

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Scytalidium thermophilum* KATALAZİNİN MERKEZİ KANALININ
KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

BEDİRHAN ÖZTÜRK

KOCAELİ 2022

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Scytalidium thermophilum* KATALAZİNİN MERKEZİ KANALININ**
KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

BEDİRHAN ÖZTÜRK

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

.....

Dr. Öğretim Üyesi Gülsüm Ebru ÖZER UYAR
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

.....

Doç. Dr. Nuray VAROL
Jüri Üyesi, Gazi Üniv.

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 23.06.2022

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

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

- Bu tezin/projenin 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 gösterdiğim 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/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından FHD-2021-2447 no'lu proje kapsamında maddi destek alınarak gerçekleştirilmiştir.

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

.....
Bedirhan Öztürk

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin 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/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanımı bana ait olacaktır.

Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin 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.

Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

.....
Bedirhan Öztürk

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum*'dan izole edilen çift aktiviteli katalaz enziminin aktif merkezine uzanan kanallardan biri olan merkezi kanalın enzimin katalitik mekanizmadaki olası rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, merkezi kanalda bulunan bazı kritik amino asitler hedef olarak seçilerek nokta mutasyonlar gerçekleştirildi. Rekombinant DNA sistemi kullanarak üretilen ve saflaştırılan CATPO varyantlarının spektrofotometrik analizleri yapılarak yabanıl tip enzime göre katalitik etkinliklerindeki değişiklikler kaydedildi. Çalışma sonunda merkezi kanalda gerçekleştirilen değişikliklerin katalitik aktiviteyi etkilediği tespit edildi. Ayrıca yabanıl tip enzime göre daha aktif varyantlar elde edildi. Buradan katalitik etkinliği arttırılmış varyantların farklı endüstriyel uygulama alanlarında kullanımına yönelik yeni çalışmaların oluşturulma potansiyeli yüksektir.

Yüksek lisans öğrenimim süresince her türlü desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, bilimin sınır tanımadığını gösteren saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü Karakuş'a, çalışmalarımın gerçekleşmesi için laboratuvarında çalışma fırsatı veren Doç. Dr. Özlem Aksoy, Doç. Dr. Arda Acemi, Doç.Dr. Halim Aytekin Ergül'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca zorlu ve uzun bir süreçte hiçbir desteği esirgemeyen hocam Dr.Ahmet Yavuz Candan ve Ar. Gör. Elif Kale'ye, çalışmalarına ilk başladığım günden itibaren yardımlarını esirgemeyen Günce Göç, Kaan Solmaz, Didem Ülgüt ve Simge Çolak'a teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürden daha fazlasını hakeden gösterdikleri sabır sevgi ve verdikleri büyük destekler için biricik ailem annem Filiz Uzun ve eşim Buse Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: FHD-2021-2447) Birimine şükranlarımı sunarım.

Haziran-2022

Bedirhan ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Termofilik Mantarlar	3
2.2. Endüstriyel Enzimler	4
2.3. Endüstriyel Bir Enzim Olarak Katalaz	8
2.4. Katalaz Çeşitliliği ve Yapısal Analizi.....	10
2.5. <i>S. thermophilum</i> Katalazı (CATPO).....	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1. Kimyasallar ve Enzimler.....	18
3.2. Mikroorganizmalar	18
3.3. Plazmit, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması.....	18
3.4. Bölge Yönelimli Mutasyon Çalışmaları	19
3.5. Kompetan Hücrelere Transformasyon.....	22
3.6. Plazmit DNA İzolasyonu	22
3.7. DNA Sekans Analizi.....	23
3.8. Rekombinant CATPO Varyantlarının Üretimi	23
3.9. Rekombinant CATPO Varyantlarının Saflaştırılması	24
3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) Analizi .	25
3.11. Görünür UV Spektrum Analizi.....	25
3.12. Protein Miktar Tayini.....	25
3.13. Enzim Aktivite Tayini	25
3.14. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Bölge Yönelimli Mutagenез ile CATPO Varyantlarının Oluşturulması.....	27
4.2. CATPO Varyantlarının <i>E. coli</i> 'de Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması.....	29
4.3. CATPO Varyantlarının UV Görünür Bölge Spektrumlarının Karşılaştırılması..	31
4.4. wtCATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Karşılaştırılması	33
4.5. CATPO Varyantlarının Kinetik Sabitlerinin Karşılaştırılması	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR.....	38
EKLER	47
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Enzimlerin endüstriyel üretimi.....	7
Şekil 2.2.	(A) "Hem-b" grubu ve (B) "Hem -d" grubunun yapısı.	11
Şekil 2.3.	CATPO'daki kanal yapısı	15
Şekil 2.4.	Kristal yapısı belirlenen monofonksiyonel katalazların amino asit dizi hizalama sonucu.....	16
Şekil 2.5.	<i>S. thermophilum</i> CATPO ve <i>N. crassa</i> CAT-1 katalazlarında merkezi kanal ve merkezi kavitenin karşılaştırılması.	17
Şekil 4.1.	Bölge Yönelimli Mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların agaroz jel görüntüleri.....	27
Şekil 4.2.	Bölge Yönelimli Mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların DpnI enzimi ile muamelesi sonrası agaroz jel görüntüleri.....	28
Şekil 4.3.	CATPO ve varyantların Bioedit programı (7.2.5) ile oluşturulan DNA sekans analizi sonuçları.	29
Şekil 4.4.	Histidin bağlı kolon kromatografisi ile saflaştırılan CATPO varyantlarının SDS-PAGE jel görüntüsü.	31
Şekil 4.5.	200-900 nm aralığında belirlenen saf wtCATPO ve varyantlarının (3 mg/mL) UV-Vis spektrumu.....	32
Şekil E.1.	Protein miktar tayini için Bradford yöntemindeki standart BSA eğrisi.....	51

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Endüstriyel enzimlerden bazıları.....	5
Tablo 2.2.	Mikrobiyal enzimlerin endüstride kullanımına örnekler.....	7
Tablo 2.3.	Katalazların farklı uygulamalarda kullanımına örnekler	9
Tablo 2.4.	Kristal yapısı belirlenen monofonksiyonel katalazlar	12
Tablo 2.5.	<i>S. thermophilum</i> katalazının (CATPO) merkezi kanal amino asitlerinin bazı monofonksiyonel katalazlardaki eşleniklerinin karşılaştırılması	16
Tablo 3.1.	Bölge yönelimli mutasyonlarda kullanılmak üzere tasarlanan oligonükleotitler.	20
Tablo 3.2.	Reaksiyon karışımı	21
Tablo 3.3.	Takip edilen PZR Döngüsü	21
Tablo 3.4.	DNA sekans analizi esnasında kullanılan CATPO primerleri	23
Tablo 4.1.	CATPO varyantları için primer bağlanma sıcaklıkları	28
Tablo 4.2.	Quikchange sonrası recombinant plazmitler için ölçülen DNA miktar bulguları.....	28
Tablo 4.3.	wtCATPO ve varyantlarının R_z , A_{590}/A_{408} ve A_{715}/A_{408} değerlerinin <i>E. coli</i> HP11 ile karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.4.	wtCATPO ile merkezi kanal varyantlarının spesifik aktiviteleri ve “hem” tiplerinin kıyaslanması.....	33
Tablo 4.5.	wtCATPO ve varyantlarının katalaz aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

Kısaltmalar

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
ddH ₂ O	: Double distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozit Trifosfat
DpnI	: <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41'den restriksiyon endonükleaz
E.C	: Enzim Kodu
EPR	: Elektron Paramanyetik Rezonans
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HPII	: Hidroperoksidaz II
IPTG	: Isopropylthio-β-galactoside
Kan ₅₀	: Kanamisin
CAT	: Katalaz
k_{cat}	: Turnover Sayısı, Dönüşüm Sayısı
k_{cat}/K_m	: Katalitik Etkinlik
K_m	: Michealis Menten Sabiti
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 Veri Bankası
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PVC	: <i>Penicillium vitale</i> Katalazı
RbCl ₂	: Rubidyum Klorür
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı):
R _z	: Demir miktarı belirleyici
TEMED	: Tetrametilendiamin
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
Tris-HCl	: Tris Hidroklorür
UV	: Ultraviyole
Wt	: Wild Type (Yabanıl Tip)



***Scytalidium thermophilum* KATALAZININ MERKEZİ KANALININ KATALİTİK AKTİVİTEDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Katalaz enzimi antioksidan metalloenzimler grubuna dâhil olup başlıca işlevi hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene parçalanmasıdır. Katalazlar ile 100 yılı aşkın bir süredir çalışılmaktadır. Bu süreç içinde bu enzimler birçok farklı organizmadan izole edilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bunlardan biri termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen katalaz enzimidir. Bu enzim önceleri birçok difenolik bileşiği okside edebilme yeteneğinden dolayı fenol oksidaz olarak isimlendirilmiş ancak sonrasında yapılan ayrıntılı saflaştırma ve dizi analizleri sonucunda aslında fenol oksidaz aktivitesi gösteren bir katalaz olduğu bulunmuş ve CATPO (katalaz/fenol oksidaz) olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışmada, CATPO'nun aktif merkezine uzanan kanallardan biri olan merkezi kanalın enzimin katalitik mekanizmadaki olası rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, merkezi kanalda bulunan amino asitler (A80, T372, N375, N377 ve G378) hedef olarak seçilerek nokta mutasyonlar gerçekleştirildi. Rekombinant DNA sistemi kullanarak üretilen ve saflaştırılan CATPO varyantlarının katalitik etkinliklerinde meydana gelen değişiklikler, spektrofotometrik analizler ile değerlendirildi. N375H, N375E ve N375S hariç diğer amino asit dönüşümlerini içeren proteinler başarılı bir şekilde üretildi. Saf haldeki tüm varyantların ölçülebilir miktarda hem-*d* içerdikleri tespit edildi. T372A ve T372S varyantlarının katalaz aktivitelerinde CATPO'ya göre sırasıyla %10 ve %14 oranında bir düşüş gözlenirken N377L ve A80I'da sırasıyla %263 ve %148'lik bir artış gözlemlendi. Fenol oksidaz aktivitelerinde T372A hariç diğer varyantlarda önemli bir değişiklik kaydedilmedi. T372A'nın fenol oksidaz aktivitesinde CATPO'ya göre %38 oranında bir kayıp gözlemlendi. Bulgular, merkezi kanalın katalitik aktiviteyi etkilediğini göstermekte olup endüstriyel uygulamalara yönelik daha etkin bir katalaz enziminin üretilme potansiyelinin olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, Merkezi Kanal, Mutasyon, *Scytalidium*, Termofilik Fungus.

INVESTIGATION OF THE ROLE OF CENTRAL CHANNEL ON CATALYTIC ACTIVITY OF *Scytalidium thermophilum* CATALASE

ABSTRACT

Catalase enzyme belonging to antioxidant metalloenzyme group catalyze the decomposition of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen. Catalases have been studied for over 100 years, with the result that examples of the enzyme have been isolated, purified and characterized from many different organisms. Among them, the catalase enzyme produced by thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, is of our interest. This enzyme was previously named phenol oxidase because of its ability to oxidize many diphenolic compounds, but as a result of detailed purification and sequencing analyzes, it was found to be actually a catalase with phenol oxidase activity and was named CATPO (catalase/phenol oxidase). In this study, it was aimed to investigate the possible role of the central channel, which is one of the channels extending to the active center of CATPO, in the catalytic mechanism of the enzyme. For this purpose, the amino acids (A80, T372, N375, N377 and G378) residing in the central channel were selected and mutated. The changes in the catalytic activities of the CATPO variants, produced and purified using the recombinant DNA system, were evaluated by spectrophotometric analyses. Almost all recombinant proteins except N375H, N375E and N375S were successfully produced. All CATPO variants were found to contain a measurable amount of hem-d. The T372A and T372S variants exhibited a 10% and 14% decrease in catalase activity with respect to CATPO enzyme, whereas the N377L and A80I variants presented a 263% and 148% increase in catalase activity, respectively. In terms of phenol oxidase activity, no significant change was detected among variants but T372A presenting 38% loss in activity. The results have shown that the central channel affects the catalytic activity and by mutations on this channel more efficient variants than wild type enzyme can be produced and tested for their potential use in industrial applications.

Keywords: Catalase, Central Channel, Mutation, *Scytalidium*, Thermophilic Fungus.

1. GİRİŞ

Termofilik mantarlar ısıya en fazla dayanan ökaryotik canlılardır. Isıya adaptasyon sonucu, mezofilik atalarından evrimleştikleri iddia edilmektedir (Feofilova ve Tereshina, 1999). Bunlardan, özellikle *Scytalidium thermophilum* (*Mycothermus thermophilus*), mantar kompostu üretiminde önemli bir rol oynamakla birlikte çok sayıda termostabil enzim kaynağı olarak endüstriyel önem taşımaktadır (Tuomela ve diğ., 2000).

S. thermophilum büyüme ile paralel olarak ortaya çıkan ve fenolik maddeler varlığında üretimi tetiklenen bir katalaz enzimi üretmektedir (Kocabas ve diğ., 2008; Ögel ve diğ., 2006). *Penicillium vitale* katalazına (PVC) %77 oranında homoloji gösteren bu enzim ‘monofonksiyonel büyük alt üniteli katalaz’ grubuna dahildir (Kocabas ve diğ., 2008). Monofonksiyonel katalaz ailesinde yer almasına karşılık temel fonksiyonu olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanması yanında 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 bazı *para*-difenolikleri de oksitleyebilmektedir (Koclar Avcı ve diğ., 2013). Bu özelliği sebebiyle katalaz/fenol oksidaz (kısaca CATPO) olarak isimlendirilen enzim, y. 320 kDa molekül ağırlığında bir tetramerdir (Kocabas ve diğ., 2008). Yapısında protoporfirin IX (Hem) içeren CATPO enziminde diğer katalazlarda olduğu gibi aktif merkeze uzanan üç kanal (ana kanal, yanal kanal ve merkezi kanal) bulunmaktadır (Yuzugullu ve diğ., 2013a). Bu kanallardan biri olan merkezi kanal, 'hem' grubuna yukarıdan ancak tetramer yapının ortasındaki boşluktan yaklaşmaktadır (Şekil 2.3).

Birçok farklı organizmadan izole edilen, saflaştırılan ve karakterize edilen katalaz örnekleri ile 100 yıldan fazla bir süredir çalışılmaktadır. Oldukça eski bir geçmişe sahip olmasına rağmen katalaz enziminin katalitik mekanizması üzerine hala cevaplanmamış bazı sorular bulunmaktadır. Örneğin hidrofilik yapıda olan ve doğrudan “hem” bağlanma bölgesine açılan merkezi kanalın katalitik mekanizmadaki rolü henüz bilinmemektedir. Moleküler dinamik simülasyonlar yardımıyla öne sürülen bazı görüşler (reaksiyon ürünleri olan su ve oksijenin merkezi kanalı kullandığına dair) olsa da bu görüşleri destekleyen deneysel bulgular eksiktir. Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen bu çalışmada monofonksiyonel katalazlar arasında kısmen korunmuş olan Ala80, Thr372, Asn375, Asn377, ve Gly378 hedef alınarak burada bölge yönelimli mutasyonlar

gerçekleştirildi. Mutasyon sonrası *Escherichia coli*'de üretilen rekombinant proteinler afinite kromatografi tekniği ile tek basamakta saflaştırıldı ve saf haldeki CATPO varyantlarının spesifik aktivite değerleri, prostetik grupları ("Hem" grubu miktar ve çeşitliliği açısından) ve kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m) karşılaştırıldı.

