

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

TERMOFİLİK *Anoxybacillus gonensis* G2 SUŞUNUN FRUKTOZ-1,6-BİSFOSFAT  
ALDOLAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE  
KARAKTERİZASYONU

746092

Kimyager Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Doktora (Kimya)”  
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.01.2006

Tezin Savunma Tarihi : 17.02.2006

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYOĞLU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Murat KÜÇÜK

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2006

## ÖNSÖZ

“Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 Suşunun Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu” adlı çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Lisans Üstü ve Spektroskopi Laboratuvarları ile Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Lisans Üstü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Üniversiteye başladığım günden beri kendisini hayranlıkla takdir ettiğim ve Biyokimya Anabilim Dalında Lisans Üstü eğitime başlamamın en önemli sebebi olan sayın hocam Prof. Dr. Saadettin GÜNER’i tekrar rahmetle ve özlemle anıyorum. Doktora tez çalışmalarım esnasında özellikle zor günlerimde hep yanımda, arkamda oldu. Hakkını ödemek çok zor, ama bu tez bendeki emeğinin bir karşılığıdır. Teşekkürden çok daha fazlasını hak ediyorsun. Dualarım hep seninle. Prof. Dr. Saadettin GÜNER’den sonra tez danışmanlığımı üstlenen, akademik hayatım boyunca desteğini hep hissettiğim ve bu projenin tamamlanmasında katkısı olan sayın hocam Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan ve bilimsel bilgi birikimini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürlerimi sunuyorum. Sevgili arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya yardım ve emeklerinden dolayı sonsuz teşekkürler. Desteği ve yardımları olmasaydı bu tez nasıl biterdi! Ayrıca Biyoloji bölümündeki sevgili arkadaşlarım doktora öğrencisi Hakan KARAOĞLU’na, Arş. Gör. Cemal SANDALLI’ya ve emeği geçen diğer hocalarım ve arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum. Özellikle tezimin son aşamalarına doğru bana yardımları ile büyük katkısı olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Melike YILDIRIM’a çok teşekkür ediyorum. Ayrıca her konudaki yardım ve desteklerinden dolayı Kimya Bölümündeki değerli hocalarım ve sevgili arkadaşlarıma çok teşekkürler.

Akademik hayatım boyunca onların manevi gücü ile bu günlere geldiğim sevgili aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum. Canım anneciğim hayatın boyunca hep destekçimdin, sana da teşekkür yetmez. Dualarım ve kalbim hep seninle. Yoğun çalışma dönemimin son zamanlarında maddi, manevi her konuda yanımda olan sevgili eşim Osman ERTUNGA’ya da sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

Trabzon, 2006

## 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. Aldolazların Genel Özellikleri.....	2
1.3. Nükleofilik Substratlarına Göre Aldolazların Sınıflandırılması.....	2
1.3.1. DHAF Bağımlı Aldolazlar.....	2
1.3.2. Piruvat veya Fosfoenol Piruvat Bağımlı Aldolazlar.....	3
1.3.3. Asetaldehid Bağımlı Aldolazlar.....	3
1.3.4. Glisin Bağımlı Aldolazlar.....	3
1.4. Reaksiyon Mekanizmalarına Göre Aldolazların Sınıflandırılması.....	3
1.4.1. Sınıf I Aldolazlar.....	4
1.4.1.1. Ökaryotik Sınıf I Aldolazlar.....	5
1.4.1.2. Prokaryotik Sınıf I Aldolazlar.....	6
1.4.2. Sınıf II Aldolazlar.....	7
1.4.2.1. Sınıf II FBA'ların Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi.....	8
1.4.2.1.1. Birincil Yapı.....	8
1.4.2.1.2. Dimer Oluşumu ve Arg 331'in Yerleşimi.....	8
1.4.2.1.3. Yeni Bimetalik Aktif Bölge.....	10
1.4.2.1.4. FBA'nın Fukuloz-1-fosfat Aldolaz ile Karşılaştırılması.....	12
1.5. Aldolazların Bulunduğu Organizmalar.....	12
1.6. FBA'ların Reaksiyon Mekanizmaları.....	15
1.6.1. Sınıf I FBA'ların Reaksiyon Mekanizması.....	15
1.6.2. Sınıf II FBA'ların Reaksiyon Mekanizması.....	15

1.7.	Sınıf I ve Sınıf II Aldolazlar Arasındaki Yapısal İlişkiler.....	17
1.8.	Sınıf I ve Sınıf II Aldolazların <i>in vivo</i> Fonksiyonları.....	18
1.9.	Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri.....	20
1.10.	<i>Anoxybacillus</i> Türlerinin Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	22
1.11.	Endüstride Enzim Kullanımı ve Aldolazların Endüstrideki Yeri.....	24
1.12.	Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Kullanılan Materyaller.....	28
2.1.1.	Cihazlar.....	28
2.1.2.	Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	28
2.1.3.	Enzimler.....	29
2.1.4.	Primerler.....	30
2.1.5.	Kullanılan Suşlar.....	30
2.1.6.	Plazmidler.....	31
2.1.7.	Bilgisayar Programları.....	31
2.1.8.	Sıvı ve Katı Besiyerleri.....	35
2.1.9.	Çözeltiler ve Tamponlar.....	35
2.2.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	38
2.2.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Suşunun Büyütülmesi.....	40
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu.....	40
2.2.3.	Plazmid DNA İzolasyonu.....	41
2.2.4.	DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	42
2.2.5.	Genomik ve Plazmid DNA'larının <i>EcoR</i> I ile Kesimi.....	42
2.2.6.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	42
2.2.7.	DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi.....	43
2.2.8.	DNA Parçalarının pUC 18 Vektörüne Ligasyonu.....	44
2.2.9.	Kompetent Hücre Hazırlanması.....	44
2.2.10.	Transformasyon.....	45
2.2.11.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi.....	45
2.2.12.	DNA Sıralarının İncelenmesi.....	45
2.3.	İnvers PCR ile FBA Geninin Sonunun Yakalanması.....	46
2.3.1.	İnvers PCR İçin Primer Tasarımı.....	46
2.3.2.	Genomik DNA'nın RE'ler ile Kesimi.....	46

2.3.3.	DNA Parçalarının Ligasyonu.....	46
2.3.4.	İnvers Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	48
2.3.5.	PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu.....	49
2.3.6.	PCR Ürünlerinin PGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu.....	50
2.3.7.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon.....	50
2.3.8.	Rekombinant Plazmid İzolasyonu ve Sıra Analizi.....	50
2.4.	FBA Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Genin Ekspresyonu.....	50
2.4.1.	Primer Tasarımı ve Sentezi.....	50
2.4.2.	PCR ile Genin Tamamının Çoğaltılması.....	51
2.4.3.	PCR Ürünlerinin ve pET-28a(+) Vektörünün RE'ler ile Kesimi.....	52
2.4.4.	Genin pET-28a(+) Vektörüne Ligasyonu.....	53
2.4.5.	Rekombinant Plazmidin BL21(DE3)pLysS Hüccesine Transformasyonu ve İzolasyonu.....	53
2.5.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	54
2.5.1.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	54
2.5.2.	Protein Tayini.....	56
2.5.3.	Doğal Jel Elektforezi.....	56
2.5.4.	Substrat ve Commassie Boyaması.....	57
2.5.5.	SDS Jel Elektforezi.....	58
2.6.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolaz Aktivitesinin Tayini.....	59
2.6.1.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	60
2.6.2.	Aldolaz Aktivitesi üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	61
2.6.3.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	61
2.6.4.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	61
2.6.5.	Aldolazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	61
2.6.6.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisinin İncelenmesi.....	62
3.	BULGULAR.....	63
3.1.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	63
3.2.	İnvers PCR ile Genin Sonunun Yakalanması.....	63
3.3.	FBA Geninin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu.....	64
3.4.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Saflaştırılması.....	70
3.5.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	71

3.5.1.	Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu...	71
3.5.2.	Aldolaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu.....	73
3.5.2.1.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	73
3.5.2.2.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	74
3.5.2.3.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	74
3.5.2.4.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	75
3.5.2.5.	Aldolazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	76
3.5.2.6.	Aldolaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisi....	77
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	78
5.	ÖNERİLER.....	85
6.	KAYNAKLAR.....	86



## ÖZET

Bu çalışmada, yeni bir termofilik tür olan *Anoxybacillus gonensis* G2 (*A. gonensis* G2) suşundan fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) geni klonlandı ve protein *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilerek bazı biyokimyasal özellikleri incelendi. Genomik DNA kütüphanesi oluşturularak ve invers polimeraz zincir reaksiyonu ile FBA geninin 861 bp'lik tam DNA sırası elde edildi. Bu sıra, amino asit sırasına (286 aa) çevrildikten sonra BLAST programı ile karşılaştırma yapıldı. Karşılaştırma sonuçlarına göre amino asit sırasının, özellikle *Bacillus* türü sınıf II FBA'lar ile yaklaşık % 80-90 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Gen pET28a(+) vektörüne klonlandı ve protein, *E.coli* BL21(DE3)pLysS suşunda N- ucunda bir histidin kuyruğu ile ekspres edildi. Ekspres edilen protein, nikel kolonu ile saflaştırıldı. Saf protein kullanılarak gerçekleştirilen doğal elektroforez ve FBA'lara spesifik olan aktivite boyaması sonrası kağıt üzerinde mor renkli bir bant oluşumu gözlemlendi. Sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile enzimin ya tersiyer yapılı olduğu ya da aynı molekül ağırlığına sahip birden fazla alt birim içerdiği tespit edildi. Histidin kuyruğu içeren proteinin alt birim ağırlığı 33,3 kDa, histidin kuyruğu içermeyen orijinal proteinin alt birim ağırlığı ise 30,9 kDa olarak hesaplandı. Rekombinant proteinin bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için aktivite testleri gerçekleştirildi. Bu testler sonucunda enzim aktivitesinin optimum sıcaklığının 60 °C, optimum pH'sının ise 8,5 (Tris-HCl, 50 mM) olduğu tespit edildi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde enzimin 30 ve 40 °C'deki inkubasyonlarda aktivitesini 3 saatlik bir zaman diliminde koruduğu, 50 °C'de ise, aktivitesini ilk yarım saatten sonra kaybetmeye başladığı tespit edildi. Fruktoz-1,6-bisfosfat (FBF) substratı varlığında  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırası ile 2,4 µM/dak.mg protein ve 567 µM olarak belirlendi. Metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelendiğinde 1 mM'lık nihai iyon konsantrasyonunda  $Zn^{+2}$ 'nin aktiviteyi 3 kat kadar artırdığı gözlemlendi. Sınıf II aldolazların genel inhibitörü olan etilendiamin tetraasetik asitin (EDTA) 1 mM'lık nihai konsantrasyonu varlığında aldolaz aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar *A. gonensis* G2 suşundan klonlanan FBA'nın sınıf II aldolaz grubuna dahil, ısıl kararlı bir enzim olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Anoxybacillus gonensis*, Klonlama, Fruktoz-1,6-bisfosfat Aldolaz, His-Tag, Metaloenzim

## SUMMARY

### **Cloning, Expression and Characterization of the Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Gene from Thermophilic *Anoxybacillus gonensis* G2 Strain**

In this study, the fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) gene of a novel thermophilic bacteria, *Anoxybacillus gonensis* G2 (*A. gonensis* G2) strain, was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), and then some biochemical properties of the protein were investigated. The whole DNA sequence of the gene was determined by constructing genomic DNA library and performing inverse polymerase chain reaction. Nucleotide-sequence analysis revealed an open reading frame consisting of 861 bp and 286 amino acids. Sequence alignments were done by using BLAST programme. The results showed that amino acid sequence of FBA was similar to the amino acid sequences of FBAs belonging to *Bacillus* species in the ratio of 80-90%. The gene was cloned into pET28a(+) vector and overexpressed with His-tag in *E.coli* BL21(DE3)pLysS strain. The enzyme was purified with nickel column. The native gel electrophoresis was done using the purified protein, and after the activity staining, the purple band was formed on the paper. SDS gel electrophoresis showed that the enzyme was composed of either one subunit or more than one subunit that have the same molecular weight. The calculated subunit molecular weight of the protein with and without his-tag end were 33.3 and 30.9 kDa, respectively. Activity tests were performed for the characterization of the recombinant protein. The optimum temperature and pH were found 60 °C and 8.5 (in the Tris-HCl buffer, 50 mM), respectively. When the thermal stability graphic was investigated, the enzyme protected its activity at 30 and 40 °C for 3 hours. However, it was determined that the enzyme started to lose its activity at 50 °C after 30 minutes.  $V_{max}$  and  $K_m$  values in the presence of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) substrate were calculated as 2,4  $\mu\text{M}/\text{min.mg}$  protein and 567  $\mu\text{M}$  respectively. It was showed that the concentration of 1 mM  $\text{Zn}^{+2}$  increased the activity three times. In case of 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), the activity was lost completely. These results showed that the FBA enzyme cloned from *A. gonensis* G2 strain belongs to the class II aldolase group.

**Key Words:** *Anoxybacillus gonensis*, Cloning, Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase, His-Tag, Metalloenzyme



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolazın katalizlediği reaksiyon.....	2
Şekil 2. Sınıf I aldolazların katalizlediği reaksiyon.....	5
Şekil 3. <i>E. coli</i> FBA'sının ikincil yapısının şematik gösterimi.....	9
Şekil 4. <i>E. coli</i> sınıf II FBA'sının amino asit sırası.....	10
Şekil 5. <i>E. coli</i> FBA dimerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 6. Sınıf I aldolazların reaksiyon mekanizması.....	16
Şekil 7. <i>E. coli</i> sınıf II FBA'sının reaksiyon mekanizması.....	17
Şekil 8. pUC 18 vektörünün, çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijinini, lacZ genini ve ampisilin direnç genini gösteren haritası.....	32
Şekil 9. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, lacZ genini ve ampisilin direnç genini gösteren haritası.....	33
Şekil 10. pET-28a(+) vektörünün replikasyon orijinini, LacI genini, kanamisin direnç genini gösteren haritası ve klonlama/ekspresyon bölgesi.....	34
Şekil 11. <i>A. gonensis</i> G2 genomik DNA'sının <i>EcoR</i> I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi.....	39
Şekil 12. FBA geninin son kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'in şematik gösterimi.....	47
Şekil 13. FBA geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotid sırası.....	51
Şekil 14. Polihis-tag kuyruğu içeren FBA proteininin nikel kolonu ile saflaştırılmasının şematik gösterimi.....	55
Şekil 15. Aldolaz aktivitesinin tayininde izlenen rutin yol.....	60
Şekil 16. pUC-P123'ün restriksiyon analizi.....	63
Şekil 17. İvers PCR ürününün % 1'lik jeldeki görüntüsü.....	64
Şekil 18. <i>A. gonensis</i> G2 genomik DNA'sının FBA'yı içeren parçası.....	65
Şekil 19. PCR ile çoğaltılan FBA geninin % 1'lik jeldeki görüntüsü.....	66
Şekil 20. <i>A. gonensis</i> G2 suşunun FBA geninin DNA ve protein sırası.....	67
Şekil 21. <i>A. gonensis</i> G2 FBA amino asit sırasının Clustal W programı ile bazı organizmaların FBA sıraları ile karşılaştırma sonuçları.....	68
Şekil 22. FBA geninin pET28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi.....	70
Şekil 23. Doğal jel elektroforez analizi.....	71

Şekil 24.	SDS jel elektroforez analizi.....	72
Şekil 25.	Aldolaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	73
Şekil 26.	Aldolaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	74
Şekil 27.	FBF substratı varlığında FBA'nın doyumluk eğrisi.....	75
Şekil 28.	FBF substratı varlığında aldolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi....	75
Şekil 29.	Aldolaz aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi.....	76
Şekil 30.	FBA'nın ısıl kararlılık eğrisi.....	76



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Sınıf I ve sınıf II aldolazların bulunduğu bazı organizmalar.....	13
Tablo 2. Sınıf II aldolazların bulunduğu bazı prokaryotik organizmalar.....	14
Tablo 3. Bazı sınıf I ve sınıf II aldolazların yapısal ve katalitik özellikleri.....	19
Tablo 4. Bazı <i>Anoxybacillus</i> türlerinin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	23
Tablo 5. Kullanılan cihazlar.....	28
Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	28
Tablo 7. Kullanılan enzimler.....	29
Tablo 8. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler.....	30
Tablo 9. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>Escherichia coli</i> suşları.....	30
Tablo 10. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmidler.....	31
Tablo 11. Kullanılan bilgisayar programları ve internet adresleri.....	31
Tablo 12. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları.....	35
Tablo 13. Agaroz jel elektroforezinin yapılışı.....	43
Tablo 14. İnvers PCR bileşenleri.....	48
Tablo 15. İnvers PCR reaksiyon şartları.....	49
Tablo 16. PCR'ın bileşenleri.....	51
Tablo 17. PCR reaksiyon şartları.....	52
Tablo 18. Doğal jel elektroforezinin bileşenleri.....	57
Tablo 19. SDS jel elektroforezinin bileşenleri.....	58
Tablo 20. <i>A. gonensis</i> G2 FBA amino asit sırasının diğer bazı türlerle benzerliği....	66
Tablo 21. Aldolaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi.....	77

## SEMBOLLER DİZİNİ

$\epsilon$	: Molar absorblama katsayısı
[S]	: Substrat konsantrasyonu
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
Å	: Angstrom
aa	: Amino asit
ADL	: Aldolaz
AldP	: Plastidik aldolaz
AldS	: Sitoplazmik aldolaz
amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartat
atm	: Atmosfer
ATP	: Adenozin trifosfat
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumin
CTP	: Sitidin trifosfat
dd H <sub>2</sub> O	: Çift distile su
DERA	: 2-Deoksiriboz-5-fosfat aldolaz
DHAF	: Dihidroksiaseton fosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleozit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FBA	: Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz
FBF	: Fruktoz-1,6-bisfosfat
FucA	: Fukuloz-1- fosfat aldolaz
GAF	: Gliseraldehid-3-fosfat
GDH	: Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz

gDNA	: Genomik DNA
Glu	: Glutamat
His	: Histidin
IPTG	: İzopropiltiyο-β-galaktozid
kDa	: Kilodalton
KDO	: 2-Keto-3-deoksioktanoat aldolaz
$k_{kat}$	: Dönüşüm sayısı
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Lauria-Bertani
LBA	: Lauria-Bertani agar
Lys	: Lisin
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi
mL	: Mililitre
$NAD^+$	: Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş form)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş form)
NanA	: N-asetilnöraminik asit aldolaz
ng	: Nanogram
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
OD	: Optik yoğunluk
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Pikomol
RamA	: Ramnuloz-1-fosfat aldolaz
RBB	: Ribozom bağlanma bölgesi
RE	: Restriksiyon enzimi
rec	: Replikasyon orjini
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SHMT	: Serin hidroksimetiltransferaz
$t_{1/2}$	: Yarılanma ömrü
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TAL	: Transaldolaz
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>

TDFA	: Tagatoz-1,6-difosfat aldolaz
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
T <sub>m</sub>	: Erime sıcaklığı
TPI	: Triozfosfat izomeraz
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
U/L	: Ünite/Litre
UV	: Ultra viyole
V <sub>maks</sub>	: Maksimum hız
X-Gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktozid



## 1.GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

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 bir çok 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.

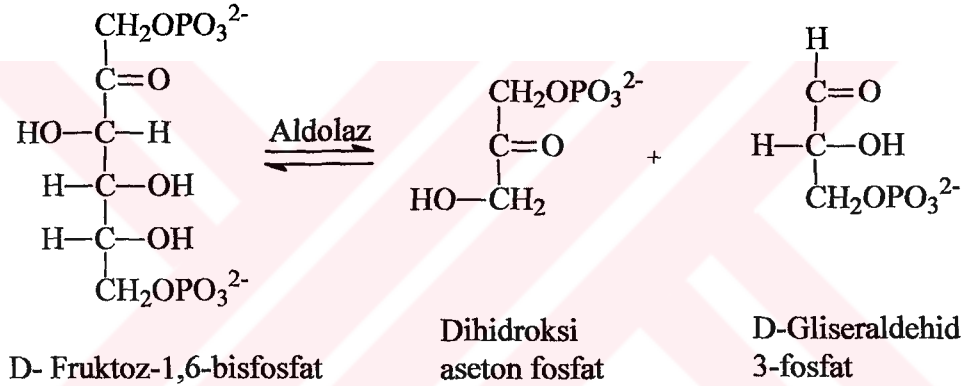
Önemli bir biyomolekül sınıfı olan enzimler, canlı organizmalarda çok önemli görevlere sahip oldukları gibi, kullanıldıkları sağlık, gıda, tekstil, kozmetik ve diğer bir çok alan için de vazgeçilmez olmuşlardır. Endüstriyel alanda, enzim kullanımının bazı avantajları vardır. Bunlar; reaksiyon özgünlükleri, ılımlı reaksiyon şartlarında çalışabilmeleri ve yan ürün oluşturmadıkları için daha az kirliliğe neden olmaları şeklinde ifade edilebilir (Benjamin ve Pandey, 2000). Piyasada ticari olarak çeşitli organizmalardan elde edilen farklı enzimler mevcuttur. Bunlar arasında en çok tercih edilenler, pratikteki eldeleri daha kolay olduğu için genellikle mikrobiyal orijinli olanlardır. Enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan iki özellik; yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaları ve organik çözücülerdeki düşük kararlılıklarıdır. İşte bu noktada termofilik organizmalardan elde edilen enzimler oldukça önemlidir. Çünkü mezofilik homologlarına göre termofilik enzimler, yüksek sıcaklık ve organik çözücülerde oldukça kararlıdır. Bu özellikleri termofilik enzimleri oldukça cazip yapmaktadır (Sauve ve Sygush, 2001).

Bu çalışmanın amacı, yeni bir termofilik bakteriden ısı kararlı fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) kodlayan genin klonlanması, ekspresyonu ve rekombinant enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin karakterize edilmesidir.

Aldolazlar, bir çok metabolik yolda, çeşitli şeker fosfatların aldol parçalanmasını veya kondenzasyonunu katalizler (Fessner, 1998; Henze vd., 1998). Bu sınıf enzimler, C-C bağının oluşumunu ya da kırılmasını katalizlediği için özellikle sentetik kimyada oldukça cazip katalizörlerdir. Yeni şekerlerin sentezinde, antibiyotik tasarımı ve sentezinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Fessner, 1998).

## 1.2. Aldolazların Genel Özellikleri

Bu yüzyılın başlarında, bir enzim sınıfının aldol kondenzasyonu ile üç karbonlu bileşenlerinden tersinir olarak heksoz oluşumunu katalizlediği bilinmekteydi (Meyerhof ve Lohmann, 1934). Orijinal olarak zimoheksaz olarak isimlendirilen ve aldol kondenzasyonunu katalizleyen bu enzimler artık aldolazlar olarak bilinmektedir (Takayama vd., 1997). Aldolazların bir üyesi olan fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA, EC 4.1.2.13) yaşayan organizmalarda glikoliz, glukoneojenez ve Calvin çevrimi için gerekli olan bir enzimdir. FBA, D-fruktoz-1,6-bisfosfatın (FBF) D-gliseraldehid-3-fosfat (GAF) ve dihidroksiaseton fosfata (DHAF) tersinir olarak parçalanmasını katalizler (Şekil 1) (Henze vd., 1998; Sauve ve Sygush, 2001).



Şekil 1. Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolazın katalizlediği reaksiyon

## 1.3. Nükleofilik Substratlarına Göre Aldolazların Sınıflandırılması

Aldolazlar, tipik olarak, nükleofilik substratlarına göre dört ana sınıfta toplanırlar (Takayama vd., 1997; Fessner, 1998).

### 1.3.1. DHAF Bağımlı Aldolazlar

*In vivo* olarak dört DHAF bağımlı aldolaz, DHAF'nin D-gliseraldehid-3-fosfata (GAF) veya L-laktaldehide tersinir asimetrik aldol katılımını katalizler ve her bir reaksiyon C-3 ve C-4'teki stereokimyası diğerleri ile aynı olan tek bir ürün oluşturur. Dört farklı DHAF bağımlı aldolaz vardır; fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA, EC 4.1.2.13),



fukuloz-1- fosfat aldolaz (FucA, EC 4.1.2.17), ramnuloz-1-fosfat aldolaz (RamA, EC 4.1.2.19) ve tagatoz-1,6-difosfat aldolaz (TDFa, EC 4.1.2.40). Bu enzimlerden bugüne kadar en çok çalışılanı fruktoz-1,6-bisfosfat aldolazdır (Wong vd., 1995; Takayama vd., 1997; Fessner, 1998; Machajewski ve Wong, 2000).

### 1.3.2. Piruvat veya Fosfoenol Piruvat Bağımlı Aldolazlar

Piruvat bağımlı aldolazlar *in vivo* katabolik fonksiyonlara sahiptir. Fosfoenol piruvat bağımlı aldolazlar ise ketoasitlerin biyosentezinde kullanılır. Bu gruba örnek olarak N-asetilnöraminik asit aldolaz (NanA, EC 4.1.3.3) ve 2-keto-3-deoksioktanoat aldolaz (KDO, EC 4.1.2.23) verilebilir (Gijsen vd., 1996; Takayama vd., 1997; Fessner, 1998).

### 1.3.3. Asetaldehid Bağımlı Aldolazlar

Asetaldehid bağımlı aldolazların tek örneği olan 2-deoksiriboz-5-fosfat aldolaz (DERA, EC 4.1.2.4) *in vivo* olarak 2-deoksiriboz-5-fosfat oluşturmak için, asetaldehid ve D-gliseraldehid-3-fosfatın tersinir aldol reaksiyonunu katalizler (Chen, 1992; Gijsen ve Wong, 1995; Takayama vd., 1997; Fessner, 1998).

### 1.3.4. Glisin Bağımlı Aldolazlar

Glisin bağımlı aldolazlar,  $\beta$ -hidroksi- $\alpha$ -amino asit oluşturmak için, glisinin bir aldehidle tersinir aldol reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. İki tip glisin bağımlı aldolaz bulunmuştur; serin hidroksimetiltransferaz (SHMT, EC 2.1.2.1) ve L-treonin aldolaz (EC 4.1.2.5) (Takayama vd., 1997; Fessner, 1998).

