

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ZEYTİN TAHMİNİ TRİOZFOFAT İZOMERAZ GENİNİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZEYNEP KARABAŞ**

**BALIKESİR, EYLÜL - 2011**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ZEYTİN TAHMİNİ TRİOZFOFAT İZOMERAZ GENİNİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZEYNEP KARABAŞ**

**BALIKESİR, EYLÜL - 2011**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

ZEYNEP KARABAŞ tarafından hazırlanan “ZEYTİN TAHMİNİ TRİOZFOFAT İZOMERAZ GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 23.09.2011 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Sakin Vural VARLI

Üye  
Yrd. Doç. Dr. İsmet BAŞARAN

Yedek Jüri Üyeleri

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 110O108 nolu proje ve Balıkesir Üniversitesi tarafından 2011-30 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**ZEYTİN TAHMİNİ TRIOZFOSFAT İZOMERAZ GENİNİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ZEYNEP KARABAŞ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)  
BALIKESİR, EYLÜL - 2011**

Bu çalışmada; Ayvalık zeytin çeşidine (*Olea europaea* L. cv. Ayvalık) ait Kasım ayındaki meyve örneklerinden saflaştırılan toplam RNA kullanılarak yapılan cDNA kütüphanesinden izole edilen tahmini triozfosfat izomeraz geninin moleküler analizi yapıldı. Triozfosfat izomeraz (TIM); dihidroksi asetonfosfat ile D-gliseraldehit-3-fosfat arasında tersinir olarak işlev gören katalitik aktivatör bir enzimdir. Hızlı ve verimli enerji üretiminde görev aldığından hemen hemen tüm canlılarda bulunur. Hayvanlar, bitkiler, bakteriler, böcekler, memeliler ve mantarlar dahil olmak üzere birçok canlıda korunmuş formdadır. Çeşitli biyoinformatik araçlarla analiz edilen triozfosfat izomeraz geninin; yaklaşık 1176 nükleotit uzunluğundaki mRNA'sının 254 amino asit kodlayan bir açık okuma çerçevesi (ORF) bulundurduğu, kısa bir 5'UTR (19 nükleotit) ve çok uzun (23 nükleotitlik Poli A kuyruğu hariç 367 nükleotit uzunluğunda) bir 3'UTR içerdiği, moleküler ağırlığının 29044.44 Dalton olduğu ve izoelektrik noktasının da yaklaşık 5.36 olduğu tespit edildi. Triozfosfat izomerazın, stoplazmik TIM enzimlerinin homoloğu olmasına rağmen; valin ve alanin içeriği sırasıyla %11 ve %12 olmak üzere toplam %48 hidrofobik amino asit içermesi dikkat çekmektedir. Zeytin çeşitleri arasında yapılan dizilemeler bu gende polimorfizm oranının çok düşük olduğunu gösterdi. Ayrıca zeytin triozfosfat izomeraz geninde introna rastlanmadı. Zeytinde ilk defa uygulanan TAIL - PCR ile tahmini promotör bölgesinden yaklaşık 350 nükleotitlik dizi tespit edildi. Tahmini genin dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesini belirlemek için 12 ay boyunca toplanan zeytin örneklerinden elde edilen RNA'lar ile real - time PCR yapıldı. Genin meyvede sentezlendiği aylara göre bakıldığında ise; Kasım ayında oluşan olgun meyvede en çok sentezlendiği saptandı. Farklı zeytin çeşitlerinin meyveleri arasında yapılan ekspresyon analizi sonucunda da "İzmir Sofralık" zeytin çeşidinde en fazla bulunduğu görüldü.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin, triozfosfat izomeraz, intron analizi, promotör, polimorfizm analizi

## ABSTRACT

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE  
TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM OLIVE  
MSC THESIS  
ZEYNEP KARABAŞ  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY  
(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. EKREM DÜNDAR )  
BALIKESİR, SEPTEMBER 2011**

In this study, a putative olive triosephosphate isomerase (TIM), isolated from a cDNA library constructed from olive (*Olea europaea* L.) fruits in November, has been analyzed. BLAST analysis of the cDNA sequence in NCBI databases revealed it has homology to triosephosphate isomerases from various plants. Triosephosphate isomerase is an enzyme that acts as a catalytic activator between D-glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. TIM plays an important role in several metabolic pathways and is essential for efficient energy production. It occurs as a conserved form at animals, plants, bacteria, insects, mammals and fungi. Analysis using various bioinformatics tools revealed that the putative triosephosphate isomerase gene had an approximately 1176 nucleotides long mRNA that encodes a 254 amino acid long open reading frame (ORF). It was estimated to have a molecular weight of 29044.44 Daltons. It contains a short 5' UTR (19 nucleotides) and a long (367 nucleotides in addition to 23 nucleotides Poly A tail) 3' UTR. The isoelectric point of the putative triosephosphate isomerase was calculated as 5.36. Although the putative triosephosphate isomerase had homology to cytosolic TIMs, its 48% hydrophobic content including 11% valine and 12% alanine is noteworthy. Experimental studies suggested that polymorphism is not found among olive cultivars. No introns of the putative gene were detected. With this study, TAIL-PCR was applied for the first time in olive to determine the promoter region of the putative triosephosphate isomerase, and a portion of approximately 350 nucleotides was detected. Spatial and temporal expression patterns of its mRNA were detected using real – time PCR from total RNA of olive samples collected monthly for a year. Real – time PCR analysis revealed olive putative TIM had the highest expression level in November. Expression analysis among fruits of different cultivars revealed “İzmir Sofralık” had the highest TIM mRNA level.

**KEYWORDS:** Olive, triosephosphate isomerase, intron analysis, promoter, polymorphism analysis

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zeytin ( <i>Olea europaea</i> L.).....	1
1.1.1 Triozfosfat İzomeraz Nedir? .....	1
1.1.2 Triozfosfat İzomerazın İşlevi .....	2
1.1.3 Glikoliz Reaksiyonunda Triozfosfat İzomerazın Rolü .....	4
1.1.4 TIM Proteini ve TIM'in Aktif Bölgesi .....	5
1.1.4.1 TIM Barrel .....	6
1.1.4.1.1 TIM Barrel'deki Esnek ve Hareketli Kıvrımların Önemi ....	8
Kıvrım6 ve Kıvrım7 .....	8
1.1.5 Etkin Bir Enzim Olarak TIM .....	9
1.1.6 TIM ile İlgili Yapısal Çalışmalar .....	11
1.1.7 3 Atomlu TIM'in Çözünürlüğü Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	12
1.1.8 Monomerik TIMlerle İlgili Çalışmalar .....	13
1.1.9 Korunmuş Dizi Modelleri .....	15
1.1.10 Klasik ve Çapraz Reaksiyon Mekanizması .....	16
1.1.11 TIM'in Kimyasal Mekanizması .....	18
1.1.11.1 Genel Asit-Baz Katalizleri .....	20
1.1.11.1.1 TIM Tarafından Katalize Edilen GAP ve DHAP Ara .....	21
Ürünlerinin Kinetik İçerikleri.....	21
1.1.12 İzomeraz Reaksiyonu.....	22
1.1.13 TIM' in Fizyolojik Rolü .....	23
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>25</b>
2.1 Biyoinformatik Analiz .....	255
2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	26
2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama .....	26
2.4 DNA İzolasyonu .....	27
2.5 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması .....	27
2.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	29
2.7 Agaroz Jel Elektroforezi .....	30
2.8 Gerçek Zamanlı PCR İçin Bitki Materyali Toplama.....	31
2.9 RNA İzolasyonu .....	33
2.10 DEPC'li Su Hazırlama .....	33
2.11 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced) .....	35
2.12 Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	37
2.13 Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) .....	38
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>40</b>
3.1 Bioinformatik Analiz .....	40
3.1.1 BLAST Analizi .....	40

3.1.2	BioEdit Programı .....	43
3.2	ExPASy Analizleri .....	44
3.3	DNA İzolasyonu ve PCR .....	47
3.4	İntron Analizi .....	48
3.5	Polimorfizm Analizi .....	49
3.6	TAIL-PCR .....	50
3.7	Triozfosfat İzomeraz Geninin Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	51
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>60</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Var yılı olarak belirlenen 1.Ağaç .....	32
Şekil 2.2: Yok yılı olarak belirlenen 2.Ağaç .....	35
Şekil 2.3: TAIL-PCR'nin mekenizması .....	35
Şekil 3.1: TIM'in cDNA dizisinin BLAST analizi.....	40
Şekil 3.2: TIM cDNA dizisine benzeyen nükleotit kayıtları .....	41
Şekil 3.3: Protein dizisinin analizi .....	41
Şekil 3.4: ORF dizisine benzeyen protein kayıtları .....	41
Şekil 3.5: "mk4mk22" cDNA dizisinin ait olduğu protein ailesi .....	41
Şekil 3.6: TIM proteininin aktif bölgesi .....	42
Şekil 3.7: TIM proteininin Cn3D'de görüntülenen 3 boyutlu yapısı.....	42
Şekil 3.8: Triozfosfat İzomerazın cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu ...	43
Şekil 3.9: Triozfosfat izomeraz geninin açık okuma çerçevesi .....	43
Şekil 3.10: Triozfosfat izomeraz proteinin amino asit kompozisyonu .....	44
Şekil 3.11: Triozfosfat izomerazın hücre içi lokalizasyon tahmini .....	44
Şekil 3.12: Triozfosfat izomeraz proteinin hücre içi tahmini lokalizasyonu....	45
Şekil 3.13: Triozfosfat izomeraz proteinin transit peptid analizi .....	45
Şekil 3.14: Triozfosfat izomerazın protein özelliği .....	46
Şekil 3.15: Triozfosfat izomerazın sinyal peptid analizi .....	46
Şekil 3.16: Triozfosfat izomerazın transmembran proteini analizi .....	47
Şekil 3.17: İzole edilen genomik DNA örnekleri .....	47
Şekil 3.18: Zeytin çeşitleriyle yapılan PCR ürünleri .....	48
Şekil 3.19: İntron tespiti için yapılan PCR ürünleri .....	48
Şekil 3.20: Zeytin triozfosfat izomeraz geninin intron analizi .....	49
Şekil 3.21: Dizi analizinden gelen dizilere ait kromotogramlar .....	49
Şekil 3.22: Zeytin çeşitlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.23: Zeytin çeşitlerinin amino asit dizilerinin karşılaştırılması .....	50
Şekil 3.24: TAIL-PCR jel görüntüsü .....	50
Şekil 3.25: Promotör analizi .....	51
Şekil 3.26: Promotör aday bölgenin NCBI veri tabanında analizi .....	51
Şekil 3.27: TIM' in 5' ucundan 63 bazla benzeşmesi.....	51
Şekil 3.28: Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 3.29: Yaprak örnekleri grafiği .....	52
Şekil 3.30: Yaprak örneklerindeki ekspresyon seviyesi .....	53
Şekil 3.31: Doku örnekleri grafiği .....	53
Şekil 3.32: Farklı dokulardaki ekspresyon seviyesi .....	54
Şekil 3.33: Meyve hasat zamanı ayları grafiği .....	54
Şekil 3.34: Meyve örneklerinde hasat zamanı olan aylara göre ekspresyon seviyeleri .....	55
Şekil 3.35: Meyve çeşitleri grafiği.....	55
Şekil 3.36: Meyve çeşitlerine göre ekspresyon seviyeleri.....	56

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> TIM'in kinetiği .....	21
<b>Tablo 2.1:</b> Polimorfizm için toplanan zeytin çeşitleri .....	27
<b>Tablo 2.2:</b> PCR'lerde kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri .....	28
<b>Tablo 2.3:</b> Primerlerden çalışma solüsyonu hazırlanması .....	29
<b>Tablo 2.4:</b> PCR komponentler, kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları .....	29
<b>Tablo 2.5:</b> PCR döngü koşulları .....	30
<b>Tablo 2.6:</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve komponentlerinin miktarı .....	31
<b>Tablo 2.7:</b> Agaroz jelde kullanılan malzemeler .....	31
<b>Tablo 2.8:</b> Ekspresyon seviyelerini belirlemek için toplanan örnekler ve hava şartları .....	34
<b>Tablo 2.9:</b> TAIL-PCR programı .....	36
<b>Tablo 2.10:</b> TAIL-PCR için gerekli komponentler ve kullanılan miktarlar .....	37
<b>Tablo 2.11:</b> RT-PCR komponentleri ve uygulanma protokolü .....	38
<b>Tablo 2.12:</b> Real-Time PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları .....	39
<b>Tablo 2.13:</b> Real-Time PCR döngü koşulları .....	39

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AD:</b>	Arbitrary degenerate (rastgele bağlanan)
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>bp:</b>	Base pair (Baz çifti)
<b>BHAP:</b>	Bromhidroksiaseton fosfat
<b>cDNA:</b>	Complementary DNA (Komplementer DNA)
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit molekülü
<b>DEPC:</b>	Dietilpirokarbonat
<b>DHAP:</b>	Dihidroksiaseton fosfat
<b>DGAP:</b>	D-Gliseraldehit-3-fosfat
<b>D,L-GOP D,L-:</b>	Glisidolfosfat
<b>DMSO:</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP:</b>	Deoksiribonükleosid trifosfat
<b>EDTA:</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EtBr:</b>	Etidyum bromid
<b>FBPase:</b>	Fruktoz-1,6-bifosfataz
<b>GAP:</b>	D-Gliseraldehit-3-fosfat
<b>gDNA:</b>	Genomik DNA
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen peroksit
<b>IPP 2:</b>	(N-formil-N-hidroksi)-aminoetilfosfonat
<b>Kb:</b>	Kilo baz
<b>NMR:</b>	Nükleer manyetik rezonans
<b>O<sub>2</sub>:</b>	Oksijen molekülü
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>PGH0:</b>	Fosfoglikolohidroksimat
<b>PGI:</b>	Fosfogluko izomeraz
<b>RNA:</b>	Ribonükleik asit
<b>RPI:</b>	D-Riboz-5-fosfat izomeraz
<b>RT-PCR:</b>	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları)
<b>TAIL:</b>	Thermal Asymmetric Interlaced
<b>Taq:</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE:</b>	Tris borat etilendiamintetraasetikasit
<b>TIM:</b>	Triozfosfat İzomeraz
<b>UV:</b>	Ultraviyole
<b>VY:</b>	Var yılı
<b>YY:</b>	Yok yılı
<b>2PG:</b>	2-Fosfoglikolat

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince ilgi, alaka ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukta bana destek olan, bilimin kapılarını aralamamı sağlayan, engin tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım, başta Biyoloji Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülendam TÜMEN olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih Coşkuna'a ve tüm değerli öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.

Bilgi, deneyim ve önerilerinden yararlandığım Araş. Gör. Görkem Deniz SÖNMEZ, Araş. Gör. Serdar SÖNMEZ, Araş. Gör. Meltem ALPER ve Araş. Gör. Sümeyye Aydoğan TÜRKÖĞLU'na teşekkür ederim.

Ders ve laboratuvar aşamasında bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, karşılaştığım sorunlarda koşarak yardımına gelen Öznur SUAKAR ve Şakir AKGÜN'e teşekkür ederim.

Uzun bir yolculuğa çıktık. Zorlu ve keyifli günler geçirdik. Hep beraber güldük-ağladık. İyi ve kötü anlar paylaştık, hep gülümseyerek hatırlayacağım "Beşi Bir Yerde" nin değerli üyeleri; Gülçin ÇETİN, Şenay SÜNGÜ, Gamze YENER ve Müslime YAVUZ'a teşekkür ederim.

Çalışmam için gerekli laboratuvar imkânlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü'ne ve bu merkezde görev alan diğer çalışanlara teşekkür ederim.

Toplanan zeytin örneklerinin -80 °C dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde nükleazlardan korumak için kullanılan sıvı azotun temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği müdürü Hasan DERTLİ'ye teşekkür ederim.

Sevgisiyle, dostluğuyla, pozitif enerjisiyle hayatıma anlam katan, neşeli veya sıkıntılı günlerimi paylaştığım, ne zaman zora düşsem ilk yanımda bulduğum, iyi niyetine ve yardımseverliğine hayran olduğum oda arkadaşım Nuray ŞENDEMİR'e çok teşekkür ederim.

Sonsuz anlayışı ve güzel yüreğiyle her zaman yanımda olan yurt müdirem Gamze UÇAR'a teşekkürlerimi sunarım.

İki yıl süren tez çalışmalarım süresince karşılaştığım her zorlukta moralimi yüksek tutmamı sağlayan, manevi desteklerini hep hissettiren arkadaşlarım Hüseyin DİNÇER, Göksel BİLGİÇ, Sabriye CAFEROĞLU, ve Ercüment YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayata umutla ve azimle tutunmamı sağlayan, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, en büyük teşekkürü hak eden aileme ve güzel bakış açısıyla örnek insan dedem Osman KIZILAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

**Balıkesir, 2011**

**Zeynep KARABAŞ**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.)

Zeytin (*Olea europaea* L.) gün geçtikçe çeşitli tıbbi ve ekonomik değerleri farkedilen bir meyve ağacıdır. Tüm dünyada yaygın bir gıda olarak tüketilen zeytin meyvesi, içeriğindeki yağ ve proteinlerle insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Dünyada zeytin üretiminin en fazla yapıldığı ülkeler; İspanya, Yunanistan ve Türkiye'dir [1]. Türkiye, İspanya'dan sonra dünyadaki ikinci büyük zeytin üreticisidir. Türkiye'de zeytin ülke ekonomisi ve beslenme yönünden büyük öneme sahip tarımsal bir üründür. Toplam 81 ilin 36'sında zeytin üretimine rastlanmaktadır [2].

### 1.1.1 Triozfosfat İzomeraz Nedir?

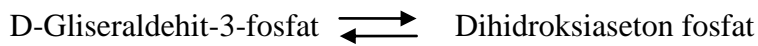
Yaygın adı triozfosfat izomeraz (TIM) olmakla beraber sistematik adı; D-Gliseraldehit-3P Ketol İzomeraz'dır [3]. Dihidroksi asetonfosfat ile D-gliseraldehit-3-fosfat arasında tersinir olarak işlev gören katalitik aktivatör bir enzimdir [4]. TIM; yapılan çalışmalarda tanımlanmış tüm türlerde homodimer yapıdaki bir enzim olarak saptanmıştır [5]. Ökaryotlardan arkeaya kadar çok iyi korunmuş bir amino asit dizisine sahiptir [6]. TIM ile ilgili ilk çalışmalara, 1977 ile 1991 yılları arasında Knowles ile başlanmıştır. Knowles ve arkadaşları [7]; TIM üzerine kısmi ve genel olacak şekilde enzimatik katalizörlüğü hakkında araştırmalar yapmıştır. Bu enzimi, katalitik gücün enzimler üzerindeki etkisini anlamak için kullanmışlardır. Ve bu yolla enzimler üzerinde canlı ortamda ideal katalitik etkiyi arttırmaya çalışmışlardır. Bu enzimler  $k_{cat}/K_m$  değerlerini aşmıştır. Difüzyon çarpışma limiti  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 'e yaklaşmıştır. Bundan önce yapılan enantiyomer TIM çalışmaları katalitik döngü üzerine yapılmıştır. Yan tepkimede istenilmeyen fosfatın eliminasyonunun önlenmesi, ayrıca geçiş durumu kararlılığı kuralı TIM'in aktif bölgesinin görevidir [8]. İlk olarak; TIM'in kristal yapısı,

1975'te Philips ve arkadaşları [9] tarafından bulunmuştur ve bu ilk kez tavuk kası TIM'inde araştırılarak bildirilmiştir.

TIM'in yapısı benzer birçok enzimin yapısı ile birlikte 1970ler'in ortasında Greg Petsko [10] tarafından tamamen çözümlenmiştir. TIM, genel olarak asit baz katalizi tepkimelerinde, enzimin aktif bölgesindeki pKa'nın moderasyonunda, ara ürün tepkimelerinde, reaksiyondaki katalitik verimliliğin optimizasyonunda, kriptik sterokimya görevler alır.

### 1.1.2 Triozfosfat İzomerazın İşlevi

TIM; reaksiyonları çok hızlı kataliz eden katabolik aktivatör bir enzim olduğundan etkin enerji üretimi için gereklidir ve birçok metabolik yolda rol oynar. Örneğin; fotosentezde CO<sub>2</sub> fiksasyonunda, pentoz fosfat döngüsünde, yağ asidi biyosentezinde, glukoneogenez ve solunumda glikolizde olmak üzere çeşitli görevlere sahiptir [11]. Sürekli enerji üretiminde görev aldığından hemen hemen tüm canlılarda bulunur. Hayvanlar, bitkiler, bakteriler, böcekler, memeliler ve mantarlar dahil birçok canlıda korunmuş formdadır [12]. Yüksek yapıli bitkilerde 2 farklı izoformu mevcuttur: Stoplazmada glikolitik yolda görevli enzim ve kloroplastta Kelvin döngüsünde görevli enzim [13]. TIM; D-gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfat arasında bir enediol aracısının şekillenmesi vasıtasıyla, enzimdeki tek bir bazın katıldığı proton transfer mekanizmasıyla ara indirgenmeleri katalizler [14]. TIM'in substratı açık zincirli triozfosfattır. TIM, divalent metal iyonlarına ihtiyaç duymaz [15].



Dihidroksiaseton fosfat ile D-gliseraldehit-3-fosfatın karşılıklı dönüşümlerini triozfosfat izomeraz katalizler. Bu reaksiyonla glikolizin hazırlık fazı tamamlanmış olur. Bu yolla, D-fruktoz, D-galaktoz ve D-mannoz gibi diğer heksozlar da D-gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülebilirler [16]. Aldolaz ve triozfosfat izomeraz reaksiyonlarının son ürünü iki molekül D-gliseraldehit-3-

fosfattır ki; gliseraldehit-3-fosfatın üç karbonundan her biri glukozun iki spesifik karbonunun birinden türer [17].

TIM, biyokimyasal çalışmalarda detaylı olarak irdelenmiş glikolitik yolda görevli bir enzimdir [18]. Hemen hemen tüm canlı organizmalarda görev alır [19]. TIM reaksiyonları, birbirine dönüşebilen şekilde, karşılıklı olarak bir substrat ile bir ürün arasında genel bir denge içerisinde cereyan eder. Bu özellik, reaksiyonun tersinir olarak karakterize olmasına imkan verir. Bunun yanı sıra TIM, diğer tüm faydalarıyla beraber mekanizma boyunca aracı bir enediol olarak rol oynar. Bu ara ürün olan TIM'in varlığı sadece substrat ve üründen ziyade mekanizmadaki çözülmüş halde bulunan protonların da reaksiyonun ortasında ayrılmasına ya da reaksiyona girmesine olanak tanır [20]. Knowles ve ekibi, 1970ler'in ortalarında TIM reaksiyonları üzerinde her biri birbirinden farklı hidrojen izotopu olarak görev yapan 16 çeşitte TIM ile seri halinde çalışmalar yapmıştır. Bir enzimle katalizlenen reaksiyonlarda ilk serbest enerji profili TIM üzerinden ortaya konmuştur [21]. Bu durum biyokimyasal çalışmalarda enzim tarihi için bir dönüm noktasını simgeler.

