

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Scytalidium thermophilum* ÇİFT AKTİVİTELİ KATALAZ-FENOL
OKSİDAZİN (CATPO) KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN
ARTTIRILMASI**

ÇİĞDEM AKÇAY

KOCAELİ 2022

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Scytalidium thermophilum* ÇİFT AKTİVİTELİ KATALAZ-FENOL
OKSİDAZİN (CATPO) KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN
ARTTIRILMASI**

ÇİĞDEM AKÇAY

Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.

.....

Doç. Dr. Fikriye POLAT
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

.....

Dr. Öğr. Üyesi Gülden KOÇAK
Jüri Üyesi, Bingöl Üniv.

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 05.01.2022

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

☒ Bu tez çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2019-1568 no'lu proje kapsamında maddi/alt yapı desteği alınarak gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumda saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Çiğdem Akçay

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanımı bana ait olacaktır.

Tezin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan **“Lisanüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☒ Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

Çiğdem Akçay

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Scytalidium thermophilum* çift aktiviteli katalazının (CATPO, Katalaz Fenol Oksidaz, Catalase-Phenol Oxidase) katalitik etkinliğinin artırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması için ikincil fenol oksidaz aktivite üzerine odaklanılmış ve aktivite üzerinde önemli rol oynadığı düşünülen bazı amino asitler hedef alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda oluşturulan farklı CATPO varyantlarının biyokimyasal karakterizasyon analizi gerçekleştirilerek enzimin aktivitesinde meydana gelen değişiklikler gözlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmanın, çift aktiviteye sahip katalazların aktivite mekanizması üzerine aydınlatıcı bilgiler sunacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans öğrenimim süresince kıymetli bilgilerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, bu çalışma sürecimde bana yardımcı olan Biyoloji Bölümün'deki tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Son olarak, çalışmalarım süresince maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olup bana destek olan canım annem Aysun AKÇAY'a ve babam Osman AKÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: FYL-2019-1568) Birimine şükranlarımı sunarım.

Ocak - 2022

Çiğdem AKÇAY

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	3
2.1.1. Oksidatif Stres	4
2.2. Katalazlar (E.C. 1.11.1.6)	7
2.2.1. Katalazların Fonksiyonu	7
2.2.2. Katalazların Gruplandırılması	8
2.2.3. Katalazların Genel Yapısı	11
2.2.4. Katalazların Endüstrideki Yeri	15
2.2.5. Katalazların Çift Aktivite Yeteneği	16
2.3. Fenol Oksidazlar	17
2.4. Termofilik Mantarlar	19
2.4.1. <i>Scytalidium thermophilum</i>	19
2.4.2. <i>S. thermophilum</i> Katalaz-Fenol Oksidazı	20
3. MALZEME VE YÖNTEM	22
3.1. Kimyasallar	22
3.2. Plazmid, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması	22
3.3. Primer Tasarımı	22
3.4. Bölge Yönelimli Mutagenез	23
3.5. <i>E. coli</i> Suşlarından Kompetan Hücre Eldesi	25
3.6. Transformasyon	25
3.7. Plazmid DNA İzolasyonu	26
3.8. Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflığının Tespiti	27
3.9. Agaroz Jel Elektoroforezi	27
3.10. DNA Dizi Analizi	28
3.11. CATPO Varyantlarının Üretimi	28
3.12. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması	28
3.13. CATPO Varyantlarının Karakterizasyonu	30
3.13.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektoroforezi	30
3.13.2. UV Spektrum Analizi	30
3.13.3. Enzim Aktivite Tayini	30
3.13.4. Protein Konsantrasyonu Analizi	32
3.13.5. Kinetik Parametrelerin Analizi	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33

4.1.Bölge Yönelimli Mutagenез İle CATPO Varyantlarının Oluşturulması.....	33
4.2.CATPO Varyantlarının E. Coli’de Rekombinant Üretimi.....	36
4.3.CATPO Varyantlarının Afinitе Kromatografi İle Saflaştırılması	37
4.4 CATPO Varyantlarının UV Spektrumları.....	38
4.5.WT-CATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Kıyaslanması.....	40
4.6. CATPO Varyantlarının Kinetik Analizlerinin Kıyaslanması.....	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	50
EKLER.....	61
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	68
ÖZGEÇMİŞ	69



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Önemli reaktif oksijen türleri (ROS)	3
Şekil 2.2.	Oksidatif stres	5
Şekil 2.3.	Reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı üçlü kalkan modeli	6
Şekil 2.4.	Önemli ROS ve antioksidan enzimleri gösteren şematik yol.....	6
Şekil 2.5.	Hem b ve hem d yapıları	9
Şekil 2.6.	Monofonksiyonel katalazların filogenetik ağacının özeti	10
Şekil 2.7.	<i>S. thermophilum</i> CATPO monomerinin üç boyutlu yapısı	12
Şekil 2.8.	<i>S. thermophilum</i> katalazının üç kanal yapısı	14
Şekil 2.9.	Memeli katalazının olası aktivite mekanizması	16
Şekil 2.10.	Melanin sentez reaksiyonu	18
Şekil 2.11.	<i>S. thermophilum</i> ışık mikroskop görüntüsü.....	19
Şekil 2.12.	<i>S. thermophilum</i> CATPO yanal kanalındaki 3ATR bölgesi	21
Şekil 3.1.	DNA miktarının hesaplanması	27
Şekil 3.2.	Katalaz aktivitesinin hesaplanması	31
Şekil 3.3.	Fenol oksidaz aktivitesinin hesaplanması	32
Şekil 4.1.	Bölge yönelimli mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların agaroz jel görüntüleri	34
Şekil 4.2.	WT-CATPO ve varyantların Bioedit programı ile oluşturulan ikili dizi hizalama sonuçları	35
Şekil 4.3.	CATPO varyantlarına ait plazmid DNA'ların <i>E.coli</i> BL21(DE3)star hücrelerine transformasyonu sonrası gözlenen koloniler.....	36
Şekil 4.4.	WT-CATPO ile beş farklı varyantının çamur haline getirilen hücrelerinin kıyaslanması	37
Şekil 4.5.	Histidin bağlı kolon koromotografisi ile saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüsü	38
Şekil 4.6.	WT-CATPO ve yanal kanal varyantlarına ait UV spektrumlarının kıyaslanması.....	39
Şekil 4.7.	WT-CATPO ve beş varyantının 500-900 nm UV spektrumlarının kıyaslanması.....	39
Şekil B.1.	Protein miktar tayini için BSA eğrisi	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Tasarlanan farklı yanal kanal CATPO varyantı ve sekans değişikliği yapılan oligonükleotidler.....	23
Tablo 3.2.	PCR için reaksiyon karışımı.....	24
Tablo 3.3.	Takip edilen PCR döngüsü aşamaları	24
Tablo 4.1.	Farklı mutantların plazmidlerinde bulunan DNA miktarları.....	34
Tablo 4.2.	DNA sekans analizi için tasarlanan CATPO primerleri	35
Tablo 4.3.	Mutantların hem miktarının spektrofotometrik analizi	40
Tablo 4.4.	WT-CATPO ve varyantların spesifik aktiviteleri ile hem tiplerinin kıyaslanması	41
Tablo 4.5.	WT-CATPO ve varyantlarının katalaz aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri	44
Tablo 4.6.	WT-CATPO ve varyantlarının fenol-oksidad aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
Tm	: Erime Sıcaklığı
U	: Unit (Enzim Birimi)

Kısaltmalar

Abs	: Absorbans Değeri
3ATR	: 3-Amino-1,2,4 Triazol
Bç	: Baz Çifti
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT-3	: Katalaz-3
CATPO	: Katalaz-Fenol Oksidaz
CBB	: Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Parlak Mavi)
Cpd I	: Bileşik 1 (Oksiferril)
Cpd II	: Bileşik 2
Cpd III	: Bileşik 3
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozit Trifosfat
DpnI	: <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41'den restriksiyon endonükleaz
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E.C	: Enzim Kodu
FP	: Forward Primer (İleri Primer)
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HPII	: Hidroperoksidaz II
IPTG	: Isopropylthio-β-galactoside (İzopropil tiyogalatktopiranozit)
Kan ₅₀	: Kanamisin
CAT	: Katalaz
k _{cat}	: Turnover Sayısı, Dönüşüm Sayısı
k _{cat} /K _M	: Katalitik Etkinlik
K _M	: Michealis Menten Sabiti
<i>N. crassa</i>	: <i>Neuspora crassa</i>
NaCl	: Sodyum Klorür
NAD(P)H	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
O ₂	: Moleküler Oksijen

OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PDB	: Protein Data Bank (Protein Veri Bankası)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PVC	: <i>Penicillium vitale</i> Katalazı
RbCl ₂	: Rubidyum Klorür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RP	: Reverse Primer (Geri Primer)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı):
<i>S.thermophilum</i>	: <i>Scytalidium thermophilum</i>
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SOD:	: Süperoksit Dismutaz
Tris-HCl	: Tris Hidroklorür
UV	: Ultraviyole
WT	: Wild Type (Yabanıl Tip)

***Scytalidium thermophilum* ÇİFT AKTİVİTELİ KATALAZ-FENOL OKSİDAZIN (CATPO) KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI**

ÖZET

Katalazlar, antioksidan enzimlerdendir. Katalazların temel görevi, reaktif oksijen türlerinden (ROS) biri olan hidrojen peroksit molekülünü parçalayarak su ve moleküler oksijene dönüştürmesidir. Termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* kaynaklı çift aktiviteli CATPO (Katalaz-Fenol Oksidaz) şeklinde isimlendirilen enzim, Fe/hem grubu bulunduran monofonksiyonel katalazlardandır. Monofonksiyonel katalaz ailesinin bir üyesi olmasına rağmen asıl fonksiyonun yanında hidrojen peroksit yokluğunda başka kofaktörlere gereksinim duymadan çeşitli fenolik bileşikler okside edebilme yeteneği de göstermektedir. Ancak bu ikincil aktivite, katalaz aktivitesine göre oldukça düşük seviyede gerçekleşmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada; CATPO'nun fenol oksidaz aktivitesini arttırarak farklı endüstriyel uygulamalarda kullanmak üzere daha etkin bir enzimin elde edilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda aktif bölgeye oksidatif substratların erişimini kolaylaştırmak üzere katalazlarda tanımlanan yanıl (lateral) kanal üzerinde oksidatif aktivitede önemli olduğu düşünülen amino asitler (Lys248, His246, Lys323, Asp224 ve His214) hedef seçilerek bölge yönelimli mutagenез ile küçük yan zincirli Ala (Alanin) amino asite dönüştürüldü. Rekombinant DNA sistemi kullanarak üretilen ve saflaştırılan CATPO varyantlarının aktivite ve katalitik etkinliklerinde meydana gelen değişiklikler, spektrofotometrik analizler ile değerlendirildi. Bulgular, yapılan mutasyonlar neticesinde tüm varyantların fenol oksidaz aktivitesinin yabanıl tip CATPO enzimine göre yaklaşık iki ila üç kat arttığını gösterirken özellikle Lys323Ala ile Asp224Ala varyantlarında katalaz aktivitede önemli bir kayıp olmadan (yabanıl tip CATPO aktivitesinin yaklaşık %92'si korunmuş durumda) fenol oksidaz aktivitenin arttığı bulundu. Sonuçta, katalaz aktivitesini değiştirmeden oksidaz yeteneği arttırılmış varyantlar başarılı bir şekilde geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: CATPO, Fenol Oksidaz Aktivite, Katalitik Etkinlik, *Scytalidium thermophilum*, Yanıl Kanal.

INCREASING THE CATALYTIC EFFECTIVENESS OF A BIFUNCTIONAL CATALASE-PHENOL OXIDASE (CATPO) FROM *Scytalidium thermophilum*

ABSTRACT

Catalases are antioxidant enzymes. Their main function is to convert hydrogen peroxide, one of the reactive oxygen species, into water and oxygen. A bifunctional catalase enzyme from *Scytalidium thermophilum*, named as CATPO (Catalase-Phenol Oxidase), belongs to the Fe/hem containing monofunctional catalases. Although being a member of monofunctional catalase family, this enzyme also exhibits phenol oxidase activity in the absence of hydrogen peroxide. However, secondary phenol oxidase activity occurs at a very low levels when compared to the catalase activity. In this study, it was aimed to improve the oxidase activity of catalase for its industrial use. For this purpose, the residues (Lys248, His246, Lys323, Asp224 and His214) located in the lateral channel and believed to play important role for phenolic substances getting access to the active center were chosen and converted into smaller side-chain amino acid- Ala (Alanine) by site-directed mutagenesis. Changes in catalytic efficiency of CATPO variants purified using the recombinant DNA system were evaluated by spectrophotometric analysis. The results have shown that the phenol oxidase activity was increased by two or three-fold in all variants while some possessed decreased catalase activity. The Asp224Ala and Lys323Ala variants gave the best results presenting increased oxidase activity without catalytic activity lost (approximately 92% of wild type catalase activity retained). As a result, two variant proteins with improved properties have been successfully produced.

Keywords: CATPO, Phenol Oxidase Activity, Catalytic Efficiency, *Scytalidium thermophilum*, Lateral Channel.

1.GİRİŞ

Termofilik mantarlar, 20-60°C arasında olan sıcaklıklarda gelişebilmektedir. Isıya dayanıklı oldukları için çeşitli endüstriyel uygulamalarda termostabil enzim kaynağı olarak tercih edilmektedirler. Bu özelliğinden dolayı termofilik mantarlar, çok sayıda çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Ögel ve diğ., 2001).

Katalazlar (EC 1.11.1.6), genellikle homotetramer yapıya sahip olup metalloenzimler grubundandır. Temel fonksiyonu zararlı hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünün, suya ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektir. Hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumlarda enzim, ortamda uygun bir elektron vericisi olduğunda peroksidaz aktivitesi de gösterebilir.

Nitekim memeli katalazı ile yapılan bir çalışmada, H_2O_2 yokluğunda enzimin oksidaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiş ve enzim katalaz-oksidadaz olarak isimlendirilmiştir (Vetrano ve diğ., 2005). Buradan, çift aktivite gösteren katalaz-fenol oksidaz türündeki enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

Scytalidium thermophilum, optimum gelişme sıcaklık aralığı 45-50°C olan ve kültür mantarı olarak bilinen *Agaricus bisporus* büyümesini önemli oranda indükleyen termofilik bir mantardır (Wiegant, 1992). Sporulasyon sonrası melanin kaynaklı koyu kahverengi hatta bazen kömür siyahı bir renge bürünen *S. thermophilum*, büyüme ile paralel olarak ortaya çıkan gallik asit ve tannik asit gibi bazı fenolik maddeler varlığında üretimi tetiklenen bir hücre-dışı katalaz enzimi üretir (Yuzugullu ve diğ., 2011).

Penicillium vitale katalazına %77 oranında homoloji gösteren bu enzim ‘monofonksiyonel büyük alt üniteli katalaz’ grubuna dahildir (Sutay Kocabas ve diğ., 2008).

Ancak monofonksiyonel katalaz ailesinde yer almasına karşılık H_2O_2 yokluğunda katekol, kafeik asit, katekin, klorojenik asit ve L-DOPA gibi *ortho* pozisyonunda iki hidroksil grubu bulunduran fenolik maddeler ile hidrokinon gibi *para*-difenolikleri oksitleyebilmektedir (Koclar Avcı ve diğ., 2013).

Bu sebeple enzim, katalaz-fenol oksidaz (CATPO: Catalase-Phenol Oxidase) olarak isimlendirilmiştir. Hidrojen peroksitten bağımsız gerçekleşen enzimatik aktivite oksijen varlığına gereksinim duymakla birlikte 3-amino-1,2,4-triazol (3TR) dahil olmak üzere klasik katalaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmekte (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018); ancak katalaz aktivitesine göre oldukça düşük ($\sim 5 \times 10^4$ kat) seviyede gerçekleşmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013).

Bu bilgiler ışığında *S. thermophilum* CATPO enziminin bölge yönelimli mutagenез ile sahip olduğu minimum seviyelerdeki fenol-oksidad aktivite özelliğinin artırılarak katalitik açıdan daha etkin bir enzimin üretilmesi literatüre katkı sağlamasının yanında çift aktivitenin daha iyi anlaşılmasına ve böylece yeni projelere ve enzimin tekstil sanayi, gıda endüstrisi ve biyosensör geliştirme gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanımına kaynak olması muhtemeldir.

2.GENEL BİLGİLER

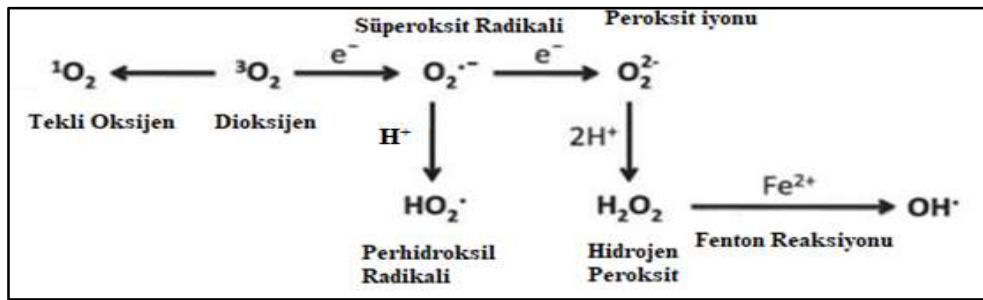
Yapılan bu tez çalışmasında antioksidan özellikteki katalaz enzimi hakkında daha kapsamlı bilgi sahibi olmak için reaktif oksijen türleri (ROS) ve bu reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif stres ile ilgili genel bilgilere de kısaca değinildi.

2.1.Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif Oksijen Türleri (ROS); genel olarak hücrede bir takım zarar verici reaksiyonlara neden olabilen, oksijen atomu içeren herhangi bir radikal ve radikal olmayan molekülleri belirtmek üzere kullanılan bir kavramdır. (Lambert ve Brand, 2009).

Aerobik solunumda ökaryotik ve prokaryotik canlılar, moleküler oksijeni (O_2) kullanır ve metabolizmalarının yan ürünlerinin bir sonucu olarak (ROS) üretir (Aguirre ve diğ., 2005).

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), tekli oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi önemli ROS'lar (Şekil 2.1) ; moleküler oksijenin (O_2) kısmi olarak indirgenmesi sonucu oluşan radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinden meydana gelir (Ray ve diğ., 2012). Moleküler oksijen (O_2), elektron diziliminden dolayı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna karşı oldukça hassas bir moleküldür.



Şekil 2.1. Önemli reaktif oksijen türleri (ROS) (Abouzari ve Fakheri, 2015)

Oksijen molekülünün dış yörüngesinde ayrı elektron orbitallerinde yer alan eşleştirilmemiş iki elektron bulunur. Tekli oksijen (1O_2) ve süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) gibi reaktif oksijen türleri, moleküler oksijenin (O_2) sıralı olarak indirgenmesi ve aşamalı bir şekilde elektron aktarılması sonucunda üretilir (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

H₂O₂'nin demir metal iyonları (Fe⁺²) ile girmiş olduğu reaksiyon sonucunda yüksek derecede toksik özellikte olan hidroksil radikali (•OH) üretilir (Fattman ve diğ., 2003).

Ökaryotik hücrelerin çoğunda mitokondriyal enerji metabolizması, nicel olarak önemli olan ROS kaynağı olarak bilinmektedir (Kowaltowski ve diğ., 2009).

ROS'lar, özellikle kimyasal açıdan yüksek reaktivitelere sahip olmalarından dolayı; DNA, karbohidratlar, lipitler ve proteinler ile yıkıcı olarak reaksiyon gösterebilirler (Curtin, ve diğ., 2002).

ROS'lar, hücrelere zarar veren fonksiyonlarının yanında normal seviyede üretildiklerinde farklı hücresel süreçlerde önemli görevleri üstlenirler.

Örneğin, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon radikali, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek hücre içi sinyal molekülleri olarak rol oynar.

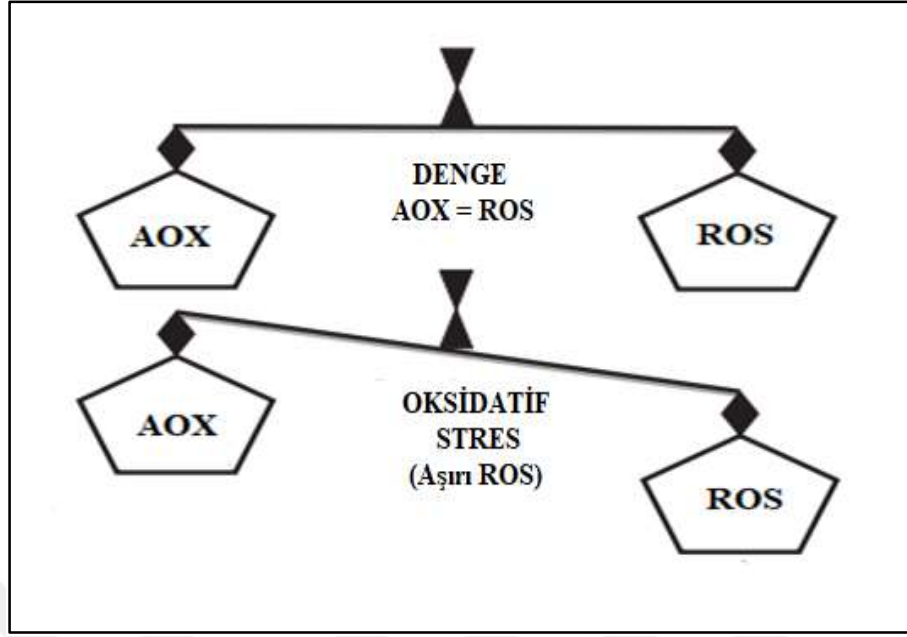
ROS'un diğ er bazı fonksiyonlarına ek olarak; antioksidan gen ifadesinin düzenlenmesi, apoptoz veya nekrozun indüklenmesi, hücre farklılaşması, antimikrobiyal aktivite, iyon taşınması, patojene bağı lı gen aktivasyonu ve kalsiyum iyon (Ca⁺²) mobilizasyonu sayılabilir (Belozerskaya ve Gessler, 2006; Scandalios, 2005).

Sonuç olarak, hücrelerde bulunan sabit seviyelerdeki ROS'ların fonksiyonları önemlidir (Scandalios, 2005).

