

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***ANOPHELES. GAMBIAE* VE *APIS MELLIFERA* GLOBİNLERİNİN  
KLONLANMASI VE ÖN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bengü ERGENOĞLU**

**MAYIS 2012**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***ANOPHELES GAMBIAE VE APIS MELLIFERA GLOBİNLERİNİN  
KLONLANMASI VE ÖN KARAKTERİZASYONU***

**Bengü ERGENOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.04.2012  
Tezin Savunma Tarihi : 03.05.2012**

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

**Trabzon 2012**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalında**

**Bengü ERGENOĞLU tarafından hazırlanan**

***ANOPHELES GAMBIAE VE APIS MELLIFERA GLOBİNLERİNİN  
KLONLANMASI VE ÖN KARAKTERİZASYONU***

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17/04/ 2012 gün ve 1453 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03 / 05 / 2012 tarihinde yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK .....**

**Üye : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA .....**

**Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Anopheles Gambiae* ve *Apis Mellifera* Globinlerinin Klonlanması ve Ön Karakterizasyonu” adlı bu çalışma Antwerp Üniversitesi (Belçika) Biyomedikal Bilimler Bölümü Protein Araştırma Laboratuvarında, Prof. Dr. Sylvia DEWILDE danışmanlığında, Erasmus programı ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince tez danışmanlığımı üstlendiği için ve bize sağladığı olanaklarla birlikte desteğini, sevgisini, hoşgörüsü esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Antwerpen Üniversitesi’ndeki çalışmalarım süresince gerek akademik gerekse kişisel bütün sıkıntılarında hiç bir desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Sylvia DEWILDE’ ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Antwerpen Üniversitesi Biyomedikal Bilimler Bölümü Protein Araştırma Laboratuvarında çalışan/doktora yapan herkese bütün yardımları ve yarattıkları dostane ortam için çok teşekkür ediyorum.

Karadeniz Teknik Üniversitesi ve Antwerpen Üniversitesi Erasmus koordinatörleri başta olmak üzere, öğrenci değişimi programının yürütülmesinde görevi olan herkese teşekkür ederim.

Hocam Yrd. Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’ na tez yazım süresince desteğini eksik etmediği için çok teşekkür ederim. Ayrıca tezimdaki grafik düzenlemelerine yardımcı olan Mehmet Ali TEKİNCANLI’ya ve biyokimya araştırma laboratuvarındaki bütün arkadaşlarıma maddi manevi destekleri için teşekkür ederim.

Bana hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan ve varlıklarıyla ömrümü taçlandıran, Babam Yrd. Doç. Dr. Bora ERGENOĞLU’na, annem Gönül ERGENOĞLU’na, abim Üstün ERGENOĞLU’na ve bütün sevdiklerime minnettarım. İyi ki varsınız.

Bengü ERGENOĞLU

Trabzon 2012

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anopheles Gambiae* ve *Apis Mellifera* Globinlerinin Klonlanması ve Ön Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

16/04/2012

Bengü ERGENOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Globinlerin Keşfi ve Evrimi.....	1
1.3. Omurgalı Globinleri.....	2
1.3.1. Miyoglobın.....	3
1.3.2. Hemoglobın.....	5
1.3.3. Neuroglobin ve Sitoglobın.....	5
1.4. Omurgalı Olmayan Canlılarda Globinler.....	7
1.5. Böceklerde Globinler.....	7
1.5.1. <i>Anopheles</i> ve <i>Apis</i> .....	10
1.5.2. <i>Anopheles gambiae</i> ve <i>Apis mellifera</i> Globinleri.....	12
1.6. Globinler Hakkında Literatür Özeti.....	12
1.6.1. Rekombinant Vektör.....	13
1.6.2. Flaş Fotoliz ile Ligant Bağlama Özelliklerinin Ölçülmesi.....	15
1.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Kullanılan Materyaller.....	17
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	17
2.1.2. Cihazlar.....	18
2.1.3. Kullanılan Enzimler.....	18

2.1.4.	Klonlama ve Protein Saflaştırma İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
2.1.5.	Kullanılan Suşlar.....	19
2.1.6.	Klonlamada Kullanılan Vektör.....	19
2.1.7.	Kullanılan Primerler.....	21
2.1.8.	Sıvı ve Katı Besiyerleri.....	21
2.1.9.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
2.1.10.	SDS PAGE Jel Elektroforezi.....	22
2.1.11.	Nikel Afinite Kromatografisi Çözeltilerinin Hazırlanması.....	23
2.1.12.	Jel Filtrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
2.1.13.	Flash Fotoliz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
2.1.14.	Diğer Çözeltilerin Hazırlanması.....	24
2.2.	Klonlama ve Protein Ekspresyonu.....	25
2.2.1.	DNA Fragmentlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	25
2.2.2.	Agaroz Jel Elektroforez.....	26
2.2.3.	PCR Ürününün Saflaştırılması.....	26
2.2.4.	PCR Ürünlerinin ve pET Vektörünün Kesimi.....	27
2.2.5.	DNA Parçasının pET Vektörüne Ligasyonu.....	27
2.2.6.	Rekombinant Vektörün Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu.....	29
2.2.7.	Protein Ekspresyonu.....	30
2.3.	Proteinin Saflaştırılması.....	30
2.3.1.	Nikel Afinite Kromatografisi.....	30
2.3.2.	Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	31
2.4.	Kalite Analizleri.....	32
2.4.1.	SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	32
2.4.2.	Analitik Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	33
2.4.3.	UV-vis Spectrum Analizleri.....	33
2.5.	Kinetik Analizler.....	33
2.5.1.	Flaş Fotoliz.....	33
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	Klonlama ve Protein Ekspresyonu (pET Sistemi).....	34
3.1.1.	Klonlama.....	34
3.2.	Proteinin Saflaştırılması.....	35

3.2.1.	Nikel Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma İşleminin Optimizasyonu....	35
3.2.1.1.	AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys'in Nikel Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması.....	36
3.2.1.2.	AgaGb'nin Nikel Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması.....	38
3.2.2.	Jel Filtrasyon.....	39
3.2.2.1.	AmeGb'in Jel Filtrasyon Kromatografisiyle Saflaştırılması.....	39
3.3.	Kalite Analizleri.....	40
3.3.1.	UV-VIS Spektrum Analizleri.....	40
3.3.2.	Analitik Jel Filtrasyon ile Molekül Ağırlığı Tayini.....	43
3.4.	Kinetik Ölçümler.....	47
3.4.1.	Flaş Fotoliz Ölçümleri.....	47
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	52
5.	ÖNERİLER.....	57
6.	KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*ANOPHELES GAMBIAE* VE *APIS MELLIFERA* GLOBİNLERİNİN KLONLANMASI  
VE ÖN KARAKTERİZASYONU

Bengü ERGENOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2012, 65

Yakın zamana kadar böceklerin sahip olduğu trake solunum sisteminin yüksek difüzyon ve kapasite katsayısının yeryüzündeki en büyük böcek için bile yeterli olacağı ve bu sebeple solunum proteinlerinin böcekler için gereksiz olduğu düşünülmekteydi. Sadece *Chironomus* gibi oksijence fakir ortamda yaşayan birkaç tür istisna olarak biliniyordu. Fakat son yıllarda globinlerin böceklerde daha yaygın bir şekilde bulunduğu *Drosophila*, *Anopheles*, *Apis* gibi hayat döngüleri boyunca oksijence fakir ortamda yaşamayan türlerde de globin varlığının ortaya konmasıyla kanıtlandı. Bu çalışmada, *A. gambiae* ve *A. mellifera* cDNA'sı (Johannes Gutenberg Univesität Mainz, Prof. Thomas Hankeln'den alındı) pET sistemi kullanılarak klonlanıp ekspres edildi. Yanı sıra, sistein kalıntısının serin ile yer değiştirildiği  $\Delta$ Cys mutanı da klonlanıp ekspres edildi. Ekspres edilen proteinler saflaştırılıp spektroskopik analiz, kuaterner yapı belirlemesi gibi ön yapı karakterizasyon analizleri yapıldı. Kinetik çalışmalar AgaGb ve AmeGb globinlerinin  $\Delta$ Cys mutantlarına uygulanarak karbonmonoksit bağlama özellikleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre, bu iki böcek globinin deoksi formunda altı konformasyona sahip olduğu tahmin edildi. AgaGb çözeltide dimer, AmeGb'nin ise monomer ve dimer yapısının denge halinde bulunduğu gözlemlendi. Kinetik çalışmalar da ise, AmeGb'nin karbonmonoksit ligandı bağlama hız sabitinin AgaGb'in yaklaşık 10 katı olduğu tesbit edildi ve AmeGb'in aktif bölge kavitesinin harici ligandı hapsetmeye AgaGb'in kıyasla daha elverişli olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, Globin, Karbonmonoksit bağlama, Hegza form, Flaş fotoliz

Master Thesis

SUMMARY

CLONNING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF  
*ANOPHELES GAMBIAE* AND *APIS MELLIFERA* GLOBINS

Bengü ERGENOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2012, 65 Pages

Until recently, respiratory proteins have been considered unnecessary in most insects because their tracheal systems were thought to be sufficient for the biggest insect O<sub>2</sub> supply due to high diffusion rates and capacity coefficients. Only a few species that survive under hypoxic conditions were known exceptions such as *Chironomidae*. However, in recent years it has become evident that globins are found much more widespread in insects, with identification of globin existence in species that do not live in oxygen deficient environments such as *Drosophila*, *Anopheles*, *Apis*. In this study, cDNA of *Anopheles gambiae* and *Apis mellifera* (obtain from Prof. Thomas Hankeln from Johannes Gutenberg Univesität Mainz), were cloned and expressed with the pET system. Also a mutant was made where the cysteine residues were substituted for serine ( $\Delta$ Cys mutant). The produced proteins were purified and preliminary characterization, such as spectroscopic analysis and determination of quaternary structure was made. Kinetic measurements were applied to the  $\Delta$ Cys mutant of AgaGb and AmeGb to measure carbon monoxide binding properties. Due to the results that we gained in this study, we estimated that these two insects globins are hexa coordinated in the deoxy form. AgaGb is thought to occur as a dimer in solution, while the AmeGb is in equilibrium between the monomeric and tetrameric structure. Kinetic measurements show that rate constant of carbon monoxide of AmeGb is nearly 10 times bigger than of AgaGb, and active site cavity of AmeGb is more appropriate to trap the external ligand than of AgaGb.

**Key Words:** *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, Globin, Carbon monoxide binding, Hexa form, Flash fotolysis

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Globin için önerilen 4 aşamalı evrim modelinin şematik gösterimi.....	2
Şekil 2.	İnsan globinleri için önerilen evrim modeli.....	3
Şekil 3.	Hb ve Mb'nin intron pozisyonlarının şematik gösterimi.....	3
Şekil 4.	Balina sperminden elde edilen miyoglobinin üç boyutlu molekül modeli.....	4
Şekil 5.	Neuroglobinin üç boyutlu yapısı.....	6
Şekil 6.	Böcek globinlerinin amino asit sıralarının karşılaştırılması.....	8
Şekil 7.	Böcek globin genlerinin intron pozisyonları baz alınarak yapılan filogenetik incelemenin şematik gösterimi.....	10
Şekil 8.	<i>Apis</i> ve <i>Anopheles</i> görüntüleri.....	11
Şekil 9.	pET sisteminin ekspresyon kontrol mekanizmasının şematik gösterimi..	14
Şekil 10.	pET-23a(+) vektörünün gen haritası ve promotor ve ekspresyon bölgesi sıralaması.....	20
Şekil 11.	Agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	34
Şekil 12.	Nikel afinite testi SDS-PAGE görüntüleri.....	36
Şekil 13.	AmeGb Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü	37
Şekil 14.	AmeGb $\Delta$ Cys'in Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü.....	37
Şekil 15.	AgaGb'in Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü.....	38
Şekil 16.	AmeGb Superose 12 HR 10/3 kolon kromatogramı.....	39
Şekil 17.	AmeGb'nin Superdex® G75 kolon jel filtrasyonu fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü.....	40
Şekil 18.	AmeGb'nin UV-vis spektrumu.....	41
Şekil 19.	AmeGb $\Delta$ Cys'nin UV-vis spektrumu.....	41
Şekil 20.	AgaGb'nin UV-vis spektrumu.....	42
Şekil 21.	AgaGb $\Delta$ Cys'in UV-vis spektrumu.....	42
Şekil 22.	Log Ma- t <sub>r</sub> kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 23.	AmeGb'nin analitik jel kromatogramı.....	44
Şekil 24.	AmeGb $\Delta$ Cys'nin analitik jel kromatogramı.....	45
Şekil 25.	AgaGb'nin analitik jel kromatogramı.....	46
Şekil 26.	AgaGb $\Delta$ Cys'nin analitik jel kromatogramı.....	46

Şekil 27.	Ame $\Delta$ Cys'in doğal, CO ve deoksi formlarının UV-vis spectrumu.....	48
Şekil 28.	Aga $\Delta$ Cys'in doğal, CO ve deoksi formlarının UV-vis spectrumu.....	48
Şekil 29.	AmeGb $\Delta$ Cys t/ $\Delta$ O.D grafiği.....	49
Şekil 30.	AgaGb $\Delta$ Cys t/ $\Delta$ O.D. grafiği.....	49
Şekil 31.	k <sub>obs</sub> -CO konsantrasyon eğrileri.....	50
Şekil 32.	AmeGb $\Delta$ Cys Log t/ $\Delta$ O.D grafiği.....	50
Şekil 33.	AgaGb $\Delta$ Cys Log t/ $\Delta$ O.D grafiği.....	51

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.	Aktif bölgeyi oluşturan ve globin yapısını oluşturmaya yardımcı aminoasitler.....	9
Tablo 2.	Kimyasal maddeler.....	17
Tablo 3.	Kullanılan cihazlar.....	18
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan enzimler.....	18
Tablo 5.	Klonlama ve protein saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler.....	19
Tablo 6.	Kullanılan suşlar.....	19
Tablo 7.	Kullanılan primerler.....	21
Tablo 8.	PCR bileşenleri ve miktarları.....	25
Tablo 9.	PCR programı.....	26
Tablo 10.	Kesim için kullanılan restriksiyon enzimleri.....	27
Tablo 11.	Koloni PCR'ı bileşen ve miktarları.....	28
Tablo 12.	Koloni PCR'ı için sıcaklık programı.....	29
Tablo 13.	Nikel afinite testi için imidazol konsantrasyonları.....	31
Tablo 14.	SDS-PAGE Jel bileşenleri.....	32
Tablo 15.	Protein eluatlarındaki globin konsantrasyonu.	43
Tablo 16.	AmeGb için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.....	44
Tablo 17.	AmeGbΔCys için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.....	45
Tablo 18.	AgaGb için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.....	46
Tablo 19.	AgaGbΔCys için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.....	47
Tablo 20.	k Değerlerinin karşılaştırılması.....	51

## KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta$ Cys	: Delta sistein mutant
a.a.	: Aminoasit
AgaGb	: <i>Anopheles gambiae</i> globini
ALA	: 5-amino levulinik asit
AmeGb	: <i>Apis Mellifera</i> globini
APS	: Amonyum persülfat
bç/kb	: Baz çifti/kilo baz
CttHb	: <i>Chironomus tummi tummi</i> globini
Cygb	: Sitogloblin
Da	: Dalton
dak	: Dakika
DmeGb	: <i>Drosophila melanogaster</i>
dNTP	: Dinükleotid trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Hb	: Hemoglobin
hem-b	: Demir (II) protoporfirin IX
IPTG	: İzopropil- $\beta$ -D-tiyogalaktopiranozi
koff	: Ayrılma hız sabiti
kon	: Bağlanma hız sabiti
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
$M_A$	: Molekül ağırlığı
Mb	: Miyoglobin
ms	: Milisaniye
Ngb	: Nöroglobin
ns	: Nanosaniye
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
RNS	: Reaktif azot türevleri
ROS	: Reaktif oksijen türevleri

rpm	: Dakikadaki çevirme sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TB	: Terrific broth
TBE	: Tris-borik asit-edta çözeltisi
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
UV/Vis	: Ultraviyole/görünür
V	: Volt
$\mu$ L	: Mikrolitre
$\mu$ s	: Mikrosaniye

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Giriş**

Globinler, en yaygın bilinenleri hemoglobin ve miyoglobin olan, aerobik canlılarda solunum proteini olarak bilinen, şimdiye kadar keşfedilmiş en büyük protein ailesidir. Globinlere, yaygın fakat dağınık olarak bütün canlı alemlerinde rastlanılmış ve bugüne kadar bilinen canlıların %33'ünde teşhis edilmiştir. Başta miyoglobin ve hemoglobin olmak üzere, globinler, üzerinde yapılan sayısız çalışmalar sayesinde yapı ve kinetiği en iyi bilinen proteinlerdir. Sekonder ve tersiyer yapısında benzerlik gösteren bu proteinler, kuaterner yapısı ve fonksiyonu açısından çeşitlilik gösterir [1].

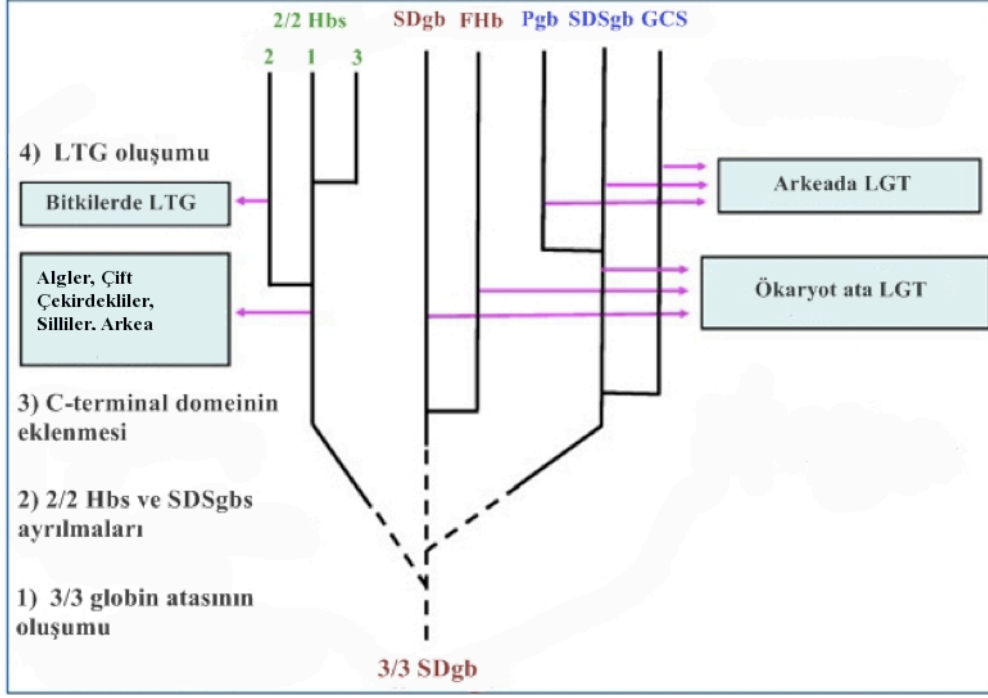
Globinlerin bir çok canlı alemlerinde keşfedilmesi ve yapılan filogenetik araştırmalar bu protein ailesinin ortak bir ata globinden türediğini öne sürmekte, bu sayede evrimin karmaşık görüntüsüne moleküler düzeyde anlaşılabilir bir yol önermektedir [2, 3].

### **1.2. Globinlerin Keşfi ve Evrimi**

1840 yılında hemoglobinin Hünefeld tarafından kırmızı kan hücresinde keşfedilmesinin ardından, hemoglobin benzeri proteinlerin (globinlerin) doku hücrelerinin sitoplazmasında (sinir, kas ve gamet hücreleri gibi) ve vücut sıvılarında da serbest olarak bulunduğu gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalar ise globinlerin sadece omurgalı canlılarında değil, canlılar aleminin tamamında yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur [4, 5].

Üç temel canlı aleminden elde edilen globin genleriyle yapılan filogenetik araştırmalar sonucunda, globin protein ailesinin, üç soya ayrılacağı görülmüştür. İlk soy, flavohemoglobinler (FHbs) ve tek alt birimli globinler (SDgb), ikinci soy, globin çifti sensörler (GCSs), protogloblinler (Pgbs) ve GCSs'in N-terminal ucuna bağlantılı 3/3 tek alt birimli globinler (SDSgbs), üçüncü soy ise yaygın bilinen adıyla "kesik uçlu" globinleri (2/2Hbs) kapsar. Bu üç soyun aynı anda benzer evrimi gösterme ihtimalinin çok düşük olması nedeniyle, bu soyların bir tanesinin ata olduğu, diğerlerinin ise bu soydan türediği ileri sürülmüştür [6].





Şekil 1. Globin için önerilen 4 aşamalı evrim modelinin şematik gösterimi [7].

Globinler her ne kadar aerobik canlıların solunum proteini olarak bilinse de, Vinogradov ve arkadaşları 2007 yılında yayınladıkları makalede, globinlerin oksijenin atmosferde kullanıma elverişli olmadığı zamanlardan itibaren var olduğunu öne sürmüşlerdir (Şekil 1) [7]. Bu sebeple, ata globinin, diğer bilinen veya tahmin edilen fonksiyonları (reaktif azot ve oksijen bileşiklerinin giderilmesi [8, 9], kemotaktik sensör olarak [10] ve başka diatomik gazları bağlamak gibi) yanında, oksijene yabancı olan organizmanın kendisini savunması ve korunması gibi işlevi olduğu da düşünülmektedir [1,2].

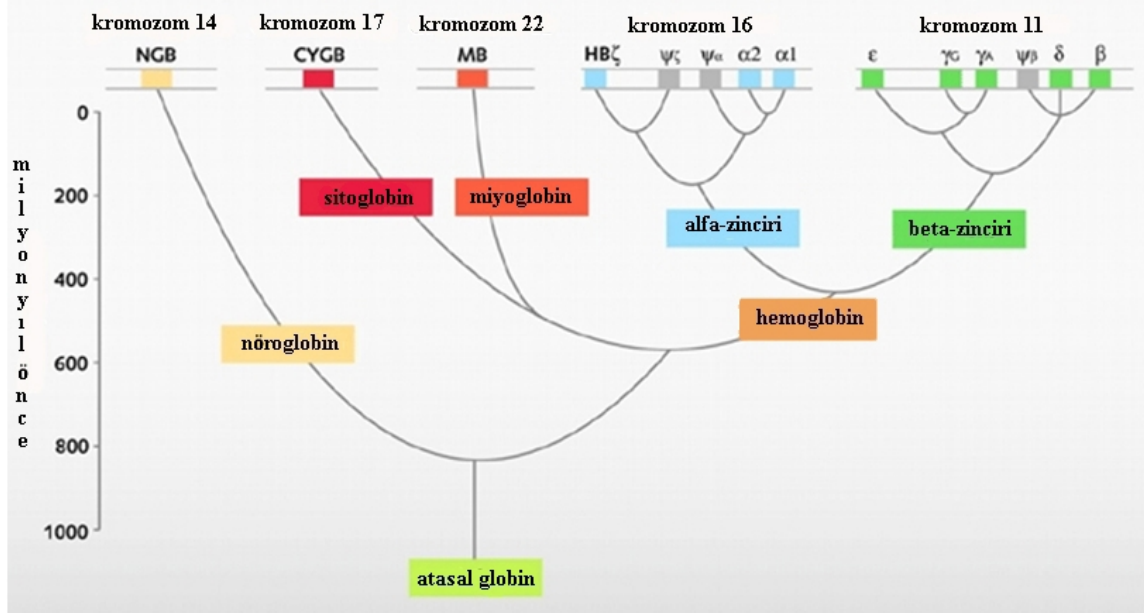
Globinler, “omurgalı canlıların globinleri” ve “omurgalı olmayan canlıların globinleri” olarak 2 alt başlık altında incelenir.