TIM, normal şartlar altında doğada bir dimer olarak bulunur. TIM'in aynı monomerleri arasında hiçbir allosterik etkiye ve kooperativiteye rastlanmamıştır [22]. TIM'in aktif bölgesinde, "TIM barrel" olarak bilinen kısmın  $\beta$  tabakasını çevreleyen bölgesinde katalitik olarak önemli göreve sahip 3 aminoasit rol oynar: Glu165 ve His95 proton transferinde rol alırken; Lys136 zincirin oksijen köprüleri ile zayıf hidrojen bağları arasında görevlidir [23].

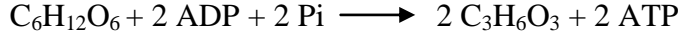
Prokaryot ve ökaryotlarda TIM'in; çok iyi bir şekilde korunmuş diziye, yapıya ve mekanizmaya sahip olduğu görülmektedir [24]. Bunun yanı sıra, TIM'in aktif bölgesi 26-28 kDa olan 2 tanımlanmış alt birimden oluşan bir dimerdir. Stoplazmik TIM genleri birçok farklı bitkiden; mısır, pirinç, marul, çavdar, *Coptis japonica*, *Stellaria longipes*, *Arabidopsis* ve petunya korollaları da dahil olmak üzere, izole edilip dizilemesinin yapılmasına rağmen, ekspresyon çalışmalarına devam edilmemiştir. Bunun aksine ise; kloroplast TIMler'i ile



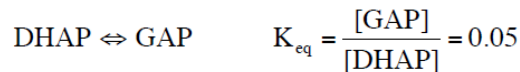
biyokimyasal aşamada çalışmalar yapılmış, protein ekspresyonu ve saflaştırılması çalışmaları yürütülmüştür [25].

### 1.1.3 Glikoliz Reaksiyonunda Triozfosfat İzomerazın Rolü

Glikoliz, glukozun çeşitli enzimler yardımıyla birbirini takip eden kademelerden geçerek pürüvata kadar parçalanması olayıdır [26]. Bir molekül glukozun glikolizi sonucunda iki molekül pürüvat meydana gelir. Glikoliz, birbirini takip eden dokuz safha sonucunda gerçekleşir. Her bir reaksiyon basamağında ayrı bir enzim görev yapmak suretiyle, süresi boyunca dokuz çeşit enzim faaliyet gösterir. Aldolazın kataliziyle dihidroksiaseton fosfat ve D-gliseraldehit-3-fosfat meydana gelir. Tersinirdir, regülasyonu yoktur. Böylece glikolizin ilk aşaması tamamlanır. Bu iki ürün triozfosfat izomeraz ile birbirine dönüşebilir. Reaksiyon daha çok glikoliz yönüne işleyeceğinden, gliseraldehit-3-fosfat daha çok oluşur [27]. Glikolizin denklemi;



TIM, glikolizde döngünün son heksozu olan fruktoz-1,6-bifosfatın DHAP ve GAP'ye degradesyonu olaylarındaki bir birleşme noktasıdır. Metabolik yolda bir sonraki enzimin substratı GAP olduğundan dolayı organizmada DHAP ve GAP'nin birbirine dönüştürülmesi sırasında hiçbir heksoz boşa harcanmış olmaz [28]. Burada TIM, reaksiyonda DHAP ve GAP arasındaki birbirine dönüşümü sağlayan biyolojik katalizördür. Böylece fruktoz-1,6-bifosfatın (F-1,6-P) açığa çıkan ürünleri sıradaki enzim olan GAP'nin 2 molekülüdür. DHAP ile GAP arasındaki denge sabiti 0.05'dir [29]. Denge için tercihen dihidroksiaseton fosfat seçilir. Hücrede DHAP'tan GAP'ye kadar olan dönüşüm TIM yardımıyla katalize edilmesiyle beraber GAP glikolizin bir sonraki basamağında GAP dehidrogenaz tarafından uzaklaştırılır [30].



#### 1.1.4 TIM Proteini ve TIM'in Aktif Bölgesi

TIM; yaklaşık 250 rezidüden oluşan tanımlanmış 2 alt birime sahip fonksiyonel bir dimerdir [31]. Her biri birbirinden bağımsız 2 aktif bölgeye sahiptir. TIM'in 3 boyutlu yapısına baktığımızda "TIM barrel" ya da " $\alpha\beta\beta$ -barrel" denen tek bir domaindir [32]. Bu yapı birçok enzimde yaygın olarak bulunur [33]. Merkezde 8 tane  $\beta$  plakası olacak şekilde onu çevreleyen bir  $\beta$  sayfasını oluşturan sekiz merkezi  $\beta$  iplikçikler bulunur [34]. Her bir çiftin iplikçikleri, silindir etrafında tekrarlanan bir  $\beta\alpha\beta$  motifi ile bağlı  $\alpha$  sarmalını meydana getirir. TIM'in aktif bölgesi  $\beta$  plakalarının C terminal ucundaki virile benzer kısmın merkezinde konumlanır. Yani; "barrel" yapısının son karboksilinde bulunur. Substrat bağlandığında aktif bölge kıvrımlarındaki 169-176 arasındaki amino asitler tarafından esnek bir katlanma modeli oluşturulur [35].  $\beta$  plakalarından içe doğru bulunan aminoasitler hidrofobisiteye katkıda bulunur. Aktif bölge rezidülerinin 168–177 arasındaki esnek ve kıvrımlı yapısındaki fonksiyonları aktif bölgeye engel teşkil eder. Aktif bölge substratın girişini sağlamak için açılır ve substrat bağlandığında kapanır.

Her bir enzim molekülü saniyede yüzlerce, binlerce substratı ürüne dönüştürebilir. Turnover (devir) sayısı, bir enzimin katalitik gücünü gösterir. Bir enzim molekülü tarafından bir saniyede ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısı olarak tanımlanır. TIM'in turnover sayısı 4400'dür [36]. TIM bir dimerdir, glikolitik yoldaki allosterik olmayan, DHAP'yi DGAP'ye çeviren bir enzimdir. Bu bir izomerizasyon reaksiyonudur. Optimum pH bu reaksiyonda 8'e yakın olarak saptanmıştır. Bu reaksiyon herhangi bir kofaktör ya da metal iyonunun yardımı haricinde yürütülmektedir. Bu reaksiyon esnasında C-H bağı kırılmalıdır. Diğer birçok biyolojik reaksiyonda olduğu gibi TIM reaksiyonunda da C atomları karbonil gruplarına bağlıdır [37]. İleriki basamaklarda; TIM reaksiyonunda, karbonil grupları DHAP'de bulunan keto grubuna girerken DGAP'de aldehit grubuna girer. Bu olay bilim adamlarının kafasında "enzimlerin bu aktivasyonu nasıl gerçekleştirdiği" sorusunu uyandırmıştır. Ve bu soru enzimleri kullanarak "aktif protonların reaksiyonda nasıl soyutlanacağı"nın bulunmasına neden

olmuştur. Rose, 1990 yılında yaptığı araştırmalar sonucu; öldürücü inhibitör olan glisidol fosfatın zincirin asidik tarafı olduğu sonucuna varmıştır [38].

Knowles ve arkadaşları; BHAP'yi öldürücü inhibitör olarak kullanıp Rose'nin çalışmalarını devam ettirmişlerdir. BHAP (haloasetol fosfat ve glisidol-fosfat) kullanılarak spesifik aminoasit Glu167 olarak tanımlanmıştır. D(S)-glisidol-fosfat L(R)-glisidol-fosfatdan 10 kat daha fazla tepki göstermektedir [39]. Farklı enzimler üzerinde yapılan araştırmalar sonucu, enzimatik oranlar değiştiği halde katalitik oranlar ve katalitik olmayan tepkimelerin oranları aynı kalmıştır. TIM için bu karşılaştırmada, çözelti içindeki kimyasal katalizasyon oranından organik baz ile katalize edilmiş enzim oranı  $10^9$  kat daha hızlıdır. Enzimsel ve enzimsel olmayan katalizasyonlar TIM'in 2 önemli fonksiyonunu ortaya koymuştur: İstenmeyen fosfat eliminasyonunu önlemek ve fosfat parçasının TIM'in aktif bölgesindeki 3 aminoasitle sıkı bir şekilde bağlanmasıdır. TIM'in kristal yapısı "TIM barrel" topolojisini açığa çıkarmıştır [40]. Bu moleküller TIM'in en sıkı olarak bilinen inhibitörleridir ve eğer tripanosomal TIM olarak düşünürsek inhibisyon sabitleri 26  $\mu$ M ve 8  $\mu$ M, sırasıyla 2PG ve PGH'dir.

#### 1.1.4.1 TIM Barrel

TIM'in aktif bölgesinde bulunan, 8  $\beta$  plakasının C terminal ucunda yer alan ve substratın bağlanması için gerekli katalitik aminoasitleri tedarik eden "TIM barrel"; TIM ile ilgisi olmayan pek çok enzimin aktif bölgesinin aydınlatılmasında da çok fazla yarar sağlamıştır [41]. Bu kıvrım düzenli olarak 8 $\beta$  plakası ve 8 $\alpha$  sarmal motifinin tekrarlanmasıyla oluşmuştur. Burada  $\beta$  plakaları merkezde olmak üzere  $\alpha$  sarmallar onları dışarıdan sarar. TIM barrel, " $\alpha\beta$ 8 kıvrımı" olarak da adlandırılmıştır ve enzimlerde en çok karşılaşılan yapıdır. Bu kıvrım her zaman enzimlerde aktif bölgede konumlanır.  $\beta$  barrel'in sonundaki C terminalinde ve 8 tane  $\alpha\beta$  aminoasitleriyle şekillendirilmiş  $\beta$  plakaları ve  $\alpha$  sarmalların arasında kıvrım1, kıvrım2, kıvrım8 olarak tanımlanmıştır. TIM'deki 8 tane  $\alpha\beta$  kıvrımlarından 3 tanesi katalitik aminoasittir. Kıvrım1 (Asn11, Lys13), kıvrım4 (His95), kıvrım6 (Glu167) [42]. Aktif bölge kıvrım4'teki küçük sarmal ve kıvrım6, 7, 8'in bir parçası olan 11, uzun ve esnek aminoasit kıvrımı ile

şekillenmiştir. Ve bu, kıvrım6 ile birlikte ana zincirde bulunan H bağı ile fosfat arasındaki etkileşimleri sağlar. Esnek olan kıvrım6 bağlanmamış ve tercihen açık konformasyondan (kıvrım5 tarafından dengede tutulan) bağlanmış ve yine tercihen kapalı bir konformasyona (kıvrım7 tarafından dengede tutulan) dönüşür. Kıvrım2 aktif bölge ile direkt bir etkileşim içerisinde değildir [43]. Aynı zamanda kıvrım8 ile birlikte dimer ara ürününü oluşturmaktadır. Sadece TIM dimeri bütünüyle aktiftir. Aktif bölgedeki bütün katalitik aminoasitler aynı alt birime bağlanmış olduğu halde dimerizasyon ile 2 ayrı aktif bölge katalitik olarak çok etkili güç sağlamak açısından birleştirilir. TIM'in aktif bölgesinin ana bileşenleri; birincisi, katalitik baz (Glu167), protonları soyutlamak için, ikincisi; sonradan açığa çıkan oksijen anyonlarının elektrostatik kararlılığı, üçüncüsü, çoğunlukla açığa çıkan çözücünün ortadan kaldırılmasıdır [44]. Aktif bölge, keton substratının 3 boyutlu yapısının aldehite dönüştürülmesine olanak sağlar. Keton karbonil parçaları ile aldehit karbonil parçalarına bağlanan enzim reaktivitesi farklıdır. Bu da bu parçaların farklı konformasyonlarda bağlanmasından kaynaklanır. İki rakip inhibitör TIM'in reaksiyon mekanizmasını anlamamıza katkıda bulunmuştur. Bu moleküller reaksiyonun ara analoglarıdır: PGH ve 2PG [45]. TIM barrel'in en küçük simetrisi 4 kıvrımlıdır. Bu kıvrımların her biri farklı uzunluktadır.

TIM barrel'i oluşturan aminoasitlerin toplam sayısı ortalama 300 olmak üzere 150 den 500 e kadar değişiklik gösterir [46]. TIM barrel, yaklaşık 250 rezidüden oluşmaktadır. Büyüklüklerindeki çeşitlilik  $\beta$  plakalarının sonunda C terminal ucundaki kıvrımların uzunluklarının çeşitli olmasından kaynaklanır [47]. Bunun yanı sıra, N terminal ucundaki kıvrımlar C terminalindeki kıvrımlara göre daha kısadır. TIM barrel kıvrımına eklenen domainin yerine uzun TIM barrel birimleri gözlenmiştir. Örneğin; pirüvat kinaz üçüncü  $\beta$  plakasının sonunda C terminal ucuna eklenen ekstra domaindir. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki; eklenen domainler genellikle üçüncü  $\beta$  plakasından sonra gelmektedir. TIM barrel kıvrımı pek çok enzimin aktif bölgesinin aydınlatılması adına çok iyi bilinen bir kaynak haline gelmiştir [48]. Bu kıvrımın elektrostatik özelliklerinin önemi detaylı olarak incelenmiştir. TIM barrel'in iki yarımdan bir bütün haline geldiğini

ortaya koymuştur. Ayrıca, enzimlerle ilgili yapılan son tasarım çalışmaları, yönlendirilmiş mutagenез kullanılarak veya bilgisayar ortamında yürütülen çalışmalar ile doğal olmayan enzimler meydana getirme çalışmaları TIM barrel'in önemini vurgulamaktadır.

#### **1.1.4.1.1 TIM Barrel'deki Esnek ve Hareketli Kıvrımların Önemi, Kıvrım6 ve Kıvrım7**

Serbest enerji reaksiyonu diyagramına ait kimyasal basamaklar, katalitik döngüyü detaylı bir şekilde substrat bağlama ve ürün oluşturma basamakları ile tanımlamıştır [49]. TIM'de kimyasal basamaklar çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Klasik mekanizmada kıvrım6 açık bir konformasyonda bulunurken ligand durumunda ise kıvrım6 kapalı konformasyonda olduğu belirtilmiştir. TIM yapılarındaki bu bağlanma işlemi 2 basamakta gerçekleşmektedir [50]. Örneğin; tavşan ait TIM'deki kıvrım6 kapalı formdadır. Tripanosomal TIM'de ise açık konformasyonda bulunur. Kıvrımın açılış kapanış oranlarını ölçmek 13.8 kcal/mol için entalpi aktivasyonu sağlamaktadır. Bu durumda ligand gliserol-3-fosfattır. Döngü kapanış özelliklerinde kıvrım7'de aktif bölgeye daha derine bağlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca kıvrım6 substratın kapanışında katalitik glutamatın yan zincirine, substratın yanına yerleşmiştir. Bu yüzden bu karmaşık kapalı komplekste substrat tamamen bağlıdır ve proton uzaklaştırılması aşaması meydana gelmiştir. Ürünün ortaya çıkışı, DGAP, birçok basamakta gerçekleşmektedir. Bu kısımda DGAP-TIM kompleksi oluşmaktadır [51].

TIM'de tirozinin önemi mutagenез çalışmalarında, Tyr210 YGGS motifi olarak tanımlanmıştır [52]. Tirozindeki hidroksil grubu kıvrım6'nın kapalı halinde ana zincire hidrojen bağlıdır. Ayrıca kıvrımdaki dinamiklerin özelliklerini anlamak için tirozin üzerinde çalışmalar yürütülmektedir [53]. Ökaryot TIMler'inde YGGS motifi korunmaktadır [54]. Rebecca ve arkadaşlarının [55] yaptığı bir çalışmada tavuk TIM'indeki YGGS motifi TGAG ile değiştirilmiştir. Fakat NMR çalışmaları ile bu değişikliğin katalitik özellikleri çok daha etkili

olarak gerçekleştirilebilir. Kıvrım6'daki karşılıklı değişim, kısmen N-terminali ve C-terminali tripeptitlerindeki küçük değişikliklerle ortaya çıkmaktadır [56]. Daha küçük bir değişim kıvrım7'deki iki YGGS motifindeki iki glisindeki phi ve psi değerlerinde önemli değişiklikler meydana getirmiştir. Gly-211-Ser210'deki peptit bağındaki peptitten dolayı phi/psi değerleri Ser213'de değişir ve böylece yüksek enerji bariyeri çaprazlanabilir [57].

TIM ile ilgili enzimolojik çalışmalar, Knowles ve arkadaşlarının [58] yaptığı klasik reaksiyon mekanizmasına dayanmaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan son çalışmalar bu enzimin katalitik gücü için elektrostatik stabilizasyonun önemini göstermektedir. Söz edilen elektrostatik etkileşimler serbest enerji profilinin geçiş durumunu azaltmaktadır ve negatif yüklü cis-enediolatı nötr hale getirerek dengelemektedir. TIM'in aktif bölgesinin eşsiz bir özelliği; esnek ve hareketli olmasıdır [59]. Aktif bölge kıvrımları; kıvrım6, kıvrım7 ligandı katalitik olarak katı çözeltiliyi çıkarır ve fosfatı ayırır. Fosfat eliminasyonu reaksiyonu burada devreye girer. Bunun yanı sıra fosfat bağlayıcı enerji geçiş durumunun stabilizasyonuna katkı sağlamaktadır. Kapalı ligand durumundaki katalitik temel, Glu167, kıvrım6'nın başında ölçülen uygunluk katalitik içeriğe dönüşmüştür. Aktif bölge burada izomerizasyon için protonların fırlatılmasında gerekli olan özelliklere sahiptir.

### 1.1.5 Etkin Bir Enzim Olarak TIM

Total DHAP ve total DGAP oranından hesaplanan denge sabiti (total-[DHAP]/total-[D-GAP]) 22'dir [60]. Çözünmüş halde DHAP'in %60'ı anhidrat iken DGAP'in sadece %4'ü anhidrat olarak bulunur ki; anhidrat türlerde denge sabiti 340'dır. TIM tarafından katalize edilen reaksiyonun serbest enerji profili Knowles ve arkadaşları tarafından açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmalarıyla Knowles ve arkadaşları, TIM'in reaksiyonda çok hızlı çalışan bir enzim olmasının yanı sıra çok yüksek bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Örneğin DHAP'den DGAP'ye dönüşüm oranı kontrol altındadır. Yani  $k_{cat}/K_m$  oranının maksimum olarak mümkün olan değeri  $109 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 'dir. Ayrıca kimyasal dönüşüm

basamaklarının serbest enerji sınırı ve substratın bağlanması ile ilgili basamaklar ve konformasyonel değişiklikler çok farklı değildir [61]. DHAP'nin DGAP'ye dönüşümü sırasında  $k_{cat}$  yaklaşık  $500 \text{ s}^{-1}$  iken DGAP'den DHAP'ye dönüşüm sırasında  $k_{cat}$   $5.000 \text{ s}^{-1}$ 'dir. DHAP ve DGAP'nin sırasıyla 1.2 ve 0.25 mM'dır ve unhidrat türler için ise yine sırasıyla 0.7 ve 0.01 mM'dır. Mekanizmada en hızlı basamak; ürün formasyonu ile ilgili proton transferinin yapıldığı basamaktır ve burada açığa çıkan DHAP değildir. İleri yönde basamak sınırlayıcı oranı, bu döngü açma gibi D-GAP çözünmemesi ile ilgili bir konformasyonel değişiklik olabilir. Herhangi bir durumda döngü açılış oranları liganda bağımlıdır ve D-GAP oluşumu döngü açılış hızı DHAP oluşumundan çok daha yavaştır. Serbest enerji profili geniş çaplı izotop transferi ve izotop ayrımı deneylerini içeren reaksiyon ölçüm oranlarından faydalanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar DHAP, ara bileşenler ve DGAP'nin miktarı ile ilişkilendirilerek ortaya konmuştur. Baskın kompleksin %65'i enzim-DHAP kompleksi oluşturduğu tahmin edilirken ara bileşenlerin ve DGAP'nin de büyük bir miktarının bulunduğu düşünülmektedir. McDermott ve arkadaşları [62] tarafından yürütülen NMR çalışmaları göstermiştir ki; DGAP ve ara bileşenler değil de sadece DHAP dengededir ve kararlılığını sürdürmektedir. Bunun yanı sıra reaksiyon ara bileşenleri ve ürün kompleksleri devir süresiyle kıyaslandığında kısa ömürlü olduğunu öne sürmüşlerdir. Serbest enerji profilinin önemli detayları izotop çalışmalarıyla ortaya çıkarılmış olan tahmini kinetik modelden karmaşıktır. Örneğin kinetik görünümde rol oynayan protein dinamiklerine bağlıdır. Katalitik döngüdeki en zor basamak ise; DHAP'den başlangıçtaki ilk protonun çıkarılmasıdır. Reaksiyonun katalize edilmesi için TIM'in aktif bölgesinin katalitik gücü bir çözelti içerisindeki basit tek bir bazın reaksiyonu katalize etmesi ile mukayese edilebilir [63]. Bu protondan ayırma olayında basit bir bazın reaksiyonu katalizmesine göre TIM'in aktif bölgesi bu reaksiyonu 109 kat daha hızlı katalize eder. Serbest enerji engeli yönünden uygun içerik oranları DHAP'nin substratı için bir engel olduğu ve eğer TIM ile reaksiyon katalize edilirse harcanan enerji 13.5 kcal/mol iken diğer basit baz katalizörlüğünde 26 kcal/mol olduğu görülmüştür. Kuramsal olarak anlaşılmıştır ki; ara ürünlerin geçiş durumundaki serbest enerji profili çözelti içerisindeki reaksiyonun katalizasyonu enzim aracılığıyla gerçekleşen reaksiyona göre yaklaşık olarak 13-15 kcal/mol daha yavaştır [64].

