olarak belirtilmi tir [Aksoy, 2010]. Ancak enzimatik reaksiyonlarda tüm moleküller arası etkile im de önemlidir. Bir enzimin en iyi aktivite gösterdi i pH de eri farklı ortam sıcaklıklarından etkilenerek de i iklik gösterebilir. Bu ko ullar göz önüne alınarak 30-35 °C sıcaklıkta pH de erlerimiz 7.0-7.5 arasındadır. Buradan sonraki sıcaklık artı larıyla birlikte belirli bir pH dü mesi de görülmü tür. 50-80 °C de pH 7.0-6.5'e kadar dü mü tür. Buradaki aktivite dü mesinde bir miktar pH de i iminde katkısı vardır. Tris-HCl tamponunun sıcaklı a göre de i mi yapılan hesaplamalar neticesinde pK_a de eri -0.028 pH unit/°C olarak bulunmu tur.

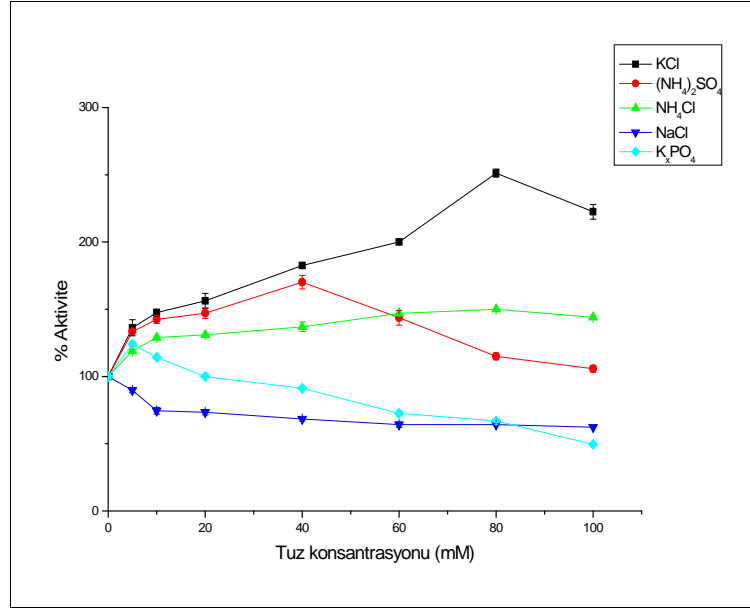


ekil 4.17: Sıcaklı ın Pta aktivitesine etkisi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT tamponu içerisinde 2 mM asetil-fosfat, 0.2 mM CoA ile 0.012 µg enzim olacak ekilde, 10-80 °C arasında sıcaklık artı nda takip edildi.

4.5.5. Farklı yonların Aktiviteye Etkisi

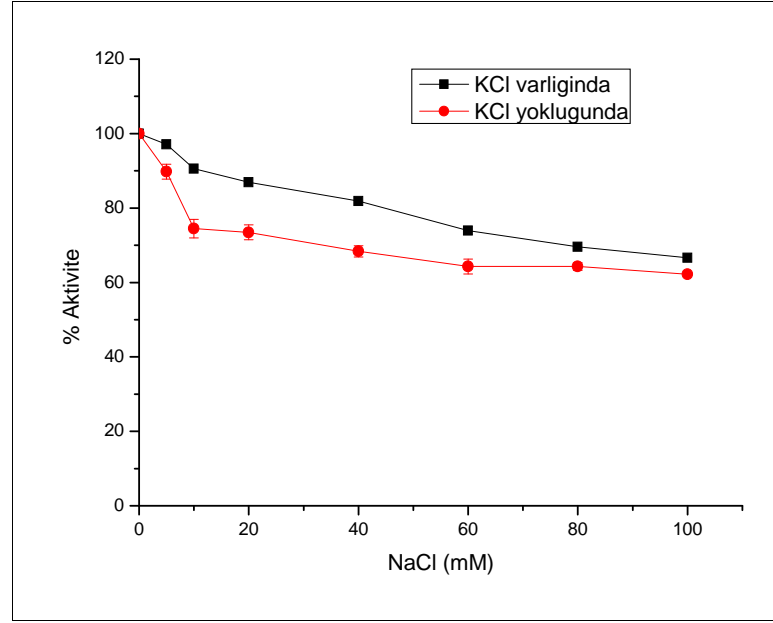
Literatürde, imdiye kadar biyokimyasal özellikleri rapor edilen tüm Pta aktiviteilerinin NH_4^+ , K^+ iyonlarının varlı nda arttı ı, fakat Na^+ varlı nda inhibe oldu u rapor edilmi tir [Yıldız vd., 2012]. Bu çalı mada, rekombinant olarak elde etti imiz *G. kaustophilus* Pta aktivitesi üzerine bu iyonların etkilerini incelemek için KCl, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_xPO_4 (pH 7.5) tuzları kullanıldı (ekil 4.18). Çalı malar sonucunda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzu, dü ük konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırırken yüksek konsantrasyonlarda enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzunun Pta'nın çözünlü ünü dü ürdü ü dü ünülmektedir. Di er yandan, KCl ve NH_4Cl tuzlarının konsantrasyonu arttıkça enzim aktivasyonunun arttı ı görülmektedir (ekil 4.18). Ayrıca, K_xPO_4 tuzu, dü ük konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırırken yüksek konsantrasyonlarda enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Fosfat ürün oldu u için, yüksek konsantrasyonda ürün inhibisyonu gerçekte mektedir.

Yukarıda belirtildi i gibi Na^+ iyonunun farklı mikroorganizmalardan elde edilen Pta'ların aktiviteilerini inhibe etti i rapo edilmi tir [Lundie and Ferry, 1989]. Bu çalı mada da NaCl'ün rekombinant Pta aktivitesini inhibe etti i açıkça görülmü tür (ekil 4.18).



ekil 4.18: Farklı iyonların Pta aktivitesine etkisi. Reaksiyon bileşimi son konsantrasyonları 2 mM asetilfosfat, 0.2 mM CoA olacak şekilde, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT içeren tamponda, 5-100 mM'a kadar değişen tuz konsantrasyonları varlığında, 25 °C'de ve 233 nm'de enzim aktivite değişimi incelendi. Reaksiyonda kullanılan % 100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü.

NaCl'ün inhibisyon etkisi KCl varlığında daha azdır, fakat NaCl konsantrasyonu arttıkça inhibisyon etkisi de artmaktadır. Bu da, Na⁺ iyonlarının K⁺ iyonlarının bağımlı bölgesine bağlanarak inhibe ettiğini göstermektedir (ekil 4.19).

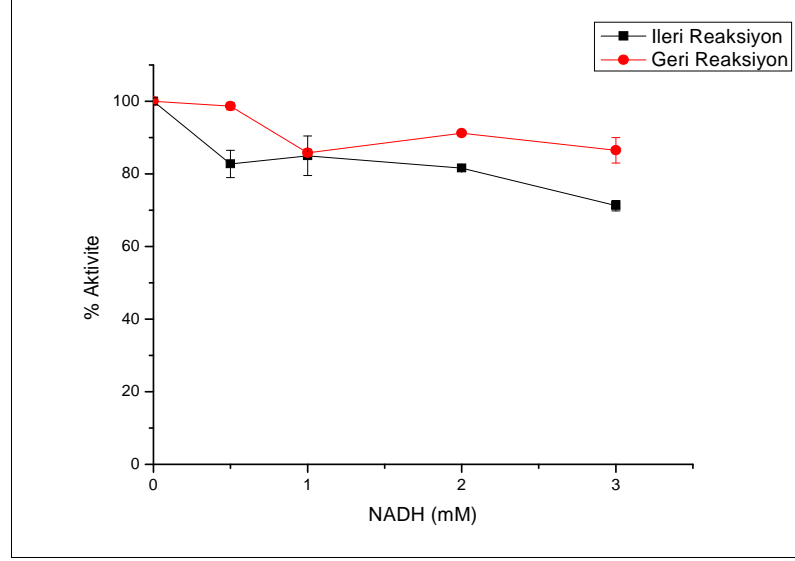


ekil 4.19: NaCl'ün KCl varlığına ve yokluğunda Pta aktivitesine etkisi. Reaksiyon bileşimi son konsantrasyonları 2 mM asetilfosfat, 0.2 mM CoA olacak şekilde, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT içeren tamponda ve 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT ve 150 mM KCl içeren tamponda 5-100 mM'a kadar değişen NaCl konsantrasyonları varlığında, 25 °C'de ve 233 nm'de enzim aktivite değişimi incelendi. Reaksiyonda kullanılan % 100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü.