Gerçekleştirilen bu çalışma hem temel bilimlere hem de uygulamalı bilimlere katkılar sağlamaktadır. Ayrıca saf olarak elde edilen CATPO varyantları kullanılarak X-ışını kristalografisi (varyantlardaki yapısal değişimleri belirleme, fenolik bileşikler ile oluşturulan farklı enzim-fenolik komplekslerin yapısal ve fonksiyonel analizlerini gerçekleştirme, vb.) ve Elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi (fenolik madde varlığında ve yokluğunda katalitik döngüdeki ara bileşiklerin tayini) gibi analizlerin uygulanabileceği yeni çalışmaların tasarlanmasına da ışık tutmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Termofilik Mantarlar

Büyüme sıcaklıkları optimum 50-70 °C aralığında olan mikroorganizmalar termofilik olarak isimlendirilir (Maheshwari ve diğ., 2000). Termofilik mantarlar, endüstri alanındaki zorlu uygulama şartlarında canlılıklarını koruma özelliği göstermekte olup endüstriyel alanda önemli olan termostabil enzimlerin kaynağıdır (Akram ve diğ., 2021).

Yaklaşık bir asır önce ekmekten ilk termofilik mantar *Mucor pusillus* Lindt tarafından izole edilmiş, ardından Tsiklinskaia *Thermomyces lanuginosus*'u patatesten izole etmiştir (Maheshwari ve diğ., 2000). Bu küflerin keşfedilmesi tesadüfen olmuştur.

Allen ve Emerson, bitki kümelerinin içerdiği besinlerin, hacminin ve havalandırma koşullarının termofilik mantarların üremesine etkisini göstermişlerdir. Bu çalışmalardan sonra, Cooney ve Emerson izole ettikleri 13 termofilik mantar türünü yaşama ortamlarına göre sınıflandırmış ve bu alanda çalışmaların artmasını sağlamışlardır (Maheshwari ve diğ., 2000).

Termofilik mantarların termofilik özelliklerini açıklayan bazı hipotezler Crisan tarafından öne sürülmüştür. Buna göre, mikroorganizmadaki yağ asitlerinin tipleri, üreme ısılarını belirlemektedir. Yüksek ısılarda hücresel yağların erimesi gerçekleşir ve hücrenin bütünlüğü kaybolur. Üreme ısıları yükselince birçok hücrede çoğunlukla doymuş yağ asitleri görünmektedir. Termofilik mikroorganizmalar daha çok doymuş yağ içerdikleri için, yüksek ısılarda hücresel bütünlüklerini mezofiliklere göre daha iyi korurlar. Yağların en önemli kısmı hücre zarındaki fosfolipitlerdir. Yağ asitlerinin saturasyonundaki değişiklik hücre metabolizmasını etkiler. Yüksek ısılarda hücre zarındaki sıvı miktarı düşeceği için geçirgenlik değişir. Bu yönden bakıldığında, Crisan tarafından önerilen lipit çözünürlük hipotezi kabul edilebilir. İkinci bir hipotez de temel metabolitlerin tekrar tekrar hızlı sentezi hipotezi olup termofillerin bilinen metabolik yollar dışında bir mekanizmaya sahip olmadıkları gerçeği ile örtüşür (Maheshwari ve diğ., 2000).

Termofilik mantarlar bulundukları yerlere göre, jeotermal bölgelerde üreyenler ve çürümüş bitki kümeleri ile gübre gibi kendini ısıtan (self-heating) kaynaklarda üreyenler olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. Jeotermal topraklar, dünyada birçok yerde bulunur.

Amerika Birleşik Devletleri'nde Yellowstone Milli Parkı'nda bu tür sıcak su kaynakları bulunmaktadır. Buradaki toprağın özelliği, ısısının 70 °C ve daha fazla olması, ağır metaller içermesi, pH'sının 2,0-7,0 arasında veya daha az olması, az organik madde içermesidir (Maheshwari ve diğ., 2000).

Termofilik mantarların en zengin bulunduğu yerlerden biri çürümüş organik maddelerden oluşan, azot gibi mineral besinleri içeren, pH'sı 4,0-8,0 olan, iyi havalandırılan bitki kümeleridir. Bu kümelere bilinen en iyi örnek, bahçedeki yığınlardır. Diğer örnekler buğday, saman yığınları, at veya domuz gübresi, kuru ot veya mısır yığınları, tahta parçaları, toz haline getirilmiş ağaç ve şehir çöpleridir. Aslında bu tür mantarlar çevremizde çok yaygındır. Isısı 40-50 °C olan sıcak sulardan, topraktan, sıcak havuzlardan, yağmur ormanlarının etrafından, çamurdan, ağaç yapraklarından, topraktan hem mezofilik hem de termofilik mantarlar bir arada izole edilmiştir (Maheshwari ve diğ., 2000).

2.2. Endüstriyel Enzimler

Biyolojik katalizör olarak enzimler, endüstriyel ürün ve süreçlere katkı sağlayan doğal araçlardır (Beilen ve Li, 2002; Bull ve diğ., 2000). Kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldığında, enzimler oldukça spesifik olup doğal yollar ile kendiliğinden oldukça yavaş seyreden veya gerçekleşmesi mümkün olmayan kimyasal reaksiyonları kolayca gerçekleştirebilirler. Ayrıca, yenilenebilir doğal kaynaklardan (bakteri, maya ve küf gibi birçok mikroorganizma) kolayca elde edilebilir, biyolojik olarak parçalanabilir, nispeten ılıman sıcaklık ve pH koşulları altında çalışabilirler. Bu özelliklerinden dolayı enzimlerin endüstride kullanımı giderek yaygınlaşmakta (Tablo 2.1) ve kimyasal katalizörlere kıyasla farklı uygulama alanlarında daha fazla kullanım potansiyeli göstermektedirler (Divya ve diğ., 2015; Fernandes, 2010; Paulino ve diğ., 2017; Polaina ve MacCabe, 2007; Schäfer ve diğ., 2006; Singhania ve diğ., 2015). 1995'te endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki kullanımı bir milyar dolar, 2000'li yılların başında ise 2 milyar dolar olarak rapor edilmiştir. 2019 yılında ise elde edilen verilere göre enzimlerin küresel endüstriyel pazar büyüklüğü yaklaşık 5,6 milyar dolara yükselmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında 2027 yılına kadar %6,4 oranında büyüme göstererek 9,14 milyar dolara ulaşması öngörülmektedir. Bu artışın, gelişmiş üretim teknolojilerinin ve mühendisliğin yeni uygulamalarının ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (URL-1).

Tablo 2.1. Endüstriyel enzimlerden bazıları (Singh ve diğ., 2017).

Numara	Sınıf	Enzimler	Katalizlenen Tepkime Tipi
EC 1	Oksidoredüktaz	Katalaz, glukoz oksidaz, lakkaz	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları)
EC 2	Transferaz	Fruktosiltransferaz, glukoziltransferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
EC 3	Hidrolaz	Amilazlar, selülozlar, lipazlar, mannanazlar, pektinazlar, fitazlar, proteazlar, pullulanazlar, ksilanazlar	Hidrolaz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
EC 4	Liyaz	Pektat liyazları, α -asetolaktat dekarboksilazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve yer değişmesiyle çift bağların oluşması.
EC 5	İzomeraz	Glukoz izomerazlar, epimerazlar, mutazlar, liyazlar, topoizomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
EC 6	Ligaz	Argininosuksinat, glutatyon sentetaz	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması
EC 7	Translokaz	Ornitin translokaz	İyonların veya moleküllerin membranlar arasındaki hareketi ya da membranlar içindeki ayrılmaları

Batı Avrupa, Japonya, Kanada, ABD gibi gelişmiş ülkelerde endüstriyel enzimlere karşı olan talep son yıllarda göreceli olarak nitelendirilebilirken, Asya-Pasifik, Doğu Avrupa, Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde en hızlı büyüyen pazarlar olarak değerlendirilmektedir. Endüstriyel enzim pazarında en büyük pay %65 oranında teknik enzimlerdedir. Bunlar; deterjan (amilaz), tekstil (lakkaz), nişasta işleme (glukoz izomeraz), kâğıt (selüloz) ve kozmetik (ürikaz, glukoz-oksidad, galaktoz-oksidad, lakkaz ve tirozinaz) endüstrisinde kullanılan enzimleri içerir.

Pazarın ikinci en büyük pay sahibi %25 meyve suyu (pektinaz), fırıncılık (proteaz) ve süt ürünleri (laktaz) gibi endüstrilerde kullanılan gıda enzimleridir. Pazarın son kısmını ise yaklaşık %10 oranıyla yem enzimleri (α -amilaz) oluşturmaktadır (Kirk ve diğ., 2002).

Endüstriyel enzim pazarında, dünya enzim talebi yaklaşık olarak 12 adet büyük ve 400 adet küçük üretici/tedarikçi tarafından karşılanmaktadır (Ogawa ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2012). Endüstriyel enzim pazarında kilit rol oynayan şirketler arasında BASF SE (Almanya), DuPont Danisco (ABD), Novozymes (Danimarka), DSM (Hollanda), Associated British Foods (İngiltere), Adisseo (Çin), Novus International (ABD), Advanced Enzyme Technologies (Hindistan), Chr. Hansen Holding A/S (Danimarka), Enzyme Development Corporation (ABD) ve Lesaffre (Fransa) yer almaktadır (URL-1).

Endüstride kullanılan enzim kaynağı olarak bitki ve hayvanların kullanımı veya sentetik olarak üretilen enzimler ile karşılaştırıldığında mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin birçok konuda çok daha avantajlı olduğu görülmektedir. Mikrobiyal enzimler, bitkisel ve hayvansal enzimlerden daha aktif ve kararlı yapıda olup yüksek verime sahiptir (Liu ve Kokare, 2017).

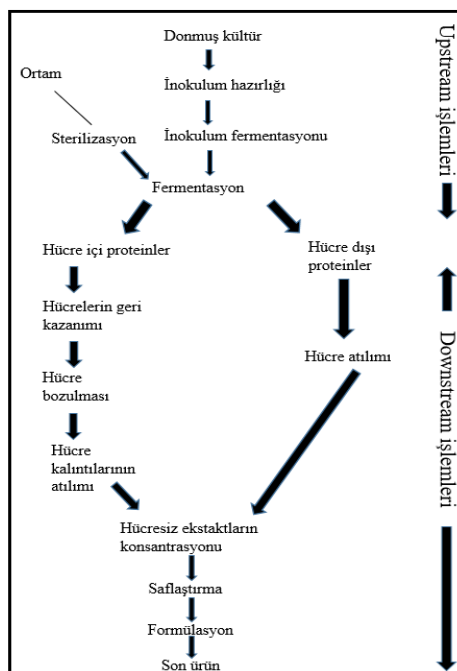
Mikroorganizmaların sahip olduğu çeşitlilik ve genetik manipülasyonlarındaki kolaylığı sayesinde ürün modifikasyonu ve optimizasyonu rahatlıkla sağlanabilir (Gurung ve diğ., 2013). Bu özellikler sebebiyle endüstride kullanılan enzimlerin %90'ından fazlası, ürün saflığını ve üretim ekonomisini en üst düzeye çıkarmak için rekombinant olarak üretilmektedir (Cherry ve Fidantsef, 2003).

Modern biyoteknoloji ve protein mühendisliğinin gelişmesi, endüstriyel enzimlerin gelişiminde daha da devrim yaratmıştır. Bu ilerlemeler, yeni aktiviteler sergileyen (ikincil aktivite) ve yeni koşullara adapte olabilen (pH ve sıcaklık değişimi gibi), endüstriyel kullanımlarının daha da genişlemesini sağlayan özel tasarlanan enzimler oluşturmayı mümkün kılmıştır (Kirk ve diğ., 2002).

Mikroorganizmaların farklı biyoproseslerdeki kapsamlı uygulaması, endüstride çeşitli ürünler sunmak için kullanılır. Tablo 2.2'de çeşitli ürünleri elde etmek için gerekli olan bazı mikroorganizma çeşitleri özetlenmiştir (Singh ve diğ., 2017). Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel üretiminin şematik gösterimi ise Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Mikrobiyal enzimlerin endüstride kullanımına örnekler

Endüstri	Enzim	Fonksiyon	Mikroorganizma
Süt	Lipaz	Hızlı peynir olgunlaşması	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>
	Transglutaminaz	Protein çapraz bağlama	<i>Streptomyces sp.</i>
	Katalaz	Peynir üretimi	<i>A. niger</i>
Fırın	Amilaz	Ekmek üretimi	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>
	Ksilanaz	Hamur hazırlanması	<i>A. niger</i>
	Lipaz	Hamur stabilesi	<i>A. niger</i>
İçecek	Proteaz	Bulanıklık Giderici	<i>A. niger</i>
	Selüloz	Meyve sıvılaştırma	<i>Trichoderma atroviride</i>
Hayvan Yemi	β -glukanaz	Sindirime yardımcı olmak	<i>A. niger</i>
Hamur ve Kâğıt	Proteaz	Biyofilm giderimi	<i>B. subtilis</i>
Deri	Lipaz	Yağdan arındırma	<i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i>
Kozmetik	Lakkaz	Saç boyası	<i>B. subtilis</i> , <i>Trametes versicolor</i>
	Lipaz	Cilt bakımı	<i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i>
Organik sentez	Glukoz izomeraz	Yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi	<i>Corynebacterium sp.</i> , <i>S. murinus</i>
Atık Yönetimi	Amilaz	Bitkisel atıkların biyodönüşümü	<i>B. licheniformis</i> , <i>Aspergillus sp.</i>



Şekil 2.1. Enzimlerin endüstriyel üretimi (Singhania ve diğ., 2015).

2.3. Endüstriyel Bir Enzim Olarak Katalaz

Endüstriyel enzimlerden biri olan katalaz enzimi (EC1.11.1.6), ilk kez yirminci yüzyılın başlarında isimlendirilmiştir (Loew, 1900). Hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunan katalaz, hücreyi, hidrojen peroksidin (H_2O_2) zararlı etkilerinden koruyarak organizmanın yaşam süresinin uzatılmasında önemli rol oynamaktadır. Nitekim yaşa bağlı bazı dejeneratif hastalıkların (Alzheimer, Parkinson, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, yüksek tansiyon, bipolar ve şizofreni) katalaz eksikliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Habib ve diğ., 2010; Yakunin ve diğ., 2014). Bu nedenle, bu tür hastalıkların tedavisi için potansiyel bir ilaç olarak "katalaz" enziminin kullanımını araştırmak üzere birçok laboratuvar çalışması gerçekleştirilmektedir (Nandi ve diğ., 2019). Diğer yandan, saniyede binlerce peroksit molekülünü moleküler oksijen ve suya dönüştürebilme yeteneği bakımından başlıca gıda, tekstil, farmasötik ve kozmetik endüstrileri olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri ve enzimatik polimerizasyon işlemleri gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.3). Gıda işlenmesi ve fırın ürünlerinin yapımı gibi uygulamalarda ise oksidaz enzimi ile birlikte kullanılmakta olduğu görülmektedir.