### 1.1.6 TIM İle İlgili Yapısal Çalışmalar

PDB’de TIM’in 111 tane kristal yapısı ile karşılaşılmıştır. Bu kristal yapılar 22 farklı organizmada bulunan yabancı yapıdaki TIM yapısını da içine alır [65]. Bu yapılardan 3 tanesi atomsal rezolüsyondadır. TIM dimeri en son zamana ait sık karşılaşılan bir yapı olmasına rağmen termofilik organizmalarda TIM tetramerleri gibi ortaya çıkar. Bu tetramerler dimerlerin dimeridir. 2 tane dimerin tetramerlerin içinde biraraya gelmesi ile gereğinden fazla ısısal kararlılığı ortaya çıkarırlar. Doğada bulunmayan TIM monomerleri, kristalografik ve enzimatik yollar ile karakterize edilir [66]. Yapılan araştırmalar sonucu; aktif bölge aynı altbirime ait bütün katalitik aminoasitler ile dimer arayüzdedir. İkinci altbirim kıvrım3, kıvrım1 ve kıvrım4’ün arasına 1. altbirimi de yerleştirerek aktif kısmı tanımlar. Kıvrım3’ün ucunda bulunan Thr75 diğer altbirimlerdeki aktif kısımlara hidrojen bağlı ağlar ile katkıda bulunur. Birçok su molekülü dimerin ayrılmaz parçasıdır. Bu su moleküllerinden 6 tanesi dikkatlice korunur. TIM’in yapısı ile yapılan çalışmalar, iki esnek kıvrımın substrat katalitiğinde ve bağlanmasındaki önemini ortaya çıkarmıştır [67]. En iyi bilinen substrat bağlanması sırasında kıvrım6’nın kapanmasıdır. 7 Å<sup>0</sup>’dan açık ve merkezi atoma bağlı olmayan durumundan kapalı ve merkezi atoma bağlı olan duruma dönüşmesi bunu açıklamaktadır. Merkezi atoma bağlı olmayan durumda kıvrım6, kıvrım5 ile etkileşim içindedir. Merkezi atoma bağlı ve kapalı olma durumunda ise kıvrım7 ile etkileşim içindedir. Ligand aktif kısma bağlandığında, kıvrım7’de uyarlanabilir değişiklikler görülebilir. Bu kıvrımların kapatılması çok özel olan fosfat-danyon bağlamını meydana getirmektedir. Bu durumda fosfat-danyon parçaları 4 hidrojen bağı ile bu kıvrımlarda bulunan (kapalı kıvrımlar) 4 ana zincirdeki NH-gruplarına tutturulur (kıvrım6 ile kıvrım1 hidrojen bağı, kıvrım7 ile 1 hidrojen bağı ve kıvrım8 ile 2 hidrojen bağı). Monoanyonik sülfonata benzer şeyler ve dihidroksiaseton sülfat gibi maddeler zayıf TIM bağlayıcılarıdır. Kıvrım6, kıvrım7 ve kıvrım8’deki ana zincirdeki NH grubu, danyon fosfat ile iyi bir bağ alanı sağlarken, monoanyon benzeri şeyler ile zayıf bir bağ alanı sağlar [68]. Yapılan son araştırmalara göre, 4 tane kapalı durumdaki peptid NH grubu ile itici elektrostatik arasındaki ilişki monoanyonik sülfonat grubu tarafından etkili bir şekilde kompanse edilmemektedir. Bir TIM varyantındaki kıvrım6’nın ucunda



bulunan 4 tane amino asit yok edildiğinde, bu TIM varyantı fosfat parçaları ile hidrojen bağı yapamaz. Bu nedenden dolayı, reaksiyon ara maddesine sıkı bağlanamadığından, metilglioksal sentaz oluşumu kaçınılmaz hale gelir. Ve bu TIM türüne “metilglioksal sentaz” denir. Katalitik kısım çözücü tarafından gömülmüş ve korunmuştur. Glu167’de meydana gelen özel etkileşimlerde katalitik kısım yoğun olarak bulunur. Yine de yan zincirdeki katalitik glutamat (Glu167), hidrofobik hava boşluğunda hidroksimat düzlem üzerinde hareket eder. Anahtar, katalitik amino asit Glu167 olmasına rağmen; Asn11, Lys13, ve His 95’de önemli ve korunmuş amino asitlerdir. Glu167 hidroksimat düzlem üzerinde, Lys13 ve Asn11 ise hidroksimat düzlem altındadır. His95 yan zincirindeki imidazol halka cis-enediolat düzlemi ile aynı düzlemedir. Daha sonra gelen 3 aminoasit, reaksiyondan negatif yüklü olarak çıkan ara ürünler için oksiyon dengesi sağlar. Asn11 ve Lys13’ün elektrostatik dengedeki önemi büyüktür. His95 ise direkt olarak proton transferinde görev alır. Substratın katalitik sonu dehidrat edilmiştir. Ancak, katalitik glutamatın yan zinciri su moleküllerine hidrojen bağlamaktadır. Bu su, çözeltiyi yoğunlaştıran sudaki yoğun hidrojen bağlarının bir parçasıdır. Apo yapısında aktif kısım daha çok su moleküllerine bağlanmıştır ve bu moleküller substrat bağlandığında yer değiştirir.

### **1.1.7 3 Atomlu TIM’in Çözünürlüğü Üzerine Yapılan Çalışmalar**

TIM komplekslerinin X ışını çözünürlüğü ile 3 atomlu yapısı tespit edilmiştir [69]. Bu kompleksler DHAP substratı ile, reaksiyon ara bileşenlerinin analogları olan 2PG ve PGH ile bağlantılıdır. Bu yüksek çözünürlükte aktif bölge elemanlarının proton uzaklaştırması ve anizotropik dinamik nitelikleri üzerine bilgi edinmek mümkün olmuştur. TIM-DHAP kompleksinin kristal yapısına baktığımızda baskın olan ligand DHAP’dır ve ara bileşenlerin olması veya ürünün DGAP olması olasılığı çok düşüktür. Ayrıca yapılan NMR çalışmaları sonucunda da DHAP’in baskın olduğu ortaya çıkmıştır. Bu 3 atomik çözünmüş yapının her biri substrat ile glutamatın karboksilat grubu arasında çok sıkı bir şekilde etkileşim halinde olduğunu vurgulamaktadır. Örneğin; TIM-DHAP kompleksinde karboksilat oksijeni karbon substratından 3 Å ötede konumlanmıştır [70]. 0.82 Å ötede yer alan TIM-PGH yapısı proton uzaklaştırılması ve alınması

mekanizması için katalitik glutamatın protein dinamiklerinin önemine ışık tutmaktadır. 0.83 Å'da konumlanmış TIM-2PG yapısı ise; TIM'in aktif bölgesinde prolinin Glu167-Pro168 dipeptid oluşturacak şekilde bulunduğunu açığa çıkarmıştır. Sonuç olarak; bu sıkı konformasyonun döngü açılmasını kolaylaştırmasıyla ürün açığa çıkmış ve reaksiyon tamamlanmıştır.

### 1.1.8 Monomerik TIMlerle İlgili Çalışmalar

Tek bir TIM dimeri, kendi başına aktiftir. Bu nedenle birçok ilaç ham maddesi keşif çalışmaları dimerlerdeki monomerlerin birleştirilmesi ve katlanması ile inhibitörler ortaya koyulması ile yürütülmüştür [71]. Örneğin; özellikle parazit organizmalara ait TIMler seçilerek inhibe edilmiştir. Balaram ve arkadaşları tarafından, bir sıtma TIM'inde test edilmiş ve yaklaşık olarak 0.7 µM'lık bir değere sahip IC50 inhibitörü içeren sıtmalı bir TIM'in kıvrım3'ünde bir peptid analogu bulunmuştur [72]. İlaç ham maddesi keşif çalışmalarında TIM gibi sadece oligomerik olarak tamamen aktif olan oligomerik enzimlerin protein-protein etkileşimlerinde bağlanma bölgeleri ile spesifik inhibitörlerin araştırılması merak uyandırmaktadır. Ayrıca bu gibi enzimlerin protein-protein etkileşimlerine ait diziler aktif bölgeye göre daha az korunmuştur.

TIM'in katalitik rezidüleri yani aktif bölge aminoasitleri aynı alt birimde yer almaktadır [73]. Bunlardan en sık rastlananlar: Asn11, Lys13, His95'dir. Bu aminoasitler dimer etkileşimleri sayesinde kararlı bir halde dengede tutularak aynı kıvrım üzerinde bulunurlar. Monomerik TIMler üzerinde yapılan enzimatik çalışmalar göstermiştir ki; monomerler katalitik etkinliği azaltmaktadır. Öyle ki; birçok monomerik TIM'in yapısal özellikleri sistematik olarak çalışılmıştır [74]. İlk monomerik TIM (monoTIM) bilgisayar ortamında kıvrım tasarım programları aracılığıyla modelleme paketi ICM kullanılarak oluşturulmuştur. Bu protokol aracılığıyla tripanosomal, glikozomal TIM'in kıvrım3'ündeki 15 aminoasitlik bir bölge 8 aminoasitlik bir bölgeyle yer değiştirilmiştir. Bu monomerik TIMlerin kristal yapıları göstermiştir ki; doğal tip TIMlerin dimerizasyonunu içeren

kıvrımlar bozulmuştur veya özellikle bağlanmamış halde bulunan monomerik yapıdaki doğal olmayan TIMlerinin konformasyonuna dönüşmüştür. Örneğin; kıvrım4'te bulunan monomer konformasyonu en çok bilinenlerden biridir. Oysaki kıvrım1 yapısal bozukluğa sahiptir. Kıvrım4 ile ilgili olarak, kıvrım4 konformasyonundaki doğal tip monomerik TIMlerdeki monomerik değişkenlerin bir sonraki neslinin korunmasında etkin olan A100W mutasyonu zincirin geniş olan yönü ile kararlı hale getirilir. A100W mutasyonu monomerik TIMlerin katalitik özelliklerini etkilemez. TIM dimerinde ara bileşenlerin kıvrımları; kıvrım 8, kıvrım 1, kıvrım 2, kıvrım 3, kıvrım 4 değişmez, sabittir. Monomerik TIMlerin 1, 3, 4 ve 8. kıvrımlarının yapısal özelliklerine bakıldığında, TIM'in ara ürünlerinin doğal tip monomerik katlanmalarında düzensizlik görülmüştür [75]. Doğal tip TIM'in dimere doğru katlanma yolunda her biri çok sert olan dimer ara bileşenleriyle etkileşiminden sonra 2 alt birimdeki düzensiz kıvrım bölgeleri dimerize olurlar.

Monomerik TIMler, TIM aktivitesinin yaklaşık  $1 \text{ s}^{-1}$  kcat ve  $K_m$ 'si ise yaklaşık olarak  $5 \text{ Mm}$ 'dir. Doğal tip TIM'e göre kcat yaklaşık 1000 kat daha düşüktür ve  $K_m$  yaklaşık 10 kat daha yüksektir [76]. Monomerizasyon tarafından devre dışı bırakılan fosfat demirleme mekanizması faaliyet gösterirken metilglioksal sentaz aktivitesi tespit edilmemiştir.

Monomerik TIMler doğal tipteki TIMlerden daha az karardır [77]. Bu monomerik değişkenlerin optimum pH'sı tam olarak bilinmemekle beraber katalitik döngüye ait serbest enerji profili saptanamamıştır. Yapısal çalışmalar sonucu anlaşılmıştır ki; karakteristik olarak açık ve kapalı konformasyonel değişimlerin gerçekleştirilmesi değişkenler vasıtasıyla halen söz konusudur.

Monomerik TIMlerdeki düşük katalitik etki esnek katalitik katlanmalar hakkında bilgi veren yapısal özelliklerle anlaşılmıştır [78]. Örneğin; kıvrım 1, 4 ve 8. Aktif bölge ile çözelti hacminin büyük bir kısmı açığa çıkmıştır. Başlangıç noktası olarak monomerik TIMlerin kullanılmasıyla yönlendirilmiş mutagenез sonucunda kıvrım2'deki mutasyonların 4. faktörün rolüyle  $K_m$  azalırken, 11.

faktör etkisiyle kcat'in arttığı görülmüştür. İlk monomerik TIM değişkenleri bilgisayar programları aracılığıyla 1. katlanma ve akabinde 8. katlanma tarafından yeni ve spesifik bir substrat modeli oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Başlangıçta 8. katlanmadaki delesyon değişkeni aktif değildir ve zayıf bağlanma gösterir. Fakat delesyon mutasyonu V233A varyantı daha iyi bağlanma göstermektedir. V233A mutasyonunun önemini kavramak adına yapılan rasyonel çalışmalarla temin edilen yüksek çözünürlüklü ml8bTIM yapısı doğal tip TIM ile kıyaslandığında Val233'ü ortaya koymuştur ve doğal tip TIM'in konformasyonundaki kıvrım7'nin müdahale etmesiyle fosfat bağlanma bölgesini kilitlemiştir. Katalitik aktivite standart sınırın altında olmasına rağmen A-TIM'in BHAP inhibitörünün yanı sıra 2PG ara ürün analogunun bağlanmasını mümkün kılan bir aktif bölgesi vardır. A-TIM'in tahmini aktif bölgesi sitrat gibi doğal tip TIM'in bağlanmadığı çok büyük moleküllere bağlanır. A-TIM'de kıvrım 1, 3 ve 8 kısaltılmış olarak bulunurken kıvrım 4'te A100W isminde bir nokta mutasyonu yer almaktadır. TIM barrel'in sonundaki katalitik döngüler çerçeve kayması mutasyonuna uğrayarak bütünlüğünü kaybetmektedir. A-TIM çerçevesi yeni katalitik aktif varyantlarla ilgili yapay spesifik substratların keşfi için etkili bir başlangıç noktasıdır.

### **1.1.9 Korunmuş Dizi Modelleri**

TIMler; tavuk, maya, tripanosoma, sıtmada kapsamlı olarak çalışılmıştır [79]. Tripanosomada yapılan çalışmalara göre; aktif bölge amino asitleri olan Asn11, Lys13, His95, ve Glu167 için dizi numaraları değerlendirilmiştir. Bu 4 anahtar amino asit çok iyi korunmuştur. Bununla beraber kıvrım6, kıvrım7 ve kıvrım8'deki amino asitler yüksek derecede korunmuş olarak bulunur. İlginç bir şekilde; arkeanın kıvrım6'daki korunmuş dizilerinin farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Glu167 burada katalitik bir bazdır. TIM'in aktif bölgesinin önemli bir özelliğidir. Katalitik rezidü Glu167, kıvrım6'nın başlangıcında konumlanır. Kıvrım6 kapandığında, Glu167 karboksilat substrattan yaklaşık 2 Å öteye taşınır. Enzim-substrat kompleksinde Glu167 zincirinin dinamik özellikleri proton ekleyip çıkarma mekanizmasının bir anahtar özelliğidir. 2 farklı proton ekleyip çıkarma mekanizmaları: Klasik mekanizma ve çapraz geçişli mekanizmadır. Bu

mekanizmalar enolize edilen enzimlerin substratlarıyla olan etkileşimlerinden sorumludur.

#### 1.1.10 Klasik ve Çapraz Reaksiyon Mekanizması

TIM'in aktif bölgesi DHAP ve DGA'yı yüksek bir spesifite ile katalize etmektedir. C1-pro-R protonu DHAP substrat olduğunda C2-R protonu ise DGAP substrat olduğunda devre dışı bırakılmaktadır. Bu kiral özelliği enzim substrat kompleksinde olası kristal yapılardan anlaşılmaktadır. Bu durum; Rose ve arkadaşları tarafından önerilmiştir [80]. Substrat bağlama durumu etkili bir enolizasyon için stereoelektronik gereklilikle iyi bir uyum içerisindedir [81]. Bu aşama O1, O2, C1, C2 atomları tarafından tanımlanan ortogonal olarak konumlanmış protonun uzaklaştırıldığını belirtmektedir. İlk katalitik döngü, Glu167 tarafından ilk protonun uzaklaştırılmasından sonra ortaya çıkmıştır. Etkin bir kataliz için sabit  $pK$  ve substrat aynı orandadır [82]. Molekülde  $pK$  substrat 16-20'de aynı sırada olması beklenmektedir [83]. Temel olarak Glu167 karboksilata ait  $pK$  değeri tamamlanmamış reaksiyondaki enzim suda çözüldüğünde yaklaşık olarak 4 zincirdedir. Etkin bir kataliz bu iki  $pK$  değerinin ayarlanacağını göstermektedir ve bu yüzden daha iyi bir çözelitide birbirlerine daha yakın değerleri ortaya çıkarırlar.

Enzim geçiş durumunu ve açıl durumları dengeleyerek  $10^4$  oranında bir genişlik sağlamaktadır. Teorik ve deneysel çalışmalar göstermiştir ki; hidrojen atomu TIM mekanizmasında önemli bir rol oynamamaktadır [84]. NMR ve X-ray çalışmaları kısa hidrojen bağları kompleks TIM yapılarında reaksiyon analog durumunda bulunduğunu göstermiştir. Katalitik oranın büyümesine istinaden TIM'deki önemi araştırılmaktadır.

Substratın ürün değişimini tamamlayabilmesi için en az iki proton transfer yolu gerekmektedir. Bunlar: Klasik mekanizma ve çapraz mekanizma [85]. Çapraz yolun mekanizmasında, bütün proton transferleri Glu167 tarafından

gerçekleştirilmekte iken; klasik geçiş yolunda His95'de proton transferine katılmaktadır. Her iki yolda da basit kimyasal basamaklar farklı basamaklara ayrılmıştır. Son basamak, Glu167 tarafından reprotoneleşmadır. Ürün bu aşamada elde edilir.

Geniş QM/MM TIM mekanizmasına ait reaksiyon hesaplamaları iki olası reaksiyon mekanizmasının bütün reaksiyonlara katkı sağlayabileceğini göstermiştir [86]. NMR çalışmaları ile maya TIM'inde klasik mekanizmanın en az %3.9, tavuk TIM'inde en az %12.1 ve genel reaksiyonda katkıda bulunur. Bu homolog enzimlerin reaksiyon mekanizmalarında reaksiyon farklılıklar göstermektedir. Homolog enzimlerin katalitik mekanizmasındaki farklılıklara diğer çeşitlerde rastlanmamaktadır.

Klasik mekanizmalarında hem Glu167 hem de His95 yan zincirleri açıl enediolat komplekslerinde protonların uzaklaştırılmasında etkilidir. Bu negatif Histidin yan zincirin oluşturulmasında görevlidir. Proton transfer basamağı için, Histidin yan zincirinin büyük ölçüde önem taşımaktadır [87]. *Leishmania*'da TIM/PGH kompleksinin atomik yapısının çözülmesi iyi bir adım sağlamıştır. Bu yapının analizinden TIM ligand yapısının ana zincir ve yan zincir geometrisindeki küçük farklılıklar ortaya konmuştur.

Knowles ve arkadaşları [88] tarafından da tanımlandığı gibi, sinorbital karboksilat en yüksek yakınlığa sahip bir proton için bu orbitalin birinci karbon atomundan protonu uzaklaştırdığı düşünülmektedir. Çapraz mekanizmada; karboksilat iskeletin diğer ucuna gittiğinde proton alıcı atomdan gönderilir. Sonrasında O1 protonu çıkarır ve ikinci karbon atomuna transfer eder ve böylelikle aldehit ürünü oluşturulur.

DHAP'den DGAP'ye ürün dönüşümünde oksianyon proton çıkarılması esnasında birinci karbon atomundan oluşturulur [89]. Lys13 ve His95 yan zincirlerinden oksianyonlarda kararlı hale getirilerek oluşturulur. Sonrasında reaksiyon döngüsünde negatif yük oksijene transfer edilir. Bu durum aslında ilk olarak açıl DGAP'den proton uzaklaştırılmasında oluşturulur. DGAP'den DHAP'ye dönüşüm söz konusu olduğunda, O1 negatif yükü His95 ve Asn11 yan zincirleri tarafından stabilize edilmiştir. Bu da proteinin kristalografik çalışmalarında sunulmuştur [90]. Ayrıca NMR çalışmaları D<sub>2</sub>O'yu tavsiye etmektedirler. Çünkü geçiş durumları DHAP ve DGAP deprotonlaşmasında oluşturulan O1 ve O2 oksianyonlarındaki enediolat hidrojen oranlarını değiştirmektedir [91]. Knowles'in bu konuda yaptığı ilk çalışmalardan biri trityumlu DHAP substratı ile yapılan kataliz boyunca sulu çözelti içinde sonrasında kayıp olduğunu görülmüştür [92].

#### 1.1.11 TIM'in Kimyasal Mekanizması

TIM aracılığıyla GAP ve DHAP'nin birbirine dönüşümü için 2 mekanizma geliştirilmiştir: İlki; hidrit değişim mekanizması; C1 ve C2'nin her biri sp<sup>2</sup> geçiş orbitaline sahiptir ve C1'den C2'ye eşdeğer bir hidrit transferi söz konusudur. İkinci mekanizma ise; proton transfer mekanizmasıdır. GAP'nin deprotonasyonu yani proton uzaklaştırılması, DHAP'nin reprotonasyonu yani proton alınması ile oluşan bir enediolat ara ürünün formasyonuna öncülük eder [93]. Proton transferi için en güçlü mekanik kanıt J. P. Richard tarafından geliştirilen kimyasal değişim deneyidir. TIM döteryumlanmış su ile inkübe edildiğinde DHAP %50 oranında döteryumlanır ve reaksiyon boyunca çözelti ile proton değişimi söz konusudur. Eğer su, protonları hariç hidrit ile değiştirilmezse proton transfer mekanizması gösterilmiştir. Dikkat edilmesi gerekir ki; döteryum C1 pozisyonundaki pro-R2 de tek başına bulunan DHAP üzerinde görünür. Ve bu döteryumlu malzemeler C2'deki döteryumlu GAP modelinin eski şeklini almasında rol oynar. Reaksiyon GAP ve DHAP arasında hidrojenin tutulmasını engellemeden C1 ve C2 arasında proton transferini sağlayan tek bir baz içerir. Tüm bunlar proton transfer mekanizmasını desteklemektedir. GAP'nin engellenmesi ile DHAP'nin

döteryumla birleşmesinin stereokimyasını veren bir *cis*-enediolat olan ara ürün boyunca reaksiyon devam eder.

TIM'in aktif bölgesindeki tek bir bazın varoluşunu, triozfosfat substratlarının C1 ve C2 arasındaki proton değişiminin sağlanması için enzimlerin aktif bölgelerindeki olası fonksiyonel aminoasitlerin en küçük numaralarının kullanılmasıyla dizayn etmeye yarayan "tutumluluk ilkesi" takip eder [94]. Optimum katalitik verimlilik için yan zincirin yer değiştirilmesi bağıklık olarak tahmin edildiğinden beri çift yönlü fonksiyonlarda ikisinin yer değiştirmesi birine göre daha zordur. Doğal katalitik metabolizma TIM üzerinde rol oynadığı bilinen rakip inhibitörlerin yapısı için bir kanıttır. Fosfoglikohidroksimat 4  $\mu$ M'lık Kd ile çok güçlüdür. Çok sıkı olarak TIM'e bağlanan mükemmel bir *cis*-enediolat ara ürünüdür. Hidroksimatın çift bağ eksikliği olan benzer bir inhibitördür ve anyonik yükü nedeniyle 100 kat daha zayıf olarak bağlanır.

