T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS LİPAZ YAPISINDA BULUNAN MET287 VE ASP365 REZİDÜLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ YÖNTEMİYLE DEĞİŞTİRİLMESİ, AKTİVİTE VE KARARLILIĞINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ATİKE NUR SEYİTOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2016

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS LİPAZ YAPISINDA BULUNAN MET287 VE ASP365 REZİDÜLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ YÖNTEMİYLE DEĞİŞTİRİLMESİ, AKTİVİTE VE KARARLILIĞINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ATİKE NUR SEYİTOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALİ TÜRKAN

GEBZE
2016

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE RESIDUES MET287 AND ASP365 OF GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS LIPASE AND THE EFFECTS OF THESE MUTATIONS ON THE ACTIVITY AND STABILITY

ATİKE NUR SEYİTOĞLU

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMİSTRY

THESIS SUPERVISOR

ASSOC. PROF. DR. ALİ TÜRKAN

GEBZE

2016

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/06/2016 tarih ve 2016/37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/07/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Atike Nur SEYİTOĞLU'nun tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç.Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE : Prof.Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE : Prof.Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu çalışmada, *Geobacillus kaustophilus* lipaz enziminin yapısında bulunan Met287 rezidüsü proline (M287P) ve Asp365 rezidüsü alanine (D365A) yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarıyla dönüştürülmüştür. Mutasyonlar, DNA dizi analizi ile doğrulandıktan sonra, *E. coli* BL21 (DE3) hücresinde ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Mutant lipazlar, DEAE-selüloz rezin kullanılarak iki aşamada saflaştırıldı ve SDS-PAGE analiziyle ~43 kDa büyüklüğünde ve >%90 saflıkta oldukları belirlendi.

Yaban tip ve mutant lipazların, Ca^{2+} ve Mn^{2+} için yarı-maksimal aktivasyon (K_a) değerleri belirlendi. NaCl yokluğunda, her iki metal iyon konsantrasyonuna karşı lipaz aktivitelerinde iki-aşamalı artış görülürken, NaCl varlığında yapan tip ve M287P lipaz için tek-aşamalı, D365A lipaz için ise iki-aşamalı artış görülmektedir. NaCl, hem yaban tip hem de mutant lipazların her iki metal iyonu için K_a değerlerini düşürmektedir. Sıcaklık etkisine bakıldığında, yaban tip 30-70 °C arasında optimum aktiviteye sahipken, M287P mutant 30-50 °C ve D365A mutant 50-70 °C arasında yüksek aktivite göstermektedir. NaCl varlığında yapılan sıcaklık kararlılık deneyleri, kalsiyumun yaban tipin yarı-ömrünü arttırdığını, mutantların ise yarı-ömürlerini azalttığını göstermektedir. Ayrıca, Sirküler Dikroizm Spektroskopisi ile yaban tip ve mutant lipazların erime sıcaklık (T_m) değerleri belirlenmiştir. Yaban tip lipazın sadece EDTA ve Ca^{2+} varlığında T_m değerleri, sırasıyla, 70 °C ve 77.5 °C; M287P lipazın 70 °C ve 69.7 °C; D365A lipazın ise 74.7 °C ve 75.5 °C olarak bulunmuştur. NaCl, yaban tip ve mutant lipazların Ca^{2+} ve Mn^{2+} afinitesini arttırırken, T_m değerlerini birkaç derece düşürmektedir. Bu sonuçlar, M287P-lipazın aktivitesi için kalsiyuma olan afinitesi artarken kalsiyuma-bağlı termal kararlılığını kaybettiğini; D365A-lipazın sadece EDTA varlığında daha kararlı olduğu, kalsiyum varlığında ise daha çok agregasyona giderek aktivitesini kaybettiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Geobacillus kaustophilus*, alkalotermofilik lipaz, yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları, kalsiyum, mangan, termal kararlılık, aktivite.

SUMMARY

In this study, the residues Met287 and Asp365 of *Geobacillus kaustophilus* lipase were substituted to proline and alanine, respectively, by site-directed mutagenesis. The mutations were confirmed by DNA sequencing. The mutants were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by DEAE-cellulose using two-step purification method. The molecular masses of the variants were ~43 kDa and the purity were about 90% as determined by SDS-PAGE analysis.

The half-maximal activation (K_a) values of wild-type and mutant lipases for Ca^{2+} and Mn^{2+} ions were determined in the absence and presence of NaCl. Biphasic responses were observed for wt lipase as well as mutant lipases in the absence of NaCl. Whereas monophasic response for wt lipase and M287P lipase and biphasic response for D365A lipase were observed in the presence of NaCl. NaCl decreases the K_a values of both wt and mutant lipases for Ca^{2+} and Mn^{2+}. The wt lipase has high activity at the temperature range of 30-70 °C while M287P and D365A lipases show high activity at 30-50 °C and 50-70 °C, respectively. Thermal stability experiments show that calcium enhances the half-life of wt-lipase whereas reduces that of mutants. Also, (T_m) values of wt and mutant lipases were determined by circular dicroism spectroscopy in the presence and absence of Ca^{2+}. T_m values for wt lipase in the absence (EDTA alone) and presence of calcium were 70 °C and 77.5 °C, while 70 °C and 69.7 °C for M287P lipase and 74.7 °C ve 75.5 °C for D365A lipase, respectively. Although NaCl increases the affinity of the wt and mutant lipases for Ca^{2+} and Mn^{2+}, it reduces their T_m values.

These results show that calcium-dependent thermal stability of M287P lipase decreases while the affinity for Ca^{2+} ion increases. Also D365A lipase is more stable in the presence of EDTA whereas loses its activity in the presence of calcium due to aggregation.

Keywords: *Geobacillus kaustophilus*, alkalothermophilic lipase, site-directed mutagenesis studies, calcium, manganese, thermal stability, activity.

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak bu tez çalışmasını bana yapma olanağını veren, gerekli alt yapıyı sağlayan, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e ve Prof. Dr. Ayhan Çelik'e gerek bilgi paylaşımı gerekse laboratuvarlarında bulunan cihaz, kimyasal madde kullanımı konusunda gösterdikleri ilgi ve anlayış için teşekkür ederim. Ayrıca tez savunmamda jüri üyeliğimi yapan Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN, Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU ve Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Yoğun tez çalışmam sırasında çok büyük yardımları bulunan stajyer arkadaşlarım Tuğçen Doğan ve Özlem Keskin'e desteklerinden dolayı minnetlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince benden yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Fatma ERTAN, Saadet ALPTUNGAŞ, Muhammed Gamal SHAETA, Meltem KESKİN, Uğur PALA, Arş. Gör. Aişe ÜNLÜ Gülden AŞÇI YETİŞ ve Arzu GÜRSOY'a teşekkür ederim.

Son olarak da beni bu günlere getiren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, attığım her adımda arkamda olan aileme teşekkür ederim.