Enzim kaynağı olarak sığır karaciğerinden izole edilen katalaz (Bovine Liver Catalase, BLC), ticari olarak temin edilebildiği ve sert çevre şartlarında kararlı bir yapı göstermesi sebebiyle bilimsel araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Endüstriyel ölçekli proseslerde ise nispeten büyük ölçekli fermantasyonlarla üretilmesi kolay olduğundan genelde bakteri veya mantar kökenli katalazlar kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015). Yüksek aktiviteye sahip kararlı yapıda mikrobiyal katalazların geliştirilmesi, biyobozunmadan (biyoremediasyondan) tıbbi tanı uygulamasına kadar çok çeşitli ticari uygulamalar için uzun süredir talep görmektedir. Günümüzde ticari şirketlerin çoğu, ağartma işlemleri için kendi katalazlarını pazarlamış olsa da çoğu ticari katalaz, zorlu işlem koşullarına dayanamamaktadır. Dolayısıyla, çevre düzenleme otoriteleri fenollerin bozunması için termal kararlı katalaz veya katalaz-peroksidaz tabanlı teknolojilerin endüstriyel olarak kullanılmasını teşvik etmektedir. Ancak, katalaz tipleri, yapıları, filogenetik ilişkileri ve katalitik mekanizmaları üzerine çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky ve diğ., 2008) literatürde endüstriyel kullanım için protein mühendisliği yaklaşımıyla özellikleri geliştirilmiş katalaz enzimlerinin

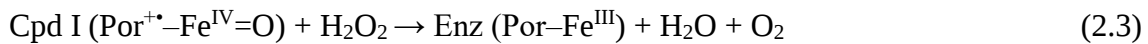
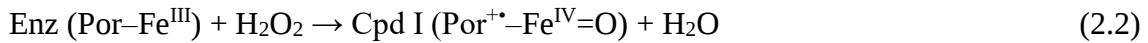
mikrobiyal üretimi üzerine sınırlı sayıda rapor mevcuttur (Samson ve diğ., 2018). Bu durum, farklı biyokimyasal özelliklere sahip katalaz üreten mikroorganizmalardan enzimin izolasyonu için daha fazla çalışma yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Tablo 2.3. Katalazların farklı uygulamalarda kullanımına örnekler

Organizma	Uygulama	Kaynakça
İnsan	İmmünomodülatör etki	Shi ve diğ., 2013a
	H1N1 enfeksiyonun neden olduğu reaktif oksijen türlerinin ortamdaki uzaklaştırılması	Shi ve diğ., 2013b
	Kırmızı kan hücrelerinden hidrojen peroksitin uzaklaştırılması	Gaetani ve diğ., 1994
Sığır karaciğeri	Yara iyileştirme	Abdel-Mageed ve diğ., 2012
	Hidrojen peroksit tayini	Shamsipur ve diğ., 2012
	Süt ve su örneklerinde kalsiyum tayini	Akyılmaz ve Kozgus, 2009
	CPPU (Forchlorfenuron) tespiti	Xu ve diğ., 2015
	Enfekte süt tespiti	Fütö ve diğ., 2012
	Kırsal alkollerin biyotransformasyonu	Magner ve Klivanov, 1995
	Peroksinitrit gibi sitotoksik ajanların uzaklaştırılması	Gebicka ve Didik, 2009
	Pişmemiş ette lipit oksidasyonunun engellenmesi	Pradhan ve diğ., 2000
	Biyomedikal ve klinik tanı	Laskin ve diğ., 2006
	Oksidatif stres tedavisi	Chen ve diğ., 2013
<i>Escherichia coli</i>	Enzimatik polimerizasyon	Di Gennaro ve diğ., 2014
	Metallerin biyo-korozyonu	Baeza ve diğ., 2013
<i>Bacillus sp.</i>	Tekstil atıklarının arıtılması	Gudelj ve diğ., 2001
<i>Bacillus pumilus</i>	Beta-laktamların sülfoksitlerine oksidasyonu	Sangar ve diğ., 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Yeni destek materyallere immobilizasyon	Bayramoglu ve diğ., 2011
	Süt pastörizasyonu sırasında peroksitin uzaklaştırılması	Akertek ve Tarhan, 1995
	Peynir üretimi	Kaushal ve diğ., 2018
	İçeceklerden kalıntıların arındırılması	Kaushal ve diğ., 2018
	(Glukoz oksidaz ile birlikte)	
	Şişelerde ve konserve yiyecek ya da kutu içeceklerde ağız kısmındaki oksijenin uzaklaştırılması (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
	Fırın ürünleri (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
	Yumurta işlenmesi (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
	Kontakt lens solüsyonundan peroksitin çıkarılması	Cook ve Worsley, 1996
	Mayonez ve şaraplarda kararmayı önlemek amacıyla (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
<i>Aspergillus terreus</i>	Pamuk liflerinden peroksit uzaklaştırmada	Amorim ve diğ., 2002
	Tümör metastazının engellenmesi ve kötü huylu özelliklerin geri döndürülmesi	Nishikawa ve diğ., 2005
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Yumurta işlenmesi (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
	Mayonez ve şaraplarda kararmayı önlemek amacıyla (Glukoz oksidaz ile birlikte)	Kaushal ve diğ., 2018
	Kontakt lens solüsyonundan peroksitin çıkarılması	Cook ve Worsley, 1996
<i>Carassius auratus</i>	Su kütlelerinde atrazin kirliliğini izlemeye biyosensör olarak kullanımı	Chen ve diğ., 2008
<i>Thermobifida fusca</i>	Tekstil ağartma / katekol oksidasyonu	Loncar ve Fraaije, 2015
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Çeşitli fenoliklerin antioksidan özelliklerinin değiştirilmesi	Koclar Avcı ve diğ., 2013

2.4. Katalaz Çeşitliliği ve Yapısal Analizi

Katalazları genel olarak üç gruba ayırabiliriz; “hem” (heme, haem) grubu içeren monofonksiyonel katalazlar, “hem” grubu içeren ve çift aktivite gösteren katalaz-peroksidazlar ve “hem” yerine protetik grup olarak “Mn” içeren katalazlar olmak üzere. Bunlar arasında, üzerinde en çok çalışılan ve oldukça yaygın olan grup monofonksiyonel katalazlardır. Tetramerik yapıda olan bu enzimler peroksit yıkımını (2.1) hızlı bir şekilde iki ayrı basamakta gerçekleştirirler (Chelikani ve diğ., 2004). İlk basamakta birinci hidrojen peroksit enzimdeki “hem” grubunu oksiferril formuna (Compound I, Cpd I) çevirir (2.2). İkinci hidrojen peroksit molekülü ise ilk basamakta oluşan bileşiği tekrar indirgeyip enzimin orijinal formuna dönüşmesinde ve su ile oksijenin oluşumunda görev alır (2.3) (Nicholls ve diğ., 2001; Switala ve Loewen, 2002). Alternatif olarak, düşük hidrojen peroksit koşulları altında, Cpd I, Cpd II (2.4) 'ye indirgenebilir; Cpd II ise başka bir hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek aktif olmayan Cpd III (2.5) 'e dönüşebilir. NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlayan katalazlarda, enzimin NADPH tarafından Cpd III oluşumunun önlenerek inhibisyona karşı korunduğu belirtilmiştir (Sevinç ve diğ., 1999; Putnam ve diğ., 2000; Nicholls, 2012).

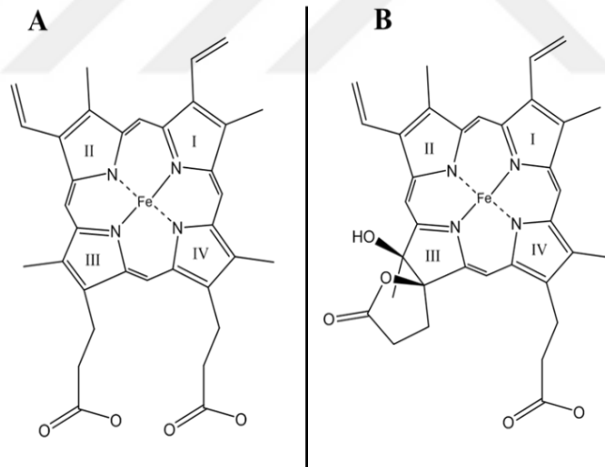


Monofonksiyonel katalazlar, 405-407 nm arasında karakteristik bir absorpsiyona sahiptir (Soret bandı). Prostetik porfirin grubunun belirleyicisi olarak R_z (A_{Soret}/A_{280}) değeri ise bu enzimler için yaklaşık 1 civarındadır (Zámocký ve Koller, 1999).

Monofonksiyonel katalazlar, monomerleri birbirine benzemekle birlikte: Büyük alt üniteli (monomerleri 75-80 kDa arasında değişen) ve Küçük alt üniteli (monomerleri 55-60 kDa arasında değişen) katalazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Her iki grup da yapısında kovalent olmayan bir şekilde bağlanmış “Hem (ferriprotoporfirin)” grubu

içerir. Ancak, büyük alt üniteli katalazlardaki “hem” grubu (Hem-*d*, Heme-*d*) cis-hidroksiklorin- γ - spirolakton yapıda olup küçük alt üniteli katalazlardakine (Hem-*b*, Heme-*b*) kıyasla 180 derece rotasyon yapmıştır (Şekil 2.2). Hem-*d*'nin kökeni kesin olarak belirlenmemiş olsa da enzimin muhtemelen ilk önce Hem-*b*'yi bağladığı, sonrasında enzime bağlanan ilk H₂O₂ molekülü tarafından oksidasyona uğrayarak Hem-*d*'ye dönüştürüldüğü öne sürülmüştür (Timkovich ve Bondoc, 1990). Hidroperoksidaz II (HPH) enziminde bu oksidasyon durumu çalışılmış olup H₂O₂ (Loewen ve diğ., 2004) veya singlet oksijen varlığında (Díaz ve diğ., 2004) enzim tarafından katalizlenen reaksiyonla Hem-*b*'nin Hem-*d*'ye dönüştüğü gösterilmiştir.

Küçük alt üniteli katalazlarda ayrıca bir NADPH bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Zamocky, 1999; Chelikani ve diğ., 2004). Bu bağlanma bölgesi, katalaz aktivitesinde rol oynamamasına karşın katalitik döngüde enzim formunun korunmasını sağlamaktadır (Kirkman ve diğ., 1984). Büyük alt üniteli katalazlarda bu bağlanma bölgesi yerine ekstra C-terminal (karboksil uç) bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgenin enzimi sıcaklık ve denatüre edici ajanlara karşı korunmada rol oynadığı düşünülmektedir (Maté ve diğ., 2001).



Şekil 2.2. (A) "Hem-*b*" grubu ve (B) "Hem-*d*" grubunun yapısı (Yuzugullu ve diğ., 2013a).

Günümüze kadar 16 farklı monofonksiyonel katalazın kristal yapısı belirlenmiştir; bunlardan *S. thermophilum* katalazı (CATPO) da dahil olmak üzere sadece beş tanesi büyük alt üniteli katalazlara aittir (Tablo 2.4). Üç boyutlu yapıları incelendiğinde hepsinde aktif bölgenin oldukça korunmuş halde olduğu gözlenmektedir. Buna göre, 'Hem' paketi olarak da adlandırılan aktif bölgedeki protoporfirin IX (Hem) yapısı

molekülde iyice gömülmüş halde bulunmakta (Şekil 2.3) ve molekül yüzeyinden y. 20 Å uzaktadır (Diaz ve diğ., 2012).

Tablo 2.4. Kristal yapısı belirlenen monofonksiyonel katalazlar

PDB ID	Katalaz	Organizma	Alt sınıf	Fe/Hem çeşidi	Kaynak
4AUM	CATPO	<i>Mycothermus thermophilus</i>	Büyük alt üniteli	<i>d</i>	Yuzugullu ve diğ., 2013a
2IUF	PVC	<i>Penicillium vitale</i>	Büyük alt üniteli	<i>d</i>	Alfonso-Prietro ve diğ., 2007
1SY7	CAT-1	<i>Neurospora crassa</i>	Büyük alt üniteli	<i>d</i>	Diaz ve diğ., 2004
1GGF	HPH	<i>Escherichia coli</i>	Büyük alt üniteli	<i>d</i>	Melik-Adamyan ve diğ., 2001
3EJ6	CAT-3	<i>Neurospora crassa</i>	Büyük alt üniteli	<i>b</i>	Diaz ve diğ., 2009
7CAT	BLC	<i>Bos taurus</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Fita ve Rossman, 1985
1DGF	HEC	<i>Homo sapiens</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Putnam ve diğ., 2000
1M85	PMC	<i>Proteus mirabilis</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Gouet ve diğ., 1995
2XQ1	PAC	<i>Pichia angusta</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Penya-Soler ve diğ., 2011
1A4E	CAT-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Mate ve diğ., 1999
1HBZ	MLC	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Murshudov ve diğ., 1992
1M7S	CAT-F	<i>Pseudomonas syringae</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Carpena ve diğ., 2003
1QWL	KATA	<i>Helicobacter pylori</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Loewen ve diğ., 2004
1SI8	EFC	<i>Enterococcus faecalis</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Hakansson ve diğ., 2004
2J2M	EOC	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Hara ve diğ., 2007
2ISA	VSC	<i>Vibrio salmonicida</i>	Küçük alt üniteli	<i>b</i>	Riise ve diğ., 2007

Katalazlar üzerinde yapılan çalışmalar enzim yüzeyinden aktif bölgeye uzanan üç kanalın varlığını göstermektedir. Bu kanallardan biri ana kanal olarak adlandırılmakta olup katalitik merkeze yukarıdan (distal kısımdan) dik olarak uzanmakta ve hidrojen peroksitin katalitik bölgeye ulaşmasında başlıca role sahiptir (Chelikani ve diğ., 2003; Switala ve Loewen, 2002). Bu kanalın uzunluğu y. 55 Å'dur; 'hem' bölgesine yakın olan kısmında daha çok hidrofobik amino asit kalıntıları yer almaktadır.

Yanal kanal ise y. 30 Å uzunluğunda, proteinin yan yüzeyinden başlayarak 'hem' grubunun alt kısmına (proksimal) doğru uzanmaktadır. Bu kanalın katalitik mekanizmadaki rolü aktif bölgeye proksimal kısımdan yaklaştığı ve substratın distal kısma nasıl geçebileceği sorusu yanıtlanamadığından henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak reaksiyon ürünlerinden biri olan su molekülünün proteini terk ederken bu kanalı kullanabileceği öne sürülmektedir (Sevinc ve diğ., 1999). Son olarak merkezi kanal olarak adlandırılan kanal ise ana kanal gibi 'hem' grubuna yukarıdan ancak tetramer yapının ortasındaki boşluktan yaklaşmaktadır.

Merkezi kanal hakkında literatürde sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Bu kanal ile ilgili geçmişte rapor edilen dört yayında kanalda genelde hidrofilik amino asitlerin yer aldığı; bu özelliğinden dolayı katalaz reaksiyon ürünlerinden dioksijenin uzaklaşmasında ve büyük alt üniteli katalazlarda “hem” modifikasyonunda (hem-*b*’nin hem-*d*’ye oksidasyonu) rol alabileceği önerilmiştir (Diaz ve diğ., 2004; Murshudov ve diğ., 1996; Putnam ve diğ., 2000; Sevinc ve diğ., 1999). Ancak öne sürülen bu görüşler sadece moleküler dinamik simülasyonlar ile ortaya konmuş olup mutasyon, bu görüşlerin spektrofotometrik veya yapı çalışmaları ile desteklenmesi gereklidir (Diaz ve diğ., 2004).

Son olarak merkezi kanal olarak adlandırılan kanal ise ana kanal gibi 'hem' grubuna yukarıdan ancak tetramer yapının ortasındaki boşluktan yaklaşmaktadır. Merkezi kanal hakkında literatürde sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Bu kanal ile ilgili geçmişte rapor edilen dört yayında kanalda genelde hidrofilik amino asitlerin yer aldığı; bu özelliğinden dolayı katalaz reaksiyon ürünlerinden dioksijenin uzaklaşmasında ve büyük alt üniteli katalazlarda “hem” modifikasyonunda (hem-*b*’nin hem-*d*’ye oksidasyonu) rol alabileceği önerilmiştir (Diaz ve diğ., 2004; Murshudov ve diğ., 1996; Putnam ve diğ., 2000; Sevinc ve diğ., 1999). Ancak öne sürülen bu görüşler sadece moleküler dinamik simülasyonlar ile ortaya konmuş olup mutasyon, bu görüşlerin spektrofotometrik veya yapı çalışmaları ile desteklenmesi gereklidir (Diaz ve diğ., 2004).