2.1.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres kavramı (Ş ekil 2.2.), ilk olarak Helmut Sies tarafından ROS'ların lehine olan antioksidan (AOX) dengenin bozulması sonucunda potansiyel zarara sebep olan bir rahatsızlık olarak tanımlanmıştır (Sies, 1991).

Daha sonra, aerobik organizmalarda ROS'ların ortaya çıkması ve antioksidan koruma mekanizmalarının karşı koyma kapasitesi arasındaki denge eksikliği olarak ifade edilmiştir (Persson ve diğ., 2014).



Şekil 2.2. Oksidatif stres (Gill ve Tuteja, 2010) (AOX: antioksidan, ROS: reaktif oksijen türleri)

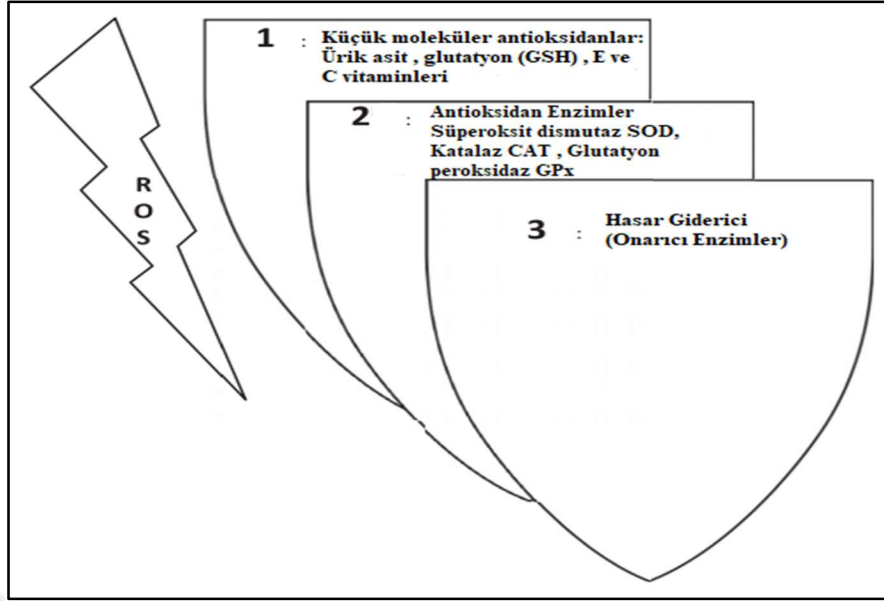
Yani oksidatif stres, yüksek miktarda ROS üretimi ve tüketimi arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucu olarak görülmüştür.

Bunun yanında oksidatif stres, gelişmiş bir serbest radikal türlerinin oluşumu ve aynı zamanda koruyucu antioksidan savunma sisteminin aktivitesinin de azalmasıyla ilişkilidir (Poljsak ve diğ., 2013).

Toksik özellikteki reaktif oksijen türlerinin, fonksiyonel ve yapısal açıdan hücrelere zarar verdiği bilinmektedir. Bu sebeple aerobik hücreler, ROS birikiminin neden olduğu zarar verici etkileri detoksifiye ederek ortadan kaldırmak için çeşitli enzimatik savunma sistemleri (Şekil 2.3) içerir (Nantapong ve diğerleri, 2019).

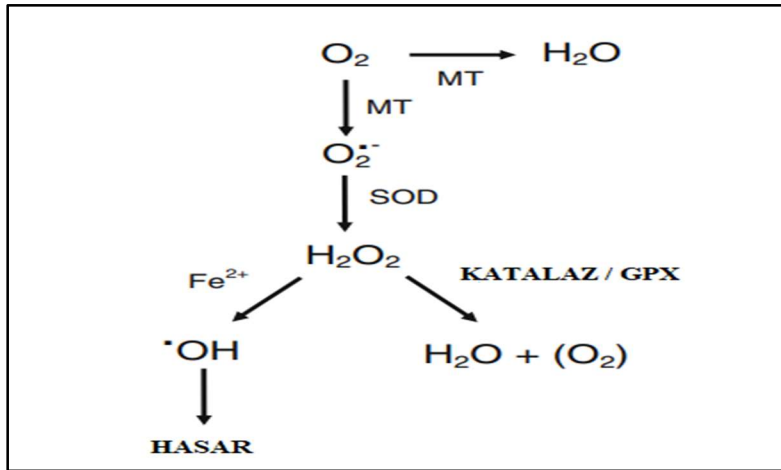
Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx); biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinin birikmesine karşı temel bir rol oynayan antioksidan enzimlerdir (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Ökaryotik hücreler; SOD, GPx ve CAT gibi farklı ROS tutucu antioksidan enzimlerini üreterek reaktif oksijen türlerinin meydana getirmiş olduğu oksidatif stresi düzenler (Thannickal ve Fanburg, 2000).



Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı üçlü kalkan modeli (Lei ve diğ., 2016)

Enzimatik savunma mekanizmaları, reaktif oksijen türlerini daha zararsız olan reaktif türlere dönüştürerek, hücreleri serbest radikallerin zarar verici etkilerinden korur. Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\cdot-}$), katalaz enziminin substratı olan H_2O_2 'ye dönüştürülmesini katalizleyen enzimdir (Şekil 2.4). Glutatyon peroksidaz (GPx); azaltılmış olan glutatyonun (GSH), glutatyon disülfite dönüşümüyle birlikte H_2O_2 'nin parçalanmasını katalizler (Scandalios, 2005; Schrader ve Fahimi, 2006).



Şekil 2.4. Önemli ROS ve antioksidan enzimleri gösteren şematik yol (MT, mitokondri; SOD, süperoksit dismutaz; GPx, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi) (Schriner ve Linford, 2006)

2.2. Katalazlar (E.C. 1.11.1.6)

Aerobik organizmalar, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS'lara karşı hücreleri korumak ve bu bileşiklerin ayrışmasını sağlamak amacıyla farklı enzimatik sistemler geliştirmişlerdir. Bu enzimatik sistemlerden biri olan katalazlar, zararlı etki gösteren hidrojen peroksite karşı güçlü koruma sağlayan enzimlerden biridir (Kalko ve diğ., 2001).

Doğal çevrede kritik bir rol oynayan katalazlar, prokaryotik ve ökaryotik hücre detoksifikasyonunda görev alırlar.

Katalazlar hidrojen peroksiti, suya ve moleküler oksijene olan ayrışmasını katalize ederek artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu engeller ve böylece hücreleri ROS'un zarar verici etkilerinden korur (Mate ve diğ., 2001; Vlasits ve diğ., 2010).

Katalazlar, yaklaşık 100 yıldır biyokimyasal olarak incelenmektedir. Katalaz enzimi birçok farklı organizmadan izole edilerek biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır (Nicholls ve diğ., 2000).

Ayrıca, 200'den fazla birçok farklı organizmadan elde edilen katalaz genlerinin dizileri mevcut olup çoklu karşılaştırmalı analiz için geniş bir veri tabanı bulunmaktadır (Switala ve Loewen, 2002).

2.2.1. Katalazların Fonksiyonu

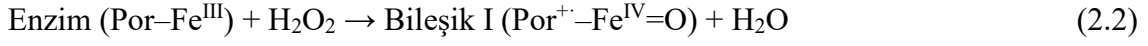
Katalaz enzimleri aerobik olarak solunum yapan tüm organizmalarda bulunan en önemli antioksidan enzimlerden olup substratı olan hidrojen peroksitin (H_2O_2), Denklem (2.1)'deki gibi;



su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) parçalanmasını sağlar (Chelikani ve diğ., 2005; Krych-Madej ve Gebicka, 2017).

Katalazların bu genel katalitik reaksiyonu, hidrojen peroksitin iki farklı basamakta katalizlenmesi sonucu meydana gelir (Chelikani ve diğ., 2004).

İlk basamakta gerçekleşen katalitik reaksiyonda, birinci hidrojen peroksit substratı indirgenir ve enzimdeki Fe^{III} içeren ferrik formdaki ($\text{Por}-\text{Fe}^{\text{III}}$) hem grubunu oksiferril (Bileşik I, Cpd I) formuna çevirerek, Denklem (2.2)'deki gibi;



bir su molekülü meydana gelir.

İkinci basamakta gerçekleşen katalitik reaksiyonda ise ikinci hidrojen peroksit substratı, ilk katalitik basamakta oluşan Bileşik I ara bileşiğinin (Cpd I, $\text{Por}^{+\cdot}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) yeniden indirgenmesini sağlar ve enzimi doğal formu olan ferrik katalaz formuna tekrar dönüştürerek, Denklem (2.3)'deki gibi;



su ile moleküler oksijenin meydana gelmesinde görev alır (Nicholls ve diğ., 2000; Switala ve Loewen, 2002).

Enzimatik reaksiyonun ara bileşiği olan Bileşik I (Cpd I, $\text{Por}^{+\cdot}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$), oksiferril porfirin katyon radikalidir ve bir hem grubunun ($\text{Por}-\text{Fe}^{\text{III}}$), iki elektronlu oksidasyon ürünüdür (Nicholls ve diğ., 2000).

İki aşamalı katalitik reaksiyonlarda katalaz enziminin substratı olan hidrojen peroksit, hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak rol oynamaktadır (Kremer, 1970; Lardinois, 1995; Switala ve Loewen 2002).

2.2.2. Katalazların Gruplandırılması

Katalazlar; alt birimlerinin büyüklüğü, sekans grupları ve aktif bölgelerine göre üç genel gruba ayrılırlar (Loewen ve diğ., 2015): Monofonksiyonel Katalazlar, Katalaz-Peroksidazlar ve Mangan (Mn) Katalazları.

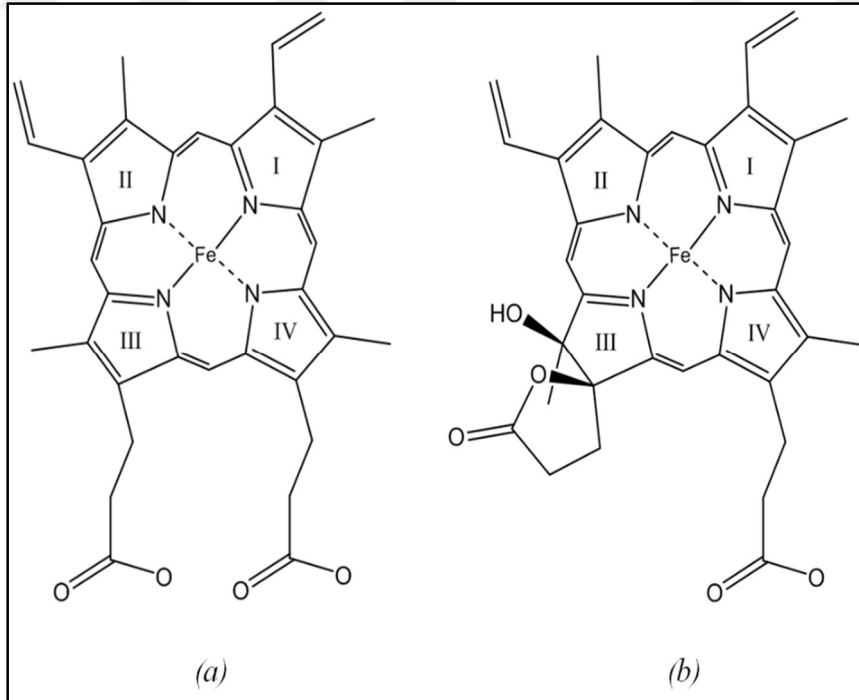
Fe/hem grubu içeren monofonksiyonel katalazlar, katalaz gruplarının en sık çalışılan grubunu oluşturmaktadır (Chelikani ve diğ., 2004; Switala ve Loewen, 2002). Mangan katalazlar ise, Fe/hem içeren katalazlara göre daha düşük spesifik aktivite sergiler (Grigoras, 2017).

Fe/hem grubu içeren monofonksiyonel katalazlar, alt birimlerinin büyüklüğüne (molekül ağırlığına) göre iki gruba ayrılır; Küçük alt birim katalazlar genelde 55-65 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahipken, büyük alt birimli katalazlar küçük alt birimli katalazlardan farklı olarak daha uzun bir karboksil terminal (C-terminal) bölgeye sahip olması nedeniyle yaklaşık olarak 80 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir (Zárate-Romero ve diğ., 2013).

Şimdiye dek karakterize edilen bütün küçük alt birimli katalazlar, protohem IX veya hem *b* grubu bulundururlar (Nicholls ve diğ., 2000). Çoğu büyük alt birimli katalazda ise protoporfirin IX'in (hem-*b*) oksitlenmiş bir formu olan hem *d* grubu yer almaktadır (Loewen ve diğ., 1993; Mate ve diğ., 2001).

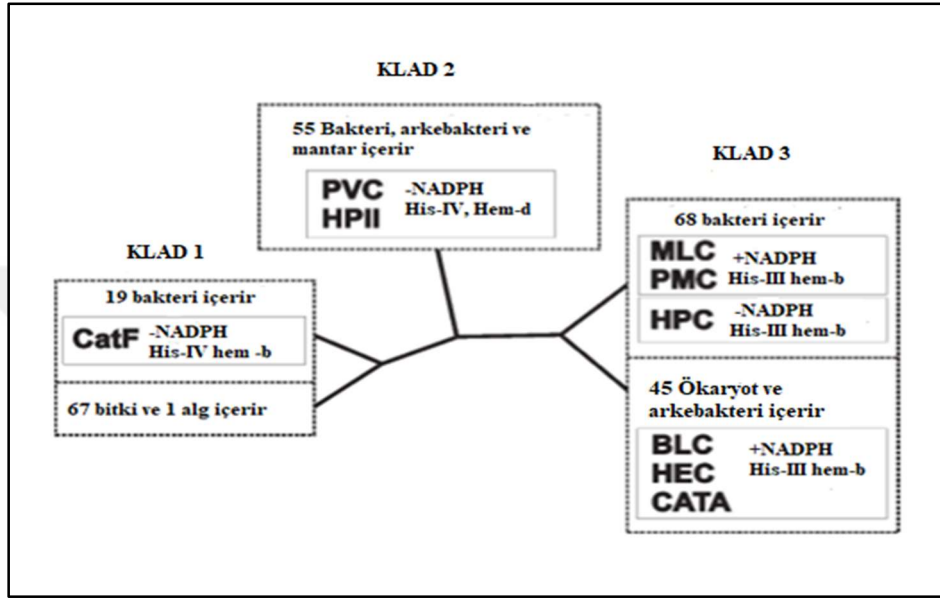
Hem-*b*'nin hem-*d*'ye oksidasyonun enzimin kendisi tarafından hidrojen peroksit varlığında gerçekleştiği rapor edilmiştir (Loewen ve diğ., 1993).

Şekil 2.5'de hem-*b* ve hem-*d*'nin yapısal farklılıkları gösterilmektedir. Hem-*d*'nin yapısındaki γ -spiro lakton halkası ile hidroksil grubunun varlığı hem-*d*'yi hem-*b*'ye göre daha asimetrik yapmaktadır (Murshudov ve diğ., 1996).



Şekil 2. 5. Hem-*b* ve hem-*d* yapıları (Yuzugullu ve diğ., 2013)

Fe/hem içeren monofonksiyonel katalazlar; arke, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunan homotetramerik enzimlerdir. Monofilitik kökenli olup üç filogenetik gruptan oluşurlar (Klotz ve Loewen, 2003). Şekil 2.6’da gösterildiği gibi; Klad 1: Yeşil alg ve bitkiler Klad 2: Arke, bakteri ve mantar ve Klad 3: Arke, bakteri, mantar ve hayvanlardan oluşmaktadır.



Şekil 2.6. Monofonksiyonel katalazların filogenetik ağacının özeti (Chelikani ve diğ., 2004)

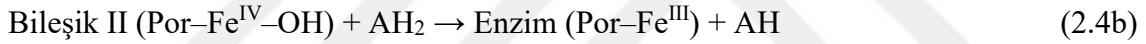
Klad 1 ve 3 grubu, genelde 55-69 kDa’lık alt birimleri içeren katalaz enzimlerini içerirken; Klad 2 grubu yaklaşık 75-86 kDa’lık daha büyük alt birimlerden oluşan katalazlara karşılık gelir (Diaz ve diğ., 2009). Klad 1 katalazlar, alt birim başına 500 amino asit kalıntısı içerir (Chelikani ve diğ., 2004; Diaz ve diğ., 2012). Klad 2 katalaz gruplarının alt birimlerinin büyüklüğü yaklaşık 150 amino asit kalıntısı içeren bir C terminal alanının varlığından kaynaklanmaktadır. Bu katalaz gruplarındaki ekstra alan, flavodoksin benzeri bir topolojiye sahiptir; fakat bu alana hiçbir nükleotitin bağlandığı rapor edilmemiştir, diğer olası rolleri ise tam olarak bilinmemektedir (Diaz ve diğ., 2012).

Klad 1 ve 2 katalazlarda bulunmayan ancak tüm Klad 3 katalazlara özgü özellik ek olarak bir NADP(H) kofaktörünün bağlanmasıdır (Kirkman ve Gaetani, 1984).

Klad 1 ve Klad 2 katalaz gruplarının hiçbirine NADP(H) kofaktörü bağlanmaması, NADP(H) dinükleotidinin katalaz aktivitesi için gerekli olmadığını göstermektedir (Diaz ve diğ., 2012).

Klad 3 katalazlarda ise moleküler yüzeye yakın olarak bulunan NAD(P)H'nin inaktif bileşik II ara ürününün oluşumunu en az seviyeye indirerek enzimin inhibisyonunu engellemek amacıyla bu tip katalazlara bağlandığı rapor edilmiştir (Nicholls, 2012).

Bir diğer büyük katalaz grubu, katalaz aktivitesine ek olarak peroksidaz aktivite gösteren katalaz-peroksidazlardır (Nicholls ve diğ., 2000). Katalaz-peroksidazlar, aktif bölgelerinde Fe/hem grubu içeren katalaz gruplarından biridir. Homodimer yapıda ve molekül ağırlığı 120-340 kDa arasında olan enzimlerdir. Katalaz-peroksidaz enzimleri, sergiledikleri katalitik aktivite ile birlikte; hidrojen peroksit substratının yeterli miktarda bulunmadığı durumlarda (Denklem 2.4a, 2.4b)' deki gibi;



peroksidaz aktivitesi de sergilemektedir (Nicholls ve diğ., 2000).

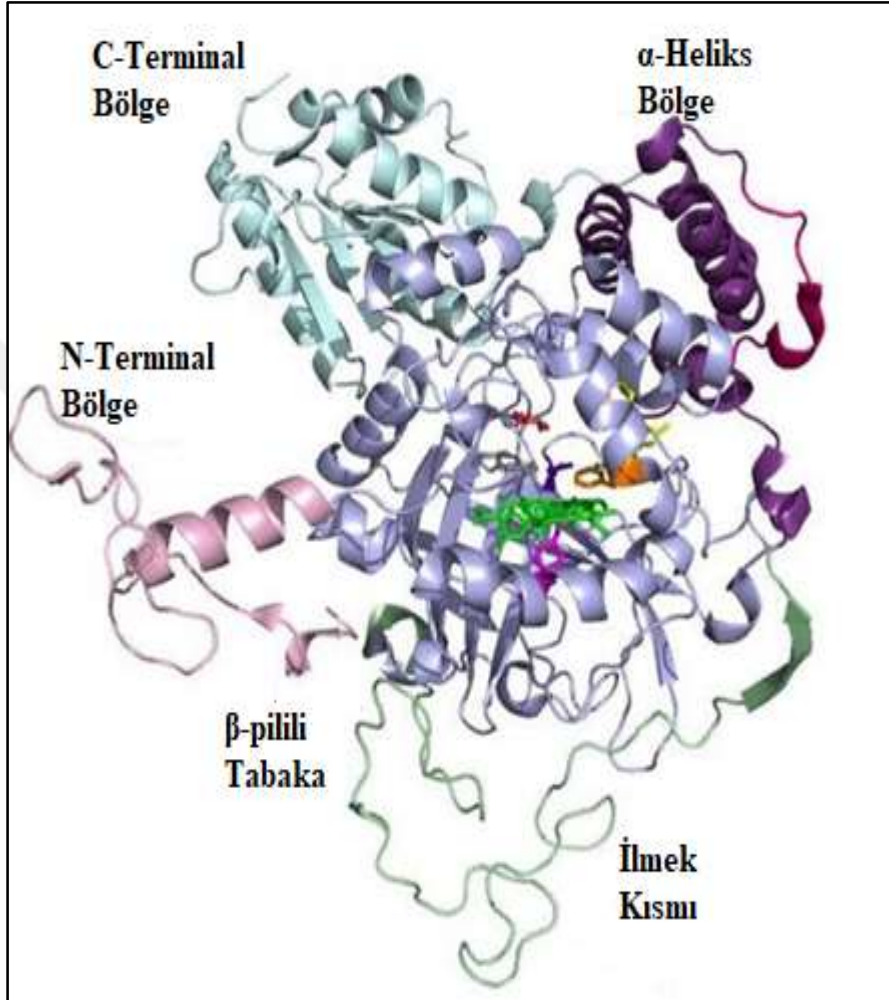
Mangan (Mn) grubu içeren katalazlar, Fe/hem grubu içermediklerinden dolayı psödo katalazlar olarak da isimlendirilir. Bu grupta bulunan katalazlar, Fe/Hem grubu içeren monofonksiyonel katalazlara göre daha az yaygındır.

2.2.3 Katalazların Genel Yapısı

Katalazlar ile ilgili yapılan çalışmalarda, üç boyutlu yapıları incelendiğinde enzimin her birinin aktif bölgesinin genel olarak korunduğu görülmüştür (Chelikani, 2003). Katalazların aktif bölgelerinde yüksek oranda korunan ve aktivitede rol oynayan önemli üç amino asit kalıntısı bulunmaktadır :Histidin (His), Serin (Ser) ve Asparajin (Asn) olmak üzeredir (Chelikani ve diğ., 2004).

Fe/hem grubu, herbir homotetramer katalaz enziminin alt birimininde yer alan aktif bölgenin içinde gömülü haldedir (Murshudov ve diğ., 1996; Nicholls ve diğ., 2000).

Katalazların herbir alt birimi beş farklı kısımdan oluşur : Amino terminal (N-terminal) bölge, 2) Anti-paralel şekilde dizilmiş sekiz β -pilili tabakadan oluşan çekirdek kısmı, 3) α -heliks ve β -pilili tabakayı birbirine bağlayan uzun ilmek kısmı, 4) α -heliks bölgesi, 5) Karboksil terminal (C-terminal) bölge (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).



