

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN ALKALİN
FOSFATAZIN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Kimyager Melek ÇOL

**AĞUSTOS 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 SUŞUNDAN ALKALİN
FOSFATAZIN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Melek ÇOL

**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. Murat KÜÇÜK

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI

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

Enstitü Müdürü: Prof.Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşundan Alkalin Fosfatazın Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma TÜBİTAK 106T696 nolu proje tarafından desteklenmiş olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Lisans Üstü ve Spektroskopi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Lisans Üstü eğitimime birlikte başladığım, bilgeliğini ve hoşgörüsünü her zaman hatırlayacağım değerli hocam, merhum Prof. Dr. Saadettin GÜNER’i saygı ve rahmetle anarım. Bu projenin planlanıp hayata geçirilmesinde çok büyük katkıları olan, değerli eleştiri ve önerileri ile tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam, sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK’a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımın ve tez yazımının her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında kullandığımız bakterinin temin edilmesinde ve bunun yanında çalışmam boyunca bilimsel anlamda değerli katkılarıyla beni destekleyen ve bana yol gösteren Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmamın dahil olduğu projeyi beraber yürüttüğüm Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ, Arş. Gör. Melike YILDIRIM ve Öğr. Gör. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na çalışmalarım esnasındaki yardımlarından ve sabırlarından dolayı çok teşekkür ediyorum. Ayrıca gerek çalışmalarım esnasında gerek özel yaşantımda, desteğini ve dostluğunu her zaman hissettiren sevgili arkadaşım Dr. Arzu ÖZEL’e teşekkür ederim.

Lisans Üstü Eğitimim Boyunca beni Yurt İçi Yüksek Lisans ve Yurt İçi Doktora Bursu almaya layık gören TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) Değerlendirme ve Destekleme Kurulu’na maddi destekleri için teşekkür ederim.

Ve hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan ve haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum.

Melek ÇOL
Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
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 Alkalin Fosfataz Çalışmalarının Tarihsel Gelişimi	3
1.3. Alkalin Fosfataz Kaynakları	4
1.4. Alkalin Fosfatazların Çeşitliliği	5
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> Alkalin Fosfatazı	7
1.4.2. İnsan Dokularından Elde Edilen (Memeli) Alkalin Fosfataz	13
1.4.3. Memeli ve Bakteri Alkalin Fosfatazları Arasındaki Farklılıklar	14
1.5 Alkalin Fosfataz Substratları.....	17
1.6. Alkalin Fosfataz Aktivatör ve İnhibitörleri	19
1.7. Alkalin Fosfatazların Fonksiyonları.....	19
1.7.1. Alkalin Fosfatazın Klinik Önemi	19
1.8. Alkalin Fosfatazın Lokalizasyonu	21
1.9. Alkalin Fosfatazların Reaksiyon Mekanizmaları	23
1.10. <i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	25
1.11. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri	26
1.11.1. Termofilliğin Moleküler Temelleri	27
1.12. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi	31
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	33
2.1. Kullanılan Materyaller.....	33
2.1.1. Cihazlar.....	33

2.1.2.	Enzimler	34
2.1.3.	Kimyasal Madde ve Malzemeler	34
2.1.4.	Primerler.....	35
2.1.5.	Kullanılan Suşlar.....	35
2.1.6.	Plazmitler.....	36
2.1.7.	Bilgisayar Programları.....	36
2.1.8.	Sıvı ve Katı Besiyerileri.....	40
2.1.9.	Çözeltiler ve Tamponlar.....	41
2.1.9.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	41
2.1.9.2.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	41
2.1.9.3.	Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	42
2.1.9.4.	Moleküler Tekniklerde Kullanılan Çözeltiler.....	43
2.1.9.5.	Substrat Çözeltisi.....	44
2.1.9.6.	Tamponlar.....	44
2.2.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	44
2.2.1.	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> TK4 Suşunun Büyütülmesi.....	46
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu.....	46
2.2.3.	Plazmit DNA İzolasyonu.....	47
2.2.4.	DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	48
2.2.5.	Genomik ve Plazmit DNA'larının <i>EcoR</i> I ile Kesimi.....	48
2.2.6.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
2.2.7.	DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi.....	49
2.2.8.	DNA Parçalarının pUC 18 Vektörüne Ligasyonu.....	50
2.2.9.	Kompetent Hücre Hazırlanması.....	50
2.2.10.	Transformasyon.....	51
2.2.11.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi.....	51
2.2.12.	DNA Sıralarının İncelenmesi.....	52
2.3.	İnvers PCR ile Alkalın Fosfataz Geninin Eksik Kısmının Yakalanması.....	52
2.3.1.	İnvers PCR İçin Primer Dizayını.....	52
2.3.2.	Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi.....	52
2.3.3.	DNA Parçalarının Ligasyonu.....	53
2.3.4.	İnvers Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	53

2.3.5.	PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu.....	55
2.3.6.	PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu.....	56
2.3.7.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon.....	56
2.3.8.	Rekombinant Plazmit İzolasyonu ve Sıra Analizi.....	57
2.4.	AP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu...	57
2.4.1.	Primer Dizaynı ve Sentezi.....	57
2.4.2.	PCR ile Genin Tamamının Çoğaltılması.....	57
2.4.3.	PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün <i>Bam</i> H I ve <i>Nhe</i> I İle Kesilmesi.....	59
2.4.4.	Genin pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu.....	59
2.4.5.	Rekombinant Plazmitin BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve İzolasyonu.....	60
2.5.	Alkalin Fosfatazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	60
2.5.1.	Alkalin Fosfatazın <i>E.coli</i> 'de Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	60
2.5.2.	Protein Tayini.....	63
2.5.3.	Doğal Jel Elektroforezi.....	63
2.5.4.	Substrat ve Commassie Boyaması.....	64
2.5.5.	SDS Jel Elektroforezi.....	65
2.6.	Alkalin Fosfataz Aktivitesinin Tayini.....	65
2.6.1.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	66
2.6.2.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	66
2.6.3.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	66
2.6.4.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi....	67
2.6.5.	Alkalin Fosfatazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	67
2.6.6.	Alkalin Fosfatazın pH Kararlılığının İncelenmesi.....	67
2.6.7.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisinin İncelenmesi.....	68
3.	BULGULAR.....	69
3.1.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	69
3.2.	İnvers PCR ile Genin Sonunun Yakalanması.....	69
3.3.	Alkalin Fosfataz Geninin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu.....	70
3.4.	Alkalin Fosfatazın Saflaştırılması.....	76
3.5.	Alkalin Fosfatazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	76

3.5.1.	Alkalin Fosfatazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu.....	76
3.5.2.	Alkalin Fosfataz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu....	79
3.5.2.1.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	80
3.5.2.2.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	80
3.5.2.3.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	81
3.5.2.4.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi...	82
3.5.2.5.	Alkalin Fosfatazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	83
3.5.2.6.	Alkalin Fosfatazın pH Kararlılığı.....	84
3.5.2.7.	Alkalin Fosfataz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisi.....	85
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	87
5.	ÖNERİLER.....	96
6.	KAYNAKLAR.....	98
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 verilere dayanılarak yapılan invers PCR sonucunda, 1410 bazdan oluşan bir alkalın fosfataz (AP) geninin tam DNA sırası belirlendi. Bu DNA sırasının amino asit sırasına çevrildikten sonra BLAST programı ile incelenmesi sonucunda, *Bacillus* türü AP'lere % 70 oranında benzediği tespit edilmiştir. pET-28a(+) vektörüne klonlanan AP geni, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS'de ekspres edildi. Rekombinant protein, nikel afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. SDS-PAGE sonucunda, saflaştırılan proteinin ya tek bir alt birimden ya da aynı molekül ağırlığına sahip birden fazla alt birimden oluştuğu belirlendi. Enzimin optimum pH ve sıcaklığının, sırasıyla 9,5 ve 50 °C olduğu tespit edildi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde 10-30 °C'de aktivitenin önemli ölçüde değişmediği, 40 °C'de ilk 60, 50 °C'de ise ilk 30 dakikada yaklaşık olarak % 50 oranında azaldığı ve 60-70 °C'de ilk 30 dakika da % 10 seviyesine kadar düştüğü gözlemlenmiştir. 4 °C'de, pH 7,0-11,0 aralığındaki tamponlarda 12, 24 ve 48 saat inkübe edilmesiyle yapılan pH kararlılığı çalışmasında, enzimin özellikle pH 8,0 ve daha bazik pH değerlerinde 12 saatlik inkübasyon sonrasında, aktivitesini % 90'nın üzerinde koruduğu 24 saatlik inkübasyon sonunda ise, enzimin aktivitesini % 50 oranında kaybettiği, 48 saat sonunda ise aktivitede % 90'lara varan bir azalma olduğu görülmüştür. para-Nitrofenol fosfat (*p*-NPP) substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 0,049 U/mg protein ve 87 µM olarak belirlendi. Metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelendiğinde 1 mM Hg²⁺, Cd²⁺ ve Al³⁺ varlığında aktivitede sırasıyla % 85, % 55 ve % 18 oranında azalma gözlenmektedir. 1 mM'lık EDTA varlığında aktivitenin tamamen kaybolması aktif bölgesinde Mg²⁺ ve Zn²⁺ içerdiği bilinen AP'lerin gösterdiği özelliklerle uyumlu bir sonuçtur. Bütün bu veriler, *G. caldoxylosilyticus* TK4'ten klonlanan AP'nin endüstriyel uygulamalarda kullanılan AP'lere benzer özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Alkalın Fosfataz, *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Termofilik Bakteri, Rekombinant DNA, Klonlama, Protein Saflaştırma, Karakterizasyon

SUMMARY

Cloning, Expression and Characterization of Alkaline Phosphatase from Thermophilic *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Strain

In this study, supported by TUBITAK (Project number is 106T696), a genomic DNA library was made from a novel thermophilic *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 strain. The whole DNA sequence of an alkaline phosphatase (AP) gene consisting of 1410 bp was determined by performing inverse PCR. Amino acid sequence alignments were done by using BLAST programme. The results indicated that the amino acid sequence of the AP was similar to *Bacillus* species AP in the ratio of 70%. The gene was cloned into pET28a(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. The recombinant protein was purified by using nickel affinity chromatography. SDS-PAGE showed that the purified protein was composed of either one subunit or more than one subunit having the same molecular weight. pH and temperature optima of the enzyme were determined as 9.5 and 50 °C, respectively. When thermostability data were examined, it was seen that the activity was not changed at 10-30 °C remarkably. However, the enzyme started to lose about 50% of its initial activity at 40-50 °C after 60 and 30 minute incubations, respectively. It was seen that the activity decreased down to 10% at 60-70 °C after 30 minute incubation. When the enzyme was incubated at 4 °C in the buffer solutions (pHs ranging from 7.0-11.0) for 12, 24 and 48 hours, the enzyme retained 90% of its activity at basic pH values for 12 hours. The enzyme lost its activity in the ratio of 50% after 24 hours. The V_{max} and K_m values of the recombinant protein 0.049 U/mg protein and 87 μ M, respectively in the presence of para-nitrophenol phosphate (*p*-NPP). Activity was decreased in the ratio of 85%, 55% and 18% in the presence of 1 mM Hg^{2+} , Cd^{2+} and Al^{3+} , respectively. In the presence of 1 mM EDTA the activity was lost completely. This result was consistent with APs, which are known to have Zn^{2+} and Mg^{2+} at the active site. All these data support the presence of an AP from *G. caldoxylosilyticus* TK4 with similar properties to other APs used in industrial applications.

Key Words: Alkaline Phosphatase, *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Thermophilic Bacteria, Recombinant DNA, Cloning, Protein Purification, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Alkalin fosfatazıda içeren bir grup enzimin katalizlediği genel reaksiyon. 3
Şekil 2.	Kim ve Wyckoff (1991) tarafından elde edilen X-ray kristallografik verilere dayanılarak AP dimerinin sekonder yapısının şematik gösterimi..... 9
Şekil 3.	ECAP’da M1 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu..... 10
Şekil.4.	Fosfat grubu, magnezyum ve iki çinko bağlanma bölgelerini içeren ECAP’ın aktif bölgesi..... 11
Şekil 5.	ECAP’da M3 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu..... 12
Şekil 6.	ECAP’da M2 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu 13
Şekil.7.	PLAP ve ECAP’daki aktif bölge metallerine koordine olan birimlerin karşılaştırılmaları..... 15
Şekil 8.	Bir <i>E. coli</i> hücresinde alkalin fosfatazının konumunun şematik gösterimi. 22
Şekil 9.	<i>E. coli</i> alkalin fosfatazının katalitik mekanizması..... 24
Şekil 10.	ECAP tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi..... 25
Şekil 11.	pUC 18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijinini, <i>LacZ</i> ve ampisilin direnç genlerini gösteren harita..... 37
Şekil 12.	pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, <i>LacZ</i> ve ampisilin direnç genlerini gösteren harita..... 38
Şekil 13.	pET-28a(+) vektörünün replikasyon orijinini, <i>LacI</i> genini, kanamisin direnç genini gösteren haritası ve klonlama/ekspresyon bölgesi..... 39
Şekil 14.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 genomik DNA’sının <i>EcoR</i> I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi..... 45
Şekil 15.	AP geninin baş kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR’ın şematik gösterimi..... 54
Şekil 16.	AP geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotit sırası..... 58
Şekil 17.	Polihis-tag kuyruğu içeren AP proteininin nikel kolonu ile saflaştırılmasının şematik gösterimi..... 61
Şekil 18.	İnvers PCR ürününün % 1’lik jeldeki görüntüsü..... 70
Şekil 19.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 genomik DNA’sının AP’yi içeren parçası..... 71
Şekil 20.	PCR ile çoğaltılan AP geninin % 1’lik jeldeki görüntüsü..... 72

Şekil 21.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 suşunun AP geninin DNA ve protein sırası.....	73
Şekil 22.	<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 AP amino asit sırasının Clustal W programı kullanılarak bazı organizmaların AP sıraları ile karşılaştırma sonuçları.....	74
Şekil 23.	AP geninin pET28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi	76
Şekil 24.	Doğal poliakrilamid jel elektroforez analizi	77
Şekil 25.	SDS jel elektroforez analizi.....	78
Şekil 26.	Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	80
Şekil 27.	Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	81
Şekil 28.	Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi.....	81
Şekil 29.	<i>p</i> -NPP substratı varlığında AP'nin doyumluk eğrisi.....	82
Şekil 30.	<i>p</i> -NPP substratı varlığında AP aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi.....	83
Şekil 31.	AP'nin ısıl kararlılık eğrisi.....	83
Şekil 32.	AP'nin pH kararlılığı (pH-% Kalan Aktivite).....	84
Şekil 33.	AP'nin pH kararlılığı (İnkübasyon zamanı-% Kalan Aktivite).....	85
Şekil 34.	AP aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi.....	86

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri	25
Tablo 2. Kullanılan cihazlar	33
Tablo 3. Kullanılan enzimler	34
Tablo 4. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	34
Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler.....	35
Tablo 6. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>E. coli</i> suşları.....	35
Tablo 7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler.....	36
Tablo 8. Kullanılan bilgisayar programları ve internet adresleri.....	36
Tablo 9. İnvrs PCR bileşenleri.....	55
Tablo 10. İnvrs PCR reaksiyon şartları.....	55
Tablo 11. PCRreaksiyonunun bileşenleri.....	58
Tablo 12. PCR reaksiyonunun şartları.....	58
Tablo 13. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri.....	64
Tablo 14. SDS jel elektroforezinin bileşenleri.....	65
Tablo 15. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 AP amino asit sırasının diğer bazı türlerle benzerliği.....	72
Tablo 16. AP aktivitesinin spektroskopik olarak tayini.....	79

SEMBOLLER DİZİNİ

aa	: Amino asit
ADP	: Adenozin 5' difosfat
amp	: Ampisilin
AMP	: Adenozin 5' monofosfat
AP	: Alkalın fosfataz
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartat
atm	: Atmosfer
ATP	: Adenozin 5' trifosfat
BAP	: Bakteriyel alkalın fosfataz
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumin
C	: Sitozin
cAMP	: Adenozin 3',5'-monofosfat
CIAP	: Dana bağırsağı alkalın fosfatazı
Cys	: Sistein
D	: Aspartat
Da	: Dalton
dd H ₂ O	: Bidestile su
DMF	: Dimetilformamit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozit trifosfat
E	: Glutamat
EC	: Enzim kod numarası
ECAP	: <i>Escherichia coli</i> alkalın fosfatazı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
G	: Guanin

gDNA	: Genomik DNA
Gln	: Glutamin
Glu	: Glutamat
GTP	: Guanozin trifosfat
H	: Histidin
His	: Histidin
IAP	: Bağırsak alkalın fosfatazı
IPTG	: İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozit
K	: Lisin
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Lauria-Bertani
LBA	: Lauria-Bertani agar
Lys	: Lisin
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi
mL	: Mililitre
MUFP	: 4-metilumbelliferilfosfat
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NAP	: Nötrofil alkalın fosfataz
NSAP	: Spesifik olmayan alkalın fosfataz
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
P	: Fosfor
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	: Fenilalanin
phoA	: Alkalın fosfataz kodlayan gen
P_i	: İnorganik fosfat
PLAP	: Plasental alkalın fosfataz
PLP	: Pridoksal-5'-fosfat
pmol	: Pikomol
<i>p</i> -NP	: para-nitrofenol

<i>p</i> -NPP	: para-nitrofenilfosfat
PoliP	: İnorganik polifosfatlar
PP _i	: İnorganik pirofosfat
Pt	: Fosfit
rbb	: Ribozom bağlanma bölgesi
RE	: Restriksiyon enzimi
rec	: Replikasyon orjini
RG	: Reverse Giraz
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Ser	: Serin
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Thr	: Treonin
T _m	: Erime sıcaklığı
TNAP	: Doku spesifik olmayan alkalın fosfataz
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
UTP	: Uridin 5'-trifosfat
UV	: Ultra viyole
<i>V</i> _{maks}	: Maksimum hız
X-Gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktozit
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
Å	: Angstrom

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlılığın en önemli karakterlerinden olan oldukça çok sayı ve çeşitteki biyokimyasal reaksiyonlar, enzimler olarak bilinen olağanüstü sayılabilecek biyolojik katalizörler yardımıyla gerçekleştirilirler. Enzimlerin tıbbi, endüstriyel ve çevresel amaçlarla kullanımına günümüzde sıkça rastlanmakta ve bu durum hızlıca başka birçok alana da yayılmaktadır (Xu vd., 2006). Etkili ve ekonomik katalizörler olması sebebiyle enzimler; çamaşır deterjanları ve kağıt işlemeden, kimyasal sentez ve tanı/araştırma reaktiflerine kadar artan uygulamalarda yer bulmaktadır. Varolan enzimleri geliştirmek, mevcut prosesleri optimize edebilmek veya pazarlanabilir kısımlar kazanmak amacıyla farklı tür organizmalardan yeni enzimlerin taranması için büyük bir çaba sarfedilmektedir (Xiao vd., 2002).

Gen ve protein mühendisliğini de içine alan biyoloji ve kimya alanlarında son yıllarda sağlanan önemli ilerlemeler, canlılığın temeli hakkında aydınlatılmayı bekleyen konulara ışık tutmakta, ayrıca elde edilen bilimsel veri ve sonuçların değerlendirilerek, sağlıktan gıdaya kadar birçok alanda pratikte kullanımı sağlanmaktadır. Kaydedilen bu gelişme ve ilerlemelere paralel olarak canlı sistemlerde bulunan biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar vs.) insanlığın yararına farklı alanlarda kullanımı günden güne artmaktadır (Ertunga, 2006).

Endüstriyel olarak özellikle ısıya dayanıklı enzimlerin saflaştırılması çok önemli olduğundan termofilik bakterilerden enzim izolasyonu, karakterizasyonu ve klonlanması üzerine ilgi gittikçe artmaktadır. Rekombinant DNA teknolojileri, stereoseçiciliğini, substrat özgünlüğünü ve genel performansını değiştirerek özel amaçlara uygun enzimlerin üretilmesine imkan sağlar. Bu yöntemlerin kullanımı ayrıca saf enzimlerin ekonomik ve büyük miktarlarda üretimini de sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu rekombinant enzim genlerinin, yabani tiplerinden yaklaşık 40-50 kat daha fazla enzim ürettiği ve bu enzimlerin aktivitelerinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Bu yollardan biri veya birkaçı kullanılarak özel bazı endüstriyel uygulamaların amacına uygun olan enzimlerin katalitik performansları geliştirilmiştir.

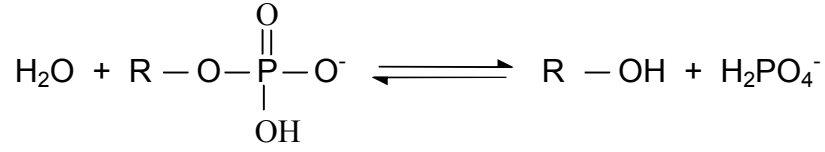
Endüstriyel kullanımları açısından enzimlerin geniş skalada üretilmeleri gerekmektedir. Ne var ki, enzimlerin endüstriyel talebe cevap verecek çoklukta üretilmeyişi, üretim maliyetlerinin fazlalığından ve bunları daha çok fakat daha ucuz üretebilecek metodların yetersiz oluşundan kaynaklanmaktadır. Enzimlerin canlı organizmalardan üretimi ve saflaştırılması için günümüzde tercih edilen yöntemlerin başında klonlama gelmektedir. İstenilen gen parçasının uygun bir vektöre klonlanıp *Escherichia coli* (*E.coli*)’de ekspresyonu sonucu elde edilen protein, bazı tekniklerle saflaştırılıp kullanıma hazır hale getirilmektedir. Böylelikle, enzimin üretimi, doğrudan üretildiği organizmadan eldesinden daha pratik ve maliyeti daha düşük hale gelir (Ertunga, 2006).

Bu nedenle bu çalışmada, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı araştırmacılarından Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ, Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI ve gruplarının yapmış oldukları çalışmalarla izole edilen ve çeşitli özellikleri tanımlanmış olan *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 (*G. caldoxylosilyticus* TK4) (Dülger, 2003) termofilik bakterisinin genomik kütüphanesinin oluşturulması ve rekombinant plazmitlerin sıralarının incelenmesi sonucu belirlenen klinik öneme sahip bir enzim olan alkalın fosfatazı kodlayan gen izole edilmiş, konakçı bir hücreye aktarılmış ve ekspresyonu ile üretilen rekombinant enzimin bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Alkalın fosfataz (AP, EC 3.1.3.1, ortofosforik-monoester fosfohidrolaz) serbest inorganik fosfat (P_i) üretmek ya da fosforil grubunu diğer alkollere transfer etmek üzere bir fosfoseril araürünü aracılığı ile fonksiyon gösteren spesifik olmayan bir fosfomonoesterazdır (Kal, 1989; Xiao vd., 2002). Bakterilerden memelilere kadar doğada yaygın olarak bulunması AP’lerin temel biyokimyasal işlemlerde özellikle fosfat taşınımı ve metabolizmasında rol aldığını gösterir (Coleman ve Gettins, 1983; Posen, 1967; Trowsdale vd., 1990). Fizyolojik fonksiyonlarının çok net olmamasına karşın bazı türlerde (özellikle prokaryotik organizmalarda) P_i eksikliğinde indüklenmiş üretimleri fosfat metabolizmasında hayati bir rol oynadığını gösterir. Memelilerde taşıma mekanizmasıyla bağlantılıdır (McComb vd., 1979). AP’ler yaygın olarak tanı ve tedavi amaçlı işlemlerde, immünoloji çalışmalarında ve ELISA, Western blotting analizleri, nükleik asit hibridizasyonu ve *in situ* hibridizasyon gibi işlemlerde duyarlı biyolojik marker olarak ve moleküler biyolojide, rekombinant plazmitlerin oluşturulmasında DNA paraçalarından 5'-ucundaki fosfatı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Blake vd., 1984; Jablonski vd., 1986; Augood vd., 2002; Zappa vd., 2001).

1.2. Alkalin Fosfataz Çalışmalarının Tarihsel Gelişimi

Suzuki, Yoshimura ve Takaishi tarafından 1907 yılında alkalin fosfatazın ilk tanımı yapılmıştır. AP, alkali pH'da monofosfat esterlerini hidroliz eden bir grup enzimin genel ismidir. Bu enzim grubunun optimum aktivitesi pH 8,0-10,0 aralığında gözlenmektedir. Enzim katalizli genel reaksiyon denklemi Şekil 1'de gösterildiği gibidir (Kal, 1989).



Şekil 1. Alkalin fosfatazı da içeren bir grup enzimin katalizlediği genel reaksiyon

AP, literatürde ilk defa, Suzuki ve arkadaşlarının (1907) fosfatazların ökaryotik enzimlerin ayrı bir sınıfını oluşturduğunu önermesiyle, 1900'lü yılların başlarında yer almıştır. Pirinç tohumları üzerinde yapılan çalışma, fosforun çoğunun fitin formunda mevcut olduğunu ve P_i seviyesinin çimlenme sırasında arttığını ve P_i 'nin artışının fitini inositol ve fosforik aside ayıran bir enzim varlığıyla sağlandığını göstermektedir. Aynı zamanlarda Harden ve Young mayada P_i üreten, heksoz difosfatı hidrolizleyen bir enzimi çalışmaktaydılar. Bu sırada ürün olan P_i 'nin aynı zamanda enzimin bir inhibitörü de olduğunu gösterdiler. Harden ve Young tarafından yapılan bu çalışma eksojen bir substratın AP ile hidrolizinin kayıtlı ilk kanıtıdır (Murphy, 1996).

1912 yılında Grosser ve Husler ile von Euler AP'nin çeşitli dokularda olmasına rağmen gliserofosfat ve fruktoz 1,6-difosfatı hidrolizleyebilen enzimin bağırsak mukozasında yüksek miktarlarda mevcut olduğunu göstermişlerdir. Bu noktada bağırsak mukozasından elde edilen AP, bu enzim üzerindeki araştırmalar için bir prototip (örnek) haline gelmiştir (Murphy, 1996).

1962 yılında Engström, bağırsaktan elde edilen enzimin düşük pH'da fosfat esterleriyle inkübe edildiğinde bir fosfoseril birimi oluşturduğunu göstermiştir. Bu zamana kadar AP'lerle katalizlenen reaksiyon mekanizmalarıyla ilgili çok şey bilinmemektedir. 1960'larda ise fosfat kıtlığında baskılanamayan bir AP'ye sahip *E. coli* keşfi söz konusudur (Murphy, 1996).

E. coli AP (ECAP)'si, bağırsaktan elde edilen enzimle benzer pH-aktivite profili ve fosfoseril araürününün oluşumu gibi bazı karakteristik özelliklere sahiptir. 1960 ve 70'li yıllarda AP konusunda yapılan araştırmaların çoğu serin-fosfat kovalent ara ürününün izole edilmesi ve aktif bölgedeki iki çinko ve bir magnezyum atomunun oynadığı rolün belirlenmesi üzerinde odaklanmıştır. Enzimin P_i ve bir alkol üretmek üzere benzer hızla çeşitli fosfat monoesterlerinin hidrolizini katalizleyen spesifik olmayan bir fosfomonoesteraz olduğu gösterilmiştir. Ayrıca enzim etanolamin veya Tris gibi bir fosfat akseptörü varlığında fosforil grubunun bir alkole transferiyle transfosforilasyon reaksiyonu katalizlemektedir. 1962 yılında ECAP'nın her bir dimer için iki çinko atomu içerdiği gösterilmiştir. Enzim ayrıca her bir dimer için bir magnezyum atomu içerir ve AP'nin fonksiyonu için magnezyumun çok önemli olduğunun bilinmesine rağmen o yıllarda tam rolü henüz belirlenememiştir (Murphy, 1996).

ECAP'nın aminoasit sırasının belirlenmesine ilk olarak 1980'lerde başlanmıştır. Bu keşfi enzimin X-ray yapısının belirlenmesi takip etmiştir. *E. coli* enziminin X-ray yapısı ilk defa Sowadski ve arkadaşları tarafından çözülmüş ve 1991'den itibaren daha detaylı yapı Kim ve Wyckoff tarafından aydınlatılmıştır. AP'nin X-ray yapısının iyileştirilmesi sonucu sıra belirlemeleri enzim üzerinde yeni çalışmalara yol açmıştır. Bölge spesifik mutajenez çalışmaları ve enzimin karakterizasyonu bu çalışmalara örnek verilebilir. Bu çalışmalarla sırasıyla, enzimin mutant versiyonları üretilmekte ve enzimin fonksiyonunda hangi birimlerin kritik rol oynadığı ayrıca enzim katalizli reaksiyon mekanizması anlaşılmaktadır (Murphy, 1996).

1.3. Alkalın Fosfataz Kaynakları

İnaktive olabilme kolaylıklarına göre farklılandırılabilen çeşitli alkalın fosfataz kaynakları vardır (URL-1, 2008)

a) Bakteriyel Alkalın Fosfataz (BAP): AP'lerin en aktifidir ama aynı zamanda defosforilasyon reaksiyonunun sonunda etkinliğini yok etmek çok zordur.

b) Dana Bağırsağı Alkalın Fosfatazi (CIAP): Sığır bağırsağından saflaştırılır. BAP'a göre daha az aktif olmasına rağmen proteaz mumalesi veya ısı (5 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) varlığında 10 dakika 75 °C) ile etkili bir şekilde etkisi yok edilebildiği için moleküler biyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan fosfatazdır.

c) Karides Alkalın Fosfataz (Shrimp): Soğuk su karidesinden elde edilir. Isı (65 °C'de 15 dakika) ile kolayca etkinliği yok edildiği için daha kullanışlıdır.

1.4. Alkalın Fosfatazların Çeşitliliği

AP'ler, bakteriden insana canlı formların hemen hepsinde mevcut olan substrata karşı spesifik olmayan fosfomonoesterazlardır (McComb vd., 1979). Bazı mikroorganizmalar glukoz, amonyak, ve P_i gibi tercih edilen besinler mevcut olmadığı durumlarda kompleks substratları parçalamak için gerekli olan enzimleri sentezlerler. Bunların hepsinin esas olmasına rağmen, proteaz, lipaz ve nükleazlar gibi enzimler aracılığıyla sağlanan besinleri hücreler, çeşitli karbon veya azot kaynaklarının metabolizması aracılığıyla elde edebilirler. Fakat fosfat sentezlenemez ve hücreler, P_i sınırlı olduğunda, fosfatı mutlaka nükleik asitlerden, fosforillenmiş şekerlerden, proteinlerden elde etmelidirler. Bu yüzden organizmaların doğada hayatta kalması için en önemli enzimlerden biri fosfat esterlerini hidrolizleyen ve inorganik fosfat üreten fosfatazlardır (De Prada vd., 1996). Çoğu bakteriyel tür, özellikle gram negatif bakteriler, P_i yokluğunda AP üretirler (Wanner, 1993).

Mikroorganizmalar fosfat için şiddetli yarış içinde olduklarından, fosfataz üreten bazı mikroorganizmalar bulmak ve onların sentezini ve aktivitelerini düzenlemek için mekanizmalarının değerlendirilmesi şaşırtıcı değildir. Fakat şaşırtıcı olan keşfedilen fosfatazların çeşitliliğidir. Alt birim büyüklüğü, metal iyon gerekliliği ve substrat spesiflikleri aynı olan çoğu enzim ailesinden farklı olarak, çalışılan fosfatazlar oldukça değişkendir (Vincent vd., 1992). Örneğin iki farklı halofilik türden 15,5 kDa'luk küçük ve 160 kDa'luk büyük AP monomerleri rapor edilmiştir (Goldman vd., 1990). Çoğu hücre dışı fosfatazlar monomerdır fakat *Thermus aquaticus*'dan elde edilen enzim 143 kDa'luk bir trimerdir (Yeh ve Trela, 1976). Fosfatazlar, substrat spesiflikleri, optimum pH aralıkları ve metal iyon gereklilikleri açısından da oldukça değişiklik gösterirler. Enzim aktivitesi için çinko genellikle gereklidir fakat *Halobacter*'den elde edilen bir enzim mangana (Fitt ve Peterkin, 1976) ihtiyaç duyarken, birkaç tanesi kalsiyum (Glew ve Heath, 1971; Goldman vd., 1990) kullanır. Ayrıca *Synechococcus* sp.'den elde edilen enzim Zn^{2+} iyonu ile inhibe olmaktadır (Ray vd., 1991).

Bazıları ECAP'da olduğu gibi periplazmik, bazıları membran bağımlı (Baoudene-Assali vd., 1993; Schaffel ve Hulett, 1978; Yamane ve Maruo, 1978 a, b) bazıları ise

hücre dışıdır (Glew ve Heath, 1971; Goldman vd., 1990; Kobori ve Taga, 1980; Nomoto vd., 1988). Gram negatif bakteride enzimin periplazmik alana yerleştiği (Torriani, 1990), gram pozitif bakterilerde membrana bağlı olduğu (Ghosh vd., 1977) bildirilmiştir. Ayrıca *Saccharomyces cerevisia* vokula bağlı bir AP sentezler ve inaktif bir öncülden aktif olgun enzime dönüşüm için 3' ucunda post translasyonel işlem gerektirir (Hulett vd., 1991). *Vibrio cholerae*'dan elde edilen AP rapor edilen ilk monomerik AP'dir (Roy vd., 1982).

Bacillus'lar spor oluşumuyla sonuçlanan hücresel farklılaşmanın ilkel haline maruz kalan prokaryotik organizmalardır. AP üretimi hem bitkisel hem de spor oluşturan hücre tipleriyle ilişkilidir. Bir *Bacillus* kültüründeki en önemli AP türleri kültür şartlarına ve kültürün büyüme fazına bağlıdır (Glynn vd., 1977; McNicholas ve Hulett, 1977). AP proteininin salınan, membrana bağlı, integral ya da periferik olup olmaması hangi AP geninin ekspres edildiğine bağlıdır (Spencer ve Hulett, 1981; Spencer vd., 1982; Hulett vd., 1986; Hulett ve Jensen, 1988).

E. coli PhoA enziminin homologları; *Escherichia fergussonii* (DuBose ve Hartl, 1990), *Serratia marcescens* (DuBose ve Hartl, 1990), *Bacillus subtilis* (Hulett vd., 1991), *Bacillus licheniformis* (Kim vd., 1998), *Enterococcus faecalis* (Lee vd., 1999) ve *Thermotoga maritima*'nın (Nelson vd., 1999) dahil olduğu çeşitli gram pozitif ve gram negatif türlerde tespit edilmiş ve karakterize edilmiştir.

Bir çok AP izole edilmiş ve karakterize edilmiş olmasına rağmen sadece ticari ECAP ve CIAP rutin olarak moleküler biyolojide kullanılmaktadır (Zappa vd., 2001). Fakat onların doğal olan düşük termal kararlılıkları ve yarı ömürleri bazı özel şartlar, örneğin yüksek sıcaklık ve yüksek pH gibi hallerde ileri uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Yaygın AP'lerle kıyaslandığında termal kararlı AP'ler yüksek termalkararlılık, yüksek reaksiyon hızları, denatürasyon ve mikrobiyal kontaminasyona karşı dirençli olmak gibi bazı yararlı özelliklere sahiptir (Sterner ve Liebl, 2001). Bu gibi avantajlar sebebiyle termofilik bakterilerden elde edilen termofilik AP'lere ilgi artmaktadır. Şimdiye kadar birkaç tane termal kararlı AP *Thermus caldophilus* ve *Thermus thermophilus* gibi *Thermus* türleri, *Thermotoga neapolitana*, *Meiothermus ruber*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Pyrococcus abyssi* gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve onları kodlayan genler klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Angelini vd., 2001; Gong vd., 2005; Ji vd., 2001; Kim vd., 1997; Park vd., 1999; Pantazaki vd., 1998; Yeh ve Trela, 1976; Dong ve Zeikus, 1997; Yurchenko vd., 2003; Mori vd., 1999; Zappa vd., 2001).

Bunların yanında ısı olarak kararsız AP'lerinde varlığı bilinmektedir. HK47 olarak tasarlanan bir Antartic bakterisinden (Kobori vd., 1984), *Sphingobacterium antarcticus*'dan (Chattopadhyay vd., 1995), *Arthrobacter* D10 (De Prada vd., 1996) ve *Shewanella* sp.'den (Ishida vd., 1998) elde edilen AP'lerin üçü sadece kısmen saflaştırılmıştır ve yapısal ve fonksiyonel özellikleri bakımından karakterizasyonu minimumdur. Ama üçü de soğukta aktif enzimler için gözlenen karakteristik ısı kararsızlık ve yüksek katalitik aktiviteyi göstermektedir (De Prada vd., 1996; Kobori vd., 1984; Chattopadhyay vd., 1995). Ayrıca omurgalı Atlantic morina balığından (*Gadus morhua*) elde edilen soğukta aktif AP da sığır enzimleriyle kıyaslandığında 2,5 kat daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Ásgeirsson vd., 1995). Isıl kararsız bir fosfataz sonraki reaksiyon başlamadan aktivitenin uzaklaştırılacağı uygulamalarda yararlı olur. Örneğin sıcaklıkla kolayca aktivite kaybeden bir AP ile rekombinant DNA moleküllerinin oluşumu sırasında lineer plazmit DNA'nın defosforilasyonunu takiben etanol çöktürmesi ve fenol ekstraksiyonu basamaklarına olan ihtiyaç giderilebilir (De Prada vd., 1996).