2.5. *S. thermophilum* Katalazı (CATPO)

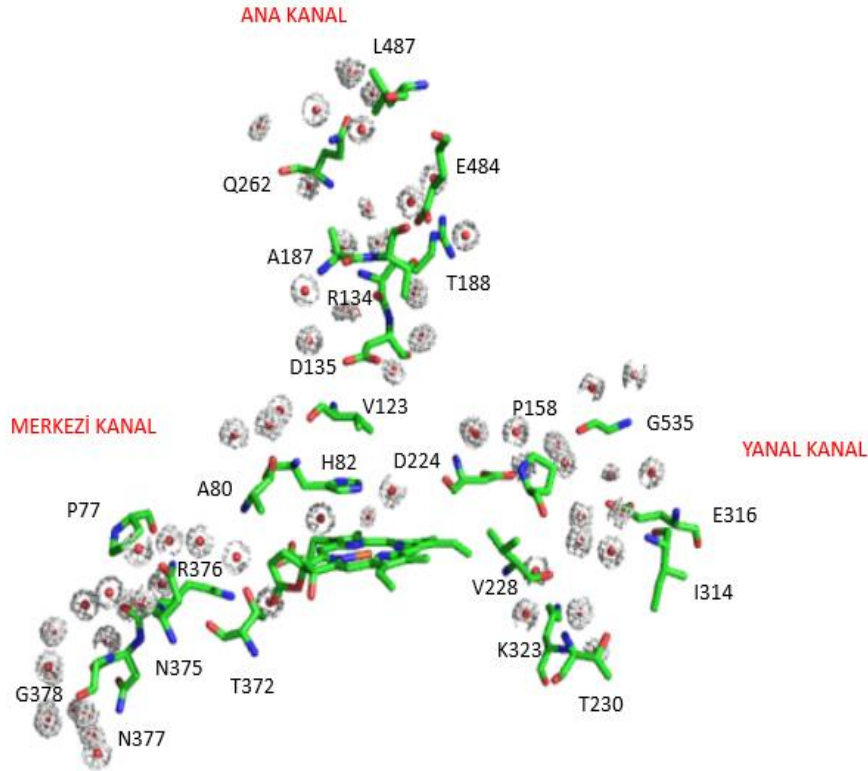
S. thermophilum katalazı (CATPO) her biri yaklaşık 80 kDa’dan oluşan tetramerik bir enzimdir. Her bir alt ünitesinde bir adet olmak üzere toplam dört adet *d*-tipi Fe/Hem grubu içermektedir. *P. vitale* katalazına (PVC) %77 oranında homoloji gösteren bu enzim

‘monofonksiyonel büyük alt üniteli katalaz’ grubuna dahildir (Kocabas ve diğ., 2008). Monofonksiyonel katalaz ailesinde yer almasına karşılık temel fonksiyonu olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanması yanında 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 oksitleyebildiği görülmüştür (Avcı ve diğ., 2013). Bu beklenmeyen bulgu üzerine Leeds Üniversitesi (İngiltere) ile iş birliği çerçevesinde enzimin rekombinant olarak ifadesi, çeşitli mutasyon ve üç-boyutlu yapı çalışmaları başlatılmıştır. Bu çalışmalarda esas amaç katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinin aynı aktif bölgede gerçekleşip gerçekleşmediğinin aydınlatılması olup; sonuçta katalitik aktivitenin tek bir merkezde meydana geldiği keşfedilmiştir. *Scytalidium* katalazında görülen H_2O_2 ’den bağımsız bu ikincil fenol oksidaz aktivite varlığı insan, sığır, ya da *Corynebacterium glutamicum* ve *Aspergillus niger* gibi mikroorganizmalardan elde edilmiş ticari katalazlarda da gösterilmiş olup bu tip bir ikincil aktivitenin düşük seviyelerde de olsa birçok katalazda olabileceği saptanmıştır (Yuzugullu ve diğ., 2013a). Nitekim memeli hücreleri (Vetrano ve diğ., 2005) başta olmak üzere *B. pumilus* (Loewen ve diğ., 2015), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*’dan (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) izole edilen katalazlarda da tanımlanmış ve aynı “hem” grubu içeren aktif bölgede gerçekleştiği öne sürülmüştür. Buradan, monofonksiyonel olarak tanımlanan katalazlarda “ikincil (fenol) oksidaz aktivite” varlığının çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

CATPO’nun merkezi kanalı P77, E78, R79, A80, T372, N375, N377 ve G378’den oluşmaktadır (Şekil 2.3). Merkezi kanalda yer alan bu amino asitlerden P77 (Pro77, Prolin), E78 (Glu78, Glutamik asit), R79 (Arg79, Arjinin) ve G378 (Gly378, Glisin), hemen hemen tüm monofonksiyonel katalazlarda korunmuş haldedir (Şekil 2.4).

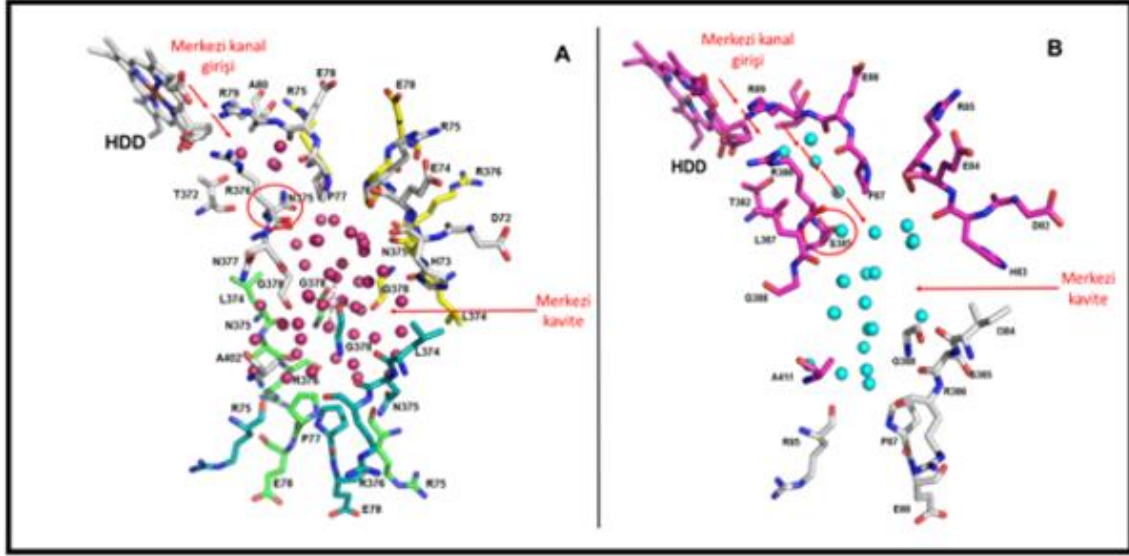
Diğer taraftan, kanaldaki diğer bir amino asit olan T372 (Thr372, Treonin), tüm büyük alt üniteli katalazlarda korunmuş (Şekil 2.4) olmakla birlikte bazı küçük alt üniteli katalazlarda yerini Alanin (A358, CAT-A; A340, PMC) amino asidi almıştır (Tablo 2.5). Diğer bir merkezi kanal amino asidi A80 (Ala80, Alanin) ise sadece *P. vitale* katalazında (PVC) korunmuştur (A62); diğer katalazlarda yerini Val (V90, CAT-1), Ile (I126, *E. coli* HP11), Asn (N68, CAT-A) veya Arg’nin (R52, PMC) aldığı görülmektedir (Tablo 2.5).

Diğer bir merkezi kanal amino asidi olarak N375 (N375, Asparajin), büyük alt üniteli katalazlardan *P. vitale* PVC (N357) ve *N. crassa* CAT-3 (N395) katalazlarında korunmuştur. Ancak başka büyük alt üniteli katalaz olan *E. coli* HPII ve *N. crassa* CAT-1 katalazlarında Asn'nin yerini Ser (S421, HPII; S385, CAT-1) alırken; küçük alt üniteli katalazlarda Asn yerine Tyr (Y343, PMC; Y361, CAT-A) veya His (H363, BLC; H343, EFC) bulunmaktadır (Tablo 2.5). Son olarak, N377 hiçbir büyük ya da küçük alt üniteli katalazda korunmamıştır. Diğer katalazlarda yerini His (H359, PVC; H397 CAT-3), Leu (L387, CAT-1; L423, HPII; L345, PMC; L363, CAT-A; L365, BLC) veya Val (V345, EFC)'e bırakmıştır.



Şekil 2.3. CATPO'daki kanal yapısı. Ana, merkezi ve yanıl kanal üzerindeki su molekülleri ve bazı amino asitler gösterilmektedir.

Merkezi kanalda korunmamış olan amino asitler (Tablo 2.5), enzimlerde yapısal bazı farklılıklara yol açmaktadır. Örneğin, CATPO'da bulunan N375 yerine CAT-1'de S385'in gelmesi CAT-1'de merkezi kanal ile kavite arasında düzenli bir solvent akışının oluşmasına sebep olmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *S. thermophilum* CATPO (A) ve *N. crassa* CAT-1 (B) katalazlarında merkezi kanal ve merkezi kavitenin karşılaştırılması. *Farklı alt birimlerdeki amino asitler, farklı renklerle gösterilmiştir. Ayrıca merkezi kanal ile kavite üzerinde tespit edilen su molekülleri koyu pembe (A) ve siyan mavimsi (B), Ca^{+2} iyonu (A) ise açık pembe ile renklendirilmiştir. (A) panelinde daire içine alınan N375'in (Asn375), CAT-1'e göre merkezi kanalı daralttığı ve merkezi kanal ile kavite arasında solvent akışını engellediği görülmektedir. Şekil çizimi için PyMOL programı kullanılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Enzimler

Bu çalışma esnasında kullanılan enzimler, markörler ve kimyasallar Sigma (Almanya), Invitrogen (İngiltere), Merck (Almanya), Bio-rad (Amerika), Bioshop (Kanada), ve Neofroxx (Almanya) firmalarından temin edildi. Plazmit DNA izolasyonunu gerçekleştirebilmek için QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) satın alındı. Restriksiyon enzimi olarak *DpnI* (NEB, İngiltere) kullanıldı. Selüloz membran filtreler (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya), solüsyonların sterilizasyonunu sağlamak için kullanıldı. Hızlı Performans Sıvı Kromatografi (FPLC) cihazı (AKTAPrime) ve saflaştırmada kullanılan kolon (HisTrap HP, 5 mL) GE Healthcare (Amerika)'dan temin edildi. Saflaştırılmış olan proteinlerin spektroskopik ölçümleri sıcaklık kontrollü Cary60 UV-VIS spektrofotometre (Agilent, Amerika) cihazı ile gerçekleştirildi.

3.2. Mikroorganizmalar

Farklı CATPO varyantlarının eldesinde *E. coli* XL-1 Blue ve BL21 (DE3) star suşları kullanıldı. Bu suşlar Luria Broth (LB) besiyerinde (%1 w/v tripton, %0,5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) ve uygun antibiyotik varlığında (50 µg/mL kanamisin), 37 °C'de bir gece orta düzeyde çalkalanarak (200 rpm) büyütüldü.

3.3. Plazmit, Mikroorganizma ve Kültür Hazırlanması

Bu çalışmada altı adet histidinden oluşan polihistidin etiketi, TEV proteaz bağlanma dizisi ve *catpo* genini taşıyan pET28a-CATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013a) rekombinant plazmiti kullanıldı.

S. thermophilum catpo genini taşıyan pET28a-CATPO plazmiti transfer etmek için kullanılan *E. coli* XL-1 Blue ve BL21 (DE3)star hücreleri farklı petrilerde, bir gece katı besiyerinde (Luria Broth Agar, LBA) büyütüldü. Kültürlerden alınan hücreler, sıvı besiyerlerine (LB) aktarıldı. LB besiyerine aktarılan hücreler, 37 °C'de yaklaşık 3 saat inkübe edildi ve saatte bir 595 nm'de optik yoğunluk (OD) değerleri ölçüldü. OD değeri yaklaşık 0,4 olduğunda, LB besiyerinde büyüyen kültürler 50 mL'lik falkon tüplerde 5 dk buz üzerinde bekletildi. Buzda bekletilen hücreler, 4 °C ve 3000 x g'de 10 dk santrifüj

edildi. Santrifüjden sonra falkondaki hücrelerin süpernatant kısmı atılıp, pelet kısmı 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 çözündürüldü. Daha sonra çözündürülen örnek, 4 °C ve 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Örneğin pelet kısmı 2 mL Tfb2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, %15 (v/v) gliserol, pH 6,5) içinde çözündürülüp, 50 µL olacak şekilde ependorf tüplerine konulduktan sonra hücreler sıvı azotta dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı.

3.4. Bölge Yönelimli Mutasyon Çalışmaları

S. thermophilum'un çift aktiviteli CATPO enziminde merkezi kanalın katalitik aktivitede herhangi bir rolü olup olmadığını araştırmak üzere kanalda bulunan amino asitleri (A80, T372, N375, N377 ve G378) hedef alarak bölgeye yönelik mutageniz çalışmalarının gerçekleştirilmesinde "Quikchange Site Directed Mutagenesis Kit (Agilent)" i kullanıldı. Mutasyon çalışmaları için tasarlanan oligonükleotit dizileri Tablo 3.1'de verilmektedir.

Primer tasarlamada kullanılan kit için hazırlanmış kılavuzda önerilen adımlar izlendi. Buna göre, 31 ila 36 baz uzunluğunda tasarlanan primerler için erime sıcaklığı (T_m) >75 °C üzerinde olmasına ve %GC oranının %47-71 arasında olmasına dikkat edildi.

Hedef mutasyonları içeren CATPO varyantlarına ait tahmini yapıların homoloji modellerini elde etmek için SWISS-MODEL protein modelleme sunucusu kullanıldı.(URL-2) Model olarak *E. coli*'de rekombinant olarak üretilen yabancı tip CATPO'nun amino asit dizisi (PDB numarası: 4aum) kullanıldı.

Her bir varyant için SWISS-MODEL tarafından oluşturulan modellerin değerlendirilmesi GMQE (Global Model Quality Estimation) ve QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) değerleri üzerinden yapıldı (Tablo 3.1)

CATPO'nun zıt zincirindeki her bir tamamlayıcı oligonükleotit primeri, KOD Hot Start DNA polimeraz (Merck, Almanya) kullanılarak 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) boyunca çoğaltıldı. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı (Tablo 3.2) ve takip edilen PZR döngü aşamalarına (Tablo 3.3) ait detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

Tablo 3. 1.Bölge yönelimli mutasyonlarda kullanılmak üzere tasarlanan oligonükleotitler.

Varyantlar	Sekans değişikliği	Oligonükleotit	GMQE	QMEAN
A80I	GCT→ATC	CGTGTTCGGAACGTATCGTTCACGCTCGTGGTGC	0,91	0,9±0,05
N375H	AAC→CAC	GGACACCCAGCTGCACCGTAACGGTGGTCCGAA	0,91	0,9±0,05
N375S	AAC→AGT	GGACACCCAGCTGAGTCGTAACGGTGGTCCGAA	0,91	0,9±0,05
T372A	ACC→GCG	CTCTTACCTGGACGCGCAGCTGAACCGTAACGG	0,91	0,9±0,05
T372S	ACC→TCC	CTCTTACCTGGACTCCCGCTGAACCGTAACGG	0,91	0,9±0,05
N375E	AAC→GAG	GGACACCCAGCTGGAGCGTAACGGTGGTCCGAA	0,91	0,9±0,05
G378R	GGT→CGC	CCAGCTGAACCGTAACCGCGGTCCGAACCTTCGAA	0,91	0,9±0,05
N377L	AAC→CTC	CCAGCTGAACCGTCTCGGTGGTCCGAACCTTCGAAC	0,91	0,9±0,05

*Mutasyona uğratılmış kodonlar kırmızı renk ile belirtildi.

CATPO'nun zıt zincirindeki her bir tamamlayıcı oligonükleotit primeri, KOD Hot Start DNA polimeraz (Merck, Almanya) kullanılarak 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) boyunca çoğaltıldı. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı olarak Tablo 3.2 ve takip edilen PZR döngü aşamaları Tablo 3.3'de detaylı olarak verilmiştir.