Aktif bölge bazlarının kimliği bir substrat analogu olan ve açıl bromid mekanizmasında aşırı derecede elektrofil reaktifi içeren bromohidroksiaseton fosfat kullanılarak keşfedilmiştir [95]. TIM ile inkübe edildiğinde tek bir aminoasit glutamat 165 vasıtasıyla kovalent bağ ile bağlanır. Glutamat 165 doğal bir substratın varlığında modifiye edilemez. Çünkü Glu165 aktif bölgedeki en çok nükleofil reaktifi içeren aminoasittir. Aktif bölge bazı olarak Glu165'in seçilmesi kısmen şaşırtıcıdır. Glutamatın yan zincirindeki karboksilik asitine ait pKa değeri yaklaşık 4'tür. Aldehit ve ketonlarla ilgili  $\alpha$  durumundaki protonların pKa'sı yaklaşık 19'dur. Bu da gösterir ki; triozfosfat substratlarından biri olan Glu165'den bir proton transferi için denge sabiti yaklaşık olarak 10-15'dir. DHAP ve GAP'nin izomerizasyonu için reaksiyon mekanizması bir enediol ara ürünü vasıtasıyla asit-baz katalizlemesi reaksiyonlarını içerir.

Triozfosfat izomeraz prototip "TIM barrel" yapısını temsil eder ve  $\beta$ -barrel,  $\beta$  iplikçikleri arasındaki  $\alpha$  sarmal bağlantıları tarafından çevrilmiştir [96]. Enzim homodimerdir, her altbirim barrel'in sonundaki karboksilin yanında aktif bir tarafı vardır. TIM (bazen TPI olarak da bilinir) triozfosfatın izomerleştirilmesidir; özellikle, glikoz ve glukoneogenezde D-gliseraldehit-3-



fosfat (aldoz) ve dihidroksiaseton fosfatı (ilgili ketoz) karşılıklı dönüştürür. İzomerizasyon katalizör yokluğunda kararsız bir enediol ara ürün aracılığıyla devam edebilir, ama katalizör yokluğunda aldoz ve ketoz her ikisinde kararlı bileşikler olduğundan katalize edilemeyen reaksiyon yavaşlatır. Katalizör enediolün konsantrasyonunu arttırmalıdır. Enediol ara ürünün serbest enerjisini düşürür ve enediol için gereken proton değişimini yükseltmesi ile oran artar.

#### 1.1.11.1 Genel Asit-Baz Katalizleri

Aktif bölge asit ve bazları olarak iş gören rezidüer genellikle enzim katalizörleridir [97]. Biyokimyasal dönüşümlerde molekülün yük dağılımı bir değişim tarafından gerçekleştirilir. Negatif yükün pozitif dönüşüğü durumlarda yaygın olarak bir hidrojen iyonunun transfer edilmesi ile nötrleşme sağlanır ve eğer pozitif yükte birikme olursa reaksiyondan bir protonun uzaklaştırılması ile normale döndürülür.

Biyokimyasal dönüşümlerde bir hidrojen iyonunun uzaklaştırılmasının bağımsız olarak gerçekleştirilmesine dair birçok örnek vardır. Hiçbir zaman  $H_3O^+$  hariç bir asit katalize edilmesi esnasında proton transferi yapmaz. Buna “genel asit katalizi” denir. Eğer  $OH^-$  hariç bir baz kataliz olayında proton transferini gerçekleştiriyorsa buna da “genel baz katalizi” denir. Bu reaksiyonlar için biyokimyasal kanıt pH gibi reaksiyon oranlarının sık sık kontrol edilmesidir. Eğer bir “asit” kataliz olayı için gerekliyse, yüksek pH’da proton uzaklaştırılmış aktivitede bir düşüş gözlemlenir. Eğer bir “baz” gerekliyse, pH arttıkça aktivitede de bazın oluşumuna yol açan proton uzaklaştırılmasına bağlı olarak bir artış gözlemlenir. TIM için de aynı durum söz konusudur. TIM aktivitesindeki artış pH artışıyla birlikte göze çarpar.

Triozfosfat izomeraz mekanizması, asit-baz katalizine örnek sağlar. Aktif kısım Glu (Glu<sup>165</sup>) atom grubu hem de His (His<sup>95</sup>) ve Lys (Lys<sup>12</sup>) içerir ve bu atom grubu baz olarak düşünülür. Enzim, enediol ara ürününün su ile tepkimesinden korumak ve substratı yakalamak için kapanan bir kapak tarafından substratın tutulduğu bir kafes sağlar. Asit-baz katalizini gerçekleştirmek ve aynı

zamanda enediolün katalizi için katalik grup mükemmel bir şekilde konumlanmıştır. Glu'nun Asp'ye dönüşümü ve katalitik COO<sup>-</sup> grubun substrattan 0.1 nm öteye hareketi sonucu katalitik oranda 1000 kıvrımlık bir düşüş olur. Kimyasal mekanizmanın şu şekilde devam ettiği düşünülmektedir: Glu-COO<sup>-</sup> (B<sup>-</sup>), C-2'den proton ayırır, aynı zamanda enediolün oluşum oranını artırarak His imidozal (AH) grup C-1 karbonil O'ya proton verir. Sonra, Glu-COOH protonunu C-1'e verir ve His, C-2 OH grubundan proton alır.

#### 1.1.11.1.1 TIM Tarafından Kataliz Edilen GAP ve DHAP Ara Ürünlerinin Kinetik İçerikleri

Bir enzimin aktif bölgesine ulaşan küçük moleküller için difüzyon sınırı 108-109 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> sabit oranıdır. TIM'le kıyaslayacak olursak TIM için difüzyon sınırı kabaca 107 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>'dir. GAP spesifik diolüyle bir denge halindedir. GAP'nin nominal konsantrasyonu 0.4 mM olduğunda diol baskın formdadır. TIM'in substratının yaklaşık olarak 0.02 mM olduğunda aldehit uzaklaştırılır. Böylece DHAP ve GAP dönüşümü için kcat/Km değeri yaklaşık 108 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>'dir. Yani bu değer TIM'in difüzyon sınırındır ve daha hızlı gerçekleştirmesi mümkün değildir [98]. Knowles ve arkadaşları tarafından; viskojenler yoluyla DHAP ve GAP dönüşüm oranlarının ölçülmesi ile TIM'in mükemmelliği doğrulanmıştır. Gliserol gibi bileşikler eklenerek oluşturulan yeni bir viskoz çözeltinin difüzyon hızı düşüktür. Tüm bunların ışığında viskozitenin artırılması sonucu; kcat/Km oranında doğrusal bir azalma olduğu göze çarpmaktadır.

Tablo 1.1: TIM'in kinetiği

Substrat	kcat (s <sup>-1</sup> )	Km (mM)	kcat/Km (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
GAP	4300	0.4*	9.1 x 10 <sup>6</sup>
DHAP	430	0.97	4.4 x 10 <sup>6</sup>

### 1.1.12 İzomeraz Reaksiyonu

TIM reaksiyonu, karbonilin komşu C atomuna proton vermesiyle başlar. Genellikle ketoz aldoz reskasyonu iki olası mekanizmayla gerçekleşir; ya proton transferiyle ya da metal-iyon bağımsız hidrid transferiyle. Molekülün içersinde optimum pH'da her iki mekanizma da meydana gelir ve neredeyse her ikisi de eşit etki yaratır. TIM katalitik reaksiyonunda proton transfer mekanizması kullanılmaktadır. Reaksiyonun mekanizmasındaki ilk adım karbonilden karbona proton çıkarılmasıyla ya aldehit DGAP olduğunda ya da keton DHAP olduğunda gerçekleşir [99]. Her iki durumda da ilk ortaya çıkan cis-enediolat iyonudur. TIM bu yüzden “enolize enzim” olarak görülmektedir. TIM, DHAP ve DGAP gibi üç karbonlu şeker fosfatları için yüksek derecede spesifiktir. Aynı proton transfer mekanizmasını kullanan diğer üç karbonlu şeker fosfat izomerleri de TIM gibi aynı reaksiyonu gösterirler. Sadece substratları farklıdır. Örneğin; D-riboz-5-fosfat izomeri beş karbonlu şeker fosfatı kullanırken ve fosfosglukoz (PGH) izomeri altı karbonlu şeker fosfatını kullanır. Tamamen değişik kıvrımları olmasına rağmen TIM ile aynı reaksiyon mekanizmasına sahip 2 farklı RPI enzimleri vardır: RPI-A ve RPI-B. TIM ile beraber bu üç katalitik enzimden her biri, glutamatı katalitik enzim olarak kullanmaktadır ve proton uzaklaştırılmasına dayanan her bir enzimdeki oksianyon cis-enediolattaki negatif yükü dengelemektedir.

Sadece TIM'de dört ana zincir  $NH^-$  grubu ile üç farklı bir kıvrımın substratı fosfat ile iyi bir şekilde demirlenmiştir ama hiçbir fosfat zinciri bu etkileşime dahil değildir [100]. Bu fosfat bağlayan kıvrımlar TIM'in oluşumunda hem ligand hem de ligand olmayan konformasyonları tamamen bünyesinde bulundurur. PGI, fosfat ana zincire 2 H bağı ile bağlanırken RPI-B'de ana zincire bağlı böyle bir H bağı bulunmamaktadır. Bu her iki yapıdan en az birinde arjinin ya da lizin yan zincir fosfatına katkıda bulunmaktadır. RPI-A'da aynı zamanda fosfat ve yan zincir lizinleri ana zincir  $NH^-$  grupları arasında H bağları bulunmaktadır. TIM'deki fosfat demirlemesi RPI ve PGI'dan daha karmaşıktır. Burada katalize edilemeyen TIM reaksiyonu fosfat elimine edilmesi durumunu desteklemektedir. RPI ve PGI izomerlerinin katalize edilmesinde uymamıştır.

Bunun nedeni; uzun karbon iskeletine sahip bir substrat ile kısmen beş veya altı karbonlu şeker fosfatı içermesidir.

Aktif fosfit glikolaldehit izomerizasyonun ürün analizi TIM'deki proton transfer mekanizması ile aynıdır. Her iki reaksiyonda TIM'in kapalı formunda gerçekleşmektedir. Bu durumda 700 kıvrıma sahip fosfit dianyon aktivasyonu bu kapalı formu enerjisini kullanarak dengede tutmada başarılı olmuştur. Katalitik etkinliğini arttırmak için substrat bağlayıcı etkileşimleri TIM ile ilgisi olmayan farklı enzimler de kullanılabilir.

### **1.1.13 TIM'in Fizyolojik Rolü**

TIM, bir glikolitik enzimdir. İnsan vücudunda TIM'i kodlayan tek bir gen vardır [101]. Pek çok organizmada TIM stoplazmada yer alır ancak tripasonomada ve leishmaniada ise; hem stoplazmada hem de glikozomda bulunur. Bu organizmalarda glikozom, glikoliz için peroksizom gibi önemli bir organel parçasıdır [102]. Glikolitik yolda TIM, fruktoz-bifosfat aldolazdan sonra gelir. Bu demek oluyor ki; fruktoz-bifosfat aldolaz DHAP ve DGAP'yi oluşturur. DGAP daha ileride glikolitik yolu takip eden enzim tarafından metabolik yolda görev alır. DHAP ileriki basamaklarda glikolitik enzimle metabolik yola katılır [103]. Hücrede olayların düzenli bir şekilde işleyişi için TIM aktivasyonu çok önemlidir. TIM'in aktivitesinin düşmesi ile genlerde oluşan nokta mutasyona bağlı olarak pek çok hastalık meydana gelebilir. Hastalıkların bir çoğu DHAP'de oluşan toksiklenme ile ilişkilidir.

Glikololitik yolda, DHAP ve GAP vasıtasıyla; pentoz fosfat yolu, lipid metabolizması, glukoneogenez birbiri ile ilişkilidir [104]. Bu yollarda metabolik geçiş TIM'in aktivitesine bağlıdır ve burada oluşabilecek herhangi bir TIM eksikliği bazı hastalıkların baş göstermesine neden olabilir. TIM insan E104D varyantı, karakterize edilmiş en iyi bilinen ve hastalığa neden olan mutasyon varyantıdır. Bunun kristal yapısı açığa çıkarılmıştır. Bu mutasyon 1000 yıl önce bile insanlık üzerinde etkisini göstermiştir. Glu104 tamamen korunmuş bir

aminoasittir. Bu geni taşıyan homozigot hastalarda TIM, katalitik aktivitesinin sadece %2-20 arasında olarak kullanılabilir. Bu geni taşıyan heterozigotlar ise tıbben normal bireylerdir. Bu bireyler çeşitli fiziksel ve zihinsel bozukluğa sahip olurlar ve bu kişilerin en fazla 5 yıl yaşarlar. TIM'in yapısı incelendiğinde; Glu104 bir dimer aminoasittir. İlginç bir şekilde; bu belirlenmiş nokta mutasyonlarından biri E104D'dir. E104D-TIM varyantı, rekombinant bir protein olarak karakterizasyonu yapıp ekspre edildiğinde aynı bir doğal tip TIM gibi aktiftir. Bu mutasyon E104D varyantı, dimerin hücrede etkisini önlediği gibi enzimin de kararlılığını daha düşük seviyede tutmasına neden olur.

TIM eksikliği; çocukluk döneminde öldürücü etkisini gösterir [105]. Bu semptomların çoğu hemolitik anemi göstergesi olduğu gibi aynı zamanda nörolojik bozuklukların da sebebi olabilir. I170V milder semptomuna ve hemolitik anemiye sebep olur. Ama nörolojik bozukluk görülmez. Bir sonraki mutasyon ise kıvrım6'da bulunmakla beraber dimerin kararlılığını bozmamaktadır. Ancak E104D dimerin kararlılığını bozar. Maya, drosophila ve fare gibi model organizmalar kullanılarak E104D mutasyonu ile ilgili yapılan araştırmalar devam etmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Biyoinformatik Analiz

Triozfosfat izomeraz geninin ve proteinin özellikleri hakkında bilgi edinmek için çeşitli veri tabanlarındaki programlar kullanıldı.

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önceden oluşturulan cDNA kütüphanesinden temin edilen "mk4mk22" isimli dizinin homoloji gösterdiği nükleotit dizilerini saptamak için; NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [106] programının "nBLAST" (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren diziler bulundu. Daha sonra cDNA dizisinin BioEdit [107] programındaki "Sorted Six - Frame Translation" sekmesi ile açık okuma çerçevesi (ORF) belirlendi. Bulunan amino asit dizisine göre; NCBI veri tabanındaki BLAST [106] programının "pBLAST" (Protein Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla protein dizisine benzerlik gösterenlerin belirlenmesinin yanı sıra en yakın benzerlik gösterdiği gen ailesi tespit edildi.

Triozfosfat izomeraz proteinin aktif bölgesini ve bu bölgenin özelliğini belirlemek için; NCBI veri tabanındaki CDD (Conserved Domain Database) programı [108] yardımıyla belirlendi. Triozfosfat izomeraz proteinin 3 boyutlu yapısını ve domainlerinin dizilerini belirlemek için ise Cn3D programı kullanıldı.

Zeytin triozfosfat izomeraz geninin BioEdit programı [107] yardımıyla cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu ile amino asit dizisine ait amino asit kompozisyonu belirlendi. Triozfosfat izomeraz proteinin hem nükleotit dizisi hem

de amino asit dizisine göre zeytin çeşitleri arasında farklılık gösterip göstermediği belirlendi. Bunun için DNA izolasyonu yapılan örneklerin REFGEN ticari firmasından (Refgen, Ankara, Türkiye) gelen dizileme sonuçları BioEdit programında [107] işlenerek hizalandı, karşılaştırılarak analiz edildi.

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz proteininin translyasyon sonrası özelliklerini anlamak için; ExPASy web sayfasındaki (<http://www.expasy.org>) programlar kullanıldı. “Predotar” [109] programı ile triozfosfat izomeraz geninin tahmini hücre içi lokalizasyonuna bakıldı. Triozfosfat izomeraz proteinin transit peptidinin olup olmadığını belirlemek için, “TARGET-P” [110] programından yararlanıldı. Triozfosfat izomeraz proteinin hidrofob / filik olduğunun saptanması ve membran / stoplazmik özellikte olduğunun belirlenmesi amaçlı “SOSUI” [111] programı kullanıldı.

## **2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C’de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir.

## **2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama**

Polimorfizm için; zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinin yaprak örnekleri toplandı (Tablo 2.1). Bu örnekler, Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu’nun zeytin bahçesinden temin edildi. Toplanan örnekler Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği’nden temin edilen sıvı azot içerisinde laboratuara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 °C dolabına yerleştirildi.

## 2.4 DNA İzolasyonu

Triozfosfat izomeraz geni için; zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında polimorfizmin bulunup bulunmadığının belirlenmesi kapsamında zeytin çeşitlerinden (Tablo 2.1) gDNA izolasyonu, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait “Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kiti (Katalog No: G2N70-1KT)” kullanılarak yapıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek gerçekleştirildi.

Elde edilen gDNA örnekleri, kalıp olarak kullanarak gen spesifik primerler (TIMampL ve TIMampR) ile PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri jelde yürütüldü ve görüntüledi. Jelde tek bant olarak elde edilen PCR ürünleri, REFGEN (Ankara, Türkiye) isimli ticari firmaya gönderilerek dizi analizleri yapıldı.

Tablo 2.1: Polimorfizim için toplanan zeytin çeşitleri

1. Domat
2. Erkence
3. Ascolana
4. Manzallina
5. Piqual
6. Leço
7. 0108
8. 0308
9. UB1

## 2.5 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması

PCR deneylerinde kullanılan spesifik primerler (Tablo 2.2) “Primer3” [112] bilgisayar programı ile dizayn edildi. Dizayn edilen primerler yerli, aracı



şirketler yoluyla “Integrated DNA Technologies (Leuvene, Belçika)” firmasından temin edildi. Liyofilize haldeki primerler laboratuara geldikten sonra yaklaşık 15 sn. 12 000 rpm’de santrifüj yapıldı. Primerlere nükleazlardan arındırılmış sudan 1 mL eklenerek, 2 dk. süreyle alt üst edildikten sonra 15 sn. vorteks uygulandı. Sulandırılmış primerlerin, kullanıma hazır hale getirilmesi için, AD primerleri hariç, tüm primerlerin çalışma solüsyonlarının son konsantrasyonu 5 µM iken AD primerler için son konsantrasyon; 10 µM olarak belirlenmiştir. 200 µL’lik çalışma solüsyonları uygun konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı (Tablo 2.3).

Tablo 2.2: PCR’lerde kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri

<b>Primerler</b>	<b>Nükleotit dizileri ( 5’-3’)</b>	<b>Tm</b>
TIMAmplL	GAAAATGGGCAGGAAATTCTTC	54.5 °C
TIMAmplR	AAATTCACCACACGAGTGATACTG	51 °C
TIMRTF	CCTGGATTAACCTTGTGCATTTATACTT	60 °C
TIMRTR	CATCTAAGCGAAGTTCCAAATAGATAC	59.8 °C
TIMT1	GAAC TTTTAACCACTGGAAGAAACAC	60.6 °C
TIMT2	ATCTTCTTCACCTCTTCAGTGGTTT	60.8 °C
TIMT3	GAAGAATTTTCCTGCCATTTT	60.6 °C
AD 1	NTC GAS TWT SGW GTT	43.7 °C
AD 2	NGT CGA SWG ANA WGA A	45.6 °C
AD 2a	STT GNT AST NCT NTG C	45.2 °C
AD 3	WGT GNA GWA NCA NAG A	44.6 °C
AD 5	WCA GNT GWT NGT NCT G	46.7 °C

Tablo 2.3: Primerlerden çalışma solüsyonu hazırlanması

Primerler	Molaritesi	Çalışma solüsyonu
TIMampL	25.1 $\mu$ M	36.1 $\mu$ L primer + 164 $\mu$ L distile su
TIMampR	30 $\mu$ M	27.2 $\mu$ L primer + 173 $\mu$ L distile su
TIMRTF	28.2 $\mu$ M	27.85 $\mu$ L primer + 172.15 $\mu$ L distile su
TIMRTR	33.6 $\mu$ M	34.72 $\mu$ L primer + 165.28 $\mu$ L distile su
TIMT1	26.3 $\mu$ M	31.5 $\mu$ L primer + 168.5 $\mu$ L distile su
TIMT2	29.1 $\mu$ M	23.6 $\mu$ L primer + 176.4 $\mu$ L distile su
TIMT3	30.4 $\mu$ M	27.3 $\mu$ L primer + 172.7 $\mu$ L distile su
AD1	81 $\mu$ M	24.7 $\mu$ L primer + 175.3 $\mu$ L distile su
AD2	90.2 $\mu$ M	22.2 $\mu$ L primer + 177.8 $\mu$ L distile su
AD2a	82.9 $\mu$ M	24.1 $\mu$ L primer + 175.1 $\mu$ L distile su
AD3	88.3 $\mu$ M	22.7 $\mu$ L primer + 177.3 $\mu$ L distile su
AD5	73.2 $\mu$ M	2.3 $\mu$ L primer + 172.7 $\mu$ L distile su

## 2.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR reaksiyonları; 50  $\mu$ L'lik toplam hacimde, Tablo 2.4'de gösterilen gerekli komponentler belirtilen miktarlarda eklenerek uygulandı. Primerlerin ortak çalıştığı sıcaklık belirlenerek oluşturulan Tablo 2.5'deki PCR programında gerçekleştirildi. Özellikle gDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı deneylerde uygulanan PCR reaksiyonlarına standart komponentlere ilaveten DMSO (dimetil sülfoksit) ilave edilmesi ile verimin arttığı gözlemlendi.