1.4.1. *Escherichia coli* Alkalın Fosfatazı

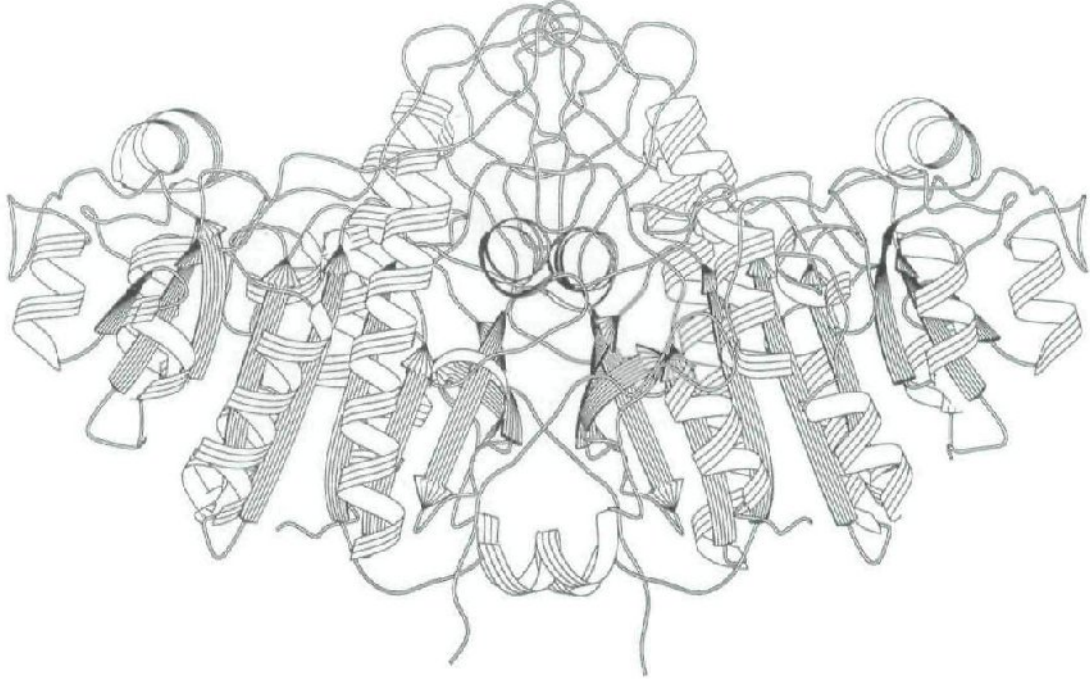
AP sentezini yöneten genetik düzenleyici sistemler oldukça detaylı bir şekilde *E. coli*'de çalışılmıştır ve birçok düzenleyici gen aydınlatılmıştır (Majumdar vd., 2005). Genetik analizler, *E. coli*'nin, fosfit (Pt)'in fosfata okside olduğu iki tane bağımsız yola sahip olduğunu gösterir. Bir yol C-P liyaz enzimini kodlayan 14-gen *phn* operona bağımlıdır. Diğer yolsa BAP'yi kodlayan *phoA* genine bağlıdır. Transposon mutajenez çalışmaları BAP'ın *phoA*-bağımlı yoldaki tek enzim olduğunu göstermiştir. BAP fosfit bağımlı ve H₂ üreten tek hidrojenazdır. Bu reaksiyon fosfor (P) ve hidrojen (H) biyokimyasında benzeri görülmemiş bir reaksiyondur ve hidritin, substrattan su üreten protonlara direkt transferinde rol alır (Yang ve Metcalf, 2004).

Canlı organizmalardaki diğer önemli elementlerden farklı olarak fosfor yaygın olarak redoks korunmuş bir element olarak düşünülür. Buna göre P_i, organik fosfat esterleri ve fosfoanhidridler içeren biyolojik araürünlerin büyük bir çoğunluğunda bulunan P merkezleri, tamamıyla okside durumdadır (+5). Tamamen kabul edilmiş olmamasına rağmen yine de, bazı organizmalar P redoks reaksiyonlarının biyokimyasal olarak mümkün olduğunu göstererek indirgenmiş P bileşiklerini metabolize etme kabiliyetine sahiptirler.

Prokaryotik (ve bazı ökaryotik) organizmaların geniş bir kısmı indirgenmiş P bileşiklerini sentezleyebilirler ya da parçalayabilirler (Ternan vd., 1998; Seto ve Tomohisa, 1999). Bu özellik organizmaya bir avantaj sağlar. İndirgenmiş P metabolizmasının incelenmesi alışılmamış biyoloji ve biyokimya zenginliği oluşturur. ECAP diğer enzimlere göre daha fazla ilgi odağı olmuştur ve hem H hem de P metabolizmasında eşî görülmemiş bir enzimatik reaksiyonla Pt'nin fosfat ve moleküler H₂'ye oksidasyonunu katalizler. Fosfat büyüme için gerekli olduğundan, organizmalar Pt ortamı üzerinde fosfiti fosfata yükseltgeyebilme kapasiteleri olmadıkça büyüyemezler (Yang ve Metcalf, 2004). Fosfatın sınırlı olduğu durumlarda *phoA* (alkalin fosfataz kodlayan gen) birkaç yüz kat indüklenmiştir. *phoA* bağlı olmayan fosfat kıtlığında indüklenabilen (*psi*) 20'den fazla promotor içeren fosfat düzenleme sisteminin bir üyesidir ve fosfat sindiriminde rol oynayan *phoA*, *phoE*, *psiB*, *psiC*, *psiD* ve *pstSCAP* gibi *psi* genlerinin transkripsiyonu *phoB* ve *phoR* ile düzenlenir (Wanner ve Chang, 1987). P_i kısa bir süre temin edilirse hücre dışındaki fosforillenmiş bileşikler, bir dış membran proteini olan Porin E (*phoE* gen ürünü) tarafından periplazmik alana transfer edilir. İndüklenmiş AP bu substratlardan fosfatı salar ve salınan fosfat, diğer proteinlerle ilişkili olan iç membran fosfat kanalı (PstC ve PstA) aracılığıyla sitoplazmaya transfer edilir (Yang ve Metcalf, 2004). *E. coli*'de *phoB* ve *phoR* genleri *phoA* genine oldukça yakındır (Torriani, 1990).

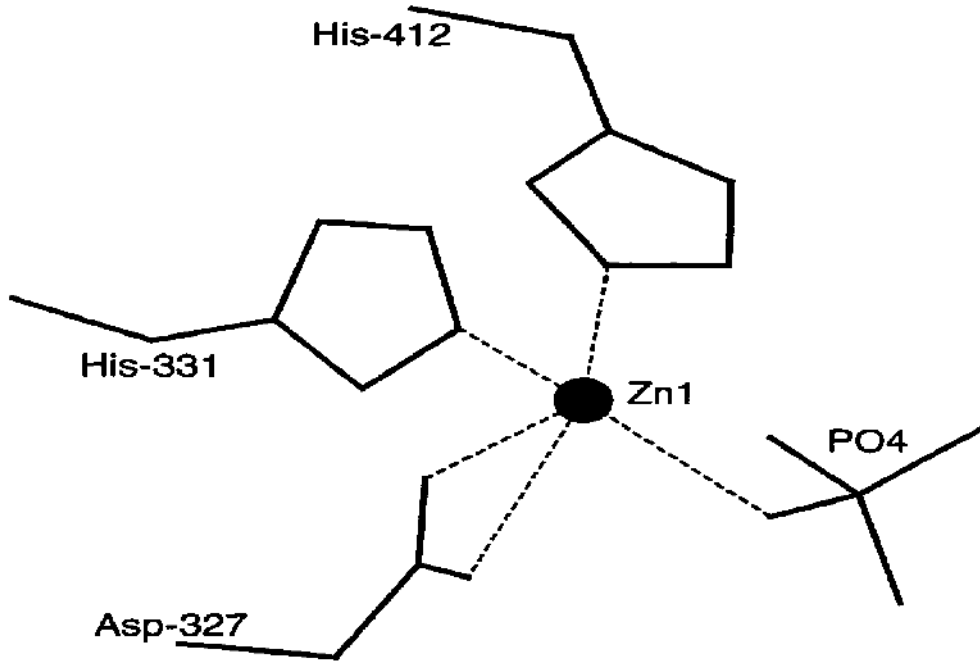
Tüm bu nedenlerden dolayı bakterilerde AP'ler *E. coli* PhoA enzimi ile temsil edilir (Berlutti vd., 2001). AP aşırı üretimi, saflaştırılması ve kararlılığı kolay olduğu için öncelikle *E. coli*'de çalışılmıştır (Murphy, 1996). *E. coli*, organizma fosfat kıtlığında olduğu zaman periplazmik alana AP salınmasıyla sonuçlanan tek bir yapısal AP geni içerir (Hulett vd., 1991). Şekil 2, fosfat varlığında ECAP dimerinin yapısını göstermektedir (Kim ve Wyckoff, 1991). *E. coli*'den elde edilen AP, biyosentez, yapı ve katalitik mekanizması bakımından incelenmiştir (Derman ve Beckwith, 1991; Karamyshev vd., 1998; Bradshaw vd., 1981; Chang vd., 1986; Coleman, 1992; Kim ve Wyckoff, 1990, 1991). ECAP, 94 kDa ağırlığında, her bir monomerde bir aktif bölgeye sahip olan bir homodimer olarak periplazmik alana yerleşmiştir ve her bir monomer 449 aminoasit biriminden oluşur ve iki Zn²⁺ ve bir Mg²⁺ içerir. İki aktif bölge arasındaki mesafe 30 Å'dur. Her bir aktif bölge üç tane metal bağlanma bölgesi (M1, M2 ve M3) ve bir tane de fosfat bağlanma bölgesinden oluşur. M1 ve M2 iki çinko atomu (Zn₁ ve Zn₂) M3 ise bir magnezyum atomu (Mg) ile dolu durumdadır. İki çinko atomu arasında 4 Å mesafe varken, Zn₂ ile Mg arasında 5 Å ve Zn₁ ile Mg arasında 7 Å mesafe vardır (Murphy, 1996). İnorganik fosfatla bağlı aktif bölge

cebi yüzeyseldir ve 3 metal iyonuna ilave olarak Arg 166 ve Ser 102 ile aynı hat üzerindedir (Holtz vd., 1999). Her bir aktif bölgedeki 3 metal iyonu *Bacillus cereus* (Hough vd.,1989)'dan fosfolipaz C, *Penicillium citrinum* (Volbeda vd., 1991)'dan P1 nükleazinkine benzer şekilde katalitik metal üçlü oluştururlar.



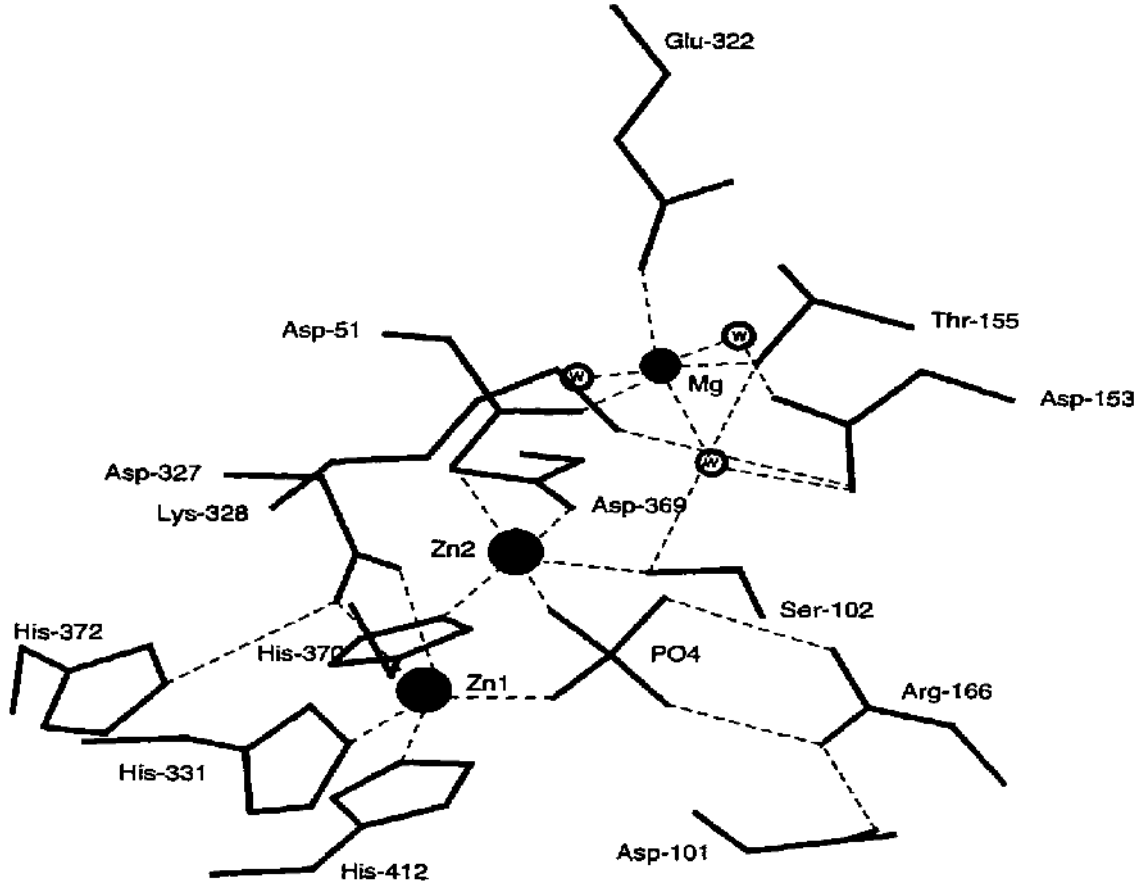
Şekil 2. Kim ve Wyckoff (1991) tarafından elde edilen X-ray kristalografik verilere dayanılarak AP dimerinin sekonder yapısının şematik gösterimi. β -tabaka oklarla, α -sarmaller ise kurdela şeklinde gösterilmiştir.

Zn_1 , Asp 327'nin her iki karboksilatı, His 412 ve His 331'in imidazol azotları ve fosfatın oksijenlerinin biri ile beşli koordinasyon halindedir (Şekil 3). Zn_2 , Asp 51 ve Asp 369'un karboksilatlarının biri, His 370 imidazol azotu ve fosfat oksijenlerinden biriyle tetrahedral olacak şekilde koordine olmuştur. M1 bölgesindeki çinko atomu (Zn_1) ile M2 bölgesindeki çinko atomu (Zn_2) arasındaki etkileşim enzimin katalitik mekanizmasında esas rol oynar (Kim ve Wyckoff, 1991). Mg ise Thr 155'in hidroksili, Glu 322 ve Asp 51'in karboksilatlarının biri ve Asp 153'ün karboksil grubuyla koordine durumda üç tane su molekülünün ikisi (Lys 328 ile tuz köprüsü de oluşturan) ile bozulmuş oktahedral olarak koordine olmuştur (Murphy, 1996) (Şekil 4). Asp 153 iki su molekülü aracılığıyla dolaylı olarak magnezyuma koordine olmuştur. Lys 328 Mg bağlanma bölgesinin yakınına yerleşmiştir ve Asp 153 ile bir tuz köprüsü oluşturur (Şekil 5). Magnezyumun tam rolü bilinmemekle birlikte enzimin tam aktivitesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmektedir.



Şekil 3. ECAP’da M1 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu (Murphy, 1996).

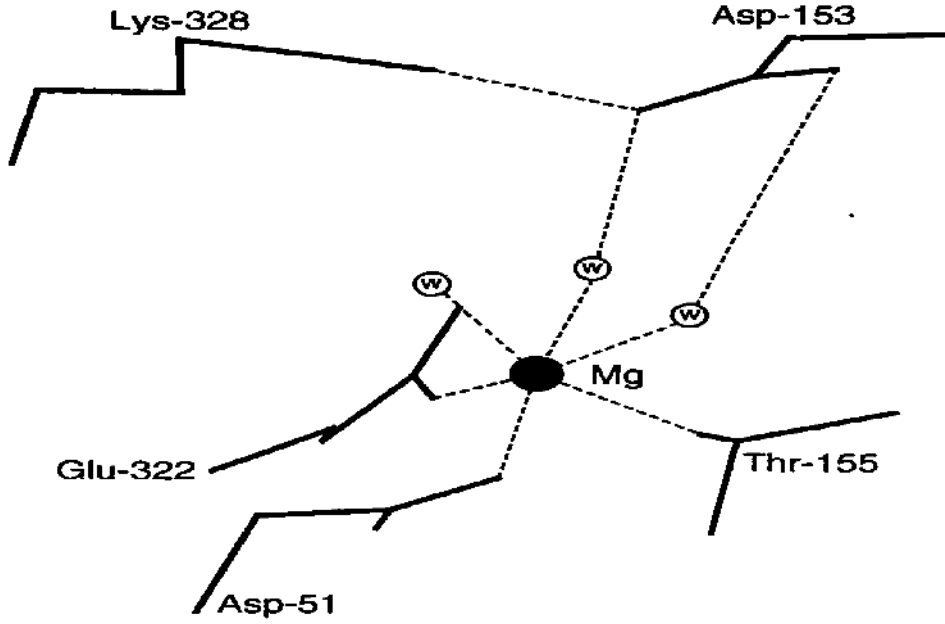
E. coli’den elde edilen yaban tip AP’de iki çinko atomu enzimin katalitik mekanizmasında doğrudan rol oynar. M1 metal bağlanma bölgesindeki çinko kataliz için önemliyken M2 metal bağlanma bölgesindeki (Şekil 6) çinko katalizi kolaylaştırır ama tamamen gerekli değildir. Zn_1 ’in iki rolü vardır; kovalent olmayan enzim-substrat kompleksinde substrattan ayrılan grup üzerindeki negatif yükü kararlı hale getirmek ve kovalent enzim-fosfat araürünüden Ser 102’nin yer değiştirmesi amacıyla fosfora saldırmak için mevcut hale gelen bir su molekülünü aktive etmektir. Yaban tip AP’de M2 metal bağlanma bölgesindeki çinko (Zn_2), fosfata saldırabilen serin oksijen anyonunun oluşumunu kararlılaştırmaktan ve nükleofilik saldırı için fosfatın uygun pozisyonda bulunmasından sorumludur.



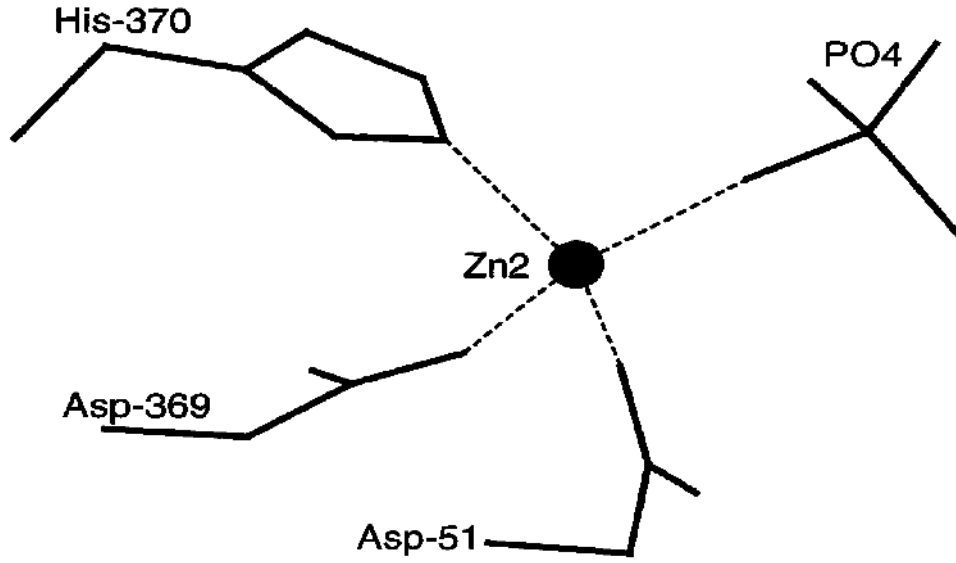
Şekil 4. Fosfat grubu, magnezyum ve iki çinko bağlanma bölgelerini içeren ECAP'ın aktif bölgesi. Su molekülleri "w" harfi ile gösterilmiştir (Murphy, 1996).

Fosfat, iki çinko atomu ve 166. pozisyondaki arginin birimi ile su aracılı etkileşimlerle aktif bölgede tutulur (Şekil 4). Aktif bölge cebi çözücüyeye maruz kalan R grubunu bırakarak substratın fosfat kısmını içine almaya yetecek büyüklüktedir. Bu durum alkalın fosfatazın karakteristik olan substrat nonspesifikliğini açıklamaktadır (Murphy, 1996). Tek Mg atomu, fosfattan yaklaşık 5 Å mesafededir. Ayrıca ECAP 2 tane molekül içi disülfid bağı (Cys 168-Cys 178 ve Cys 286-Cys 336) içerir. AP'nin hücre içi kararlılığı, bir veya her iki disülfid bağının yokluğu ile azalmaktadır. N-ucundaki disülfid bağı (Cys 168-Cys 178) olmayan mutant protein Cys 286-Cys 336 birimlerinde disülfid bağına sahiptir ve dimerik bir yapıya ve hemen hemen tam enzimatik aktiviteye sahiptir. Fakat mutant protein karakteristik olarak yaban tip enzimde gözlenen tripsin dirençli konformasyonu kaybetmiştir. Aksine Cys 286-Cys 336 eksikliği olan mutantlar monomeriktir ve inaktiftir. Bu sonuçlar, Cys 286-Cys 336 disülfid bağının gerekli ve bu

enzimin aktif bölgesinin doğru yerleşimi için yeterli olduğunu göstermektedir. Fakat böyle bir aktif konformasyon, enzimin konformasyonel kararlılığı için hala yetersizdir. Böylece, bu enzimin tam bir aktif hali, tam protein kararlılığı dışında oluşturulur ve iki disülfid bağı bu özelliklere farklı yönlerden katkılarda bulunur (Sone vd., 1997).



Şekil 5. ECAP’da M3 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu (Murphy, 1996).



Şekil 6. ECAP’da M2 metal bağlanma bölgesinin koordinasyonu (Murphy, 1996).

1.4.2. İnsan Dokularından Elde Edilen (Memeli) Alkalin Fosfataz

Yapılan araştırmalar sonucu, AP’nin çinko içeren bir metaloenzim olduğu, aynı iki alt üniteden meydana geldiği ve aktif merkezinde serin (Ser) aminoasidi içerdiği tespit edilmiştir. AP’nin bir glikoprotein olduğu terminal sialik asit kalıntılarının varlığı, bu enzimlerin elektroforetik göçündeki değişikliklerde gösterilmiştir (AP izoenzimleri) (Kal, 1989). Farklı insan dokularından elde edilen AP’lerin birçok yönleri aynı olmasına rağmen ayrıcalık gösteren özellikleri de vardır (Moss, 1982). Dokuya spesifik olan bu farklılıkların özellikleri ve kaynağı tamamen aydınlatılamamıştır. Her bir doku içindeki AP’nin önemli elektroforetik farklılıkları mevcuttur. Bu, muhtemelen karbohidrat içeriklerindeki değişikliklerle birlikte enzimi oluşturan çeşitli komplekslerin oluşmasından meydana gelir (Kal, 1989). Kromozom 2 de yerleşmiş olan 3 tane doku spesifik (kök hücre, plasenta ve bağırsak) ve kromozom 1 de yerleşmiş olan doku spesifik olmayan bir AP genine karşılık gelen insan AP’si kodlayan 4 yapısal gen (Moss, 1992) klonlanmıştır (Kam vd., 1985; Millán, 1986; Henthorn vd., 1987; Millán ve Manes, 1988). İnsan AP gen ailesinde en azından 4 gen AP kodlar; bağırsak, plasenta, plasenta benzeri ve kemik/akciğer/böbrek. Bağırsak ve plasenta AP’si primer yapılarına göre %87 benzerken kemik/akciğer/böbrek AP’si bağırsak ve plasenta AP’sine sırasıyla %57 ve %52 oranında benzerdir (Henthorn vd., 1988).

Bu enzim, vücudun tüm dokularında özellikle plazma membranında mevcuttur. AP aktivitesi birçok dokuda daha da yüksektir (Kal, 1989)

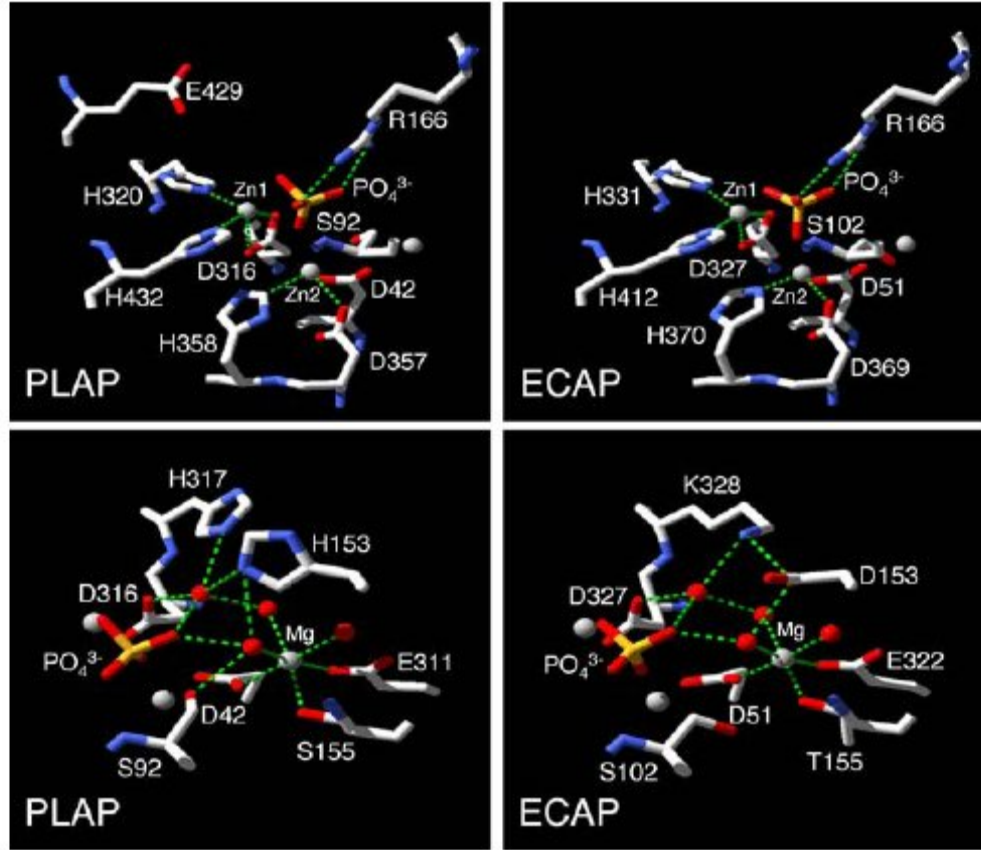
- Kemik (osteoblastlar)
- Karaciğer
 - i*: safra kanaliküllerine bitişik olan hepatosit membranında
 - ii*: parankim hücrenin sinusoidal sınıra yakın kısmında (McComb vd., 1979)
- Plasenta
- Lökosit
- Proksimal renal tubulus hücreleri
- Aktif meme bezleri
- İnce bağırsak epiteli

1.4.3. Memeli ve Bakteri Alkalın Fosfatazları Arasındaki Farklılıklar

E. coli (Bradshaw vd., 1981; Chang vd., 1986), *B. subtilis* (Hulett vd., 1991), *Saccharomyces cerevisiae* (Kaneko vd., 1987), sıçan (Thiede vd., 1988), ve insandan (Kam vd., 1985; Millán, 1986; Weiss vd., 1986; Berger vd., 1987) elde edilen AP'lerin primer sıralarına dayanılarak gerçekleştirilen karşılaştırmalardan bakteri ve memeli enzimlerinin %25-30 oranında sıra benzerliğine sahip olduğu görülmektedir. Aktif bölgedeki iki tane Zn^{2+} ve bir Mg^{2+} iyonunun koordinasyonunda rol alan birimler, substrat bağlanmada rol oynayan Asp 91, Ser 92 ve Arg 166 gibi birimler (Kim ve Wyckoff, 1991) ve katalitik Ser birimi, ECAP'dan (Kim ve Wyckoff, 1990) insan plasenta AP (PLAP) (Le Du vd., 2001)'sine kadar hepsinde korunur, ancak çevredeki birimlerin çoğu farklıdır. Bu durum her iki enzimin de katalitik mekanizmalarının benzer olduğunu ve, memeli AP'sinin L-Phe veya L-Arg ile yarışmasız olarak inhibe olurken ECAP'ın inhibe olmadığını gösterir (Fishman ve Sie, 1970, 1971; Lin vd., 1971; Byers vd., 1972; Hummer ve Millán, 1991; Hoylaerts vd., 1992).

Yıllardır, ECAP (Stec vd., 2000) molekülünün kristallografik koordinatları, AP'ler hakkında yapısal bilginin tek kaynağını sağlamaktaydı fakat ilk memeli AP'si olarak insan PLAP'ın 3 boyutlu yapısı çözülmüştür (Le Du vd., 2001). Tüm memeli AP'leri her bir altbirimde 5 sistein birimine sahiptir (PLAP'da Cys 101, Cys 121, Cys 183, Cys 467 ve Cys 474). Bunlar ECAP'daki 4 sisteinin hiçbirine homolog değildir. İki tane disülfid bağı

oluştururlar. Cys 121-Cys 183 ve Cys 467-Cys 474. Cys 101 birimi serbest formda kalır (Kozlenkov vd., 2002).



Şekil 7. PLAP ve ECAP'daki aktif bölge metallerine koordine olan birimlerin karşılaştırmaları. Üst kısımdaki şekiller Zn₁ ve Zn₂ metal bölgelerinin ve onların ligandlarının çevresine odaklanılmışken alttaki şekiller Mg metal bağlanma bölgesi ve ligandlarının çevresini göstermektedir. Su molekülleri kırmızı kürelerle gösterilmiştir. Yeşil nokta nokta şeklindeki bağlantılar metal-ligand etkileşimlerini ve hidrojen bağlarını temsil etmektedir (Millán, 2006).

Aminoasit sıraları %25-30 oranında tamamen korunmuş olmasına rağmen memeli AP'leri ile karşılık gelen bakteriyel enzimler arasında önemli fonksiyonel farklılıklar vardır. Genellikle, bakteriyel enzimler memeli enzimlerine göre daha ısı kararlıdır. Fakat, memeli enzimleri pH optimumunda daha yüksek pH'ya doğru kayma göstererek 20-30 kat daha yüksek katalitik aktiviteye sahiptirler. Ayrıca bazı memeli AP'leri maksimum aktivite göstermek için magnezyuma ihtiyaç duyarlar (Murphy ve Kantrowitz, 1994). Bakteri ve memeli AP'sinin aktif bölgeleri üç ayrıcalık dışında tamamen

korunmuştur. *E. coli* enziminin 153. ve 328. pozisyonlarında Asp ve Lys bulunurken memeli enzimlerinde bu pozisyonların her ikisi de histidin (His) ile doludur. Diğer farklılık ise 155. pozisyonundaki korunmuş substitusyonudur. *E. coli* enziminde bu pozisyonda treonin (Thr) bulunurken memeli enzimlerinde Ser bulunmaktadır (Murphy, 1996). Thr ve Ser'in O_γ atomları arasında önemli kimyasal farklılıklar olmamasına rağmen, bu birimlerin yan zincirleri konformasyon ve büyüklük olarak oldukça farklıdır. Thr'nin yan zincirinin bazı durumlarda avantajları vardır. C_γ , suyun aktif bölgeden uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Dodson ve Wlodawer, 1998). Bölge spesifik mutajenez, genetik ve X-ray kristallografik bilgiler, 153. ve 328. pozisyonlardaki His substitusyonunun bakteriyal ve memeli AP'leri arasındaki farklılıktan sorumlu başlıca etken olduğunu önermektedir (Murphy ve Kantrowitz, 1994). Bunların dışında önemli fonksiyonel aminoasit birimlerinin çoğu oldukça korunmaktadır. Memeli AP'sinin aminoasit sırası *E. coli* enziminin merkez (çekirdek) yapısına modellenmiştir ve benzer tersiyer yapı topolojisi göstermektedir. Bakteri ve memeli enzimleri arasındaki katalitik mekanizmaların benzer bir yolla işlediği önerilmektedir. Bu, memeli enzimlerinin yapı ve fonksiyon analizi için *E. coli* enziminin bir model olarak kullanılmasını sağlar (Kim ve Wyckoff 1990).

ECAP'dan farklı olarak insan AP proteinleri membrana bağlı bir glikoproteindir ve proteinin C-ucundaki karboksil grubuna bağlı bir glikozilfosfatidilinositol içermektedir (Low ve Finean, 1977; Redman vd., 1994; Ferguson, 1999) ve membrana fosfatidilinositol glukan biriminin karboksil ucu aracılığıyla tutunur (Ogata vd., 1988). Yapılarındaki ve sıralarındaki farklılığa rağmen *E. coli* ve memeli AP'leri P_i ve alkol açığa çıkararak hemen hemen tüm fosfomonoesterlerin hidrolizini katalizler (Zhang vd., 2004).

AP, memelilerde çoğunlukla bulunan oldukça önemli bir enzimdir. Ölümcül insan kalıtsal hastalığı olan hipofosfatasia kemik AP aktivitesi eksikliğinden kaynaklanan tek bir aminoasit substitusyonunun sonucudur. Tıbbi olarak insan serumunda AP'nin seviyesi iskelet, karaciğer ve plasentayı içeren fizyolojik ve patolojik işlemlerin teşhisinde son derece önemlidir. Serum AP'si için yapılan testlerin, klinik laboratuvarlarda yapılan enzim aktivitesi belirlemelerinin %24'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir (Murphy ve Kantrowitz, 1994).

1.5. Alkalın Fosfataz Substratları

AP'ler doğal ve sentetik substratların pek çok çeşidine etki ederler (Kal, 1989). AP, gerçekte DNA ve proteinler gibi büyük biyomolekülleri olduğu kadar çeşitli küçük organik molekülden fosfat grubunun uzaklaştırılmasını da katalizleyen spesifik olmayan monofosfoester hidrolazdır (McComb vd., 1979; Kobori vd., 1984).

Memeli AP'leri geniş bir substrat spesifikliğine sahiptirler ve *in vitro* olarak birçok fosfatlanmış bileşiği hidroliz edebilmekte veya trans- pozisyonda fosforilleyebilmektedir. Fakat bu bileşiklerden sadece seçilen birkaç tanesinin bazı AP izoenzimleri için doğal substrat olarak kullanılabilmesi doğrulanmıştır. Doku spesifik olmayan alkalın fosfatazın (TNAP) kemik matriksindeki rolünün, hidroksiapatit kristalizasyonu için gerekli olan P_i 'yi üretmek olduğu önerilmiştir (McComb vd., 1979; Majeska ve Wuthier, 1975; Fallon vd., 1980) Fakat TNAP'ın ayrıca mineral çökmesine ve büyümeye yardımcı olarak mineralizasyon inhibitörü inorganik pirofosfat (PP_i)'yi hidroliz ettiği de düşünülmektedir (McComb vd., 1979; Moss vd., 1967; Whyte, 1994. Rezende vd., 1998). Gerçekte, doğuştan bir metabolizma problemi olan hipofosfatasia, TNAP'ın fonksiyonunu etkilemekte ve ağırlı kemik yumuşamasına yol açmaktadır (Millán, 2006). Son çalışmalar, TNAP'ın kemik dokusundaki normal kemik mineralizasyonunu sürdürmek için mineralizasyon inhibitörü PP_i 'yi hidroliz ederek uygun konsantrasyonda kalmasını sağlayan ana fonksiyonunu tartışmalı bir şekilde kanıtlamıştır.

Lökositlerdeki TNAP için pridoksal-5'-fosfatın (PLP) fizyolojik bir substrat olduğu gösterilmiştir (Smith ve Peters, 1981; Wilson vd., 1983). İnsan SAOS-2 kemik sarkomu hücrelerinden izole edilen TNAP, fosfoetanolamin ve PLP'yi fizyolojik pH'da hidrolizler (Fedde vd., 1988). PLP metabolizmasındaki anormallikler ayrıca hipofosfatiasialı bazı hastalar tarafından tecrübe edilen sara nöbetlerini açıklamaktadır (Millán, 2006; Di Mauro vd., 2002). Diğer tanımlanan substratlardan monoflorofosfat, TNAP tarafından hidrolizlenebilir (Farley vd., 1987). İnsan AP izoenzimleri çeşitli yağ asidi zincirleriyle fosfatidatları hidrolizleyebilir. PLAP'ın fosfatidat hidrolitik aktivitesi bağırsak alkalın fosfataz (IAP) enzimininkinden 2-3 kat daha yüksektir. TNAP, uzun yağ açıl zincirli (C16-C18) fosfatidatları sodyum deoksikolat varlığında bile hidrolizleyemez (Sumikawa vd., 1990). İnorganik polifosfatlar (poliP), bakteri, maya ayrıca ökaryotlarda da mevcut olduğu bilinen ortofosfat birimlerinin enerjice zengin lineer polimerleridir. CIAP, zincir uzunluğu yaklaşık 800 olan poliP molekülünü, ekzopolifosfataz olarak rol oynayarak

ayırabilmektedir. pH optimumu alkali aralıktadır. PLAP ve ECAP'ın poliP paraçalayıcı aktivite gösterdiği şartlarda TNAP, poliP'yi hidrolizleyememektedir (Lorenz ve Schröder, 2001).

