

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN  
FOSFOTRİESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİN KLONLANMASI,  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Kimyager Melike YILDIRIM**

**AĞUSTOS 2009  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN  
FOSFOTRİESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİN KLONLANMASI,  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Melike YILDIRIM**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"Doktor (Kimya)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 03.07.2009  
Tezin Savunma Tarihi : 04.08.2009**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ**

**Jüri Üyesi : Doç.Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI**

**Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Enstitü Müdürü: Prof.Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2009**

## ÖNSÖZ

TÜBİTAK'ın 106T696 nolu projesi ile desteklenen “Termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Suşundan Fosfotriesteraz Homolog Protein'in Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Akademik hayatımın başlangıcından itibaren, benden sevgisini, hoşgörüsünü ve bilgisini hiçbir şekilde esirgemeyen sayın hocam merhum Prof.Dr. Saadettin GÜNER'i saygı, çok büyük bir özlem ve rahmetle anıyorum. Umarım bu tez ile sevgili hocamın bana olan emeğinin karşılığını azda olsa verebilmiş ve bana olan güvenine layık olabilmişimdir.

Prof.Dr. Saadettin GÜNER'in ardından tez danışmanlığımı üstlenen, gerek akademik hayatımda ve gerekse özel yaşamımda hep yanımda olan, bana olan desteğini, sevgisini, hoşgörüsünü ve sabrını hep hissettiğim sevgili hocam sayın Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarını kullanırken tıpkı kendi laboratuvarımızda çalışıyor gibi hissettik. Bu fırsatı ve rahatlığı bize sunduğundan dolayı ve bizi bilgisinden ve yardımlarından hiçbir zaman mahrum bırakmadığı için hocam sayın Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ'e teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmam esnasında, yardımını ve desteğini hep gördüğüm hocam sayın Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya da çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitime başladığım günden bu yana, her konudaki desteğiyle ve yardımlarıyla hep yanımda olan sevgili hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya çok teşekkür ediyorum. Yine, çalışmalarım esnasındaki yardımlarından dolayı Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doğduğum günden bu yana sevgilerinden, maddi ve manevi desteklerinden beni mahrum bırakmadıkları için sevgili aileme minnettarım. Kocaman ve çok özel bir teşekkürü de sevgili yengem Havva YILDIRIM hak ediyor, iyi ki varsın. Son olarak, sevgili yeğenlerim Elif, Esra Ülkü, Oğuzhan, Ömercan ve Alpertunga sizi çok seviyorum.....

Melike YILDIRIM  
Trabzon 2009

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Esterazlar.....	2
1.2.1 Esterazların Kullanım Alanları.....	3
1.2.2. Isıl Kararlı Esterazların Mikrobiyal Üretimi.....	4
1.3. Fosfotriesterazlar (PTE'ler).....	4
1.3.1. PTE'lerin Yapısı.....	5
1.3.2. PTE'lerin Substrat Spesifitesi.....	8
1.3.3. PTE'lerin Reaksiyon Mekanizması.....	9
1.3.4. PTE'lerin Kullanım Alanları.....	11
1.3.5. Bakteriyal PTE'ler.....	13
1.4. Fosfotriesteraz Homolog Proteinler (PHP'ler).....	14
1.4.1. <i>E. coli</i> PHP'sinin (ePHP) Yapısı.....	15
1.4.2. ePHP ve PTE'nin 3 Boyutlu Yapılarının Çakıştırılması.....	17
1.5. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri.....	19
1.6. Hipertermofillerden Elde Edilen Genlerin Mezofillerde Klonlanması ve Ekspresyonu.....	21
1.7. <i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	22
1.8. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Kullanılan Materyaller.....	24

2.1.1.	Cihazlar.....	24
2.1.2.	Enzimler.....	25
2.1.3.	Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	25
2.1.4.	Primerler.....	26
2.1.5.	Kullanılan Suşlar.....	26
2.1.6.	Plazmitler.....	26
2.1.7.	Sıvı ve Katı Besiyerleri.....	32
2.1.8.	Çözeltiler ve Tamponlar.....	32
2.1.8.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	32
2.1.8.2.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	32
2.1.8.3.	Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	33
2.1.8.4.	Tampon Çözeltiler.....	34
2.1.8.5.	Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler.....	35
2.1.8.6.	Diğer Çözeltiler.....	36
2.2.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	37
2.2.1.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 Suşunun Büyütülmesi.....	39
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu.....	39
2.2.3.	Plazmit DNA İzolasyonu.....	40
2.2.4.	DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	41
2.2.5.	Genomik DNA ve pUC18 Plazmit DNA'sının <i>EcoR</i> I ile Kesimi.....	41
2.2.6.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	42
2.2.7.	DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi.....	42
2.2.8.	gDNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu.....	43
2.2.9.	Kompotent Hücre Hazırlanması.....	43
2.2.10.	Transformasyon.....	44
2.2.11.	Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi..	44
2.2.12.	DNA Sıralarının İncelenmesi.....	45
2.3.	Fosfotriesteraz Homolog Protein (PHP) Geninin Eksik Kalan Baş Kısmının İvers PCR ile Bulunması.....	45
2.3.1.	İvers PCR İçin Primer Tasarlanması.....	45
2.3.2.	Genomik DNA'nın <i>Hinf</i> I ile Kesimi.....	45
2.3.3.	DNA Parçalarının Ligasyonu.....	46

2.3.4.	İnvers PCR.....	46
2.3.5.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	47
2.3.6.	PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu.....	48
2.3.7.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon, Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi.....	48
2.4.	PHP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu.....	49
2.4.1.	PHP Geninin Tamamını Çoğaltmak İçin Primer Tasarlanması.....	49
2.4.2.	PHP Geninin Tamamının PCR ile Çoğaltılması.....	49
2.4.3.	PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün <i>Bam</i> H I ve <i>Nde</i> I ile Kesilmesi.....	50
2.4.4.	Kesik PCR Ürününün Kesik pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu.....	51
2.4.5.	Rekombinant pET-28a(+) Vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu.....	51
2.4.6.	PHP'nin <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspresyonu.....	51
2.5.	Filogenetik Analiz.....	52
2.6.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen PHP'nin Saflaştırılması.....	52
2.7.	PHP'nin Karakterizasyonu.....	54
2.7.1.	Protein Tayini.....	54
2.7.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	55
2.7.3.	Doğal PAGE.....	56
2.7.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	57
2.7.4.1.	Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini.....	57
2.7.4.1.1.	Paraokson ile Aktivite Tayini.....	57
2.7.4.1.2.	Paratiyon ile Aktivite Tayini.....	57
2.7.4.1.3.	Malatyon ile Aktivite Tayini.....	57
2.7.4.2.	Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini.....	58
2.7.4.2.1.	Bazı <i>p</i> -Nitrofenil Esterleri ile Aktivite Tayini.....	58
2.7.4.2.2.	$\alpha$ -Naftil Asetat ve $\beta$ -Naftil Asetat ile Aktivite Tayini.....	58
2.7.5.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	58
2.7.6.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	59
2.7.7.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	59
2.7.8.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	59

2.7.9.	PHP'nin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	60
2.7.10.	PHP'nin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	60
2.7.11.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	60
2.7.12.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi	61
3.	BULGULAR.....	62
3.1.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	62
3.2.	Fosfotriesteraz Homolog Protein (PHP) Geninin Eksik Kalan Baş Kısmının İnvers PCR ile Bulunması.....	62
3.3.	PHP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	64
3.4.	PHP'nin Karakterizasyonu.....	69
3.4.1.	Protein Tayini.....	70
3.4.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	70
3.4.3.	Doğal PAGE.....	71
3.4.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	72
3.4.4.1.	Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini.....	72
3.4.4.2.	Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini.....	72
3.4.5.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	73
3.4.6.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	74
3.4.7.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.	75
3.4.8.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	76
3.4.9.	PHP'nin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	78
3.4.10.	PHP'nin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	78
3.4.11.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	80
3.4.12.	PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi	81
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	83
5.	ÖNERİLER.....	89
6.	KAYNAKLAR.....	91

## ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

TÜBİTAK, 106T696 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, yeni bir termofilik suş olan *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4'den bir genomik DNA kütüphanesi oluşturuldu. Bu kütüphaneden elde edilen veriler ve bu verilere dayanılarak yapılan invers PCR sonucunda, 921 bazdan oluşan *G. caldoxylosilyticus* TK4 fosfotriesteraz homolog protein (PHP) geninin tamamının DNA sırası belirlendi. Elde edilen bu sıra GenBank veri tabanında FJ788931 numarası ile depolandı. Protein sırasının, BLAST programında incelenmesi sonucunda, bu proteinin fosfotriesterazlar (PTE'ler) ve putatif PTE'lere değişik oranlarda benzediği görüldü. PHP geni, pET-28a(+) vektörüne klonlandıktan sonra, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS'de ekspres edildi. N ucunda 6 tane histidin içeren PHP, nikel afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Ekpres edilen rekombinant polipeptidin molekül ağırlığının, SDS-PAGE ile yaklaşık 36,5 kDa olduğu belirlendi. Aktivite tayini çalışmalarında, paraokson ve paratyon varlığında herhangi bir aktivite elde edilemezken, denenen diğer substratlar içinde en yüksek aktivite, *p*NPA ve *p*NPB varlığında gözlemlendi. *p*NPA varlığında enzimin optimum pH ve sıcaklığı, sırasıyla 8,0 ve 50 °C olarak bulunurken,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri ise sırası ile 0,17 mM ve 1667 U/mg protein olarak hesaplandı. Rekombinant PHP'nin, 50 °C'de, pH 3,0-9,0 aralığındaki tamponlarda ayrı ayrı 7 gün inkübe edilmesiyle, aktivitesini büyük oranda koruduğu gözlemlendi. Enzim, 90 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda aktivitesini %60 oranında korudu. Reaksiyon karışımlarına %10 nihai konsantrasyonda etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO ilave edildiğinde aktivitede azda olsa bir artış meydana geldiği görüldü. Bu sonuçlar, oldukça pH ve ısıl kararlı bir esteraz aktivitesine sahip ilk PHP olan bu enzimin, endüstriyel uygulamalar için çok önemli bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fosfotriesteraz, Fosfotriesteraz Homolog Protein, *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Klonlama, Saflaştırma, Karakterizasyon



## SUMMARY

### **Cloning, Expression and Characterization of Phosphotriesterase Homology Protein from a Thermophilic Bacterium, *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4**

In this study, supported by TUBITAK (Project number is 106T696), a genomic DNA library was constructed from the thermophilic *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 strain. The whole DNA sequence, available in the GenBank database under the accession number FJ788931, of the *G. caldoxylosilyticus* TK4 phosphotriesterase homology protein (PHP) gene consisting of 921 bp was determined by performing inverse PCR. Sequence alignments done with BLAST programme indicated that the amino acid sequence of the *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP was similar to phosphotriesterases (PTEs) and putative PTEs in different ratios. The gene was cloned into pET-28a(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. The recombinant protein containing 6xHis tag at the N- terminus was purified by using nickel affinity chromatography. The molecular weight of the recombinant polypeptide was found to be 36.5 kDa with SDS-PAGE. Whereas the enzyme did not have any activity in the presence of paraoxon and parathion, the highest activities were observed with *p*NPA and *p*NPB. The optimum pH and temperature of the enzyme were determined as 8.0 and 50 °C, respectively, in the presence of *p*NPA.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated as 0.17 mM and 1667 U/mg protein, respectively. When the enzyme was separately incubated at 50 °C in the buffer solutions (pHs ranging from 3.0-9.0) for 7 days, the activity was mainly retained. The enzyme retained about 60% of its original activity after 7 days of incubation at 90 °C. In the presence of 10% ethanol, isopropanol, acetonitrile, acetone, and DMSO, the enzyme activity slightly increased. It is clear from the present results that the enzyme, which is the first PHP showing an extremely pH- and thermo- stable esterase activity, might have a very important potential for industrial applications.

**Key Words:** Phosphotriesterase, Phosphotriesterase Homology Protein, *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Cloning, Purification, Characterization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. TIM silindir katlanması içeren bir fosfotriesterazın kristal yapısı.....	6
Şekil 2. Fosfotriesterazın binükleer metal merkezi.....	7
Şekil 3. Paraokson, paratyon, metil paratyon ve fensulfotiyon'un kimyasal yapıları.....	8
Şekil 4. Sarin, soman ve VX'in kimyasal yapıları.....	9
Şekil 5. Paraokson analoglarının temel yapısı.....	9
Şekil 6. Paraoksonun dietilfosfat ve <i>p</i> -nitrofenole hidroliz reaksiyonu.....	10
Şekil 7. Paraoksonun PTE tarafından hidrolizi için önerilen katalitik mekanizma .....	10
Şekil 8. ePHP'nin yapısının kurdele gösterimi.....	16
Şekil 9. ePHP ve PTE'nin yapılarının üst üste çakıştırılması.....	18
Şekil 10. pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijinini, LacZ genini ve amfisilin direnç genini içeren harita.....	27
Şekil 11. pGEM-T Easy vektörünün haritası.....	28
Şekil 12. pGEM-T Easy vektörünün promotörü ve çoklu klonlama bölgesi.....	29
Şekil 13. pET-28a(+) vektörünün haritası.....	30
Şekil 14. pET-28a(+) vektörünün <i>lac</i> operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini (rbs), His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası.....	31
Şekil 15. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 genomik DNA'sının <i>EcoR</i> I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi.....	38
Şekil 16. PHP geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotid sıraları.....	49
Şekil 17. MagneHis protein saflaştırma sisteminin şematik gösterimi.....	53
Şekil 18. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 genomik DNA'sının PHP genini içeren parçası.....	63
Şekil 19. İnvers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	64
Şekil 20. PHP geninin pET-28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi.....	64
Şekil 21. PCR ile tamamı çoğaltılan PHP geninin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	65
Şekil 22. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 PHP'sinin DNA ve protein sırası.....	66

Şekil 23.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 PHP'sinin amino asit sırasının (TK4PHP), <i>P. diminuta</i> PTE'si (PDPTE), <i>M. tuberculosis</i> PHP'si (MTPHP) ve <i>E. coli</i> PHP'sinin (EPHP) amino asit sıraları ile karşılaştırılması.....	68
Şekil 24.	PTE, PHP ve fosfotriesteraz-benzeri proteinlerin filogenetik analizi....	69
Şekil 25.	SDS-PAGE elektroforezi.....	70
Şekil 26.	Doğal PAGE.....	71
Şekil 27.	PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	74
Şekil 28.	PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	75
Şekil 29.	PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	76
Şekil 30.	<i>p</i> NPA varlığında PHP'nin substrat doygunluk eğrisi.....	77
Şekil 31.	<i>p</i> NPA varlığında PHP'nin Lineweaver-Burk eğrisi.....	77
Şekil 32.	PHP'nin ısı kararlılık eğrisi.....	78
Şekil 33.	PHP'nin 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	79
Şekil 34.	PHP'nin 50 °C'deki pH kararlılık eğrisi.....	80

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Rekombinant DNA teknolojisi ile ticari olarak üretilen bazı proteinler ve enzimler.....	2
Tablo 2. <i>G. caldoxylosilyticus</i> TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri.....	22
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	24
Tablo 4. Kullanılan enzimler.....	25
Tablo 5. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	25
Tablo 6. PCR’da kullanılan primerler.....	26
Tablo 7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>Escherichia coli</i> suşları.....	26
Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler.....	26
Tablo 9. İnvrs PCR reaksiyonunun bileşenleri.....	47
Tablo 10. İnvrs PCR için reaksiyonun şartları.....	47
Tablo 11. PCR reaksiyonunun bileşenleri.....	50
Tablo 12. PCR reaksiyonun şartları.....	50
Tablo 13. SDS-PAGE’in bileşenleri.....	55
Tablo 14. Doğal PAGE’in bileşenleri.....	56
Tablo 15. <i>G. caldoxylosilyticus</i> TK4’den elde edilen PHP’nin amino asit sırasının diğer mikroorganizmalardaki proteinlere benzerliği.....	67
Tablo 16. Genel esteraz substratları ile elde edilen aktivite değerleri.....	73
Tablo 17. PHP’nin esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	81
Tablo 18. PHP’nin esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi.....	81

## SEMBOLLER DİZİNİ

amp	: Amfisilin
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arginin
Asp	: Aspartat
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albümini
DMSO	: Dimetilsülfoksit
dNTP	: Deoksinükleotriposfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FITC	: Floresin izotiyosiyanat
gDNA	: Genomik DNA
Glu	: Glutamat
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
IPTG	: İzopropil- $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozid
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria-Bertani
LBA	: Luria-Bertani agar
Leu	: Lösin
Lys	: Lisin
mA	: Miliamper
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi
Met	: Metiyonin
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
OP	: Organofosfat
OPD	: Organofosfat parçalayan enzim

OPH	: Organofosfat hidrolaz
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	: Fenilalanin
PHP	: Fosfotriesteraz homolog protein
<i>p</i> NPA	: <i>p</i> -nitrofenil asetat
<i>p</i> NPB	: <i>p</i> -nitrofenil butirat
<i>p</i> NPL	: <i>p</i> -nitrofenil laurat
<i>p</i> NPP	: <i>p</i> -nitrofenil palmitat
PTE	: Fosfotriesteraz
rbs	: Ribozom bağlanma bölgesi
rec	: Replikasyon orijini
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamin tetraasetik asit
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TIM	: Triozfosfat izomeraz
T <sub>m</sub>	: Erime sıcaklığı
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirosin
U	: Ünite
$V_{maks}$	: Maksimum hız
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid
$\alpha$ NA	: $\alpha$ -naftil asetat
$\beta$ NA	: $\beta$ -naftil asetat
Å	: Angstrom

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Önemli bir biyomolekül sınıfı olan enzimler, canlı organizmalarda çok önemli görevlere sahip oldukları gibi, gıda, tekstil, kozmetik ve diğer birçok alan için de vazgeçilmez olmuşlardır (Benjamin ve Pandey, 2000). Enzimlerin endüstride kullanımı, geleneksel kimyasal muamelelerle elde edilemeyen daha yüksek ürün kalitesi, daha düşük üretim maliyeti, daha az atık ve az enerji tüketimi gibi faydalarla sonuçlanır. Sıradan kimyasal reaksiyonlar genellikle spesifik değildir, istenmeyen yan ürünler ortaya çıkmaktadır, kontrol edilmesi kolay değildir ve ılımlı olmayan şartlarda gerçekleşmektedir. Bütün bu problemler enzimlerin kullanımı ile ortadan kalkmaktadır (URL-1, 2009).

Düşük ekspresyon seviyeleri, birçok proteinin doğal kaynaklarından izolasyonunu ve çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile bu teknik zorluğun üstesinden gelinmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretiminin temel olarak 3 önemli avantajı vardır;

- 1) Bazı proteinler (sitokinler gibi), doğal ortamlarında çok düşük konsantrasyonlarda üretilirler. Uygun ekspresyon sistemlerinin kullanımı ile bu proteinler fazla miktarda üretilebilirler.
- 2) Bazı proteinler, yılanlar ve mikrobiyal patojenler gibi tehlikeli veya patojenik olan organizmalarda üretilirler. Bu durum, proteinlerin bu organizmalardan elde edilmesini zorlaştırmaktadır ve son ürüne toksik bileşenlerin bulaşma ihtimalini artırmaktadır. Patojen ve toksik olmayan konakçı bir hücrede rekombinant üretim ile bu problemlerin üstesinden gelinmektedir.
- 3) Protein mühendisliği ile, protein amino asit sırasında hedeflenen değişimler yapılabilmektedir. Özellikle enzim mühendisliği ile birlikte katalitik aktivite ve/veya ısı ve pH kararlılığı artırmak için oldukça fazla çaba harcanmaktadır.

Günümüzde, birçok protein ve enzim rekombinant olarak üretilmektedir. Bunların bazıları kullanım alanları ile birlikte Tablo 1'de verilmektedir (Walsh, 2002; URL-2, 2009).

Tablo 1. Rekombinant DNA teknolojisi ile ticari olarak üretilen bazı proteinler ve enzimler

<b>Protein</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Kan proteinleri (faktör VIII ve IX gibi)	Hemofili ve diğer kan hastalıklarının tedavisi
Trombolitik ajanlar (doku plazminojen aktivatör gibi)	Kalp krizi tedavisi
İnterferonlar	Kanser ve viral hastalıkların tedavisinde
Rekombinant Beta interferon (interferon-beta-1b)	MS hastalığının tedavisinde
Rekombinant “subunit” aşılar (hepatit B yüzey antijeni gibi)	Spesifik hastalıklara karşı aşılama
Kolesterol esteraz	Kan kolesterol seviyesinin belirlenmesi
Kimosin	Peynir üretimi
Fitaz	Hayvan yemlerinde fitik asidin parçalaması
$\alpha$ -Amilaz	Nişastanın hidrolizi
Proteazlar	Proteinlerin enzimatik hidrolizi ve özellikle deterjan endüstrisi
Lipazlar	Lipidlerin enzimatik hidrolizi, süt ürünleri endüstrisi ve deterjan endüstrisi
Değiştirilmiş antikolar	Tümörlerin <i>in vivo</i> olarak belirlenmesi ve tedavisi
Doğal veya değiştirilmiş insülin	Diabetis mellitus tedavisi
İnsan büyüme hormonu	Kısa boyluluğun tedavisi

## 1.2. Esterazlar

Esterazlar (EC 3.1.1.1), ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir ve hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bol miktarda bulunurlar (Kawamoto vd., 1987).



### 1.2.1. Esterazların Kullanım Alanları

Ferulik, sinapik, kafeik ve kumarik asitler, gıda, içecek ve parfüm endüstrilerinde çok yaygın olarak kullanılırlar (Chaabouni vd., 1996). Bu asitlerin esterleri, tahıllarda, tarım sanayi bileşenlerinde ve meyve özlerinde bulunur (Asther vd., 2002). *Aspergillus niger*'den elde edilen feruloil ve sinnamoil esterazlar, pektinazlar, selülozlar ve ksilanazlarla birlikte buğday ve pirinç kepeğinden, şeker ve hint kamışından bu tür hidroksil sinnamik asitleri ayırıp serbest bırakabilirler (Panda ve Gowrishankar, 2005). Kolesterol esteraz ve poliüretanazlar, plastikler, poliüretanlar, poliesterler ve polietilen glikol adipat gibi polimer bileşimli insan yapımı kirleticileri parçalamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Jahangir vd., 2003).

Esterazlar bazı hastalıkların tedavisinde oldukça faydalı olan kiral ilaçların sentezinde büyük bir rol oynamaktadırlar (Bornscheuer, 2002). Örneğın, *Trichosporon brassicae*'den elde edilen bir esteraz eklem iltihabı, güneş yanıkları, adet sancıları ve ateşte iltihabı azaltmak ve ağrıyı dindirmek için oldukça etkili olan optikçe aktif (S)- ve/veya (R)-ketoprofen [2-(3-benzoilfenil) propiyonik asit] üretiminde kullanılmaktadır (Shen vd., 2002). *Rhodococcus* sp., *Bacillus circulans* gibi diğerk mikroorganizmalardan elde edilen esterazlarla kiral bileşikler üretilebilmektedir. Bu türlere ilaveten, *Pseudomonas* sp.'den elde edilen esterazlar ticari olarak piyasada mevcut olan ibuprofen [(R, S)-2-(4-izobutilfenil) propiyonik asit] gibi antiienflamatuar ilaçların üretiminde kullanılmaktadır (Kim vd., 2002a,b). Benzer şekilde, *Bacillus coagulans* esterazı, bir biyoaktif molekül olan rasemik ester 1,2-O-izopropiliden gliserolün enantiyoseçimli hidrolizini katalizlemektedir (Molinavi vd., 1996). İnsan serum esterazı ise etoposidin hidrolizinde ve toksisitesinin azaltılmasında kullanılmaktadır. Etoposid türevleri oldukça etkili antikanser ilaçlarıdır (Wrasidlo vd., 2002).

Esterazlar, kâğıt ve kâğıt hamuru, tekstil, deri ve fırıncılık gibi diğerk endüstrilerde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Ophiostoma piceae* sterol esterazı, trigliseritleri ve sterol esterlerini etkili bir şekilde hidroliz ettiğiki için kâğıt endüstrisinde kullanılmaktadır. *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium viscosum* ve *Candida rugosa*'dan elde edilen esterazlar, kağıt hamuru üretimi esnasında açığa çıkan ziftlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadırlar (Kontkanen vd., 2004).

### 1.2.2. Isıl Kararlı Esterazların Mikrobiyal Üretimi

Oldukça potansiyel olmasına rağmen, esterazlarla biyokataliz, büyük ölçekli endüstriyel işlemler için çok uygun değildir. Buradaki sınırlayıcı etken, biyolojik katalizörün endüstriyel olarak uygun olan sert reaksiyon şartlarında (yüksek sıcaklık, organik çözücüler, kuvvetli bazik veya asidik ortamlar gibi) kararsız olmasıdır. Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler bu şartlara daha dirençlidir ve bu nedenle endüstriyel biyokatalitik işlemlerin geliştirilmesi için alternatifler sunmaktadırlar (Niehaus vd., 1999). Ayrıca, biyoteknolojideki artan potansiyel uygulamalara ilaveten, bu organizmalardan elde edilen enzimler, olağanüstü termodinamik kararlılıklar için yapısal gereksinimleri incelemek amacıyla da büyük bir ilgi kaynağıdır (Zeikus vd., 1998; Pantazaki vd., 2002). Bu artan ilgiye rağmen, arke ve bakterilerden sadece az sayıda esteraz karakterize edilmiştir (Rhee vd., 2005). Termoasidofilik *Picrophilus torridus* ve hipertermofilik arkeler *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus* ve *Pyrobaculum calidifontis*'in ısı kararlı esterazlar ürettikleri belirlenmiştir (Ikeda ve Clark, 1998; Manco vd., 2000; Hotta vd., 2002; Hess vd., 2008). Hipertermofilik bakterilerden ise *Thermoanaerobacterium* türlerinden iki asetil ksilan esteraz (Shao ve Wiegel, 1995), *Thermoanaerobacter tengcongensis*'den bir esteraz (Zhang vd., 2003) ve *Thermotoga maritima*'dan bir karboksil esteraz (Kakugawa vd., 2007) olmak üzere sadece birkaç esterazın varlığı belirlenmiştir. Ayrıca yine *T. maritima*'dan hipotetik protein olarak açıklanmış olmasına rağmen tipik esteraz motifleri içeren ester hidrolizleyen enzimlerin (Levisson vd., 2007), *Geobacillus stearothermophilus*'dan ise ısı kararlı karboksilesterazların varlığı bildirilmiştir (Ewis vd., 2004). Yine Mısır'da çöl toprağından izole edilen *Geobacillus thermoleovorans* YN bakterisinden ısı kararlı bir esteraz kodlayan gen, klonlanarak *Escherichia coli*'de ekspres edilmiş ve saflaştırılan enzim karakterize edilmiştir (Soliman vd., 2007).

### 1.3. Fosfotriesterazlar (PTE'ler)

Sinir sisteminin bir enzimi olan asetilkolinesterazı dönüşümsüz olarak inhibe ettiklerinden dolayı bütün omurgalılar için toksik bileşikler olan OP'lerin çevreden uzaklaştırılması son yıllarda oldukça fazla ilgi çekmiştir. OP'ler II. Dünya Savaşı'ndan beri dünya genelinde sarin, soman ve VX gibi kimyasal savaş ajanlarının geliştirilmesinde

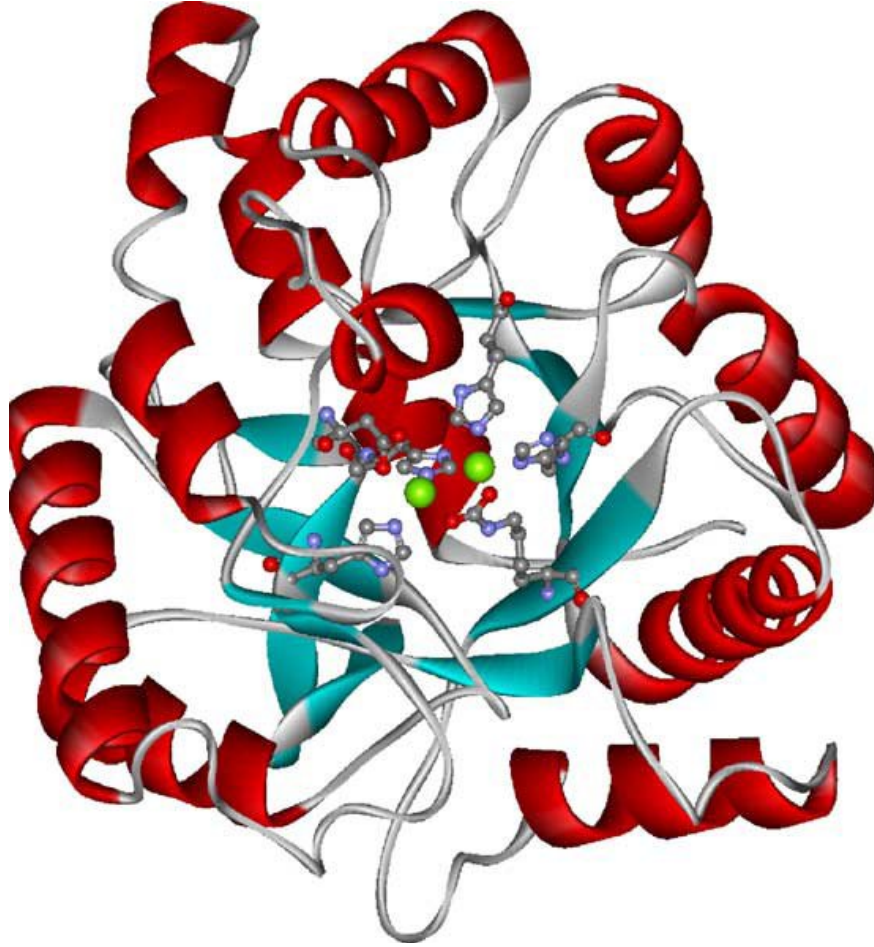
ve tarımda böcek öldürücülerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Raushel, 2002). OP'lerdeki fosfoester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimler, fosfotriesterazlar (PTE, EC 3.1.8.1), organofosfat hidrolazlar (OPH), organofosfat parçalayan enzimler (OPD), paratyon hidrolazlar veya paraoksonazlar (SsoPox) olarak adlandırılırlar (Hou vd., 1996; Merone vd., 2005).

### 1.3.1. PTE'lerin Yapısı

PTE, amidohidrolaz üst ailesinin üyelerinden bir tanesidir. Ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi PTE'de aktif bölgenin  $\beta$  silindirin C ucunda yerleşmiş olduğu bir TIM silindir ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> katlanması içerir (Şekil 1). Amidohidrolaz üst ailesinin diğer üyeleri arasında üreaz, adenozin deaminaz ve atrazin klorohidrolaz gibi enzimler bulunmaktadır (Holm ve Sander, 1997). Bu ailenin neredeyse bütün üyeleri bir veya iki tane divalent katyon içermektedir (Aubert vd., 2004). PTE doğal halinde, çinko içeren bir metaloproteindir. Ancak,  $Zn^{2+}$  iyonlarının yerine  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  veya  $Ni^{2+}$  iyonları da bulunabilmektedir. Yapılan çalışmalarla birlikte  $Co^{2+}/Co^{2+}$  içeren enzimin en aktif olduğu bulunmuştur (Omburo vd., 1992). Daha önceki incelemeler her iki metal iyonunun da optimum katalitik aktivite için gerekli olduğunu göstermiştir, ancak, her bir metal iyonunun aktif bölgedeki rolü tam olarak bilinmemektedir (Shim ve Raushel, 2000). Metal iyonlarının biri veya ikisi için potansiyel katalitik fonksiyonlar; fosfat merkezindeki elektrofilik karakteri artırmak için substratın P=O veya P=S bağlarını polarizlemesi, hidrolitik su molekülünü aktifleştirmesi ve P-O bağının parçalanması esnasında ayrılan grup üzerinde meydana gelen negatif yükü nötralleştirmesi şeklinde özetlenebilmektedir (Aubert vd., 2004).

Moleküler yapısı bilinen bütün enzimlerin yaklaşık %10'u ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> silindir yapısı içerecek şekilde katlanmaktadır. ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> silindiri, 8 tane  $\alpha$ -sarmalın oluşturduğu bir çember tarafından çevrelenen 8 paralel  $\beta$ -tabakadan oluşan bir iç halka içerir (Pickett vd., 1992). ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> silindir içeren proteinlerin çoğu, narbonin ve konkanavalin B gibi birkaç istisna ile enzim olarak fonksiyon göstermektedirler. Bu enzimler çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalizlemektedirler (Nagano vd., 2002; Gerlt ve Raushel, 2003). Enzim Komisyonu'nun sınıflandırma sistemine göre ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> silindir katlanmasına sahip enzimler, ligazlar hariç diğer bütün enzim sınıflarını içermektedirler (Gerlt ve Raushel, 2003). Bu enzimlerin ortak bir atadan gelerek birbirinden ayrılmış olabilecekleri önerilmiştir. Çünkü birçok durumda, sıra benzerliği içermezler ve farklı kofaktör gereksinimleri ile çok farklı

bileşiklerin (fosfoesterler, esterler, amidler gibi) hidrolizini katalizlerler. Ancak, hepsi çok kesin benzer yapısal özelliklere sahiptirler. Aktif bölgeleri  $\beta$  silindirin C ucunda yerleşmiştir ve istisnasız hepsi 8 tabakalı  $(\alpha\beta)_8$  katlanması içerirler (Farber ve Petsko, 1990). PTE'nin apo-formunun X-ışını kristalografisi ile 3 boyutlu yapısının incelenmesi sonucunda, bu enzimin de bir  $(\alpha\beta)_8$  katlanması içerdiği sonucuna varılmıştır (Benning vd., 1994).