4.5.6. Bazı Metabolitlerin Etkileri ve Geri Reaksiyonlarda Aktiviteye Etkisi

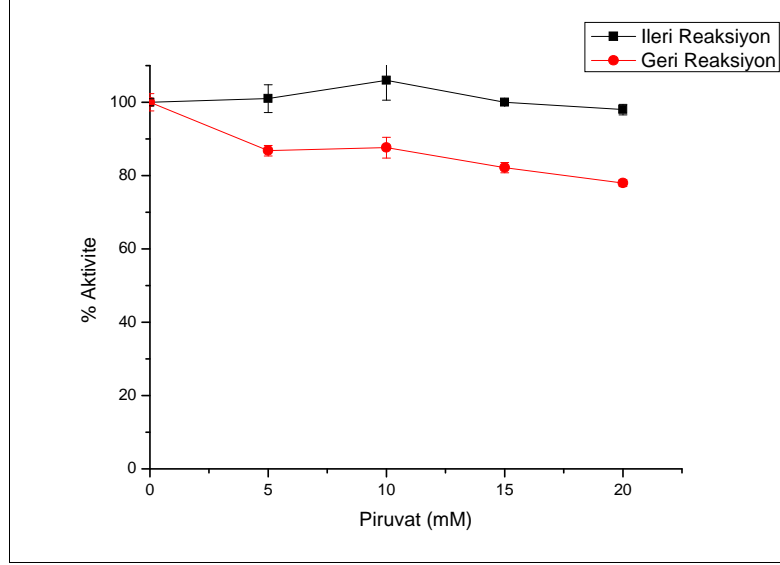
Hücrelerin enerji düzeyi ATP ve NADH varlığıyla ilişkilidir. ATP ve NADH'in fazla olması hücrenin yeterince enerjiye sahip olduğunu bir göstergesidir. Yüksek ATP ve NADH konsantrasyonunun enerji metabolizmasında görevli olan enzimlerin inhibisyonuna sebep olduğu yapılan çalışmaları sonucunda gözlenmiştir [Yıldız vd., 2011]. Bugüne kadar farklı mikroorganizmalardan elde edilen PtaI sınıfı enzim aktivitelerinin ATP tarafından inhibe edilirken NADH'in aktiviteye etkisi olmadığı belirtilmiştir [Yıldız vd., 2012]. Bu amaçla PtaI sınıfı enzimi olan *G. kaustophilus* Pta aktivitesine ATP, pirüvat, NADH ve α -ketoglutarat gibi enerji metabolizmasında bulunan metabolitlerin etkisini inceledik.

Substrat konsantrasyonları K_m civarlarında tutulup, farklı NADH konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı. ekil 4.20'dan da görüldüğü gibi bu metabolitin Pta aktivitesine kayda değer bir etkisi bulunmamaktadır.



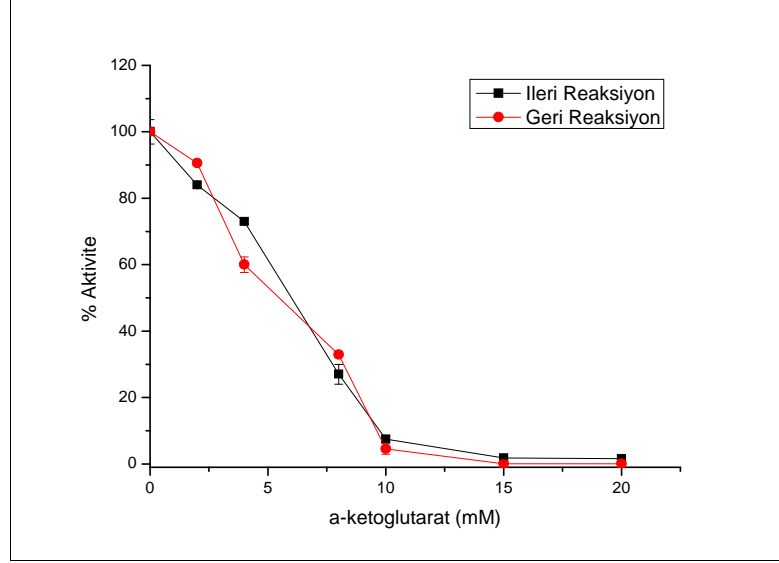
ekil 4.20: NADH'ın Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da, geri reaksiyonda Ac-CoA ve Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 4 mM'da sabit tutulup NADH konsantrasyonu 0.5-3 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. İleri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü. Geri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 50 unit/mg protein olarak ölçüldü.

Aynı şekilde, pirüvatın Pta aktivitesine etkisi incelendi. ekil 4.21'den de görüldüğü gibi pirüvatın da *G. kaustophilus* Pta'nın katalizlediği hem ileri hem geri reaksiyonlara önemli bir etkisinin olmadığı görüldü.



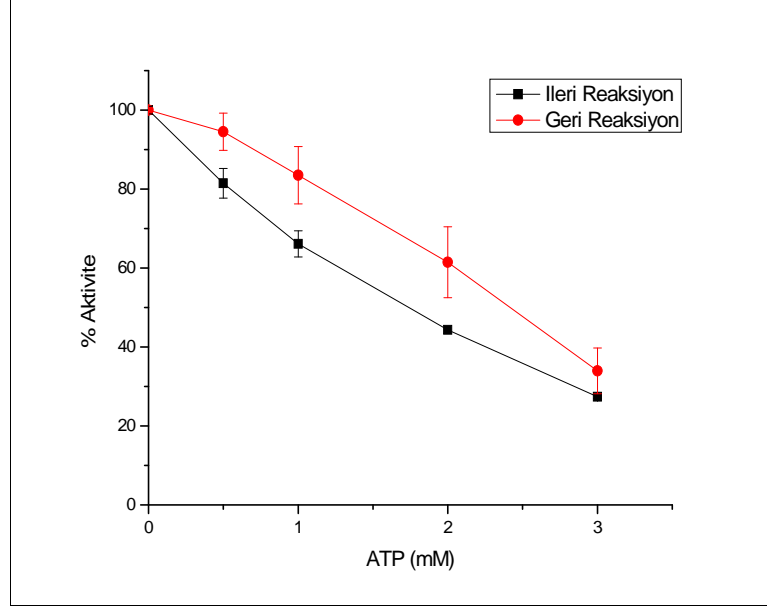
ekil 4.21: Pirüvat'ın Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da, geri reaksiyon için Ac-CoA ve Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 4 mM'da sabit tutulup Pirüvat konsantrasyonu 5-20 mM arasında de i tirilerek reaksiyon takip edildi. İleri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü. Geri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 50 unit/mg protein olarak ölçüldü.

Metabolizmada önemli olan α -ketoglutarat'ın da farklı konsantrasyonlarda Pta aktivitesine etkisi incelendi. CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları K_m civarında tutularak reaksiyon takip edildi. Ayrıca α -ketoglutarat inhibisyonunun sigmoidal oldu u görüldü (ekil 4.22). ekil 4.22'de görüldü ü gibi 15 mM α -ketoglutarat varlı nda *G. kaustophilus* Pta'nın katalizledi i reaksiyonu % 100 inhibe etti i izlendi.



ekil 4.22: -Ketoglutarat'ın Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 µM ve 500 µM'da, geri reaksiyon için Ac-CoA ve P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 µM ve 4 mM'da sabit tutulup -ketoglutarat konsantrasyonu 2-25 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. İleri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü. Geri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 50 unit/mg protein olarak ölçüldü.

İlaveten önemli metabolitlerden olan ATP'nin de farklı konsantrasyonlarda *G. kaustophilus* Pta'nın aktivitesine etkisi incelendi. ATP'nin inhibisyon etkisinin hiperbolik özellik gösterdiği ve 2 mM ATP'nin Pta aktivitesini yaklaşık % 60 inhibe ettiği görüldü (ekil 4.23). Yıldız ve arkadaşları *S. Saprophyticus* Pta için ATP'nin Ac-P_i için yarı masız inhibitör, CoA için ise yarı maslı inhibitör olduğu belirlendi [Yıldız, 2011].



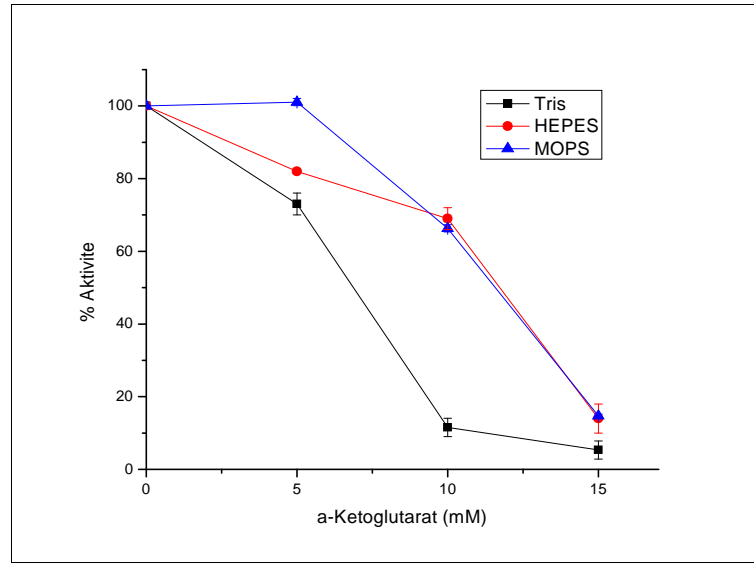
ekil 4.23: ATP'nin Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da, geri reaksiyon için Ac-CoA ve P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 4 mM'da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0.5-3 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. İleri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 100 unit/mg protein olarak ölçüldü. Geri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 50 unit/mg protein olarak ölçüldü.

4.5.7. Tamponların ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Etkisi

Pta'nın inhibitörü olan α -ketoglutarat'ın ve ATP'nin Tris, HEPES ve MOPS tamponlarında aktiviteye etkileri incelendi. İnhibitorlerin enzimler üzerine etkileri çalışmaları sırasında doğru inhibisyon etkisini görmek için substrat konsantrasyonu K_m civarında tutulmaktadır. Bu çalışmada da CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları daha önce belirlediğimiz K_m değerleri civarında sabit tutulup, farklı konsantrasyonlardaki α -ketoglutaratlı ortamlarda Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyona tampon etkisi çalışıldı.