## 1.4. Reaksiyon Mekanizmalarına Göre Aldolazların Sınıflandırılması

Reaksiyon mekanizmalarına göre aldolazlar sınıf I ve sınıf II olmak üzere iki grupta toplanır (Cooper vd., 1996; De Montigny ve Sygusch, 1996; Imanaka vd., 2002). Bu iki sınıf enzim aynı katlanma yapısına sahiptir, aynı enzimatik reaksiyonu katalizler ve alt birimlerinin molekül ağırlıkları yaklaşık 30-40 kDa arasındadır. Fakat birincil yapılarında önemli bir sıra benzerlikleri yoktur, dördüncül yapıları ve paralelinde de molekül

ağırlıkları birbirinden farklıdır. Ayrıca bu iki sınıf aldolaz enzimi farklı pH profilleri, reaksiyon mekanizmaları ve substrat spesifitesine sahiptir (Blom vd., 1996; De Montigny ve Sygusch, 1996; Plaumann vd., 1997; Imanaka vd., 2002).

Genellikle bir çok organizmada yalnızca bir sınıf FBA fonksiyoneldir, fakat bazı ökaryotik ve bakteriyal hücrelerde her iki sınıfta bulunur. Bu durumda bunlardan sadece bir tanesi ekspres edilir (Marsh ve Leberherz, 1992) .

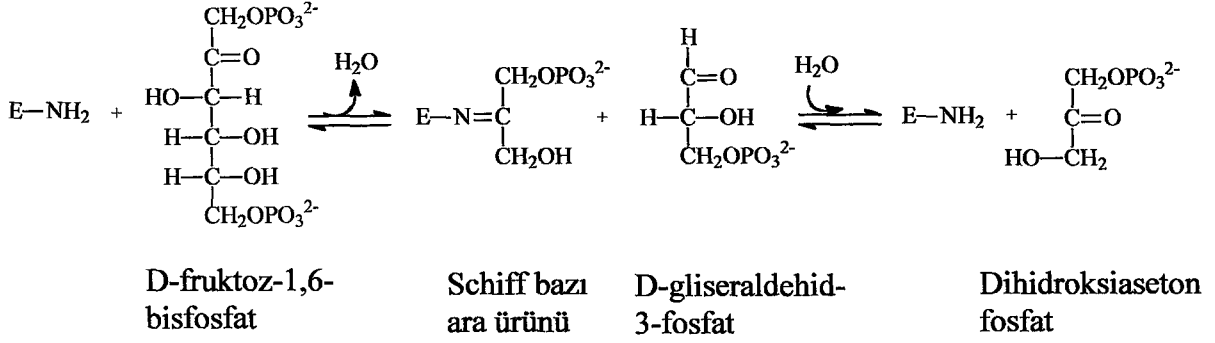
*Escherichia coli* ve *Mycobacterium tuberculosis* her iki sınıf enzimi kodlayan nadir organizmalardandır (Stribling ve Perham, 1973; Bai vd., 1974). *E. coli*'de yapılan son çalışmalar sınıf I enziminin daha önce *E. coli* dehidrin geni (*dhn A*) olarak adlandırılan bir gen tarafından kodlandığını ortaya çıkarmıştır (Thomson vd., 1998). *E. coli* ve diğer prokaryotlardaki sınıf II aldolazlar hayati bir gendir ve sürekli olarak ekspres edilir. Oysaki aynı organizmalardaki sınıf I aldolazlar hayati öneme sahip değildir ve ekspresyonları glukoneojenetik substratlar varlığında indüklenmektedir (Stribling ve Perham, 1973).

Sınıf I aldolazlar hakkında yeterli bilgi olmasına rağmen, sınıf II aldolazlar hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Sınıf II aldolazlar sınıf I'lerden daha kararlı olduğu için (oda sıcaklığında mikrobiyal enzim için  $t_{1/2} = 60$  gün, tavşan kas aldolazı için  $t_{1/2} = 2$  gün) kullanım alanları bakımından daha caziptir (De Montigny ve Sygusch, 1996).

#### 1.4.1. Sınıf I Aldolazlar

Sınıf I aldolazlar aktif bölgelerinde bulunan bir lizin biriminin  $\epsilon$ -amino grubu ile substratın C-2 karbonil grubu arasında kovalent bir Schiff bazı ara ürünü oluşumu ile reaksiyonu katalizler (Şekil 2) (Rutter, 1964; Morse ve Horecker, 1968; Witke ve Götz, 1993).

Bu sınıf enzimler; yüksek organizmalarda (hayvanlar, bitkiler), yeşil yosunlarda, protozoa ve bazı prokaryotlarda bulunur ve alt birimleri  $(\alpha/\beta)_8$  katlanma yapısına sahiptir (Cooper vd., 1996; Sauve ve Sygush, 2001). Bu katlanma yapısı ilk olarak triozfosfat izomerazda tespit edilmiştir (Banner vd., 1975) ve proteinlerde en sık bulunan katlanma yapısıdır (Branden, 1991).



Şekil 2. Sınıf I aldolazların katalizlediği reaksiyon (Jia vd., 1996).

#### 1.4.1.1. Ökaryotik Sınıf I Aldolazlar

Birçok ökaryotik organizmadan sınıf I aldolazlar izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu enzimler ökaryotlarda daima homotetramerik yapıdadır. Alt birim ağırlıkları yaklaşık 40 kDa ve enzimin molekül ağırlığı ise yaklaşık 160 kDa'dır. Bu gruba dahil olan ve yapısı tam olarak belirlenmiş aldolaz enzimine en iyi örnek tavşan kasından elde edilendir. Tavşan kas aldolazı, her bir alt biriminde 363 amino asit bulunan bir homotetramerdir ve  $\alpha/\beta$  katlanma yapısına sahiptir (Sygusch vd., 1987). Reaksiyonun katalizlenmesi için gerekli olan Schiff bazı oluşumu, substrat ile enzimin birincil yapısındaki bir lizin birimi (Lys 229) arasında kovalent bağlanma ile gerçekleşir. Bu enzim günümüzde ticari olarak firmalar tarafından üretilmekte ve bir çok alanda kullanılmaktadır. Farklı ökaryotik organizmalardan elde edilen ondan fazla aldolaz enziminin amino asit sıralarının karşılaştırılması sonucu, aktif bölgeler de dahil olmak üzere bu izoenzimlerin büyük bir benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. İnsan kas aldolazı ile tavşan kas aldolazı arasında 363 amino asitten sadece 4 tanesinin farklı olduğu belirlenmiştir (Gefflaut vd., 1995).

Memeliler üç farklı aldolaz izoenzimine sahiptir. Bu üç izoform; baskın olarak kasta bulunan ve glikolizde kullanılan aldolaz A; karaciğerde, böbrekte, dalakta, bağırsakta bulunan ve glukoneojenezde kullanılan aldolaz B; beyin ve sinir hücrelerinde bulunan aldolaz C'dir (Leberherz ve Rutter, 1969; Inoue vd., 1997). Bu üç aldolaz enziminin her biri, yetişkin dokularında, doku spesifik olarak farklı genler tarafından ekspres edilir (Hikasa vd., 1997). Molekül ağırlıkları 160 kDa'dur ve homotetramerik yapıdadırlar (Kuba vd., 1997). DNA ve amino asit sıralarının karşılaştırılması sonucu aldolaz A ve C'nin birbirine benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Berardini vd., 1997). Buna paralel olarak aldolaz A ve C

substrat olarak FBF'yi kullanırken, aldolaz B FBF'ye ilave olarak fruktoz-1-fosfatı da kullanmaktadır (Hodgson ve Plaxton, 1998). Aldolaz B fruktoz-1-fosfatı kullandığı için fruktoz metabolizmasında da kullanılır. Bu yüzden insanlardaki kalıtsal fruktoz intoleransı aldolaz B geninde meydana gelen mutasyonların sebep olduğu bir hastalıktır ve fruktozun organizmada metabolize edilememesinden kaynaklanır (Llewellyn vd., 1998). Yapılan istatistiklere göre doğan her 20.000 bireyden birinde bu hastalık görülmektedir. Bazı durumlarda öldürücü olmasına rağmen sıkı bir diyetle tedavi edilebilir. Bu hastalık ve tedavisi ile ilgili hem aldolaz B geni, hem de bu genin mutantları üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Malay vd., 2002).

Ayrıca yüksek bitkilerde de aldolaz enzimleri karakterize edilmiştir (Krüger ve Schnarrenberger, 1983; Lebherz ve Bradshaw, 1984; Lebherz vd., 1984). Aldolazlar fotosentetik karbon indirgenme döngüsünde yer alır ve GAF ve DHAF'den FBF'nin sentezini katalizler. Aldolaz geninin ekspresyonu ışıkla regüle edilmektedir, fakat diğer çevresel etkenlerin bu enzim üzerine etkisi bilinmemektedir. Yüksek bitkilerde aldolazlar iki izoenzim olarak bulunurlar. Bunlardan biri kloroplastlarda bulunan plastidik aldolaz (AldP), diğeri de sitozolde bulunan sitoplazmik aldolazdır (AldS) (Gross vd., 1999). *AldS* geni anaerobik şartlar altında indüklenir ve bu şartlar altında glikolizin uyarılması ile adenozin trifosfat (ATP) üretiminde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Yamada vd., 2000). Yeşil yosunlar ise genellikle benzer iki aldolaz enzimine sahiptir, fakat bazen sitozolik izoenzimi görülmez (Gross vd., 1999).

#### 1.4.1.2. Prokaryotik Sınıf I Aldolazlar

Sınıf I FBA'ların prokaryotik organizmalarda mevcudiyeti ilk olarak 1970'li yılların başlarında rapor edilmiş (Lebherz ve Rutter, 1973; Stribling ve Perham, 1973) ve incelemeler sınıf I aldolazların geniş bir prokaryotik hayat formunda ekspres edildiğini göstermiştir (Fischer vd., 1982).

Prokaryotlardaki sınıf I aldolazlar monomerikten dekameriğe kadar farklı yapılar oluşturur ve katalitik özellikleri ökaryotik aldolazlardan farklıdır (Cooper vd., 1996; Plaumann vd., 1997; Thomson vd., 1998). Jia ve arkadaşları (1996) sınıf I aldolaz grubuna ait olan dimerik *E. coli* transaldolaz B'nin, Izard ve arkadaşları (1994) trimerik bakteriyal fosfoglukonat aldolazın yapılarını aydınlatmışlardır.

### 1.4.2. Sınıf II Aldolazlar

Sınıf II aldolazlar metaloenzimlerdir. Katalitik mekanizmalarında elektrofil olarak divalent bir katyona (genellikle  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  veya  $Co^{+2}$ ) ihtiyaç duyarlar (Rutter, 1964) ve aktiviteleri etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ile inhibe edilir (Harris vd., 1969; Horecker vd., 1972).

Bu sınıf enzimler bakteri, mantar, protozoa, maya ve bazı yosunlarda bulunur (Rutter, 1964; Plaumann vd., 1997). Belirlenen ilk sınıf II aldolaz yapısı *E. coli* fukuloz-1-fosfat aldolazdır (FucA) ve mekanizması diğer sınıf II enzimlerden farklıdır (Fessner vd., 1996). Tetramer olan *Thermus aquaticus* (Freze ve Brock; 1970), *Anacystis nidulans* ve *Saprosira thermalis*'de (Willard ve Gibbs; 1968) bulunanlar hariç bu enzimler genellikle homodimerik yapıdadırlar ve toplam molekül ağırlıkları yaklaşık 60-80 kDa civarındadır. Ekstratermofil olan *T. aquaticus* FBA'sı molekül ağırlığı 132 kDa olan ve her bir alt birimin ağırlığı 33 kDa olan bir tetramerdir (Sauve ve Sygusch; 2001). Sınıf II aldolazlar sınıf I aldolazlarla sadece %15 sıra benzerliği gösterir (Naismith vd., 1992).

Şimdiye kadar en çok çalışılan sınıf II aldolaz enzimine sahip prokaryot, termofilik bir bakteri olan *Bacillus stearothermophilus*'tur (sinonimi *Geobacillus stearothermophilus*) (Thompson ve Thompson, 1962). *B. stearothermophilus*'un sınıf II aldolaz geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu enzim molekül ağırlığı 60,6 kDa olan ve her bir alt birimde bir çinko iyonu içeren bir dimerdir. Enzim, 70 °C'de maksimum aktivite göstermektedir. Aktivitesi EDTA ile inhibe,  $K^+$  ile aktive edilmektedir (De Montigny ve Sygusch, 1996; Sugimoto ve Nosoh, 1971). Sınıf II aldolazlar memelilerde bulunmadığı için antibakteriyal ilaçlar için hedef moleküller olarak kullanılabilir (Blom vd., 1996; Fessner vd., 1996). Bu yüzden bu enzimlerin mekanizmalarını ve yapılarını anlamak oldukça önemlidir.

Yapısal kriterler ve sıra bilgilerine dayanarak sınıf II enzimler tip A ve tip B olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Tip A enzimleri dimerik yapıya, tip B enzimleri ise dimerik, tetramerik veya oktamerik yapılardan birine sahip olabilir (Plaumann vd., 1997; Sauve ve Sygusch; 2001). Bu iki grup aldolaz enziminin meydana getirdiği taksonomik dağılım henüz açıklanamamıştır. Birçok öbakteri ve arkebakterideki aldolazlar bu sınıflardan birine dahildir (Marsh ve Lebherz, 1992).

### 1.4.2.1. Sınıf II FBA'ların Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

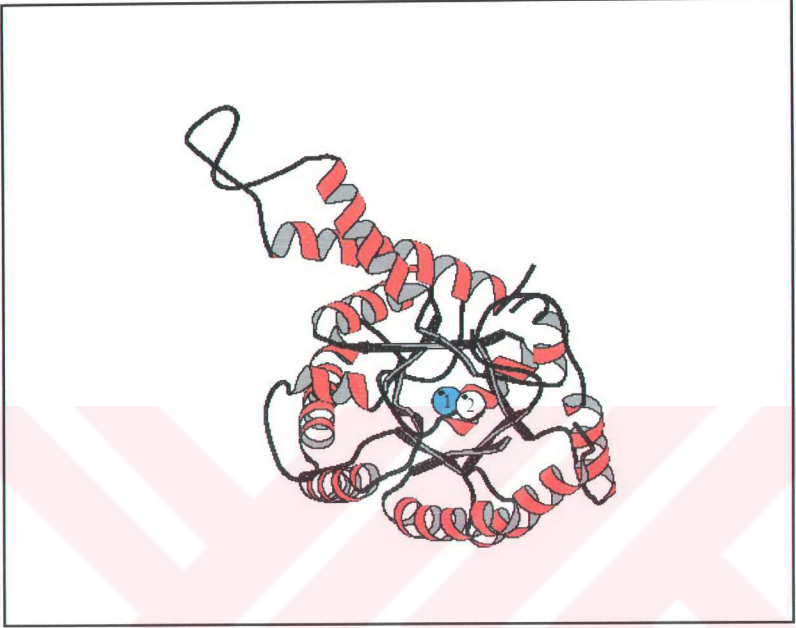
Enzimlerin reaksiyon mekanizmalarını anlayabilmek, yapılarını ortaya koymak ve kullanım alanları için kristallendirme, yapısal analiz ve bölgesel mutasyon çalışmaları oldukça önemlidir. 1900'lü yılların başlarından beri bilinen aldolazlarla ilgili günümüze kadar yapı ve mekanizma ile ilgili birçok yayın rapor edilmiştir. Burada anlatılan *E. coli* sınıf II FBA'nın yapısal özellikleridir (Cooper vd., 1996).

#### 1.4.2.1.1. Birincil Yapı

Altbirimi, birçok farklı tip proteinde bulunan  $(\alpha/\beta)_8$  katlanma yapısıdır. Yapının çapı yaklaşık 45 Å ve yüksekliği 25 Å'dur (Şekil 3). Yapının iç göbeği daireseldir. İkincil yapı elementleri Şekil 4'teki amino asit sırası üzerinde gösterilmektedir. Modeldeki birimlerin yaklaşık %47'si  $\alpha$ -sarmal yapısında ve %18'i  $\beta$ -katlanma yapısındadır. Göbek yapısı sekiz paralel  $\beta$  yapısından oluşur.  $\beta$  tabakalarının etrafında  $\alpha$ -sarmal yapıları yer almaktadır.  $\alpha$  11 sarmalı substratın bağlanmasında kritik bir role sahip olan bir arginin birimini (Arg 331) içerir. Diğer  $\alpha/\beta$  katlanma yapılarında olduğu gibi aktif bölge C-terminal ucundaki çukura yerleşmiştir (Cooper vd., 1996).

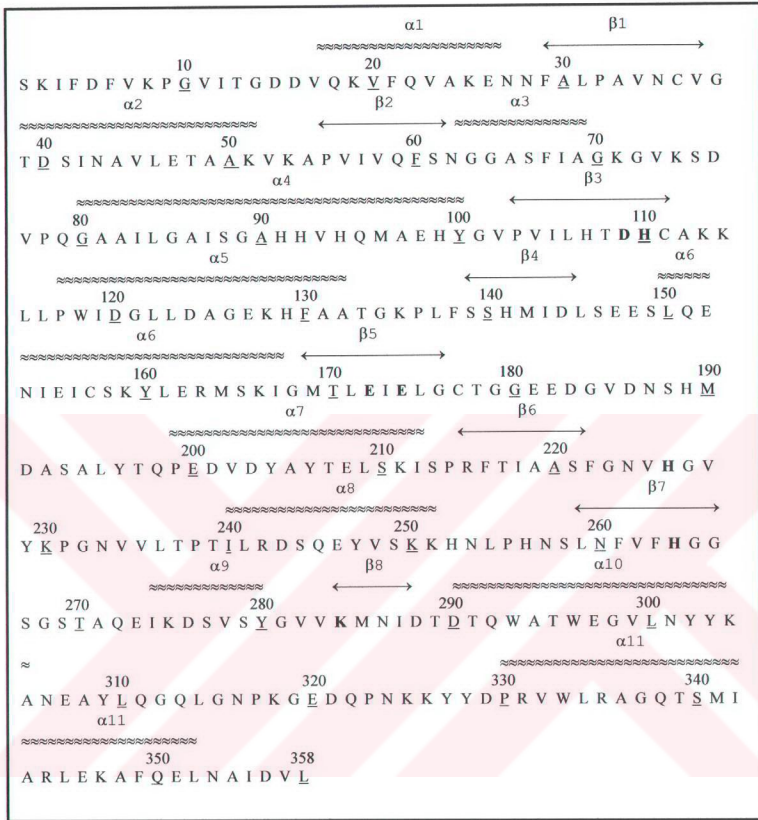
#### 1.4.2.1.2. Dimer Oluşumu ve Arg 331'in Yerleşimi

Sınıf II FBA'ların çoğu homodimer olarak fonksiyon görürler. Dimer yaklaşık olarak 100 Å uzunluğundadır (Şekil 5). Dimeri kararlı kılmak için önemli olan iç altbirim etkileşimlerinin hepsi sarmal-sarmal etkileşimleridir. En son iki sarmal olan  $\alpha$  10 ve  $\alpha$  11 yapıları birbirine antiparalel yönlenmişlerdir. Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağlarına ilave olarak Arg 344 ve bir aspartat amino asidi (Asp 290) arasındaki tuz köprüsü ile iki alt birim birbiriyle etkileşir. Ayrıca dimerizasyonun sağlanmasında her bir alt birimdeki  $\alpha$  4 sarmallarının birbiriyle etkileşimi de önemlidir (Cooper vd., 1996).



Şekil 3. *E. coli* FBA'sının ikincil yapısının şematik gösterimi. Metal iyonları mavi (1) ve beyaz (2) dairelerle gösterilmiştir (Cooper vd., 1996).

Bölgesel mutasyon çalışmaları substratı tanıma açısından Arg 331 biriminin oldukça önemli olduğunu ortaya koymuştur (Qamar vd., 1996). Bu birim sınıf II FBA'larda kesin olarak korunmuştur ve GAF'yi oluşturan FBF'nin C-6 fosfatının enzime bağlanması ile ilişkisi vardır. Kristal yapı çalışmaları, bu bölgenin altbirimdeki  $\alpha$  11 sarmalının N-terminal ucunda bulunduğunu ve aktif bölgenin içine yönelmiş olduğunu göstermektedir. Dimer oluşumu, Arg 331'in diğer alt birimdeki aktif bölgeye GAF'nin bağlanmasını sağlayacak bir şekilde yerleşimini sağlar. Bu yüzden DHAF bileşiği katalitik çinko iyonunun bulunduğu ikinci metal bölgesine yakın olan aktif bölgenin diğer ucuna yerleşecektir (Cooper vd., 1996).



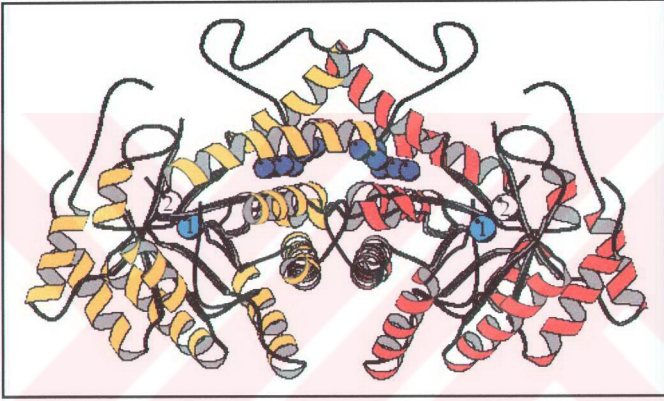
Şekil.4. *E. coli* sınıf II FBA'sının amino asit sırası.  $\beta$  zincirleri  $\longleftrightarrow$  ile,  $\alpha$  sarmalları ise  $\sim\sim\sim$  ile gösterilmektedir. Her bir on birimdeki amino asitlerin altı çizilmiştir ve metal ligandları koyu yazılmıştır (Cooper vd., 1996).

#### 1.4.2.1.3. Yeni Bimetalik Aktif Bölge

( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> katlanma yapısına sahip enzimlerin aktif bölgeleri birçok biyokimyasal reaksiyonda kullanılır (Branden, 1991) ve bu aktif merkezler içinde ya tek, ya da daha fazla metal iyonunu kullanarak bağlanma bölgesi oluşturan birçok protein vardır. Ne var ki, diğer metaloenzimlerin bazı yapısal özellikleri ile benzerlikleri olmasına rağmen *E. coli* sınıf II aldolazlar yeni bir metalik-bağlanma bölgesi içerir. M1 olarak isimlendirilen



bölgede bir metal iyonu içe gömülmüş durumdadır, M2 olarak isimlendirilen bölgede ise diğer metal iyonu aktif bölgenin yüzeyinde olacak şekilde organize olmuştur (Şekil 5). Her iki metal iyonunun özelliklerinin tam olarak belirlenememesine rağmen, M2 metalinin katalitik çinko olduğu bilinmektedir. M1 ise potasyum veya çinko ya da başka bir katyon olabilir. Aldolazlar özellikle potasyum olmak üzere monovalent katyonlarla aktive olurlar. Aktif bölgedeki  $Zn^{2+}$  iyonu üç histidin (His 110, His 226 ve His 264) ve bir glutamik asit (Glu 172) birimleriyle koordine olmuş bir yapıdadır (Cooper vd., 1996).



Şekil 5. *E. coli* FBA dimerinin şematik gösterimi. Bir altbirimdeki sarmallar kırmızı kurdele şeklinde, diğer altbirimdeki sarmallar ise yeşil kurdele şeklinde gösterilmektedir.  $\beta$  tabakalar ve ilmekler siyahla gösterilmektedir. Arg 331 koyu mavi ile, metal iyonlarının bağlandığı 1 (M1) ve 2 (M2) pozisyonları sırası ile mavi ve beyazla gösterilmektedir (Cooper vd., 1996).

Çinko içeren enzimler metal sayılarına göre iki sınıfa ayrılırlar; tekli çinko sistemleri (Vallee ve Auld, 1990) ve son dönemlerde belirlenen ortak katalitik veya ortak aktif bölgeler (Vallee ve Auld, 1993). Bu son grup enzimler iki veya daha fazla metal iyonu içerir. *E. coli* sınıf II aldolazlar bu sınıfa dahildir ve iki metal bölgesine sahiptir. Bir histidin birimi (His 264) bu iki metal arasında köprü görevi görmektedir. Bu yapı bakır-çinko içeren süperoksit dismutaz yapısına oldukça benzerdir (Tainer vd., 1982).

#### 1.4.2.1.4. FBA'nın Fukuloz-1-fosfat Aldolaz ile Karşılaştırılması

*E.coli*'de yapısı şimdiye kadar belirlenen diğer bir sınıf II aldolaz fukuloz-1-fosfat aldolazdır (FucA) (Dreyer ve Schulz, 1993). Bu enzim bir homotetramerdir ve alt biriminin molekül ağırlığı yaklaşık 28 kDa'dur. Bu farklı katlanmalar sınıf II aldolazların iki alt gruba ayrıldığını göstermektedir ki bunlar; her bir alt birimde tek bir çinko bağlanma bölgesi içeren dimerik, tetramerik, oktamerik yapılar (Tip B) ve her bir alt birimde bimetalik bağlanma bölgesi içeren dimerik yapılarıdır (Tip A). Bu nedenle, Sınıf II aldolazlar tek metal içeren (demir veya mangan) enzimler ve bimetalik bakır-çinko içeren enzimler olmak üzere ikiye ayrılan süperoksit dismutazlarla analogdurlar (Tainer vd., 1982).

Her bir FucA alt biriminin aktif bölgesi FBA'nın M2 metalinde olduğu gibi üç histidin ve bir glutamik asit birimlerini kullanarak bir çinko atomunu bağlar. Substrat özgüllüklerinin farklı olmasına rağmen, bu iki enzim arasındaki yapısal ve reaksiyon mekanizmasının benzerliğinden dolayı her ikisinin de aynı mekanizmayı kullandığı ortaya çıkmıştır. Her iki enzimde de çinko Lewis asidi görevini görmektedir ve kesim veya kondenzasyon reaksiyonu için hazır olan ketoz substratının karbonil bağı polarize etmektedir (Cooper vd., 1996).