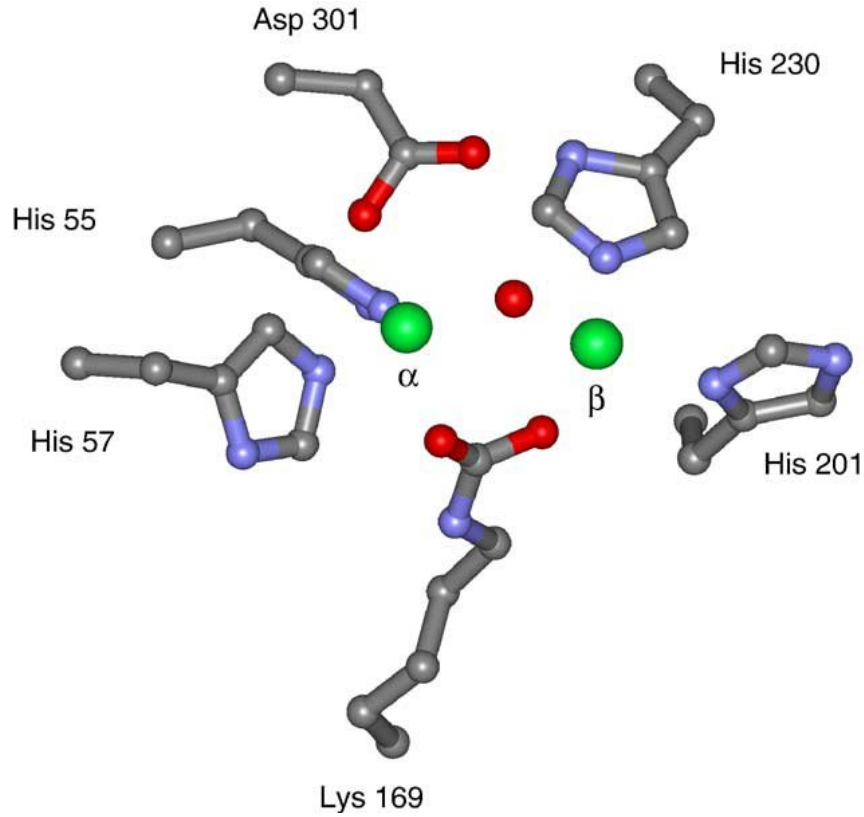


Şekil 1. TIM silindir katlanması içeren bir fosfotriesterazın kristal yapısı (Ghanem ve Raushel, 2005).

Amidohidrolaz üst ailesinde, birkaç alt tür belirlenmiştir. Bu alt türler mononükleer veya dinükleer metal merkezi koordine eden amino asit sıraları açısından farklılaşmıştır, fakat katalitik özellikler açısından aralarında açık bir ilişki yoktur. *Pseudomonas diminuta* PTE'si alt tür I'e aittir (Seibert ve Raushel, 2005). Bu enzim, şimdiye kadar tespit edilen en etkili PTE'dir (Dumas vd., 1989). Enzimin aktif bölgesinde bulunan ve daha fazla

gömülmüş olan “ $\alpha$ -metal” olarak adlandırılan metal iyonu His 55, His 57, karboksillenmiş Lys 169, Asp 301 ve bir su molekülü tarafından koordine edilmiş, trigonal bipiramidal koordinasyondadır. Daha fazla çözücünün maruz kaldığı “ $\beta$ -metal” olarak adlandırılan metal iyonu ise His 201, His 230, karboksillenmiş Lys 169 ve bir su molekülü tarafından koordine edilmiş, tetrahedral koordinasyon sergilemektedir. Bu iki metal iyonu karboksillenmiş Lys 169 ve hidroliz reaksiyonu sırasında görülebilen bir su/hidroksil molekülü ile köprü oluşturmuş haldedir (Şekil 2) (Buchbinder vd., 1998; Ghanem ve Raushel, 2005).

Yukarıda adı geçen amino asitlere ve histidinlere ilave olarak Trp 131 ve Asp 253’ün de PTE’nin katalitik fonksiyonu için önemli olabileceği bildirilmiştir (Benning vd., 1995). Asp 253, His 230’un imidazol grubu ile elektrostatik etkileşim yapmaktadır. Bu etkileşim, His 230’un, daha fazla çözücünün maruz kaldığı metal iyonu ile optimum ligasyonu için uygun konformasyon kazanmasında etkili olmaktadır. Trp 131 ise substratın aromatik halkasının konumlanmasında etkili olmaktadır (Kuo vd., 1997).

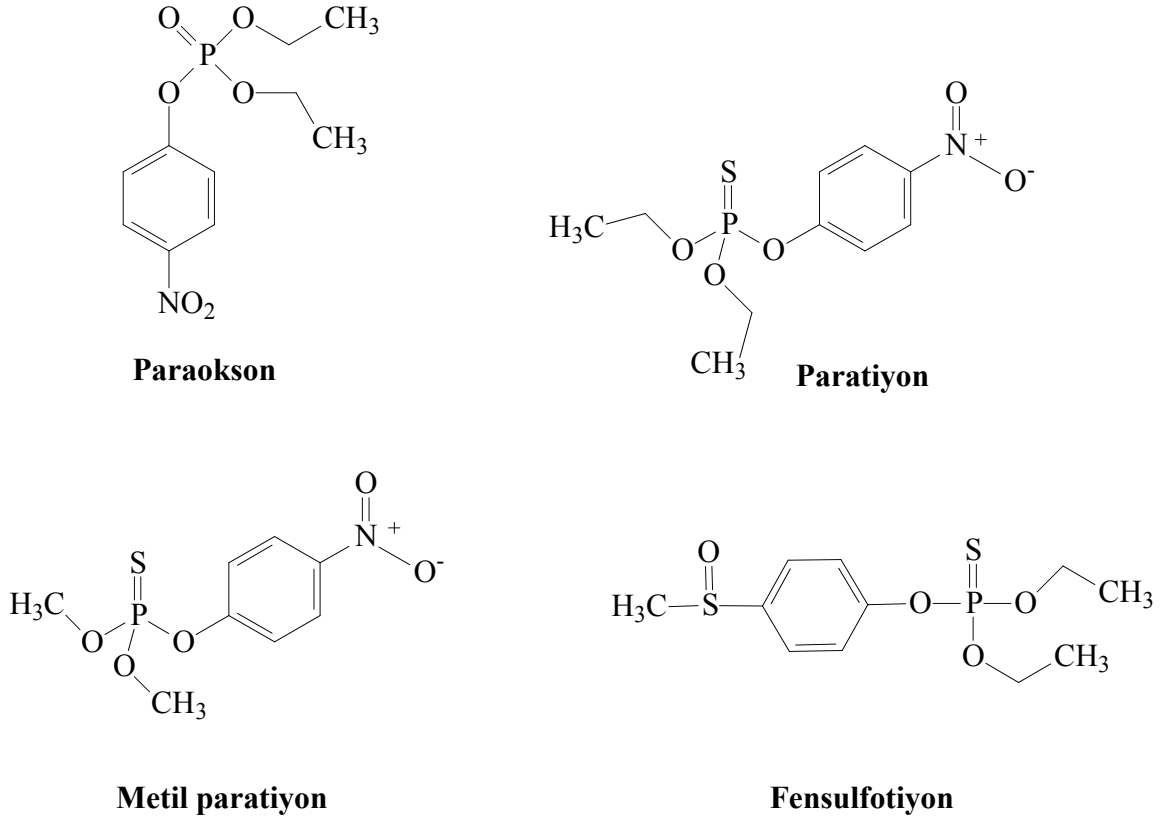


Şekil 2. Fosfotriesterazın binükleer metal merkezi (Ghanem ve Raushel, 2005).

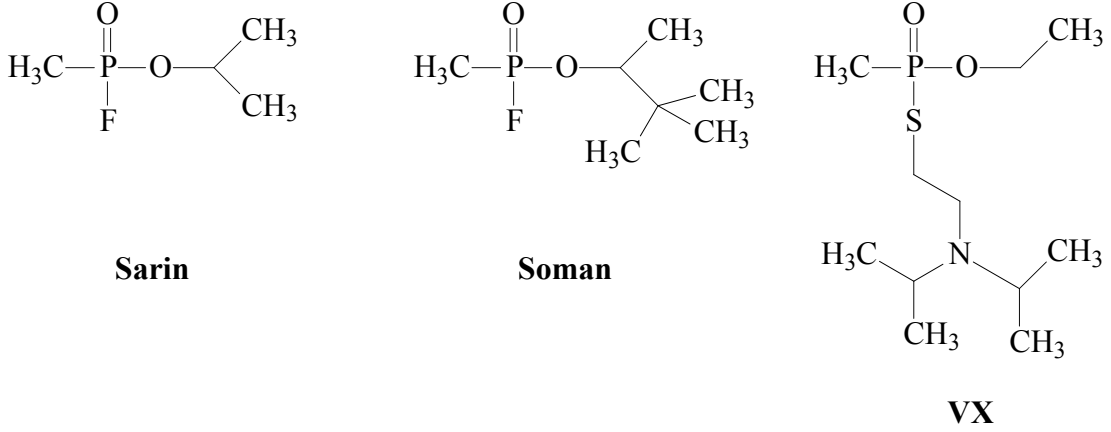
### 1.3.2. PTE'lerin Substrat Spesifitesi

Paraokson, PTE için bilinen en iyi substrat olmasına rağmen, enzimin substrat spesifitesi oldukça geniştir ve OP'lerin, tiyofosfatların ve fosfortiyolatların birçok çeşidini içermektedir. Ayrılan grupların farklı olduğu substratlar için katalitik etkinlik ve hız sınırlayıcı basamak, ayrılan grubun pKa değerine bağlıdır (Hong ve Raushel, 1996).

PTE'nin doğal substratı henüz bilinmemektedir. Ancak, enzim, paraokson yanında diğer böcek öldürücüler olan, paratiyon, metil paratiyon, fensulfotiyon gibi OP'leride hidrolizleyebilmektedir (Şekil 3) (Schrader, 1950; Dumas vd., 1989). Ayrıca enzim, sinir ajanları olan sarin, soman ve VX gibi maddeleri de hidrolizleyebilir (Şekil 4). Fakat bu substratlar için katalitik aktivite, daha az toksik olan böcek öldürücüler için olandan daha düşüktür (Dumas vd., 1990; Kolakowski vd., 1997).

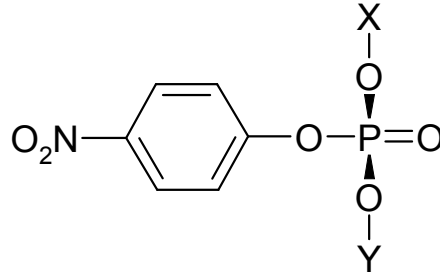


Şekil 3. Paraokson, paratiyon, metil paratiyon ve fensulfotiyon'un kimyasal yapıları



Şekil 4. Sarin, soman ve VX'in kimyasal yapıları

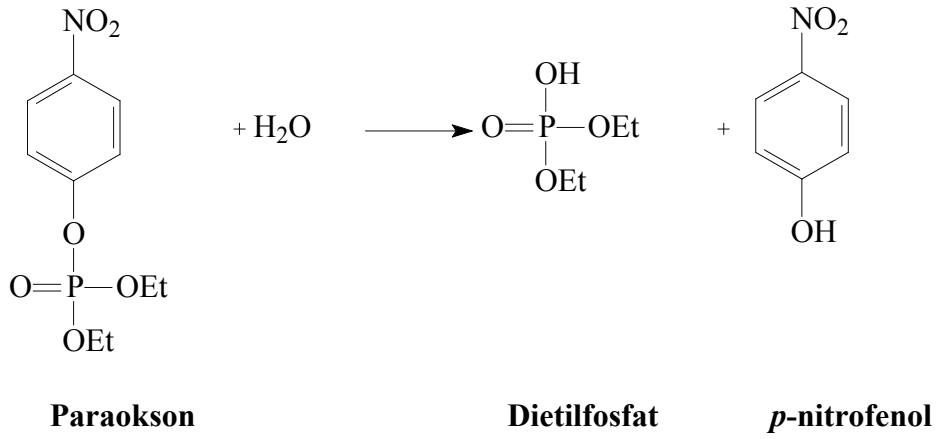
PTE'nin substrat spesifitesi, paraokson analogların küçük bir kütüphanesi taranarak belirlenmiştir. Şekil 5'de görülen yapının, metil, etil, izopropil ve fenil gruplarının kombinasyonu ile X ve Y substituentleri için toplam 16 tane potansiyel OP substratı elde edilmiştir. Bütün bu paraokson analoglarının PTE için substrat olduğu bulunmuştur. Dimetil *p*-nitrofenil fosfat için  $18000 \text{ s}^{-1}$  ve diizopropil *p*-nitrofenil fosfat için  $220 \text{ s}^{-1}$  arasında dönüşüm sayısı değerleri elde edilmiştir (Hong ve Raushel, 1999).



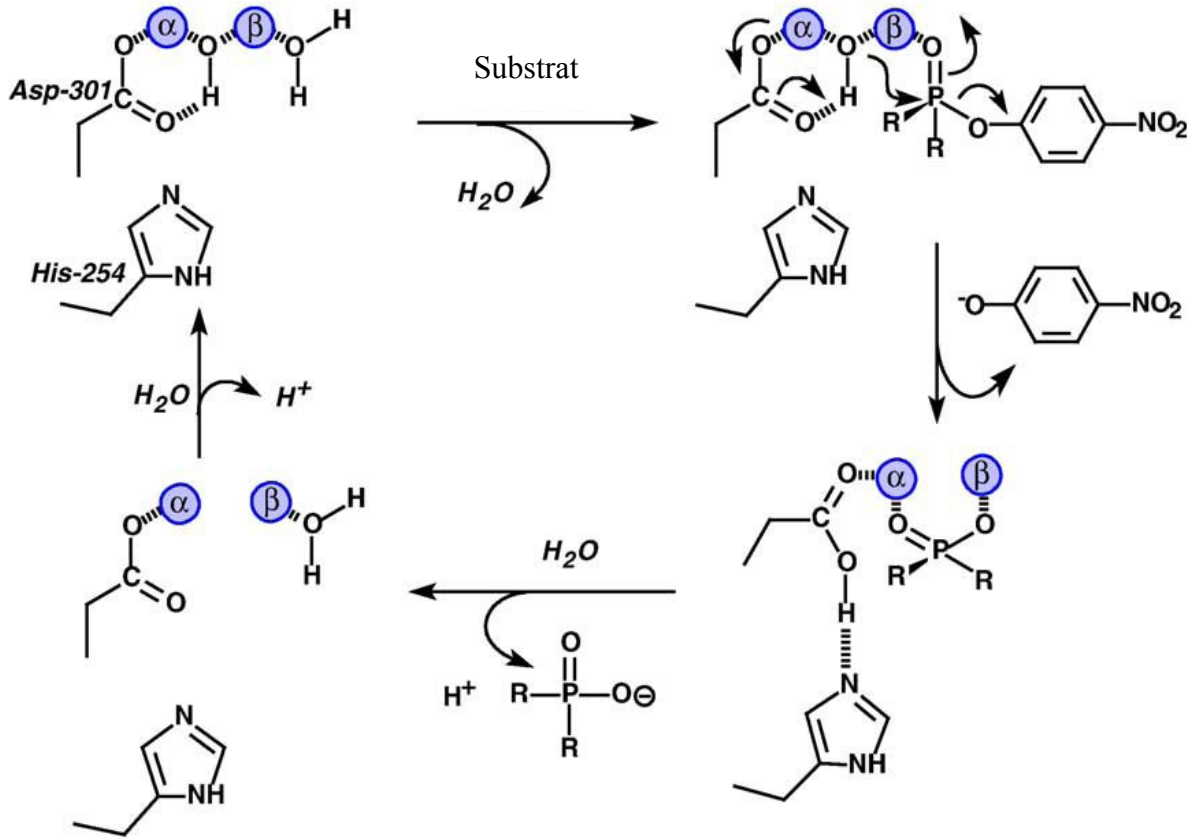
Şekil 5. Paraokson analoglarının temel yapısı

### 1.3.3. PTE'lerin Reaksiyon Mekanizması

Paraokson, PTE tarafından hidrolizlendiğinde dietilfosfat ve *p*-nitrofenole dönüşür (Şekil 6) (Meng, 2003).



Şekil 6. Paraoksonun dietilfosfat ve p-nitrofenole hidroliz reaksiyonu



Şekil 7. Paraoksonun PTE tarafından hidrolizi için önerilen katalitik mekanizma (Aubert vd., 2004).

PTE ile yapılan kinetik çalışmalar, hidrolizin S<sub>N</sub>-2 tipi katalitik mekanizma ile gerçekleştiğini göstermiştir (Lewis vd., 1988). Bakteriyal PTE'nin paraokson için önerilen reaksiyon mekanizması Şekil 7'de gösterilmiştir. Paraoksonun hidrolizi için yapılan



çalışmada, pH-hız profili, tek bir grubun yaklaşık 6,1 pKa değerinde deprotonlanması gerektiğini göstermiştir (Donarski vd., 1989). Substrat bu pH değerinde iyonlaşmadığı için gözlenen bu iyonlaşma enzim üzerinde olmaktadır. Bu sonuçlar, iki divalent metal katyonu arasında köprü durumunda bulunan hidroksilin nükleofil olarak kullanılmasıyla uyum içindedir. Köprü hidroksilin reaktifliği, substratın aktif bölgeye bağlanması sonucunda, Asp 301'e bir protonun transfer edilmesiyle artar. Substratın fosforil oksijeni  $\beta$  metali ile kompleks oluşturur ve aktifleşmiş hidroksilin fosfor merkezine nükleofilik saldırısı gerçekleşir. P-O bağı kırılır, *p*-nitrofenolat iyonu salıverilir ve iki metal iyonuna köprü oluşturan bir fosfat anyonu olarak enzim-ürün kompleksi oluşur. His 254'ün bu reaksiyonu bir protonu Asp 301'den çözücüye ve aktif bölgeden uzağa getirip götürmesiyle kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Aubert vd., 2004). Bundan sonra, ürün salıverilir ve aktif bölge hidroksili tekrar oluşur. Teorik çalışmalar, Tyr 309'un bir hidrojen bağı etkileşimi ile ayrılan *p*-nitrofenolat grubundaki negatif yükü kararlılaştırdığını önermektedir (Koca vd., 2001). Ancak, Tyr 309'un fenilalanine mutasyonu OP'lerin hidrolizini önemli derecede etkilememiştir. Bu nedenle bu potansiyel etkileşim hidrolize bir katkı sağlamamaktadır (Aubert vd., 2004).

#### 1.3.4. PTE'lerin Kullanım Alanları

OP böcek öldürücüler, zararlı böceklere karşı etkili kimyasal ajanlar olarak bütün dünya genelinde kullanılmaktadırlar. Bu kimyasalların sürekli kullanımı ekosistemde birikmelerine ve çevreye özellikle de hedef olmayan organizmalara çok büyük zararlar vermesine neden olmaktadır (Bhat ve Krishnamachari, 1977; Bailey, 2001). OP böcek öldürücülerle dünya genelinde yılda yaklaşık 3 milyon zehirlenme ve 200.000 ölüm vakasının görüldüğü bildirilmiştir (Karalliedde ve Senanayake, 1999). Savaş sinir ajanları da OP yapısındadır ve insanlar için OP böcek öldürücülerden daha toksiktirler. En çok üretilen 4 sinir ajanı tabun, soman, sarin ve VX'dir (Gunderson vd., 1992; Greenfield vd., 2002). Sinir ajanlarının sentezlenmesinin çok kolay olması onları terörist amaçlar için uygun bileşikler haline getirmektedir. Matsumoto ve Tokyo (Japonya) 1994 ve 1995'de sarin ile gerçekleştirilen terörist saldırılara maruz kalmıştır. Bu saldırılardan sırasıyla 600 ve 1500 kişi etkilenmiş ve bunların 7 ve 11 tanesi ölmüştür (Morita vd., 1995). Ayrıca, ilk Körfez Savaşı'nda da müttefik askerlerinin sarine maruz kaldığına inanılmaktadır (Abdel-Rahman vd., 2002; Abu-Qare ve Abou-Donia, 2002).

Günümüzde, OP'lerin detoksifikasyonu, ağartıcı muamelesi, alkali hidrolizi ve yakıp kül etme gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Yavaş, pahalı ve çevreye zarar verebilen bu yöntemlerde reaksiyon şartları serttir ve yan ürünler toksik olabilmektedir. Bu nedenle enzim katalizli dekontaminasyon üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Geniş substrat spesifitesi ve stereoseçiciliği nedeniyle PTE, OP'lerin *in vivo* ve *in vitro* detoksifikasyonu için ümit verici bir adaydır (Ghanem ve Raushel, 2005). Farelerle yapılan denemelerde, farelere paraokson verilmesinden önce veya verildikten hemen sonra, damardan 1,5 IU (1,5 µmol/dak paraoksonaz aktivitesi) PTE verilmesi ile beyin asetilkolin esterazının inhibisyonundan korunduğu görülmüştür (Kaliste-Korhonen vd., 1993). Paraokson ile muamele edilmiş fare serumu, PTE ile 24 saat inkübe edildiğinde, asetilkolin esteraz aktivitesi kontrol aktivitesine oranla %25-31'den %76-100'e çıkmıştır (Tuovinen vd., 1994). Hayvanlarda yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlar, PTE ile muamele edilmiş hayvanların diğer hayvanlara oranla paraoksonu 50 kat daha fazla tolere edebileceğini göstermiştir (Ghanem ve Raushel, 2005).

Radyoaktif iyot (<sup>125</sup>I) kullanılarak yapılan çalışmalarda, PTE'ye karaciğer, böbrek ve akciğerlerde rastlanırken, sinir sisteminde rastlanmamıştır. Bu sonuçlar PTE'nin sinir sistemine ulaşmadan önce dolaşımdaki OP'leri hidroliz ettiğini göstermektedir. PTE'nin *in vivo* terapötik uygulaması, plazmada yaklaşık 5 saat olduğu bildirilen yarı ömrü nedeniyle sınırlanmıştır (Tuovinen vd., 1996). Bu engelin üstesinden gelmek amacıyla, PTE murin eritrositlerinde (Pei vd., 1994) ve sterik olarak kararlı lipozomlarda (Petrikovics vd., 1999) başarılı bir şekilde kapsülleştirilmiştir.

OP'lerce kirlenmiş alanlarda kirlilik miktarını tayin edebilmek amacıyla çok yönlü OPD tabanlı bir metot geliştirilmiştir. Bu yöntem, enzimin çok yakınındaki bir alanda meydana gelen pH değişimini esas almaktadır. Bu pH değişimi, enzime kovalent olarak immobilize edilmiş olan floresin izotiyosiyanat (FITC) kullanılarak tayin edilmektedir. Bu yöntemle, miktarı tayin edilebilen OP böcek öldürücüler; etilparatyon, metilparatyon, fensulfotiyon ve diğer birçok maddeyi içermektedir (Rogers vd., 1999). Bunun yanında, metil paratyonun tespiti için cam fiber filtrelerde *Flavobacterium* sp. hücrelerinin immobilizasyonu ile üretilen mikrobiyal bir biyosensör geliştirilmiştir. İmmobilize mikrobiyal biyokomponent ekonomiktir, birçok defa kullanılabilir ve yüksek derecede tekrarlanabilirliği vardır (Kumar vd., 2006). Potansiyometrik (Mulchandani vd., 1998a), amperometrik (Wang vd., 2003; Chough vd., 2002) ve optik (Rogers vd., 1999) dönüştürücüler içeren birçok OPH temelli biyosensörler de geliştirilmiştir. Ayrıca, OPH'yi

hücre içi olarak ekpres eden rekombinant *E. coli* hücrelerinin potansiyometrik dönüştürücülerle bir kombinasyonunu içeren mikrobiyal biyosensörler (Rainina vd., 1996) ve OPH'yi yüzeyde ekpres eden rekombinant *E. coli* hücrelerinin potansiyometrik (Mulchandani vd., 1998b), amperometrik (Mulchandani vd., 2001a,b) ve optik (Mulchandani vd., 1998c) dönüştürücülü biyosensörleri üretilmiştir.

Ayrıca son yıllarda, PTE tarafından zayıf olarak hidroliz edilen substratlara karşı aktiviteyi artırmak amacıyla birkaç bakteriyel PTE'nin mutant formları geliştirilmiştir. Soman ve sarin kimyasal savaş ajanları ve bazı böcek öldürücülerin hidrolizi için *P. diminuta* PTE'sinin mutantları yapılmıştır (Chen-Goodspeed vd., 2001a,b; Li vd., 2001; Raushel, 2002). Bunun yanında, diğer bakteriyel türlerden elde edilen PTE'ler VX hidrolizini artırmak için mutasyona uğratılmıştır (Gopal vd., 2000). Ayrıca, tarım ürünlerini korumak amacıyla çok kullanılan bir böcek öldürücü olan klorpirifoz'un hidrolizi yönlendirilmiş evrim ile 700 kat artırılmıştır (Cho vd., 2004).

### 1.3.5. Bakteriyel PTE'ler

Genelde, bakteriler OP'lerin varlığından etkilenmezler çünkü bu bileşikler hücre içine giremezler (Richins vd., 1997). Bunun yanında bazı mikroorganizmaların büyümeleri için OP'leri C, N ve P kaynağı olarak hidroliz edebildikleri bildirilmiştir (Cheng vd., 1998; Raushel, 2002). PTE genine sahip olduklarından dolayı bu kabiliyete sahip olan bazı bakteriyel izolatlar, *P. diminuta* (Munnecke, 1976), *Flavobacterium* sp. (Sethunathan ve Yoshida, 1973) ve *Agrobacterium radiobacter* (Horne vd., 2002)'dir. Metil paratiyonu bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen bir toprak bakterisi olan *Serratia* sp. DS001 metilparatiyon içeren minimal ortamda seçici zenginleştirme ile izole edilmiştir (Pakala vd., 2007). *Alteromonas* türleri (Cheng vd., 1993), *Bacillus stearothermophilus* (Grimsley vd., 1988), *E. coli* (Zech ve Wigand, 1975), *Corynebacterium glutamicum* (Laurence vd., 2000) ve *Burkholderia* sp. NF100 (Masahito vd., 2000) türleri de OP böcek öldürücü parçalayabilen mikroorganizmalar arasındadır.

Yaban tip bakteriler düşük miktarda PTE üretirler. Bu nedenle PTE kodlayan genin *Streptomyces lividans* ve *E. coli* gibi konakçı hücrelerde yüksek miktarda ve etkili bir biçimde üretimi için çaba harcanmaktadır (Mulbry ve Karns, 1989; Steiert vd., 1989; Rowland vd., 1991; Somara vd., 2002). *Flavobacterium* sp. ATCC27551 ve *Flavobacterium balustinum*'dan OP parçalayabilen enzimleri kodlayan genler klonlanmış

ve *E. coli*'de ekspres edilmiştir (Manavathi vd., 2005; Siddavattam vd., 2006). OP ile muamele edilmiş topraktan izole edilen *Pseudomonas pseudoalcaligenes* bakterisinden OPD kodlayan *ophc2* geni de klonlanmış ve *Pichia pastoris*'de ekspres edilmiştir (Chu vd., 2006). *Plesiomonas* sp. tür M6'dan yeni bir metilparatasyon hidrolaz geni C ucunda histidin kuyruğu içerecek şekilde klonlanmış ve *E. coli*'de ekspres edilmiştir (Fu vd., 2004). Hipertermofilik bir arkedeki varlığı ilk olarak bildirilen paraoksonaz olan *Sulfolobus solfataricus* MT4 paraoksonazı da ayrıca klonlanmış ve *E. coli* HB101'de ekspres edilmiştir (Merone vd., 2005).

#### 1.4. Fosfotriesteraz Homolog Proteinler (PHP'ler)

Evrimin, genellikle bir organizmanın özel bir ekolojik bölgeye seçimli adaptasyonu için milyonlarca yıl gerektirdiği tahmin edilmektedir. Ancak, son bulgular, mikroorganizmaların evriminin çok uzun zaman değil de 10 yıllık veya 100 yıllık daha kısa sürelerde meydana gelebileceğini önermektedir. Bakterilerin laboratuvar ortamında yapay evrimi çalışmaları, proteinlerin seçici baskılara cevaben daha kısa bir zaman yelpazesinde değiştiğini belgelemektedir (Benner ve Ellington, 1988). Yeni aktivitelerin kazanılması, belirli bir katalitik fonksiyon için enzim özgünlüğünü değiştirmek üzere bir proteinin substrat bağlanma bölgesinin yeniden düzenlenmesini veya bir katalitik fonksiyona sahip olmayan fakat var olan bir bağlanma bölgesinde yeni kazanılmış bir katalitik aktivitenin oluşumunu gerektirebilir (Buchbinder vd., 1998).

*P. diminuta* PTE'si çevre koşullarının değişmesine karşılık yeni bir enzimatik aktivitenin doğal evrimine bir örnek olabilir. PTE, birçok OP'nin hidrolizini katalizleyen binükleer çinko merkezi içeren bir metaloproteindir (Dumas vd., 1989; Benning vd., 1995). PTE'nin substratı olan OP'lerin tamamı sentetik bileşiklerdir ve enzim için doğal olarak bulunan herhangi bir substratla benzerlikleri bilinmemektedir. Paraoksonun sentezi, ilk olarak 1950'de (Schrader, 1950) bildirilmiştir. Bu durum, bakterilerdeki PTE aktivitesinin, geçen birkaç 10 yıllık süre zarfında benzer bir katalitik fonksiyona sahip başka bir enzimden besin ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla sentetik bileşikleri hidrolizleyebilme kabiliyetine sahip olacak şekilde evrimleştiğini önermektedir (Buchbinder vd., 1998).

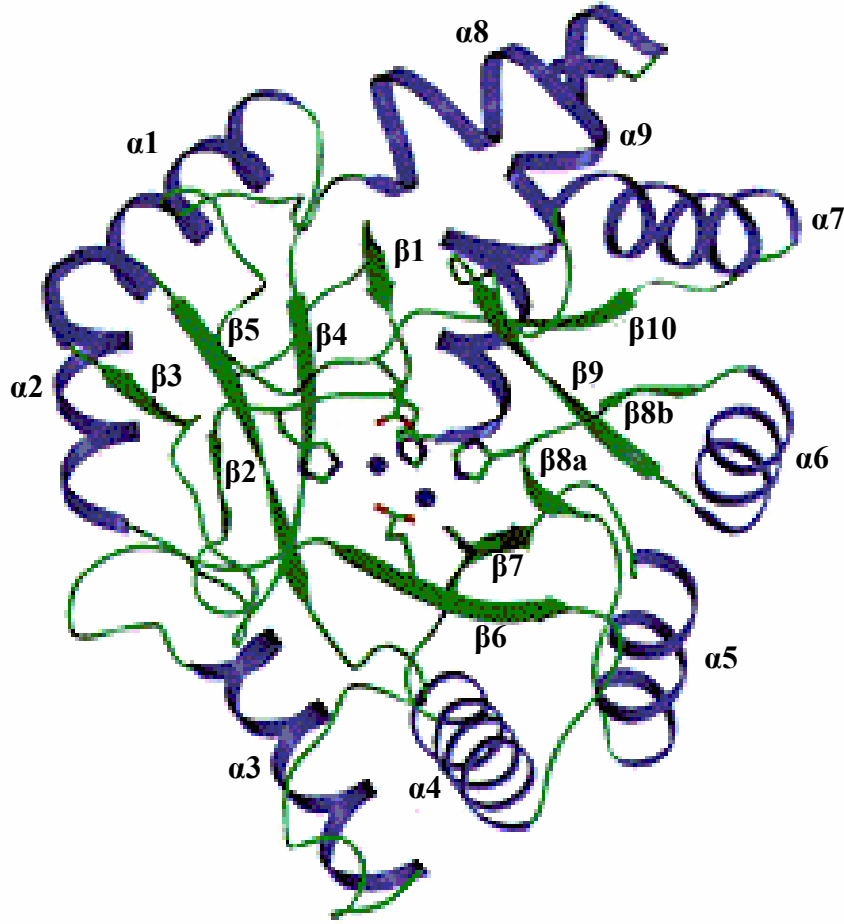
PTE'ye en yakın sıra homolojisini, fosfotriesteraz homolog protein (PHP) göstermektedir. Her ne kadar PHP'nin doğal substratı bilinmese de yapılan çalışmalarla

paraoksonaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Fonksiyonu bilinmeyen bir enzim olan PHP'nin PTE ile sıra özdeşliği %28, sıra benzerliği %66'dır. Her iki enzim de aynı binükleer ( $Zn^{2+}$ ) metal merkezine sahiptir ve yüzeydeki 3 nolu lop hariç 3 boyutlu yapılar birbiri ile oldukça güzel örtüşmektedir (Buchbinder vd., 1998). Ancak, birinci, yedinci ve sekizinci  $\beta/\alpha$  birimlerini örten 3 aktif bölge lopu PHP'de PTE'den daha kısadır (Afriat vd., 2006).