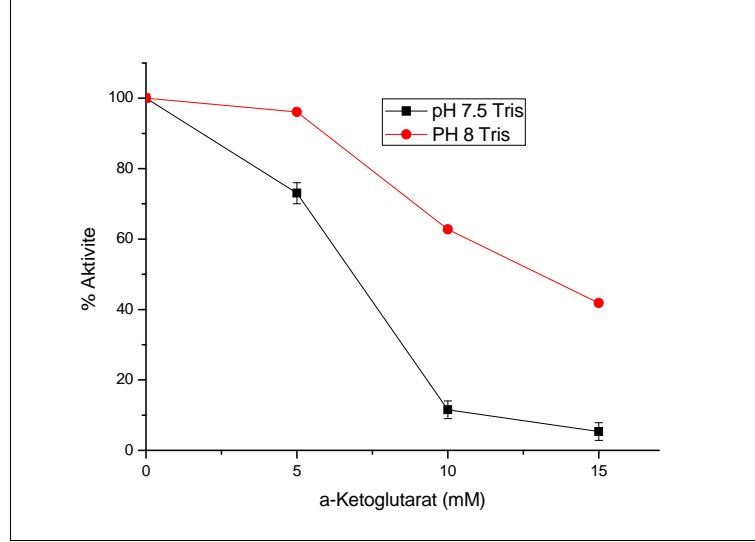
Tris, HEPES ve MOPS tampon çözeltileri pH 7.5'te sabit tutulup, 10mM α -ketoglutaratlı ortamda Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu sırası ile yaklaşık %90, %30 ve %30 oranında inhibe ederken, 15 mM α -ketoglutaratlı ortamda her üç tamponda da yaklaşık %100 inhibe ettiği görüldü (ekil 4.24). α -Ketoglutarat, iki karboksilik gruba sahip olup negatif yüklü bir moleküldür. Buna göre; Pta'ya inhibisyon etkisi elektrostatik etkileşime dayandığı tahmin edilmektedir. HEPES ve MOPS sülfat grubu içermektedir. Böylece bu tamponlar α -ketoglutaratın etkisi

Pta sarmalındaki pozitif yüklü rezidülere etki ederek inhibisyon etkisini azaltmaktadır.



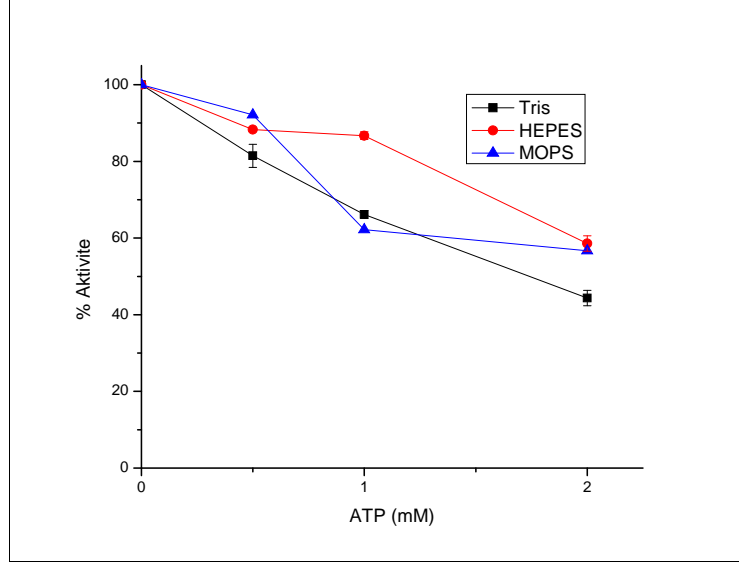
ekil 4.24: -Ketoglutarat'ın Pta aktivitesine HEPES, MOPS ve Tris tampon çözeltilerinde etkisi. Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5), HEPES (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) ve MOPS (50 mM MOPS, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) tamponlarında, CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup -ketoglutarat konsantrasyonu 0-15 mM olarak de i tirilerek reaksiyon takip edildi. leri reaksiyon için % 100 enzim aktivitesi ortalama 110 unit/mg protein olarak ölçüldü.

Ayrıca, Tris tamponunda pH'ın -ketoglutarat inhibisyonuna etkisini görebilmek için iki farklı pH de erinde (pH 7.5 ve pH 8.0) ölçümler yapıldı. 10 mM -ketoglutarat ölçümlerinde pH 7.5'ta Pta %90 civarında inhibe olurken pH 8.0'de %30 civarında inhibe oldu u görüldü. Bu inhibisyon oranı 15 mM -ketoglutarat konsantrasyonunda ise pH 7.5 ortamında %100 ve pH 8.0 ortamında %50 olarak tespit edilmi tir (ekil 4.25). Bu çalı ma ileriki zamanlarda mutasyon çalı maları ile aydınlatılması gereken noktalardan bir tanesini olu turmaktadır.



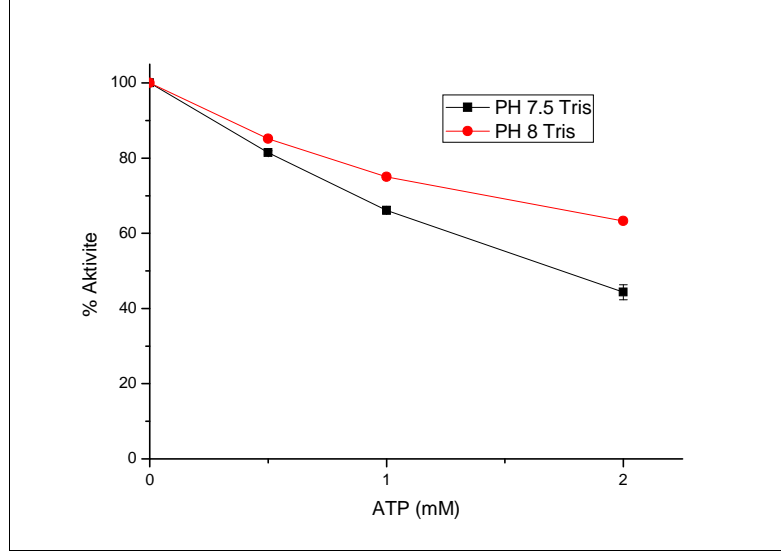
ekil 4.25: -Ketoglutarat'ın Pta aktivitesine farklı pH'larda Tris tamponundaki etkisi. Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5), Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 8.0) tamponlarında, CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup -ketoglutarat konsantrasyonu 0-15 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Her reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 110 unit/mg protein olarak ölçüldü.

ATP'nin farklı konsantrasyonlarının Pta aktivitesine etkisi HEPES, MOPS ve Tris tamponları kullanılarak incelendi. ATP'nin her üç tampon ortamında da Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu yaklaşık % 50 oranında inhibe ettiği ve farklı tampon ortamlarından önemli ölçüde etkilenmediği görüldü (ekil 4.26).



ekil 4.26: ATP'nin Pta aktivitesine HEPES, MOPS ve Tris ortamında etkisi. Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5), HEPES (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) ve MOPS (50 mM MOPS, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5) tamponlarında, CoA ve Ac-P_i konsantrasyonları sırasıyla 200 µM ve 500 µM'da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0-2 mM arasında değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Heri reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 110 unit/mg protein olarak ölçüldü.

Ayrıca 2 mM ATP konsantrasyonunda pH 7.5 Tris tamponlu ortamda yapılan takiplerde Pta'nın %50 civarında inhibe olurken, pH 8.0 Tris tamponlu ortamda %30 oranında inhibe olduğu izlenmiştir (ekil 4.27). Bu çalışmada ileriki zamanlarda mutasyon çalışmaları ile pH etkisinin aydınlatılması gereken noktalardan bir tanesini oluşturmaktadır.



ekil 4.27: ATP'nin Pta aktivitesine farklı pH'larda Tris tamponundaki etkisi. Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5), Tris (50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 8.0) tamponlarında, CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 200 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0-2 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Her reaksiyon için %100 enzim aktivitesi ortalama 110 unit/mg protein olarak ölçüldü.

5. GENEL DE ERLENDİRME

Bu çalışmada, *G. kaustophilus* bakterisi genomunda olduğu bilinen *eutD* geni klonlanmıştır, *E.coli*'de rekombinant olarak üretilip saflaştırıldıktan sonra karakterize edilmiştir. Bu sonuçlar, KEGG veri bankasında verilen *G. kaustophilus* genom haritasında verilen *eutD* gen dizisi ile karşılaştırıldı; Leu⁶¹ rezidüsünün yerini Histidin, Gly¹²⁵ rezidüsünün yerini Triptofan, Glu²⁴⁷ rezidüsünün yerini Glisin rezidüsünün aldığı görülmüştür (ekil 4.7). Üç boyutlu yapıda Leu⁶¹, az korunmuş α -heliks-3 ile α -plaka3 arasındaki loop bölgesinde; Gly¹²⁵, yüksek korunmuş α -plaka5 ile α -heliks7 arasındaki loop bölgesinde; Glu²⁴⁷, korunmamış α -heliks-10 ile α -heliks11 arasındaki loop bölgesinde yer almaktadır. Leu⁶¹, Gly¹²⁵ ve Glu²⁴⁷ rezidülerinin fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Ancak, bu rezidülerin loop bölgelerinde bulunmaları sebebiyle yukarıdaki mutantların fonksiyonda ve regülasyonda değişikliklere neden olma ihtimali vardır. Bu rezidülerin mutasyon çalışmalarıyla enzimin yapı ve fonksiyonuna etkilerinin incelenmesi bu konuya katkı olacaktır.

Klonladığımız Pta'nın amino asit dizisiyle, kristal yapıları aydınlatılmış üç bakterinin (*M. thermopila*, *B. subtilis*, *S. pyogenese*) Pta amino asit dizileri, CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignment programıyla karşılaştırıldı; buna göre *G. kaustophilus* Pta dizisi, *B. subtilis* Pta ile %73, *M. thermophila* Pta ile %44, *S. pyogenes* Pta ile %59 oranında dizi benzerliği göstermiştir. Bu sonuçlara göre yapı ve fonksiyon için en yakın benzerliğe sahip olan *B. subtilis* Pta'dır (ekil 4.8). Kristal yapıları bilinen Pta'ların sekonder ve üç boyutlu yapılarının aynı olduğu bildirilmiştir [Xu et al. 2005]. Buna göre; elde edilen *G. kaustophilus* Pta'nın ikincil ve üçüncül yapılarının da aynı olduğu düşünülmektedir.