AP'ler ayrıca nükleotit metabolizmasında rol oynar. Say ve arkadaşları (1991) kemikten saflaştırılmış TNAP'ın geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğunu ve *p*-NPP'ye ilaveten ATP, ADP, AMP, PP_i, glukoz-1-fosfat, glukoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat, β -gliserofosfat, bis-(*p*-nitrofenil)-fosfatı da hidrolizleyebildiğini göstermiştir. Fakat ATP, bis-(*p*-nitrofenil)-fosfat ve PP_i daha az hidrolizlenen substratlar arasındadır. Yine de TNAP hem pH 7,5 hem de pH 9,4'te ATP'yi hidroliz edebilmektedir (Demenis ve Leone, 2000). Fakat Pizauro ve arkadaşları (1998) kemik tabakası membranlarındaki membran spesifik ATPaz ve TNAP'ın farklı proteinler olduğu sonucuna varmışlardır. Çeşitli raporlar TNAP'ın AMP hidrolizinde rol oynadığını göstermektedir (Ohkubo vd., 2000; Picher vd., 2003). Hücre dışı adenin nükleotitleri, membran yüzeyinde adenozin üretimi ve NG108-15 nöronal hücrelerinde adenozin A (2A) reseptörlerinin izleyen aktivasyonu aracılığıyla cAMP yükselmesini indükler. NG108-15 hücreleri, AMP'yi adenezine hidrolizler ve bu aktivite pH 6,5'te baskılanır, fakat 8,5'de önemli ölçüde artar. AMP hidrolizi ayrıca TNAP'ın unkompetitif inhibitörü olan levamisol tarafından da engellenir (Kozlenkov vd., 2004) ve hücreler TNAP mRNA'sı ekspres eder. Bu sonuçlar, NG108-15 hücrelerinde TNAP'dan dolayı AMP fosfohidrolaz aktivitesini gösterir ve bu da enzimin NG108-15 hücrelerinde, P1 zıt duyarlı ATP indüklenmiş cAMP birikiminde temel rol oynadığını göstermektedir (Ohkubo vd., 2000).

Alkalin fosfataz tayininde kullanılan substratlar;

- β -gliserofosfat
- p*-nitrofenil fosfat
- fenil fosfat
- indoksil fosfat
- β -naftil fosfat
- fenolftalein monofosfat
- metilumbelliferil fosfat

Son zamanlarda AP aktivasyonu için substrat olarak *p*-nitrofenil fosfat tercih edilmektedir (Kal, 1989).

1.6. Alkalın Fosfataz Aktivatör ve İnhibitörleri

Bazı iyonlar AP aktivitesini artırır. Bu aktivatörlerin en başında Mg^{2+} yer alır. Bir dereceye kadar Mn^{2+} ve Ca^{2+} da AP aktivitesini artırır. Klasik olarak özellikle *E. coli* ve memeli AP'leri (Kim ve Wyckoff, 1990) Zn(II)- ve Mg(II)- bağımlı enzimler olarak düşünülmektedir. AP'ler metaloenzimlerdir (Posen, 1967) ve EDTA gibi metal bağlayıcılar, AP aktivitesini inhibe eder. EDTA'nın bu etkisi optimal aktivite için gerekli Mg^{2+} iyonu ile şelatlaşması nedeniyledir. AP aktivitesi Cu^{2+} , Hg^{2+} ve aşırı fosfat ile inhibe edilir. İzoenzimlerin bazıları L-Phe, üre, aşırı Zn^{2+} veya AsO_4^{3-} tarafından değişik derecelerde inhibe edilirler (Kal, 1989).

1.7. Alkalın Fosfatazların Fonksiyonları

AP'nin metabolik fonksiyonu henüz bilinmemesine rağmen hücre membranında lokalize olması AP aktivitesi ile membran transportu arasında bir ilişkiyi düşündürmektedir. Enzimin lipid transportunda ve kemikte kalsifikasyonla ilişkili olduğu görülmektedir. Kalsifikasyon olayında fizyolojik öneme sahip olan PP_i 'nin AP tarafından hidroliz edildiği düşünülür. Hipofosfatasia gibi AP'nin yetersizliğinde kalsifikasyon kusurludur (Kal, 1989).

1.7.1. Alkalın Fosfatazın Klinik Önemi

Plazma AP ölçümleri iki grup hastalığın araştırılmasında özellikle önemlidir. Karaciğer hastalıkları ve artmış osteoblastik aktivite (kemik yapımı) ile birlikte kemik hastalığı (Kal, 1989).

Karaciğer Hastalıkları: Kolestaz, AP sentezini artırma ve plazmaya hepatik enzim regürjitasyonu etkisine sahiptir. Yükselme ekstrahepatik tıkanmada (taş veya pankreas başı kanseri) intrahepatiğe göre üç kat daha fazla olur. Tam tıkanma durumlarında daha fazladır. Bu durumda serum enzim aktivitesi normal üst sınırın 10-12 katına kadar yükselebilir. Safra akışının intrahepatik tıkanması (safra yollarına etki eden klorpromazin gibi ilaçlar) serum AP'yi 2-5 katına kadar yükseltir.

İnfeksiyöz hepatit gibi esas olarak parankim hücrelerini etkileyen karaciğer hastalıkları, orta derecede yükselme veya normal serum AP seviyesi gösterir. Ekstrahepatik ve intrahepatik tıkanma sarılığı ile parankimal sarılık arasındaki bu ayrılık klinik olarak çok önemlidir. Fakat bazı durumlarda istisnaların olabileceği gözönünde tutulmalıdır.

Oral kontraseptif kullanan kadınlarda hepatik izoenzim indüksiyonuna bağlı olarak plazma AP aktivitesinde orta derecede bir yükselme görülür. Barbitürat ve difenilhidantoin de AP'yi yükseltir (Kal, 1989).

Kemik Hastalıkları: Osteoblastik aktivite (kemik yapımı)'nin arttığı durumlarda AP aktivitesinin de arttığı bilinir. Kemik hastalıkları arasında serum AP aktivitesinin en yüksek seviyelerine, osteoblastların kontrolsüz aktivitesi ile rezorbe olan kemiği tekrar oluşturmaya çalışan osteoblastik hücrelerin etkisinin bir sonucu olarak, Paget's hastalığında rastlanır. Normal üst sınırın genellikle 10-25 katına yükselebilir. Orta derecede yükselmeler osteomalaside gözlenir. D vitamini tedavisiyle enzim seviyesi yavaş yavaş düşer. Raşitizmde normalin 2-4 katına kadar yükselir ve bunlar, vitamin D ile tedavide yavaş olarak normal düzeye gelir. Enzim seviyesi osteoporoziste genellikle normaldir. Az ve orta derecede yükselmeler Fankoni sendromunda, primer ve sekonder paratiroidizm de görülür. Geçici yükselmeler kemik kırıklarının iyileşmesi esnasında bulunabilir (Kal, 1989).

Plazma AP'sinin aktivitesinde azalma nadirdir. Vitamin D'ye dirençli raşitizmlerin en kuvvetli bulgusu olduğu bir kalıtsal hastalık olan hipofosfatiasida meydana gelir. Gerek doku, gerekse plazma aktivitesi genellikle düşüktür ve idrarda fosforil etanolamin mevcuttur. Akondroplazia da genel malnutrisyon ve skorbütde de AP aktivitesi azdır (Kal, 1989).

Kanserlerde: Kanserli hastalarda plazma AP artış nedenleri aşağıdaki gibi grublanabilir.

a) Kemik AP aktivitesi; primer veya sekonder kemik tümörlerinde (osteogenik sarkom) artar. Kemik tümörlerinde kemik AP izoenziminin yükselmesi osteoblastik proliferasyon olduğunu gösterir. Multipl myelomada olduğu gibi osteolitik lezyonlarda yükselmez.

b) Karaciğer AP aktivitesi; primer veya sekonder karaciğer tümörlü hastaların büyük bir kısmında artar. Genelde bu durum tümörün neden olduğu tıkanma ile ilgilidir.

c) Tümöre spesifik AP izoenzimleri; regan izoenzimi, akciğer kanserli hastaların serumlarında, homoarginine duyarlı AP izoenzimi ise uterus, pankreas ve akciğer kanserli

hastaların serumlarında bulunmuştur. Yükselmiş idrar AP seviyesi böbrek karsinomlu hastalarda gösterilmiştir (Kal, 1989).

Ayrıca; AP aktivitesinin yüksek seviyeleri *Bacteroides* ve *Capnocytophaga* türleri ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gibi çeşitli periodontopatik bakterilerde gözlenmektedir (Laughon vd., 1982; Slots, 1981). İnsan periodontitinin gelişmiş durumunda bazı bakteri türleri diş yuvası kemik yüzeyine yakın hale gelir ve bakteriyal yüzey boyunca tipik kemik emilimi gerçekleşir (Frank ve Voegel, 1978). BAP aktivitesi ile bakterinin sebep olduğu diş yuvası kemiğinde meydana gelen patolojik değişiklikler arasındaki ilişki oldukça ilginçtir. Son zamanlarda, diş eti sıvısındaki AP aktivitesinin, periodontal hastalık aktivitesi ile pozitif olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Binder vd., 1987).

Hamilelikte serumda AP artar. Bu durum, hamileliğin 7. haftasında plasentada sentezlenen ve annenin serumuna geçen PLAP'dan kaynaklanır (Sussman vd., 1968; Beck ve Clark, 1950; Boyer, 1961; McMaster vd., 1964; Okamoto vd., 1990). Serumdaki bu aktivitenin yanında AP aktivitesi hamile bayanların nötrofillerinde de artar, fakat, sorumlu olan spesifik olmayan alkalın fosfataz (NSAP) izoenzimidir (Findlay ve Johnston, 1977.) Şimdiye kadar normal gebelik süresinde AP aktivitesini düzenleyen mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. AP aktivitesinin ortaya çıkmasında 3 ayrı mekanizmanın kombinasyonu rol oynar.

a) Hamilelikte lökosit sayımında sabit bir artışla ortaya çıkan fizyolojik hiperlökositoziz (Wintrobe, 1990)

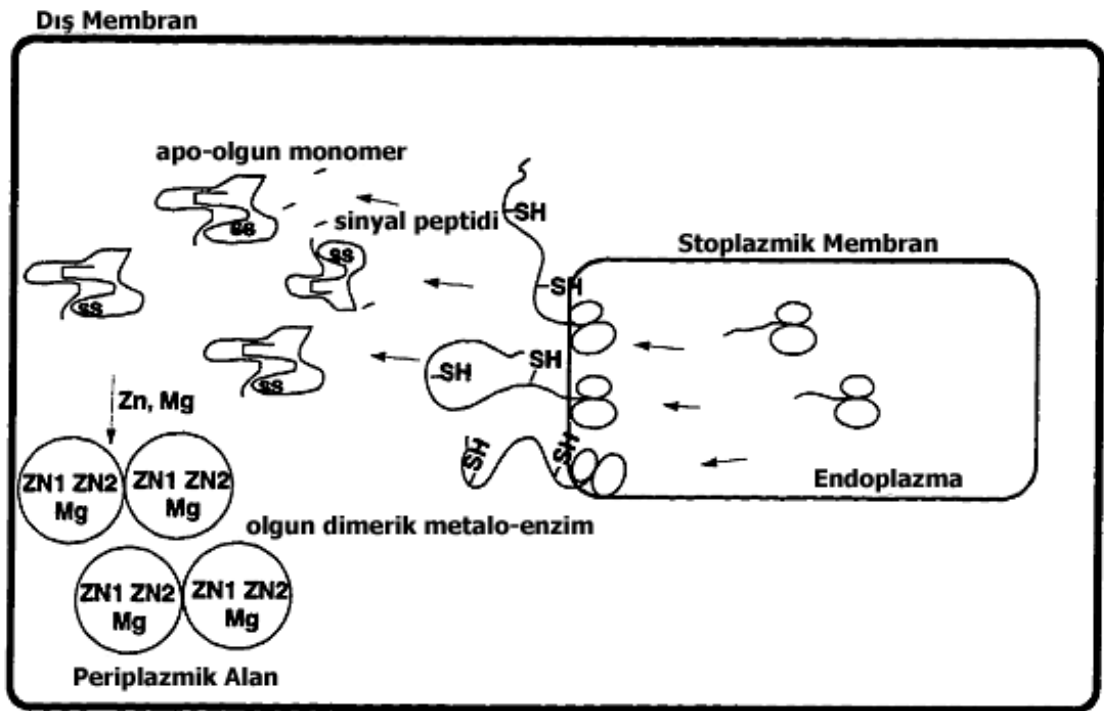
b) Plasental hormonal salgılarda, östrojen ve başlıca pregestoronda artış, artan gen transkripsiyonunun bir sonucu ve sabit hal mRNA seviyesindeki yükselmeye ilişkili olarak, AP aktivitesinde bir artışla sonuçlanır (Zernik vd., 1991; Di Lorenzo vd., 1993)

c) Nötrofil alkalın fosfataz (NAP) aktivitesinden sorumlu en önemli modülatörlerden biri olan granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) nin indüksiyonu (Sato vd., 1994)

1.8. Alkalın Fosfatazın Lokalizasyonu

AP ilk olarak sitoplazmada bir monomer olarak sentez edilmiştir, fakat olgun enzim hücrenin periplazmik alanına yerleşmiştir (Brockman ve Heppel, 1968; Malamy ve Horecker, 1964). Monomer transport sırasında ya da sonrasında proteolitik olarak ayrılan bir tane amino uç sinyal sırası içerir (Inouye vd., 1982; Ito vd., 1981). Periplazmaya doğru

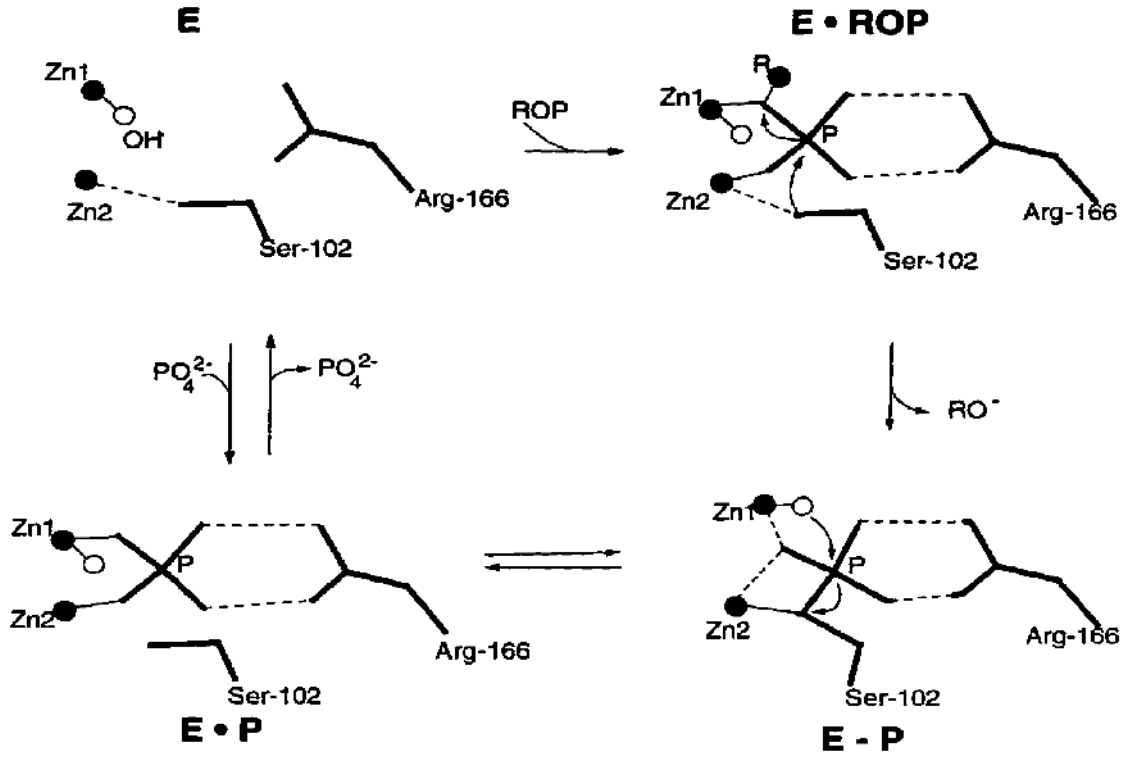
transport esnasında enzim sinyal peptidini kaybeder, bir dimer oluşturur ve metal atomlarını (her bir monomer başına bir Mg ve iki Zn atomu) kazanarak enzim tamamen fonksiyonellik kazanır (Şekil 8). AP'nin lokalizasyonu histokimyasal tekniklerle de incelenmiştir. Nötrofil ve eozinofillerdeki stoplazmik granüller gibi birkaç istisna dışında memeli hücresinin plazma membranı enzimin asıl yerleşim yeri olarak belirlenmiştir (Makita ve Sandborn, 1970; Wilson vd., 1981). Yine plazma membranındaki AP'ye ek olarak intestinal epitelyal hücrelerdeki golgi cisimciği ve yoğun cisimciklerde de bu enzim bulunmaktadır (Kal, 1989). AP'nin sentezi ve lokalizasyonuna ait son çalışmalarda, enzimin endoplazmik retikulumda sentezlendiği ve daha sonra golgi cisimciği yolu üzerinden plazma membranına ulaştığı görüşü desteklenmektedir (Tokumitsu ve Fishman, 1983).



Şekil 8. Bir *E. coli* hücresinde alkalın fosfatının konumunun şematik gösterimi (Murphy, 1996).

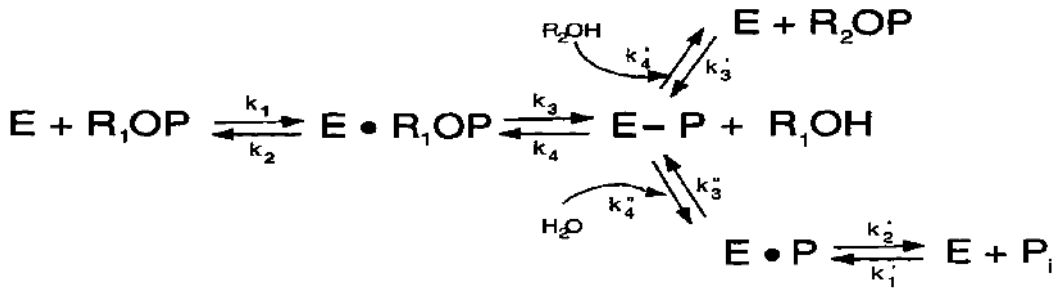
1.9. Alkalın Fosfatazların Reaksiyon Mekanizmaları

ECAP, P_i ve bir alkol üretmek üzere bir fosfoseril araürünü (Schwartz ve Lipmann, 1961) üzerinden ilerleyen spesifik olmayan bir fosfomonoesteraz olarak fonksiyon gösterir. Ters reaksiyon için bir substrat olan P_i (Kim ve Wyckoff, 1991) aynı zamanda enzimin kuvvetli bir yarışmalı inhibitörüdür ve yüzeysel aktif bölge cebinin tüm hacmini doldurur (Stec vd., 2000). Katalitik mekanizma birçok kinetik (Coleman, 1992) ve yapısal çalışmanın (Kim ve Wyckoff, 1991) konusu olmuştur. AP için X-ışını kristal yapısı ve bölge spesifik mutajenez yanında NMR teknikleri de kullanılarak çeşitli biyokimyasal denemelerle bir mekanizma önerilmiştir (Şekil 9). Substrat AP'ye bağlandığında enzim kovalent olmayan bir E-ROP kompleksi haline dönüşür. Bu komplekste fosfat aktif bölgede, Arg 166, iki çinko atomu, su aracılı bir çeşit etkileşim ve aktif bölgenin elektrostatik potansiyeli aracılığıyla, sıkıca tutulmaktadır. Substratın R grubu çözücüye maruz kalır ve enzimin aktif bölgesiyle hiçbir etkileşim yapmaz. Ser 102'nin hidroksili fosfat üzerindeki nükleofilik saldırı için gerekli olan serinin protonlanmamış formunu kararlılaştırarak Zn_2 ile etkileşir. Zn_1 oluşan negatif yükün kararlılığı için ayrılan RO^- grubunun üzerine yerleşmiştir. Ser 102 oksijeninin nükleofilik saldırısı sonucu E-P kovalent kompleksinin fosforu oluşur ve daha sonra su fosfat üzerinde Ser 102'nin yerdeğiştirmesine yol açarak tekrar bir nükleofilik saldırıya olanak sağlayacak şekilde apikal bir pozisyonda Zn_1 ile koordine olur. Bu adımda, Zn_2 , Ser 102 üzerinde oluşan negatif yükü kararlılaştıracak pozisyonadadır. Kovalent olmayan E·P kompleksi fosfatın salınımıyla oluşur. Reaksiyonun sıralı iki yer değiştirmeye tüm konfigürasyonun korunmasıyla ilerlediğini gösterecek şekilde çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Jones vd., 1978).



Şekil 9. *E. coli* alkalın fosfatazının katalitik mekanizması (Kim ve Wyckoff, 1991)

ECAP hem transferaz hem de hidrolaz aktivitesi gösterir (Şekil 10). Mekanizmanın hız belirleyen basamağı pH'ya bağlıdır. Lys 328 üzerindeki pozitif yük, ECAP'nin hız sınırlayıcı adımını belirlemede önemli rol oynar (Sun vd., 1999). Asidik pH'da Ser 102 ve fosfatla oluşan kovalent enzim-fosfat kompleksinin (E-P_i) hidrolizi hız belirleyicidir. Bazik şartlarda hız belirleyici adım, kovalent olmayan enzim fosfat kompleksinden (E•P_i) fosfatın ayrılmasıdır (Bloch ve Gorby, 1980; Gettins ve Coleman, 1983; Hull vd., 1976). Etanolamin ya da Tris gibi fosfat akseptörü varlığında enzim, substrattan alkole fosfat transfer ederek bir transfosforilasyon reaksiyonu katalizler (Dayan ve Wilson, 1964; Wilson vd., 1964). Önceleri magnezyum iyonunun katalizde direkt rol oynamadığı fakat yapısal bütünlük ve optimum aktivitede rol oynadığı düşünülmekteydi (Janeway vd., 1993). Fakat, enzimin son zamanlarda elde edilen yüksek çözünürlükteki kristal yapısı, Mg^{2+} -OH'nin bir genel baz olarak Ser 102 nükleofilini oluşturarak katalitik rolünü açığa çıkarır (Stec vd., 2000).



Şekil 10. ECAP tarafından katalizlenen reaksiyonların şematik gösterimi. E enzimi; R_1 substrat üzerinde ayrılan grubu temsil eder. E·P kovalent olmayan enzim-fosfat kompleksini temsil ederken E-P kovalent enzim-fosfat kompleksini temsil etmektedir

1.10. *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

G. caldxylosilyticus TK4 Suşu Çanakkale Kestanbol Kaplıcasından elde edilen su örneklerinden izole edilmiştir ve 14283 kodlu numarayla National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria'da stoklanmıştır. Bakteri izolasyonu, zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Çanakkale Kestanbol Kaplıcası Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcasının yerden çıkış sıcaklığı 71 °C'dir. İzolatın tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmıştır. *G. caldxylosilyticus* TK4 suşu için elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda termofilik izolatın basil morfolojisine sahip, spor oluşturabilen ve katalaz enzimi üretebildiği gözlenmiştir (Dülger, 2003).

Tablo 1. *G. caldxylosilyticus* TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri

Gram Boyama	+/-	Anaerobik Büyüme	-	Sitrat Kullanımı	-
Spor Boyama	+	Glukoz fermentasyonu	+	Propiyonat Kullanımı	+
Katalaz Üretimi	+	Mannitol fermentasyonu	+	%2-5 NaCl'de büyüme	+
Jelatin Hidrolizi	+	Arabinoz fermentasyonu	+	%7 NaCl'de büyüme	-
Nişasta Hidrolizi	+	Ksiloz fermentasyonu	+	30, 37 °C'de Büyüme	-
VP Testi	-	İndol testi	-	40, 70, 75 °C'de Büyüme	+

1.11. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, ökaryotlar, bakteriler ve arkebakterilerdir (Trent, 2000). Bakteriler dünya üzerinde çok geniş bir yayılım göstermektedir ve büyüyebildikleri en uygun sıcaklıklara göre üç grup altında toplanırlar. Sakrofiller, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda büyüeyebilen fakat optimum büyüme sıcaklığı $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ veya daha düşük sıcaklıklar olan bakterileri içermektedir. Mezofiller, normal ortam sıcaklıklarında ($15\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$) büyüeyebilirler ve insan sağlığı açısından patojen olan bakterileri içermektedirler. Termofiller ise genel olarak $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin ise $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bakteri grubudur.

Optimum büyüme sıcaklıkları $50\text{-}105\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında olan pek çok termofilik bakteri tanımlanmıştır. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabildikleri için, bunlar aşırı termofiller ve çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadırlar. Termofiller ve aşırı termofiller yüksek sıcaklıklarda yalnızca hayatta kalmazlar, ayrıca büyümeleri ve çoğalabilmeleri için de bu yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Termofillerin optimum büyüme sıcaklığı $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarken, aşırı termofillerin optimum büyüme sıcaklığı $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerindedir. Ayrıca aşırı termofiller, genellikle $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin aşağısındaki sıcaklıklarda büyüyemezler.

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. En yaygın ve erişilebilir alanları, termal alanlar, kaplıcalar ve jeotermal sıcak topraklardır. Termofiller, ayrıca derin kara ve okyanus dipleri gibi daha az ulaşılabilir jeotermal alanlarda da bulunurlar (Takami vd., 1997). Termofillerin en fazla çalışılan doğal yaşam alanları kaplıcalardır (Hugenholtz vd., 1998).

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğer mikroorganizmaların büyüyemediği veya çok az büyüebildiği şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduğundan, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyele sahiptir (Dülger, 2003). Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamıştır. Bu organizmalardaki proteinlerin de ekstrem şartlarda kararlı oldukları bilinmektedir. Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem

şartlarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır. Mezofilik organizmalara ait proteinlerin üç boyutlu yapıları, yüksek sıcaklık ve organik çözücülerde önemli derecede bozunur. Son zamanlarda proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kararlı olmaları veya kararlılıklarının artırılması için biyofiziksel çalışmalar yapılmaktadır.

Enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan iki özellik; yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaları ve reaksiyonu katalizleyebilmeleri için bir çözücüye olan ihtiyaçtır. Bu yüzden, protein mühendisliği enzimlerin ve rekombinant proteinlerin biyoteknolojide geniş bir alanda kullanımlarının sağlanması açısından oldukça önemlidir (Hao ve Berry, 2004). Termal denatürasyon genellikle iki şekilde izah edilebilir. Birincisi; düşük sıcaklıklarda proteinin katlanmış formu ile katlanmamış formu arasındaki dengenin katlanmamış form yönüne kayması. İkincisi; yüksek sıcaklıklarda tersinir olmayan çökelmelerin ve kovalent modifikasyonların olmasıdır. Termofilik organizmalar, proteinlerin aktif konformasyonlarını yüksek sıcaklıklarda sürdürerek bu problemin üstesinden gelirler. Yine de, enzimlerin termal kararlılık mekanizmalarının tam olarak anlaşılması zordur. Çünkü, bu mekanizmalar oldukça karışık ve fazladır (Arnold, 2001).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının temelinde; reaksiyon hızının artması, ortam viskozitesinin düşmesi, substrat çözünürlüğünün artması, kontaminasyon ihtimalinin düşmesi ve termofil ve hipertermofil enzimlerinin sıcaklığa tabi tutularak daha kolay saflaştırılabilmesi gibi sebepler yatmaktadır (Stetter, 1996). Termal kararlılıktan başka termofillerden elde edilen enzimlerin organik çözücülerdeki denatürasyona karşı dayanıklılıkları onların sudaki ısı kararlılıkları ile ilişkilidir (Owusu ve Cowan, 1989). Bu nedenle termal kararlı enzimler sadece sulu ortam da değil, organik ortamda da kullanılmak için çekicidirler.

Termal uyumluluğu daha iyi anlayabilmek ve kullanım alanlarını artırmak için yeni termal kararlı proteinlerin çalışılması faydalı olacaktır. *Thermus aquaticus* DNA polimeraz (*Taq* DNA polimeraz, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan) termofilik proteinlerin potansiyel ticari uygulanabilirliğine iyi bir örnektir (Sauve ve Sygusch, 2001).

1.11.1. Termofilliğin Moleküler Temelleri

Bütün organizmaların bünyelerindeki enzimler ve proteinler, yapılarını, içerisinde yaşadıkları ortamın sıcaklığına göre adapte etmek zorundadır. Bu olay canlıların protein

döngülerindeki hayat sürelerini ve yüksek sıcaklık yüzünden meydana gelebilecek olan bozulmalarını göz önüne alarak biyolojik aktivitesinin de çok yüksek seviyede olmasını belirler. Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır (Dinçer, 2005).

Bu organizmalar nasıl olup da yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmektedir? Canlılığın devam ettirilebildiği üst sıcaklık limiti nedir? Bu soruların cevapları halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak içinde yaşanılan ortam sıcaklığı arttıkça canlıda olması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanabilir:

1) DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65 °C'de termal denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin en az 107 °C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Plazmit DNA'sı termal denatürasyona dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Marguet ve Forterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107 °C'de termal degradasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler.

Reverse giraz (RG) enzimi, bütün hipertermofillerde, bazı termofilik bakterilerde ve arkeobakterilerde bulunur. RG, pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve bağlantı sayısında aşırılık olmasını sağlar (Duguet, 1995; Forterre vd., 1996). Bağlantı sayısındaki aşırılık, yüksek sıcaklıklarda DNA'nın fonksiyonel halde kalması için gereklidir. Mezofilik bakterilerin ve birçok canlının DNA'sı RG enzimini içermediği için, negatif süpersarmallık gösterirler. Bu yapı, DNA'nın daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Yani pozitif süper sarmal DNA, termal denatürasyona karşı negatif süpersarmal DNA'dan daha dirençlidir. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynarlar (López-García, 1999). Önceleri, genomik DNA'nın yüksek G+C içeriğinin DNA'yı denatürasyona karşı koruduğuna inanılırdı. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar, kromozomal DNA'nın G+C içeriği ile hipertermofillerin optimum büyüme sıcaklıkları arasında hiçbir bağlantının olmadığını göstermektedir (Marguet ve Forterre, 1994).

2) RNA yapısı: Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu

göstermiştir. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişmelerin RNA'ları kararlı hale getirdiği belirtilmektedir (Fang vd., 2001). Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan bir çalışmada, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976). Yapılan bu çalışmada, *Thermus thermophilus*'un tRNA'sındaki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuştur.

3) Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar. Proteinin termal kararlılığı hem bilim hem de endüstriyel alanlarda çok önemli olmasına rağmen, yıllardır yapılan deneysel ve teorik çalışmalar proteinin termal kararlılığını sadece kısmen açıklayabilmiştir (Vogt vd., 1997). Termofillerin ve mezofillerin homolog proteinlerinin tersiyer yapıları ve dizi analizlerinin karşılaştırılması, teorik çalışmaların temelini oluşturur. Protein yapısında mutasyonları meydana getiren protein mühendisliği ise deneysel analizlerin favori şeklidir ve kararlılığı artırır.

Querol ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada, termal kararlılığı artıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu göstermiştir. Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir. Bu faktörler üzerine bir çok araştırmacı tarafından yapılan araştırmalar mevcuttur (Grupta, 1995; Russel ve Taylor, 1995; Querol vd., 1996; Vieille vd., 1996; Colacino ve Crichton, 1997; Vogt ve Argos, 1997; Vogt vd., 1997; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998).

Kumar ve arkadaşları (2000) yaptıkları bir çalışmada, mezofilik ve termofilik proteinler arasındaki sistematik farklılıkları araştırdılar. Yapılan bu çalışmada, hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* ve mezofilik *Clostridium symbiosum* bakterilerindeki glutamat dehidrojenaz enzimi incelendi. Termofilik glutamat dehidrojenaz 168 tuz köprüsü içerirken, mezofilik glutamat dehidrojenazın ise 107 tuz köprüsü içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısı, mezofilik proteinlere oranla yaklaşık %70 daha fazladır. Tuz köprülerinin sayısı ile proteinin termal kararlılığı arasında kuvvetli bir korelasyon vardır. Bunun nedeni tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda daha karardır ve yüksek sıcaklıklardaki tuz köprülerini kırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulur. Böylece tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda protein çözülmesine karşı kinetik kararlılık sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

Haney ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada termofilik bir arkeobakteri olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile, mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan proteinlerin sıralarını karşılaştırmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda protein termal kararlılığının oluşmasında, aminoasit değişimlerinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Termofilik proteinlerin valin, izolösin ve yüklü aminoasit (Arg, Lys, His, Asp ve Glu) içeriğinde artış görülürken, yüklenmiş polar aminoasit (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Bir proteinin hidrofobikliği, toplam polar olmayan yüzey alanı dışında kalan gömülü polar olmayan yüzey alanının fonksiyonu olarak hesaplanır (Tsai ve Nussinov, 1997a,b). Hidrofobik etki proteinin katlanmasında etkin bir güce sahiptir. Bu nedenle de termofilik proteinler mezofilik proteinlere göre daha büyük bir merkeze sahiptirler (Haney vd., 1997).

Termofilik proteinler mezofilik proteinler ile karşılaştırıldığında, bunların daha fazla halka delesyonuna maruz kaldığı görülür ve bu yüzden termofilik proteinler mezofilik proteinlerden daha kısadır. Halka delesyonu proteinin üç boyutlu yapılarının entropisini düşürerek, serbest enerjisini artırır. Yani proteinlerdeki halka delesyonu protein kararlılığını artırır (Thompson ve Eisenberg, 1999). Aynı zamanda termofilik proteinler üç boyutlu yapısına katlanırken, daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturabilecek daha etkili bir paketlemeye sahiptirler (Russell vd.,1997, 1998). Sıcak şok proteinlerinin bir türü olan şaperonlar, yüksek moleküler ağırlıklı kompleks proteinlerdir ve bunların görevi denatüre edilmiş proteinlere bağlanmak ve onların aktif formları içerisinde tekrar katlanmalarını sağlamaktır. Ayrıca, organik çözünenler de protein yüzey alanını azaltarak proteinin üç boyutlu yapısının korunmasını sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

4) Hücre membran yapısı: Normal sıcaklıklarda yaşayan canlı organizmalar, lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler ve lipid bilayer membran yapısı ısıya karşı dirençli değildir. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan değişik bir membran yapısına sahiptirler. Bu hücre membranı, yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösterir. Ayrıca arkeobakteriler, hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradesyona karşı dirençli olan eter lipitlerini içerirler (Daniel ve Cowan, 2000).

Termofilik organizmaların hücre membran proteinlerinin en önemli özelliği daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere, daha yoğun bir şekilde sahip olmasıdır. Aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını

kuvvetlendirirken, glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteininin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlar (Senes vd., 2000; Zhou vd., 2001; Adamian ve Liang, 2002; Rinia vd., 2002). Sıcaklık arttıkça sitoplazma membranının proton geçirgenliği artar. Artan proton geçirgenliği, yüksek sıcaklıklarda bakterilerin büyümesini engeller. Düşük proton geçirgenliği yüksek sıcaklıklarda büyüme için önemli bir etkidir. Bu nedenle termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklarda taşıma sisteminde iyon olarak daha az geçirgen olan sodyum iyonunu kullanırlar (Tolner vd., 1997).

5) Küçük Moleküller: Termofillerin sahip olması gereken diğer bir özellik ise, küçük moleküllerin karalılığıdır. GTP, translasyon, RNA sentezi ve diğer birçok işlem için gerekli olan bir moleküldür ve bu molekülün 100 °C'deki yarılanma ömrü birkaç saniyedir.

Ayrıca, ATP, UTP, NAD ve FAD gibi diğer birçok küçük molekül de ısıya karşı dirençli değildir. Termofilik bakterlerde bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan moleküller kullanılacakları zaman sentezlenir (Dülger, 2003).