PHP'lerin varlığına ilk olarak *E. coli*'de rastlanmıştır (Scanlan ve Reid, 1995). Bunun dışında homolog sıraları olan diğer 4 genin varlığı sırasıyla sıçan, fare, mikobakteri ve mikoplazmada belirlenmiştir (Hou vd., 1996; Himmelreich vd., 1996; Philipp vd., 1996; Alimova-Kosta, 1998). Sıra homolojisine dayanılarak PHP'nin yapısının PTE ile aynı olabileceği beklenebilir. PHP ve PTE'nin primer sıralarının incelenmesi sonucunda PTE'de bulunan çinkonun koordinasyonunda görev alan 4 histidin ve 1 aspartat biriminin PHP'de korunmuş olduğu görülmüştür (Scanlan ve Reid, 1995). Sadece, PTE'de 169. pozisyonda bulunan Lys tam olarak korunmamıştır. Bu birim PHP'de bir glutamat ile yer değiştirmiştir ve *E. coli*, fare ve sıçan PHP'lerinin sıralarında bir pozisyon kaymış durumdadır. Mikobakteri ve mikoplazma PHP'lerinde ise PTE'deki Lys 169'un yerinde yine bir Lys birimi vardır ve bu lizin birimleri muhtemelen aynı şekilde karboksillenmiştir (Buchbinder vd., 1998). Bu metal merkezi yapısı nedeniyle PHP ailesi, alt tür II olarak sınıflandırılmıştır (Seibert ve Raushel, 2005).

#### 1.4.1. *E. coli* PHP'sinin (ePHP) Yapısı

ePHP'nin X ışını kristalografik yapısı, proteinin 3 boyutlu yapısının silindirin  $\beta 1$  tabakası ve  $\alpha 1$  sarmalı arasına girmiş olan ilave iki antiparalel  $\beta$  tabaka içeren elips biçiminde bir  $(\alpha\beta)_8$  katlanması içerdiğini göstermektedir (Şekil 8). İlave bir  $\alpha 9$  sarmalı, silindirin C ucundan çinko merkeze doğru yönelen  $\alpha 8$  sarmalını takip etmektedir. Binükleer çinko merkezi  $\beta$  silindirin C ucunda yerleşmiştir ve bu yapı enzimin aktif bölgesini oluşturmaktadır.



Şekil 8. ePHP'nin yapısının kurdele gösterimi. Protein, silindirin birinci  $\beta$  tabaka ve  $\alpha$  sarmalı arasına girmiş olan iki ilave  $\beta$  tabaka ( $\beta 2$  ve  $\beta 3$ ) içeren  $(\alpha\beta)_8$  katlanması içerir.  $\alpha$  sarmallar mor,  $\beta$  tabakalar yeşil ile gösterilmektedir. Silindirin C ucunda yerleşmiş olan 2 çinko iyonu mavi kürelerle gösterilmektedir (Buchbinder vd., 1998).

Aktif bölgede yer alan iki çinko iyonu birbirinden 3,35 Å uzaklıktadır. Birinci çinko iyonu 5 ligand tarafından koordine edilmiş trigonal bipiramidal geometride iken diğer çinko iyonu tetrahedral geometridedir. Birinci çinkonun ligandları His 14, His 12, Asp 243 ve Glu 125'dir. Asp 243 ve Glu 125'in karboksilat grupları trigonal bipiramidin aksiyal konumlarını doldurmaktadır. Elektron yoğunluğu haritasında 5. ligandın ne olduğu tam olarak açık değildir fakat bunun, proteinin saflaştırıldığı *E. coli* özütünden gelen bir molekül veya kristallendirme ortamındaki bilinmeyen bir kirlilik olabileceği düşünülmektedir. Glu 125'in karboksilat grubu ve kimliği bilinmeyen bu molekül, 2 çinko atomu arasında köprü oluşturmuş bulunmaktadır. İkinci çinkonun etrafındaki ligandlar ise Glu 125, His 158 ve His 186'nın yan zincirleri ve kimliği bilinmeyen molekülden ibarettir.

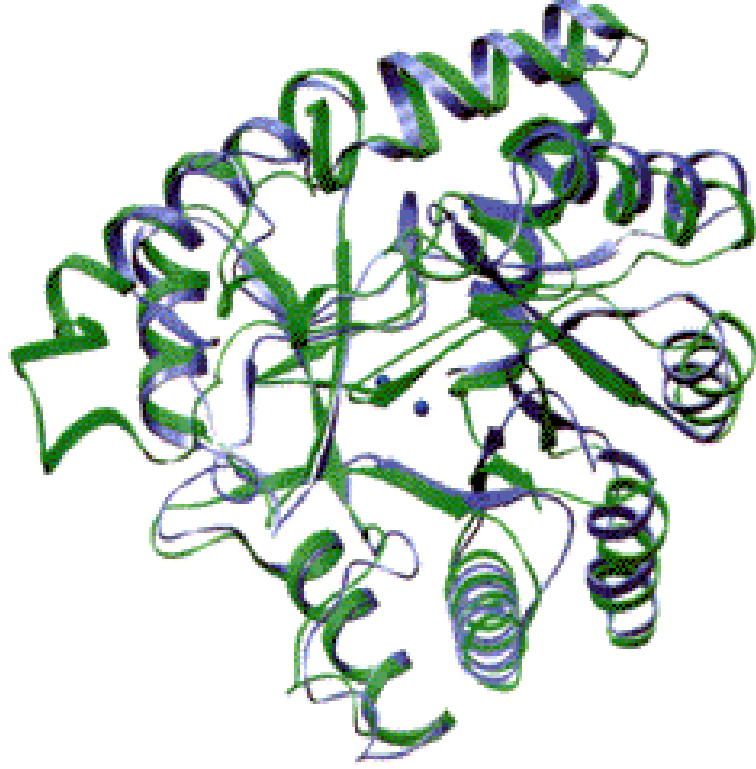
PTE yapısında ePHP'deki Glu 125'in yerinde karboksillenmiş bir Lys birimi köprü ligandı olarak bulunmaktadır. Ayrıca ePHP'nin yapısında aynı pozisyonda görülen ne olduğu anlaşılamayan molekül yerine PTE'de bir su molekülü, divalent katyonlar ile ikinci köprü ligandı olarak görev almaktadır. Bu nedenle, yapısal olarak bu hidrolitik metaloenzime benzeyen ePHP'nin, çinko merkezinde koordine olmuş bir hidroksil içerebileceği veya alternatif olarak bir substrat molekülünün her iki çinko iyonuna bağlanabileceği muhtemeldir (Buchbinder vd., 1998).

#### 1.4.2. ePHP ve PTE'nin 3 Boyutlu Yapılarının Çakıştırılması

ePHP ve PTE'nin yapıları üst üste çakıştırıldığında (Şekil 9) PTE'nin ePHP'den hacimsel olarak daha büyük olduğu ve N ucunda ePHP'nin birinci  $\beta$  tabakasının önünde olan 2 antiparalel  $\beta$  tabakayı da içeren yaklaşık 40 ilave amino aside sahip olduğu görülmektedir. PTE yapısı ile karşılaştırıldığında büyük farklılıklar gösteren ePHP kısımları bu çakıştırmada gösterilmemiştir. PTE ile çok büyük yapısal farklılıklar gösteren ePHP kısımları, PTE'de olmayan antiparalel  $\beta 2$  ve  $\beta 3$  tabakalarını kuşatan  $\beta 1$  ve  $\alpha 1$  arasındaki bölge,  $\beta 7$  ve  $\alpha 5$  arasındaki lop,  $\beta 9$  ve  $\alpha 7$  arasındaki lop ile  $\beta 10$  ve  $\alpha 8$  arasındaki lop şeklinde sıralanabilir. Ayrıca,  $\beta 6$  ile  $\alpha 4$ 'ü ve  $\beta 8$  ile  $\alpha 6$ 'yı bağlayan loplarda da kısmen büyük farklılıklar görülmektedir (Buchbinder vd., 1998).

Her iki yapı arasındaki önemli farklılıklar, ePHP'nin muhtemel aktif bölgesine karşılık gelen bölgelerde görülmektedir. Metal ligasyonunda görev alan birimlerden başka, aktif bölgedeki birimlerin birkaçı korunmuştur. ePHP'deki pozitif yüklü birimler olan Lys 23, Lys 213 ve Arg 246, PTE'de sırasıyla Trp, His ve Ile ile yer değiştirmiş bulunmaktadır. PTE'de bir substrat benzeri olan dietil 4-metilbenzilfosfonat ile etkileşime giren birimler olan Phe 306, Tyr 309, Met 317, Leu 271, Trp 131 ve His 257 birimleri de korunmamıştır. Met 317 nispeten tek korunmuş birimdir ve ePHP'de bunun yerine hidrofobik bir birim olan Leu 250 bulunmaktadır. Ancak Phe 306, Tyr 309 ve Leu 271'un ePHP'de herhangi bir karşılığı bulunmamaktadır. PTE'de  $\beta 9$  tabakası ePHP'ninkinden daha kısadır ve aktif bölge üzerinde bir kulak şekli oluşturacak biçimde uzanmaktadır. Bu yapı ePHP'de görülmemektedir. PTE,  $\beta 9$  ve  $\alpha 7$  arasındaki bölgede (lop 7), ePHP sırasına göre ilave 14 birim daha ve substrat bağlanma bölgesinde bulunan Leu 271'i içermektedir. PTE'de, Phe 306 ve Tyr 309'u içeren  $\beta 10$  ve  $\alpha 8$  arasındaki lop (lop 8), ePHP sırasına göre ilave 9 birim

daha içermektedir. Her iki yapıda farklılık gösteren bu lop çinko ligasyonunda görev alan korunmuş aspartat birimini de (ePHP'de Asp 243) içermektedir (Buchbinder vd., 1998).



Şekil 9. ePHP ve PTE'nin yapılarının üst üste çakıştırılması. ePHP mor, PTE ise yeşil renk ile gösterilmektedir (Buchbinder vd., 1998).

Şimdiye kadar keşfedilen bütün  $\alpha/\beta$  silindir proteinlerinin aktif bölgeleri  $\alpha/\beta$  silindirin karboksil ucunda benzer pozisyonlarda yerleşmiş olan enzimler olduğu bulunmuştur. Aktif bölgenin aynı düzende yerleşiminden dolayı  $\alpha/\beta$  silindir proteinlerinin ortak bir atadan farklı şekillerde evrimleştiği sonucuna varılmaktadır (Farber ve Petsko, 1990). ePHP, PTE, üreaz ve adenozin deaminaz gibi enzimleri içeren  $\alpha/\beta$  silindir proteinlerinin bir alt sınıfına yapısal olarak en çok benzeyen enzimdir. Bu proteinlerin tamamı uzun elips biçiminde  $\alpha/\beta$  silindirlere sahiptirler ve neredeyse benzer ligandlar tarafından koordine edilen metal iyonları içermektedirler (Wilson vd., 1991; Jabri vd., 1995; Vanhooke vd., 1996). PTE ve üreazda, Glu 125 karboksillenmiş bir lizin ile yer değiştirmiştir. Adenozin deaminazda Glu 125 bir aspartat ile yer değiştirmiştir. İlginç bir biçimde adenozin deaminaz, ePHP'de çinkonun bağlandığı birimlerin bulunduğu pozisyonlarda 4 histidin ve 1 aspartat birimi



içermesine rağmen sadece bir çinko bağlamaktadır. Katalitik aktiviteleri bilinen bu alt sınıftaki her 3 protein de hidrolitik enzimdir ve bu gözlemin sonucunda ePHP'nin de bazı hidrolitik reaksiyonları katalizleyebileceği sonucuna varılabilir (Buchbinder vd., 1998). Keza, düşük miktarda esteraz aktivitesi gösteren PHP'de, PTE'den en çok farklı olan loplarda yapılan mutasyonlarla daha yüksek bir esteraz aktivitesi elde edilmiştir. Estarazların reaksiyon mekanizması, amidohidrolaz üst ailesinin diğer üyelerinin doğal bir fonksiyonu olarak belirtilmemiş olmasına rağmen, metaloenzimlerin bu grubunun üyeleri tarafından katalizlenen diğer hidrolitik reaksiyonlara mekanistik olarak benzetilmektedir. Bu nedenle, gelecekte keşfedilecek TIM silindir metaloesterazların bu üst aileye ait olabileceği veya bu aktivitenin amidohidrolazlar tarafından katalizlenen reaksiyonları ve substrat spesifitesini genişletmek için laboratuarda evrimleştirilebileceği muhtemeldir (Roodveldt ve Tawfik, 2005).

### **1.5. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri**

Dünya üzerinde yaşayan canlılar ökaryotlar, bakteriler ve arkebakteriler olmak üzere 3 ana grup altında toplanmaktadır (Woese vd., 1990). Bakteriler büyüydikleri sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller (-5 ve 20 °C arasında), mezofiller (15 ve 45 °C arasında), termofiller (45 ve 80 °C arasında) ve hipertermofiller (ekstrem termofiller,  $\geq 80$  °C) olmak üzere 4'e ayrılırlar (Vieille ve Zeikus, 2001). Termofiller ve hipertermofiller tarafından üretilen enzimler (termozimler) yüksek sıcaklıklarda dönüşümsüz inaktivasyona karşı dirençli oldukları için ısı kararlı ve ayrıca genellikle 60 ve 125 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum aktivite gösterdikleri için termofiliktirler (Vieille vd., 1996).

Termozimler, ekstremofillerden elde edilen ekstremozimler olarak adlandırılan diğer bir enzim sınıfının parçasıdır. Ekstremozimler yüksek tuz içeren ortamlarda (halozimler), yüksek alkali ortamlarda (alkalozimler) ve diğer ekstrem şartlarda (basınç ve asitlik vb.) aktivite gösterebilirler (Lowe vd., 1993; Adams ve Kelly, 1995; Gershenson vd., 2000). Doğası gereği yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktif olan termofilik ve hipertermofilik enzimler mezofilik veya sakrofilik türlerden elde edilen enzimlere oranla çok büyük biyoteknolojik avantajlara sahiptirler:

- 1) Bu enzimler mezofilik bir konakçıda ekspres edildiklerinde ısı muamelesi ile saflaştırılmaları çok kolaydır.

- 2) Çözücüler veya guanidinyum hidroklorür gibi, denatüre edici kimyasallara karşı oldukça fazla dirençlidirler.
- 3) Enzimatik reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ile yüksek konsantrasyonda substrat kullanımı, daha düşük viskozite, daha az mikrobiyal kontaminasyon riski ve genellikle daha yüksek reaksiyon hızları elde edilebilmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001).

Doğal, aktif proteinler, kovalent olmayan etkileşimlerin zayıf bir dengesi ile bir arada tutulurlar. Yüksek sıcaklıklar, bu kovalent olmayan etkileşimleri bozduğu zaman proteinin katları açılır. Çoğu zaman, sekonder ve tersiyer yapıların bozulması enzimin yüksek sıcaklıkta inhibisyonu ile aynı anda olur. Çoğu protein soğutma ile birlikte kendi doğal ve aktif konformasyonlarını kazanabilir. Bu açılma “termodinamik olarak dönüşümlü açılma” olarak adlandırılır (Privalov ve Khechinashvili, 1974; Backmann vd., 1998). Mezofilik organizmalardan elde edilen proteinlerin çoğu dönüşümsüz olarak açılır. İnaktif, fakat kinetik olarak kararlı yapılara dönüşürler ve genellikle kümeleşerek çökerler. Kümeleşme sırasında, doğal proteinde gömülü olarak bulunan hidrofobik birimler diğer açılmamış protein moleküllerindeki hidrofobik birimlerle etkileşime girerler ve bunun sonucunda çözücü ile etkileşim minimuma iner (Volkin ve Middaugh, 1992). Bu dönüşümsüz açılmadan dolayı mezofilik türlerden elde edilen enzimler ısı kararlı değildirler.

Araştırmacılar, termozimlerin yüksek sıcaklıklarda fonksiyonlarını açıklayabilecek yeni amino asitler, kovalent modifikasyonlar veya yapısal motifler bulamamıştır (Fields, 2001). Isıl kararlılık, bir proteinin bazı amino asitlerinin ve 3 boyutlu yapısında mevcut olan hidrojen bağları, iyon-çifti etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler gibi doğal etkileşimlerinin değişimi ile ortaya çıkan küçük yapısal modifikasyonların sonucu kazanılan bir özellik olarak görülmektedir (Scandurra vd., 1998). Bölge spesifik mutasyon denemeleri ve termozimler ile mezofilik organizmalardan elde edilen enzimler olan mesozimlerin yapısal ve kararlılık karşılaştırmaları, termozimlerin kararlılığına dikkate değer ölçüde katkı sağlayan bazı önemli faktörlerin olduğunu ortaya koymuştur (Fontana, 1991; Ladenstein ve Antranikian, 1998). Ancak, kararlılığı destekleyen tek bir evrensel mekanizma yoktur çünkü ısı kararlılığın moleküler mekanizması spesifik enzimlere göre değişmektedir (Vieille vd., 1996). Kararlılığa katkıda bulunan faktörler, ilave moleküller arası etkileşimleri (hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları, metal bağlanması gibi) ve konformasyonel yapıları (daha rijid, sıkı

paketlenme,  $\alpha$ -sarmal kararlılığı ve düşük açılma entropisi gibi) içermektedir (Li vd., 2005).

Hipertermofilik enzimler, enzimlerin gelişimi, kararlılığı ve aktivite mekanizmaları, protein yapı-fonksiyon ilişkileri ve uç şartlar altında biyokatalizi incelemek için model sistemler haline gelmiştir. Bu uygulamalar, genlerin hipertermofillerden klonlanıp mezofilik konakçılarda ekspres edilmesi ile kolaylaşan protein saflaştırma ve karakterizasyon gibi moleküler biyoloji ve biyokimyasal çalışmalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Arkeal ve bakteriyal hipertermofillerin çeşitliliği, gelişen yeni biyokimyasal uygulamalar için enzim seçiminde büyük bir havuz oluşturmaktadır. Bu alanın geleceği oldukça çekici ve sınırsızdır (Vieille ve Zeikus, 2001).

### **1.6. Hipertermofillerden Elde Edilen Genlerin Mezofillerde Klonlanması ve Ekspresyonu**

Doğal ve rekombinant hipertermofilik enzimlerin özellikleri karşılaştırıldığında, *E. coli*'de ekspres edilen hipertermofilik enzimlerin büyük çoğunluğunun, doğal enzimin uygun katlanma (Grattinger vd., 1998), ısı kararlılık ve yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite (Tomschy vd., 1993; Vieille vd., 1995; Arnone vd., 1997; Andra vd., 1998; Ghosh vd., 1998) gibi biyokimyasal özelliklerinin tamamını muhafaza ettiği görülmektedir. Hipertermofillerden elde edilen birkaç protein, tam olarak ısı kararlı olabilmek için tuzlar veya poliaminler gibi dış faktörlere veya translasyon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç duyabilirken, bu proteinlerin çoğu doğası gereği ısı kararlıdır ve fizyolojik şartlarının altında olan 60 °C'de bile uygun bir şekilde katlanabilmektedirler. Birçok hipertermofilik enzimin *E. coli*'de gereği gibi ekspres olup katlandığı gerçeği bu enzimlerin çalışılmalarını kolaylaştırmıştır. Çünkü hipertermofilik mikroorganizmaları büyütmeğe, *E. coli*'yi büyütmeğe ve enzimi buradan saflaştırmak daha kolaydır. Rekombinant hipertermofilik proteinlerin doğru biçimde katlandığı ile ilgili başka bir delil de bu proteinlerin kristal yapılarının mezofilik homologlarına benzer olmasıdır (Yip vd., 1995; Knapp vd., 1997; Russell vd., 1997; Tahirov vd., 1998; Isupov vd., 1999; Maes vd., 1999). Rekombinant ve doğal hipertermofilik protein yapılarının benzer olduğu görüşü, hem doğal hem de rekombinant enzimlerin ayrı ayrı kristallendirilme çalışmaları ile oldukça yaygın bir şekilde kabul edilen bir görüş haline gelmiştir (Aguilar vd., 1997). Ancak, başarısız olan çalışmalar genellikle bildirilmediği için bütün hipertermofilik proteinlerin mezofilik

ortamda ekspres edilip edilemeyeceği tam olarak açık değildir. Şimdiye kadar, *E. coli*'de ekspres edilen bütün hipertermofilik enzimlerin %10'undan azının doğal organizmadan saflaştırılan enzimlerden farklı kararlılık, katalitik ve yapısal özellikler gösterdiği belirlenmiştir (Matussek vd., 1998; Cacciapuoti vd., 1999).

### 1.7. *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

*Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 suşu Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan alınan su örneklerinden izole edilmiştir. Bakteri izolasyonu, zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Kestanbol Kaplıcası Çanakkele'nin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcası'nın yerden çıkış sıcaklığı 73 °C'dir. İzolatın, tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, "National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria"da 14238 numarası ile depolanan termofilik izolatın, basil morfolojisine sahip olduğu, spor oluşturabildiği ve katalaz enzimi üretebildiği gözlenmiştir (Dülger, 2003).

Tablo 2. *G. caldxylosilyticus* TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri

Özellik	Sonuç	Özellik	Sonuç
Gram Boyama	+/-	Anaerobik Büyüme	-
Spor Boyama	+	Glukoz fermantasyonu	+
Katalaz Üretimi	+	Mannitol fermantasyonu	+
Jelatin Hidrolizi	+	Arabinoz fermantasyonu	+
Nişasta Hidrolizi	+	Ksiloz fermantasyonu	+
VP Testi	-	%2-5 NaCl'de büyüme	+
Sitrat Kullanımı	-	%7-10 NaCl'de büyüme	-
Propiyonat Kullanımı	+	30-37 °C'de Büyüme	-
İndol testi	-	40-70 °C'de Büyüme	+

## 1.8. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Enzimler hayatın birçok alanında tarihin başlangıcından beri önemli bir rol oynamaktadırlar. Toplumlar enzimleri, ne olduklarını ve nasıl çalıştıklarını anlamadan binlerce yıl kullanmışlardır. Geçen birkaç nesil boyunca, bilim enzimlerin sırrını çözmüş ve bu bilgiyi bu olağanüstü maddeleri değişik uygulama alanlarında daha iyi bir şekilde kullanmak için geliştirmiştir.

Enzim endüstrisi, modern biyoteknolojinin araçlarının kullanılmasıyla birçok üretim işlemini geliştirmek üzere önemli derecede gelişme kaydetmektedir. Daha az miktarda enerji, su ve hammadde tüketimi ile daha az atık ve çevresel kirlilik bu teknolojinin hedef yararları arasındadır.

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonu, karakterizasyonu ve klonlanması üzerine ilgi gittikçe artmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile enzimlerin stereoseçiciliği, substrat özgünlüğü ve genel performansı değiştirilebilmekte ve özel amaçlara uygun enzimler üretilebilmektedir. Bu yöntemlerin kullanımı ayrıca saf enzimlerin ekonomik ve bol miktarlarda üretimini de sağlamaktadır.

TÜBİTAK 106T696 nolu proje tarafından desteklenen bu çalışmanın amacı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü araştırmacıları Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI tarafından Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan izole edilen *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan ısı kararlı fosfotriesteraz homolog protein (PHP) geninin klonlanması, *E. coli*'de bol miktarda ekspres edilip saflaştırılması ve doğal substratı bilinmeyen bu enzimin aktivite gösterebileceği substratların belirlenip biyokimyasal olarak karakterize edilmesidir.

PHP'lerin varlığı çok az sayıda mikroorganizmada bildirilmiştir. Ayrıca PHP kodlayan genlerin klonlanması ve ekspres edilip ayrıntılı biyokimyasal karakterizasyonun yapıldığı çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, termofilik bir bakteri olan *G. caldxylosilyticus* TK4'den klonlanıp *E. coli*'de ekspres edilen enzimin saflaştırılıp ileri derecede karakterize edilmesi ile birlikte bu alandaki eksiklikler bir nebze olsun giderilmiş ve literatüre PHP'lerin enzimatik aktivitesi ile ilgili çok önemli veriler sunulmuş olacaktır. Ayrıca elde edilecek enzimatik aktivitelerle birlikte bu enzimin endüstriyel ve/veya klinik açıdan kullanılabilirliği de araştırılabilecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
PCR	Bio-Rad	MJ Mini Personal
DNA Elektroforezi	Owl Separation Systems	Easy Cast B1A
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Ligasyon Fırını	Nüve	ES110
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Otoklav	Tomy	SS-325
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280
Steril Kabin	Tezsan	—

### 2.1.2. Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyonu
<i>EcoR</i> I	Fermentas	10 U/μL
<i>Hinf</i> I	Fermentas	10 U/μL
<i>Bam</i> H I	Fermentas	10 U/μL
<i>Nde</i> I	Fermentas	10 U/μL
T4 DNA Ligaz	Promega	3 U/μL
T4 DNA Ligaz, HC	Promega	20 U/μL
GoTaq Flexi DNA Polimeraz	Promega	5 U/μL

### 2.1.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal maddeler ve çözücüler	Fluka, Sigma, Merck
Plazmit DNA İzolasyon Kiti (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems)	Promega
Genomik DNA İzolasyon Kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit)	Promega
pGEM-T Vektör Sistemi (pGEM-T Easy Vector System I)	Promega
PCR Ürünlerini Temizleme Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System )	Promega
Protein Saflaştırma Kiti (MagneHis Protein Purification System)	Promega
DNA Standardı (1 kb DNA Ladder)	Promega
DNA Standardı (100 bp DNA Ladder)	Promega
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Markers )	Promega

### 2.1.4. Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. PCR’da kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Sırası	Tm (°C)	Sentezleyen Firma
PteF1	5’-GCTTCATCCAGAGTATCATCGTCC-3’	57,9	IONTEK
PteF2	5’-AATGGGGGTACTAGAGACAACG-3’	57,0	IONTEK
PteR1	5’-CGTCCCATCAATGCCATTCTCG-3’	59,5	IONTEK
PteF3	5’-CCATATGTACATTCAGACTGTCCTTGGG-3’	59,5	IDT
PteR3	5’-CGGATCCGTCAATTAACCTTCTTTCCG-3’	60,3	IDT

### 2.1.5. Kullanılan Suşlar

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* suşları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* suşları

Tür	Suş	Genotip	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	JM101	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB)</i> [F’ <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ]	Klonlama hücresi
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $λ$ (DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup>	Ekspresyon hücresi

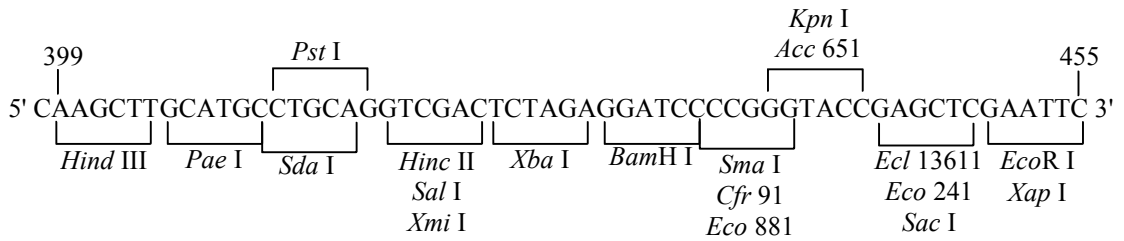
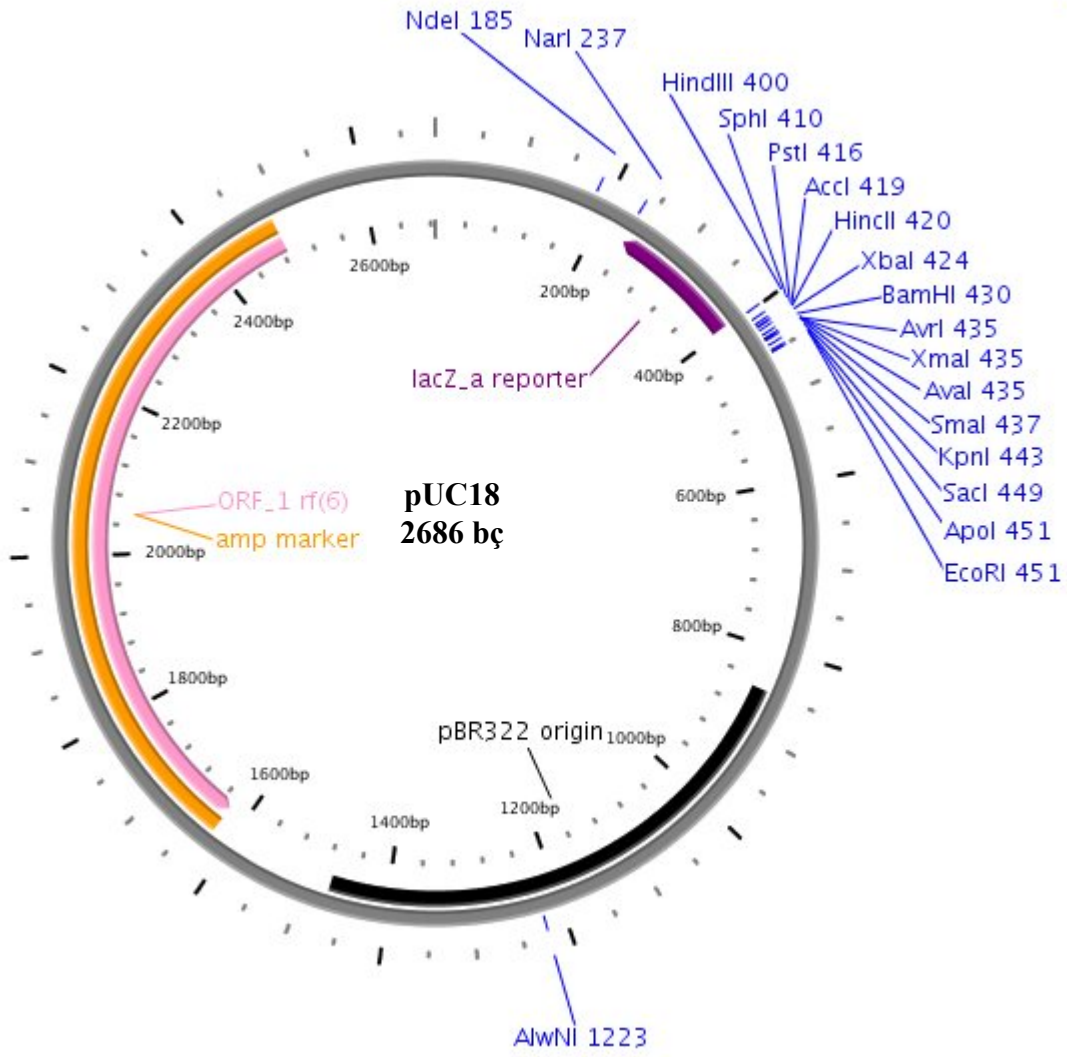
### 2.1.6. Plazmitler

Çalışmada kullanılan plazmitler Tablo 8’de verilmiştir.