### 1.3. Omurgalı Globinleri

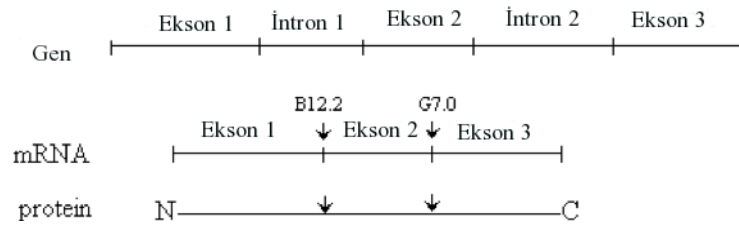
Omurgalılarda 4 çeşit globin teşhis edilmiş olup, miyogloblin (Mb) [15], hemogloblin (Hb), nörogloblin (Ngb) ve sitogloblin (Cygb) olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2) [16].

Omurgalı canlı globinlerinin en belirgin özelliği intron pozisyonlarının iyi korunmuş olmasıdır (Şekil 3). Hb ve Mb genlerinde B12.2 ve G7.0 intron pozisyonları çok iyi

korunmuştur (B12.2, intronun B sarmalının 12. kodonunun 2. ve 3. nükleotidi arasında bulunduğunu simgelemektedir). Bunun yanında Ngb ve Cygb, E11.0 (Ngb) BC11.2 (Cygb) konumlarında fazladan 1 intron pozisyonuna sahiptir [11].



Şekil 2. İnsan globinleri için önerilen evrim modeli. Renklendirilmiş genler işlevli, gri olanlar ise işlevsiz (psödo) genleri belirtir [11].

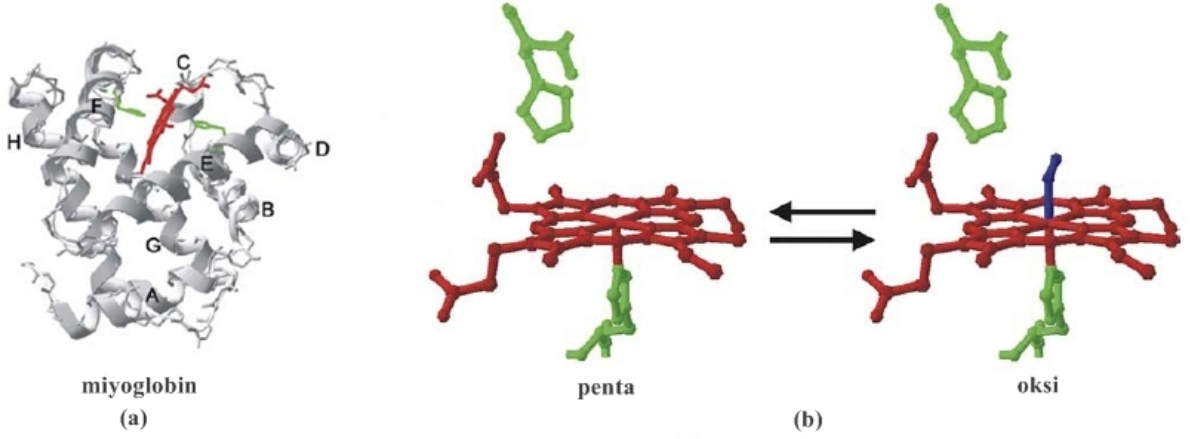


Şekil 3. Hb ve Mb'nin intron pozisyonlarının şematik gösterimi

### 1.3.1. Miyogloblin

Yoğun olarak kas hücrelerinde ekspres edilen Mb, yapısında, yaklaşık 150 aminoasitten (a.a.) oluşan tek bir polipeptit zinciri ve demir (II) protoporfirin IX (hem-b) kompleksi bulundurur. Polipeptit zincirinin oluşturduğu sekiz  $\alpha$ -sarmal yapı, hem-b grubu

etrafında katlanarak sıkı, küresel bir protein yapısı oluşturur. A, B ve E sarmal yapıları, hem-b grubunu distal (uzak), F,G ve H  $\alpha$ -sarmalları ise hem-b grubunu proksimal (yakın) tarafından sarar. Bu yapı, tipik globin yapısını oluşturmakta ve 3-3  $\alpha$ -sarmal sandviç modeli olarak adlandırılmaktadır [12,13].



Şekil 4. (a) Balina sperminden elde edilen miyoglobinin üç boyutlu molekül modeli. 3-3  $\alpha$ -sarmal sandviç yapısı ve (b) demir-protoporfirin halkasının deoksi ve oksidasyon konformasyonları (Oksijen mavi olarak renklendirilmiştir) [14].

Polipeptit zincirindeki hidrofobik grupların oluşturduğu cepte yer alan hem-b grubunun demir atomu, F8 konumundaki histidin biriminin azot atomuyla koordinasyon bağı oluşturur ve CD1 fenilalanin birimi hem-b grubunun konumunu sterik olarak kısıtlayarak yapıyı sağlamlaştırır. Mb'nin hem-b grubu, ligand olmadan beş koordinasyon yapar ve penta-form olarak adlandırılır. Oksijen bağlanmış durumda ise 6 koordinasyon yapar ve oksidasyon form olarak adlandırılır (Şekil) [14]. Oksijen zayıf alan ligandı olduğu için Mb'nin oksijen bağlanması, ancak demir 2+ değerlikli ise gerçekleşir. Demir atomunun çevresindeki grupların elektron verme isteği, oksijenin, demiri, +3 değerliliğe yükseltmeden bağlanmasını sağlar [15].

Mb'nin en yaygın bilinen özelliği oksijen depolamasıdır. Bunun yanı sıra oksijen difüzyonuna yardımcı olur, hücre içi oksijen yoğunluğunu sabit ve homojen tutar [8]. Ayrıca, diğer bilinen bir fonksiyonu da NO'yu NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e yükseltgeyerek detoksifiye etmesidir [19].

### 1.3.2. Hemoglobin

Hb, omurgalıların çoğunda, oksijenin, akciğerden dokulara taşınımına yarayan hemoproteindir. İnsanda ve diğer omurgalılarda kırmızı kan hücresinde yer alır ve  $\alpha$  (141 a.a.) ve  $\beta$  (146 a.a.) olmak üzere iki çeşit alt birimden oluşan tetramer yapıya sahiptir. Alt birimlerinin her biri miyogloblin benzeri tipik globin yapısı sergiler ve her biri hidrofobik cebinde hem-b grubu içerir [19].

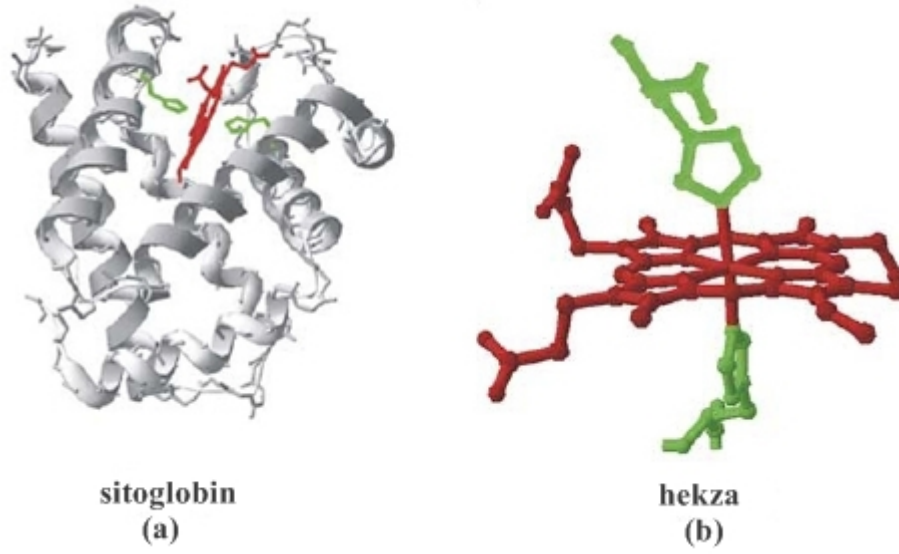
Hemoglobinin tetramer yapısı ona allosterik aktivasyon kazandırır. Bir oksijen molekülü Hb'ne bağlandığı zaman kaviteye tam olarak yerleşemeyen demir (II) iyonunun elektron konformasyonunu değiştirerek çapının küçülüp protoporfirin grubundaki 4 azot atomu arasındaki boşluğa tam olarak yerleşmesi ve hem-b grubunun tam düzlemselleşmesi sağlanır. Yapıda meydana gelen bu değişme, komşu alt birimlerinin afinitesini önemli ölçüde artıracak bir dizi zincir konformasyonel değişim reaksiyonlarına yol açar. Bu yüzden, Mb'nin substrat doygunluk eğrisi Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk gösterirken, Hb sigmoidal grafik sergiler. Bu özellik, Hb ile dokulara taşınan oksijenin Mb'e aktarılmasına yardımcı olur. Ayrıca kanda artan CO<sub>2</sub> seviyesi kan pH'ını düşürüp, hemoglobin molekülünün konformasyonunda oksijen bağlama afinitesini azaltacak değişmelere sebep olur [19].

### 1.3.3. Neuroglobin ve Sitogloblin

Ngb ve Cygb, omurgalı globinleri ailesinin yeni keşfedilmiş iki üyesidir. İlk olarak, sinir hücrelerinde sentezlenen Ngb [21]; hemen ardından da, neredeyse bütün memeli dokularında sentezlenen Cygb keşfedilmiştir [22].

Ngb ve Cygb'in a.a. dizisi her ne kadar %20-30 civarında bir benzerlik gösterse de, her ikisi de bazı adaptasyonların sonucu olduğu düşünülen farklılıkların yanı sıra tipik, 8  $\alpha$ -sarmal yapıdan oluşan monomerik Mb yapısına sahiptir [21, 22].

Cygb'nin dizi analizlerine baktığımızda, ilk göze çarpan farklılık, N- ve C- terminal bölgelerinin ikisinde de gözlenen 20 a.a.'lık uzamadır. N- terminalindeki uzamanın sebebi gen motifi ikilemesiyle açıklanırken, C-terminalindeki, balık Cygb'inde gözlenmeyen, uzamanın memelilerin evrimleşmesi sürecinde kazanıldığı düşünülmektedir [14].



Şekil 5. (a) Neuroglobinin üç boyutlu yapısı ve (b) Neuroglobinin distal ve proksimal histininin konumu [14].

Ngb ve Cygb'nin en çok bilinen omurgalı globinlerden farkı hegza-form da bulunabilmesidir. Ligandın olmadığı durumlarda, hem-b grubunun distal tarafındaki E7 histidin biriminin demir atomunun altıncı koordinasyonuna bağlanmasıyla hegza form oluşur (Şekil 5b). Bu sebeple harici ligandlar bağlanmak için distal histidin ile yarışma halindedir [23]. Hegza koordinasyon sergileyen globin yapıları, yakın zamanda, bitkilerde, bakterilerde ve omurgasızlarda teşhis edilmiştir [25]. Hegza formun bu kadar yaygın bir şekilde bulunması iyi korunmuş bir fonksiyonu olduğunu öne sürse de, fizyolojik önemi henüz anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalar, Ngb'nin ligand bağlanmasında, pH'daki cüzi değişmelerin bile belirgin değişmelere yol açtığını, diğer taraftan sıcaklık değişmelerine pH'ya nazaran bağımsız kaldığını göstermiştir [26-28].

Ngb ve Cygb'nin diğer bir özelliği ise hem-b grubundan dışarı açılan apolar yapılı benzersiz bir kanal sistemine sahip olduğudur. Bu kanal sisteminin ligandın bağlanması ve ayrılması için özgün bir yol sunduğu düşünülmektedir [29-31].

Ngb ve Cygb'nin fonksiyonu hakkında bugüne kadar yapılmış çalışmalar henüz belli bir fonksiyon veya mekanizma ortaya koymamıştır. Ngb'nin, kinetik, hücre içi konsantrasyonu ve konumu gibi özelliklerinin Mb'ne olan aşırı benzerliğinden dolayı, sinir hücreleri gibi metabolik olarak aktif hücreler için özelleştirilmiş solunum proteini olduğunu öne sürmektedir [32-35]. Bunun yanı sıra, Ngb'nin, reaktif oksijen ve azot türevlerinin giderilmesinde de görev alabileceği öne sürülmüştür [36, 37]. Hakkında daha

az bilgi sahibi olunan Cygb'nin ise kollajen sentezinin bilinmeyen bir basamağında rol oynadığı düşünülmektedir [38, 39].

#### 1.4. Omurgalı Olmayan Canlılarda Globinler

Globinler, omurgalı canlıların yanı sıra günümüze kadar, omurgasızlarda, bitkilerde, yassı solucanlarda, yumuşakçalarda, bakterilerde vs. canlılarda teşhis edilmiştir. Omurgalı olmayan canlıların globinleri, yapısal, fonksiyonel ve buldukları dokular açısından oldukça yaygın bir çeşitlilik gösterir. Omurgalı olmayan canlı globinleri, yapısal bakımdan her ne kadar daha ilkel olsa da, gösterdikleri yaygın çeşitlilik, onların farklı koşul ve fonksiyonlara adaptasyonunu sağlamıştır [40].

Omurgalı olmayan canlıların globinleri, R.E. Weber ve S.N. Vinogradov tarafından yapısal olarak beş gruba ayrılmıştır: 1) Tek zincirli ve tek aktif bölgesi monomerik, (hücre içi veya hücre dışı), 2) Dimer ve tetramerik globinler, 3) Molekül ağırlığı 200-800 kDa arasında olan büyük çok alt birimli globinler, 4) Bir veya daha fazla zincirden oluşan, çok alt birim ve aktif bölgeye sahip olan Hb'ler ve 5) Hegzagonal, çift katmanlı, hücre dışı dev globinler [1].

Globinler, omurgalı olmayan canlılarda, hücre sıvısında, kırmızı kan hücresinde, hücre zarının yapısında ve hücre dışı sıvılarda bulunmuştur. Ağırlıklı olarak oksijence fakir çevrede yaşayan canlılarda sentezlenmesinden dolayı, bu canlılardaki önerilen birincil fonksiyonu, oksijen depolaması ve taşınmasıdır. Bunun yanı sıra, bugüne kadar yapılan çalışmalar çeşitli fonksiyonlar önermiştir. Bunlara örnek olarak, *Amphitrite ornata*'da oksidaz/peroksidaz benzeri aktivitesi [41, 42], *Lumbricus*'da süperoksit dismutaz aktivitesi [46], *Chironomus thummi*'de vitellogenin benzeri aktivite [44], *Anisop* ve *Bunea* gibi böcek cinslerinin sudaki dengelerini sağlaması [45-47] ve *Rhizobium meliloti*'de oksijen sensörü [48, 49] sayılabilir.

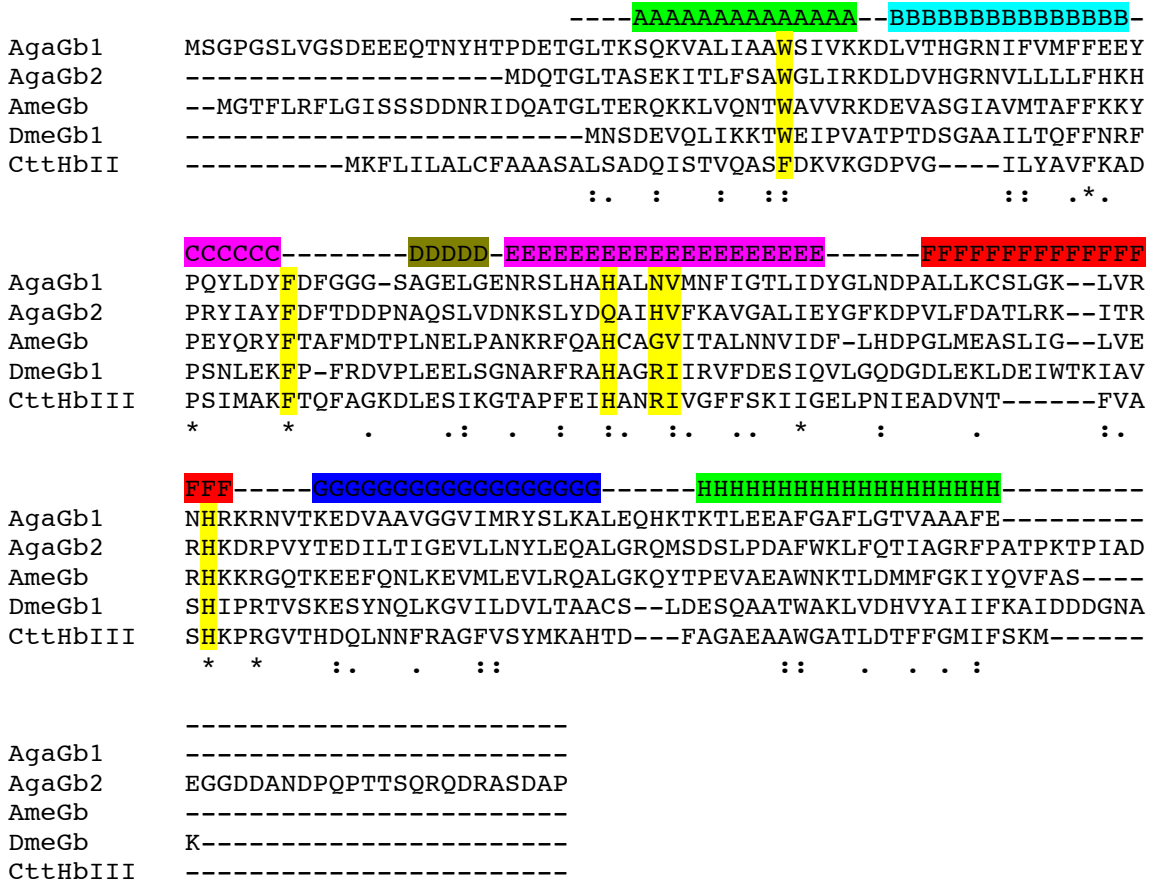
#### 1.5. Böceklerde Globinler

Böcekler, yeryüzünde en yaygın bulunan canlı sınıflarından biridir ve milyondan fazla tanımlanmış türü ile en çok çeşitliliğe (tür sayısına) sahip hayvan sınıfı olarak da tanınırlar. Oksijenli solunum yapan bu canlıların solunumu, trake adı verilen gelişmiş

kanallar sistemi sayesinde sağlanmaktadır. Hatta bu kanalların hücre mitokondrilerine kadar bağlantısı olduğu kanıtlanmıştır [50].

Yıllar boyunca, böceklerin trake solunum sisteminin yüksek difüzyon hızı ve kapasite katsayısından dolayı, bu sistemin, yeryüzünde yaşayan en büyük böceğin dahi oksijen tedariki için yeterli olduğu ve böceklerin bir solunum proteinine sahip olmasının gereksiz olduğu düşünülmekteydi [51, 52]. 1972 yılında, *chironomid* larvalarının parlak kırmızı renginin globin varlığından kaynaklandığının kanıtlanmasıyla, *chironomid* ve benzer oksijence fakir ortamda yaşayan birkaç tür için yukarıda bahsedilen durum istisna olarak kabul edilmiştir [53, 54].

Fakat yakın zamanda yapılan çalışmalar, globinlerin, böceklerde (*Drosophila* [55, 56], *Anopheles* [57], *Apis* [58] vs.) daha yaygın bir şekilde bulunduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 6. Böcek globinlerinin amino asit sıralarının karşılaştırılması. Sarı bölgeler globin yapısının ve aktif bölgesinin oluşmasında önemli aminoasitler, diğer renkli kısımlar ise alfa sarmal yapıları oluşturan a.a. sıralarını; (\*), çakışan a.a.'leri; (:), benzer iki a.a. birimini ve (.) ise benzer yapıdaki ikiden fazla a.a. sıralamasını göstermektedir [59].

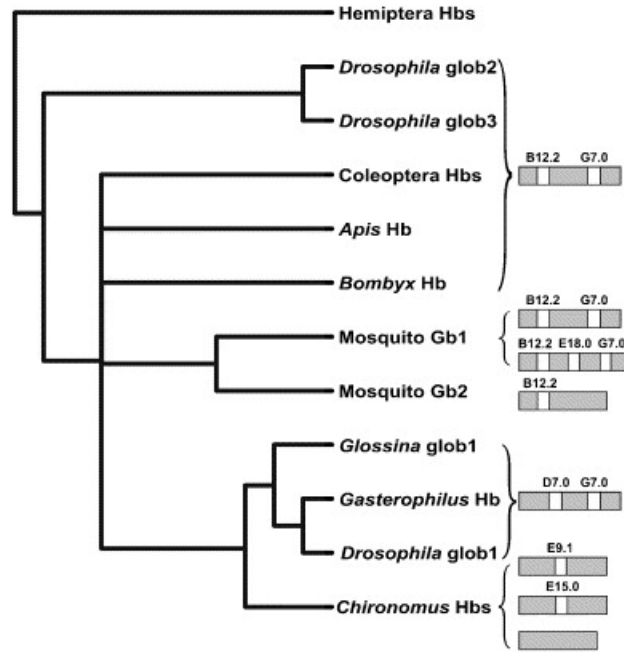
Böcek globinleri kendi aralarında dahi yaygın bir çeşitliliğe sahip olsalar bile, klasik miyogloblin katlanmasını sağlayan ve aktif bölgeyi oluşturan a.a.'ler korunmuştur (Tablo 1) [60].

Tablo 1. Aktif bölgeyi oluşturan ve globin yapısını oluşturmaya yardımcı a.a.'ler [60].

Türler	A12	B10	CD1	E7	E10	E11	F8
İnsan Mb	Trp	Leu	Phe	His	Thr	Val	His
<i>Chironomus</i> Hb	Trp/Phe/Tyr	Leu	Phe	His	Arg	Ile/Val	His
<i>G. intestinalis</i> Hb	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His
<i>Drosophila</i> glob1	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His
<i>Drosophila</i> glob2	Trp	Phe	Phe	His	Ala	Met	His
<i>Drosophila</i> glob3	Trp	Phe	Phe	His	Arg	Phe	His
<i>A. mellifera</i> glob1	Trp	Met	Phe	His	Gly	Val	His
<i>A. gambiae</i> glob1	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Leu	His
<i>A. gambiae</i> glob2	Trp	Leu	Phe	Gln	His	Ile	His
<i>A. aegypti</i> glob1	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Leu	His
<i>A. aegypti</i> glob2	Trp	Met	Phe	His	Asn	Val	His
<i>A. pisum</i> glob1	Trp	Val	Phe	His	Lys	Val	His
<i>A. gossypii</i> glob1	Trp	Phe	Phe	His	Lys	Val	His
<i>D. cervinus</i> glob1	Trp	Leu	Phe	Gln	Ser	Val	His
<i>T. castaneum</i> glob1	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Val	His
<i>B. mori</i> glob1	Trp	Leu	Phe	His	Asn	Ile	His
<i>G. morsitans</i> glob1	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His

Omurgalı hemoglobinlerinin aksine, böcek globin genleri intron pozisyonları açısından da çeşitlilik gösterir. En çok bilinen günümüz *chironomid* globin genlerinin intron pozisyonu içermediği için, intron pozisyonlarının yatay gen transferi sayesinde kaybedildiği, yerine E9.1, E15.0 ve E12.2 noktalarında intron pozisyonu olduğu önerilmektedir [60]. *Chironomid* globin genlerinin çeşitliliği ve omurgalı canlıların globin genleri ile benzerliği daha çok olduğu için böcekler için ata olduğu öne sürülmüş olup, fakat bu durum kanıtlanamamıştır [61]. İtron pozisyonları kullanılarak yapılan filogenetik inceleme aşağıda gösterilmektedir [60].





Şekil 7. Böcek globin genlerinin intron pozisyonları baz alınarak yapılan filogenetik incelemenin şematik gösterimi [60].