Ayrıca GTU-BAP projesi (proje no 2015-A06) ile tez çalışmam için mali destek sağlayan GTU-BAP daire başkanlığına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Lipazlar	1
1.2. Mutasyonların Önemi ve Aktivite Üzerine Etkileri	7
1.3. Tezin Katkısı, Amacı ve İçeriği	11
2. MATERYAL VE METOD	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	12
2.2. Metod	12
2.2.1. *p*ET22b-Gk lipazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	12
2.2.2. Yönlendirilmiş Mutasyon Çalışmaları	13
2.2.2.1 Primer Dizaynı	13
2.2.2.2 Mutasyonların Gerçekleştirilmesi	14
2.2.3. Mutant Lipaz Geninin Kompetent Hücreye Transformasyonu	16
2.2.3.1. Katı Agar Besiyeri Hazırlama	16
2.2.3.2. Dpn1 ile PCR Ürününün Kesimi	16
2.2.3.3. Transformasyon	16
2.2.3.4. Üreyen Kolonilerden Plazmid İzole Edilmesi ve Hücre Stoklarının Hazırlanması	17
2.2.4. M287P/D365A Mutant Lipazlarının Ekspresyonu ve Saflaştırılması	17
2.2.5. Protein Konsantrasyon Tayini	17

2.2.6. Yaban Tip ve Mutant Lipaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Belirlenmesi 17
2.2.6.1 Ca^{2+} ve Mn^{2+} İyonlarının NaCl Varlığında ve Yokluğunda Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi 18
2.2.6.2. Ca^{2+} ve Mn İyonları Varlığında Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi 18
2.2.6.3. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipazın Sıcaklık Stabilite Deneyleri 19
2.2.7. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının CD ile İncelenmesi 19
2.2.7.1. Kalsiyum ve Mangan İyonunun Yaban Tip, M287P ve D365A Lipazın İkincil (Sekonder) Yapısına Etkisi 19
3. SONUÇ 21
3.1. Mutasyonların Seçimi 21
3.2. Mutasyonların Gerçekleştirilmesi 23
3.3. Mutasyonların DNA Sekuans Analizi ile Doğrulanması 24
3.4. M287P ve D365A-Lipazın *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu ve Saflaştırılması 27
3.5. Kalsiyumun, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi 28
3.6. Manganın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi 31
3.7. Sıcaklığın Yaban Tip ve Mutant Lipazların Aktivitesine Etkisi 34
3.8. Yaban Tip, M287P Lipaz ve D365A Lipazın Sıcaklık Kararlılığı 38
3.8.1. Yaban Tip Lipazın Sıcaklık Kararlılığı 38
3.8.2 M287P ve D365A Mutant Lipazların Sıcaklık Kararlılığı 43
3.9. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının Sirküler Dikroizm ile İncelenmesi 46
3.9.1 Yaban Tip Lipazın İkincil Yapısının İncelenmesi 47
3.9.2 M287P Lipazın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, İkincil Yapısının İncelenmesi 51
3.9.3 D365A Lipazın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, İkincil Yapısının İncelenmesi 60

4. YORUMLAR 69

KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ 81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
bp	:	Baz çifti
CD	:	Circular Dichroism
dH_2O	:	Deiyonize su
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
PMSF	:	Fenil metil sülfonil florit
IPTG	:	İzopropil-beta-D-tiyo galaktopiranozid
kDa	:	Kilodalton
LB	:	Luria-Bertani Broth
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
*p*NPP	:	*p*-nitrofenil palmitat
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Taq	:	Thermus aquaticus
Tris	:	2-amino-2-hidroksimetil propan 1,3-diol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
1.1:	Lipazın hidroliz reaksiyonu.	1
1.2:	I.5 sınıfına ait bakteriyel lipazların sekuans karşılaştırması.	2
1.3:	*Geobacillus stearothermophilus* L1 lipazın şerit (ribbon) diyagramı.	4
1.4:	Lipazın üçlü katalitik mekanizmasının şematik olarak gösterimi.	5
1.5:	Metiyonin rezidülerinin oksidasyonu.	10
3.1:	a) *Bacillus stearothermophilus* L1 lipazın kalsiyum bağlanma bölgesindeki rezidülerin (Gly^{286}, Glu^{360}, Asp^{365}, Pro^{366}) Ca^{2+} ile koordinasyonu ve Met^{287}'nin bu bölgedeki konumu, b) Met^{287} rezidüsünün proline çevrilmesi, c) Asp^{365} rezidüsünün alanine çevrilmesi	22
3.2:	Mutasyonu içeren primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	23
3.3:	XL-1 Blue hücrelerinden saflaştırılan mutant plazmitler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.	24
3.4:	DNA dizi analizi sonucunda elde edilen M287P lipazın baz dizisi.	25
3.5:	DNA dizi analizi sonucunda elde edilen D365A lipazın baz dizisi	26
3.6:	Saflaştırılan M287P lipaz ve D365A lipazın SDS-PAGE jel görüntüsü.	27
3.7:	Kalsiyumun yaban tip ve mutant lipazlar üzerine etkisi.	30
3.8:	Manganın yaban tip ve mutant lipazlar üzerine etkisi.	33
3.9:	Sıcaklığın yaban tip lipaz aktivitesi üzerine etkisi.	35
3.10:	Sıcaklığın yaban tip ve mutant lipaz aktiviteleri üzerine etkisi.	37
3.11:	Yaban tip lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen kararlılık grafikleri.	41
3.12:	Yaban tip lipazın lineer grafiğe dönüştürülmesiyle elde edilen kararlılık grafikleri.	42
3.13:	Mutant lipazların farklı sıcaklıklarda elde edilen kararlılık grafikleri.	45
3.14:	Mutant lipazların lineer grafiğe dönüştürülmesiyle elde edilen kararlılık grafikleri.	45

3.15: Yaban tip lipazın termal denatürasyon grafiği. 49
3.16: Yaban tip lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. 50
3.17: M287P lipazın termal denatürasyon grafiği. 53
3.18: M287P lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. 54
3.19: M287P lipazın NaCl varlığında termal denatürasyon grafiği. 56
3.20: M287P lipazın NaCl varlığında farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. 57
3.21: M287P lipazın NaCl varlığında ve yokluğunda termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılması. 59
3.22: D365A lipazın termal denatürasyon grafiği. 62
3.23: D365A lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. 63
3.24: D365A lipazın NaCl varlığında termal denatürasyon grafiği. 65
3.25: D365A lipazın NaCl varlığında farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. 66
3.26: D365A lipazın NaCl varlığında ve yokluğunda termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılması. 68

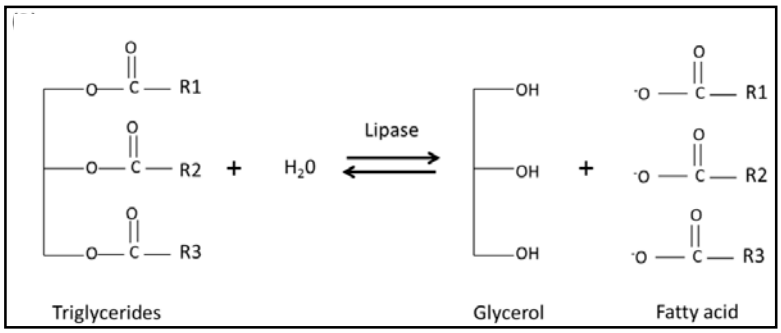
TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		**Sayfa**
2.1:	M287P /D365A mutant primerlerin sekuansı ve hesaplanan *Tm* değerleri.	14
2.2:	Mutasyonların gerçekleştirilmesi için kullanılan PCR reaktifleri.	15
2.3:	Mutasyonların gerçekleştirilmesi için kurulan PCR programı.	15
3.1:	Yaban tip ve mutant lipazların Ca^{2+} için K_a (*half-maximal activation value*) değerleri.	29
3.2:	Yaban tip ve mutant lipazların Mn^{2+} için K_a (*half-maximal activation value*) değerleri.	32
3.3:	Yaban tip lipazın yarı-ömür değerleri.	40
3.4:	Mutant lipazların yarı-ömür değerleri.	44
3.5:	Yaban tip lipazın T_m değerleri.	48
3.6:	M287P lipazın T_m değerleri.	52
3.7:	D365A lipazın T_m değerleri.	61

1. GİRİŞ

1.1. Lipazlar

Lipazlar (triaçilgliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3) uzun zincirli yağ asitlerinin hidrolizi ile diaçil gliserol, monoaçil gliserol, gliserol ve yağ asitlerini katalizleyen; bunun yanında yağ asitleri ve gliserollerden esterlerin sentezini gerçekleştiren enzimlerdir (Şekil1.1) [1].