Şekil 2.7. *S. thermophilum* CATPO monomerinin üç boyutlu yapısı (PDB No: 4AUM)

Monomeri oluşturan N-terminal (pembe), α -heliks (magenta), ilmek (yeşil), β pilili tabaka (mavi) ve C-terminal (siyan mavisi) bölgeleri farklı renklerde çizilmiştir.(Şekil 1.7). Aktif merkezde bulunan hem-*d* grubu yeşil renkle gösterilirken, katalitik aktivite önemli rol oynayan Tyr369, His82, Asn155, Val123, Phe160, Phe161 ve Phe 168 amino asitleri sırasıyla magenta, gri, mor, kırmızı, limon yeşili, sarı ve turuncu renklerde gösterilmiştir. (Şekil 2.7) (Yuzugullu ve diğ., 2013)

Büyük alt birimli monofonksiyonel katalazlar, uzun bir C-terminal bölgeye sahiptir (Diaz ve diğ., 2012). Küçük alt birimli katalazlar ise, her bir alt birimin çevresine sıkıca bağlanmış olan bir NADP(H) kofaktörü içerir (Diaz ve diğ., 2012). Katalaz enziminde yüzeyden oldukça uzak konumda olan aktif bölgeye erişim üç farklı kanal yardımıyla sağlanır: Ana kanal, yanal (lateral) kanal ve merkezi kanal olmak üzere (Şekil 2.8).

Aktif bölgenin distal kısmında en belirgin erişim kanalı olarak isimlendirilen ana kanal, uzun yıllardır çeşitli moleküler çalışmalarla desteklenmiş bir olgu olan hidrojen peroksit substratı için aktif alanının birincil erişim kanalı olarak kabul edilmektedir (Kalko ve diğ., 2001).

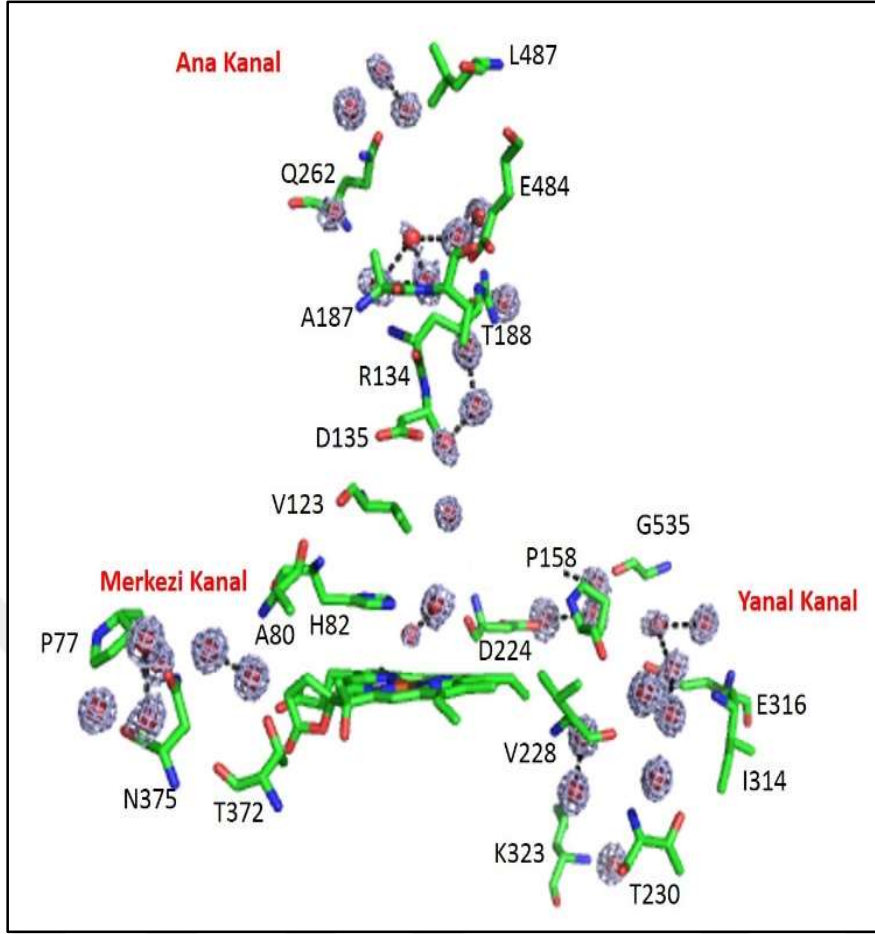
Yanal kanal yaklaşık 30 Å uzunluğuna sahip ve 590-595 amino asit içeren bir erişim kanalıdır. Yanal kanal, enzimin aktif bölgesine doğru yaklaştıkça kanal çapı daralan huni benzeri bir yapı şekline sahiptir (Murthy ve diğ., 1981).

Nikotinamid kofaktörünü bağlayabilen katalazlarda, NADP(H) bağlayıcı bölgeye denk gelen bir bölgede enzimin moleküler yüzeyinde ortaya çıkar. NADP(H) kofaktörünü bağlamayan katalazlar için yanal kanalın, reaksiyon ürünlerinin çıkışında (Diaz ve diğ., 2012) veya çeşitli substratların/inhibitörlerin girişinde görev aldığına ilişkin bazı kanıtlar mevcuttur (Sevinç ve diğ., 1999).

Merkezi kanal ise aktif bölgenin distal kısmından enzimin merkezi boşluğuna doğru uzanan bir kanaldır (Melik-Adamian ve diğ., 2001). Bu kanalın Fe/hem içeren katalazlar için hem-*b*'nin, hem-*d*'ye oksidasyonunda rol oynadığı önerilmektedir (Murshudov ve diğ., 1996; Putnam ve diğ., 2000; Sevinc ve diğ., 1999).

Fakat hem-*b* katalazlar için merkezi kanalın henüz tam olarak işlevsel açıdan bir rolü gösterilmemiştir (Chelikani ve diğ., 2004).

Enzimdeki birden çok kanalın varlığı her kanal için ayrı olarak giriş ve çıkış fonksiyonlarının mümkün olduğunu, böylece reaksiyon ürünlerinin (su ve oksijen gibi), bu çeşitli kanallar aracılığı ile aktif bölgeden uzaklaştırılabileceğini göstermiştir (Sevinç ve diğ., 1999).



Şekil 2.8. *S. thermophilum* katalazının üç kanal yapısı (Su molekülleri (kırmızı renkte) ile merkezi, yanal ve ana kanal üzerinde bulunan bazı amino asitler (yeşil renkte) gösterilmiştir)

Belirli amino asit kalıntıları ve aktif bölgeye erişim kanalları gibi topografik özellikler dahil olmak üzere, katalazların çeşitli özelliklerinin katalitik aktivite açısından önemli olduğu belirlenmiştir (Jha ve diğ., 2011). Aktif bölgeye erişim kanallarının, onları çevreleyen amino asit kalıntıları tarafından belirlenmesi ile birlikte, erişim kanallarının yapısal boyutları da katalitik aktive açısından önemli hale gelmiştir (Putnam ve diğ., 2000).

Örnek olarak; HP11 enziminin yanal kanalında bulunan bir Arjinin-Glutamat (Arg-Glu) amino asit çiftinin kanal yapısından çıkarılması durumunda kanal çapının genişleyerek H_2O_2 ayrıştırılması sonucunda meydana gelen reaksiyon ürünlerinin kanaldan daha kolay taşınımına olanak sağlanması ile birlikte enzimin k_{cat} (devir hızı) aktivitesinin yaklaşık olarak 3 kat arttığı rapor edilmiştir (Sevinc ve diğ., 1999).

2.2.4. Katalazların Endüstrideki Yeri

Katalazlar, birçok endüstriyel uygulama alanına sahiptir (Kirk ve diğ., 2002). Yüksek katalitik hıza ve yüksek stabiliteye sahip olmalarından dolayı katalazlar, endüstriyel açıdan tercih edilen biyokatalizörler arasında yer alan bir enzim grubudur (Loncar ve Fraaije, 2015).

Katalazların, peynir üretiminin belli bir kısmında rol aldığı belirlenmiştir. Peynir sütü üretimi için gıda ve ilaç uygulamasının onay verdiği miktarda hidrojen peroksit, soğuk pastörizasyon yönteminde kullanılmaktadır (Kaushal ve diğ., 2018). H_2O_2 , güçlü bir oksitleyici etkiye sahip olup hücreler açısından toksik özellik göstermesinden dolayı, peynir üretiminde rol oynayan bakteri kültürlerini sınırlamada işlev görür. Diğer taraftan sütte bulunan H_2O_2 kalıntılarının arındırılması gereklidir. Böylece, soğuk pastörizasyon aşamasından sonra sütte bulunan ROS'lerden biri olan H_2O_2 'yi uzaklaştırmak için katalaz enzimi kullanılır (Geciova ve diğ., 2002).

Bununla birlikte katalaz enzimleri tekstil ağartma endüstrisinde, yine H_2O_2 'nin ortamdan ayrıştırılması amacıyla kullanılır (Kaushal ve diğ., 2018). H_2O_2 , tekstil endüstrisi için ağartma maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Zeronian ve Inglesby, 1995). Buna ek olarak, ağartma işleminden sonra, geriye kalan yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 , boyama aşamasını etkiler (Sooch ve diğ., 2014).

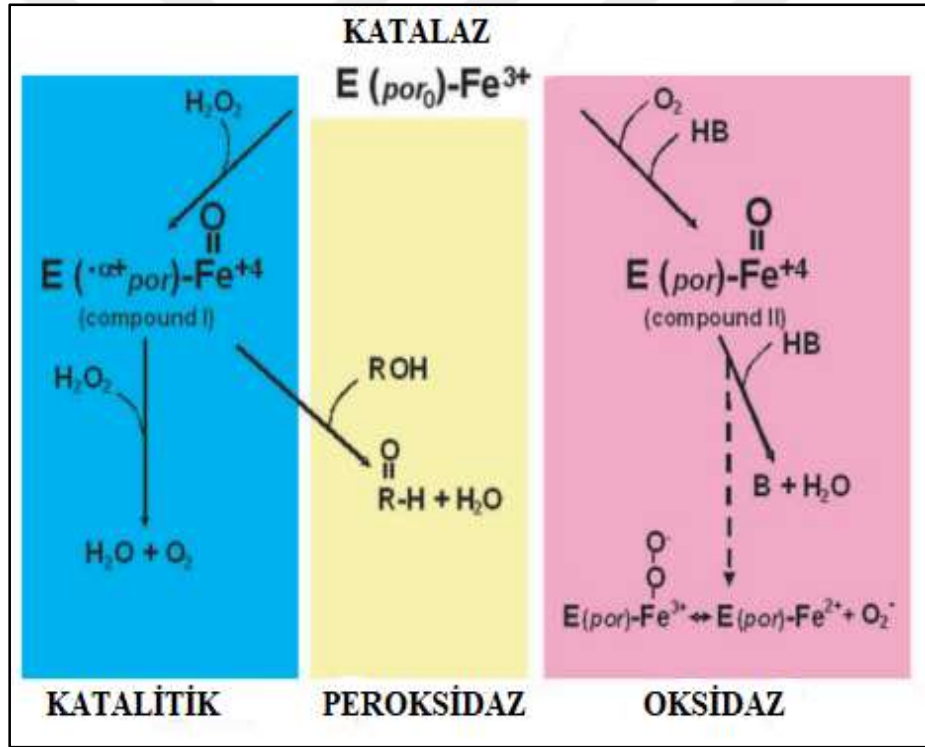
H_2O_2 'nin yüksek oranda su kullanılarak seyreltilmesi, yüksek miktarda su israfına sebep olurken sudaki H_2O_2 çevreye zarar verebilir (Yu ve diğ., 2016). Katalaz enziminin ağartma ve boyama aşamalarının arasında, ortama doğrudan eklenmesiyle H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır ve aynı zamanda yüksek miktarda su kayıplarının da önüne geçilmiş olur (Amorim ve diğ., 2002).

Enzim ve protein mühendisliğindeki son gelişmeler sayesinde, katalazların daha etkili bir şekilde yeniden tasarlanarak elde edilmesi kolaylaşacaktır. Başarılı bir rasyonel protein tasarımına örnek, *Bacillus subtilis* katalazının katalitik etkinliğinin yapılan tek bir mutasyon sonucunda 5 kat iyileştirilmesidir (Cao ve diğ., 2014). Rekombinant katalaz enzimlerinin, daha önceden ROS'un sebep olduğu birden fazla hastalığı azalttığı bildirilmiştir (Dympna ve diğ., 2007 ; Kim ve diğ., 2009).

Pnömoninin sebep olduğu akciğer hasarının tetiklenmesinde, ROS'ların önemli bir etkisi olduğu söylenmektedir. Yapılan bir çalışmada, rekombinant insan katalazının kullanılması sonucunda İnfluenza kaynaklı pnömoninin, akciğer dokularında meydana getirdiği oksidatif hasarın azaldığı tespit edilmiştir (Shi ve diğ., 2010).

2.2.5.Katalazların Çift Aktivite Yeteneği

Monofonksiyonel olarak tanımlanan katalazlardaki çift aktivite yeteneği ilk kez Vetrano ve diğ. (2005) tarafından keşfedilmiştir. Memeli hücrelerinde çalışılan katalaz enziminin substratı olan H_2O_2 yokluğunda oksidaz aktivitesi sergilediği kaydedilmiş ve memeli katalaz-oksidadı olarak isimlendirilmiştir. Memeli katalazında gerçekleşen olası reaksiyon mekanizmaları Şekil 2.9.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Memeli katalazının olası aktivite mekanizması (Vetrano ve diğ., 2005)

Önceki bölümlerde belirtildiği üzere katalazın ana fonksiyonu, H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene dönüştürerek katalitik aktivite sergilemektir. Bununla birlikte, H_2O_2 'in düşük seviyelerde olduğu durumlarda ise katalazların, düşük molekül ağırlıklı alkollerini okside ederek peroksidaz aktivite sergilediği bilinmektedir.

Peroksidaz aktivite, katalazın katalitik reaksiyon sonucunda meydana gelen Bileşik I (=Cpd I) ara ürünün düşük molekül ağırlıklı alkoller ile okside edilmesi neticesinde meydana gelmektedir.

Vetrano ve diğ., (2005) tarafından ortaya konulan oksidaz aktivitenin ise hidrojen peroksitten bağımsız olarak gerçekleştiği ve bu aktivitenin benzidin (HB) gibi kuvvetli bir indirgeyici molekül ile reaksiyondaki moleküler oksijenin, Bileşik II (=Cpd II) şeklinde isimlendirilen bir reaksiyon ara ürününün oluşumunu desteklediği ileri sürülmüştür.

Bu oluşan Bileşik II ara ürünü, elektron transferi ile okside olması sonucunda enzimin doğal formuna tekrar geri döndüğü önerilmiştir. Gerçekleşen oksidaz reaksiyonu esnasında, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali gibi radikal merkezli ara ürünlerin oluştuğu belirtilmiştir. (Vetrano ve diğ., 2005).

Daha sonra *S. thermophilum* (Kocabas ve diğ., 2008), *Bacillus pumilus* (Loewen ve diğ., 2015), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*'da (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) da benzer özelliğe sahip bir katalaz enzimi tanımlanmıştır.

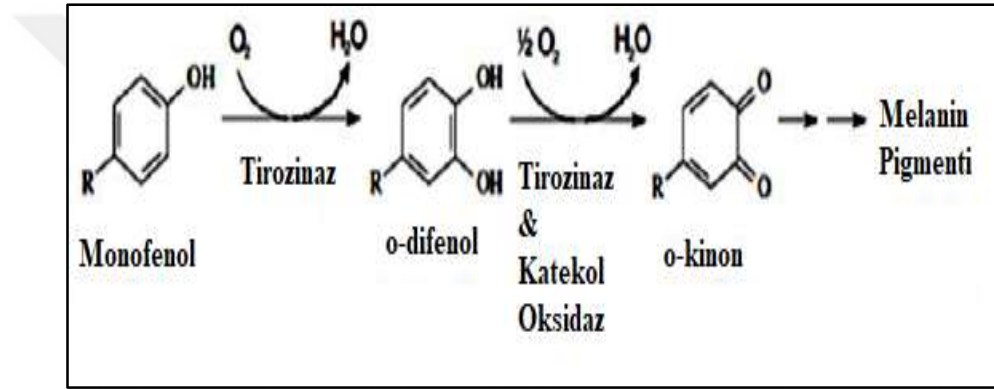
Buradan monofonksiyonel katalazlarda bu tür çift aktivite olgusunun çok daha yaygın olabileceği ve katalazın canlılarda önemli bir antioksidan olma özelliğinin yanı sıra ikincil aktivite yeteneği ile çeşitli endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak da kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

2.3. Fenol Oksidazlar

Fenol oksidazlar, farklı fenolik bileşikleri moleküler oksijen yardımı ile okside edebilen bir enzim sınıfıdır (Ögel ve diğ., 2006). Mikroorganizmalar ve bitkiler, hücre içi ve hücre dışı fenol oksidazları çeşitli amaçları gerçekleştirmek üzere üretir. Fenol oksidazlar genel olarak, fenolik maddelerin ve metal iyonlarının toksik etkilerini azaltmak ve antimikrobiyal savunmaya yardımcı olmak amacıyla üretilir (Sinsabaugh, 2010). Fenol oksidazlar lakkaz, tirozinaz ve katekol oksidaz olmak üzere başlıca üç sınıftan oluşur.

Lakkazlar, çoklu bakır atomu ihtiva eden fenol oksidaz grubundan biridir ve moleküler oksijeni suya indirgeyerek çeşitli *para*- ve *orto*-difenolik maddelerin oksidasyonunu katalizler (Endo ve diğ., 2003; Hoegger ve diğ., 2006).

Tirozinazlar, monofenol bileşiklerinin *orto*-difenollere hidroksilasyonunu ve akabinde *orto*-difenollerin moleküler oksijen aracılığı ile *orto*-kinonlara oksidasyonunu katalizleyerek melanin sentezinde görev yaparlar (Decker ve diğ., 2006). Katekol oksidazlar ise, moleküler oksijen varlığında *orto*-difenolleri okside ederek *orto*-kinonları meydana getirir (Şekil 2.10). Bu enzim sınıfı daha çok bitkilerde bulunur (Sanchez-Amat ve Solano, 1997).



Şekil 2. 10. Melanin sentez reaksiyonu (Marusek ve diğ., 2006)

Fenol oksidazlardan biri olan tirozinazlar, biyosensör olarak kullanılan enzim temelli bir biyoreseptördür ve fenol belirleyicisi olarak endüstriyel alanda kullanılırlar (Arecchi ve diğ., 2010). Biyoremediasyon uygulamalarının yanında, gıda endüstrisinde, meyve sularının özelliklerini ve hamur kıvamlarını iyileştirmek veya kağıt endüstrisinde, kağıt hamurunun delignifikasyonunda ve kağıt ağartma aşamasında klorun kullanımını azaltmak amacıyla bunun yerine lakkazlar tercih edilmiştir (Riva, 2006; Couto ve Herrera, 2006).

Katalaz enziminde gözlenen çift aktivite yeteneği bazı fenol oksidazlarda da tanımlanmıştır. Mantar tirozinaz enzimi, hidrojen peroksit varlığında katalaz aktivitesi sergileyen ilk fenol oksidaz olarak Jolley ve diğ., (1974) tarafından rapor edilmiştir. Tirozinaz enziminin bu çift aktivitesi, Garcia-Molina ve diğ., (2005) ve Yamazaki ve diğ., (2004) tarafından da araştırılmıştır.

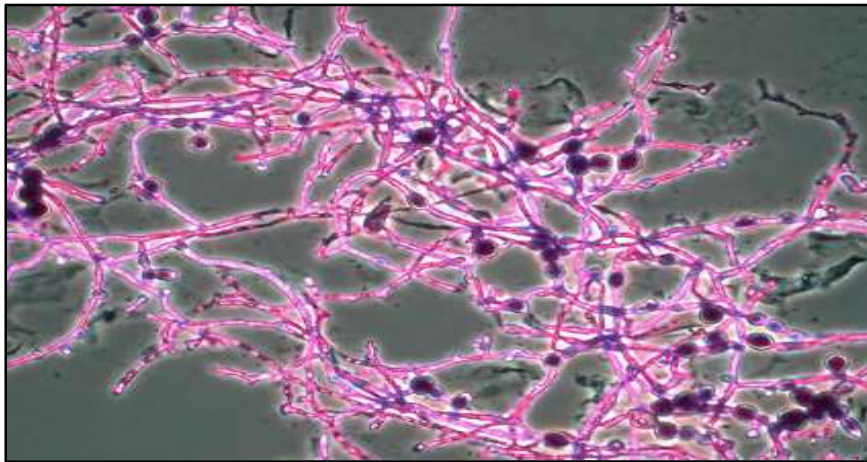
Ayrıca tatlı patatesten (*Ipomoea batatas*) elde edilen katekol oksidaz enzimin bir izozimi olan tirozinazın da katalaz aktivitesine benzer bir aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Gerdemann ve diğ., 2001).

2.4. Termofilik Mantarlar

Optimum büyüme sıcaklıkları 50-70°C aralığında olan mikroorganizmalar termofilik şeklinde isimlendirilir. Termofilik mantarlar geniş bir optimum sıcaklık aralığına sahip olup, genelde 20°C – 60°C arasında gelişim gösterebilir ve mantar kompostlama işlemlerinde çok önemli rollere sahiptirler (Crisan, 1973; Ögel ve diğ., 2001). Termofilik mantarlar, endüstri alanındaki zorlu uygulama şartlarında canlılığını koruma özelliği gösterir ve endüstriyel anlamda önemli olan termostabil enzimlerin kaynağıdır (Akram ve diğ., 2021).

2.4.1. *Scytalidium thermophilum*

Termofilik bir mantar olan *S. thermophilum* (Şekil 2.11), mantar kompostu üretiminde önemli bir rol oynar. *S. thermophilum*, 45-50°C aralığındaki sıcaklıklarda optimum bir şekilde gelişir ve yenilebilir bir mantar olan *Agaricus bisporus*'un gelişimini büyük bir ölçüde teşvik eder. Mantar miselyumunun büyümesi için farklı uyarıcı etkilere sahiptir; Ortamdaki amonyak konsantrasyon seviyesini azaltarak mantar miselyumunun büyümesine olanak sağlar ve besin maddelerini mantar miselyum büyümesi için uygun duruma getirecek şekilde hareketsizleştirir (Wiegant, 1992).