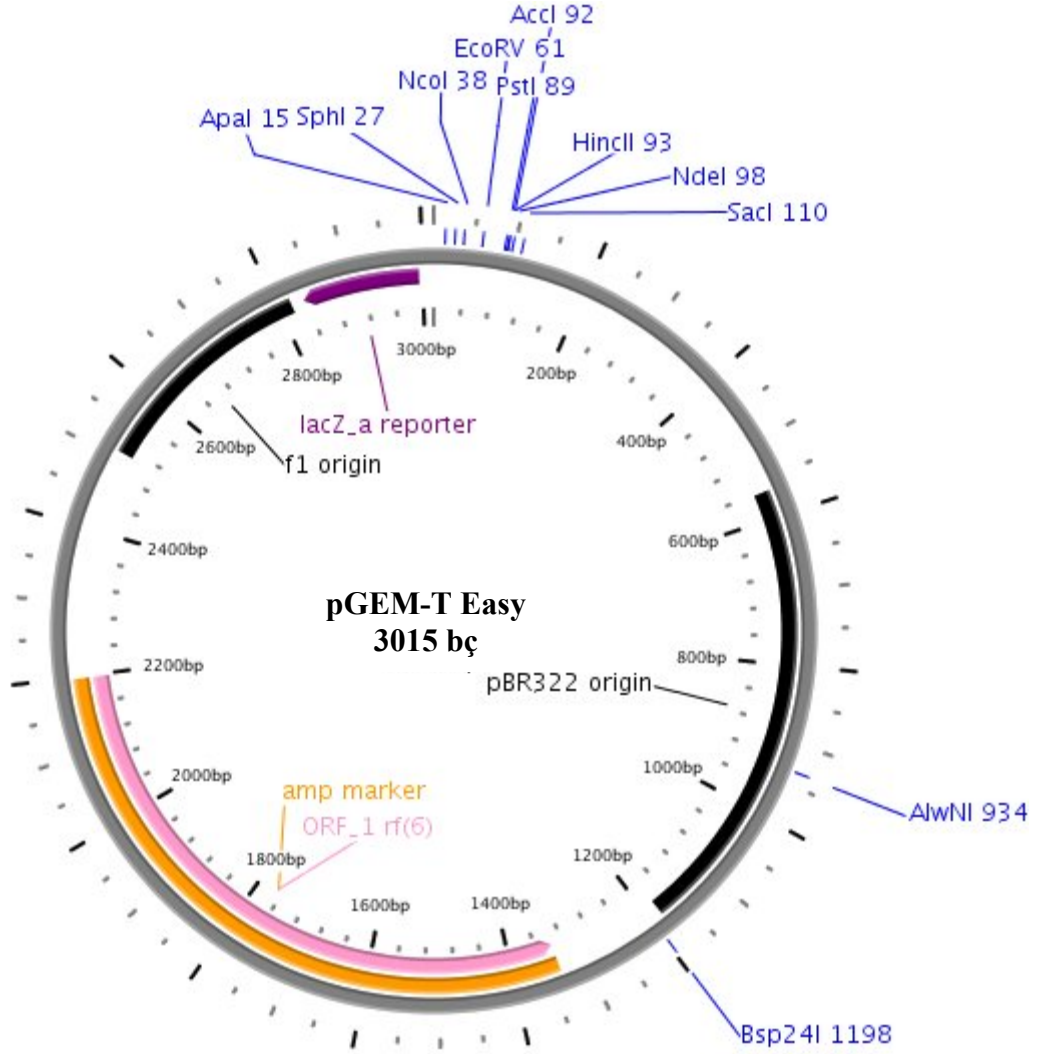
Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

Plazmit Adı	Firma	Kullanım Amacı
pUC18	Promega	Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için
pGEM-T Easy	Promega	İnvers PCR ürünlerini klonlamak için
pET-28a(+)	Novagen	Ekspresyon vektörü

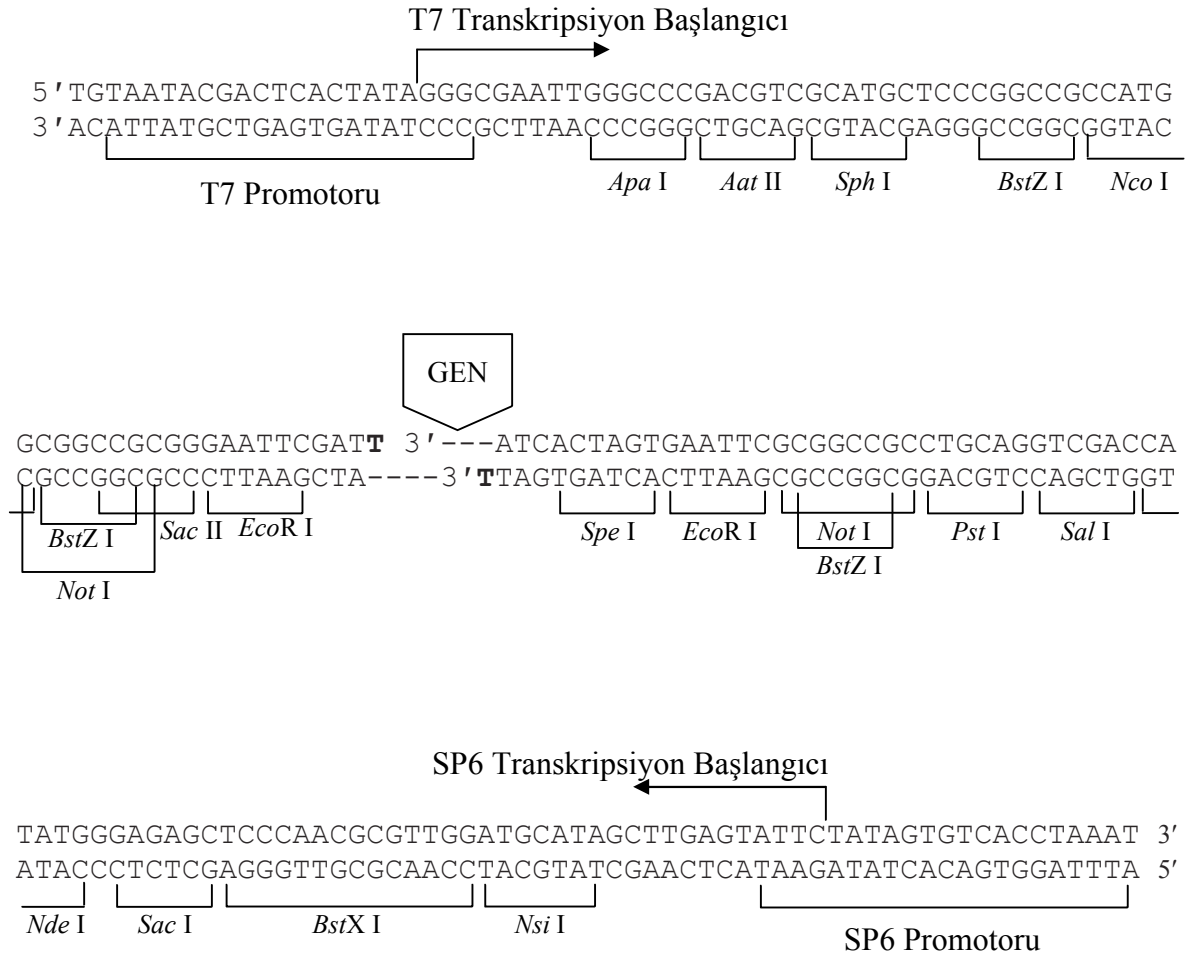




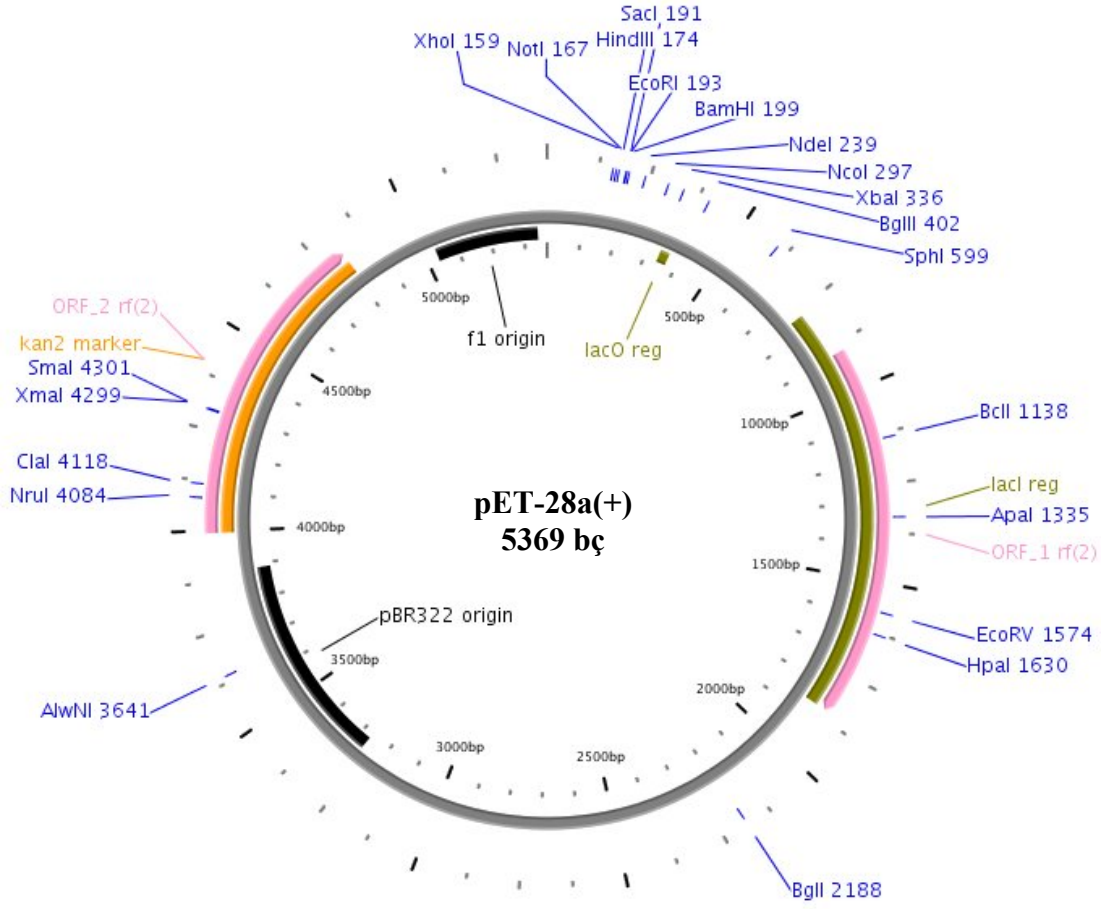
Şekil 10. pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijini, *LacZ* genini ve amfisilin direnç genini içeren harita (Dong vd., 2004; URL-3, URL-4 ve URL-5, 2009).



Şekil 11. pGEM-T Easy vektörünün haritası (Dong vd., 2004; URL-5 ve URL-6, 2009).



Şekil 12. pGEM-T Easy vektörünün promotoru ve çoklu klonlama bölgesi. Üst zincir T7 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA sırasını, alt zincir ise SP6 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA sırasını ifade etmektedir (URL-7, 2009).



Şekil 13. pET-28a(+) vektörünün haritası (Dong vd., 2004; URL-5 ve URL-8, 2009).

Bgl II T7 Promotoru → lac Operatörü  
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC

Xba I rbs  
 CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA

Nco I His Tag  
 CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC  
 MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySer

Nde I Nhe I T7 Tag BamHI EcoRI Sac I Sal I  
 CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCTGA  
 HisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArg

Hind III Eag I Not I Xho I His Tag  
 CAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC  
 GlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd

Bpu1102 I T7 Terminatörü  
 GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCT  
 CTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Şekil 14. pET-28a(+) vektörünün *lac* operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini (rbs), His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası (URL-9, 2009).

### 2.1.7. Sıvı ve Katı Besiyerleri

- Luria-Bertani (LB) Besiyeri: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi (Maniatis vd.,1989).

- Luria-Bertani Agar (LB Agar) Besiyeri: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Hacmi 1000 mL'ye tamamlanan çözeltiye 15,0 g agar ilave edilip 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi (Maniatis vd.,1989).

### 2.1.8. Çözeltiler ve Tamponlar

#### 2.1.8.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

- Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi): 1,0 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.

- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

- 0,1 N NaOH içinde %0,1 SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

#### 2.1.8.2. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Jel Yükleme Boyası (6X): 25,0 mg bromofenol mavisi ve 3 mL gliserol saf su ile iyice karıştırılıp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

- EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0): 18,61 g EDTA.2H<sub>2</sub>O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-Asetik Asit-EDTA Çözeltisi (50X TAE): 24,2 g Tris, 5,7 mL glasiyal asetik asit ve 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisinin steril saf su ile iyice karıştırılıp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (1X TAE): 20 mL 50X TAE çözeltisinin hacminin saf su ile 1000 mL'ye tamamlanması ile elde edildi.
- Etidiyum Bromür Çözeltisi (10 mg/mL): 100 mg etidiyum bromür saf suda çözümlenerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.8.3. Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözümlenerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözümlenerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrlamid/Bisakrlamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrlamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrlamid saf suda çözümlenerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bakteri stoğu hazırlamak için kullanılacaksa otoklavda steril edildi.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptolanolün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.

- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

- β-Naftil Asetat Çözeltisi (30 mM): 11,4 g β-naftil asetatın aseton ile çözülüp hacminin 2 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

#### 2.1.8.4. Tampon Çözeltiler

- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.



- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,5): 8,3 mL A çözeltisi ile 91,7 mL B çözeltisi karışımından 13 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 7,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7,4): 0,0386 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 1,0732 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 7,4'e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0): 0,1670 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,1346 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 7,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (40 mM, pH 8,0): 0,0768 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,6009 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu (100 mM, pH 8,0): 0,1862 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 1,5035 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

#### 2.1.8.5. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- Paraokson Çözeltisi (100 mM stok): 21,5  $\mu\text{L}$  paraoksonun hacminin saf su ile 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Paratiyon Çözeltisi (20 mM stok): 5,8 mg paratiyon metanolde çözüldü ve hacmi 1 mL'ye tamamlandı.
- Malatyon Çözeltisi (100 mM stok): 33,0 mg malatyon aseton ile çözüldü ve hacmi 1 mL'ye tamamlandı.
- Ellman's reaktifi: 4 mg 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)'in 1 mM EDTA içeren fosfat tamponunda (100 mM, pH 8,0) çözülmesiyle hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Butirat Çözeltisi (10 mM stok): 1,78  $\mu\text{L}$  *p*-nitrofenil butiratın hacmi asetonitril ile 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

- *p*-Nitrofenil Asetat Çözeltisi (10 mM stok): 1,8 mg *p*-nitrofenil asetatın dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Laurat Çözeltisi (10 mM stok): 3,2 mg *p*-nitrofenil asetatın asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Palmitat Çözeltisi (10 mM stok): 3,7 mg *p*-nitrofenil asetatın asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- $\alpha$ -Naftil Asetat Çözeltisi (10 mM stok): 1,9 g  $\alpha$ -naftil asetatın aseton ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- $\beta$ -Naftil Asetat Çözeltisi (10 mM stok): 1,9 g  $\beta$ -naftil asetatın aseton ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Fast Blue B Tuzu Çözeltisi (%1): 0,1 g Fast Blue B tuzunun saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- SDS Çözeltisi (%5): 0,5 g SDS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Sonlandırma Çözeltisi: Hacimce 2 kısım %1 Fast Blue B tuzu çözeltisi ile 5 kısım %5 SDS çözeltisinin karıştırılması ile hazırlandı.
- Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi (%10): 10 g TCA'nın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Sodyum Karbonat Çözeltisi (%10): 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ün saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

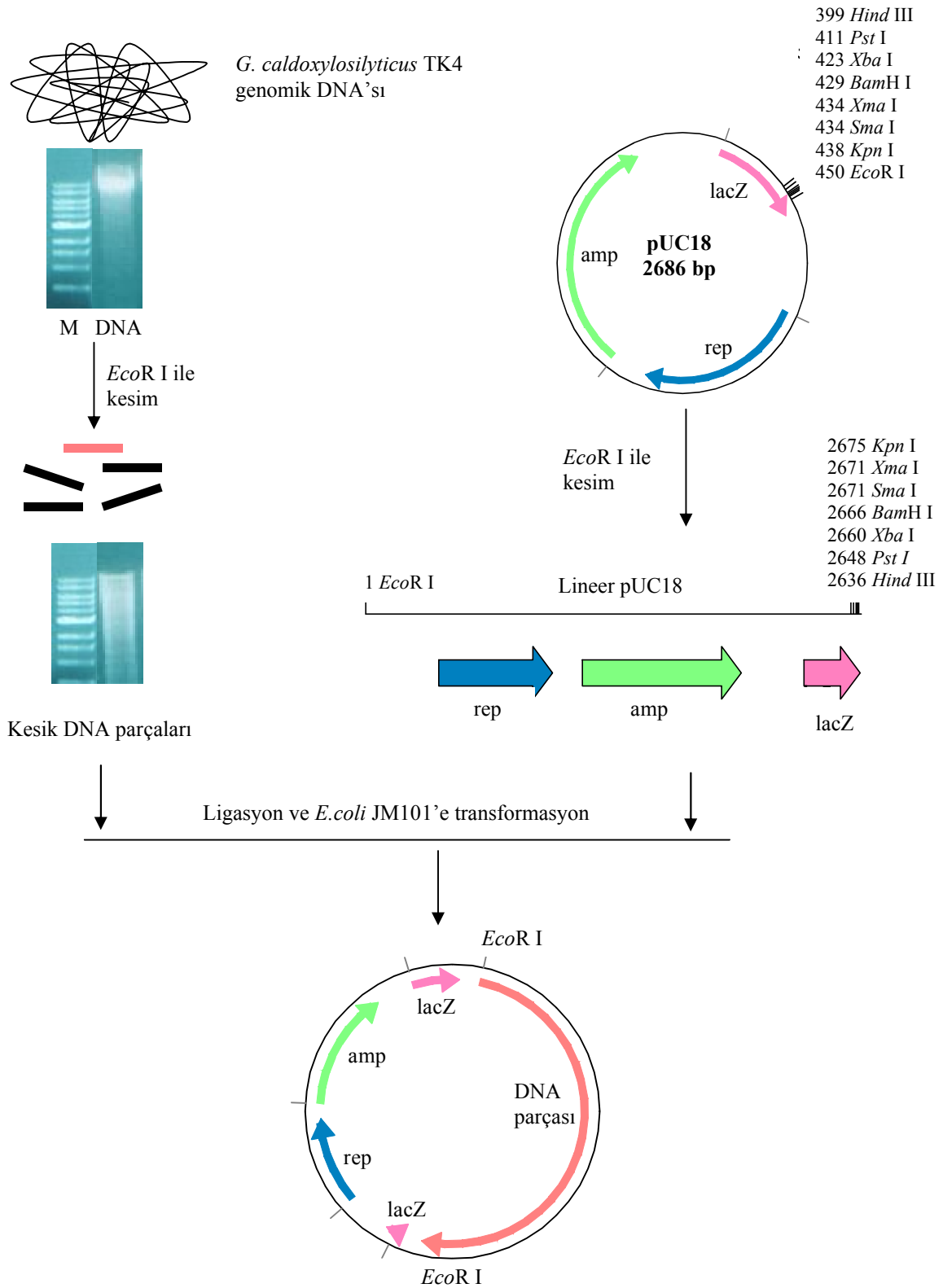
#### 2.1.8.6. Diğer Çözeltiler

- Amfisilin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg amfisilin saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- Kanamisin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg kanamisin sülfat (Kanamisin A) saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- IPTG Çözeltisi (0,2 g/mL): 2 g IPTG saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

- X-gal Çözeltisi (20 mg/mL): 200 mg X-gal dimetilformamid (DMF) ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- Sodyum Asetat Çözeltisi (3 M, pH 5,2): 20,412 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 40 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit çözeltisi ile 5,2'ye ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Filtre ile steril edildi.
- Etanol Çözeltisi (%96): 96 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Etanol Çözeltisi (%70): 70 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g CaCl<sub>2</sub> dihidratın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip 4 °C'de saklandı.
- EDTA Çözeltisi (50 mM): 1,86 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0' e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Lizozim Çözeltisi (10 mg/mL): 10 mg lizozimin saf suyla çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

## 2.2. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesinin oluşturulması amacıyla, *G. caldxylosilyticus* TK4 bakterisinden izole edilen genomik DNA, öncelikle *EcoR* I enzimiyle kesildi. Kesilen DNA parçaları yine aynı enzimle kesilmiş olan pUC18 plazmitine yapıştırıldı ve elde edilen rekombinant vektörler *E. coli* JM101 konakçı hücrelerine aktarıldı (Şekil 15).



Şekil 15. *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sının *Eco*R I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi (Sağlam Ertunga, 2006).

### 2.2.1. *G. caldxylosilyticus* TK4 Suşunun Büyütülmesi

*G. caldxylosilyticus* TK4 bakterisi stok kültürden LB agar besiyerine yayma ekim yapılarak ekildi ve 60 °C’de bir gece bekletilerek büyütüldü. Büyüyen kolonilerden öze yardımıyla bir tane alınıp LB besiyerine ekildi ve çalkalayıcılı hava banyosunda 60 °C’de inkübe edilerek gece kültürü hazırlandı (Dülger, 2003).

### 2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

*G. caldxylosilyticus* TK4 bakterisinden genomik DNA izolasyonu “Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)” kullanılarak yapıldı.

- 1 mL gece kültürü 1,5 mL’lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelte 480 µL 50 mM EDTA çözeltisi içinde pipetlenerek çözüldü ve 120 µL lizozim çözeltisi (10 mg/mL stok) ilave edilerek karıştırıldı.
- 37 °C’de 1 saat inkübasyondan sonra 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelte üzerine 600 µL nüklei lizis çözeltisi ilave edildi ve pipetlenerek süspansiyon edildi.
- Süspansiyon, hücrelerin lizis olması için 80 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu.
- Hücre lizatına 3 µL RNaz çözeltisi ilave edilerek dikkatlice 2-5 kez altüst edildi. Elde edilen karışım 37 °C’de 60 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu.
- RNaz muamelesi yapılmış hücre lizatına 200 µL protein çöktürme çözeltisi ilave edildi ve 20 saniye kadar kuvvetlice vortekslendi.
- Numune buz üzerinde 5 dakika bekletildi ve 13.000 x g’de 3 dakika santrifüj edildi.
- DNA’yı içeren süpernatant, önceden 600 µL oda sıcaklığında izopropanol koyulmuş olan 1,5 mL’lik temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Karışım DNA iplikçikleri görünene kadar yavaşça altüst edilerek karıştırıldı.
- 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve eppendorf tüp temiz ve emici bir kâğıt üzerinde kurutuldu. Pelte üzerine 600 µL oda sıcaklığında %70'lik etanol ilave edildi ve yavaşça altüst edilerek DNA'nın yıkanması sağlandı.

- 13.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve etanol dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Eppendorf tüp temiz ve emici bir kâğıt üzerinde kurutuldu ve oda sıcaklığında 10-15 dakika daha bekletilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Elde edilen DNA üzerine 50 µL DNA rehidrasyon çözeltisi ilave edilerek 65 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu bir saatlik inkübasyon süresi boyunca eppendorf tüplere aralıklı olarak hafifçe vurularak çözeltinin karışması sağlandı.

- Genomik DNA kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.

### 2.2.3. Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)” kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

- pUC18 plazmitini içeren *E. coli* JM101 hücresinden 50 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'deki çalkalayıcı hava banyosunda inkübe edilerek gece kültürü hazırlandı.

- 1-5 mL gece kültürü 10.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorf tüp ters çevrilip kâğıt bir havlu üzerine bastırılarak ortamda kalan fazla besiyerinin tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Bakteri peltesinin üzerine 250 µL hücre süspansiyon çözeltisi ilave edilip vorteksenerek hücrelerin tamamen çözünmesi sağlandı.

- 250 µL hücre lizis çözeltisi ilave edildikten sonra 4 kere altüst edildi. Hücre süspansiyonu berraklaşana kadar (yaklaşık 5 dakika) oda sıcaklığında bekletildi.

- 10 µL alkali proteaz çözeltisi ilave edildikten sonra 4 defa altüst edilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

- 350 µL nötralizasyon çözeltisi ilave edildikten sonra hemen 4 kere altüst edildi.

- Elde edilen bakteriyal lizat 14.000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant, toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarılarak 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 750 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edildi ve 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 250 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edilerek 14.000 x g'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi.

- Minikolon temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirildi ve içine 100 µL nükleaz içermeyen su ilave edildi. 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazmit DNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

#### 2.2.4. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Genomik ve plazmit DNA çözeltilerinin konsantrasyonu, nükleotidlerin heterosiklik halkalarının 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliğinden yararlanılarak ölçüldü (Temizkan ve Arda, 2004). DNA çözeltisi saf su ile 10 kat seyreltilerek 260 nm'de absorbans okundu. 1 absorbans değeri, çift iplikli DNA için 50 µg/mL'ye karşılık gelmektedir. Bu nedenle DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında aşağıdaki (1) eşitliği kullanıldı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL veya ng}/\mu\text{L}) = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times 50 \quad (1)$$

#### 2.2.5. Genomik DNA ve pUC18 Plazmit DNA'sının *EcoR* I ile Kesimi

İzole edilen genomik DNA (gDNA) ve pUC18 plazmit DNA'sı 50 µL son hacimde olacak şekilde *EcoR* I ile ayrı ayrı kesildi.

gDNA/pUC18	10 µg
10X <i>EcoR</i> I tamponu	5 µL
<i>EcoR</i> I (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımları 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra, enzimin deaktivasyonu için 65 °C'de 20 dakika daha inkübe edildi. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde incelendi.

### 2.2.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi moleküler biyolojide oldukça gerekli bir tekniktir ve temeli negatif yüklü DNA'nın bir matriks üzerinde büyüklüğüne göre ayrılmasına dayanır. DNA elektroforezi genellikle bir deniz yosunu özütü olan agaroz kullanılarak gerçekleştirilir. Agaroz jel elektroforezi yapmak amacıyla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-10, 2009)

- %1'lik agaroz jel dökmek için 0,3 g agaroz tartıldı ve 30 mL 1X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında 1 dakika tutularak eritildi.
- Sıcak agaroz çözeltisi 50-55 °C'ye gelinceye kadar oda sıcaklığında biraz bekletildi ve 3 µL etidiyum bromür ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına döküldü.
- Jel donduktan sonra, elektroforez kabı 1X TAE ile dolduruldu. Her bir kuyucuğa ayrı bir yerde karıştırılmış olan 1 µL jel yükleme boyası ve 5 µL DNA yüklendi.
- Yaklaşık 45 dakika boyunca 100 mA'de elektrik akımı uygulandı.
- Jel görüntüleri, jel görüntüleme cihazında Kodak Molecular Imaging System programı yardımıyla incelenip kaydedildi.

### 2.2.7. DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi

Restriksiyon enzimleri ile kesimden sonra çözelti içindeki proteinlerin uzaklaştırılması ve DNA'nın saflaştırılması amacıyla etanol ile çöktürme işlemi yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-11, 2009).

- DNA çözeltisi üzerine tuz konsantrasyonunu 0,3 M'a ayarlamak için hacminin 1/10'u kadar 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edilip iyice karıştırıldı.
- Son hacmin 2,5 katı kadar %96'lık soğuk etanol ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 1 saat bekletildi.
- Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.



- DNA peltesi üzerine 500  $\mu$ L %96'lık soğuk etanol ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi 500  $\mu$ L %70'lik soğuk etanol ile tekrarlandı. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Eppendorf içindeki DNA, etanolün tamamen uzaklaşması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Pelte halindeki DNA 25  $\mu$ L nükleaz içermeyen suda çözülerek -20 °C'de saklandı.

### 2.2.8. gDNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu

*EcoR* I ile kesilen gDNA'dan elde edilen parçalar yine aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla yapıştırıldı.

gDNA kesigi	3 $\mu$ L
pUC18 kesigi	1 $\mu$ L
10X ligaz tamponu	1 $\mu$ L
T4 DNA Ligaz (3 U/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
Nükleaz içermeyen su	2 $\mu$ L

Reaksiyon karışımı 16 °C'deki ligasyon fırınında 1 gece bekletildi.

### 2.2.9. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna göre hazırlandı (Maniatis vd.,1989). Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak amacıyla ve diğer klonlama işlemleri için *E. coli* JM101 suşundan, ekspresyon yapmak amacıyla ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşundan kompetent hücre hazırlandı.

- 3 mL LB besiyerine, daha önceden LB agar besiyerinde büyütülmüş olan *E. coli* suşundan ekim yapıldı ve çalkalayıcılı hava banyosunda 37 °C'de inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı.

- Hazırlanan gece kültüründen 300 µL alınarak 30 mL LB besiyeri içeren erlen içine aktarıldı ve 600 nm'deki optik yoğunluk 0,4-0,6 arasında bir değere ulaşınca kadar yaklaşık 2 saat 37 °C'de büyütüldü.

- Bu değere ulaşan hücre kültürü steril bir falkon tüpüne koyularak 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Tüp içine 4 °C'de soğutulmuş olan 10 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ilave edildi ve hücre peltesi yavaşça pipetlenerek süspansiyon haline getirildi.

- 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Pelte 2 mL 0,1 M soğuk CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde süspansiyon edilerek 200 µL'lik kısımlar halinde steril eppendorf tüplerine bölündü.

- Kompetent hücreler 2 saat buzda bekletilerek transformasyona hazır hale getirildi.

### 2.2.10. Transformasyon

Rekombinant olan ve olmayan pUC18 vektörlerini birbirinden ayırabilmek için 2.2.8. nolu kısımda anlatıldığı şekilde elde edilen ligasyon ürünü hazırlanan kompetent hücrelere aktararak çoğaltıldı. Bunun için aşağıdaki yöntem takip edildi (Maniatis vd.,1989).

- Eppendorf tüp içinde bulunan kompetent hücrelere 3-5 µL ligasyon ürünü ilave edildi ve 30 dakika buz içinde bekletildi.

- 2 dakika 42 °C'de bekletmek suretiyle plazmitin hücre içine girmesi sağlandı.

- Buz içine alınıp 5 dakika bekletilen hücrelere 200 µL LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat bekletildi.

- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyon karışım, 50 µg/mL amfisilinli LB agar içeren, sırasıyla ayrı ayrı 45 µL IPTG ve 45 µL X-gal sürülüp iyice kurutulmuş petrilere yayma ekim yapılarak ekildi ve 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmiti içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

### 2.2.11. Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Petrilerde büyüyen mavi ve beyaz kolonilerden sadece beyaz olanlar seçildi ve 50 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütülüp gece kültürleri

hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL %80'lik steril gliserol çözeltisi ile karıştırılarak gliserol stoğu hazırlandı ve bu stoklar gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. Hazırlanan gece kültürlerinden aynı zamanda kit kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler DNA sıra analizi için Macrogen Inc. (Güney Kore)'ye gönderildi.

### 2.2.12. DNA Sıralarının İncelenmesi

Macrogen Inc.'den gelen DNA sıraları öncelikle protein sırasına dönüştürüldü (URL-12, 2009) ve daha sonra BLAST programında incelendi (URL-13, 2009).

## 2.3. Fosfotriesteraz Homolog Protein (PHP) Geninin Eksik Kalan Baş Kısımının İncers PCR ile Bulunması

İncers PCR, DNA sırası bilinen bir bölgenin hemen yan tarafının DNA'sının *in vitro* olarak çoğaltılması için kullanılan bir metottur (Ochman vd., 1988). Bu metotta normal PCR'daki yönün tersi şekilde yönlenmiş olan primerler kullanılarak PCR yapılır. Bu primerler için kullanılan DNA kalıbı, restriksiyon enzimi ile elde edilmiş DNA parçalarının T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla bir çember oluşturmak üzere kendi üzerine yapışması ile elde edilir.

### 2.3.1. İncers PCR İçin Primer Tasarlanması

PHP geninin başında bulunan yaklaşık 327 bazlık kısmın DNA sırasının incers PCR yardımıyla bulunabilmesi için, bilinen DNA sırasından faydalanarak 2 tane ileri (PteF1 ve PteF2) ve 1 tane geri (PteR1) olmak üzere 3 adet primer tasarlandı ve sentezletirildi (Tablo 6).

### 2.3.2. Genomik DNA'nın *Hinf*I ile Kesimi

*G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı PteF1/PteR1 ve PteF2/PteR1 primer çiftleri arasında kalan, sırası bilinen bölgeyi kesmeyen *Hinf*I enzimi ile kesildi.

gDNA	10 µg
10X R tamponu	5 µL
<i>Hinf</i> I (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra enzimin deaktivasyonu için 65 °C'de 20 dakika daha inkübe edildi.

### 2.3.3. DNA Parçalarının Ligasyonu

Etanol ile çöktürülerek temizlenmiş olan *Hinf*I kesiği DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yapıldı.

Kesik gDNA karışımı	25 µL (yaklaşık 5 µg)
10X ligaz tamponu	25 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	3 µL
Nükleaz içermeyen su	197 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C'de 1 gece bekletildikten sonra etanol çöktürmesi yapılarak protein ve diğer bileşenler uzaklaştırıldı. Böylelikle invers PCR için kalıp DNA elde edilmiş oldu.

### 2.3.4. İvers PCR

İvers PCR için kalıp DNA, primer çiftleri (PteF1/PteR1 ve PteF2/PteR1), dNTP karışımı, tampon ve GoTaq Flexi DNA polimerazın ilavesi ile ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı (Tablo 9) ve uygun şartlarda (Tablo 10) PCR yapıldı. Sonuçlar %1'lik agaroz jelde incelendi.

Tablo 9. İnvrs PCR reaksiyonunun bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X Yeşil GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 10. İnvrs PCR için reaksiyonun şartları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	53	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

### 2.3.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması için “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)” kiti kullanıldı.

- PCR ürününü içeren reaksiyon karışımına, eşit hacimde membran bağlanma çözeltisi ilave edilip karıştırıldı ve elde edilen karışım toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarıldı.

- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi ve minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 700 µL membran yıkama çözeltisi ilave edildi ve 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Yıkama işlemi 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlandı ve 16.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama çözeltisinden gelen etanolün tamamen uzaklaşması için 1 dakika daha santrifüj edildi.

- Minikolon temiz bir eppendorf tüpüne alınıp içine 50 µL nükleaz içermeyen su ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Saf PCR ürünü 4 °C'de saklandı.