### 1.5. Aldolazların Bulunduğu Organizmalar

Aldolazlar, canlı sistemlerde oldukça önemli olan glukoz metabolizmasının bir enzimi olduğu için bu enzim hakkında yapılan çalışmalar oldukça eskiye dayanmaktadır. Günümüze kadar aldolazlar ökaryotik ya da prokaryotik birçok organizmada incelenmiştir. Genel hatları ile yapılan çalışmalar farklı organizmalardan bu enzimi kodlayan genin klonlanması, protein sırasının belirlenmesi, yapısal ve katalitik özelliklerinin ortaya konulması ve farklı organizmalardaki aldolaz genleri ile karşılaştırılmasını içermektedir.

İnsan (Sakakibara vd., 1985), siçan (Joh vd., 1985), fare (Stauffer vd., 1990), tavuk (Burgess ve Penhoet, 1985), kurbağa (*Xenopus laevis*) (Atsuchi vd., 1994), balık (*Sparus aurata*) (Llewellyn vd., 1995) ve lamprey (*Entosphenus japonicus*) (Zhang vd., 1995) gibi omurgalılarda ayrıca omurgasız bir canlı olan meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) (Kai vd., 1992) sınıf I aldolaz geninin moleküler klonlanması ve yapısal analizi gerçekleştirilmiştir. Aldolaz genleri mısır (*Zea mays*) (Kelly ve Tolan, 1986), pirinç

(Tsutsumi vd., 1994), ispanak (Pelzer-Reith vd., 1993) gibi bitkilerde, ayrıca yosun (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Schnarrenberger, vd., 1994) ve protozoada da (*Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*) (Clayton, 1985; Knapp vd., 1990) klonlanmış ve karakterize edilmiştir.

Ayrıca bu enzim çok geniş bir prokaryotik organizma türünde de incelenmiştir. Tablo 1'de sınıf I ve sınıf II aldolazların bulunduğu bazı organizmalar, Tablo 2'de sınıf II aldolazların Tip A ve Tip B gruplarının bulunduğu bazı prokaryotik organizmalar verilmiştir.

Tablo 1. Sınıf I ve sınıf II aldolazların bulunduğu bazı organizmalar (Marsh ve Leberz, 1992).

Arkebakteriler	
Sınıf I	Sınıf II
<i>Halobacterium saccharovorum</i> <i>Halobacterium R-113</i> <i>Halobacterium vallismortis</i> <i>Halobacterium CH-1</i>	<i>Halobacterium halobium</i> <i>Halobacterium mediterranei</i> <i>Halobacterium volcanii</i>
Sınıf I ve Sınıf II	
Literatür bilgisi yok	
Ökaryotlar	
Sınıf I	Sınıf II
Hayvanlar Bitkiler Protozoa Yosunlar	Maya Mantar
Sınıf I ve Sınıf II	
<i>Euglena</i> <i>Chlorella</i> <i>Chlamydomonas</i> <i>Chondrus</i> <i>Ochromonas</i>	

Tablo 1'in devamı.

Öbakteriler	
Sınıf I	Sınıf II
<i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Staphylococci</i> <i>Peptococci</i>	Mavi-yeşil yosunlar <i>Reptococci</i> <i>Staphylococcus caseolyticus</i> <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>
Sınıf I ve Sınıf II	
<i>Staphylococci</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Escherichia coli</i>	

Tablo 2. Sınıf II aldolazların bulunduğu bazı prokaryotik organizmalar (Henze vd., 1998).

Tip A	Tip B
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Euglena gracillis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	<i>Xanthobacter flavus</i> <i>Rhodobacter spheroides</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Vibrio furnissii</i> <i>Aquifex aeolicus</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Thermus aquaticus</i>

## 1.6. FBA'ların Reaksiyon Mekanizmaları

### 1.6.1. Sınıf I FBA'ların Reaksiyon Mekanizması

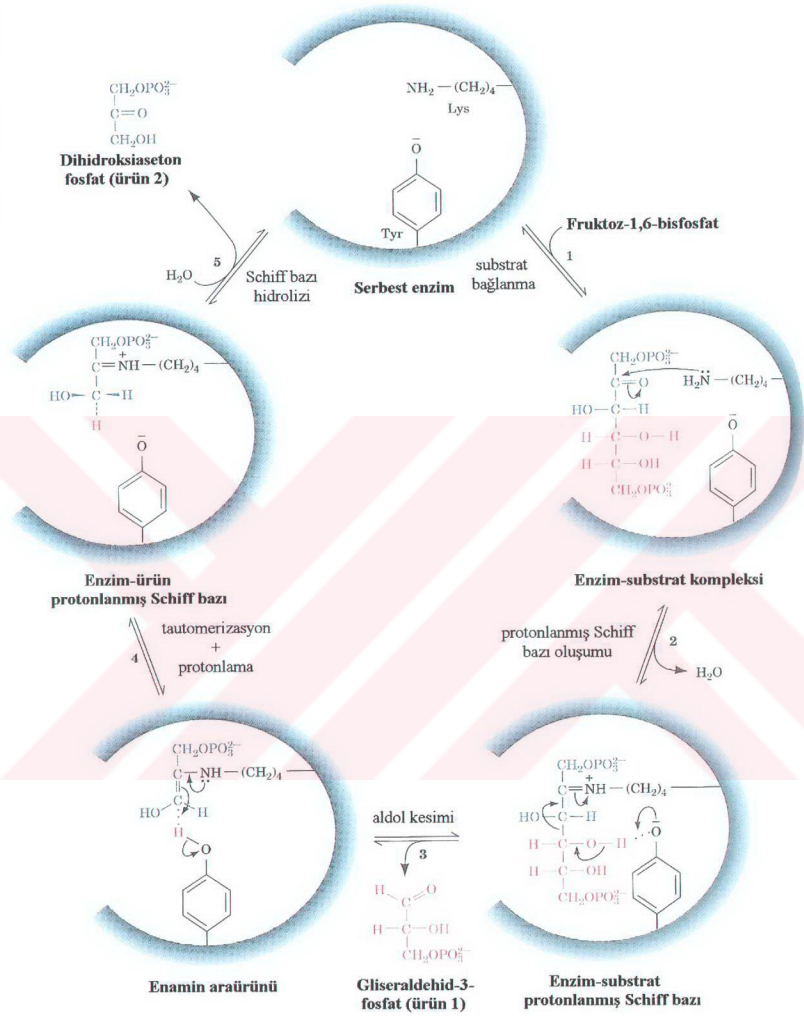
Bu gruptaki FBA'lar benzer bir mekanizma ile reaksiyonu katalizlerler. Burada gösterilen mekanizma genel olmakla birlikte tavşan kası fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz enziminin reaksiyon mekanizmasıdır (Gefflaut vd., 1995; Voet vd., 1999). Bu mekanizma tersinirdir ve FBF'nin GAF ve DHAF'ye parçalanması yönünde açıklanmıştır (Şekil 6).

İlk basamakta kovalent olmayan etkileşimlerle substrat enzime bağlanır. İkinci basamakta FBF'nin karbonil grubu, aktif bölgedeki lizin amino asidinin  $\epsilon$ -amino grubu ile reaksiyonu sonucu bir iminyum katyonu (protonlanmış Schiff bazı olarak da isimlendirilir) oluşur. Üçüncü basamakta ise C3-C4 bağının kırılması ile bir enamin ara ürünü oluşur. Dördüncü adımda enamin araürünü bir iminyum katyonuna protonlanır. Son basamak olan beşinci basamakta oluşan iminyum katyonu hidrolizlenerek DHAF'yi açığa çıkarır ve enzim serbest formuna geri döner (Voet vd., 1999).

### 1.6.2. Sınıf II FBA'ların Reaksiyon Mekanizması

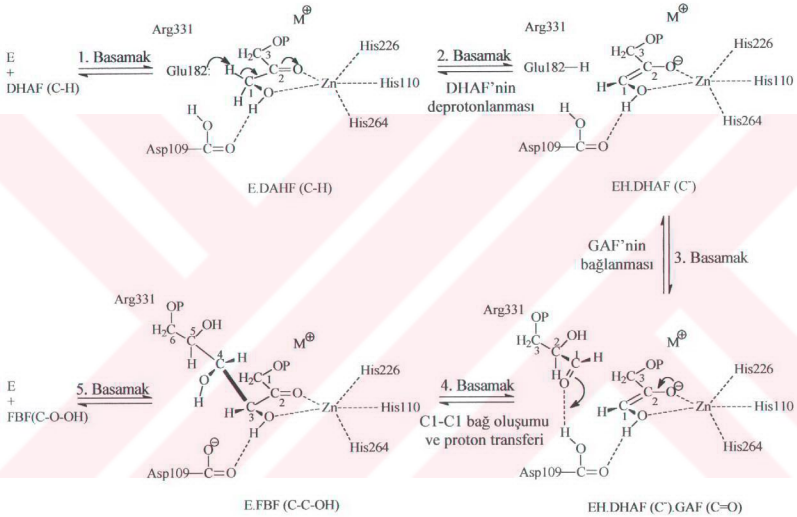
FBA'nın katalizlediği aldol kondenzasyonunda üç önemli kovalent değişiklik olur. Birincisi DHAF'deki C1-H protonunun enediolat oluşumu için ayrılmasıdır. İkincisi, DHAF C1 ile GAF C1 karbonlarının kovalent olarak bağlanması ile C-C bağının oluşumudur ki, bu ayrıca FBF'nin C3-C4 bağını oluşturur. Üçüncü kovalent değişiklik ise FBF'nin tam olarak sentezi için C4=O'nun C4-O-H'ye dönüştüğü ikinci proton transferidir (Hall vd., 1999).

Burada açıklanan mekanizma, *E. coli* sınıf II FBA'nın kondenzasyon yönündeki mekanizmasıdır ve mutasyon çalışmalarına dayanmaktadır (Şekil 7). Çinkoya bağlı olan histidinlerin yeniden düzenlenmesi ile gömülü pozisyonundaki çinko iyonu substratın karbonil grubunu polarize etmek için açığa çıkar. Enzimdeki bu değişikliklerden sonra DHAF öncelikle enzime bağlanır. Sonra DHAF kataliz esnasında aktif bölgenin üzerine yakın olan esnek loplardan birinde bulunan korunmuş bir glutamat birimi (Glu 182) tarafından deproton edilir. Bir asparagin birimi (Asn 286) oluşan enediolat karbon iyonu



Şekil 6. Sınıf I aldolazların reaksiyon mekanizması (Voet vd., 1999).

ara ürününü kararlı kılar. Bunu GAF'nin bağlanması ve GAF'nin karbonil grubunun bir aspartik asit birimi (Asp 109) tarafından polarizasyonu takip eder. Daha sonra enediolat nükleofil ve karbonil alıcısı arasında bir C-C bağı oluşur, GAF'nin karbonil grubu Asp 109 tarafından protonlandırılır ve FBF açığa çıkar. Bu mekanizmadaki tüm basamaklar tamamen tersinirdir ve fonksiyonel tüm amino asit birimleri başlıca bakteri, mantar, yosun ve protozoalarda bulunan sınıf II FBA'lar içinde korunmuştur ( Hall vd., 1999; Plater vd., 1999).



Şekil.7. *E. coli* sınıf II FBA'nın reaksiyon mekanizması (Hall vd., 1999).

### 1.7. Sınıf I ve Sınıf II Aldolazlar Arasındaki Yapısal İlişkiler

Bazı sınıf I ve sınıf II aldolazların önemli yapısal ve katalitik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir. Bu tabloda da gösterildiği gibi her bir sınıf aldolaz hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda ekspres edilebilir.

Sınıf I aldolazlar, geniş bir ökaryotik organizma grubundan izole edilip karakterize edilmiştir. Bu enzimlerin hepsi karboksi ucunda maksimum katalitik aktivite için gerekli olan bir tirozin birimine sahiptir (Rutter,1964; Morse ve Horecker, 1968). Günümüzde,

sınıf I prokaryotik aldolazlar hakkında detaylı yapısal bilgiler sınırlıdır. Buna rağmen, yapısal ve katalitik özellikleri açısından, prokaryotik ve ökaryotik sınıf I aldolazlar arasında bazı önemli farklılıklar olduğu bilinmektedir (Tablo 3). Örneğin, prokaryotik enzimler, altbirim büyüklüğü ve dördüncül yapılarında önemli farklılıklar gösterir. Ayrıca prokaryotik sınıf I aldolazlar, ökaryotik sınıf I aldolazlar için karakteristik olan ve karboksi ucunda bulunan fonksiyonel bir tirozin birimine sahip olmayabildiği için, katalitik aktivitelerinin genelde karboksi peptidaz muamelesine hassas olmadığı tespit edilmiştir. Farklı ökaryotik ve prokaryotik organizmalardan elde edilen sınıf I enzimlerin amino asit sıralarının karşılaştırılması sonucu bu iki grup aldolaz yapısının birbirinden farklı olduğu önerilmiştir (Marsh ve Lebherz, 1992).

Prokaryotik ve ökaryotik sınıf II aldolazlar üzerinde yapılan çalışmalar bu enzimlerin yapısal ve katalitik özellikleri bakımından oldukça benzer olduklarını göstermiştir (Tablo 3). Prokaryotik (*E.coli*) ve ökaryotik (maya) sınıf II aldolazların amino asit sıralarının karşılaştırılması sonucu, bu proteinlerin amino asit sıraları bakımından birbirlerine benzer oldukları açıkça gösterilmiştir (Schwelberger vd., 1989). Diğer yandan, bilinen kaynaklardan sınıf I ve sınıf II aldolazlar arasındaki sıra karşılaştırmaları, iki tip arasında önemli bir sıra benzerliği olmadığını ortaya koymuştur (Alefounder vd., 1989).

### 1.8. Sınıf I ve Sınıf II Aldolazların *in vivo* Fonksiyonları

FBA'lar ve benzeri enzimler katabolik yol olan glikolitik yol dışında, anabolik yollar olan glukoneojenez ve fotosenteze de katılırlar. Glikoliz ve glukoneojenezdeki aynı adımlar farklı organizmalarda farklı enzimler tarafından katalizlenebilir (Sanchez vd., 2002). Koşulsal bazı kanıtlara dayanarak ve spekülatif olarak, sınıf I aldolazların glukoneojenetik yolda heksoz sentezini sınıf II analoglarından daha iyi gerçekleştirdikleri ifade edilmiştir. Örneğin bazı öbakteriler glikolitik bir karbon kaynağında büyürken sadece sınıf II aldolaz aktivitesi ekspres edilmektedir, fakat sınıf I aktivitesinin ekspresyonu glukoneojenetik bir karbon kaynağında büyürken indüklenebilir (Lebherz ve Rutter, 1973). Oysaki Marsh ve Lebherz (1992) aşağıdaki incelemelere dayanarak sınıf I ve sınıf II aldolazların *in vivo* gerçekleşen heksoz sentezine eşit adapte olduklarını kabul etmektedir.



Tablo 3. Bazı sınıf I ve sınıf II aldolazların yapısal ve katalitik özellikleri ( Marsh ve Leberhtz, 1992).

Özellik	Sınıf I		Sınıf II	
	Arkebakteriler <i>Halobacterium vallis mortis</i>	Ökaryotlar Tavşan kası Arkebakteriler <i>Micrococcus aerogenes</i>	Arkebakteriler <i>Halobacterium mediterranei</i>	Ökaryotlar Arkebakteriler <i>Escherichia coli</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Altbirim ağırlığı	27 kDa	33 kDa	Belirlenmedi	39 kDa
Doğal yapısı	Homodekamer	Monomer	Belirlenmedi	Homodimer
Tam sıra mevcudiyeti	Yok	Yok	Yok	Var
Schiff bazı oluşumu	Var	Var	Yok	Yok
Karboksipeptidaz hassasiyeti (% kalan FBF kesim aktivitesi)	100	100	8	100
FBF kesimi için optimum pH	Geniş (7,2-8,5)	Geniş (6,5-8,5)	Geniş (6,9-8,8)	Dar (7,5) Dar (7,0)

1) Üç ana aleme ait olan bir çok mikroorganizma glikolitik veya glukoneojenetik karbon kaynaklarında büyürken sınıf I ya da sınıf II aldolaz aktivitelerinden sadece biri ekspres edilir. 2) Prokaryotik mavi-yeşil yosunlar (siyanobakteri) fotosentezin karanlık reaksiyonları boyunca heksoz sentezi için sınıf II aldolaz aktivitesini kullanır, oysa ki aynı fonksiyon yüksek bitkilerin kloroplastlarında sadece sınıf I aldolazlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Lebherz vd., 1984). 3) En önemlisi; sınıf I aldolaz, fotosentezin karanlık reaksiyonları boyunca heksoz şekerlerini sentezlemek için kullanılırken (Russel ve Gibbs, 1967), tek hücreli yeşil yosun *Chlamydomonas mundana*, asetattan heksoz sentezini gerçekleştirmek için sınıf II aldolazı kullanır (Eppley vd., 1963). Bu yaklaşımlar doğrultusunda sınıf I ve sınıf II aldolazların *in vivo* benzer katalitik fonksiyonlar gösterdiği önerilmektedir (Marsh ve Lebherz, 1992).

### 1.9. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri

Dünya üzerinde yaşayan canlılar üç grup altında toplanmaktadır. Bunlar; bakteriler (öbakteriler), arkebakteriler ve ökaryotlardır (Woese vd., 1990). Bakteriler, havada, toprakta, suda yaşayabilen çomak, filament veya disk şeklinde olan mikroorganizmalardır. Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Sakrofiller -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların en iyi büyüebildiği sıcaklık 15 °C civarıdır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında (20-45 °C) büyüebilir ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girer. Termofiller ise 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta bazıları kaynar sularda bile yaşayabilir (Brock, 1985). Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda ve çöplerde bulunmaktadır.

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğer mikroorganizmaların büyümediği 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).

Termofilik ve mezofilik proteinlerin sıra ve yapılarının karşılaştırılması sonucu termofilik proteinlerin termal denatürasyondan sakınmak için mezofilik homologlarından farklı olarak bazı ilave yapısal özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Yapılan çalışmalar, termofilik enzimlerin bazı amino asitleri tercih ettiğini, öncelik gösterdiğini belirlemiştir (Cambillau ve Claverie, 2000). Bu enzimler genellikle mezofilik benzerlerinden daha kısa yüzey loplarna sahiptir (Wintrode vd., 2001) ve disülfür bağları, tuz köprüleri ve metal koordinasyonu genel olarak termal kararlılığı sağlamak için kullanılır (Vieille ve Zeikus, 2001). Ayrıca proteinin içindeki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları termal kararlılık için önemli etkileşimlerdir (Sauve ve Sygusch, 2001).

Kararlı ikincil yapı elementlerini, çalışılan proteinin içine dahil edilmesi (Willegas vd., 1996) veya termofilik enzim üretmek için doğal termofilik enzimlerin yapısının taklit edilmesi ile termal kararlılığın artırılması üzerine yapılan çalışmalardan bazıları başarılı sonuçlar vermiştir. Örneğin, siklodekstrin glikoziltransferazın termal kararlılığı tuz köprülerinin katılımı ile artmakta iken (Leemhuis vd., 2004) trioz fosfat izomerazın termal kararlılığı amino asit içeriğinin değiştirilmesi ile artmaktadır (Ahern vd., 1987). Bu başarılarla rağmen, protein mühendisliğinin, çalışılan enzimin tam ve kesin yapısal bilgilerinin eksikliğinden doğan bazı problemleri vardır. Homolog proteinlerin çoklu sıra karşılaştırmalarından elde edilen korunmuş bir sıranın, doğal proteinlerden daha fazla

termal kararlılık gösterdiği belirlenmiş ve “korunmuş içerik” olarak adlandırılan bu sıra yeni termal kararlı proteinlerin üretilmesi için kullanılmıştır (Lehmann ve Wyss, 2001).

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 büyüyebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denatürasyon bu sıcaklık derecesinin üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunabilirler (Koffler, 1957; Amelunxen ve Lins, 1968).

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 ısıl 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).

### 1.10. *Anoxybacillus* Türlerinin Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

*Anoxybacillus* cinsi, Pikuta ve arkadaşları tarafından *Bacillus* cinsinden farklılandırılmış olup bu cinsin tip türü *Anoxybacillus pushchinensis* DSM 12423<sup>T</sup>’tir (Pikuta vd., 2000). Pikuta ve arkadaşları ilk olarak bu cinsin tip suşunu zorunlu anaerob olarak tanımlamış fakat daha sonraki bir makalede *Anoxybacillus* cinsinin fakültatif anaerob olduğunu belirtmişlerdir. *Anoxybacillus* cinsi 8 türe sahip olup, bunlar; *Anoxybacillus flavithermus* (*A. flavithermus*) DSM 2641<sup>T</sup>, *Anoxybacillus pushchinensis* (*A. pushchinensis*) DSM 12423<sup>T</sup> (Pikuta vd., 2000), *Anoxybacillus gonensis* (*A. gonensis*) NCIMB 13933<sup>T</sup> (Belduz vd., 2003), *Anoxybacillus kestanbolensis* (*A. kestanbolensis*) K4<sup>T</sup>, *Anoxybacillus ayderensis* (*A. ayderensis*) AB04<sup>T</sup> (Dulger vd., 2004), *Anoxybacillus voinovskiensis*

(*A. voinovskiensis*) NCIMB 13956<sup>T</sup> (Yumoto vd., 2004), *Anoxybacillus contaminans* (*A. contaminans*) DSM 15860<sup>T</sup> (De Clerck vd., 2004) ve *Anoxybacillus kamchatkensis* (*A. kamchatkensis*) DSM 14988 (Kevbrin vd., 2005) şeklinde sıralanabilir. Tablo 4' te 5 *Anoxybacillus* türü ile ilgili bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikler özet oluşturacak şekilde sunulmaktadır.

Tablo 4. Bazı *Anoxybacillus* türlerinin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri (Dülger, 2003).

Özellikler	<i>A. kestanbolensis</i> K4 <sup>T</sup>	<i>A. gonensis</i> NCIMB 13933 <sup>T</sup>	<i>A. ayderensis</i> AB04 <sup>T</sup>	<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 <sup>T</sup>	<i>A. pushchinensis</i> DSM 12423 <sup>T</sup>
G+C içeriği (%mol)	50	57	54	41,6	42
Gram boyama	+	+	+	+	+
Oksijen kullanımı	fakültatif	fakültatif	fakültatif	fakültatif	fakültatif
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Spor oluşumu	+	+	+	+	+
Fiziksel büyüme şartları					
Sıcaklık aralığı (°C)	40-70	40-70	30-70	30-72	37-66
Optimum sıcaklık (°C)	50-55	55-60	50	60-65	62
pH aralığı	6,0-10,5	6,0-10,0	6,0-11,0	5,5-9,0	8,0-10,5
Optimum pH	7,5-8,5	7,5-8,0	7,5-8,5	7,0	9,5-9,7
NaCl toleransı (%)	4,0	4,0	2,5	2,5	3,0
Karbon kaynağı kullanımı					
D-rafinoz	+	+	+	-	Veri yok
D-ksiloz	-	+	+	-	Veri yok
L-arabinoz	-	-	+	zayıf	Veri yok
D-mannoz	+	-	+	+	Veri yok
L-ramnoz	-	-	-	-	Veri yok
D-glukoz	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	Veri yok
Laktöz	-	-	-	-	Veri yok
Nitrat indirgeme	+	+	-	-	+
Jelatin hidrolizi	-	+	+	-	-

### 1.11. Endüstride Enzim Kullanımı ve Aldolazların Endüstrideki Yeri

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak tüketim malzemelerine duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Gelişen teknoloji insanların bu talebine cevap vermeyi hedeflemektedir. Günümüzde, gıda, sağlık, tekstil, kozmetik ve daha bir çok alanda, kullanılan klasik yöntemler artık terk edilmekte ve yerini daha pratik, maliyeti daha düşük ve hızlı üretim sağlayan yöntemler almaktadır. Bu yöntemlere en iyi örnek enzim katalizli endüstriyel proseslerdir. Günümüzde bilinen 4.000 enzimden yaklaşık 200 tanesi ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenlidir. 1960'a kadar yıllık enzim satışı yalnızca birkaç milyon dolardı. O tarihten bu yana enzim pazarı hızla büyümüştür (Godfrey ve West, 1996; Wilke, 1999).

Biyokimyasal tekniklerin gelişmesi, fermantasyon işlemlerinin ve yeni metodların keşfedilmesi ile enzim üretiminde dikkate değer bir artış gözlemlenmektedir. Ayrıca enzimlerin kullanım alanlarının gelişmesi ile enzim talebi de oldukça artmıştır (Sharma vd., 2001). Tüm dünyada enzim ihtiyacı 12 ana üretici firma tarafından karşılanmaktadır. Dünya enzim ihtiyacının % 60'ını Avrupa ülkeleri sağlamaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitiktir. Lipazlar ve proteazlar günümüzde endüstriyel prosesler için çok yaygın kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Proteazlar enzim satış piyasasının % 40'ını oluşturmaktadır. Endüstriyel enzimlere başka bir örnekte aldolazlardır. *In vivo* FBA'dan GAF ve DHAF'nin oluşumunu tersinir olarak katalizleyen bu enzim, özellikle ilaç endüstrisinde biyokatalizör veya ilaçların hedef molekülü olarak kullanılmaktadır (De Walque vd., 1999).

Aldol kondenzasyon reaksiyonunun önemi sadece biyosentezde anahtar role sahip olmasından kaynaklanmaz, ayrıca bu reaksiyon organik kimyada ana C-C bağ oluşum metodlarından biridir. Aldol kondenzasyonu, asitler, bazlar ya da metal iyonları tarafından katalizlenen çok basamaklı bir reaksiyon serisidir ve organik sentez için büyük öneme sahiptir (Shulman ve Keinan, 1999). Aldolazlar, stereoseçimli olarak spesifik aldol kondenzasyonlarını katalizler. Enzim katalizli aldol reaksiyonlarının ılımlı reaksiyon şartları, enantioseçicilik ve atık ürünlerin az olması gibi potansiyel avantajlarından dolayı sentetik kimya için tercih sebebi olmaktadır (Schoevaart vd., 1999). İlave olarak, bu enzimlerin, ürün ve reaktanların konsantrasyonuna bağlı olarak regüle edilebilirliği büyük bir avantajdır (Cooper vd., 1996).