Şekil 2. 11. *S. thermophilum* ışık mikroskop görüntüsü (URL-1)

2.4.2. *S. thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidazı (CATPO)

S. thermophilum katalazı katalitik aktivitesinin yanında hidrojen peroksit yokluğunda fenolik bileşikleri (*o*-difenolik bileşik, özellikle katekol) okside edebilme yeteneğine sahiptir. Bu çift aktiviteye sahip olmasından dolayı, katalaz-fenol oksidaz veya kısaca CATPO olarak isimlendirilmiştir. CATPO enzimi, dört özdeş alt birimden (80 kDa) oluşan homotetramer bir yapıya (320 kDa) sahiptir (Kocabas ve diğ., 2008).

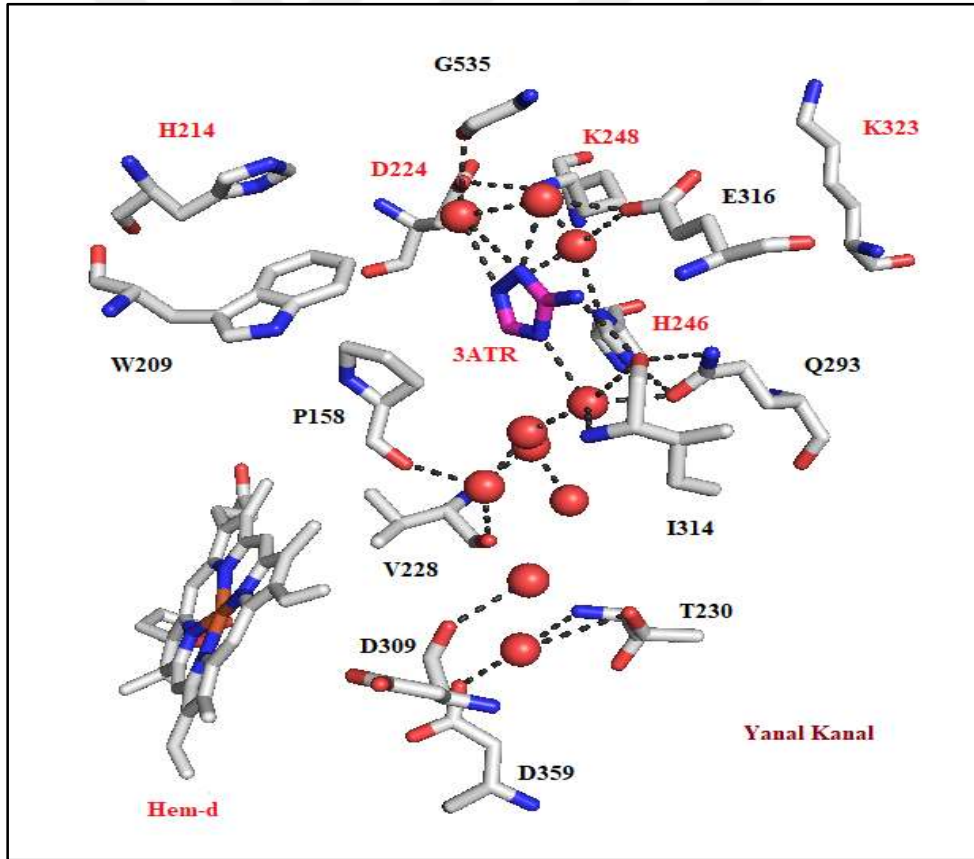
CATPO enziminde gözlenen çift aktivitenin aynı aktif merkezde gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmak üzere *catpo* geni klonlanmış ve bölge yönelimli mutagenезle incelenmiştir. Sonuçta her iki aktivitenin aynı merkezle ilişkili olduğu bulunmuştur (Yuzugullu ve diğ., 2013). Daha sonra fenol oksidaz aktivitenin enzime nasıl bir katkı sağladığını araştırmak üzere klasik bir katalaz inhibitörü olan 3-amino-1,2,4 triazol'ün (3TR) katalaz ile oluşturduğu kompleksin kristal yapısı belirlenmiştir (Şekil 2.12).

Bu çalışmanın sonucunda 3TR'nin "hem" içeren aktif bölgeye bağlanmadığı bunun yerine memeli katalazlarında yanal kanal girişinde bulunan NADPH bağlayıcı cebe karşılık gelen bir bölgede, 3TR ve oksidaz substratlarının yarışmalı (kompetatif) inhibisyon göstererek aynı cebe bağlandığı bulunmuştur. Bununla birlikte bu gözlenen yarışmalı inhibisyon sonucunda, 3TR ve oksidaz substratlarından olan katekolün enzimin katalaz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak 3TR'nin, enzimi katekole göre daha fazla inhibe ettiği gözlenmiştir (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018).

Yanal kanalda oksidatif substratlar veya inhibitörler için tespit edilen substrat/inhibitör bağlanma bölgesinin (Şekil 2.12) keşfinden sonra ikincil aktivitenin daha detaylı araştırılması üzerine yanal kanalın aktif bölgeye yakın olan kısmında yarı korunmuş halde bulunan Val228 amino asidi daha büyük ve küçük yan zincirli amino asitlere (Ala, Ser, Gly, Cys, Phe ve Ile) dönüştürülerek aktivitedeki değişimler incelenmiştir.

Val228, Ala, Gly veya Ser gibi daha küçük yan zincir grubuna sahip amino asitlere dönüştürüldüğü zaman oksidaz aktivitesinde belirgin bir artış görülmesine rağmen tüm varyantların katalitik etkinliklerinde belirgin bir düşüş görülmüştür.

Azalan katalitik etkinlikler, daha küçük yan zincir grubuna sahip amino asitlere dönüştürülmesiyle yanal kanal girişinin açılmasından dolayı aktif merkezde hidrojen peroksitin kısıtlanmasından kaynaklanabileceği şeklinde açıklanmıştır. Diğer taraftan, oksidaz aktivitesindeki artışın ise, Val228'in daha küçük yan zincir gruplarına dönüştürülmesi ile yanal kanalın genişleyerek uygun elektron donörünün aktif bölgedeki hem grubuna daha yakından yaklaşmasına izin vermesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Goc ve diğ., 2021). CATPO enzimi, çeşitli aromatik bileşiklerin veya buna benzer bileşikler içeren zengin ürünlerin antioksidan özelliğini değiştirmeyi hedefleyen gıda ve biyoteknolojik uygulamalar için değerli bir biyokatalizör olarak geliştirilebilir (Loncar ve Fraaije, 2015). Enzimin katekol, kafeik asit ve L-DOPA gibi çeşitli fenolik bileşikleri okside edebilme özelliği sayesinde endüstriyel uygulamalarda kimyasal toksisiteyi ve biyoremediasyonu azaltmak adına yararlı olabilir.



Şekil 2.12. *S. thermophilum* CATPO yanal kanalındaki 3TR bölgesi (PDB kodu: 5ZZ1) (Su molekülleri (kırmızı yuvarlak) ile yanal kanalda bulunan önemli amino asitler (gri renkte), mutasyona uğratmak için seçilen hedef amino asitler ise koyu kırmızı etiketle renklendirildi)

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Bio-Rad (Amerika) ve Tekkim (Türkiye) firmalarından temin edildi.

3.2. Plazmid, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması

Bu tez çalışmasında daha önceden hazırlanan peT28a-CATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013) olarak isimlendirilmiş *catpo* gen bölgesinin yanında Histidin etiketi (altı adet histidin amino asit kalıntısından oluşan) bulunduran bir rekombinant plazmid kullanıldı.

Farklı CATPO varyantlarının üretiminde ise *E. coli* bakterisinin iki suşu olan XL1-Blue ve BL21 (DE3)star suşları kullanıldı.

Bu suşlar, Luria Broth (LB) sıvı besiyerinde (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) ve uygun seçici antibiyotik varlığında (50 µg/mL kanamisin), 37°C’de ve bir gece boyunca orta seviyede çalkalanarak (200 rpm) büyütülmesi gerçekleştirildi.

3.3. Primer Tasarımı

BO&GA Medikal (İstanbul) firmasından satın alınan ve istenen mutasyonları içeren oligonükleotitler Tablo 3.1’de gösterilmektedir. 28 ila 40 baz uzunluğunda tasarlanan primerler için erime sıcaklığı (T_m değeri) 78°C ya da daha yüksek olacak şekilde tasarlandı. İstenen özellikteki mutasyonları içeren primerler, CATPO dizisinin her iki uç kısmından da yaklaşık 8-15 bazlık bir kısmı içerecek şekilde bulunmaktadır.

Primerlerin en az %40 oranında GC (Guanin-Sitozin) baz çifti içermesi ve GC bazları ile başlayıp GC bazları ile sonlanmasına önem gösterildi.

100 µM stok primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için hazırlanmış olan 10 µM ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerden oluşan numuneler, bölge yönelimli mutagenez yöntemine kadar -20°C koşullarında saklandı.

Tablo 3.1. Tasarlanan farklı yanıl kanal CATPO varyantı için sekans değışikliğı yapılan oligonükleotitler

Mutant	Sekans Değışikliğı	Oligonükleotitler	Tm
H214A	CAC→GCC	GGGCTATGTCTGGT <u>GCC</u> GGTATCCCGCG	78
K248A	AAA→GCC	GGCACTTC <u>GCC</u> TCTCGTCAGGGTAAAGCTAGTCTG	78
D224A	GAC→GCC	CGCGTTCTTACAGGCACATG <u>GCC</u> GGCTTCGG	83
H246A	CAC→GCC	CTGATCAAATGG <u>GCCTT</u> CAAATCTCGTCAGGGTAAAGCTC	79
K323A	AAA→GCC	CGCTCCGCTGACC <u>GCC</u> CTGGGTCTGCTGAAACTGG	82

3.4. Bölge Yönelimli Mutagenез

CATPO'nun ters zincirinde yer alan her bir tamamlayıcı oligonükleotit primeri, KOD Hot Start DNA polimeraz (Merck, Almanya) enzimi kullanılarak 25 sıcaklık döngüsünden oluşan ve yaklaşık 4 saat süren PCR ile çoğaltıldı. (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3) Oligonükleotitler her bir sıcaklık döngüsünde uzayarak, istenen özellikteki mutasyonu içeren çentikli plazmidlerin meydana gelmesini sağlamaktadır. Sıcaklık döngüsü sonrasında, PCR ürünü 1 µL *DpnI* (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimi ile yaklaşık 3 saat 37°C 'deki sıcak su banyosunda muamele edilerek bekletildi.

DpnI restriksiyon enzimi, metillenmiş ve yarı-metillenmiş olan hedef DNA'yı tanıyan bir endonükleazdır ve PCR sonrasında reaksiyon ortamındaki mutasyona uğramamış olan hedef plazmid DNA'yı tanıyarak parçalaması sonucu sadece arzu edilen mutasyonu içeren mutant plazmid DNA'nın eldesi için kullanılmaktadır.

E. coli suşundan izole edilen ve polimeraz zincir reaksiyonuna katılmayan hedef plazmid DNA metillenmiş durumda bulunduğundan dolayı *DpnI* restriksiyon endonükleaz enzimi tarafından tanınarak parçalanır.

Böylelikle ortamda endonükleaz enzimi ile muamele sonrasında yalnızca istenen mutasyonu içeren mutant plazmid DNA'sı kalmış olur. Mutasyon içeren yeni sentezlenmiş plazmid DNA ise daha sonra *E.coli* XL-1 Blue kompetan (alıcı uyumlu) hücresine aktarılmak üzere hazır duruma getirildi.

Tablo 3.2. PCR için reaksiyon karışımı (Yuzugullu, 2010)

PCR Bileşenleri	Miktar
10X KOD Buffer	5 µL
KOD Hot Start DNA Polimeraz (1 U/µL)	1 µL
Plazmid DNA (90 ng/µL)	1 µL
İleri (Forward) Primer (10 µM)	1,5 µL
Geri (Reverse) Primer (10 µM)	1,5 µL
MgSO ₄ (25 mM)	3 µL
dNTP (2 mM)	5 µL
Steril ddH ₂ O	32 µL
TOPLAM	50 µL

Tablo 3.3. Takip edilen PCR döngüsü aşamaları

Sıcaklık (°C)	Zaman	PCR Aşamaları
95	2 dak	Ön Denatürasyon
95	30 sn	Denatürasyon
55-65	30 sn	Bağlanma
68	8 dak	Uzaman
68	10 dak	Son Uzama
4	süresiz	Saklama Aşaması

PCR ürünlerinden, 5'er µL örnek kullanılarak %0,8'lik (%w/v) agaroz jel elektroforezinde 100V, 45 dakika yürütüldü.

CATPO yanal kanalında bulunan H214, K248, D224, H246 ve K323 (Şekil 2.12) amino asit kalıntılarına bölge yönelimli mutagenез uygulanması sonucunda beş farklı yanal kanal varyantı elde edildi. Oluşturulan varyantlar: H214A, K248A , D224A, H246A ve K323A'dır.

Bölge yönelimli mutagenез tekniği ile oluşturulan mutant varyantların, agaroz jel elektroforezi ile DNA bantları elde edildi.

3.5. *E. coli* Suşlarından Kompetan Hücre Eldesi

Bir gece boyunca kanamisin antibiyotiği içermeyen (Kan₅₀) katı besiyerinde (Luria Broth Agar, LBA) büyüyen kültürler aynı şekilde kanamisin içermeyen (Kan₅₀) sıvı besiyerlerine (LB) (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) inoküle edildi. Daha sonra XL-1 Blue hücreleri yaklaşık 3 saat, BL-21 hücreleri ise yaklaşık 1 saat 40 dak 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi ve 30 dak’da bir 595 nm’de optik yoğunluk (OD) değerleri ölçüldü. OD değeri yaklaşık 0,4 olduğu zaman kültürler 50 mL’lik falkon tüpler içerisinde 5 dak buz üzerinde inkübe edildi. İnkübe edilen kültürler daha sonra 4°C’de 3000 rpm’de 10 dak santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant (sıvı kısım) atılıp kalan pellet kısmı (çöken kısım) 20 mL Tfb1 (3 mM potasyum asetat, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, %15 (v/v) gliserol, pH 5,8) solüsyonu içinde çözündürüldükten sonra 4°C’de 3000 rpm’de 10 dak santrifüj edilerek çöktürüldü.

Süpernatant atılıp geriye kalan pellet kısım ise 2 mL Tfb2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, %15 (v/v) gliserol, pH 6,5) solüsyonu içerisinde çözündürüldü. Elde edilen hücreler sıvı azot (N₂) tankı içine daldırılıp dondurulduktan sonra -80°C’de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı. Bu işlem sonucunda alıcı hücreler olan XL-1 Blue ve BL-21(DE3)star suşları, kompetan (uyumlu) hücre özelliği kazanır.

3.6. Transformasyon

Transformasyon yönteminde kullanılan hücreler *E. coli*’nin kompetan (alıcı uyumlu) özelliği kazandırılmış olan XL-1 Blue ve BL21(DE3)star suşlarıdır. -80°C’deki dondurucudan çıkartılan kompetan hücreler buz üzerinde eritilip hücrelerin sıcaklığı yükselmeden 50 µL hücre kültürüne 3 µL PCR ürünü olan farklı tipte plazmid DNA örnekleri (yaklaşık 1-10 ng DNA içerecek şekilde) eklendi.

Örnekler, 30 dak buzda bekletildikten sonra 1 dak 42°C’deki su banyosunda inkübasyonda inkübasyona bırakıldı. 2 dak buz inkübasyon sonrası 450 µL LB sıvı besiyeri eklendi. 37°C’de 1 saat çalkalamalı inkübasyon ile kültürler çoğaltıldıktan sonra 8000 rpm’de 3 dak santrifüj edilerek çöktürüldü.

Santrifüj sonrası 400 µL süpernatant kısım atılarak geriye kalan 100 µL örnek ise pipetle çözöldüröldü ve 50 µg/mL kanamisin (Kan₅₀) antibiyotiğı içeren LBA katı besiyerine yayma yöntemi ile inokölasyonu gerçekteştirildi (Yuzugullu ve diğ., 2013). Alıcı uyumlu hücrelerin rekombinant mutant plazmiti içeri içermediklerini belirlemek için besiyeri ortamına seçici antibiyotik olan 50 µg/mL kanamisin (Kan₅₀) eklendi.

3.7. Plazmid DNA İzolasyonu

Transformasyon işlemleri doğrulanarak rekombinant mutant plazmidde sahip olan koloniler steril çubuk yardımı ile katı besiyerinden seçilip alınarak plazmid DNA izolasyonunda kullanılmak üzere LB sıvı besiyerine (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) inoküle edildi ve seçici antibiyotik varlığında (50 µg/mL kanamisin), 37°C’de bir gece orta düzeyde çalkalanarak (200 rpm) büyüldü.

Plazmid DNA izolasyonu, Alkalın-SDS Plazmid Miniprep yöntemine dayanan QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile firma tarafından belirtilen basamaklara uyularak gerçekteştirildi.

Bu doğrultuda; bir gece 37°C’de inkübe edilen 10 mL (LB) taze költür 10000 rpm’de 10 dak santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı. Daha sonra 250 µL “Buffer P1” eklenerek çözöldü ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 250 µL “Buffer P2” eklendi ve örnek berrak olana kadar 4 ila 6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 350 µL “Buffer N3” eklendi ve 4 ila 6 kere alt üst edilerek karıştırıldı. 13000 rpm’de 10 dak mikrosantrifüj yapılaraya çöktüröldü.

Süpernatant kısım elüsyon kolonuna alındı ve 1 dak santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzöntü kısım uzaklaştırıldı. Kolon, 500 µL “Buffer PB” eklenerek yıkandı ve 1 dak santrifüj yapılaraya çötüröldü. Kolondan geçen süzöntü uzaklaştırıldı. Kolon 0,75 mL (750 µL) “Buffer PE” eklenerek yıkandı ve 1 dak santrifüj yapıldı.

Kolondan geçen süzöntü uzaklaştırıldı. Yeniden 1 dak 13000 rpm’de santrifüj edilerek çötüröldü. Kolon 1,5 mL’lik yeni eppendorf tüpe aktarıldı ve kolona 50 mL ddH₂O (double distile su) eklendi, 1 dak beklendikten sonra 1 dak santrifüj yapılaraya plazmid DNA elde edildi. Elde edilen 50 µL plazmid DNA -20°C’de kaldırılarak muhafaza edildi.

3.8. Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Saflığının Tespiti

Bölüm 3.7’de açıklanan şekilde izole edilen plazmid DNA örneklerinin miktarı ve saflığını belirlemek üzere UV spektroskopisi kullanıldı. Örneğin içermiş olduğu DNA konsantrasyonu Şekil 3.1’de gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{l/ml}) = (\text{OD}_{260}) \times \text{Seyreltme faktörü} \times \frac{(50\mu\text{l DNA/ml})}{(1 \text{ OD}_{260} \text{ birim})}$$

Şekil 3.1. DNA miktarının hesaplanması (Zengin, 2016)

Örneklerin saflığının tespiti, UV spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin kıyaslanmasıyla belirlendi. 260/280nm oranı, örneklerin saflığını belirlemek üzere bir karşılaştırma imkanı sunmaktadır.

Saf olarak çöktürülen plazmid DNA örneklerinin 260nm/280nm dalgaboyu oranı 1,7-2,0 arasında olmalıdır.

3.9. Agaroz Jel Elektoroforezi

0,5 g agaroz hassas terazide tartıldı ve 100 mL 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) eklendi. Agaroz, mikrodalga fırında kaynatılarak çözelti berrak olana kadar çözdürüldü ve 50°C’de sıcak su banyosunda 20 dak bekletildi.

SYBR Safe (İnvitrogen, İngiltere) 5 µL olacak şekilde çözeltiye eklendi ve çalkalanarak tüm çözelti içinde dağılması sağlandı. Çözeltinin belli bir süre soğuması beklendikten sonra agaroz tabağına kenarlardan taşmayacak şekilde yavaşça döküldü ve polimerizasyon için beklemeye bırakıldı.

Jel 1X TAE tamponu içeren tanka yerleştirildi. Örnekler yükleme tamponu (6X; NEB, İngiltere) ile 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Başka bir kuyucuğa 6 µL markör (NEB, İngiltere) yüklendi. Elektroforez 100 V’da yaklaşık 60 dak yürütüldü (Yuzugullu ve diğ., 2013). Agaroz jel elektoroforezi sonrası DNA bantları, ultraviyole ışık (UV) altında görselleştirildi.

3.10. DNA Dizi Analizi

Arzu edilen mutasyonu içeren plazmid örneklerinin DNA dizi analizlerinin doğrulanması, Macrogen (Amsterdam, Hollanda) tarafından yapılarak hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3.11. CATPO Varyantlarının Üretimi

İstenen özellikteki mutasyonu içeren plazmid örnekleri DNA dizi analizi ile doğrulandıktan sonra *E. coli* BL21(DE3)star hücrelerine aktarıldı ve tek koloniden çoğaltılmış bakteri suşları LB sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra 121°C’de 20 dak otoklavda steril edilen %80 v/v gliserol eklenerek -80°C’de saklandı.

Stok kültürler daha sonra yabanıl tip (wt) CATPO proteini ve varyantlarının üretiminde kullanıldı. Bu doğrultuda; bir gece 37°C’de inkübe edilen 10 mL (LB) taze kültür, 50 µg/mL kanamisin antibiyotiği içeren 1 litrelik LB sıvı besiyerine transfer edildi.

Ardından 37°C’de yaklaşık 2 saat inkübe edilmiş ve 30 dak’da bir 595 nm’de optik yoğunluk (OD) ölçüldü. OD yaklaşık 0,6-0,8 olduğunda besiyerine 0,1 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) eklenerek 30°C ve 120 rpm’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler inkübasyon sonrasında 9000 rpm’de 15 dak santrifüj edilerek çöktürüldü ve protein saflaştırma aşamasında kullanılmak üzere -80°C’de saklandı (Yuzugullu ve diğ., 2013).