### 2.3.6. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünleri, pGEM-T Easy klonlama vektörüne, T4 DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştırıldı.

Saf PCR ürünü	3,5 µL
2X ligaz tamponu	5 µL
pGEM-T Easy vektörü	0,5 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	1 µL

Reaksiyon karışımları 16 °C'de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.

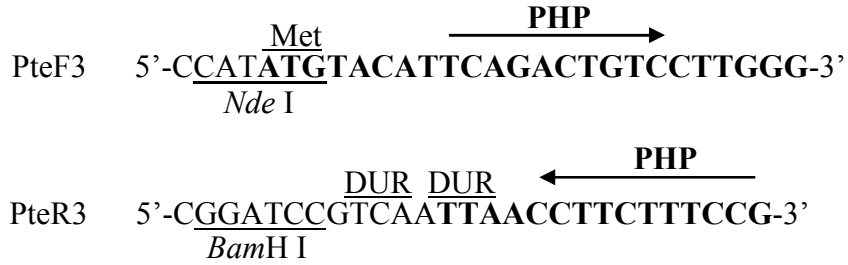
### 2.3.7. *E. coli* JM101'e Transformasyon, Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Ligasyon ürünleri, *E. coli* JM101 hücrelerine aktararak rekombinant plazmitler çoğaltıldı. IPTG ve X-gal sürülmüş amfisilinli LB agar içeren petrilerde büyüyen beyaz koloniler seçilerek alındı ve 50 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL %80'lik steril gliserol çözeltisi ile karıştırılarak gliserol stoğu hazırlandı ve bu stoklar gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. Hazırlanan gece kültürlerinden aynı zamanda kit kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler, DNA sıra analizi için Macrogen Inc. (Güney Kore)'ye gönderildi.

## 2.4. PHP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu

### 2.4.1. PHP Geninin Tamamını Çoğaltmak İçin Primer Tasarlanması

PHP geninin tamamını PCR ile çoğaltıp pET-28a(+) vektörüne aktarabilmek amacıyla bir set ileri (PteF3) ve geri primer (PteR3) tasarlandı (Tablo 6). İleri primer, başlama kodonundan önce *Nde* I kesim bölgesi, geri primer ise gene ait DUR kodonundan sonra tekrar bir DUR kodonu ve *Bam*H I kesim bölgesi içerecek şekilde tasarlandı (Şekil 16).



Şekil 16. PHP geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotid sıraları. Koyu yazılan nükleotidler, PHP geninin başlangıç ve bitiş bölgelerine denk gelmektedir.

### 2.4.2. PHP Geninin Tamamının PCR ile Çoğaltılması

gDNA, primerler, dNTP karışımı, tampon ve GoTaq Flexi DNA polimerazın ilavesi ile bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 11) ve uygun programa (Tablo 12) ayarlanan PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar %2'lik agaroz jelde incelendi.

Tablo 11. PCR reaksiyonunun bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X Yeşil GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
gDNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 12. PCR reaksiyonun şartları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	55	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

### 2.4.3. PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün *BamH I* ve *Nde I* ile Kesilmesi

PCR ürünü “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)” kiti kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra saf PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü ayrı ayrı hem *BamH I* ve hem de *Nde I* ile kesilerek her iki uçtan da sarkık uçların oluşması sağlandı.

PCR ürünü/pET-28a(+) vektörü	10 µL
10X Tango tamponu	4 µL
<i>BamH I</i> (10 U/µL)	2 µL
<i>Nde I</i> (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL



Reaksiyon karışımları 37 °C’de 8 saat inkübe edildikten sonra, 80 °C’de 20 dakika daha bekletilerek enzimlerin deaktivasyonu sağlandı.

#### 2.4.4. Kesik PCR Ürününün Kesik pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu

Her iki uçtan da restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA’lar etanol ile çöktürülerek saflaştırıldı ve T4 DNA Ligaz enzimi ile birbirlerine yapıştırıldı.

Kesik PCR ürünü	10 µL
Kesik pET-28a(+) vektörü	5 µL
10X ligaz tamponu	2,5 µL
T4 DNA Ligaz, HC (20 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	6,5 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C’de 1 gece inkübe edildi.

#### 2.4.5. Rekombinant pET-28a(+) Vektörünün *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu

Ligasyon ürünü, önceden hazırlanan *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetent hücrelerine aktarıldı. Rekombinant vektörü içeren bu hücreler, 45 µL IPTG eklenip iyice yayılarak kurutulmuş olan 50 µg/mL kanamisinli LB agar içeren petrilerin üzerine yayma ekim yapılarak ekildi. 37 °C’de 1 gece bekletilerek plazmiti içeren hücrelerin büyümesi sağlandı. Bu ortamda büyüyen tüm koloniler seçilerek alındı ve 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C’de büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden hem gliserol stoğu hazırlandı hem de plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler *Bam*H I ve *Nde* I enzimleri ile kesilerek gen parçasını içerip içermedikleri kontrol edildi.

#### 2.4.6. PHP’nin *E. coli* BL21(DE3)pLysS’de Ekspresyonu

Rekombinant pET-28a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stoğundan 50 µg/mL kanamisin içeren 3 mL LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C’de

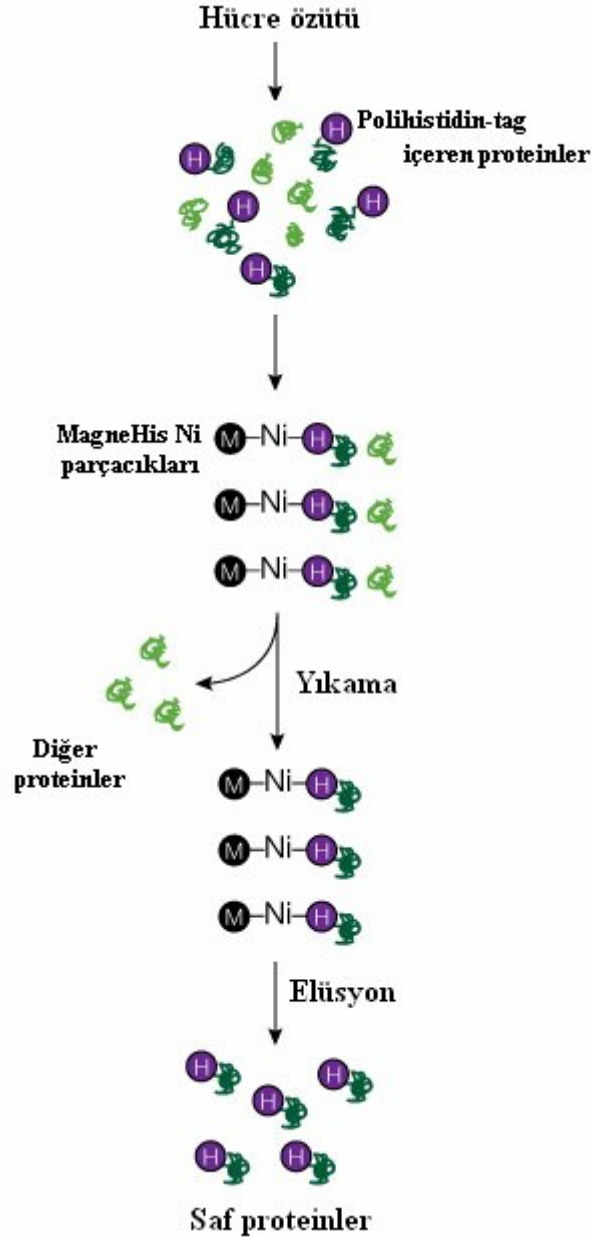
büyütülerek gece kültürü hazırlandı. Hazırlanan bu gece kültürü %1 (v/v) olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin içeren LB'ye aktarılarak OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 olana kadar büyütme işlemine devam edildi. İstenilen optik yoğunluğa ulaşıldığında nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edildi ve 37 °C'de 3 saat inkübe edilerek indüklemeye işlemi gerçekleştirildi.

## 2.5. Filogenetik Analiz

Filogenetik ve moleküler evrim analizi MEGA 4 programı ile, proteinlerin amino asit sıralarının karşılaştırılmasına dayanan "maximum parsimony" metoduna göre yapıldı (Tamura vd., 2007). Bunun için *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'si (TK4PHP), *P. diminuta* PTE'si (P0A434), *Flavobacterium* sp. (strain ATCC 27551) paratiyon hidrolazı (P0A433), *Flavobacterium* sp. MTCC 2495 organofosfat hidrolazı (Q5UB52), *Homo sapiens* fosfotriesteraz-benzeri proteini (Q96BW5), *Rattus norvegicus* fosfotriesteraz-benzeri proteini (Q63530), *Mus musculus* fosfotriesteraz-benzeri proteini (A2AUR4), *E. coli* PHP'si (P45548) ve *M. tuberculosis* PHP'sinin (P96413) amino asit sıraları kullanıldı.

## 2.6. *E. coli* BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen PHP'nin Saflaştırılması

Üç saat indüklemeden sonra hücreler, 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Toplanan hücreler, 1 mL 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponunda süspansiyone edilip, süspansiyona 0,5 mg/mL içerecek şekilde lizozim ilave edildi. 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak hücreler patlatıldı. Daha sonra 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı. Ön saflaştırma işlemi için ham enzim özütü 70 °C'de 10 dakika bekletildi ve 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek denatüre olan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı.



Şekil 17. MagneHis protein saflaştırma sisteminin şematik gösterimi

Ekspres edilen PHP, N ucunda 6 tane histidin birimi içerdiğinden dolayı, paramagnetik nikel parçacıkları içeren “MagneHis Protein Purification System (Promega)” kullanılarak saflaştırıldı (Şekil 17). Bu amaçla aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Isı şok yapılarak *E. coli*'den gelen proteinlerin kısmen uzaklaştırılmış olduğu, eppendorf tüpü içindeki 1 mL ham özüte, nikle bağlanmayı kolaylaştırmak için son konsantrasyonu 500 mM olacak şekilde NaCl ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

- 1 mL'lik protein karışımına 120  $\mu$ L vortekslenmiş nikel ilave edilip, oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem sonucunda N ucunda bulunan 6 tane histidinden dolayı rekombinant protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak özütten ayrılmaktadır.

- Nikel parçalarını tüpün kenarına toplamak için tüp manyetik tutucuya yerleştirildi ve 1 dakika bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Manyetik tutucudan alınan eppendorf tüpüne 1000  $\mu$ L bağlanma/yıkama tamponu ilave edildi. 2 dakika boyunca alt üst edilerek nikel parçalarının yıkanması sağlandı ve tüp 1 dakika manyetik tutucuda tutulduktan sonra süpernatant atıldı.

- Yıkama işlemi 750  $\mu$ L bağlanma/yıkama tamponu kullanılarak iki defa daha tekrarlandı.

- Nikel parçaları üzerine 250  $\mu$ L elüsyon tamponu ilave edildi ve tüp oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edildikten sonra manyetik tutucuya yerleştirildi. Süpernatant yani saf enzim dikkatlice alınıp 4 °C'de saklandı.

## **2.7. PHP'nin Karakterizasyonu**

### **2.7.1. Protein Tayini**

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu$ L ilave edildi. Bu şekilde BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ g/mL olmaktadır.

- Başka bir deney tüpüne saf proteinden 5  $\mu$ L ilave edildi.

- Standartlara ve örneğe hacimlerini 500  $\mu$ L'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.

- Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.

- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100  $\mu$ L ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.

• 650 nm’de absorpsanlar okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek saf proteinin konsantrasyonu hesaplandı.

### 2.7.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE’de analiz edilecek protein örneği SDS ve bir indirgeyici ajan varlığında ısıtılarak denatüre edilir ve deterjan ile kaplanır. SDS kabuğu proteine polipeptid zincirinin büyüklüğüne bağlı olarak negatif bir yük kazandırır. Bu şekilde hazırlanan örnek poliakrilamid jele yüklenir ve yüksek voltaj uygulanarak proteinlerin pozitif elektroda göç etmeleri sağlanır. Proteinler büyüklüklerine bağlı olarak negatif yük kazandıklarından dolayı sadece moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılırlar. Bir proteinin moleköl ağırlığı protein standartlarının jeldeki hareketleri ile karşılaştırılarak hesaplanabilir.

SDS-PAGE Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %5’lik yığıma jeli ve %12’lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 13).

Tablo 13. SDS-PAGE’in bileşenleri

	<b>%5’lik Yığıma Jeli</b>	<b>%12’lik Ayırma Jeli</b>
	<b>Bileşenleri (mL)</b>	<b>Bileşenleri (mL)</b>
Saf su	2,7	3,3
%30’luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	4,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10’luk SDS	0,04	0,1
%10’luk APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg saf protein SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Bu şekilde denatüre olan proteinler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA’de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA’de yürütüldü. Jel, jel boyama çözeltisi içine alındı ve yavaş bir şekilde sallanarak

10 dakika bekletildi. Boyanan jel, fazla boya uzaklaşıp protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edildi.

### 2.7.3. Doğal PAGE

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yığıma jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 14).

Jel hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 35 µg saf protein doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılıp Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü.

Tablo 14. Doğal PAGE'in bileşenleri

	<b>%5'lik Yığıma Jeli</b>	<b>%8'lik Ayırma Jeli</b>
	<b>Bileşenleri (mL)</b>	<b>Bileşenleri (mL)</b>
Saf su	2,74	4,7
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	2,7
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10'luk APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,006

Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra, jel, 2 mL 30 mM β-naftil asetat içeren 100 mL fosfat tamponunda (20 mM, pH 7,0) 15 dakika bekletildi. Daha sonra 40 mg Fast Blue B tuzunun ilave edilmesi ile esteraz bantları görünür hale getirildi (Zhou vd., 2004).

## 2.7.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

### 2.7.4.1. Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini

#### 2.7.4.1.1. Paraokson ile Aktivite Tayini

PTE aktivitesi 1 mM paraoksonun enzim tarafından dietilfosfat ve *p*-nitrofenole hidrolizlenmesi sonucu 400 nm’de meydana gelen absorbanstaki artış takip edilerek belirlenmektedir (Dumas vd., 1989). Bir küvet içinde 970 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0), 10 µL paraokson (100 mM stok) ve 20 µL saf enzim karıştırılarak 400 nm’de 5 dakika süreyle absorbanstaki artış takip edildi. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

#### 2.7.4.1.2. Paratiyon ile Aktivite Tayini

Paratiyon substratı varlığında enzim aktivitesi bazı değişikliklerle birlikte Chu ve arkadaşları (2006) tarafından kullanılan yöntemle belirlendi. 100 µL paratiyon (20 mM stok), 870 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0), 10 µL metanol ve 20 µL saf enzim 50 °C’de 10 dakika bekletildi. Reaksiyon, 1 mL %10’luk TCA ilave edilerek durduruldu. Renk oluşumunu görebilmek için 1 mL %10’luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildi ve 410 nm’de absorbanstaki artış okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

#### 2.7.4.1.3. Malatyon ile Aktivite Tayini

Malatyon ile enzimatik aktivite, hidroliz sırasında açığa çıkan tiyol gruplarının miktarının Ellman’s reaktifi kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi ile belirlenebilir (Irene vd., 2002). 10 µL malatyon (100 mM stok), 470 µL Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 7,4) ve 20 µL saf enzim 50 °C’de 20 dakika bekletildi. 2250 µL 1 mM EDTA içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 8,0) ve 50 µL Ellman’s reaktifi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve 412 nm’de absorbanstaki artış okundu. 1 U enzim aktivitesi,

1 dakikada 1  $\mu\text{M}$  ürün oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

#### **2.7.4.2. Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini**

##### **2.7.4.2.1. Bazı *p*-Nitrofenil Esterleri ile Aktivite Tayini**

*p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları ile aktivite tayini Lee ve arkadaşları (1999) tarafından kullanılan yöntemle yapıldı. Bunun için 10 mM'lık stok substrat çözeltileri kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) karışımları hazırlandı. Daha sonra 2490  $\mu\text{L}$  karışım 10  $\mu\text{L}$  saf enzim ile 50 °C'de 15 dakika bekletildi. Tüpler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorbans okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1  $\mu\text{M}$  *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

##### **2.7.4.2.2. $\alpha$ -Naftil Asetat ve $\beta$ -Naftil Asetat ile Aktivite Tayini**

$\alpha$ -naftil asetat ( $\alpha$ NA) ve  $\beta$ -naftil asetat ( $\beta$ NA) ile aktivite tayini bazı değişikliklerle birlikte Cao ve arkadaşları (2008) tarafından kullanılan yöntemle belirlendi. Bunun için 10  $\mu\text{L}$   $\alpha$ NA ve  $\beta$ NA (10 mM stok) ayrı ayrı, 480  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu (40 mM, pH 8,0) ve 10  $\mu\text{L}$  saf enzim ile 50 °C'de 15 dakika bekletildi. Reaksiyon 900  $\mu\text{L}$  sonlandırma çözeltisi ilave edilerek durduruldu ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanın  $\alpha$ NA için 600 nm'de,  $\beta$ NA için ise 550 nm'de absorbansı okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1  $\mu\text{M}$  ürün ( $\alpha$ -naftol veya  $\beta$ -naftol) oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

#### **2.7.5. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltisi kullanılarak farklı pH'larda tampon çözeltilerle 1:4:95 (v/v/v)



oranında substrat:etanol:tampon karışımları hazırlandı. Bunun için 50 mM konsantrasyonda hazırlanan Mcilvaine (pH 3,0-7,5) ve Tris-HCl (7,5-9,0) tamponları kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan karışımların 2490  $\mu\text{L}$ 'si ayrı ayrı 10  $\mu\text{L}$  saf enzim ile 50  $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika bekletildi. Tüpler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorpsiyon okundu. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH belirlendi (Basaran ve Hang, 2000).

#### **2.7.6. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Aktivite üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltisi ve Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan alınan 2490  $\mu\text{L}$ 'lik kısımlar ayrı ayrı 10  $\mu\text{L}$  saf enzim ile 10  $^{\circ}\text{C}$ 'lik artışlarla birlikte 10-90  $^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda 15 dakika bekletildi. Daha sonra yukarıda belirtildiği şekilde aktivite tayin edildi ve optimum sıcaklık belirlendi (Kim vd., 2006).

#### **2.7.7. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi**

PHP'nin esteraz aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltisi ve Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan alınan 2490  $\mu\text{L}$ 'lik kısımlar, reaksiyon karışımında ayrı ayrı 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde seyreltilmiş olan 10  $\mu\text{L}$ 'lik enzim çözeltileriyle 50  $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika bekletildi. Elde edilen sonuçlar incelenerek optimum enzim konsantrasyonu belirlendi.

#### **2.7.8. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

PHP'nin esteraz aktivitesinin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin belirlenebilmesi için Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0) içinde 5-600  $\mu\text{M}$  son konsantrasyonda *p*NPA içeren etanol:tampon karışımları hazırlandı. Bu karışımlar kullanılarak sabit protein

konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.

### **2.7.9. PHP'nin Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0) içindeki saf enzim 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'lerdeki su banyolarında ayrı ayrı 3, 5 ve 7 gün boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Yildirim vd., 2005; Kim vd., 2006).

### **2.7.10. PHP'nin pH Kararlılığının İncelenmesi**

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM Mcilvaine (pH 3,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C ve 50 °C'de 1, 2 ve 7 gün boyunca inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Basaran ve Hang, 2000).

### **2.7.11. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi**

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Hess vd., 2008).

### **2.7.12. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi**

Aktivite üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacı ile, reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları %10 ve %30 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı (Nawani vd., 2006).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

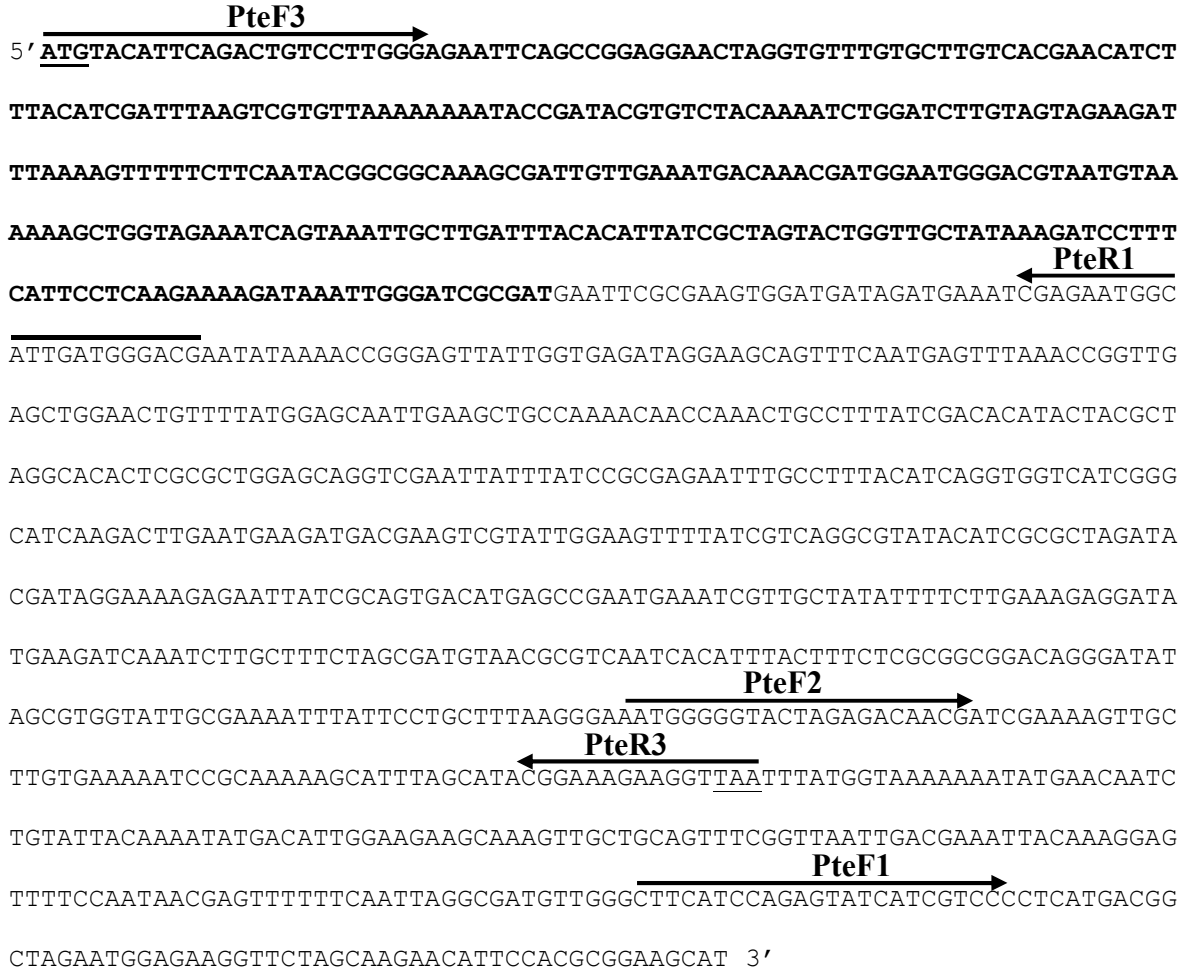
*Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 bakterisinden genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için, bakteriden elde edilen genomik DNA, *EcoR* I enzimi ile kesildi ve oluşan DNA parçaları yine aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne yapıştırıldı. Rekombinant vektörün *Escherichia coli* JM101'e aktarılması ile yaklaşık 250 adet klon elde edildi. Bu klonlardan 50 tanesinden plazmit izolasyonu yapıldı ve bu plazmitlerin DNA sıraları belirlendi. DNA sıralarının protein sırasına dönüştürüldükten sonra BLAST programı ile incelenmesi sonucunda, 814 baz çifti içeren 8 nolu klonun amino asit sırasının, *Bacillus halodurans* C-125 hipotetik proteini, *Bacillus clausii* KSM-K16 fosfotriesterazı ve *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 çinko iyonu içeren putatif hidrolazı ile sırasıyla %75, %64 ve %47 oranında sıra benzerliği gösterdiği tespit edildi. Ayrıca, genin baştan yaklaşık 327 baz çiftinin sırasının eksik olduğu ama bu bölgeden itibaren DUR kodonuna kadar olan kısmın tamamının var olduğu belirlendi (Şekil 18).

#### 3.2. Fosfotriesteraz Homolog Protein (PHP) Geninin Eksik Kalan Baş Kısmının İncers PCR ile Bulunması

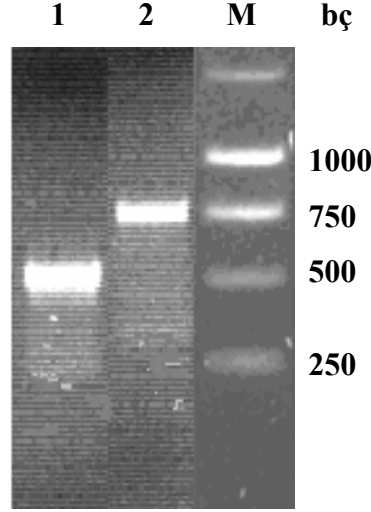
PHP geninin başında bulunan yaklaşık 327 bazlık kısmın DNA sırasının incers PCR yardımıyla bulunabilmesi için *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı *Hinf* I enzimi ile uygun şartlar altında kesildi. *Hinf* I kesiği DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yapıldı ve ligasyon ürünü etanol ile çöktürülerek incers PCR için kalıp DNA hazır hale getirilmiş oldu. PteF1/PteR1 ve PteF2/PteR1 primer çiftleri kullanılarak incers PCR yapıldı. Sonuçların %1'lik agaroz jelde incelenmesi ile PteF1/PteR1 primer çifti kullanıldığı durumda yaklaşık 500 bazlık ve PteF2/PteR1 primer çifti kullanıldığı durumda ise yaklaşık 750 bazlık DNA parçasının varlığı gözlemlendi (Şekil 19).

Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve rekombinant vektör, *E. coli* JM101'e aktarıldı. Büyüyen beyaz kolonilerden izole edilen plazmitler DNA sıra analizine gönderildi. Elde edilen DNA sıralarının protein sırası haline

dönüştürüldükten sonra BLAST programı ile incelenmesi sonucunda genin eksik olan yaklaşık 327 bazlık baş kısmının DNA sırasının da belirlendiği tespit edildi (Şekil 18).



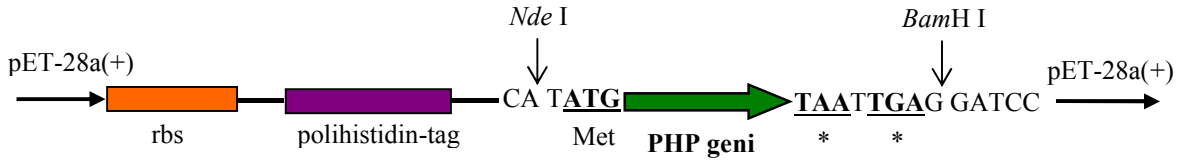
Şekil 18. *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sının PHP genini içeren parçası. Koyu yazılan DNA sırası invers PCR ile bulunan kısmı ifade etmektedir. Altı çizili kodonlar genin başlama ve DUR kodonlarını göstermektedir. Oklarla gösterilen bölgeler invers PCR için kullanılan primerlerin (PteF1, PteF2 ve PteR1) tam DNA sıralarını ve genin tamamını çoğaltmak için kullanılan primerlerin (PteF3 ve PteR3) DNA sıralarının bir kısmını göstermektedir.



Şekil 19. İncers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: PteF1/PteR1 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü, 2: PteF2/PteR1 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü, M: 1 kb DNA standardı

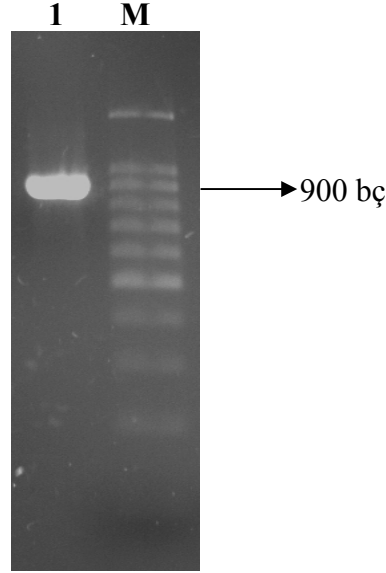
### 3.3. PHP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması

PHP geninin klonlanması için ekspresyon vektörü olarak pET-28a(+) kullanıldı. pET-28a(+) vektörü ribozom bağlanma bölgesi (rbs)'nden sonra ve *Nde* I kesim bölgesinin hemen önünde 6 tane histidin kodlayan kodon içermektedir. PHP geninin tamamı PCR ile çoğaltıldıktan sonra 5'-ucundan *Nde* I ve 3'-ucundan ise *Bam*H I ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne klonlandığı durumda rekombinant vektör, PHP'nin başlama kodonundan hemen önce 6 tane histidin kodlayan kodon içerecektir (Şekil 20). Yani PHP, N ucunda 6 tane histidin amino asidi (polihistidin-tag) içerecek şekilde ekspres edilecektir.



Şekil 20. PHP geninin pET-28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi. Turuncu ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbs), mor ile gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodonlar ise "DUR" sinyallerini göstermektedir.

PHP geninin tamamını çoğaltabilmek için tam DNA sırası dikkate alınarak bir set primer (PteF3/PteR3) tasarlandı ve sentezletildi. *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı ve bu primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda yaklaşık 900 bazlık bir DNA parçasının varlığı gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 21. PCR ile tamamı çoğaltılan PHP geninin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: PCR ile çoğaltılan PHP geni, M: 100 bazlık DNA standardı

Elde edilen PCR ürünü *Nde* I ve *Bam*H I enzimi ile kesilip, yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne klonlandı. Rekombinant vektör, *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarıldı ve gece kültürü hazırlanarak gerektiğinde kullanılmak üzere gliserol stok yapıldı. Stok kültür -20 °C'de saklandı.

GenBank veri tabanında FJ788931 numarası ile depolanan *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP geninin tam DNA sırası, protein sırasına dönüştürüldükten sonra (Şekil 22) BLAST programında incelendi ve amino asit sırasının, başta fosfotriesterazlar (PTE'ler) ve putatif PTE'ler olmak üzere TIM silindir yapısı içeren hidrolazlara benzediği görüldü (Tablo 15).

atg tac att cag act gtc ctt ggg aga att cag ccg gag gaa cta ggt gtt tgt  
M Y I Q T V L G R I Q P E E L G V C  
gct tgt cac gaa cat ctt tac atc gat tta agt cgt gtt aaa aaa aat acc gat  
A C H E H L Y I D L S R V K K N T D  
acg tgt cta caa aat ctg gat ctt gta gta gaa gat tta aaa gtt ttt ctt caa  
T C L Q N L D L V V E D L K V F L Q  
tac ggc ggc aaa gcg att gtt gaa atg aca aac gat gga atg gga cgt aat gta  
Y G G K A I V E M T N D G M G R N V  
aaa aag ctg gta gaa atc agt aaa ttg ctt gat tta cac att atc gct agt act  
K K L V E I S K L L D L H I I A S T  
ggg tgc tat aaa gat cct ttc att cct caa gaa aag ata aat tgg gat cgc gat  
G C Y K D P F I P Q E K I N W D R D  
gaa ttc gcg aag tgg atg ata gat gaa atc gag aat ggc att gat ggg acg aat  
E F A K W M I D E I E N G I D G T N  
ata aaa ccg gga gtt att ggt gag ata gga agc agt ttc aat gag ttt aaa ccg  
I K P G V I G E I G S S F N E F K P  
ggt gag ctg gaa ctg ttt tat gga gca att gaa gct gcc aaa aca acc aaa ctg  
V E L E L F Y G A I E A A K T T K L  
cct tta tcg aca cat act acg cta ggc aca ctc gcg ctg gag cag gtc gaa tta  
P L S T H T T L G T L A L E Q V E L  
ttt atc cgc gag aat ttg cct tta cat cag gtg gtc atc ggg cat caa gac ttg  
F I R E N L P L H Q V V I G H Q D L  
aat gaa gat gac gaa gtc gta ttg gaa gtt tta tcg tca ggc gta tac atc gcg  
N E D D E V V L E V L S S G V Y I A  
cta gat acg ata gga aaa gag aat tat cgc agt gac atg agc cga atg aaa tcg  
L D T I G K E N Y R S D M S R M K S  
ttg cta tat ttt ctt gaa aga gga tat gaa gat caa atc ttg ctt tct agc gat  
L L Y F L E R G Y E D Q I L L S S D  
gta acg cgt caa tca cat tta ctt tct cgc ggc gga cag gga tat agc gtg gta  
V T R Q S H L L S R G G Q G Y S V V  
ttg cga aaa ttt att cct gct tta agg gaa atg ggg gta cta gag aca acg atc  
L R K F I P A L R E M G V L E T T I  
gaa aag ttg ctt gtg aaa aat ccg caa aaa gca ttt agc ata cgg aaa gaa ggt  
E K L L V K N P Q K A F S I R K E G  
taa  
...

Şekil 22. *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin DNA ve protein sırası. (\*\*\*) ile gösterilen kodon genin DUR kodonunu temsil etmektedir.