6) Enzimatik Fonksiyonlar: Enzim fonksiyonları organizmanın büyüme sıcaklığı tarafından düzenlenir. Mezofilik organizmalara ait enzimler 20-40 °C arasında en iyi şekilde çalışır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Buna karşın termofillerin enzimleri de organizmanın büyüebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denatürasyon bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunurlar (Koffler, 1957; Amelunxen ve Lins, 1968)

1.12. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Gelişen teknoloji ile birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Gıda, tekstil, temizlik ve sağlık gibi alanlarda artan talebi karşılamak için daha hızlı, az enerji maliyetli ve çevreye daha az zarar verebilecek yöntemler tercih edilmektedir. Klasik kimyasal yöntemler, spesifik olmaması, verimin düşük olması, yan ürünlerin fazla olması ve çevreye daha çok zararlı atık verilmesinden dolayı tercih sebebi olmaktan çıkmaktadır. Endüstriyel enzimler, kolay eldeleri ve reaksiyon ortamındaki kararlılıklarından dolayı, genellikle mikrobiyal orijindir. Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ekstrem şartlarda daha kararlı

olan proteinler keşfedilmiştir. Mezofilik organizmalardan elde edilen proteinler yüksek sıcaklık, basınç, pH ve organik çözücüler mevcudiyetinde düşük kararlılığa sahiptir. Oysaki termofilik proteinler yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterebilmekte ve yüksek basınçlarda termal kararlılıkları devam etmektedir. Bu yüzden endüstriyel açıdan termofilik enzimler daha caziptirler.

Bir çok AP izole edilmiş ve karakterize edilmiş olmasına rağmen sadece ticari ECAP (bakteriyal AP) ve CIAP rutin olarak moleküler biyolojide kullanılmaktadır (Zappa vd., 2001), fakat onların doğal olan düşük termal kararlılıkları ve yarı ömürleri, bazı özel şartlar da örneğin yüksek sıcaklık ve yüksek pH gibi hallerde ileri uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Yaygın AP'lerle kıyaslandığında termal kararlı AP'ler yüksek termalkararlılık, yüksek reaksiyon hızları ve denatürasyona ve mikrobiyal kontaminasyona karşı dirençli olmak gibi bazı yararlı özelliklere sahiptir (Sterner ve Liebl, 2001). Bu gibi avantajlar sebebiyle termofilik bakterilerden elde edilen termofilik AP'lere ilgi artmaktadır.

Bu çalışmada, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı araştırmacılarından, Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ, Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI ve gruplarının yapmış oldukları çalışmalarla izole edilen ve çeşitli özellikleri tanımlanmış olan *G. caldxylosilyticus* TK4 (Dülger, 2003) termofilik bakterisinin genomik kütüphanesi oluşturulmuş ve rekombinant plazmitlerin sıralarının incelenmesi sonucu belirlenen klinik öneme sahip bir enzim olan AP'yi kodlayan gen izole edilmiştir. İzole edilen gen pET28a(+) vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilmesi sağlanmıştır. N- ucunda bulunan 6 tane histidin biriminden dolayı, ekspres edilen protein nikel kolonu içeren "Protein Saflaştırma Kiti" (Magnehis Protein Purification System) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu kapsamında, optimum pH ve sıcaklığı, pH ve ısıl kararlılığı, protein ve substrat konsantrasyonunun ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi araştırılarak, bazı kinetik verilere ulaşılmıştır. Yapılan bu çalışmayla, bu yeni AP'nin endüstride bir uygulama alanı bulabileceği açıktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Spektrofotometre	UV 2	Unicam
PCR	MJ Mini Personal	Bio-Rad
Agaroz-DNA Elektroforezi	Easy Cast B1A	Owl Seperation Systems
Protein Elektroforezi	P8DS	Owl Seperation Systems
Santrifüj	Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen
Mikrosantrifüj	1-14	Sigma
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System	Kodak
Kuru Havalı İnkübatör	EN400	Nüve
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	TS-100 Thermo Shaker	Boeco
Saf Su Cihazı	Arium 611UV	Sartorius
Su Banyolu Çalkalayıcı	WNB 7-45	Memmert
Ligasyon Fırını	ES110	Nüve
Hava Banyolu Çalkalayıcı	MaxQ Mini 4450 Shaker	Barnstead/ Lab-Line
pH metre	WTW pH 720	InoLab
Otoklav	SS-325	Tomy
Sonikatör	Labsonic	Sartorius
Buz Makinesi	FM-80EE	Hoshizaki
Vorteks	Type 37600 Mixer	Thermolyne
Mikrodalga Fırın	RMD-17	Regal
Terazi	Pioneer	Ohaus
Steril Kabin	—	Tezsan

2.1.2. Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyon
<i>EcoR</i> I	Takara	15 U/μL
<i>Hind</i> III	Promega	10 U/μL
<i>Bam</i> H I	Fermentas	10 U/μL
<i>Nde</i> I	Fermentas	10 U/μL
<i>Ava</i> II	Promega	10 U/μL
<i>Pst</i> I	Fermentas	10 U/μl
<i>Bfa</i> I	Biolabs	5 U/μL
<i>Nhe</i> I	Fermentas	10 U/μL
GoTaq Flexi DNA Polimeraz	Promega	5 U/μL
T4 DNA Ligaz	Promega	3 U/μL

2.1.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal maddeler ve çözücüler	Fluka, Sigma, Aldrich, 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
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Marker)	Promega

2.1.4. Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler

Primer	Baz Sırası	T _m (°C)	Sentezleyen Firma
Ap F1	5’- ATACCGGGGAAGACGTTCC-3’	57,6	IDT
Ap R1	5’- ATTCGTCACATAGCTGTATCCG-3’	55,3	IDT
Ap F2	5’-GGCTAGCTTAAAATTGTTTCAGAAAAAAAATCTTACC-3’	57,7	IONTEK
Ap R2	5’- CGGATCCGTCAACTACTTATCTTCAATGAC-3’	59,1	IONTEK
Ap F3	5’- GGCTAGCATGAAATTGTTTCAGAAAAAAA TCTTACC-3’	59,1	IONTEK

2.1.5. Kullanılan Suşlar

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) suşları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *E. 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^qZΔM15</i>]	Klonlama hücresi
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cm ^r	Ekspresyon hücresi

2.1.6. Plazmitler

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler Tablo 7’de verimiştir.

Tablo 7. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

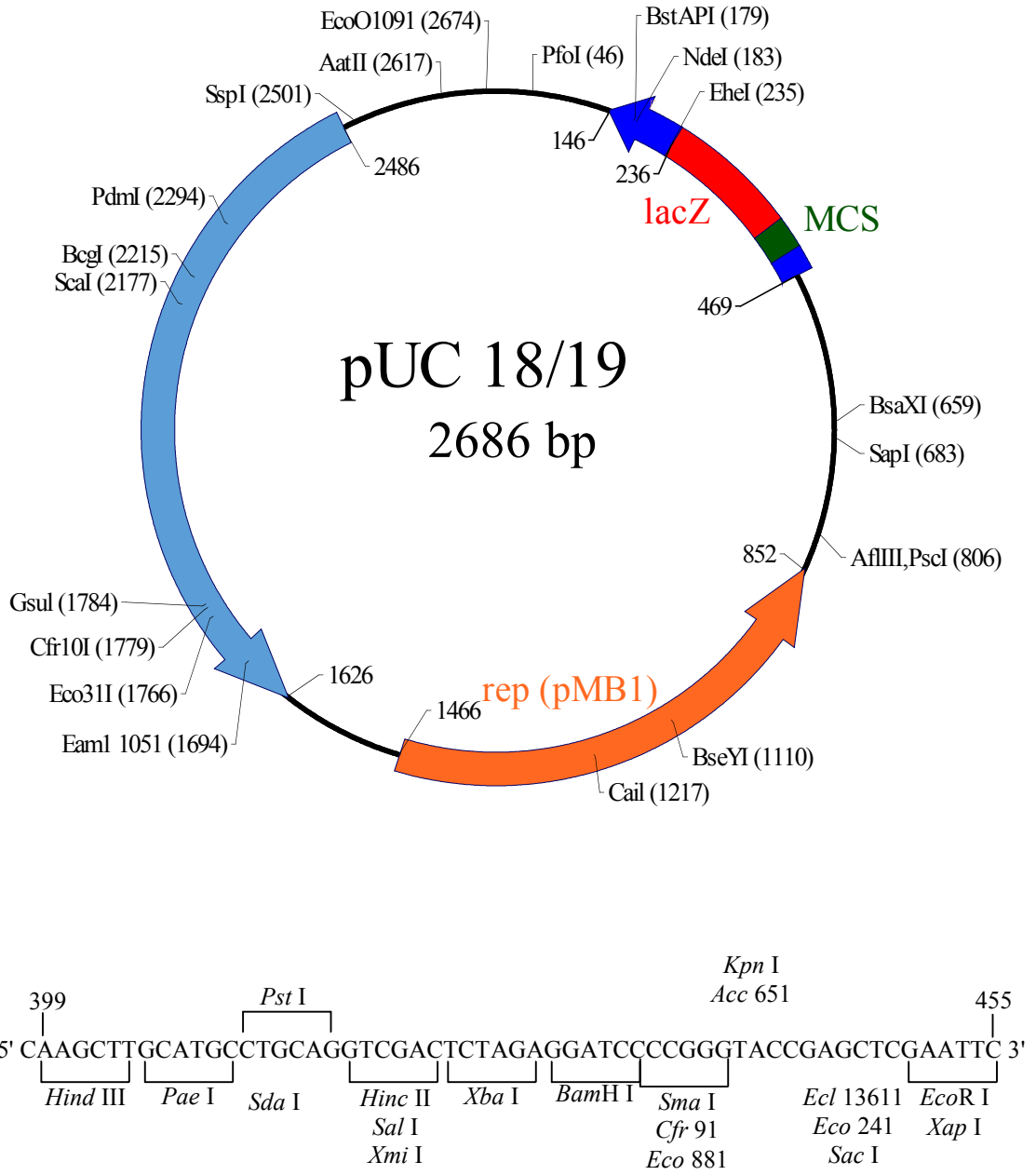
Plazmit	Firma	Kullanım Amacı
pUC18	Promega	Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için
pGEM-T Easy	Promega	İnvers PCR ürünlerini klonlamak için
pET-28a(+)	Novagen	Ekspresyon vektörü

2.1.7. Bilgisayar Programları

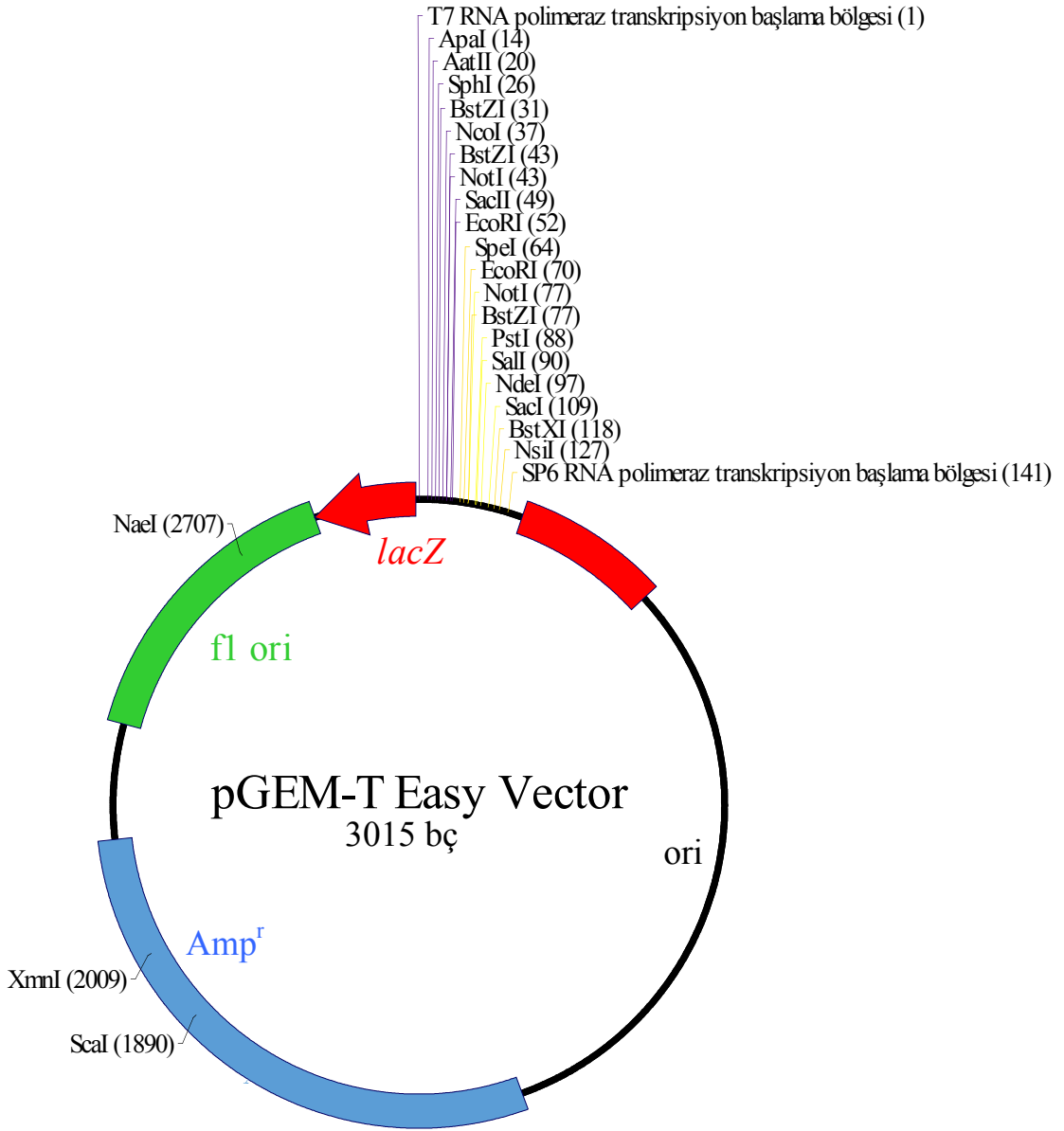
Çalışma boyunca kullanılan bilgisayar programları ve internet adresleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan bilgisayar programları ve internet adresleri

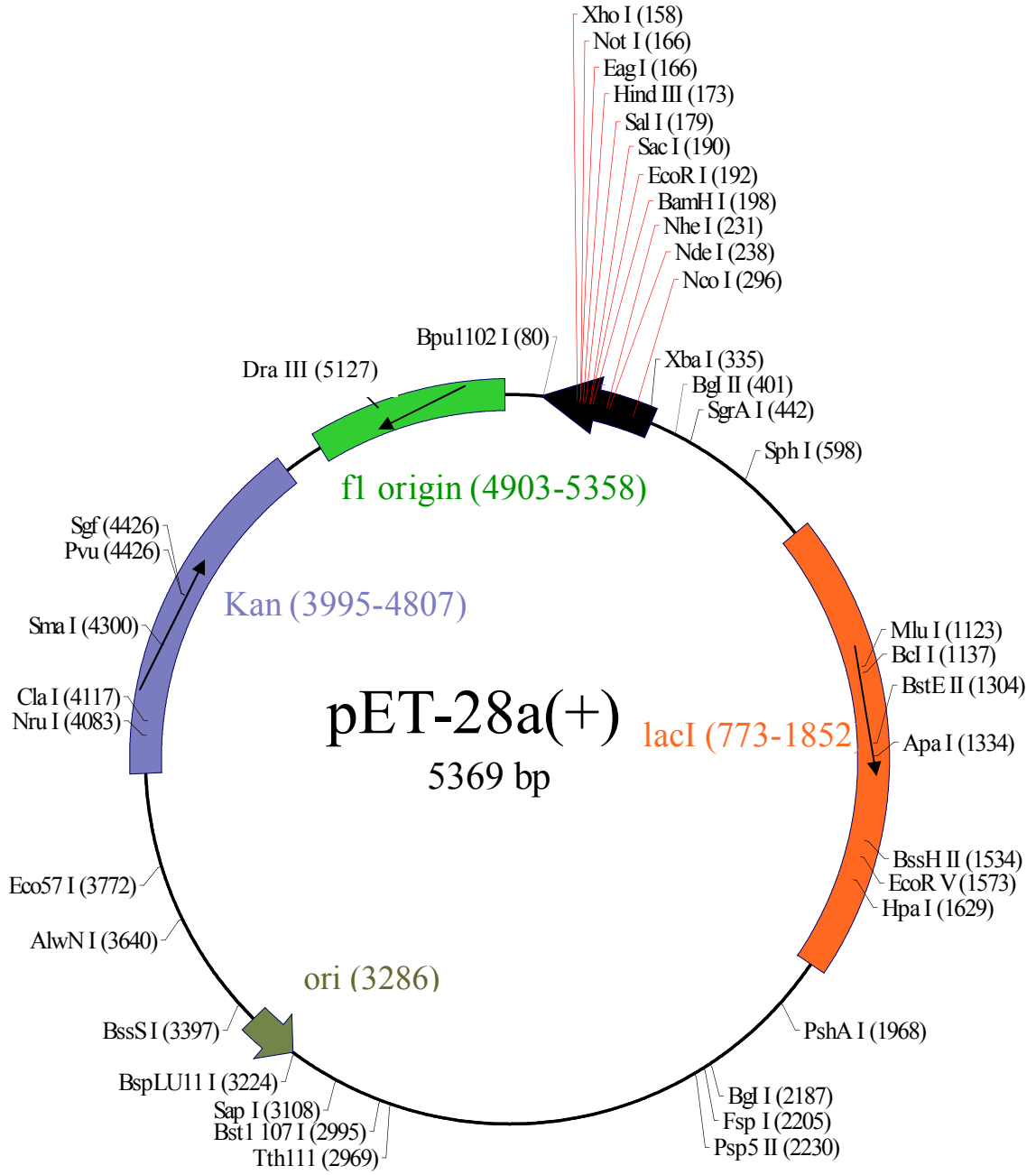
Program Adı	Adresi	Kullanım Amacı
Fast PCR	http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm	Tm’lerin hesaplanması
Expasy	http://www.expasy.org/	DNA’nın translasyonu
Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	DNA ve protein sıralarının karşılaştırılması
Redasoft Visual Cloning	http://www.redasoft.com/downloads	Plazmit haritalarının çizilmesinde
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/	Çoklu amino asit sıra karşılaştırmasında



Şekil 11. pUC 18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijinini, *LacZ* genini ve ampisilin direnç genini gösteren harita (URL-2, 2008).



Şekil 12. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, *LacZ* genini ve ampisilin direnç genini gösteren harita (URL-3, 2008).



Şekil 13. pET-28a(+) vektörünün replikasyon orijinini, *LacI* genini, kanamisin direnç genini gösteren haritası ve klonlama/ekspresyon bölgesi (URL-4, 2008).

Şekil 13'ün devamı

Bgl II T7 Promotoru → lac Operatörü
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC

Xba I rbs
 CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA

Nco I His.Tag
 CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC
 MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySer

Nde I Nde I T7.Tag BamHI EcoRI Sac I Sal I
 CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCTCGA
 HisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArg

Hind III Eag I Not I Xho I His.Tag
 CAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC
 GlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd

Bpu1102 I T7 Terminatörü
 GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCT
 CTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

2.1.8. Sıvı ve Katı Besiyerileri

- Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 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 bekletildi ve steril edildi (Maniatis vd.,1989).

- Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LBA) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı, 5,0 g NaCl ve 15,0 g agar 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 bekletildi ve steril edildi (Maniatis vd.,1989).

2.1.9. Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.9.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry Çözeltisi (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi): 1,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 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 Albumin (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 (w/v) 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.

2.1.9.2. 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 $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 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 (5 mg/mL): 50 mg etidiyum bromür saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.9.3. Protein Elektroferezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,43 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,29 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 çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Cozeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- 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-merkaptolanol'un 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.

- Substrat Boyama Çözeltisi: 50 mM NaOH-glisin tamponu içerisinde konsantrasyonları sırasıyla 0,5 mM ve 2,5 mM olacak şekilde CoCl_2 ve 4-metilumbelliferil fosfat (MUFPP) çözülerek hazırlanır.

2.1.9.4. Moleküler Tekniklerde Kullanılan Çözeltiler

- Amfisilin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg amfisilinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

- Kanamisin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg kanamisin sulfatın (Kanamisin A) saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

- IPTG Çözeltisi (0,2 g/mL): 2 g IPTG'nin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

- X-gal Çözeltisi (20 mg/mL): 200 mg X-gal'ın dimetilformamid (DMF) ile çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti küçük kısımlara bölünerek $-20\text{ }^\circ\text{C}$ '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.

- Etanol Çözeltisi (%96): 96 mL etanolun hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Etanol Çözeltisi (%70): 70 mL etanolun hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g CaCl_2 dihidratın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

- EDTA Çözeltisi (50 mM): 1,86 g $\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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.

2.1.9.5. Substrat Çözeltisi

- *p*-Nitrofenil Fosfat Çözeltisi (25 mM stok): 20 mg *p*-nitrofenil fosfat (*p*-NPP) disodyum tuzu içeren tablet 3 mL su içinde çözüldü.

2.1.9.6. Tamponlar

- Tris-HCl Tamponu (200 mM, pH 6,5-10,0): 24,23 g Tris bazı suda çözülerek 1 M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı.

- Sodyum Asetat Tamponu (200mM, pH 3,0-6,5): 27,22 g sodyum asetat suda çözülerek 1 M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı.

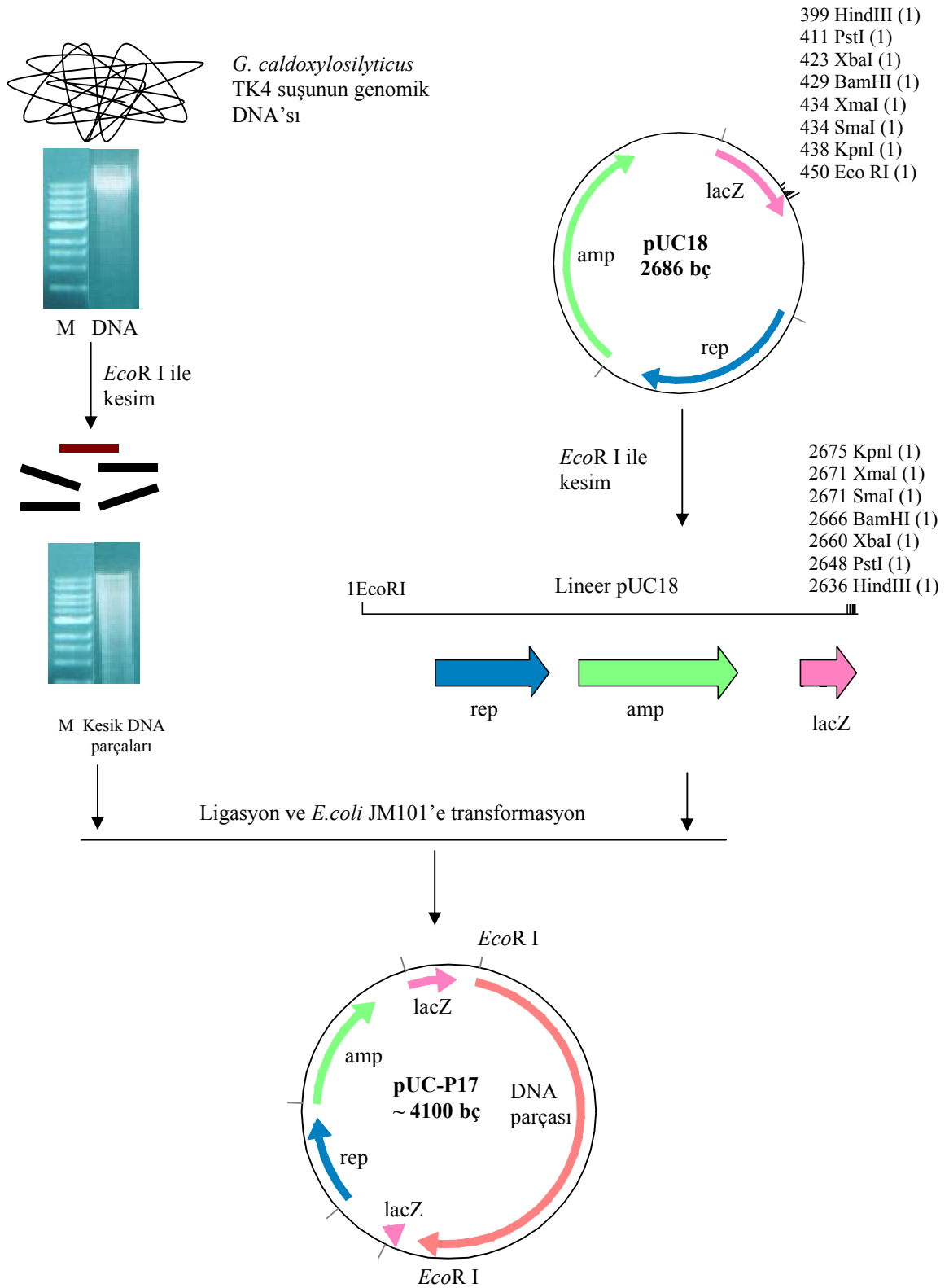
- Fosfat Tamponu (200mM, pH 6,0-8,0): 34,80 g K₂HPO₄'ün 1 L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti 27,20 g KH₂PO₄'ün 1 L sudaki çözeltisi ile titre edilerek pH'sı ayarlandı.

- Glisin-NaOH Tamponu (200mM, pH 8,5-11,5): 15,01 g glisin suda çözülerek 1 M NaOH çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı.

Bütün çözelti ve tamponlar bidestile su (dd H₂O) ile hazırlandı.

2.2. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesi; organizmanın genomik DNA'sının bir ya da birden fazla restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA parçalarının, yine aynı enzimle kesilen bir vektöre girmesi ile elde edilir (Şekil 14). Böylece genomik DNA'nın tamamı vektöre aktarılmış olur. Bu yöntemle organizmanın genomik DNA sırası tespit edilebilir ve genom haritası çıkarılabilir.



Şekil 14. *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sının *EcoR* I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi (Ertunga, 2006).

2.2.1. *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşunun Büyütülmesi

Termofilik bir bakteri olan *G. caldxylosilyticus* TK4 suşu stok kültürden LBA katı besiyerine yayma ekim yapılarak ekildi ve bir gece boyunca 58 °C’de inkübe edilerek büyütüldü. Gece kültürü ise, sıvı LB besiyerinde katı LBA besiyerinden öze yardımı ile tek koloni alınarak ekilmesi ve bir gece boyunca çalkalayıcı hava ya da su banyosunda 58 °C’de sallanılarak büyütülmesi ile hazırlandı (Dülger, 2003).

2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

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

- 1 mL gece kültürü 1,5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 13.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Pellet 480 µL 50 mM EDTA çözeltisinde çözüldü.

- 120 µL 10 mg/mL lizozim çözeltisinden ilave edildi hafifçe pipetlendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. 2 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.

- Tüpe 600 µL Nüklei Lizis Çözeltisi (Nüklei Lysis Solution) ilave edildi ve pellet çözünene kadar dikkatlice pipetlendi. 80 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve sonra oda sıcaklığına soğutuldu.

- 3 µL RNaz Çözeltisi (RNase Solution) ilave edilerek tüp dikkatlice 2-5 kez alt-üst edildi. 37 °C’de 15 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu.

- RNaz muamelesi yapılmış hücrelere 200 µL Protein Çöktürme Çözeltisi (Protein Precipitation Solution) ilave edildi. Çözeltinin hücrelerle iyice temas etmesi için tüp 20 saniye vortekslendi ve buz üzerinde 5 dakika bekletildi. 13.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.

- DNA’yı içeren süpernatant 1,5 mL’lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 600 µL oda sıcaklığında izopropanol ilave edildi. DNA iplikçikleri görünene kadar tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. 13.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüpe 600 µL oda sıcaklığında %70’lik etanol ilave edildi ve yavaşça alt-üst edilerek DNA pelletinin yıkanması sağlandı. 13.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi ve etanol pipetle uzaklaştırıldı.

- Tüp oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
- Son olarak elde edilen DNA pelleti 50 µL DNA Rehidrasyon Çözeltisi (DNA Rehydration Solution) ilave edilerek 65 °C’de 1 saat inkübe edildi. Bu bir saatlik inkübasyon süresi boyunca periyodik olarak tüpler dibe vurulmak suretiyle DNA çözüldü.
- Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zamana kadar 4 °C’de saklandı.

2.2.3. Plazmit DNA İzolasyonu

DNA parçası içeren ya da içermeyen bütün plazmitler “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak izole edildi. Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için vektör olarak pUC 18 plazmiti kullanıldı. pUC 18 plazmitini içeren *E. coli* JM101 hücrelerinden LB besiyerine ekim yapılarak gece kültürü hazırlandı.

- 1-5 mL gece kültürü 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatanı uzaklaştırıldı.
- Üzerine 250 µL Hücre Süspansiyon Çözeltisi (Cell Resuspension Solution) ilave edilip vorteksle pelletin tamamen çözünmesi sağlandı.
- 250 µL Hücre Lizis Çözeltisi (Cell Lysis Solution) ilave edildi ve tüp 4 kere alt-üst edilerek karıştırıldı. Hücre süspansiyonu berraklaşana kadar tüp yaklaşık 4 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 10 µL Alkali Proteaz Çözeltisi (Alkaline Protease Solution) ilave edildi ve tüp 4 kere alt-üst edildi. Oda sıcaklığında 4 dakika bekletildi.
- 350 µL Nötralizasyon Çözeltisi (Neutralization Solution) ilave edildi ve tüp derhal 4 kere alt-üst edilerek karıştırıldı.
- Elde edilen bakteriyal lizat 13.000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatan minikolon (SV Minicolumn) içine aktarılarak 13.000 rpm’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama kabına geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 750 µL Kolon Yıkama Çözeltisi (Column Wash Solution) ilave edildi ve 13.000 rpm’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Toplama kabına geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolon bir kez daha 250 µL Kolon Yıkama Çözeltisi (Column Wash Solution) ile yıkandı.

- Minikolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 100 µL Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease-Free Water) ilave edildi. Minikolon 13.000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çözeltiye geçmesi sağlandı. Elde edilen plazmit DNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

2.2.4. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Genomik ve plazmit DNA çözeltilerinin konsantrasyonu, nükleotitlerin heterosiklik halkalarının 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliğinden yararlanılarak ölçüldü (Temizkan ve Arda, 2004). DNA çözeltisi saf su ile 100 kat seyreltilerek 260 nm'de absorbans okundu. 1 absorbans değeri, çift iplikli DNA için 50 µg/mL'ye karşılık gelmektedir. DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikten yararlanıldı.

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

2.2.5. Genomik ve Plazmit DNA'larının *EcoR* I ile Kesimi

Genomik DNA (gDNA) (850 µg / mL) ve pUC 18 plazmit DNA (930 µg / mL)'sı 50 µL son hacimde ayrı ayrı kesildi (Maniatis vd.,1989).

gDNA / pUC 18	5 µg
10x H Tamponu	5 µL
<i>EcoR</i> I	1,5 µL (10 U)
dd H ₂ O	50 µL'ye tamamlandı

Plazmit DNA'yı içeren reaksiyon karışımı 37 °C'de 2-3 saat, genomik DNA'yı içeren reaksiyon karışımı ise 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra enzimin deaktivasyonu için karışımlar 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

2.2.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi yatay jel tankı kullanılarak gerçekleştirildi (Maniatis vd., 1989).

- %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 doldurulup her bir kuyucuğa ayrı bir yerde karıştırılmış olan 1 µL jel yükleme boyası ve 5 µL DNA yüklendi.
- Yaklaşık 1 saat 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

DNA'nın etanol ile çöktürülmesi restriksiyon enzimleri ile kesimden sonra ayrıca PCR'den sonra çözelti içindeki proteinlerin ve tamponların uzaklaştırılması amacı ile yapıldı (URL-5, 2008).

- DNA çözeltisi üzerine tuz konsantrasyonunu 0,3 M'a ayarlamak için 1/10 kadar 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edilip iyive karıştırıldı ve son hacmin 2,5 katı kadar %96'lık soğuk etanol ilave edildi. Tüp alt-üst edilerek karıştırıldı ve -20 °C'de 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
- DNA peltesi üzerine 500 µL %96'lık soğuk etanol ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi 500 µL %70'lik soğuk etanol ile tekrarlandı. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı. Eppendorf içindeki DNA, etanolün tamamen uzaklaşması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Pellet halindeki DNA uygun miktarda nukleaz içermeyen suda çözülerek -20 °C'de saklandı.

2.2.8. gDNA Parçalarının pUC 18 Vektörüne Ligasyonu

EcoR I kesilen gDNA'dan elde edilen parçalar aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne T4-DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989).

pUC18 (vektör DNA)	2 µL
gDNA parçaları (insert DNA)	4 µL
10x Ligaz Tamponu	2 µL
T4-DNA Ligaz	2 µL (5 U)
Nükleaz içermeyen su	20 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı 23 °C'de bir gece inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

2.2.9. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücrelerin hazırlanışı kalsiyum klorür metoduna göre gerçekleştirildi (Maniatis vd.,1989). Kompetent hücreler *E. coli* JM101 ve BL21(DE3)pLysS suşları ile hazırlandı. Genomik DNA kütüphanesini oluşturmak için DNA parçalarını içeren pUC18 ve PCR ürünlerini içeren pGEM-T vektörlerinin transformasyonu için JM101 suşu, genin tamamını içeren pET-28a(+) vektörünün transformasyonu için ise BL21(DE3)pLysS suşu kullanıldı.

- Gece kültürü hazırlamak için, 3 mL LB besiyeri içine petriden ekim yapıldı. Sıvı kültür gece boyunca 37 °C'de 200 rpm'de sallanarak büyütüldü.

- Hazırlanan gece kültürünün 600 µL'si 60 mL LB besiyeri içeren erlen içine aktarıldı ve 600 nm'deki optik yoğunluk 0,4-0,6 arasında bir değere ulaşmaya kadar yaklaşık 2 saat 37 °C'de ve 200 rpm devirde büyütüldü.

- Bu değere ulaşıldığında hücre kültürü 30 mL'lik tüplere konularak 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı

- Her bir tüpe 10 mL 0,1 M CaCl₂ ilave edilerek pellet çözüldü. Tüpler 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar uzaklaştırıldı.

- Pelletler 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde süspansiyeye edilerek 200 µL hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek 2 saat buzda bekletildi ve transformasyona hazır hale getirildi.

2.2.10. Transformasyon

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

- Kompetent hücreleri içeren tüpe 1-5 µL arasında uygun hacimde plazmit çözeltisi ilave edilerek 30 dakika buz içinde bekletildi.

- Daha sonra tüp 2 dakika 42 °C'de bekletilerek plazmitin hücre içine geçmesi sağlandı.

- Tüp içine 200 µL LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat bekletildi.

- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyeye karışım petriye yayma ekimle ekildi ve 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmiti içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

- Transformasyonda pUC18 ve pGEM-T vektörleri kullanıldığı durumlarda, 50 µg/mL ampisilin içeren LBA'lı petrilere üzerine 200 mg/mL'lik IPTG çözeltisinden 45 µL ve 20 mg/mL'lik X-gal çözeltisinden 45 µL eklenip iyice yayılarak kurutuldu ve daha sonra ekim yapıldı. Bu ortamda büyüyen mavi ve beyaz kolonilerden sadece beyazları seçilerek alındı.

- pET-28a(+) vektörü kullanıldığı durumlarda ise 50 µg/mL oranında kanamisin içeren LBA'lı petrilere üzerine 200 mg/mL'lik IPTG çözeltisinden 45 µL eklenip iyice yayılarak kurutuldu ve daha sonra ekim yapıldı. Bu ortamda büyüyen tüm koloniler seçilerek alındı.

2.2.11. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Petrilerden seçilen beyaz koloniler (pUC18 + DNA parçası), 50 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C'de gece boyunca 200 rpm'de sallanarak gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL %80'lik gliserol çözeltisi ile karıştırılarak gliserol stoğu hazırlandı ve bu stoklar gerektiğinde kullanılmak

üzere -20 °C'de saklandı. Rekombinant plazmitler “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak izole edildi (Bölüm 2.2.3.). İzole edilen rekombinant plazmitler *EcoR* I enzimi ile kesilerek vektör içine aktarılan DNA parçaları kontrol edildi. Yaklaşık 2 kbç'den daha büyük DNA parçalarını içeren rekombinant plazmitler DNA sıra analizi için Macrogen Inc.(Güney Kore)'e gönderildi.

2.2.12. DNA Sıralarının İncelenmesi

G. caldxylosilyticus TK4 suşundan elde edilen DNA ve protein sıraları BLAST programı yardımı ile incelendi.

2.3. İners PCR ile Alkalın Fosfataz Geninin Eksik Kısımının Yakalanması

Normal PCR'dan farklı olarak iners PCR'da DNA kalıbına bağlanacak ileri ve geri primerler ters yönlüdür. DNA kalıbına bağlanan primerler ile DNA sentezi dışı doğru gerçekleşir. Kalıp DNA olarak genellikle restriksiyon enzimleri ile kesilip kendi üzerine yapışmış halkasal DNA parçaları kullanılır (Şekil 15).

2.3.1. İners PCR İçin Primer Dizaynı

AP geninin başındaki yaklaşık 600 bazlık kısmın belirlenmesi için iners PCR gerçekleştirildi (Ertunga, 2006) AP'nin bilinen DNA sırasından yararlanılarak ileri ve geri primer (Ap F1 ve Ap R1) dizayn edilip, sentezletirildi (Tablo 5).