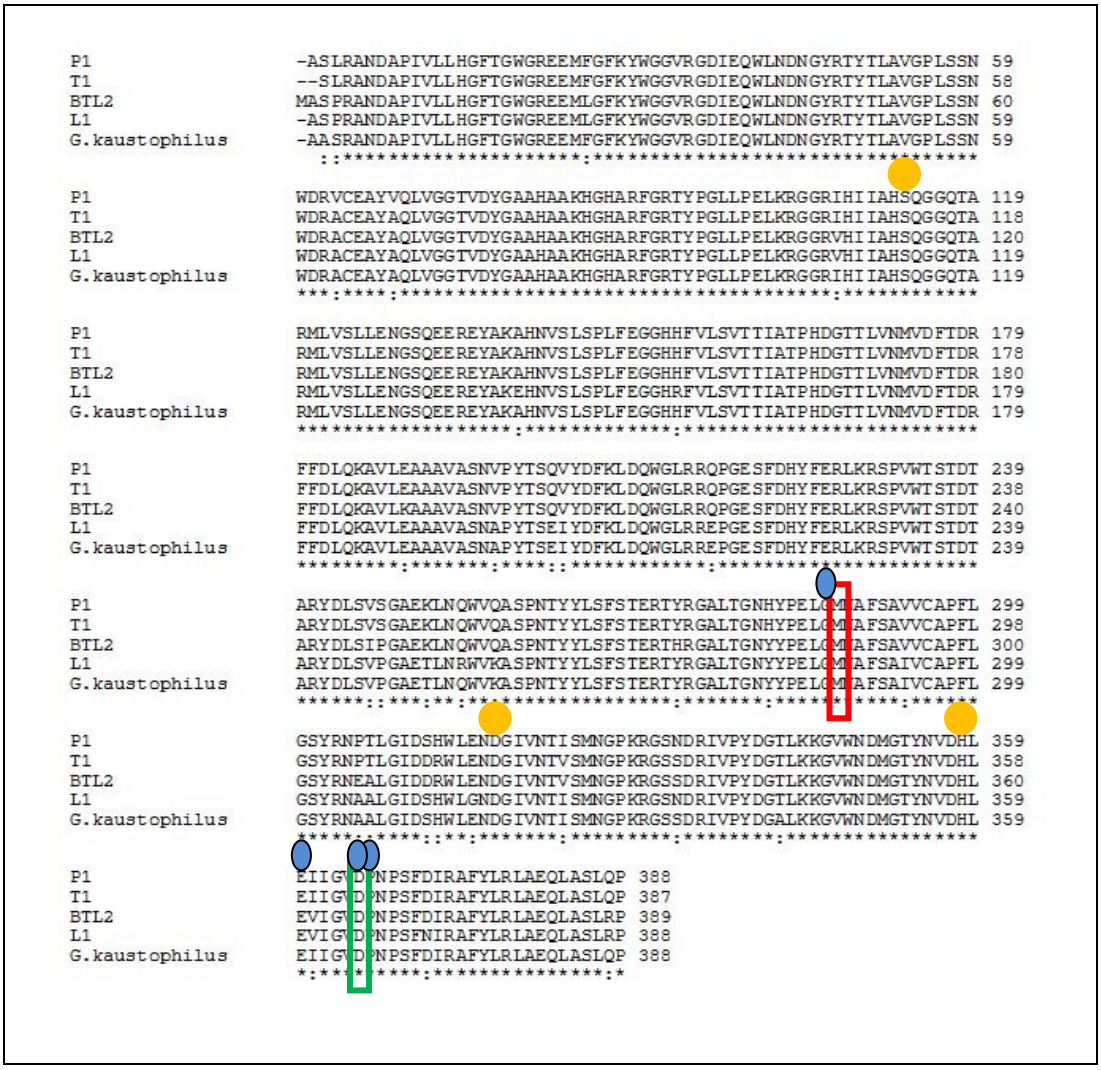


Şekil 1.1: Lipazın hidroliz reaksiyonu.

Lipaz enzimi bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedir. Bitkisel lipazların ticari bir uygulaması yoktur; fakat mikrobiyal ve hayvansal lipazlar yeni katkı maddelerinin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar birçok bakteri, mantar ve küften elde edilebilmektedir [2]. Lipazlar endüstride; gıda, kimya, kozmetik, deri, kağıt, eczacılık olmak üzere pek çok kullanım alanına sahiplerdir [3]. Özellikle mikrobiyal termostabil lipazlar, organik sentez [4, 6], yağların modifikasyonu, gıda sanayi ve kimyasal analizlerde ticari olarak oldukça önem taşımaktadır [7]. Substrat seçiciliği [8,38], organik solventlerde stabil ve aktif olmaları [5,9], kofaktör gerektirmemeleri [10,40], yüksek derecede bölgesel seçicilik göstermeleri [36] ve sentetik substratların dönüşümü için geniş ölçüde substrat seçiciliği göstermesi [6] gibi birçok eşsiz özellikleri lipazları endüstriyel açıdan kullanımı oldukça fazla olan enzimler haline getirmektedir.

Bakteriyel termoalkalofilik lipazlar; *Bacillus stearothermophilus* L1 ve P1, *Bacillus thermocatenulatus* BTL2, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus subtilis* (lip A) ve *Bacillus sp.* TP10A olarak sıralayabileceğimiz çeşitli termofilik bakteri

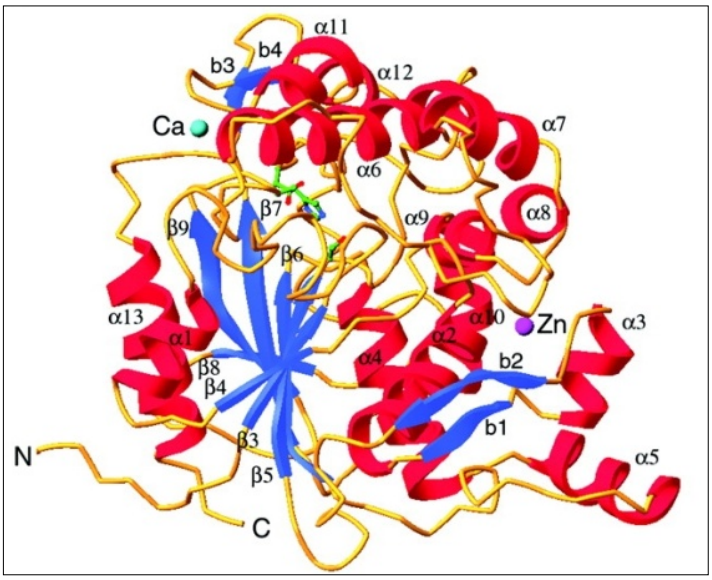
suşlarından elde edilirler. Termofilik Geobacillus bakterilerine ait lipazlar, lipazların sınıflandırılmasında kullanılan I.5 sınıfına ait enzimlerdir. Literatürde bu sınıfa ait olan ve %95 sekuans benzerliği gösteren, *B. stearothermophilus* L1 ve P1 [17, 23, 26, 54], *B. subtilis* (lip A) [56-60], *G. stearothermophilus* (T1) [67] ve *G. thermacatenulatus* BTL2 [24,55] lipazın yapıları X-ışını metodu ile aydınlatılmıştır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: I.5 sınıfına ait bakteriyel lipazların sekuans karşılaştırması. P1, *B. stearothermophilus* lipaz; L1, *G. stearotehrmophilus* lipaz; BTL2, *G. thermocatenulatus*; T1, *G. zalihae* lipaz; G. kaustophilus bu tez çalışmasının enzimidir. *CLUSTAL Multiple Sequence Alignment* programı kullanılarak sekans karşılaştırması yapılmıştır. , M287 rezidüsünü; , D365 rezidüsünü; , aktif bölge rezidülerini; , Ca^{2+} ile koordine olan rezidüleri göstermektedir.