Tablo 15. *G. caldoxylosilyticus* TK4'den elde edilen PHP'nin amino asit sırasının diğer mikroorganizmalardaki proteinlere benzerliği

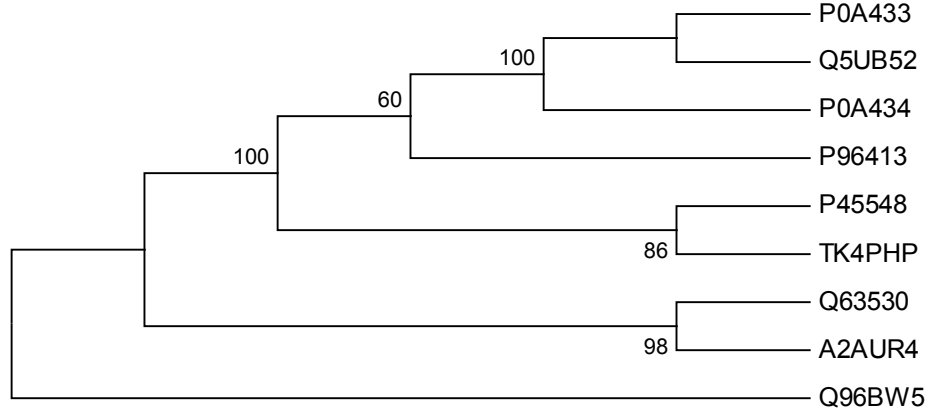
Bakteri Adı	Protein	Benzerlik (%)
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Hipotetik protein	71
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	Fosfotriesteraz	62
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	Putatif fosfotriesteraz	42
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	TIM silindir katlanması içeren metal-bağımlı hidrolaz	41
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	Çinko içeren putatif hidrolaz	43
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	Paraoksonaz	45
<i>Escherichia albertii</i> TW07627	Fosfotriesteraz ailesi proteini	38
<i>Escherichia coli</i> UTI89	Fosfotriesteraz benzeri protein	38
<i>Escherichia coli</i>	Fosfotriesteraz homolog protein	37
<i>Escherichia coli</i> E22	Fosfotriesteraz ailesi proteini	37

*G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinin amino asit sırası, ClustalW programı (URL-14, 2009) kullanılarak, *E. coli* ve *Mycobacterium tuberculosis* PHP'leri ile *Pseudomonas diminuta* ve *Bacillus clausii* KSM-K16 PTE'lerinin amino asit sıraları ile karşılaştırıldı ve proteinin korunmuş bölgeleri tespit edildi (Şekil 23). Karşılaştırma sonucunda, PHP ve PTE'de bulunan, çinkonun koordinasyonunda görev alan 4 histidin ve 1 aspartat biriminin *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde de korunmuş olduğu görüldü. Ayrıca *P. diminuta* PTE'sinde 169. pozisyonda bulunan Lys birimi *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde de tıpkı *E. coli* PHP'sinde olduğu gibi bir glutamat ile yer değiştirmiştir ve bir pozisyon kaymış durumdadır. PHP ve PTE'lerde farklı uzunlukta olan birinci, yedinci ve sekizinci loplardan uzunlukları da beklenildiği gibi *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde daha kısadır. *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde sözü geçen bu loplardan, *P. diminuta* PTE'sindeki loplardan sırası ile 3, 14 ve 9 amino asit daha kısadır.

PDPTE	MQTRRVVLKSAAAAGTLLGGLAGCASVAGSIGTGDRINTVRGPITISEAGFTLT	HEHIC	59	
MTPHP	-----MPELNTARGPIDTADL	GVTLMEHV	26	
TK4PHP	-----MYIQTVLGRIQPEEL	GVCACHELY	25	
EHPH	-----MSFDPT	GYTLAHEHLH	16	
		* *		
Lop 1				
PDPTE	GSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVRGLRRARAAGVRTIVDVSTFDI	GRDVSLLAEVSRA	119	
MTPHP	IMTTEIAQNYPEAWGDEDKRVAGAIARLGELKARGVDTIVDLTVIGL	GRYIPRIARVAAA	86	
TK4PHP	IDLSRVKKNNTDTCLQN----LDLVVEDLKVFLQYGGKAIEMTNDGM	GRNVKKLVEISKL	81	
EHPH	IDLSGFKNVDCRLDQ----YAFICQEMNDLMTRGVRNVIEMTNRYM	GRNAQFMLDVMRE	72	
Lop 2				
PDPTE	ADVHIVAATGLWFDPLSMRLR-----SVEELTQFFLREIQY	GIEDTGIRAGI	169	
MTPHP	TELNIVVATGLYTYNDVPFYFHYLPGAQLDGPEIMTDMFVRD	IEHGIADTGIKAGILK	145	
TK4PHP	LDLHI IASTGCYKDPFIPQEKIN-----WRDEFKWMIDE	LENGIDGTNIKPGVIGE	134	
EHPH	TGINVVACTGYQDAFFPEHVAT-----RSVQELAQEMVDE	IEQGITDGTTELKAGIIAE	125	
Lop 3				
PDPTE	VATTG-KATPFQELVLKAAARASLATGV	VVTHTTAASQRDGEQAAIFESEGLSPSRVCI	228	
MTPHP	CATDEPGLTPGVERVLRVAQAHKRTGAP	ISTHTHAGLRRGLDQQRIFAEEGVDLSRVVI	205	
TK4PHP	IGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKT	TKLPLSTHTTLG-TLALQVELFIRENLPLHQVVI	193	
EHPH	IGTSEGKITPLEEKVFIAAAALHNQTGR	PISHTSFS-TMGLEQLALLQAHGVDLSRVTV	184	
		*		
Lop 7				
PDPTE	GHSDDDDLSTALAAAGYLIGLDHIPHSA	IGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALI	288	
MTPHP	GHCGDSTDVGYLEELIAAGSYLGM	DRFGVDVIS-----PFQDRVNIVARMC	251	
TK4PHP	GHQDLNEDDEVVLEVLSSCVYIALD	TIGKENYR-----SDMSRMKSLLYFL	239	
EHPH	GHCDLKNLDNILKMLDLCAYVQFD	TIGKNSYY-----PDEKRIAMLHALR	230	
		*		
Lop 8				
PDPTE	DQGYMKQILVSN	DWLFGFSSYVTNIMDVMDRVNPD	GMAFIPLRVIPFLREKGV	348
MTPHP	ERGHADKMVLSH	DACCYFDALPEELVPVAMPN--WHY	LHIHNDVIPALKQHGV	309
TK4PHP	ERGEDQILLSS	DVTR-----QSHLLSRGGQGYSV	VLKRFIPALREMGVLETTIEK	290
EHPH	DRGLLNRVMLSM	ITR-----RSHLKANGGYGYDYLL	TTFIPQLRQSGFSQADVDV	281
		*		
PDPTE	ITVTNE	ARFLSPTLRAS	365	
MTPHP	MLVDNE	RRIFERQGGYQ	326	
TK4PHP	LLVKNE	QKAFSIRKEG-	306	
EHPH	MLRENE	SQFFQ-----	292	

Şekil 23. *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin amino asit sırasının (TK4PHP), *P. diminuta* PTE'si (PDPTE), *M. tuberculosis* PHP'si (MTPHP) ve *E. coli* PHP'sinin (EHPH) amino asit sıraları ile karşılaştırılması. Yeşil renk ile boyalı amino asitler tüm sıralardaki korunmuş birimleri, sarı renk ile boyalı aminoasitler PTE'de 169. pozisyonda bulunan Lys biriminin PHP'lerde bir kaymış pozisyonda olarak Glu ile yer değiştirmiş biçimde bulunduğu aminoasitleri, yıldız (\*) ile gösterilen birimler ise binükleer metal merkezi oluşturan amino asitleri göstermektedir. PHP ve PTE'lerde farklı uzunlukta olan birinci, yedinci ve sekizinci loplara ise mavi renk ile gösterilmiştir.

Amino asit sıralarının karşılaştırılması ile yapılan filogenetik analizde *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin *E. coli* PHP'si ile çok yakın bir ilişki içinde olduğu sonucu görülmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. PTE, PHP ve fosfotriesteraz-benzeri proteinlerin filogenetik analizi. Filogenetik ağaç MEGA 4 programı ile *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'si (TK4PHP), *P. diminuta* PTE'si (P0A434), *Flavobacterium* sp. (strain ATCC 27551) paratyon hidrolazı (P0A433), *Flavobacterium* sp. MTCC 2495 organofosfat hidrolazı (Q5UB52), *Homo sapiens* fosfotriesteraz-benzeri proteini (Q96BW5), *Rattus norvegicus* fosfotriesteraz-benzeri proteini (Q63530), *Mus musculus* fosfotriesteraz-benzeri proteini (A2AUR4), *E. coli* PHP'si (P45548) ve *M. tuberculosis* PHP'sinin (P96413) amino asit sıraları kullanılarak çizilmiştir.

### 3.4. PHP'nin Karakterizasyonu

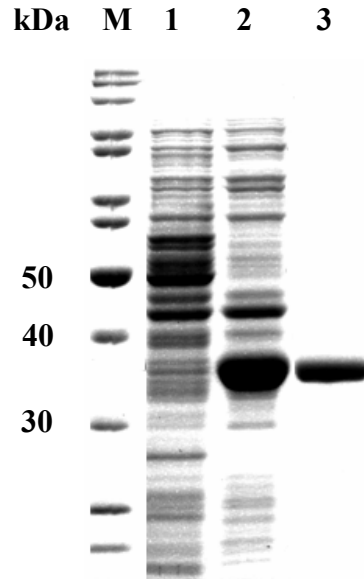
*E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilen PHP, N ucunda 6 tane histidin içerdiğinden dolayı paramagnetik nikel parçacıkları kullanılarak saflaştırıldı. PHP'deki bu histidin birimlerinin azotları nikel parçacıkları ile etkileşerek PHP'nin diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır.

### 3.4.1. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi ve protein standardı olarak BSA kullanıldı. Saf PHP çözeltilerindeki toplam protein miktarlarının yaklaşık olarak 5,0 ile 7,0 mg/mL arasında olduğu belirlendi.

### 3.4.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Yaklaşık 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektrofrez yapıldı. Elektrofrez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda, PHP geninin *E. coli*'de fazla miktarda ekspres edildiği ve kullanılan kit ile etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 25).



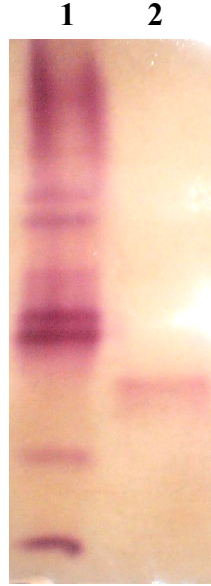
Şekil 25. SDS-PAGE elektrofrez. M: Moleküler ağırlık standartları, 1: İndüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2: IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3: Saf protein

Saf proteinin tek bant halinde olması enzimin farklı molekül ağırlıklı alt birimlerden oluşmadığını veya monomer olduğunu göstermektedir. Standart proteinlerin  $R_f$  değerleri,

bu proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiğe geçirildi ve saf proteinin  $R_f$  değerinden faydalanılarak PHP'nin molekül ağırlığı belirlendi. Yapılan bu hesaplama ile PHP eğer monomer ise molekül ağırlığı yaklaşık 36,5 kDa, monomer değilse bir tek alt biriminin molekül ağırlığının bu değerde olduğu belirlendi. Sadece amino asit sırasından faydalanarak yapılan teorik hesaplamada (URL-15, 2009) PHP'nin molekül ağırlığı 34,58 kDa olarak bulundu. Fakat, PHP geni, pET-28a(+) vektöründe ekspres edildiğinden dolayı başlama sinyalinin önceki polihistidin ve diğer amino asitlerin de göz önüne alınması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan hesaplama sonucunda pET-28a(+) vektöründe ekspres edilen PHP'nin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 36,96 kDa olarak bulundu. Dolayısıyla teorik ve deneysel molekül ağırlıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.

### 3.4.3. Doğal PAGE

Saflaştırılan proteinin esteraz aktivitesi, ilk olarak doğal PAGE ile ortaya koyuldu. Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra, jel,  $\beta$ -naftil asetat ve Fast Blue B tuzu ile muamele edildi ve esteraz bantları görünür hale getirildi (Şekil 26).



Şekil 26. Doğal PAGE. 1: *G. caldxylosilyticus* TK4 hücre içi özütü, 2: Saf protein

Şekil 26'da görüldüğü gibi, saf proteinin yüklendiği kuyucukta mor renkli bir protein bandının varlığı, saf proteinin aktif bir esteraz olduğunu göstermektedir. *G. caldxylosilyticus* TK4'den elde edilen ham özütte birden fazla bant çıkması ise bakteriyi tarafından farklı esterazların üretildiği anlamına gelmektedir.

### 3.4.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

#### 3.4.4.1. Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini

*G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'si ile genel PTE substratları olan paraokson ve paratyon varlığında herhangi bir aktivite elde edilemedi. Malatyon kullanıldığı durumda ise saf enzimin spesifik aktivitesi 2,1 U/mg protein olarak belirlendi.

#### 3.4.4.2. Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini

*p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL), *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP),  $\alpha$ -naftil asetat ( $\alpha$ NA) ve  $\beta$ -naftil asetat ( $\beta$ NA) substratları ile aktivite tayini spektroskopik olarak gerçekleştirildi. Saflaştırılan enzimde, aktivite en fazla kısa zincirli *p*-nitrofenil esterleri olan *p*NPA ve *p*NPB varlığında gözlemlendi (Tablo 16).

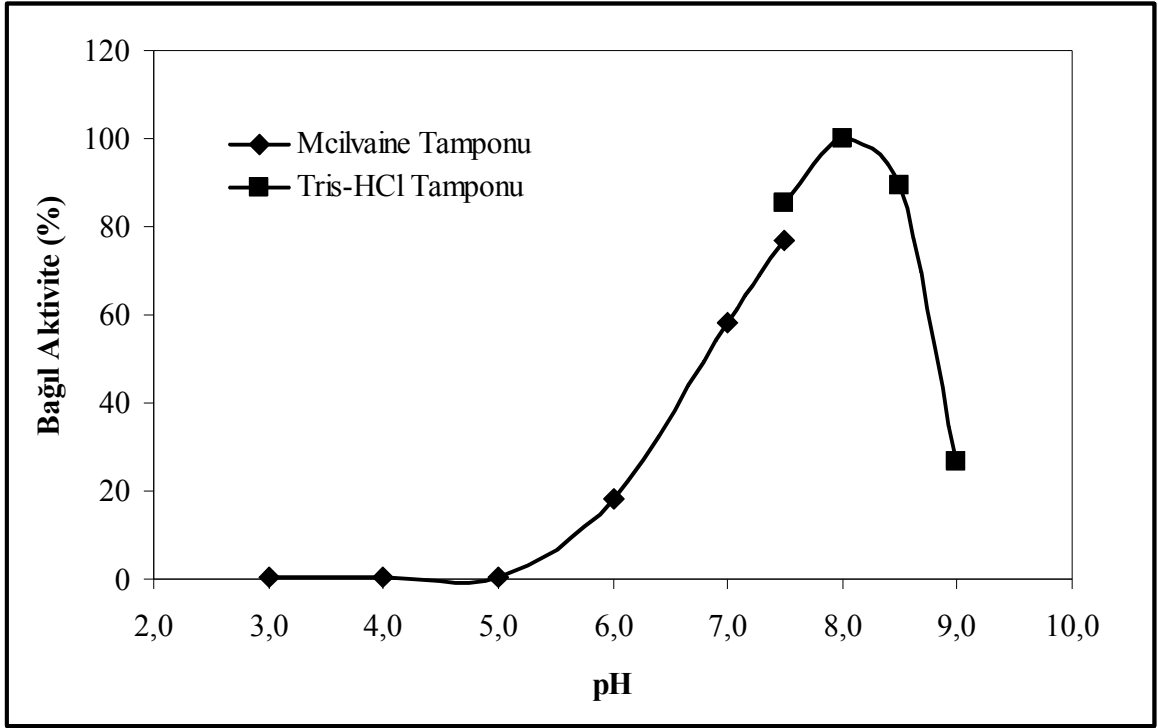
Elde edilen sonuçlara göre, *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin, PTE substratlarından ziyade özellikle *p*NPA ve *p*NPB varlığında yüksek bir esteraz aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bundan dolayı bu aşamadan sonra *p*NPA kullanılarak PHP'nin esteraz aktivitesinin ayrıntılı karakterizasyonu yapıldı. Bu amaçla, pH, sıcaklık, protein konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, bazı metal iyonları ve organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca PHP'nin pH ve ısıl kararlılığı da incelendi.

Tablo 16. Genel esteraz substratları ile elde edilen aktivite değerleri

<b>Substrat</b>	<b>Spesifik aktivite (U/mg protein)</b>
<i>p</i> NPA	73,6
<i>p</i> NPB	73,4
<i>p</i> NPL	9,7
<i>p</i> NPP	14,1
$\alpha$ NA	50,8
$\beta$ NA	62,7

#### **3.4.5. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

PHP'nin esteraz aktivitesinin optimum pH değerini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak pH-%bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 27). Elde edilen grafikten optimum pH'nın 8,0 olduğu, ancak enzimin pH 7,5 ile 8,5 arasında da yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, enzimin pH 5,0'e kadar olan asidik pH değerlerinde hiç aktivite göstermediği, pH 8,5'dan sonra da aktivitesini hızlı bir şekilde kaybettiği görülmektedir.

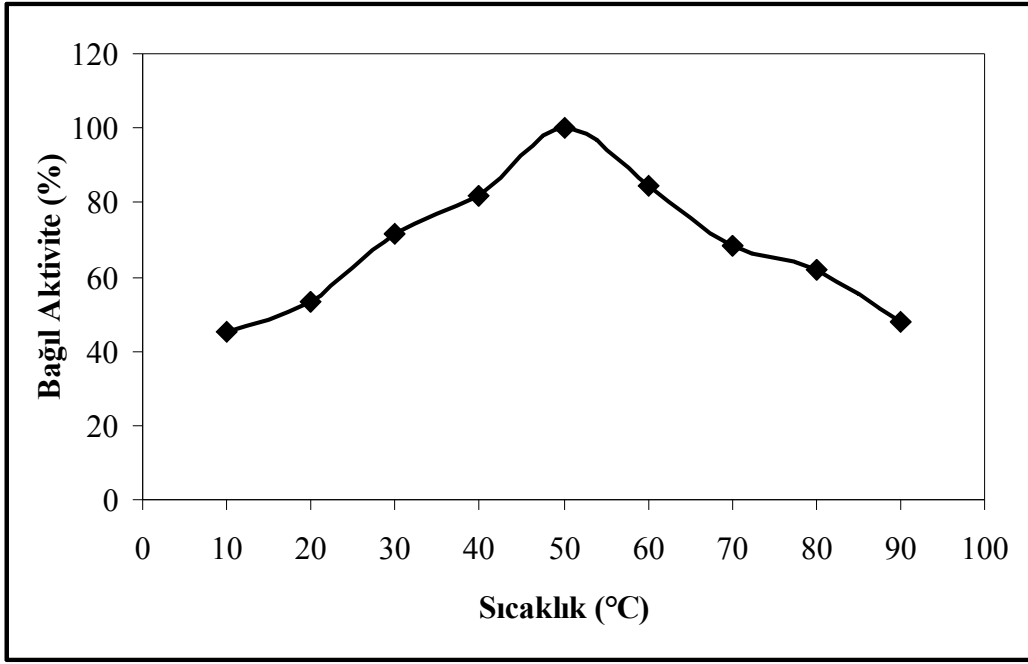


Şekil 27. PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

#### 3.4.6. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine etkisi, 10 °C'lik artışlarla birlikte olmak üzere 10-90 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılarak incelendi ve sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği çizildi (Şekil 28). Enzim aktivitesinin 50 °C'de optimuma ulaştığı ve enzimin 40 ve 60 °C'lerde, optimum aktivitesinin yaklaşık %80'ine sahip olduğu belirlendi. 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim çok hızlı bir şekilde olmamakla beraber aktivitesini kaybetmeye başlamaktadır. Bu aktivite kaybına rağmen, enzim 90 °C'de optimum aktivitesinin yaklaşık %50'sini hâlâ korumaktadır.

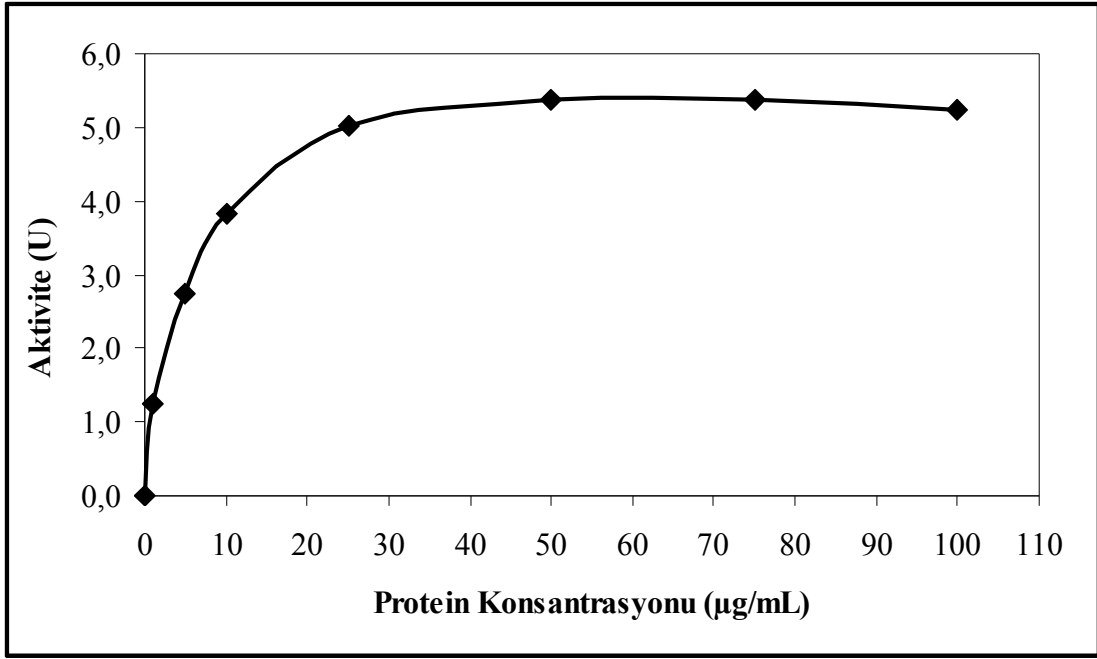




Şekil 28. PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

#### 3.4.7. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

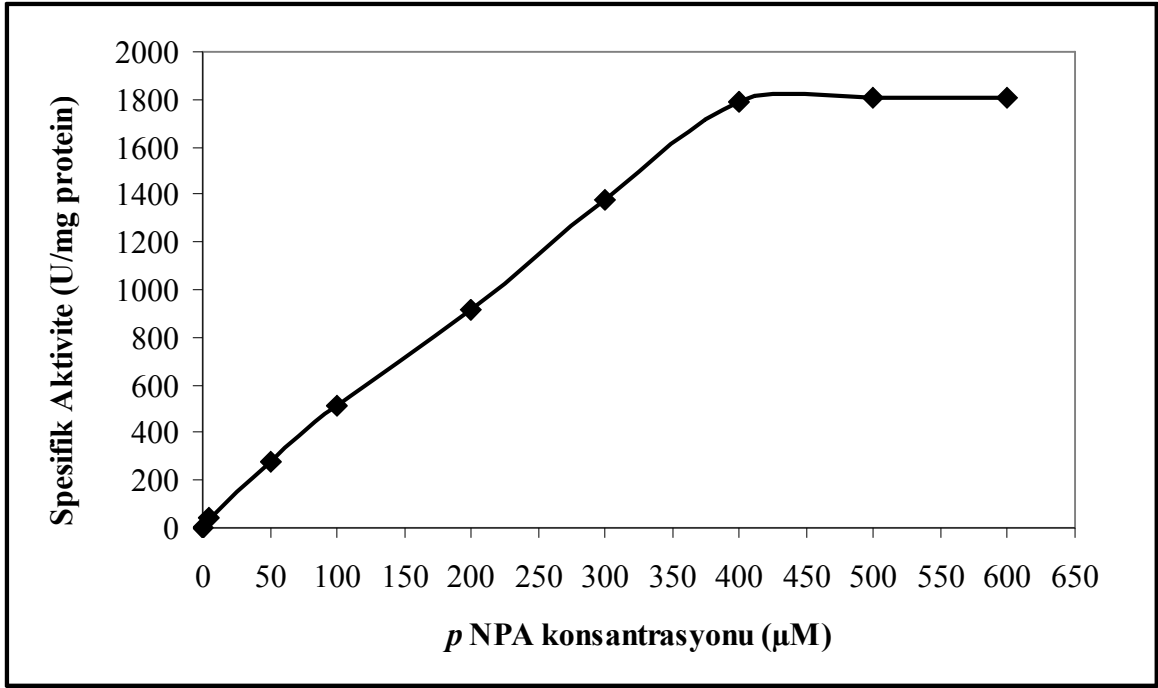
PHP'nin esteraz aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla reaksiyon karışımında ayrı ayrı 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildiğinde, optimum enzim konsantrasyonunun 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olduğu belirlendi (Şekil 29).



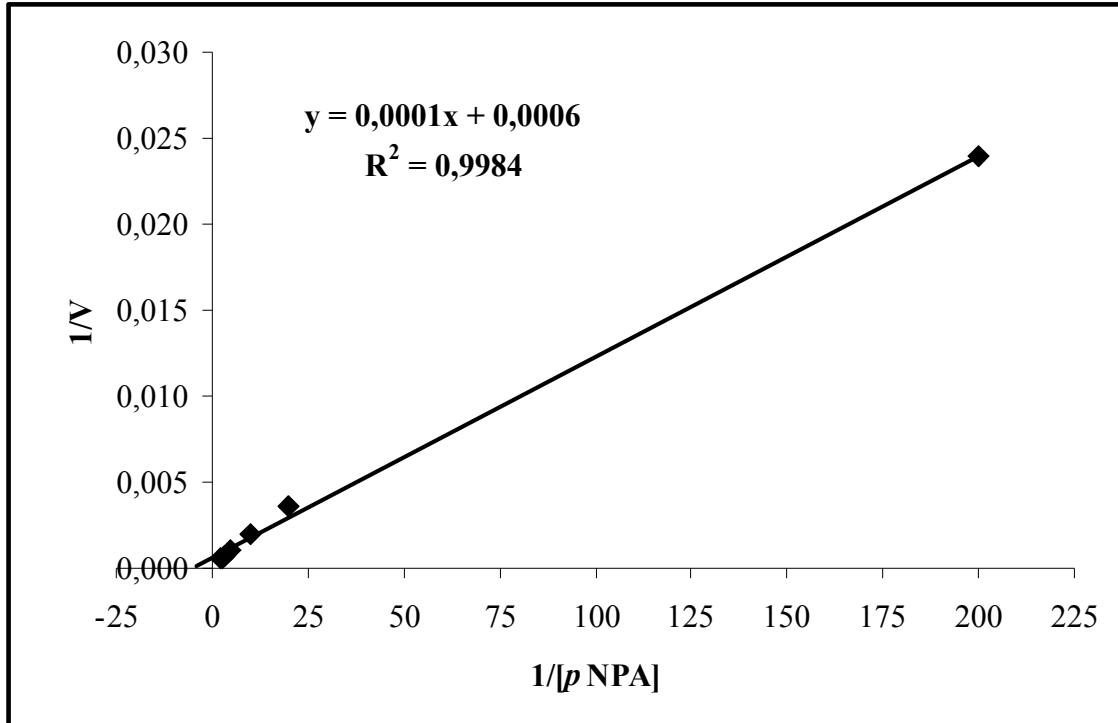
Şekil 29. PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

#### 3.4.8. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla, sabit protein konsantrasyonunda ve 5-600 µM son konsantrasyonda *p*NPA varlığında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluk eğrisi (Şekil 30) ve Lineweaver-Burk (Şekil 31) grafiği çizildi. Substrat doygunluk eğrisinden enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğini takip ettiği ve optimum substrat konsantrasyonunun 400 µM olduğu belirlendi. Lineweaver-Burk eğrisinden ise  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,17 mM ve 1667 U/mg protein olarak tespit edildi.



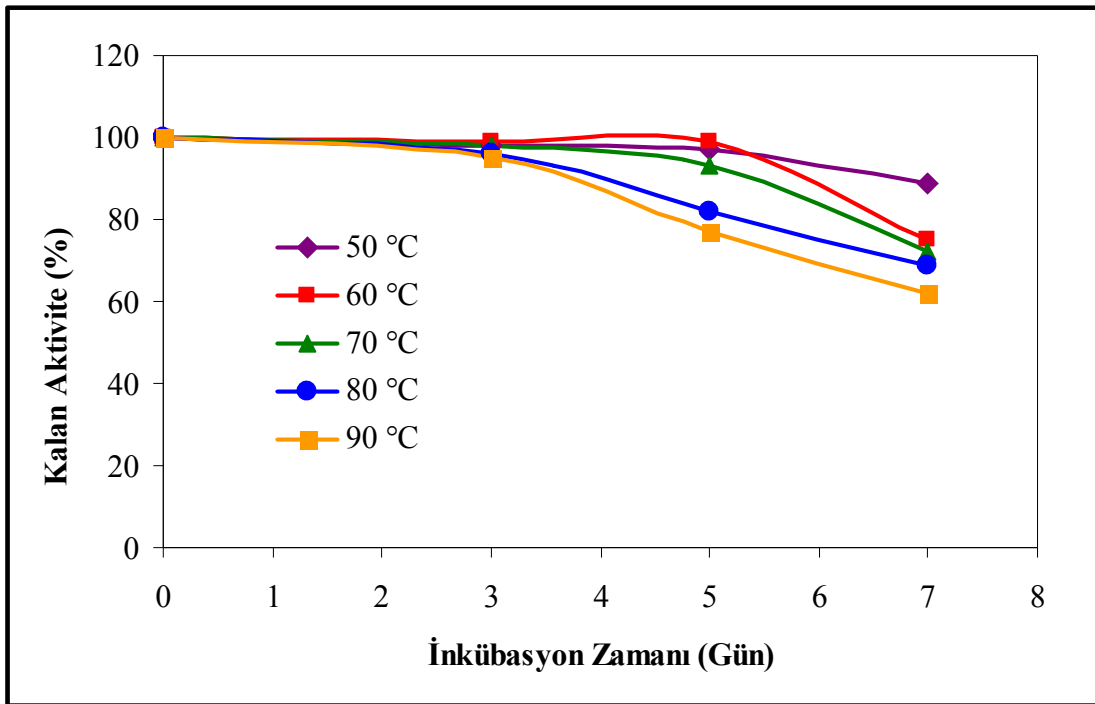
Şekil 30. *p*NPA varlığında PHP'nin substrat doygunluk eğrisi



Şekil 31. *p*NPA varlığında PHP'nin Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.4.9. PHP'nin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0) içindeki saf enzim 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'lerdeki su banyolarında 3, 5 ve 7 gün boyunca inkübe edildi ve bu sürenin sonunda, gerekli işlemler yapılarak optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübasyona maruz bırakılan enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı ve zaman-%kalan aktivite grafiği çizildi (Şekil 32). Enzimin aktivitesinin 3 gün sonunda neredeyse hiç değişmediği, 5 gün sonunda sadece 80 ve 90 °C'lerde yaklaşık %20'lik bir azalma olduğu belirlendi. Enzim belirtilen sıcaklıklarda 7 gün inkübe edildiğinde ise yaklaşık olarak 50 °C'de aktivitenin %90'ının, 60 °C'de %75'inin, 70 ve 80 °C'lerde %70'inin ve 90 °C'de ise %60'ının hâlâ korunduğu tespit edildi.