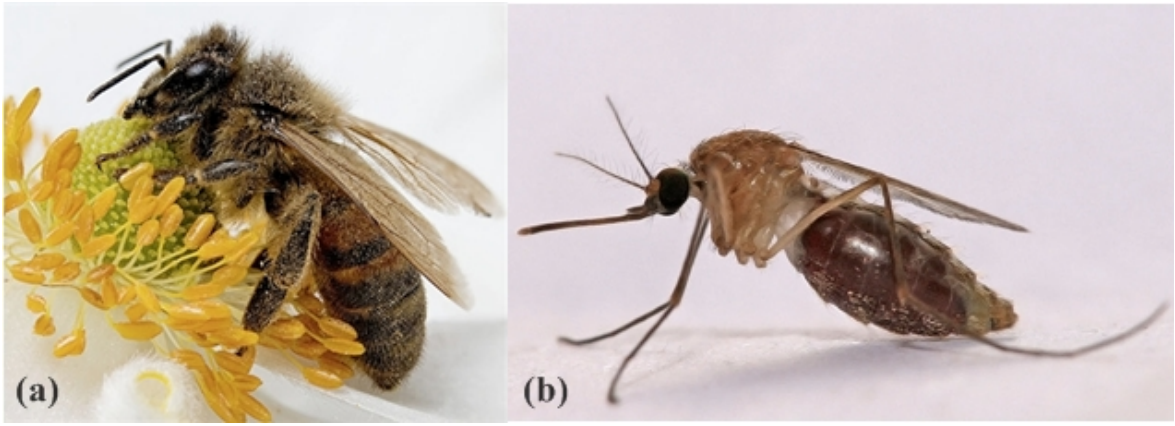
Globinlerin, böceklerde bu denli yaygın bulunmasının fizyolojik bir açıklaması olması gerektiği düşünülmüştür. Fakat böcek dokularındaki hücre içi mikro koşullar bilinmediğinden, globinler hakkında elde edilmiş bilgiler ışığında, keşfedilmiş fonksiyonları dikkate alınarak fonksiyon tahminleri yapılmıştır. Bunlara örnek olarak; reaktif azot ve oksijen türlerinin giderilmesi [18], trake çeperlerinde oksijenin içerideki hücrelere akış hızını sabit tutmak için tampon görevi görmesi [17], vd. söylenebilir. Globinler düşük konsantrasyonlarda ekspres edildiği için, miyogloblin benzeri bir oksijen taşıma fonksiyonunun olması düşük bir ihtimal olarak düşünülmüştür [60].

### 1.5.1. *Anopheles* ve *Apis*

*Apis* (bal arısı) ve *Anopheles* (sivrisinek), heksapoda alt şubesinin insekta sınıfına ait olan gelişkin böcek cinsleridirler.

*Apidae* (arılar) ailesine ait olan *Apis*, temel olarak, bal yapımı, depolaması ve bal mumundan oluşan kovanda koloni halinde yaşaması gibi özellikleriyle tanınırlar. *Apis*, tanımlanmış 44'e yakın alt türü ile yaklaşık 20.000 türü bilinen *Apidae* ailesinin, yalnızca küçük bir kısmını oluşturur. Koloni halinde yaşayan bu canlılar, koloni içerisinde yapı ve

görevlerine göre, kraliçe arı, işçi arı ve erkek arı olmak üzere üçe ayrılırlar. Döllenen yumurtadan erkek arılar, döllenmemiş yumurtalardan ise işçi ve kraliçe arılar meydana gelir. Kraliçe arının oluşması ise larvaların beslenmelerine bağlı olarak belirlenir. Baş, göğüs ve karından oluşan vücut yapıları, genelde sarı tonlarında renkli olup, soylarına göre rengi değişiklik gösterir. Larvada, sprakıl kanalları aracılığıyla sağlanan solunum, ergin bireylerde gelişmiş trake sistemiyle sağlanır. Avrupa bal arısı olarak bilinen bir tür olan *Apis mellifera*, yaygın olarak arıcılıkta kullanılan ve gen haritası oluşturulan üçüncü böcektir (Şekil 8a) [62].



Şekil 8. *Apis* ve *Anopheles* görüntüleri (a) *A. mellifera* [63] (b) *A. gambiae* [64].

*Anopheles* ise culicidae ailesine ait zararlı kan emici bir böcek cinsidir. Temiz su birikintisinin bulunduğu yerlerde yaşar. Yumurta, larva, pupa ve erişkin yaşam evrelerini sergiler. Yumurtaları, suda tek ve dağınık halde bulunur. Lavraları, solunumu, solungaç yarıklarıyla gerçekleştirdiği ve solunum borusunun henüz oluşmamasından dolayı vücutları su yüzeyine paralel şekilde bulunur. Pupa evresinde oluşan karın ve gövde kısmı baş yapısı etrafında bükülerek virgüle benzer bir şekil sergiler. Yumurtanın oluşumundan pupa evresinin tamamlanması, türe ve çevre koşullarına bağlı olarak 5-14 gün sürer. Solunum kanallarıyla solunum sağlanır ve larvada gözlemlendiği gibi pupanın, solunum için su yüzeyine çıkması gerekir. Yaklaşık 460 tanımlanmış türünün 100'den fazlası sıtma parazitinin taşıyıcısı olabilir. En tehlikeli sıtma paraziti taşıyıcısı olan *Anopheles gambiae*, en çok bilinenleridir (Şekil 8b) [65].

### 1.5.2. *Anopheles gambiae* ve *Apis mellifera* Globinleri

Yakın zamanda, *A. gambiae*'den (sivrisinek) iki globin geni (AgaGb1-AgaGb2) [57] ve *A. mellifera*'den (bal arısı) bir globin geni [58] tespit edilmiş, klonlama ve ekspresiyon analizleri yapılmıştır.

AmeGb, AgaGb1 ve AgaGb2 genleri, çeşitlilik gösteren böcek globinlerinin aksine omurgalı globinleriyle aynı B12.2 ve G7.0 intron pozisyonlarına sahiptir. Dördüncü evresindeki larvalarda yapılan *in situ* çalışmaları, AgaGb1 için, proteinin, yoğunlukla trake borularının çevresinde sentezlendiğini gösterirken; AmeGb, için trake borularının yanı sıra testislerde ve malpigi tüplerinde de sentezlendiğini göstermiştir [57, 58].

Ekspress edilen proteinler, 168 (AgaGb1), 182 (AgaGb2) ve 171 (AmeGb) a.a.'den oluşmaktadır ve sinyal peptit zinciri içermediğinden, hücreiçi protein olarak öngörülmüştür. Polipeptidin zincir sıralaması, sekiz  $\alpha$ -sarmal yapıyı ve aktiviteyi sağlayacak a.a.'lere sahip olduğu ispatlanmıştır [57, 58].

Ağırlıklı olarak trake çevresinde sentezlendiği için solunum proteini olarak düşünülmüştür, fakat ne oksijen bağlama kinetiği ne de oksijenin hücre içi kısmi basıncı bilinmektedir [57, 58].

### 1.6. Globinler Hakkında Literatür Özeti

Globinler yoğun ekspres edildiği organizmalarda veya dokulardaki parlak kırmızı rengi sayesinde birçok canlı dokusundan izole edilerek teşhis edilmiştir. Ekspresyonun düşük miktarlarda olduğu durumlarda ise bilinen gen haritalarından veya elde edilen gen kütüphanelerinden globin kodlayan gen varlığı teşhis edilerek araştırılmıştır. Fakat canlı dokusunda çok az miktarda ekspres edilen globinin saflaştırılması mümkün olmadığı için, globin genini içeren DNA parçası ile rekombinant bir vektör oluşturularak konak *E. coli* hücresinde globinin fazla miktarda ekspresyonu sağlanmıştır (Bölüm 1.6.1). Bu sayede saflaştırılan globinler, bir çok teknik kullanılarak, yapı ve kinetik özellikleri incelenerek fonksiyonlarının aydınlatılmasında kullanılmıştır [66].

Globinlerin sahip olduğu hem grubunun, bu proteinlere kazandırdığı karakteristik özelliklerden dolayı, UV-vis spektrum ve elektron paramagnetik rezonans spektrum analizleri, sıklıkla yapının ön karakterizasyonu için başvurulan tekniklerdir. Bu teknikler,

globinlerin, yüksek spin (genellikle penta formu) veya düşük spin (genellikle hegz formu) durumunun incelenmesinde kullanılır [67].

Yapı ve kinetik özelliklerinin incelenmesinde ise flaş fotoliz en çok kullanılan tekniklerdendir. Bu teknik, ayrı başlık altında daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Bölüm 1.6.2).

Globin yapısının analiz edilmesi için kullanılan diğer bir yöntem ise, X-ışını kristalografisidir. Bu yöntemle molekülün 3 boyutlu yapısı aydınlatılabilir ve aktif bölge kavitesi incelenebilmektedir. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda, globinin aktif bölgesindeki a.a.'lerin oluşturduğu kavite büyüklüğü belirlenerek, kavitenin, ligand bağlama mekanizmasına etkisi araştırılmıştır. Keşfedilen kavite/kanal sistemlerinin, oluşturulan mutasyonlarla bloke edilmesiyle, kavitenin, afinite üzerindeki etkisi incelenmiştir [67-69].

Globin ekspresyonunu sağlayan genin silinmesiyle veya globinin geri dönüşümsüz inhibisyonuyla, organizmada gerçekleşen değişiklikler, globinlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasında kullanılmıştır. Literatürde, fare kalp Mb geni silinerek yapılan deneylerde, kalp fonksiyonlarının %30 azaldığı görülmüştür. Buna dayanarak, Mb'nin dokularda oksijen depoladığı ve dokunun uzun süreli oksijen yetersizliğine dayanıklılığını arttırdığı düşünülmüştür [70]. Anisops üzerinde yapılan karbonmonoksitle zehirlenme çalışmaları ise göstermiştir ki, anisops globininin solunumda görev almaktan ziyade su içinde dengesini sağlamada rol oynamaktadır [45, 46]. Fakat, globin yokluğunda takip edilebilir bir değişim sergilemeyen canlılarda bu tür fonksiyon analizlerini yapmak mümkün olmamaktadır. Böyle durumlarda ise, globinlerin bulunduğu dokular ve bilinen fonksiyonları göz önüne alınarak, yapılan kinetik çalışmalarla farklı ligandlara (CO, NO, reaktif oksijen ve azot türleri) afinitesine göre, globin fonksiyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır (Bölüm 1.6.2).

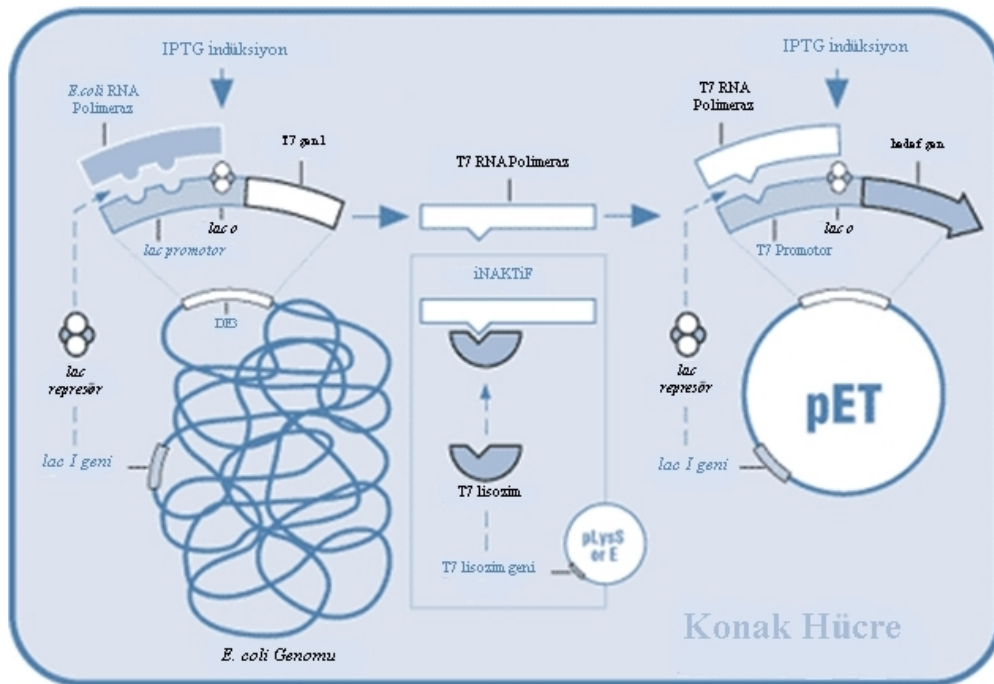
### 1.6.1. Rekombinant Vektör

*A. gambiae* (AgaGb) ve *A. mellifera* (AmeGb) globinlerinin dokularda çok düşük konsantrasyonlarda bulunması, onları doğal ortamlarından elde edip saflaştırmayı imkansız kılar. Bu yüzden bu proteinlerin karakterizasyon çalışmaları için en uygun yöntem klon ekspresyonu olarak önerilmiştir [66].

pET sistemi, hedef proteinlerin, kısa bir sürede çok miktarda üretilmesi için tasarlanmış etkili bir sistemdir. Bu sistem, hedef proteinin geninin klonlanması ve proteinin *E. coli* hücrelerinde ekspresyonundan oluşmaktadır [71].

Enzimle kesilmiş PCR ürünlerinin aynı enzimle kesilen pET-23a(+) vektörünün ekspresyon bölgesine yapıştırılmasıyla elde edilen plazmid, *E. coli* hücrelerine transfer edilir ve antibiyotik kontrolü altında çoğaltılır. pET-23a(+) plazmidinin amfisilin antibiyotiğine karşı direnç geni, ekspresyon bölgesi ve ekspresyon bölgesinin sonunda saflaştırmada kolaylık sağlamak için His-kuyruğu uzantısı içermektedir [71].

BL21(DE3)pLysS, ekspresyon için konak hücre sistemi olarak kullanılmaktadır. Bu hücre T7 bakteriofaj geni sayesinde kontrollü protein üretimi sağlanmaktadır. *Lac I* geninden replike edilen *lac* represör, DE3 geninin promotor bölgesine bağlanarak T7 RNA polimeraz enziminin transkripsiyonunu inhibe etmektedir. Baskılayıcıya rağmen az miktarda sentezlenen T7 RNA polimeraz, pLysS plazmidinde bulunan T7 lizozim geninden replike edilen T7 lizozim ile inaktive edilmektedir. Böylece yeterli hücre konsantrasyonuna ulaşılan kadar protein ekspresyonu engellenmiş olmaktadır. Uygun konsantrasyona ulaşıldığında, IPTG eklenmesiyle *Lac* baskılayıcısı uzaklaşmakta ve T7 RNA polimeraz üretimiyle protein ekspresyonu başlamaktadır (Şekil 9). Ayrıca BL21(DE3)pLysS konak hücresi hedef proteine zararlı olabilecek proteaz içermemektedir [71].



Şekil 9. pET sisteminin ekspresyon kontrol mekanizmasının şematik gösterimi [71].

### 1.6.2. Flaş Fotoliz ile Ligant Bağlama Özelliklerinin Ölçülmesi

Hem-proteinlerinin ligand tekrar bağlama ilişkisinin flaş fotolizle incelenmesi, protein-ligand moleküler mekanizmasının anlaşılması için sıkça başvurulan bir yöntemdir. Bir yan tepkime vermeksizin, hem-karbonmonoksit komplekslerinin, görünür ışıkla flaşlanmasıyla, kolaylıkla ligandından ayrılması çok kullanışlı bir özelliktir. Bu sayede, lazer gönderilmiş numunenin, zaman(ns-ms)-absorpsiyon değişimine bağlı olarak ligandın tekrar bağlanma özellikleri incelenmektedir [72, 73].

Mb ve Hb gibi harici ligandın bağlanmadığı durumlarda hegz formunda bulunan globinlerde yalancı birinci dereceden gözlenen ligand-globin reaksiyonu tek üssel fonksiyondan ilerlemekte ve k sabiti Formül 2'nin integrasyonu ile kolaylıkla hesaplanabilmektedir. Distal histidin biriminin altıncı koordinasyona bağlanabildiği durumlarda ise harici ligandın bağlanması için histidin biriminin ayrılarak harici ligandın bağlanacağı ara fazı oluşturması gerekmektedir (3). Bu ara basamağın oluşması reaksiyon hız denklemini oldukça karmaşık bir hale getirmektedir (4). Gerçekte, bu reaksiyonun daha çok ara basamak üzerinden yürüdüğü tahmin edilse de, bu, işlemleri, çözülmesi imkansız hale getireceğinden ihmal edilmektedir. İstatiksel eğri uydurma programıyla, t-ΔO.D grafiğinden elde edilen iki üssel fonksiyon denklemleri elde edilerek bu denklemlerden de  $k_{deneyse}$  değerleri elde edilmektedir.  $K_{deneyse}$  – CO konsantrasyonu grafiği çizilerek  $k_{onCO}$  ve  $k_{offH}$  değerleri elde edilmektedir [72, 73].

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (2)$$



$$[P_{CO}] = [P]_0 \left[ 1 - \left( \frac{k'_{CO}[CO](k_{-H} - \gamma_1)}{\gamma_1(\gamma_2 - \gamma_1)} \right) e^{-\gamma_1 t} - \left( \frac{k'_{CO}[CO](k_{-H} - \gamma_2)}{\gamma_2(\gamma_1 - \gamma_2)} \right) e^{-\gamma_2 t} \right] \quad (4)$$

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen globinlerin ligand bağlama hız sabitleri durgun akış yöntemiyle ölçülen ligand ayrılma hız sabitlerine ( $k_{bağlanma}/k_{ayrılma}$ ) oranından afiniteleri hesaplanmıştır. Afinitesi ve bulunduğu canlının/dokunun içinde bulunduğu koşullar göze önüne alınarak, globinlerin, fonksiyonuyla ilgili tahminler yapılmış veya

kurulan hipotezlerin doğruluğu tartışılmıştır. Yapılan kinetik çalışmalarla Mb ve Hb'nin oksijen taşıma ve depolama ve azot oksit giderme mekanizmaları aydınlatılmıştır [18, 74]. Sinir dokularında bulunan Ngb'nin azot oksit giderilmesinde rol aldığı düşünülmüş, fakat kinetik ölçümlerle belirlenen azot oksit afinitesinin bu görev için uygun olmadığı görülmüştür [75].

### 1.7. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Globinler, yıllar boyunca belirgin kırmızı rengi ve yaygın bulunuşundan dolayı en çok araştırılan protein ailesinden biri olmuştur. Bilinen canlıların yaklaşık %33'ünde teşhis edilen ve en bilinen özelliği oksijen taşıma-depolama olan bu proteinlerin, böceklerin sahip olduğu trake gibi çok etkin bir solunum sistemi olduğundan, böceklerde bulunmasının gereksiz olduğu düşünülmekteydi. Yalnız, oksijence fakir ortamda yaşayan böcekler istisna olarak gösterilmekteydi.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, *Drosophila* [55, 56], *Anopheles* [57], *Apis* [58] gibi yaşam döngüleri boyunca oksijence fakir ortamda bulunmayan böceklerde de globin genlerinin varlığını ortaya koymuştur. *In situ* çalışmalar da bu proteinlerin aktif olarak sentezlendiğini göstermiştir.

Böcek globinlerinin fonksiyonları, gerek hücre içi konsantrasyonlarının çok düşük olması, gerekse doku içi mikro koşullar bilinmediğinden, globinler hakkında bilinenlerle kısıtlı kalmıştır. Bu sebeple kesin fonksiyonunun keşfedilmesi mümkün görülmemektedir. Fakat yapılan kinetik ve yapı karakterizasyonu çalışmalarıyla globinlerin arasındaki flogenetik ilişki, globinlerin geçirdiği değişimi anlaşılır hale getirmektedir. Bu nedenle böyle bir filogenetik ilişkinin ortaya konması, globinlerin geçirdiği değişime ışık tutmak ve böcek globinlerinin fonksiyonlarını bilinen fonksiyonlarıyla ilişkilendirmek adına bir çalışma planlanmıştır.

Bu çalışmada, Prof. Dr. Sylvia Dewilde danışmanlığında (University of Antwerp, Belçika), *A. gambiae* ve *A. mellifera* globinlerinin izole edilen cDNA'ları, Prof. Dr. Thomas Hankeln'den (Johannes Gutenberg Univesität, Almanya) temin edilmiş olup, söz konusu cDNA'lar kullanılarak pET sistemi ile globin geninin klonlanması ve ekspres edilmesi sağlanıp, ekspres edilen proteinler saflaştırılarak ön yapı karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. YAPILAN CALIŖMALAR

### 2.1. Kullanılan materyaller

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kimyasal maddeler

	Adı	Firma
Genel Kimyasallar	EDTA	Fisher Scientific
	Etanol	
	Glisin	
	HCl	
	NaCl	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
	Amonyumperoksit	
	Triton	
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	
	TRIS	
Metanol	Acros Organics	
	Prolabo	
PCR	10x PCR-tampon	Biolabs
	dNTP (10mM)	Invitrogen
	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	
Hücre yetiřtirme	Amfisilin, Kloramfenikol	Calbiochem
	5-amino levulinik asit (ALA)	Sigma-Aldrich
	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozi (IPTG)	Fermentas
	S.O.C besiyeri	Invitrogen
	Trypton	Lab M
	Maya ekstrağı (toz)	
Agar ekstrakt		
Agaroz jel elektroforezi	Gel red	Biotium
SDS-PAGE jel elektroforezi	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck
	β-merkaptöetanol	
	Amonyum peroksodisülfat	
	Akrilamit	SERVA
	Bisakrilamit	
Coomassie brilliant blue R250	Fluka	
Bromfenol mavisi		



### 2.1.2. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihazın adı	Firma	Model
PCR	Applied Biosystem	Gene-Amp PCR system 9700
Platform çalkalayıcı	Innova	2000
Hava banyolu çalkalayıcı	Innova	4230
Santrifüj	Ependorf	5810 R
Sonikatör	GeneQ	Ultrasonic processor VC 130
Spektrofotometre	Genesys	6
SDS-PAGE-elektroforez	Bio-Rad	mini proteam gel system
Nanodrop spektrometre	ISOGEN life science	ND-1000
Amikon	Milipore	AMICON 8200
Mili Q saf su cihazı	Milipore	Mili-Q Integral 3
LC-HPLC pompa sistemi	GE Healthcare	Ettan LC
Dedektör	Dawn	Heleos II
Gaz karıştırma sistemi	Bronkhost	High-tech
Spektrofotometre (flaş fotoliz)	Edinburg Instruments	LP920
Işık kaynağı (flaş fotoliz)		LED lamp
Lazer(flaş fotoliz)	Spectra Physics Quantaray	frequency doubled-Nd: YAG laserlamp

### 2.1.3 Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyonu
<i>HindIII</i>	Biolabs	3U/μL
<i>NdeI</i>	Biolabs	3U/μL
<i>XhoI</i>	Biolabs	3U/μL
T4 DNA ligaz	Biolabs	3U/μL
Taq DNA polimeraz	Biolabs	5U/μL

### 2.1.4. Klonlama ve Protein Saflaştırma İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Klonlama ve protein saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Klonlama ve protein saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzemeler	Firma
Plazmid İzolasyon Kiti (High Pure Plasmide Isolation Kit)	Roche
PCR Ürünleri Saflaştırma Kiti (High Pure PCR Product Purification Kit)	Roche
Protein standard marker: Low Molecular Weight-marker	Bio-Rad
1 kb DNA ladder	Fermentas
Protein Saflaştırma kolon matriksi (Ni-kolon )	GE healthcare
Protein Saflaştırma jel filtrasyon kolonu Superdex GF75	GE Healthcare
Analitik jel filtrasyon kolonu Superose 12 HR 10/30	GE Healthcare

### 2.1.5. Kullanılan Suşlar

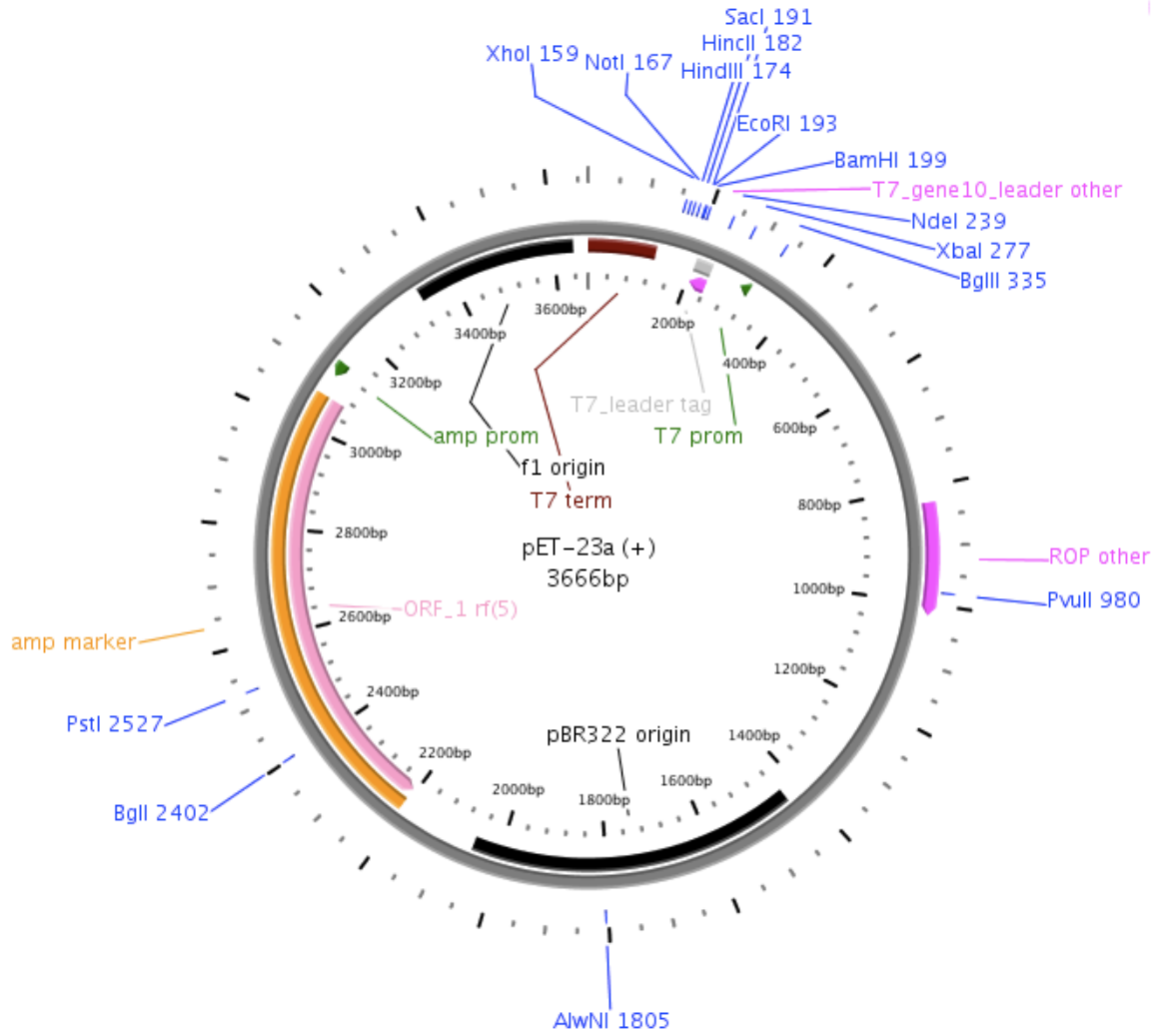
Çalışmada kullanılan suşlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan suşlar

Tür	Suş	Genotip	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, laqIqZΔM15</i> ]	Klonlama hücresi
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT, hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup></i>	Ekspresyon hücresi

### 2.1.6. Klonlamada Kullanılan Vektör

Çalışmada kullanılan pET-23a(+)vektörünün dairesel gen haritası ve çoklu klonlama bölgesinin baz dizini Şekil 10'da gösterilmiştir.