3.12. CATPO Varyantlarının Saflaştırılması

Rekombinant yabanıl tip CATPO ve 5 farklı yanıl kanal varyantının saflaştırılmasında kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilen hücreler belli bir süre buzda bekletildikten sonra 100 mL lizis tamponu (50 mM Na-HEPES, %25 (w/v) süktroz, %1 (v/v) Triton X 100, 5 mM MgCl₂.6H₂O 1 mg/mL lizozim, 5 µL benzonaz nukleaz (5KU, Sigma), 1:4 oranında EDTA içermeyen proteaz inhibitör tablet, pH 8,0) içinde yaklaşık 3 saat lizis işlemine bırakıldı.

Lizis işlemi sonrasında hücreler, 10000 rpm’de (+4°C’de) çöktürülerek supernatant sıvı kısmı bir gece diyaliz membranına konuldu ve bağlama tamponunun içinde (0,5 M NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7,4) diyaliz edilerek saflaştırılmak için hazır hale getirildi.

His-etiketi içeren rekombinant proteinlerin tek basamak şeklinde saflaştırılmasına olanak sağlayan afinite kromatografi tekniği kullanıldı.

Bu teknikte, His-etiketli protein, nikel kolon (HiTrap, 1mL) içerisine tutuklanmış olan Ni^{+2} katyonuna bağlanır. Bağlanmamış olan proteinler ise kolondan İmidazol (5-40 mM) ve NaCl (500 mM) içeren Sodyum fostat tampon çözeltisi (20 mM, pH 7,4) ile geçirilerek yıkandıktan sonra, hedeflenen protein yüksek miktarda imidazol içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi ile kolondan geri kazanılır.

Bu yöntemde 1mL’lik HiTrap kolonu AKTA Prime Plus Kromatografi cihazına (GE Healthcare, Amerika) bağlandı. Saflaştırma sırasında gerçekleştirilen tüm basamaklarda akış hızı 1 mL/dak olarak belirlendi ve tüm çözeltiler kullanılmadan önce degaze edilerek 0,22 μ m’lik filtrelerden geçirildi.

1 mL kolon cihaza bağlandıktan sonra A ve B tüpleri, öncelikle distile su ile 4 dak boyunca yıkandı. Bir sonraki aşamada, bağlama tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 5-20 mM İmidazol, pH 7,4) ile yaklaşık 20 dak boyunca yüklenmeye maruz bırakıldı ve His-etiketi içeren hedef proteinlerin kolona bağlanması için hazır hale getirildi. Lizis işlemi yapılan, hücrelerinden arındırılan ve kolona yüklemek için hazır hale getirilen hedef proteini içeren diyaliz örneği, 1 mL/dak akış hızı ile kolona yüklendi. Daha sonra kolona bağlanmamış veya zayıf bağlanmış proteinleri elimine etmek için kolon yıkama tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 40 mM İmidazol, pH 7,4) ile yaklaşık 15 dak boyunca yıkama işlemine maruz bırakıldıktan sonra elüsyon tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 500 mM İmidazol, pH 7,4) ile hedef proteinin kolondan uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Afinite kromatografisi sonucunda saf proteini içeren fraksiyonlar tek bir tüpte toplandı ve proteinlerden tuz ve imidazolü uzaklaştırmak için bir gece 20 mM Sodyum fosfat (pH 7,4) çözeltisi içinde diyaliz edildi.

Diğer basamakta ise, çözünür halde olan sodyum fosfat tamponu içerisindeki saf protein, Milipore's Amicon Ultra-15 santrifüj tüplerine aktarılmıştır ve 30 dak, 10000 rpm'de santrifüj edildi. Konsantre edilmiş örneklerdeki protein miktarı Quick Start™ Bradford Protein deneyine göre belirlendi. Konsantre edilen protein örnekleri, spektrofotometrik karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azot içinde dondurularak - 80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi.

3.13. CATPO Varyantlarının Karakterizasyonu

3.13.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan varyantların saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi uygulandı. Bu doğrultuda elektroforez, Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %5 v/v yükleme jeli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), %0,1 w/v SDS, %5 v/v Akrilamid/Bisakrilamid ve TEMED) ve %15 (v/v) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), %0,1 w/v SDS, %15 v/v Akrilamid/Bisakrilamid ve TEMED) hazırlanarak yapıldı (Laemmli, 1970). Örnekler indirgeme ajanı içeren yükleme tampon ile 90°C'de 10 dak kaynatılarak denatüre edildi. Protein markör'ü olarak EuroClone (6,5-270 kDa) kullanıldı. Elektrophorez 200 V'da yaklaşık 50 dak yürütülerek gerçekleştirildi ve yürütülen jeller Coomassie Brilliant Blue (CBB) ile boyandı.

3.13.2. UV Spektrum Analizi

Spektrofotometrik çalışmalarını kapsayan biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları, oda sıcaklığında Cary 60 UV-Visible Spektrofotometre (Agilent, Amerika) kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılmış olan yabancı tip (WT) ve 5 varyantının absorpsiyon spektra ölçümleri 200-900 nm dalgaboyu aralığında, 100 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu içerisinde ve 1 cm kvartz küvet kullanılarak gerçekleştirildi.

3.13.3. Enzim Aktivite Tayini

Katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktivite ölçüm denemeleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Katalaz aktivitesi Beers ve Sizer (1952)'in tanımladığı yöntemle dayanarak, hidrojen peroksitin tükendiği (kaybolduğu) 240 nm dalgaboyunda ölçülmüştür.

Reaksiyon karışımında 10 mM hidrojen peroksit solüsyonu, 100 mM Sodyum fosfat tampon (pH 7,0) solüsyonu ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde seyreltilmiş enzim kullanıldı. Enzim eklenmeden önce H₂O₂ substrat solüsyonu, sıcaklığın dengelenmesi 1 dak boyunca sıcak su banyosunda (60°C) inkübe edildi. Solüsyon, inkübasyon sonrası UV küvete (Brand, Almanya) alındı ve enzim eklendikten sonra 240 nm’de aktivitesi ölçüldü.

Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızını ve hidrojen peroksitin yok olma katsayısı olan 39,4 M⁻¹cm⁻¹ kullanılarak belirlendi (Merle ve diğ., 2007). Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol H₂O₂ ayrışmasını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlandı ve aşağıdaki formül ile hesaplandı. (Eşitlik 2).

Katalaz aktivitesi Şekil 3.2’de gösterilen formül ile hesaplandı:

$$\text{CAT aktivitesi (U/mL)} = \frac{(\Delta OD_{240}/\Delta t) \times (1/\epsilon) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (10^3)}{\text{Enzim hacmi (mL)}} \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (2)$$

Şekil 3.2. Katalaz aktivitesinin hesaplanması (Yuzugullu, 2010)

Katalaz aktivite ölçüm analizlerinde “kontrol/kör” olarak reaksiyon ortamına enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

Fenol oksidaz aktivitesi de aynı şekilde spektrofotometrik yöntemler ile belirlendi. Buna göre, 2 mL’lik reaksiyon sıvısı, 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içinde hazırlanmış olan 100 mM katekol çözeltisinden 0,5 ml, ortam sıvısından 0,5 ml ve tampon çözeltisinden 1 mL eklenerek hazırlandı.

60°C’de gerçekleşen reaksiyon sırasındaki katekol oksidasyon ürünü zamana karşı 420 nm’deki soğurma (absorbans) değişimi olarak belirlendi ve aktivite buna göre belirlenerek hesaplandı.

Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızını ve katekolün okside olma katsayısı olan 3450 M⁻¹cm⁻¹ kullanılarak belirlendi (Ögel ve diğ., 2006). 1 Ünite aktivite 1 nanomol Katekol’ü 1 dak’da okside edebilen enzime karşılık gelmektedir ve aşağıdaki formül ile hesaplandı (Eşitlik 3).

Fenol oksidaz aktivitesi Şekil 3.3’de gösterilen formüle göre hesaplandı:

$$PO \text{ aktivitesi (U/mL)} = \frac{(\Delta OD_{420}/\Delta t) \times (1/\epsilon) \times \text{Reaksiyon hacmi (ml)} \times (10^6)}{\text{Enzim hacmi (mL)}} \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (3)$$

Şekil 3.3. Fenol oksidaz aktivitesinin hesaplanması (Yuzugullu, 2010)

Fenol oksidaz aktivite ölçüm analizlerinde “kontrol” olarak reaksiyon ortamına enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

3.13.4. Protein Konsantrasyonu Analizi

Protein konsantrasyonu analizi Bradford Yöntemine göre belirlenmiş olup, standart protein grafiğın çizilmesinde ise protein olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı (Bradford, 1976).

1500 µL Bradford boyasına, 50 µL BSA (Sığır Serum Albümini) çözeltisi (2 mg/mL) eklendi. Örneklerin oda sıcaklığında yaklaşık 10 dak’lık inkübasyon sonrasında, 595 nm’de üç tekrar şeklinde absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda standart protein grafiğı (BSA eğrisi) çizildi (Ek B.1) ve saflaştırılan proteinlerin miktar tayini ise bu çizilen standart protein grafiğine göre belirlendi.

3.13.5. Kinetik Parametrelerin Analizi

Saflaştırılan katalaz varyantlarının 0-150 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda (Sutay, 2007) hidrojen peroksit ve katekol olarak kullanılarak hem katalaz hem de fenol oksidaz aktiviteleri ölçüldü ve K_M , V_{max} , k_{cat}/K_M (katalitik etkinlik) değerleri Lineweaver–Burk Plot ile hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

Tüm deneyler sıcaklık kontrollü bir spektrofotometre kullanılarak (Agilent, Cary 60), 60°C’de pH 7,0 olan 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

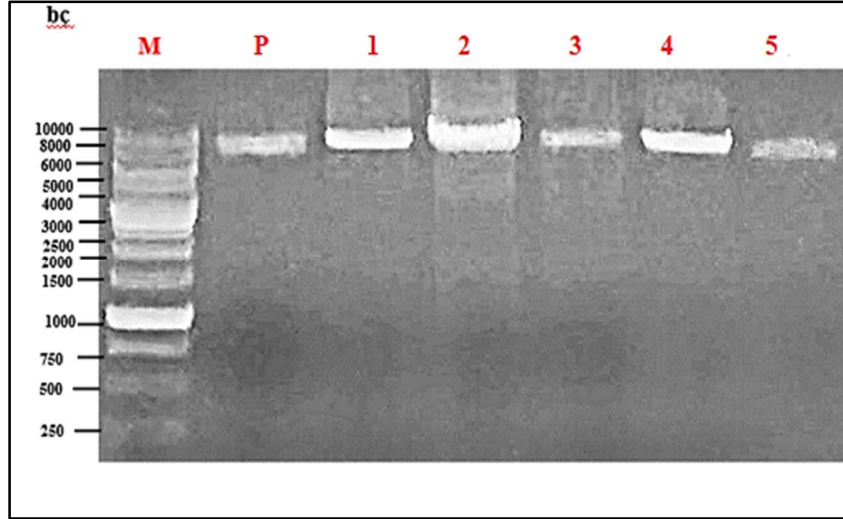
4.1. Bölge Yönelimli Mutagenез İle CATPO Varyantlarının Oluşturulması

Termofilik bir mantar olan *S. thermophilum*'un ürettiği çift aktiviteli katalaz-fenol oksidaz (CATPO) enziminin katalaz aktivitesini etkilemeden, minimum düzeylerdeki ikincil aktivitesi olan fenol-oksidadz aktivitesini arttırmak amacıyla enzimin yanal kanalında yer alan ve fenol-oksidadz aktivitede önemli olduğu düşünülen K248, H246, K323, D224 ve H214 amino asitleri üzerinde bölge yönelimli mutagenез tekniği ile mutasyonlar gerçekleştirildi.

İstenen nokta mutasyonlarını içeren mutantların oluşturulmasında QuikChange bölge yönelimli mutagenез kiti kullanıldı. Üretici firma tarafından belirtilen talimatlara göre hazırlanan mutajenik oligonükleotitler(primer) ile catpo geni Bölüm 3.4'de belirtilen şekilde mutasyona uğratıldı. Yapılan mutasyonlar sonrasında mutant catpo genini içeren plazmid, *DpnI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi ve mutant gen içermeyen plazmidlerin uzaklaştırılması sağlandı.

QuikChange bölge yönelimli mutagenез tekniğinde kullanılan mutajenik primerlerin hedef DNA ile bağlanabilmesi için 55°C - 63°C arasındaki farklı sıcaklıklar denemeler yapıldı. WT-CATPO ve varyantların yaklaşık 8 kbç uzunluğundaki DNA bantları, Şekil 4.1'de gösterilen agaroz jel elektroforezi ile gözlemlendi. H214A, K248A ve H246A mutasyonları için optimum bağlanma sıcaklığı 55,9°C; D224A mutasyonu için optimum bağlanma sıcaklığı 55-60°C (gradient PCR); K323A mutasyonu için optimum bağlanma sıcaklığı 63°C olarak saptandı.

Daha önceden CATPO ile yapılan bölge yönelimli mutagenез çalışmaları (Balcı, 2016; Zengin, 2016) ile oluşturulan çeşitli CATPO varyantları için kullanılan optimum bağlanma sıcaklıklarının bu çalışmadaki bağlanma sıcaklıklarıyla benzer olduğu görüldü. Bununla birlikte, agaroz jel elektroforezi sonucunda yaklaşık 8 kbç uzunluğunda DNA bantları gözlenerek benzer sonuçlar elde edildi ve sırasıyla marker 10 kbç ;P, Plazmid; 1, H246A; 2, H214A; 3, K248A; 4, K323A; 5, D224A şeklinde Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Bölge yönelimli mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların agaroz jel görüntüleri (M: Markör /10 kbç DNA markörü; P: Pozitif kontrol /WT-CATPO; 1 H246A; 2, H214A; 3, K248A; 4, K323A; 5, D224A)

Farklı CATPO varyantlarını içeren rekombinant plazmidlerin DNA miktarları Bölüm 3.8’de belirtilen şekilde yapılarak ölçüldü ve sonuçları Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1. Farklı mutantların plazmidlerinde bulunan DNA miktarları

Mutant	DNA Miktarı (ng/μL)
H214A	150
K248A	131
D224A	151
H246A	83
K323A	81

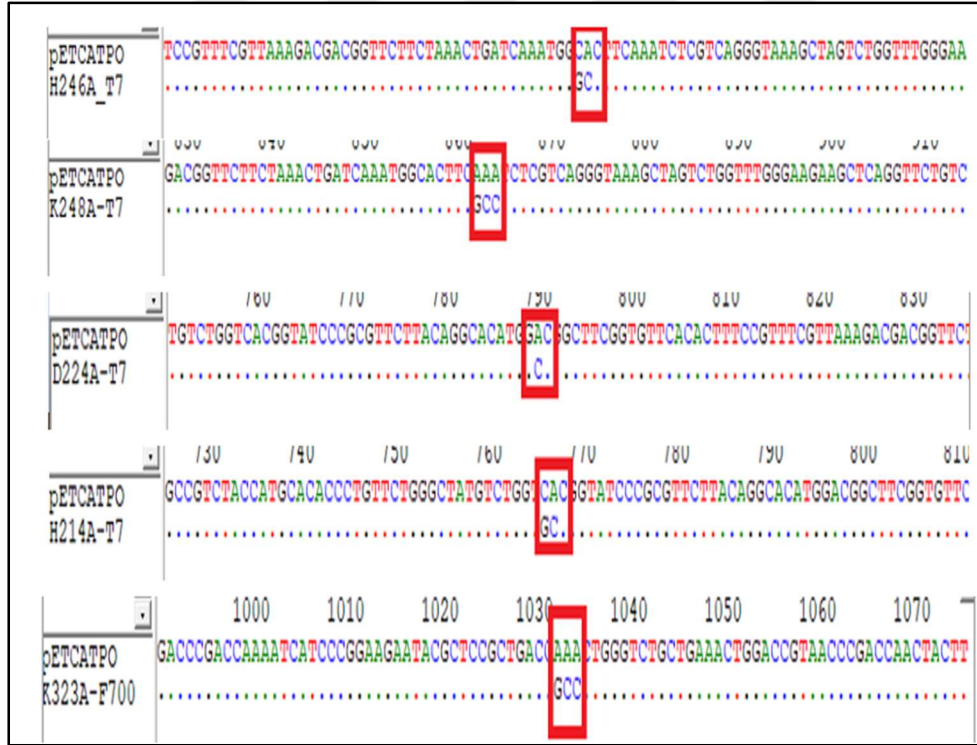
Tablo 4.1’deki verilere göre DNA sekans analizi için yeterli miktarda (≥ 80 ng/μL) plazmid DNA izolasyonu elde edildi. Yakın geçmişte CATPO ile yapılan çalışmalarda da (Balcı, 2016; Zengin, 2016), benzer miktarlarda plazmid DNA izole edildiği görüldü.

Farklı CATPO varyantlarının istenen mutasyonları içerip içermediği ise DNA sekans analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilerek Tablo 4.2’de yer alan CATPO primerlerinin kullanmasıyla doğrulandı.

Tablo 4.2. DNA sekans analizi için tasarlanan CATPO primerleri

Primer	Oligonükleotid Dizisi
CATPO_T7 (İleri)	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
CATPO_T7 (Geri)	3'-CTATAGTGAGTCGTATTA-5'
CATPO_F700 (İleri)	5'-GTCACGGTATCCCGC-3'
CATPO_R700 (Geri)	3'-GCGGGATACCGTGAC-5'

WT-CATPO plazmidine ait olan DNA sekansı ile beş mutant varyanta ait olan DNA sekansları Bioedit programı kullanılarak karşılaştırıldı ve istenen mutasyonların varlığı doğrulandı (Şekil 4.2.) WT-CATPO ile DNA sekansları kıyaslanan beş varyantın, planlanan gen bölgelerinde istenen özellikte mutasyonlar içerdiği gözlemlendi ve sekans dizilimde herhangi bir kirlilik görülmeden temiz bir sekans dizilimi elde edildi. Sırasıyla H246A, K248A, D224A, H214A ve K323A'nın DNA sekans analiz sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. WT-CATPO ve varyantların Bioedit programı ile oluşturulan ikili dizi hizalama sonuçları

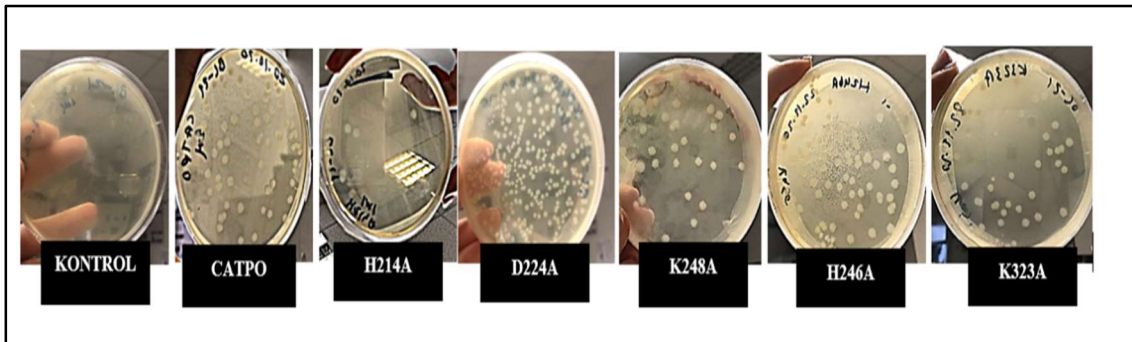
4.2. CATPO Varyantlarının E. Coli’de Rekombinant Üretimi

Farklı CATPO varyantlarının rekombinant üretiminde *E. coli* BL21 (DE3)star suşları kullanıldı. Rekombinant proteinlerin üretiminin indüklenmesinde besi ortamına farklı proteinler için kullanılan IPTG eklendi.

E. coli BL21 (DE3)star suşlarında, T7 RNA polimeraz için bir promotor bölge bulunur. T7 RNA polimeraz enzimi, bakterilerdeki protein sentezini önler ve katalaz üretimini durdurur. Besiyerine IPTG eklenmesinin ardından yalnızca mutant rekombinant plazmidi içeren varyantlardan katalaz üretimi sağlanır.

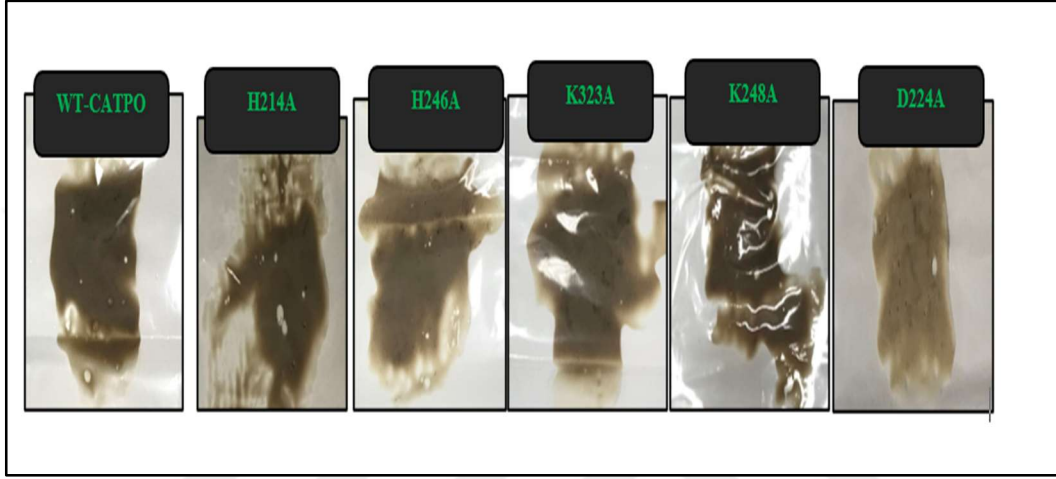
Bu doğrultuda, mutasyonu DNA sekansı ile doğrulanan mutant plazmid DNA’lar, *E. coli* BL21 (DE3)star hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. (Şekil 4.3). Negatif (su) ve pozitif kontrolleri (WT CATPO) doğrulanan transformasyonlardan, her bir mutant CATPO varyantı için petride üreyen kolonilerden tek koloni seçildi ve çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler, CATPO varyantlarının üretimi için -80°C’ de saklandı.