Oligonükleotitler sıcaklık döngüsü boyunca uzayarak, arzu edilen mutasyonu içeren çentikli plazmitlerin ortaya çıkmasını teşvik etmektedirler. Sıcaklık döngüsünü takiben, PZR ürünü *DpnI* (NEB, İngiltere) ile muamele edildi. *DpnI* enzimi metillenmiş ve yarı-metillenmiş DNA'yı tanıyan bir endonükleazdır ve PZR sonrası reaksiyon ortamında mutasyona uğramamış plazmit DNA'sının parçalayarak sadece arzu edilen mutasyonu içeren plazmit DNA'yı seçmek için kullanılmaktadır. *E. coli* suşundan izole edilen ve PZR'ye girmeyen parental plazmit DNA'ya metil takılmış halde bulunduğundan *DpnI* enzimi tarafından parçalanır. Böylece ortamda endonükleaz ile muamele sonrası sadece arzu edilen mutasyonu içeren plazmit DNA'sı kalmaktadır. Mutasyon içeren yeni sentezlenmiş DNA daha sonra *E. coli* XL-1 Blue kompetan hücrelerine aktarılacak için hazır hale getirildi.

Tablo 3.2. Reaksiyon karışımı (Yüzügüllü, 2010; Zengin, 2016)

PZR bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µL	1 U/µL
KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µL	10X
dNTP	5 µL	2 mM
Plazmid DNA	1 µL	90 ng/ µL
İleri (forward) primer	1,5 µL	10 µM
Geri (reverse) primer	1,5 µL	10 µM
MgSO ₄	3 µL	25 mM
Steril ddH ₂ O	32 µL	-
Toplam	50 µL	-

Tablo 3.3. Takip edilen PZR Döngüsü (Yüzügüllü, 2010; Zengin, 2016)

PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyon aşaması	95	2 dk	1
Denatürasyon	95	30 s	25
Bağlanma	55-65	30 s	25
Uzama	68	8 dk	25
Son uzama	68	10 dk	1
Saklama	4	Süresiz	-

Rekombinant plazmit DNA (pET28a-CATPO) bantlarını görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı. Agaroz jel hazırlamak için 0,8 g agaroz tartılarak 100 mL 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) çözeltisi içinde sıcakta çözünmesi sağlandı. DNA bantlarını görüntülemek amacıyla agaroz jel çözeltisine SYBR Safe (Invitrogen, İngiltere) son konsantrasyonu 1 g/mL olacak şekilde eklendi. Örnekler yükleme tamponu (6X; NEB, İngiltere) ile 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Başka bir kuyucuğa 6 µL

DNA markörü (1kbç; NEB, İngiltere) yüklendi. Elektroforez 100 V'da 45 dk yürütüldü (Yuzugullu ve diğ., 2013b). Elektroforez bitiminde DNA'ların görüntülenmesi için Ultra Viyole (UV) ışık kullanıldı.

Örneklerin içerdikleri DNA miktarını tayin etmek ve saflıklarını belirlemek için UV spektroskopisi ve Qubit 2,0 florometre (Amerika) kiti kullanıldı. Saflık için UV spektroskopisinde 260 nm ve 280 nm ölçümlerinin karşılaştırılması yöntemi kullanıldı. DNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranının 1,7 ile 2,0 arasında olmasına dikkat edildi. DNA konsantrasyonunu hesaplamak için 260 nm'de ölçülen değerler kullanıldı (Denklem 3.1).

$$\text{Dna konsantrasyonu}(\mu\text{L/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times \frac{50\mu\text{ DNA/mL}}{(1 \text{ OD}_{260} \text{ birim})} \quad (3.1)$$

3.5. Kompetan Hücrelere Transformasyon

İstenilen saflık ve miktarda üretilen rekombinant plazmit DNA'lar, daha sonra *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine transforme edildi. -80 °C'den alınan hücreler buz içerisinde çözündürülüp hücrelerin ısısı yükselmeden 50 µL hücre kültürüne 1 µL PZR ürünü olan farklı tipte plazmit örnekleri (yaklaşık 1-10 ng DNA içerecek şekilde) eklendi. 30 dk buzda inkübasyonu gerçekleşen hücreler 1 dk 42 °C'deki su banyosunda inkübasyona maruz bırakıldı. 2 dk buzda gerçekleşen inkübasyonun ardından içerisine 450 µL LB sıvı besiyeri eklendi. 37 °C'de 1 saat çalkalamalı inkübasyon ile kültürler çoğaltıldıktan sonra 8000 x g'de 3 dk santrifüj edildi ve 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine yayma yöntemi ile inokülasyonu gerçekleştirildi (Yuzugullu ve diğ., 2013b). İnoküle edilen hücreler 37°C'lik etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.6. Plazmit DNA İzolasyonu

Hedeflenen baz dönüşümlerinin gerçekleşip gerçekleşmediğini test etmek üzere *E. coli* XL-1 Blue hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Kanamisin içeren LBA'da büyüyen koloniler steril çubuk ile seçilerek LB sıvı besiyerinde ve uygun antibiyotik varlığında (50 µg/mL kanamisin), 37 °C'de bir gece 200 rpm'de inkübe edildi. Plazmit DNA'yı izole etmede Alkalın-SDS Plazmit Miniprep yöntemine dayanan QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) firma tarafından önerilen basamaklar izlenerek gerçekleştirildi. Bu kapsamda; bir gece 37 °C'de inkübe edilen 10 mL (LB sıvı) taze

kültür 10000 x *g*'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. 250 µL “Buffer P1” eklenerek pellet çözöldü ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 250 µL “Buffer P2” eklendi ve örnek berraklaşınca kadar 4-6 kere ters düz edilerek karıştırıldı. 350 µL “Buffer N3” eklendi ve 4-6 kere ters düz edilerek karıştırıldı. 13000 x *g*'de 10 dk mikrosantrifüj yapıldı. Süpernatant elüsyon kolonuna alındı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzöntü atıldı. Kolon, 0,5 mL “Buffer PB” eklenerek yıkandı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzöntü atıldı. Kolon 0,75 mL “Buffer PE” eklenerek yıkandı ve 1 dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzöntü atıldı. Kolon 1,5 mL’lik eppendorf tüpe yerleştirildi ve kolona 50 µL ddH₂O eklendi, 1 dk beklemenin ardından 1 dk santrifüj yapıldı ve plazmit süzöntüde elde edildi. Elde edilen plazmit -20°C’de saklandı.

3.7. DNA Sekans Analizi

Plazmit DNA’lar izole edildikten sonra istenilen nokta mutasyonlarının gerçekleşip gerçekleşmediğini test etmek üzere DNA sekans analizi MacroGen (Hollanda) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Sekanslama için Tablo 3.4’te verilen primerler kullanıldı.

Tablo 3.4. DNA sekans analizi esnasında kullanılan CATPO primerleri

Primer	Oligonökleotid Dizisi
T7 (İleri)	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
T7 (Geri)	3'-CTATAGTGAGTCGTATTA-5'
CATPO_F700 (İleri)	5'-GTCACGGTATCCCCGC-3'
CATPO_R700 (Geri)	3'-GCGGGATACCGTGAC-5'

3.8. Rekombinant CATPO Varyantlarının Üretimi

Hedeflenen mutasyonların doğrulanmasından sonra rekombinant plazmitler, *E. coli* BL21(DE3) star hücrelerine transforme edildi. Tek koloniden çoğaltılan bakteri suşları LB sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra 121 °C’de 20 dk otoklavda steril edilen %80 (v/v) gliserol eklenerek -80 °C’de muhafaza edildi. Stok kültürler daha sonra yabanıl tip (wt) CATPO proteini ve varyantlarının üretiminde kullanıldı. Bu kapsamda bir gece 37 °C’de inkübe edilen 10 mL (LB) taze kültür, 50 µg/mL kanamisin içeren 1 litrelik LB sıvı besiyerine transfer edildi. Ardından 37 °C’de yaklaşık 2 saat inkübe edildi ve 30 dk’da

bir 595 nm’de OD değerleri ölçüldü. OD yaklaşık 0,6-0,8 olduğunda besiyerine 0,1 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ilave edilerek 30 °C ve 120 rpm’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler inkübasyon sonrasında 9000 x *g*’de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve protein saflaştırma denemelerinde kullanılmak üzere -80 °C’ye kaldırıldı (Yuzugullu ve diğ., 2013b).

3.9. Rekombinant CATPO Varyantlarının Saflaştırılması

Rekombinant (wt)CATPO ve dört farklı varyantının (A80I, T372A, T372S ve N377L) saflaştırılmasında kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edilen hücreler buzda eritildikten sonra 100 mL lizis tamponuna (50 mM Na-HEPES, %25 (w/v) süktroz, %1 (v/v) Triton X-100, 5 mM, MgCl₂. 6H₂O 1 mg/mL lizozim, 5 μ L benzonase nuclelease (5KU, Sigma), 1:4 oranında EDTA içermeyen proteaz inhibitör tablet, pH 8,0) transfer edilerek yaklaşık 3 saat lizis işlemine maruz bırakıldı. Hücreler daha sonrasında 10000 x *g*’de çöktürülerek supernatant kısmı bir gece boyunca bağlama tamponuna (0,5 M NaCl içeren 20 mM Sodyum fosfat, pH 7,4) karşı diyaliz edilerek saflaştırmada kullanılmak üzere hazır duruma getirildi. Bunun için 5 mL’lik HiTrap kolonu AKTA Prime Plus Kromatografi cihazına (GE Healthcare, Amerika) bağlandı. Daha sonra kolondan bağlama tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 20 mM İmidazol, pH:7,4) geçirilerek His-etiketli proteinlerin kolona bağlanması için hazır hale getirildi. Lizis işlemi uygulanan, hücrelerden arındırılan ve kolona yüklemek için hazır hale getirilen istenilen proteini içeren diyaliz örneği, 1,0 mL/dk akış hızı ile kolona yüklendi. Kolona bağlanmamış veya zayıf bağlanmış proteinleri uzaklaştırmak için kolon yıkama tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 40 mM İmidazol, pH 7,4) ile yıkama işlemine maruz bırakıldıktan sonra elüsyon tamponu (20 mM Sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 500 mM İmidazol, pH 7,4) ile arzu edilen proteinin kolondan uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Saflaştırma sırasında kullanılan tüm çözeltiler AKTA cihazına verilmeden önce 0,22 μ m’lik filtrelerden geçirildi.

Afinite kromatografisi sonucunda saf proteini içeren fraksiyonları belirlemek amacıyla jel elektroforezi uygulandı. Tek bir tüpte toplanan fraksiyonlardan tuz (NaCl) ve imidazolü uzaklaştırmak amacı ile bir gece 20 mM Sodyum fosfat (pH 7,4) çözeltisine karşı diyaliz edildi. Diyaliz edilen örnekler 0,22 μ m’lik filtrelerden geçirildikten sonra 1,5 mL’lik tüplere aktarıldı.

3.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Analizi

Afinite kromatografi sonrası toplanan fraksiyonlarda saf haldeki hedef proteinin tespiti için SDS-PAGE uygulandı. Bu analizde, Bio-Rad Mini-Protean (Amerika) sistemi kullanıldı.

SDS-PAGE; % 5 v/v yükleme jeli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), % 0,1 SDS, % 5 Akrilamid ve TEMED) ve % 15 v/v ayırma jeli (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), % 0,1 SDS, % 15 Akrilamid ve TEMED) hazırlanarak gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Örnekler indirgeme ajanı içeren yükleme tampon ile 90 °C’de 10 dk kaynatıldı. Protein markör’ü olarak Prestained Protein SHARPMASS VII (6,5-270 kDa) kullanıldı. Elektroforez 250 V’da 50 dk yürütülerek gerçekleştirildi. Yürütülen jeller Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama ile boyandı.

3.11. Görünür UV Spektrum Analizi

Spektrofotometrik çalışmaları içeren biyokimyasal deneyler, oda sıcaklığında Cary 60 UV-Visible Spektrofotometre (Agilent, Amerika) ile gerçekleştirildi. Saflaştırılmış wtCATPO ile varyantlarının absorpsiyon spektra ölçümleri 200-900 nm aralığında yapıldı.

3.12. Protein Miktar Tayini

Saflaştırılmış örneklerin protein miktar tayinleri Bradford (Sigma, Almanya) metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının verdiği absorpsiyon değerlerine bakıldı (595 nm). Standart protein olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı (Bradford, 1976). Standart eğri grafiği EK-B’de verilmektedir.

3.13. Enzim Aktivite Tayini

Saf haldeki proteinlerin katalaz (CAT) ve fenol oksidaz (PO) aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Katalaz aktivitesi (CAT), Beers ve Sizer (1952)’in tanımladığı metoda göre, hidrojen peroksitin kaybolduğu 240 nm’de ölçüldü. 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. Enzimi eklemeyen önce substrat solüsyonu, sıcaklığı dengelemek için sıcak su

banyosunda (60 °C) 1 dk inkübe edildi. 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 Denklem 3.2’de verilen denklem ile hesaplandı.

$$CAT\ aktivitesi(U/mL) = \frac{(\Delta OD_{240} / \Delta t) \times \left(\frac{1}{\epsilon}\right) \times Reaksiyon\ hacmi(mL) \times (10^3)}{Enzim\ hacmi\ (mL)} \times Seyreltme\ faktörü \quad (3.2)$$

Fenol oksidaz (PO) aktivitesi için kullanılan 2 mL’lik reaksiyon sıvısı, 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içinde hazırlanmış 100 mM katekol çözeltisinden 0,5 ml, enzim çözeltisinden 0,5 ml ve tampon çözeltisinden 1 mL ilave edilerek hazırlandı. 60 °C’de gerçekleşen reaksiyon sırasındaki katekol oksidasyon ürünü zamana karşı 420 nm’deki soğurma (absorbans) değişimi olarak belirlendi ve aktivite buna göre 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 dk’da okside edebilen enzime karşılık gelmekte olup Denklem 3.3’te verilen formül ile hesaplandı.

$$PO\ aktivitesi(U/mL) = \frac{(\Delta OD_{420} / \Delta t) \times \left(\frac{1}{\epsilon}\right) \times Reaksiyon\ hacmi(mL) \times (10^6)}{Enzim\ hacmi\ (mL)} \times Seyreltme\ faktörü \quad (3.3)$$

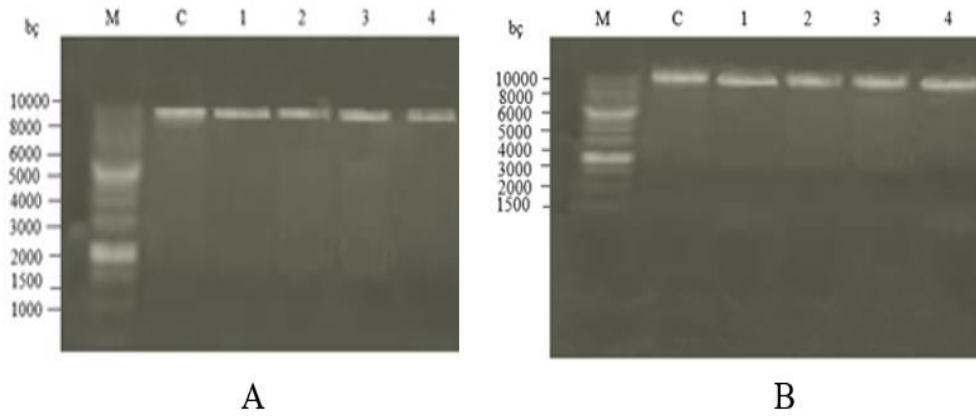
3.14. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Her bir CATPO varyantına ait K_m (Michaelis-Menten sabiti, mM), V_{max} (maksimal başlangıç hızı, U/mL), k_{cat} (turn-over sayısı, 1/s) ve k_{cat}/K_m (katalitik etkinlik) değerleri hesaplandı. K_m ve V_{max} sabitleri, Lineweaver–Burk grafiğinden hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934). Enzimin katalitik hız sabiti (k_{cat}), V_{max}=k_{cat}·[E]_t denkleminde hesaplandı. Substrat olarak H₂O₂ (katalaz substratı) ve katekol (fenol oksidaz substratı) kullanıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bölge Yönelimli Mutagenез ile CATPO Varyantlarının Oluşturulması

CATPO merkezi kanalın enzimin katalitik aktivitesinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmak üzere merkezi kanal amino asitlerinin benzer veya farklı özellikte amino asitlere (Ala80Ile, Thr372Ser, Thr372Ala, Asn375Glu, Asn375Ser, Asn375His, Asn377Leu, Gly378Arg) dönüştürülmesinde PZR bazlı Quikchange bölge yönelimli mutagenез yöntemi uygulandı. PZR sırasında mutajenik primerlerin hedef DNA ile bağlanabilmesi için 55 °C-62 °C arasında farklı sıcaklıklarda denemeler yapıldı. Sonuçta, her bir CATPO varyantını taşıyan rekombinant plazmitler için yaklaşık 9 kbç büyüklüğünde agaroz jel elektroforez sonrası bantlar görüntülendi (Şekil 4.1).