BglIII Xba I  
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATT

Nde I Nhe I Bam HI  
 TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTCCACAGCAAATGGGTCCGCGGATCC

Ecor I Sac I Sal I HindIII Not I Xho I  
 GAATTTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTG

CTAACAAAGCCC GAAAGGAAGCTGAGTTGGCCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGG

GGCCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Şekil 10. pET-23a(+) vektörünün gen haritası ve promotor ve ekspresyon bölgesi sıralaması. Ekspresyon bölge sıralamasında, sarı bölge T7, promotor bölge, yeşil, ribozom bağlanma, mavi, His-kuyruğu uzantısı, pembe ise T7 terminatör bölge baz sıralamasını göstermektedir. Kesim bölgeleri, üzerine ilgili enzimlerin isimleri ile belirtilmektedir [62].

### 2.1.7. Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Sırası	Tm (°C)	Sentezleyen Firma
Ame ileri	5'-GGA-ATT-CCA-TAT-GGG-AAC-GTT-TCT-ACG-3'	53.1	Eurogentec
Ame geri	5'-CCG-CTC-GAG-AGA-AGC-GAA--AAC-CTG-ATA-TA-3'	56.4	Eurogentec
Aga ileri	5' GGA-ATT-CCA-TAT-GTC-CGG-ACC-CGG-GTC-G 3'	60.7	Eurogentec
Aga geri	5' CCC-AAG-CTT-CTC-GAA-CGC-GGC-CGC-AAC-CG 3'	64.9	Eurogentec
T7 promotor:	TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG	55	Eurogentec
pET3aR3:	CTA-GTT-ATT-GCT-CAG-CGG-TG	55	Eurogentec

### 2.1.8. Sıvı ve Katı Besiyerleri

- Luria-Bertani (LB) 6 mL’lik kültürler için besiyeri: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 0,5 g NaCl son hacim 1 L olacak şekilde saf suda çözülüp, tüplere 6 mL’şar dolduruldu. Ağzı pamuk ve demir kapakla kapatılan tüpler 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi [76].

- Luria-Bertani Agar (LB Agar) Besiyeri: 10 g bakto-tripton, 5 g maya ekstrağı ,30 g agar ve 5 g NaCl son hacim 1 L olacak şekilde saf suda çözülüp, 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi [76].

- Terrific Broth (TB) besiyeri: 60 g Tripton, 120 g maya ekstrağı, 11,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 62,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> yaklaşık 4,5 L saf suda çözülüp, 25 mL %80’lik gliserol çözeltisi eklendikten sonra saf su ile 5L’ye tamamlandı. 1L’lik erlenlere 250’şer mL doldurulup 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi [77].

### 2.1.9. Agaroz Jel Elektrofözezi

- Jel Yükleme Boyası (6X): 25,0 mg bromofenol mavisi ve 3 mL gliserol saf su ile iyice karıştırılıp, hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0): 18,61 g EDTA.2H<sub>2</sub>O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı, 1 N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-Borik Asit-EDTA Çözeltisi (5X TBE): 54,0 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisinin steril saf su ile iyice karıştırılıp hacminin 1000 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (1X TBE): 100 mL 5X TBE çözeltisinin hacminin saf su ile 500 mL'ye tamamlanması ile elde edildi.

### 2.1.10. SDS PAGE Jel Elektrofözezi

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris ve 10 g SDS yaklaşık 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris ve 10 g SDS yaklaşık 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%15): 0,15 g APS yaklaşık 8 mL saf suda çözüldü hacmi 10 mL'ye tamamlandı her kullanım için günlük hazırlandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözüldü hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bakteri stoğu hazırlamak için kullanılacaksa otoklavda steril edildi.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptöetanol karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

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

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

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

### **2.1.11. Nikel Afinite Kromatografisi Çözeltilerinin Hazırlanması**

- Stok 500 mM Tris-HCl pH 7,5 tamponu: 60,55 g Tris, yaklaşık 980 mL saf suda çözülerek 1 N HCl çözeltisi ile pH'ı 7,5'a ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlandı, +4°C'de saklandı.

- A tamponu: 100 mL stok Tris-HCl çözeltisine, 17,53 g NaCl eklenip 1000 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

- B tamponu: 50 mL stok Tris-HCl çözeltisine, 8,76 g NaCl ve 17,01 g imidazol eklenip hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

- Nikel afinite testi için tamponlar:

1. 4 mL B tamponu, üzerine A tamponu eklenerek 100 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

2. 20 mL B tamponu, üzerine A tamponu eklenerek 100 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

3. 50 mL B tamponu, üzerine A tamponu eklenerek 100 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

4. 70 mL B tamponu, üzerine A tamponu eklenerek 100 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

- Diyaliz tamponu: 5 mL Tris-HCl tamponu, saf su ile 500 mL'ye ile tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

### 2.1.12. Jel Filtrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

- Stok EDTA pH 7,0 tamponu: (0,5 M, pH 7,0): 18,61 g EDTA.2H<sub>2</sub>O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

- Stok Jel filtrasyon tamponu 10X: 2 mL stok EDTA pH 7,0 tamponu, 12,11 g Tris-HCl ve 17,55 g NaCl yaklaşık mili Q ile filtre edilmiş 180 mL saf suda çözülüp pH 8,5'a ayarlandıktan sonra mili Q filtre edilmiş saf suyla 200 mL'ye tamamlandı ve +4'de saklandı.

- Jel filtrasyon tamponu: 100 mL stok Jel filtrasyon tamponu mili Q ile filtre edilmiş saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı ve +4'de saklandı.

### 2.1.13. Flash Fotoliz Çözeltilerinin Hazırlanması

- Fosfat pH 7,0 tamponu: 50 mL 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisinin pH'ı, 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisiyle pH 7,0'ye ayarlandı (Son hacim ~100mL).

- Sodyum ditiyonit çözeltisi: ependorf tüpün içinde 1 mL saf suda dibinde çökelek gözlenene kadar Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> eklendi ve çözülmeye çalışarak doymuş çözelti elde edildi.

### 2.1.14. Diğer Çözeltiler

- Amfisilin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg amfisilin saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

- Kloramfenikol Çözeltisi (30 mg/mL): 30 kloramfenikol saf alkolde çözülerek hacmi 10mL'ye tamamlandı küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

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

- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip +4 °C'de saklandı.

- Tris-HCl (500 mM, pH 8,0) tamponu: 60,55 g Tris yaklaşık 980 mL saf suda

çözülerek 1 N HCl çözeltisi ile pH'ı 8'e ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

- EDTA Çözeltisi (50 mM, pH 8): 1,86 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0' e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

- Süspansiyon çözeltisi: 50 mL 500mM Tris-HCl pH 8.0 tamponuna 1,75 g NaCl karıştırılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

## 2.2. Klonlama ve Protein Ekspresyonu

### 2.2.1. DNA Fragmentlerinin PCR ile Çoğaltılması

*A. gambiae* ve *A. mellifera* cDNA'larından globin genleri uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı [78]. Reaksiyon karışımı Tablo 8'deki miktarlarla son hacim 25 µL olacak şekilde hazırlandı. DNA fragmentleri Tablo 9'daki sıcaklık programı uygulanarak PCR'la çoğaltıldı.

Tablo 8. PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µL)
İleri primer	1
Geri primer	1
10x tampon	2,5
10 mM dNTP	0,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0.1
H <sub>2</sub> O	18,25
DNA plasmit	1



Tablo 9. PCR programı. \*: AmeGb için 56, AgaGb için 65.

	T (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlaması	*	1	25
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	1
Bekleme	4	$\infty$	

### 2.2.2. Agaroz Jel Elektroforez

PCR ürünlerini görüntülemek için agaroz jel elektroforezi uygulandı [79]. %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,3 g agaroz tartıldı ve 30 mL 1X TBE tamponu içinde mikrodalga fırında 2 dakika tutularak eritildi. Sıcak agaroz çözeltisi, 50-55 °C'ye gelinceye kadar oda sıcaklığında biraz bekletildi ve 3 µL gel red ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına döküldü. Jel donduktan sonra, elektroforez kabı 1X TBE ile dolduruldu. Her bir kuyucuğa ayrı bir yerde karıştırılmış olan 2 µL jel yükleme boyası ve 10 µL PCR ürünü yüklendi. Yaklaşık 45 dakika boyunca 100 mA'de elektrik akımı uygulandı. Jel görüntüleri, jel görüntüleme cihazında Kodak Molecular Imaging System programı yardımıyla incelenip kaydedildi.

### 2.2.3. PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, PCR ürünleri temizleme kitiyle üretici firmanın önerdiği prosedüre uygun olarak saflaştırıldı. 100 µL PCR ürünü 500 µL bağlama tamponuna karıştırıldıktan sonra filtre tübüne aktarılıp karışım 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrede tutulan DNA parçaları 300 µL ve 200 µL'lik hacimlerdeki yıkama tamponuyla 2 kez daha santrifüj edilerek yıkandı (1 dak. 13000 rpm). Son olarak filtrede tutulan DNA parçaları 100 µL steril su ile santrifüj edilerek filtreden ayrıldı (1 dak. 13.000 rpm).

### 2.2.4. PCR Ürünlerinin ve pET Vektörünün Kesimi

Tablo 10: Kesim için kullanılan restriksiyon enzimleri

Gen	Birinci kesim			İkinci kesim		
	Restriksiyon enzimi	Restriksiyon tamponu	T(°C)	Restriksiyon enzimi	Restriksiyon tamponu	T(°C)
AgaGb WT/ $\Delta$ cys	<i>NdeI</i>	Tampon 4	37	<i>HindIII</i>	Tampon 2	37
AmeGb WT/ $\Delta$ cys	<i>NdeI</i>	Tampon 4	37	<i>XhoI</i> (+BSA)	Tampon 2	37

AgaGb ve AmeGb DNA parçalarının pET vektörüne uygun şekilde yapıştırmak için her ikisinde uygun iki farklı enzimle firmanın önerdiği prosedüre uygun olarak kesildi (Tablo 10). 1  $\mu$ L restriksiyon enzimi ve 12  $\mu$ L restriksiyon tamponu 100  $\mu$ L saflaştırılmış PCR ürününe eklendi. İlgili enzimin gerektirdiği durumlarda ayrıca karışıma 1,2  $\mu$ L BSA eklendi ve karışıma son hacmi 120  $\mu$ L olacak şekilde steril su eklendi. Karışım, üretici firmanın belirttiği koşullarda ~6 saat su banyosunda bekletildi. Yapılan kesim işleminden sonra 2. kesim için enzim farklı tampon gerektirdiği için Yüksek saflık PCR ürünleri saflaştırma kitiyle saflaştırıldı. pET-23a(+) vektörde Yüksek saflık PCR ürünleri saflaştırma kitiyle saflaştırılıp, AgaGb ve AmeGb DNA parçalarıyla aynı enzimle kesilerek rekombinant vektöre oluşturmaya uygun parçalar elde edildi [80].

### 2.2.5. DNA Parçasının pET Vektörüne Ligasyonu

Enzimlerle kesilmiş ve saflaştırılmış DNA parçalarının vektörle yapışmasında en uygun konsantrasyonları belirlemek için, aynı enzimlerle kesilip saflaştırılmış DNA parçaları ve vektörlerinin konsantrasyonları nano drop spektrometre ile ölçülerek ligasyon için gerekli miktarlar aşağıdaki formül (1) ile 1/3, 1/5 ve 1/10 olmak üzere üç farklı vektör/plazmid oranında hesaplandı [80].

$$\{ ( 50 \text{ ng vektör} \times \text{kb plazmid} ) / \text{kb vektör} \} \times \text{molar oran} = \text{ng plazmid} \quad (1)$$

Hesaplanan miktarlarla hazırlanan vektör/plazmid karışımına 1  $\mu\text{L}$  ligasyon tamponu, 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligaz ve son hacim 10  $\mu\text{L}$  olacak şekilde steril su eklendi. Karışım 18°C’de su banyosunda bir gece inkübe edildi [80]. 1  $\mu\text{L}$  ligasyon karışımı, 300  $\mu\text{L}$  *E. coli* kompetent hücrelerine eklenip 30 dakika buzda inkübe edildikten sonra 45 saniye 42°C’de ısı şoku uygulandı. Isı şokundan sonra 2 saat daha buzda inkübe edilen hücrelere 1  $\mu\text{L}$  LB besiyeri eklenip 37°C’de 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda hücreler amfisilinli agar besiyerlerine tabaka ekimi yapıldı ve gece boyunca etüvde 37°C’de büyümeye bırakıldı. Petride bir gece boyunca büyüyen kolonilerden steril pipet ucuyla seçilerek agaroz besiyerine çizgi ekimi yapıldı ve ekim sırasında kullanılan pipet uçlarında kalan hücreler koloni PCR’ında kullanıldı. Tablo 11’de verilen konsantrasyonlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımına sıcaklık programı (Tablo 12) uygulanarak plazmidlerin ekspresyon bölgesi PCR reaksiyonuyla çoğaltıldı [81]. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde koşturularak DNA parçasına sahip koloniler belirlendi.

Tablo 11. Koloni PCR’ı bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
T7 promotor	1
pET3aR3	1
10x Tampon	2,5
10 mM dNTP	0,5
25 mM $\text{MgCl}_2$	0,75
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.1
$\text{H}_2\text{O}$	18,25
1 koloni	

Tablo 12. Koloni PCR'ı için sıcaklık programı

	T (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlaması	55	1	35
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	1
Bekleme	4	$\infty$	

Belirlenen kolonilerin agar besiyerindeki stoklarından alınarak 6 mL'lik LB besiyerlerinde bir gece boyunca büyütüldü ve ertesi gün yüksek saflık PCR plasmid izolasyon kiti ile üretici firmanın tarifine uygun olarak aşağıda açıklandığı gibi plazmid saflaştırılması yapıldı.

3 mL *E. coli* kültürü 4.000 rpm'de santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında hücreler, 250  $\mu$ L süspansiyon tamponunda tekrar süspansiyon edildi ve 250  $\mu$ L lizis tamponu eklenip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda soğutulmuş bağlama tamponu eklenerek tekrar 5 dakika buzda inkübe edildi ve ardından 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj uygulandı. Santrifüj sonunda elde edilen supernatant yüksek saflık filtre tüpüne yerleştirilip 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj uygulandı. Filtre tarafından tutulan plazmidler, filtreden 1 dakikalık 13.000 rpm'lik santrifüj uygulanarak geçirilen 500  $\mu$ L yıkama tamponu I ve 700  $\mu$ L'lik yıkama tamponu II ile arıtıldı. Yıkama tamponlarından tamamen uzaklaştırılması için filtreye son kez boş olarak 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulandı ve ardından, saflaştırılmış plazmidler, 100  $\mu$ L steril su ile santrifüj edilerek filtreden ayrıldı. Elde edilen plazmid çözeltisinin 10  $\mu$ L'si sıra analizi için Gent Üniversitesi'ne yollandı, geri kalanı -20°C derecede saklandı.

*E. coli* gece kültüründen alınan 1 mL'lik kısım üzerine, 500  $\mu$ L %50'lik gliserol çözeltisi eklenerek gliserol stok hazırlandı ve -80°C'de saklandı [82].

### 2.2.6. Rekombinant Vektörün Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu

Doğru sıralamayı içeren rekombinant vektör, *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine 45°C'de 30 saniye ısı şokuyla transfer edildi [76]. 250  $\mu$ L S.O.C besiyeri eklenen hücreler

1 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra amfisilin ve kloramfenikol içeren agar besiyerlerine ekilip gece kültürü hazırlandı. Büyüyen kolonilerden seçilerek 6 mL’lik LB besiyerinde ilgili antibiyotikler eşliğinde 37°C’de gece boyu büyütüldü (0.02 mg/mL kloramfenikol ve 0.03 mg/mL amfisilin). Elde edilen gece kültüründen 1 mL alınıp, 500 µL %50’lik gliserol çözeltisi eklenerek gliserol stok hazırlandı ve -80°C’de saklandı [82].

### **2.2.7. Protein Ekspresyonu**

Rekombinant genleri içeren *E. coli* BL(DE3)pLysS hücrelerinden hazırlanan gliserol stoktan, 6mL’lik bir kısım LB besiyerine (0.02 mg/mL kloramfenikol ve 0.03 mg/mL amfisilin içeren) ekilip gece boyunca 37°C’de büyütüldü. Gece kültürü, 250 mL’lik besiyerlerine (0.02 mg/mL kloramfenikol ve 0.03 mg/mL amfisilin) ekildi ve 37°C’de optik yoğunluğu ~0.8 olana kadar büyütüldü. Ardından son konsantrasyonu 0,4 mM olacak şekilde IPTG eklenip gece boyu 37°C’de çalkalıyıcılı hava banyosunda yaklaşık 20 saat inkübe edildi [70].

Gece boyunca protein ekspres eden hücreler, 4.000 rpm’de santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücreler, süspansiyon tamponuyla tekrar süspansiyon edildikten sonra 3 kere dondurulup (-20°C) çözülerek hücrelerin parçalanması sağlandı ve hücre DNA’larını kırmak için 2 dakikalık 70 Hz sonikasyona maruz bırakıldı. Parçalanmış hücreler, 20°C’de 20 dakika 10.000 rpm’lik santrifüj uygulandıktan sonra hücre kalıntıları uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre özütü, saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere -20°C’de saklandı [70].

## **2.3. Proteinin Saflaştırılması**

### **2.3.1. Nikel Afinite Kromatografisi**

Nikel afinite kromatografisi, Ni<sup>2+</sup> iyonu yüklenmiş matrikste polihistidin kuyruğu içeren proteinin düşük imidazol konsantrasyonlarında adsorplanması, yüksek imidazol konsantrasyonunda ise ayrılması esasına dayanır [83]. 6 histidin uzantısıyla nikel karşı afinite kazanan AmeGb, AgaGb ve AmeGbΔCys’i, nikel afinite kromatografisi

kullanılarak saflaştırmak için önce nikel afinite testi yapılarak saflaştırma için en uygun imidazol konsantrasyonları belirlendi.

Nikel afinite testi için, 4 tane ependorf tüpüne 100 µL nikel afinite kromatografisi kolon matriksi koyularak 1 mL suyla yıkanıp 3500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Aynı şekilde A tamponuyla yıkandı ve 1 mL kültür ekstratı eklendi ve yavaşça karıştırılıp, histidin kuyruğunun nikel bağlanması için 5 dakika inkübe edildi. Ardından tüpler santrifüj edilip (3.500 rpm, 3 dakika) süpernatant atıldı [83].

Tablo 13. Nikel afinite testi için imidazol konsantrasyonları

Ependorf tüp	İmidazol konsantrasyonu
1.	20 mM
2.	100 mM
3.	250 mM
4.	350 mM

Tablo 13'deki konsantrasyonlarda imidazol içeren çözeltilerden ependorf tüplere 500 µL eklenip yavaşça karıştırıldıktan sonra santrifüj edildi (3.500 rpm, 3 dakika). Her ependorf tüpteki süpernatant SDS-PAGE jel elektroforezi için numune alındı.

Nikel afinite kromatografisi kolon uygulaması için ise, nikel afinite testine göre en uygun bağlama ve ayırma tamponları belirlendi. Kolon matriksi, üretici tarifine uygun olarak kolon içinde paketlendikten sonra bağlama tamponuyla dengelendi. Hazırlanan hücre özütüne bağlama tamponu imidazol konsantrasyonuna eşdeğer olacak imidazol eklendi ve kolona yüklendi. Yükleme sonrasında bağlama tamponu ile optik yoğunluğu ~0.1 olana kadar yıkandı. Son olarak kolona bağlanan numune ayırma tamponu ile ayrıldı ve imidazolden arındırmak için diyaliz yapıldı. Amikon kullanılarak elde edilen ürün, konsantre edildi. Saflaştırma işleminin her basamağında alınan numuneler SDS-PAGE jeline koşturuldu [83].

### 2.3.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Nikel afinite kromatografisinden elde edilen ve konsantre hale getirilen elüatın ~2mL'si jel filtrasyon tamponuyla dengelenen kolona yüklendi ve 0.75mL/dak. akış

hızıyla koşturuldu. Kolondan proteinlerin çıkışı Optilab rEX dedektör ile takip edildi. 2'şer dakika aralıklarla toplanan elüatlerden alınan örnekler SDS-PAGE jelinde koşturuldu [84].

## 2.4. Kalite Analizleri

### 2.4.1. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ayırma jeli %15'lik ve yükleme jeli %3 olacak şekilde Manitanis ve arkadaşlarına [76] göre yapıldı.

Tablo 14'de belirtildiği şekilde hazırlanan jeller, cam plakalar arasına döküldü. Standart proteinler ve örneklerden alınan 10 µL'lik kısımlar eşit hacimde yürütme tamponuyla karıştırılıp 95°C'de 5 dakika bekletilip Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Örneklerin mavi rengi, jelden ayrılana kadar, ilk 10 dakika 150 V kalan sürede 250 V olacak şekilde akım uygulandı. Elektrofrezin sonunda jel, coomassie renklendirme çözeltisinin içinde ve ardından da jel renk giderici çözeltide bekletilip boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Jel üzerinde görünür hale gelen proteinler beyaz ışık altında görüntüldü.