Tablo 2.4: PCR komponentleri, kullanılan miktarları ve konsantrasyonları

Komponentler	Miktar	Konsantrasyonlar
Tampon	5 $\mu$ L	10 X
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ L	25 mM
Primer F	5 $\mu$ L	5 $\mu$ M
Primer R	5 $\mu$ L	5 $\mu$ M
dNTP (2 mM)	5 $\mu$ L	2.5 mM (her biri için)
DMSO	2 $\mu$ L	
gDNA	1 $\mu$ L	
Taq Polimeraz	0.5 $\mu$ L	5 unit
Distile su	23.5 $\mu$ L	
Toplam	50 $\mu$ L	

Tablo 2.5: PCR döngü koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön ısıtma	95 °C	1 dk.	1
Denatürasyon	94 °C	30 sn.	35
Eşleşme	53 °C	45 sn.	
Sentez	72 °C	1 dk.	
Uzama	72 °C	5 dk.	1

## 2.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen “Atto” marka (Tokyo, Japonya) elektroforez sistemi kullanıldı. Elektroforezde kullanılan “Agaroz (Katalog No: A9539-100G)”, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasından temin edilirken, TBE tampon çözeltisi için gerekli olan “Tris-base (Katalog No: 0826-500G)”, Amresco (Solon, A.B.D) firmasından, “Borik Asit (Katalog No: A0768,1000)” ve “EDTA (Katalog No: A5097,0250)” ise; Applichem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. TBE (5 X) tampon çözeltisi oluşturmak için kullanılan bileşenler belirli miktarlarda eklendi (Tablo 2.6). Bu tampon çözeltisinden de elektroforezde kullanmak için, TBE (0.5 X) tampon çözeltisi hazırlandı (Tablo 2.6). Zeytinden izole edilen gDNA (bkz. Tablo 2.1) ve RNA örneklerini gözlemek için %0.8’lik agaroz jeli hazırlandı. Bunun için 0.4 g agaroz tartıldı ve 50 mL TBE (0.5 X) tampon çözeltisi içerisine eklenip kaynatılarak çözüldü. Karışım soğuyana kadar elektroforez tankı ve taraklar DEPC’li su ile yıkanarak steril edildi (özellikle de hassas olan RNA örnekleri için). Soğuyan karışımın içerisine 0.5 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek, tarakları önceden yerleştirilen jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektroforez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar TBE (0.5 X) tampon çözeltisi ile dolduruldu. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli bir DNA standartı olan Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilen markır (Katalog No: SM1333) yüklendi (Şekil 2.7). gDNA örnekleri için 5 µL gDNA ve 1 µL yükleme boyası (Şekil 2.7) karıştırılırken RNA örnekleri için 3 µL RNA kalıbı, 2 µL distile su ve 1 µL yükleme boyası eklenerek jeldeki kuyucuklara pipet yardımıyla yükleme yapıldı. Örnekler 100 V elektrik akımı

verilerek yaklaşık 35 dk. jelde yürütüldü. Yürütülen DNA ve RNA örnekleri UV transillüminatöründe gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.6: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve komponentlerinin miktarı

<b>Çözeltiler</b>	<b>Kompozisyonu (1L için)</b>
TBE (5 X)	54 gr. Tris-base
	27,5 gr. Borik Asit
	20 mL. 0,5 M EDTA ( pH:8)
TBE (0.5 X)	100 mL TBE (5 X)
	900 mL distile su

Tablo 2.7: Agaroz jelde kullanılan malzemeler

<b>Yükleme boyası</b>	Fermentas GeneRuler™ DNA Ladders (Katalog No: SM0313)
<b>Markır</b>	Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333)

## 2.8 Gerçek Zamanlı PCR İçin Bitki Materyali Toplama

Balıkesir’de yetişen “var yılı” (Şekil 2.1) ve “yok yılı” (Şekil 2.2) olarak belirlenen zeytin ağaçlarından, triozfosfat izomeraz geninin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için çeşitli dokulardan örnekler toplandı. “Var yılı” ve “yok yılı” ifadeleri zeytin bitkisinin sırasıyla; çok meyveli ve az meyveli durumunu ifade etmektedir. 12 ay boyunca bu ağaçların çeşitli dokularından örnekler toplandı. Her örnek toplamada; tarih, hava durumu, toplanan doku örnekleri ve toplandıği ağaç hakkındaki bilgiler not edildi (Tablo 2.8). Toplanan örnekler, sıvı azot içerisinde laboratuara getirildi ve -80 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 2.1: Var yılı olarak belirlenen 1.Ağaç



Şekil 2.2: Yok yılı olarak belirlenen 2.Ağaç

## 2.9 RNA İzolasyonu

Triozfosfat izomeraz proteinin zamansal ve yersel ekspresyon seviyelerini belirlemek için; 12 ay boyunca toplanan var yılı ve yok yılı zeytin ağaçlarına ait çeşitli doku örneklerinden (Tablo 2.8) RNA izolasyonu için, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait “Spectrum Plant Total RNA Kiti (Katalog No: STRN50-1KT)” kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. Bu kit ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu, zeytin yaprak örneklerinde oldukça başarılı iken meyve örnekleri ile yapılan izolasyonlarda verimsiz olduğu gözlemlendi. Bu nedenle meyve örnekleri için Qiagen (Hilden, Almanya) firmasına ait “RNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 74904)” kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. Toplam RNA örneklerindeki DNA moleküllerini ortadan kaldırıp daha saf RNA örneği elde etmek için DNaz enzimi kullanıldı. Sigma kiti kullanılarak yapılan örnekler, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait “On-Column DNase I Digestion Seti (Katalog No: DNASE70-1SET)” ile Qiagen kullanılarak yapılan meyve örnekleri ise; Qiagen (Hilden, Almanya) firmasına ait “On-Column DNase Digestion with the RNase-Free Dnase enzimi (Katalog No: 79254)” ile muamele edildi. İşlem protokollerine uygun şekilde gerçekleştirildi.

## 2.10 DEPC’li Su Hazırlama

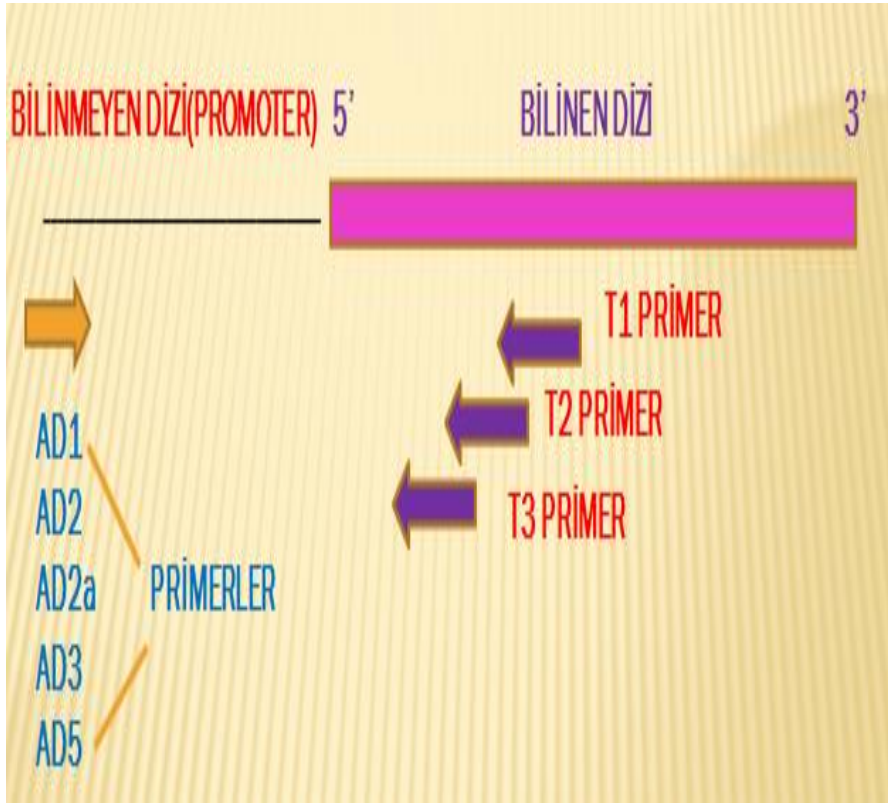
RNA örneklerini nükleazlardan korumak için izolasyonda kullanılan ortamın, kullanılan pipetlerin ve elektroforez takımının temizlenmesi için DEPC’li su kullanıldı. DEPC’li suyun hazırlanmasında Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait DEPC’den (Katalog No: D5758) kullanıldı. 0.1 mL DEPC’den alınarak 100 mL suya eklendi ve alt üst edildi. 37 °C’de 12 saat bekletildikten sonra 15 dakika otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Tablo 2.8: Ekspresyon seviyelerini belirlemek için toplanan örnekler ve hava şartları

Tarih	Sıcaklık Ortalama	Nem Ortalama	Örnekler
15.04.2010	15 °C	%61	Tomurcuklu yaprak(1.Ağaç)
			Tomurcuksuz yaprak(2.Ağaç)
			Sürgün(3.Ağaç)
14.05.2010	21 °C	%47	Yaprak (1.Ağaç)
			Tomurcuk (1.Ağaç)
			Çiçek(1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Tomurcuk (2.Ağaç)
			Tomurcuk+çiçek(2.Ağaç)
17.06.2010	26 °C	%60	Sürgün(3.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
15.07.2010	26 °C	%61	Sürgün
			Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
19.08.2010	27 °C	%55	Meyve (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
22.09.2010	20 °C	%61	Yaprak (2.Ağaç)
			Olgunlaşmamış meyve (1.Ağaç)
			Olgunlaşmış meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Olgunlaşmamış meyve (2.Ağaç)
19.10.2010	20 °C	%71	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Pedisel (1.Ağaç)
			Meyve
22.11.2010	7 °C	%84	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
20.12.2011	11 °C	%72	Yaprak (2.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
19.01.2011	2 °C	%81	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Yaprak (3.Ağaç)
21.02.2011	6 °C	%63	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
16.03.2011	12 °C	%41	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Sürgün (3.Ağaç)

## 2.11 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced)

Triozfosfat izomeraz geninin promotörünü tespit etmek için; ilk olarak bilinen cDNA dizisinden 5' ucuna ters yönde ve kademeli olarak TAIL1, TAIL2 ve TAIL3 primerleri (bkz. Tablo 2.3) Primer3 [112] programı yardımıyla tasarlandı. Bu primerlere karşılık olarak rastgele bağlanan primerler (AD1, AD2, AD2a, AD3 ve AD5) kullanıldı (bkz. Tablo 2.3). Liu Y. G. ve arkadaşlarının detaylı olarak analiz ettiği TAIL-PCR protokolü modifiye edilerek kullanıldı. Optimize edilen PCR reaksiyonları kademeli olarak gerçekleştirildi (Tablo 2.9). Bu PCR'lerin her biri için farklı komponentler kullanıldı (Tablo 2.10). Şekil 2.3' de TAIL-PCR'nin mekanizması şematize edilmiştir.



Şekil 2.3 TAIL - PCR'nin mekanizması



Tablo 2.9: TAIL-PCR programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
<b>TAIL1 - PCR</b>			
1. Basamak	92 °C	3 dk.	1
2. Basamak	95 °C	1 dk.	
3. Basamak	94 °C	30 sn.	5
4. Basamak	60 °C	1 dk.	
5. Basamak	72 °C	2 dk.	1
6. Basamak	94 °C	30 sn.	
7. Basamak	25 °C	2 dk.	
8. Basamak	72 °C	2 dk.	
9. Basamak	94 °C	30 sn.	30
10. Basamak	60 °C	1 dk.	
11. Basamak	72 °C	2 dk.	
12. Basamak	72 °C	5 dk	1
<b>TAIL2 - PCR</b>			
1) Basamak	94 °C	30 sn.	12
2) Basamak	60 °C	1 dk.	
3) Basamak	72 °C	2 dk.	
4) Basamak	94 °C	30 sn.	
5) Basamak	60 °C	1 dk.	
6) Basamak	72 °C	2 dk.	
7) Basamak	94 °C	30 sn.	
8) Basamak	45 °C	1 dk.	
9) Basamak	72 °C	2 dk.	
10) Basamak	72 °C	5 dk.	1
<b>TAIL3 - PCR</b>			
1) Basamak	94 °C	30 sn.	20
2) Basamak	45 °C	1 dk.	
3) Basamak	72 °C	2 dk.	
4) Basamak	72 °C	5 dk.	1

Tablo 2.10: TAIL-PCR için gerekli komponentler ve kullanılan miktarlar

<b>TAIL1</b>	<b>Miktar</b>
Tampon (10 X)	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.2 µL
Primer TAIL1 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.4 µL
DMSO	0.4 µL
gDNA	2 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	6.5 µL
AD Primer (10 µM)	5 µL
<b>TAIL2</b>	
Tampon (10 X)	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
Primer TAIL2 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.4 µL
DMSO	0.5 µL
1/40 TAIL1 PCR ürünü	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	12.6 µL
AD Primer (10 µM)	5 µL
<b>TAIL3</b>	
Tampon (10 X)	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 µL
Primer TAIL3 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.8 µL
DMSO	1 µL
1/10 TAIL2 PCR ürünü	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	26.7 µL
AD Primer (10 µM)	10 µL

## 2.12 Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından yerli firmalar aracılığıyla temin edilen “RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti (Katalog No: K1622)” kullanılarak ters transkripsiyon (RT-PCR) yapıldı ve bunun için kit protokolü

takip edildi. PCR reaksiyonları, 20 µL'lik toplam hacim içerisinde Tablo 2.11'deki komponentlerden belirtilen miktarlarda eklenerek gerçekleştirildi.

Tablo 2.11: RT-PCR komponentleri ve uygulanma protokolü

Bileşenler	Miktar	Konsantrasyon
Kalıp RNA	5 µL	-
Oligo (dT)18 primer	1 µL	-
DEPC'li su	6 µL	-
5 dk. 65 °C'de inkübasyon		
Tampon	4 µL	5 X
RNaz inhibitörü	1 µL	20 u/µL
dNTP Mix	2 µL	10 mM
Revers Transkriptaz	1 µL	200 u/µL
60 dk. 42 °C'de inkübasyon		
5 dk. 70 °C'de inkübasyon		

### 2.13 Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR)

Belirlenen zeytin ağaçlarının çeşitli dokularından 12 ay boyunca toplanan örneklerden (bkz. Tablo 2.8) izole edilen RNA örneklerinden, ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR, Bioneer (Seoul, Kore) firmasına ait “GreenStar qPCR PreMix (Katalog No: K-6210)” kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR için gerekli malzemeler kitin kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde, Tablo 2.12'de gösterildiği gibi, ilave edilerek Bioneer (Seoul, Kore) markalı Gerçek zamanlı PCR cihazı ile Tablo 2.13'de gösterilen programda uygulandı. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları, her bir cDNA örneği için, hem zeytin tahmini TIM genine hem de normalizör gen olan GapDH'ye (GenBank erişim no: 154260889) ait özgül primerler kullanılarak 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.12: Real-Time PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar	Konsantrasyon
cDNA Kalıp	1 µL	-
Primer L	1 µL	5 µM
Primer R	1 µL	5 µM
DEPC'li su	17 µL	-
GreenStar qPCR PreMix	Liyofilize halde	

Tablo 2.13: Real-Time PCR döngü koşulları

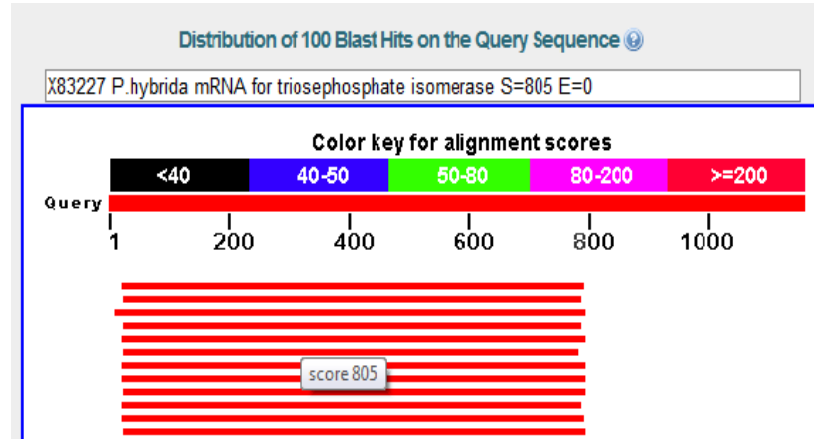
Basamak	Fonksiyon	Sıcaklık	Zaman	Döngü
1. Basamak	İnkübasyon	95 °C	5 dk.	-
2. Basamak	İnkübasyon	94 °C	15 sn.	-
3. Basamak	İnkübasyon	55 °C	15 sn.	-
4. Basamak	Tarama	-	-	-
5. Basamak	İnkübasyon	72 °C	15 sn.	-
6. Basamak	Basamak 2'ye dön	-	-	35
7. Basamak	İnkübasyon	72 °C	1 dk.	-
8. Basamak	Erime	70 °C – 94 °C	Her 1 sn.1 °C	-

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Bioinformatik Analiz

##### 3.1.1 BLAST Analizi

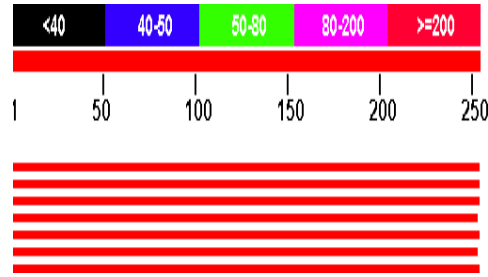
Başlangıçta ismi belirsiz olan cDNA dizisine ait, NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programının nBLAST sekmesi ile yapılan analizin sonucu, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterilmektedir. “mk4mk22” isimli cDNA dizisinin; triozfosfat izomeraz genine ait olduğu görüldü. pBLAST sekmesi yardımıyla amino asit dizisi analize tabi tutuldu (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Kütüphaneden temin edilen “mk4mk22” isimli cDNA dizisinin en yakın benzerliği gösterdiği gen ailesi tespit edildi (Şekil 3.5). Triozfosfat izomeraz gen ailesinin bir üyesi olduğu belirlendi.



Şekil 3.1: TIM cDNA dizisinin BLAST analizi

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">EF144195.1</a>	Populus trichocarpa clone PX0011_E19 unknown mRNA	824	824	65%	0.0	84%	<a href="#">UM</a>
<a href="#">XM_022316251.3</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	823	823	65%	0.0	83%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">AK522525.1</a>	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1052EG02, HTC in leaf	809	809	67%	0.0	82%	
<a href="#">X83227.1</a>	P.hybrida mRNA for triosephosphate isomerase	805	805	65%	0.0	83%	
<a href="#">AY438596.1</a>	Solanum chacoense triose phosphate isomerase cytosolic isoform mF	801	801	65%	0.0	83%	
<a href="#">XM_022333657.1</a>	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100263345 (LOC11	753	753	65%	0.0	83%	<a href="#">UGM</a>
<a href="#">EF146514.4</a>	Populus trichocarpa clone WS01210_K03 unknown mRNA	752	752	65%	0.0	82%	<a href="#">UGM</a>
<a href="#">XM_022311132.1</a>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	767	767	65%	0.0	82%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">DQ222436.1</a>	Solanum tuberosum clone 104F01 triose phosphate isomerase cytos	767	767	65%	0.0	82%	<a href="#">UM</a>
<a href="#">CU225075.1</a>	Populus EST from leave	765	765	65%	0.0	82%	

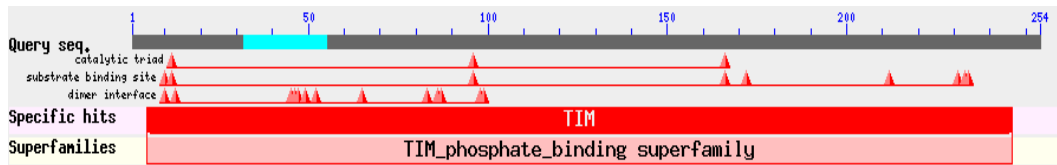
Şekil 3.2: TIM cDNA dizisine benzeyen nükleotit kayıtları



Şekil 3.3: Protein dizisinin BLAST analizi

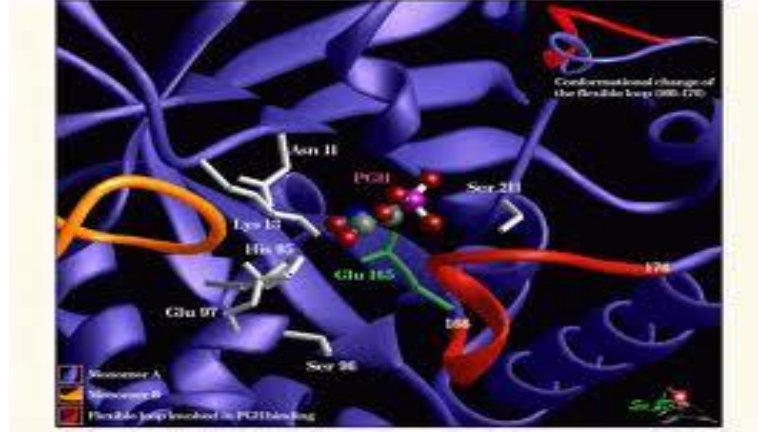
Accession	Description	Max score	Total score
<a href="#">AB802628.1</a>	triose phosphate isomerase cytosolic isoform-like [Solanum tuberosu	455	465
<a href="#">AC111723.1</a>	triosephosphate isomerase [Gossypium hirsutum]	454	464
<a href="#">P48495.1</a>	Reclame: Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic; Short=TIM; SH	454	464
<a href="#">XP_002283693.1</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera] >emb(CBI31684.3)	452	462
<a href="#">AAR11379.1</a>	triose phosphate isomerase cytosolic isoform [Solanum chacoense]	452	462
<a href="#">CAN70587.1</a>	hypothetical protein VITISV_041523 [Vitis vinifera]	451	461
<a href="#">ACF06445.1</a>	triose phosphate isomerase cytosolic isoform [Elaeis guineensis]	457	457
<a href="#">XP_002533147.1</a>	triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis] >qb EEF292	456	456
<a href="#">VD_007876207.1</a>	...	454	454

Şekil 3.4: ORF dizisine benzeyen protein kayıtları

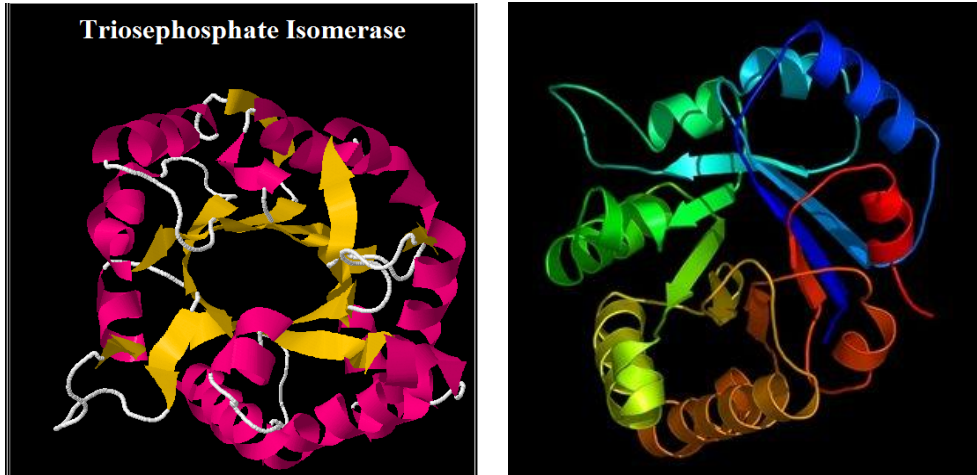


Şekil 3.5: “mk4mk22” cDNA dizisinin ait olduğu protein ailesi

Triozfosfat izomeraz geninin aktif bölgesi ve özelliği (Şekil 3.6) ve genimizin 3-boyutlu yapısı için yapılan analizin sonucu (Şekil 3.7) gösterildi. Aktif bölgesinde; “TIM Barrel” yapısının bulunduğu ve diğer TIMlerle karşılaştırıldığında korunmuş olarak bulunan aynı aktif bölge amino asitlerini içerdiği saptandı.