Karakterizasyon çalışmaları sonunda Pta enziminin bulunan kinetik parametre değerleri (Tablo 4.1) ile literatürde şimdiye kadar analizi yapılmış bilinen Pta'ların değerleri [BRENDA database] karşılaştırıldı; verilen değerler arasında kaldığı saptanmıştır. *Geobacillus* sınıfına ait türler geni pH aralığında (pH 2-12) ya amlarını devam ettirirler [Takami et al., 2004], bu bakterilerden elde edilen Pta enzimi için de optimum pH değeri 7.5 olarak bulundu; pH 8.5 ve sonrasında aktivite büyük miktarda azalmakta olduğu gözlemlendi (ekil 4.16). Dizi benzeri olan *B. subtilis* Pta için ise de optimum pH değeri 7.5 verilmiştir [BRENDA database]. Bu durumun

aydınlatılması için yapı-fonksiyon çalı malarında hücre içi iyon etkilerinin ayrıntılı çalı ılması gerekmektedir.

Yüksek sıcaklıklarda enzimler denatürasyona uğur ve aktivitesini yitirir. Bu nedenle, her enzim için optimum sıcaklı ın belirlenmesi önem arz etmektedir. *G. kaustophilus* Pta için optimum sıcaklık 30-35 °C olarak bulundu (ekil 4.17). Enzimin aktivitesi 60 °C'den sonra büyük oranda azalmaktadır. Aktivite deneylerinde, Tris-HCl kullanıldı ı için sıcaklıkla pH de erinin dü ece i ve bundan dolayı aktivitenin de dü ece i beklenmektedir. Tris-HCl tamponunun sıcaklı a göre de i imi yapılan hesaplamalar neticesinde -0.028 pH unit/°C olarak bulunmu tur. Bu ko ullar göz önüne alınarak 30-35 °C sıcaklıkta pH de erlerimiz 7.5 civarında iken sıcaklık artı larıyla birlikte bu pH de eri 6.5 kadar dü mektedir. Dizi benzeri *B. subtilis* Pta için sıcaklık çalı ılmamı tır, fakat termofilik bakteri *M. thermopila* için optimum sıcaklık 45 °C olarak bildirilmi tir [BRENDA database]. Ayrıca *S. saprophyticus* Pta için optimum sıcaklık 30-35 °C olarak belirtilmi tir [Aksoy, 2010]. Geni sıcaklık aralı ında (5-78 °C) ya ayabilen [Takami et al., 2004], termofilik *G. kaustophilus* bakterisinden elde edilen Pta enziminin de termofilik özellikte olması beklenmesine kar ın sonuçlar bunu desteklememektedir. Optimum büyüme sıcaklı ı 60 °C olan *G. kaustophilus* bakterisi içinde yer alan Pta'nın termal stabilitesini hücre içerisindeki di er etmenler tarafından sa lanması söz konusu oldu u tahmin edilmektedir.

Literatürde imdiye kadar biyokimyasal olarak karakterize edilmi Pta'lar için çe itli tuzların aktive veya inhibisyon edici rolü oldu u bilindi inden dolayı, aktivite üzerine tuzların etkileri ara tırıldı. Bu amaçla KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NaCl, K_xPO₄ tuzları kullanıldı (ekil 4.18). (NH₄)₂SO₄ tuzu, dü ük konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırırken yüksek konsantrasyonlarda enzim inhibisyonuna neden oldu u görülmü tür. Yüksek konsantrasyonda "salting out" meydana geldi i için aktivite dü mektedir. KCl ve NH₄Cl tuzlarının konsantrasyonu arttıkça enzim aktivasyonunun arttı ı ve NH₄Cl tuzu dü ük konsantrasyonlarda daha etkili oldu u gözlemlendi. Ayrıca, K_xPO₄ tuzu, dü ük konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırırken yüksek konsantrasyonlarda enzim inhibisyonuna neden olmaktadır (ekil 4.18). Fosfat aynı zamananda ürün oldu u için, yüksek konsantrasyonda ürün inhibisyonu gerçekleşmektedir [Yıldız vd., 2012]. Literatürde iyon etkisi olarak bir de NaCl çalı ılmı tır ve Pta aktivitelerinin inhibisyonuna neden oldu u rapor edilmi tir [Lundie and Ferry, 1989]. Di er bakteri genomlarından elde edilen Pta aktiviteleri

yaklaşık %100 oranında inhibe olurken *G. kaustophilus* bakteri genomundan elde edilen Pta aktivitesi %40 oranında inhibe olmaktadır. Bunun sebebi, okyanus derinliklerinde ekstrem aralarda yaşayan *G. kaustophilus* bakterisinin çevresel faktörlere karşı direnç göstermesinin bir sonucu olarak düşünülmektedir. KCl varlığında inhibisyon etkisi daha azdır. Bu da, Na⁺ iyonlarının K⁺ iyonlarının bulunduğu bölgeye bağlanarak inhibe ettiğini göstermektedir.

PtaI sınıfından olan *B. subtilis* Pta, adenin nükleotidleri, ATP, AMP ve ADP tarafından inhibe edilirken pirüvat ve NADH tarafından inhibe edilmediği görülmüştür [Thomas and Hoch, 1973]. *G. kaustophilus* Pta aktivitesine metabolizmada önemli rol oynayan pirüvat, NADH, ATP ve α -ketoglutarat gibi metabolitlerin etkisi de incelendiğinde, NADH ve pirüvatın Pta aktivitesine kayda değer bir etkisi bulunmadığı, α -ketoglutarat ve ATP'nin ise inhibe ettiği görüldü. Yıldız ve arkadaşları, üropatojen olan *S. saprophyticus* bakteri genomundan klonlayıp rekombinant olarak elde ettikleri PtaI için α -ketoglutaratın allosterik bir inhibitör olduğunu rapor etmişlerdir [Yıldız vd., 2012]. Bu çalışmada da Pta'nın inhibitörü olan α -ketoglutarat'ın ve ATP'nin farklı tamponlarda ve pH'larda aktiviteye etkileri incelendiğinde ATP'nin her üç tampon ortamında da Pta'nın katalizlediği reaksiyonu benzer oranda inhibe ettiği rapor edildi. α -Ketoglutarat'ın ise HEPES (pH 7.5) ve MOPS (pH 7.5) tampon çözeltilerinde Pta'nın katalizlediği reaksiyonu %30 oranında inhibe ettiği görülürken, Tris (pH 7.5) tamponunda yapılan takiplerde %90 civarında inhibe olduğu bulunmuştur. α -Ketoglutarat'ın ve ATP'nin pH 7.5 ve pH 8.0 deki etkisinde ise ATP pH değeri imininden fazla etkilenmezken, α -ketoglutarat, pH 7.5 ve pH 8.0 Tris tamponlarında %50 oranında inhibisyon farkı olduğu izlendi. 2 karboksilik grubu içeren ve negatif yüklü olan α -ketoglutaratın Pta ile elektrostatik etkileşim yaparak, bulunduğu bölgedeki rezidülerin pozitif yüklü olduğu (His ve/veya Lys rezidüleri) ve artan pH ile nötr hale geçtikleri için bağlanmasının zayıfladığını göstermektedir. Mutasyon çalışmaları yapılarak yapı fonksiyon bakımından bu durumun aydınlatılması bu çalışmanın devamı niteliğinde öngörülmüş, kimyasal mekanizmasının aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

Literatürde *G. kaustophilus* Pta üzerine yapılmış bir çalışmada henüz yoktur. Üç boyutlu yapıları belirlenen Pta'lar diğer PtaI'ler için bir model teşkil etmekte ve yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarında rezidülerin yerlerini tahmin etmekte kullanılmaktadır [Becker et al. 2009]; [Khyami-Horani et al., 1996]. Patojenik bakterilerin ya da amsal faaliyetlerinde önemli yer tutan Pta, bu bakterilere karşı ilaç

geli tirmede hedef olarak seçilmektedir [Morya et al., 2012]. Ayrıca, asetil-CoA/CoA rejenerasyon deneylerinde de ticari olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalı madaki sonuçların literatürdeki bo lu un dolduracak ve ileriki çalı malara ı ık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Abaibou H., Pommier J., Benoit S., Giordano G., Mandrand M. Berthelot, (1995), "Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase", *Journal Bacteriology*, 177, 7141–7149.
- Abdel-Hamid A. M., Attwood M. M., Guest J. R., (2001), "Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*", *Microbiology*, 147, 1483–1498.
- Aksoy ., (2010), "*Staphylococcus saprophyticus* Bakterisinden Fosfotransasetilaz'ın Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- Alkan H., Baysal Z., Uyar F., Dogru M., (2007), "Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes", *Appllication Biochemistry Biotechnology*, 136, 183–192.
- Amarasingham C. D., Davis B. D., (1965), "Regulation of delta-keto-glutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*", *Journal Biological Chemistry*, 240, 3664–3668.
- Anfora A.T., Halladin D.K., Haugen B.J., Welch R.A., (2008), "Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 is adapted to acetogenic growth but does not require acetate during murine urinary tract infection", *Infection and Immunity*, 76, 5760-5767.
- Bandarian V., Reed G. H., (2002), "Analysis of the electron paramagnetic resonance spectrum of a radical intermediate in the coenzyme B(12)-dependent ethanolamine ammonia-lyase catalyzed reaction of S-2-aminopropanol", *Biochemistry*, 41, 8580–8588.
- Barnard, A., Wolfe A., Busby S., (2004), "Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organisations to produce different regulatory outcomes", *Currunt Opinion in Microbiology*, 7, 102–108.
- Becker P., Abu-Reesh I., Markossian S., Antranikian G., Märkl H., (1997), "Determination of kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil", *Application Microbiology Biotechnology.*, 48, 184–190.
- Bertagnolli B. L., Hager L. P., (1991), "Activation of *Escherichia coli* pyruvate oxidase enhances the oxidation of hydroxyethylthiamin pyrophosphate", *Journal Biological Chemistry.*, 266, 10168-10173.