Tablo 14. SDS-PAGE Jel bileşenleri

Ayırma jeli %15 Akrilamid		Yükleme jeli %3 Akrilamid	
Çözelti	Miktar	Çözelti	Miktar
Akrilamid stok çözeltisi	5 mL	Yükleme jeli tamponu	4 mL
Ayırma tamponu	2.5 mL	Akrilamid stok çözeltisi	1.6 mL
H <sub>2</sub> O	2.02 mL	H <sub>2</sub> O	9.65 mL
Amonyum persülfat (APS) çözeltisi	0.47 µL	Amonyum persülfat (APS) çözeltisi	20 µL
TEMED	5 µL	TEMED	750µL

### 2.4.2. Analitik Jel Filtrasyon Kromatografisi

Standartlardan ve numunelerden alınan 100 µL'lik örnekler, jel filtrasyon tamponuyla dengelenen Superose 12 kolondan 0.5mL/dak. akış hızıyla geçirildi. Dawn Heleos II dedetörüyle fraksiyonların 280 ve 418 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapılarak Astra V bilgisayar programında zaman-absorbsiyon grafikleri oluşturuldu. Böylece elde edilen grafikten, çalışılan proteinlerin kolonu terketme zamanlarına göre molekül ağırlığı tayini yapıldı [84].

### 2.4.3. UV-vis Spektrum Analizleri

Globinlerin UV-vis spektrumunda gösterdiği karakteristik pikleri incelemek için ekspres edilen AmeGb, AmeGbΔCys ve AgaGb proteinlerinin UV-vis spektrum ölçümleri yapıldı. Elde edilen protein çözeltilerinden 10 µL alınıp saf suyla 1 mL'ye tamamlanıp 250-750 nm dalga boyu aralığında spektrum analizleri yapıldı. Kör olarak saf su kullanıldı.

## 2.5. Kinetik Analizler

### 2.5.1. Flaş Fotoliz

1 mL'lik 3 kuarz küvete, 100 µL fosfat tamponu, 2 µL EDTA tamponu ve 887 µL destile su eklenip ağzı gaz geçirmeyecek şekilde tıpayla kapatıldı. Çözeltiden azot gazı geçirilerek inert reaksiyon ortamı hazırlandı. Ardından karbonmonoksit ve azot gazı karışımları geçirilerek 100 mM, 200 mM ve 400 mM karbonmonoksit konsantrasyonları elde edildi. Her bir küvete 10 µL azot gazı geçirilmiş doygun Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> çözeltisi eklenip son optik yoğunluğu ~0.5 A olacak şekilde 1-2 µL saflaştırılmış protein çözeltisi eklendi [72, 73].

Bütün kinetik ölçümler pH 7.0'da ve 25°C'de yapıldı. Lazerle 0.82 J ve 90°'lik açıyla flaşlanan numunede oluşan absorpsiyon değişimi spektrofotometre ile 2000 ns-40 ms zaman aralığında kaydedildi. Elde edilen optik yoğunluk değişimleri, Matlab bilgisayar programı ile K<sub>obs</sub> hesaplaması için kullanıldı [72, 73].

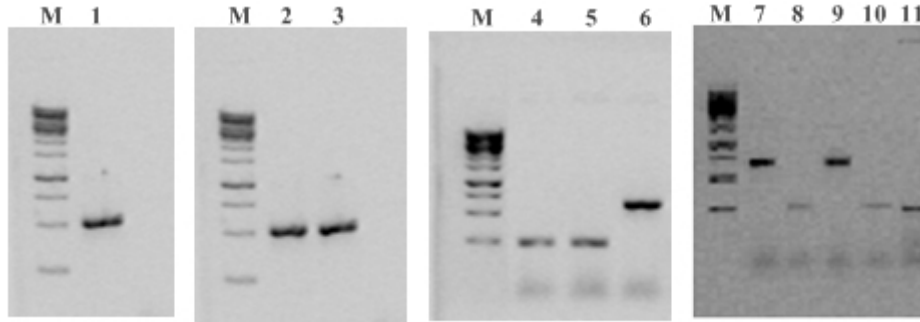


### 3. BULGULAR

#### 3.1. Klonlama ve Protein Ekspresyonu (pET Sistemi)

##### 3.1.1. Klonlama

Uygun primerler ile *A. gambiae* ve *A. mellifera* cDNA'larından çoğaltılan 513 ve 528 bp'den oluşan globin genleri, agaroz jel elektroforeziyle görüntüldü (Şekil 11 (1-3)). Çoğaltılan gen parçaları, ilgili enzimlerle kesilerek yine aynı enzimlerle kesilmiş pET-23a(+) vektörünün ekspresyon bölgesine bölüm 2.2.'de açıklandığı gibi yapıştırıldı. Plazmite gen parçasının yapışıp yapışmadığı, yapılan koloni PCR'ı ile pET-23a(+) vektörünün ekspresyon bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen gen parçalarının agaroz jel elektroforezinde koşturulmasıyla görüntüldü (Şekil 11 (6, 7 ve 9)). Gen parçası yapışmayan numunelerde, koloni PCR'ı sonucu 250 bp içeren DNA parçası gözlenirken, gen parçasının yapıştığı numunelerde ~750 bp içeren DNA parçası gözlemlendi.



Şekil 11. Agaroz jel elektroforez görüntüleri M, marker, 1, AgaGb geninin PCR ürünlerinin, 2, AmeGb geninin PCR ürünlerinin, 3, AmeGb geninin PCR ürünlerinin, 6, AgaGb koloni PCR ürünlerinin, 7, AmeGb koloni PCR ürünlerinin, 9, AmeGbΔCys koloni PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü

AmeGb ve AgaGb genlerinin yanı sıra, daha önceki çalışmalarda AmeGb'nin E8 pozisyonundaki sistein<sup>86</sup> kalıntısının serin kalıntısıyla değiştirildiği mutant (AmeGbΔCys) gen de klonlanmıştır. Bu mutant, sistein kalıntısının oluşturabileceği disülfür köprülerinin

saflaştırma basamaklarında problem teşkil edebileceğinden dolayı yapıldı. AgaGb $\Delta$ Cys (sistein<sub>110</sub> kalıtısı serin kalıntısıyla değiştirilmiş) laboratuvarında daha önceki çalışmalarda uygun saflıkta elde edildiği için tekrar üretilmedi ve üretildiği haliyle kinetik çalışmalarda kullanıldı.

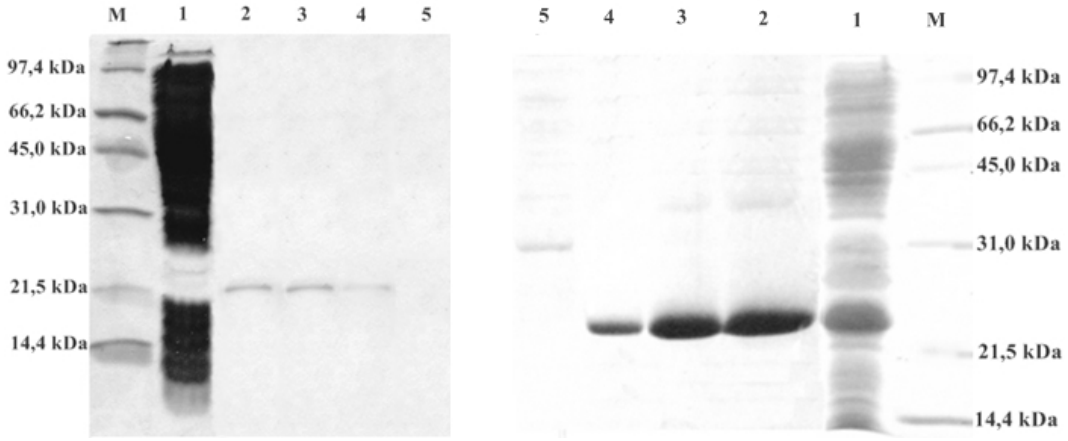
### **3.2. Proteinin Saflaştırılması**

#### **3.2.1. Nikel Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma İşleminin Optimizasyonu**

Üretilen AmeGb proteini için en uygun saflaştırma şartlarını belirlemek amacıyla normal süspansiyon tamponuyla hazırlanan hücre süspansiyonu falkon tüplere ayrıldı. Hücre süspansiyonuna uygulanan dondurma/eritme ve sonikasyon işlemiyle hücrelerin parçalanmasının ardından yapılan santrifüj sonunda oluşan kırmızı renkli pelletin varlığı, AmeGb varlığına işaret etmektedir. Suda çözünmesi beklenen AmeGb proteininin hücre lizatından ayrılması için, diğer bir parçalanmış hücre çözeltisine kütlece %1'i kadar triton eklendi ve eğimli çalkalayıcı üzerinde +4°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tekrar santrifüj edildi. Beyaz pelletin elde edimesinin ardından, bölüm 2.9.9'da açıklandığı gibi ekspresyon işlemi tekrarlandı ve elde edilen hücreler süspansiyon çözeltisi (%1 triton) kullanılarak süspansiyon edilip hücre ekstraktı hazırlandı.

AmeGb'nin matrikse bağlanması ve ayrılması için en uygun imidazol konsantrasyonlarını belirlemek için bölüm 2.3.1.'de açıklandığı gibi nikel afinite testi uygulandı. Hücre ekstraktıyla etkileştirilerek proteinin bağlanması sağlanan matriks, bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldıktan sonra, 4 farklı konsantrasyonda imidazol içeren A/B tampon karışımları ile muamele edildi. Çözeltilerden alınan numuneler SDS-PAGE'de koşturuldu (Şekil 12).

AgaGb için ilk olarak süspansiyon tamponu kullanıldı ve bölüm 2.3.1'de açıklandığı gibi nikel afinite testi uygulandı. Elde edilen eluatlar SDS-PAGE jelde koşturuldu. SDS-PAGE jel elektroforezi sonucuna göre numunenin saflaştırmanın başarılı olmadığına karar verildi (Gösterilmiyor). İkinci deneme süspansiyon tamponu (%1 triton) ile yapıldı. Fakat triton proteinin hem grubunu kaybetmesine sebep olduğu için yeşil renkli protein çözeltisi elde edildi. Son olarak, hücre ekstraktı hücreler %25 gliserol süspansiyon tamponuyla süspansiyon edilerek hazırlandı ve nikel affinite kolonuna yüklendip eluatlar SDS-PAGE'de incelendi (Şekil 12).



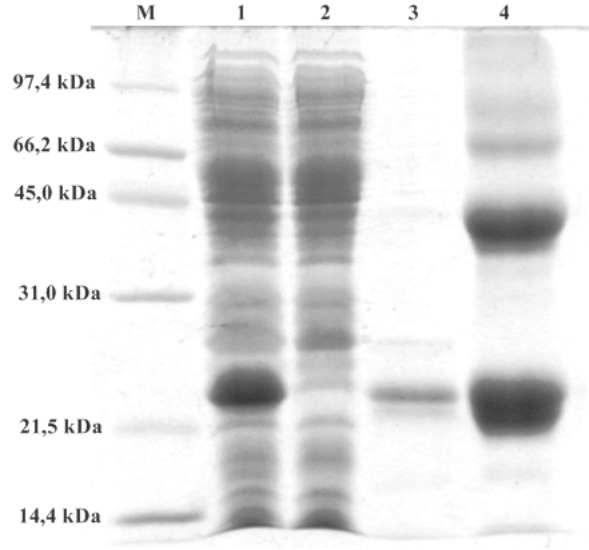
Şekil 12. Nikel afinite testi SDS-PAGE görüntüleri. Solda AgaGb, Sağda AmeGb gösterilmektedir. M. Marker, 1. Hücre özütü, 2. 500 mM imidazol içeren tamponu, 250 mM imidazol içeren tamponu, 100 mM imidazol içeren tamponu, 20 mM imidazol içeren tamponu belirtmektedir

Yukarıdaki SDS-PAGE görüntülerine göre her iki globin için en uygun bağlanma/yıkama tamponu konsantrasyonu 20mM imidazol, ayırma tamponu konsantrasyonu ise 250mM imidazol olarak belirlendi.

### 3.2.1.1. AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys'in Nikel Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması

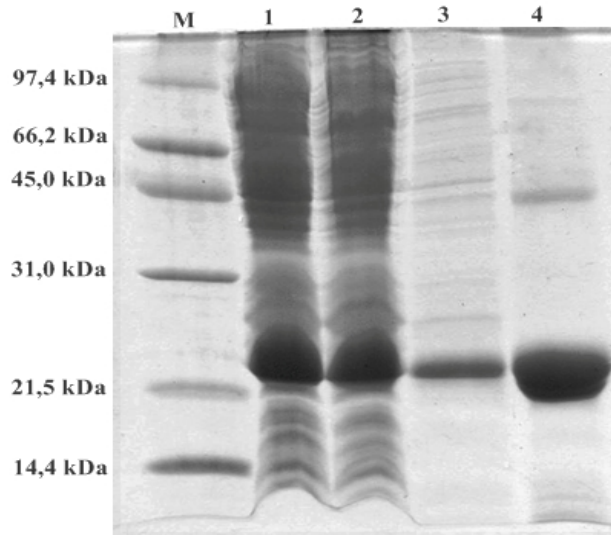
Bölüm 2.3.1'de açıklandığı gibi AmeGb optimize edilen şartlarda (Bölüm 3.2.1) kolona yüklendi. Alınan eluatlar SDS-PAGE'de koşturularak elde edilen elektroforez görüntüleri irdelendi (Şekil 13).

Hücre özütünde AmeGb'nin ekspresyon bandı belirgin olarak gözlemlendi. AmeGb içeren eluatta ise ~20 kDa molekül ağırlığında monomer AmeGb olduğu tahmin edilen band gözlemlendi. ~40 kDa molekül ağırlığında gözlenen ikinci band ise moleküldeki sistein biriminin sebep olduğu dimerler olarak tahmin edildi. 60 ve daha yüksek molekül ağırlığını gösteren bandlar ise içerdiği safsızlık olarak düşünüldü. SDS-PAGE elektroforez sonucuna dayanarak protein eluatının hala safsızlık içerdiği için jel filtrasyon tekniği kullanılarak daha ileri derece saflık elde edilmesine karar verildi.



Şekil 13. AmeGb Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü. M: marker, 1: hücre özütünü, 2: bağlanmayan proteinleri, 3: yıkama eluatı, 4: AmeGb içeren eluatı göstermektedir.

AmeGb $\Delta$ Cys ise AmeGb ile aynı şartlar altında bölüm 2.3.1’de açıklandığı gibi nikel afinite kromatografisi uygulandı. Alınan eluatlar SDS-PAGE’de koşturularak elde edilen görüntüler irdelendi (Şekil 14).

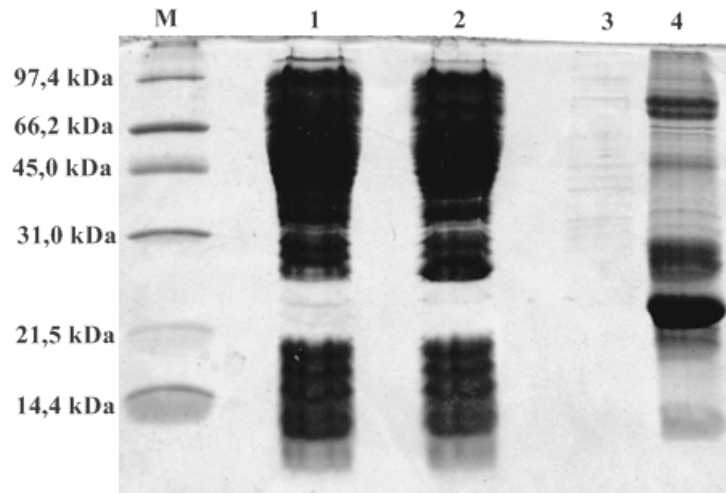


Şekil 14. AmeGb $\Delta$ Cys’in Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü. M: marker, 1: hücre özütü, 2: bağlanmayan proteinler, 3: yıkama, 4: AmeGb $\Delta$ Cys içeren eluatı göstermektedir.

SDS-PAGE jel elektroforezi sonucuna göre, AmeGb eluatında 20 kDa molekül ağırlığında AmeGb olduğu düşünölen bandın yanı sıra safsızlık olduğu düşünölen soluk bir band da gözlemlendi. Bu sonuçlara göre kinetik çalışmalara uygun derecede saflık elde edilöğine karar verildi ve protein eluatı amikonda konsantre hale getirilip, -20°C’de saklandı.

### 3.2.1.2. AgaGb’nin Nikel Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması

Bölüm 2.3.1’de açıklandığı gibi AgaGb optimize edilen şartlarda (Bölüm 3.2.1) kolona yüklendi. Alınan eluatlar SDS-PAGE’de koşturularak elde edilen elektroforez görüntöleri irdelendi (Şekil 15). Hücre özütünde ekspresyon bandı silik olarak gözlemlendi. AgaGb içeren eluatta ise yaklaşık ~20 kDa molekül ağırlığında AgaGb olduğu düşünölen band ve bu bandın yanı sıra bir çok safsızlık olduğu düşünölen bant gözlemlendi. Saflaştırma işleminden yüksek verim alınamamış olsa da elde edilen AgaGb protein çözeltilisinin UV-vis spektrum analizi ve molekül ağırlığı tayini için yeterli olduğuna karar verildi.

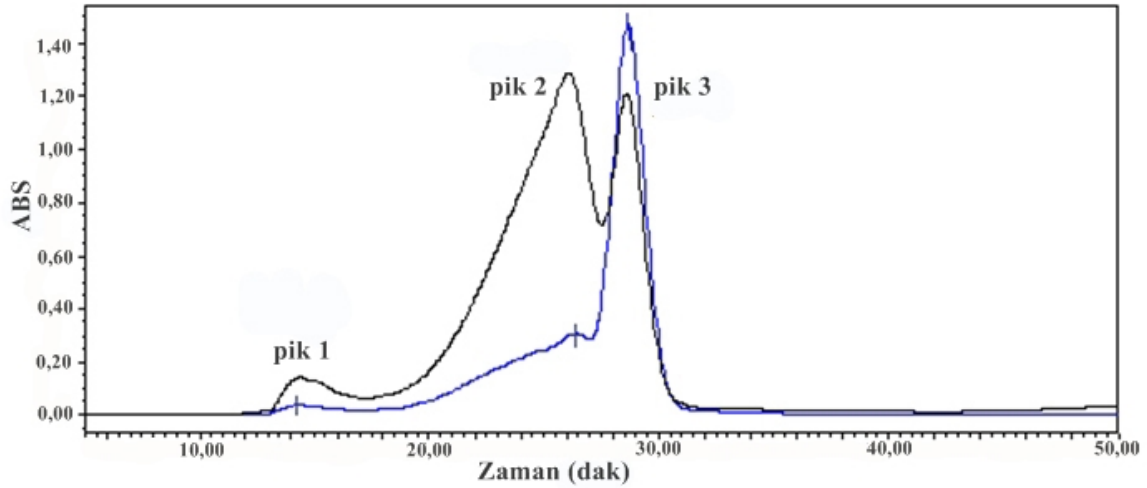


Şekil 15. AgaGb’in Nikel afinite kromatografisi eluatlarının SDS-PAGE görüntüsü. M: marker, 1: hücre özütü, 2: bağlanmayan proteinler, 3: yıkama, 4: protein eluatını göstermektedir.

### 3.2.2. Jel Filtrasyon

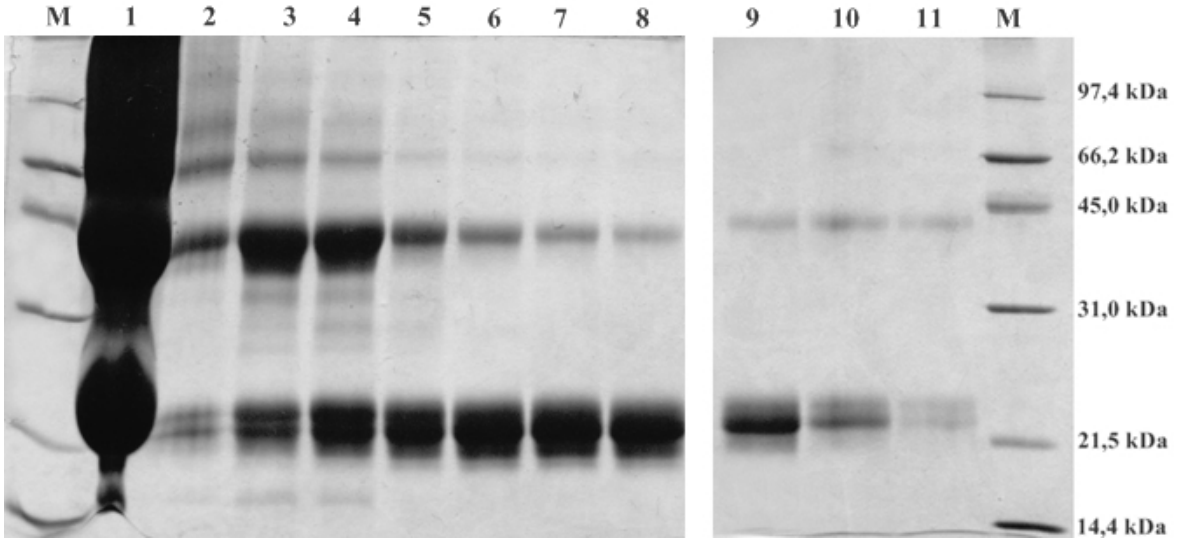
#### 3.2.2.1. AmeGb'in Jel Filtrasyon Kromatografisiyle Saflaştırılması

Nikel afinite kromatografisinden elde edilen ve konsantre hale getirilen AmeGb çözeltisi öncelikle, eluat bileşimi hakkında ön bilgi edinmek amacıyla Superose 12 HR 10/3 jel filtrasyon kolonunda yürütüldü. Kolondan çıkan eluatlar UV detektörden geçirilerek Şekil 16'da gösterilen zaman absorbans grafiği elde edildi. Bu grafikte siyah hat proteinlerin varlığını mavi hat ise globinlerin varlığını göstermektedir. Grafik incelendiğinde pik 3'te globinlerden kaynaklanan pikin maksimum olduğu, pik 2'de ise globin piki yanında safsızlık oluşturan proteinlerin olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda saflaştırılmak istenen AmeGb proteini pik 3'te rahatlıkla gözlemlendiğinden ve diğer piklerden farklı bir zamanda kolondan elue edildiğinden ilave bir jel filtrasyon uygulamasıyla diğer proteinlerden ayrılacağı düşünüldü ve bunun için superdex G75 jel filtrasyon kolonu kullanıldı.



Şekil 16. AmeGb Superose® 12 HR 10/3 kolon kromatogramı. 280 nm (siyah hat) toplam protein miktarını ve 418nm (mavi hat) globin miktarını belirlemede kullanıldı.

Numunenin Superdex® G75 jel filtrasyon kolonuna yüklenmesiyle elde edilen eluatlar SDS-PAGE jel elektroforezinde koşuturuldu (Şekil 17). SDS-PAGE görüntüsünde, safsızlığın büyük oranda giderildiği görünen 6-8 numaralı tüpler birleştirilerek amikon ile konsantre hale getirildi.