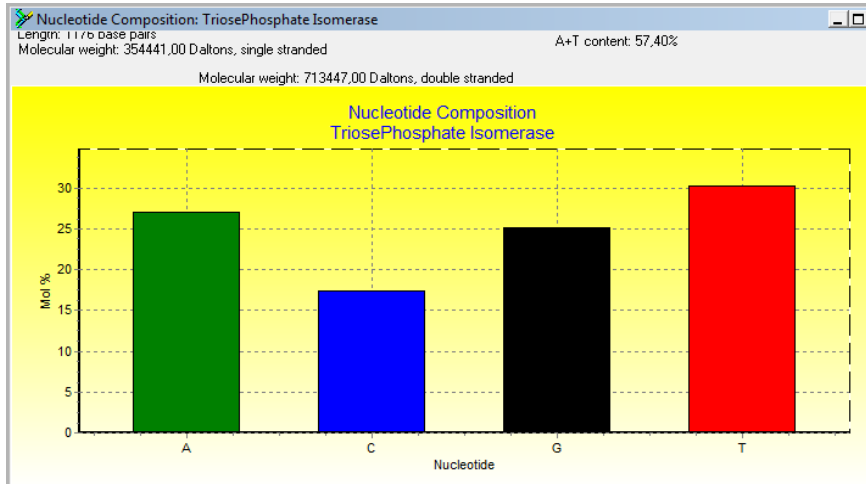
Şekil 3.6: TIM proteinin aktif bölgesi



Şekil 3.7: TIM proteinin Cn3D’de görüntülenen 3 boyutlu yapısı

### 3.1.2 BioEdit Programı

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçları Şekil 3.8’de görülmektedir. Bu sonuçlara göre 1176 nükleotit uzunluğundaki triozfosfat izomeraz geninin %42.60 G+C ve %57.40 A+T içerdiği belirlendi.



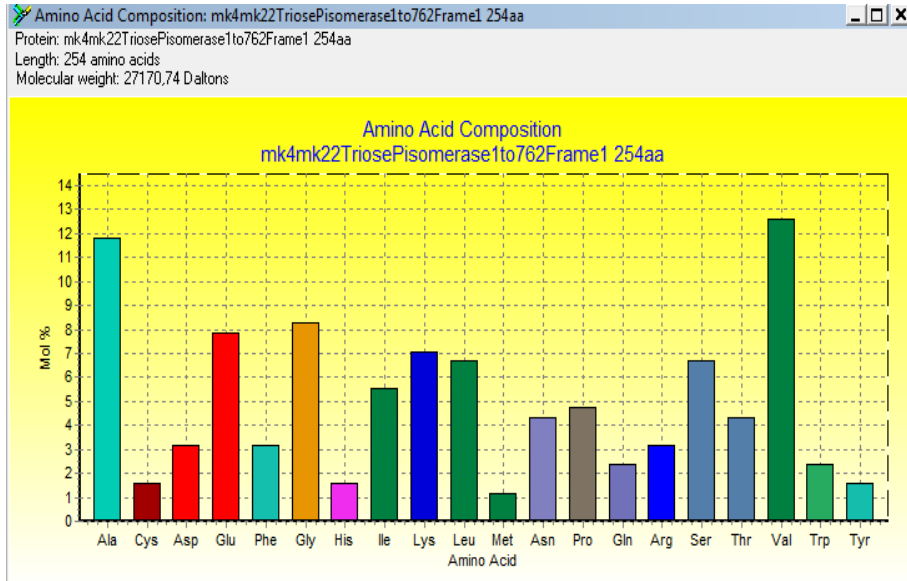
Şekil 3.8: Triozfosfat izomeraz cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu

Triozfosfat izomeraz cDNA dizisinin, Bioedit programı vasıtasıyla tespit edilen açık okuma çerçevesi (ORF) Şekil 3.9’da gösterildi. Triozfosfat izomeraz geninin açık okuma çerçevesinin amino asit kompozisyonu bulundu (Şekil 3.10). Burada; valin ve alanin içeriği sırasıyla %11 ve %12 olmak üzere toplam %48 hidrofobik amino asit içermesinin yanı sıra; glutamik asit gibi asidik özellikte, lizin gibi bazik ve glisin ile serin gibi hidrofilik amino asitleri bir arada bulunduran kompleks amino asit içeriği dikkat çekmektedir.

```
>ORF 25 to 786: Frame 1      254 aa
MGRKFFVGGNWKNGTTEEVKIVETLNAGQVPSDVEVVVSPFFVLEFVWVSSLRPDPFHVAQNCWVKKGGAYTGEISAEMLVNLDIPWVILGHSERRALLSESNEFVGEKV
AYALSKGLKVIACIGETLEQREAGSTMDVVAQTKAIAARISDWTNVVLAYPEFVNAIGTGKVATPAQAEVHAE LRKWLHANVSPEVAASTRIIYGGSVNGANCKELAA NPDVD
GFLVGGASLKPEFIDI IKS AEV KSA
```

Şekil 3.9: Triozfosfat izomeraz geninin açık okuma çerçevesi

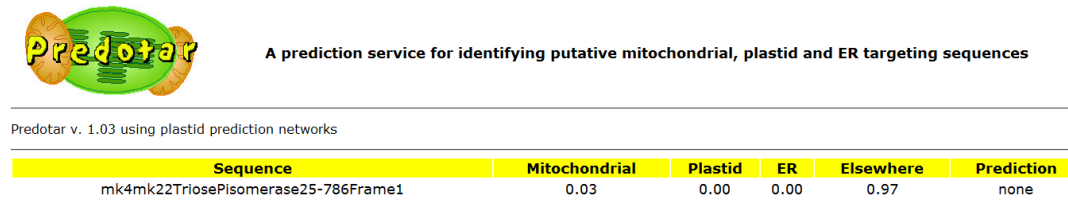




Şekil 3.10: Triozfosfat izomeraz proteinin amino asit kompozisyonu

### 3.2 ExPASy Analizleri

Zeytin triozfosfat izomeraz proteinin translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ilk olarak triozfosfat izomeraz proteininin hücre içindeki tahmini lokalizasyonuna bakıldı (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).



Şekil 3.11: Triozfosfat izomerazın hücre içi lokalizasyon tahmini

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin hücre içerisindeki lokalizasyonu, Predotar isimli programla tespit edildikten sonra SOSUI programı yardımıyla desteklenmiş olan sonuç Şekil 3.12'de görülmektedir. Predotar isimli

programda yapılan analiz ile TIM'in %3 oranında mitokondride bulunurken %97 oranında hücrede herhangi bir yerde lokalize olduğu görüldü. SOSU isimli programın ise; stoplazmik bir protein olduğunu belirtmesi sonucu; zeytin triozfosfat izomeraz geninin stoplazmada sentezlendiği belirlendi.

## SOSU<sub>GramN</sub> Result

No.	seg.Length	subcellular Localization site	ID
0001	254a.a.	C (cytoplasmic)	mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 254aa

Şekil 3.12: Triozfosfat izomeraz proteinin hücre içi tahmini lokalizasyonu

Triozfosfat izomeraz proteininin transit peptidinin olup olmadığını anlamak için yapılan analizin sonucu Şekil 3.13'de görülmektedir. RC ile ifade edilen kısım analizin güvenilirliğini ölçmektedir. 1'den 5'e kadar derecelendirilmiş ölçekte değer düşükçe güvenilirlik artmaktadır. Bu durumda 2 değeri burada sonucun %80 güvenilir olduğunu göstermektedir.

CENTERFO  
RBIOLGI  
CALSEQU  
ENCEANA  
LYSIS CBS

### TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

```

### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using PLANT networks.

```

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	254	0.092	0.169	0.038	0.815	_	2
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

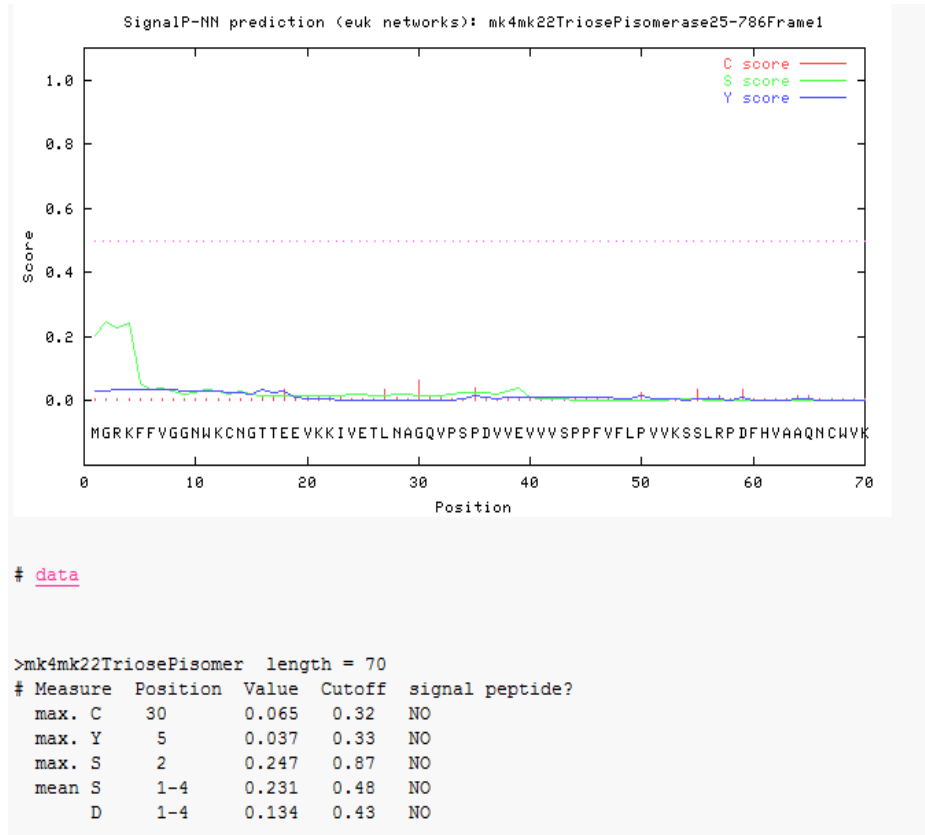
Şekil 3.13: Triozfosfat izomeraz proteinin transit peptid analizi

Triozfosfat izomerazın protein özelliğini belirlemek için yapılan analiz sonucu Şekil 3.14'deki gibidir. SOSU isimli programla yapılan analiz sonucuyla; proteinin hücre içerisinde çözünmüş halde bulunduğu görüldü.

**This amino acid sequence is of a SOLUBLE PROTEIN.**

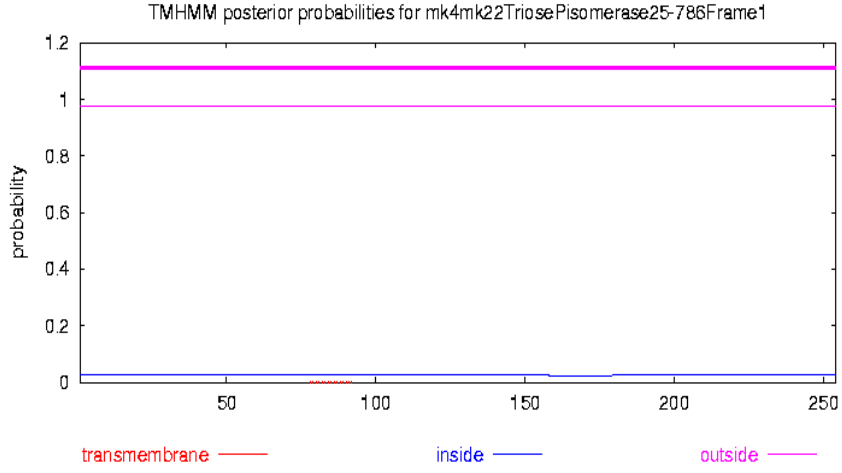
Şekil 3.14: Triozfosfat izomerazın protein özelliği

SignalP programı ile zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin sinyal peptid içerip içermediği ve transmembran proteini bulundurma durumu görülmektedir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Burada sinyal peptidi bulunmadığını ve transmembran domaini olmadığını dolayısıyla membran proteini olmadığını görmekteyiz.



Şekil 3.15: Triozfosfat izomerazın sinyal peptid analizi

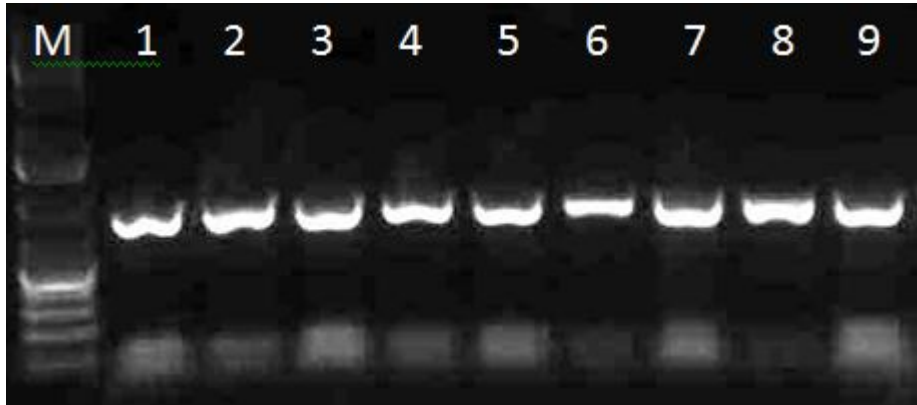
```
# mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 Length: 254
# mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 Number of predicted TMHs: 0
# mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 Exp number of AAs in TMHs: 0.00689
# mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 Exp number, first 60 AAs: 0.00161
# mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 Total prob of N-in: 0.02442
mk4mk22TriosePisomerase25-786Frame1 TMHMM2.0 outside 1 254
```



Şekil 3.16 Triozofosfat izomerazın transmembran proteini analizi

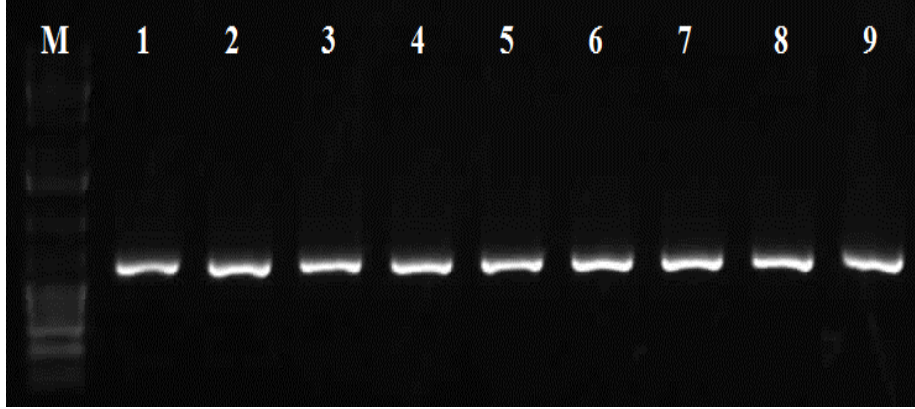
### 3.1 DNA İzolasyonu ve PCR

Zeytin çeşitlerine (Tablo 2.1) ait yapraklardan elde edilen genomik DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 3.17’de görülmektedir.



Şekil 3.17: İzole edilen genomik DNA örnekleri

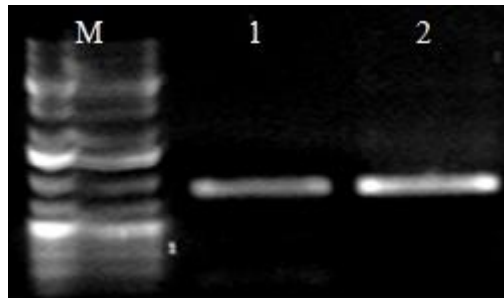
Polimorfizm olup olmadığını anlamak için toplanan örneklerden (bkz. Tablo 2.2) triozfosfat izomeraz genine spesifik primerler (TIMAmpL ve TIMAmpR) ile PCR yapıldı (Şekil 3.24).



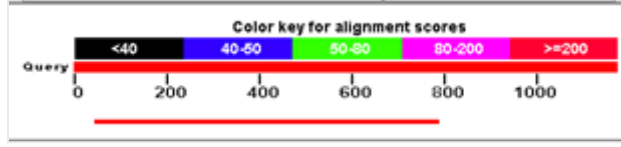
Şekil 3.18: Zeytin çeşitleriyle yapılan PCR ürünleri

### 3.2 İtron Analizi

Triozfosfat izomeraz geninde intronunun olup olmadığını belirlemek için hem gDNA hem de cDNA örneklerinden ayrı ayrı spesifik primerler (TIMAmpL ve TIMAmpR) ile PCR yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.19’da gösterildi. Jelde bant veren PCR ürünleri dizi analizine gönderildi. Jel görüntüsünde aynı büyüklükte görülmesinin yanı sıra dizi analizi sonucu; gDNA ve cDNA dizileri karşılaştırıldı ve aynı moleküler büyüklükte (yaklaşık 800 nükleotit) olduğu görüldü. Böylece zeytin triozfosfat izomerazın intronunun bulunmadığı tespit edildi (Şekil 3.19). Ayrıca yapılan BLAST analizi de sonucu doğrulamaktadır (Şekil 3.20).



Şekil 3.19: İtron tespiti için yapılan PCR ürünleri: 1. gDNA kalıbıyla yapılan PCR ürünü  
2. cDNA kalıbıyla yapılan PCR ürünü



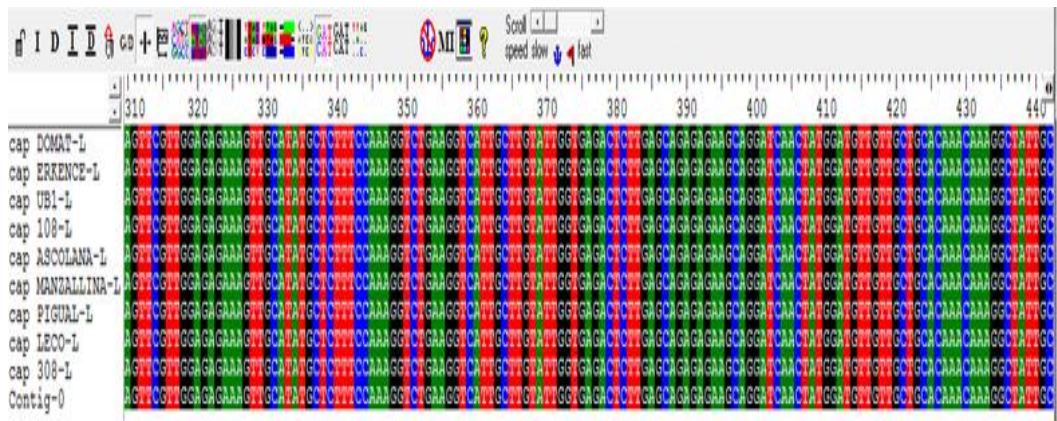
Şekil 3.20: Zeytin triozfosfat izomeraz geninin intron analizi

### 3.3 Polimorfizm Analizi

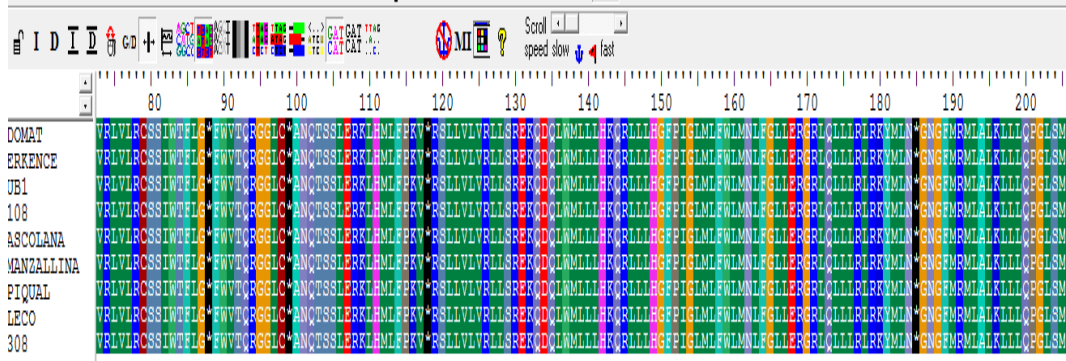
Polimorfizmin tespiti için triozfosfat izomeraz geninin zeytin çeşitleri arasındaki farklılıkları ayrı ayrı incelendi. 9 farklı zeytin çeşiti (bkz. Tablo 2.1) ile yapılan PCR ürünlerinin, dizi analizi sonuçlarına ait kromotogramlarda piklerin sağlamlığı kontrol edildikten sonra BioEdit programı ile hizalandı. Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninde polimorfizm bulunmadığı dizileme sonuçlarından görülmektedir (Şekil 3.22 ve Şekil 3.23).



Şekil 3.21: Dizi analizinden gelen dizilere ait kromotogramlar



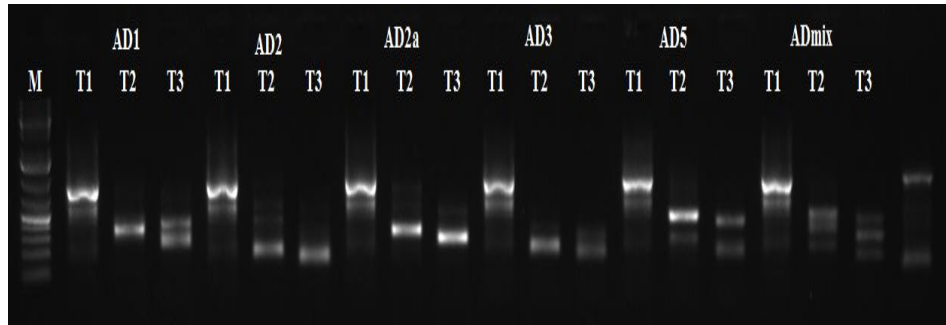
Şekil 3.22: Zeytin çeşitlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması



Şekil 3.23: Zeytin çeşitlerinin amino asit dizilerinin karşılaştırılması

### 3.4 TAIL-PCR

Triozfosfat izomeraz geninin promotörünü bulmak için gerçekleştirilen PCR ürününün jeldeki görüntüsü Şekil 3.24'deki gibi fotoğraflandı.