Bertagnolli B. L., Hager L. P., (1993), “Role of flavin in acetoin production by two bacterial pyruvate oxidases”, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 300, 364-371.

Bora L., Kalita M.C., (2008), “Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additive”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 688–693.

Brown T. D. K., Jones-Mortimer M. C., Kornberg H. L., (1977), “The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*”, *Journal General Microbiology*, 102, 327–336.

Buckel W., (1999), “Anaerobic energy metabolism. Biology of the procaryotes”, edited by H. G. Chlegel, Thieme Stuttgart Germany., 278-326.

Castaño-Cerezo S., José M. Pastor, Sergio Renilla, Vicente Bernal, José L Iborra, Manuel Cánovas., (2009), “An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*”, *Microbial Cellular Factories*, 8, 54

Chang D. E., Shin S., Rhee J. S., Pan J.G., (1999), “Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl-CoA flux for the growth and survival”, *Journal Bacteriology.*, 181, 6656–6663.

Chen R., Hatzimanikatis V., Yap W. M., Postma P. W., Bailey J. E.. (1999), “Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in aphenylalanineproducing recombinant *Escherichia coli*”, *Biotechnology Progress*, 13, 768–775.

Cozzone A. J., (1998), “Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria”, *Annual Review Microbiology.*, 52, 127–164.

Cunningham L., Georgellis D., Green J., Guest J. R., (1998), “Coregulation of lipoamide dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*: characterisation of an ArcA binding site in the *lpd* promoter”, *FEMS Microbiology Letters.*, 169, 403–408.

de Graef M. R., Alexeeva S., Snoep J. L., and Teixeira de Mattos M. J., (1999), “The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*”, *Journal Bacteriology.*, 181, 2351–2357.

Diaz-Ricci J. C., Regan L., Bailey J. E., (1991), “Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*”, *Biotechnology Bioengineering*, 38, 1318–1324.

Doelle H. W., Ewings K. N., Hollywood N. W., (1982), “Regulation of glucose metabolism in bacterial systems”, *Advances Biochemistry Engineering*, 23, 1–35.

El-Mansi E. M., Holms W. H., (1989), "Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures", *Journal General Microbiology*, 135, 2875–2883.

Farmer W. R., Liao J. C., (1997), "Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*", *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3205–3210.

Grabau C., Cronan J. E. J., (1984), "Molecular cloning of the gene (*poxB*) encoding the pyruvate oxidase of *Escherichia coli*, a lipid-activated enzyme", *Journal Bacteriology*, 160, 1088–1092.

Gray C. T., Wimpenny J. W. T., Mossman W. R., (1966), "Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs's cycle enzymes in *Escherichia coli*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 117, 33–41.

Guest J. R., Russell G. C., (1992), "Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli*", *Current Topics Cellular Regulation*, 33, 231–247.

Heyde M., Laloi P., Portalier R., (2000), "Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*", *Journal Bacteriology*, 182, 198–202.

Hideko Y. O., Matsuyama A., Nakano E., (1990), "Cloning of a gene coding for phosphotransacetylase from *Escherichia coli*", *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 680–682.

Holms W. H., (1986), "The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate", *Current Topics in Cellular Regulation*, 28, 59–105.

Holms H., (1996), "Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*", *FEMS Microbiology Reviews.*, 19, 85–116.

Iyer P. P., Ferry J. G., (2001), "Role of arginines in Coenzyme A binding and catalysis by the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*", *Journal Bacteriology*, 183, 4244–4250.

Johannes E., Barnhart D. M., Slonczewski J. L., (2004), "pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli*", *Journal Bacteriology*, 186, 192–199.

Kakuda H., Hosono K., Shiroishi K., Ichihara S., (1994), "Identification and characterization of the *ackA* (acetate kinase A)-*pta* (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an *ackA-pta* deletion mutant of *Escherichia coli*", *Journal Biochemistry*, 116, 916–922.

- Kavita S. W., Ferry J. G., (1995), “Transcriptional regulation of the phosphotransacetylase-encoding and acetate kinase-encoding genes (*pta* and *ack*) from *Methanosarcina thermophila*”, *Journal Bacteriology*, 177, 1699–1702.
- Kennedy E. P., (2001), “Hitler’s gift and the era of biosynthesis”, *Journal Biological Chemistry*, 276, 42619–42631.
- Khyami-Horani H., (1996), “Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 399–401.
- Kim H. K., Sung M. H., Kim H. M., Oh T. K., (1994), “Purification and partial characterization of thermostable carboxyl esterase from *Bacillus stearothermophilus* L1”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 961–962.
- Kleman G. L., Strohl W. R., (1994), “Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell density fermentation”, *Applied Environmental Microbiology*, 60, 3952–3958.
- Knappe J., Sawers G., (1990), “A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*”, *FEMS Microbiology Reviews*, 75, 383–398.
- Ko Y. F., Bentley W. E., Weigand W. A., (1995), “The effects of cellular energetics on foreign protein production”, *Application Biochemistry Biotechnology*, 50, 145–159.
- Kornberg H. L., (1966), “The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*”, *Journal Biochemistry*, 99, 1–11.
- Latimer M. T., Ferry J. G., (1993), “Cloning, sequence analysis, and hyperexpression of the genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Methanosarcina thermophila*”, *Journal Bacteriology*, 175, 6822–6829.
- Lawrence S. H., Luther K. B., Schindelin H., Ferry J. G., (2005), “Structural and functional studies suggest a catalysis mechanism for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*”, *Journal Bacteriology*, 188, 1143–1154.
- Lee T. Y., Makino K., Shinagawa H., Nakata A., (1990), “Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *E. coli*”, *Journal Bacteriology*, 172, 2245–2249.
- Lee S. Y., (1996), “High cell density culture of *Escherichia coli*”, *Trends Biotechnology*, 14, 98–105.
- Lewendon A., Murray I. A., Shaw W. V., Gibbs M. R., Leslie A. G., (1990), “Evidence for transition-state stabilization by serine-148 in the catalytic mechanism of chloramphenicol acetyltransferase”, *Biochemistry*, 29, 2075–2080.
- Linda I. H., Bruno L., Alan P., Wolfe J., (2010), “Bacterial protein acetylation: the dawning of a new age”, *Molecular Microbiology*, 77 (1), 15–21.

Majewski R. A., Domach M. M., (1990), “Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*”, *Biotechnology Bioengineering*, 35, 732–738.

Matsuyama A., Yamamoto-Otake H., Hewitt J., MacGillivray R. T. A., Nakano E., (1994), “Nucleotide sequence of the phosphotransacetylase gene of *Escherichia coli* strain K12”, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1219, 559–562.

McCleary W. R., Stock J. B., Ninfa A. J., (1993), “Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*?”, *Journal Bacteriology*, 175, 2793–2798.

Morya V. K., Varun Dewaker, Eun-Ki Kim, (2012), “In Silico Study and Validation of Phosphotransacetylase (PTA) as a Putative Drug Target for *Staphylococcus aureus* by Homology-Based Modelling and Virtual Screening”, *Application Biochemistry Biotechnology*, 168, 1792–1805.

Nawani N., Khurana J., Kaur J., (2006), “A Thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization”, *Molecular and Cellular Biochemistry.*, 290, 17–22.

Ninfa A. J., Jiang P., Atkinson M. R., Peliska J. A., (2000), “Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*”, *Current Topics in Cellular Regulation*, 36, 31–75.

Noronha S. B., Yeh H. J., Spande T. F., Shiloach J., (2000), “Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using (13)C-NMR/MS”, *Biotechnology Bioengineering*, 68, 316–327.

Nyström, T., (1994), “The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival”, *Molecular Microbiology*, 12, 833–843.

Park S. J., Cotter P. A., Gunsalus R. P., (1995), “Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability”, *Journal Bacteriology*, 177, 6652–6656.

Pelroy R. A., Whiteley H. R., (1972), “Kinetic properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescens*”, *Journal Bacteriology*, 111, 47–55.

Peng L., Shimizu K., (2003), “Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement”, *Applied Microbiology Biotechnology*, 61, 163–178.

Prüß B. M., Nelms J. M., Park C., Wolfe A. J., (1994), “Mutations in NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids”, *Journal Bacteriology*, 176, 2143–2150.

Prüß B. M., (1998), “Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*”, *Archiver of Microbiology*, 170, 141–146.

Quail M. A., Haydon D. J., Guest J. R., (1994), “The *pdhR-aceEF-ldp* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex”, *Molecular Microbiology*, 12, 95–104.

Roof D. M., Roth J. R., (1988), “Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*”, *Journal Bacteriology*, 170, 3855–3863.

Rose I. A., Grunsberg-Manago M., Korey S. R., Ochoa S., (1954), “Enzymatic phosphorylation of acetate”, *Journal Biological Chemistry*, 211, 737–756.

Rossmann R., Sawers G., Bock A., (1991), “Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon”, *Molecular Microbiology*, 5, 2807-2814.

Slonczewski L., (2001), “Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*”, *Journal Bacteriology*, 183, 6466–6477.