Şekil 4.3’de gösterilen kontrol grubunun, plazmid DNA yerine su içermesinden dolayı koloni oluşturmaması istenen bir sonuçtur. Böylece kontrol grubu göz önüne alınarak herhangi bir kontaminasyon görülmeden, diğer mutant plazmid DNA içeren petrilere koloni oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Petrilere farklı sayıda koloni gözlenmesi; BL-21 alıcı uyumlu hücrelerine transfer edilen CATPO varyantlarının, farklı sayılarda plazmid DNA içermesi ile ilgili olduğu söylenebilir. Şekil 4.3’de sırasıyla; kontrol, CATPO, H214A, D224A, K248A, H246A ve K323A gösterildi.



Şekil 4.3.CATPO varyantlarına ait plazmid DNA'ların *E.coli* BL21 (DE3)star hücrelerine transformasyonu sonrası gözlenen koloniler (Kontrol: Negatif kontrol (su), CATPO: Pozitif kontrol)

Beş farklı CATPO varyantının rekombinant üretimi, Bölüm 2.11’de belirtilen şekilde 120 rpm’de ve 30°C’de gerçekleştirildi. K248A, H246A, D224A, H214A ve K323A mutasyonlarını içeren hücrelerin tümünün yeşil renkte olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4). Daha önce CATPO ile yapılan mutasyon çalışmalarında hem-*d* grubuna sahip olan katalazlar yeşil hücre rengine sahipken, hem-*b* grubuna sahip olan katalazların ise süt kahvesi hücre rengine sahip olduğu saptanmıştır (Balcı, 2016; Zengin, 2016).



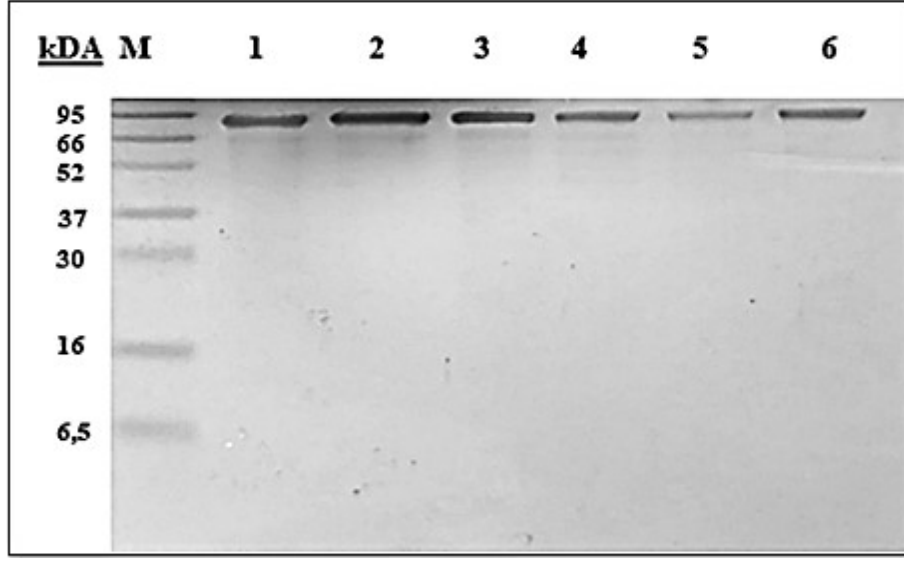
Şekil 4.4. WT-CATPO ile beş farklı varyantının çamur haline getirilen hücrelerinin kıyaslanması

4.3. CATPO Varyantlarının Afinite Kromatografi İle Saflaştırılması

Histidin etiketli WT-CATPO ve beş varyantının saflaştırılması, affinite kromatografi yöntemi ile Bölüm 3.12’de belirtilen şekilde tek basamakta gerçekleştirildi. Histidin etiketli rekombinant proteinlerin saflaştırılması için uygun olan Hi-Trap Chelating kolonu (GE Healthcare) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan tüm rekombinant CATPO varyantları histidin içermeleri sebebiyle bu proteinlerin kolon resininden elüsyonu 0,5 M tuz ve aynı miktarda imidazol içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile mümkün oldu.

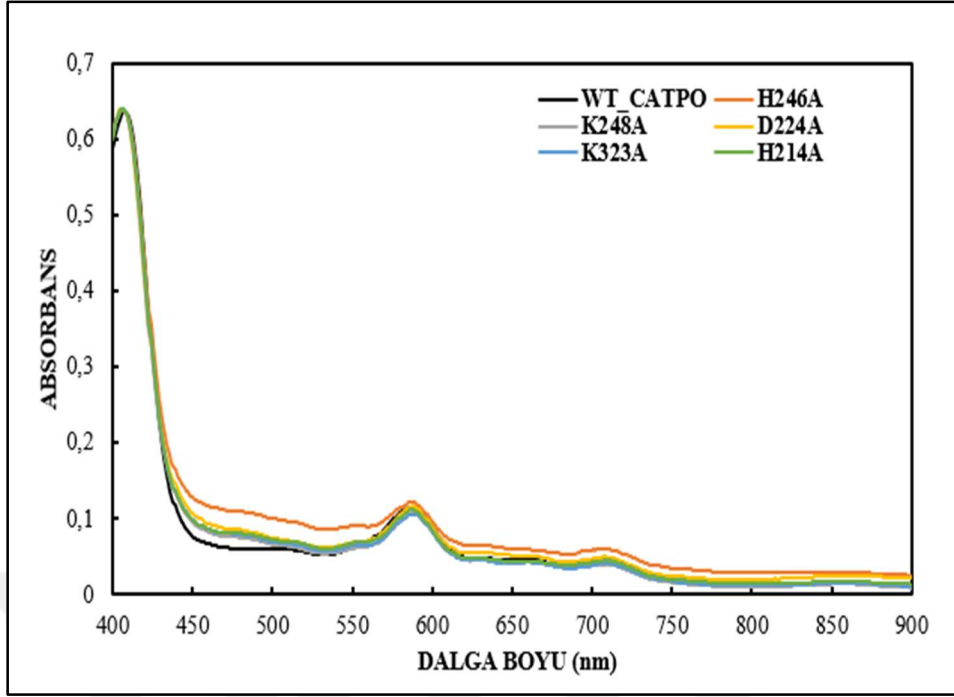
Proteinlerin saflığının kontrolü SDS-PAGE ile yapılmış olup hepsinde jel üzerinde yaklaşık 80 kDa ağırlığında tek bir bant görüldü (Şekil 4.5.) Şekil 4.5’te sırasıyla M; Protein Markör (EuroClone), 1; WT-CATPO, 2; H246A, 3; K248A, 4; H214A, 5; D224A, 6; K323A şeklinde gösterilmektedir.



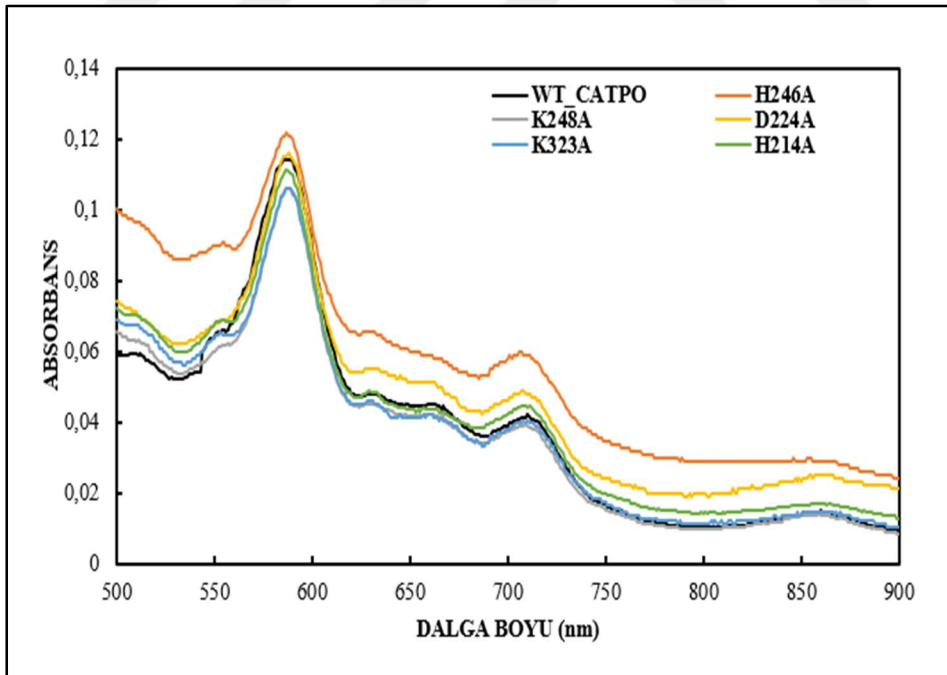
Şekil 4.5. Histidin bağlı kolon koromotografisi ile saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüsü (M; Protein Markör (EuroClone), 1; WT-CATPO, 2; H246A, 3; K248A, 4; H214A, 5; D224A, 6; K323A)

4.4 CATPO Varyantlarının UV Spektrumları

Saflaştırılan WT-CATPO ve beş farklı varyantın 200-900 nm arası UV spektrum analizleri yapıldı. Yapılan analiz sonucunda, mutantların içerdikleri “Hem” grubunun tipi ve “Hem” miktarları (R_z değeri) WT-CATPO ile kıyaslanarak değerlendirildi. Monofonksiyonel katalazlar, daha önce de belirtildiği gibi içerdikleri “Hem” gruplarına göre, Hem-*d* veya Hem-*b* grubu olmak üzere iki ayrılır. “Hem-*d*” grubu taşıyan büyük alt birimli monofonksiyonel katalazlar, UV spektrum analizinde 590 ve 715 nm’de maksimum absorbands gösterirken; “Hem-*b*” grubu taşıyan küçük alt birimli monofonksiyonel katalazların 535 ve 630 nm’de maksimum absorbands gösterdikleri saptanmıştır. Hem-*b* veya Hem-*d* grubundan en az birini içeren katalazların ise 406-408 nm’de Soret bandı gösterdikleri bilinmektedir (Loewen ve diğ., 1986; Zamocky ve Koller, 1999). Rekombinant WT-CATPO ve beş mutant proteinin UV spektrumları incelendiğinde tüm proteinlerin belirgin bir “Hem” içerdikleri gözlendi (Şekil 4.6. & Şekil 4.7.). WT-CATPO ve mutantların, içerdikleri “hem” gruplarının ise yapılan mutasyonlar sonucunda değişmeyerek “hem-*d*” grubuna sahip olduğu ve tüm varyantların “hem-*d*” grubuna özgü olan 590 nm’de maksimum absorbands gösterdiği saptandı. (Şekil 4.7)



Şekil 4.6. WT-CATPO ve yanıl kanal varyantlarına ait UV spektrumlarının kıyaslanması (408 nm’de soret bandı ile birlikte 590 ve 715 nm’de hem-*d*’nin belirleyicisi olan pikler görölmektedir)



Şekil 4.7. WT-CATPO ve beş varyantının 500-900 nm UV spektrumlarının kıyaslanması (590 ve 715 nm’de hem-*d*’nin belirleyicisi olan pikler gösterilmiştir)

R_z değerleri karşılaştırıldığında WT-CATPO ve varyantlarının içerdiği Fe/Hem miktarının benzer olduğu belirlendi (Tablo 4.3.).

Bu bulgular, protein fonksiyonu için yeterli düzeyde ‘‘Hem’’ sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir.

Tablo 4.3. Mutantların hem miktarının spektrofotometrik analizi

Varyant	R _z (A408/A280)	A590/A408	A715/A408	A535/A408	A630/A408
wtCATPO	0,8	0,18	0,06	0,08	0,06
H214A	0,8	0,17	0,07	0,09	0,08
K248A	0,8	0,17	0,06	0,09	0,07
D224A	0,8	0,18	0,07	0,09	0,08
H246A	0,7	0,19	0,09	0,10	0,10
K323A	0,7	0,16	0,06	0,09	0,07

Tablo 4.3.’deki A590/A408 ve A715/A408 absorbans oranlarının, *E. coli* HP11 katalazı ile yapılan başka bir çalışmadaki (Loewen ve diğ., 1993) hem *d* içeren varyantların absorbans oranları arasında benzerlik olduğu belirlendi.

Böylece, bu çalışmada elde edilen A590/A408 ve A715/A408 absorbans oranlarının diğer hem-*d* içeren katalazlar ile orantılı olduğu görüldü.

4.5. WT-CATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Kıyaslanması

WT-CATPO ve beş varyantının katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktivite lmleri Bölüm 3.13.3’de belirtilen şekilde yapıldı ve spesifik aktiviteleri Tablo 4.4’te kıyaslandı.

Tablo 4.4’de verilen CATPO mutantları, yanal kanal üzerinde fenolik bileşikler için tanımlanan substrat/inhibitör bağlayıcı bölgede (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018) veya bölgeye yakın mesafede yer alan His246, Lys248, Lys323, His214 ve Asp224 amino asitlerinin (şekil 2.12) hedef seçilerek daha küçük zincirli Ala amino asidine dönüştürülmesiyle oluşturuldu. Amaç, yanal kanalın genişletilerek fenolik bileşikler için daha uygun hale getirilmesi ve buna bağlı olarak oksidaz aktivitenin arttırılmasıydı.

Tablo 4.4. WT-CATPO ve varyantlarının spesifik aktiviteleri ile hem tiplerinin kıyaslanması

Varyant	Spesifik aktivite		% WT aktivite		Hem tipi
	Katalaz aktivite ($\mu\text{mol/mg/min}$)	Fenol oksidaz aktivite (nmol/mg/min)	Katalaz	Fenol oksidaz	
WT-CATPO	15700 $\pm$ 281	211 $\pm$ 2,0	100	100	<i>d</i>
H214A	2340 $\pm$ 3	360 $\pm$ 0,8	15	171	<i>d</i>
K248A	5028 $\pm$ 27	524 $\pm$ 0,8	32	248	<i>d</i>
D224A	14500 $\pm$ 175	351 $\pm$ 0,9	92	166	<i>d</i>
H246A	5875 $\pm$ 145	585 $\pm$ 0,7	37	277	<i>d</i>
K323A	14448 $\pm$ 89	443 $\pm$ 1,6	92	210	<i>d</i>

Beklenildiği gibi WT-CATPO'ya göre mutant proteinlerin hepsinin fenol-oksidadz aktivitesinde artış gözlemlendi (Tablo 4.4). Bu artışın büyükten küçüğe doğru sırasıyla; H246A, K248A, K323A, H214A ve D224A şeklinde olduğu belirlendi. Ancak, H214A, K248A ve H246A'nın katalaz aktivitelerinde sırasıyla %85, %68 ve %63 oranlarında düşüş tespit edildi.

Pozitif yüklü imidazol halkası taşıyan His214, yanal kanalda daha önceki çalışmalarda (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018) tespit edilen katalaz inhibitörü 3TR'den yaklaşık 7.8 Angstrom uzakta, inhibitör bağlanma bölgesinin yukarı kısmında yer almaktadır (Şekil 2.12). Aktif bölgeye kısmen yakın bölgede bulunan Asn156 ile polar bağ yapmaktadır. Gerçekleştirilen mutasyon sonucu oluşan Ala214 varyantında katalaz aktivitede gözlenen %85'lik kayıp bu konumda Histidin amino asidinin bulunmasının önemli olduğuna işaret etmektedir. Histidin amino asidinin protein yapısının stabilizasyonunda rol aldığı (Chelikani ve diğ., 2004) düşünüldüğünde, daha küçük yan zincirli hidrofobik bir amino asite dönüşümü (Ala) protein yapısını etkilemiş olabilir ki bu da katalaz aktivitesindeki düşüşü açıklar.

Pozitif yüklü Lys248 amino asidi yanal kanalda substrat/inhibitör bağlayıcı bölgenin (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018) yüzeyinde yer almaktadır (Şekil 2.12). Bu bölgede bulunan Asp224 ile iyonik etkileşimdedir. Ayrıca His246 ve Glu316 ile birlikte protein iç kısmındaki su molekülü ile H-bağı yapma eğilimindedir. Diğer bir deyişle, Lys248 uzun yan zinciri sebebiyle yanal kanalı daraltmakta ancak etrafındaki polar amino asitlerle etkileşim içindedir. Bu sebeple Lys248'in Ala248'e dönüşümü, yanal kanalın genişlemesi ile buraya fenolik madde geçişini hızlandırmış olabilir ancak protein tersiyer yapısını sabitleyen zayıf bağların oluşumunu engelleyebileceğinden katalitik aktivitede düşüşe sebep olmuş olabilir.

His246, yanal kanalda tanımlanan substrat/inhibitör bağlayıcı bölgede 3TR etrafında dizilmiş amino asitlerden biridir (Şekil 2.12). Daha önce gerçekleştirilen çalışmada His246'nın Trp246'a dönüşümünün katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde yabanıl tip CATPO'ya göre sırayla %35 ve %85'lik bir düşüş ile sonuçlandığı rapor edilmiştir.

Trp gibi aromatik halkaya sahip amino asidin kanalı büyük ölçüde daraltarak muhtemelen oksidatif substratların burada tutulmasını engelleyerek fenol oksidaz aktivitede önemli ölçüde düşüşe sebep olabileceği yorumlanmıştır (TÜBİTAK Proje 113Z744 Sonuç Raporu). H246W varyantının fenol oksidaz aktivitesindeki yüksek kayba rağmen katalaz aktivitesinde gözlenen nispeten düşük düzeydeki azalma göz önüne alındığında bu çalışmada H246A varyantının katalaz aktivitesinin aynı şekilde önemli düzeyde etkilenmeden fenol oksidaz aktivitesinin artması beklendi.

Tahmin edildiği gibi H246A'nın fenol oksidaz aktivitesinde %277'lik bir artış tespit edilmesine rağmen katalaz aktivitesinde %63 oranda düşüş gözlemlendi. Bu durum fenolik bileşiklerin 'hem' içeren aktif bölgeye yönelimi sonucu H₂O₂'nin aktif bölgede tutunma süresinin etkilenmesinden kaynaklı olabilir. Bu bulgular doğrultusunda; yapılan mutasyonlar sonucunda yanal kanal çapının genişlemesine bağlı olduğu düşünülerek WT CATPO enzimine göre tüm mutantların fenol-oksidad aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Spesifik aktivite analizi sonrası elde edilen bulgular, WT-CATPO enzimine göre tüm varyantların fenol-oksidad aktivitelerinin yaklaşık 2 ila 3 kat arttığını göstermektedir.

Böylece tüm mutantların, yapılan mutasyonlar neticesinde daha kısa yan zincir grubuna sahip olan Alanin (Ala) amino asidine dönüştürülmesi ile yanal kanal çapının genişlemesine bağlı olduğu düşünülerek kanaldan fenolik bileşiklerin aktif bölgeye erişiminin kolaylaşması ve enzimin fenol-oksidaz aktivitesinin artırılması sağlandı.

Ancak, WT-CATPO'ya göre tüm varyantlar arasından sadece K323A ve D224A varyantlarının katalaz aktiviteleri düşmeden fenol oksidaz aktivitelerinde bir artış görüldüğü tespit edildi. Diğer taraftan tüm varyantların “Hem” tiplerinde herhangi bir değişikliklik kaydedilmemekle birlikte WT-CATPO ile mutantların “d-tipi hem” grubuna sahip oldukları belirlendi (Tablo 4.4.).

Yanal kanal ile yapılan benzer bir çalışmada (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018), bu kanalda çeşitli fenolik bileşikler için bir susbtrat/inhibitör bağlanma bölgesinin varlığına işaret edilmiştir. Bu çalışmada gerçekleştirilen mutasyonlar sonucunda ise WT-CATPO enzimine göre tüm mutantların fenol oksidaz aktivitelerindeki artış, burada çeşitli fenolik bileşikler için substrat bağlayıcı bölgenin varlığını desteklemektedir.

Sonuç olarak, WT-CATPO'ya göre tüm varyantların oksidaz aktivitelerinde artış görülmekle birlikte katalaz aktivitesi düşmeden fenol-oksidaz aktivite açısından daha aktif olan K323A ve D224A varyantlarının oluşturulması gerçekleştirildi. Böylece K323A ve D224A varyantlarının, etkin bir enzim geliştirilmesi için istenen şartları sağlayan ve katalaz aktivitesi düşmeden fenol oksidaz aktivitesi artan varyantlar olduğu görüldü.

4.6. CATPO Varyantlarının Kinetik Analizlerinin Kıyaslanması

WT-CATPO ve beş varyantının kinetik özelliklerinin karşılaştırılması hem katalaz hem de fenol oksidaz aktiviteleri ölçülerek yapıldı. WT-CATPO ve mutantların artan H_2O_2 konsantrasyonlarında katalaz aktiviteleri ölçülerek kinetik analizleri Bölüm 3.13.5'de belirtildiği şekilde yapıldı ve Tablo 4.5'te kıyaslandı. Michaelis-Menten sabitlerinden biri olan K_M değeri, enzimin subtrata olan affinitesinin (ilgisinin) bir göstergesi olarak bilinir. Yüksek K_M değeri substrat için daha düşük bir affiniteyi gösterirken, düşük bir K_M değeri ise substrat için daha yüksek bir afiniteyi gösterir.

V_{max} değeri ise bir enzimin ulaşabileceği maksimum hız değerini temsil etmektedir. Enzimin katalitik devir sayısı olarak da bilinen k_{cat} değeri, her enzim bölgesinin birim zamanda substratı ürüne dönüştürme sayısıdır. k_{cat}/K_M oranı ise, katalitik etkinlik olarak tanımlanır (Rogers ve Gibon, 2009).

Tablo 4.5. WT-CATPO ve varyantlarının katalaz aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri

Protein	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{dak}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
WT-CATPO	10	500000	203000	20300
H246A	75	2500000	2358875	31452
K248A	67	1666666	1397852	20970
K323A	50	1000000	943657	18873
H214A	43	1428571	1572584	36700
D224A	33	1111111	1223461	36741

Tablo 4.5'teki verilere göre WT-CATPO enziminin K_M değerinin CATPO varyantlarına göre düşük olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü WT-CATPO enziminde Fe/hem içeren aktif bölgeye, yanıl kanaldan erişilebilirlik kanal üzerinde bulunan amino asit kalıntıları ile sınırlanır ve böylece aktif bölgeye H_2O_2 dışındaki substratların yanıl kanaldan erişimi bu şekilde engellenerek H_2O_2 'ye olan ilgi artmış olur.

Yanal kanaldaki hedef amino asitlerin daha düşük yan zincirli amino asite dönüştürülerek H_2O_2 dışındaki fenolik bileşiklerin erişiminin sağlanmasıyla K_M değerinin yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur. Spesifik aktivite sonucu ile tutarlıdır.