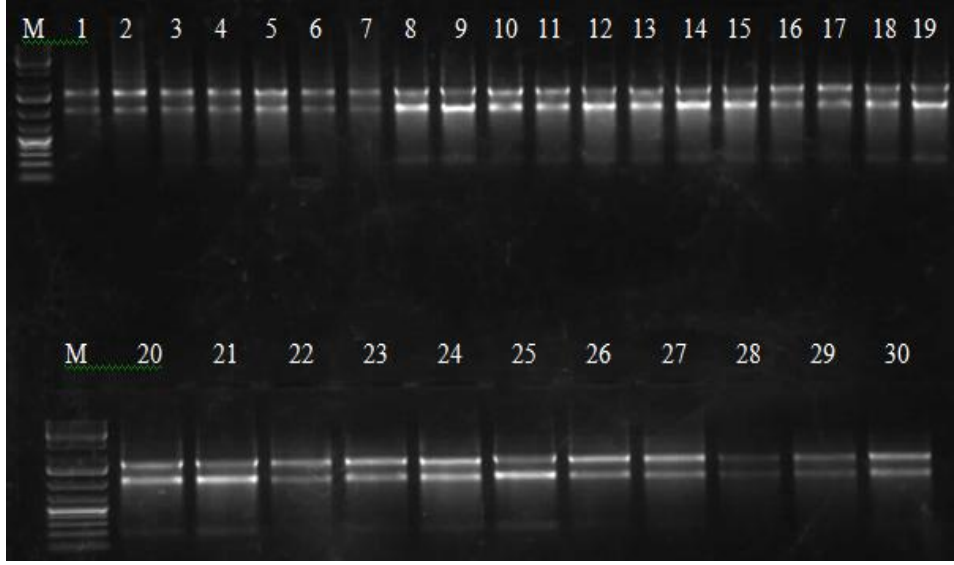
Şekil 3.24: TAIL-PCR jel görüntüsü

TAIL-PCR sonucunda elde edilen hedef PCR ürünleri dizi analizine gönderildi. Dizi analizinden gelen sonuçlara göre, Şekil 3.25'te görüldüğü gibi; kendi içlerinde karşılaştırılarak bir dizi oluşturuldu. Oluşturulan bu dizi ile cDNA dizisi BioEdit programı yardımı ile karşılaştırılarak promotör analizi yapıldı (Şekil 3.26). Bunun sonucunda; elde edilen promotör aday bölgesinin zeytin triozfosfat izomeraz cDNAsı'na ait 5' ucundan ilk 63 nükleotitlik bölge ile benzeştiği görüldü (Şekil 3.27).



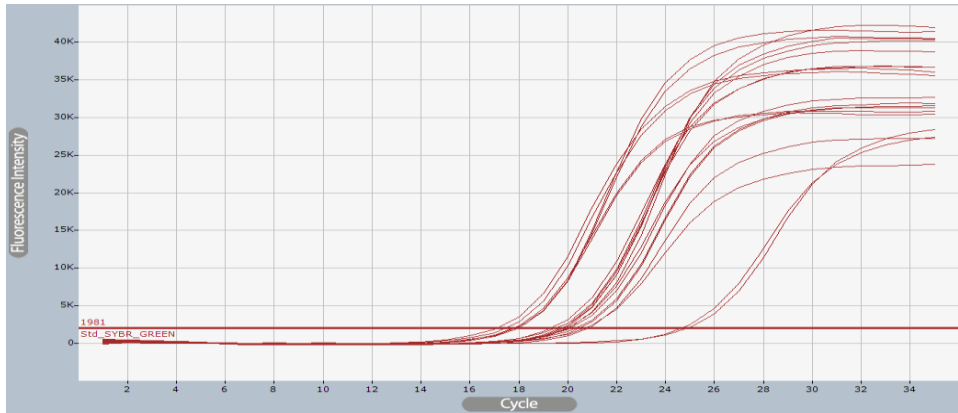




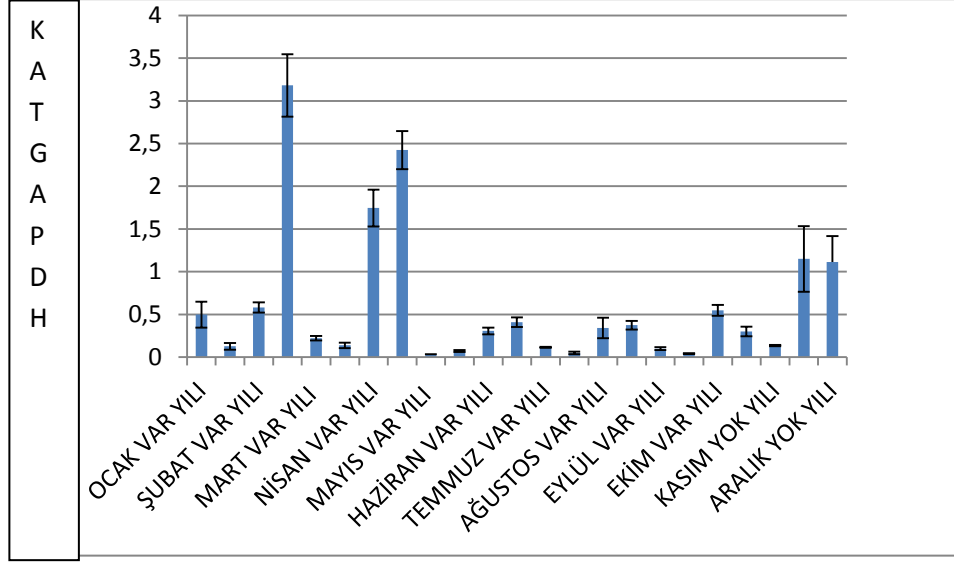


Şekil 3.28: Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

12 ay boyunca toplanan yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçları analiz edildiğinde oluşan grafik Şekil 3.30'da görülmektedir. Burada zeytin triozfosfat izomeraz geninin en çok “yok yılı” diye isimlendirilen ağaçta Şubat ayında en fazla sentezlendiği görüldü.

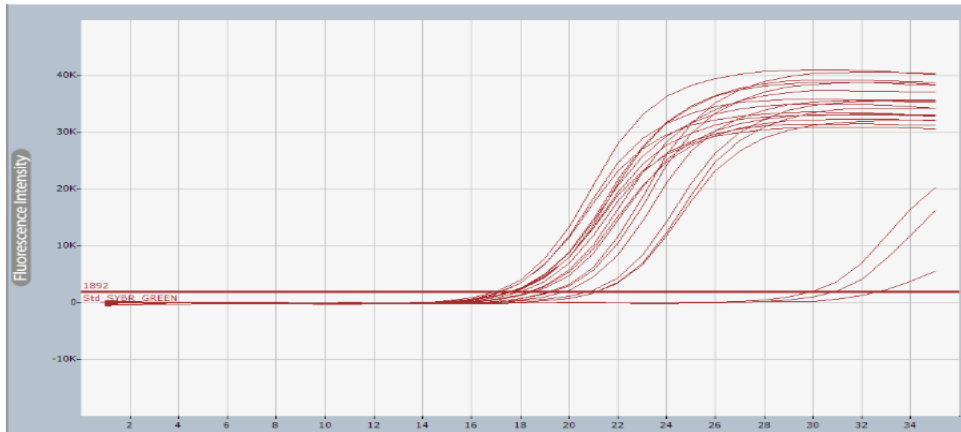


Şekil 3.29: Yaprak örnekleri grafiği

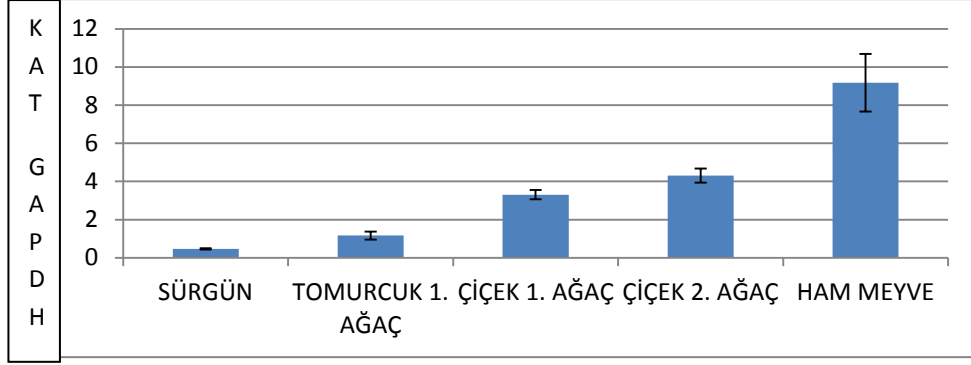


Şekil 3.30: Yaprak örneklerindeki ekspresyon seviyesi

12 ay boyunca, zeytinin çeşitli dokularından toplanan örneklerden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçları analiz edilerek bir grafik oluşturuldu (Şekil 3.32). Meyve örneklerine ait cDNA kütüphanesinden temin edilen zeytin triozfosfat izomeraz geninin farklı zeytin dokularındaki ekspresyon seviyelerini gösteren grafik de meyveye has bir gen olduğunu doğruladı.

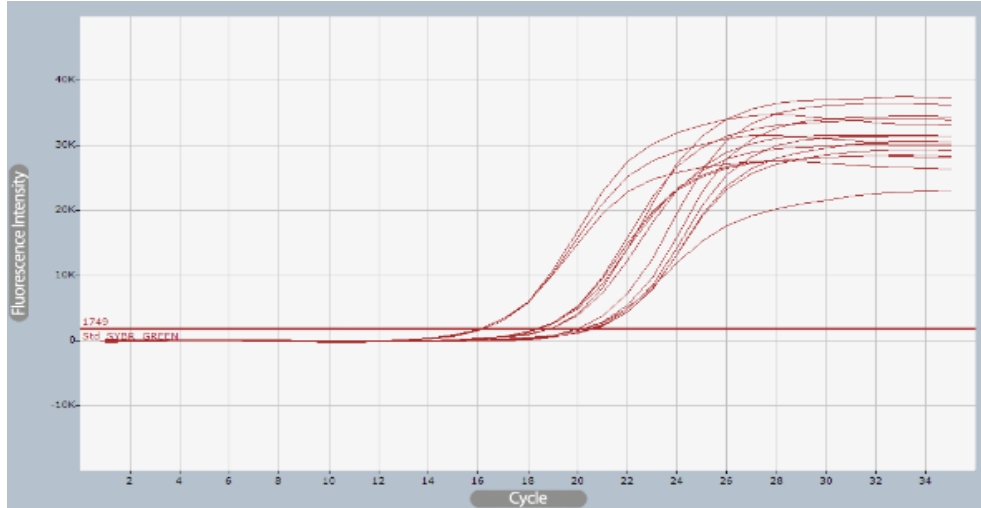


Şekil 3.31: Doku örnekleri grafiği

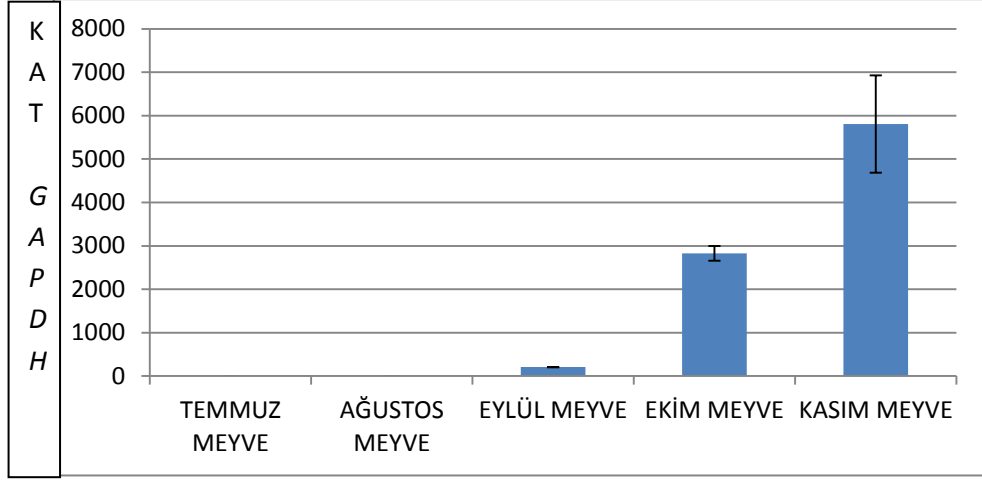


Şekil 3.32: Farklı dokulardaki ekspresyon seviyesi

12 ay boyunca zeytin ağaçlarından toplanan meyve örneklerinden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçları analiz edildiğinde oluşan grafik Şekil 3.34’de gösterildi. Meyveye has bir gen olduğu anlaşıldıktan sonra meyve hasat zamanı olan aylara göre ekspresyon seviyelerine bakıldığında; metabolik aktivitenin en yüksek olduğu, meyvenin olgunlaşma dönemi olan Kasım ayında en yüksek oranda sentezlendiği görüldü.

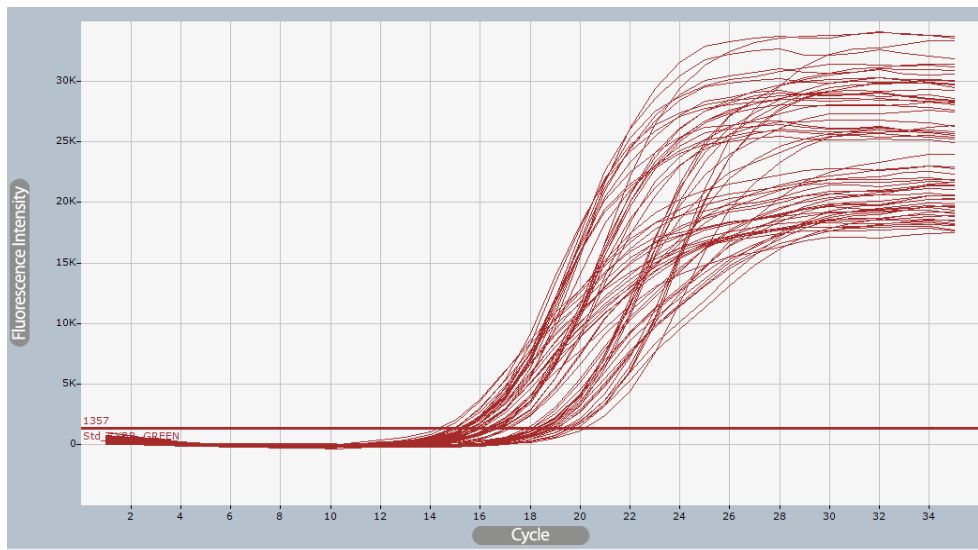


Şekil 3.33: Meyve hasat zamanı ayları grafiği

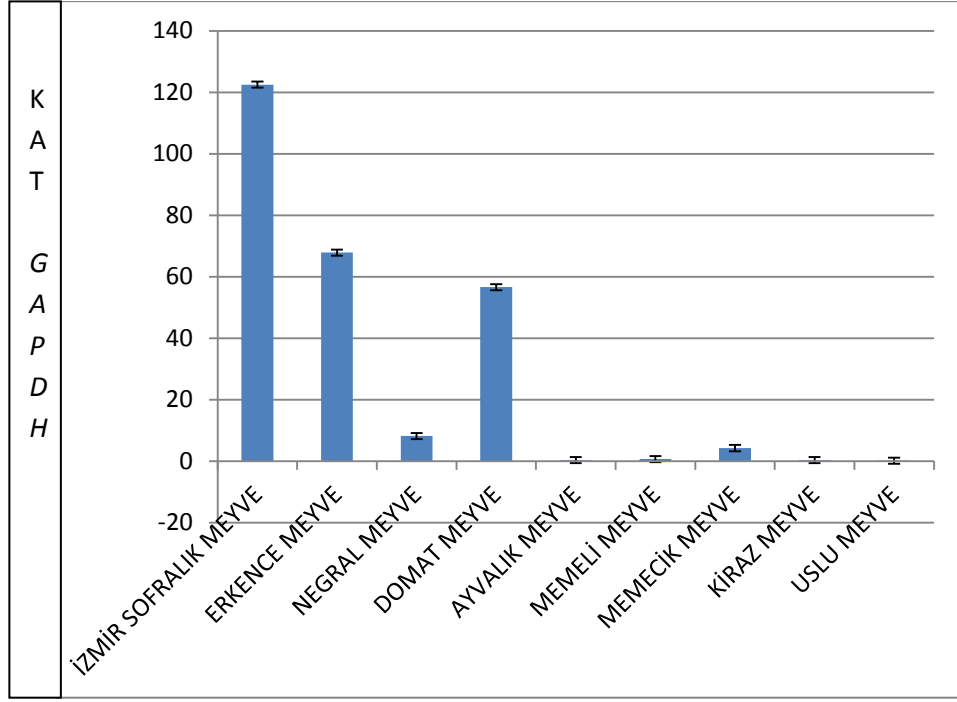


Şekil 3.34: Meyve örneklerinde hasat zamanı olan aylara göre ekspresyon seviyeleri

12 ay boyunca zeytin ağaçlarından toplanan meyve çeşitlerine ait örneklerden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçları analiz edildiğinde oluşan grafik Şekil 3.36’da gösterildi. Meyve çeşitleri arasında yapılan reaksiyonda ekspresyon seviyelerine bakıldığında ise; zeytin triozfosfat izomeraz geninin en fazla “İzmir sofralık” zeytin çeşidinde sentezlendiği görüldü.



Şekil 3.35: Meyve çeşitleri grafiği



Şekil 3.36 Meyve çeşitlerine göre ekspresyon seviyeleri

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tezin ana materyali olan zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geni, “zeytinde var yılı ve yok yılını kontrol eden genlerin tespit edilmesi” amaçlı proje kapsamında yapılan meyve cDNA kütüphanesinden temin edilmiştir. “mk4mk22” olarak isimlendirilen genin biyoinformatik araçlarla analizi sonucunda triozfosfat izomeraz gen ailesine benzediği ve *Petunia hybrida* triozfosfat izomerazı ile en yakın benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin nükleotit kompozisyonuna bakıldığında; 1176 baz çifti uzunluğunda, %42.60 G+C oranına ve %57.40 A+T oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Biyoinformatik analiz için; programlar yardımıyla genin 254 amino asit uzunluğunda bir protein sentezlediği görülmüştür. Kısa bir 5' UTR (19 nükleotit) ve çok uzun (23 nükleotitlik Poli A kuyruğu hariç 367 nükleotit) bir 3'UTR içerdiği saptanmıştır. İzoelektrik noktası, 5.36 ve moleküler ağırlığı 29044.44 Dalton olarak belirlenmiştir. Genin amino asit kompozisyonuna baktığımızda ise sitosolik TIM enzimlerinin homoloğu olmasına rağmen valin ve alanin içeriği sırasıyla %11 ve %12 olmak üzere toplam %48 hidrofobik amino asit içermesinin yanı sıra glutamik asit gibi asidik özellikte, lizin gibi bazik ve glisin ile serin gibi diğer hidrofilik amino asitleri bir arada bulunduran kompleks amino asit içeriği dikkat çekmektedir. En az bulunan amino asitin ise %1.1 ile sistein olduğu görüldü. Buna bağlı olarak bu durum; zeytin tahmini TIM proteininin ya membrana gömülü olduğu ya da globüler protein olduğu şüphesini uyandırdı. Ayrıca bu tahmin, proteinin serin bakımından (hidrofilik bir amino asit) zengin olması hücre zarı veya organel zarlarından ziyade stoplazmik olduğu ihtimalini güçlendirmektedir.

Proteinin hücre içerisindeki yerleşimine bakıldığında; yüksek oranda stoplazmada bulunması, mitokondri transit peptidinin bulunması ve çözünmüş protein olarak görünmesi, zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin stoplazmadan mitokondriye gönderildiğini düşündürmektedir.

Zeytin triozfosfat izomeraz geninin aktif bölgesinde de triozfosfat izomeraz proteinlerinin karakteristik özelliği olan “TIM Barrel” motifinin varlığı ve domainlerinin diğer canlılarla benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Kromozomal genin intron sayısı ve uzunluklarını tespit etmek için gene özgü primerler ile yapılan gDNA ve cDNA PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda zeytin triozfosfat izomeraz geninde intron bulunmadığı tespit edilmiştir.

Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu'nun Gömeç bahçesinden toplanan 9 adet zeytin çeşidinden (Tablo 2.1) yapılan PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninde herhangi bir polimorfik bölgeye raslanmamıştır. Yapılan literatür taramasında da görülmüştür ki; triozfosfat izomeraz hemen hemen tüm canlılarda bulunan, korunmuş bir yapıya sahiptir. Bu durumda NCBI web sayfası yardımıyla yapılan BLASTX analizi sonucuna göre zeytin tahmini triozfosfat izomeraz amino asit dizisinin insaninkine bile çok yüksek benzeşme gösterirken zeytinin kendi çeşitleri arasında hiç polimorfizm göstermemesi tutarlı görülmüştür.

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin promotör bölgesinin tespit edilmesi için yapılan TAIL - PCR sonucunda promotör aday bölge olarak 5' yönüne doğru yaklaşık 350 baz çifti tespit edilmiştir. Bu bölgenin bioinformatik araçlar ile analizinde ise henüz bir promotör yapısı gözlenmemesi bu bölgenin promotörün bir kısmı olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanı sıra promotör aday bölge ile zeytin tahmini triozfosfat izomerazın karşılaştırılması için BLASTn analizi yapıldığında zeytin tahmini triozfosfat izomeraz geninin nükleotit dizisine ait ilk 63 nükleotitlik bölge ile bire bir benzeştiği dikkat çekmektedir.

Zeytin tahmini triozfosfat izomeraz mRNA'sının dokusal ve zamansal (sentez) ekspresyon seviyelerini belirlemek için yapılan analizler; yapraklar, tomurcuklar, çiçekler, sürgünler ve meyve çeşitleri olmak üzere 5 grupta

değerlendirilmiştir. Aylara göre yaprak örneklerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde; Şubat ayındaki “yok yılı”na ait örneklerde en fazla sentezlendiği görülmektedir. Tomurcuk, çiçek, sürgün ve meyve dokularındaki trioşfosfat izomeraz karşılaştırıldığında ise; en fazla meyve örneklerinde sentezlendiği göze çarpmaktadır. Böylece meyveye has bir gen olduğu anlaşıldıktan sonra meyve hasat zamanı olan aylara göre ekspresyon seviyelerine bakıldığında metabolik aktivitenin en yüksek olduğu, meyvenin olgunlaşma dönemi olan Kasım ayında en yüksek oranda sentezlendiği görüldü. Meyve çeşitleri arasındaki ekspresyon seviyelerine bakıldığında; zeytin tahmini trioşfosfat izomeraz geninin ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu meyve çeşidi; “İzmir sofralık” olduğu görülmüştür.