Stancik L. M., Stancik D.M., Schmidt B., Barnhart D.M., Yoncheva Y. N., Slonczewski a. J. L., (2002), “pH-Dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*”, *Journal Bacteriology*, 184, 4246–4258.

Starai V. J., Takahashi H., Boeke J. D., Escalante-Semerena J. C., (2003), “Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, 163, 545–555.

Starai V. J., Escalante-Semerena, J. C., (2004), “Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2020-2030.

Stulke J., Hillen W., (1999), “Carbon catabolite repression in bacteria”, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 195–201.

Suzuki T., (1969), “Phosphotransacetylase of *Escherichia coli* B, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides”, *Biochimica Biophysica Acta*, 191, 559–569.

Takami H., Takaki Y., Chee G., Nishi S., Shimamura S., Suzuki H., Matsui S., Uchiyama I., (2004), “Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*”, *Nucleic Acids Research*, 32.21, 6292-6303.

Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F. R., Conway T., (1999), “Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media”, *Journal Bacteriology*, 181, 6425–6440.

Thauer R. K., Jungermann K., Decker K., (1977), “Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria”, *Bacteriology Review*, 4, 100–180.

Thomas A. R., Hoch J. A., (1973), “Phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis*: purification and physiological studies”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 321, 114-125.

Tseng G. C., Oh M. K., Rohlin L., Liao J. C., Wong W. H., (2001), "Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects", *Nucleic Acids Research.*, 29, 2549–2557.79.

Varma A., Paulson B. O., (1994), "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110", *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3724–3731.

Van de Walle M., Shiloach J., (1998), "Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation", *Biotechnology Bioengineering*, 57, 71–78.

Van Dyk T. K., LaRossa R. A., (1987), "Involvement of ack-pta operon products in alpha-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*", *Molecular General Genetics*, 207, 435–440.

Wang Y., Srivastava K. C., Shen G. J., Wang H. Y., (1995), "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841)", *Journal Fermentation Bioengineering*, 79, 433–438.

Wanner B. L., (1992), "Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria?", *EMBO Journal*, 11, 265–277.

Wanner B. L., (1993), "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria", *Journal Cellular Biochemistry*, 51, 47–54.

Whiteley H. R., Pelroy R. A., (1971), "Purification and properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescens*", *Journal of Biological Chemistry*, 247, 1911- 1917.

Wolfe A. J., Chang D. E., Walker J. D., Seitz-Partridge J. E., Vidaurri B., Prüß M., Henk M. C., Larkin J. C., (2003), "Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development", *Molecular Microbiology*, 48, 977–988.

Wong S. S., Wong L. J., (1980), "Inactivation of *E. coli* acetate kinase by N-ethylmaleimide Protection by substrates and products", *Biochimica et Biophysica Acta*, 615, 121-131.

Wong S. S., Wong L. J., (1981), "Evidence for an essential arginine residue at the active site of *E. coli* acetate kinase", *Biochimica et Biophysica Acta*, 660, 142-147.

Wu D., Govindasamy L., Lian W., Gu Y., Kukar T., Agbandje-McKenna M., McKenna R., (2003), "Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer", *Journal Biological Chemistry*, 278, 13159- 13165.

Xu B., Jahic M., Enfors S.O., (1999), "Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*", *Biotechnology Progress.*, 15, 81–90.

Xu Q. S., Jancerik J., Lou Y., Kuznetsova K., Yakunin A. F., Yokota H., Adams P., Kim R., Kim S. H., (2005), “Crystal structures of a phosphotransacetylase from *B. subtilis* and its complex with acetyl-phosphate”, *Journal of Structural and Functional Genomics*, 6, 269-279.

Yamamoto-Otake H. M., Matsuyama A., Nakano F., (1990), “Cloning of a gene coding for phosphotransacetylase from *Escherichia coli*”, *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 680–682.

Yıldız H., Yurtsever Aksoy ., Türkan A., (2012), “A phosphotransacetylase from uropathogenic *Staphylococcus saprophyticus*: Characterization, kinetic analysis and its allosteric inhibition by α -ketoglutarate”, *Turkish Journal of Biochemistry*, 37 (3), 251–263.

Yıldız H., (2011), “*Staphylococcus saprophyticus* Fosforasetilaz’ın kinetik ve mekanizmasının incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Zhuang L. B., Bennett G. N., Rudolph F. B., (1996), “Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824”, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2758–2766 81.

ÖZGEÇM

Meral AMANVERMEZ KARABA 1981 yılında Gebze'de doğdu. 1998 yılında Darıca Aslan Çimento Endüstri Meslek Lisesi Kimya Bölümünü okul 2.sini olarak bitirdi. 1999 yılında Kocaeli Üniversitesi Kimya Teknolojileri bölümüne başladı ve 2001 yılında bölüm 2.sini olarak mezun oldu. Aynı zamanda 1999 yılında TÜB TAK-UEKAE Yarı iletkenler Teknolojisi Araştırma Laboratuvarında tekniker olarak tam zamanlı göreve başladı. 2003 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümüne kayıt oldu ve 2007 yılında üstün başarıyla örenci ünvanı ile mezun oldu. 2009 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2010-2012 yılları arasında TÜB TAK-UME Fotonik ve Elektronik Sensörler Laboratuvarında araştırmacı olarak görev aldı. Halen TÜB TAK-B LGEM Yarı iletkenler Teknolojisi Araştırma Laboratuvarında araştırmacı olarak çalışmaktadır. Evli ve iki erkek annesidir.

EKLER

Ek A: Açıklamalar

- Besiyeri ve Hazırlanması

LB (Luria-Bertani) broth besiyeri: Pepton (10 g/L), maya ekstrakt (5 g/L), NaCl (5 g/L) distile su içerisinde çözülerek pH 7' ye ayarlanır ve 1'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'ta 15 dakika sterilize edilir.

- SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

% 10'luk APS Çözeltisi: Amonyum persülfat (0.1 g) tartılarak 1 mL saf suda çözülür. Çözelti taze hazırlanmalıdır.

% 10'luk SDS Çözeltisi: Sodyum dodesil sülfat (5 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve hacim 50 mL'ye tamamlanır.

% 30'luk Akrilamid Çözeltisi: Akrilamid (30 g) ve bis-akrilamid (0.8 g) tartılarak ve hacim 100 mL'ye tamamlanır.

1.5 M Tris Tampon (pH 8): Tris (36.34 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH 8'e ayarlanır. Destile suyla hacim 200 mL'ye tamamlanır.

1 M Tris Tampon (pH 6.8): Tris (1.11 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH'sı 6.8'e ayarlanır. Destile suyla hacim 100 mL'ye tamamlanır.

SDS Yürütme Tamponu: Tris (3.03 g), glisin (14.04 g) ve SDS (1 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür, hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

6X Örnek Yükleme Tamponu: Bromophenol blue (6 mg), Tris tampon (0.9 mL, 1 M, pH 6.8), gliserol (3.75 mL) , SDS (4.5 mL, % 10 (wt/vol)), destile su (2.1 mL) karıştırılarak hazırlanır. Hazırlanan çözeltiden 375 µL tüplere aktarılır. Kullanılacağı zaman mikrotüpe, 125 µL β-merkaptoetanol ilave edilir.

- Jel Boyama Çözeltisi

250 mL metanol, 50 mL asetik asit ve 0.5g Coomassie brilliant blue destile su ile 500' mL'ye tamamlanır.

- Lizozim Çözeltisi

10 mg lizozim 1mL 50mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda hazırlanır.

- 100 mM IPTG Çözeltisi:

0.12 g IPTG steril su ile 5 mL'ye tamamlanır. -20 °C'de saklanır.