K_M değerinin yanı sıra genel olarak tüm varyantlarda V_{max} ve k_{cat} değerleri de WT CATPO'ya oranla artış gösterdi. Buna bağlı olarak katalitik etkinliklerini belirleyen k_{cat}/K_M değerlerinde WT-CATPO'ya göre önemli bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 4.5.).

Bu istenilen bir sonuç olup hedef seçilen amino asitlerin katalaz aktivitesi yerine daha çok fenol-oksidadz aktivite üzerinde rol oynadığına işaret etmektedir.

Tüm varyantların k_{cat} oranlarının yabancıl tip enzime göre artmış olması (Tablo 4.5.), bu durumun kanal genişlemesine ile reaksiyon ürün salınımının kanaldan daha fazla kolaylaşması ile ilgili olduğu düşünülebilir.

Yanal kanal ile gerçekleştirilen başka bir benzer çalışmada ise *E.coli* HP11 katalazının (Sevinc ve diğ., 1999) yanal kanalında bulunan R260 amino asit kalıntısı hedef seçilerek, R260A mutasyonu sonucu yanal kanalın genişletilmesi ile reaksiyon ürünlerinin kanaldan daha kolay salınımının gerçekleştiği ve H_2O_2 dışındaki çeşitli bileşiklerin aktif bölgeye erişiminin de kolaylaştığı söylenmiştir.

Mutant varyantın katalitik devir hızındaki (k_{cat} değeri) artışın ise yanal kanaldan ürün salınımının daha fazla kolaylaşmasından kaynaklanabileceği söylenmiştir. Böylece, amino asit kalıntılarının daha kısa yan zincir grubuna dönüştürülmesi ile (alanin) k_{cat} değerlerinin artması sonucunda benzer yorumlar yapılabilir.

Bu sonuçlar doğrultusunda tüm varyantların, yapılan mutasyonlar sonucunda daha kısa yan zincir grubuna sahip olan Alanin (A) amino asidine dönüştürülmesiyle doğal enzime (WT-CATPO) göre K_M , k_{cat} ve V_{max} değerlerinin arttığı gözlemlendi.

Katalaz aktivitesine bağlı katalitik etkinlikte (k_{cat}/K_M) belirgin bir değişikliğin görülmemesi ise, hedef seçilen mutasyonların daha çok fenol oksidaz aktivite üzerinde rol oynadığından kaynaklanabileceğini doğrulamaktadır. Bu durum istenilen bir sonuç olup spesifik aktivite sonuçları ile tutarlıdır.

Bununla birlikte, tüm mutantlar ile yapılan mutasyonlar sonucunda kanal çapının genişlemesi ile muhtemelen fenolik bileşiklerin aktif bölgeye erişmesine bağlı olarak H_2O_2 'ye olan ilginin azaldığı ve bunun doğrultusunda K_M değerlerinin doğal enzime göre arttığı belirlendi.

Doğal enzime göre varyantların k_{cat} değerlerindeki artışın ise, yanal kanal ile yapılan başka bir benzer çalışmada da (Sevinc ve diğ., 1999) belirtildiği gibi kanalın genişlemesi sonucu aktif bölgeden reaksiyon ürün salınımının daha fazla kolaylaşması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

WT-CATPO ve mutantların artan katekol konsantrasyonlarda fenol-oksidadz aktiviteleri ölçülerek kinetik analizleri yapıldı ve Tablo 4.6’da gösterildi.

Tablo 4.6. WT-CATPO ve varyantlarının fenol-oksidadz aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri

Protein	K_M (mM)	V_{max} (nmol mL ⁻¹ dak ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
WT-CATPO	33	25000	23809	733
H246A	15	50000	47178	3145
K248A	10	33333	27957	2796
K323A	20	33333	31455	1572
H214A	23	25000	27520	1223
D224A	25	25000	27528	1101

Tablo 4.6.’daki bulgulara göre, çalışılan tüm varyantlarda K_M değeri WT-CATPO’ya göre daha düşük çıkmış olup CATPO varyantlarının katekole ilgisi doğal enzime göre daha yüksektir. Bu durum, WT-CATPO’ya göre tüm varyantlarda gözlenen artan fenol oksidadz aktivitesi (Tablo 4.4.) ile tutarlıdır.

Bununla birlikte k_{cat}/K_M değerlerinin de doğal CATPO’ya göre belirgin bir şekilde arttığı belirlendi. Doğal CATPO’ya göre tüm varyantların katekole bağlı katalitik etkinliklerindeki bu belirgin artışın, hedef seçilen amino asitlerin katalaz aktivitesi yerine daha çok fenol-oksidadz aktivite üzerinde rol oynadığını desteklemektedir.

CATPO varyantlarının V_{max} değerlerinin kıyaslanmasına göre H246A hariç doğal enzime göre belirgin bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 4.6.). Nitekim, H246A mutantının katekole bağlı katalitik etkinliğinde (k_{cat}/K_M) doğal CATPO enzimine göre yaklaşık 4 kat artış görüldü. Bu durum H246A’nın, doğal CATPO enzimine kıyasla diğer varyantlar içinde en yüksek fenol oksidadz aktiviteye sahip olması ile tutarlıdır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.6.’daki verilere göre, WT-CATPO enzimine kıyasla mutantların katalitik etkinliklerinde (k_{cat}/K_M) sırasıyla büyükten küçüğe doğru; H246A, K248A, K323A, H214A ve D224A şeklinde artış görüldü.

Katekole bağlı katalitik etkinlikleri açısından değerlendirildiğinde tüm varyantlarda genel olarak bir artış görüldü ancak en yüksek artış H246A ve K248A varyantlarında gözlendi. Bu bulgular, spesifik aktivite sonuçlarını desteklemektedir.

Sonuç olarak, kinetik analizlere göre katalitik aktivite değişmeden fenol oksidaz aktivitede tüm varyantlarda artış gözlendi. En yüksek artış H246A ve K248A'da tespit edildi. Ancak spesifik aktivite bulgularına göre bu varyantların katalaz aktivitelerinde önemli düşüşler görüldü. Bu sebeple, spesifik aktivite ve kinetik analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde istenen koşulları sağlayan varyantların K323A ve D224A olduğu tespit edildi.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, çift aktiviteli CATPO enziminin katalitik etkinliğini arttırmak amacıyla bölge yönelimli mutasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, CATPO enziminin katalaz aktivitesini etkilemeden çok düşük seviyede gerçekleştiği tanımlanan ikincil fenol oksidaz aktivitesini arttırmak üzere, yanal kanalda bulunan farklı amino asitler (K248, H246, K323, D224 ve H214) hedef seçilerek bölge yönelimli mutageniz tekniği ile istenen mutasyonlar oluşturuldu.

Oluşturulan her bir mutantın UV-spektrum sonuçlarına bakıldığında, ‘hem’ gruplarının tipleri yapılan mutasyonlar sonucunda değişmeyerek WT-CATPO ile aynı olduğu ve tüm mutantların *d'* tipi ‘Hem’ grubuna sahip olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte WT-CATPO enzimi ile diğer mutantların içermiş olduğu “hem” miktarlarının ise (R_z değerleri) benzer olduğu gözlemlendi. Diğer bir deyişle tasarlanan mutasyonlar aktif enzim oluşumunu destekler niteliktedir.

WT-CATPO ve beş varyantın katalaz ve fenol oksidaz aktiviteleri kıyaslandığında, varyantların fenol oksidaz aktivitelerinde yaklaşık 2-3 kat artış görüldü. WT-CATPO’ya göre mutantların fenol oksidaz aktivitelerinin büyükten küçüğe doğru sırasıyla H246A (%277), K248A (%248), K323A (%210), H214A (%171) ve D224A (%166) şeklinde olduğu tespit edildi.

Böylece tüm varyantların, gerçekleştirilen mutasyonlar sonucunda daha kısa yan zincir grubuna sahip olan Alanin (A)’e dönüştürülmesi ile yanal kanal çapının genişleyerek kanaldan fenolik bileşiklerin ‘hem’ içeren aktif bölgeye erişiminin kolaylaşması ve enzimin düşük seviyelerdeki ikinci aktivitesi olan fenol-oksidaz aktivitesinin artırılması sağlandı.

Diğer taraftan, K323A ve D224A hariç diğer varyantların (H214A, K248A ve H246A) katalaz aktivitelerinde düşüş gözlemlendi. Böylece, etkin bir enzim geliştirmek için istenen şartları sağlayan ve WT-CATPO’ya göre katalaz aktivitesi düşmeden fenol oksidaz aktivite açısından daha aktif olan varyantların K323A ve D224A olduğu belirlendi.

WT-CATPO ve beş varyantın artan hidrojen peroksit konsantrasyonlarında katalaz aktiviteleri ölçülerek kinetik analizleri yapıldı. Artan hidrojen peroksit'e bağlı kinetik analiz parametreleri, WT-CATPO'ya göre tüm mutantların K_M , V_{max} ve k_{cat} değerlerinde artış olduğunu gösterdi.

WT-CATPO'ya göre K_M değerlerindeki artış, tüm mutant varyantların H_2O_2 'ye olan ilgisinin azaldığına işaret etmektedir. Ek olarak H_2O_2 'ye bağlı kinetik analiz sonucunda göre tüm mutantların katalitik etkinliklerinde (k_{cat}/K_M) WT CATPO'ya göre önemli bir değişiklik görülmedi. Bu durum, istenen bir sonuç olmakla birlikte hedef seçilen amino asitlerin katalaz aktivitesi yerine daha çok fenol oksidaz aktivite üzerinde rol oynadığına işaret etmektedir.

WT-CATPO ve beş varyantın artan katekol konsantrasyonlarında fenol oksidaz aktiviteleri ölçülerek kinetik analizleri de yapıldı. Artan katekole bağlı kinetik analiz parametrelerine göre, WT-CATPO'ya göre tüm varyantların K_M değerlerinin daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, tüm mutantların WT-CATPO'ya kıyasla katekole olan ilgisinin arttığını göstermekte olup varyantların spesifik aktivite sonuçları ile tutarlıdır. Buna ek olarak, WT-CATPO'ya göre fenol oksidaz aktiviteye bağlı katalitik etkinliklerinde (k_{cat}/K_M) ise 2 ila 4 kat bir artış görüldü. Bu veriler, hedef seçilen amino asitlerin daha çok fenol oksidaz aktivite üzerinde rol oynadığını desteklemektedir. Sonuç olarak, spesifik aktivite ve kinetik analizler birlikte değerlendirildiğinde katalaz aktivitesi düşmeden fenol oksidaz aktivitesi artan ve katalitik etkinlik açısından doğal enzime göre daha aktif olan varyantların K323A ve D224A olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi ile katalaz aktivitesi düşmeden fenol oksidaz aktivite ve katalitik etkinlik açısından doğal CATPO enziminden daha aktif olan iki varyant elde edildi. Gerçekleştirilen bu çalışmanın, gelecekte enzim ve protein mühendisliği çalışmaları için yol gösterici olacağına inanılmaktadır. Yapılan bu çalışmaya öneri olarak; varyantlara ait aktivitedeki değişimi gözlemlemek için çeşitli inhibitörler aracılığı ile bir inhibisyon çalışması, fenol oksidaz aktivitesi artan mutant varyantların enzimin yanal kanal yapısında meydana getirdiği değişimlerin moleküler analizi için X ışını kristalografisi ve oksidaz aktivitesini yüksek düzeyde arttırmaya yönelik farklı mutant varyantların oluşturulması hedeflenebilir.

KAYNAKLAR

- Abouzari, A.,Fakheri, B. A. (2015). Reactive Oxygen Species Generation, Oxidative Damage and Signal Transduction. *International Journal of Life Sciences*,9(5),3-17.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. (2005). Reactive Oxygen Species and Development In Microbial Eukaryotes. *Trends in microbiology*, 13(3), 111-118.
- Akram, F., Akram, R., Haq, I. U., Nawaz, A., Jabbar, Z., Ahmed, Z. (2021). Biotechnological Eminence of Chitinases: A Focus on Thermophilic Enzyme Sources, Production Strategies and Prominent Applications. *Protein and peptide letters*,28(9),1009-1022.
- Amorim A. M., Gasques M. D. G., J. Andreus, M. (2002). Scharf, The Application Of Catalase For The Elimination Of Hydrogen Peroxide Residues After Bleaching Of cotton fabrics. *An. Acad. Bras. Cien*, 74, 433-436.
- Andreoletti, P., Pernoud, A., Sainz, G., Gouet, P., Jouve, H. M.(2003). Structural Studies Of Proteus Mirabilis Catalase In Its Ground State, Oxidized State and In Complex With Formic Acid. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(12), 2163-2168.
- Arecchi, A., Scampicchio, M., Drusch, S., Mannino, S. (2010). Nanofibrous Membrane Based Tyrosinase-Biosensor For The Detection of Phenolic Compounds. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2), 133-136.
- Balcı S. (2016). Scytalidium thermophilum Katalazı Yanal Kanalınnın Katalitik Aktivitede Rolünün Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli , 455541.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N. (2006). Oxidative Stress and Differentiation In Neurospora Crassa.*Microbiology*, 75(4), 427-431.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cao W, Kang Z, Liu S, Liu L, Du G, Chen J. (2014). Improved Catalytic Efficiency Of Catalase From Bacillus Subtilis By Rational Mutation Of Lys114. *Process Biochem*, 49(9),1497–1502.
- Chelikani, P., Carpena, X., Fita, I., Loewen, P. C.(2003). An Electrical Potential In The Access Channel Of Catalases Enhances Catalysis. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(33), 31290–31296.

- Chelikani, P., Carpena, X., Perez-Luque, R., Donald, L. J., Duckworth, H. W., Switala, J., Loewen, P. C. (2005). Characterization Of A Large Subunit Catalase Truncated By Proteolytic Cleavage. *Biochemistry*, 44(15), 5597-5605.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004). Diversity Of Structures And Properties Among Catalases. *Cellular And Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chelikani, P., Ramana, T., Radhakrishnan, T. M. (2005). Catalase: A Repertoire Of Unusual Features. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, 20(2), 131-135.
- Chen, N., Teng, X. L., Xiao, X. G. (2017). Subcellular Localization Of A Plant Catalase Phenol Oxidase, Accatpo, From Amaranthus And Identification Of A Non Canonical Peroxisome Targeting Signal. *Frontiers In Plant Science*, 8, 1345.
- Couto, S. R., Herrera, J. L. T. (2006). Industrial And Biotechnological Applications Of Laccases: A Review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513.
- Crisan, E. V. (1973). Current Concepts Of Thermophilism And The Thermophilic Fungi. *Mycologia*, 65(5), 1171-1198.
- Curtin, J. F., Donovan, M., Cotter, T. G. (2002). Regulation And Measurement Of Oxidative Stress In Apoptosis. *Journal Of Immunological Methods*, 265(1-2), 49-72.
- Day, B. J. (2009). Catalase And Glutathione Peroxidase Mimics. *Biochemical Pharmacology*, 77(3), 285-296.
- Decker, H., Schweikardt, T., Tucek, F. (2006). The First Crystal Structure Of Tyrosinase: All Questions Answered. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(28), 4546-4550.
- Diaz, A., Horjales, E., Rudino-Pinera, E., Arreola, R., Hansberg, W. (2004). Unusual Cys-Tyr Covalent Bond in a Large Catalase. *Journal of Molecular Biology*, 342(3), 971-985.
- Diaz, A., Loewen, P. C., Fita, I., Carpena, X. (2012). Thirty Years Of Heme Catalases Structural Biology. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 525(2), 102-110.
- Diaz, A., Valdés, V. J., Rudino-Pinera, E., Horjales, E., Hansberg, W. (2009). Structure Function Relationships In Fungal Large-Subunit Catalases. *Journal Of Molecular Biology*, 386(1), 218-232.
- Dympna, M.P., E.Z. Tahereh, R. John, O.A. Ali, J. Mohammad, U. Luis, J.M. Edmund, And L.M. Lin, (2007). Antioxidants Preserve Macrophage Phagocytosis Of Pseudomonas Aeruginosa During Hyperoxia. *Free Radic Biol Med*, 42, 1338-1349.

- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., Ueda, K. (2003). Enzymological Characterization Of Epoa, A Laccase-Like Phenol Oxidase Produced By *Streptomyces Griseus*. *Journal Of Biochemistry*, 133(5), 671-677.
- Fattman, C. L., Schaefer, L. M., Oury, T. D. (2003). Extracellular Superoxide Dismutase In Biology And Medicine. *Free Radical Biology And Medicine*, 35(3), 236-256.
- Feofilova, E.P., Tereshina, V.M. (1999). Thermophilicity Of Mycelial Fungi In The Context Of Biochemical Adaptation To Thermal Stress. *Applied Biochemistry And Microbiology*, 35(5), 486-494.
- Fita, I., Rossmann, M. G. (1985). The NADPH Binding Site On Beef Liver Catalase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 82(6), 1604-1608.
- Fita, I., Silva, A. M., Murthy, M. R. N., And Rossmann, M. G. (1986). The Refined Structure Of Beef Liver Catalase At 2.5 Å Resolution. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 42(5), 497-515.
- Garcia-Molina, F., Hiner, A.N.P., Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Canovas, F., Tudela, J. (2005). Mushroom Tyrosinase: Catalase Activity, Inhibition And Suicide Inactivation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53, 3702-3709.
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. (2002). Methods For Disruption Of Microbial Cells For Potential Use In The Dairy Industry A Review. *International Dairy Journal*, 12(6), 541-553.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Magrini, A., Meyer, H.E., Rompel, A., Spener, F., Krebs, B. (2001). Isoenzymes Of *Ipomoea Batatas* Catechol Oxidase Differ In Catalase-Like Activity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1548, 94-105.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive Oxygen Species And Antioxidant Machinery In Abiotic Stress Tolerance In Crop Plants. *Plant Physiology And Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Goc, G., Balci, S., Yorke, B. A., Pearson, A. R., Karakus, Y. Y. (2021). Probing The Role Of Val228 On The Catalytic Activity Of *Scytalidium* Catalase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins And Proteomics*, 1869(8), 140662.
- Goth, L., Rass, P., Páy, A. (2004). Catalase Enzyme Mutations And Their Association With Diseases. *Molecular Diagnosis*, 8(3), 141-149.
- Grigoras, A. G. (2017). Catalase Immobilization A Review. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 1-20.

- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., Kües, U.(2006). Phylogenetic Comparison And Classification Of Laccase And Related Multicopper Oxidase Protein Sequences. *The FEBS Journal*, 273(10), 2308-2326.
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A.(2018). First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) And Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role In The Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal Of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Jha, V., Louis, S., Chelikani, P., Carpena, X., Donald, L. J., Fita, I., Loewen, P. C. (2011).Modulation Of Heme Orientation And Binding By A Single Residue In Catalase HP11 Of Escherichia Coli. *Biochemistry*, 50(12), 2101–2110.
- Jolley, R.L. Jr., Evans, L.H., Makino, N., Mason, H.S.(1974).Oxytyrosinase. *The Journal Of Biological Chemistry*,249(2),335-345.
- Kalko, S. G., Gelpi, J. L., Fita, I., Orozco, M.(2001). Theoretical Study Of The Mechanisms Of Substrate Recognition By Catalase. *Journal Of The American Chemical Society*, 123(39), 9665–9672.
- Karakus, Y. Y. (2020). Typical Catalases: Function And Structure. Bagatini, M. D. (Ed), *In Glutathione System And Oxidative Stress In Health And Disease* (1-16), London UK: Intechopen.
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A.,Arya, S. K.(2018).Catalase Enzyme: Application In Bioremediation And Food Industry. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199.
- Kim, D.W., H.J. Jeong, H.W. Kang, M.J. Shin, E.J. Sohn, M.J. Kim, E.H. Ahn, J.J. An, S.H. Jang, K.Y. Yoo, M.H. Won, T.C. Kang, I.K. Hwang, O.S. Kwon, S.W. Cho, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi. (2009).Transduced Human PEP-1-Catalase Fusion Protein Attenuates Ischemic Neuronal Damage. *Free Radic Biol Med* , 47, 941-952.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C.(2002). Industrial Enzyme Applications.*Current Opinion In Biotechnology*,13(4), 345-351.
- Kirkman, H. N., Gaetani, G. F. (1984).Catalase: A Tetrameric Enzyme With Four Tightly Bound Molecules Of NADPH.*Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 81(14), 4343-4347.
- Kirkman, H. N., Galiano, S.,Gaetani, G. F.(1987). The Function Of Catalase-Bound NADPH. *Journal Of Biological Chemistry*, 262(2), 660-666.
- Klotz, M. G., Loewen, P. C. (2003). The Molecular Evolution Of Catalatic Hydroperoxidases: Evidence For Multiple Lateral Transfer Of Genes Between Prokaryota And From Bacteria Into Eukaryota. *Molecular Biology And Evolution*, 20(7), 1098-1112.

- Kocabas, D. S., Bakir, U., Phillips, S. E., Mcpherson, M. J., Ogel, Z. B.(2008). Purification, Characterization, And Identification Of A Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium Thermophilum*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 79(3), 407-415.
- Koclar Avcı G, Coruh N, Bolukbasi U, Ogel ZB. (2013). Oxidation Of Phenolic Compounds By The Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase (CATPO) From *Scytalidium Thermophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(2):661–672.
- Kowaltowski, A. J., De Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria And Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology And Medicine*, 47(4), 333–343.
- Kremer, M. L.(1970). Peroxidatic Activity Of Catalase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 198(2), 199-209.
- Krych-Madej, J., Gebicka, L. (2017). Interactions Of Nitrite With Catalase: Enzyme Activity And Reaction Kinetics Studies. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 171, 10–17.
- Kulys, J., Kriauciunas, K., Vidziunaite, R.(2003). Biphasic Character Of Fungal Catalases Inhibition With Hydroxylamine In Presence Of Hydrogen Peroxide. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2), 79-85.
- Laemmli, U. K.(1970). Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lambert, A.J., Brand, M. D.(2009). Reactive Oxygen Species Production By Mitochondria. *In Mitochondrial DNA Humana Press*, 165–181.
- Lardinois, O. M., Mestdagh, M. M., Rouxhet, P. G. (1996). Reversible Inhibition And Irreversible Inactivation Of Catalase In Presence Of Hydrogen Peroxide. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure And Molecular Enzymology*, 1295(2), 222-238.
- Lardinois, O. M.(1995). Reactions Of Bovine Liver Catalase With Superoxide Radicals And Hydrogen Peroxide, *Free Radical Research*, 22(3), 251-274.
- Lei, X. G., Zhu, J. H., Cheng, W. H., Bao, Y., Ho, Y. S., Reddi, A. R., Arner, E. S.(2016). Paradoxical Roles Of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms And Health Implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307-364.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The Determination Of Enzyme Dissociation Constants. *Journal Of The American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Loewen P. C., Switala J.(1986). Purification And Characterization Of Catalase HPII From *Escherichia Coli* K12. *Biochemistry And Cell Biology*, 64, 638-646.