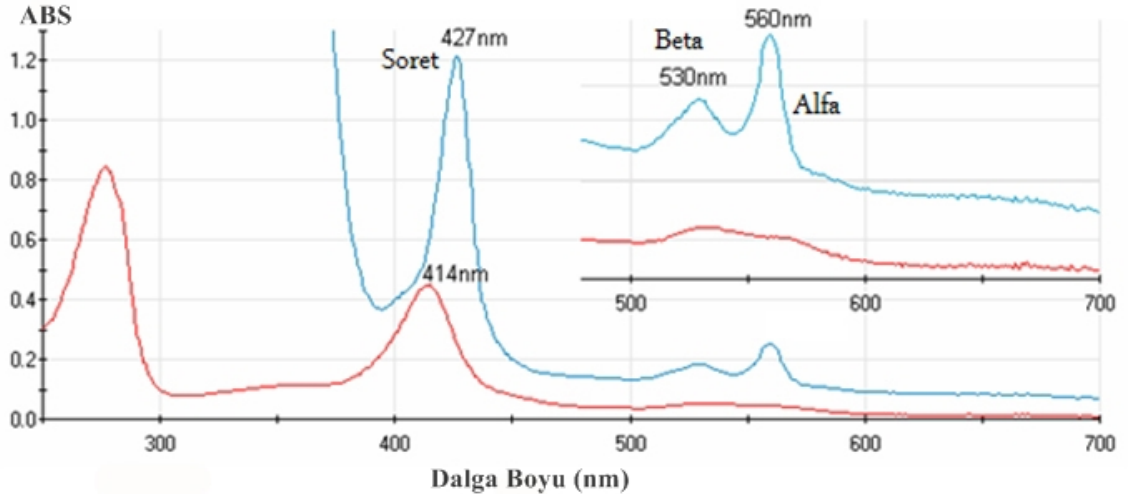
Şekil 17. AmeGb'nin Superdex® G75 kolon jel filtrasyonu fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü. M, marker, 1, Nikel afinite kromatografisinden sonra konsantre edilmiş numune, 2-11, jel kromatografisinden elde edilen eluatlar

### 3.3. Kalite Analizleri

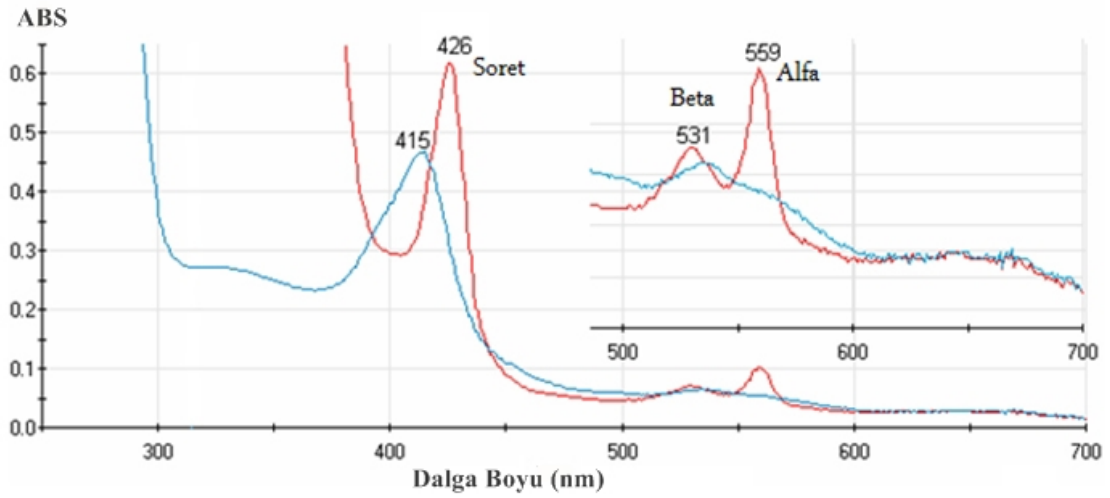
#### 3.3.1. UV-VIS Spektrum Analizleri

AmeGb, AmeGb $\Delta$ Cys, AgeGb ve AgaGb $\Delta$ Cys yaban ve mutant proteinlerinin 250-700 nm çözelti ortamındaki formlarının aralığında UV-vis spektrumları incelendi. Doygun Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> çözeltisi eklenerek de çözelti ortamındaki yükseltgenler indirgenip söz konusu proteinlerin deoksi formlarının UV-vis spektrumları kaydedildi. Globinlerin, sahip oldukları hem grubundan dolayı sergiledikleri soiret bandı ve koordinasyon durumuna göre değişkenlik gösteren alfa, beta bantları incelendi.

AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys için çözelti ortamında, 414 nm'de soiret, 575 nm'de alfa ve 540 nm'de beta bandı gözlemlenirken bu iki proteinin deoksi formunda 425 nm'de soiret, 560 nm'de alfa ve 530 nm'de beta bantları gözlemlendi (Şekil 18, 19). Globinlerin distal histidin kalıntısının katkısıyla oluşan hegzamer formuna spesifik olan alfa bandının beta bandından şiddetli olma durumu, AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys proteinleri için gözlemlendi.



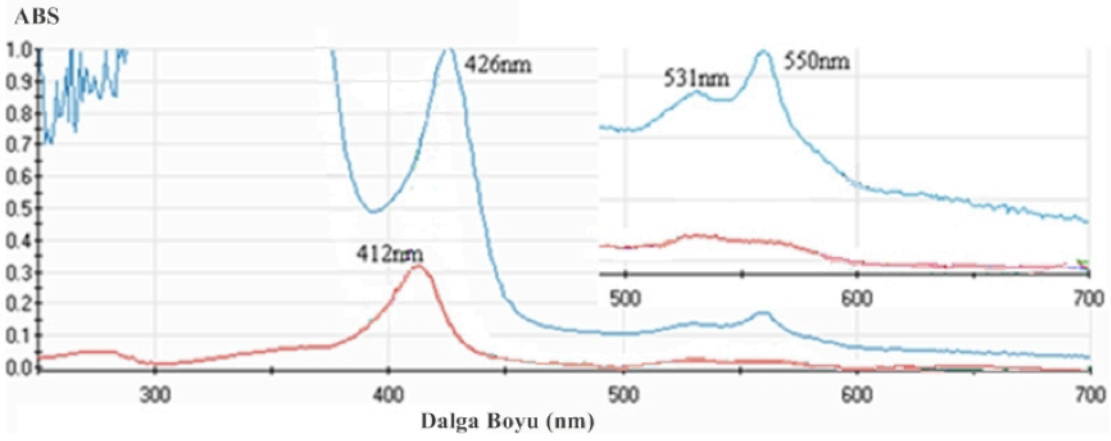
Şekil 18. AmeGb'nin UV-vis spektrumu. Kırmızı hat doğal formunun, mavi hat ise  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  eklenerek ortamdaki yükseltgenlerin indirgenmesiyle elde edilen deoksi formunu göstermektedir



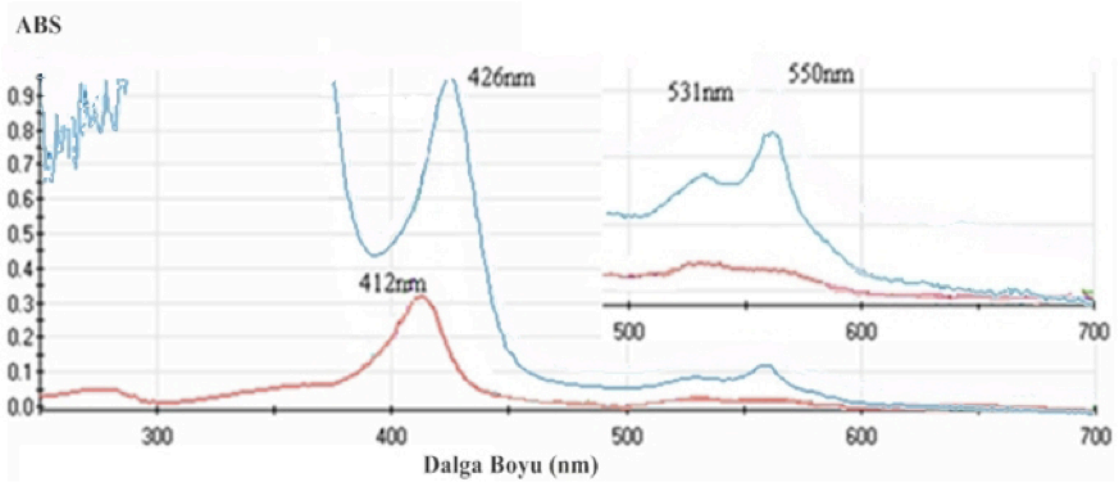
Şekil 19. AmeGbΔCys'nin UV-vis spektrumu. Mavi hat doğal formunun, kırmızı hat ise  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  eklenerek ortamdaki yükseltgenler indirgenmesiyle elde edilen deoksi formunun spektrumu

AgaGb ve AgaGbΔCys ise, çözeltideki formunda 412 nm'de soret band ve 500-600 nm aralığında yaygın bir pik; deoksi formunda ise, soret bandı 426nm'ye kayarken 550 nm'de alfa ve 531 nm'de beta bandları gözlemlenmiştir (Şekil 20). Globinlerin distal histidin kalıntısının katkısıyla oluşan hegzam formuna spesifik olan alfa bandının beta bandından şiddetli olma durumu, AgaGb ve AgaGbΔCys proteinleri için de gözlemlendi.





Şekil 20. AgaGb'nin UV-vis spektrumu. Kırmızı hat doğal formunun, yeşil hat ise  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  eklenerek ortamdaki yükseltgenler indirgenmesiyle elde edilen deoksi formunun spektrumu



Şekil 21. AgaGbΔCys'in UV-vis spektrumu. Kırmızı hat doğal formunun, yeşil hat ise  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  eklenerek ortamdaki yükseltgenler indirgenmesiyle elde edilen deoksi formunun spektrumu

Saflaştırma işlemleri sonucunda elde edilen AgaGb, AmeGb, AmeGbΔCys ve AgaGbΔCys proteinlerini içeren çözeltilerdeki globin konsantrasyonu soret bandının maksimum olduğu dalga boyundaki absorbanı kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Konsantrasyonlar ve elde edilen protein miktarları Tablo 15'de gösterilmiştir.

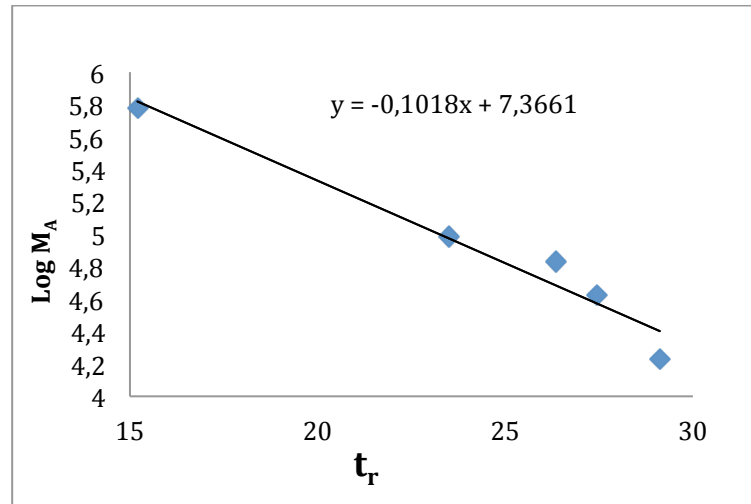
$$\text{Konsantrasyon (mg/mL)} = \text{O.D}_{\text{soret band}} \times \text{Seyreltme oranı} \times M_A/13000 \text{ (Formül 2)}$$

Tablo 15. Protein eluatlarındaki globin konsantrasyonu.

	Dalga boyu (nm)	Absorbans (A)	Seyreltme oranı	Ma (kDa)	Konsantrasyon (mg/mL)
AmeGb	427	1,22	100	19,5	0,18
AgaGb	426	1,1	100	18,5	0,16
AmeGbΔCys	426	0,63	500	19,5	0,47
AgaGbΔCys	426	0,91	500	18,5	0,65

### 3.3.2. Analitik Jel Filtrasyonu ile Molekül Ağırlığı Tayini

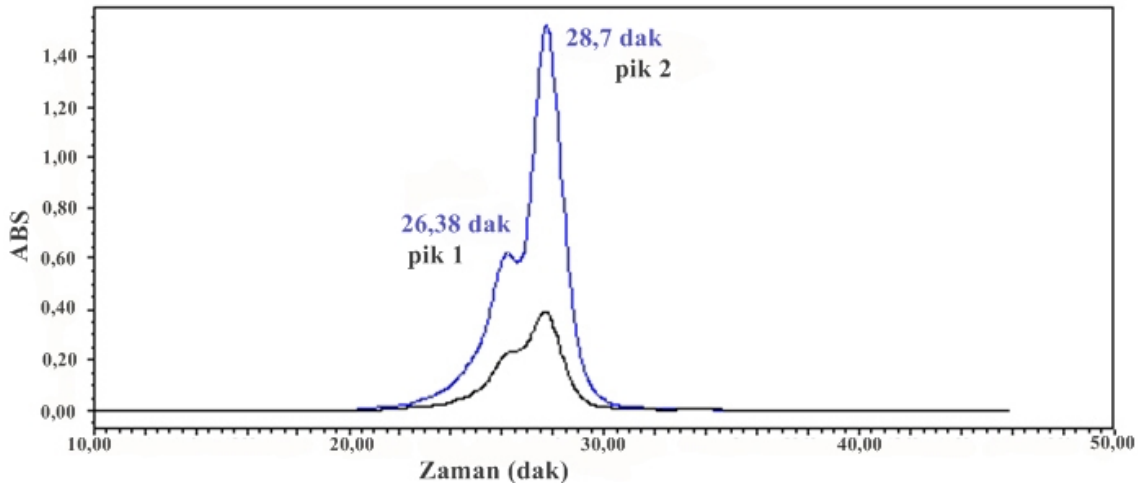
Bölüm 2.4.2’de açıklandığı gibi, ilk olarak standart olarak kullanılan protein çözeltileri superose 12 HR 10/30 jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Standart proteinlerin jel filtrasyon kolonunu terketme sürelerinin elde edilmesiyle molekül ağırlığının logaritması (Log Ma)-alınma süresi ( $t_r$ ) grafiği çizildi (Şekil 22).

Şekil 22. Log Ma-  $t_r$  kalibrasyon eğrisi

Saflaştırma işlemlerinin ardından konsantre hale getirilen protein çözeltileri molekül ağırlığı tayini için aynı kolona yüklendi. Kolona bağlı dedektör aracılığıyla 280 ve 418 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yapılarak standart proteinlerin kolonu terketme süreleri

belirlendi. Terketme sürelerine göre kalibrasyon grafiğinden yararlanarak deneysel molekül ağırlığı hesaplandı ve teorik molekül ağırlığına oranı incelendi.

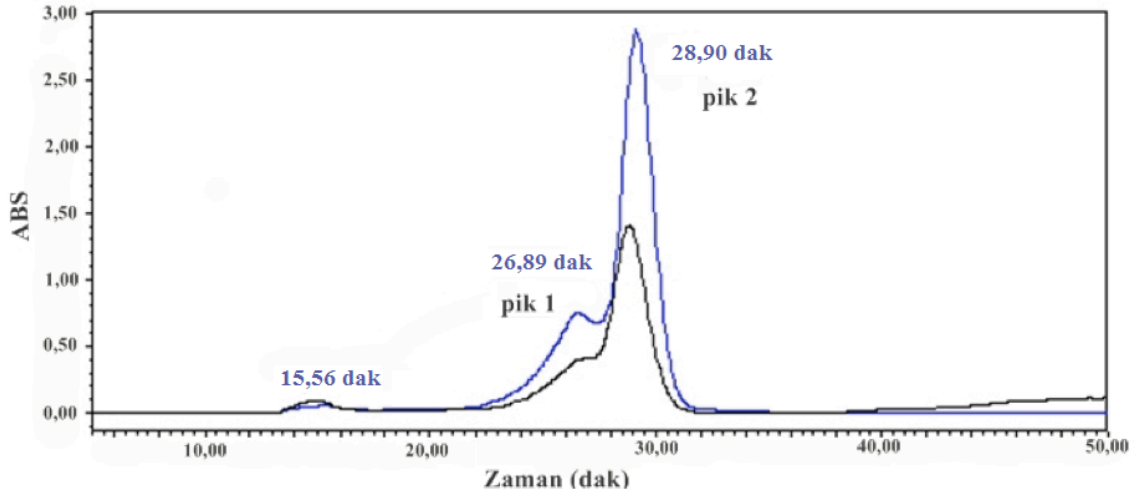
Tablo 16-19 saflaştırılan yaban ve mutant proteinlerin molekül ağırlıklarını ve kolonu terketme sürelerine bağlı olarak elde edilen eluatların bazı yapısal özelliklerini göstermektedir. Şekil 23-26 ve Tablo 16-19 incelendiğinde AmeGb ve mutantının ayrıca AgaGb ve mutantının benzer özellikler gösterdikleri gözlenmiştir. Şekil 23, 24'te 26. ve 28. dakikalarda elde edilen 1. ve 2. pikin kalibrasyon eğrisine göre hesaplanan ortalama molekül ağırlığının, teorik ağırlığının yaklaşık 2 katı ve 1 katı olduğu gözlemlendi (Tablo 16-17). Buna göre 2. pikin globin proteinin monomerik yapısını 1. pik ise dimerik yapısını temsil etmektedir.



Şekil 23. AmeGb'nin analitik jel kromatogramı (Mavi hat 418 nm ve siyah hat 280 nm dalga boyu)

Tablo 16. AmeGb için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.

	Rt (dak)	$Y = \log M_A$	$M_A$ (Da)	$M_A / 19.500$ Da	% pik
pik 1	26,383	4,84	47897	2,45	33
pik 2	28,622	4,35	28352	1,5	65

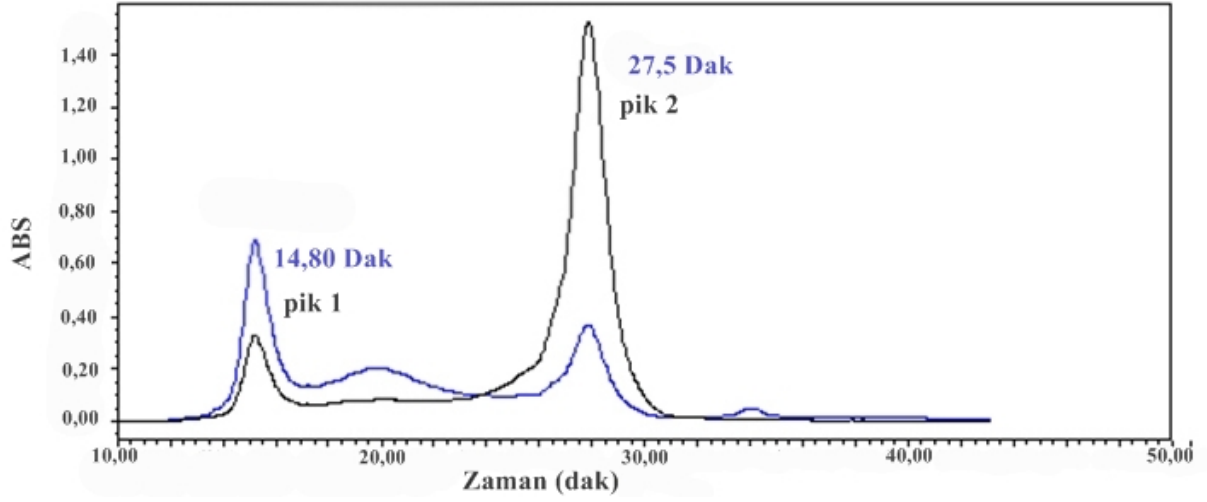


Şekil 24. AmeGbΔCys'nin analitik jel kromatogramı (Mavi hat 418 nm ve siyah hat 280 nm dalga boyu)

Tablo 17. AmeGbΔCys için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.

	$t_r$ (dak)	$Y = \log M_A$	$M_A$ (Da)	$M_a / 19.500Da$	% pik
pik 2	26,87	4,84	42730	2,19	27
pik 3	28,88	4,29	26675	0,93	71

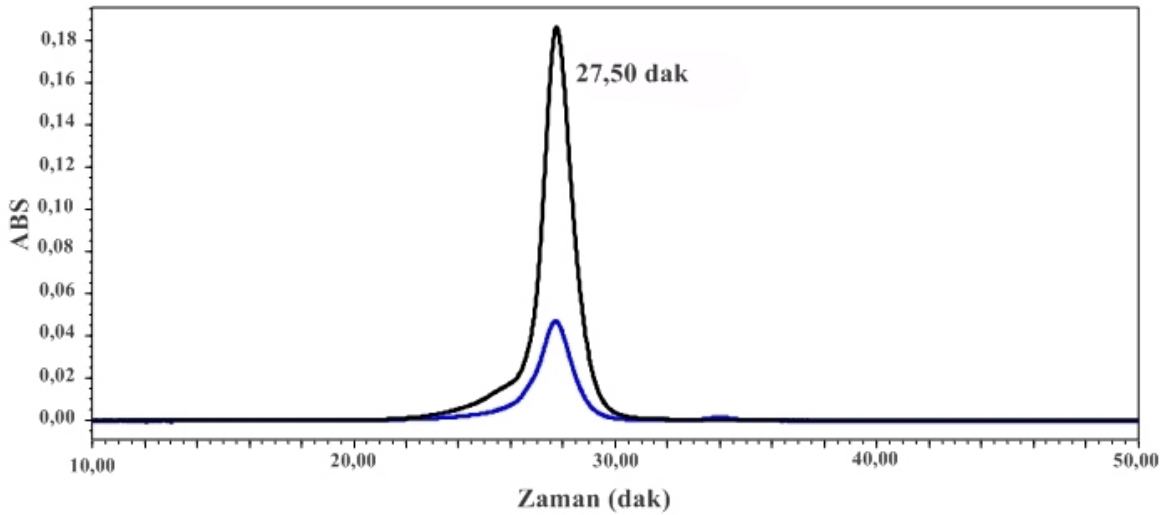
AgaGb proteinin kromatogramına göre gözlemlenen 1. pik bilinen molekül ağırlığına kıyasla çok büyük olduğundan ihmal edildi. 2. pik ise deneysel molekül ağırlığına göre dimer olarak tahmin edildi (Şekil 23, Tablo 18). AgaGbΔCys kromatogramında ise ~28. dak'da elde edilen pik AgaGb için olduğu gibi dimer olarak tahmin edildi (Şekil 24, Tablo 19).



Şekil 25. AgaGb'nin analitik jel kromatogramı (Mavi hat 280 nm ve siyah hat 418 nm dalga boyu)

Tablo 18. AgaGb için gecikme süreleri, deneysel molekül ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.

	Rt (dak)	$Y = \log M_A$	$M_A$ (Da)	$M_A / 18500\text{Da}$	% pik
pik 1	14,749	7,40	-	-	22,0
pik 2	27,485	4,60	36863	1.99	40,0



Şekil 26. AgaGbΔCys'nin analitik jel kromatogramı (Mavi hat 280 nm ve siyah hat 418 nm dalga boyu)

Tablo 18. AgaGb için gecikme süreleri, deneysel moleköl ağırlıkları ve tahmin edilen alt birim sayıları.