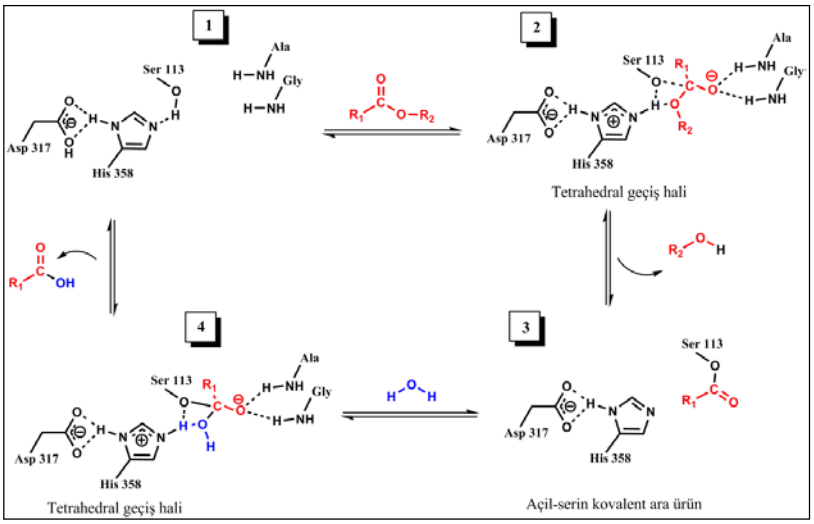
Bakteriyel termoalkalofilik lipazlar, aktif bölgesi Ser-His-Asp katalik üçlüsünden oluşan α/β hidrolazlara ait sınıfın üyelerindendir. Etrafı α-heliksler tarafından çevrilmiş, merkezinde β-tabakalar bulunan monomerik proteinlerdir. Şekil 1.3'te *G. stearothermophilus* L1 lipazın şerit diyagramı gösterilmektedir (14). Sinchaikul ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, katalitik üçlünün Ser113, His358 ve Asp317 rezidülerinden oluştuğu belirtilmiştir [25]. Serin rezidüsü Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly rezidülerinden oluşan pentapeptid zinciri içerisinde bulunmaktadır; fakat Bacillus lipazlarında farklı olarak, başta bulunan Gly rezidüsü Ala rezidüsü ile yer değiştirmektedir. Ser rezidüsü genel olarak bir beta strand (β5) ve bir α-heliks (α4) arasında, sıkı bir şekilde korunan β-dönüş yapısı içerisinde pozisyonlanmıştır [19,20,21]. Tüm *Bacillus* lipazların tam sekuansı 417 amino asit rezidüsünden oluşmakla beraber, bu rezidünün 29 rezidüsü sinyal sekuansı oluşturmaktadır ve bu kısım 388 rezidü içeren olgun bir lipazı oluşturmak için zincirden ayrılmaktadır [17].

Misellere [12,13] ve geçiş fazı analoglarına (*transition-state analogs*) bağlanan [14,15] lipaz yapısı ile ilgili çalışmalar gösterdi ki misel ya da substrat molekülleriyle etkileşim üzerine aktif bölge üzerindeki kapak açılmakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu çalışmalar yaklaşık 40 yıl önce keşfedilen "ara yüzey aktivasyonu" olarak çok iyi bilinen bir olguyu desteklemektedir [16]. Bakteriyel lipazların çoğunda aktif bölge ve kapalı pozisyonda iken hidrofobik bir çevre içerisindeki katalitik üçlüyü koruyan α-helix yapıdaki kapak (α6) oldukça hidrofobik yapıdadır. Esnek kapak bölgesi ve aktif bölge tabanı arasındaki aktif bölge ve arayüzey, baskın olarak aromatik ve diğer hidrofobik rezidülerden oluşmaktadır. Bunun yanında 3_{10}-helikalden sonraki dönüş bölgesinde aktif bölgeye doğru içerdiği amino asitler, α6'ya amfifilik olma özelliği kazandırmaktadır [17]. Lipazın lipid-su tabakası ile karşılaşması ve etkileşime girmesiyle, enzim ile yağ yüzeyindeki hidrofobik etkileşimlerin artması sonucunda kapak açılması tetiklenir [37]; lipaz aktivitesinin gerçekleştirilmesini sağlayan bu olay 'ara-yüzey aktivasyonu' [14] olarak adlandırılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarla; *B. subtilis* lipazında kapak yapısı bulunmadığı saptanmıştır [22]. Kapak yapısı bulunmadığı için aktif bölge solvente maruz kalmaktadır.



Şekil 1.3: *Geobacillus stearothermophilus* L1 lipazın şerit (ribbon) diyagramı. Yapıda ayrıca, kalsiyum (Ca^{2+}) ve çinko (Zn^{2+}) iyonları bulunmaktadır.

Lipazlar substrat ile açil-serin kovalent ara-ürün oluşturmaktadırlar. Aktivasyon enerji bariyerinin aşılması için enzimle kovalent ürünün oluştuğu ve salındığı bu iki adımdan biri büyük çoğunlukla enzimlerin hız belirleyici adımıdır (Şekil 1.4). Lipazın kataliz mekanizması şu şekilde gerçekleşmektedir. Substrat, aktif bölgeye giriş yaparak nükleofilik serinin karbonil karbonuna atakta bulunur. Aktif bölge aminoasitleri ve substratın oksianyonu arasında oluşan hidrojen bağları, tetrahedral geçiş halini kararlı tutmaktadır. Böylece tetrahedral geçiş hali olan enzim-substrat kompleksi oluşmaktadır. Bu aşamada nitrojen ile serinin arasındaki bağ kırılmış olduğu için, histidin protonu substrata bağlanır. Tetrahedral geçiş hali bozularak reaksiyonun ilk ürünü oluşur. Enzim molekülündeki ilk ürünün çıktığı oyuktan giren suyun nükleofilik atağı enzimden açil grubununda ayrılmasını sağlar. Bu sırada (deaçillenme), açillenme reaksiyonuna oldukça benzer ikinci tetrahedral geçiş hali oluşmaktadır. Bu geçiş hali sudan histidine proton transferi ile bozulur (Şekil 1.4) [68, 69].



Şekil 1.4: Lipazın üçlü katalitik mekanizmasının şematik olarak gösterimi.

Tüm proteinler katlanmış hal ile kısmen açılmış hal arasında dinamik bir denge içerisinde bulunmaktadırlar. Bazen kısmi açılmış haldeki protein, geri dönüşümsüz olarak inaktif denatüre forma dönüşebilir. Termostabil proteinler yüksek sıcaklıklarda katlanmış halin dengesini koruyabilmektedirler. Yapıdaki esnekliğin azalması ve bu vasıtayla katlanmış halde kalmaya eğilimin artması bunun başlıca sebebidir. Yapıdaki kararlılığın arttırılmasına yönelik bir çok farklı strateji proteinler tarafından başarılmaktadır. Stabiliteyi arttıran faktörler; yüzey yük ağlarının çok olması, hidrojen bağlarının çokluğu, heliks oluşturan rezidülerin fazla sayıda olması, heliks dipol etkileşimlerinin stabilizasyonu, daha fazla ve daha uzun beta plakaların bulunması, 'loop' bölgelerinin daha az sayıda rezidü içermesi, prolin rezidülerinin çok sayıda ve glisin rezidülerinin az sayıda olması, yüzey alanı ve hacminin azalması, Asn, Gln, Met, Cys gibi daha zayıf rezidülerin daha az sayıda olması, disülfit bağlarının çok olması ve metal iyonu gibi ligandların stabilizasyona katkı sağlaması olarak sayılabilir [17].