Özellikle daha kararlı olan sınıf II enzimlerini de içeren aldolazların, sentetik kimyadaki potansiyelleri geniş anlamda incelenmiş ve bu enzimlerin biyo-transformasyon ve sentetik organik kimyada etkin katalizörler oldukları tespit edilmiştir. Aldolazlar normal olmayan şekerlerin yani modifiye karbohidratların ( $^{13}\text{C}$  ile işaretli, N veya F içeren, deoksişekerler ve yeni yüksek karbonlu şekerler) ve deoksinojirmisin (deoxynojirmycin) gibi glikozidaz inhibitörlerinin sentezinde kullanılır (Von der Osten vd., 1989; Cooper vd., 1996). Kompleks monosakkarit grubuna dahil olan ulosonik asit türevleri aldolazların da katalizlediği bir seri enzimatik reaksiyon sonucunda elde edilmektedir. Bir ulosonik asit türevidir olan 3-deoksi-D-manno-2-oktuloseonik asit Gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerinin integral bir bileşenidir. Bu yüzden bakteriyel hücre duvarı bileşenlerinin biyosentezini bozabilen yeni 3-deoksi-D-manno-2-oktuloseonik asit türevlerinin geliştirilmesi yeni antibakteriyel moleküllerin elde edilmesini sağlayacaktır (Crestia vd., 2004).

Şimdiye kadar en iyi çalışılmış DHAF bağımlı aldolaz, tavşan kas aldolazıdır. Bu enzim, ticari olarak bulunabilirliğinden dolayı organik sentezde kullanılmaktadır. Ancak, düşük kararlılığından dolayı pratikteki uygulamaları sınırlanmaktadır. Bunun yerine daha kararlı olan bakteriyel aldolazlar tercih edilmektedir. Ticari olarak mevcut olan *Staphylococcus carnosus* ve *Staphylococcus aureus* sınıf I FBA'ların sıcaklık ve pH kararlı olduğu bilinmektedir (Schoevaart vd., 1999). Yüksek kararlılığından dolayı *S.carnosus* FBA'sı son zamanlarda bir grup deoksi şekerlerin stereoseçimli sentezinde kullanılmaktadır (Dinkelbach vd., 2001).

Sınıf II FBA'lar insan ve hayvanlarda bulunmadığı ve glikolitik yolda anahtar role sahip olduğu için, ilaç olarak kullanılabilen inhibitörler için iyi birer hedef olabilirler (Lewis ve Lowe, 1973; De Walque vd., 1999). DHAF'nin yakın yapısal analogu olan fosfoglikohidroksamik asit sınıf I aldolazlar varlığında sınıf II aldolazların seçimli inhibitörüdür, bu yüzden fosfoglikohidroksamik asit antibakteriyel ve antifungal ajan olarak kullanılmaktadır (Lewis ve Lowe, 1977). Aldolazlar özellikle sıtmaya ve tüberküloza karşı ilaç dizaynında hedef moleküldür (Cloonan vd., 2001). *Mycobacterium tuberculosis* tüberküloza neden olan bir insan patojenidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 yılında yapmış olduğu istatistiklere göre tüberküloz gelişmekte olan ülkelerde hala ölüme sebep olan bir hastalıktır. Ramsaywak ve arkadaşları (2004) *Mycobacterium tuberculosis* sınıf II aldolaz genini klonlayıp *E. coli*'de ekspres edip karakterize etmiştir. Tüberküloza

karşı potansiyel inhibitörler geliştirmek için bu çalışma oldukça önem arz etmektedir (Ramsaywak vd., 2004).

Aldolazlar NMR'de kolayca analiz edilebilen yüksek molekül ağırlıklı proteinler olduğu için proteinlerin katlanmış ve katlanmamış yapılarının çalışılması için çok iyi modeldir (Pan ve Smith, 2003).

Aldolaz katalizli sentetik proseslerin endüstriyel kullanımını pratikte sınırlayan başlıca sebep enzimlerin ticari olarak bulunabilirliğinin az oluşudur. Sonuç olarak, bu aldolazların üretimi için uygulanabilir proseslerin geliştirilmesi gereklidir. Günümüzde protein veya enzim eldesi için en sık başvurulan yöntemler rekombinant DNA teknikleridir. İstenilen proteini ekspres eden gen uygun bir vektördeki bir promotörün altına klonlanıp genellikle *E. coli*'de ekspres edilir ve sonrasında protein saflaştırılarak istenilen amaç için kullanılabilir. Ayrıca protein bir histidin etiketi ile işaretlenip bir füzyon proteini olarak da ekspres edilebilir (Henderson vd., 1994).

Özellikle son yıllarda moleküler biyolojide kaydedilen ilerlemelerle enzimler üzerinde yapılan mutasyonlarla kataliz etkinlikleri artırılmaktadır. Mutasyona uğratılmış enzimlerle daha hızlı ve yüksek verimle ürün eldesi sağlanmaktadır. Aldolaz spesifitesi ve mekanizması hakkında belirlenen yapısal özellik bilgileri ile bölgesel mutasyonların bileşimi seçilen reaksiyonu katalizlemek için belirlenen spesifitedeki aldolazların geliştirilmesinde kullanılabilir (Cooper vd., 1996).

## 1.12. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Gelişen teknoloji ile birlikte bir çok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. 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. Bu yüzden endüstriyel uygulamalar ve tıp alanında kimyasal yöntemlerin yerini artık enzim katalizli reaksiyonlar almaktadır. Canlı sistemler tarafından üretilen biyolojik katalizörler olan enzimler, oldukça spesifik reaksiyonları  $10^8$ - $10^{20}$  kat daha hızlı katalizleyerek spesifik ürünleri oluştururlar. Bu şekilde elde edilen ürünler hem oldukça saf olur, hem de klasik yöntemlere nazaran çok daha kısa sürede sentezlenir. Ayrıca enzim katalizli yöntemlerde reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH



vb.) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerjide tasarruf sağlanmış olur. Yani ekonomik açıdan da değerlendirildiğinde enzim kullanımının önemli avantajları olduğu açıktır.

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. Oysa ki, termofilik proteinler yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterebilmekte ve yüksek basınçlarda termal kararlılıkları devam etmektedir. Bu yüzden endüstriyel açıdan termofilik enzimler daha caziptirler.

Endüstriyel enzim sınıfına dahil olan aldolazlar özellikle sağlık alanında ilaç tasarımı ve sentezinde önemli göreve sahiptir. Tavşan kas aldolazı düşük kararlılığından dolayı kimyasal reaksiyonlarda pek tercih edilmemektedir. Piyasada mikrobiyal orijinli aldolazlar mevcuttur. Bunların bir kısmı mezofilik kaynaklardan elde edilmiştir ve termofilik homologlarına göre daha az kararlıdır. Bu açıdan yeni termofilik aldolaz enzimlerinin keşfi oldukça önemlidir. Endüstriyel kullanımları açısından enzimlerin geniş skalada üretilmeleri gereklidir. 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 parçası uygun bir vektöre klonlanıp *E. coli*'de ekspresyonu sonucu elde edilen protein bazı tekniklerle saflaştırılıp kullanıma hazır hale getirilmektedir. Bu yöntem, enzimin doğrudan üretildiği organizmadan eldesinden daha pratik ve maliyeti daha düşüktür.

Önerilen çalışmanın amacı, Biyoloji Bölümü araştırmacıları (Prof.Dr. A. O. Beldüz ve Yrd.Doç.Dr. S. Çanakçı) tarafından Balıkesir Gönen kaplıcasından izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizi ile yeni bir tür olduğu ortaya konulan *Anoxybacillus gonensis* G2 suşundan ısıya dirençli fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz geninin klonlanması ve enzimin biyokimyasal olarak karakterize edilmesidir. Aldolaz geninin termofilik bakteriden klonlanıp, ekspres edilen proteinin izole edilip saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi ile bu enzimin endüstride bir uygulama alanı bulabileceği açıktır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Kullanılan cihazlar, modelleri ve firma isimleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Spektrofotometre	UV/2	Unicam
PCR	Personal Cycler	Biometra
Agaroz-DNA Elektroforezi	B1A	Owl Speration Systems
Protein Elektroforezi	P8DS	Owl Speration Systems
Santrifüj	Biofuge haemo 2-16 K	Heraeus Instruments Sigma
Jel Görüntüleme Sistemi	BioDoc Analyze	Biometra

#### 2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Kullanılan madde ve malzemeler ile üretici firmaları Tablo 6'de verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal ve biyokimyasal maddeler	Fluka, Sigma, Aldrich, Merck
Plazmid DNA İzolasyon Kiti (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Katalog No: A1330)	Promega
Genomik DNA İzolasyon Kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Katalog No: A1120)	Promega

Tablo 6'nın devamı

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
pGEM-T Vektör Sistemi (pGEM-T Easy Vector System, Katalog No: A1360)	Promega
DNA Ekstraksiyon Kiti (DNA Extraction Kit, Katalog No: K0513)	Fermantas
Protein Saflaştırma Kiti (Magnehis Protein Purification System, Katalog No: V8500)	Promega
DNA Standardı (1 kb DNA Ladder, Katalog No: R0611)	Fermantas
SDS-PAGE Standardı (Low Molecular Weight, Katalog No: SM 0661)	Sigma

### 2.1.3. Enzimler

Kullanılan enzimler, üretici firma isimleri ve miktarları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Miktarı
<i>EcoR</i> I	Promega	12 U/ $\mu$ L
<i>Hind</i> III	Promega	10 U/ $\mu$ L
<i>Hinf</i> I	NEB	8-12 U/ $\mu$ L
<i>BamH</i> I	NEB	8-12 U/ $\mu$ L
<i>Nde</i> I	NEB	8-12 U/ $\mu$ L
Taq DNA Polimeraz	Fermantas	5 U/ $\mu$ L
T4 DNA Ligaz	Fermantas	5 U/ $\mu$ L
Gliseraldehid-3-fosfat Dehidrojenaz (Tavşan Kasından, Katalog No: G 2267)	Sigma	120 U/mg protein
$\alpha$ -Gliserol-3-fosfat Dehidrojenaz-Triozfosfat İzomeraz (Tavşan Kasından, Katalog No: G 1881)	Sigma	174 $\alpha$ -GDH U/ mg protein 1240 TPI U/mg protein

### 2.1.4. Primerler

Kullanılan primerler, baz sıraları,  $T_m$  sıcaklıkları ve kullanım amaçları Tablo 8’de verilmiştir

Tablo 8. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler

Primer	Baz Sırası	$T_m$	Kullanım Amacı
ALD F1	5'- GTGGTGC GCGAAGTATTAGC -3'	58 °C	İnvers PCR ile genin sonundaki parçanın yakalanması için
ALD R1	5'- CTGCTAAAATTGCTTGTGTCC -3'	54 °C	İnvers PCR ile genin sonundaki parçanın yakalanması için
ALD F2	5'- CCATATGCCTTTAGTTTCAATGACGG-3'	57 °C	Genin tamamının çoğaltılıp pET vektörüne klonlanması için
ALD R2	5'- GGGATCCCTCACTTACAACGCTTTGCCGG-3'	66 °C	Genin tamamının çoğaltılıp pET vektörüne klonlanması için

### 2.1.5. Kullanılan Suşlar

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan suşlar Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* suşları

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

### 2.1.6. Plazmidler

Kullanılan plazmidler, üretici firma isimleri ve kullanım amaçları Tablo 10'da verilmiştir. Ayrıca bu plazmidlerin gen haritaları Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmidler

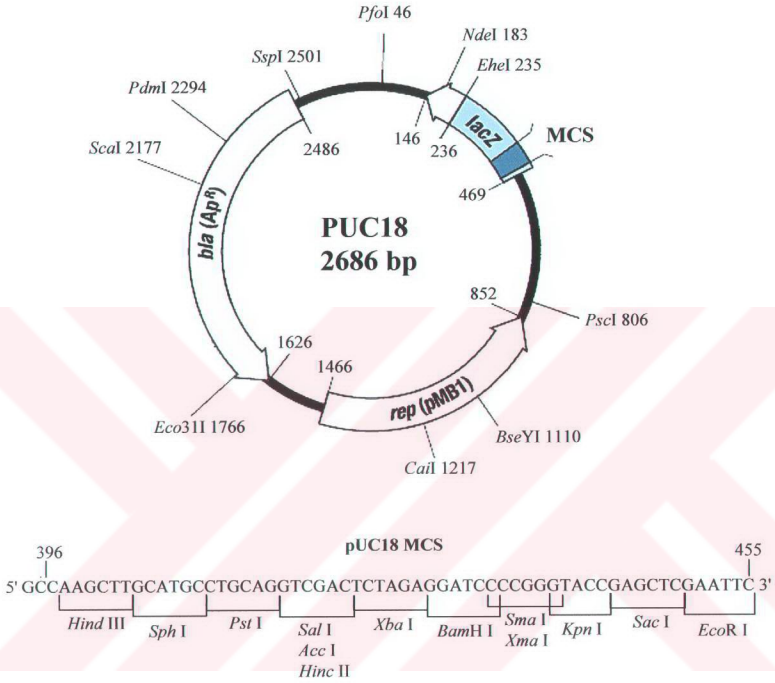
Plazmid	Firma	Kullanım Amacı
pUC18	Promega	Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için
pGEM-T	Promega	İnvers PCR ürünlerini klonlamak için
pET-28a(+)	Novagen	Ekspresyon vektörü

### 2.1.7. Bilgisayar Programları

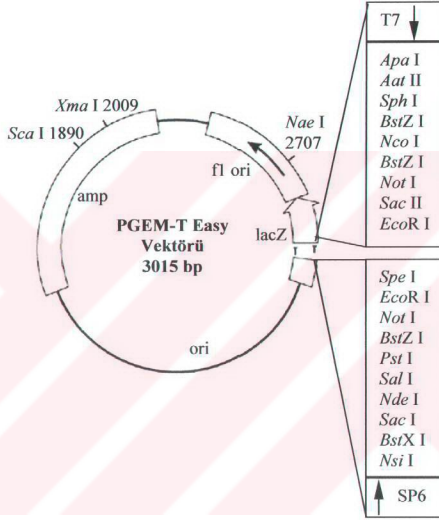
Kullanılan bilgisayar programlarının isimleri ve internet adresleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kullanılan bilgisayar programları ve internet adresleri

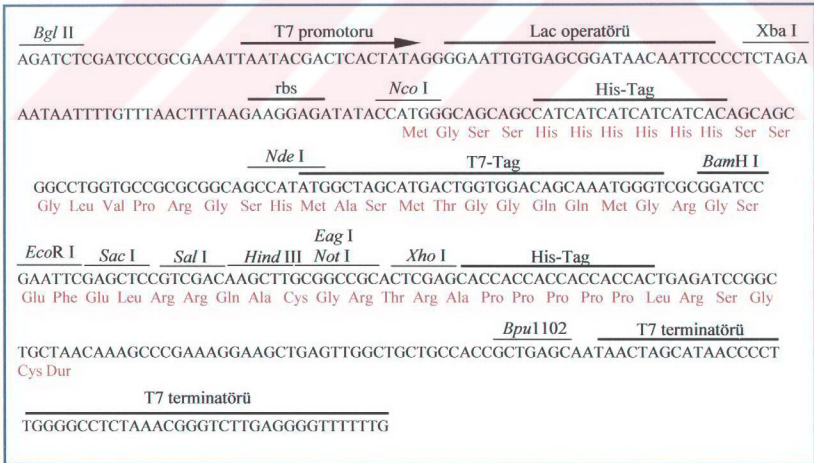
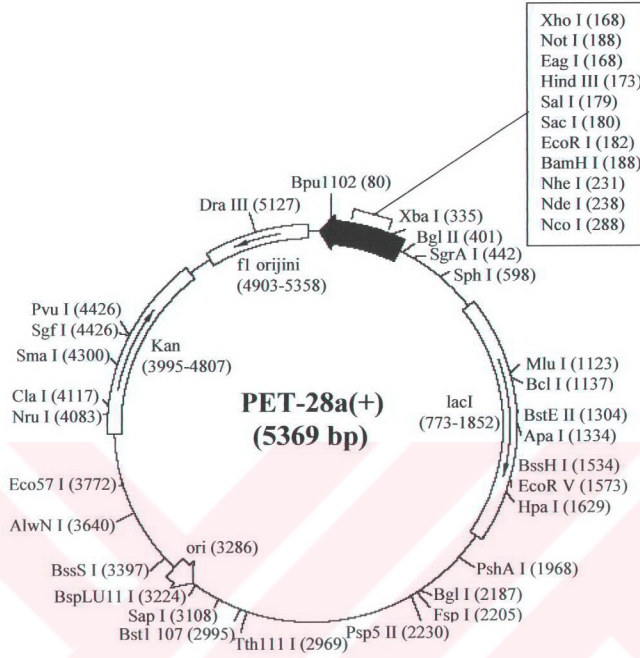
Program Adı	Adresi	Kullanım Amacı
Chromas 2.31	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>	DNA sıra analizinde
Fast PCR	<a href="http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm">http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm</a>	Tm'lerin hesaplanmasında
Expasy	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>	DNA'nın translasyonunda
Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	DNA ve protein sıralarının karşılaştırılmasında
Ape Plasmid Editor	<a href="http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/</a>	Plazmid haritalarının çizilmesinde
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	Çoklu amino asit sıra karşılaştırmasında



Şekil 8. pUC 18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijini, lacZ genini ve ampisilin direnç genini gösteren haritası (URL-1, 2006).



Şekil 9. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, lacZ genini ve ampisilin direnç genini gösteren haritası (URL-2, 2005).



Şekil 10. pET-28a(+) vektörünün replikasyon orijinini, lacI genini, kanamisin direnç genini gösteren haritası ve klonlama/ekspresyon bölgesi (URL-3, 2005).



### 2.1.8. Sıvı ve Katı Besiyerleri

Lauria-Bertani (L.B) Besiyeri;

Bacto-tripton	10 g/L
Maya ekstreği	5 g/L
NaCl	10 g/L

Lauria-Bertani Agar (LBA) Besiyeri;

Bacto-tripton	10 g/L
Maya ekstreği	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	12 g/L

Her iki besiyeri de 1 N sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 7,5'e ayarlandı. 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 15 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd.,1989).

### 2.1.9. Çözeltiler ve Tamponlar

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışları

Çözelti Adı	İçerik / Hazırlanış
<b>Lowry Protein Tayini</b>	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Lowry B	% 1(w/v) bakır sülfat ve % 2 (w/v) sodyum potasyum tartarat (1:1)
Lowry C	50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B
Lowry D	1 hacim Folin belirteci : 2 hacim su
<b>Agaroz Jel Elektroforezi</b>	
6x Jel Yükleme Tamponu	% 0,25 (w/v) bromofenol mavisi, % 0,25 (w/v) ksilen siyanol, % 30 (w/v) gliserol (su içinde)

Tablo 12'nin devamı

Elektroforez Tamponu	TAE-tamponu [Tris-HCl (40 mM), asetik asit (20 mM), EDTA (2 mM) pH 8,0]
Jel	% 0,7-1 agaroz TAE-tamponu içinde, etidyum bromür, 0,5 µg/mL
<b>SDS / Doğal Jel Elektroforezi</b>	
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	36,3 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 ml yapıldı
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl)	24,2 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, , pH 6,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 ml yapıldı
% 10 SDS	% 10 (w/v) SDS'in suda çözülmesiyle hazırlandı
% 10 Amonyum Persülfat (APS)	% 10 (w/v) APS çözeltisi su ile hazırlandı ve -20 °C' de saklandı
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullandı
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	% 29,2 (w/v) akrilamid ve % 0,8 (w/v) N, N'-metilen bisakrilamidin suda çözülmesiyle hazırlandı
SDS-Jel Yükleme Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) % 2 SDS % 0,1 Bromofenol mavisi % 20 gliserol % 6 β-merkaptetanol (100 µL'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C' de saklandı)
SDS-Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris bazı, 250 mM glisin, % 0,1 SDS, Suda çözülerek pH 8,3'e ayarlandı
Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) % 0,1 Bromofenol mavisi % 20 gliserol (100 µL'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20°C' de saklandı)

Tablo 12'nin devamı

Doğal Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris bazi, 250 mM glisin, Suda çözülerek pH 8,3'e ayarlandı
Boyama (Staining) Çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 100 mL glasiyal asetik asit, 300 mL metanol 600 mL su
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	100 mL glasiyal asetik asit, 300 mL metanol, 600 mL su
Substrat Boyama Çözeltisi	50 mM Tris-HCl, pH 7,3 10 mM $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ 2,2 mM $\text{NAD}^+$ 10 mM FBF 125 $\mu\text{g/mL}$ gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz 1 mg/mL nitro blue tetrazolyum 0,1 mg/mL fenazin metosülfat
<b>Tamponlar</b>	
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 7-9)	6,05 g Tris bazi suda çözülerek 1 M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı.
Sodyum Asetat Tamponu (50mM, pH 5-5,5)	4,1 g sodyum asetat suda çözülerek 1 M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı
Fosfat Tamponu (50mM, pH 6-6,5)	8,7 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'ün 1 L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti 6,8 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün 1 L sudaki çözeltisi ile titre edilerek pH'sı ayarlandı
Glisin-NaOH Tamponu (50mM, pH 9,5-10)	3,75 g glisin suda çözülerek 1 M NaOH çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1 L'ye tamamlandı
<b>Enzim Aktivitesinin Tayini</b>	
FBP Çözeltisi (Stok, 10 mM)	0,55 g FBP'nin trisodyum tuzu 50 mM'lık tampon içinde çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı

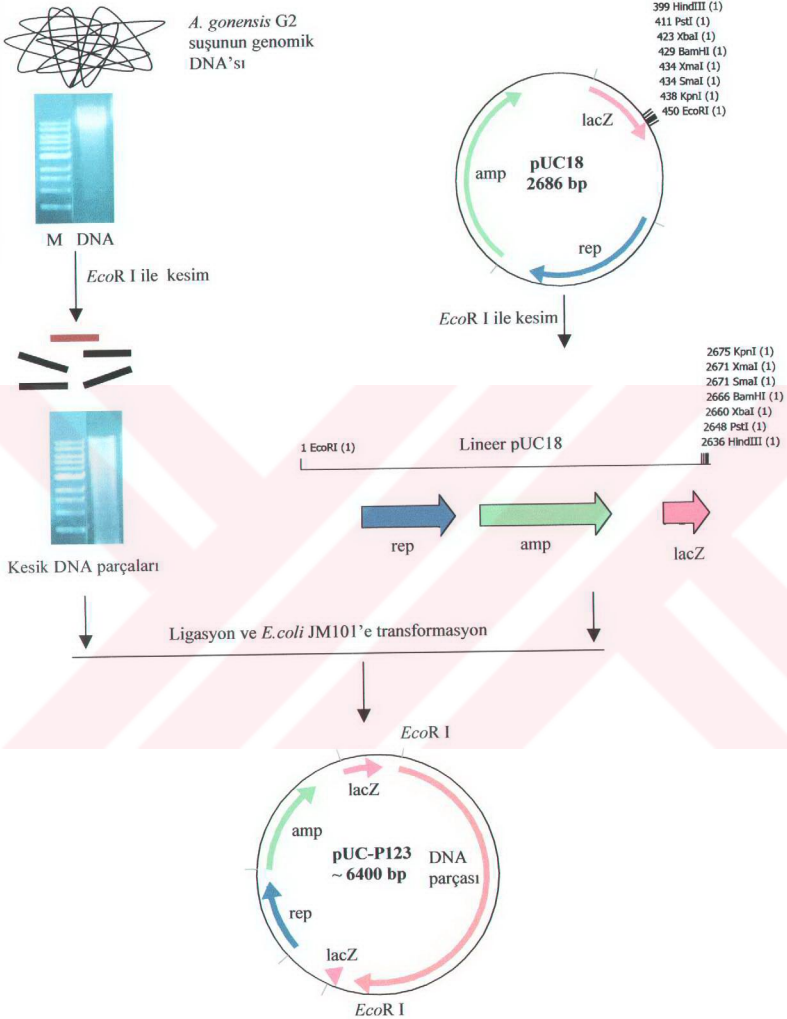
Tablo 12'nin devamı

NADH Çözeltisi (8,5 mM)	0,6 g NADH'nin disodyum tuzu suda çözülüp son hacmi 100 mL'ye tamamlandı
<b>Diğer Çözeltiler</b>	
Ampisilin	25 mg/mL oranındaki stok çözeltisi su ile hazırlandı. Filtre ile steril edilerek -20 °C'de saklandı
Kanamisin	25 mg/mL oranındaki stok çözeltisi su ile hazırlandı. Filtre ile steril edilerek -20 °C'de saklandı
IPTG	2 g IPTG suda çözülerek son hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve filtre ile steril edildi ve -20 °C'de saklandı
X-Gal	Dimetilformamid ile 20 mg/ml oranında stok çözeltisi hazırlandı ve -20 °C'de saklandı
3 M Sodyum Asetat, pH 5,2	24,6 g sodyum asetat suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 5,2'ye ayarlandı ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı
100 mM EDTA	3,72 g EDTA-disodyum tuzu son hacmi 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü
0,1 M Kalsiyum Klorür	1,47 g CaCl <sub>2</sub> dihidrat son hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü ve otoklavda steril edilerek buzdolabında saklandı

Bütün çözelti ve tamponlar çift distile su (dd H<sub>2</sub>O) ile hazırlandı.

## 2.2. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesi; DNA'nın *EcoR* I restriksiyon enzimi (RE) ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA parçalarının, yine aynı enzimle kesilen bir vektöre girmesi ile elde edilmiştir (Şekil 11). Böylece genomik DNA'nın tamamı vektöre aktarılmış olur. Bu yöntemle organizmanın genomik DNA sırası tespit edilebilir ve genom haritası çıkarılabilir.



Şekil 11. *A. gonensis* G2 genomik DNA'sının *EcoR* I ile kesilerek genomik DNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi

### 2.2.1. *Anoxybacillus gonensis* G2 Suşunun Büyütülmesi

Termofilik bir bakteri olan *A. gonensis* G2 suşu stok kültürden LBA katı besiyerine yayma ekim yapılarak ekildi ve bir gece boyunca 55 °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 55 °C'de sallanılarak büyütülmesi ile hazırlandı (Dülger, 2003).

### 2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

*A. gonensis* G2 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 çözeltisinin ilavesinden sonra örnek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpe 600 µL Nüklei Lizis Çözeltisi (Nuclei 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 karıştırıldı. 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 ters düz edilerek karıştırıldı. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpe 600 µL oda sıcaklığında % 70'lik etanol ilave edildi ve dikkatlice ters düz 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 Hidrasyon Çözeltisi (DNA Rehydration Solution) ile çözüldürülerek -20 °C’de saklandı.