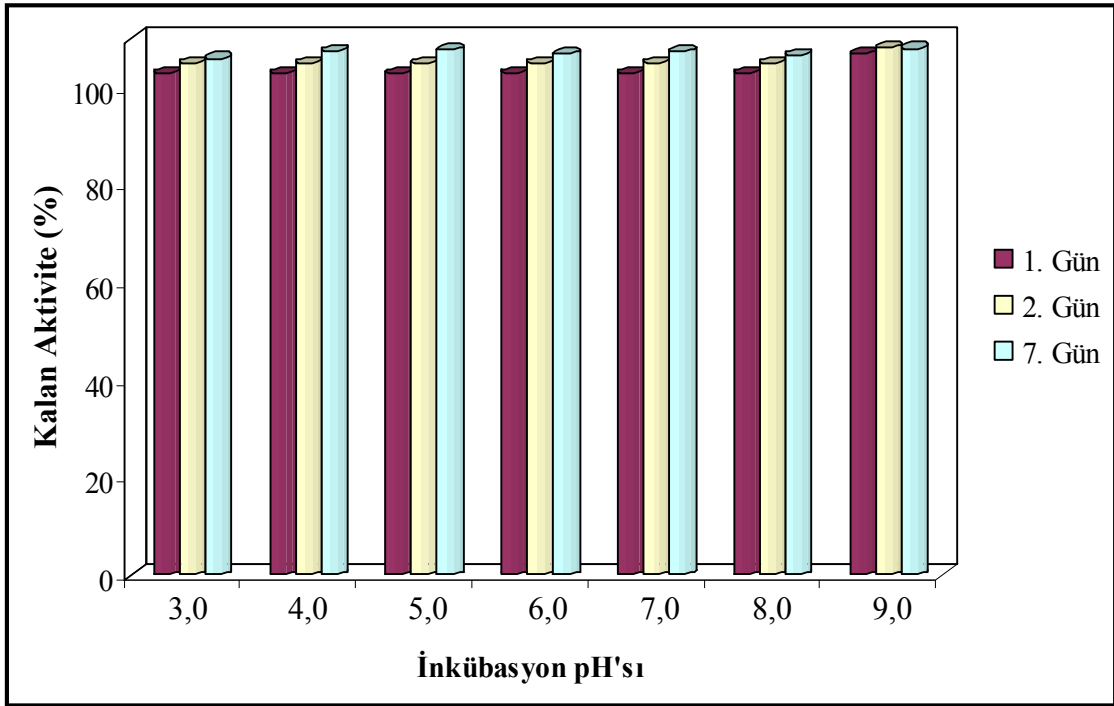


Şekil 32. PHP'nin ısıl kararlılık eğrisi

### 3.4.10. PHP'nin pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 1:1 oranında pH 3,0-9,0 arasındaki tamponlarla karıştırılarak ayrı ayrı 4 °C ve 50 °C'de 1, 2 ve 7 gün inkübe edildi

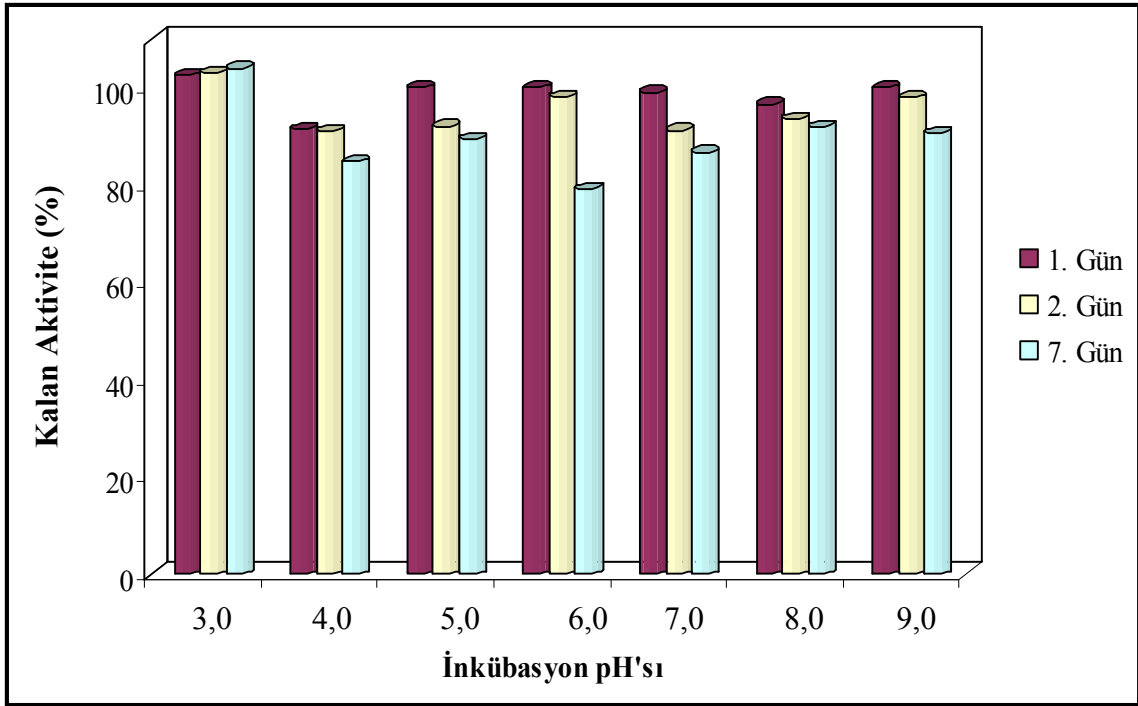
ve inkübasyon süresinin sonunda optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Aynı şekilde hazırlanmış fakat hiç inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri belirlenerek bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübasyona maruz bırakılan enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra inkübasyon pH'sına karşı %kalan aktiviteler grafiği geçirildi (Şekil 33 ve Şekil 34).



Şekil 33. PHP'nin 4 °C'deki pH kararlılık eğrisi

Şekil 33'ten de görüldüğü gibi enzim farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de inkübe edildiğinde aktivitede herhangi bir azalma olmamakta hatta bütün pH'larda aktivitelerde yaklaşık %6-8 oranında bir artış olmaktadır.

Enzim 50 °C'de ve pH 3,0'de inkübe edildiğinde ise 7 gün sonunda aktivite tam olarak korunmaktadır. Diğer pH'larda ise aktivitenin %80'in üzerinde korunduğu görülmektedir (Şekil 34).



Şekil 34. PHP'nin 50 °C'deki pH kararlılık eğrisi

#### 3.4.11. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 17).

Tablo 17'den de görüldüğü gibi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  varlığında PHP'nin esteraz aktivitesinde dikkate değer bir değişim gözlenmedi. 1 mM nihai konsantrasyonda  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  kullanıldığında yaklaşık %25-30 arasında bir inhibisyon gözlemlendi. Konsantrasyon 5 mM olduğunda ise inhibisyon oranı  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Co}^{2+}$  için daha da artarak sırasıyla %44 ve %55'e ulaştı.  $\text{Cu}^{2+}$  durumunda ise bu oran %32'de kaldı.

Tablo 17. PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

<b>Kalan aktivite (%)</b>		
<b>Metal iyonu</b>	<b>1 mM nihai konsantrasyon</b>	<b>5 mM nihai konsantrasyon</b>
Yok	100	100
Na <sup>+</sup>	100	101
Li <sup>+</sup>	103	104
Mg <sup>2+</sup>	100	100
Mn <sup>2+</sup>	98	97
Zn <sup>2+</sup>	71	56
Ca <sup>2+</sup>	99	100
Co <sup>2+</sup>	75	45
Cu <sup>2+</sup>	75	68

#### 3.4.12. PHP'nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacı ile, reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları %10 ve %30 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 18).

Tablo 18. PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

<b>Kalan aktivite (%)</b>		
<b>Organik çözücü</b>	<b>%10 nihai konsantrasyon</b>	<b>%30 nihai konsantrasyon</b>
Yok	100	100
Metanol	81	68
Etanol	104	90
İzopropanol	104	82
Asetonitril	108	58
Aseton	104	65
DMSO	104	103

Tablo 18'den de görüldüğü gibi %10 nihai konsantrasyonda organik çözücü kullanıldığında sadece metanol durumunda aktivitede %19'luk bir inhibisyon meydana geldi. Diğer çözücüler ise bu konsantrasyonda az da olsa aktivitede bir artışa neden oldu. %30 nihai konsantrasyonda DMSO kullanıldığında enzimin aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmedi. Bu konsantrasyondaki asetonitrilin, %42'lik inhibisyona neden olduğu gözlemlendi. Diğer çözücüler durumunda ise %10-35 arasında değişen değerlerde inhibisyon gerçekleşti.



#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler denatüre edici maddelere ve sert reaksiyon şartlarına daha dayanıklı olduklarından endüstriyel açıdan oldukça önemlidirler (Niehaus vd., 1999). Bu nedenle, yüksek sıcaklık ve pH değerleri ile organik çözücülerdeki kararlılıklarından dolayı bu organizmalardan elde edilen esterazlar çok farklı potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahiptirler (Herbert, 1992; Schmid ve Verger, 1998).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan izole edilen çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizleri ile yeni bir suş olduğu ortaya konulan *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4'den ısıya dirençli fosfotriesteraz homolog protein (PHP) geni, indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET-28a(+) vektörüne klonlanıp, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS'de ekspres edildi. Ekspres edilen enzim saflaştırılıp, esteraz aktivitesi elektroforetik ve spektroskopik olarak ortaya koyuldu ve ayrıca, spektrofotometrik olarak enzimin bazı biyokimyasal özellikleri de ayrıntılı bir biçimde incelendi.

*G. caldoxylosilyticus* TK4'den *EcoR* I enzimi ile genomik DNA kütüphanesi oluşturularak elde edilen 8 nolu klondaki PHP geninin 814 bazlık kısmı ile invers PCR sonucu elde edilen DNA sıralarının birleştirilmesi ile PHP geninin tam olarak 921 baz ve 308 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 22). *E. coli* PHP'sinin 876 baz ve 292 amino asitten, *Mycobacterium tuberculosis* PHP'sinin (mtPHP) ise 975 baz ve 325 amino asitten oluştuğu bildirilmiştir (Buchbinder, 1998).

PHP geninin ekspresyonu sonucunda üretilen proteinin amino asit sırasının BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki proteinlerle karşılaştırılması sonucu, bu proteinin başta fosfotriesterazlar (PTE'ler) ve putatif fosfotriesterazlar olmak üzere TIM silindir yapısı içeren hidrolazlara %37-62 oranları arasında benzediği görüldü (Tablo 15). Bu amino asit sıra benzerliğinden faydalanılarak PHP gen ürününün, PTE aktivitesine sahip olabileceği sonucuna varıldı ve bu nedenle aktivite tayin çalışmalarında öncelikle proteinin PTE aktivitesine sahip olup olmadığı incelendi.

*G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinin amino asit sırasının ClustalW programı kullanılarak *E. coli* ve *M. tuberculosis* PHP'leri ile *Pseudomonas diminuta* ve *Bacillus*

*clausii* KSM-K16 PTE'lerinin amino asit sıraları ile karşılaştırılması sonucunda, PHP ve PTE'lerde bulunan ve çinkonun koordinasyonunda görev alan 4 histidin ve 1 aspartat biriminin (Şekil 23'te yıldızlar (\*) ile gösterilmektedir) *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde de korunmuş olduğu görüldü. Ayrıca, *P. diminuta* PTE'sinde 169. pozisyonda bulunan Lys birimi, *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinde beklendiği gibi bir glutamat ile yer değiştirmiştir ve bir pozisyon kaymış durumdadır (Şekil 23). Bu durum, *E. coli*, fare ve sıçan PHP'lerinde de aynı şekildedir (Buchbinder vd., 1998).

Çeşitli organizmalardan elde edilen PTE, PHP ve PTE-benzeri proteinlerin amino asit sıralarının kullanılması ile yapılan filogenetik analizde *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinin *E. coli* PHP'si ile çok yakın bir ilişki içinde olduğu görülmüştür (Şekil 24).

PHP geninin tamamının pET-28a(+)'ya klonlanması ile elde edilen rekombinant vektör *E. coli*'ye aktarıldıktan sonra protein ekspres edildi ve nikel afinite kromatografisi kullanılarak tek adımda saflaştırıldı. Literatüre bakıldığında bu yöntemle farklı esterazların klonlanıp saflaştırıldığı görülmektedir. *Ralstonia* sp. M1 esterazı C ucunda 6 tane His içerecek şekilde pET-22b<sup>+</sup> vektörüne klonlanmış, *E. coli* BL21'de ekspres edilmiş ve Ni-NTA kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Quyen vd., 2007). Isıl kararlı *G. thermoleovorans* YN esterazı C ucunda 6 tane His içerecek şekilde pCYTEX vektörüne klonlanmış, *E. coli* DH5 $\alpha$ 'da ekspres edilmiş ve metal afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Soliman vd., 2007). pET-24b vektörüne klonlanmış olan *Picrophilus torridus* EstA ve EstB esteraz genleri ise *E. coli* Rosetta (DE3) hücrelerinde ekspres edildikten sonra yine nikel kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Hess vd., 2008).

Yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde saf proteinin tek bant halinde olması, enzimin monomer olduğu veya dördüncül yapısının homolog iki ya da daha fazla alt birimin organizasyonu ile oluştuğu sonucunu doğurmaktadır (Şekil 25). Ekspres edilen rekombinant proteinin alt birim molekül ağırlığı teorik olarak yaklaşık 34,58 kDa olarak hesaplandı. Bu sonuç SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile deneysel olarak hesaplanan 36,5 kDa değeriyle de uyum içindedir. Bir monomer olan *E. coli* PHP'sinin molekül ağırlığının 32,91 kDa olduğu bildirilmiştir (Buchbinder, 1998).

Doğal poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda, *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP'sinin aktif bir esteraz olarak *E. coli*'de ekspres edildiği tespit edilmiştir (Şekil 26). Ancak, *G. caldoxylosilyticus* TK4 hücre içi özütünde, saf protein bandı ile aynı hizada bir protein bandı bulunmamaktadır. Bu durum, iki farklı şekilde açıklanabilir; 1) Klonlanan gen, başlama sinyalinin önce histidin ve diğer bazı amino asitleri içermektedir. Bu

nedenle, elektroforezde saf proteinin göç hızı orijinal kaynağındakine göre daha yavaş olmaktadır. 2) Klonlanan gen, *G. caldoylosilyticus* TK4'te yeteri kadar ekspres edilmemektedir ve bu nedenle doğal elektroforezde görünmemektedir.

Saf protein kullanılarak yapılan aktivite tayini çalışmalarında genel PTE substratları olan paraokson ve paratyon varlığında herhangi bir aktivite elde edilemedi. Malatyon kullanıldığı durumda ise spesifik aktivite 2,1 U/mg protein olarak belirlendi. Ancak, bu spesifik aktivite değerinin literatür bilgileriyle karşılaştırılması sonucu oldukça düşük bir değer olduğu tespit edildi (Haubruge vd., 2002; Liu vd., 2004; Das ve Singh, 2006). Bu nedenle, malatyonun enzim tarafından etkili bir biçimde hidroliz edilemediği ve enzimin PTE substratlarını hidrolizleme yeteneğinin olmadığı sonucuna varıldı. Saflaştırılan enzimde, aktivite en fazla *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA) ve *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB) varlığında gözlemlendi (Tablo 16). Ayrıca,  $\alpha$ NA ve  $\beta$ NA varlığında da oldukça yüksek aktivite değerleri elde edildi. *E. coli* PHP'si ile yapılan enzim aktivite tayin çalışmalarında, *p*NPA ve paraokson varlığında herhangi bir aktivite gözlenememiştir (Buchbinder, 1998). Ancak daha sonra yapılan bir çalışmada, PHP'nin *p*NPA varlığında azda olsa bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Roodveldt ve Tawfik, 2005). Metagenomik bir kütüphaneden klonlanan bir esterazın (Kim vd., 2006), *G. thermoleovorans* YN esterazının (Soliman vd., 2007) ve *Thermotoga maritima* esterazının (Levisson vd., 2007) en yüksek aktiviteyi kısa zincirli *p*NPA varlığında gösterdiği belirlenmiştir. *E. coli* PHP'sinde Thr 210 ve Thr 245 amino asitlerinin Ala'e mutasyonu sonucu elde edilen 1.2 nolu mutantta esteraz aktivitesinin 23 kat arttığı, ayrıca yaban tip PHP'de gözlenmeyen bir paraoksonaz aktivitesinin de elde edildiği tespit edilmiştir (Roodveldt ve Tawfik, 2005).

Rekombinant PHP'nin aktivitesinin *p*NPA substratı kullanılarak pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH değerinin 8,0 olduğu gözlemlendi (Şekil 27). pH 8,0-8,5 arasındaki optimum pH değerleri birçok esteraz için benzerdir. Örneğin, ılımlı bir termofilik bakteri olan *Bacillus licheniformis*'den saflaştırılan esterazın *p*-nitrofenil kaproat substratı varlığında pH 8,0-8,5 arasında optimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Alvarez-Macarie vd., 1999). *B. subtilis* (RRL 1789)'dan saflaştırılan bir esteraz için optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur (Kaiser vd., 2006). Ayrıca *p*-nitrofenil valerat varlığında *B. acidocaldarius* esterazı pH 7,0-8,5 arasında (Manco vd., 1994), *p*NPA varlığında *Brevibacterium* sp. R312 esteraz 4a'sı ise pH 8,0'de (Lambrechts vd., 1995) optimum aktivite göstermiştir.

Rekombinant enzimin optimum sıcaklığının 50 °C olduğu ve enzimin 40 ve 60 °C'lerde optimum aktivitesinin yaklaşık %80'ine sahip olduğu belirlendi (Şekil 28). 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim çok hızlı bir şekilde olmamakla beraber aktivitesini kaybetmeye başladığı, ancak, 90 °C'de optimum aktivitesinin yaklaşık %50'sini hâlâ koruduğu gözlemlendi. Benzer sonuçlar farklı esterazlar için bildirilmiştir. *P. torridus*'dan klonlanan EstB esterazının optimum sıcaklığının 55 °C (Hess vd., 2008), *Pyrococcus furiosus* esterazının 60 °C (Almeida vd., 2006), *Pseudomonas* sp. B11-1 esterazının 45 °C (Suzuki vd., 2003) ve *B. licheniformis* esterazının 45 °C (Alvarez-Macarie vd., 1999) olduğu belirlenmiştir.

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi 0,1 mM pNPA varlığında incelendiğinde, optimum protein konsantrasyonunun 25 µg/mL olduğu ve bu konsantrasyonun üzerinde protein kullanıldığında aktivitede herhangi bir değişim olmadığı görüldü. Literatürde PHP'lerin esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

PHP'nin esteraz aktivitesinin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin belirlenebilmesi için, sabit protein konsantrasyonunda ve farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapıldı. Lineweaver-Burk eğrisinden  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırası ile 0,17 mM ve 1667 U/mg protein olarak tespit edildi (Şekil 30 ve 31).  $K_m$  değerleri *B. licheniformis*, *T. maritima*, *Bacillus* sp. ve *G. thermoleovorans* YN esterazları için sırasıyla 0,52 mM, 0,148 mM, 0,06 mM ve 6,74 mM olarak bildirilmiştir (Alvarez-Macarie vd., 1999; Levisson vd., 2007; Ateşlier ve Metin, 2006; Soliman vd., 2007). Biyoteknolojik açıdan önemli substratlar üzerinde etki eden birçok endüstriyel enzimin  $K_m$  değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu bildirilmiştir (Fullbrook, 1996). Bu nedenle, *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin endüstriyel alanlarda kullanılabileceği açıktır.

*G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin ısıl kararlılığı incelendiğinde, 50-90 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilen enzimin aktivitesinde 3 gün sonunda neredeyse hiç değişim olmadığı görüldü. 5 gün sonunda sadece 80 ve 90 °C'lerde enzim aktivitesinde yaklaşık %20'lik bir azalma olduğu, 7 gün sonunda ise aktivitede yaklaşık olarak 50 °C'de %10'luk, 60 °C'de %25'lik, 70 ve 80 °C'lerde %30'luk ve 90 °C'de ise %40'lık bir kayıp olduğu tespit edildi (Şekil 32). *P. furiosus* esterazı, 75 °C'de 2 saat bekletildiğinde aktivitesinin neredeyse tamamını korumakta, 100 °C'de ise aktivitesini hemen kaybetmektedir (Almeida vd., 2006). *Bacillus* sp. esterazı 65 °C'de 10 saat inkübe edildiğinde aktivitesini %50 oranında kaybetmiştir (Ateşlier ve Metin, 2006). *P. torridus*

EstA ve EstB esterazlarının 90 °C’de sırasıyla 21 ve 10 saat inkübe edilmeleri sonucunda aktivitelerinin %50’sini kaybettikleri bildirilmiştir (Hess vd., 2008). *Aeropyrum pernix* K1 esterazı 90 °C’de 160 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %40’ını kaybetmiştir (Gao vd., 2003). *T. maritima* esterazının 100 °C’de 1 saat sonunda aktivitesi yarıya inmiştir (Levisson vd., 2007). *Thermoanaerobacter tengcongensis* esterazı için yarılanma süresi 80 °C’de sadece 15 dakikadır (Zhang vd., 2003). Bu bilgiler ışığında *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP’sinin literatürde şimdiye kadar bildirilmemiş olan oldukça ısıl kararlı bir esteraz aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

*G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP’sinin pH kararlılığı, saf enzim, farklı pH’lardaki tamponlar içinde 4 °C’de 1, 2 ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakılarak incelendi. Bunun sonucunda, enzim aktivitesinde herhangi bir azalma olmadığı, hatta bütün pH’larda yaklaşık %6-8 oranında bir artış olduğu görüldü (Şekil 33). Enzim aktivitesindeki bu artış, 4 °C’de inkübasyon sonucunda enzimin 3 boyutlu yapısında meydana gelebilecek mükemmelleşme sonucunda olabilmektedir. Aynı işlem 50 °C’de tekrarlandığında ise pH 3,0’de aktivitenin %100, diğer pH’larda ise %80’in üzerinde korunduğu görüldü (Şekil 34). Dolayısıyla *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP’sinin geniş bir pH aralığında oldukça kararlı olduğu söylenebilir. Aydın’ın Alangüllü Kaplıcası’ndan izole edilen termofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. 4’den elde edilip kısmen saflaştırılan esterazın oda sıcaklığında farklı pH’lardaki tamponlarda bekletildiğinde, pH 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0’da 10 saat inkübasyon sonunda aktivitesini sırasıyla %82, %98, %84 ve %45 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Aynı enzim, pH 6,0’da 24 ve 30 saat bekletildiğinde aktivitede hızlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Ateşlier ve Metin, 2006). *B. licheniformis* esterazının 21 °C’de 1 saat inkübasyon sonunda pH 6,5-8,5 arasında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir (Alvarez-Macarie vd., 1999). Buna benzer sonuçlar *B. stearothermophilus* esterazında da gözlenmiştir (Matsunaga vd., 1974).

Birçok enzim, aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları, proteinler karşısında, farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). PHP’nin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının etkisi 1 mM ve 5 mM nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde incelendi (Tablo 17).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$

varlığında PHP'nin esteraz aktivitesinde dikkate değer bir değişim gözlenmedi. Buna benzer sonuçlar  $\text{Na}^+$  ile *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarında (Hess vd., 2008) ve *B. subtilis* (RRL 1789) esterazında (Kaiser vd., 2006),  $\text{Mn}^{2+}$  ile ise *Ralstonia* sp. M1 esterazı (Quyên vd., 2007) durumunda elde edilmiştir.  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin esteraz aktivitesi üzerinde değişik oranlarda inhibisyona sebep oldular. *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarının  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları varlığında (Hess vd., 2008), *Ralstonia* sp. M1 esterazının ise  $\text{Zn}^{2+}$  varlığında (Quyên vd., 2007) inhibe olduğu bildirilmiştir.

PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO'nun etkisi incelendiğinde (Tablo 18), %10 nihai konsantrasyonda sadece metanol durumunda aktivitede %19'luk bir inhibisyon olduğu, diğer çözücüler durumunda ise aktivitede az da olsa bir artış meydana geldiği görüldü. %30 nihai konsantrasyonda DMSO kullanıldığında enzimin aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmedi. Asetonitrilin bu konsantrasyonda, %42'lik inhibisyona neden olduğu gözlemlendi. Diğer çözücüler durumunda ise %10-35 arasında değişen değerlerde inhibisyon gerçekleşti. Elde edilen bu veriler literatürle uyum içindedir. Metanolde %10 nihai konsantrasyonda gözlenen inhibisyon *T. maritima* esterazında da gözlenmiştir (Levisson vd., 2007). *G. thermoleovorans* YN esterazının aktivitesinde ise %1 konsantrasyonda DMSO, izopropanol ve etanol varlığında sırasıyla %17, %2 ve %13 oranında artış meydana gelmiştir (Soliman vd., 2007).

Elde edilen bütün bu veriler göz önüne alındığında, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan klonlanarak *E. coli*'de ekspres edilen PHP'nin, bazı metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı dirençli ve bunun yanında oldukça ısı ve pH kararlı bir enzim olduğu tespit edilmiştir. *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin bu üstün özellikleri ile birçok endüstriyel ve/veya klinik uygulamada kullanılacak bir potansiyele sahip olabileceği açıkça görülmektedir.

## 5. ÖNERİLER

Ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına ve organik çözücülere dayanıklı olan enzimler endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır. Özellikle rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla enzimleri kodlayan genleri izole etmek, bu genlerin üzerinde çalışmak ve özellikle genetik mutasyonlar yapmak günümüzde artık olanaklı hale gelmiştir. Organizmalarda bulunan genlerin çokluğu nedeniyle bunlar arasında istenilen karakterleri taşıyan genleri bulmak ve bunlar üzerinde çalışmak oldukça zordur. Bu nedenle genomik DNA kütüphanesi oluşturmak ve genleri burada toplayarak, gerektiğinde buradan faydalanmak hem daha kolaydır hem de zamandan tasarruf sağlamaktadır. Ayrıca, bu şekilde oluşturulan kütüphaneler, gerektiğinde özel işaretli problemler yardımıyla istenilen genler yönünden de taranabilmektedir.

Bu çalışma, yeni bir suş olan *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4'den, varlığı sadece 3 mikroorganizmada bildirilen, fosfotriesteraz homolog protein (PHP) geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanıp *Escherichia coli*'de ekspres edilmesi ve ayrıntılı biyokimyasal karakterizasyonun yapılması açısından oldukça önemlidir. Bu şekilde klonlanan PHP geni indüklenebilir T7 promotorunun altında olduğundan bolca ekspres edilebilmektedir. Ekspres edilen protein histidin kuyruğu içerdiğinden dolayı nikel parçacıkları kullanılarak tek basamakta saflaştırılabilmektedir. Bu da enzimin fazla miktarda ve saf halde elde edilebilmesini kolaylaştırmaktadır.

Rekombinant enzim, baş kısmında histidin kuyruğu içermeyecek şekilde klonlanıp farklı saflaştırma yöntemleri kullanılarak da saflaştırılabilir. Bunun sonucunda histidin kuyruğunun enzimin biyokimyasal özelliklerinde bir değişime neden olup olmadığı belirlenebilir. Bunun yanında, HPLC veya jel filtrasyon kromatografisi ile rekombinant enzimin molekül ağırlığı ve dördüncül yapısı hakkında bilgiler edinilebilir.

Termofilik *G. caldxylosilyticus* TK4'den klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen PHP'nin oldukça yüksek pH ve ısı kararlı bir esteraz aktivitesine sahip olması ve bunun yanında çeşitli metal iyonlarına ve organik çözücülere dayanıklı olması nedeniyle, bu

enzimin endüstriyel ve/veya klinik birçok uygulamada kullanılabilceği söylenilebilir. Enzim, organik çözücülere karşı dayanıklılık gösterdiğinden dolayı, enzimin bu çözücüler içindeki bazı reaksiyonları katalizleme kabiliyeti incelenebilir.

Saf PHP kullanılarak yapılan aktivite tayini çalışmalarında genel PTE substratları olan paraokson ve paratyon varlığında herhangi bir aktivite elde edilemedi. Bu nedenle, *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sine PTE aktivitesi kazandırabilmek amacıyla bazı mutasyonlar yapıp elde edilen mutantlar bu açıdan ileri derecede karakterize edilebilir. Ayrıca, yine mutasyonlar yardımıyla enzimin sahip olduğu aktivitelerde artış olup olmayacağı incelenerek daha kapsamlı bir çalışma da yapılabilir.

Enzim immobilizasyonu enzimin kararlılığını artırmakta ve ürünün reaksiyon ortamından uzaklaştırılıp enzimin tekrar kullanılabilirliğini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, rekombinant *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'si endüstriyel ve/veya klinik uygulamalarda, özellikle tekrar kullanılabilirliğini artırmak amacıyla immobilize edilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, A., Shetty, A.K. ve Abou-Donia, M.B., 2002. Acute Exposure to Sarin Increases Blood Brain Barrier Permeability and Induces Neuropathological Changes in the Rat Brain: Dose-Response Relationships, Neuroscience, 113, 721-741.
- Abu-Qare, A.W. ve Abou-Donia, M.B., 2002. Sarin: Health Effects, Metabolism, and Methods of Analysis, Food and Chemical Toxicology, 40, 1327-1333.
- Adams, M.W.W. ve Kelly, R.M., 1995. Enzymes from Microorganisms from Extreme Environments, Chemical & Engineering News, 73, 32-42.
- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G. ve Tawfik, D.S., 2006. The Latent Promiscuity of Newly Identified Microbial Lactonases Is Linked to a Recently Diverged Phosphotriesterase, Biochemistry, 45, 13677-13686.
- Aguilar, C.F., Sanderson, I., Moracci, M., Ciaramella, M., Nucci, R., Rossi, M. ve Pearl, L.H., 1997. Crystal Structure of the  $\beta$ -Glycosidase from the Hyperthermophilic Archeon *Sulfolobus solfataricus*: Resilience as a Key Factor in Thermostability, Journal of Molecular Biology, 271, 789-802.
- Alimova-Kosta, M.V., Imreha, S., Buchmanb, V.L. ve Ninkinac, N.N., 1998. Assignment of Phosphotriesterase-Related Gene (Pter) To Human Chromosome Band 10p12 by in Situ Hybridization, Cytogenetics and Cell Genetics, 83, 16-17.
- Almeida, R.V., Alqueres, S.M.C., Larentis, A.L., Rössle, S.C., Cardoso, A.M., Almeida, W.I., Bisch, P.M., Alves, T.L.M. ve Martins, O.B., 2006. Cloning, Expression, Partial Characterization and Structural Modeling of a Novel Esterase From *Pyrococcus furiosus*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 1128-1136.
- Alvarez-Macarie, E., Augier-Magro, V. ve Baratti, J., 1999. Characterization of a Thermostable Esterase Activity from the Moderate Thermophile *Bacillus licheniformis*, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 63, 1865-1870.
- Andra, S., Frey, G, Jaenicke, R. ve Stetter, K.O., 1998. The Thermosome from *Methanopyrus kandleri* Possesses an  $\text{NH}_4^+$ -Dependent ATPase Activity, European Journal of Biochemistry, 255, 93-99.
- Arnone, M.I., Birolo, L, Pascarella, S, Cubellis, M.V., Bossa, F, Sannia, G. ve Marino, G., 1997. Stability of Aspartate Aminotransferase from *Sulfolobus solfataricus*, Protein Engineering, 10, 237-248.

- Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M. ve Asther, M., 2002. Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* a Comparison of the Production in Solid State and Submerged Fermentation, Process Biochemistry, 38, 685-691.
- Ateşlier, Z.B.B. ve Metin, K., 2006. Production and Partial Characterization of a Novel Thermostable Esterase from a Thermophilic *Bacillus* sp., Enzyme and Microbial Technology, 38, 628-635.
- Aubert, S.D., Li, Y. ve Raushel, F.M., 2004. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase, Biochemistry, 43, 5707-5715.
- Backmann, J., Schafer, G., Wyns, L. ve Bönisch, H., 1998. Thermodynamics and Kinetics of Unfolding of the Thermostable Trimeric Adenylate Kinase from the Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, Journal of Molecular Biology, 284, 817-833.
- Bailey, P., 2001. Drastic Solutions, Wellcome News, 29, 24-25.
- Basaran, P. ve Hang, Y.D., 2000. Purification and Characterization of Acetyl Esterase from *Candida guilliermondii*, Letters in Applied Microbiology, 30, 167-171.
- Benjamin, S. ve Pandey, A., 2000. Panorama of Lipases in Bioindustry, Biotech International, 5, 11-13.
- Benner, S. ve Ellington, A.D., 1988. Interpreting the Behavior of Enzymes: Purpose or Pedigree?, CRC Critical Reviews in Biochemistry, 23, 369-426.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. ve Holden, H.M., 1995. 3-Dimensional Structure of the Binuclear Metal Center of Phosphotriesterase, Biochemistry, 34, 7973-7978.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. ve Holden, H.M., 1994. The Three-Dimensional Structure of Phosphotriesterase: an Enzyme Capable of Detoxifying Organophosphorus Nerve Agents, Biochemistry, 33, 15001-15007.
- Bhat, R.V. ve Krishnamachari, K.A., 1977. Endemic Familial Arthritis of Malnad- an Epidemiological Study, Indian Journal of Medical Research, 66, 777-786.
- Bock C.W., Katz, A.K., Markham, G.D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions, Journal of the American Chemical Society, 121, 7360-7372.
- Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases: Classification, Properties, and Application in Biocatalysis, FEMS Microbiology Reviews, 26, 78-81.