2.3.2. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Primerler arasında kalan bölgeden DNA'yı kesmeyen *Hind* III, *Ava* II, *Pst* I, *Bfa* I, *Bam*H I ve *Nhe* I enzimleri ile genomik DNA uygun şartlarda kesildi (Maniatis vd.,1989). Reaksiyon karışımlarının son hacmi 50 µL yapıldı.

gDNA	2 µg
10x Reaksiyon Tamponu	5 µL
Restriksiyon Enzimi	1 µL (5-10 U)
dd H ₂ O	50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımları 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Enzimler, uygun sıcaklıkta yeterli süre inkübasyon sonucunda deaktive edildi ve sonuçlar agaroz jelde incelendi.

2.3.3. DNA Parçalarının Ligasyonu

Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının her birinin kendi içinde yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4-DNA Ligaz enzimi kullanılarak ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi (Maniatis vd.,1989). Reaksiyonların son hacimleri 500 µL yapıldı.

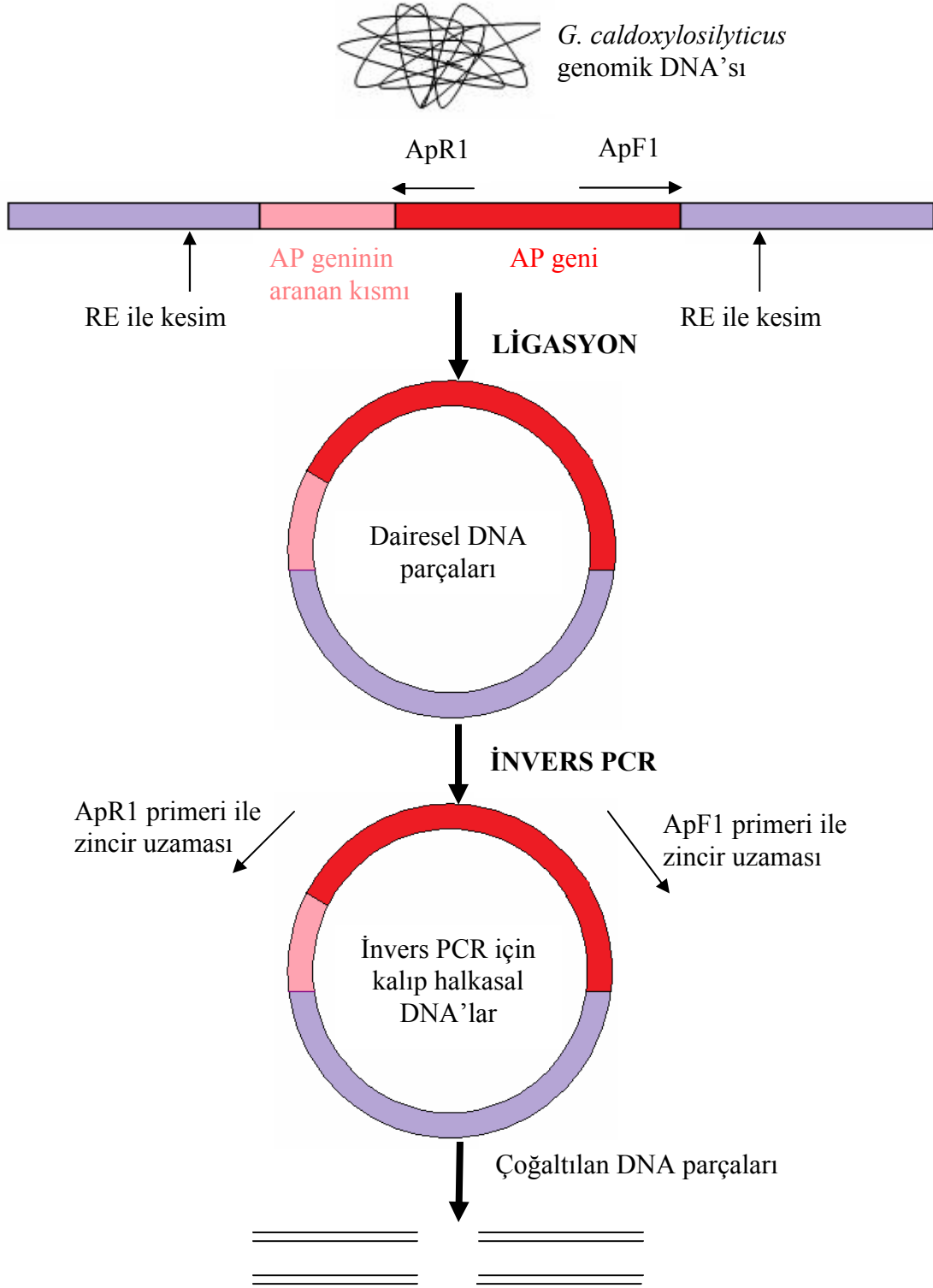
RE Kesim Karışımı	50 µL
10x Ligaz Tamponu	50 µL
T4-DNA Ligaz	3 µL (5 U)
ddH ₂ O	397 µL

Reaksiyon karışımları 23 °C'de gece boyunca bekletildi. Etanol çöktürmesi yapılarak (Bölüm 2.2.7) protein ve diğer bileşenler uzaklaştırıldı ve saf DNA pelleti elde edildi. Pellet 30 µL steril destile suda çözüldü.

2.3.4. İnvers Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA parçalarının çoğaltılması için kullanılan invers PCR, ters yönlerde primer kullanımı ile gerçekleştirildi (Maniatis vd., 1989). Kalıp DNA, primerler, dNTP karışımı, tampon ve *Taq* DNA polimerazın ilavesi ile reaksiyon karışımı hazırlandı ve uygun

programa ayarlanan PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar %1,2'lik agaroz jelde incelendi.



Şekil 15. AP geninin baş kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'ın şematik gösterimi

2.3.4. İnvrs Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo 9. İnvrs PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
5x Reaksiyon Tamponu	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
Kalıp DNA	100 ng
Primer I	25 pmol
Primer II	25 pmol
dNTP Karışımı (10 mM)	1 µL
<i>Go Taq</i> DNA Polimeraz	0,25 µL (5 U)
dd H ₂ O	50 µL'ye tamamlandı

Tablo 10. İnvrs PCR reaksiyon şartları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Hibridizasyon	53	1	36
Uzama	72	2	
Uzama	72	3	1

2.3.5. PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu

PCR reaksiyon karışımları %1,2'lik agaroz jele yüklendi. 100 V'de 45 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında PCR ile çoğaltılan fragmentler jelden kesilerek alındı. DNA fragmentleri DNA Ekstraksiyon Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) ile jelden ekstrakte edildi.

- Kesilen jel parçası mikrosantrifüj tüplerine konularak ağırlığı kaydedildi. Üzerine 10 mg için 10 µL olacak şekilde Bağlanma Çözeltilisi (Membran Binding Solution) eklendi ve 55 °C'de 5 dakika inkübe edilerek agaroz tamamen çözüldü.

- Çözölmüş jel karışımı minikolona (SV Minicolumn) aktarıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 16.000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama kabına geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona daha evvel etanol ilave edilmiş olan yıkama çözeltisinden (Wash Solution) 700 µL ilave edildi ve 16.000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama kabına geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Aynı işlem 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlandı. 16.000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama kabına geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. 50 µL Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease-Free Water) ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000×g'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çözeltiye geçmesi sağlandı. Saf PCR ürününü içeren çözeltiden 5 µL alınarak agaroz elektroforezinde DNA parçaları kontrol edildi.

2.3.6. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünleri pGEM-T Easy klonlama vektörüne T4-DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştirıldı (Maniatis vd.,1989).

PCR Ürünü	3 µL
pGEM-T Easy Vektörü	0,5 µL
2x Ligasyon Tamponu	5 µL
T4-DNA Ligaz	1,5 µL (5 U)

Karışımlar 4 °C'de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.

2.3.7. *E. coli* JM101'e Transformasyon

Ligasyon ürünleri *E. coli* JM101 hücrelerine aktararak (Bölüm 2.2.9. ve 2.2.10.) rekombinat plazmitler çoğaltıldı. IPTG ve X-gal içeren ampisilinli LBA petrillerinden beyaz koloniler seçilerek alındı (Maniatis vd.,1989).

2.3.8. Rekombinant Plazmit İzolasyonu ve Sıra Analizi

Seçilen beyaz koloniler ampisilinli LB besiyerinde 37 °C’de 200 rpm’de 1 gece büyütülerek gece kültürleri hazırlandı. Rekombinant plazmitler “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak izole edildi (Bölüm 2.2.3.). İzole edilen plazmitler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve DNA parçası içeren plazmitler tespit edildi. Bu plazmitler *EcoR* I enzimi ile kesilerek vektör içine aktarılan DNA parçaları kontrol edildi. DNA parçası içeren plazmitler DNA sıra analizi için Macrogen Inc.’e (Güney Kore) gönderildi.

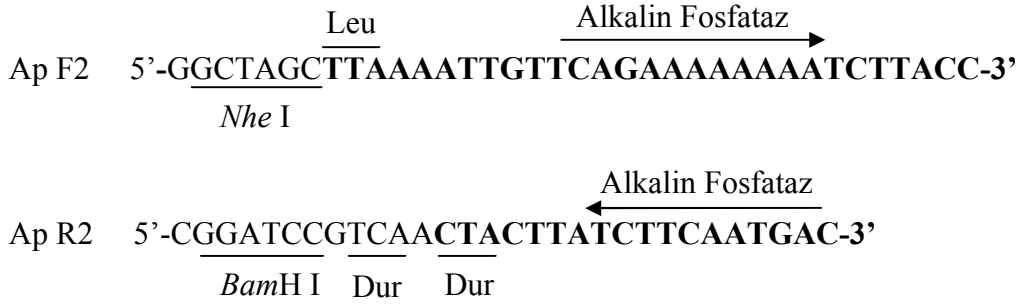
2.4. AP Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu

2.4.1. Primer Dizaynı ve Sentezi

AP geninin tam sırasını yakalamak için ileri (Ap F2) ve geri (Ap R2) primer dizayn edildi (Şekil 16). İleri primerler başlama kodonundan önce *Nhe* I kesim bölgesini içerecek şekilde dizayn edildi. Geri primer ise dur kodonundan önce tekrar bir dur kodonu ve *Bam*H I kesim bölgesini içerecek şekilde dizayn edildi ve sentez ettirildi.

2.4.2. AP Geninin Tamamının PCR ile Çoğaltılması

DNA parçalarının çoğaltılması için kullanılan PCR, Maniatis ve arkadaşlarına (1989) göre gerçekleştirildi. Kalıp DNA, primerler, dNTP karışımı, tampon ve *Taq* DNA polimerazın ilavesi ile reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 11) ve uygun programa (Tablo 12) ayarlanan PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışık altında incelendi.



Şekil 16. AP geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotit sırası. Koyu yazılan nükleotitler, alkalin fosfataz geninin başlangıç ve bitiş bölgelerine denk gelmektedir

Tablo 11. PCR reaksiyonunun bileşenleri

Bileşen	Miktar
5x Reaksiyon Tamponu	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
Kalıp DNA	100 ng
Primer I	25 pmol
Primer II	25 pmol
dNTP Karışımı (10 mM)	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0,25 µL (5 U)
dd H ₂ O	50 µL'ye tamamlandı

Tablo 12. PCR reaksiyonunun şartları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Hibridizasyon	53	1	36
Uzama	72	2	
Uzama	72	5	1

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

Hem PCR ürünleri hem de pET-28a(+) vektörü iki ucundan da restriksiyon enzimleri ile kesilerek sarkık uçların oluşturulması ve ligasyonla bu uçların birleşerek genin vektöre klonlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla PCR ürünleri ve pET-28a(+) vektörü *BamH I* ve *Nhe I* restriksiyon enzimleri ile kesilerek ligasyona hazır hale getirildi (Maniatis vd.,1989).

PCR ürünü	15 µL
10x Tango Tamponu	5 µL
<i>BamH I</i>	1 µL (10 U)
<i>Nhe I</i>	1 µL (10 U)
dd H ₂ O	28 µL

Reaksiyon karışımı 37 °C’de 6 saat inkübe edildi.

pET-28a(+) Vektörü	5 µg
10x Tango Tamponu	5 µL
<i>BamH I</i>	1 µL (10 U)
<i>Nhe I</i>	1 µL (10 U)
dd H ₂ O	50 µL’ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı 37 °C’de 6 saat inkübe edildi.

2.4.4. Genin pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu

Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jelden DNA Ekstraksiyon Kiti yardımı ile alındı (Bölüm 2.3.5) ve 20’şer µL steril destile suda çözüldü. T4 DNA Ligaz enzimi ile PCR ürünü pET-28a(+) vektörüne yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989).

pET-28a(+) (vektör DNA)	10 µL
PCR ürünü (insert DNA)	10 µL
10x Ligaz Tamponu	3 µL
T4-DNA Ligaz	0,5 µL (5 U)
dd H ₂ O	6,5 µl

Reaksiyon karışımı 16 °C’de bir gece boyunca inkübe edildi.

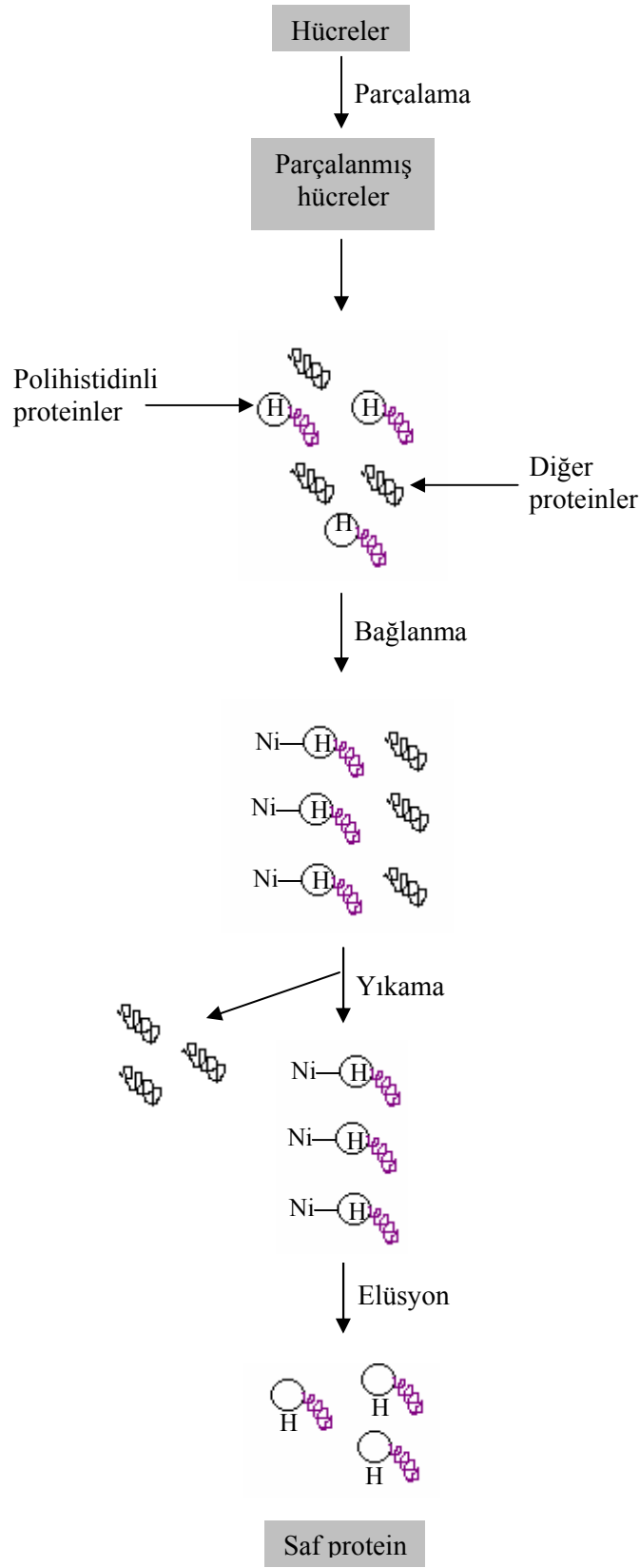
2.4.5. Rekombinant Plazmitin BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve İzolasyonu

Ligasyon ürünü bir gün önceden hazırlanan *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetent hücrelerine aktarıldı (Bölüm 2.2.9. ve 2.2.10.). Kanamisin içeren LBA petrilerden seçilen koloniler 3 mL kanamisinli LB besiyerine ekilerek 37 °C’de gece kültürleri hazırlandı. Plazmit izolasyonu “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Bölüm 2.2.2.). İzole edilen plazmitler %0,7’lik agaroz jelde yürütülerek DNA parçası içerenler tespit edildi. Bu plazmitler *Bam*H I ve *Nhe* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek içerdikleri DNA parçaları %1’lik agaroz jelde kontrol edildi. AP genini içeren plazmit biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere gliserol stoğu (900 µL gece kültürü + 300 µL gliserol) yapılarak -20 °C’de saklandı. Ayrıca izole edilen rekombinant plazmit DNA sıra analizi için MacroGen Inc.’e gönderildi.

2.5. Alkalın Fosfatazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.5.1. Alkalın Fosfatazın *E. coli*’de Ekspresyonu ve Saflaştırılması

pET28a(+) vektörüne klonlanan alkalın fosfataz geninin *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilmesi sağlandı ve N- ucunda bulunan 6 tane histidin biriminden dolayı, ekspres edilen protein nikel kolonu içeren “Protein Saflaştırma Kiti” (Magnehis Protein Purification System) kullanılarak saflaştırıldı (Şekil 17). Proteinin ekspresyonu ve saflaştırılmasında aşağıdaki basamaklar takip edildi.



Şekil 17. Polihis-tag kuyruğu içeren AP proteininin nikel kolonu ile saflaştırılmasının şematik gösterimi

Hazırlanan stok kültürden 3 mL LB besiyerine ekildi ve gece boyunca 37 °C’de sallayıcıda sallanarak gece kültürü hazırlandı. Ertesi gün 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerinin 100 mL’sine 1 mL gece kültürü eklendi ve 37 °C’de 600 nm’deki optik yoğunluğu 0,8-1,0 arasına gelinceye kadar büyütüldü. İstenilen optik yoğunluğa ulaşıldığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklenerek 6 saat indüklemeye yapıldı. AP’nin hücreden saflaştırılması hücrelerin üretimini takiben patlatılması ve protein ekstraktı elde edildikten sonra yukarıda da belirtildiği gibi “Protein Saflaştırma Kiti” kullanılarak aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Büyütülen hücreler 8.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen pellet bir gece -20 °C’de inkübe edildikten sonra 500 µL reaksiyon tamponunda (200 mM Glisin-NaOH tamponu pH 9,5) çözüldü. Üzerine 0,1 mg lizozim ilave edilerek 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. Sonrasında, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika titreşim olacak şekilde Sartorius Labsonic sonikatör aleti kullanılarak hücreler patlatıldı. Elde edilen hücre solüsyonu 14.800 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Ekim için kullanılan klonun doğruluğundan emin olmak için süpernatanda AP aktivitesi bakıldı. Aktivite varlığından emin olduktan sonra kaba ekstrakta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere bir miktar örnek ayrılarak enzim saflaştırma işlemlerine başlandı. Elde edilen ham ekstrat 15 dakika süreyle 75 °C’de bekletildi. Parçalanmış proteinleri uzaklaştırmak için 15 dakika 14.800 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatanda tekrar AP aktivitesi bakıldı. Aktivite varlığından emin olduktan sonra kaba ekstrakta protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere bir miktar örnek ayrılarak saflaştırma aşamasına geçildi.

- Süpernatant mikrosantrifüj tüplerine 1’er mL olacak şekilde aktarıldı.

- Her bir tüpe 120 µL Nikel-Parçacıkları (MagneHis Ni-Particles) eklendi. 10 kez nazikçe pipetlendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Bu işlem sonucunda N- ucunda bulunan 6 tane histidinden dolayı rekombinant protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak süpernatandan ayrıldı.

- Nikel-parçacıklarını tüplerin kenarına toplamak için tüpler magnetik tutucuya yerleştirildi. 30 saniye bekledikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Tüpler magnetik tutucudan alınarak üzerlerine 1000'er μL Bağlanma/Yıkama Tamponu (MagneHis Binding/Washing Buffer) eklenip 10 kez pipetlendi ve 2 dakika inkübe edildi. Böylece, nikel-parçacıklarının yıkanması sağlandı. Tüpler magnetik tutucuya yerleştirilerek yaklaşık 30 saniye beklendi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Yıkama basamağı 2 kez daha tekrar edildi.

- Her bir tüpe 350 μL Elüsyon Tamponu (MagneHis Elution Buffer) ilave edildi ve pipetleme işlemini takiben oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Elüsyon Tamponu ilavesiyle nikel bağli protein çözeltiye bırakıldı. Magnetik tutucuya konulan tüplerden süpernatant yaklaşık 30 saniye sonra dikkatlice alınarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.5.2. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951) Standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiğı için bir seri serum albumin çözeltisi hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- BSA standartları, kör örnek ve protein örneğı 5'er mL Lowry C belirteci ile karıştırıldı.

- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

- 0,5 mL Lowry D belirteci hızla tüplere eklendi ve vortekslendi.

- Tüpler 30 dakika karanlıkta bekletildi.

- 650 nm'de absorbanslar ölçüldü.

- Kalibrasyon grafiğı hazırlanarak örneğın protein derişimi bulundu.

2.5.3. Doğal Jel Elektrofözezi

AP'nin varlığı doğal elektrofözez ve substrat boyaması ile ortaya konuldu. Doğal elektrofözez SDS'siz ortamda gerçekleştirildi. %5'lik yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanıldı (Tablo 13).

Tablo 13. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri

Bileşenler	Yükleme Jeli (%5)	Ayırma Jeli (%12)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	0,5 mL	---
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	---	2,5 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
dd H ₂ O	2,74 mL	3,31 mL
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,04 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin ('TEMED)	0,004 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal elektroforez yürütme tamponu ile dolduruldu ve buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Doğal elektroforez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan standart ve örnekler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Her bir kuyucuğa yaklaşık olarak 20 µg protein yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi.

2.5.4. Substrat ve Commassie Boyaması

Doğal jelde AP aktivitesinin belirlenmesi için sistemden çıkarılan jel, derhal 0,5 mM CoCl₂ ve 2,5 mM 4-metilumbelliferilfosfat (MUFPP) içeren 50 mM pH 9,5 Glisin-NaOH tamponu içerisinde, aktivite için belirlenen uygun sıcaklıkta, (50-60 °C) 20 dakika süreyle bir hava banyolu çalkalayıcıda inkübe edildi. Aktif bantlar UV ışığı altında incelendi ve jel görüntüleme cihazında kaydedildi (Zappa vd., 2001).

Jeldeki denatüre olmamış proteinlerin görünür hale getirilmesi için Coomassie Brilliant Mavisinin proteinlere bağlanma özelliğinden yararlanıldı (Meyer ve Lamberts, 1965). Jel Coomassie Brilliant Mavisini içeren boyama çözeltisi içinde hafifçe sallanarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise boya uzaklaştırma çözeltisi ile yaklaşık 2-3 saat muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jel, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

2.5.5. SDS Jel Elektroforezi

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Maniatis ve arkadaşlarına (1989) göre gerçekleştirildi. %5'lik yükleme ve %12'lük ayırma jeli kullanıldı (Tablo 14).

Tablo 14. SDS jel elektroforezinin bileşenleri

Bileşenler	Yükleme Jeli (%5)	Ayırma Jeli (%12)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	0,5 mL	---
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	---	2,5 mL
%10 SDS	0,04 mL	0,1 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
dd H ₂ O	2,7 mL	3,3 mL
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,04 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin ('TEMED)	0,004 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. SDS yürütme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan standart ve örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi ve Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Her bir kuyucuğa yaklaşık olarak 20 µg protein yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkarıldı ve coomassie brilliant mavisini içeren boyama çözeltisi içinde hafifçe sallanarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise boya uzaklaştırma çözeltisi ile yaklaşık 2-3 saat muamele edildi (Bölüm 2.5.4). Bantları görünür hale getirilen jel, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

2.6. Alkalın Fosfataz Aktivitesinin Tayini

Alkalın fosfataz aktivitesi spektrofotometrik olarak 410 nm'de *p*-nitrofenol fosfattan (*p*-NPP) *p*-nitrofenolün (*p*-NP) salınımının izlenmesiyle ölçüldü. Reaksiyon karışımının son hacmi 1 mL olacak şekilde 200 mM glisin-NaOH tamponu içinde uygun miktarda substrat ve enzimin 15 dakika inkübe edilmesiyle enzimatik reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon 50 µL soğuk 4 N NaOH ilavesiyle durduruldu. (De Prada vd., 1996, Li vd., 2007). 1 ünite enzim aktivitesi, 1 dakikada oluşan 1 µmol *p*-NP olarak tanımlandı. Aktivitenin mg saf proteine oranlanmasıyla da spesifik aktivite belirlendi.

2.6.1. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

AP aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek amacı ile aktivitenin ölçüldüğü rutin yöntemde substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon çözeltinin türü ve pH'sı değiştirilerek AP'nin substratı ile olan reaksiyonu 60 °C'de gerçekleştirildi. Bu testlerde substratın ve enzimin son konsantrasyonu sabit olacak şekilde ayarlandı. Kullanılan tüm tampon çözeltiler 200 mM konsantrasyonda olup pH 3,0-6,5 aralığında sodyum asetat, pH 6,0-8,0 aralığında fosfat, pH 6,5-10,0 aralığında Tris-HCl, pH 8,5-11,0 aralığında glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH belirlendi.

2.6.2. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

AP'nin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için termal sallayıcı kullanılarak 10-90 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla AP'nin substratı ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Mikrotüpler içinde pH'sı 9,5 olan Glisin-NaOH tamponunda çözülen substratın ve enzimin son konsantrasyonu sabit olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen veriler kullanılarak AP enziminin optimum sıcaklığı tespit edildi.

2.6.3. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak gerçekleştirilen optimum pH ve sıcaklık tayinlerinden sonra sabit substrat konsantrasyonunda ve farklı enzim konsantrasyonlarında (0,1 – 200

$\mu\text{g/mL}$ nihai konsantrasyon aralığında) enzim aktivitesinin değişimi incelendi. Elde edilen veriler kullanılarak değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi ortaya konuldu.

2.6.4. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

AP aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağımlılığının incelenmesi için 25 mM'lık stok *p*-NPP çözeltisi Glisin-NaOH (pH 9,5) tamponunda hazırlandı ve AP'nin katalizlediği reaksiyon 50 °C'de geręekleřtirildi. Her bir ölçüm için farklı konsantrasyonlarda *p*-NPP (0,01 mM ile 1 mM nihai konsantrasyonu aralığında) ve etkin enzim konsantrasyonunda AP kullanılarak rutin reaksiyonlar geręekleřtirildi. Elde edilen verilerden substrat doygunluk ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek optimum substrat konsantrasyonu ve V_{maks} ve K_m kinetik verileri elde edildi.

2.6.5. Alkalın Fosfatazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Rekombinant enzimin sahip olduğu aktivitenin ısıl kararlılığının belirlenmesi için enzim çözeltisi 30 dakikalık zaman dilimlerinde 2 saate kadar sıcaklıktaki 10 °C'lik artışlarla 10-70 °C arasında inkübe edildi. Tespit edilen şartlarda bekletilen enzim çözeltisi, oda sıcaklığına kadar soğutulurak daha önce belirlenen optimum şartlarda aktivite testleri geręekleřtirildi. % kalan aktivite, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

2.6.6. Alkalın Fosfatazın pH Kararlılığının İncelenmesi

pH kararlılığını incelemek için, elde edilen saf enzim elüatı, 200 mM konsantrasyondaki pH 7,0-7,5 fosfat tamponu, pH 8,0-8,5 Tris-HCl tamponu ve pH 9,0-11,0 Glisin-NaOH tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 4 °C'de 12, 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bu enzim-tampon karışımlarından, enzimin nihai konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde alınarak, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivitesi ölçüldü. Ayrıca enzim, inkübasyona tabi tutulmadan, aynı tamponlar iğerisindeki karışımı hazırlanır hazırlanmaz hemen aktivitesi ölçüldü ve enzimin yüzde kalan aktivitesi belirlendi (Özen vd., 2004).

2.6.7. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisinin İncelenmesi

AP aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile monovalent K^+ , Na^+ , Li^+ , divalent Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve trivalent Cr^{3+} ile Al^{3+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Kullanılan metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde her bir metal iyonu reaksiyon ortamına ayrı ayrı ilave edilerek, derhal 50 °C'de reaksiyonlar gerçekleştirildi ve aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak bu metal iyonlarının AP aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Aktif bölgesinde Mg^{2+} ve Zn^{2+} içerdiği bilinen AP'lerin genel inhibitörü olan EDTA'nın aktivite üzerine etkisini incelemek amacı ile nihai konsantrasyonu 1mM olacak şekilde EDTA-sodyum tuzu reaksiyon karışımına ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar EDTA içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak EDTA'nın aktivite üzerine etkisi incelendi. Aynı denemeler, enzimle, metal iyonu ve EDTA-sodyum tuzu çözeltilisinin 30 dakika ön inkübasyonundan sonra gerçekleştirildi. Sonuçlar karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

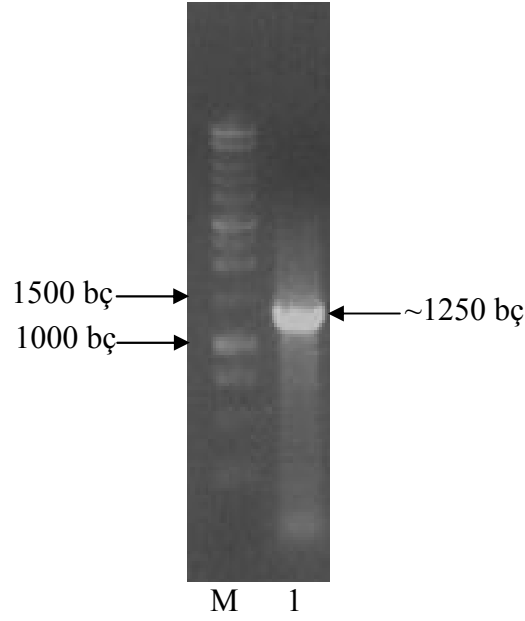
3.1. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı *EcoR* I restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen fragmentler pUC 18 plazmitine klonlandı ve *Escherichia coli* JM101 hücresine aktarıldı (Şekil 14). Yaklaşık 500 rekombinant plazmit izole edilerek uygun şartlarda saklandı. DNA sıra analizine gönderilen bir grup plazmitin DNA ve protein sıraları BLAST programında incelendi ve klon 17'nin (pUC-P17) 3'- ucundan başlayarak okunan sıranın *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 alkalın fosfatazına % 73 oranında benzerlik gösterdiği ve alkalın fosfataz geninin (AP) dur kodonunu da içeren 786 bazlık kısmının tespit edildiği belirlendi.

3.2. İners PCR ile Genin Sonunun Yakalanması

Ap F1 ve Ap R1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genin yaklaşık 600 bazlık başlangıç kısmının yakalanması hedeflendi. Bu amaçla yakalanan gen parçasında kesim bölgeleri olmayan *Hind* III, *Ava* II, *Pst* I, *Bfa* I, *Bam*H I, ve *Nde* I restriksiyon enzimleri tespit edildi ve *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı ayrı ayrı bu enzimlerle kesilerek DNA fragmentleri oluşturuldu. Bu fragmentlerin T4 DNA ligaz enzimi ile kendi üstlerine katlanması sağlandı. Elde edilen halkasal DNA'lar iners PCR'da kalıp DNA olarak kullanıldı (Şekil 15). Uygun şartlarda gerçekleştirilen iners PCR sonuçları % 1'lik jelde görüntüledi. *Ava* II ile kesilen genomik DNA ile yapılan PCR'da yaklaşık 1250 bazlık PCR ürünü elde edildi (Şekil 18).

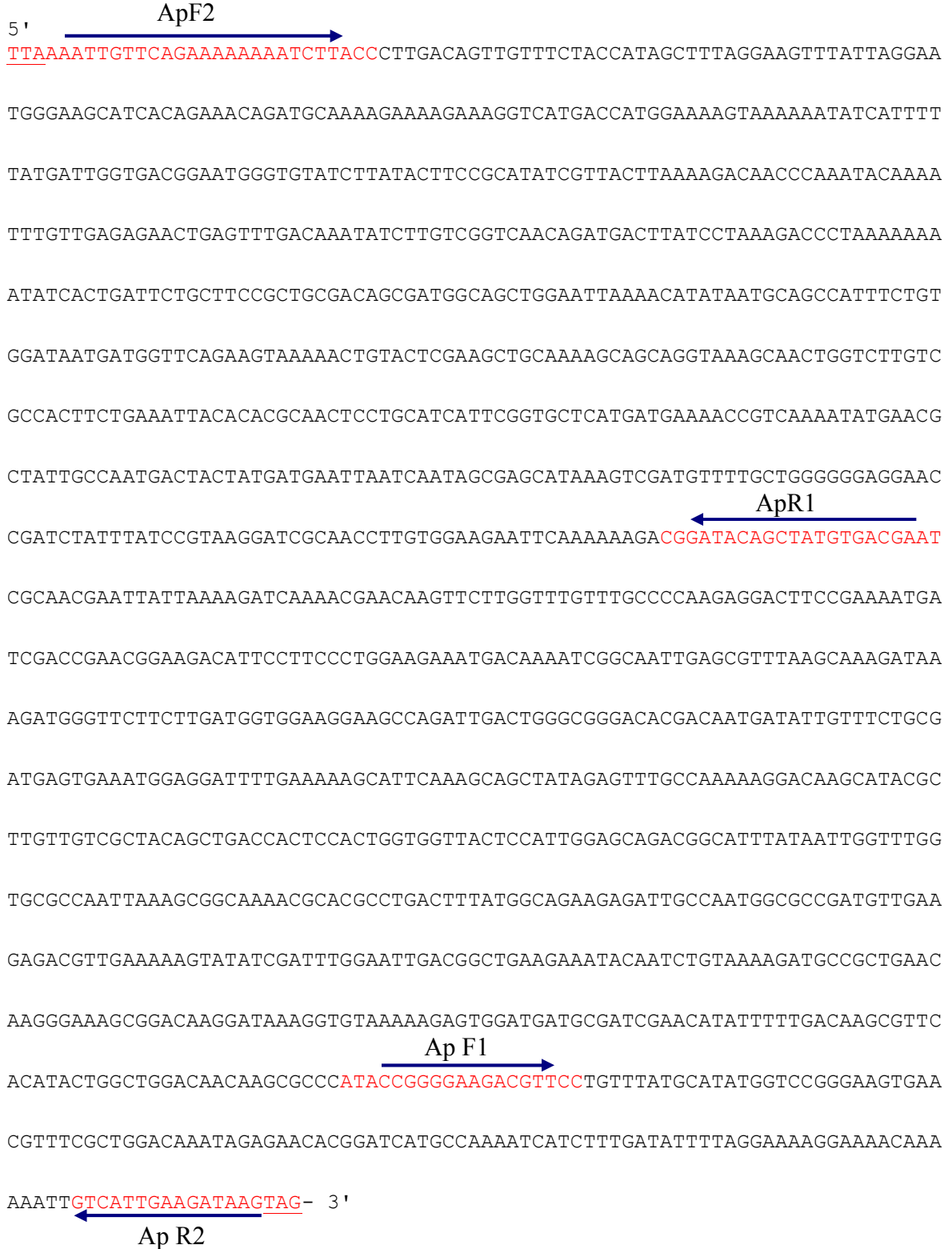
Elde edilen PCR ürünü pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve DNA sıra analizine gönderildi. Sıra analizi sonuçlarının incelenmesi sonucu AP geninin 600 bazlık başlangıç kısmının belirlendiği tespit edildi (Şekil 19). Bulunan bu yeni DNA sırası amino asit sırasına çevrilerek BLAST programı ile incelendi. İncelenen amino asit sırasının, özellikle *Bacillus* türü alkalın fosfatazlara yaklaşık % 70 oranında benzerliği tespit edildi (nükleotit sırası verilmemiştir).



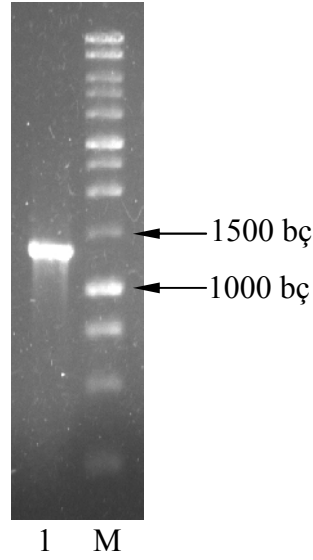
Şekil 18. İners PCR ürününün % 1'lik jeldeki görüntüsü. M; 1 Kb standart, 1; PCR ürünü (~1250 bç)

3.3. Alkalın Fosfataz Geninin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

AP geninin tam sırasının incelenmesi sonucu uygun primerler dizayn edildi (Ap F2 , Ap F3 ve Ap R2). *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sı kalıp DNA olmak üzere dizayn edilen pirimerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu 1410 bç'lik genin tamamı çoğaltıldı (Şekil 20). PCR ürünü *Bam*H I ve *Nhe* I enzimleri ile kesildi ve yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Rekombinant vektör ekspresyon için *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarıldı ve stok kültürü yapılarak -20 °C'de saklandı.