### 2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu

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

- 1-5 mL gece kültürü 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatantı 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 ters düz edilerek karıştırıldı. Hücre süspansiyonu berraklaşana kadar tüp yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 10 µL Alkali Proteaz Çözeltisi (Alkaline Protease Solution) ilave edildi ve tüp 4 kere ters düz edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- 350 µL Nötralizasyon Çözeltisi (Neutralization Solution) ilave edildi ve tüp derhal 4 kere ters düz edilerek karıştırıldı.
- Elde edilen bakteriyal lizat 13.000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant minikolon (SV Minicolumn) içine aktararak 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 gecen 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 plazmid DNA çözeltisi -20 °C’de saklandı.

### 2.2.4. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Genomik ve plazmid DNA çözeltilerinin konsantrasyonu, nükleotidlerin heterosiklik halkalarının 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliğinden yararlanılarak ölçüldü (Temizkan ve Arda, 2004). DNA çözeltisi 1/50 oranında sulandırılarak 260 nm'de optik yoğunluk (dansite) ölçüldü. 1 OD (Optik Dansite) çift iplikli DNA için 50 µg/mL'ye karşılık gelmektedir. DNA miktarının belirlenmesinde aşağıdaki (1) eşitliğinden yararlanıldı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{sulandırma oranı} \times \text{katsayı (50)} \quad (1)$$

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

Genomik DNA (gDNA) ve pUC 18 plazmid DNA'sı 50 µL son hacimde ayrı ayrı kesildi (Maniatis vd.,1989).

gDNA / pUC 18	5 µg
10x H Tamponu	5 µL
10x BSA	0,5 µL
<i>EcoR I</i>	1 µL (12 U)
dd H <sub>2</sub> O	50 µL'ye tamamlandı

Plazmid 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 DNA elektroforezinde görüntülendi.

### 2.2.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi yatay jel tankı kullanılarak gerçekleştirildi (Maniatis vd., 1989). Jelden DNA çıkarma işlemi dışındaki elektroforez işlemlerinde her bir kuyucuğa yaklaşık 50 ng DNA yüklendi. Jelde örnekler 100 V'de 45 dakika yürütüldü. DNA bantları ultraviyole ışık altında incelendi. Jel görüntüleri BioDoc Analyze programı ile kaydedildi.



Tablo 13. Agaroz jel elektroforezinin yapılışı

Bileşen	Miktarı
TAE Tamponu	Tankın içine dolduruldu
Jel	% 0,7-1,2 agaroz 30 ml TAE tamponu içinde, etidyumbromür (10 mg/ml) 0,5 µg/ml
Kuyucuklara	
6x Jel Yükleme Tamponu	1 µL
DNA Çözeltisi	5 µL
1 kbp DNA Standardı	1 µL (sadece kontrol kuyucuğuna yüklendi)

### 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-4, 2005).

- DNA çözeltisi üzerine 1/10 kadar 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ve 2,5 katı kadar % 96'lık soğuk etanol ilave edildi. Tüp ters düz edilerek karıştırıldı ve -20 °C'de 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
- Tüpe 500 µL % 96'lık soğuk etanol ilave edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
- 500 µL % 70'lik soğuk etanol ilavesinden sonra tüp 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı. İçinde kalan etanolün tamamen uzaklaşması için tüp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Pellet halindeki DNA gerekli miktarda suda çözülerek uygun şartlar altında saklandı.

### 2.2.8. DNA Parçalarının pUC 18 Vektörüne Ligasyonu

Kesilen DNA parçaları vektöre T4-DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989). Reaksiyon 10 µL son hacimde gerçekleştirildi.

pUC18 (vektör DNA)	100 ng
gDNA parçaları (insert DNA)	200 ng
10x Ligaz Tamponu	1 µL
T4-DNA Ligaz	1 µL (5 U)
dd H <sub>2</sub> O	10 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı 16 °C'de bir gece inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

### 2.2.9. Kompetant Hücre Hazırlanması

Kompetant hücrelerin hazırlanışı kalsiyum klorür metoduna göre gerçekleştirildi (Maniatis vd.,1989). Kompetant 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 ve geninin 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 ulaşınca 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde süspansiyon edilerek 200 µL hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek 2 saat buzda bekletildi ve transformasyona hazır hale getirildi.

### 2.2.10. Transformasyon

DNA parçası içeren/içermeyen vektörler önceden hazırlanan kompetant hücelere aktarılarak çoğaltıldı (Maniatis vd.,1989).

- Kompetant hücreleri içeren tüpe 1-5 µL arasında uygun hacimde plazmid çözeltisi ilave edilerek 30 dakika buz içinde bekletildi.
- Tüp 2 dakika 42 °C'de bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandı.
- Tüp içine 200 µL LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat bekletildi.
- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyon karışım petriye yayma ekimle ekildi ve 37 °C'de 1 gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.
- Transformasyonda pUC18 ve pGEM-T vektörleri kullanıldığı durumlarda, 50 µg/mL ampisilin içeren LBA'lı petrilerin üzerine 200 mg/mL'lik izopropiltiyo-β-galaktozid (IPTG) çözeltisinden 45 µL ve 20 mg/mL'lik 5-Bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktozid (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 petrilerin 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 Plazmidlerin 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. Rekombinant plazmidler “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak izole edildi (Bölüm 2.2.3.). İzole edilen rekombinant plazmidler *EcoRI* enzimi ile kesilerek vektör içine aktarılan DNA parçalarının uzunlukları tespit edildi. Yaklaşık 2 kbp'den daha büyük DNA parçalarını içeren plazmidler DNA sıra analizi için Macrogen Inc.(Güney Kore)'e gönderildi.

### 2.2.12. DNA Sıralarının İncelenmesi

*Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun elde edilen DNA ve protein sıraları BLAST programı yardımı ile incelendi.

### 2.3. İnvers PCR ile FBA Geninin Sonunun Yakalanması

Normal PCR'dan farklı olarak, invers PCR'da DNA kalıbına bağlanacak ileri ve geri primerler ters yönlü olduğu için, DNA kalıbına bağlanan primerler ile DNA sentezi dışı doğru gerçekleştirilmiştir. Kalıp DNA olarak restriksiyon enzimleri ile kesilip kendi üzerine yapışmış halkasal DNA parçaları kullanılmıştır (Şekil 12).

#### 2.3.1. İnvers PCR İçin Primer Tasarımı

FBA geninin sonundaki yaklaşık 50 bazlık kısmın belirlenmesi için invers PCR gerçekleştirildi (Li ve Hastings, 1998; Coton vd., 2004). FBA'nın bilinen DNA sırasından yararlanılarak bir set ileri (forward) ve geri (reverse) primer (ADL F1 ve ADL R1) tasarlanıp İntek Firması'na sentezletirildi (Tablo 8).

#### 2.3.2. Genomik DNA'nın RE'ler ile Kesimi

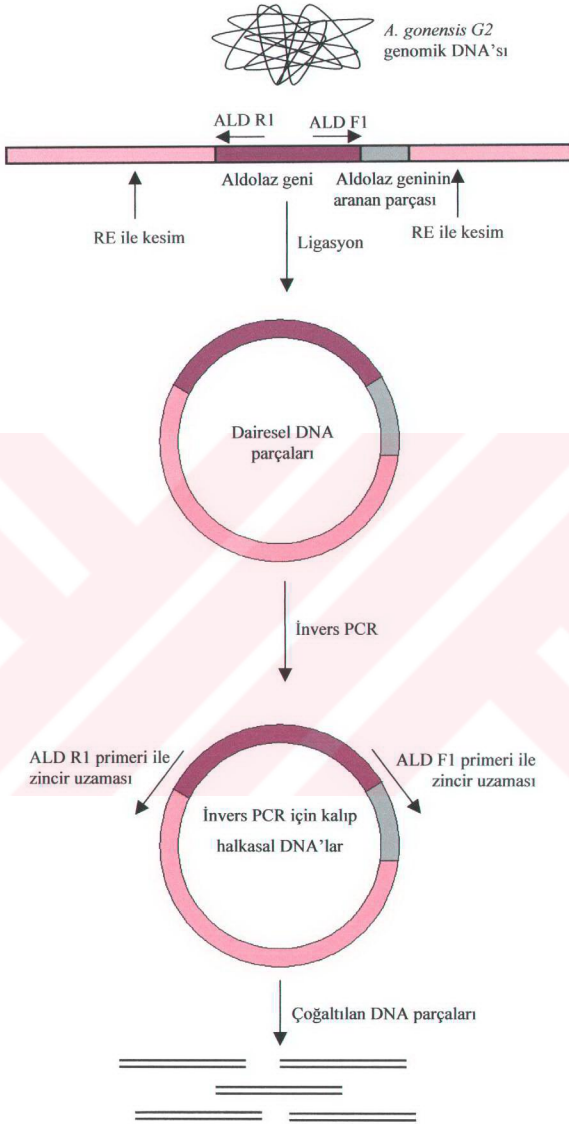
Primerlerin 5'- uçları arasında kalan bölgeden DNA'yı kesmeyen *Hind* III, *Hinf* I ve *Eco* I enzimleri ile genomik DNA uygun şartlarda kesildi (Maniatis vd.,1989). Reaksiyon karışımlarının son hacmi 50 µL yapıldı.

gDNA	2 µg
10x Reaksiyon Tamponu	5 µL
Restriksiyon Enzimi	1 µL (8-12 U)
dd H <sub>2</sub> O	50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımları 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Enzimler, 65 °C'de 15 dakika inkübasyon sonucunda deaktive edildi ve sonuçlar agaroz jelde incelendi.

#### 2.3.3. DNA Parçalarının Ligasyonu

RE'ler 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.



Şekil 12. FBA geninin son kısmını yakalamak için gerçekleştirilen invers PCR'in şematik gösterimi

RE Kesim Karışımı	45 µL (~ 1,8 µg)
10x Ligaz Tamponu	50 µL
T4-DNA Ligaz	3 µL (15 U)
dH <sub>2</sub> O	402 µL

Reaksiyon karışımları 16 °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 distile 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.

Tablo 14. İnvers PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
10x Reaksiyon Tamponu	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
Kalıp DNA	200 ng
Primer I	20 pmol
Primer II	20 pmol
dNTP Karışımı (10 mM)	1 µL
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5 µL (2,5 U)
dd H <sub>2</sub> O	50 µL'ye tamamlandı

Tablo 15. İnverson PCR reaksiyon şartları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Hibridizasyon	57	1	36
Uzama	72	2	
Uzama	72	5	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 ile jelden ekstrakte edildi.

- Kesilen jel parçası mikrosantrifüj tüplerine konularak ağırlığı kaydedildi ( 1 g jel yaklaşık 1 mL'ye eşit). Üzerine 3 hacim Bağlanma Çözeltisi (Binding Solution) eklendi ve 55 °C'de 5 dakika inkübe edilerek agaroz tamamen çözüldü.
- Tüpe 5 µL Silika Toz Süspansiyonu (Silica Powder Suspension) eklenerek vortekslenildi ve 55 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Bu zaman zarfında tüp her iki dakikada bir vortekslenerek silika tozunun süspansiyon olması sağlandı.
- Tüp 5 saniye santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µL Yıkama Tamponu (Wash Buffer) ilave edilerek vortekslenildi ve 5 saniye santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Bu basamak üç kez tekrarlanarak pellet temizlendi.
- Pellet 30 µL steril deiyonize su ilavesinden sonra 55 °C'de 5 dakika inkübe edilerek silika tozuna bağlanan DNA fragmentlerinin çözeltiye geçmesi sağlandı.
- Son olarak süspansiyon karışım 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek silika tozunun çökmesi sağlandı. DNA fragmentlerini içeren süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak uygun şartlarda saklandı. 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 yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989). Reaksiyonun son hacmi 14 µL yapıldı.

PCR Ürünü	5 µL
pGEM-T Easy Vektörü	1 µL
2x Ligasyon Tamponu	7 µL
T4-DNA Ligaz	1 µL (5 U)

Karışımlar 16 °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.) rekombinant plazmidler çoğaltıldı. IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli LBA petrilerinden beyaz koloniler seçilerek alındı (Maniatis vd.,1989).

### 2.3.8. Rekombinant Plazmid İzolasyonu ve Sıra Analizi

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

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

### 2.4.1. Primer Tasarımı ve Sentezi

FBA geninin tam sırasını yakalamak için bir set ileri ve geri primer tasarlandı (ADL F2 ve ADL R2). İleri primer başlama kodonundan önce *Nde* I kesim bölgesini içerecek





Tablo 17. PCR reaksiyon şartları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Hibridizasyon	55	1	36
Uzama	72	1.5	
Uzama	72	5	1

### 2.4.3. PCR Ürünlerinin ve pET-28a(+) Vektörünün RE'ler ile Kesimi

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

PCR ürünü	40 µL
10x <i>Bam</i> H I Tamponu	5 µL
10x BSA	0,5 µL
<i>Bam</i> H I	1 µL (8-12 U)
<i>Nde</i> I	1 µL (8-12 U)
dd H <sub>2</sub> O	2,5 µL

Reaksiyon karışımı 37 °C'de 2-3 saat ve enzimlerin inaktivasyonu için 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi.

pET-28a(+) Vektörü	5 µg
10x <i>Bam</i> H I Tamponu	5 µL
10x BSA	0,5 µL
<i>Bam</i> H I	1 µL (8-12 U)
<i>Nde</i> I	1 µL (8-12 U)
dd H <sub>2</sub> O	50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımı 37 °C'de 2-3 saat ve enzimlerin inaktivasyonu için 65 °C'de 15 dakika inkübe edildi.

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

Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA'lar %1'lik agaroz elektroforezinde yürütülerek jelden DNA Ekstraksiyon Kiti yardımı ile alındı (Bölüm 2.3.5) ve 30'ar µL steril distile suda çözüldü. T4 DNA Ligaz enzimi ile PCR ürünü pET-28a(+) vektörüne yapıştırıldı (Maniatis vd.,1989).

pET-28a(+) (vektör DNA)	5 µL
PCR ürünü (insert DNA)	5 µL
10x Ligaz Tamponu	1,5 µL
T4-DNA Ligaz	1 µL (5 U)
dd H <sub>2</sub> O	2,5 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C'de gece boyunca inkübe edildi.

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

Ligasyon ürünü bir gün önceden hazırlanan *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetant hücrelerine aktarıldı (Bölüm 2.2.9. ve 2.2.10.). Kanamisin ve IPTG içeren LBA petrilerden seçilen koloniler 3 mL kanamisinli LB besiyerine ekilerek 37 °C'de gece kültürleri hazırlandı. Plazmid izolasyonu "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Bölüm 2.2.2.). İzole edilen plazmidler % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek DNA parçası içerenler tespit edildi. Bu plazmidler *Bam*H I ve *Nde* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek içerdikleri DNA parçaları % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi. FBA genini içeren plazmid biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere gliserol stoğu (900 µL gece kültürü + 300 µL gliserol) yapılarak -20 °C'de saklandı. Rekombinant plazmidin DNA sıra analizi Macrogen Inc.'de (Güney Kore) yaptırıldı.

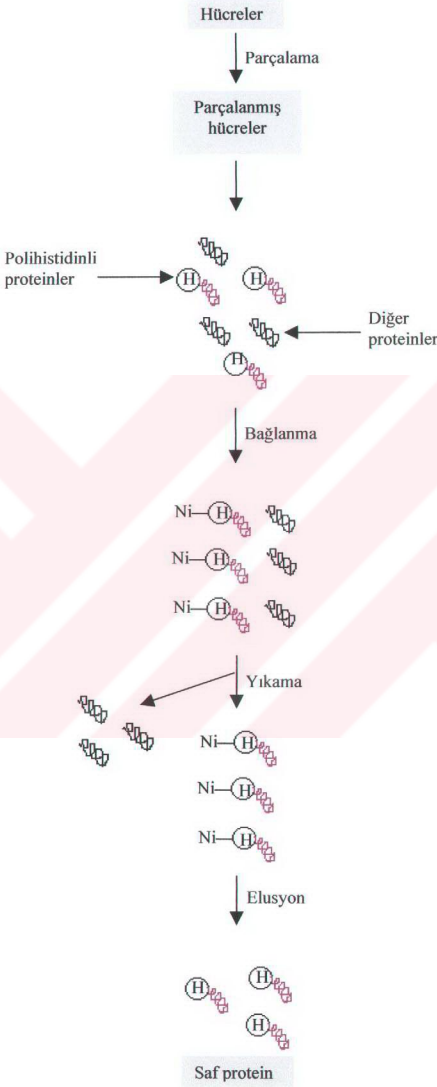
## 2.5. Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

### 2.5.1. Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın *E.coli*'de Ekspresyonu ve Saflaştırılması

pET28a(+) vektörüne klonlanan aldolaz 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” (Magne His Protein Purification System) kullanılarak saflaştırıldı (Şekil 14). Proteinin ekspresyonu ve saflaştırılmasında aşağıdaki basamaklar takip edildi.

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 besiyerininin 100 ml’sine 1 mL gece kültürü eklendi ve 37 °C’de 600 nm’deki optik yoğunluğu 0,4-0,6 arasına gelinceye kadar büyütüldü. İstenilen optik yoğunluğa ulaşıldığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklenerek 3 saat indüklemeye yapıldı. Aldolazın hücreden saflaştırılması yukarıda da belirtildiği gibi “Protein Saflaştırma Kiti” kullanılarak aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

- İndüklenen kültürün 30 mL’si Falcon tüpüne konularak 10.000 rpm’de ve 4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet -20 °C’de 15 dakika bekletildi.
- 10x Hücre Liziz Çözeltisi (FastBreak Cell Lysis Reagent) ultra saf su ile 1:10 oranında seyreltildi ve pellet 6 mL 1x Hücre Liziz Çözeltisinde çözüldü. Bu basamakta hücre duvarlarının parçalanması sağlandı.
- 30 µL DNaz ilavesinden sonra tüp oda sıcaklığında bir sallayıcı üzerinde 10-20 dakika inkübe edildi. DNaz ilavesiyle hücre parçalanması sonucu açığa çıkan DNA yapıları parçalandı.
- Pellet süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine 1’er mL olacak şekilde aktarıldı.
- Her bir tüpe 120 µL Nikel-Parçacıkları (MagneHis Ni-Particles) eklendi. Tüpler oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem sonucunda N- ucunda bulunan 6 tane histidinden dolayı rekombinant protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak süpernatantdan ayrıldı.
- Nikel-Parçacıklarını tüplerin kenarına toplamak için tüpler magnetik tutucuya yerleştirildi. 1 dakika bekledikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.



Şekil 14. Poli His-Tag kuyruğu içeren FBA proteininin nikel kolonu ile saflaştırılmasının şematik gösterimi

- Tüpler magnetik tutucudan alınarak üzerlerine 600'er µL Bağlanma/Yıkama Tamponu (MagneHis Binding/Washing Buffer) eklenerek Nikel-Parçacıkları yıkandı. Tüpler magnetik tutucuya yerleştirilerek yaklaşık 1 dakika beklendi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Yıkama basamağı 2 kez daha tekrar edildi.
- Her bir tüpe 250 µL Elusyon Tamponu (MagneHis Elution Buffer) ilave edilerek oda sıcaklığında tüpler 1-2 dakika bekletildi. Elusyon Tamponu ilavesiyle nikel bağli protein çözeltiye bırakıldı. Magnetik tutucuya konulan tüplerden süpernatant yaklaşık 1 dakika sonra dikkatlice alınarak -20 °C'de saklandı.

### 2.5.2. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry, vd., 1951) Protein standardı olarak sığır serum albumini (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.
- 660 nm'de absorbanslar ölçüldü.
- Standart eğri grafiğı hazırlanarak örneğın protein derişimi bulundu.

### 2.5.3. Doğal Jel Elektrofözezi

Aldolazın varlığı doğal elektroföze ve substrat boyaması ile ortaya konuldu. Doğal elektroföze, SDS'siz ortamda ve 10x10 cm ebadındaki elektroföze tankında gerçekleştirildi (Temizkan ve Arda, 2004). % 5'lik yığıma ve % 8'lik ayırma jeli kullanıldı.

Tablo 18. Doğal jel elektroforezinin bileşenleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 8, pH 8,8)
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,25 mL	---
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,5 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	1,67 mL	2,67 mL
dd H <sub>2</sub> O	6,97 mL	4,73 mL
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,1 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	0,01 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal elektroforez yürütme tamponu ile dolduruldu. Doğal elektroforez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan standart ve örnekler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Her bir kuyucuğa yaklaşık olarak 10-15 µg protein yüklendi. Tank buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de ve ayırma jelinden çıkana kadarda yaklaşık olarak 50-60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi.

#### 2.5.4. Substrat ve Coomassie Boyaması

Doğal jelde FBA aktivitesinin belirlenmesi için histokimyasal temele dayanan ve aldolazın bulunduğu bölgelerde mor renk oluşumu ile sonuçlanan bir test gerçekleştirildi. Bu test FBA için spesifik olup substrat varlığında bir seri renk verici madde ile gerçekleştirilmektedir (Meijer, 1985). Aktivite boyaması için, uygun ebatlarda kesilen ve substrat boyama çözeltisi (Tablo 12) ile doyurulan Whatman kağıdı, jel üzerine yatırılarak mor renkli bantlar oluşana kadar yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen sonuçlar tarayıcı ile taranarak görüntülendi.

Jelde doğal haldeki proteinlerin görünür hale getirilmesi için Coomassie Brilliant Mavisinin proteinlere bağlanma özelliğinden yararlanıldı (Meyer ve Lamberts, 1965). Jel Coomassie Brilliant Mavisini içeren boyama çözeltisi (Tablo 12) içinde hafifçe sallanarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise boya

uzaklaştırma çözeltisi (Tablo 12) ile yaklaşık 2-3 saat muamele edildi. Elde edilen sonuçlar tarayıcı ile taranarak görüntüldü.

### 2.5.5. SDS Jel Elektrofrezisi

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) Maniatis ve arkadaşlarına (1989) göre gerçekleştirildi. 10x10 cm ebadında jel tankı kullanıldı. % 5'lik yığılma ve % 12'lik ayırma jeli kullanıldı.

Tablo 19. SDS jel elektrofrezinin bileşenleri

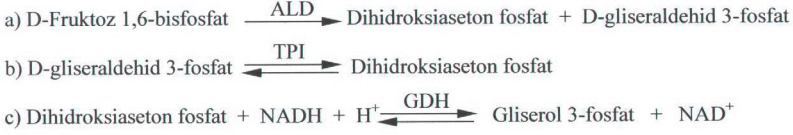
Bileşenler	Yığılma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 12, pH 6,8)
Yığılma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,25 mL	---
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	---	2,5 mL
% 10 SDS	0,1 mL	0,1 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	1,67 mL	4 mL
dd H <sub>2</sub> O	6,87 mL	3,29 mL
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,1 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	0,01 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu (Tablo 12) ile dolduruldu. SDS yürütme boyası (Tablo 12) 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 15-20 µg protein yüklendi. Boya yığılma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 10 dakika 20 mA'de ve ayırma jelinden çıkana kadarda yaklaşık olarak 50-60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Jel, Coomassie Brilliant Mavisini içeren boyama çözeltisi (Tablo 12) içinde hafifçe sallanarak yaklaşık 2 saat bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için ise boya uzaklaştırma çözeltisi (Tablo 12) ile yaklaşık 2-3 saat muamele edildi (Bölüm 2.5.4). Elde edilen sonuçlar tarayıcı ile taranarak görüntüldü.



## 2.6. Fruktöz-1,6-Bisfosfat Aldolaz Aktivitesinin Tayini

Fruktöz-1,6-bisfosfat substratına karşı aldolaz aktivitesi 340 nm'de NADH oksidasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi (Racker, E., 1947). NADH'nin oksidasyonu aşağıdaki bir seri reaksiyon sonucunda gerçekleşmektedir.



Yüksek sıcaklıklarda gliserol-3-fosfat dehidrojenaz/triozfosfat izomeraz (GDH/TPI) enzim çiftinin denaturasyonundan dolayı enzimatik aktivite son nokta deneyi ile belirlendi (Sauve ve Sygusch, 2001). Kullanılan tamponların pH'ları çalışma sıcaklıklarına göre ayarlandı. Reaksiyon karışımının son hacmi 1 mL olacak şekilde denemeler gerçekleştirildi ve spektrofotometrik ölçümler için kuvars küvetler kullanıldı. Kör denemeler, reaksiyon karışımına FBA katılmadan gerçekleştirildi ve çift ışıklı spektrofotometrede köre karşı sıfırlama yapıldıktan sonra okuma gerçekleştirildi (Şekil 15).

Aktivite hesaplamaları için eşitlik (2) kullanıldı. 1 enzim ünitesi; 60 °C'de, 1 dakikada 1 µmol FBF'yi parçalayan enzim miktarı olarak, spesifik aktivite ise 1 mg saf protein başına ünite olarak hesaplandı.

$$\text{Enzim Ünitesi} = \frac{V_t \times dA/dt \times 10^6}{\epsilon_{(\text{NADH})} \times V_e \times d} = (\text{U/L veya } \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{L}^{-1}) \quad (2)$$

$\epsilon_{(\text{NADH})}$  = NADH'nin 340 nm'deki molar absorplama katsayısı [ $6,3 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , (Siebers vd., 2001)]

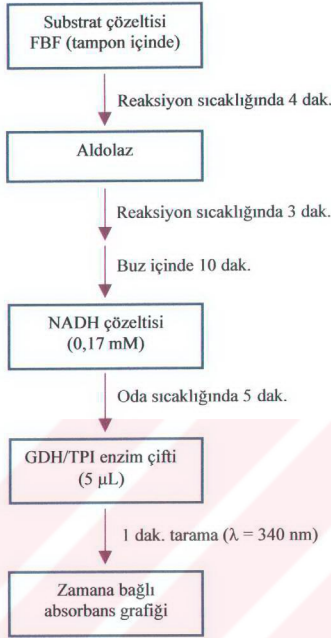
d = Küvetin ışık yolu (1 cm)

dA/dt = Birim zamandaki (dakikada) absorbans değişimi ( $\text{dak}^{-1}$ )

$V_t$  = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (1 mL)

$V_e$  = Reaksiyona katılan enzimin hacmi ( $1 \times 10^{-3}$ - $2 \times 10^{-2}$  mL)

$10^6$  = Enzim ünitesindeki miktarı µmol olarak ifade etmek için gerekli katsayı



Şekil 15. Aldolaz aktivitesinin tayininde izlenen rutin yol

### 2.6.1. Aldolaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek amacı ile aktivitenin ölçüldüğü rutin yöntemde substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon çözeltinin türü ve pH'sı değiştirilerek aldolazın substratı ile olan reaksiyonu 55 °C'de gerçekleştirildi. Bu testlerde substratın son konsantrasyonu 4 mM, enzimin son konsantrasyonu ise 2 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Kullanılan tüm tampon çözeltiler 50 mM konsantrasyonda olup pH 5-5,5 değerlerinde sodyum asetat, pH 6-6,5 değerlerinde fosfat, pH 7-9 değerlerinde Tris-HCl, pH 9,5-10 değerlerinde glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile optimum pH belirlendi.