- Buchbinder, J.L., Stephenson, R.C., Dresser, M.J., Pitera, J.W., Scanlan, T.S. ve Fletterick, R.J., 1998. Biochemical Characterization and Crystallographic Structure of an *Escherichia coli* Protein from the Phosphotriesterase Gene Family, Biochemistry, 37, 5096-5106.
- Cacciapuoti, G., Fusco, S., Caiazza, N., Zappia, V. ve Porcelli, M., 1999. Heterologous Expression of 59-Methylthioadenosine Phosphorylase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Characterization of the Recombinant Protein and Involvement of Disulfide Bonds in Thermophilicity and Thermostability, Protein Expression and Purification, 16, 125-135.
- Cao, C.-W., Zhang, J., Gao, X.-W., Liang, P. ve Guo, H.-L., 2008. Overexpression of Carboxylesterase Gene Associated with Organophosphorous Insecticide Resistance in Cotton Aphids, *Aphis gossypii* (Glover), Pesticide Biochemistry and Physiology, 90, 175-180.
- Chaabouni, M.K., Pulvin, S., Touraud, D. ve Thomas, D., 1996. Enzymatic Synthesis of Geraniol Esters in a Solvent Free System by Lipases, Biotechnology Letters, 18, 1083-1088.
- Cheng, T.C., Harvey, S.P. ve Stroup, A.N., 1993. Purification and Properties of a Highly Active Organophosphorus Acid Anhydrolase from *Alteromonas undina*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 3138-3140.
- Cheng, T.C., Rastogi, V.K., DeFrank, J.J. ve Sawiris, G.P., 1998. G-Type Nerve Agent Decontamination by *Alteromonas prolidase*, Annals of the New York Academy of Sciences, 864, 253-286.
- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M.A., Wu, F., Hong, S.B. ve Raushel, F.M., 2001a. Structural Determinants of the Substrate and Stereochemical Specificity of Phosphotriesterase, Biochemistry, 40, 1325-1331.
- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M.A., Wu, F. ve Raushel, F.M., 2001b. Enhancement, Relaxation, and Reversal of the Stereoselectivity for Phosphotriesterase by Rational Evolution of Active Site Residues, Biochemistry, 40, 1332-1339.
- Cho, C.M.-H., Ashok Mulchandani, A. ve Chen, W., 2004. Altering the Substrate Specificity of Organophosphorus Hydrolase for Enhanced Hydrolysis of Chlorpyrifos, Applied and Environmental Microbiology, 70, 4681-4685.
- Chough, S.H., Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., ve Rogers, K.R., 2002. Organophosphorus Hydrolase-Based Electrode for Determination of Organophosphate Pesticides, Electroanalysis, 14, 273-276.
- Chu, X.-Y., Wu, N.-F., Deng, M.-J., Tian, J., Yao, B. ve Fan, Y.-L., 2006. Expression of Organophosphorus Hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: Purification and Characterization, Protein Expression and Purification, 49, 9-14.

- Das, S. ve Singh, D.K., 2006. Purification and Characterization of Phosphotriesterases from *Pseudomonas aeruginosa* F10B and *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* SBL11, Canadian Journal of Microbiology, 52, 157-168.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1. Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Donarski, W.J., Dumas, D.P., Heitmeyer, D.P., Lewis, V.E. ve Raushel, F.M., 1989. Structure-Activity Relationships in the Hydrolysis of Substrates by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Biochemistry, 28, 4650-4655.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I.J. ve Wishart, D.S., 2004. PlasMapper: a Web Server for Drawing and Auto-Annotating Plasmid Maps, Nucleic Acids Research, 32, 660-664.
- Dumas, D.P., Caldwell, S.R., Wild, J.R. ve Raushel, F.M., 1989. Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Journal of Biological Chemistry, 264, 19659-19665.
- Dumas, D.P., Durst, H.D., Landis, W.G., Raushel, F.M. ve Wild, J.R., 1990. Inactivation of Organophosphorus Nerve Agents by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 277, 155-159.
- Dülger, S., Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcaları'ndan Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2003.
- Ewis, H.E., Abdelal, A.T. ve Lu, C.D., 2004. Molecular Cloning and Characterization of Two Thermostable Carboxyl Esterases from *Geobacillus stearothermophilus*, Gene, 329, 187-195.
- Farber, G.K. ve Petsko, G.A., 1990. The Evolution of  $\alpha/\beta$  Barrel Enzymes, Trends in Biochemical Sciences, 15, 228-234.
- Fields, P.A., 2001. Protein Function at Thermal Extremes: Balancing Stability and Flexibility, Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 129, 417-431.
- Fontana, A., 1991. Analysis and Modulation of Protein Stability, Current Opinion in Biotechnology, 2, 551-560.
- Fu, G., Cui, Z., Huang, T. ve Lia, S., 2004. Expression, Purification, and Characterization of a Novel Methyl Parathion Hydrolase, Protein Expression and Purification, 36, 170-176.

- Fullbrook, P.D., 1996. Practical applied kinetics. In: Godfrey, T., West, S. (Editors). Industrial Enzymology. Second Edition, Stockholm Pres, New York.
- Gao, R., Feng, Y., Ishikawa, K., Ishida, H., Ando, S., Kosugi, Y. ve Cao, S., 2003. Cloning, Purification and Properties of a Hyperthermophilic Esterase from Archaeon *Aeropyrum pernix* K1, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 24, 1-8.
- Gerlt, J.A. ve Raushel, R.M., 2003. Evolution of Function in ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzymes, Current Opinion in Chemical Biology, 7, 252-264.
- Gershenson, A., Schauerte, J.A., Giver, L. ve Arnold, F.H., 2000. Tryptophan Fluorescence Study of Enzyme Flexibility and Unfolding in Laboratory-Evolved Thermostable Esterases, Biochemistry, 39, 4658-4665.
- Ghanem, E. ve Raushel, F.M., 2005. Detoxification of Organophosphate Nerve Agents by Bacterial Phosphotriesterase, Toxicology and Applied Pharmacology, 207, 459-470.
- Ghosh, M., Grunden, A.M., Dunn, D.M., Weiss, R. ve Adams, M.W., 1998. Characterization of Native and Recombinant Forms of an Unusual Cobalt-Dependent Proline Dipeptidase (Prolidase) from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*, Journal of Bacteriology, 180, 4781-4789.
- Gopal, S., Rastogi, V., Ashman, W. ve Mulbry, W., 2000. Mutagenesis of Organophosphorus Hydrolase to Enhance Hydrolysis of the Nerve Agent VX, Biochemical and Biophysical Research Communications, 279, 516-519.
- Grattinger, M., Dankesreiter, A., Schurig, H. ve Jaenicke, R., 1998. Recombinant Phosphoglycerate Kinase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*: catalytic, spectral and thermodynamic properties, Journal of Molecular Biology, 280, 525-533.
- Greenfield, R.A., Brown, B.R., Hutchins, J.B., Iandolo, J.J., Jackson, R., Slater, L.N. ve Broze, M.A., 2002. Microbiological, Biological, and Chemical Weapons of Warfare and Terrorism, The American Journal of The Medical Sciences, 323, 326-340.
- Grimsley, J.K., Rastogi, V.K. ve Wild, J.R., 1988. Biological Detoxication of Organophosphorus Neurotoxins. In: Sikdar, S.K., Irvine, R.L. (Editors). Bioremediation: Principles and Practice. Technomic Publishing, Lancaster.
- Gunderson, C.H., Lehmann, C.R., Sidell, F.R. ve Jabbari, B., 1992. Nerve Agents: a Review, Neurology, 42, 946-950.

- Haubruge, E., Amichot, M., Cuany, A., Berge, J.-B. ve Arnaud, L., 2002. Purification and Characterization of a Carboxylesterase Involved in Malathion-Specific Resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32, 1181-1190.
- Herbert, R.A., 1992. A Perspective on the Biotechnological Potential of Extremophiles, Trends in Biotechnology, 10, 395-402.
- Hess, M., Katzer, M. ve Antranikian, G., 2008. Extremely Thermostable Esterases from the Thermoacidophilic Euryarchaeon *Picrophilus torridus*, Extremophiles, 12, 351-364.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Li, B.-C. ve Herrmann, R., 1996. Complete Sequence Analysis of the Genome of the Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*, Nucleic Acids Research, 24, 4420-4449.
- Holm, L. ve Sander, C., 1997. An Evolutionary Treasure: Unification of a Broad Set of Amidohydrolases Related to Urease, Proteins, 28, 72-78.
- Hong, S.B. ve Raushel, F.M., 1996. Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase, Biochemistry, 35, 10904-10912.
- Hong, S.B. ve Raushel, F.M., 1999. Stereochemical Constraints on the Substrate Specificity of Phosphotriesterase, Biochemistry, 38, 1159-1165.
- Horne, I., Sutherland, T.D., Harcourt, R.L., Russell, R.J. ve Oakeshott, J.G., 2002. Identification of an opd (organophosphate degradation) Gene in an *Agrobacterium* Isolate, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3371-3376.
- Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H. ve Imanaka, T., 2002. Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3925-3931.
- Hou, X., Maser, R.L., Magenheimer, B.S. ve Calvet, J.P., 1996. A Mouse Kidney- and Liver-Expressed cDNA having Homology with a Prokaryotic Parathion Hydrolase (Phosphotriesterase) Gene: Abnormal Expression in Injured and Polycystic Kidneys, Gene, 168, 157-163.
- Ikeda, M. ve Clark, D.S., 1998. Molecular Cloning of Extremely Thermostable Esterase Gene from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*, Biotechnology and Bioengineering, 57, 624-629.
- Irene, H., Tara, D.S., Harcourt, R.L., Russell, R.J. ve Oakeshott, J.G., 2002. Identification of an opd (organophosphate degradation) Gene in an *Agrobacterium* Isolate, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3371-3376.

- Isupov, M.N., Fleming, T.M., Dalby, A.R., Crowhurst, G.S., Bourne, P.C. ve Littlechild, J.A., 1999. Crystal Structure of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*, Journal of Molecular Biology, 291, 651-660.
- Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P. ve Karplus, P. A., 1995. The Crystal Structure of Urease from *Klebsiella aerogenes*, Science, 268, 998-1004.
- Jahangir, R., Mc Closkey, C.B., Mc Clung W.G., Labow, R.S., Brash, J.L. ve Santerre, J.P., 2003. The Influence of Protein Adsorption and Surface Modifying Macromolecules on the Hydrolytic Degradation of a Poly (Ether-Urethane) by Cholesterol Esterase, Biomaterials, 24, 121-130.
- Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Andrabi, K.I. ve Qazi, G.N., 2006. A Novel Esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and Characterization of the Enzyme, Protein Expression and Purification, 45, 262-268.
- Kakugawa, S., Fushinobu, S., Wakagi, T. ve Shoun, H., 2007. Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*, Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 585-591.
- Kaliste-Korhonen, E., Ylitalo, P., Hanninen, O. ve Raushel, F.M., 1993. Phosphotriesterase Decreases Paraoxon Toxicity in Mice, Toxicology & Applied Pharmacology, 121, 275-278.
- Karalliedde, L. ve Senanayake, N., 1999. Organophosphorus Insecticide Poisoning, Journal of the International Federation of Clinical Chemistry, 11, 4-9.
- Kawamoto, T., Sonomoto, K. ve Tanaka, A., 1987. Esterification in Organic Solvents: Selection of Hydrolases and Effects of Reaction Conditions, Biocatalysis, 1, 137-145.
- Kim, G.J., Choi, G.S., Kim, J.Y., Lee, J.B., Jo, D.H. ve Ryu, Y.W., 2002a. Screening, Production and Properties of a Stereo Specific Esterase from *Pseudomonas* Species-34 with High Selectivity to (S)-Ketoprofen Ethyl Ester, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 17, 29-38.
- Kim, Y.H., Cha, C.J. ve Cerniglia, C.E., 2002b. Purification and Characterization of an Erythromycin Resistant *Pseudomonas* sp. GD 100, FEMS Microbiology Letters, 210, 239-244.
- Kim, Y.-J., Choi, G.-S., Kim, S.-B., Yoon, G.-S., Kim, Y.-S. ve Ryu, Y.-W., 2006. Screening and Characterization of a Novel Esterase from a Metagenomic Library, Protein Expression and Purification, 45, 315-323.

- Knapp, S., de Vos, W.M., Rice, D. ve Ladenstein, R., 1997. Crystal structure of Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima* at 3.0 Å Resolution, Journal of Molecular Biology, 267, 916-932.
- Koca, J., Zhan, C.G., Rittenhouse, R.C. ve Ornstein, R.L., 2001. Mobility of the Active Site Bound Paraoxon and Sarin in Zinc-Phosphotriesterase by Molecular Dynamics Simulation and Quantum Chemical Calculation, Journal of the American Chemical Society, 123, 817-826.
- Kolakowski, J.E., DeFrank, J.J., Harvey, S.P., Szafraniec, L.L., Beaudry, W.T., Lai, K. ve Wild, J.R., 1997. Enzymatic Hydrolysis of the Chemical Warfare Agent VX and its Neurotoxic Analogues by Organophosphorus Hydrolase, Biocatalysis and Biotransformation, 15, 297-312.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M., Fagerstrom, R. ve Reinikainen, T., 2004. Characterisation of Steryl Esterase Activities, Journal of Biotechnology, 108, 51-59.
- Kumar, J., Jha, S.K. ve D'Souza, S.F., 2006. Optical Microbial Biosensor for Detection of Methyl Parathion Pesticide Using *Flavobacterium* sp. Whole Cells Adsorbed on Glass Fiber Filters as Disposable Biocomponent, Biosensors and Bioelectronics, 21, 2100-2105.
- Kuo, J.M., Chae, M.Y. ve Raushel, F.M., 1997. Perturbations to the Active Site of Phosphotriesterase, Biochemistry, 36, 1982-1988.
- Ladenstein, R. ve Antranikian, G., 1998. Proteins from Hyperthermophiles: Stability and Enzymatic Catalysis Close to the Boiling Point of Water, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 61, 37-85.
- Lambrechts, C., Escudero, J. ve Galzy, P., 1995. Purification and Properties of Three Esterases from *Brevibacterium* sp. R312, Journal of Applied Bacteriology, 78, 180-188.
- Laurence, G., Didier, H., Sebastien, K., Laure, D., Rols, J.L. ve Lindley, N.D., 2000. Reductive Cleavage of Demeton-S-Methyl by *Corynebacterium glutamicum* in Cometabolism on More Readily Metabolizable Substrates, Applied and Environmental Microbiology, 66, 1202-1204.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.
- Levisson, M., van der Oost, J. ve Kengen, S.W.M., 2007. Characterization and Structural Modeling of a New Type of Thermostable Esterase from *Thermotoga maritima*, FEBS Journal, 274, 2832-2842.



- Lewis, V.E., Donarski, W.J., Wild, J.R. ve Raushel, F.M., 1988. Mechanism and Stereochemical Course at Phosphorus of the Reaction Catalyzed by a Bacterial Phosphotriesterase, Biochemistry, 27, 1591-1597.
- Li, W.S., Lum, K.T., Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M.A. ve Raushel, F.M., 2001. Stereoselective Detoxification of Chiral Sarin and Soman Analogues by Phosphotriesterase, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 9, 2083-2091.
- Li, W.F., Zhou, X.X. ve Lu, P., 2005. Structural Features of Thermozyms, Biotechnology Advances, 23, 271-281.
- Liu, Y.-H., Liu, Y., Chen, Z.-S., Lian, J., Huang, X. ve Chung, Y.-C., 2004. Purification and Characterization of a Novel Organophosphorus Pesticide Hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP303, Enzyme and Microbial Technology, 34, 297-303.
- Lowe, S.E., Jain, M.K. ve Zeikus, J.G., 1993. Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, salinity, or substrates, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 57, 451-509.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M.H., Backmann, J., Martial, J.A., Wyns, L., Jaenicke, R. ve Wierenga, R.K., 1999. The Crystal Structure of Triosephosphate Isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a Comparative Thermostability Structural Analysis of Ten Different TIM Structures, Proteins, 37, 441-453.
- Manavathi, B., Pakala, S.B., Gorla, P., Merrick, M. ve Siddavattam, D., 2005. Influence of Zinc and Cobalt on Expression and Activity of Parathion Hydrolase from *Flavobacterium* sp. ATCC27551, Pesticide Biochemistry and Physiology, 83, 37-45.
- Manco, G., Di Gennaro, S., De Rosa, M. ve Rossi, M., 1994. Purification and Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from the Thermoacidophilic Eubacterium *Bacillus acidocaldarius*, European Journal Biochemistry, 221, 965-972.
- Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G. ve Rossi, M., 2000. Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 373, 182-192.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Masahito, H., Hirano, M. ve Tokuda, S., 2000. Involvement of Two Plasmids in Fenitrothion Degradation by *Burkholderia* sp. Strain NF100, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1737-1740.
- Matsunaga, A., Koyama, N. ve Nosoh, Y., 1974. Purification and Properties of Esterase from *Bacillus stearothermophilus*, *Archives of Biochemistry Biophysics*, 160, 504-513.
- Matussek, K., Moritz, P., Brunner, N., Eckerskorn, C. ve Hensel, R., 1998. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Cyclic 2,3-Diphosphoglycerate Synthetase, the Key Enzyme of Cyclic 2,3-Diphosphoglycerate Metabolism in *Methanothermus fervidus*, *Journal of Bacteriology*, 180, 5997-6004.
- Meng, Z., Yamazaki, T. ve Sode, K., 2003. Enhancement of the Catalytic Activity of an Artificial Phosphotriesterase Using a Molecular Imprinting Technique, *Biotechnology Letters*, 25, 1075-1080.
- Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M. ve Manco, G.A., 2005. A Thermostable Phosphotriesterase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Cloning, Overexpression and Properties, *Extremophiles*, 9, 297-305.
- Molinavi, F., Brenna, O., Valenti, M. ve Aragozzini, F., 1996. Isolation of a Novel Carboxylesterase from *Bacillus coagulans* with High Enantioselectivity Toward Racemic Esters of 1,2-O-Isopropylidenglycerol, *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 551-556.
- Morita, H., Yanagisawa, N., Nakajima, T., Shimizu, M., Hirabayashi, H., Okudera, H., Nohara, M., Midorikawa, Y. ve Mimura, S., 1995. Sarin Poisoning in Matsumoto, Japan, *Lancet*, 346, 290-293.
- Mulbry, W.W. ve Karns, J.S., 1989. Purification and Characterization of Three Parathion Hydrolases from Gram-Negative Bacterial Strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 289-293.
- Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J. ve Rogers, K.R., 2001a. Biosensors for Direct Determination of Organophosphate Pesticides, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 225-230.
- Mulchandani, A., Kaneva, I. ve Chen, W., 1998c. Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. 2. Fiber-optic microbial biosensor, *Analytical Chemistry*, 70, 5042-5046.

- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chauhan, S. ve Chen, W., 1998a. Enzyme Biosensor for Determination of Organophosphates, Field Analytical Chemistry & Technology, 2, 263-269.
- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I. ve Chen, W., 1998b. Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. 1. Potentiometric Microbial Electrode, Analytical Chemistry, 70, 4140-4145.
- Mulchandani, P., Chen, W. ve Mulchandani, A., 2001b. Flow Injection Amperometric Enzyme Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents, Environmental Science & Technology, 35, 2562-2565.
- Munnecke, D.M., 1976. Enzymatic Hydrolysis of Organophosphate Insecticides, a Possible Pesticide Disposal Method, Applied and Environmental Microbiology, 32, 7-13.
- Nagano, N., Orengo, C.A. ve Thornton, J.M., 2002. One Fold with Many Functions: the Evolutionary Relationships Between Tim Barrel Families Based on Their Sequences, Structures and Functions, Journal of Molecular Biology, 321, 741-765.
- Nawani, N., Singh, R. ve Kaur, J., 2006. Immobilization and Stability Studies of a Lipase from Thermophilic *Bacillus* sp: The Effect of Process Parameters on Immobilization of Enzyme, Electronic Journal of Biotechnology, 9, 559-565.
- Niehaus, F., Bertolo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application, Applied and Microbiology and Biotechnology, 51, 711-729.
- Ochman, H., Gerber, A.S. ve Hart, D.L., 1988. Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction, Genetics, 120, 621-623.
- Omburo, G.A., Kuo, J.M., Mullins, L.S. ve Raushel, F.M., 1992. Characterization of the Zinc Binding Site of Bacterial Phosphotriesterase, Journal of Biological Chemistry, 267, 13278-13283.
- Pakala, S.B., Gorla, P., Pinjari, A.B., Krovdi, R.K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick, M. ve Siddavattam, D., 2007. Biodegradation of Methyl Parathion and p-Nitrophenol: Evidence for the Presence of a p-Nitrophenol 2-Hydroxylase in a Gram-Negative *Serratia* sp. Strain DS001, Applied Microbiology and Biotechnology, 73, 1452-1462.
- Panda, T. ve Gowrishankar, B.S., 2005. Production and Applications of Esterases, Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 160-169.

- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A. ve Kyriadidis, D.A., 2002. Biotechnologically Relevant Enzymes from *Thermus thermophilus*, Applied and Microbiology and Biotechnology, 58, 1-12.
- Pei, L., Omburo, G., McGuinn, W.D., Petrikovics, I., Dave, K., Raushel, F.M., Wild, J.R., DeLoach, J.R. ve Way, J.L., 1994. Encapsulation of Phosphotriesterase within Murine Erythrocytes, Toxicology and Applied Pharmacology, 124, 296-301.
- Petrikovics, I., Hong, K., Omburo, G., Hu, Q.Z., Pei, L., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Tamulinas, C., Papahadjopoulos, D., Jaszberenyi, J.C. ve Way, J.L., 1999. Antagonism of Paraoxon Intoxication by Recombinant Phosphotriesterase Encapsulated within Sterically Stabilized Liposomes, Toxicology & Applied Pharmacology, 156, 56-63.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B.R., Jacobs, W., Jr. ve Cole, S.T., 1996. An Integrated Map of the Genome of the Tubercle Bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and Comparison with *Mycobacterium leprae*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 3132-3137.
- Pickett, S.D., Saqi, M.A. ve Sternberg, M.J., 1992. Evaluation of the Sequence Template Method for Protein Structure Prediction. Discrimination of the ( $\beta/\alpha$ )8-Barrel Fold, Journal of Molecular Biology, 228, 170-187.
- Privalov, P. L. ve Khechinashvili, N.N., 1974. A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein Structure: A Calorimetric Study, Journal of Molecular Biology, 86, 665-684.
- Quyen, D.T., Dao, T.T. ve Nguyen, S.L.T., 2007. A Novel Esterase from *Ralstonia* sp. M1: Gene Cloning, Sequencing, High-Level Expression and Characterization, Protein Expression and Purification, 51, 133-140.
- Rainina, E., Efremenco, E., Varfolomeyev, S., Simonian, A.L. ve Wild, J., 1996. The Development of a New Biosensor Based on Recombinant *E. coli* for the Detection of Organophosphorus Neurotoxins, Biosensors & Bioelectronics, 11, 991-1000.
- Raushel, F.M., 2002. Bacterial Detoxification of Organophosphate Nerve Agents, Current Opinion in Microbiology, 5, 288-295.
- Rhee, J.K., Ahn, D.G., Kim, Y.G. ve Oh, J.W., 2005. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormonesensitive Lipase Family, Cloned from a Metagenomic Library, Applied and Environmental Microbiology, 71, 817-825.

- Richins, R.D., Kaneva, I., Mulchandani, A. ve Chen, W., 1997. Biodegradation of Organophosphorus Pesticides by Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase, Nature Biotechnology, 15, 984-987.
- Rogers, K.R., Wang, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P. ve Chen, W., 1999. Organophosphorus Hydrolase-Based Assay for Organophosphate Pesticides, Biotechnology Progress, 15, 517-521.
- Roodveldt, C. ve Tawfik, D.S., 2005. Shared Promiscuous Activities and Evolutionary Features in Various Members of the Amidohydrolase Superfamily, Biochemistry, 44, 12728-12736.
- Rowland, S.S., Speedie, M.K. ve Pogell, B.M., 1991. Purification and Characterization of a Secreted Recombinant Phosphotriesterase (Parathion Hydrolase) from *Streptomyces lividans*, Applied and Environmental Microbiology, 57, 440-444.
- Russell, R.J., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J. ve Taylor, G.L., 1997. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution, Biochemistry, 36, 9983-9994.
- Sağlam Ertunga, N., 2006. Termofilik *Anoxybacillus genensis* G2 Suşunun Fruktöz-1,6-Bisfosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis T., 1989. Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes. In: Ford, N., Nolan, C.F.M. ve Ockler, M. (Editors). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie, 80, 933-941.
- Scanlan, T. S. ve Reid, R.C., 1995. Evolution in Action, Chemistry & Biology, 2, 71-75.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angewandte Chemie-International Edition, 37, 1609-1633.
- Schrader, G., 1950. Organische Phosphor-Verbindungen Als Neuartige Insektizide (Auszug), Angewandte Chemie, 62, 471-473.
- Seibert, C.M. ve Raushel, F.M., 2005. Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily, Biochemistry, 44, 6383-6391.
- Sethunathan, N. ve Yoshida, T., 1973. A *Flavobacterium* sp. that Degrades Diazinon and Parathion, Canadian Journal of Microbiology, 19, 873-875.

- Shao, W. ve Wiegel, J., 1995. Purification and Characterization of Two Thermostable Acetyl Xylan Esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485, Applied and Environmental Microbiology, 61, 729-733.
- Shen, D., Xu, J.H., Wu, H.Y. ve Liu, Y.Y., 2002. Significantly Improved Esterase Activity of *Trichosporun brassicae* Cells for Ketoprofen Resolution by 2-Propanol Treatment, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 18, 219-224.
- Shim, H. ve Raushel, F.M., 2000. Self-Assembly of the Binuclear Center of Phosphotriesterase, Biochemistry, 39, 7357-7364.
- Siddavattam, D., Raju, E.R., Emmanuel Paul, P.V. ve Merrick, M., 2006. Overexpression of Parathion Hydrolase in *Escherichia coli* Stimulates the Synthesis of Outer Membrane Porin OmpF, Pesticide Biochemistry and Physiology, 86, 146-150.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D. ve Lange, S., 2007. Molecular Cloning and Characterization of Thermostable Esterase and Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated from Desert Soil in Egypt, Process Biochemistry, 42, 1090-1100.
- Somara, S., Manavathi, B., Tebbe, C. ve Siddavattam, D., 2002. Over-Expression of Parathion Hydrolase of *Flavobacterium balustinum* in *E. coli*: Purification and Characterisation of His-Tagged Parathion Hydrolase, Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 39, 82-86.
- Steiert, J.G., Pogell, B.M., Speedie, M.K. ve Laredo J., 1989. A Gene Coding for a Membrane-Bound Hydrolase is Expressed as a Secreted, Soluble Enzyme in *Streptomyces lividans*, Biotechnology, 7, 65-68.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Choo, D.W., Hirano, Y., Kurihara, T., Nishino, T. ve Esakia, N., 2003. Cloning, Heterologous Expression, Renaturation, and Characterization of a Cold-Adapted Esterase with Unique Primary Structure from a Psychrotroph *Pseudomonas* sp. Strain B11-1q, Protein Expression and Purification, 30, 171-178.
- Tahirov, T.H., Oki, H., Tsukihara, T., Ogasahara, K., Yutani, K., Ogata, K., Izu, Y., Tsunasawa, S. ve Kato, I., 1998. Crystal Structure of Methionine Aminopeptidase from Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*, Journal of Molecular Biology, 284, 101-124.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, Molecular Biology and Evolution, 24, 1596-1599.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevi, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.

- Tomschy, A., Glockshuber, R. ve Jaenicke, R., 1993. Functional Expression of D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli*. Authenticity and Kinetic Properties of the Recombinant Enzyme, European Journal Biochemistry, 214, 43-50.
- Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F.M. ve Hanninen, O., 1994. Phosphotriesterase: A Promising Candidate for Use in Detoxification of Organophosphates, Fundamental and Applied Toxicology, 23, 578-584.
- Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F.M. ve Hänninen, O., 1996. Protection of Organophosphate-Inactivated Esterases with Phosphotriesterase, Fundamental and Applied Toxicology, 31, 210-217.
- URL-1, [www.enzymetechnicalassoc.org/benefits\\_paper.pdf](http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits_paper.pdf), Enzymes: A Primer on Use and Benefits, Enzyme Technical Association, 1 Ocak 2009.
- URL-2, <http://www.adelphisystems.com/ms-gateway/turkish/betaferon/interfer.html>, İnterferondan BETAFERON®'a: Bir Öykü, 1 Ocak 2009.
- URL-3, <http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=viewvecseq&vectorid=3227>, Addgene, Vector Database, pUC18 Sequence, 1 Ocak 2009.
- URL-4, <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>, pUC18, pUC19: Description & Restriction Map, Fermentas Life Sciences, 1 Ocak 2009.
- URL-5, <http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/index.html>, PlasMapper Version 2.0, 1 Ocak 2009.
- URL-6, <http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=viewvecseq&vectorid=152>, Addgene, Vector Database, pGEM-T Easy Vector Sequence, 1 Ocak 2009.
- URL-7, <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>, pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual, Promega, 1 Ocak 2009.
- URL-8, <http://www.addgene.org/pgvec1?f=d&cmd=viewvecseq&vectorid=270>, Addgene, Vector Database, pET-28a(+) Sequence, 1 Ocak 2009.
- URL-9, <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf>, pET-28a-c(+) Vectors, Novagen, 1 Ocak 2009.
- URL-10, <http://www.biocompare.com/protocols/protocol/318/Agarose-Gel-Electrophoresis.html>, Agarose Gel Electrophoresis, Biocompare Protocols, 1 Ocak 2009.
- URL-11, [http://www.ebioinfogen.com/dna\\_ext.htm](http://www.ebioinfogen.com/dna_ext.htm), Ethanol Precipitation of DNA, eBioinfogen, 1 Ocak 2009.

- URL-12, <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>, Translate Tool, Expasy, 1 Ocak 2009.
- URL-13, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Basic Local Alignment Search Tool, Blast, 1 Ocak 2009.
- URL-14, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>, ClustalW, EMBL-EBI, 1 Ocak 2009.
- URL-15, [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), Compute pI/Mw for Swiss-Prot/TrEMBL Entries or a User-Entered Sequence, Expasy, 1 Ocak 2009.
- Vanhooke, J. L., Benning, M. M., Raushel, F. M. ve Holden, H. M., 1996. Three-Dimensional Structure of the Zinc-Containing Phosphotriesterase with Bound Substrate Analog Diethyl 4-Methylbenzylphosphonate, Biochemistry, 35, 6020-6025.
- Vieille, C. ve Zeikus, G.J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1-43.
- Vieille, C., Burdette, D.S. ve Zeikus, G. J., 1996. Thermozyms, Biotechnology Annual Review, 2, 1-83.
- Vieille, C., Hess, J.M., Kelly, R.M. ve Zeikus, J.G., 1995. *xylA* Cloning and Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*, Applied and Environmental Microbiology, 61, 1867-1875.
- Volkin, D.B. ve Middaugh, C. R., 1992. The Effect of Temperature on Protein Structure. In: Ahern, T.J. ve Manning, M.C. (Editors). Stability of protein Pharmaceuticals. A Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation, Plenum Press, New York.
- Walsh, G., 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd., England, 52-54.
- Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. ve Schonung, M.J., 2003. Flow Injection Amperometric Detection of OP Nerve Agents Based on an Organophosphorus Hydrolase Biosensor Detector, Biosensors & Bioelectronics, 18, 255-260.
- Wilson, D. K., Rudolph, F. B. ve Quioco, F. A., 1991. Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with a Transition-State Analog: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations, Science, 252, 1278-1284.
- Woese, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 87, 4576-4579.



- Wrasidlo, W., Schroder, U., Bernt, K., Hubener, N., Shabat, D., Gaedicke, G. ve Lode, H., 2002. Synthesis, Hydrolytic Activation and Cytotoxicity of Etoposide Prodrugs, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12, 557-560.
- Yildirim, M., Col, M., Colak, A., Güner, S., Dülger, S. ve Beldüz, A.O., 2005. Diphenolases from *Anoxybacillus kestanbolensis* Strains K1 and K4<sup>T</sup>. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 501-507.
- Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova, S.E., Engel, P.C., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Scandurra, R. ve Rice, D.W., 1995. The Structure of *Pyrococcus furiosus* Glutamate Dehydrogenase Reveals a Key Role for Ion-Pair Networks in Maintaining Enzyme Stability at Extreme Temperatures, Structure, 3, 1147-1158.
- Zech, R. ve Wigand, K.D., 1975. Organophosphate-Detoxicating Enzymes in *E. coli*. Gel Filtration and Isoelectric Focusing of DFPase, Paraoxonase, and Unspecific Phosphohydrolase, Experientia, 31, 157-158.
- Zeikus, J.G., Vieille, C. ve Savchenko, A., 1998. Thermozyms: Biotechnology and Structure-Function Relationships, Extremophiles, 2, 179-183.
- Zhang, J., Liu, J., Zhou, J., Ren, Y., Dai, X. ve Xiang, H., 2003. Thermostable Esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*: High-Level Expression, Purification and Characterization, Biotechnology Letters, 25, 1463-1467.
- Zhou, X., Scharf, M.E., Sarath, G., Meinke, L.J., Chandler, L.D. ve Siegfrieda, B.D., 2004. Partial Purification and Characterization of a Methyl-Parathion Resistance-Associated General Esterase in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), Pesticide Biochemistry and Physiology, 78, 114-125.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Trabzon'da doğdu. Lise öğrenimini Trabzon Affan Kitapçioğlu Lisesi'nde tamamladı. 1997-2001 yılları arasında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2002 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve Şubat 2004'te KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda doktora programına direkt geçiş yaptı. 2002-2009 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.