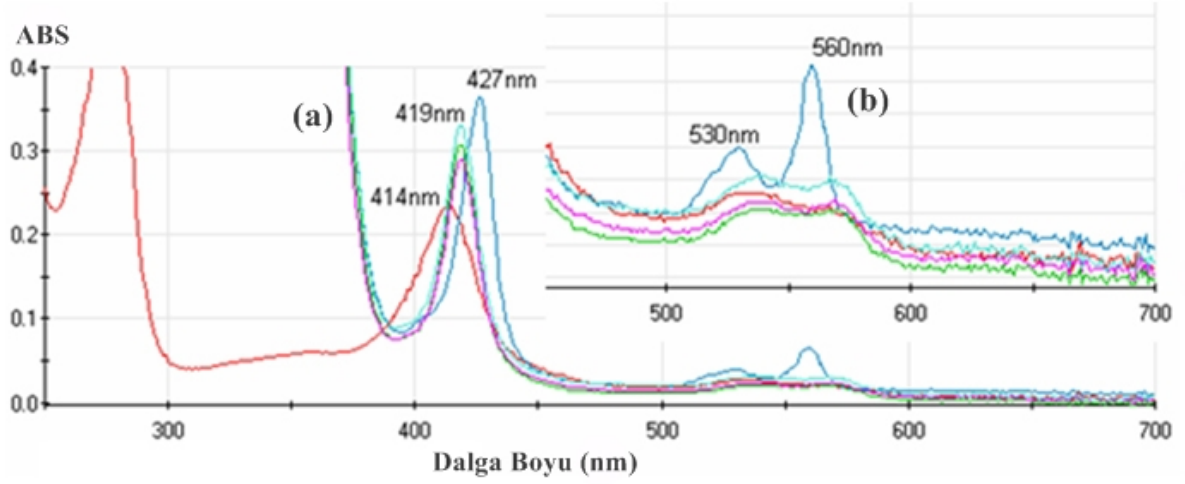
	Rt (dak)	$Y = \log M_A$	$M_A$ (Da)	$M_A / 18.000\text{Da}$	% pik
pik 2	27,485	4,60	36863	1.99	100

### 3.4. Kinetik Ölçümler

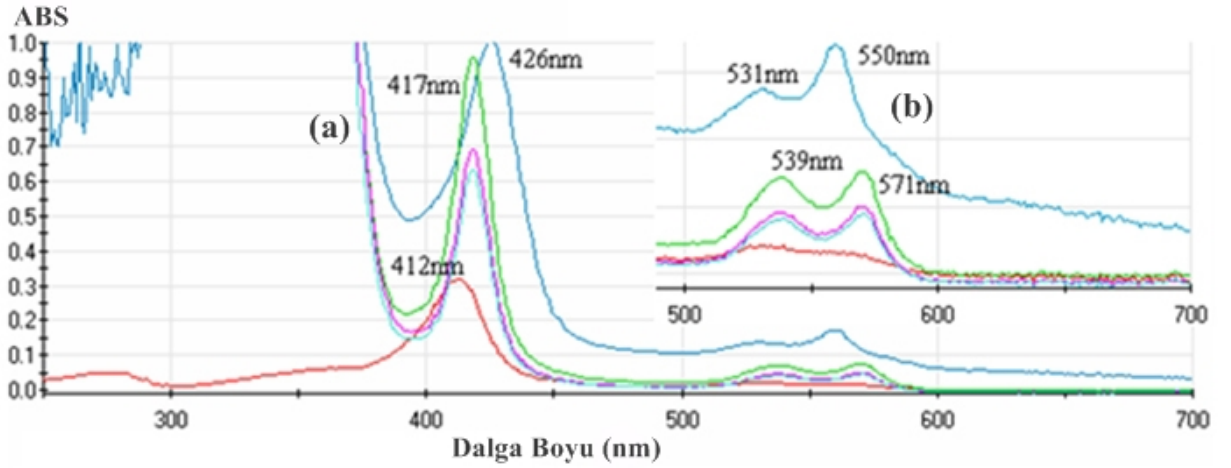
#### 3.4.1. Flaş Fotoliz Ölçümleri

UV-vis spektrumları incelenen AmeGb ve AgaGb proteinleri  $\Delta\text{Cys}$  mutantlarıyla eşdeğer spektrum sergilediğinden sistein kalıntısının oluşturabileceği muhtemel agrigasyonu önlemek için kinetik çalışmalarda her iki globininde  $\Delta\text{Cys}$  mutantları kullanıldı.

Kinetik ölçümler için, farklı konsantrasyonlarda CO içeren çözeltilere nihai konsantrasyonları aynı olacak şekilde AmeGb $\Delta\text{Cys}$  ve AgaGb $\Delta\text{Cys}$  proteinlerini ilave edilerek oluşturulan çözeltilerin UV-vis spektrum analizleri yapıldı. (Şekil 27, 28). Böylelikle bu proteinleri çözelti ortamındaki formlarının, deoksi formların ve farklı CO konsantrasyonlarındaki CO formlarının UV-vis spektrumlarında globinlere karakteristik olan alfa, beta ve soret bantlarını ve CO/His bağlamasına göre gösterdiği değişim gözlemlendi. Buna göre Şekil 25'te AmeGb $\Delta\text{Cys}$  proteinin 414 nm'de çözelti ortamındaki formu, 419 nm'de CO bağlamış formu ve 427 nm'de ise His bağlamış formu görülmektedir. Şekil 26'da ise AgeGb $\Delta\text{Cys}$  proteini için 412, 417 ve 426 nm'de sırasıyla yukarıdaki formlar gözlenmektedir.

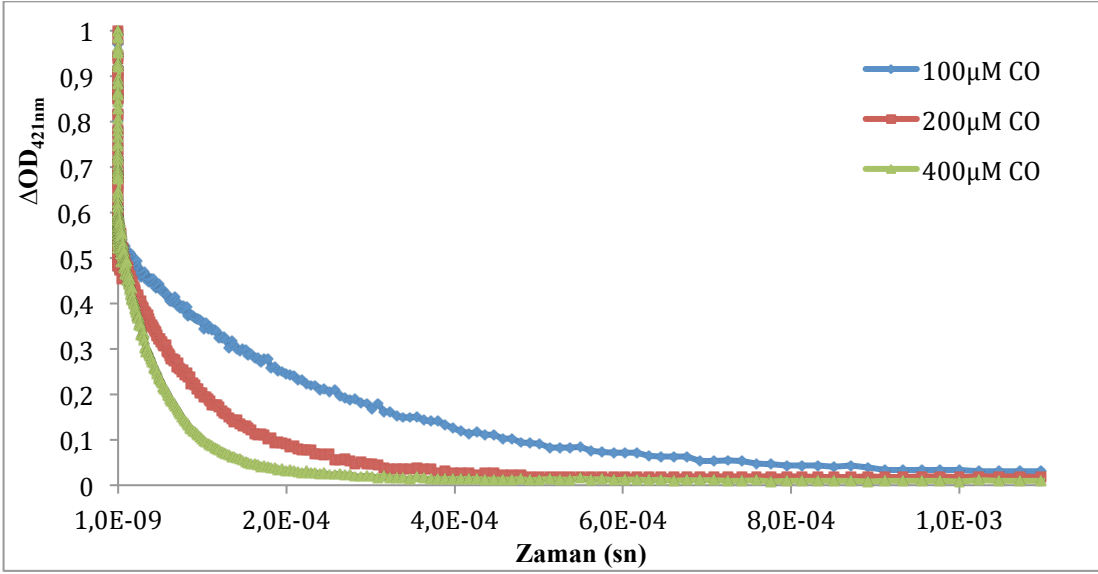


Şekil 27. Ame $\Delta$ Cys'in doğal, CO ve deoksi formlarının UV-vis spectrumu. Kırmızı hat proteinin çözültideki formu, mavi hat deoksi formu; yeşil hat 100 $\mu$ M CO, pembe hat 200 $\mu$ M CO, açık mavi hat ise 400 $\mu$ M CO içeren çözültileri belirtmektedir. (a) Soret bantlarındaki değişim, (b) Alfa ve beta bantlarındaki değişim

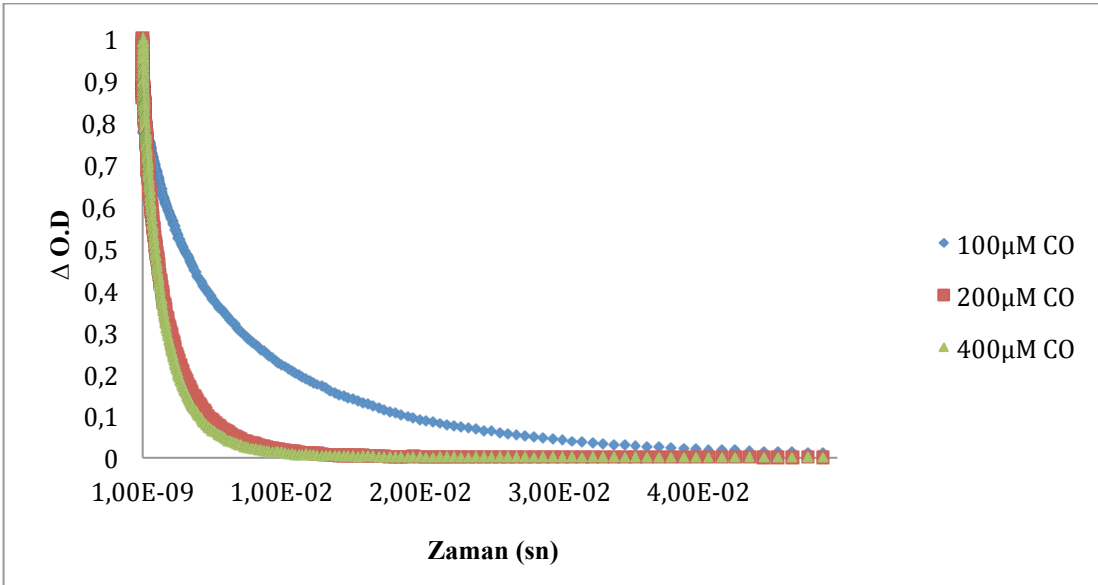


Şekil 28. Aga $\Delta$ Cys'in doğal, CO ve deoksi formlarının UV-vis spectrumu. Kırmızı hat proteinin doğal formu, mavi hat deoksi formu; yeşil hat 100 $\mu$ M CO, pembe hat 200 $\mu$ M CO, açık mavi hat ise 400 $\mu$ M CO içeren çözültileri belirtmektedir. (a) Soret bantlarındaki değişim, (b) Alfa ve beta bantlarındaki değişim

Yukarıda CO bağlaması sonrasında spektral özellikleri incelenen her iki mutant protein çözültileri flaşlanarak numunede gerçekleşen optik yoğunluk değişimi 2000ns-40 ms aralığında ölçülerek elde edilen değerler MAT-LAB programına yüklenerek zamana bağlı optik değişim ( $t/\Delta O.D$ ) grafiğinden  $k_{Deneyse}$  değerleri hesaplandı.



Şekil 29. AmeGbΔCys t/ΔO.D. grafiği. Mavi hat 100μM, kırmızı hat 200μM ve yeşil hat 400μM CO konsantrasyonlarını göstermektedir.

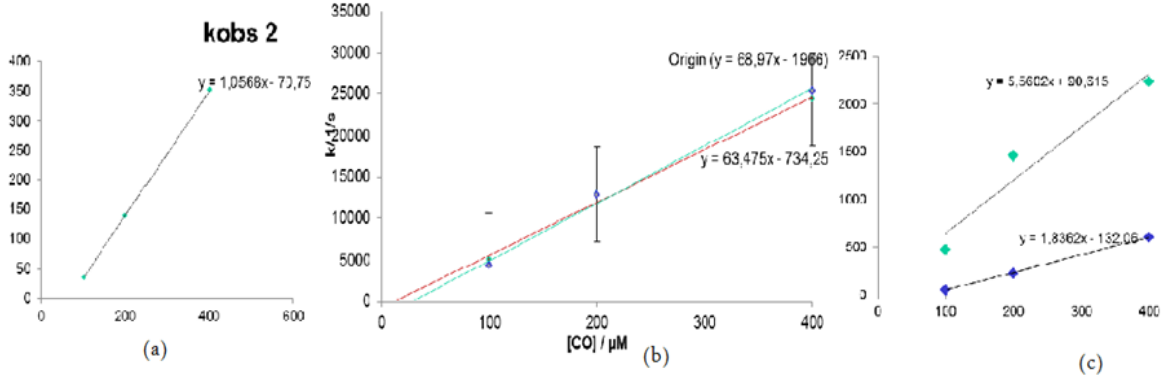


Şekil 30. AgaGbΔCys t/ΔO.D. grafiği. Mavi hat 100μM, kırmızı hat 200μM ve yeşil hat 400μM CO konsantrasyonlarını göstermektedir.

Distal histidin kalıntısının 6. koordinasyona bağlanmadığı globinlerde; eksternal ligandın bağlanma reaksiyonu yalancı 1. dereceden reaksiyon gibi davranır ve tek k değeri sergiler. Fakat distal histidinin bağlandığı durumlarda reaksiyonun en az iki basamak üzerinden gerçekleşmesi beklenir. Çalışılan her iki mutant proteinde de distal histidin

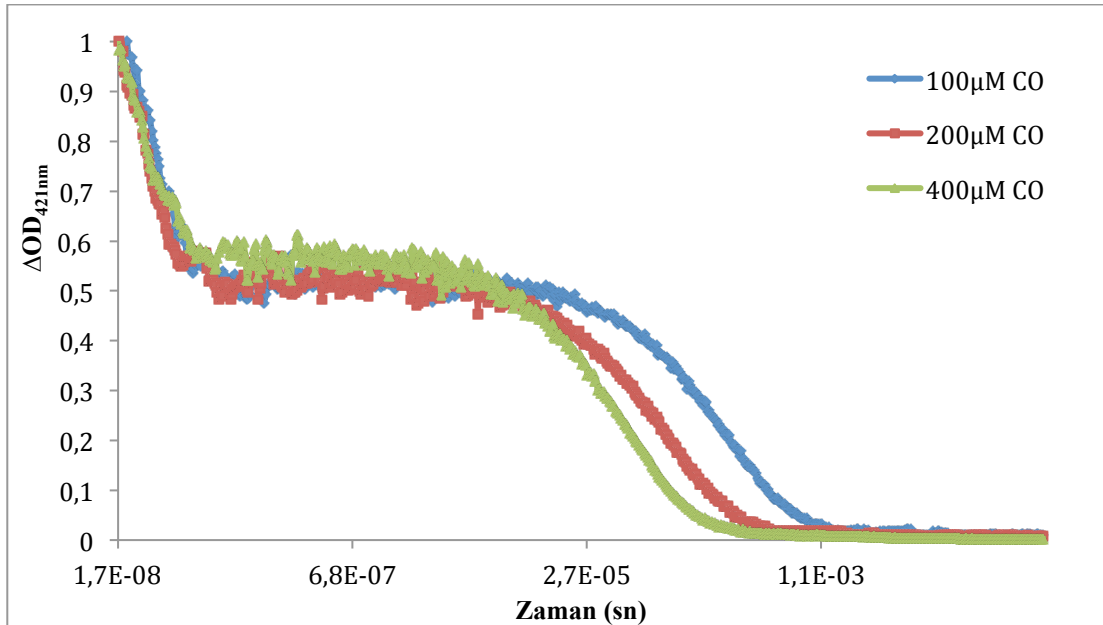


globinin 6. koordinasyonunu oluşturması söz konusu olduğu için iki  $k_{\text{deneyssel}}$  değeri hesaplandı. Hesaplanan  $k_{\text{deneyssel}}$  değerleri ile  $k_{\text{deneyssel}} / \text{konsantrasyon}$  grafikleri çizilerek grafiğin eğiminden  $k_{\text{on}}$  değerleri elde edildi (Şekil 29).

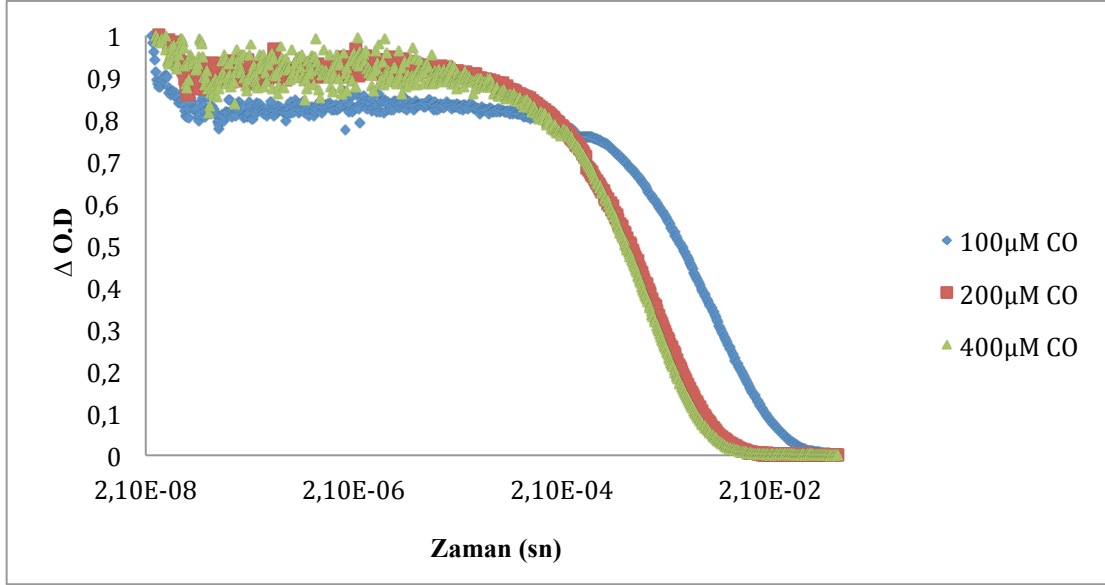


Şekil 31.  $k_{\text{obs}}$ -CO konsantrasyon eğrileri. (a)  $k_{\text{obsH}_2}$ , AmeGb $\Delta$ Cys (b)  $k_{\text{obsCO}}$ , AmeGb $\Delta$ Cys (c) AgaGb $\Delta$ Cys için  $k_{\text{obsH}}$  ve  $k_{\text{obs}}$  değerleri.

Nanosaniye, mikrosaniye ve mili saniyeden oluşan zaman aralıklarını eşit parametrelerde görüntüleyip, grafiği daha kolay irdelemek için;  $t/\Delta O.D$  grafiğinde zamanın logaritması alınarak  $\text{Log}t/\Delta O.D$  grafikleri elde edildi. Elde edilen değerler ve literatürde başka çalışmalardan elde edilmiş değerler Tablo 20’de gösterilmiştir.



Şekil 32. AmeGb $\Delta$ Cys Log  $t/\Delta O.D.$  grafiği



Şekil 33. AgeGbΔCys Log t/ΔO.D. grafiği

Tablo 20. k Değerlerinin karşılaştırılması.

	$k_{onCO} (s^{-1} \cdot \mu M^{-1})$	$k_{offH} (s^{-1})$	$F_{cemnet}$	Ref.
AmeGbΔCys	68,97	1,05	0,47	
AgaGbΔCys	5,56	1,2	0,1	
Mb (at)	0,5	-	~0	[85]
Ngb (insan)	50	0,6	0,65	[86]
Cygb (insan)	0,6	1,5	-	[86]
<i>Drosophila</i>	10	30/40	0,9	[87]
<i>Arabidopsis</i>	50	34/43	-	[87]

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, *A. gambiae* ve *A. mellifera*'dan elde edilen globin kodlayan gen pET-23a(+) vektörüne klonlanmış, BL21(DE3)pLysS *E. coli* hücresinde ekspres edilmiş, ekspres edilen protein hücre özütünden protein kinetik çalışmalar için uygun derecede saflaştırılmış ve UV-vis spektrum analizi, analitik jel filtrasyonu ile molekül ağırlığı tayini, karbonmonoksit bağlama özelliği araştırmaları flaş fotoliz yöntemiyle yapılmıştır.

T7 RNA polimeraz promotörü ve poli-histidin sıralaması içeren pET-23a(+) vektörüne klonlanmış (Şekil 10) AgaGb, AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys genleri Gent Üniversitesine (Belçika) gönderilerek sıra analizi yaptırılmış, elde edilen gen sıralamaları ExPASy programı kullanılarak doğru gen dizilişini içeren vektör belirlenmiştir [67]. Doğru gen sıralamasını içeren rekombinant vektör *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresine aktararak genin bu hücrede ekspresyonu sağlanmıştır. Ekspresyon hücreleri toplanıp hücre özütü hazırlanmış ve hedef proteinler nikel afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılma işlemi sonrasında elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE elektroforezinde koşturularak analiz edilmiştir.

AmeGb $\Delta$ Cys için etkin saflaştırma işlemi gerçekleşirken (Şekil 13) AmeGb'nin sistein kalıntısından dolayı oluştuğu düşünülen dimerler ve safsızlıklar gözlemlendi (Şekil 12). Nikel afinite kromatografisinden elde edilen AmeGb eluatı daha yüksek saflık elde edebilmek için Superdex G75 kolonuna yüklendi ve kolondan elde edilen eluatlar Superose 12 kolonunda koşturularak elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldı. Jel filtrasyon sonucu elde edilen kromatogramda 26. Dakikada gelen pikteki protein safsızlığın giderildiği görüldü (Şekil 15, 22).

AgaGb'nin nikel afinite kromatografisinden elde edilen eluatlar SDS-PAGE'de incelendiğinde ise, hücre özütünde indüklenmiş proteinin çok belirsiz olduğu ve elde edilen protein eluatında safsızlık olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 14). Safsızlığa sistein kalıntılarının moleküller arası disülfür köprüleri oluşturmasının yanı sıra nikel afinite kolonuna bağlanan başka moleküllerin de yol açtığı düşünülmüştür. Elde edilen Superose 12 kromatogramında görülen piklerin globin aktivitesi göstermesi bunu destekler niteliktedir (Şekil 24).

Elde edilen protein eluatları bir miktar safsızlık içerse de yapılan saflaştırma işlemleri, proteinlerin yapısının ön karakterizasyonu ve kinetik analizleri için yeterli bulunmuştur.

Globinlerin sahip olduğu hem grubundan dolayı görünür bölge spektrumunda koordinasyon durumuna göre karakteristik davranışlar sergilediği literatürde kanıtlanmıştır. UV-vis spektrumları incelendiğinde bu moleküllerin alfa-beta ve soret bandı olarak isimlendirilen 3 karakteristik pik sergilediği görülür. Soret bandı hem-b prostetik grubu serbest haldeyken 400 nm civarında gözlenirken apoprotein zinciriyle kompleks oluşturduğunda bu pik 413-430 nm aralığına kayar. Soret bandı hem-b grubuna bağlı liganda göre değişim gösterdiği için kinetik çalışmalarda bu özellikten faydalanılır. Globinlerin UV-vis spektrumundaki diğer bir bölge ise 500-600 nm aralığıdır. Globin molekülündeki hem-b, grubu penta formunda, 500-600 nm aralığında geniş ve belirgin olmayan bir pik sergiler. Hem-b grubunun hegz formunda ise alfa ve beta bandı olarak adlandırılan iki pik gözlenir. Altıncı koordinasyon bölgesine distal histidin yerleştiği durumlarda karakteristik olarak alfa bandının betadan büyük olduğu görülür. Altıncı koordinasyon bölgesine harici bir ligand bağlanması durumunda ise beta bandının büyük olduğu veya iki bandın birbirine denk olduğu görülür [88].

AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys proteinin doğal formunda 414 nm'de soret, 575 nm'de alfa ve 540nm'de beta bandı gözlenirken deoksi formunda 425 nm'de soret, 560 nm'de alfa ve 530nm'de beta bantları gözlemlendi. Verilere göre deoksi formunda gözlemlenen alfa piki beta pikinden büyük olduğu için AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys proteinlerinin deoksi formunda altıncı koordinasyon bölgesine distal histidin kalıntısının yerleştiği belirlendi. Çözültideki formunda birbirine yakın büyüklükte alfa ve beta bandlarının gözlenmesi, bu proteinlerin oksijen formunda bulunduğunu göstermiştir (Şekil 17-18).

AgaGb doğal formunda 414 nm'de soret band ve 500-600 nm aralığında ise yaygın bir pik gözlemlendi. Deoksi formunda ise, soret bandı 427 nm'ye kayarken 560 nm'de alfa ve 530nm'de beta bantları gözlemlendi (Şekil 19). Veriler, deoksi formunda histidin kalıntısının altıncı koordinasyon bölgesine yerleştiğini, doğal formunun ise yaygın bir pik sergilediği için penta formunda veya bir miktar oksijen formuyla penta formunun dengede olduğu tahmin edilmiştir. Bu durumda proteinin oksijen bağlayıp bağlayamadığına dair kesin bir karara varılamamıştır.

AgaGb ve AmeGb'nin bu davranışları literatürle karşılaştırıldığında benzer durumlar görülmektedir. *D. melanogaster* globini harici ligandın yokluğunda, AgaGb ve AmeGb

gibi hegza formda bulunurken, oksijence fakir ortamda yaşayan böcek globinleri (*Chironomids*, *G. intestinalis*) ise farklı olarak penta formda bulunmaktadır [89-91]. Nonsimbiyotik bitki globinleri, Ngb ve Cygb'de gözlenen hegza formun yapıya ısıl ve asit kararlılığını arttırdığını, bununda globinin hücre içi koşullara adapte olmasını sağladığı düşünülmüştür [92, 93]. İçerdiği sistein kalıntısının, Ngb için önerildiği gibi, hücre içinde bulunduğu yüksektgenme basamağına bağlı olarak ligand bağlama affinitesinin belirlenmesinde etkisi olabileceği düşünülmektedir [94].

Jel filtrasyon kromatografisinin analitik uygulaması sonucu proteinlerin deneysel molekül ağırlığı hesaplanmış ve teorik molekül ağırlığına oranından kuaterner yapısına dair tahminlerde bulunulmuştur.