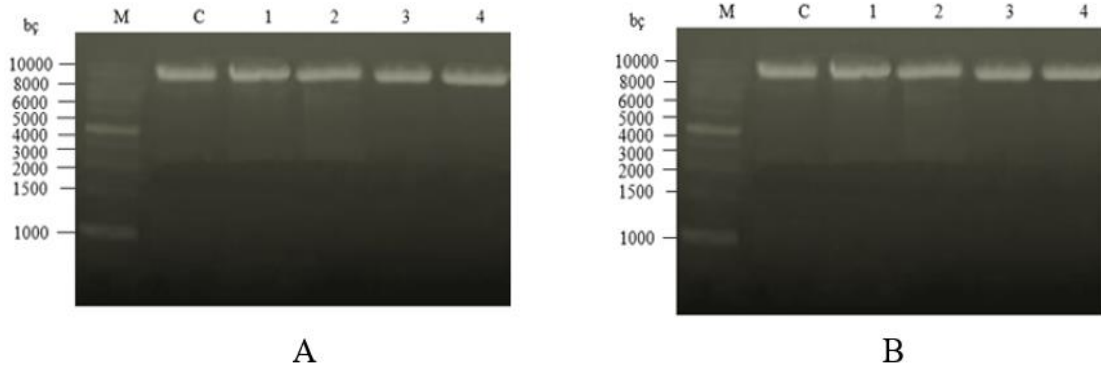


Şekil 4. 1. Bölge Yönelimli Mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların agaroz jel görüntüleri, A-B.*A; bç, Baz çifti; M, DNA markör (10 kbç, NEB); C, CATPO; 1, A80I; 2, T372S; 3,T372A; 4, N377L. B; bç, Baz çifti; M, DNA markör (10 kbç, NEB); C, CATPO; 1, N375E; 2, N375S; 3, N375H; 4, G378R.

Her bir CATPO varyantının oluşturulmasında kullanılan primer bağlanma sıcaklıkları (Tablo 4.1) incelendiğinde aynı enzimle daha önceden yapılmış bölge yönelimli mutagenез çalışmalarında (Balcı, 2016; Zengin, 2016) tespit edilen primer bağlanma sıcaklıkları ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği görülmektedir. Mutasyonu taşıyan plazmitlerin seçilimi için reaksiyon karışımı PZR sonrası *DpnI* enzimi ile muamele edilerek parental plazmitlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi restriksiyon enzimle muamele sonrası istenilen uzunlukta (9 kbç) DNA bantları tüm CATPO varyantlarında görüntülendi.

Tablo 4.1. CATPO varyantları için primer bağlanma sıcaklıkları

Mutant	Bağlanma sıcaklığı (°C)
A80I	55,9°C
N377L	55°C-60°C
T372A	55,9°C
T372S	55,9°C
N375E	55,9°C
N375S	55,9°C
N375H	55,9°C
G378R	55,9°C



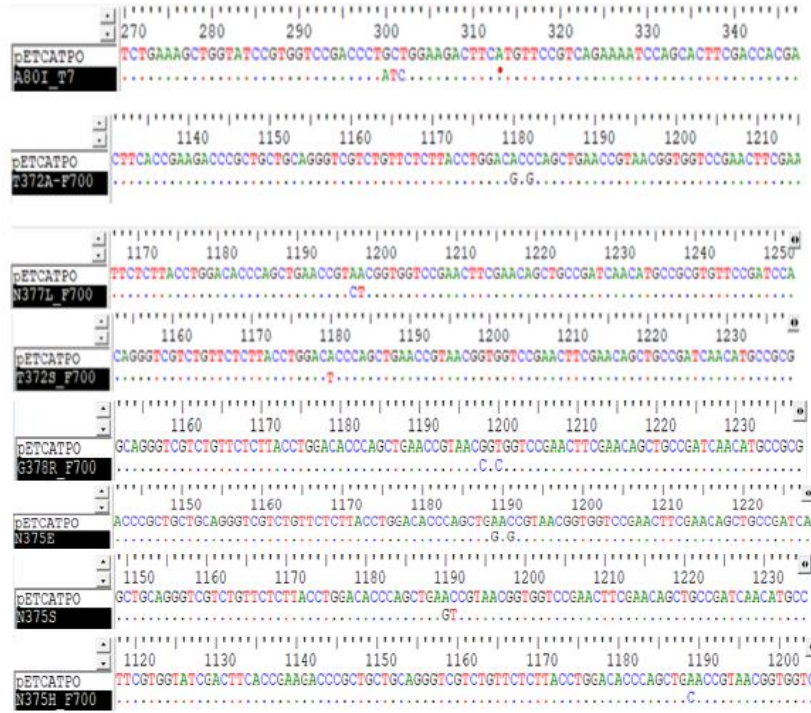
Şekil 4. 2.Bölge Yönelimli Mutagenез sonucunda elde edilen mutant CATPO'ların DpnI enzimi ile muamelesi sonrası agaroz jel görüntüleri, A-B.* A; bç, Baz çifti; M, DNA markör (10 kbç, NEB); C, CATPO; 1, A80I; 2, T372S; 3, T372A; 4, N377L. B; bç, Baz çifti; M, DNA markör (10 kbç, NEB); C, CATPO; 1, N375E; 2, N375S; 3, N375H; 4, G378R.

Sonrasında rekombinant plazmitlerin konsantrasyonları ölçülerek saflıkları test edildi. Tablo 4.2'de verilen DNA miktarlarının bakteri hücrelerine aktarım için uygun (≥ 80 ng/ μ L) oldukları belirlendi (Balcı, 2016; Zengin, 2016).

Tablo 4.2. Quikchange sonrası recombinant plazmitler için ölçülen DNA miktar bulguları

Mutant	DNA Miktarı (ng/ μ L)
A80I	95
N377L	140
T372A	102
T372S	101
N375E	119
N375S	85
N375H	99
G378R	88

Quikchange yöntemi ile mutasyona uğratılan *catpo* geninde istenilen nokta mutasyonun doğrulanması DNA dizi analizi ile yapıldı. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi wtCATPO ile DNA dizileri karşılaştırılan dört varyantın, planlanan gen bölgelerinde istenen özellikte mutasyonlar içerdiği gözlemlendi ve dizilimde herhangi bir kirlilik görülmeden temiz bir dizilim elde edildi.



Şekil 4. 3.CATPO ve varyantların Bioedit programı (7.2.5) ile oluşturulan DNA sekans analizi sonuçları.

4.2. CATPO Varyantlarının *E. coli*'de Rekombinant Üretimi ve Saflaştırılması

Farklı CATPO varyantlarının üretimi esnasında *E. coli* BL21(DE3)star suşları kullanıldı. Rekombinant proteinlerin üretiminin indüklenmesinde besi ortamına farklı proteinler için kullanılan IPTG eklendi (Klug ve diğ., 2011). IPTG eklenmesinin sebebi şu şekilde açıklanabilir:

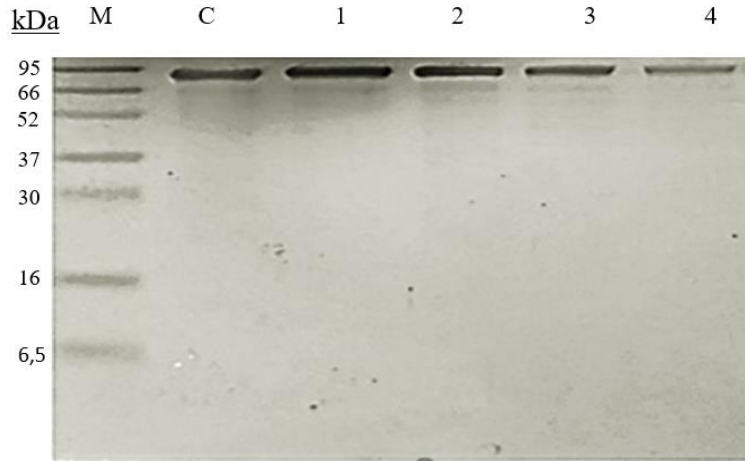
Rekombinant protein üretiminde sıklıkla T7 RNA polimeraza dayalı pET sistemi kullanılmaktadır. pET vektör sisteminin temeli, bakteriyofaj T7'nin RNA polimeraz enzimini kodlayan genin kromozomal kopyasını taşıyacak şekilde tasarlanmış *E. coli* konağına dayanmaktadır. Bu RNA polimeraz geni, IPTG ile uyarılabilecek bir

promotörün kontrolü altındadır. Bu bölge, bakteri kromozomundaki DE3 lokusunda yer almaktadır. IPTG eklenmediği sürece, lac promotörü, LacI represörü tarafından baskılanmaktadır. Bu durumda T7 polimeraz sentezlenmemektedir. IPTG eklendiğinde, LacI represörü, lac promotör bölgesinden uzaklaştırılır ve T7 RNA polimeraz geninin ifadesi gerçekleştirilir. T7 RNA polimeraz, ancak translasyonu gerçekleştikten sonra pET ekspresyon plazmitindeki T7 promotöründen transkripsiyonu yapabilmektedir. En önemlisi, pET ekspresyon plazmitindeki T7 promotörü, *E. coli*'nin ürettiği RNA polimeraz tarafından yeterince aktifleştirilemediği için, klonlanan genin ekspresyonu IPTG'ye bağlıdır.

Bu bilgi ışığında, *E. coli* BL21(DE3)star hücrelerine tranforme edilen pET28aCATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013a) plazmitinden *catpo* geninin ekspresyonunun sadece IPTG varlığında gerçekleşmesi beklenmektedir. Buna göre, mutasyonun gerçekleştiği doğrulanan CATPO varyantlarından A80I, T372A, T372S, N375E, N375S, N375H, N377L ve G378R'nin üretimi, büyüme ortamına IPTG eklenmesinin ardından 120 rpm'de ve 30 °C'de 24 saat süreyle gerçekleştirildi. Sekiz varyanttan sadece dördünde (A80I, T372A, T372S ve N377L) aktif haldeki katalaz enzim üretiminin gerçekleştiği SDS-PAGE ve aktivite analizleri ile tespit edildi (veriler gösterilmemiştir).

N375E, N375S, N375H ve G378R üretiminin başarılı sonuçlanmaması, Asn375 ve Gly378'in proteinin doğru bir şekilde katlanması için gerekli olduğuna işaret etmektedir. Belirtilen pozisyonlardaki bu iki amino asitin farklı amino asitlere değişimi protein yapısını bozarak denatürasyona sebep olmuş olabilir (Jha ve diğ., 2011). Diğer taraftan aktif bir şekilde üretilen CATPO varyantlarından A80I, T372A, T372S ve N377L'ye ait sıvı hücre kültürlerinin yeşil renkte olduğu gözlemlendi. Aktif bölgesinde *d* tipi hem grubu içeren proteinlerin üretildiği hücrelerin yeşil renkte olması (Balcı, 2016; Zengin, 2016), bu çalışmada üretilen CATPO varyantlarının da hem-*d* içerdiğine işaret etmektedir.

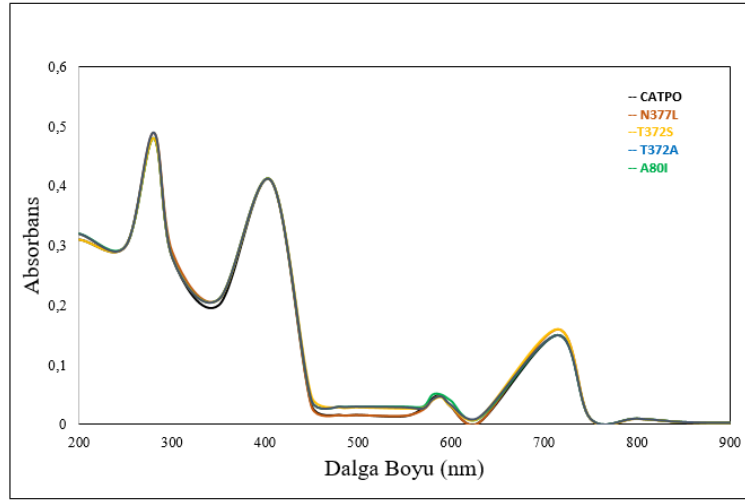
A80I, T372A, T372S ve N377L proteinlerini saflaştırmak üzere Bölüm 3.12'de belirtilen adımlar izlenerek tek basamakta proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirildi. Afinite kromatografi sonunda elde edilen örnekteki proteinin saflığı ise SDS-PAGE ile yapıldı ve beklenildiği gibi jel üzerinde yaklaşık 80 kDa ağırlığında tek bir bant gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 4. Histidin bağlı kolon kromatografisi ile saflaştırılan CATPO varyantlarının SDS-PAGE jel görüntüsü. *(M; EuroClone Marker, C; wtCATPO, 1; N377L, 2; A80I, 3; T372A, 4; T372S. Her kuyucuğa 100µg örnek yüklenmiştir.).

4.3. CATPO Varyantlarının UV Görünür Bölge Spektrumlarının Karşılaştırılması

Saf haldeki A80I, T372A, T372S ve N377L'nin UV-Vis spektrumları, her bir protein örneğinden 3 mg/mL kullanarak 200-900 nm aralığında gerçekleştirildi. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere 280 nm, 408 nm, 590 nm ve 715 nm dalga boylarında olmak üzere dört adet maksimum absorbands piki gözlemlendi. Bunlardan 280 nm'de gözlenen pik protein varlığının bir göstergesidir. 408 nm'de gözlenen ikinci pik ise proteinin yapısında hem grubunun bulunduğu işaret eder. Bu sonuçlar, maksimum absorbandsları 405 nm ve 588 nm'de gözlemlenen termofilik bir mantar olan *Thermoascus aurantiacus* (Wang ve diğ., 1998), maksimum absorbandsları 405 ve 590 nm'de gözlemlenen bir bakteri olan *Klebsiella pneumoniae*'de (Goldberg ve Hochman, 1991) üretilen katalaz enzimine ait sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae* (Zámocký ve Koller, 1999) ve *Penicillium simplicissimum* (Fraaije ve diğ., 1996) gibi diğer kaynaklardan elde edilen katalazlar da sırasıyla 406 nm ve 407 nm'de maksimum absorbands göstermektedirler. Bu enzimlerin tümü, 405-408 nm civarında Soret bandında “hem” içeriklerini belirleyen absorbands değerlerine sahiptir.