Şekil 19. *G. caldxylosilyticus* TK4 genomik DNA'sının AP'yi içeren parçası. Altı çizili kodonlar sırası ile "lösin" ve "dur" sinyallerini kodlamaktadır. Oklarla gösterilen bölgeler ise kullanılan primer sıralarını göstermektedir.



Şekil 20. PCR ile çoğaltılan AP geninin % 1'lik jeldeki görüntüsü. M; 1 Kb standart, 1; PCR ile çoğaltılan AP geni (~ 1410 bç)

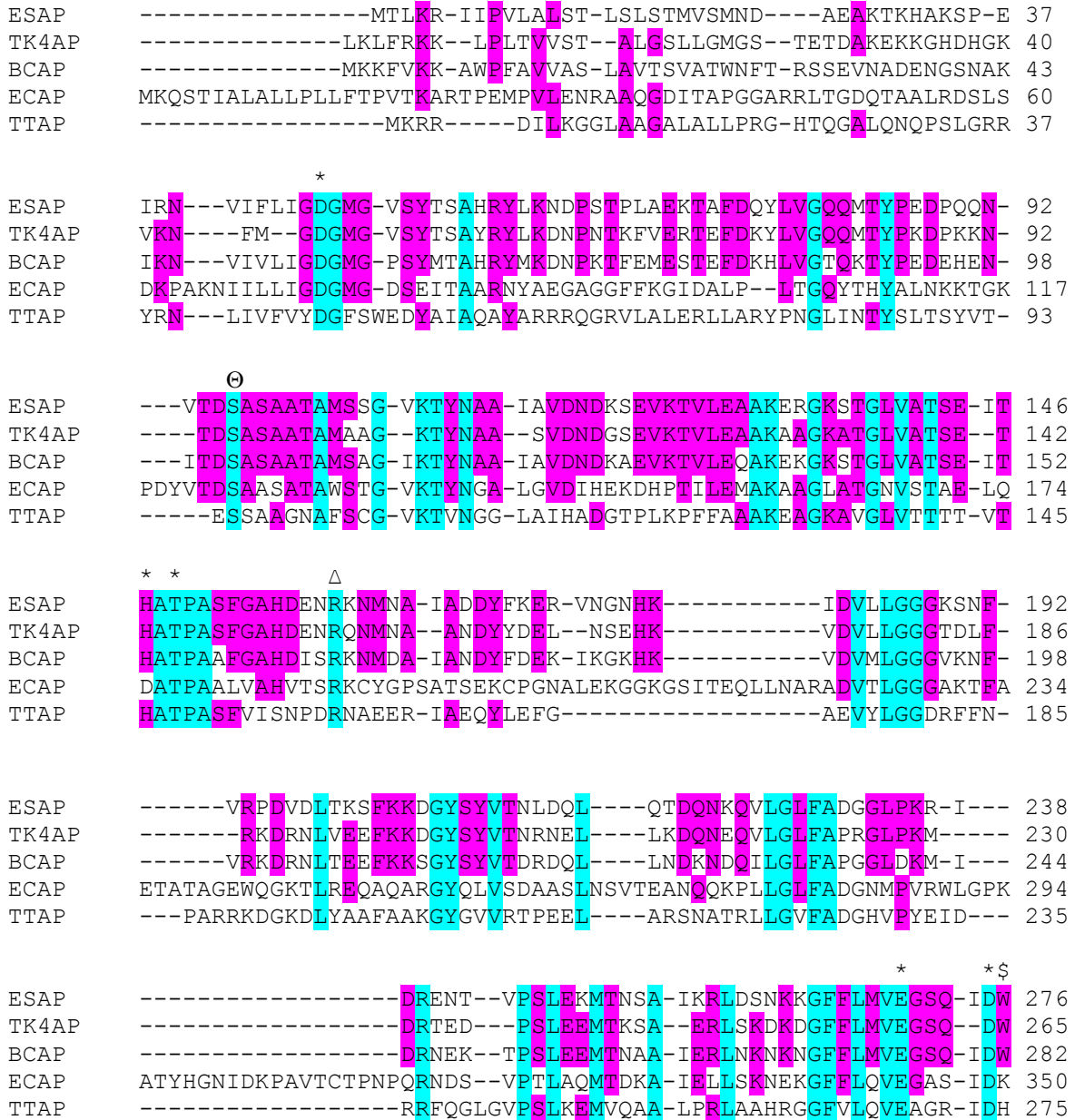
AP geninin DNA sırası amino asit sırasına çevrilerek (Şekil 21) BLAST programı ile karşılaştırma yapıldı. En çok benzerlik gösterdiği türler Tablo 15'de verilmiştir. Ayrıca, *G. caldxylosilyticus* TK4 AP sırası Clustal W programı kullanılarak *Escherichia coli* W3110, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *E. sibiricum* 255-15, *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 ve *Bacillus thuringiensis* str. Al Hakam AP'leri ile karşılaştırılmış ve korunmuş bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 22).

Tablo 15. *G. caldxylosilyticus* TK4 AP amino asit sırasının diğer bazı türlerle benzerliği

Bakteri Adı	Benzerlik	Bakteri Adı	Benzerlik
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	% 68	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	% 31
<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15	% 69	<i>Shewanella sp.</i> SIB1	% 56
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	% 67	<i>Homo sapiens (human)placental</i>	% 36
<i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam	% 67	<i>Escherichia coli</i>	% 36

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

Şekil 21. *G. caldxylosilyticus* TK4 suşunun AP geninin DNA ve protein sırası. Yıldızlar (***) ile gösterilen kodon “dur” sinyalini temsil etmektedir.



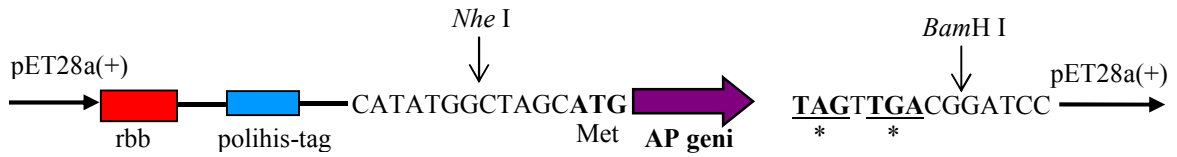
Şekil 22. *G. caldoxysilyticus* TK4 AP (TK4AP) amino asit sırasının Clustal W programı kullanılarak *E. sibiricum* 255-155 AP (ESAP), *B. cereus* ATTC 14579 AP (BCAP), *E. coli* W3110 AP (ECAP) ve *T. thermophilus* HB27 AP (TTAP)'lerinin amino asit sıraları ile karşılaştırma sonuçları. Mavi birimler tüm sıralardaki korunmuş birimleri pembe renkli birimlerde çoğunda korunan birimleri göstermektedir. Yıldız (*) ile gösterilen birimler *E. coli* AP'sinin 3 metal bağlanma bölgesini oluşturan aminoasit birimlerini göstermektedir. *E. coli* AP'sinin katalitik bölgesi (fosforilasyon bölgesi) ve fosfat bağlanma bölgesini oluşturan serin ve arginin birimleri sırasıyla Θ ve Δ ile gösterilmektedir. *E. coli* AP'sinde fosfat bağlanması için önemli olan K328 \$ ile gösterilmektedir.

Şekil 22'nin devamı

	*		**	
ESAP	AGHDND	-IVGAMSEMEDFERAFKAA	-IAFAKKDKHTLVVATADHSTGGYS	-IGADG-IYN 332
TK4AP	AGHDND	--VSAMSEMEDFEKAFKAA	--EFAKKDKHTLVVATADHSTGGYS	--GADG--YN 317
BCAP	AGHDND	-IVGAMSEMEDFEKAFKAA	-IEFAKKDKNTLVVATADHATGGLS	-LGANG-EYN 338
ECAP	QDHAAN	-PCGQIGETVDLDEAVQRA	-LEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQI	----- 398
TTAP	ANHLND	-AGATLWDVLAADDEVLELL	-TAFVDRNPDTLLIVVSDHATGVGGLYGAGRSYLE	333
ESAP	WFAEP	-IKAAKKTPDFMAEK	-IINGADVROTLTTYIDQKKLALTEDEIGSVIRAA	----- 385
TK4AP	WFGAP	--KAAKRTPDFMAEE	--ANGADVEETLKKY	----DLELTAE--QSVKDA----- 362
BCAP	FKVEP	-IKAAKRTPDFMANE	-IAKGANVEETLKKY	---IDLQLTPEEIQAVNDIA----- 388
ECAP	--VAP	----DTKAPG	-----	----- 407
TTAP	SSRGVDLLEPQR	ASFEHMLRVLGQAPEASQVKEAFRAMKGV	LEDAEAERVVRAIREKVY	393
			*	
ESAP	----	ESQKLLDIDNAIEAIFNE	-----RSHGTGWTGGHTGEDVPVYAFGPAKERFA	432
TK4AP	----	AEQKADKDKGVKRVDDA	--EH--FDKRSHTGWTSAHTGEDVPVYAYGPGSERFA	414
BCAP	----	PSKDVTKIDNAIEDIFNK	-----RSVTGWTGGHTGEDVNVYAFGPGKYLEFS	435
ECAP	----	LTQALNTKDGAVMVMSYG	-----NSEEDSQEHTGSQLRIAAYGPHAANVV	452
TTA	WPEGVRQGVQPANTLAWAMAQRN	---AQKPDRPNIGYSSGQHT	ASPVMLLLYGQGLRFVN	450
ESAP	GQ	-VDNTDHAK	-----IIFD	-----LLKSKK----- 452
TK4AP	GQ	--ENTDHAK	-----FD	-----LGKKGQK--V--EDK-- 436
BCAP	GV	-QENTNIAKR	-----VFD	IVGGDPNKGRR----- 461
ECAP	GL	-TDQTDLFYT	-----MKAALGLK	----- 471
TTAP	LGLVDN	THVFRMLGGEALGLRYQNPVMSEEEALEIL	KARPQGMHRHPEDVWA	500

3.4. Alkalın Fosfatazın Saflaştırılması

Ticari olarak mevcut olan pET vektörleri bir ya da iki farklı bölgede histidin kodlayan kodonlar (polihistidin-tag) içermektedir. Son zamanlarda sıklıkla kullanılan bu yöntemle ekspres edilen proteinlerin nikel kolonu ile kolaylıkla tek basamakta saflaştırılması sağlanmaktadır. AP proteininin saflaştırılmasında bu yöntem kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu AP geninin klonlanması için pET28a(+) vektörünün kullanılmasının uygun olacağı tespit edilmiş ve ekspresyon vektörü olarak kullanılmıştır. pET28a(+) vektörü ribozom bağlanma bölgesinden sonra ve *Nhe* I kesim bölgesinin hemen önünde 6 tane histidin kodlayan kodon (polihistidin-tag) içermektedir. PCR ile çoğaltılan AP geni 5'- ucundan *Nhe* I, 3'- ucundan *Bam*H I ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET28a(+) vektörüne klonlandığında (pET-AP1), rekombinant vektör, genin başlama kodonundan hemen önce 6 tane histidin kodlayan kodon içerir (Şekil 23). Yani ekspres edilen AP, N- ucunda 6 tane histidin amino asidi (histidin kuyruğu) içermektedir.



Şekil 23. AP geninin pET28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi. Kırmızı ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbb), mavi ile gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodonlar ise “dur” sinyallerini göstermektedir

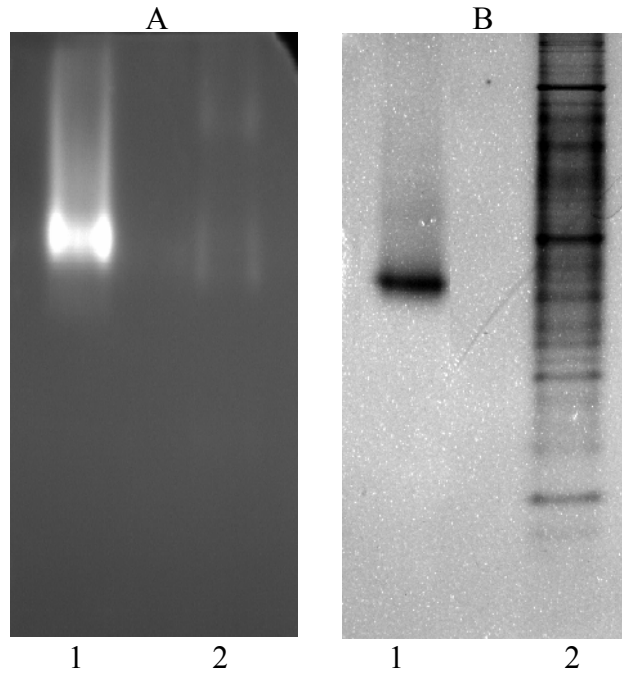
E. coli BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilen AP proteini, nikel taneciklerinin proteinin N-ucunda bulunan histidin birimlerindeki azotlar ile etkileşmesiyle diğer proteinlerden ayrılarak saflaştırıldı (Şekil 17).

3.5. Alkalın Fosfatazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Alkalın Fosfatazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu

Saflaştırılan proteinin AP aktivitesi öncelikle elektrofotetik olarak ortaya konuldu. AP aktivitesi, SDS'siz ve soğuk ortamda yapılan doğal elektroforez sonrasında jelin,

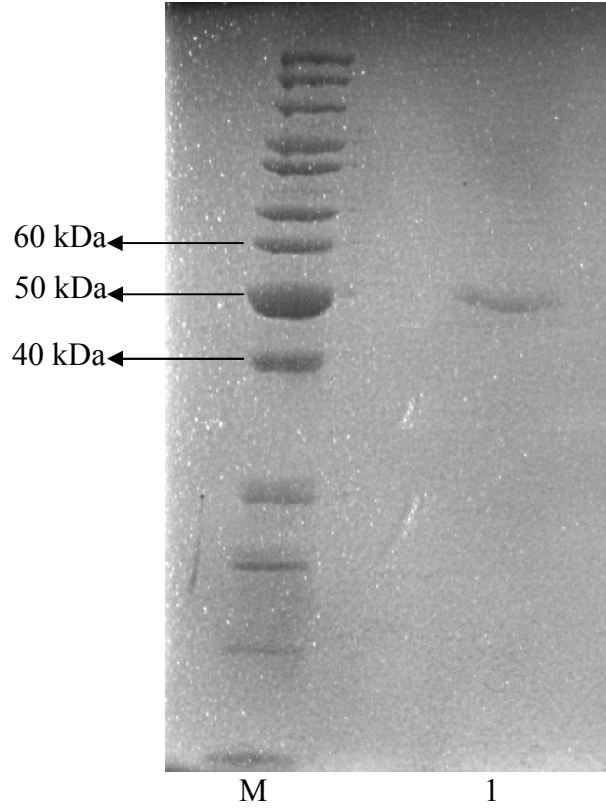
0,5 mM CoCl₂ ve 2,5 mM 4-metilumbelliferilfosfat (MUF_P) içeren 50 mM pH 9,5 Glisin-NaOH tamponu içerisinde 50 °C'de 20 dakika süreyle bir hava banyolu çalkalayıcıda inkübe edilmesinin ardından aktif bantların UV ışığı altında incelenmesiyle belirlenmiştir (Zappa vd., 2001). (Şekil 24).



Şekil 24. Doğal poliakrilamid jel elektroforez analizi

A) Aktivite boyaması **B)** Coomassie brilliant blue boyaması
 1; Saf protein [pET-AP; (*E. coli* BL21(DE3)pLysS +pET28a(+)-AP geni] 2; *E. coli* BL21(DE3)pLysS'nin hücre içi proteinleri

Şekil 24A-1'de protein tek bant olarak görülmektedir. Bu da proteinin saf olarak izole edildiğini göstermektedir. Saf proteinin, substrat boyaması sonucunda bir bant oluşturması AP aktivitesi gösterdiğinin kanıtıdır. AP'nin yaklaşık moleküler ağırlığı ve farklı alt birimler içerip içermediği sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Gerçekleştirilen SDS elektroforezinden sonra jel Coomassie brilliant blue ile boyanarak protein bantları görünür hale getirilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. SDS jel elektroforez analizi. M; protein standartları, 1; Saf protein [pET-AP; (*E. coli* BL21(DE3)pLysS + pET28a(+)) – AP geni]

Şekil 25'te görüldüğü gibi saf protein tek bant halindedir. Bu da enzimin, alt birim içermediğini ve içeriyorsa da farklı alt birimlerden oluşmadığını göstermektedir. Standart proteinler dikkate alınarak yapılan hesaplamada elektroforezde görülen bandın moleküler ağırlığı, yaklaşık 50 kDa civarında bulundu. Ayrıca proteinin moleküler ağırlığı teorik olarak da hesaplandı. Yalnızca AP'nin amino asit sırası dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucu moleküler ağırlık 51 kDa olarak bulundu. Fakat AP proteinin pET28a(+) vektöründe ekspres edildiği dikkate alındığında başlama sinyalinden önceki polihistidin ve diğer amino asitlerin de göz önüne alınması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan hesaplama sonucu histidin kuyruğu içeren AP proteininin moleküler ağırlığı 54 kDa olarak bulunmuştur. Teorik moleküler ağırlıkla deneysel moleküler ağırlık birbirine oldukça yakın değerlerdir.

3.5.2. Alkalın Fosfataz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

AP aktivitesi para-nitrofenol fosfattan (*p*-NPP) para-nitrofenolün (*p*-NP) salınımının 410 nm’de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle ölçüldü (De Prada vd., 1996, Li vd., 2007). 1 ünite enzim aktivitesi, 1 dakikada oluşan 1 µmol *p*-NP olarak tanımlandı. Aktivitenin mg saf proteine oranlanmasıyla da spesifik aktivite belirlendi.

AP aktivitesi, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşunun ham ekstraktında, ekspresyon hücresinde (*E. coli* BL21(DE3)pLysS), 6 saat süreyle indüklenen ham özütte ve saf enzimde, spektroskopik olarak ölçüldü (Tablo 16). Böylece, izlenen saflaştırma yöntemiyle rekombinant enzimin (ekspresyon hücresinden) yaklaşık olarak 62 kat saflaştırıldığı tespit edildi.

Tablo 16. AP aktivitesinin spektroskopik olarak tayini

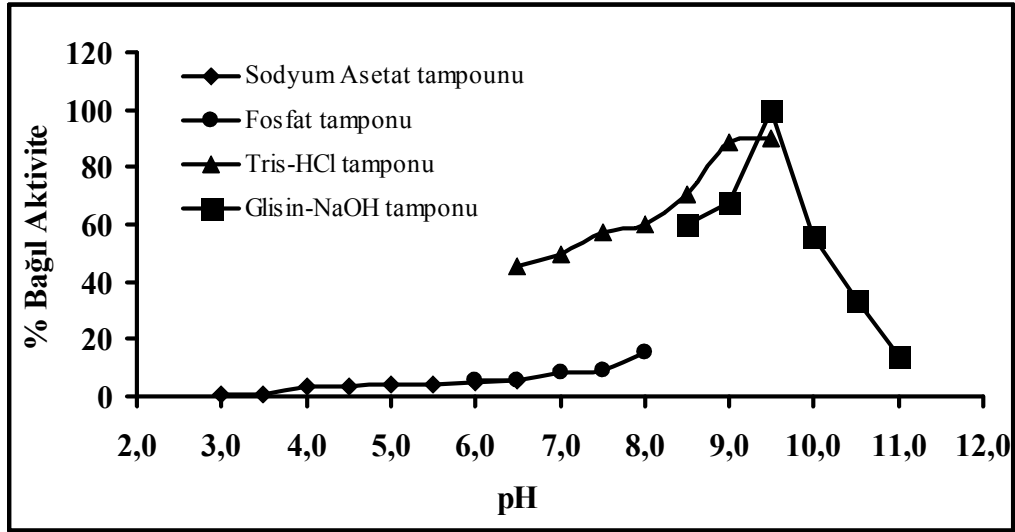
	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	0,001
<i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 suşu	0,002
Ham özüt (6 saat indüklenen)	0,003
Saf enzim	0,186

Ayrıca ısı şokuyla *E. coli* proteinlerini uzaklaştırmak amacıyla ham ekstrakt, 15 dakika süreyle 75 °C’de bekletildi ve takiben parçalanmış proteinleri uzaklaştırmak için 15 dakika 14.800 rpm’de santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant uygun koşullarda saflaştırıldığında ve ısı şoku yapılmadan elde edilen saf enzimle spesifik aktivite değerleri karşılaştırıldığında önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

G. caldxylosilyticus TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*’de ekspres edilen AP’nin detaylı bir şekilde karakterizasyonu için aktivite üzerine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, protein konsantrasyonu, metal iyonu ve inhibitör etkisi incelendi. Ayrıca enzimin pH ve ısıl kararlılığı belirlendi.

3.5.2.1. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

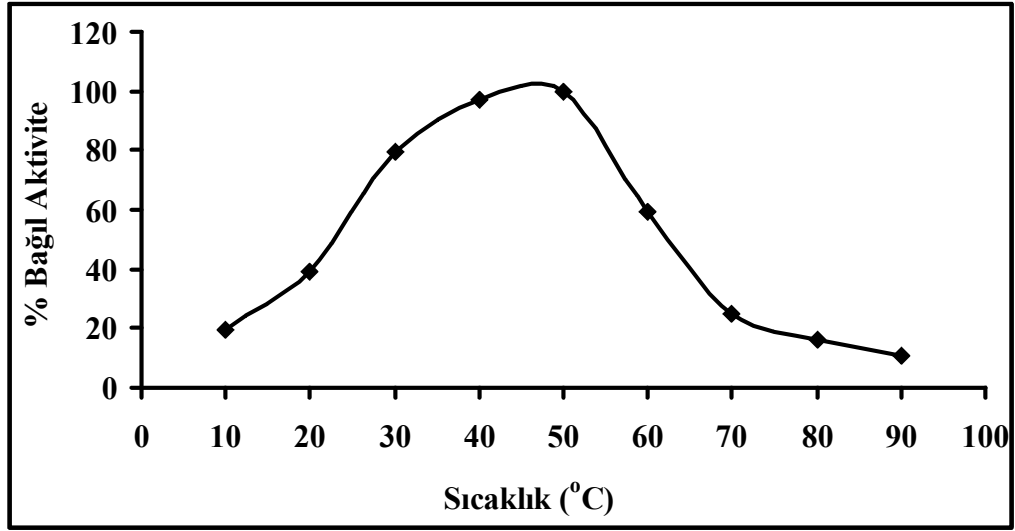
G. caldxylosilyticus TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin en yüksek etkinlik gösterdiği pH değerinin bulunması amacı ile farklı pH değerlerindeki tamponların kullanılması ile enzim aktiviteleri belirlenerek pH değerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH - % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 26). Bu eğriden, optimum pH'nın 9,5 civarında olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin asidik pH değerlerinde oldukça düşük olduğu görülmektedir. Elde edilen bu grafikte, tek bir pikin varlığı enzimin kararlı bir şekilde saflaştırıldığını da desteklemektedir.



Şekil 26. Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.5.2.2. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

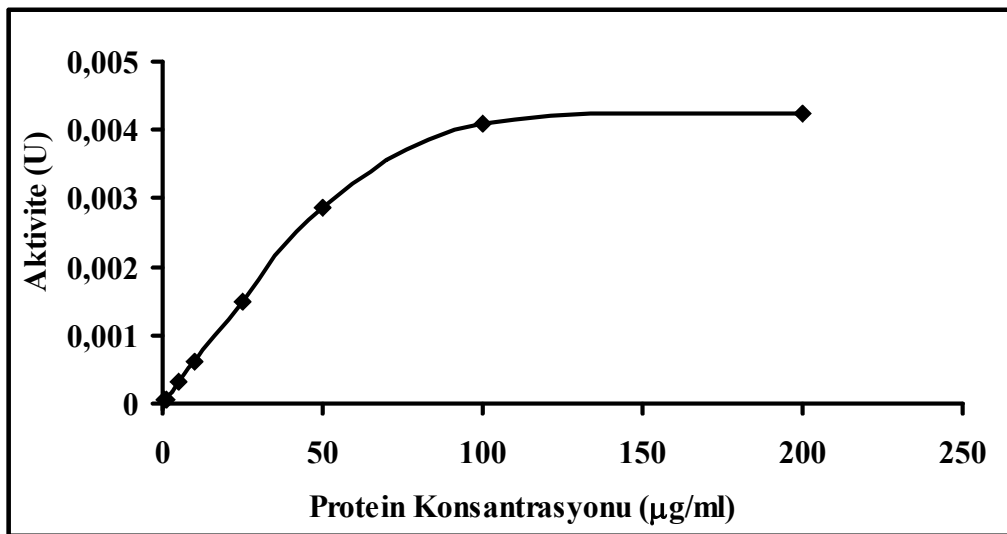
G. caldxylosilyticus TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin en yüksek etkinlik gösterdiği sıcaklık değerinin bulunması amacı ile 10-90 °C arasındaki sıcaklık değerlerindeki enzim aktiviteleri belirlenerek sıcaklık değerine karşılık gelen aktivitelerle bir sıcaklık - % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 27). Elde edilen eğri, çan eğrisi şeklindedir ve 50 °C'de aktivite maksimumdur. 60 °C'de aktivitenin yaklaşık % 40 oranında düştüğü görülmektedir. 80 ve 90 °C'de ise aktivite yaklaşık % 90 oranında kaybolmaktadır.



Şekil 27. Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.5.2.3. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

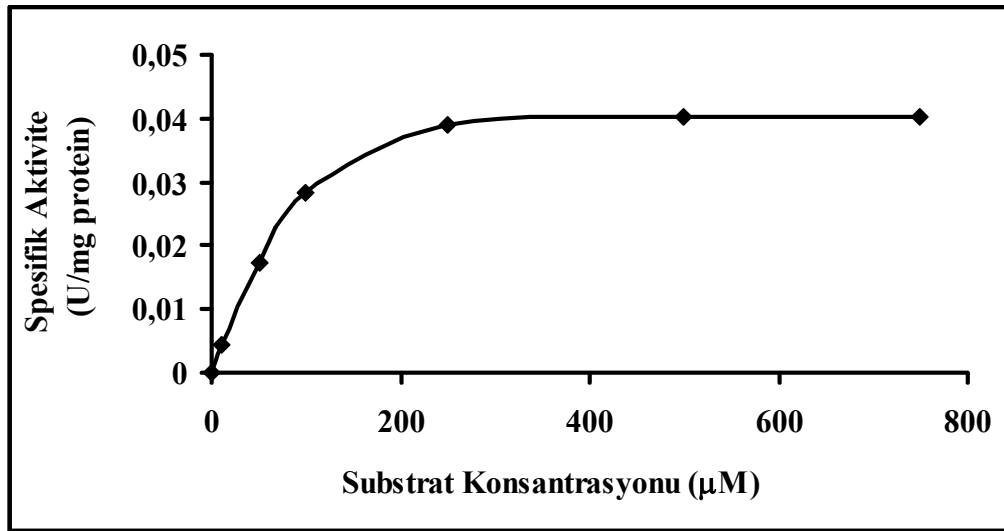
G. caldxylosilyticus TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin aktivitesi, sabit substrat konsantrasyonunda, proteinin 0,1-200 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki konsantrasyon değişimine bağlı olarak incelendi. Şekil 28'deki hiperbolik eğriden de görüleceği üzere, AP aktivitesi için çalışılan şartlarda optimum enzim konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.



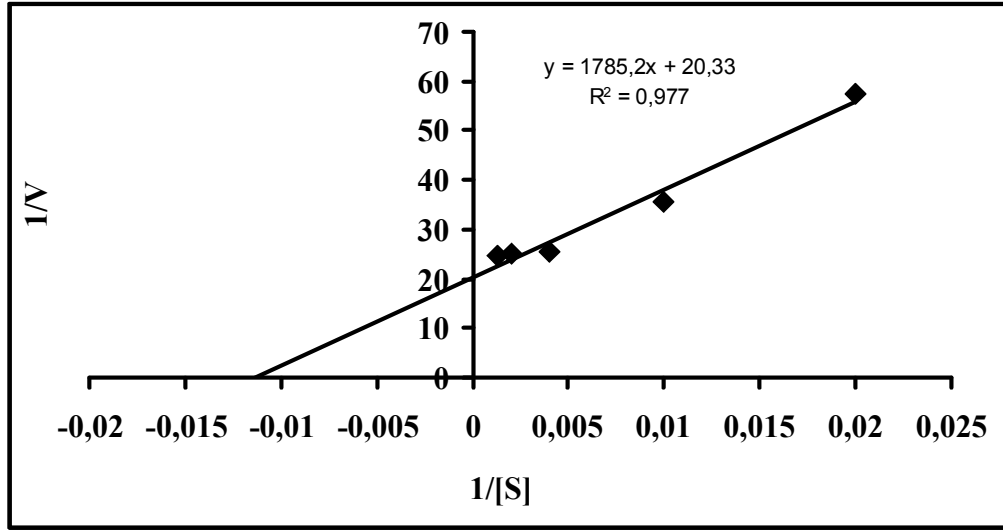
Şekil 28. Alkalın fosfataz aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi

3.5.2.4. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin enzim aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacı ile nihai konsantrasyonu 0,01-1,0 mM aralığında olacak şekilde değişik konsantrasyonlardaki *p*-NPP substratından salınan *p*-NP'nin 410 nm'de oluşturduğu absorbans ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için substrat doygunluk eğrisi (Şekil 29), kinetik veriler için ise Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 30) çizildi. Substrat doygunluk eğrisinden enzim aktivitesinin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu ve optimum *p*-NPP konsantrasyonunun 250 μ M olduğu tespit edildi. Lineweaver-Burk eğrisinden V_{maks} ve K_M değerleri sırası ile 0,049 U/mg protein ve 87 μ M olarak belirlendi.



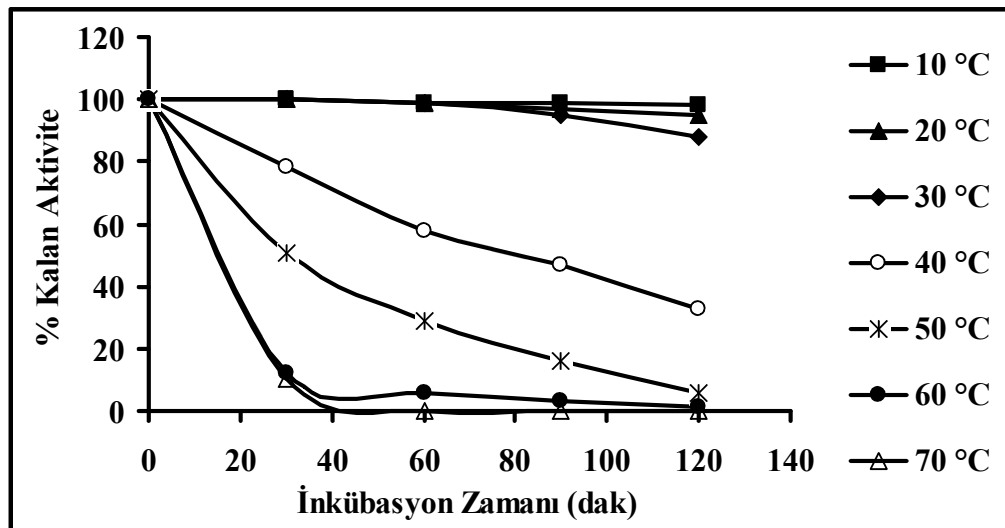
Şekil 29. *p*-NPP substratı varlığında AP'nin doygunluk eğrisi



Şekil 30. *p*-NPP substratı varlığında AP aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

3.5.2.5. Alkalın Fosfatazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

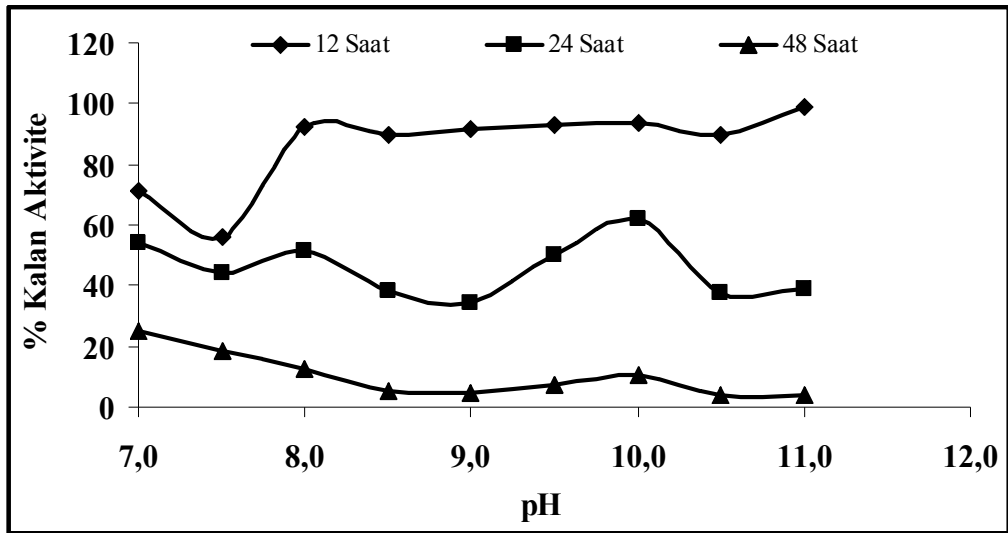
Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacı ile, çalışmalar 10 ile 70 °C arasında 10 °C'lik aralıklarla ve 30 dakikalık zaman aralıklarında 2 saatlik bir süre boyunca gerçekleştirildi. 10-30 °C'de tüm zaman dilimleri için aktivitenin önemli ölçüde değişmediği, 40 °C'de ilk 60, 50 °C'de ise ilk 30 dakikada yaklaşık olarak % 50 oranında azaldığı ve 60-70 °C'de ilk 30 dakika da % 10 seviyesine kadar düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 31).



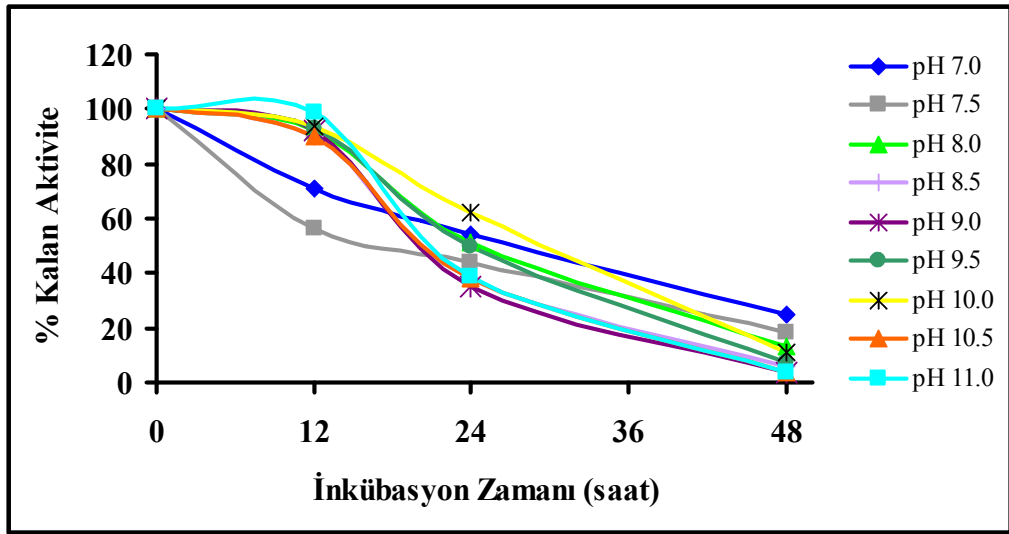
Şekil 31. AP'nin ısıl kararlılık eğrisi

3.5.2.6. Alkalın Fosfatazın pH Kararlılığı

G. caldoylosilyticus TK4 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin pH kararlılığını incelemek için, enzim pH 7,0-11,0 aralığındaki farklı tamponlar içerisinde, 4 °C'de 12, 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi. Şekil 32'de görüldüğü gibi, enzimin, özellikle pH 8,0 ve daha bazik pH değerlerinde 12 saatlik inkübasyonu sonrasında, aktivitesini % 90'nın üzerinde koruduğu görülmektedir. 24 saatlik inkübasyon sonunda ise, enzim orjinal aktivitesini % 50 oranında kaybetmektedir. 48 saat sonunda ise aktivitede % 90'lara varan bir azalma söz konusudur. Şekil 33'de ise her bir pH değerinde inkübasyon süresince aktivitedeki değişim gösterilmiştir.