- Metal İyonlarının Etkisi

I.5 sınıfı lipazların kristal yapılarında Ca^{2+}- ve Zn^{2+}-bağlanma bölgelerinin olduğu gösterilmiştir [17,26]. *G. stearothermophilus* L1 lipazın yapısında, kalsiyum iyonu, Glu-360 ve Asp-365'in iki tane karboksil oksijen atomu, Gly-286 ve Pro-366'in ana zincirindeki iki tane karbonil oksijen atomu ve iki tane su molekülüyle etkileşime girmektedir [17]. Çinko iyonunun yapıyla koordineli olduğu rezidüler ise, Asp-61, His-81, His-87, Asp-238'dir [17].

Kalsiyumun I.5 sınıfına ait lipazların yapısında bulunduğu ve yapısal kararlılığın sağlanmasında gerekli olduğu bilinmektedir. İlk olarak kalsiyum iyonlarının, uzun zincirli yağ asitlerinin inhibitör etkilerini önlediği düşünülmüştür [32]. Bununla beraber kalsiyum iyonu pankreatik lipaz yapısında bulunduğu için [33], enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine direk etkileri de oldukça dikkat çekmiştir. Bakteriyel lipazlar olarak Noble ve arkadaşları ilk olarak *Pseudomonas glumae* lipazının X-ışını yöntemiyle üç boyutlu yapısını çözmüş ve proteine bağlı bir kalsiyum bağlanma bölgesinin varlığını ortaya koymuşlardır. Kalsiyum bağlanma bölgesi ve aktif bölge arasındaki mesafeden dolayı, kalsiyumun aktivitede direk rol almadığını, daha çok lipaz stabilitiesini arttıran yapısal bir rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir [3]. Buna dayanarak, kalsiyuma bağlı lipaz aktivitesindeki artış, enzim yapısı ve salınan yağ asitleri üzerine kalsiyum iyonlarının kompleks etkisi olarak düşünülebilir. Ayrıca *P. glumae* lipazın üç boyutlu yapısı üzerinde yapılan çalışmalar gösterdi ki; kalsiyum iyonu, aktif bölgeyi ikinci bir altdomaine bağlayarak protein stabilitesini arttırmaktadır [3].

Yapılan diğer çalışmalar ile kalsiyumun, denatürasyona sebep olan yüksek sıcaklıklara karşı enzimin stabilitesini arttırdığı [4] ve kalsiyum iyonlarının lipazı proteazlara karşı koruduğu öne sürülmüştür [5]. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan kalsiyuma bağlı stabilite çalışmalarında görüldü ki, *B. stearothermophilus* lipazının yapısı kalsiyum varlığında 66 °C'de bozulmaya başlarken, kalsiyum yokluğunda 58 °C'de bozulmaya başlamıştır [18]. Simon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre; *Staphylococcus hyicus* lipazının 354 ve 357. rezidülerindeki Asp amino asitlerinin kalsiyum bağlanma ligandları olabilecekleri düşünülmüştür. Ayrıca *S. hyicus* lipazda iki kalsiyum iyonu aktif bölgenin bulunduğu 'loop'ta konumlanırken; *B. stearothermophilus* lipazın altdomainlerinin yapısal olarak farklı organizasyonları ile *S. hyicus* lipazından ayrıldığı görülmüştür [6].

Literatürde I.5 sınıfına ait lipazlar üzerine metal etkisinin incelendiği bazı çalışmalarda, manganın lipaz aktivitesini %50 arttırdığı belirtilmiştir [73]. Fakat, manganın bu sınıfa ait termofilik lipazlar üzerine etkisini inceleyen detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Nayara ve arkadaşlarının *Bacillus sp.* ITP-001 lipaz ile yaptıkları çalışmada, manganın immobilize edilen lipazın aktivitesini %25 arttırdığı belirtilmiştir [72]. Ghori ve arkadaşları da, *Bacillus* sp. lipaz üzerine metal etkisini inceledikleri çalışmada, manganın lipaz aktivitesini % 40 arttırdığını rapor

etmişlerdir [51]. Ayrıca Kübra Ekşiler'in tez çalışmasında da manganın *G. kaustophilus* lipazın aktivitesini yaklaşık 3 kat arttırdığı belirtilmiştir [27]. Diğer yandan yapılan bazı çalışmalar ile, manganın lipaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi de rapor edilmektedir [75]. Emmanuel ve arkadaşlarının *B. subtilis* 168 lipaz ile yaptıkları çalışmada, lipazın mangan ile inkübe edilmesinin ardından aktivitesinin %68 azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışma da aynı zamanda, lipaz aktivitesi üzerine metal etkisinin kompleks bir mekanizma olduğu rapor edilmektedir. Çünkü bu sonuçların, çözünürlükte ve arayüzeyde iyonize olan yağ asitlerinin etkileşimlerinde meydana gelen değişiklikten kaynaklanıyor olabileceği gibi, enzimin kendi katalitik özelliklerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanabileceği de belirtilmektedir [74].

1.2. Mutasyonların Önemi ve Aktivite Üzerine Etkileri

Bir çok lipaz, aktivitesini yüksek pH ya da yüksek sıcaklık gibi ekstrem koşullarda koruyabilmektedirler; buna bağlı olarak endüstriyel alanda geniş kullanım alanına sahiplerdir [42]. Endüstriyel kullanımı sağlama açısından, termal stabilite bir enzim için en önemli gereksinimdir; çünkü termal stabilite enzim inaktivasyonunun başlıca sebebidir [43]. Önceki yıllarda farklı protein varyasyonlarının in vitro koşullarda incelenmesi; enzimin stabilitesi, afinitesi ve proteinlerin seçiciliği gibi enzimlerin fonksiyonel özelliklerini değiştirme konusunda birçok sıra dışı başarılı çalışmalara yön vermiştir [44]. Mutasyon çalışmalarına ait birçok alanda bölgesel dizayn uygulanmaktadır. Odaklanılması gereken önemli bir nokta ana tip enzime göre hangi mutasyonun stabiliteyi artırıcı yönde etkili olacağının belirlenmesidir [45]. Mutantlar esas olarak farklı enerji seviyelerindeki gelişim esas alınarak tasarlanır ve stabiliteye bağlı serbest enerji değişimleri hesaplanır [46,47]. Dahası, yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları, enzim yapısına yeni ion çifti kazanımları gibi katkı sağlayarak birçok yararlı modifikasyonlara yol açabilir [48]. Rahman ve arkadaşları, ion çifti ağlarının ekstrem sıcaklıklarda enzim stabilitesini korumada anahtar bir rol oynadığını göstermişlerdir [49].

Ruslan R. ve arkadaşlarının *Geobacillus zalihae T1* lipaz ile yaptıkları mutasyon çalışmalarında; D311E mutantının ana tip T1 lipaza göre termal erime sıcaklığında 2 derece artış gösterdiği bulunmuştur [45]. T1 lipazın T_m değeri 68.52

°C iken, D311E mutant lipazın T_m değeri 70.59 °C'ye yükselmiştir. Bununla beraber T1 lipaz ve mutantların α-heliks yapılarında oluşan bozulmaları görüntülemek amacıyla 220 nm'de ki CD spektraları incelendi; fakat elde edilen CD spektrum ölçümlerine göre, T_m değerlerinde farklılık olmasına rağmen α-heliks yapılarında önemli bir yapısal farklılık olmadığı görülmüştür. Sıcaklık artışına bağlı olarak protein yapısı çözülmeye başladığında, enzim 'intermediate state' olarak adlandırılan bir ara faza maruz kalır; oluşan bu fazdaki serbest enerji değişimi denge halinde sıfırdır. Böylece farklı bozunma entalpi ve entropi değerlerine bağlı olarak her biri farklı T_m değerlerine sahiptir [45].