- Ni kolonu Rejenerasyonu Kimyasalları ve İşlem Sırası

— 10xRezin hacmi (RH) dI su

— 10 x RH Stripping the Ni²⁺ buffer

— 10 x RH dI su

— 10 x RH 1,5M NaCl çözeltisi

— 10 x RH dI su

— 10 x RH 1M NaOH çözeltisi

— 10 x RH dI su

— 10 x RH %30 luk isopropanol

— 10 x RH dI su

— 5 x RH 0.2M NiSO₄ çözeltisi

— 5 x RH dI su

— 10 x RH Buffer A çözeltisi

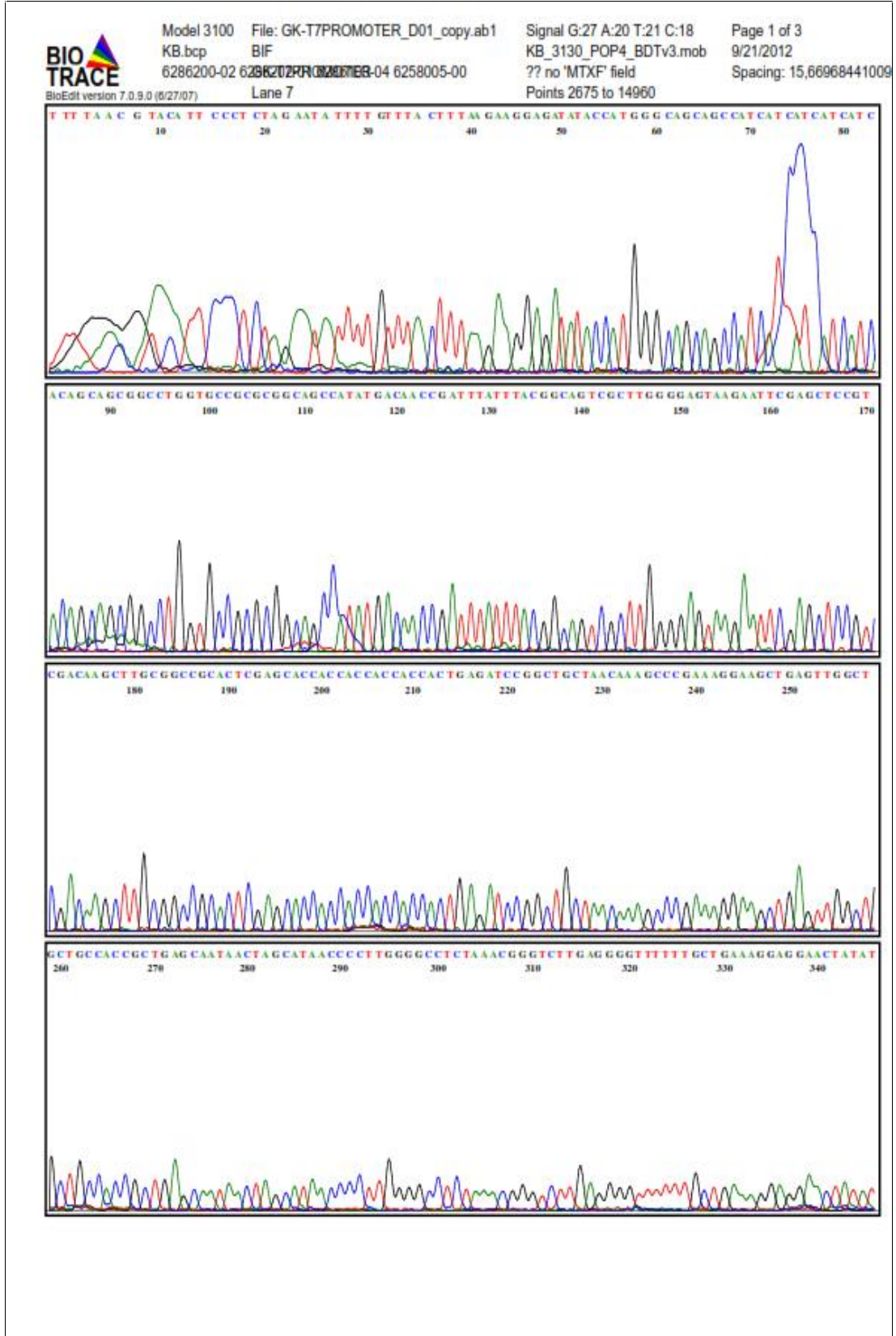
- Top 10/ BL21(DE3) Kompetant Hücre Hazırlama

Kompetant hücre hazırlamak için, öncelikle *E.coli* Top 10/BL21(DE3) bakterisinin -80 °C'den 5µl 1 gece önce 5 ml hacimli LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde üremeye bırakıldı. Ertesi gün, üremiş olan kültürden 50 ml hacimli LB sıvı besiyerinde %1 olacak şekilde inoküle edildi ve 37 °C'de OD_{600nm} yaklaşık 0.4 oluncaya kadar (2.5-3.0 saat) üretildi. Bakteri kültürü 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirildi. Sıvı kısım uzaklaştırılarak bakteri peleti 2 ml yaklaşık 0.1 M CaCl₂ ile çözüldü ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Bakteri kültürü 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirildi. Süpernatant dökülerek bakteri peleti 1000 µl yaklaşık 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözüldü. Bakteri kültürü steril mikrosantrifüj tüplerine 50'er µl olacak şekilde paylaştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

- Kullanılan Tampon Çözeltiler

- Tampon A, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl içermektedir.
- Tampon B, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 içermektedir.
- Tampon C, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT içermektedir.
- Tampon D, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl içermektedir.

- Klonladı ımız *G. kaustophilus EutD* Geninin Dizi Kromotogramları



ekil A1.1: T7 Promoter ile yapılan klonladı ımız *G. kaustophilus eutD* geninin dizi kromotogramları.

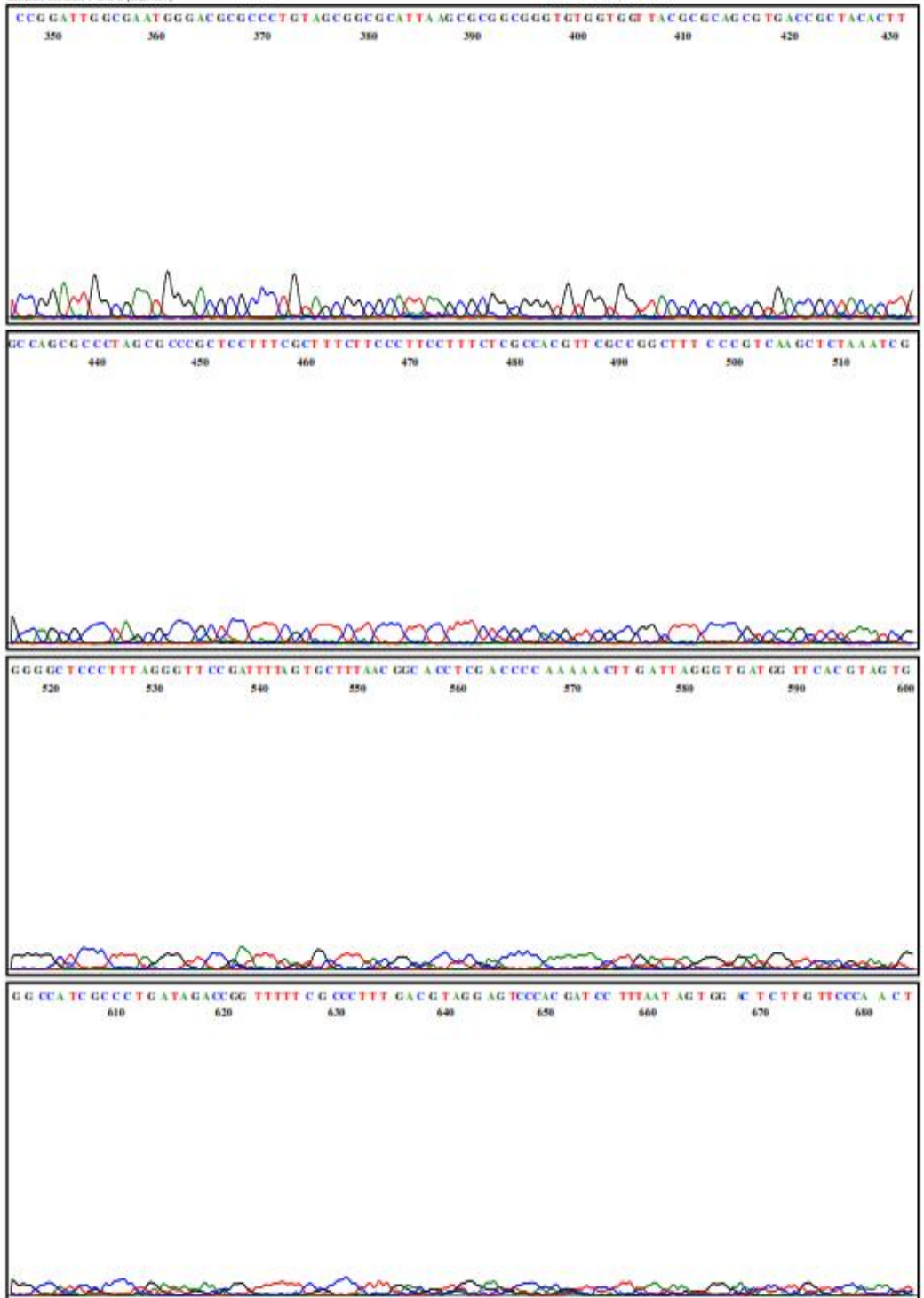


BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07)

Model 3100 File: GK-T7PROMOTER_D01_copy.ab1
KB.bcp BIF
6286200-02 6286200-04 6258005-00
Lane 7

Signal G:27 A:20 T:21 C:18
KB_3130_POP4_BDTv3.mob
?? no 'MTXF' field
Points 2675 to 14960

Page 2 of 3
9/21/2012
Spacing: 15,66968441009



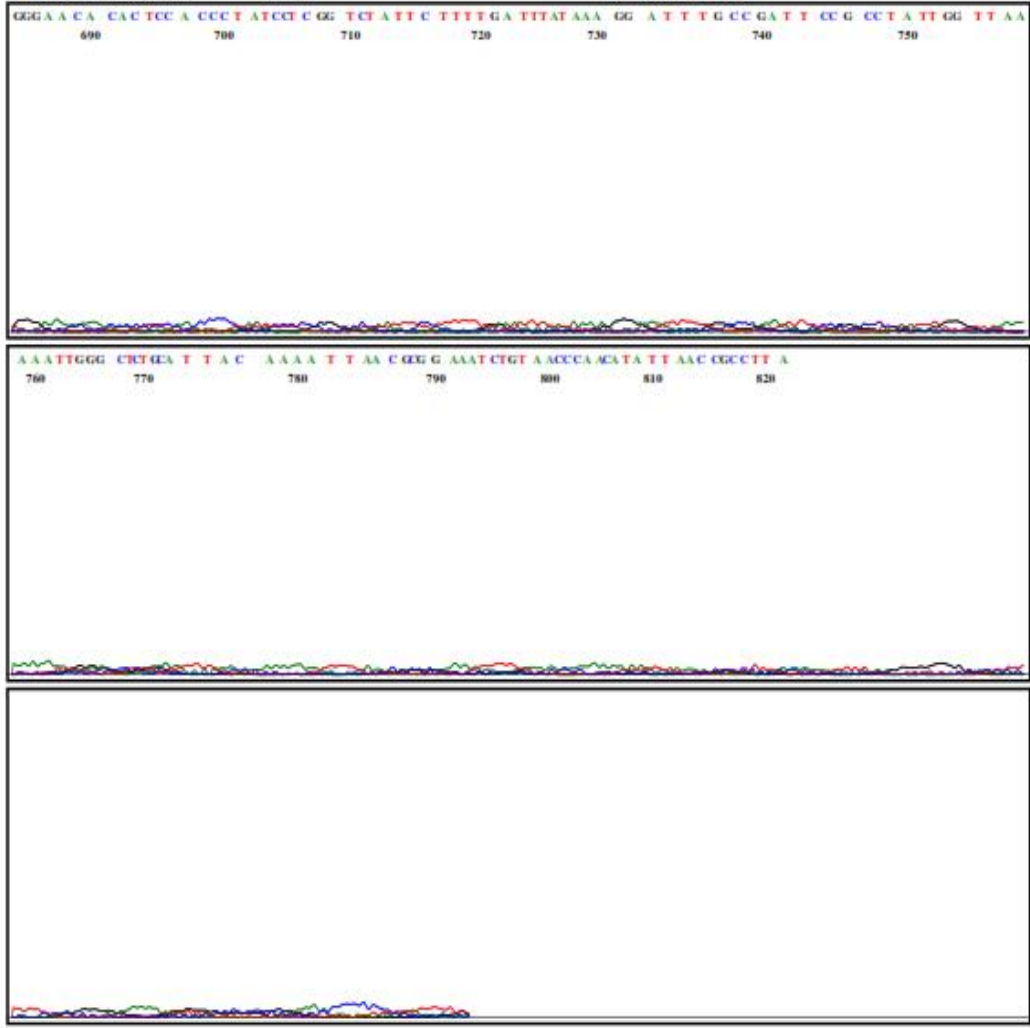
ekil A1.1 : Devam.