### 2.6.2. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolazın optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için, gerçekleştirilen rutin deneyden farklı olarak 30-80 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla sabit sıcaklıklı su banyosunda aldolazın substratı ile reaksiyonu gerçekleştirildi. pH'sı 8,5 olan 50 mM'lık Tris-HCl tamponunda çözülen substratın son konsantrasyonu 4 mM, enzimin son konsantrasyonu ise 2 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen veriler kullanılarak aldolaz enziminin optimum sıcaklığı tespit edildi.

### 2.6.3. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak gerçekleştirilen optimum pH ve sıcaklık tayinlerinden sonra 10 mM'lık stok FBF çözeltisi Tris-HCl (50 mM, pH 8,5) tamponunda hazırlandı ve aldolazın katalizlediği reaksiyon 60 °C'de gerçekleştirildi. Her bir ölçüm için farklı konsantrasyonlarında FBP (0,05 mM ile 3 mM nihai FBP konsantrasyonu aralığında) ve 2 µg/mL aldolaz kullanılarak rutin reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen verilerden substrat doygunluk ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek optimum substrat konsantrasyonu ve  $V_{maks}$  ve  $K_m$  kinetik verileri elde edildi.

### 2.6.4. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

Gerçekleştirilen bu denemeler 1 mM'lık nihai FBF ve farklı enzim konsantrasyonlarında yapıldı (0,5 – 30 µg/mL nihai konsantrasyon aralığında). Elde edilen veriler kullanılarak değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi.

### 2.6.5. Aldolazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Rekombinant enzimin sahip olduğu aktivitenin ısıl kararlılığının belirlenmesi için, gerçekleştirilen rutin deneyden farklı olarak, enzim çözeltisi 30 dakikalık zaman dilimlerinde 3 saate kadar sıcaklıktaki 10 °C'lik artışlarla 30-70 °C arasında inkübe edildi. Tespit edilen şartlarda bekletilen enzim çözeltisi, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş daha önce belirlenen optimum şartlarda aktivite testleri gerçekleştirildi. % Kalan aktivite, %

herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **2.6.6. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisinin İncelenmesi**

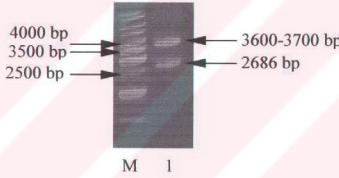
Aldolaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile monovalent  $K^+$  ve divalent  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Gerçekleştirilen rutin testten farklı olarak, kullanılan metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde her bir metal iyonu FBF çözeltilisine eklenerek 60 °C'de, 4 dakika ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Daha sonra, FBA'nın ilavesi ile 60 °C'de reaksiyonlar gerçekleştirildi ve aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak bu metal iyonlarının aldolaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

Sınıf II aldolazların genel inhibitörü olan EDTA'nın aktivite üzerine etkisini incelemek amacı ile EDTA-sodyum tuzunun 100 mM'lık stok çözeltilisi kullanıldı. Gerçekleştirilen rutin testten farklı olarak, kullanılan EDTA-sodyum tuzunun nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde FBF çözeltilisine eklenerek 60 °C'de, 4 dakika ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Daha sonra, FBA'nın ilavesi ile 60 °C'de reaksiyonlar gerçekleştirildi ve aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar, EDTA-sodyum tuzu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak EDTA'nın aldolaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için *Anoxybacillus gonensis* G2 genomik DNA'sı *EcoR* I restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen fragmentler pUC 18 plazmidine klonlandı ve *Escherichia coli* JM101 hücresine aktarıldı (Şekil 11). Yaklaşık 500 rekombinant plazmid izole edilerek uygun şartlarda saklandı. DNA sıra analizine gönderilen bir grup plazmidin DNA ve protein sıraları BLAST programında incelendi ve klon 123'ün (pUC-P123) 3'- ucundan başlayarak okunan sıranın fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) geninin başlama sinyalinden itibaren 832 bazlık kısmını içerdiği tespit edildi (Şekil 16, 18 ve 20).

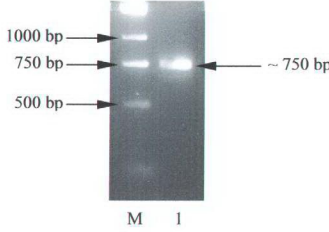


Şekil 16. pUC-P123'ün restriksiyon analizi. M; 1 Kb standart, 1; pUC-P123'ün *EcoR* I ile kesimi [lineer pUC 18 (2686 bp) ve FBA geninin büyük bir kısmını da içeren DNA parçası (~3600-3700 bp)]

#### 3.2. İnvers PCR ile Genin Sonunun Yakalanması

ALD F1 ve ALD R1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genin yaklaşık 30 bazlık son kısmının yakalanması hedeflendi. Bu amaçla yakalanan gen parçasında kesim bölgeleri olmayan *Hind* III, *Hinf* I ve *Nde* I restriksiyon enzimleri tespit edildi ve *A. gonensis* G2 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 invers PCR'da kalıp DNA olarak kullanıldı (Şekil 12). Uygun şartlarda gerçekleştirilen invers

PCR sonuçları % 1'lik jelde görüntülendi. *Hinf* I ile kesilen genomik DNA ile yapılan PCR'da yaklaşık 750 bazlık PCR ürünü elde edildi (Şekil 17).



Şekil 17. İnvers PCR ürününün % 1'lik jeldeki görüntüsü. M; 1 Kb standart, 1; PCR ürünü (~750 bp)

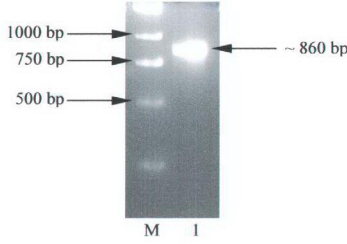
Elde edilen PCR ürünü pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve DNA sıra analizine gönderildi. Sıra analizi sonuçlarının incelenmesi sonucu FBA geninin 26 bazlık son kısmının belirlendiği tespit edildi (Şekil 18). İnvers PCR ile FBA geninin son kısmı ile beraber bu genden sonra yaklaşık 400 bp'lik DNA sırası da belirlendi. Bulunan bu yeni DNA sırası amino asit sırasına çevrilerek BLAST programı ile incelendi. İncelenen amino asit sırasının, özellikle *Bacillus* türü transaldolazlarla (TAL) yaklaşık % 90 oranında benzerliği tespit edildi (nükleotid sırası verilmemiştir).

### 3.3. FBA Geninin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

FBA geninin tam sırasının incelenmesi sonucu uygun primerler dizayn edildi (ALD F2 ve ALD R2). *A. gonensis* G2 genomik DNA'sı kalıp DNA olmak üzere bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu 861 bp'lik genin tamamı çoğaltıldı (Şekil 19). PCR ürünü *Bam*H I ve *Nde* I enzimleri ile kesildi ve yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Rekombinant vektör ekspresyon için *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresine aktarıldı ve stok kültürü yapılarak -20 °C'de saklandı.



Şekil 18. *A. gonensis* G2 genomik DNA'sının FBA'yı içeren parçası. Koyu yazılan sıra invers PCR ile bulunan bölgeyi göstermektedir. Altı çizili kodonlar sırası ile "metiyonin" ve "dur" sinyallerini kodlamaktadır. Oklarla gösterilen bölgeler ise kullanılan primer sıralarını göstermektedir.



Şekil 19. PCR ile çoğaltılan FBA geninin % 1'lik jeldeki görüntüsü. M; 1 Kb standart, I; PCR ile çoğaltılan FBA geni (~ 860 bp)

FBA geninin DNA sırası amino asit sırasına çevrilerek (Şekil 20) BLAST programı ile çakıştırma yapıldı. Çakıştırma sonuçları *A. gonensis* G2 FBA enziminin sınıf II FBA'lar ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. En çok benzerlik gösterdiği türler Tablo 20'de verilmiştir. Ayrıca, *A. gonensis* G2 FBA sırası Clustal W programı kullanılarak mezofilik bakteri *Escherichia coli* ve termofilik bakteriler *Geobacillus kaustophilus* HTA426, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus* sınıf II FBA'ları ile karşılaştırılmış ve korunmuş bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 21).

Tablo 20. *A. gonensis* G2 FBA amino asit sırasının diğer bazı türlerle benzerliği

Bakteri Adı	Benzerlik	Bakteri Adı	Benzerlik
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	% 92	<i>Bacillus subtilis</i>	% 78
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	% 91	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	% 78
<i>Bacillus cereus</i> G9241	% 84	<i>Thermus aquaticus</i>	% 46
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	% 80	<i>Escherichia coli</i>	% 44



atg cct tta gtt tca atg acg gaa atg ctt aaa caa gca tlg gca ggc aag tat gcg gtc  
**M P L V S M T E M L K Q A L A G K Y A V**  
 ggt caa ttc aat att aac aac tta gaa tgg aca caa gca att tta gca gcg gcg gaa gaa  
**G Q F N I N N L E W T Q A I L A A A E E**  
 gaa aaa tct cct gtc att ctc ggt gtg tca gaa ggg gca gct cgc tac atg ggc ggc ttt  
**E K S P V I L G V S E G A A R Y M G G F**  
 aaa act gtc gtg aac atg gtg aaa ggg tta atg gaa gac atg aac att act gtt cct gtc  
**K T V V N M V K G L M E D M N I T V P V**  
 gct att cac att gat cac ggt tca agc ttt gaa aaa tgt aaa gca gcg atc gac gct gga  
**A I H I D H G S S F E K C K A A I D A G**  
 ttt aca tca gtc atg atc gat gca tgc cat cat ccg ttt gaa gaa aac gtt gaa att aca  
**F T S V M I D A S H H P F E E N V E I T**  
 tca aaa gtt gtc gag tac gct cat gcg cgt ggt gta tgc gtt gaa gcg gag ctc gga act  
**S K V V E Y A H A R G V S V E A E L G T**  
 gtt ggt gga caa gaa gat gat gtg gtg gca gaa ggg atc att tat gca aat cca gat gag  
**V G G Q E D D V V A E G I I Y A N P D E**  
 tgc gaa gag ctt gtg aag cgc aca ggc att gac tgt tta gcg cca gcg ctc ggt tct gta  
**C E E L V K R T G I D C L A P A L G S V**  
 cac ggt cca tac aag gga gaa ccg aaa tta ggt ttt aaa gag atg gaa gaa att cgc gat  
**H G P Y K G E P K L G F K E M E E I R D**  
 cgt aca ggt gta ccg ctc gta tta cac ggt ggc aca ggt att ccg aca gaa caa att caa  
**R T G V P L V L H G G T G I P T E Q I Q**  
 cgt gct att tgc ctc ggt aca tca aaa att aac gtc aat aca gaa aac caa atg gcg ttt  
**R A I S L G T S K I N V N T E N Q M A F**  
 aca aaa gtg gtg cgc gaa gta tta gca aaa gat gaa aaa gtg tac gat cgc gaa ttc  
**T K V V R E V L A K D E K V Y D P R K F**  
 ctc ggc cct ggc cgc gat gcg att aaa gaa aca gtg att ggc aaa atg cgc gaa ttc ggt  
**L G P G R D A I K E T V I G K M R E F G**  
 tct tcc ggc aaa gcg ttg taa  
**S S G K A L \*\*\***

Şekil 20. *A. gonensis* G2 suşunun FBA geninin DNA ve protein sırası. Yıldızlar (\*\*\*) ile gösterilen kodon “dur” sinyalini temsil etmektedir.

*G. kaustophilus* HTA426  
*G. stearothermophilus*  
*A. gonensis* G2  
*T. aquaticus*  
*E. coli*

*G. kaustophilus* HTA426  
*G. stearothermophilus*  
*A. gonensis* G2  
*T. aquaticus*  
*E. coli*

*G. kaustophilus* HTA426  
*G. stearothermophilus*  
*A. gonensis* G2  
*T. aquaticus*  
*E. coli*

*G. kaustophilus* HTA426  
*G. stearothermophilus*  
*A. gonensis* G2  
*T. aquaticus*  
*E. coli*

-----MPLVSMKEMLINELRGKYAVGQFNINNLEWQIILAAE 39  
-----MSLYSMKEMLINELRGKYAVGQFNINNLEWQIILAAE 39  
-----MPLVSMTEMLKQALAGKYAVGQFNINNLEWQIILAAE 39  
-----MLVTGLEILKAREEGYGVGAFVNNMEFLQAVLEARE 38  
SKIFDFVKPGVITGDDVQKVQVQKKNFALPAVNCVGTDSINAVLETA 50  
  
EKSFVILGVSEGAARYMSGFKTVNNMVKGLMEDMNI----- 76  
EKSFVILGVSEGAARYMGFKTVNNMVKGLMEDMNI----- 76  
EKSFVILGVSEGAARYMGFKTVNNMVKGLMEDMNI----- 76  
EORSFVILALSEGAARYGG--RALTIMAVELAKEA----- 71  
KVKAPEVIVQFENSGASFIAGKGVKSDVPQGAAILGALSGAHHVHQMAEHY 100  
  
TFVVAIILDRGSS-----FECKAAIDAG---FTSVMIDASHHPF 113  
TFVVAIILDRGSS-----FECKAAIDAG---FTSVMIDASHHPF 113  
TFVVAIILDRGSS-----FECKAAIDAG---FTSVMIDASHHPF 113  
RVPVAVILDRGSS-----YESVLRALRAG---FTSVMIDKSHEDF 108  
GVFVAILTDRCAKLLPWIDGLLDAGEKHFALTKPFLSSHMIDLSEESL 150  
\*\*  
  
EENVRIITSQVVEYAHARVSVVAELGIVGQDDVYVGEG----IIVADEK 159  
EENVRIITSQVVEYAHARVSVVAELGIVGQDDVYVGEG----IIVADEK 159  
EENEVITSKVVEYAHARVSVVAELGTGVGQDDVVAEG----IIVANPD 159  
ETVRETRRVVAAHAYGVTVVAELGRLAGIIEHVAVDEK--DALITNPE 156  
QENIEICSKYLERMSKIEMTLEIELGCTGEGEDVNDNHMDASALYTPQE 200  
\*

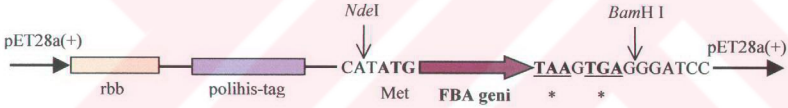
Şekil 21. *A. gonensis* G2 FBA amino asit sırasının Clustal W programı ile bazı organizmaların FBA sıraları ile çakıştırma sonuçları. Kırmızı renkli birimler tüm sıralardaki korunmuş birimleri göstermektedir.

## Şekil 21 'in devamı

<i>G. kaustophilus</i> HTA426	-----ECELVKRTGVDCCIAPALSSVHGPPYKGE-----PKLGFAMEQIRD 200
<i>G. stearothermophilus</i>	-----ECELVKRTGIDCCIAPALSSVHGPPYKGE-----PKLGFAMEKIRD 200
<i>A. gonenisis</i> G2	-----ECELVKRTGIDCCIAPALSSVHGPPYKGE-----PKLGFEMEIIRD 200
<i>T. agnaticus</i>	----EARIFMERTGADYIIVAIIGTSGAYKKG---RPFIDHARLERIAR 199
<i>E. coli</i>	DVDVAYTELSKISPRFTIIVASFGNVHGVPGNVLTPTILRDSQEVVSK 250
<i>G. kaustophilus</i> HTA426	LTGVPE----LVLHGTTGIP-----TEQIQRAIS 224
<i>G. stearothermophilus</i>	LTGIP----LVLHGTTGIP-----TEQIQRAIS 224
<i>A. gonenisis</i> G2	RTGVPE----LVLHGTTGIP-----TEQIQRAIS 224
<i>T. agnaticus</i>	LVPAP----LVLHGASAVPPPELVERFRASGGFIEGFAAGIHPELIKKAIS 244
<i>E. coli</i>	KHNLPHNSLNEVFRGSGST-----AQEIKDSVS 279
<i>G. kaustophilus</i> HTA426	LGTSKINVNENQVFTKVVRELLAK-----DPNVYD 256
<i>G. stearothermophilus</i>	LGTSKINVNENQVFTKVVRELLAK-----DPNVYD 256
<i>A. gonenisis</i> G2	LGTSKINVNENQVFTKVVREVLAK-----DEKYYD 256
<i>T. agnaticus</i>	LGIAKINTDLRLAFTALIREALNK-----NPKFED 276
<i>E. coli</i>	YGVVKMAIDTDQVETWEGVLNYYKANEAYLQQLGNPKGEDQPNKKYYD 329
<i>G. kaustophilus</i> HTA426	PKIIIGPGRDAIKATVIKMKREFGSSGKAAR 287
<i>G. stearothermophilus</i>	PKIIIGPGRDAIKATVIKMKREFGSSGKAAQ 287
<i>A. gonenisis</i> G2	PKRFLGFRDAIKETVIKMKREFGSSGKAL- 286
<i>T. agnaticus</i>	PKYLGPAAREAVKVEVKSRMELFGSVGRA-- 305
<i>E. coli</i>	PRVWLRAGQTSMIARLEKAFQELNAIDVLI-- 358

### 3.4. Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın 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. FBA proteininin saflaştırılmasında bu yöntem kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu FBA geninin klonlanması için pET28a(+) vektörünün kullanılmasının uygun olacağı tespit edilmiş ve ekspresyon vektörü olarak kullanılmıştır. pET28a(+) vektörü ribozom bağlanma bölgesinden sonra ve *Nde* I kesim bölgesinin hemen önünde 6 tane histidin kodlayan kodon (polihistidin-tag) içermektedir. PCR ile çoğaltılan FBA geni 5'- ucundan *Nde* I, 3'- ucundan *Bam*H I ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET28a(+) vektörüne klonlandığında (pET-ald1), rekombinant vektör genin başlama kodonundan hemen önce 6 tane histidin kodlayan kodon içerir (Şekil 22). Yani ekspres edilen FBA, N'- ucunda 6 tane histidin amino asidi (histidin kuyruğu) içermektedir.



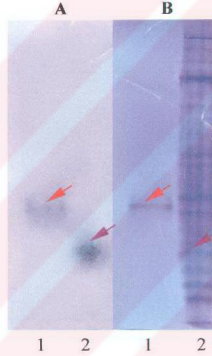
Şekil 22. FBA geninin pET28a(+) vektörüne klonlandığı bölgenin şematik gösterimi. Turuncu ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbb), eflatunla gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodonlar ise “dur” sinyallerini göstermektedir.

*E.coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilen FBA proteinini, nikel taneciklerinin proteinin N- ucunda bulunan histidin birimlerindeki azotlar ile etkileşmesiyle diğer proteinlerden ayrılarak saflaştırıldı (Şekil 14).

### 3.5. Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.5.1. Fruktoz-1,6-Bisfosfat Aldolazın Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu

Saflaştırılan proteinin aldolaz aktivitesi ilk olarak elektroforetik olarak ortaya konuldu. Aldolaz aktivitesi, fruktoz-1,6-bisfosfat (FBF), nikotinamid adenin dinükleotid ( $\text{NAD}^+$ ) ve bir seri renk oluşturuvcu madde varlığında mor renkli bant oluşumu ile belirlenmektedir (Meijer, 1985). Bu yöntem FBA'lar için spesifiktir. Doğal elektroferezle proteinlerin denatüre olmadan jelde birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen boyama testi ile jel üzerine yatırılan substrat boyama çözeltisiyle doyurulmuş kağıtta mor renkli bantların oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Doğal jel elektroferez analizi

**A)** Aktivite boyaması

**B)** Coomassie brilliant blue boyaması

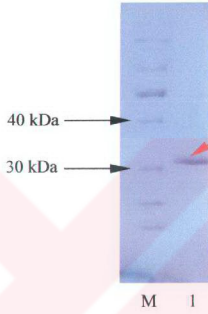
1; Saf protein [pET-ald1; (*E. coli* BL21(DE3)pLysS + pET28a(+)) – FBA geni]

2; Orijinal *A. gonenis* G2 suşunun hücre içi proteinleri (pozitif kontrol)

Şekil 23 A'da protein tek bant olarak görülmektedir. Bu da proteinin saf olarak izole edildiğini göstermektedir. Saf proteinin, substrat boyaması sonucunda jel üzerine yatırılan kağıtta, mor renkli bir bant oluşturması FBA aktivitesi gösterdiğinin kanıtıdır. Pozitif kontrol olarak kullanılan *A. gonenis* G2 suşunun çözünen hücre içi proteinleri hücre duvarının lizozimle parçalanması ile elde edilmiştir ve aldolaz aktivitesi göstermektedir. Saf protein başlama sinyalinin önce histidin ve diğer bazı amino asitleri içerdiğinden

yürüme hızının orijinal bakteridekinden daha yavaş olması beklenmektedir. Bu farklı göç hızı da Şekil 23'te görülmektedir.

FBA'nın moleküler ağırlığı ve farklı alt birimler içerip içermediği sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen SDS elektroforezinden sonra jel Coomassie brilliant blue ile boyanarak protein bantları görünür hale getirilmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. SDS jel elektroforez analizi.

M; protein standartları, 1; Saf protein [pET-ald1 (*E. coli* BL21(DE3)pLysS + pET28a(+)-FBA geni]

Şekil 24'te görüldüğü gibi saf protein tek bant halindedir. Bu da enzimin farklı alt birimlerden oluşmadığını göstermektedir. Standart proteinlerin ve saf proteinin  $R_f$  değerleri hesaplanarak moleküler ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiğe geçildi ve saf proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık 31,9 kDa civarında bulundu. Ayrıca proteinin moleküler ağırlığı teorik olarak da hesaplandı. Yalnızca FBA'nın amino asit sırası dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucu moleküler ağırlık 30.875 Da olarak bulundu. Fakat FBA proteinin pET28a(+) vektöründe ekspres edildiği dikkate alındığında başlama sinyalinin önceki polihistidin ve diğer amino asitlerin de göz önüne alınması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan hesaplama sonucu histidin kuyruğu içeren FBA proteininin moleküler ağırlığı 33.287 Da olarak bulunmuştur. Teorik moleküler ağırlıkla deneysel moleküler ağırlık birbirine oldukça yakın değerlerdir.

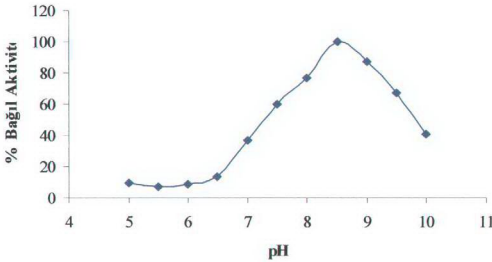
### 3.5.2. Aldolaz Aktivitesinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu

Fruktoz-1,6-bisfosfat substratına karşı aldolaz aktivitesi 340 nm'de NADH oksidasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi (Racker, E., 1947). Aktivite hesaplamaları için 340 nm'de  $\epsilon_{(NADH)} = 6,3 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  alındı (Siebers vd., 2001). 1 enzim ünitesi; 60 °C'de, 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  FBF'yi parçalayan enzim miktarı olarak, spesifik aktivite ise 1 mg saf protein başına ünite olarak hesaplandı.

*A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen FBA'nın detaylı bir şekilde karakterizasyonu için aktivite üzerine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, protein konsantrasyonu, metal iyonu ve inhibitör etkisi incelendi. Ayrıca enzimin ısı kararlılığı belirlendi.

#### 3.5.2.1. Aldolaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

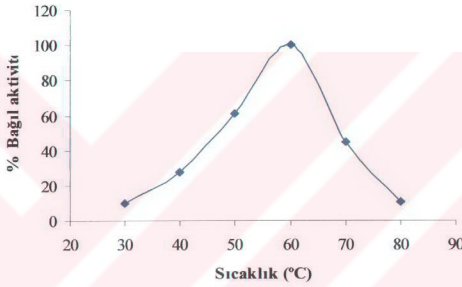
*A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen FBA'nın en yüksek etkinlik gösterdiği pH değerinin bulunması amacı ile farklı pH değerlerindeki tamponların kullanılması ile enzim aktiviteleri belirlenerek pH değerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH - % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 25). Buna göre, çizilen grafik, saf proteinler için tipik olan ve tek bir maksimumun olduğu bir eğri şeklindedir. Bu egride, optimum pH'nın 8,5 civarında olduğu görülmektedir. Aktivite tayininde FBA dışında triozfosfat izomeraz (TPI) ve gliserol-3-fosfat dehidrojenaz (GDH) enzimleri de kullanıldığından elde edilen optimum pH değerinin toplam reaksiyonun optimum pH'sı olduğu söylenebilir.



Şekil 25. Aldolaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

### 3.5.2.2. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

*A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen FBA'nın en yüksek etkinlik gösterdiği sıcaklık değerinin bulunması amacı ile 30-80 °C arasındaki sıcaklık değerlerindeki enzim aktiviteleri belirlenerek sıcaklık değerine karşılık gelen aktivitelerle bir sıcaklık - % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 26). Elde edilen eğri, çan eğrisi şeklindedir ve 60 °C'de aktivite maksimumdur. 70 °C aktivitenin yaklaşık % 50 oranında düştüğü görülmektedir. 80 °C'de ise aktivite yaklaşık % 90 oranında kaybolmaktadır.