Pseudomonas aeruginosa LST-03'den elde dilen lipazda gerçekleştirilen bir mutasyonun, lipaz yapısında tuz köprüsü ve hidrojen bağları oluşumu gibi yapısal değişikliklerin gerçekleşmesini indükleyerek lipaz stabilitesine katkı sağladığı görülmüştür [50].

Dror ve arkadaşları, *G. stearothermophilus* T6 lipaz yapısında H86Y/A269T/R374W üçlü mutasyonunu gerçekleştirerek biyodizel üretiminde kullanım amaçlı metanole dirençli mutant geliştirmişlerdir. Mutasyonlar sonucunda yan zincirlerin, proteinin yapısında bulunan H_2O moleküllerine hidrojen bağı ile bağlanarak ekstra etkileşimleri oluşturduğu ve bu etkileşimlerin de metanoldeki termal stabiliteyi artırdığı rapor edilmiştir [79].

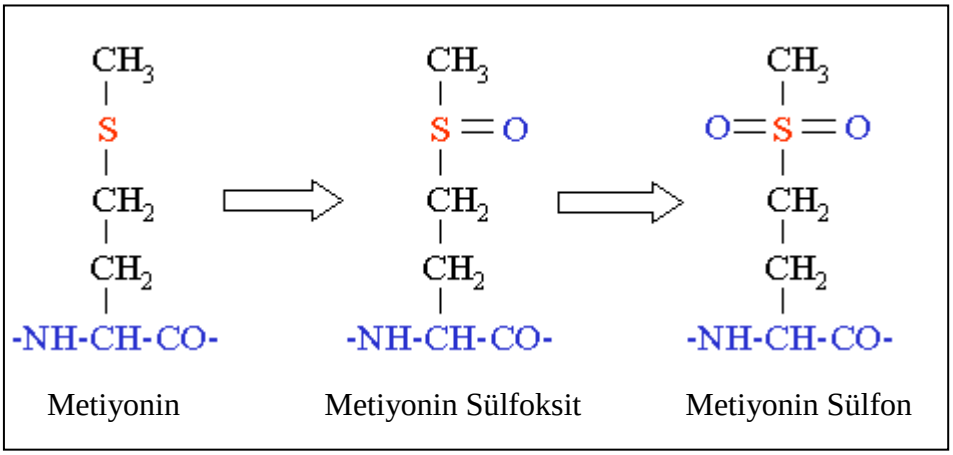
Bakteriyel termoalkalofilik lipazların agregasyon eğilimine dair oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Yüksek ısı sebebiyle denatüre olmuş proteinlerin agregasyona uğraması sonucu aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak kaybetmesi, proteinlerin termodinamik karakterizasyonunu sınırlar [41]. Agregasyonlar kısmen agregasyona meyilli hidrofobik rezidülerin varlığından kaynaklanır. Bir proteinin agregasyona uğraması, proteinin suda çözünürlüğünü azaltır. Bunun sebebi denatürasyon ile bozulan yapının sistemin entropisini azaltmasıdır. Bunun üzerine sistem, protein içi ya da proteinler arası etkileşimleri başlatarak entropisini arttırmak ister bu da agregasyona sebep olur. Katlanmamış haldeki proteinlerin agregasyonunu önleyen mutasyonların gerçekleştirilmesi, proteinlerin katlanma aşamaları hakkında bilgi edinebilmeyi sağlar.

Diğer yandan, çözünür (*soluble*) agregasyonun, bazı proteinlerin termal stabilitesine katkı sağladığı bilinmektedir [80, 81]. Agregasyona meyilli rezidüler, agregasyon süresince, birbirleri ile olan etkileşimlere bağlı olarak konsantrasyona

bağlı bir gecikme süresi sağlarlar, moleküller arasındaki bu etkileşimler termal stabiliteyi arttırır [82, 83]. Bazı çalışmalarda hidrofobik bir rezidü olan triptofanın yapışkan bölgeleri (*sticky-sites*) sayesinde agregasyonu tetiklediği ve birçok proteinin termal stabilitesini arttırdığı belirtilmiştir [84, 85]. Timuçin ve Sezerman'ın *B. thermocatenulatus* (BTL2) lipaz ile yaptıkları çalışmada, kapak yapısında bulunan 211. ve 234. triptofan rezidülerinin agregasyonu tetikleyerek termostabiliteye katkı sağladıkları belirtilmiştir. Mutasyon ile Trp211 rezidüsünün alanine çevrilmesi sonucunda, BTL2 lipazın agregasyon eğiliminin azaldığı ve buna bağlı olarak termal stabilitenin de azaldığı belirtilmiştir [86].

- Proteinlerde Metiyonin ve Aspartik Asit Rezidülerinin Rolü

Metiyonin (Met), nonpolar ve orta derecede hidrofobik bir amino asittir; yan grubunda "inert" tiyoether grubu vardır. Met, proteinlerde amino asit rezidülerinin %1.5 oluşturmakta ve hidrofobik özelliğinden dolayı çoğunlukla iç kısımlarda, %15 kadarı da yüzeyde yer almaktadır. Met yan zinciri, esnek ve polar olduğu için substrat/ kofaktör bağlanmasında ve proteinlerin hidrofobik kısımların katlanmasında ve stabilizasyonunda rol oynayabilmektedir. Metiyonin, sistein ile birlikte, yan zincirlerinde bulundurdukları sülfürden dolayı oksidasyona karşı hassas rezidülerdir. Metiyoninin tiyoether grubu, oksidasyona uğradığı zaman ilk önce sulfoksit, sonra da sülfona dönüşmektedir (Şekil 1.5); hem sülfoksit hem de sülfon hidrofilik gruplardır. Met oksidasyonu sonucunda, proteinler yapısal değişikliğe uğrayabilmekte ve aktivitelerini kaybedebilmektedir [66]. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerde (örn. deterjanlarda) oksidatif stabilite, önemli parametrelerden bir tanesidir. Bundan dolayı, biyoteknolojik alanda kullanılan bazı enzimlerin yapılarında bu rezidüler, özellikle aktif bölgeye yakın olanlar, mutasyon yoluyla okside olmayan rezidülerle (örn. Ala, Ser, Thr, Leu, Ile) değiştirilmektedir.



Şekil 1.5: Metiyonin rezidülerinin oksidasyonu.

Aspartik asit (Asp); negatif yüklü, polar bir amino asittir ve proteinlerde bulunan iki asidik amino asitden biridir (Asp ve Glu). Metabolizmada proteinlerin biyosentezinde kullanılmaktadırlar. Aslında Asp, β hidrojenleri bir karboksil grubu ile yer değiştirmiş bir alanindir. Ayrıca piruvatın alaninin bir α-keto homoloğu olduğu gibi, Asp okzaloasetatın α-keto homoloğudur. Piruvatın ve alaninin birbirine dönüştürülebilmeleri gibi, Asp ve okzaloasetat basit bir transaminasyon reaksiyonu ile birbirlerine dönüştürülebilmektedirler. Böylece metabolizmada okzaloasetatdan sentezi sağlanmaktadır.

Asp, yüklü ve polar olduğu için genellikle sulu bir çevreye maruz kalan protein yüzeylerini tercih eder. Proteinin iç kısmına gömülü olduğunda, çoğunlukla Arginine gibi pozitif yüklü iyonlarla yük paylaşarak tuz köprüleri oluşturular ve oluşturdukları iyonik etkileşimler protein stabilizasyonunda oldukça önemlidir.