Şimdiye kadar yapılan literatür taramasında; zeytin (*Olea europaea* L.) trioşfosfat izomeraz genine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile zeytin tahmini trioşfosfat izomeraz geninin moleküler biyolojik düzeyde zeytin çeşitlerinde ilk defa analizi yapılmıştır. Böylece bu genle ilgili literatüre katkı sağlanmıştır. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde zeytin tahmini trioşfosfat izomeraz geninin moleküler karakterizasyonu; zeytin moleküler genetik araştırmalarına ve dolayısıyla zeytin genlerinin aydınlatılması çalışmalarına az da olsa bir katkı sağlamıştır.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] Vergara, P. D., "Dünya Zeytin Ansiklopedisi", Madrid: İspanya, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, (1997).
- [2] Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milloni, D. and Haralampidis, K., "Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 574-586, (2002).
- [3] Rozovsky, S. and Ann, E., "Substrate product equilibrium on a reversible enzyme, triosephosphate isomerase", *PNAS*, 104, 2080–2085, (2007).
- [4] Yong X., Larry W., McCollum J. C., Hardin S. H. and Hall T. C., "Nuclear gene encoding cytosolic triosephosphate isomerase from rice (*Oryza sativa* 1)", *Plant Physiol.*, 102, 697, (1993).
- [5] Kurzok, H. G. and Feirabend, J., "Genetic control of triosephosphate isomerase isoenzymes in wheat and rye", *Theor. Appl. Genet.*, 72, 359-363, (1986).
- [6] Wade, R. C., Malcolm, E. D., Brock A. L., Jeffrey D. M. and McCammon J. A., "Gating of the active site of triosephosphate isomerase: Brownian dynamics simulations of flexible peptide loops in the enzyme", *Biophys. J.*, 64(1), 9–15, (1993).
- [7] Knowles, J. R. and Albery, W. J., "Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase", *Acc. Chem. Res.*, 10, 105–111, (1977).

- [8] Rozovsky, S., Jog, G., Tong, L. and McDermott A. E., “Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics”, *J. Mol. Biol.*, 310, 271-280, (2001).
- [9] Daar, I. O., Artymiuk, P. J., Phillips, D. C. and Maquat, L. E., “Human triosephosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 7903–7907, (1986).
- [10] Lolis, E., Petsko, G. A., “Transition-state analogues in protein crystallography: probes of the structural source of enzyme catalysis”, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 597–630, (1990).
- [11] LucôÁa, J., Norberto V. P., Luz, N. and Abraham, L., “Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*”, *Int. J. for Par.*, 30, 1007-1012, (2000).
- [12] Sulaiman, I. M., Ronald, F., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., Das, P., Lal, A. A., and Xiao, L. “Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*”, *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 1444–1452, (2003).
- [13] Pichersky, E. and Gottlieb, L., “Plant triosephosphate isomerase isoenzymes purification immunological and structural characterization and partial amino acid sequence”, *Plant physiol.*, 74, 340-347, (1984).
- [14] Xu, Y. and Hall, T. C., “Cytosolic triosephosphate isomerase is a single gene in rice”, *Plant Physiol.*, 101, 683-687, (1993).
- [15] Marchionni, M. and Gilbert, W., “The triosephosphate isomerase gene from maize: introns antedate the plant-animal divergence”, *Cell*, 46, 133-141, (1986).

- [16] Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G. and Venkatesan, R., “Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 67, 3961–3982, (2010).
- [17] Harris, T. K., “The mechanistic ventures of triosephosphate isomerase”, *UBMB Life*, 60, 195–198, (2008).
- [18] Cui, Q. and Karplus, M., “Catalysis and specificity in enzymes: a study of triosephosphate isomerase and comparison with methyl glyoxal synthase”, *Adv. Protein Chem.*, 66, 315–372, (2003).
- [19] Richard, J. P., “Acid–base catalysis of the elimination and isomerization reactions of triose phosphates”, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 4926–4936, (1984).
- [20] Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. and Waley, S. G. “Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data”, *Nature*, 255, 609–614, (1975).
- [21] Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E. A., Liu, K. D., Knowles, J. R., Petsko, G. A. and Ringe D., “Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution”, *Biochemistry*, 33, 2830–2837, (1994).
- [22] Rose, I. A. and O’Connell, E. L., “Inactivation and labeling of triose phosphate isomerase and enolase by glycidol phosphate”, *J. Biol. Chem.*, 244, 6548–6550, (1969).
- [23] De la Mare, S., Coulson, A. F., Knowles, J. R., Priddle and J. D., Offord, R. E., “Active-site labelling of triose phosphate isomerase. The reaction of bromohydroxyacetone phosphate with a unique glutamic acid residue and the migration of the label to tyrosine”, *Biochem. J.*, 129, 321–331, (1972).

- [24] Hartman, F. C., “Haloacetyl phosphates. Characterization of the active site of rabbit muscle triose phosphate isomerase”, *Biochemistry*, 10, 146–154, (1971).
- [25] Schray, K. J., O’Connell, E. L. and Rose, I. A., “Inactivation of muscle triose phosphate isomerase by D- and L-glycidol phosphate”, *J. Biol. Chem.*, 248, 2214–2218, (1973).
- [26] Hall, A. and Knowles, J. R. “The uncatalyzed rates of enolization of dihydroxyacetone phosphate and of glyceraldehyde 3-phosphate in neutral aqueous solution. The quantitative assessment of the effectiveness of an enzyme catalyst”, *Biochemistry*, 14, 4348–4353, (1975).
- [27] Rose, I. A., Fung, W. J. and Warms, J. V., “Proton diffusion in the active site of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 29, 4312–4317, (1990).
- [28] Jogl, G., Rozovsky, S., McDermott, A. E. and Tong, L., “Optimal alignment for enzymatic proton transfer: structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-Å resolution”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 50–55, (2003).
- [29] Alahuhta, M. and Wierenga, R. K., “Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism”, *Proteins*, 78, 1878–1888, (2010).
- [30] Nagano, N., Orengo, C. A. and Thornton, J. M., “One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions”, *J. Mol. Biol.*, 321, 741–765, (2002).
- [31] Wierenga, R. K., “The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes”, *FEBS Lett.*, 492, 193–198, (2001).

- [32] Pujadas, G. and Palau, J., “Evolution of alpha-amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha)<sub>8</sub> scaffold”, *Mol. Biol. Evol.*, 18, 38–54, (2001).
- [33] Go, M. K., Koudelka, A., Amyes, T. L. and Richard, J. P., “The role of Lys-12 in catalysis by triosephosphate isomerase: a two-part substrate approach”, *Biochemistry*, 49, 5377–5389, (2010).
- [34] Desamero, R., Rozovsky, S., Zhadin, N., McDermott, A. and Callender, R. “Active site loop motion in triosephosphate isomerase: T-jump relaxation spectroscopy of thermal activation”, *Biochemistry*, 42, 2941–2951, (2003).
- [35] Webb, M. R. and Knowles, J. R., “The orientation and accessibility of substrates on the active site of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 14, 4692–4698, (1975).
- [36] Lolis, E. and Petsko, G. A., “Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis”, *Biochemistry*, 29, 6619–6625, (1990).
- [37] Collins, K. D., “An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolohydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis”, *J. Biol. Chem.*, 249, 136–142, (1974).
- [38] Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. and Ringe, D., “Structure of the triosephosphate isomerase phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway”, *Biochemistry*, 30, 5821–5826, (1991).
- [39] Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R. and Wierenga, R. K., “Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. A comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes”, *Eur. J. Biochem.*, 168, 69–74, (1987).

- [40] Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. and Wierenga, R., “Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies”, *Protein Sci.*, 5, 229–239, (1996).
- [41] Fonvielle, M. and Mariano, S., Therisod, M., “New inhibitors of rabbit muscle triose-phosphate isomerase”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2906–2909, (2005).
- [42] Campbell, I. D., Jones, R. B., Kiener, P. A. and Waley, S. G., “Enzyme-substrate and enzyme-inhibitor complexes of triose phosphate isomerase studied by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance”, *Biochem. J.*, 179, 607–621, (1979).
- [43] Tang, G. L., Wang, Y. F., Bao, J. S. and Chen, H. B., “Overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the chloroplast triosephosphate isomerase from spinach”, *Protein Expression and Purification*, 16, 432–439, (1999).
- [44] Helfert, S., Estevez, A. M., Bakker, B., Michels, P. and Clayton, C., “Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*”, *Biochem. J.*, 357, 117–125, (2001).
- [45] Michels, P. A., “Evolutionary aspects of trypanosomes: analysis of genes.”, *J. Mol. Evol.*, 24, 45–52, (1986).
- [46] Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. and Komives, E. A., “Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12”, *Biochemistry*, 33, 2809-2814, (1994).
- [47] Richard, J. P., “Restoring a metabolic pathway”, *ACS Chem. Biol.*, 3, 605–607, (2008).

- [48] Henn-Sax, M., Hocker, B., Wilmanns, M. and Sterner, R., “Divergent evolution of (betaalpha) 8-barrel enzymes”, *Biol. Chem.*, 382, 1315–1320, (2001).
- [49] Livesay, D. R. and La, D., “The evolutionary origins and catalytic importance of conserved electrostatic networks within TIM barrel proteins”, *Protein Sci.*, 14, 1158–1170, (2005).
- [50] Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J. and Martial, J. A., “The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures”, *Proteins*, 37, 441–453, (1999).
- [51] Schneider, A. S., “Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects”, *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13, 119–140, (2000).
- [52] Sampson, N. S. and Knowles, J. R., “Segmental motion in catalysis: investigation of a hydrogen bond critical for loop closure in the reaction of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 31, 8488–8494, (1992).
- [53] Derreumaux, P. and Schlick, T., “The loop opening/closing motion of the enzyme triosephosphate isomerase”, *Biophys. J.*, 74, 72–81, (1998).
- [54] Kursula, I., Salin, M., Sun, J., Norledge, B. V., Haapalainen, A. M., Sampson, N. S. and Wierenga, R. K., “Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase”, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17, 375–382, (2004).
- [55] Wang, Y., Berlow, R. B. and Loria, J. P., “Role of loop-loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 48, 4548–4556, (2009).

- [56] Joseph, D., Petsko, G. A. and Karplus, M., “Anatomy of a conformational change: hinged ‘lid’ motion of the triosephosphate isomerase loop”, *Science*, 249, 1425–1428, (1990).
- [57] Noble, M. E., Zeelen, J. P. and Wierenga, R. K., “Structures of the ‘open’ and ‘closed’ state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism”, *Proteins*, 16, 311–326, (1993).
- [58] Thakur, S. S., Deepalakshmi, P. D., Gayathri, P., Banerjee, M., Murthy, M. R. and Balaram, P., “Detection of the protein dimers, multiple monomeric states and hydrated forms of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in the gas phase”, *Protein Eng. Des. Sel.*, 22, 289–304, (2009).
- [59] Yuksel, K. U., Sun, A. Q., Gracy, R. W. and Schnackerz, K. D., “The hinged lid of yeast triose-phosphate isomerase. Determination of the energy barrier between the two conformations”, *J. Biol. Chem.*, 269, 5005–5008, (1994).
- [60] Pompliano, D. L., Peyman, A. and Knowles, J. R., “Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 29, 3186–3194, (1990).
- [61] Orosz, F., Olah, J., and Ovadi, J., “Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1792, 1168–1174, (2009).
- [62] Xu, Y., Lorieau, J. and McDermott, A. E., “Triosephosphate isomerase: 15N and 13C chemical shift assignments and conformational change upon ligand binding by magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy”, *J. Mol. Biol.* 397, 233–248, (2010).
- [63] Zhang, Z., Komives, E. A., Sugio, S., Blacklow, S. C., Narayana, N., Xuong, N. H., Stock, A. M., Petsko, G. A. and Ringe, D., “The role water in the



- catalytic efficiency of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 38, 4389–4397, (1999).
- [64] Gayathri, P., Banerjee, M., Vijayalakshmi, A., Balaram, H., Balaram, P. and Murthy, M. R., “Biochemical and structural characterization of residue 96 mutants of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: active-site loop conformation, hydration and identification of a dimer-interface ligand-binding site”, *Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr*, 65, 847–857, (2009).
- [65] Kursula, I. and Wierenga, R. K., “Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution”, *J. Biol. Chem.*, 278, 9544–9551, (2003).
- [66] Donnini, S., Groenhof, G., Wierenga, R. K. and Juffer, A. H., “The planar conformation of a strained proline ring: a QM/MM study”, *Proteins*, 64, 700–710, (2006).
- [67] Allen, S. C. and Muirhead, H., “Refined three-dimensional structure of cat-muscle (M1) pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å”, *Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr*, 52, 499–504, (1996).
- [68] Verlinde, C. L., Witmans, C. J., Pijning, T., Kalk, K. H., Hol, W. G., Callens, M., Opperdoes, F. R., “Structure of the complex between trypanosomal triosephosphate isomerase and N-hydroxy-4-phosphono-butanamide: binding at the active site despite an “open” flexible loop conformation”, *Protein Sci.*, 1, 1578–1584, (1992).
- [69] Belasco, J. G., Herlihy, J. M. and Knowles, J. R., “Critical ionization states in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 17, 2971–2978, (1978).
- [70] Singh, S. K., Maithal, K., Balaram, H. and Balaram, P., “Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum*

- triosephosphate isomerase by interface peptides”, *FEBS Lett.*, 501, 19–23, (2001).
- [71] Tellez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernandez-Santoyo, A., Perez-Montfort, R., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., Lo’pez- Calahorra, F., Tuena De Go’mez-Puyou and M., Go’mez-Puyou, A., “Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface”, *J. Mol. Biol.*, 341, 1355–1365, (2004).
- [72] Olivares-Illana, V., Rodriguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., Garcia, J., Perez Montfort, R., Cabrera N, Lo’pez-Calahorra, F., de Go’mez-Puyou, M. T. and Go’mez-Puyou, A. “Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*”, *PLoS Negl. Trop. Dis*, 1, (2007).
- [73] Borchert, T. V., Abagyan, R., Kishan, K. V., Zeelen, J. P. and Wierenga, R. K., “The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop”, *Structure*, 1, 205–213, (1993).
- [74] Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R. and Wierenga, R. K., “Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 1515–1518, (1994).
- [75] Borchert, T. V., Kishan, K. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R. and Wierenga, R. K., “Three new crystal structures of point mutation variants of monoTIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8”, *Structure*, 3, 669–679, (1995).
- [76] Norledge, B. V., Lambeir, A. M., Abagyan, R. A., Rottmann, A., Fernandez, A. M., Filimonov, V. V., Peter, M. G. and Wierenga, R. K., “Modeling, mutagenesis, and structural studies on the fully conserved phosphate-binding loop (loop 8) of triosephosphate isomerase: toward a new substrate specificity”, *Proteins*, 42, 383–389, (2001).

- [77] Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V. and Wierenga, R. K., “The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase”, *Eur. J. Biochem.*, 267, 2516–2524, (2000).
- [78] Saab-Rincon, G., Juarez, V. R., Osuna, J., Sanchez, F., Soberon, X., “Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution”, *Protein Eng.*, 14, 149–155, (2001).
- [79] Alahuhta, M., Salin, M., Casteleijn, M. G., Kemmer, C., El-Sayed, I., Augustyns, K., Neubauer, P. and Wierenga, R. K., “Structure-based protein engineering efforts with a monomeric TIM variant: the importance of a single point mutation for generating an active site with suitable binding properties”, *Protein Eng. Des. Sel.*, 21, 257–266, (2008).
- [80] Albery, W. J. and Knowles, J. R., “Free-energy profile of the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 15, 5627–5631, (1976).
- [81] Casteleijn, M. G., Alahuhta, M., Groebel, K., El-Sayed, I., Augustyns, K., Lambeir, A. M., Neubauer, P. and Wierenga, R. K., “Functional role of the conserved active site proline of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 45, 15483–15494, (2006).
- [82] Amyes, T. L., O’Donoghue, A. C. and Richard, J. P., “Contribution of phosphate intrinsic binding energy to the enzymatic rate acceleration for triosephosphate isomerase”, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 11325–11326, (2001).
- [83] Amyes, T. L. and Richard, J. P., “Enzymatic catalysis of proton transfer at carbon: activation of triosephosphate isomerase by phosphite dianion”, *Biochemistry*, 46, 5841–5854, (2007).

- [84] Go, M. K., Amyes, T. L. and Richard, J. P., “Hydron transfer catalyzed by triosephosphate isomerase. Products of the direct and phosphite-activated isomerization of [C]-glycolaldehyde in D<sub>2</sub>O”, *Biochemistry*, 48, 5769–5778, (2009).
- [85] Harris, T. K., Abeygunawardana, C. and Mildvan, A. S., “NMR studies of the role of hydrogen bonding in the mechanism of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 36, 14661-14675, (1997).
- [86] Bash, P. A., Field, M. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., Ringe, D. and Karplus, M., “Computer simulation and analysis of the reaction pathway of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 30, 5826–5832, (1991).
- [87] Nickbarg, E. B., Davenport, R. C., Petsko, G. A. and Knowles, J. R., “Triosephosphate isomerase: removal of a putatively electrophilic histidine residue results in a subtle change in catalytic mechanism”, *Biochemistry*, 27, 5948–5960, (1988).
- [88] Harris, T. K., Cole, R. N., Comer, F. I. and Mildvan, A. S., “Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase”, *Biochemistry*, 37, 16828–16838, (1998).
- [89] Lodi, P. J. and Knowles, J. R., “Neutral imidazole is the electrophile in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase: structural origins and catalytic implications”, *Biochemistry*, 30, 6948–6956, (1991).
- [90] Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A. M., Antonov, D. M., Augustyns, K. and Wierenga RK, “Structural determinants for ligand binding and catalysis of triosephosphate isomerase”, *Eur. J. Biochem.*, 268, 5189–5196, (2001).
- [91] O’Donoghue, A. C., Amyes, T. L. and Richard, J. P., “Hydron transfer catalyzed by triosephosphate isomerase. Products of isomerization of dihydroxyacetone phosphate in D<sub>2</sub>O”, *Biochemistry*, 44, 2622–2631, (2005).

- [92] Herlihy, J. M., Maister, S. G., Albery, W. J. and Knowles, J.R., “Energetics of triosephosphate isomerase: the fate of the 1(R)-3H label of tritiated dihydroxyacetone phosphate in the isomerase reaction”, *Biochemistry*, 15, 5601–5607, (1976).
- [93] Aparicio, R., Ferreira, S. T. and Polikarpov, I., “Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity”, *J. Mol. Biol.*, 334, 1023–1041, (2003).
- [94] Belasco, J. G. and Knowles, J. R., “Direct observation of substrate distortion by triosephosphate isomerase using Fourier transform infrared spectroscopy”, *Biochemistry*, 19, 472–477, (1980).
- [95] Parthasarathy, S., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P. and Murthy, M. R., “Structure of the *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase-phosphoglycolate complex in two crystal forms: characterization of catalytic loop open and closed conformations in the ligand-bound state”, *Biochemistry*, 41, 13178–13188, (2002).
- [96] Cui, Q. and Karplus, M., “Triosephosphate isomerase: a theoretical comparison of alternative pathways”, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 2284–2290, (2001).
- [97] Pereira, L. A., Pereira, M., Felipe, M. S. S., Rosely, Z. M. and Soares A. C. M., “Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*”, *Mic. and Infect.*, 6, 892–900, (2004).
- [98] Williams, J. C. and McDermott, A. E., “Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated”, *Biochemistry*, 34, 8309–8319, (1995).
- [99] Berlow, R. B., Igumenova, T. I. and Loria, J. P., “Value of a hydrogen bond in triosephosphate isomerase loop motion”, *Biochemistry*, 46, 6001–6010, (2007).

- [100] Guix, F. X., Raga, G., Bravo, R., Nakaya, T., de Fabritiis, G., Coma, M., Miscione, G. P., Villa`-Freixa, J., Suzuki, T., Ferna`ndez-Busquets, X., Valverde, M. A., de Strooper, B. and Mun˜oz, F. J., “Amyloiddependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation”, *Brain*, 132, 1335–1345, (2009).
- [101] Orosz, F., Olah, J. and Ovadi, J., “Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts”, *IUBMB Life*, 58, 703–715, (2006).
- [102] Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. and Knowles, J. R., “Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by <sup>31</sup>P NMR”, *Biochemistry*, 27, 1158–1167, (1988).
- [103] Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. and Wierenga, R. K., “Structural and mutagenesis studies of *leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power”, *Protein Eng.*, 12, 243–250, (1999).
- [104] Rodriguez-Almazan, C., Arreola, R., Rodriguez-Larrea, D., Aguirre-Lopez, B., de Gomez-Puyou, M. T., Perez-Montfort, R., Costas, M., Gomez-Puyou, A. and Torres-Larios, A., “Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface”, *J. Biol. Chem.*, 283, 23254–23263, (2008).
- [105] Schneider, A., Westwood, B., Yim, C., Cohen-Solal, M., Rosa, R., Labotka, R., Eber, S., Wolf, R., Lammi, A. and Beutler, E., “The 1591C mutation in triosephosphate isomerase (TPI) deficiency. Tightly linked polymorphisms and a common haplotype in all known families”, *Blood Cells Mol.*, 22, 115–125, (1996).

- [106] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and D. J., L., "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, (1990).
- [107] Hall, T. A., "Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/Nt", *In Nucl. Acids Symp Ser*, 41, 95-98, (1999).
- [108] Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J. and Bryant, S. H., "CDD: A conserved domain database for protein classification", *Nucleic Acids Res.*, 33, 192-196, (2005).
- [109] Small, I., Peeters, N., Legeai, F. and Lurin, C., "Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences", *Proteomics*, 4, 1581-1590, (2004).
- [110] Liu, Y. G. and Whittier, R. F., "Thermal asymmetric interlaced Per: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and Yac clones for chromosome walking", *Genomics*, 25, 674-681, (1995).
- [111] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S., "Sosui: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins", *Bioinformatics*, 14, 378-379, (1998).
- [112] Rozen, S. and Skaletsky, H.J., "Primer3", <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, (05.09.2011), (1998).
- [113] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G., "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence", *J. Mol. Biol*, 300, 1005-1016, (2000).