Elde edilen sonuçlar neticesinde, AmeGb ve AmeGb $\Delta$ Cys proteinlerinin çözelti içerisinde monomer ve dimer yapıda olduğu tahmin edilmektedir (Tablo 16-17). AmeGb ve mutantının benzer kromatogram sergilemesinden dolayı sistein kalıntısının kuaterner yapı oluşumunda etkin olmadığını, sadece protein agregasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. Monomer ve dimer yapılarının çözelti ortamında birlikte bulunması, literatürde de başka kaynaklardan elde edilen globinlerde gözlemlendiği gibi, monomer ve dimer halinin birbiriyle denge halinde bulunduğu düşünülmüştür [95].

Şekil 24'e göre ise, AgaGb, dimer olarak tahmin edilmiş ve  $\Delta$ Cys mutanı ile benzer kromatogramı sergilediğinden sistein kalıntısının kuaterner yapı oluşumunda etkin olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 18). Bu da sistein kalıntısının serbest olduğu ve Ngb/Cygb'de görüldüğü gibi ortam pH'ına göre molekülün ligand afinitesinde etkin olabileceği fikrini doğurmaktadır [94].

Bilinen böcek globinlerinin kuaterner yapılarında monomerden hegzamere çeşitlilik gözlemlendiği kaydedilmiştir [60]. Örneğin, en az iki farklı genden sentezlenen dimerik *Gasterophilus* globini [89] ve 30'dan fazla Gb genine sahip monomerik ve homodimerik ekstrasellüler *Chironomus thummi*'nin varlığı bilinmektedir [96].

*A. gambiae* ve *A. mellifera* globinlerinin CO bağlama özelliklerinin incelenmesi ve  $k_{onCO}$  değerlerinin hesaplanması için kinetik ölçümler yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen zamana bağlı  $\Delta O.D$  değerleri MAT-Lab programı kullanılarak deneysel hız sabiti değerleri hesaplandı.

AmeGb ve AgaGb proteinlerinin hegza koordinasyona sahip olduğu bilindiğinden, harici ligandın bağlanmasının, Ngb ve Cygb'de görüldüğü gibi [29,30], en azından iki basamak üzerinden ilerlemesi gerektiği tahmin edildiği için hızlı ve yavaş basamak olarak

$k_{onCO}$  ve  $k_{offH}$  değerleri hesaplandı.  $k_{offH}$  değerleri birbirine yakın gözlenirken, AmeGb  $k_{onCO}$  değerinin büyük olmasında, aktif bölge a.a.'lerinin ve özellikle distal histidin kalıntısının reaksiyon mekanizmasında hızlandırıcı etkisinin olduğu tahmin edilmektedir. AgaGb proteinin, yukarıda bahsi geçen özelliklerinin hegzaz formu sahip hayvan globinlerinin çoğu dolaşım sistemine yakın hücrelerde bulunan Cygb'ne benzer olduğu bulundu [86].  $k_{onCO}$  değeri daha büyük olan AmeGb'nin ise Ngb'nin kavite sistemine benzer bir yapıya sahip olduğu belirlendi (Tablo 19).

$t/\Delta O.D$  grafiğini daha iyi irdeleyebilmek için zamanın logaritması alınarak  $\log t/\Delta O.D$  grafiği elde edildi (Şekil 30-31). Bu grafikte, nano saniyelerde gözlenen ani düşüş, aktif bölge kavitesinde hapsedilmiş nano saniye içinde geri bağlanabilen ligandların varlığını gösterir. Globin ve hapsedilmiş ligand ikilisi cemnet (geminate) olarak isimlendirilmektedir. Cemnet miktarı ne kadar fazla ise aktif bölge kavitesinin ligandın çözelti ortamına kaçmasını engelleyecek şekilde kapalı olduğu anlamına gelir. Grafiğin sigmoidal görünen kısmı ise reaksiyonun bimoleküler işleyen kısmını belirtmektedir [72, 73].

$\log t/\Delta O.D$  grafikleri incelendiğinde AmeGb $\Delta$ Cys proteininin ~%50, AgaGb'nin ise ~%10-20 oranında cemnete sahip olduğu görülmektedir. Verilere göre, AmeGb $\Delta$ Cys ve AgaGb $\Delta$ Cys'in, Cygb ve Ngb'de gözlenen aktif bölge kavite sistemine benzer bir sisteme sahip olduğu tahmin edilmektedir ve bu sebeple, harici ligandın bu kavite sisteminde hapsedilerek çözelti ortamına kaçmasının engellendiği düşünülmektedir. AmeGb $\Delta$ Cys, AgaGb $\Delta$ Cys ile kıyaslandığında ise, AmeGb $\Delta$ Cys'de hapsedilen ligandın miktarının daha fazla olduğu belirlenmiş ve bunun sebebi olarakta aktif bölgedeki a.a.'lerin ligandın kaviteden çıkmasını sterik olarak engellediği düşünülmüştür (Tablo 19).

Elde edilen sonuçlara göre, AgaGb ve AmeGb proteinlerin oksijen bağlayabildiği bu açıdan da literatürde belirtildiği gibi ağırlıklı olarak trake borularının çevresinde sentezlendiği, bu sebeple solunumda görevli olabileceği ve böcek solunum sisteminin bilindiğinin aksine daha karmaşık olduğu önerilmektedir. Ayrıca AgaGb ve AmeGb proteinlerinin kinetik çalışmalarla elde edilen verilerin literatürle uygunluk göstermesinden dolayı daha önce *D. melanogaster* için önerildiği gibi, globinlerin trake sistemi oluşuncaya kadar solunumda görev aldığı sonrasında ise doku içi hücre oksijen konsantrasyonunun stabil tutulmasında ve azot/oksijen radikallerinin giderilmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Fakat, hayvan dokularındaki ekspresyonun çok düşük olması, hücre içi koşulları bilinmemesi, elde edilen verilerin *in vitro* deneylerden elde edilmesi gibi

sebeplerden dolayı, bu globilerin gerçek fonksiyonlarının günümüz teknolojisiiyle aydınlatılmasını imkansız kılmaktadır. Bu sebeple, bu çalışmada, literatüre uygun olarak, in *vitro* ortamda yapılan analiz sonuçları, globinlerin bilinen zellikleriile kıyaslanarak fonksiyonuna dair tahminlerde bulunumuştur.

## 5. ÖNERİLER

Globinler bir çok canlıda keşfedilmiş ve yapılan filogenetik araştırmalar sonucu bu proteinlerin tek bir atadan türediği öne sürülmüştür. Farklı kaynaklardan elde edilen globinlerin yapılarının incelenmesi, geçirdikleri bu değişimin fizyolojik ve fonksiyonel olarak yapıya kattığı özelliklerin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

Bu çalışma *A. gambiae* ve *A. mellifera* canlılarından elde edilen globin genlerinin bir vektöre klonlanıp *E. coli*'de ekspresyonu sağlanarak üretilen proteinlerin ilk defa ön karakterizasyonunun yapılması açısından önem taşımaktadır. Enzim üretimi indüklenabilir bir promotör kontrolü altında gerçekleştiği için işlemleri kolaylaştırmıştır. Ayrıca taşıdığı histidin kuyruğu saflaştırma işlemlerinde kolaylık sağlamıştır. Elde edilen proteinler zamanla agregat oluşturduğu tesbit edildiğinden, kinetik ölçüm yapılacak numunelerin uzun süre bekletilmemesi önerilmektedir.

Daha ileriki çalışmalarda, bu globinlere oksijen, azot oksit gibi başka ligandların bağlanma özellikleri incelenebilir. Durgun akım yöntemi ile ligand ayrılma hız sabitleri hesaplanıp, ligand bağlama hız sabitine oranından farklı ligandlara karşı afinitesi incelenebilir. Proteinlerin, jel üzerinde sabitlenip, farklı konformasyonlarının veya kuaterner yapılarının harici ligand afinitesine etkisi incelenebilir. Ek saflaştırma ile daha yüksek saflık elde edilip, X-ray difraksiyonu ile kristal yapısı aydınlatılabilir. Kristal yapı özelliklerine göre, aktif bölge aminoasitlerinin harici ligand bağlama afinitesine etkisi, farklı mutantlar oluşturularak incelenebilir. Farklı pH'lardaki ortamlardaki etkinlikleri incelenebilir. Tüm bu çalışmalarla söz konusu globinler hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilebilir ve böylece bu proteinlerin fonksiyonları hakkında daha gerçekçi tahminler yapılabilir.



## 6. KAYNAKLAR

1. Weber, R. ve E., Vinogradov, S., N., Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations, Physiol. Rev., 81 (2001) 568-629.
2. Terwilliger, N., T., Functional adaptations of oxygen-transport proteins, The Journal of Experimental Biology, 201 (1998) 1085-1098.
3. Vinogradov, S., N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., ve Vanfleteren, J., R., A phylogenomic profile of globins. BMC Evol. Biol., 6 (2006) 31-45.
4. Hünefeld, F., L., Die Chemismus in der thierischen Organization, 1840.
5. Funke, O., “Über das milzvenenblut”, Z Rat Med, 1 (1851) 172-218.
6. Vinogradov, S.,N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Guertin, M., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L. ve Vanfleteren, J., R., Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102 (2005) 11385–11389.
7. Vinogradov, S., N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Mizuguchi, K., Dewilde, S., Moens, L. ve Vanfleteren J. R., A model of globin evolution, Gene, 398 (2007) 132-142.
8. Poole, R., K. ve Hughes, M., N., New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress, Mol. Microbiol., 36, 4 (2000), 775-783.
9. Poole, R., K., Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria, Biochem. Soc. Trans., 33 (2005) 176-180.
10. Freitas T., A., Saito, J., A., Hou, S. ve Alam, M., Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor, J Inorg Biochem., 99 (2005) 23-33.
11. Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T. and Burmester, T., Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family, EMBO Rep., 3 (2002) 1146-1151.
12. Kendrew, J.,C., Myoglobin and the structure of proteins, Science, 139 (1963) 1259.
13. Millikan, G., A., Muscle hemoglobin, Physiol Rev., 19 (1939) 503–523.

14. Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T., L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R.E., Fago, A. ve Burmester, T., Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family, J Inorg Biochem, 99, 1 (2005) 110-9.
15. Wittenberg, J. B. ve Wittenberg, B., A., Myoglobin function reassessed, J. Exp. Biol., 206 (2003) 2011-2020.
16. Merx, M., W., Godecke, A., Flögel, U. ve Schrader, J., Oxygen supply and nitric oxide scavenging by myoglobin contribute to exercise endurance and cardiac function, FASEB J., 19 (2005) 1015-7.
17. Merx, M., W., Flögel, U., Stumpe, T., Godecke, A., Decking, U., K. ve Schrader J., Myoglobin facilitates oxygen diffusion, FASEB J., 15 (2001) 1077-1079.
18. Flögel, U., Merx, M., W., Godecke, A., Decking, U., K. ve Schrader, J., Myoglobin: a scavenger of bioactive NO, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98 (2001) 735-740.
19. Perutz, M., F., Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron, Annu. Rev. Biochem, 48 (1979) 327-386
20. Ilan, E., Azem, A. ve Daniel, E., Structural characterization and oxygen binding properties of extracellular hemoglobin from the marine polychaete *Eurythoe complanata*, Comp. Biochem. Physiol., 96B (1990) 783-786.
21. Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. ve Hankeln, T., A vertebrate globin expressed in the brain, Nature, 407 (2000) 520-3.
22. Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. ve Hankeln, T., Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues, Mol. Biol. Evol., 19 (2002) 416-421.
23. Trent III, J., T. ve M., S., Hargrove, A Ubiquitously Expressed Human Hexacoordinate Hemoglobin, J. Biol. Chem., 277, 22 (2002) 19538-19545.
24. Kundu, S., Trent III, J., T. ve Hargrove, M., S., Plants, humans and hemoglobins, Trends Plant Sci., 8 (2003) 387-393.
25. Vinogradov, S., N., The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocruorins), Comp. Biochem., (1985) 82, 1-15.
26. Couture, M., Burmester, T., Hankeln, T. ve D., L., Rousseau, The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket, J. Biol. Chem., 276 (2001) 36377-36382.

27. Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts T., Marden, M., C., Caubergs, R., ve Moens, L., Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a member of the globin family, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38949-38955.
28. Du, W., Syvitski, R., Dewilde, S., Moens, L. ve G.N.La Mar, Solution 1h NMR characterization of equilibrium heme orientational disorder with functional consequences in mouse neuroglobin, J. Am. Chem. Soc., 125 (2003) 8080-8081.
29. Kriegl, J.,M., Bhattacharyya, A., J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O., ve Nienhaus, G.,U., Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2002) 7992-7997.
30. De Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. ve Bolognesi, M., Mapping protein matrix cavities in human cytoglobin through Xe atom binding, Biochem. Biophys. Res. Commun., 316, 4 (2004) 1217-1221.
31. De Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. ve Bolognesi, M., Crystal structure of cytoglobin: The fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination, J. Mol. Biol., 316 (2004) 917-927.
32. Trent III, J., T., Watts, R., A. ve Hargrove, M., S., Human Neuroglobin, a Hexacoordinate Hemoglobin That Reversibly Binds Oxygen, J. Biol. Chem., 276 (2001) 30106-30110.
33. Uno, T., Ryu D., Tsutsumi, H., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y., Wilkinson, A., J., Sato, H. ve Hayashi, T., Residues in the distal heme pocket of neuroglobin . Implications for the multiple ligand binding steps, J Biol Chem, 279 (2004) 5886-5893.
34. Schmidt, M., Giessler, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. ve Burmester, T., How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina, J. Biol. Chem. 278 (2003) 1932-5.
35. Sun, Y., Jin, K., Mao, X., O., Zhu, Y. ve Greenberg, D., A., Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98 (2001) 15306-15311.
36. Sun, Y., Jin, A., Peel, X., O., Mao, L. ve Greenberg, D., A., Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100 (2003) 3497-3500.
37. Herold, S., Fago, A., Weber, R., E., Dewilde, S. ve Moens, L., Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a role against oxidative stress, J. Biol. Chem., 279 (2004) 22841–22847.
38. Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki S., Kim, D., H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N. ve Yoshizato, K., Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis, Lab. Invest., 84 (2004) 91-101.

39. Hirsila, M., P. Koivunen, V. Gunzler, K. I. Kivirikko, ve J. Myllyharju, Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor, J. Biol. Chem., 278 (2003) 30772-30780.
40. Weber R.E., Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia, Am. Zool, 20 (1980) 79-101.
41. LaCount, M., W., Zhang, E., Chen, Y., P., Han, K., Whitton, M., M., Lincoln, D., E., Woodin, S., A., ve Lebioda, L., The crystal structure and amino acid sequence of dehaloperoxidase from *Amphitrite ornata* indicate common ancestry with globins, J. Biol. Chem., 275 (2000) 18712-1871.
42. Lebioda L., LaCount, M., W., Zhang E., Chen, Y., P., Han, K., Whitton, M., M., Lincoln, D., E. ve Woodin, S., A., An enzymatic globin from a marine worm, Nature, 401 (1999) 445.
43. Liochev, S., I., Kuchumov, A., R., Vinogradov, S.,N. ve Fridovich, I., Superoxide dismutase activity in the giant hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*, Arch. Biochem. Biophys., 330 (1996) 281-284.
44. Trewitt P.M., Boyer D.R. ve Bergtrom G., Characterization of maternal haemoglobins in the egg and embryos of *Chironomus thummi*, J.Insect Physiol., 32 (1986) 963-969.
45. Miller, P., L., Possible function of haemoglobin in *anisops*, Nature, 201 (1964) 1052.
46. Miller, P., L., The function of haemoglobin in relation to the maintenance of neutral buoyancy in *Anisops pellucens* (Notonectidae, Hemiptera), J. Exp. Biol. 44 (1966) 529-543.
47. Gilles-Gonzalez, G. ve Gonzalez, M., A., The function of haemoglobin in relation to the maintenance of neutral buoyancy in *Anisops pellucens* (Notonectidae, Hemiptera), J. Biol. Chem., 268 (1993) 16293-16297.
48. Gilles-Gonzalez, M., A., Gonzalez, G., Perutz, M., F., Kiger, L., Marden, M., C. ve Poyart, C., Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation, Biochemistry, 33 (1994) 8067-8073.
49. Gilles-Gonzalez, M., A., Gonzalez, G. ve Perutz, M., F., Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron, Biochemistry, 34 (1995) 232-236.
50. Resh V.H. and Carde R.T., Encyclopedia of insects, 1002-1007, Academic Press, USA, 2003.
51. Law, J., H., Wells, M., A., Insects as biochemical models, Biol. Chem., 264 (1989) 16335-16338.

52. Mangum, C., P., Oxygen transport in invertebrates, Am. J. Physiol., 248 (1985) R505-R514.
53. Lankester, E.,R., A contribution to the knowledge of haemoglobin, Proc. Roy Soc. Lond. B. Biol. Sci., (1872) 70-80.
54. Kawai, K. ve Konishi, K., Fundamental studies on *chironomid* allergy. II. Analyses of larval allergens of some Japanese *chironomids* (*Chironomidae*, Diptera), Aerugi, 35 (1986) 1088-1098.
55. Burmester, T., Storf, J., Hasenjager, A., Klawitter, S., ve Hankeln, T., The hemoglobin genes of *Drosophila*. FEBS J., 273 (2006) 468-480.
56. Hankeln, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., Ungerechts, G. ve Schmidt, M., Characterization of *Drosophila* hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects, J.Biol.Chem., 277 (2002) 29012-29017.
57. Burmester, T., Klawitter, S. ve Hankeln, T., Characterization of two globin genes from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: divergent origin of nematoceran haemoglobins, Insect Mol.Biol., 16 (2007) 133-142.
58. Hankeln, T., Klawitter, S., Kramer, M., ve Burmester, T., Molecular characterization of hemoglobin from the honeybee *Apis mellifera*, J.Insect Physiol, 52 (2006) 701-710.
59. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast: Basic local alignment. 2 Mart 2012.
60. Burmester, T. ve Hankeln, T., The respiratory proteins of insects, J.Insect Physiol, 53 (2007) 285-294.
61. Goodman, M., Braunitzer, G., Kleinschmidt, T. ve Aschauer, H., The analysis of a protein-polymorphism. Evolution of monomeric and homodimeric haemoglobins (erythrocrucorins) of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera), Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem., 364 (1983) 205-217.
62. Snodgrass, R., E., Anatomy of the honey bee, united states of america, Cornell University Press, Sage House, 512 East street, Ithaca New York, 1956, 228-238.
63. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anopheles\\_gambiae\\_Mosquito.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anopheles_gambiae_Mosquito.jpg) Wikipedia the free encyclopedia. 2 Mart 2012.
64. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Apis\\_mellifera\\_focus\\_stack.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Apis_mellifera_focus_stack.jpg) Wikipedia the free encyclopedia. 2 Mart 2012.
65. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>

66. Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts, T., Marden, M.C., Caubergs R. ve Moens L., Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family, J. Biol. Chem., 276 (2001) 38949-38955.
67. Perutz, M., F., Preparation of hemoglobin crystals, J. Cryst. Grow., 2 (1968) 54-56.
68. Rowlett, S., R., Protein X-ray crystallography methods, 2. Baskı, NY, 2005
69. Shishikura, F. ve Takami, K., The amino acid sequences of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin chains of hemoglobin from the Aldabra giant tortoises, Geochelone gigantea, Zool. Sci., 18 (2001) 515–526.
70. Mammen, P., P., Kanatous, S., B., Yuhanna, I., S., Shaul, P., W., Garry, D., J., Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice, Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 285, 5 (2003) H2132-H2141.
71. <http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf> 3 Mart 2012.
72. Cosa, G. ve Scalano, J., C., Laser Techniques in the Study of Drug Photochemistry, Photochemistry and Photobiology, 80 (2004) 159 – 174.
73. Bonneau, R., Wirz, J. ve Zuberbuehler, A., D., Methods for the analysis of transient absorbance data, Pure and App. Chem., 69, 5 (1997) 979 – 992.
74. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., ve Stamler J., S., S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control, Nature, 380, 6571 (1996) 221-226.
75. Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Kiger, L., Nistor, S., V., Goovaerts, E., Marden, M., C. ve Moens, L., Nitric oxide binding properties of neuroglobin, J. Biol. Chem., 278 (2003) 4919-4925.
76. Maniatis, T., Sambrook, J. ve Fritsch, E.F. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
77. Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc., in association with John Wiley & Sons, Inc, 1993.
78. Bartlett, J., M., S. ve Stirling, D., "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". PCR Protocols. 226., 2003.
79. <http://www.biocompare.com/protocols/protocol/318/Agarose-Gel-Electrophoresis.html>, Agarose Gel Electrophoresis, Biocompare Protocols, 3 Mart 2012.
80. <http://www.e-biotek.com/dna/141-dna-ligation-protocol-.html>, DNA ligation protocol, Biotechniques, 3 Mart 2012.

81. <http://www.e-biotek.com/pcr/76-colony-pcr-protocols.html>, Colony PCR protocols, *Biotechniques*, 3 Mart 2012.
82. <http://www.scienceprotocols.org/Preparation-of-Glycerol-Stocks.html>, Preparation of glycerol stocks, *Science Protocols*, 3 Mart 2012.
83. Hengen, P., Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*, *Trends in biochemical sciences*, 20, 7 (1995) 285–286
84. Andrews, P., National Institute for Research in Dairying, Shinfield, nr. Reading, Berks, 1963, NY.
85. Nienhaus, K., Deng, P., Olson, J., S., Warren, J., J., ve Nienhaus, G., U., Structural dynamics of myoglobin: Ligand migration and binding in valine 68 mutants, *Am. soc. for biochem. and mol. biol. Inc.*, 278 (2003) 42532 – 42544.
86. Kiger, L., Tilleman, L., Geuens, E., Hoogewijs, D., Lechauve, C., Moens, L., Dewilde, S. ve Marden, M., C., Electron Transfer Function versus Oxygen Delivery: A Comparative Study for Several Hexacoordinated Globins Across the Animal Kingdom, *Plos One*, 6, 6 (2011) 1 – 10.
87. Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane D., Marden, M., C. ve Kiger, L., Neuroglobin and Other Hexacoordinated Hemoglobins Show a Weak Temperature Dependence of Oxygen Binding, *Biophysic. J.*, 87 (2004) 1196–1204.
88. Antonini, E. ve Brunori, M., Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971.
89. Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M., L., Van Houte, K., Pesce, A., Griffon, N., Kiger, L., Marden, M., C., Vermeire, S., Vanfleteren, J., Esmans, E. ve Moens, L., Structural, functional, and genetic characterization of *Gastrophilus* hemoglobin, *J Biol Chem.*, 273, 49 (1998) 32467-74.
90. Amiconi, G., Antonini, E., Brunori, M., Formanek, H. ve Huber, R., Functional properties of native and reconstituted hemoglobins from *Chironomus thummi thummi*. *Eur J Biochem.*, 31, 1 (1972) 52–58.
91. Weber, R., E., Braunitzer, G. ve Kleinschmidt, T., Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VIIB, CTT IX and CTT X, *Comp Biochem Physiol B.*, 80, 4 (1985) 747-753.
92. Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L. ve Marden, M., C., Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin, *FEBS J.*, 272, 8 (2005) 2076-2084.

93. Picotti, P., Dewilde, S., Fago, A., Hundahl, C., De Filippis, V., Moens, L. ve Fontana A., Unusual stability of human neuroglobin at low pH--molecular mechanisms and biological significance., FEBS J., 276 (2009) 7027-7039.
94. Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B., N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L. ve Marden, M., C., The Redox State of the Cell Regulates the Ligand Binding Affinity of Human Neuroglobin and Cytoglobin, J. Biol. Chem., 10 (2003) 1074.
95. Rana, M., S. ve Riggs, A., F., Indefinite noncooperative self-association of chicken deoxy hemoglobin D., Proteins, 79, 5 (2011) 1499-1512.
96. Hankeln, T., Friedl, H., Ebersberger, I., Martin, J. ve Schmidt, E., A., Variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain, Gene, 205, 1-2 (1997) 151-160.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Sivas'da doğdu. Lise öğrenimini Denizli Lisesinde tamamladı. 2003-2008 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2008 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. 2010-2011 eğitim döneminde Erasmus öğrenci değişim programı ile Antwerpen Üniversitesi'nde (Antwerp, Belçika) yüksek lisans tezi deneysel çalışmalarını tamamladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.