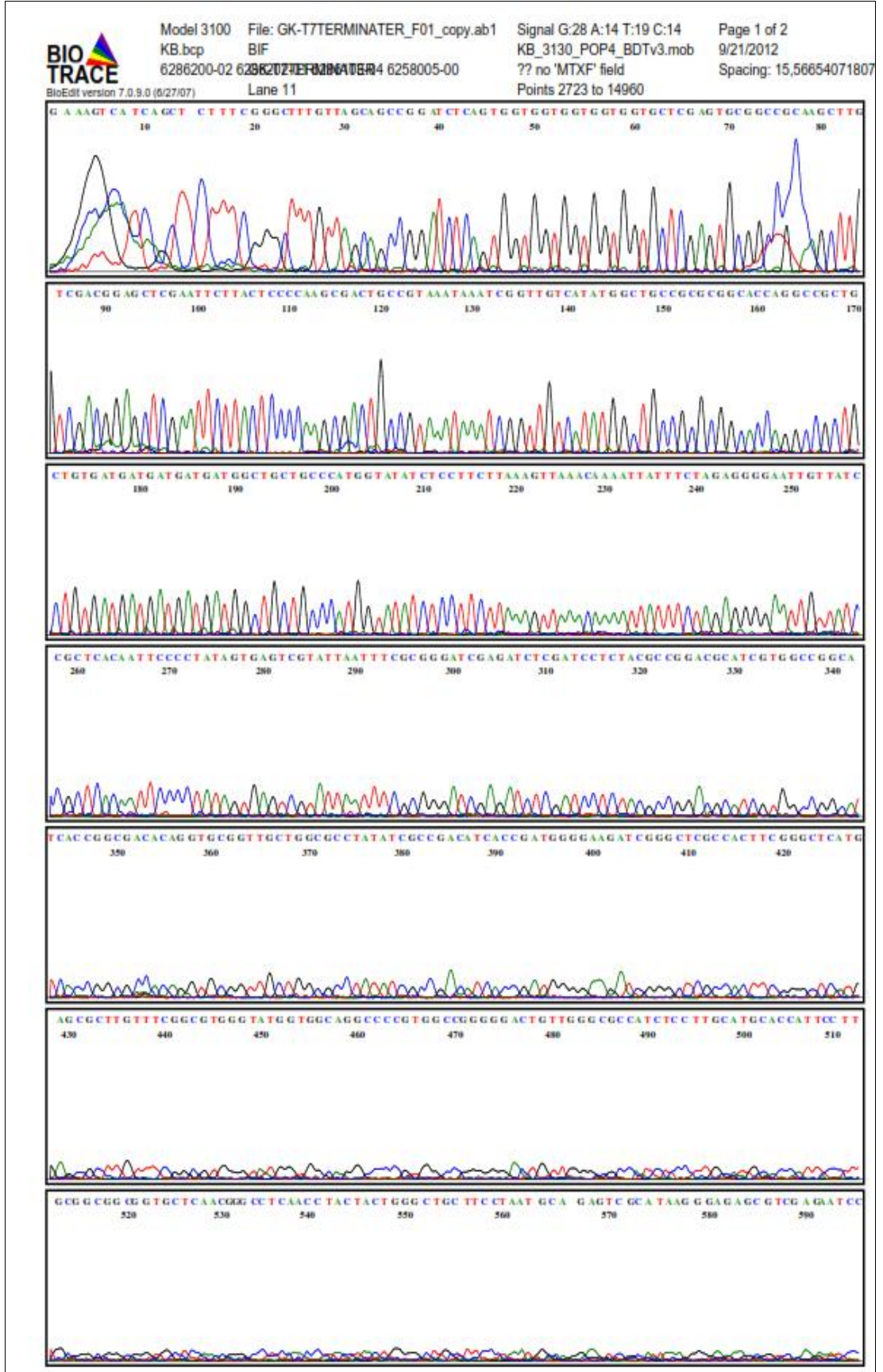
Model 3100 File: GK-T7PROMOTER_D01_copy.ab1
KB.bcp BIF
6286200-02 6286200-04 6258005-00
Lane 7

Signal G:27 A:20 T:21 C:18
KB_3130_POP4_BDTv3.mob
?? no 'MTXF' field
Points 2675 to 14960

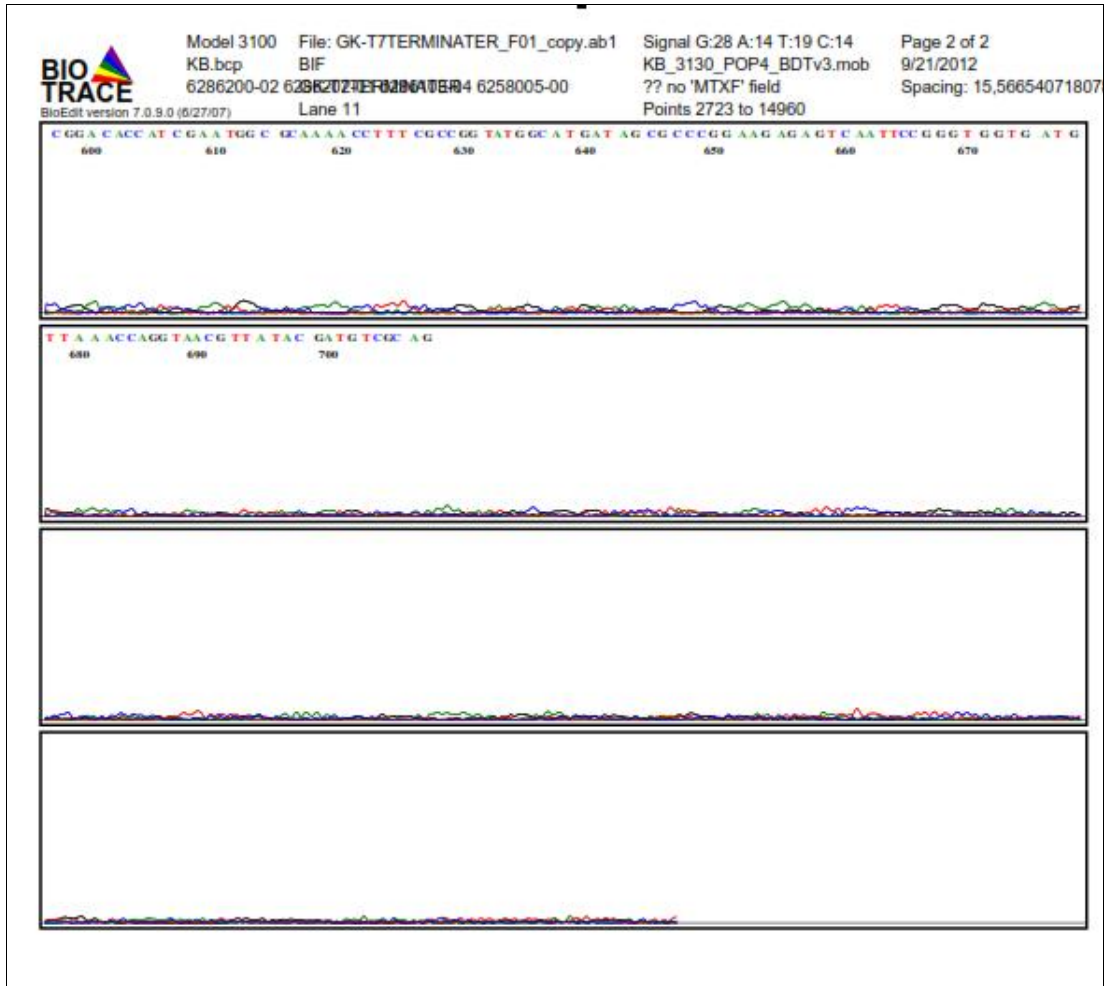
Page 3 of 3
9/21/2012
Spacing: 15,66968441009



ekil A1.1 : Devam.



ekil A1.2: T7 Terminater ile yapılan klonladı ımız *G. kaustophilus eutD* geninin dizi kromotogramları.



ekil A1.2: Devam.