Asp, sıklıkla proteinlerin aktif bölgesinde (*active-site*) ya da bağlanma bölgesinde (*binding-site*) yer alan proteinlerden biridir. Negatif yüklü oldukları için çinko gibi non-protein yapıdaki katyonlarla etkileşime girebilmektedirler. Kısa bir yan zincire sahip olduğu için protein yapısında kararlılık sağlamaktadır. Bu özelliği proteinin aktif bölgesinde yer alması tercihini arttırmaktadır. Muhtemelen aspartatın serin proteazların aktif bölgesinde yer alması (Ser-His-Asp) bunun en iyi bilinen örneklerindendir.

1.3. Tezin Katkısı, Amacı ve İçeriği

G. kaustophilus lipaz I.5 sınıfına ait bir enzim olup, bu sınıfa ait lipazların yapısında Ca^{2+}- ve Zn^{2+}-bağlanma bölgeleri bulunmaktadır [18, 26]. Her iki metalin de lipazın termal stabilitesini arttırdığı rapor edilmiştir [17]. Zn^{2+}-bağlanma bölgesinde mutasyonlar gerçekleştirilerek bu metal iyonunun lipazın termal kararlılığına etkisi gösterilmiştir [79]; fakat Ca^{2+}- bağlanma bölgesinde mutasyon gerçekleştirilerek etkileri incelenmemiştir. Bu çalışmada, *p*ET22b(+) vektörüne klonlanmış *G. kaustophilus* lipazın kalsiyum bağlanma bölgesinde iki noktada mutasyonlar gerçekleştirerek aktivite ve stabiliteye etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak Ca^{2+}'a koordine olan Asp365 alanine; ikinci olarak ise yine Ca^{2+}'a koordine olan Gly286'nın yanında bulunan Met287 rezidüsü proline çevrilmiştir. Glu360 ve Asp365'in yan zincirlerindeki karboksilik gruplar ile, Gly286 ve Pro366 rezidülerinin karbonil oksijenleri Ca^{2+} iyonu ile etkileşim içinde olan ligandlardır [18]. Met287 rezidüsü de, Gly286 ile birlikte, β-dönüş bölgesinde yer almaktadır. Ca^{2+}, koordinasyon içinde bulunduğu rezidüler ile 'loop' bölgesini kararlı hale getirerek lipazın termal stabilitesini arttırmaktadır. Ca^{2+} ile koordine olan Asp365 rezidüsünü alanine çevirerek lipazın termal kararlılığına etkisinin incelenmesi, ayrıca Met287, β-dönüş bölgesinde olduğu için Pro rezidüsüne dönüştürürerek bu bölgenin stabilitesinin arttırılması amaçlanmıştır.

Mutant lipazların öncelikle yaban tip lipaza göre metal afinitelerindeki değişimi, Ca^{2+} ve Mn^{2+} için K_a değerleri belirlendi. K_a değeri, maksimum enzim aktivitesinin yarıya ulaştığı metal iyonu konsantrasyonunu vermektedir. Sıcaklık-stabilite deneyleri ile yaban tip ve mutant lipazların yüksek sıcaklıklardaki yarı-ömürleri hesaplandı. Lipazın termal kararlılığı Sirküler Dikroizm Spektroskopisi (CD) kullanarak belirlendi. Termal denatürasyon deneyleri ile yaban tip ve mutantların ikincil (sekonder) yapılarındaki değişim incelendi ve T_m değerleri hesaplandı. Aynı zamanda farklı sıcaklıklarda 'far-UV' bölgesinde CD Spectra ölçümleri gerçekleştirildi. Na^{2+} iyonunun lipazın aktivite ve stabilitesine etkisini incelemek için aynı deneyler NaCl varlığında da tekrar edildi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Yeast extract granulated (Merck), Acrylamide (Merck), Sodium dodecyl sulfate (Sigma), Peptone (Merck), TEMED (Merck), Tris-HCl (Calbiochem), 2-mercaptoethanol (Merck), Acrylamide:N, N-methylene bis acrylamide (Fluka), Agar (Fluka), Agarose (Sigma), Imidazole (Sigma), IPTG (Qiagen), Etidyum bromid, *Taq* DNA Polimeraz (Fermantas), 10X *Taq* DNA Polimeraz Buffer (Fermantas), PCR tamponu (Fermantas), HS *Pfu* Polymerase (Finnenzymes), 10X *Pfu* buffer (Finnenzymes), dNTP (Fermantas), Sodium chloride (Merck), Ampisilin (AppliChem), $CaCl_2$ (Sigma Aldrich), $MnCl_2$ (Sigma Aldrich), EDTA (Merck). Protein saflaştırması için DEAE-Selüloz (Sigma) kolon rezini kullanılmıştır. Mini plazmit DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich).

2.2. Metod

2.2.1. *p*ET22b-Gk lipazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

G. kaustophilus lipazın rekombinant üretimi için, bu laboratuvardan Kübra EKŞİLER'in *p*ET22b(+) vektörüne klonladığı ve *E.coli* BL21(DE3)'e aktardığı hücreler kullanılmıştır [27].

80 µg/mL ampisilin ve *p*ET22b(+) lipaz vektörü içeren %50 gliserol stok *E.coli* BL21(DE3) hücresinden 25 µL, 25 mL steril LB besiyerine eklenip 37 ^{o}C 180 rpm'de gece boyu büyümeye bırakıldı. 16 saat büyümenin ardından küçük kültürden 10 mL alınarak, 100 µg/mL ampisilin içeren 500 mL LB besiyerine aktarıldı. OD_{600} 0.9 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. OD_{600} 0.9'a ulaşınca, IPTG ile son konsantrasyon 0.25 mM olacak şekilde uyarıldı. 4 saat boyunca LB besiyerinden saat başı 600 µL örnek alındı ve alınan örneklerin ekspresyon kontrolü SDS-PAGE ile

yapıldı. 4. saatin sonunda büyüyen hücreler +4ºC ve 9000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüjlenerek çöktürüldü ve -80 °C'de saflaştırma yapılıncaya kadar (genelde ertesi gün) saklandı.

Hücre peletleri, hacminin 10 katı kadar liziz tamponda (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 75 mM NaCl, 10 mM Benzamidin pH 8.0) çözüldü. Elde edilen karışım buz içerisinde 40 saniye bekleme ve 2 dakika sonikasyon işlemi olacak şekilde 30 kere tekrar edilerek parçalandı. Homojenat 20 dk +4ºC'de ve 9000 rpm'de santrifüjlendi. Hücre ekstraktı filtreden geçirilerek hücre kalıntılarından uzaklaştırıldı.

DEAE-selüloz rezin 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 75 mM NaCl pH 8.0 tamponu ile dengelendi. Rezin, 80 mL hücre özütü ile 1 saat karıştırıldı ve kolona yüklendi. 100, 200 ve 500 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0 tamponu ile 5'er mL fraksiyonlar toplandı. Fraksiyonların saflığı SDS-PAGE ile analiz edildi. Yeterli saflıkta olmayan fraksiyonlar diyaliz yapılarak tuzdan uzaklaştırıldı, DEAE-selüloz kolona tekrar yüklendi. 10, 25, 50, 75 ve 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0 tamponu ile elüye edilerek fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonların saflığı %12'lik SDS-PAGE ile analiz edildi. Saf olarak geldiği belirlenen fraksiyonlar birleştirilerek konsantre edildi ve saflığı tekrar %12'lik SDS-PAGE ile analiz edildi.

2.2.2. Yönlendirilmiş Mutasyon Çalışmaları

2.2.2.1. Primer Dizaynı

G. kaustophilus lipaz enziminin 287. rezidüsündeki metiyoninin proline ve 365. rezidüsündeki aspartik asitin alanine çevrilmesi, *Strategene QuikChange Site-Directed Mutagenesis* protokolüne göre gerçekleştirildi. M287P ve D365A ileri ve geri primerleri dizayn edilerek, eşitlik 2.1'de verilen formül ile T_m değerleri hesaplandı (Tablo 2.1). *IDT Oligo Analyzer Tool* kullanılarak mutant primerlerin hairpin oluşturma sıcaklıkları hesaplandı ve eşleşen kısım analizleri yapıldı.