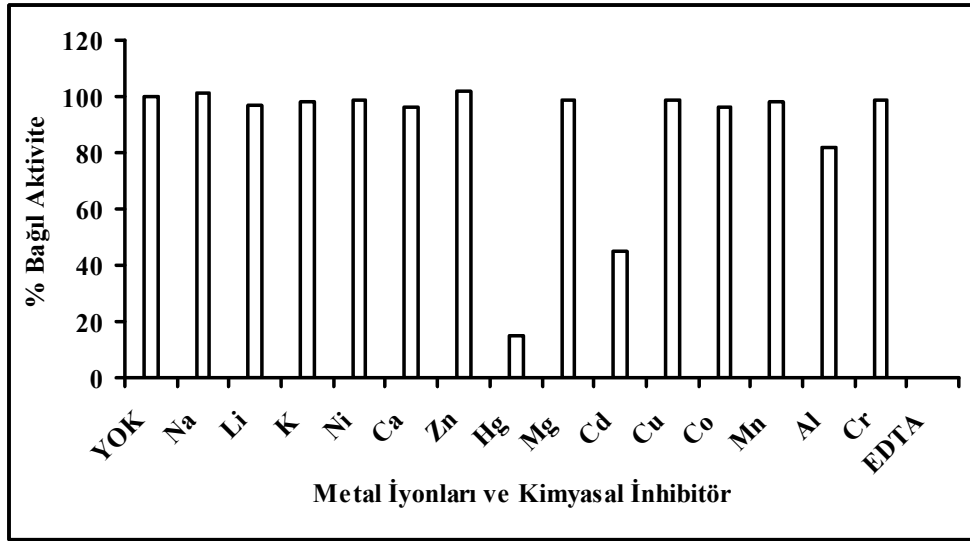
Şekil 32. AP'nin pH kararlılığı (pH-% Kalan Aktivite)



Şekil 33. AP'nin pH kararlılığı (İnkübasyon zamanı-% Kalan Aktivite)

3.5.2.7. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisi

AP aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisini ortaya koymak amacı ile monovalent K^+ , Na^+ , Li^+ , divalent Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve trivalent Cr^{3+} ile Al^{3+} iyonlarının klorür tuzları ile EDTA'nın sodyum tuzu kullanıldı. 1 mM'lık metal iyonları ve EDTA varlığında ve optimum şartlardaki AP aktivitesindeki değişimler kaydedildi. Kontrol olarak, metal iyonu veya EDTA ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışım için gözlenen aktivite değeri % 100 kabul edildi. Metal iyonlarının çoğu aktivitede dikkat çeken bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Hg^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} varlığında aktivite sırasıyla % 15, % 45 ve % 82 olarak hesaplanmıştır. Aynı metal iyonlarının enzimle 30 dakika ön inkübasyona maruz bırakılmasının ardından yapılan aktivite ölçümlerinde sonuçlar inkübasyon yapılmayanla karşılaştırıldığında bağıl olarak aynıdır. 1 mM'lık EDTA varlığında aktivitenin tamamen kaybolması ise aktif bölgesinde Mg^{2+} ve Zn^{2+} içerdiği bilinen AP'lerin gösterdiği özellikle uyumlu bir sonuçtur.



Şekil 34. AP aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

1960'dan beri çeşitli kaynaklardan elde edilen alkalın fosfataz (AP)'ler karakterize edilmektedir. Örneğin *Escherichia coli* (*E. coli*) AP'si yapı ve katalitik özellikleri açısından yoğun olarak çalışılmıştır (Kim ve Wyckoff, 1991; Karamyshev vd., 1998). Ayrıca birkaç memeli AP'si de karakterize edilmiştir (Besman ve Coleman, 1985; Bortolato vd., 1999).

Direk uygulama açısından *E. coli*'den ve sığır bağırsağından elde edilen AP'ler moleküler biyoloji ve immünoedeksiyon alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Zueva vd., 1993). Bu enzimlerin Western, Southern veya Northern analizi gibi dedeksiyon kitlerinin bir parçası olarak kullanılması, onların nadir olarak gözlenen özelliklerine, özellikle spesifikliğı ve fotokimyasal veya kromojenik sistemlerde çalışma kabiliyetlerine dayanmaktadır. AP'nin tıbbi olarak immünojenik denemelerde ve gıda endüstrisinde kullanımı gittikçe artmaktadır (Niehaus vd., 1999; Vieille ve Zeikus, 2001). Bu tip uygulamalar yüksek termal kararlılık ve depo kararlılığı gerektirmektedir. Dolaylı uygulama açısından bakıldığında termal kararlı AP'ler, yüksek sıcaklıklarda metal iyon bağımlı katalizin termal kararlılık mekanizmasını çalışmak için iyi modellerdir.

Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen AP'ler, hazırlama veya etiketleme prosedürleri sırasında termal denatürasyona dirençli olmaları, kolay taşınma ve depolanmaları ve enzimatik aktivitenin yarı ömrü gibi doğal avantajları sebebiyle radyoaktif olmayan etiketleme gibi moleküler biyoloji, immünojenoloji ve tedavi amaçlı çalışmalarda gittikçe ilgi çekici olmaya başlamıştır (Li vd., 2007).

Gerçekleştirilen çalışmada, Çanakkale Kestanbol kaplıcasından izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizi ile yeni bir tür olduğu ortaya konulan *Geobacillus caldxylosilyticus* (*G. caldxylosilyticus*) TK4 suşundan ısıya dirençli AP geni indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET28a(+) vektörüne klonlanıp *E. coli*'de ekspres edilmiştir. Ekspres edilen enzim saflaştırılıp AP aktivitesi elektroforetik ve spektroskopik olarak ortaya konulmuştur. Spektrofotometrik aktivite testi ile enzimin bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

EcoR I enzimi ile genomik DNA kütüphanesi oluşturularak yakalanan AP geninin dur kodonunu da içeren 786 bazlık kısmı klon 17 içinde bulunmaktadır. Bu da genin *EcoR* I kesim bölgesi içerdiğini göstermektedir. İnvers PCR yardımıyla yakalanan parça ile

birlikte genin 1410 baz ve 469 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 21). *Pyrococcus abyssi* (Zappa vd., 2001)'den elde edilen termal kararlı AP 1485 baz ve 495 amino asitten oluşmaktadır. *Bacillus subtilis* AP III ve IV sırasıyla 429 ve 420 aminoasitten oluşmaktadır (Hulett vd., 1991). Termofilik bir bakteri *Thermus thermophilus* XM'de termal kararlı bir AP'yi kodlayan gen, 1506 baz çifti uzunluğunda ve 501 aminoasit birimi içeren bir protein kodlamaktadır (Li vd., 2007). *Shewanella* sp. SIB1'den elde edilen ısıl kararsız olan AP ise 455 aminoasit biriminden oluşmaktadır (Suzuki vd., 2005).

Amino asit sırasının BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki AP'ler ile karşılaştırılması sonucu özellikle *Bacillus* türü AP'lere yaklaşık % 70 oranında benzediği tespit edilmiştir. Bunun yanında termofilik olduğu bilinen *Thermus thermophilus* HB27, mezofilik bakteri *E. coli* ve insan plasentasından elde edilen AP'lerin sıralarıyla karşılaştırıldığında benzerlik oranı yaklaşık olarak %30 civarındadır (Tablo 15). *P. abyssi* (Zappa vd., 2001)'den elde edilen termal kararlı AP ökaryotik karşıtlarına %30, %80 benzerlik oranıyla *Pyrococcus furiosus* AP'si hariç prokaryotlardan elde edilen karşıtlarına yaklaşık %35 oranında benzerlik göstermektedir.

Ayrıca, *G. caldxylosilyticus* TK4 AP sırası Clustal W programı kullanılarak *E. coli* W3110, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 ve *T. thermophilus* HB27 ile karşılaştırılmış ve korunmuş bölgeleri ile *E. coli* AP'sinin üç metal bağlanma bölgesini oluşturan aminoasit birimleri ile katalitik bölgesi (fosforilasyon bölgesi) ve fosfat bağlanma bölgesini oluşturan serin ve arginin birimleri (Suzuki vd., 2005) tespit edilmiştir (Şekil 22). Şekil 22'de Θ ve Δ ile gösterilen S ve R birimleri karşılaştırılan tüm AP'lerde korunmuştur. *E. coli* AP'sinde Zn₁, H 331 (6. yıldız (*)) ve H 412 (9. yıldız (*))'nin iki imidazol bazları ve D 327 (5. yıldız (*))'nin bir karboksili ile koordine durumdadır. Zn₂, D 51 (1. yıldız (*)) ve D 369 (7. yıldız (*))'un iki karboksili aracılığıyla H 370 (8. yıldız (*))'in bir imidazol bazı boyunca bağlıdır. Mg, D51 (1. yıldız (*)), T 155 (3. yıldız (*)) ve E 322 (4. yıldız (*)) birimleri ile bağlıdır (Kim ve Wyckoff, 1990). Fakat Mg iyonunun ikincil ligandları yani D153 (2. yıldız (*)) ve K 328 (\$ işareti ile gösterilmiştir) *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinde sırayla histidin ve triptofan ile yer değiştirmiştir. D 153, Mg iyonu bağlanma bölgesinin bir kısmıdır. K 328 ise *E. coli* AP'sinde fosfat bağlanması için önemlidir. Benzer substitusyonlar *E. sibiricum* 255-15 (Gen Bank Accession No: YP_001815175), *B. cereus* ATCC 14579 (Gen Bank Accession No: AAP11256) *Antarctic psychrophilic bacterium* TAB5 (GenBank Accession No:

CAB82508), *Thermotoga neapolitana* (GenBank Accession No: AAX98659) AP'lerinde de gözlenmektedir. Önceki çalışmalar D 153'deki substitusyonun Mg^{2+} ile yer değiştirerek bu bölgeye Zn^{2+} iyonunun bağlanmasıyla enzimatik aktivitede bir artışla sonuçlandığını göstermektedir (Murphy vd., 1993).

G. caldxylosilyticus TK4 AP'sinin amino asit sırası *E. coli* AP'si ile karşılaştırıldığında *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin yüklü birimlerinin (Lys+Arg+Glu+Asp) içeriği (% 29,42) *E. coli* AP' sinden (% 20,16) önemli ölçüde yüksektir. Hesaba dayalı analiz, yüklü birimlerin içeriğindeki azalmanın protein kararlılığına yol açtığını önermektedir (Nakashima vd., 2003). Yüklü birimler genellikle protein molekülünün yüzeyinde yerleşmişlerdir ve elektrostatik etkileşimlerle proteinleri kararlılaştırırlar. Bu yüzden elektrostatik etkileşimlerdeki artış *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermesinin bir sebebi olabilir. Ayrıca *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'si sistein birimi içermezken *E. coli* AP' si dört tane sistein birimi içerir. Bu sistein birimleri iki tane disülfid bağı oluşturduğundan (Kim ve Wyckoff, 1991) ve disülfid bağları genellikle proteinleri kararlılaştırdığı (Thornton, 1981) için disülfid bağlarının sayısındaki azalma *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin yüksek sıcaklıklarda beklenildiği kadar kararlı olmayışının sebebi olabilir. Prolin birimlerinin içeriği azaldıkça protein kararlılığının azaldığı rapor edilmiştir (Watanabe vd., 1991). Prolin birimlerinin dönme bölgelerine girmesinin proteinlerin katlanmamış halinin entropisini azaltarak protein kararlılığını artırdığı rapor edilmiştir (Matthews vd., 1987). *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin prolin birimi içeriği (% 2,55) *E. coli* AP'sinin prolin birimi içeriğinden (% 4,8) oldukça azdır. Bu bilgilerde *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin yüksek sıcaklıklarda beklenildiği kadar kararlı olmayışı ile uyumludur. Termofilik olduğu bilinen *T. thermophilus* HB27 (Henne vd., 2004) AP'sinin prolin içeriği % 4,59' dur ve *E. coli* için hesaplanan değerden düşüktür. Ayrıca bu AP sadece bir adet sistein birimi içermektedir ve yüklü birim içeriği %22,35'dir. Isılkararsız olduğu bilinen *Shewanella* sp. SIB1 AP'si (GenBank Accession No: BAD90663) (Suzuki vd., 2005) yukarıdaki bilgilerle uyumlu olarak sistein birimi içermezken prolin içeriği ve yüklü birim içeriği sırasıyla % 4,6 ve 16,9'dur. Prolin içeriği *T. thermophilus* HB27 AP'sininkiyile hemen hemen aynıdır. Bu sonuçlar her bir proteinin soğuk veya sığa adaptasyon için kendine özgü bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir.

Rekombinant AP, *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda N- ucunda 6 tane histidin amino asidi (histidin kuyruğu) içerecek şekilde ekspres edilmiştir ve nikel kolonu ile kolaylıkla tek

basamakta saflaştırılması sağlanmıştır. Termofilik bir bakteri *T. thermophilus* XM'den termal kararlı bir AP de aynı şekilde saflaştırılmıştır (Li vd., 2007). *Bacillus* sp. P9'dan ısıl kararsız bir AP (Dhaked vd., 2005) amonyum sülfat çöktürmesinin ardından DEAE-sephadex A25 kullanılarak iyon değiştirici kromatografiyi takiben Bio-gel A kolonu kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi prosedürü ile saflaştırılırken, termal kararlı bir AP aerobik hipertermofilik *Aeropyrum pernix* K1'den afinite kromatografi kolonu (matriks olarak L-histidildiazobenzilfosfonik asid-agaroz içeren) kullanılarak saflaştırılmıştır (Helianti vd., 2007). Bunların dışında Psychrophilic *Arthrobacter* izolatından hücre dışı AP (De Prada ve Brenchley, 1997), deniz bakterisi *Cobetia*'dan oldukça aktif bir AP (Yu Plisova vd., 2005), *Halobacterium cutirubrum*'dan bir AP (Fitt ve Peterkin, 1976), *Pinctada fucata*'dan bir AP (Xiao vd., 2002) farklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminden sonra elektroforetik çalışmalarla da klonlanan genin AP'yi ekspres ettiği tespit edilmiştir. AP'lere özgü olan doğal elektroforez (Zappa vd., 2001) sonucunda UV ışık altında AP'nin varlığını gösteren tek bant gözlenmesi proteinin saf olarak izole edildiğini göstermektedir (Şekil 24A-1). *P. abyssi*'den saflaştırılan rekombinant AP doğal şartlar altında poliakrilamid jelde iki aktif form halinde görülmüştür. Moleküler ağırlıkları 54 ve 106 kDa olarak tahmin edilmiştir. 54 kDa, klonlanan gen ürününün hesaplanan moleküler ağırlığı ile uyumlu olması rekombinant *P. abyssi* AP'sinin ikiside aktif olan monomerik ve homodimerik iki form halinde mevcut olduğunu ortaya çıkarır (Zappa vd., 2001). Aminoasit sırasında bir sistenin bulunması dimerik formun zincirler arasında disülfid bağı ile sağlandığı hipotezi elektroforez öncesinde *P. abyssi* AP'sini SDS ile muamele edilerek monomerik formda tek bant gözlenmesiyle doğrulanmıştır. *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin amino asit sırasında sisten biriminin bulunmaması doğal elektroforezde tek bant gözlenmesini desteklemektedir. *Bacillus* sp. P9'dan ısıl kararsız bir AP doğal elektroforezde bakteri tarafından tek tip AP üretildiğini göstererek tek bant vermiştir (Dhaked vd., 2005). Psychrophilic *Arthrobacter* izolatından saflaştırılan iki tane hücre dışı AP doğal elektroforezde farklı göç hızıyla sadece tek bir aktivite bandı vermişlerdir (De Prada ve Brenchley, 1997).

Enzimin tek bir tür alt birimden oluştuğu SDS jel elektroforezi ile ortaya konulmuştur (Şekil 25). SDS jel elektroforezi sonuçlarına göre proteinin tek bant halinde olması, enzimin alt birim içermediğini veya dördüncül yapısının homolog iki ya da daha

fazla birimin organizasyonu ile oluştuğunu gösterir. Ekspres edilen rekombinant protein histidin kuyruğu içerdiğinden alt birim molekül ağırlığı 54 kDa olarak, histidin kuyruğu içermeyen orijinal protein alt birim ağırlığı ise 51 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu değerler SDS elektroforez sonuçları ile de desteklenmektedir. Deneysel olarak rekombinant enzimin alt birim molekül ağırlığı yaklaşık olarak 50 kDa civarında bulunmuştur. İleriki çalışmalarda, HPLC veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak, *G. caldxylosilyticus* TK4 AP'sinin dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı belirlenebilir. AP'ler klasik olarak *E. coli* ve memeli AP'leri durumunda homodimerik olarak tanımlanmaktadır. Fakat bir çok monomerik (Eguchi, 1995; Hauksson vd., 2000; Sharipova vd., 1998) ve oligomerik (Goldman vd., 1990) formlarda tanımlanmıştır. *Arthrobacter* izolatından saflaştırılan iki tane hücre dışı AP'nin SDS-PAGE analizi 71 ve 61 kDa moleküler ağırlığında tek bir polipeptid açığa çıkarmıştır. Jel filtrasyon kolonu kullanılarak moleküler ağırlıkları sırasıyla 80 ve 78 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar bu iki hücre dışı AP'lerinin monomerik proteinler olduğunu göstermektedir (De Prada ve Brenchley, 1997). Termofilik bir bakteri *T. thermophilus* XM'den saflaştırılan termal kararlı bir AP 55 kDa moleküler ağırlığındadır (Li vd., 2007). SDS-PAGE'de 52 kDa moleküler ağırlıkla tek bir peptidten oluşan *Thermus yunnanensis* sp. nov. AP'si jel filtrasyonu ile bir homodimer olduğunu gösterecek şekilde 104 kDa'luk molekül ağırlığı sonucunu vermiştir (Gong vd., 2005). *Bacteroides gingivalis* 381'den saflaştırılan AP SDS-PAGE'de 61 kDa'luk moleküler ağırlığında tek bir protein bandı vermiştir. Enzimin moleküler ağırlığı HPLC ile 130 kDa olarak tahmin edilmiştir. Bu bulgular *B. gingivalis* AP'sinin bir homodimer olduğunu göstermektedir (Yamashita vd., 1990).

AP geninin tamamının pET28a(+)’ya klonlanması ile elde edilen rekombinant vektör (pET-AP1) *E. coli*'ye aktarıldı, bu hücrede histidin kuyruğu içeren bir fizyon proteini olarak ekspres edildi ve nikel kolonu ile tek adımda saflaştırıldı. AP'lere özgü doğal elektroforez sonrasında UV ışığı altında gözlenen parlak bant AP aktivitesinin varlığını göstermektedir (Şekil 24 A) ve ekspres edilen proteinin aktif formda olduğunun bir kanıtıdır. Spektroskopik olarak yapılan testlerde de saflaştırılan proteinin AP aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da polihistidin kuyruğunun enzimin katalitik etkinliğini ortadan kaldıracak bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Rekombinant enzimle gerçekleştirilen aktivite testleri ile enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Rekombinant proteinin AP aktivitesinin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde grafiğin tek bir pik verdiği ve optimum pH'nın 9,5

(NaOH-Glisin) olduğu gözlenmiştir (Şekil 26). AP'ler, tüm canlı süperalemlerdeki bilinen üyeleriyle alkali pH değerlerinde optimum defosforilasyon aktivitesi gösteren geniş bir süper aile oluşturur (Berlutti vd., 2001).

AP'lerin *in vitro* ortamda optimum aktiviteleri için yüksek pH değerleri gereklidir. Öte yandan canlı hücrelerde pH değerleri sitoplazmada 6,9, çekirdekte 7,6 ile nötralliğe yakındır. Optimum aktivite için gerekli pH ile canlı hücrelerin pH değerleri arasındaki fark AP'nin *in vivo* ortamda optimum olarak aktivite göstermediğini göstermektedir. Fakat *in vivo* ortamdaki optimum aktivite için gerekli olan pH ile *in vitro* ortamdaki aynı değildir. AP aktivitesi için pH optimumunun, substrat konsantrasyonu, substratın tipi ve kullanılan tampona bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Fakat 8,0'den aşağıda olan bir pH optimumu AP'ler için rapor edilmemiştir (Ross vd., 1951). pH 8,5 (Tris-HCl) da optimum aktivite ile pH 7,0-9,5 arasında fosfataz aktivitesi gösteren *Chryseobacterium meningosepticum* AP'sinde denendiği gibi örtüşen pH değerlerinde farklı tampon sistemlerinin kullanılmasıyla önemli farklılıklar gözlenmemiştir (Berlutti vd., 2001). Fosfatazlar pH aralıkları bakımından oldukça farklılık gösterirler. *Arthrobacter* izolatından saflaştırılan iki tane hücre dışı AP'den biri pH 9,5 (NaOH-Glisin) civarında maksimum aktiviteye sahip olup pH 7,0-11,0 arasındaki geniş bir aralıkta etkinlik gösterir. Diğeri ise tam tersi bir şekilde dar bir pH aralığında etkindir ve optimum aktivite pH 9,0 (NaOH-Glisin)'dadır. Bununla birlikte pH 10,0'da ise çok az aktivite göstermektedir. Termofilik bakterilerden elde edilen AP'ler yüksek bir pH optimumu gösterirler. Örneğin *T. neapolitana* enzimi (Dong ve Zeikus, 1997) için optimum pH 9,9; *T. thermophilus* AP'leri (Pantazaki vd., 1998) için 10,0 ve 11,5'tur. Memeli AP'leri *E.coli* enzimine göre daha yüksek pH optimumuna sahiptir. D 153 ve K328 birimlerinin histidinle yerdeğiştirmesi pH'daki bu artıştan sorumlu olabilir (Holtz ve Kantrowitz, 1999; Murphy vd., 1995). *P. abyssi*'den saflaştırılan rekombinant AP için optimum pH, 0,2 M CAPS tamponunda, 11,0 olarak bulunmuştur (Zappa vd., 2001).

Rekombinant enzimin sıcaklık-aktivite profilinden optimum sıcaklığın 50 °C olduğu bulundu (Şekil 27). 60 °C'de aktivite yaklaşık % 40, 80 ve 90 °C'de ise yaklaşık % 90 oranında azalmaktadır. Hipertermofilik *A. pernix* K1'den elde edilen AP'nin optimum sıcaklığı 95 °C (Helianti vd., 2007), termofilik bakteri *T. thermophilus* XM'den elde edilen termal kararlı rekombinant AP'nin optimum sıcaklığı 75 °C (Li vd., 2007) ve optimum büyüme sıcaklığı 100 °C civarında olan *P. abyssi*'den saflaştırılan oldukça termal kararlı rekombinant AP'nin optimum sıcaklığı ise 70 °C'dir (Zappa vd., 2001).

Buna karşın bir çeşit inci istiridyesi olan *P. fucata*'dan elde edilen AP'nin optimum sıcaklığı 45 °C'dir (Xiao vd., 2002). Isıl kararsız olduğu bilinen AP'nin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C (Suzuki vd., 2005) ve *Bacillus* sp. P9'dan elde edilen bir başka ısı kararsız AP'nin optimum sıcaklığı ise 40 °C civarındadır (Dhaked vd., 2005). Enzim 5 °C'de aktivitesinin % 27'sini koruyarak soğukta aktif olan doğal yapısını göstermektedir. Optimum büyüme sıcaklığı 55 °C (Dülger, 2003) civarında olan *G. caldoxylosilyticus* TK4 AP'sinin tespit edilen optimum sıcaklığının 50 °C olması ve 10 °C'de bile aktivitenin sadece % 20 sini koruması rekombinant enzimin aşırı termofilik AP'lerle ısı kararsız AP'ler arasında bir ara özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

G. caldoxylosilyticus TK4 AP'sinin aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, 100 µg/mL'lik protein içeriğine kadar, aktivitenin arttığı, daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, aktivitenin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Şekil 28). Tespit edilen bu enzim konsantrasyonu literatür bilgileri ile uyum içinde olup, genellikle reaksiyon karışımları, 50-100 µg/mL arasında AP konsantrasyonu içermektedir (Suzuki vd., 2005).

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak, değişen substrat konsantrasyonlarında çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, *G. caldoxylosilyticus* TK4 AP'sinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu açıkça görülmüştür (Şekil 29). Çizilen bu grafikten yararlanılarak, enzimin optimum substrat konsantrasyonu 250 µM olarak belirlenmiştir. 250 µM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda, hızın değişmediği saptanmıştır. Protein miktarı sabit tutularak yapılan çalışmada elde edilen Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrilerinden V_{maks} ve K_M değerleri sırası ile 0,049 U/mg protein ve 87 µM olarak belirlendi. K_M değeri, substratın enzime olan ilgisinin bir göstergesidir. Bu değer ne kadar küçük olursa, enzimin substrata karşı ilgisi o kadar fazladır. Yapılan diğer bazı çalışmalar incelendiğinde *p*-NPP substratı varlığında K_M değerleri, *P. fucata* (Xiao vd., 2002), *Arthrobacter* izolatu (De Prada ve Brenchley, 1997), *H. cutirubrum* (Fitt ve Peterkin, 1976), *B. gingivalis* 381 (Yamashita vd., 1990), *C. meningosepticum* (Berlutti vd., 2001), *T. thermophilus* XM (Li vd., 2007), *Thermus caldophilus* (Pantazaki vd., 1998), *Meiothermus ruber* (Yurchenko vd., 2003), *E. coli* (Janeway vd., 1993; Krupianko vd., 1981) AP'leri için sırasıyla 2,86 mM, 89 µM, 1,8 mM, 0,037 mM, 115 µM, 0,034 mM, 0,036 mM, 0,055 mM, 0,021-0,040 mM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *C. meningosepticum* (Berlutti vd., 2001), *P. fucata* (Xiao vd., 2002) ve *Arthrobacter* izolatu (De Prada ve Brenchley, 1997) için

enzimin substratla doygunluğa ulaştığı noktadaki hız değerleri sırası ile 71 µmol/dakika, 9,09 µmol/L.dakika, 6 U/mg dir.

Enzimin ısı kararlılığının belirlenmesi amacı ile, çalışmalar 10 ile 70 °C arasında 10 °C'lik aralıklarla ve 30 dakikalık zaman aralıklarında 2 saatlik bir süre boyunca gerçekleştirildi. 10-30 °C'de aktivitenin önemli ölçüde değişmediği, 40 °C'de ilk 60, 50 °C'de ise ilk 30 dakikada yaklaşık olarak % 50 oranında azaldığı ve 60-70 °C'de ilk 30 dakika da % 10 seviyesine kadar düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 31). *P. abyssi* AP'sinin 100 ve 105 °C'deki yarı ömürleri sırasıyla 18 ve 5 saat iken *T. neapolitana* AP'sinin 90 °C'deki yarı ömrü yaklaşık 4 saattir (Zappa vd., 2001). *T. thermophilus* XM'den elde edilen rekombinat enzim 80 °C'de 6 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %50 sinden fazlasını koruyarak ılımlı ısı kararlı olarak karakterize edilmektedir (Li vd., 2007). *Arthrobacter* türünden elde edilen iki tane hücre dışı AP, 55 °C'de inkübe edildiğinde, 15 dakikada AP'lerden biri aktivitesinin % 60'dan fazlasını kaybederken diğeri yaklaşık %20'sini kaybetmektedir (De Prada vd., 1996). *C. meningosepticum*'dan elde edilen fosfataz 50 veya 60 °C'de 10 dakika inkübe edildiğinde sırasıyla aktivitesinin % 40 ve 60'ını kaybetmektedir. 100 °C'de 2 dakika ısıtılması ise aktivitenin tamamen kaybolmasına sebep olmaktadır (Berlutti vd., 2001). *Bacillus* sp. P9 AP'sinin ısı kararsız olduğunu göstermek için yapılan bir denemede enzim 60 °C'de inkübe edildiğinde 10 dakikada aktivitesinin % 62'sini kaybetmektedir ve 50. dakikadan sonra aktivite gözlenmemektedir (Dhaked vd., 2005). Bu çalışmada, termofilik *G. caldxylosilyticus* TK4'ten elde edilmesine rağmen ısı kararsız enzimlere benzer özellik gösteren rekombinant enzimin, kalan aktivitenin bir sonraki reaksiyon için istenmediği uygulamalarda kullanımı avantajlıdır.

G. caldxylosilyticus TK4'ten klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen AP'nin pH kararlılığının incelenmesi sonucunda enzimin özellikle pH 8,0 ve daha bazik pH değerlerinde 12 saatlik inkübasyon sonrasında, aktivitesini % 90'nın üzerinde koruduğu 24 saatlik inkübasyon sonunda ise, enzimin aktivitesini % 50 oranında kaybettiği, 48 saat sonunda ise aktivitede % 90'lara varan bir azalma olduğu görülmüştür. AP'lerin pH kararlılığına ilişkin çok fazla literatür bilgisi bulunmamakla birlikte deniz bakterisi *Cobetia*'dan elde edilen AP'nin 6,0-11,0 arasındaki pH değerlerinde 15 dakika inkübe edildikten sonra aktivitesini koruduğuna dair bir bilgi bulunmaktadır (Yu Plisova vd., 2005). Ayrıca yine bir deniz bakterisi *Vibrio* sp.'den elde edilen AP'nin 24 saatlik

inkübasyon sonrasında 8,0-9,0 arasındaki pH değerlerinde oldukça kararlı ama pH 6,0'nın altındaki değerlerde inaktive olduğu gösterilmiştir (Hauksson vd., 2000).

AP'ler klasik olarak metaloenzim olarak tanımlandığı için (Posen, 1967) çeşitli metal iyonlarının ve EDTA'nın aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. 1 mM'lık EDTA varlığında aktivitenin tamamen kaybolması aktif bölgesinde Mg^{2+} ve Zn^{2+} içerdiği bilinen AP'lerin gösterdiği özellikle uyumlu bir sonuçtur. Denenen metal iyonlarının çoğu aktivitede dikkat çeken bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Hg^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} varlığında aktivitede sırasıyla % 85, % 55 ve % 18 oranında azalma gözlenmektedir. AP'lerin metal iyon gereksinimleri oldukça farklıdır (Vincent vd., 1992). *P. abyssi* AP'si 1 mM Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} veya Co^{2+} varlığında iki kat artan aktivite göstermiştir ve 1 mM EDTA varlığında aktivitede %90 oranında inhibisyon gözlenmektedir (Zappa vd., 2001). Deniz suyundan izole edilen *Cobetia marina*'dan elde edilen AP, aktivite için divalent iyonlara ihtiyaç duymamaktadır (Yu Plisova vd., 2005). Başka bir deniz suyu bakterisi *Pseudomana* sp.'den elde edilen AP, katyonların çoğunun varlığında aktivitesini değiştirmezken Zn^{2+} ve Hg^{2+} varlığında inhibe olmaktadır (Kobori ve Taga, 1980). 2 mM Mg^{2+} , 0,1 mM Mn^{2+} ve Co^{2+} , *T. thermophilus* XM'den elde edilen rekombinant enzim için aktivatör etkisi gösterirken, Zn^{2+} , Ca^{2+} ve Cu^{2+} inhibitör etkisi göstermiştir (Li vd., 2007). *A. pernix* K1'den elde edilen AP divalent katyonlara oldukça bağımlıdır. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} ve Ni^{2+} enzim aktivitesini artırırken Cu^{2+} ve Mn^{2+} aktiviteyi düşürmektedir (Helianti vd., 2007). *P. fucata*'dan elde edilen AP üzerinde monovalent katyonların etkisi yokken, bivalent katyonlar, farklı etkilere sahiptirler (Xiao vd., 2002). *Bacillus* sp. P9 AP'si 100 μ M EDTA varlığında %25 oranında inhibe olmaktadır. Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Mg^{2+} varlığında aktivitede bir artış gözlenirken enzim Hg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} varlığında inhibe olmaktadır (Dhaked vd., 2005). Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} ve Sr^{2+} *Shewanella* sp. SIB1'den elde edilen AP aktivitesini önemli derecede artırmazlar (Suzuki vd., 2005).

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan klonlanıp *E. coli*'de histidin kuyruğu ile ekspres edilen AP'nin, *p*-NPP substratı varlığında, optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, metal iyon etkisi ve çalışılan kinetik parametrelerinin değerlendirilmesiyle çeşitli organizmalardaki AP'lere oldukça benzer davranışlar gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca rekombinant enzimin, kalan aktivitenin bir sonraki reaksiyon için istenmediği durumlarda uygulama alanı bulabileceği düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir. Özellikle son yıllarda rekombinant DNA teknolojilerinin çok değişik sahalarda uygulanması bir enzimin özelliklerinin iyileştirilmesi veya çok daha uygun şartlarda üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışma, yeni bir tür olan *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 suşunun alkalın fosfataz (AP) geninin bir vektöre klonlanıp *Escherichia coli* (*E. coli*)’de ekspres edilmesi açısından önem arz etmektedir. İzlenen yol enzim üretimini daha kolay hale getirmiştir. Çünkü bu şekilde gen indüklenebilir bir promotorun altında olduğundan bolca ekspres edilebilir. Ayrıca histidin kuyruğu içerdiğinden tek basamakla nikel kolonu ile saflaştırılabilir. Bu da enzimin saf halde eldesi açısından oldukça önemlidir. Fakat, literatürde AP’lerin çeşitli kaynaklardan genellikle kromatografik yöntemlerle saflaştırıldığı görülmektedir. Bu nedenle daha ileri bir çalışmada nikel kolonu ile tek basamakta saflaştırılarak elde edilen rekombinant enzimin katalitik etkinliği ve özellikleri poli histidin kuyruğu içermeyen rekombinant enzimle veya *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan kromatografik yollarla elde edilen AP ile karşılaştırılabilir.

AP’ler klasik olarak moleküler biyolojide DNA parçalarından 5'-ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için kullanılıyor. *E. coli* AP’si (ECAP) bu amaçla oldukça kullanılmıştır. Fakat sonuçta oluşan DNA parçalarını birleştirmek veya fosforillemek için AP’ler tamamen inaktive edilmeli veya uzaklaştırılmalıdır. ECAP oldukça termal kararlı olduğundan inaktive etmek için fenol/kloroform muamelesi ve etanol çöktürmesi gereklidir. *Shewanella* sp. SIB1’den elde edilen ısıl kararsız olan AP bu sebeple ECAP’dan daha kullanışlıdır. Çünkü basit bir ısı muamelesi enzimi inaktive eder ve bir sonraki DNA parçalarının ligasyon ya da fosforilasyon aşamasının başarılı bir şekilde ilerlemesini sağlar (Suzuki vd., 2005). Benzer şekilde termofilik bir bakteri olan *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan elde edilen AP’nin beklenildiği kadar ısıl kararlı olmaması sebebiyle DNA defosforilasyon etkinliği incelenebilir.

İleriki çalışmalarda, HPLC veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak, *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan saflaştırılan AP’nin dördüncül yapısı ve moleküler ağırlığı belirlenebilir.

Ayrıca farklı substratlar üzerindeki etkinliği ve değişen inorganik fosfat konsantrasyonu varlığındaki etkinliği incelenerek enzimin sınıfı hakkında bilgi edinilebilir. Tüm bu araştırmalarla çalışma daha kapsamlı hale getirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Adamian, L. ve Liang, J., 2002. Interhelical Hydrogen Bonds and Spatial Motifs in Membrane Proteins: Polar Clamps and Serine Zippers, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 47, 2, 209-218.
- Amelunxen, R. ve Lins, M., 1968. Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 125, 3, 765-769.
- Angelini, S., Moreno, R., Gouffi, K., Santini, C. L., Yamagishi, A., Berenguer, J. ve Wu, L. F., 2001. Export of *Thermus thermophilus* alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. FEBS Letters, 506, 103–107.
- Arnold, F. H., 2001. Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Ásgeirsson, B., Hartemink, R. ve Chlebowski, J. F., 1995. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 110, 2, 315–329.
- Augood, S. J., McGowan, E. M., Finsen, B. R., Heppelmann, B. ve Emson, P.C., 2002. Non-radioactive *in situ* hybridization using alkaline phosphatase-labelled oligonucleotides, International Review of Neurobiology, 47, 173–201.
- Baoudene-Assali, F., Baratti, J. ve Michel, G. P. F., 1993. Purification and properties of a phosphate-irrepressible membrane-bound alkaline phosphatase from *Zymomonas mobilis*, Journal of General Microbiology, 139, 2, 229–235.
- Beck, E. ve Clark, L.C., 1950. Plasma alkaline phosphatase. II. Normative data for pregnancy, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 60, 4, 731-740.
- Berger, J., Garattini, E., Hua, J.C. ve Udenfriend, S., 1987. Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDNA, Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 695–698.
- Berlutti, F., Passariello, C., Selan, L., Thaller, M. C. ve Rossolini G. M., 2001. The *Chryseobacterium meningosepticum* PafA enzyme: prototype of a new enzyme family of prokaryotic phosphate-irrepressible alkaline phosphatases?, Microbiology, 147, 2831–2839.
- Besman, M. ve Coleman, J.E., 1985. Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase, Journal of Biological Chemistry, 260, 20, 11190–11193.