Şekil 4. 5. 200-900 nm aralığında belirlenen saf wtCATPO ve varyantlarının (3 mg/mL) UV-Vis spektrumu

CATPO ve dört varyantı için içerdikleri “hem” grubunun miktarlarını karşılaştırmak üzere “hem” miktarının belirleyicisi olarak bilinen R_z (A_{408}/A_{280}) değerleri hesaplandı (Tablo 4.3). Her protein için ölçülen R_z değerinin *T. aurantiacus* ($R_z=1,02$) (Wang ve diğ., 1998), *S. cerevisiae* ($R_z=1,0$) (Zámocký ve Koller, 1999) ve *E. coli* HP11 katalazı ($R_z=0,8$) (Loewen ve diğ., 1993) için rapor edilen R_z değerlerine oldukça benzer olduğu görüldü. Bu bulgular, proteinlerin fonksiyonları için yeterli düzeyde “Hem” miktarının sentezini gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca hem-*d* için belirleyici olan 590 ve 715 nm’de ölçülen pikler için A_{590}/A_{408} ve A_{715}/A_{408} değerleri hesaplanarak (Tablo 4.3) literatürde hem-*d* içeren *E. coli* HP11 enzimi (Loewen ve diğ., 1993) ile karşılaştırıldı ve benzer oldukları gözlemlendi. Böylece, bu çalışmada elde edilen A_{590}/A_{408} ve A_{715}/A_{408} oranlarının diğer hem-*d* içeren katalazlar ile orantılı ve tutarlı olduğu görüldü.

Tablo 4.3. wtCATPO ve varyantlarının R_z , A_{590}/A_{408} ve A_{715}/A_{408} değerlerinin *E. coli* HP11 ile karşılaştırılması

Varyant	R_z (A_{408}/A_{280})	A_{590}/A_{408}	A_{715}/A_{408}
wtCATPO	0,8	0,16	0,07
N377L	0,8	0,15	0,06
A80I	0,7	0,14	0,05
T372S	0,7	0,12	0,06
T372A	0,7	0,13	0,07
HP11	0,8	0,17	0,06

*HP11’ya ait değerler Loewen ve diğ., 1993’den alınmıştır.

4.4. WtCATPO ve Varyantlarının Spesifik Aktivitelerinin Karşılaştırılması

CATPO ve dört varyantın (A80I, T372A, T372S ve N377L) katalaz ve fenol oksidaz aktivite ölçümleri Bölüm 2.13’de belirtilen şekilde yapıldı. Tablo 4.4’te verilen katalaz ve fenol oksidaz aktivite sonuçlarına göre iki varyant hariç spesifik aktivitelerinde herhangi azalma tespit edilmedi. Diğer taraftan en çarpıcı ve dikkat çekici artış N377L varyantında gözlemlendi.

N377, merkezi kanala yaklaşık 10,87 Å uzaklıkta yer almaktadır. T372 ve A80 amino asitlerine göre en uzak konumda merkezi kavitede yer almaktadır. N377’nin diğer katalazlardaki eşlenikleri Lösin ve Valin gibi hidrofobik amino asitlerdir (Şekil 2.4). Bu çalışmada Asn377, diğer katalazlardaki eşleniklerinden biri olan Leu’ya dönüştürülerek enzim üzerinde nasıl bir etkiye sebep olacağı araştırıldı. Tablo 4.4’te görüldüğü gibi CATPO’ya oranla katalaz aktivitede %263, fenol oksidaz aktivitede ise %125 artış tespit edildi. Bulgular, asparajin gibi polar bir amino asidin apolar karakterde başka bir amino aside dönüştürülmesinin katalitik aktiviteyi olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.

Tablo 4.4. wtCATPO ile merkezi kanal varyantlarının spesifik aktiviteleri ve “hem” tiplerinin kıyaslanması

Varyant	Spesifik aktivite		% WT aktivite		Hem tipi
	Katalaz aktivite ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{dk}$)	Fenol oksidaz aktivite ($\text{nmol}/\text{mg}/\text{dk}$)	Katalaz	Fenol oksidaz	
wtCATPO	15703 $\pm$ 281	211 $\pm$ 2	100	100	<i>d</i>
N377L	41344 $\pm$ 421	264 $\pm$ 3	263	125	<i>d</i>
A80I	23278 $\pm$ 204	227 $\pm$ 1	148	107	<i>d</i>
T372S	13515 $\pm$ 164	227 $\pm$ 1	86	108	<i>d</i>
T372A	14184 $\pm$ 162	138 $\pm$ 2	90	65	<i>d</i>

A80 aktif merkezdeki “hem” grubuna N375 ve T372’ye göre en yakın olanıdır (9,15 Å uzaklıkta). Diğer katalazlardaki eşleniklerinde aynı konumda Valin, Asparajin, İzolösin ve Arjinin amino asitleri bulunmaktadır (Şekil 2.4). Çalışmada alanin amino asiti izolösine dönüştürülerek aktivitedeki olası etkilerine bakıldı. Mutasyon sonucunda katalaz aktivitede CATPO’ya göre %148’lik bir artış gözlenirken fenol oksidaz aktivitede

önemli bir değişiklik saptanmadı. Bulgular, bu konumda hidrofobik bir amino asitin katalitik aktivite için önemli olduğunu göstermektedir.

T372, aktif bölgede bulunan Hem-d'den yaklaşık 10.36 Å uzaklıkta yer alır. T372 monofonksiyonel katalazlarda yarı korunmuş bir amino asittir. Kristal yapısı belirlenen monofonksiyonel katalazların yarısında Treonin yerine Alanin bulunmaktadır. Bu durum bu konumda apolar veya polar yapıda bir amino asidin bulunabileceğine işaret etmektedir. Gerçekten de hem polar ancak daha küçük yan zincire sahip Serin hem de apolar Alanin'e dönüştürüldüğünde aktivitede büyük bir azalma/artış gözlenmedi (Tablo 4.4).

Çalışmanın başında Treonin'den daha küçük yan zincire sahip Serin eklendiğinde kanal çapında oluşabilecek olası artışa bağlı olarak katalaz veya fenol oksidaz aktivitede artış olabileceği öngörülmüştü. Ancak beklenenin tersine aktivitede herhangi bir artış gözlenmedi. Hatta Alanin varlığında fenol oksidaz aktivitede düşüş gözlenmesi oksidatif substratlar için polar bir amino asidin bu konumda olması gerektiğine işaret etmektedir.

Özetle, CATPO'nun merkezi kanalında bulunan A80, T372 ve N377'nin diğer katalazlardaki eşleniklerine dönüştürüldüğünde üretilen varyantlardan N377L (%263) ve A80I'nın (%148) katalaz aktivitelerinde yabancı tip enzime göre dikkate değer bir artış tespit edildi. Diğer taraftan T372S ve T372A'nın katalaz aktivitelerinde CATPO'ya göre sırasıyla %14 ve %10'luk bir düşüş olduğu gözlemlendi.

T372A'nın fenol oksidaz aktivitesinde de CATPO'ya göre %35'lik bir düşüş kaydedildi ancak T372S'nin fenol oksidaz aktivitesinde düşüş saptanmadı. Aktivite bulguları, gerçekleştirilen dört mutasyonun (Ala80Ile, Thr372Ala, Thr372Ser ve Asn377Leu) enzimin fonksiyonel yapısını bozmadığını göstermekte ve "hem" grup analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.

4.5. CATPO Varyantlarının Kinetik Sabitlerinin Karşılaştırılması

wtCATPO ve dört varyantının kinetik özelliklerinin karşılaştırılması katalaz aktiviteleri ölçülerek yapıldı. wtCATPO, A80I, T372A, T372S ve N377L artan H₂O₂ konsantrasyonlarında katalaz aktiviteleri ölçülerek kinetik analizleri Bölüm 3.17'de belirtildiği şekilde yapıldı ve Tablo 4.5'te kıyaslandı.

Tablo 4.5. wtCATPO ve varyantlarının katalaz aktivite için hesaplanan kinetik sabitleri

Protein	K_M (mM)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_M (s⁻¹ M⁻¹)
wtCATPO	10	20,3 x 10 ⁴	20,3 x 10 ³
A80I	20	1660 x 10 ⁴	83 x 10 ³
N377L	120	9500 x 10 ⁴	79 x 10 ³
T372A	16	64 x 10 ⁴	39 x 10 ³
T372S	14	189 x 10 ⁴	135 x 10 ³

Michaelis-Menten sabitlerinden biri olan K_M değeri, enzimin substrata 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 affiniteyi 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'teki verilere göre K_M değeri tüm varyantlarda CATPO'ya göre artmıştır. Bu enzimin substrata olan ilgisinin azaldığını göstermektedir. Diğer taraftan varyantlar ölçülen k_{cat} değerleri açısından değerlendirildiğinde hepsinin turn-over sayısının arttığı, hatta en yüksek değerlerin A80I (1660 x 10⁴ s⁻¹) ve N377L'de (9500 x 10⁴ s⁻¹) ölçüldüğü görülmektedir. Buna bağlı olarak da tüm varyantların katalitik etkinliği yabanıl tip enzime göre önemli ölçüde arttığı saptandı. Sonuç olarak, analiz edilen CATPO varyantlarının hepsinin CATPO'ya göre katalitik özellikleri bakımından daha etkin oldukları söylenebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *S. thermophilum* katalazının (CATPO) merkezi kanalında yer alan ve monofonksiyonel katalazlar arasında kısmen korunmuş olan Ala80, Thr372, Asn377 ve Gly378 seçilerek bu amino asitler nokta mutasyonu ile diğer katalazlardaki eşleniklerine dönüştürüldü. Mutasyonların katalitik aktiviteyi nasıl etkilediği biyokimyasal analizlerle incelendi. Merkezi kanalın doğrudan “hem” bağlanma bölgesine açılmasının katalitik aktiviteyi etkileyebileceği ön görüldüğünden bu kanal üzerinde bulunan amino asitleri hedef alarak gerçekleştirilecek mutasyonların da katalitik aktiviteyi etkilemesi beklendi.

Çalışılan CATPO varyantlarının UV-spektrum bulguları incelendiğinde, ‘hem’ grup yapısının yapılan mutasyonlar sonucunda değişmediği (CATPO ile aynı olduğu) ve tüm mutantların *d'* tipi ‘Hem’ grubuna sahip olduğu belirlendi. Bununla birlikte CATPO enzimi ile diğer mutantların içermiş olduğu “hem” miktarlarının (R_z değerleri) benzer olduğu gözlemlendi.

Spesifik aktiviteleri bakımından karşılaştırıldıklarında N377L varyantının katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde CATPO’ya göre sırasıyla %263 ve %125’lik artışlar ölçüldü. N377L’yi %148 (katalaz) ve %107’lik (fenol oksidaz) artışla A80I varyantı izledi. T372S varyantında katalaz aktivitesinde gözlenen %14 oranındaki düşüşe rağmen fenol oksidaz aktivitesinde %8’lik bir artış gözlemlendi. Son varyant olan T372A’nın katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinde ise sırasıyla %10 ve %35’lik düşüşler tespit edildi.

Kinetik parametreler açısından değerlendirildiklerinde, N377L varyantının en yüksek k_{cat} değerine ($9500 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) sahip olduğu belirlendi. N377L’yi sırasıyla A80I ($1660 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$), T372S ($189 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) ve T372A ($64 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) izledi. K_M sonuçlarına bakıldığında, en yüksek K_M değerine T372S’nin (14 mM) sahip olduğu belirlendi. T372S’yi sırasıyla T372A (16 mM), A80I (20 mM) ve N377L (120 mM) takip etmektedir.

Bu çalışmada Quikchange bölge yönelimli mutagenез ile her iki aktivitesi (katalaz ve fenol oksidaz) yabanıl tip CATPO enzimine göre önemli ölçüde artan varyant(lar) elde edildi. Bu durum merkezi kanalın katalitik aktivitede etkin bir rolü olduğunu göstermekle birlikte üretilen CATPO varyantları üzerine ileri biyokimyasal ve yapısal analizlerin yapılmasının gerekliliğini öne sürmektedir. Endüstriyel bir enzim olan katalaz enziminin

farklı uygulama alanlarda denenmesi için tez çıktısı olarak sunulan merkezi kanal CATPO varyantları (özellikle N377L) iyi aday olarak önerilebilir.



KAYNAKLAR

- Akertek, E., Tarhan, L. (1995). Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H_2O_2 . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 50(3), 291–303.
- 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*, 1009-1022.
- Akyilmaz, E., Kozgus, O. (2009). Determination of calcium in milk and water samples by using catalase enzyme electrode. *Food Chemistry*, 115(1), 347–351.
- Ali, M., Ishqi, H. M., Husain, Q. (2020). Enzyme engineering: Reshaping the biocatalytic functions. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(6), 1877–1894.
- Amorim, A. M., Gasques, M. D. G., Andreus, J., Scharf, M. (2002). The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 74(3), 433–436.
- Anwar, A., Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology*, 64(3), 175–183.
- Baeza, S., Vejar, N., Gulppi, M., Azocar, M., Melo, F., Monsalve, A., Pérez-Donoso, J., Vásquez, C. C., Pavez, J., Zagal, J. H., Zhou, X., Thompson, G. E., & Páez, M. A. (2013). New evidence on the role of catalase in Escherichia coli-mediated biocorrosion. *Corrosion Science*, 67, 32–41.
- Bayramoglu, G., Karagoz, B., Yilmaz, M., Bicak, N., Arica, M. Y. (2011). Immobilization of catalase via adsorption on poly(styrene-d-glycidylmethacrylate) grafted and tetraethyldiethylenetriamine ligand attached microbeads. *Bioresource Technology*, 102(4), 3653–3661.
- Balcı S. (2016). *Scytalidium thermophilum* Katalazı Yanal Kanalınnın Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli , 455541.
- Beilen, J. B. va., Li, Z. (2002). Enzyme technology: An overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338–344.
- 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.
- Bilal, M., Iqbal, H. M. N. (2020). Biologically active macromolecules: Extraction strategies, therapeutic potential and biomedical perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1–18.

- Bravo, J., Verdaguer, N., Tormo, J., Betzel, C., Switala, J., Loewen, P. C., Fita, I. (1995). Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*. *Structure*, 3(5), 491–502.
- Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M. (2000). Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 573–606.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 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, B., Jia, Y., Zhao, J., Li, H., Dong, W., Li, J. (2013). Assembled hemoglobin and catalase nanotubes for the treatment of oxidative stress. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(38), 19751–19758.
- Chen, H., Mousty, C., Chen, L., Cosnier, S. (2008). A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 28(5–6), 726–730.
- Cherry, J. R., Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438–443.
- Choi, J., Han, S., Kim, H. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*.
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M. A., Roosens, N. H. C. (2020). Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: An overview. *Foods*, 9(3).
- Demiralp, B. (2015). *Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı* Industrial and biotechnological applications of laccase enzyme. 72(4), 351–368.
- Di Gennaro, P., Bargna, A., Bruno, F., Sello, G. (2014). Purification of recombinant catalase-peroxidase HPI from *E coli* and its application in enzymatic polymerization reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1119–1126.
- Dias, A. A., Bezerra, R. M., Pereira, A. N. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 92(1), 7–13.
- Díaz, A., Loewen, P. C., Fita, I., Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 525, Issue 2, pp. 102–110).

- Díaz, A., Valdés, V. J., Rudiño-Piñera, E., Horjales, E., Hansberg, W. (2009). Structure-Function Relationships in Fungal Large-Subunit Catalases. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 218–232.
- Divya, D., Gopinath, L. R., Merlin Christy, P. (2015). A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 690–699.
- Fak, F., Do, K. O. (2013). *ÇİAktiviteli Katalaz-FenolOksidazinin the Value of Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase and Other Catalases in Food Industry*. 38, 111–118.
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, 2010.
- Futo, P., Markus, G., Kiss, A., Adányi, N. (2012). Development of a Catalase-Based Amperometric Biosensor for the Determination of Increased Catalase Content in Milk Samples. *Electroanalysis*, 24(1), 107–113.
- Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., & Kirkman, H. N. (1996). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87(4), 1595–1599.
- Gebicka, L., Didik, J. (2009). Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(10), 1375–1379.
- Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004). Catalase Enzyme Mutations and their Association with Diseases. In *Mol Diagn* (Vol. 8, Issue 3).
- Gudelj, M., Fruhwirth, G. O., Paar, A., Lottspeich, F., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2001). A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. *Extremophiles*, 5(6), 423–429.
- GÜL, Ü. D. (2013). Fungal Lipases and Use in Industri al Areas. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 13(1), 1–8.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013.
- Habib, L. K., Lee, M. T. C., Yang, J. (2010). Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from β -amyloid-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38933–38943.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 525, Issue 2, pp. 170–180).