- Loewen P. C., Switala J., Von Ossowski I., Hillar A., Christie A., Tattre B., Nicholls P. (1993). Catalase HPII Of *Escherichia Coli* Catalyzes The Conversion Of Protoheme To Cis-Heme D. *Biochemistry*, 32, 10159-10164.
- Loewen P. C., Villanueva J., Switala J., Donald L. (2015). Unprecedented Access Of Phenolic Substrates To The Heme Active Site Of A Catalase: Substrate Binding And Peroxidase-Like Reactivity Of *Bacillus Pumilus* Catalase Monitored By X Ray Crystallography And EPR Spectroscopy. *Proteins*, 83, 853-866.
- Loewen, P. C., Klotz, M. G., Hassett, D. J. (2000). Catalase An Old Enzyme That Continues To Surprise Us. *ASM News*, 66(2), 76-82.
- Loncar, N., Fraaije, M. W. (2015). Catalases As Biocatalysts In Technical Applications Current State And Perspective. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(8), 3351-3357.
- Loncar, N., Fraaije, M. W. (2015). Not So Monofunctional A Case Of Thermostable *Thermobifida Fusca* Catalase With Peroxidase Activity. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(5), 2225-2232.
- Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J. K. (2006). Comparative Analysis Of Polyphenol Oxidase From Plant And Fungal Species. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 100, 108-123.
- Mate M., Murshudov G., Bravo J., Melik-Adamyan W., Loewen P. C., Fita I. (2001). Heme-Catalases. In: *Encyclopedia Of Inorganic And Bioinorganic Chemistry*, 486-502.
- Melik-Adamyan, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Mate, M. J., Fita, I., Loewen, P. C. (2001). Substrate Flow In Catalases Deduced From The Crystal Structures Of Active Site Variants Of HPII From *Escherichia Coli*. *Proteins: Structure, Function, And Bioinformatics*, 44(3), 270-281.
- Merle, P. L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., Furla, P. (2007). Catalase Characterization And Implication In Bleaching Of A Symbiotic Sea Anemone. *Free Radical Biology And Medicine*, 42(2), 236-246.
- Murshudov, G. N., Grebenko, A. I., Barynin, V., Dauter, Z., Wilson, K. S., Vainshtein, B. K., Fita, I. (1996) Structure Of The Heme D Of *Penicillium Vitale* And *Escherichia Coli* Catalases. *Journal Of Biological Chemistry*, 271(15), 8863-8868.
- Murthy, M. R. N., Reid, T. J., Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M. G. (1981). Structure Of Beef Liver Catalase. *Journal Of Molecular Biology*, 152(2), 465-499.

- Nantapong, N., Murata, R., Trakulnaleamsai, S., Kataoka, N., Yakushi, T., Matsushita, K.(2019). The Effect Of Reactive Oxygen Species (ROS) And ROS-Scavenging Enzymes, Superoxide Dismutase And Catalase, On The Thermotolerant Ability Of *Corynebacterium Glutamicum*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 103(13), 5355-5366.
- Nicholls P., Fita I., Loewen P. C.(2000).Enzymology And Structure Of Catalases.*Advances In Inorganic Chemistry*,51, 51-106.
- Nicholls, P.(2012).Classical Catalase: Ancient And Modern. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 525(2), 95-101.
- Ögel Z. B., Yarangümeli K., Dü H., Ifrij İ.(2001). Submerged Cultivation Of *Scytalidium Thermophilum* On Complex Lignocellulosic Biomass For Endoglucanase Production. *Enzyme And Microbial Technology*,28, 689-695.
- Ögel, Z. B., Yüzügüllü, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D., Demir, A. S. (2006).Production, Properties And Application To Biocatalysis Of A Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase From The Thermophilic Fungus *Scytalidium Thermophilum*.*Applied Microbiology And Biotechnology*,71(6),853-862.
- Persson, T., Popescu, B. O., Cedazo-Minguez, A.(2014). Oxidative Stress In Alzheimers Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail.*Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 1–11.
- Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I.(2013). Achieving The Balance Between ROS And Antioxidants: When To Use The Synthetic Antioxidants.*Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 1-11.
- Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., Tainer, J. A.(2000). Active And Inhibited Human Catalase Structures: Ligand And NADPH Binding And Catalytic Mechanism.*Journal Of Molecular Biology*, 296(1), 295-309.
- Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y.(2012).Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis And Redox Regulation In Cellular Signaling.*Cellular Signalling*, 24(5), 981-990.
- Riva, S. (2006).Laccases: Blue Enzymes For Green Chemistry.*TRENDS In Biotechnology*, 24(5), 219-226.
- Rogers, A., Gibon, Y.(2009). Enzyme Kinetics: Theory And Practice. Schwender J. (Ed), *Plant Metabolic Networks* (71-103), New York: Springer.
- Rovira, C.(2005). Structure, Protonation State And Dynamics Of Catalase Compound II. *Chemphyschem*,6(9), 1820-1826.

- Sanchez-Amat, A., Solano, F.(1997).A Pluripotent Polyphenol Oxidase From The Melanogenic Marine *Alteromonas* Sp Shares Catalytic Capabilities Of Tyrosinases And Laccases. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 240,787-792.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative Stress: Molecular Perception And Transduction Of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 38(7), 995-1014.
- Schrader, M., Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes And Oxidative Stress. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766.
- Schriner, S. E., Linford, N. J.(2006). Extension Of Mouse Lifespan By Overexpression Of Catalase. *Age*, 28(2), 209-218.
- Sevinc, M. S., Mate, M. J., Switala, J., Fita, I., Loewen, P. C.(1999). Role Of The Lateral Channel In Catalase HPII Of *Escherichia Coli*.*Protein Science*, 8(3), 490-498.
- Shi X., Shi Z., Huang H., Zhu H., Zhou P., Ju D.(2010).Therapeutic Effect Of Recombinant Human Catalase On H1N1 Influenza-Induced Pneumonia In Mice. *Inflammation*, 33(3), 166–172.
- Sicking, W., Korth, H. G., De Groot, H., Sustmann, R. (2008). On The Functional Role Of A Water Molecule In Clade 3 Catalases: A Proposal For The Mechanism By Which NADPH Prevents The Formation Of Compound II. *Journal Of The American Chemical Society*, 130(23), 7345-7356.
- Sies, H.(1991).Oxidative Stress: From Basic Research To Clinical Application. *The American Journal Of Medicine*, 91(3), S31-S38.
- Sinsabaugh, R. L.(2010).Phenol Oxidase, Peroxidase And Organic Matter Dynamics Of Soil.*Soil Biology And Biochemistry*, 42(3), 391-404.
- Sooch B. S., Kauldhar B. S., Puri M. (2014).Recent Insights Into Microbial Catalases: Isolation, Production And Purification. *Biotechnol. Adv*, 32,1429-1447.
- Soysal, Ç., Söylemez, Z. (2005).Kinetics And Inactivation Of Carrot Peroxidase By Heat Treatment. *Journal Of Food Engineering*, 68(3), 349-356.
- Straatsma, G., Samson, R. A., Olijnsma, T. W., Den Camp, H. J. O., Gerrits, J. P., Van Griensven, L. J. (1994). Ecology Of Thermophilic Fungi In Mushroom Compost, With Emphasis On *Scytalidium Thermophilum* And Growth Stimulation Of *Agaricus Bisporus* Mycelium. *Appl. Environ. Microbiol*,60(2), 454-458.

- Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E. V., Mcpherson M. J., Ogel Z. B. (2008). Purification, Characterization, And Identification Of A Novel Bifunctional Catalase Phenol Oxidase From *Scytalidium Thermophilum*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 79, 407-415.
- Sutay Kocabas, D., Pearson, A. R., Phillips, S. E., Bakir, U., Ogel, Z. B., Mcpherson, M. J., Trinh, C. H. (2009). Crystallization And Preliminary X-Ray Analysis Of A Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium Thermophilum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology And Crystallization Communications*, 65(5), 486-488.
- Sutay, D.(2007).Purification, Characterization, Crystallization And Preliminary X-Ray Structure Determination Of *Scytalidium Thermophilum* Bifunctional Catalase And Identification Of Its Catechol Oxidase Activity. Doktora Tezi, METU,Ankara,198742.
- Switala, J., Loewen, P. C.(2002).Diversity Of Properties Among Catalases. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*,401(2), 145–154.
- Takeda, A., Miyahara, T., Hachimori, A., Samejima, T.(1980).The Interactions Of Thiol Compounds With Porcine Erythrocyte Catalase.*The Journal Of Biochemistry*, 87(2), 429–439.
- Teng, X. L., Chen, N., Xiao, X. G.(2016). Identification Of A Catalase-Phenol Oxidase In Betalain Biosynthesis In Red Amaranth (*Amaranthus Cruentus*). *Frontiers In Plant Science*, 6, 1228.
- Thannickal, V. J.,Fanburg, B.L.(2000).Reactive Oxygen Species In Cell Signaling.*American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology*,279(6), 1005-1028.
- Tuomela, M. (2000). Biodegradation Of Lignin In A Compost Environment: A Review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169–183.
- URL-1: https://www.diark.org/diark/species_list/scytalidium_thermophilum, (Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2020).
- URL-2 :http://web.expasy.org/compute_pi/, (Ziyaret Tarihi: 5 Ocak 2020).
- Valetti, N. W., Pico, G. (2013). A Friendly Method For *Raphanus Sativus* L (Wild Radish) Peroxidase Purification By Polyelectrolyte Precipitation. *Separation And Purification Technology*, 119, 1-6.
- Vetrano A. M., Heck D. E., Mariano T. M., Mishin, V., Laskin, D. L.,Laskin, J. D. (2005). Characterization Of The Oxidase Activity In Mammalian Catalase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 280(42), 35372-81.

- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2010). Mechanisms Of Catalase Activity Of Heme Peroxidases. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 500(1), 74-81.
- Wiegant, W. M. (1992). Growth Characteristics Of The Thermophilic Fungus *Scytalidium Thermophilum* In Relation To Production Of Mushroom Compost. *Applied And Environmental Microbiology*, 58(4), 1301-1307.
- Yamazaki, S., Morioka, C., Itoh, S. (2004). Kinetic Evaluation Of Catalase And Peroxygenase Activities Of Tyrosinase. *Biochemistry*, 43, 11546-11553.
- Yu Z., Zheng H., Zhao X., Li S., Xu J., Song H. (2016). High Level Extracellular Production Of A Recombinant Alkaline Catalase In *E. Coli* BL21 Under Ethanol Stress And Its Application In Hydrogen Peroxide Removal After Cotton Fabrics Bleaching. *Bioresour. Technol*, 214, 303-310.
- Yuzugullu Karakus, Y., Goc, G., Balci, S., Yorke, B. A., Trinh, C. H., Mcpherson, M. J., Pearson, A. R. (2018). Identification Of The Site Of Oxidase Substrate Binding In *Scytalidium Thermophilum* Catalase. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(10), 979-985.
- Yuzugullu Y. (2010). Functional And Structural Analysis Of Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium Thermophilum*. Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 255456.
- Yuzugullu, Y., Ögel, Z. B., Bölükbaşı, U., Coruh, N., Karakaş, G. (2011). Production Of A Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase Of *Scytalidium Thermophilum* In The Presence Of Phenolic Compounds. *Turkish Journal Of Biology*, 35(6), 697-704.
- Yuzugullu, Y., Trinh, C. H., Fairhurst, L., Ogel, Z. B., Mcpherson, M. J., Pearson, A. R. (2013). Investigating The Active Centre Of The *Scytalidium Thermophilum* Catalase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology And Crystallization Communications*, 69(4), 369-375.
- Yuzugullu, Y., Trinh, C.H., Smith, M.A., Pearson, A.R., Phillips, S.E.V., Sutay Kocabas, D., Bakir, U., Ogel Z.B., Mcpherson, M.J. (2013). Structure, Recombinant Expression And Mutagenesis Studies Of The Catalase With Oxidase Activity From *Scytalidium Thermophilum*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(3), 398-408.
- Yüzügüllü, Y., Ögel, Z. B. (2013). Çift Aktiviteli Katalaz-Fenol Oksidazının ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi. *Gıda*, 38(2), 111-118.
- Zamocky M., Koller F. (1999). Understanding The Structure And Function Of Catalases Clues From Molecular Evolution And In Vitro Mutagenesis. *Progress In Biophysics Molecular Biology*, 72, 19-66.

- Zarate-Romero, A., Stojanoff, V., Rojas-Trejo, S. P., Hansberg, W., Rudino-Pinera, E. (2013). Conformational Stability And Crystal Packing: Polymorphism In *Neurospora Crassa* CAT-3. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology And Crystallization Communications*, 69(7), 753–758.
- Zengin M.(2016). Scytalidium Thermophilum Katalaz-Fenol Oksidaz Enzimi Ana Kanal Yapısının Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 10122189.
- Zeronian S. H. (1995). Inglesby M. K, Bleaching Of Cellulose By Hydrogen Peroxide, *Cellulose*. 2, 265-272.





Ek-A

Besiyeri ve Çözeltiler

Luria Broth (1 litre)

10 g Tripton
5g Maya Ekstratı
10 g NaCl
Son hacim 1 litre

Luria Broth Kanamisin Agar (1 litre)

10 g Tripton
5g Maya Ekstratı
10 g NaCl
20 g Agar-agar
Son hacim 1 litre. Besiyerine 50 µg/mL kanamisin (Kan₅₀) eklenir.

EDTA (0,5 M, pH 8)

7,3 g EDTA tartılır, 30 mL distile su ile çözündürülür. pH 8,0 olana kadar 1 M NaOH eklenir, 0,22 µm'lik filtreden geçirilir.

IPTG (1 M)

2,4 g IPTG tartılır, 10 mL distile su içerisinde çözündürülür ve filtreden geçirilir. -20°C' de saklanır.

Lizis Tamponu (100 mL)

50 mM HEPES (Na Salt)
%25 (w/v) Sükroz
%1 (v/v) Triton-X 100
5 mM MgCl₂·6H₂O
Son hacim 100 mL. pH 8'e ayarlanır.

Sterilizasyon için 0,22 µmlik filtreden geçirilir ve 4°C 'de saklanır.

Taze olarak hazırlanan 1 mg/ml lizozim tartılır, 5 µL Benzonaz nükleaz (Sigma) ve 50 µL proteaz inhibitör (EDTA içermeyen) lizis tampona eklenir.

Sodyum Fosfat Tamponu (20 mM, 5 litre, pH 7,4)

146 g NaCl
2,9 g Monobasic
21,7 g Dibasic
Son hacim 5 litre, pH 7,4 ayarlanıp 4°C 'de saklanır.

Bağlama Tamponu (1 litre, pH 7,4)

0,59 g Monobasic

4,34 g Dibasic

29,22 g NaCl

1,36 g İmidazol

500 mL, pH 7,4 ayarlanır ve son hacim 1 litreye tamamlanarak 4°C 'de saklanır.

Yıkama Tamponu (1 litre, pH 7,4)

0,59 g Monobasic

4,34 g Dibasic

29,22 g NaCl

34 g İmidazol

500 mL distile su içerisinde çözündürülerek pH 7,4 ayarlanır ve son hacim 1 litreye tamamlanarak 4°C 'de muhafaza edilir.

Coomassie Parlak Mavi Solüsyonu (1 litre)

450 mL Metanol

70 mL Asetik asit

480 mL Distile su

2,5 g Coomessie Mavisi

Koyu renkli şişede 4°C'de saklanır.

Destain Solüsyonu (1 litre)

250 mL Metanol

150 mL Asetik Asit

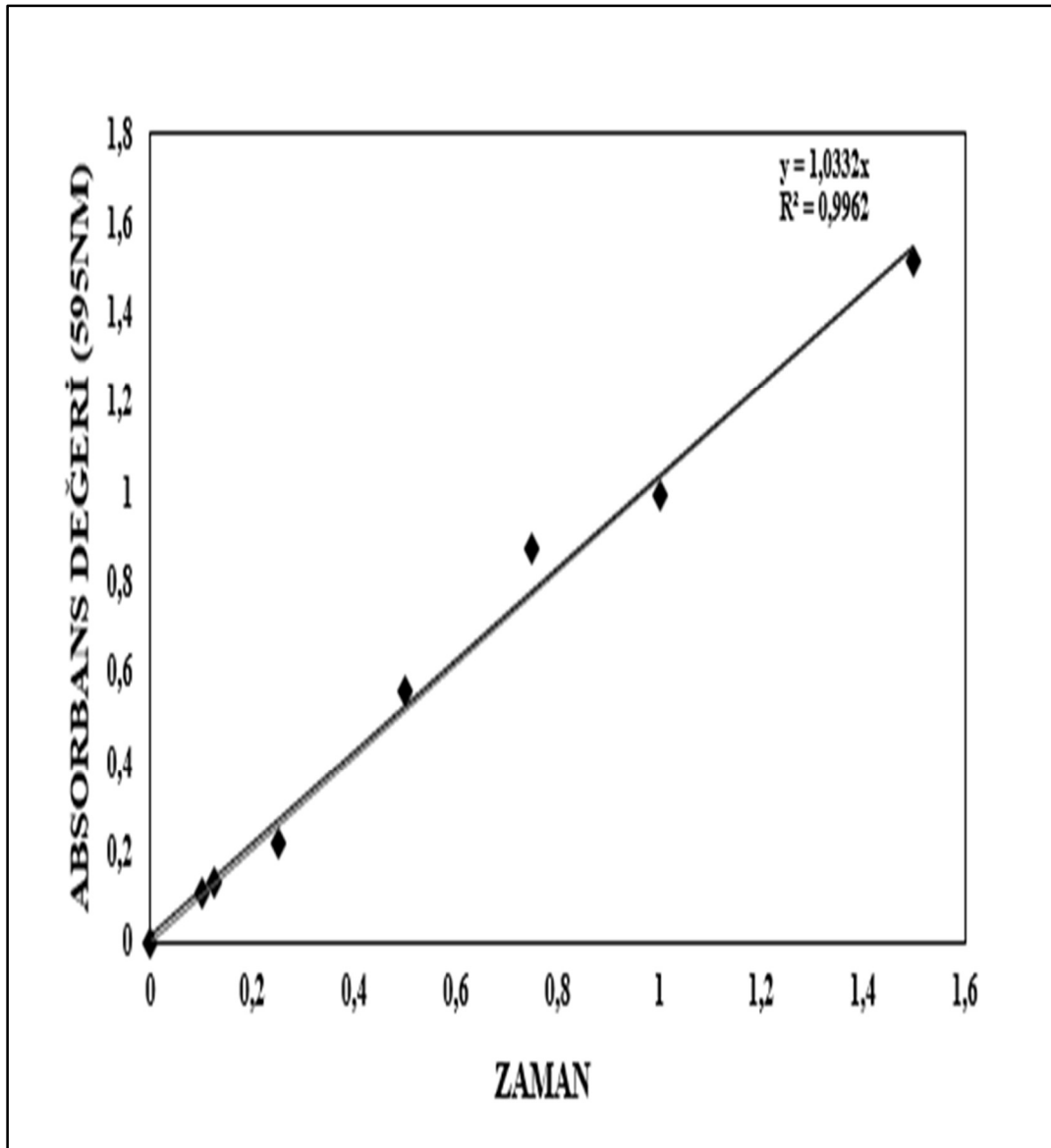
675 mL Distile su

Oda sıcaklığında saklanır.

Ek-B

Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Protein konsantrasyonunu belirlemek için standart protein olarak sığır serum albümin (BSA) eğrisi kullanıldı. Hazırlanan 2 mg/mL'lik stok BSA çözeltisi, aynı tampon çözelti kullanılarak uygun oranlarda seyreltildi ve 0, 0,125, 0,25, 0,50, 0,75, 1, 1,5, 2 mg/mL konsantrasyonlarda standart protein çözeltileri hazırlandı. 1,5 mL'lik ependorflarda hazırlanan farklı BSA konsantrasyonlarından 50 µL protein ve 1,5 mL Bradford reaktifi eklendi. Proteinlerin, oda sıcaklığında 10-15 dakikalık inkübasyonu ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçümleri gerçekleştirildi. (Şekil B.1.)



Şekil B. 1. Protein miktar tayini için BSA eğrisi

Ek-C

Yanal Kanal Mutant Varyantlarının Amino Asit Sekans Dizilimi

Yanal kanalda bulunan ve mutasyona uğratılan aminoasitler kırmızı renk ile belirtilmektedir. CATPO mutant varyantlarının molekül ağırlık ve pI değerleri, “http://web.expasy.org/compute_pi/” web adresinden hesaplandı.(URL-2).

H214A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGAGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSQRQKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

w= 79258.21 Da pI: 5.47

K248A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHAGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFASRQKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

w = 79267.18 Da pI: 5.46

D224A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMAGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLD TQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGGFTAPGRTASGALVREVSP TFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADV PEDGDGVYSEE
SVDMFVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

w = 79280.27 Da pI :5.55

H246A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
AFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLD TQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGGFTAPGRTASGALVREVSP TFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADV PEDGDGVYSEE
SVDMFVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

w= 79258.21 Da pI: 5.47

K323A Varyantının Amino Asit Sekans Dizilimi

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTALGLLKLDRNPTNYFAETEQVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGGFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

w= 79267.18 pI : 5.46

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Akçay Ç., Yüzügüllü Karakuş Y., *Scytalidium Thermophilum* Çift Aktiviteli Katalaz Fenol Oksidazın (CATPO) Katalitik Etkinliğinin Arttırılması, *11. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi (UBAK)* , Ankara, 20-21 Ağustos 2021.



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girerek 2018 yılında Bölüm İkincisi olarak mezun oldu. 2018-2022 yılları arasında, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. Aralık 2021 yılından itibaren Koç Üniversitesi Hastanesinde Biyolog olarak görev yapmaktadır.