- Binder, T. A., Goodson, J. M. ve Socransky, S. S., 1987. Gingival fluid levels of acid and alkaline phosphatase, Journal of Periodontal Research, 22, 1, 14-19.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. ve Gotschlich, E. C., 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots, Analytical Biochemistry, 136, 1, 175-179.
- Bloch, W. ve Gorby, M. S., 1980. Catalytic Mechanism of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase: resolution of Three Variants of the Acyl-Enzyme Mechanism, Biochemistry, 19, 5008-5018.
- Bortolato, M., Besson, F. ve Roux, B., 1999. Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa, Proteins: Structure, Function and Genetics, 37, 310-318.
- Boyer, S. H., 1961. Alkaline Phosphatase in Human Sera and Placentae: Starch gel electrophoresis reveals many phosphatase components including a polymorphism in placentae, Science, 134, 1002-1004.
- Bradshaw, R. A., Cancedda, F., Ericsson, L. H., Neumann, P. A., Piccoli, S. P., Schlesinger, M. J., Shriefer, K. ve Walsh, K. A., 1981. Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase, Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 6, 3473-3477.
- Brockman, R. W. ve Heppel, L. A., 1968. On the Localization of Alkaline Phosphatase and Cyclic Phosphodiesterase in *Escherichia coli*, Biochemistry, 7, 7, 2554-2562.
- Byers, D. A., Fernley, H. N. ve Walker, P. G., 1972. Studies on alkaline phosphatase. Inhibition of human-placental phosphoryl phosphatase by L-phenylalanine, European Journal of Biochemistry, 29, 197-204.
- Chang, C. N., Kuang, W. J. ve Chen, E.Y., 1986. Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*, Gene, 44, 1, 121-125.
- Chattopadhyay, M. K., Devi, K. U., Gopishankar, Y. ve Shivaji, S., 1995. Thermolabile alkaline phosphatase from *Sphingobacterium antarcticus* a psychrotrophic bacterium from Antarctica, Polar Biology, 15, 215-219.
- Colacino, F. ve Crichton, R. R., 1997. Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnology & Genetic Engineering Review, 14, 211-277.
- Coleman, J. E. ve Gettins, P., 1983. Alkaline phosphatase, solution structure, and mechanism, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 55, 381-452.
- Coleman, J. E., 1992. Structure and mechanism of alkaline phosphatase, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 21, 441-483.

- Daniel, R. M. ve Cowan, D. A., 2000. Biomolecular Stability and Life at High Temperatures, Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 2, 250-254.
- Das, R. ve Gerstein M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Functional & Integrative Genomics, 1, 76-88.
- Dayan, J. ve Wilson, I. B., 1964. The Phosphorylation of Tris by Alkaline Phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, 81, 620-623.
- Demenis, M. A. ve Leone, F. A., 2000. Kinetic characteristics of ATP hydrolysis by a detergent-solubilized alkaline phosphatase from rat osseous plate, IUBMB Life, 49, 2, 113-119.
- De Prada, P., Loveland-Curtze, J. ve Brenchley, J. E., 1996. Production of Two Extracellular Alkaline Phosphatases by a Psychrophilic *Arthrobacter* Strain, Applied and Environmental Microbiology, 62, 10, 3732-3738.
- De Prada, P. ve Brenchley, J. E., 1997. Purification and Characterization of Two Extracellular Alkaline Phosphatases from a Psychrophilic *Arthrobacter* Isolate, Applied and Environmental Microbiology, 63, 7, 2928-2931.
- Derman, A. I. ve Beckwith, J., 1991. *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm, Journal of Bacteriology, 173, 23, 7719-7722.
- Dhaked, R. K., Alam, S. I., Dixit, A. ve Singh, L., 2005. Purification and characterization of thermo-labile alkaline phosphatase from an Antarctic psychrotolerant *Bacillus* sp. P9, Enzyme and Microbial Technology, 36, 855-861.
- Di Lorenzo, D., Gianni, M., Savoldi, G.F., Ferrari, F., Albertini, A. ve Garattini, E., 1993. Progesterone induced expression of alkaline phosphatase is associated with a secretory phenotype in T47D breast cancer cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 192, 3, 1066-1072.
- Di Mauro, S., Manes, T. ve Hessle, L., Kozlenkov, A., Pizauro, J. M., Hoylaerts, M. F, Millán, J. L., 2002. Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates, Journal of Bone and Mineral Research, 17, 8, 1383-1391.
- Dinçer, B. 2005. Bazı Termofilik Bakterilerdeki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dodson, G. ve Wlodawer, A., 1998. Catalytic triads and their relatives, Trends in Biochemical Sciences, 23, 347-352.
- Dong, G. ve Zeikus, J. G., 1997. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Thermotoga neapolitana*, Enzyme and Microbial Technology, 21, 335-340.

- DuBose, R. F. ve Hartl, D. L., 1990. The molecular evolution of bacterial alkaline phosphatase: correlating variation among enteric bacteria to experimental manipulations of the protein, Molecular Biology and Evolution, 7, 6, 547-577.
- Duguet, M., 1995. Nucleic Acids and Molecular Biology, Volume 9, Lilley D. ve Eckstein, F., Eds., Springer Verlag., Berlin, Germany, 84 s.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eguchi, M., 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme, Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular biology, 111, 2, 151-162.
- Ertunga, N. S., 2006. Termofilik Bir Bakteride Aldolaz Kodlayan Genin Klonlanması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fallon, M. D., Whyte, M. P. ve Teitelbaum, S. L., 1980. Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by *L*-tetramisole prevents *in vitro* cartilage calcification, Laboratory Investigation, 43, 6, 489-494.
- Fang, X. W., Golden, B. L., Littrell, K., Shelton, V., Thiyagarajan, P., Pan, T. ve Sosnick, T. R., 2001. The Thermodynamic Origin of the Stability of a Thermophilic Ribozyme, Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 8, 4355-4360.
- Farley, J. R., Tarbaux, N. M., Lau, K. H. ve Baylink, D. J., 1987. Monofluorophosphate is hydrolyzed by alkaline phosphatase and mimics the actions of NaF on skeletal tissues, *in vitro*, Calcified Tissue International, 40, 1, 35-42.
- Fedde, K. N., Lane, C. C. ve Whyte, M. P., 1988. Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells, Archives of Biochemistry and Biophysics, 264, 2, 400-409.
- Ferguson, M. A. J., 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosyl-phosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research, Journal of Cell Science, 112, 2799-2809.
- Findlay, A. B. ve Johnston, N. G., 1977. The iso-enzyme of alkaline phosphatase in neutrophils during pregnancy, Pathology, 9, 1, 13-18.
- Fishman, W. ve Sie, H. G., 1970. L-homoarginine; an inhibitor of serum "bone and liver" alkaline phosphatase, Clinica Chimica Acta, 29, 2, 339-341.
- Fishman, W. H. ve Sie, H. G., 1971. Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoarginine, Enzymologia, 41, 3, 141-167.

- Fitt, P. S. ve Peterkin, P. I., 1976. Isolation and properties of a small manganese-ion-stimulated bacterial alkaline phosphatase, Biochemical Journal, 157, 161–167.
- Forterre, P., Bergerat, A. ve López-García, P., 1996. The Unique DNA Topology and DNA Topoisomerases of Hyperthermophilic Archaea, FEMS Microbiology Reviews, 18, 2-3, 237- 248.
- Frank, R. M. ve Voegel, J. C., 1978. Bacterial bone resorption in advanced cases of human periodontitis, Journal of Periodontal Research, 13, 3, 251-261.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A Nonhyperthermophilic Common Ancestor to Extant Life Forms, Science, 283, 5399, 220-221.
- Gettins, P ve Coleman, J. E., 1983. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance of Phosphoenzyme Intermediates of Alkaline Phosphatase, The Journal of Biological Chemistry, 258, 1, 408-416.
- Ghosh, R., Ghosh, A. ve Ghosh, B.K., 1977. Properties of the membrane-bound alkaline phosphatase from glucose- and lactate-grown cells of *Bacillus subtilis* SB 15. The Journal of Biological Chemistry, 252, 19, 6813–6822.
- Glew, R. H. ve Heath, E. C., 1971. Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. I. Isolation and characterization, The Journal of Biological Chemistry, 246, 6, 1556–1565.
- Glynn, J. A., Schaffel, S. D., McNicholas, J. M. ve Hulett, F. M., 1977. Biochemical localization of the alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age. Journal of Bacteriology, 129, 2, 1010-1019.
- Goldman, S., Hecht, K., Eisenberg, H. ve Mevarech, M., 1990. Extracellular Ca²⁺-dependent inducible alkaline phosphatase from the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. Journal of Bacteriology, 172, 12, 7065–7070.
- Gong, N., Chen, C., Xie, L., Chen, H., Lin, X. ve Zhang, R., 2005. Characterization of a thermostable alkaline phosphatase from a novel species *Thermus yunnanensis* sp. nov. and investigation of its cobalt activation at high temperature. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 1750, 2, 103–111.
- Gupta, M., 1995. Thermostability of Enzymes, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z. ve Wolynes, P.G., 1997. Structural Basis for Thermostability and Identification of Potential Active Site Residues for Adenylate Kinases from the Archaeal Genus *Methanococcus*, Proteins: Structure, Function ve Genetics, 28, 117-130.

- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G. J., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 96, 3578-3583.
- Hao, J. ve Berry, A., 2004. A Thermostable Variant of Fructose Bisphosphate Aldolase Constructed by Directed Evolution Also Shows Increased Stability in Organic Solvents, Protein Engineering Design and Selection, 17, 9, 689-697.
- Hauksson, J. B., Andrésón, Ó. S. ve Ásgeirsson, B., 2000. Heat-labile bacterial alkaline phosphatase from a marine *Vibrio* sp. Enzyme and Microbial Technology, 27, 66–73.
- Helianti, I., Okubo, T., Morita, Y. ve Tamiya, E., 2007, Characterization of thermostable native alkaline phosphatase from an aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* K1, Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 107-112.
- Henne, A., Brüeggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H.P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G. ve Fritz, H.J., 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*, Nature Biotechnology, 22, 547-553.
- Henthorn, P. S., Raducha, M., Edwards, Y. H., Weiss, M. J., Slaughter, C., Lafferty, M. A. ve Harris, H., 1987. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 84, 1234–1238.
- Henthorn, P. S., Raducha, M., Kadesch, T., Weiss, M. J. ve Harris, H., 1988. Sequence and Characterization of the Human Intestinal Alkaline Phosphatase Gene, The Journal of Biological Chemistry, 263, 24, 12011-12019.
- Holtz, K. M. ve Kantrowitz, E. R., 1999. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. FEBS Letters, 462, 7–11.
- Holtz, K.M., Stec, B. ve Kantrowitz, E. R., 1999. A Model of the Transition State in the Alkaline Phosphatase Reaction, The Journal of Biological Chemistry, 274, 13, 8351-8354.
- Hough, E., Hansen, L. K., Birknes, B., Jynge, K., Hansen, S., Hordvik, A., Little, C., Dodson, E. J. ve Derewenda, Z., 1989. High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Nature, 338, 6213, 357-360.
- Hoylaerts, M. F., Manes, T. ve Millán, J. L., 1992. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. Biochemical Journal, 286, 23–30.

- Hulett, F. M. ve Jensen, K., 1988. Critical roles of *spo0A* and *spo0H* in vegetative alkaline phosphatase production in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 170, 8, 3765-3768.
- Hulett, F.M., Kim, E.E., Bookstein, C., Kapp, N.V., Edwards, C.W. ve Wyckoff, H.W., 1991. *Bacillus subtilis* alkaline phosphatases III and IV: Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. The Journal of Biological Chemistry, 266, 2, 1077–1084.
- Hulett, F. M., Stuckmann, K., Spencer, D. B. ve Sanopoulou, T., 1986. Purification and characterization of the secreted alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis* MC14: identification of a possible precursor. Journal of General Microbiology, 132, 8, 2387-2395.
- Hull, W. E., Halford, S. E., Gutfreund, H. ve Sykes, B. D., 1976. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Study of Alkaline Phosphatase: The Role of Inorganic Phosphate in Limiting the Enzyme Turnover Rate at Alkaline pH, Biochemistry, 15, 7, 1547-1561.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. ve Pace, N. R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring, Journal of Bacteriology, 180, 2, 366–376.
- Hummer, C. ve Millán, J. L., 1991. Gly⁴²⁹ is the major determinant of uncompetitive inhibition of human germ cell alkaline phosphatase by L-leucine. The Biochemical Journal, 274, 91–95.
- Inouye, H., Barnes, W. ve Beckwith, J., 1982. Signal Sequence of Alkaline Phosphatase of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 149, 2, 434-439.
- Ishida, Y., Tsuruta, H., Tsuneta, S. T., Uno, T., Watanabe, K. ve Aizono, Y., 1998. Characteristics of psychrophilic alkaline phosphatase. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62, 11, 2246 –2250.
- Ito, K., Bassford, P. J. ve Beckwith, J., 1981. Protein localization in *E. coli*: Is There a Common Step in the Secretion of Periplasmic and Outer-membrane Proteins?, Cell, 24, 3, 707-717.
- Jablonski, E., Moomaw, E.W., Tullis, R.H. ve Ruth, J.L., 1986. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes. Nucleic Acids Research, 14, 15, 6115–6128.
- Jaenicke, R. ve Bohm, G., 1998. The Stability of Proteins in Extreme Environments, Current Opinion in Structural Biology, 8, 6, 738-748.

- Janeway, C.M.L., Xu, X., Murphy, J.E., Chaidaroglou, A. ve Kantrowitz, E.R., 1993. Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. Biochemistry, 32, 1601–1609.
- Ji, C. N., Jiang, T., Chen, M. Q., Sheng, X. Y. ve Mao, Y. M., 2001. Purification, crystallization and preliminary X-ray studies of thermostable alkaline phosphatase from *Thermus* sp. 3041. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 57, 614–615.
- Jones, S. R., Kindman, L. A. ve Knowles, J. R., 1978. Stereochemistry of Phosphoryl Group transfer Using a Chiral [^{16}O , ^{17}O , ^{18}O] Stereochemical Course of Alkaline Phosphatase. Nature, 275, 564-565.
- Kal, S. 1989. Alkali Fosfataz Aktivitesi Üzerine Glukozun Etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
- Kam, W., Clauser, E., Kim, Y.S., Kan, Y.W. ve Rutter, W.J., 1985. Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 82, 8715–8719.
- Kaneko, Y., Hayashi, N., Toh-e, A., Banno, I. ve Oshima, Y., 1987. Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 58, 137–148.
- Karamyshev, A. L., Karamysheva, Z. N., Kajava, A. V., Ksenzenko, V. N. ve Nesmeyanova, M.A., 1998. Processing of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: Role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. Journal of Molecular Biology, 277, 859–870.
- Kim, E.E. ve Wyckoff, H.W., 1990. Structure of alkaline phosphatases. Clinica Chimica Acta, 186, 2, 175–187.
- Kim, E.E. ve Wyckoff, H.W., 1991. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. Journal of Molecular Biology, 218, 2, 449–464.
- Kim, J. W., Peterson, T., Bee, G. ve Hulett, F. M., 1998. *Bacillus licheniformis* MC14 alkaline phosphatase I gene with an extended COOH-terminus. FEMS Microbiology Letters, 159, 47-58.
- Kim, Y. J., Park, T. S., Kim, H. K. ve Kwon, S. T., 1997. Purification and characterization of a thermostable alkaline phosphatase produced by *Thermus caldophilus* GK24. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 30, 4, 262–268.
- Kobori, H. ve Taga, N., 1980. Extracellular alkaline phosphatase from marine bacteria: purification and properties of extracellular phosphatase from a marine *Pseudomonas* sp. Canadian Journal of Microbiology. 26, 7, 833–838.

- Kobori, H., Sullivan, C. W. ve Shizuya, H., 1984. Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: rapid 5' end-labeling of nucleic acid. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 81, 6691–6695.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences Between Mesophiles and Thermophiles, Bacteriological Reviews, 21, 4, 227-240.
- Kozlenkov, A., Le Du, M.H., Cuniasse, P., Ny, T., Hoylaerts, M. F. ve Millán, J. L., 2004. Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. Journal of Bone and Mineral Research, 19, 11, 1862-1872.
- Kozlenkov, A., Manes, T., Hoylaerts, M.F. ve Millán, J.L., 2002. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. The Journal of Biological Chemistry, 277, 25, 22992-22999.
- Krupianko, V.I., Kolot, M.N. ve Nesmeianova, M.A., 1981. Comparative study of properties of periplasmic and membrane-bound alkaline phosphatase of *E. coli*. Biokhimiia, 46, 7, 1249–1257.
- Kumar, S., Tsai, C. J. ve Nussinov, R., 2000. Factors Enhancing Protein Thermostability, Protein Engineering, 13, 3, 179-191.
- Laughon, B. E., Syed, S. A. ve Loesche, W. J., 1982. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. Journal of Clinical Microbiology, 15, 1, 97- 102.
- Le Du, M.H., Stigbrand, T., Taussig, M.J., Ménez, A. ve Stura, E. A., 2001. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. The Journal of Biological Chemistry, 276, 12, 9158-9165.
- Lee, M. H., Nittayajarn, A., Ross, R. P., Rothschild, C. B., Parsonage, D., Claiborne, A. ve Rubens, C. E., 1999. Characterization of *Enterococcus faecalis* alkaline phosphatase and use in identifying *Streptococcus agalactiae* secreted proteins. Journal of Bacteriology, 181, 18, 5790-5799.
- Li, J., Xu, L. ve Yang, F., 2007. Expression and Characterization of Recombinant Thermostable Alkaline Phosphatase from a Novel Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* XM, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39, 11, 844–850.
- Lin, C. W., Sie, H. G. ve Fishman, W. H., 1971, L-tryptophan. A nonallosteric organ-specific uncompetitive inhibitor of human placental alkaline phosphatase. Journal of Biological Chemistry, 124, 3, 509–516.
- López-García, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life?, Journal of Molecular Evolution, 49, 4, 439-452.

- Lorenz, B. ve Schröder, H.C., 2001. Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1547, 254-261.
- Low, M. G. ve Finean, J. B., 1977. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C, Biochemical Journal, 167, 281–284.
- 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, 1, 265-275.
- Majumdar, A., Ghatak, A. ve Ghosh, R.K., 2005. Identification of the gene for the monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* serogroup O1 strain, Gene, 344, 251-258.
- Majeska, R.J. ve Wuthier, R.E., 1975. Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, 391, 1, 51-60.
- Makita, T. ve Sandborn, E. B., 1970. The Ultrastructural localization of adenosine triphosphatase and alkaline phosphatase activity in eosinophil leukocytes, Histochemistry, 24, 2, 99-105.
- Malamy, M. H. ve Horecker, B. L., 1964. Release of Alkaline Phosphatase from *Escherichia coli* upon Lysozyme Spheroplast Formation, Biochemistry, 3, 12, 1889-1893.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperatures Typical for Hyperthermophiles, Nucleic Acids Research, 22, 9, 1681-1686.
- Matthews, B.W., Nicholson, H. ve Becktel, W. J., 1987. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 84, 6663-6667.
- McComb, R. B., Bowers, G. N. ve Posen, S., 1979. Alkaline Phosphatase, New York: Plenum Press, 268-269.
- McMaster, Y., Tennant, R., Clubb, J.S. ve Neale F.C., 1964. The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth, 71, 735-739.
- McNicholas, J. M. ve Hulett, F. M., 1977. Electron microscope histochemical localization of alkaline phosphatase(s) in *Bacillus licheniformis*. Journal of Bacteriology, 129, 1, 501-515.

- Meyer, T. S. ve Lamberts, B. L., 1965. Use of coomassie brilliant blue r250 for electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips, Biochimica et Biophysica Acta, 107, 1, 144-145.
- Millán, J.L., 1986. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. The Journal of Biological Chemistry, 261, 7, 3112–3115.
- Millán, J.L., 2006. Alkaline Phosphatases Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes, Purinergic Signalling, 2, 335-341.
- Millán, J.L. ve Manes, T., 1988. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. (gene structure/tissue specificity/tumor markers/synthetic peptides/three-dimensional modeling) PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 85, 3024–3028.
- Mori, S., Okamoto, M., Nishibori, M., Ichimura, M., Sakiyama, J. ve Endo. H., 1999. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 29, 235–239.
- Moss, D. W., 1982. Alkaline Phosphatase isoenzymes, Clinical Chemistry, 28, 10, 2007-2016.
- Moss, D. W., 1992. Perspectives in alkaline phosphatase research. Clinical Chemistry, 38, 12, 2486–2492.
- Moss, D.W., Eaton, R.H., Smith, J.K. ve Whitby, L.G., 1967. Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. Biochemistry Journal, 102, 53-57.
- Murphy, J. E. 1996. Investigating The Structure and Function of *Escherichia Coli* Alkaline Phosphatase Using Site-Specific Mutagenesis And X-Ray Crystallography, Doktora Tezi, Boston College.
- Murphy, J. E. ve Kantrowitz, E. R., 1994. Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases?, Molecular Microbiology 12, 3, 351-357.
- Murphy, J. E., Tibbitts, T. T. ve Kantrowitz, E. R., 1995. Mutations at positions 153 and 328 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase provide insight towards the structure and function of mammalian and yeast alkaline phosphatases. Journal of Molecular Biology, 253, 4, 604–617.
- Murphy, J. E., Xu, X. ve Kantrowitz E.R., 1993. Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by a single amino acid substitution in *Escherichia coli* alkaline phosphatase, The Journal of Biological Chemistry, 268, 29, 21497-21500.

- Nakashima, H., Fukuchi, S. ve Nishikawa, K., 2003. Compositional changes in RNA, DNA and proteins for bacterial adaptation to higher and lower temperatures, Journal of Biochemistry, 133, 507-513.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D. H., Hickey, E.K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., ve Fraser, C.M., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature, 399, 323-329.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 711–729.
- Nomoto, M., Ohsawa, M., Wang, H. L., Chen, C.C. ve Yeh. K. W., 1988. Purification and characterization of extracellular alkaline phosphatase from an alkalophilic bacterium. Agricultural and Biological Chemistry, 52, 7, 1643–1647.
- Ogata, S., Hayashi, Y., Takami, N. ve Ikehara, Y., 1988. Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase, The Journal of Biological Chemistry, 263, 21, 10489-10494.
- Ohkubo, S., Kimura, J. ve Matsuoka, I., 2000. Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: A key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. British Journal of Pharmacology, 131, 1667-1672.
- Okamoto, T., Seo, H., Mano, H., Furuhashi, M., Goto, S., Tomoda, Y. ve Matsui, N., 1990. Expression of human placenta alkaline phosphatase in placenta during pregnancy, Placenta, 11, 4, 319-327.
- Owusu, R. K. ve Cowan, D. A., 1989. Correlation Between Microbial Protein Thermostability and Resistance to Denaturation in Aqueous Organic Solvent Two-Phase Systems, Enzyme and Microbial Technology, 11, 9, 568-574.
- Özen, A., Colak, A., Dincer, B. ve Güner, S., 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae), Food Chemistry, 85, 431-437.
- Pantazaki, A. A., Karagiorgas, A. A., Liakopoulou-Kyriakides, M. ve Kyriakidis, D. A., 1998. Hyperalkaline and thermostable phosphatase in *Thermus thermophilus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 75, 249–259.
- Park, T., Lee, J. H., Kim, H. K., Hoe, H. S. ve Kwon, S. T., 1999. Nucleotide sequence of the gene for alkaline phosphatase of *Thermus caldophilus* GK24 and characteristics of the deduced primary structure of the enzyme. FEMS Microbiology Letters, 180, 133–139.

- Picher, M., Burch, L.H., Hirsh, A. J., Spsychala, J. ve Boucher, R.C., 2003. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. The Journal of Biological Chemistry, 278, 15, 13468-13479.
- Pizauro, J.M., Demenis, M.A., Ciancaglini, P. ve Leone, F.A., 1998. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. Biochimica et Biophysica Acta, 1368, 1, 108-114.
- Posen, S., 1967. Alkaline phosphatase, Annals of Internal Medicine, 67, 1, 183–203.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A. ve Mozo-Villarias, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Engineering, 9, 3, 265-271.
- Ray, J.M., Bhaya, D., Block, M.A. ve Grossman, A.R., 1991. Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Journal of Bacteriology, 173, 14, 4297– 4309.
- Redman, C. A., Thomas-Oates, J. E., Ogata, S., Ikehara, Y. ve Ferguson. M. A. J., 1994. Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. Biochemical Journal, 302, 861–865.
- Rezende, L.A., Ciancaglini, P., Pizauro, J.M. ve Leone, F.A., 1998. Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand). 44, 2, 293-302.
- Rinia, H. A., Boots, J. W. P., Rijkers, D. T.S., Kik, R. A., Snel, M. M. E., Demel, R. A., Killian, J. A., van der Eerden, J.P.J.M. ve de Kruijff, B., 2002. Domain Formation in Phosphatidylcholine Bilayers Containing Transmembrane Peptides: Specific Effects of Flanking Residues, Biochemistry, 41, 8, 2814-2824.
- Ross, M. H., Ely, J. O. ve Archer, J. G., 1951, Alkaline Phosphatase Activity and pH Optima, The Journal of Biological Chemistry, 192, 2, 561-568.
- Roy, N.K., Ghosh, R.K. ve Das, J., 1982. Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology, 150, 3, 1033–1039.
- Russell, R. J. M., Ferguson, J. M. C., 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.
- Russell, R. J. M, Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. ve Taylor, G.L., 1998. Structural Adaptations of the Cold-Active Citrate Synthase from an Antartic Bacterium, Structure, 6, 3, 351-361.

- Russell, R.J. ve Taylor, G.L., 1995. Engineering Thermostability: Lessons from Thermophilic Proteins, Current Opinion in Biotechnology, 6, 4, 370-374.
- Sato, N., Takahashi, Y. ve Asano, S., 1994. Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes. Blood, 83, 4, 1093-1101.
- Sauvé, V. ve Sygush, J., 2001. Molecular Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*, Protein Expression and Purification, 21, 293-302.
- Say, J.C., Ciuffi, K., Furriel, R.P., Ciancaglini, P. ve Leone, F.A., 1991. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. Biochimica et Biophysica Acta, 1074, 2, 256-262.
- Schaffel, S. D. ve Hulett, F. M., 1978. Alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis*. Solubility dependent on magnesium, purification and characterization. Biochimica et Biophysica Acta, 526, 2, 457-467.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie, 80, 11, 933-941.
- Schwartz, J. H. ve Lipmann, F., 1961. Phosphate Incorporation into Alkaline Phosphatase of *E. coli*. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 47, 1996-2005.
- Senes, A., Gerstein, M. ve Engelman, D.M., 2000. Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The GxxxG Motif Occurs Frequently and in association with β -Branched Residues at Neighboring Positions, Journal of Molecular Biology, 296, 3, 921-936.
- Seto, H. ve Tomohisa, K., 1999. Bioactive natural products with carbon-phosphorus bonds and their biosynthesis, Natural Product Reports, 16, 589-596.
- Sharipova, M. R., Balaban, N. P., Mardanova, A. M., Nekhotyayeva, N. V., Demytyev, A. A., Vershinina, O. A., Garusov, A. V. ve Leshchinskaya, I. B., 1998. Isolation and properties of extracellular alkaline phosphatase from *Bacillus intermedius*. Biochemistry (Moscow), 63, 10, 1178-1182.
- Slots, J., 1981. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. Journal of Clinical Microbiology, 14, 3, 288-294.
- Smith, G.P. ve Peters, T.J., 1981. Subcellular localization and properties of pyridoxal phosphate phosphatases of human polymorphonuclear leukocytes and their relationship to acid and alkaline phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, 661, 2, 287-294.

- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. ve Ito K., 1997. Roles of Disulfide Bonds in Bacterial Alkaline Phosphatase. The Journal of Biological Chemistry, 272, 6174-6178.
- Spencer, D. B., Hansa, J. G., Stuckmann, K. V. ve Hulett, F. M., 1982. Membrane-associated alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* that requires detergent for solubilization: lactoperoxidase ¹²⁵I localization and molecular weight determination, Journal of Bacteriology, 150, 2, 826-834.
- Spencer, D. B. ve Hulett, F. M., 1981. Lactoperoxidase-¹²⁵I localization of salt-extractable alkaline phosphatase on the cytoplasmic membrane of *Bacillus licheniformis*. Journal of Bacteriology, 145, 2, 934-945.
- Stec, B., Holtz, K. M. ve Kantrowitz, E. R., 2000. A Revised Mechanism for the Alkaline Phosphatase Reaction Involving Three Metal Ions, Journal of Molecular Biology, 299, 1303-1311.
- Sternner, R. ve Liebl, W., 2001. Thermophilic adaptation of proteins. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 36, 1, 39-106.
- Stetter, K. O., 1996. Hyperthermophilic Procaryotes, FEMS Microbiology Reviews, 18, 2-3, 149-158.
- Sumikawa, K., Okochi, T. ve Adachi, K., 1990. Differences in phosphatidate hydrolytic activity of human alkaline phosphatase isozymes. Biochimica et Biophysica Acta, 1046, 1, 27-31.
- Sun, L., Martin, D.C. ve Kantrowitz, E.R., 1999. Rate-determining step of *Escherichia coli* alkaline phosphatase altered by the removal of a positive charge at the active center. Biochemistry, 38, 2842-2848.
- Sussman, H. H., Bowman, M. ve Lewis, J. L. Jr., 1968. Placental alkaline phosphatase in maternal serum during normal and abnormal pregnancy. Nature, 218, 5139, 359-360.
- Suzuki, Y., Mizutani, Y., Tsuji, T., Ohtani, N., Takano, K., Haruki, M., Morikawa, M. ve Kanaya, S., 2005. Gene Cloning, Overproduction and Characterization of Thermolabile Alkaline Phosphatase from a Psychrotrophic Bacterium, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 69, 2, 364-373.
- Takami, H., Inoue, A. , Fuji, F. ve Horikoshi, K., 1997. Microbial Flora in The Deepest Sea Mud of The Mariana Trench, FEMS Microbiology Letters, 152, 279-285.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.

- Ternan, N. G., Mc Grath, J. W., Mc Mullan, G. ve Quinn., J. P., 1998. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 635-647.
- Thiede, M. A., Yoon, K., Golub, E. E., Noda, M. ve Rodan, G. A., 1988. Structure and expression of rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) alkaline phosphatase: Product of a single copy gene. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 85, 319–323.
- Thompson, M.J. ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, Journal of Molecular Biology, 290, 2, 595-604.
- Thornton, J.M., 1981., Disulphide bridges in globular proteins. Journal of Molecular Biology, 151, 2, 261-287.
- Tokumitsu, S. ve Fishman, W. H., 1983. Alkaline phosphatase biosynthesis in the endoplasmic reticulum and its transport through the golgi apparatus to the plasma membrane:cytochemical evidence, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 31, 5, 647-655.
- Tolner, B., Poolman, B. ve Konings, W.N., 1997. Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems to High Temperatures, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Physiology, 118, 3, 423-428.
- Torriani, A., 1990. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. BioEssays 12, 8, 371– 376.
- Trent, D.J., 2000. Extremophiles in Astrobiology: Per Ardua ad Astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 5-11.
- Trowsdale, J., Martin, D., Bicknell, D. ve Campbell, I., 1990. Alkaline phosphatases. Biochemical Society Transactions, 18, 2, 178–180.
- Tsai, C.J. ve Nussinov, R., 1997a. Hydrophobic Folding Units Derived from Dissimilar Monomer Structures and Their Interactions, Protein Science, 6, 1, 24-42.
- Tsai, C. J. ve Nussinov, R., 1997b. Hydrophobic Folding Units at Protein-Protein Interfaces: Implications to Protein Folding and to Protein-Protein Association, Protein Science, 6, 7, 1426-1437.
- URL-1, <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/phosphatase.html>
Alkaline Phosphatase. 15 Temmuz 2008.
- URL-2, <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>,
Fermantas Life Sciences, 1 Ekim 2008.

- URL-3, www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf#search=pGEMTeasyvector map, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, TM042, Promega, 1 Ekim 2008.
- URL-4, www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf, Novagen Vector Tables, Novagen, 1 Ekim 2008.
- URL-5, www.research.umbc.edu/~jwolf/m5.htm, DNA Protocols, eBioinfogen, 1 Ekim 2008.
- Vieille, C., Burdette, D.S. ve Zeikus, J.G., 1996, Thermozyms, Biotechnology Annual Review, 2, 1-83.
- Vieille, C. ve Zeikus, G.J., 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65,1, 1–43.
- Vincent, J. B., Crowder M. W. ve Averill, B. A., 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. Trends in Biochemical Sciences, 17, 105–110.
- Vogt, G. ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability: Hydrogen Bonds or Internal Packing?, Folding and Design, 2, 4, 40-46.
- Vogt, G., Woell, S ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, Journal of Molecular Biology, 269, 631-643.
- Volbeda, A., Lahm, A., Sakiyama, F. ve Suck, D., 1991. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution. The EMBO Journal, 10, 7, 1607-1618.
- Wanner, B.L., 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. Journal of Cellular Biochemistry, 51, 1, 47–54.
- Wanner, B.L. ve Chang, B., 1987. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 169, 12, 5569– 5574.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K. ve Suzuki, Y., 1991. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. Journal of Biological Chemistry, 266, 36, 24287-24294.
- Watanabe, K., Oshima, T. ve Nishimura, S., 1976. CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nucleic Acids Research, 3, 7, 1703-1713.

- Weiss, M.J., Henthorn, P.S., Lafferty, M.A., Slaughter, C., Raducha, M. ve Harris, H., 1986. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 83, 7182–7186.
- Whyte, M.P., 1994. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. Endocrine Reviews, 15, 4, 439-461.
- Wilson, I. B., Dayan, J. ve Cyr, K., 1964. Some Properties of Alkaline Phosphatase from *Escherichia coli*. Transphosphorylation. The Journal of Biological Chemistry, 239, 12, 4182-4185.
- Wilson, P.D., Rustin, G. J. S. ve Peters, T. J., 1981. The Ultrastructural localization of human neutrophil alkaline phosphatase in normal individuals during pregnancy and in patients with chronic granulocytic leukaemia. The Histochemical Journal, 13, 1, 31-43.
- Wilson, P.D., Smith, G.P. ve Peters, T.J., 1983. Pyridoxal 5'-phosphate: A possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils. The Histochemical Journal, 15, 3, 257-264.
- Wintrobe, M.M., 1990. Neutrophils, eosinophils, basophils. In Clinical Hematology. Clinical Hematology. Philadelphia, Lea and Febiger.
- Xiao, R., Xie, L. P., Lin, J. Y., Li, C. H., Chen, Q. X., Zhou, H. M. ve Zhang, R.Q., 2002. Purification and enzymatic characterization of alkaline phosphatase from *Pinctada fucata*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 17, 65-74.
- Xu, S., Ju, J., Misono, H. ve Ohnishi, K., 2006. Directed evolution of extradiol dioxygenase by a novel in vivo DNA shuffling, Gene, 368, 126-137.
- Yamane, K. ve Maruo, B., 1978a. Alkaline phosphatase possessing alkaline phosphodiesterase activity and other phosphodiesterases in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 134, 1, 108–114.
- Yamane, K. ve Maruo, B., 1978b. Purification and characterization of extracellular soluble and membrane-bound insoluble alkaline phosphatases possessing phosphodiesterase activities in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 134, 1, 100–107.
- Yamashita, Y., Toyoshima, K., Yamazaki, M., Hanada, N. ve Takehara, T., 1990. Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase of *Bacteroides gingivalis* 381. Infection and Immunity, 58, 9, 2882-2887.
- Yang, K. ve Metcalf, W. W., 2004. A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase, PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 101, 21, 7919-7924.

- Yeh, M. F. ve Trela, J. M., 1976. Purification and characterization of a repressible alkaline phosphatase from *Thermus aquaticus*. The Journal of Biological Chemistry, 251, 10, 3134–3139.
- Yu Plisova, E., Balabanova, L.A., Ivanova, E.P., Kozhemyako, V.B., Mikhailov, V.V., Agafonova, E.V. ve Rasskazov, V.A., 2005. A Highly Active Alkaline Phosphatase from the Marine Bacterium Cobetia, Marine Biotechnology, 7, 173-178.
- Yurchenko, J. V., Budilov, A. V., Deyev, S. M., Khromov, I. S. ve Sobolev, A. Y., 2003. Cloning of an alkaline phosphatase gene from the moderately thermophilic bacterium *Meiothermus ruber* and characterization of the recombinant enzyme. Molecular Genetics Genomics, 270, 87–93.
- Zappa, S., Rolland, J. L., Flament, D., Gueguen, Y., Boudrant, J. ve Dietrich, J., 2001. Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 10, 4504–4511.
- Zernik, J., Kream, B. ve Twarog, K., 1991. Tissue-specific and dexamethasone- inducible expression of alkaline phosphatase from alternative promoters of the rat bone/liver/kidney/placenta gene. Biochemical and Biophysical Research Communications, 176, 3, 1149-1156.
- Zhang, L., Buchet, R. ve Azzar, G., 2004. Phosphate Binding in the Active Site of Alkaline Phosphatase and the Interactions of 2-Nitrosoacetophenone with Alkaline Phosphatase-Induced Small Structural Changes, Biophysical Journal, 86, 3873–3881.
- Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T. ve Engelman, D.M., 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America), 98, 5, 2250-2255.
- Zueva, N.N., Dalev, P.G. ve Lazarova, D.L., 1993. Properties, production, and practical uses of alkaline phosphatase. Biokhimiia, 58, 7, 1009–1023.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ordu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1997 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı ve 2001 yılında bu programdan kimyager unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve Şubat 2004'te K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalında doktora programına direk geçiş yaptı. Ekim 2002'den itibaren Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalıştı. TÜBİTAK tarafından Ekim 2002-2004 tarihleri arasında Yurt İçi Yüksek Lisans, Ekim2004-Ocak 2009 tarihleri arasında ise Yurt İçi Doktora bursu ile ödüllendirildi. İyi derecede İngilizce bilmektedir.