- Hochman, A., Goldberg, I. (1991). Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1077(3), 299–307.
- Horjales, E., Rudin, E., Dı, A., Arreola, R., Hansberg, W. (2004). *Unusual Cys-Tyr Covalent Bond in a Large Catalase*. 971–985.
- Ibrahim, Y. H. E. Y., Regdon, G., Hamedelniei, E. I., Sovány, T. (2020). Review of recently used techniques and materials to improve the efficiency of orally administered proteins/peptides. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 403–416.
- Karadem, A., Akg, M., Tutu, A., Fak, O., End, O., Kelimeler, A., Usages, T. E., Industry, T. P., Pulp, D. P. (2002). *Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış : Enzimlerin Kabuk Soyma , Liflerin Modifikasyonu , Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1)*. 5(1), 61–71.
- 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.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.
- Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C. A., Genomik Analiz, Editörler: Öner C., Sümer S., Öner R., Ögüş A., Açık L., Genetik Kavramlar, 8. basım, Palme Yayıncılık, Ankara, 457-484, 2011.
- Koclar Avcı, G., Coruh, N., Bolukbasi, U., Ogel, Z. B. (2013). Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase-phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 661–672.
- Kurakov, A. V., Kupletskaya, M. B., Skrynnikova, E. V., Somova, N. G. (2001). Search for micromycetes producing extracellular catalase and study of conditions of catalase synthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(1), 59–64.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 47(1), 69–85.
- Li, G., Fang, X., Su, F., Chen, Y., Xu, L., Yan, Y. (2018). Enhancing the thermostability of *Rhizomucor miehei* lipase with a limited screening library by rational-design point mutations and disulfide bonds. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2).

- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017.
- Liu, X., Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc.
- Loew.O. (1900). *Catalase, new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant*. XI, No 279, 701–702.
- Loewen, P. C., Carpena, X., Rovira, C., Ivancich, A., Perez-Luque, R., Haas, R., Odenbreit, S., Nicholls, P., & Fita, I. (2004). Structure of Helicobacter pylori Catalase, with and Without Formic Acid Bound, at 1.6 Å Resolution. *Biochemistry*, 43(11), 3089–3103.
- Lončar, N., Fraaije, M. W. (2015). Catalases as biocatalysts in technical applications: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3351–3357.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M. K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461–488.
- Mate M., Murshudov G., Bravo J., Melik-Adamyany W., Loewen P. C., Fita I. (2001). Heme-catalases. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 486-502.
- Matsuo, M., Seki, T., Mitsuishi, Y., Shoun, H., Nakahara, T. (1996). Purification and Characterization of an Intracellular α -D-Xylosidase from Penicillium wortmannii IFO 7237. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(2), 341–343.
- Melik-Adamyany, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Maté, M. J., Fita, I., Loewen, P. C. (2001). Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HP11 from Escherichia coli, *Proteins. Structure, Function, and Bioinformatics*, 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., Melik-Adamyany, W., Bravo, J., Ferrán, J. M., Ferrer, J. C., Switala, J., Loewen, P. C., Fita, I. (1996). Structure of the heme d of Penicillium vitale and Escherichia coli catalases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(15), 8863–8868.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

- Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95–101).
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51(January 2000), 51–106. Nicholls, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2001). *Intel_Lund_120502*.
- Nishikawa, M., Hyoudou, K., Kobayashi, Y., Umeyama, Y., Takakura, Y., Hashida, M. (2005). Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. *Journal of Controlled Release*, 109(1–3), 101–107.
- Ogawa, J., Sulistyaningdyah, W. T., Li, Q.-S., Tanaka, H., Xie, S.-X., Kano, K., Ikeda, T., Shimizu, S. (2004). Two extracellular proteins with alkaline peroxidase activity, a novel cytochrome c and a catalase-peroxidase, from *Bacillus* sp. No.13. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1699(1–2), 65–75.
- 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*, 853-862.
- Paulino, B. N., Pessôa, M. G., Molina, G., Kaupert Neto, A. A., Oliveira, J. V. C., Mano, M. C. R., Pastore, G. M. (2017). Biotechnological production of value-added compounds by ustilaginomycetous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21), 7789–7809.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). Structure , Function and Applications. In *Library*.
- Pradhan, A. A., Rhee, K. S., Hernández, P. (2000). Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Science*, 54(4), 385–390.
- 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*, 295-309.
- Raveendran, S., Kuruvilla, A., Rebello, S. (2018). *Applications of Microbial Enzymes in Food Industry*. 56(1).
- Rogers, A., Gibon, Y.(2009). Enzyme kinetics: theory and practice. *Plant metabolic networks*, Springer, New York, 71-103.
- Samson, M., Yang, T., Omar, M., Xu, M., Zhang, X., Alphonse, U., Rao, Z. (2018). Improved thermostability and catalytic efficiency of overexpressed catalase from *B. pumilus* ML 413 (KatX2) by introducing disulfide bond C286-C289. *Enzyme and Microbial Technology*, 119(June), 10–16.

- Sangar, S., Pal, M., Moon, L. S., Jolly, R. S. (2012). A catalase-peroxidase for oxidation of β -lactams to their (R)-sulfoxides. *Bioresource Technology*, 115, 102–110.
- Schäfer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L. D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H. P., Poulsen, P. B., Lund, H., Oxenbøll, K. M., Gui, F. W., Pedersen, H. H., Xu, H. (2006). Industrial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105(December 2006), 59–131.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, 441(7093), 651–655.
- Sepasi Tehrani, H., Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 5–12).
- Sevinc, M. S., Maté, M. J., Switala, J., Fita, I., Loewen, P. C. (2008). Role of the lateral channel in catalase HP11 of *Escherichia coli*. *Protein Science*, 8(3), 490–498.
- Shamsipur, M., Asgari, M., Maragheh, M. G., Moosavi-Movahedi, A. A. (2012). A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase. *Bioelectrochemistry*, 83(1), 31–37.
- Sharma, I., Ahmad, P. (2014). Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (Issue 1983). Elsevier Inc.
- Shi, X., Shi, Z., Huang, H., Zhu, H., Zhu, H., Ju, D., Zhou, P. (2013). PEGylated human catalase elicits potent therapeutic effects on H1N1 influenza-induced pneumonia in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10025–10033.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1–15.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Saini, R., Pandey, A. (2016). Industrial Enzymes: β -glucosidases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, August 2018, 103–125.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B. S., Pandey, A. (2015). Industrial Enzymes. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V.
- Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., Puri, M. (2014). Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1429–1447.
- Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., Puri, M. (2017). Catalases: Types, structure, applications and future outlook. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*, 241–254.

- 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(3), 407–415.
- Switala, J., Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2), 145–154.
- Thapa, S., Li, H., Joshua, O., Bhatti, H. S., Zhou, S. (2017). Metagenomics Prospective in Bio-mining The Microbial Enzymes. *Journal of Genes and Proteins*, 1(1), 5.
- 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.
- 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 <https://swissmodel.expasy.org/> (Ziyaret tarihi: 20 Mart 2020).
- URL-3 :http://web.expasy.org/compute_pi/, (Ziyaret tarihi: 5 Ocak 2020).
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372–35381.
- Xu, Q., Cai, L., Zhao, H., Tang, J., Shen, Y., Hu, X., Zeng, H. (2015). Forchlorfenuron detection based on its inhibitory effect towards catalase immobilized on boron nitride substrate. *Biosensors and Bioelectronics*, 63, 294–300.
- Yakunin, E., Kisos, H., Kulik, W., Grigoletto, J., Wanders, R. J. A., Sharon, R. (2014). The regulation of catalase activity by PPAR γ is affected by α -synuclein. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(3), 145–159.
- Yap-Bondoc, F., Bondoc, L. L., Timkovich, R., Baker, D. C., Hebbler, A. (1990). C-methylation occurs during the biosynthesis of heme d1. *Journal of Biological Chemistry*, 265(23), 13498–13500.
- 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.
- Yüzügüllü Karakuş, Y., Göç, G. (2019). *Bacillus pumilus* Y7 Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması ve Açıklanması. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 19(1), 15–21.

- 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)a. 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)b. Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazının ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi. *Gıda*, 38(2), 111-118.
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(9), 1527–1547.
- Zámocký, M., Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1), 19–66.
- 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.
- Zhao, J., Wang, G., Chu, J., Zhuang, Y. (2020). Harnessing microbial metabolomics for industrial applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1).



EKLER

Ek-A

Besiyeri ve Çözeltiler

Luria Broth Kanamisin Agar (1 litre)

10 g Tripton

5 g Maya Ekstratı

10 g NaCl

20 g Agar-agar

Son hacim 1 litre. Besiyerine 50 µg/mL kanamisin (Kan50) eklenir.

Luria Broth (1 litre)

10 g Tripton

5 g Maya Ekstratı

10 g NaCl

Son hacim 1 litre

EDTA (0,5 M, pH 8,0)

7,3 g EDTA tartılır, 30 mL distile su ile çözündürülür. pH 8 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 sodyum fosfat (NaH_2HPO_4)

21,7 g Dibasic di sodyum fosfat (Na_2HPO_4)

Son hacim 5 litre, pH 7,4 ayarlanıp 4 °C‘de saklanır.

Elüsyon Tamponu (1 litre, pH 7,4)

0,59 g Monobasic sodyum fosfat (NaH_2HPO_4)

4,34 g Dibasic disodyum fosfat (Na_2HPO_4)

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 sodyum fosfat

4,34 g Dibasic disodyum fosfat

29,22 g NaCl

34 g İmidazol

500 mL distile su içerisinde çözdürülürerek 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

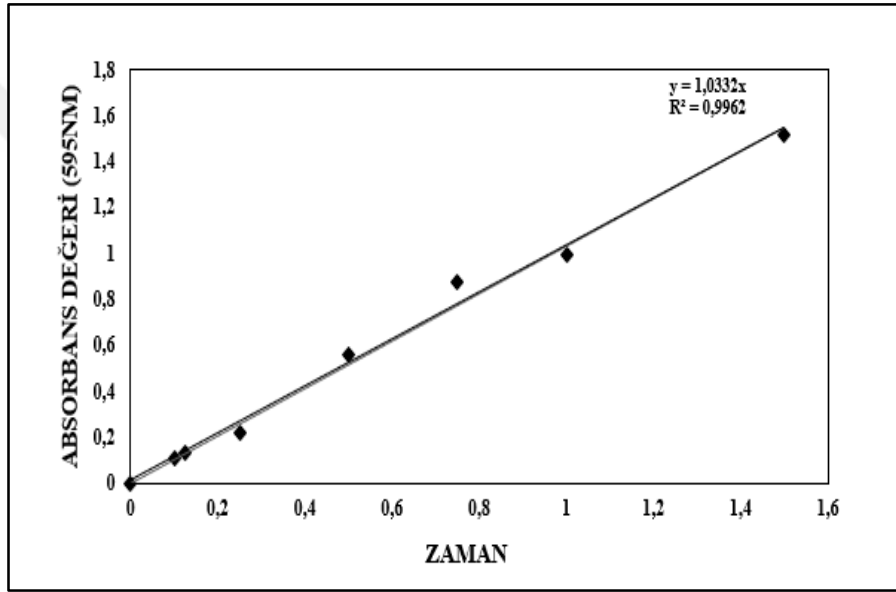
Oda sıcaklığında saklanır.



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 dk'lık inkübasyonu ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçümleri gerçekleştirildi. (Şekil E.1.)



Şekil E. 1. Protein miktar tayini için Bradford yöntemindeki standart BSA eğrisi

Ek-C

Merkezi Kanal Mutant Varyantlarının Amino Asit Sekans Dizilimi

Merkezi 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-3).

A80I

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERIVHARG
AGAHTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVHG
FATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSAW
DFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKWHF
KSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDESQ
AQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVRGI
DFTEDPLLQGRLFSYLD TQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRD GAGQMFIH
RNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHWSQ
PRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVAA
AIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQAA
QLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAST
ASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEES
VDMFVEEFKGLATFRFTDRFALDS*

W= 79366,36 Da pI: 5.50

N377L

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLD TQLNRLGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRD GAGQMFI
HRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHWS
QPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVAA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVEEFKGLATFRFTDRFALDS

W= 79323,33Da pI: 5,50

T372A

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSQRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGR LFSYLD AQLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGR GFFTAPGRTASGALVREVSPTEFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVEEF EKGLATFRFTDRFALDS*

W= 79294,25 Da pI: 5,50

T372S

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSQRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGR LFSYLD S QLNRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGR GFFTAPGRTASGALVREVSPTEFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVD MFVEEF EKGLATFRFTDRFALDS

W= 79310,25 Da pI: 5.50

N375S

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSQRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGR LFSYLD TQL SRNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMFI
HRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGR GFFTAPGRTASGALVREVSPTEFNDHWS
QPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA

AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVDMFVEEFKGLATFRFTDRFALDS*

W= 79297.25Da pI: 5.50

N375E

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFIDVGNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRFLSYLDTQL **E**RNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
HRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHWS
QPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVDMFVEEFKGLATFRFTDRFALDS

W= 79339.29 Da pI: 5.46

N375H

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR
GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFIDVGNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETE QVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRFLSYLDTQL **H**RNGGPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGFFTAPGRTASGALVREVSPTFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGVVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVDMFVEEFKGLATFRFTDRFALDS

W= 79347.31 Da pI:5.54

G378R

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTCPFADPAALYSRQDTTSGQSPLAAYEVDD
STGYLTSDVGGPIQDQTSKAGIRGPTLLEDFMFRQKIQHFDHERVPERAVHAR

GAGAHGTFTSYADWSNITAASFLNATGKQTPVFVRFSTVAGSRGSADTARDVH
GFATRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHSVKPRPDNEIPQAATAHDSA
WDFFSQQPSTMHTLFWAMSGHGIPRSYRHMDGFGVHTFRFVKDDGSSKLIKW
HFKSRRQGKASLVWEEAQVLSGKNADFHRQDLWDAIESGNGPEWDVCVQIVDE
SQAQAFGFDLLDPTKIIPEEYAPLTKLGLLKLDRNPTNYFAETEQVMFQPGHIVR
GIDFTEDPLLQGRLFSYLDTQLNRN**R**GPNFEQLPINMPRVPIHNNNRDGAGQMF
IHRNKYPYTPNTLNSGYPRQANQNAGRGGFTAPGRTASGALVREVSPTEFNDHW
SQPRLFFNSLTPVEQQFLVNAMRFEISLVKSEEVKKNVLTQLNRVSHDVAVRVA
AAIGLGAPDADDTYYHNNKTAGVSIVGSGPLPTIKTLRVGILATTSESSALDQA
AQLRTRLEKDGLVVTVVAETLREGVDQTYSTADATGFDGTVVVDGAAALFAS
TASSPLFPTGRPLQIFVDAYRWGKPVGVCGGKSSEVLDAADVPEDGDGVYSEE
SVDMFVEEFKGLATFRFTDRFALDS

W= 79423.41 Da pI: 5.55



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Öztürk B., Yüzügüllü Karkuş Y., *Scytalidium* Katalazının Merkezi Kanalınnın Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması, 4. *Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi (UBBK)*, Adana, Türkiye, 6-7 Aralık 2021.



ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü’ne girerek 2018 yılında bu bölümden mezun oldu. 2018-2022 yılları arasında, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.