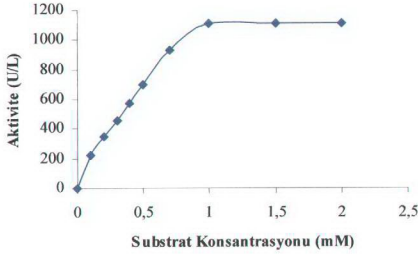


Şekil 26. Aldolaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

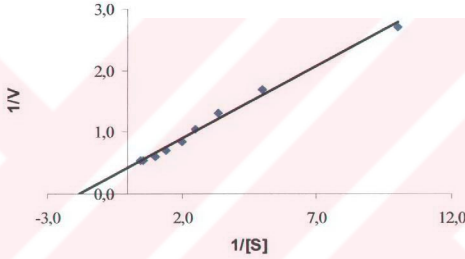
### 3.5.2.3. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, *A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen FBA'nın enzim aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacı ile nihai konsantrasyonu 0-3,0 mM aralığında olacak şekilde değişik konsantrasyonlardaki FBF substratının parçalanması sonucu yükseltgenen NADH miktarı 340 nm'de absorbanstaki azalma ile ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için substrat doygunluk eğrisi (Şekil 27), kinetik veriler için ise Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 28) çizildi. Substrat doygunluk eğrisinden enzim aktivitesinin basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu ve etkili bir aktivitenin gözlenmesi için FBF konsantrasyonunun 1 mM olması gerektiği tespit edildi. Lineweaver-Burk eğrisinden FBF substratı varlığında  $V_{maks}$  ve  $K_M$  değerleri sırası ile 2,4  $\mu\text{M}/\text{dak.mg}$  protein ve 567  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi.





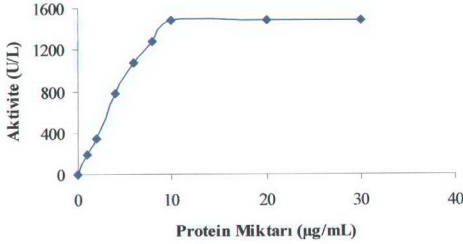
Şekil 27. FBF substratı varlığında FBA'nın doygunluk eğrisi



Şekil 28. FBF substratı varlığında aldolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi

#### 3.5.2.4. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

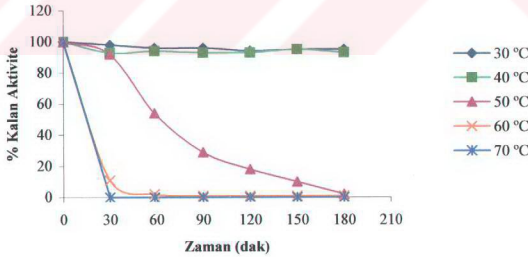
*A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E. coli*'de ekspres edilen FBA'nın aktivitesi, sabit substrat konsantrasyonunda protein miktarındaki değişime bağlı olarak incelendi. Şekil 29'daki hiperbolik eğriden de görüleceği üzere, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  enzim konsantrasyonuna kadar enzim miktarındaki artış hızı artırmakta, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve yukarıdaki enzim konsantrasyonlarında ise hız sabit kalmaktadır. Yani, bu noktadan sonra enzim miktarındaki artış artık reaksiyon hızını etkilememektedir. Bu nedenle, aldolaz aktivitesi için optimum enzim miktarı 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak belirlendi (Şekil 29).



Şekil 29. Aldolaz aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi

### 3.5.2.5. Aldolazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacı ile, çalışmalar 30 ile 70 °C arasında 10 °C'lik aralıklarla ve 30 dakikalık zaman aralıklarında 3 saatlik bir süre boyunca gerçekleştirildi. 30 ve 40 °C'de aktivitenin önemli ölçüde değişmediği, 50 °C'de ilk 30 dakikadan sonra azaldığı ve 60-70 °C'de ilk 30 dakika da % 10'un altına düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. FBA'nın ısıl kararlılık eğrisi

### 3.5.2.6. Aldolaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının ve EDTA'nın Etkisi

Aldolaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisini ortaya koymak amacı ile monovalent  $K^+$  ve divalent  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  iyonlarının klorür tuzları ile EDTA'nın sodyum tuzu kullanıldı. 1 mM'lık metal iyonları ve EDTA varlığında ve optimum şartlardaki aldolaz aktivitesindeki değişimler kaydedildi. Kontrol olarak, metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışım için gözlenen aktivite değeri % 100 kabul edildi (Tablo 21).

Tablo 21. Aldolaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın etkisi

Metal iyonu	% Kalan Aktivite	Metal iyonu	% Kalan Aktivite
Yok	100	$Cr^{+2}$	64
$K^+$	130	$Cd^{+2}$	100
$Zn^{+2}$	289	$Cu^{+2}$	43
$Ca^{+2}$	182	EDTA	0
$Co^{+2}$	163		

#### 4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Gerçekleştirilen çalışmada, Balıkesir Gönen kaplıcasından izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizi ile yeni bir tür olduğu ortaya konulan *Anoxybacillus gonensis* (*A. gonensis*) G2 suşundan ısıya dirençli fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) geni indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET28a(+) vektörüne klonlanıp *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmiştir. Ekspres edilen enzim saflaştırılıp aldolaz 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 FBA geninin 832 bazlık kısmı klon 123'ün içinde bulunmaktadır. Bu da genin *EcoR* I kesim bölgesi içerdiğini göstermektedir. İnvers PCR ile yakalanan parça ile birlikte genin 861 baz ve 286 amino asitten oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 20).

Amino asit sırasının BLAST programı kullanılarak diğer organizmalardaki aldolazlarla karşılaştırılması sonucu özellikle *Bacillus* türünün dimerik yapıdaki sınıf II FBA'larının amino asit sıralarına % 80-90 arasında benzediği tespit edilmiştir. Oysaki tetramerik yapıda olan sınıf II FBA'ları içerdiği bilinen türlere (Sauve ve Sygusch, 2001) % 40-45 oranında benzemektedir (Tablo 20). Bu bilgiler ışığında klonlanan proteinin sınıf II grubuna ait fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz olduğu ve dimerik yapıda olma olasılığının oldukça fazla olduğu söylenebilir. Karşılaştırma sonuçları enzimin dimerik yapıda olma ihtimalini ne kadar güçlü kılsın, yine de dördüncül yapısı hakkında deneysel verilere sahip olmadan kesin bir değerlendirme yapmak doğru değildir. Bununla birlikte, *Thermus aquaticus*, *Helicobacter pylori* ve siyanobakteri olan *Synechocystis* türleri tetramerik yapıya sahip olan sınıf II FBA enzimlerini içermektedir ve bu enzimlerin hepsinin amino asit sırasında 21 amino asitlik ilave bir bölge bulunmaktadır (Sauve ve Sygusch, 2001). Bu bölgenin tetramerik dördüncül yapıyı kararlı kılabileceği ifade edilmektedir. Oysaki bu 21 amino asitlik bölge dimerik yapıdaki sınıf II A [*E. coli* (Baldwin vd., 1978), *S. cerevisiae* (Jack ve Harris, 1971)] ve sınıf II B [*B. stearothermophilus* (Sugimoto ve Nosoh, 1971 )] gruplarında ve *A. gonensis* G2 FBA'sında bulunmamaktadır (Şekil 21). Bu çalışmanın devamında jel filtrasyon

kromatografisi ya da yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile klonlanan enzimin dördüncül yapısı ve toplam molekül ağırlığı tespit edilebilir.

Elektroforetik çalışmalarla da klonlanan genin FBA'yı ekspres ettiği tespit edilmiştir. FBA'lara özgü olan substrat boyama testi (Sauve ve Sygusch, 2001) rekombinant proteine uygulanıp, mor renkli bant elde edilmiştir (Şekil 23). Enzimin tek bir tür alt birimden oluştuğu SDS jel elektroforezi ile ortaya konulmuştur (Şekil 24). SDS jel elektroforezi sonuçlarına göre proteinin tek bant halinde olması, enzimin dördüncül yapısının homolog iki ya da daha fazla birimin organizasyonu ile oluştuğunu gösterir. Ekspres edilen rekombinant protein histidin kuyruğu içerdiğinden alt birim molekül ağırlığı 33,3 kDa olarak, histidin kuyruğu içermeyen orijinal protein alt birim ağırlığı ise 30,9 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu değerler SDS elektroforez sonuçları ile de desteklenmektedir. Deneysel olarak rekombinant enzimin alt birim molekül ağırlığı yaklaşık olarak 31,9 kDa civarında bulunmuştur. Bu değer, termofilik bir bakteri olan *B. stearothermophilus*'dan saflaştırılan ve alt birim ağırlığı 30,3 kDa olan homodimerik yapıdaki FBA'nın molekül ağırlığına oldukça yakın bir değerdir (Sugimoto ve Nosoh, 1971).

BLAST programı ile yapılan karşılaştırma sonucu, *A. gonensis* G2 FBA'sının homodimerik yapıdaki *Geobacillus kaustophilus* HTA426 FBA'sına % 92, *Geobacillus stearothermophilus* FBA'sına % 91 ve *E. coli* FBA'sına % 40 oranında, homotetramerik yapıdaki *Thermus aquaticus* FBA'sına ise % 46 oranında benzediği tespit edilmiştir (Tablo 20).

Clustal W programı kullanılarak yapılan karşılaştırmada *A. gonensis* G2 FBA'sının amino asit sırası, *E. coli*, *G. kaustophilus*, *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* ve *T. aquaticus* sınıf II FBA'larının amino asit sıraları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 21). Sonuçlar incelendiğinde, *A. gonensis* G2 FBA'sının da diğer sınıf II FBA'lar gibi korunmuş birim ve bölgeleri olduğu bulundu. Özellikle kataliz ve metal bağlanma bölgeleri tamamen korunmuştur.

Sınıf II FBA'lar aktif bölgelerindeki genellikle bir çinko iyonu mevcudiyetinde reaksiyonu katalizlerler. Sınıf II aldolazlardaki substratın bağlanmasından sorumlu olan birimler hakkında sınıf I aldolazlara göre daha az bilgi vardır (Plater vd., 1999). Sınıf II enzimler çoğunlukla benzer bir mekanizma ile reaksiyonu katalizler. Mekanizma aydınlatma çalışmaları genellikle *E. coli* sınıf II FBA proteininde gerçekleştirilmektedir. Fonksiyonel amino asitler mutasyonla değiştirilerek mutantların aktiviteleri incelenmekte ve bu şekilde fonksiyonel amino asit birimleri ortaya konmaktadır. Berry ve Marshall'ın

(1993) yaptığı çalışmada, aktif bölgedeki katalitik çinko iyonunun 3 tane histidin birimi (His110, His226 ve His264) ve bir tane glutamat birimi (Glu172) ile koordinasyon yaptığı belirlenmiştir. His110 ve His 264'ün rotasyonu sonucu gömülü pozisyonundaki çinko iyonu yüzeye çıkarak substrat ile etkileşebileceği pozisyona gelir (Berry ve Marshall, 1993). Qamar ve arkadaşlarının (1996) gerçekleştirdiği çalışmalar sonucu, bir arginin biriminin (Arg331) kesim reaksiyonu yönünde FBF substratının C6 fosfatının, kondenzasyon reaksiyonu yönünde ise GAP'ın C3 fosfatının enzime bağlanması ve tanınmasında, kritik bir role sahip olduğu ortaya konulmuştur (Qamar vd., 1996). Zgiby ve arkadaşları (2002) Glu174'ün substrat bağlanmasında etkin bir rolü olmasa da bu birimin katalizde önemli bir rolü olduğunu, ayrıca Glu182 biriminin de katalitik çevrimde önemli olduğunu bildirmektedir. Glu182 kondenzasyon yönündeki reaksiyonun ilk basamağında DHAF'ın C1 hidrojeninin uzaklaştırılmasında önemli bir rolü vardır. Ayrıca Glu182 kesim reaksiyonu yönünde FBF C3'deki protonlanmadan sorumludur (Zgiby vd., 2002). Aktif bölgede yer alan bir asparagin biriminin (Asn286) katalizde ve ketonik uçlu substratın enzime bağlanmasında önemli bir rolü vardır. Ayrıca yapılan mutasyon çalışmaları bir aspartat biriminin (Asp109) kondenzasyon reaksiyonunda GAF'nin karbonil grubunun polarizasyonundan, kesim reaksiyonunda ise C4 hidroksi protonunun uzaklaştırılmasından sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (Plater vd., 1999). Yukarıda anlatılan ve enzimin reaksiyonu katalizlemesinde rol alan tüm amino asitler *A. gonensis* G2 FBA'sında tamamen korunmuşlardır (Şekil 21). Bu birimler; divalent metal iyonunun bağlanmasından sorumlu olan His86, His181, His209 ve Glu135 birimleri (*E. coli*'de sırası ile; His110, His226, His264 ve Glu 172); katalitik reaksiyonda rol alan Arg258, Glu145, Asn231 ve Asp85 birimleri (*E. coli*'de sırası ile; Arg331, Glu182, Asn286ve Asp109) ve Glu137 birimidir (*E. coli*'de; Glu174). Genellikle çoğu sınıf II FBA'lar bir metal iyonu mevcudiyetinde benzer mekanizmalar ile reaksiyonları katalizlerler (Sauve ve Sygusch, 2001). Bu sonuçlar ışığı altında *A. gonensis* G2 FBA'sının da kesim ve kondenzasyon reaksiyonunu diğer sınıf II FBA'larla benzer bir yolla katalizlediği söylenebilir.

FBA geninin tamamının pET28a(+)'ya klonlanması ile elde edilen rekombinant vektör (pET-ald1) *E.coli*'ye aktarıldı, bu hücrede histidin kuyruğu içeren bir fizyon proteini olarak ekspres edildi ve nikel kolonu ile tek adımda saflaştırıldı. Kolorimetrik olarak gerçekleştirilen testte mor bandın oluşumu aldolaz aktivitesinin varlığını göstermektedir (Şekil 23 A) ve ekspres edilen proteinin aktif formda olduğunun bir kanıtıdır. Spektroskopik olarak yapılan testlerde de saflaştırılan proteinin aldolaz aktivitesi

gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da histidin kuyruğunun proteinin katlanması ve metal iyonu bağlaması açısından aktiviteyi kaybettirecek ya da oldukça azaltacak şekilde etki etmediğini göstermektedir.

Rekombinant enzimle gerçekleştirilen aktivite testleri ile enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Histidin kuyruğu içeren rekombinant proteinin aldolaz aktivitesinin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde grafiğin tek bir pik verdiği ve optimum pH'nın 8,5 olduğu gözlenmiştir (Şekil 25). Aktivite tayini, FBA dışında iki ilave enzim (TPI-GDH, optimum pH 7,4) varlığında gerçekleştirildiğinden, ortamın pH'sının değişmesi ile bu enzimlerin de aktivitelerinin değişmesi oldukça olasıdır. Literatürlerde, bu üçlü enzim varlığında tayin edilen aktivitenin en yüksek olduğu pH, aldolaz için optimum pH olarak verilmesine rağmen, aslında gerçekleşen tüm reaksiyonlar için optimum pH belirlenmektedir. Bu değer *B. stearothermophilus* FBA'sının optimum pH'sı ile oldukça yakındır. Saflaştırılmış *B. stearothermophilus* FBA'sının optimum pH'sının Tris ya da borat tamponunda 8,5-8,6 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Sugimoto ve Nosoh, 1971). Ayrıca ekstrotermofil olan *T. aquaticus*'un, tetramerik yapıdaki FBA'sı pH 6,5'de maksimum aktivite göstermektedir. Bu değer şimdiye kadar saflaştırılan sınıf II aldolazlardan daha düşük bir değerdir (De Montigny ve Sygusch, 1996). Genellikle sınıf I aldolazlar pH 7-9 aralığında geniş bir pH optimumu gösterirken, sınıf II aldolazlar pH 7-9 aralığında tek bir noktada ya da dar bir aralıkta pH optimumu göstermektedir (Tablo 3) (Ramsaywak vd., 2004). Bu yüzden rekombinant enzimin dar bir pH optimumuna sahip olması dahil olduğu sınıf II aldolazlarının genel bir özelliğidir.

Rekombinant enzimin sıcaklık-aktivite profilinden optimum sıcaklığın 60 °C olduğu bulundu (Şekil 26). 70 °C'de aktivite yaklaşık % 50, 80 °C'de ise yaklaşık % 90 oranında azalmaktadır. Enzimin ısı kararlılığı ile ilgili bulgularda ise 60 ve 70 °C'de enzimin sırası ile 90 ve 30 dakikalık inkübasyon süreleri sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği görülmektedir (Şekil 30). 50 °C'de ise enzim aktivitesinde ilk yarım saat içinde önemli bir değişim olmadığı, yarım saatten sonra ise aktivitenin azalmaya başladığı ve 3 saat sonra tamamen kaybolduğu görülmektedir. 30 ve 40 °C'de ise enzimin 3 saat içinde aktivitesini hemen hemen koruduğu görülmektedir. Sıcaklık parametreleri *B. stearothermophilus* FBA'sı ile karşılaştırıldığında yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür. *B. stearothermophilus* FBA'sı maksimum aktiviteyi 70 °C'de göstermektedir ve 45 °C'ye kadar enzim kararlılığını korumaktadır. 55-65 °C aralığında ise enzimde az da olsa aktivite kaybı görülmekte, 75 °C'de 30 dakikanın üzerinde enzim tamamen aktivitesini

kaybetmektedir (Sugimoto ve Nosoh, 1971). Ekstrotermofil olan *T. aquaticus* FBA'sı ise maksimum aktiviteyi 95 °C civarında göstermekte ve 80 °C'de 2 saat inkübasyon zamanından sonra bile aktivitesini muhafaza etmektedir (De Montigny ve Sygusch, 1996). Oysaki, mezofilik türlerden saflaştırılan FBA'lar yaklaşık olarak 30-40 °C arasında aktivite gösterirken bu sıcaklığın üzerinde aktiviteleri kaybolmaktadır (Alefounder vd., 1989; Sauve ve Sygusch, 2001). Bu da termofilik enzimleri mezofilik homologlarına göre daha cazip kılmaktadır.

Rekombinant enzimin kinetik değerlerinin ve optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda FBF kullanıldı. Protein miktarı sabit tutularak yapılan çalışmada elde edilen Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrilerinden optimum substrat konsantrasyonu 1 mM,  $V_{maks}$  ve  $K_M$  değerleri sırası ile 2,4 µM/dak.mg protein ve 567 µM olarak belirlendi. 1 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda hızın değişmediği saptandı (Şekil 27 ve 28).  $K_M$  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 FBF substratı için  $K_M$  değerleri *E. coli*, *Euglena gracilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, *B. subtilis* ve *T. aquaticus*'ta sırası ile 170 µM, 175 µM, 370 µM, 30 µM, 2 mM ve 330 µM olarak tespit edilmiştir (De Montigny ve Sygusch, 1996). *E. coli*'de bulunan sınıf I ve sınıf II FBA'ları için enzimin substratla doygunluğa ulaştığı noktadaki hız değerleri sırası ile 13,8 ve 5,9 µM/dak.mg protein (Nakahara vd., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* için 35,1 µM/dak.mg protein olarak tespit edilmiştir (Ramsaywak vd., 2004). Ayrıca, diğer bir sabit olan  $k_{kat}$ , ürünün katalitik üretiminin doğrudan bir ölçüsüdür ve herhangi bir enzim molekülünün bir substrat molekülünü ürüne dönüştürebilmesi için gereken zamanı ifade eder.  $k_{kat}$  değeri ne kadar büyükse enzim yüzeyindeki katalitik olaylar o kadar çabuk oluşur. Bu değerlin bulunabilmesi için enzim konsantrasyonuna gereksinim vardır. Bu çalışmada enzimin tersiyer yapısı belirlenemediği için enzim konsantrasyonu hesaplanamamıştır. Dolayısıyla,  $k_{kat}$  değeri de hesaplanamamıştır. Enzimin tersiyer yapısı belirlendikten sonra bu sabit hesaplanabilir.

Rekombinant enzimin sergilediği aktivitenin enzim konsantrasyonuna bağımlılığı incelendiğinde, 10 µg/mL'lik protein içeriğine kadar aldolaz aktivitesinin arttığını daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise aldolaz aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Şekil 29). Sonuç olarak maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan



sonra FBF'nin parçalanma hızının enzim miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği söylenebilir. Tespit edilen bu enzim konsantrasyonu literatür bilgileri ile uyum içindedir. Genellikle reaksiyon karışımları 5-10 µg/mL arasında aldolaz konsantrasyonuna sahiptir (De Montigny ve Sygusch, 1996; Ramsaywak vd., 2004).

Bir çok enzim, aktivitesi için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). Aktivite üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından  $K^+$  iyonunun aktiviteyi stimüle ettiği gözlenmiştir. Bazı divalent metal iyonları ile de aktivite test edildi ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının enzimin en potansiyel aktivatörü olduğu gözlemlendi.  $Zn^{+2}$  iyonu varlığında aldolaz aktivitesi yaklaşık 3 kat artmaktadır.  $Co^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  varlığında enzim aktivitesinde bir artış olsa da  $Zn^{+2}$  durumundakine göre çok daha düşüktür (Tablo 21). Bu yüzden, tüm bu verilere dayanarak rekombinant enzimin maksimum aktivitenin sağlanması için  $Zn^{+2}$  iyonuna gerek duyan bir sınıf II aldolaz enzimi olduğu söylenebilir. Genellikle çoğu sınıf II aldolazlar kofaktör olarak  $Zn^{+2}$  iyonunu kullanırlar. *B. stearothermophilus* ve *E. coli* FBA'ları kofaktör olarak  $Zn^{+2}$  iyonuna ihtiyaç duyarlarken (Sugimoto ve Nosoh, 1971; Alefounder vd., 1989), *Taq* FBA'sı  $Co^{+2}$ 'ye gereksinim duymaktadır (De Montigny ve Sygusch, 1996).

Metaloenzim grubundan olan sınıf II aldolazların genel inhibitörü EDTA'dır (Horecker vd., 1972; Harris vd., 1969). EDTA mevcudiyetinde aldolaz aktivitesi tamamen kaybolması ya da önemli bir oranda azalması karakterize edilen enzimin sınıf II aldolaz grubuna dahil olduğunun önemli bir göstergesidir. Bu durum sınıf II aldolazların  $Zn^{+2}$  içeren bir metaloenzim olmasına ve EDTA'nın da bir metal şelatlayıcı olarak rol oynamasına atfedilebilir. 1 mM'lık EDTA konsantrasyonunda aldolaz aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (Tablo 21). Doğal olarak bu sonuç, sınıf II aldolazlar için kesinlikle beklenen bir sonuçtur. 0,1 mM - 10 mM arasındaki EDTA konsantrasyonlarının *B. stearothermophilus* FBA'sını aktivitesini % 90 oranında azalttığı (Freeze ve Brock, 1970), 1 mM'lık EDTA konsantrasyonunun *Mycobacterium tuberculosis* FBA'sının aktivitesini tamamen ortadan kaldırdığı (Ramsaywak vd., 2004) rapor edilmiştir.

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, *A. gonensis* G2 suşundan klonlanıp *E. coli*'de histidin kuyruğu ile ekspres edilen FBA'nın metal bağımlı sınıf II aldolaz grubuna ait bir enzim olduğu söylenebilir. Ayrıca bu enzimin mezofilik FBA'lara nazaran daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması organik sentezlerde kullanımını daha cazip kılmaktadır.

## 5.ÖNERİLER

Enzimler doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. 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 *Anoxybacillus gonensis*'in (*A. gonensis*) G2 suşunun fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) geninin bir vektöre klonlanıp *Escherichia coli*'de (*E. coli*) ekspres edilmesi açısından önem arz etmektedir. İzlenen yol enzim üretimini daha kolay hale getirmiştir. Çünkü bu şekilde gen indüklenebilir bir promotörün altında olduğundan bolca ekspres edilebilir. Ayrıca histidin kuyruğu içerdiğinden tek basamakla nikel kolonu ile saflaştırılabilir. Bu da enzimin saf halde eldesi açısından oldukça önemlidir.

Enzimlerin endüstride en çok kullanıldıkları alan kuşkusuz organik sentezlerdir. Sentez reaksiyonları genellikle ekstrem şartlar olan yüksek sıcaklık, yüksek basınç ve organik çözücüler mevcudiyetinde gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, sentez reaksiyonlarında kullanılacak olan enzimler, ekstrem şartlarda kararlı olmalı ve katalitik fonksiyonunu gerçekleştirmelidir. Aldolazlar, özellikle sentez reaksiyonlarında C-C bağlarının oluşumu ya da kırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, termofilik *A. gonensis* G2 suşundan klonlanan ve *E.coli*'de ekspres edilen FBA enziminin, mezofilik homologlarına göre daha yüksek ısı kararlılığına sahip olması nedeniyle, özellikle organik sentezde kullanılabileceği söylenilebilir. Ancak bunun için enzimin deterjan ve organik çözücü içeren ortamlardaki kararlılığı incelenmeli ve bu yönüyle sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır. Enzimlerin kararlılıklarını arttırmanın bir yolu da immobilize edilmeleridir. Bu çalışmada, saflaştırılan aldolazın immobilizasyonu ile de kararlılığı arttırılabilir ve ileri derecede karakterize edilerek organik reaksiyonlarda kullanılabilirliği araştırılabilir. Ayrıca, rekombinant proteinin molekül ağırlığı, molekül yapısı ve pH kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özelliklerini ortaya koymak adına eksiklikler içermekte olup, bu eksiklikleri giderecek çalışmalarla daha kapsamlı hale getirilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A. ve Klivanov, A. M., 1987. Control of Oligomeric Enzyme Thermostability by Protein Engineering , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 675-679.
- Alefunder, P. R., Baldwin, S. A., Perham, R. N. ve Short, N. J., 1989. Cloning, Sequence Analysis and Over Expression of the Gene for the Class-II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *Escherichia coli*, Biochem. J., 257, 529-534.
- Amelunxen, R. E. ve Lins, M., 1968. Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125, 765-771.
- Arnold, F. H., 2001. Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Atsuchi, Y., Yamana, K., Hitomi, Y., Hori, K., Ueda, S. ve Shiokawa, K., 1994. Cloning of a Brain Type Aldolase cDNA and Changes in its Messenger RNA Level During Oogenesis and Early Embryogenesis in *Xenopus laevis* , Biochim. Biophys. Acta, 1218, 153-157.
- Bai, N. J., Pai, M. R., Murthy, P. S. ve Venkatasubramanian, T. A., 1974. Effect of Oxygen-Tension on Aldolases of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, FEBS Lett., 45, 68-70.
- Baldwin, S. A., Perham, R. N. ve Stribling, D., 1978. Purification and Characterization of the Class-II D-Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from *Escherichia coli* (Crookes' strain), Biochem. J., 169, 633-641.
- Banner, D. W., Bloomer, A., Petsko, G. ve Waley, S.G., 1975. Structure of Chicken Muscle Triosephosphate Isomerase Determined by Crystallography at 2.5 Å Resolution Using Amino Acid Sequence Data, Nature, 255, 609-614.
- Belduz, A. O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microb., 53, 1315-1320.
- Benjamin, S. ve Pandey, A., 2000. Panorama of Lipases in Bioindustry, Biotech. J. Int., 6, 11-14.
- Berardini, T. Z., Drygas-Williams, M., Callard, G. V. ve Tolan, D. R., 1997. Identification of Neuronal Isozyme Specific Residues by Comparison of Goldfish Aldolase C to Other Aldolases, Comp. Biochem. Physiol., 117A, 4, 471-476.
- Berry, A. ve Marshall, K. E., 1993. Identification of Zinc Binding Ligands in the Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *E. coli*, FEBS Lett., 318, 11-16.

- Bloom, N. S., Tetreault, S., Coulombe, R. ve Sygusch, J., 1996. Novel Active Site in *Escherichia coli* Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase, Nat. Struct. Biol., 3, 856-862.
- Bock, W. C., Katz, A. G., Markham, G. D. ve Glusker, J. P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparasion of the Divalent Ions. J. Am. Chem. Soc., 121, 7360-7372.
- Branden, C-I., 1991. The TIM Barrel-the Most Frequently Occuring Folding Motif in Proteins, Curr. Opin. Struct. Biol., 1, 978-983.
- Brock, T. D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Burgess, D. G. ve Penhoet, E. E., 1985. Characterization of the Chicken Aldolase B Gene, J. Biol. Chem., 260, 4604-4614.
- Cambillau, C. ve Claverie, J. M., 2000. Structural and Genomic Correlates of Hyperthermostability , J. Biol. Chem., 275, 32388-32386.
- Chen, L. R., Dumas, D. P. ve Wong, C. H., 1992. Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase as a Catalyst in Asymmetric Aldol Condensation, Am. Chem. Soc., 114, 741-748.
- Clayton, C. E., 1985. Structure and Regulated Expression of Genes Encoding Fructose Biphosphate Aldolase in *Trypanosoma brucei* , EMBO J., 4, 2997-3003.
- Cloonan, N., Fischer, K., Cheng, Q. ve Saul, A., 2001. Aldolase genes of *Plasmodium* Species, Mol. Biochem. Parasitol., 113, 327-330.
- Cooper, S. J., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Thompson, A. W., Naismith, J. H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A. ve Hunters, W. N., 1996. The Crystal Structure of a Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Shows a Novel Binuclear Metal-Binding Active Site Embedded in a Familiar Fold, Structure, 4, 1303-1315.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P. ve Lonvaud, A., 2004. Identification of the Gene Encoding a Putative Tyrosine Decarboxylase of *Carnobacterium Divergens* 508. Development of Molecular Tools for the Detection of Tyramine-Producing Bacteria, Food Microbiol. 21, 125-130.
- Crestia, D., Demuynck, C. ve Bolte, J., 2004. Transketolase and Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase, Complementary Tools for Access to New Ulosonic Acid Analogues, Tetrahedron, 60, 2417-2425.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N. A. ve De Vos, P., 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., Isolated from Contaminated Gelatin Batches, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 941-946.

- De Montigny, C. ve Sygusch, J., 1996. Functional Characterization of an Extreme Thermophilic Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase, Eur. J. Biochem, 241, 243-248.
- De Walque, S., Opperdoes, F. R. ve Michels, P. A. M., 1999. Cloning and Characterization of *Leishmania mexicana* Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase, Mol. Biochem. Parasitol., 103, 279-283.
- Di Tusa, C. A., Christensen, T., McCall, K. A., Fierke, C. A. ve Toone, E. J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding.1.Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Dinkelbach, M., Hodenius, M., Steigel, A. ve Kula, M-R., 2001. Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Staphylococcus carnosus*: Stereoselective Enzymatic Synthesis of Ketose-1-Phosphates and Successive Reaction to 1,3-Dioxanes, Biocatal Biotransform., 19, 51-68.
- Dreyer, M. K. ve Schulz, G. E., 1993. The Spatial Structure of the Class II L-Fructose-1-Phosphate Aldolase from *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 231, 549-553.
- Dulger, S., Demirbag, Z. ve Belduz, A. O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Micr., 54, 1499-1503.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eppley, R. W., Gee, R. ve Saltman, P., 1963. Photometabolism of Acetate by *Chlamydomonas mundana* , Physiol. Plant., 16, 777-792.
- Fessner, W. D., Schneider, A., Held, H., Sinerius, G., Walter, C., Hixon, M. ve Schloss, J. V., 1996. The Mechanism of Class II, Metal-Dependent Aldolases, Angew Chem. Int. Edit. Engl., 35, 2219-2221.
- Fessner, W-D., 1998. Enzyme Mediated C-C Bond Formation, Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 85-97.
- Fischer, S., Luczak, H. ve Schleifer, K. H., 1982. Improved Methods for The Detection of Class-I and Class-II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolases in Bacteria , FEMS Microbiol. Lett., 15, 103-108.
- Fothergill-Gilmore, L. A. ve Michels, P. A. M., 1993. Evolution of Glycolysis, Progr. Biophys. Mol. Biol., 59, 105-235.
- Freeze, H. ve Brock, T. D., 1970. Thermostable Aldolase from *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 101, 541-550.
- Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J. ve Wilson, M., 1995. Class I Aldolases: Substrate, Mechanism, Inhibitors and Structural Aspects, Prog. Biophys. Molec. Biol., 63, 301-340.

- Gijsen, H. J. M. ve Wong, C. H., 1995. Recombinant 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis Use of Sequential 2-Substrate and 3-Substrate Aldol Reactions, J. Am. Chem. Soc., 117, 3333-3339.
- Gijsen, H. J. M., Qiao, L., Fitz, W. ve Wong, C. H., 1996. Recent Advances in the Chemoenzymatic Synthesis of Carbohydrates and Carbohydrate Mimetics, Chem. Rev., 96, 443-473.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology, In: Godfrey, T., West, S., Industrial Enzymology 2nd Ed., Stockton Pres., New York.
- Gross, W., Lenze, D., Nowitzki, U., Weiske, J. ve Schnarrenberger, C., 1999. Characterization, Cloning, and Evolutionary History of the Chloroplast and Cytosolic Class I Aldolases of the Red Alga *Galdiera sulphuraria*, Gene, 230, 7-14.
- Hall, D. R., Leonard, G. A., Reed, C. D., Watt, C., Berry, A. ve Hunter, W.N., 1999. The Crystal Structure of *Escherichia coli* Class II Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase in Complex with Phosphoglycolohydroxamate Reveals Details of Mechanism and Specificity, J. Mol. Biol., 287, 383-394.
- Hao, J.J. ve Berry, A., 2004. A Thermostable Variant of Fructose Bisphosphate Aldolase Constructed by Directed Evolution Also Shows Increased Stability in Organic Solvents, Protein Eng. Des. Sel., 17, 689-697.
- Harris, C. E., Kobes, R. D., Teller, D. C. ve Rutter, W. J., 1969. The Molecular Characteristics of Yeast Aldolase, Biochem., 8, 2442-2454.
- Henderson, I., Garcia-Junceda, E., Liu, K. K. C., Chen, Y. L., Shen, G. ve Wong, C. H., Cloning, Overexpression and Isolation of the Type II FDP Aldolase from *E. coli* for Specificity Studies and Synthetic Application, Bioorg. Med. Chem., 2, 837-843.
- Henze, K., Morrison, H. G., Sogin, M. L. ve Müller, M., 1998. Sequence and Phylogenetic Position of a Class II Aldolase Gene in the Amitochondriate Protist, *Giardia lamblia*, Gene, 222, 163-168.
- Hikasa, H., Hori, K. ve Shiokawa, K., 1997. Structure of Aldolase A (Muscle-Type) cDNA and its Regulated Expression in Oocytes, Embryos and Adult Tissues of *Xenopus laevis*, Biochim. Biophys. Acta, 1354, 189-203.
- Hodgson, R. J. ve Plaxton, W. C., 1998. Purification and Characterization of Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from Endosperm of Germinated Castor Oil Seeds, Arch. Biochem. Biophys., 355, 2, 189-196.
- Horecker, B. L., Tsolas, O. ve Lai, C. Y., 1972, Aldolases, Enzymes, 7, 213-258.
- Imanaka, H., Fukui, T., Atomi, H. ve Imanaka, T., 2002. Gene Cloning and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD 1, J. Biosci. Bioeng., 94, 237-243.

- Inoue, T., Yatsuki, H., Kusakabe, T., Joh, K., Takasaki, Y., Naruo, N., Miyata, T. ve Hori, K., 1997, *Caenorhabditis elegans* has Two Isozymic Forms, CE-1 and CE-2, of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Which are Encoded by Different Genes, Arch.Biochem. Biophys., 339, 1, 226-234.
- Izard, T., Lawrence, M. C., Malby, R. L., Lilly, G. G. ve Colman, P., 1994. The Three-Dimensional Structure of N-Acetylneuraminate Lyase from *Escherichia coli*, Structure, 2, 361-369.
- Jack, R. S. ve Harris, J. I., 1971. The Primary Structure of Yeast Aldolase, Biochem J., 124, 68-69.
- Jia, J., Huang, W. J., Schorken, U., Sahn, H., Sprenger, A. G., Lindqvist, Y. ve Schneider, G., 1996. Crystal Structure of Transaldolase B from *Escherichia coli* Suggests a Circular Permutation of the  $\alpha/\beta$  Barrel within the Class II Aldolase Family, Structure, 4, 715-724.
- Joh, K., Mukai, T., Yatsuki, H. ve Hori, K., 1985. Rat Aldolase Messenger RNA the Nucleotide Sequence and Multiple Messenger RNA Species with Different 5'-Terminal Regions, Gene, 39, 17-24.
- Kai, T., Sugimoto, Y., Kusakabe, T., Zhang, R., Koga, K. ve Hori, K., 1992. Gene Structure and Multiple Messenger RNA Species of *Drosophila melanogaster* Aldolase Generating 3 Isozymes with Different Enzymatic Properties, J. Biochem., 112, 677-688.
- Kelly, P. M. ve Tolan, D. R., 1986. The Complete Amino Acid Sequence for the Anaerobically Induced Aldolase from Maize Derived from cDNA Clones, Plant Physiol., 82, 1076-1080.
- Kevbrin, V. V., Zengler, K., Lysenko, A. M. ve Wiegel, J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a Novel Thermophilic Facultative Aerobic Bacterium with a Broad pH Optimum from the Geyser Valley, Kamchatka, Extremophiles, 9, 391-398.
- Knapp, B., Hundt, E. ve Kuepper, H. A., 1990. Plasmodium falciparum Aldolase Gene Structure and Localization, Mol. Biochem. Parasitol., 40, 1-12.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences between Mesophiles and Thermophiles, Bacterial Rev., 21, 227-232.
- Krüger, I. ve Schnarrenberger, C., 1983. Purification, Subunit Structure an Immunological Comparison of Fructose-Bisphosphate Aldolases from Spinach and Corn Leaves, Eur. J. Biochem., 136, 101-106.
- Kuba, M., Yatsuki, H., Kusakabe, T., Takasaki, Y., Nikoh, N., Miyata, T., Yamaguchi, T. ve Hori, K., 1997. Molecular Evolution of Amphioxus Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase, Arch. Biochem. Biophys., 348, 2, 329-336.



- Lebherz, H. G. ve Rutter, W. J., 1973. Class I (Schiff-Base) Fructose Diphosphate Aldolase of Prokaryotic Origin Purification and Properties of *Micrococcus aerogenes* Aldolase, J. Biol. Chem., 248, 1650-1659.
- Lebherz, H. G. ve Rutter, W. J., 1969. Distribution of Fructose Diphosphate Aldolase Variants in Biological Systems, Biochem., 8, 109-121.
- Lebherz, U. K. ve Bradshaw, R. A., 1984. Cellular Fructose-P<sub>2</sub> Aldolase has a Derivatized (Blocked) NH<sub>2</sub> Terminus, J. Biol. Chem., 259, 1132-1135.
- Lebherz, U. K., Leadbetter, M. M. ve Bradshaw, R. A., 1984. Isolation and Characterization of the Cytosolic and Chloroplast from of Spinach Leaf Fructose Diphosphate Aldolase, J. Biol. Chem., 259, 1011-1017.
- Leemhuis, H., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W. ve Dijkhuizen, L., 2004. Improved Thermostability of *Bacillus circulans* Cyclodextrin Glycosyltransferase by the Introduction of a Salt Bridge, Proteins, 54, 128-134.
- Lehmann, M. ve Wyss, M., 2001. Engineering Proteins for Thermostability: The Use of Sequence Alignments Versus Rational Design and Directed Evolution, Curr. Opin. Biotechnol., 12, 371-375.
- Lewis, D. J. ve Lowe, G., 1973. Phosphoglycolohydroxamic Acid: an Inhibitor of Class I and II aldolases and Triosephosphate Isomerase. A Potential Antibacterial and Antifungal Agent, J. C. S. Chem. Commun., 19, 713-715.
- Lewis, D. J. ve Lowe, G., 1977. Inhibition of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from Rabbit Muscle and *Bacillus stearothermophilus*, Eur. J. Biochem., 80, 119-133.
- Li, L. ve Hastings, J. W., 1998. The Structure and Organization of the Luciferase in the Photosynthetic Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*, Plant Mol. Biol., 36, 275-284.
- Llewellyn, L., Sweeny, G. E., Ramsurn, V. P., Rogers, S. A. ve Wigham, T., 1998. Cloning and Unusual Expression Profile of the Aldolase B Gene from Atlantic Salmon, Biochim. Biophys. Acta, 1443, 375-380.
- Llewellyn, L., Ramsurn, V. P., Sweeney, G. E., Wigham, T., Santos, C. R. ve Power, D. M., 1995. Cloning and Characterization of a Fish Aldolase B Gene, Biochim. Biophys. Acta, 1263, 75-78.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Machajewski, T. D. ve Wong, C. H., 2000. The Catalytic Asymmetric Aldol Reaction, Angew. Chem. Int. Edit. Engl., 39, 1352-1374.
- Malay, A. D., Prociou, S. L. ve Tolan, D. R., 2002. The Temperature Dependence of Activity and Structure for the most Prevalent Mutant Aldolase B Associated with Hereditary Fructose Intolerance, Arch Biochem Biophys., 408, 295-304.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marsh, J. J. ve Lebherz, H. G., 1992. Fructose-Bisphosphate Aldolases: an Evolutionary History, *Trends Biochem. Sci.*, 17, 110-113.
- Meijer, A. E. F. H., 1985. The Histochemical Demonstration of Fructose Diphosphate Aldolase Activity Using a Semipermeable Membrane Technique, *Histochem. J.*, 17, 1271-1275.
- 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, *Biochim. Biophys. Acta.*, 107, 144-153.
- Meyerhof, O. ve Lohmann, K., 1934. Enzymic Equilibrium Reaction Between Hexosediphosphate and Dihydroxyacetonephosphate, *Biochem. Z.*, 271, 89-110.
- Morse, D. E. ve Horecker, B. L., 1968. Mechanism of Action of Aldolase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 31, 125-181.
- Naismith, J. H., Ferrara, J. D., Bailey, S. ve Hunter, W. N., 1992. Initiating a Crystallographic Study of a Class II Aldolase, *J. Mol. Biol.*, 225, 1137-1141.
- Nakahara, K., Yamamoto, H., Miyake, C. ve Yokota, A., 2003. Purification and Characterization of Class-I and Class-II Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.*, 44, 326-333.
- 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 Microbiol. Tech.*, 11, 568-574.
- Pan, H. ve Smith, D. L., 2003. Quaternary Structure of Aldolase Leads to Differences in Its Folding and Unfolding Intermediates, *Biochem.*, 42, 5713-5721.
- Pelzer-Reith, B., Penger, A. ve Schnarrenberger, C., 1993. Plant Aldolase cDNA and Deduced Amino Acid Sequences of the Chloroplast and Cytosol Enzyme from Spinach, *Plant. Mol. Biol.*, 21, 331-340.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybasillus puschinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 50, 2109-2117.
- Plater, A. R., Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S., Wharton, C. W. ve Berry, A., 1999. Conserved Residues in the Mechanism of the *E. coli* Class II FBP-aldolase, *J. Mol. Biol.*, 285, 843-855.

- Plaumann, M., Pelzer-Reith, B., Martin, W. F. ve Schnarrenberger, C., 1997. Multiple Recruitment of Class-I Aldolase to Chloroplasts and Eubacterial Origin of Eukaryotic Class-II Aldolases Revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*, Curr. Genet., 31, 430-438.
- Qamar, S., Marshak, K. ve Berry, A., 1996. Identification of Arginine 331 as an Important Active Site residue in the Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *Escherichia coli*, Protein Sci., 17, 154-161.
- Racker, E., 1947, Spectrophotometric Measurement of Hexokinase and Phosphohexokinase Activity., J. Biol. Chem., 167, 843-854.
- Ramsaywak, P. C., Labbe, G., Siemann, S., Dmitrienko, G. I. ve Guillemette, J. G., 2004. Molecular Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase from *Mycobacterium tuberculosis* a Novel Class II A Tetramer, Protein Expression Purif., 37, 220-228.
- Russel, G. K. ve Gibbs, M., 1967. Partial Purification and Characterization of 2-Fructose Diphosphate Aldolases from *Chlamydomonas mundana* , Biochim. Biophys. Acta, 132, 145-154.
- Rutter, W. J., 1964. Evolution of Aldolase, Fed. Proc., 23, 1248-1257.
- Sakakibara, M., Mukai, T. ve Hori, K., 1985. Nucleotide Sequence of a cDNA Clone for Human Aldolase a Messenger RNA in the Liver, Biochem. Biophys. Res. Commun., 131, 413-420.
- Sanchez, L. B., Horner, D. S., Moore, D. V., Henze, K., Embley, T. M. ve Müller, M., 2002. Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases in Amitochondriate Protists Constitute a Single Protein Subfamily with Eubacterial Relationships, Gene, 295, 51-59.
- Sauve, V. ve Sygush, J., 2001. Molecular Cloning, Expression, Purification and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*, Protein Expression Purif., 21, 293-302.
- Schnarrenberger, C., Pelzer-Reith, B., Yatsuki, H., Freund, S., Jacobshagen, S. ve Hori, K., 1994. Expression and Sequence of the only Detectable Aldolase in *Chlamydomonas reinhardtii*, Arch. Biochem. Biophys., 313, 173-178.
- Schoevaart, R., Rantwijk, F. ve Sheldon, R. A., 1999. Class I Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolases as Catalysts for Asymmetric Aldol Reactions, Tetrahedron: Asymmetry, 10, 705-711.
- Schwelberger, H. G., Kohlwein, S. D. ve Paltauf, F., 1989. Molecular Cloning, Primary Structure and Disruption of The Structural Gene of Aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*, Eur. J. Biochem., 180, 301-308.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U. C., 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases, Biotechnol. Adv., 19, 627-662.

- Shulman, H. ve Keinan, E., 1999. Substrate-Selective Mechanisms in Biocatalysis Demonstrated with a Versatile and Efficient Aldolase Antibody, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 1745-1750.
- Siebers, B., Brinkmann, H., Dörr, C., Tjaden, B., Lilie, H., van der Oost, J. ve Verhees, C. H., 2001. Archeal Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases Constitute a New Family of Archeal Type Class I Aldolase, J. Biol. Chem., 276, 28710-28718.
- Stauffer, J. K., Colbert, M. C. ve Ciejek-Baez, E., 1990. Nonconservative Utilization of Aldolase A Alternative Promoters, J. Biol. Chem., 265, 11773-11782.
- Stetter, K. O., 1996. Hyperthermophilic Prokaryotes, FEMS Microbiol Rev., 18, 149-158.
- Stribling, D. ve Perham, R. N., 1973. Purification and Characterization of Two Fructose diphosphate Aldolases from *Escherichia coli* (Crookes strain), Biochem. J., 131, 833-841.
- Sugimoto, S. ve Nosoh, Y., 1971. Thermal Properties of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from Thermophilic Bacteria, Biochim. Biophys. Acta, 235, 210-221.
- Sygyusch, J., Beaudry, D. ve Allaire, M., 1987. Molecular Architecture of Rabbit Skeletal-Muscle Aldolase at 2.7 Å Resolution , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7846-7850.
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Beem, K. M., Richardson, J. S. ve Richardson, D. C., 1982. Determination and Analysis of the 2 Å Structure of Copper, Zinc Superoxide Dismutase, J. Mol. Biol., 160, 181-217.
- Takayama, S., McGarvey, G. J. ve Wong, C-H., 1997. Microbial Aldolases and Transketolases: New Biocatalytic Approaches to Simple and Complex Sugars, Annu. Rev. Microbiol., 51, 285-310.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.
- Thompson, P. J. ve Thompson, T. L., 1962. Some Characteristics of a Purified Heat Stable Aldolase, J. Bacteriol., 84, 694-700.
- Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E. ve Berry, A., 1998. The *dhnA* Gene of *Escherichia coli* Encodes a Class I Fructose Bisphosphate Aldolase, Biochem. J., 331, 437-445.
- Tsutsumi, K., Kagara, Y., Hidaka, S., Suzuki, K., Tokairin, Y., Hirai, T., Hu, D. L., Ishikawa, K. ve Ejiri, S., 1994. Structural Analysis of the Chloroplastic and Cytoplasmic Aldolase Encoding Genes Implicated the Occurrence of Multiple Loci in Rice, Gene, 141, 215-220.
- URL-1, <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>, Fermentas Life Sciences, 1 Mart 2006.

- URL-2, [www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf#search='pGEMTeasyvectormap'](http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf#search='pGEMTeasyvectormap'), pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, TM042, Promega, 21 Ekim 2005.
- URL-3, [www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf](http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf), Novagen Vector Tables, Novagen, 21 Ekim 2005.
- URL-4, [www.research.umbc.edu/~jwolf/m5.htm](http://www.research.umbc.edu/~jwolf/m5.htm), DNA Protocols, eBioinfogen, 16 Şubat 2005.
- Vallee, B. L. ve Auld, D. S., 1990. Active-Site Ligands and Activated H<sub>2</sub>O of Zinc Enzymes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 220-224.
- Vallee, B. L. ve Auld, D. S., 1993. New Perspective on Zinc Biochemistry: Co-Catalytic Sites in Multi-Zinc Enzymes, Biochem., 32, 6493-6500.
- Vieille, C. ve Zeikus, G. J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 1-43.
- Villegas, V., Viguera, A. R., Aviles, F. X. ve Serrano, L., 1996. Stabilization of Proteins by Rational Design of Alpha-Helix Stability Using Helix/Coil Transition Theory, Fold. Des., 1, 29-34.
- Voet, D., Voet, J. G. ve Pratt, C. W., 1999. Fundamentals of Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Von der Osten, C. H., Sinskey, A. J., Barbas, C. F. ve Wong, C. H., 1989. Use of a Recombinant Bacterial Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase in Aldol Reactions: Preparative Synthesis of 1-Deoxynojirimycin, 1-Deoxymannojirimycin, 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol, and Fagomine, J. Am. Chem. Soc., 111, 3924-3927.
- Wilke, D., 1999. Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics will Challenge the Chemical and Fermentation Industry, Appl. Microbiol. Biot., 52, 135-145.
- Willard, J. M. ve Gibbs, M., 1968. Purification and Characterization of the Fructose Diphosphate Aldolases from *Anacystis nidulans* and *Saprospira thermalis*, Biochim. Biophys. Acta, 151, 438-448.
- Wintrode, P. L., Miyazaki, K. ve Arnold, F. H., 2001. Patterns of Adaptation in a Laboratory Evolved Thermophilic Enzyme, Biochim. Biophys. Acta, 1549, 1-8.
- Witke, C. ve Götz, F., 1993. Cloning, Sequencing and Characterization of the Gene Encoding the Class I Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase of *Staphylococcus carnosus*, J. Bacteriol., Nov., 7495-7499.
- Woese, C. R., Kandler, O. ve Wheelis, M. L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 4576-4579.

- Wong, C. H., Halcomb, R. L., Ichikawa, Y. ve Kajimoto, T., 1995. Enzymes in Organic Synthesis: Application to the Problems of Carbohydrate Recognition, Angew. Chem. Int. Edit. Engl., 34, 521-546.
- Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H. ve Kubo, T., 2000. Differential Expression of Plastidic Aldolase Genes in *Nicotina* Plants under Salt Stres, Plant Sci., 154, 61-69.
- Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H., Yokota, Y., Nakajima, K. ve Hoshino, T., 2004. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic Bacterium from a Hot Spring in Kamchatka, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1239-1242.
- Zgiby, S., Plater, A. R., Bates, M. A., Thomson, G. J. ve Berry, A., 2002. A Functional Role for a Flexible Loop Containing Glu 182 in the Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 315, 131-140.
- Zhang, R., Yatsuki, H., Kusakabe, T., Iwabe, N., Miyata, T., Imai, T., Yoshida, M. ve Hori, K., 1995. Structures of cDNAs Encoding the Muscle-Type and Non-Muscle-Type Isozymes of Lamprey Fructose Bisphosphate Aldolases and the Evolution of Aldolase Genes, J. Biochem., 117, 545-553.

## ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Trabzon'un Beşikdüzü ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Beşikdüzü'nde tamamladı. 1993-1997 yılları arasında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimini tamamladı. 1997-2000 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını tamamladı. 2000 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora Programına girdi. 2003 yılında TÜBİTAK NATO A-2 bursu kazandı ve 2003-2004 yılları arasında 6 aylık bir zaman zarfında Almanya'nın Greifswald şehrindeki Greifswald Üniversitesi'nde bulundu. 1998-2005 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. Yabancı dili İngilizce'dir.