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - (\%mismatch) \quad (2.1)$$

Tablo 2.1: M287P/D365A mutant primerlerin sekuansı ve hesaplanan *Tm* değerleri.

Mutant Primer	**Sekuans**	**T_m (°C)**
M287P-Fwd	5′-CTT GGA CCG AAC GCA TTC AGC GCG ATT GTC-3 L G P N A F S A I V	78
M287P- Rev	5'-GCT GAA TGC GTT CGG TCC AAG TTC GGG ATA ATA GTT GCC-3' S F A N P G L E P Y Y N G	80
D365A-Fwd	5′- ATC GGC GTT GCC CCG AAT CCG TCA TTT GAT ATT -3′ I G V A P N P S F D I	78
D365A- Rev	5′- CGG ATT CGG GGC AAC GCC GAT GAT TTC CAA ATG -3′ P N P A V G I I E L H	80

2.2.2.2. Mutasyonların Gerçekleştirilmesi

M287P ve D365A mutasyonları, Tablo 2.2‘de gösterilen miktarlarda reaktifler ile PCR (Finnenzymes) kurularak gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu DMSO varlığında ve yokluğunda *Pfu Polymerase* ve bu enzime ait koşulları sağlayan *10X Pfu Buffer* kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 2.2: Mutasyonların gerçekleştirilmesi için kullanılan PCR reaktifleri.

Reaktifler	**1.tüp**	**2.tüp**
dH_2O	27,5 µL	30 µL
10X Pfu Buffer	5 µL	5 µL
DMSO (5%)	2,5 µL	-
dNTPs (10 mM)	2 µL	2 µL
İleri mutant primer (10 µM)	5 µL	5 µL
Geri mutant primer (10 µM)	5 µL	5 µL
Kalıp DNA (30 ng/µL)	2 µL	2 µL
Pfu Polymerase	1 µL	1 µL
Toplam hacim:	**50 µL**	**50 µL**

Mutasyonları gerçekleştirmek üzere kurulan PCR programı Tablo 2.3'te gösterilmektedir. Primerlerin *Tm* değerleri ve hairpin oluşturma sıcaklıkları dikkate alınarak annealing sıcaklığı M287P mutantı için 72 °C, D365A mutant için 68 °C olarak ayarlandı (Tablo 2.3). PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Tablo 2.3: Mutasyonların gerçekleştirilmesi için kurulan PCR programı.

PCR Programı			
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	2 dakika	
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30 döngü
Erime sıcaklığı	72/68 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	3,5 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	
	+4 °C	∞	

2.2.3. Mutant Lipaz Geninin Kompetent Hücreye Transformasyonu

M287P ve D365A mutasyon bölgesi içeren plazmidler öncelikle, *E.coli* XL-1 Blue kompetent hücreye transforme edildi. Ardından, XL-1 Blue hücresinden izole edilerek *E.coli* BL21 (DE3) suşuna transforme edildi.

2.2.3.1. Katı Agar Besiyeri Hazırlama

100 mL LB besiyeri, 2 g agar ilave edilmesinin ardından otoklavlanarak sterilize edildi. 50 °C'ye soğutulduktan sonra 125 µL ampisilin son konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde henüz donmamış agar içerisine ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra petri kaplarına eşit olarak paylaştırıldı ve 60 dakika alev yanında donmaya bırakıldı. Ağızları kapatılıp, parafilmle kenarları sarıldıktan sonra transformasyon işlemi için kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

2.2.3.2. DpnI ile PCR Ürününün Kesimi

40 µL PCR ürünü üzerine 4 µL DpnI kesim enzimi eklendi ve 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saat boyunca 15'er dakikalık aralıklarla hafif hızda vortekslendi.

2.2.3.3. Transformasyon

100 µL kompetent hücre -80 °C'den çıkarılıp hemen buzun içine alındı ve buz üstünde çözülmesi sağlandı. DpnI ile kesilen PCR ürünü (50 µL) kompetent hücre içerisine eklendi, elle hafifçe vurularak karıştırıldı. 30 dk buzda, ardından 60 sn 42 °C'deki su banyosunda ve tekrar 15 dakika buz içerisinde bekletildi. Üzerine 900 µL antibiyotiksiz LB besiyeri eklendi ve 37 °C, 250 rpm’de 1 saat inkübasyona bırakılarak büyümeleri sağlandı. +4 °C’de muhafaza edilen katı agar petrilerinin ağızları açılarak alev yanında kurumaları sağlandı. İnkübe edilen kompetent hücre karışımından 500'er µL her bir petriye ekildi ve ucu L şeklinde pastör pipet ile petrinin her tarafına eşit bir şekilde yayıldı. 30 dakika hücrenin agar içerisine iyice emmesi için beklendi ve 37 °C'de etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.3.4. Üreyen Kolonilerden Plazmid İzole Edilmesi ve Hücre Stoklarının Hazırlanması

Katı agar içerisinde üreyen kolonilerden büyük ve yalnız bir koloni seçilerek 100 µg/mL amphisilin içeren içeren LB besiyerine ekim yapıldı. 37 °C'de 180 rpm'de 16 saat boyunca gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre kültüründen 50% gliserol içeren hücre stokları yapıldı ve bu stoklar -80 °C'de muhafaza edildi. Hücre kültürünün 5 mL'sinden pellet elde edilerek Plasmid Isolation kitleri (*Sigma-Aldrich ve NucleoSpin*) ile plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitden 50 µL alınarak, mutasyonların doğrulanması için DNA dizi analizine (*Medsantek Lab. Malz. San. ve Tic. Ltd. Şti.*) gönderildi.

2.2.4. M287P/D365A Mutant Lipazlarının Ekspresyonu ve Saflaştırılması

M287P ve D365A mutant lipaz enzimlerinin ekspresyonu, saflaştırıması ve kontrolü yaban tipi gibi gerçekleştirildi (Bölüm 2.2.1).

2.2.5. Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford metotu ile Bio-Rad kiti kullanılarak tayin edildi. Bradford metodu, proteinlerin fosforik asitli ortamda "Coomassie Blue" ile kompleks yapma esasına dayanır. Negatif yüklü olan bu boya pozitif yüklü proteinleri bağlayarak kırmızı formdan mavi forma dönüşür. 1-10 µg arasındaki konsantrasyonlarda BSA standartları kullanılarak, 595 nm'de absorbans ölçümü ile standart grafiği çizilir. Bu grafikte, protein örneğinin absorbansına karşılık gelen konsantrasyon değeri o proteinin konsantrasyonunu göstermektedir.

2.2.6. Yaban Tip ve Mutant Lipaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Belirlenmesi

Aktivite ölçümleri, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP veya 4-nitrofenil palmitat)'ın hidrolizinin lipaz enzimi tarafından katalizlenmesi ve oluşan

p-nitrofenol'ün (*p*NP) oluşum hızının 405 nm'de zamana karşı takip edilmesiyle yapıldı. 0.2 mM *p*NPP konsantrasyonunda, 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponu kullanıldı. Ca^{2+} ve Mn^{2+} metalleri varlığında ve yokluğunda 50 ^{o}C'de ölçümler yapıldı.

Aktivite hesaplamaları unit cinsinden, V_{max} ve farklı sıcaklıklarda hesaplanan 'extinction coefficient' değerleri kullanılarak yapıldı. Unit, bir mikromol *p*NPP'ı dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarıdır. Spesifik aktivite ise, bir miligram enzim başına düşen unit sayısı olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak ifade edilir.

2.2.6.1. Ca^{2+} ve Mn^{2+} İyonlarının NaCl Varlığında ve Yokluğunda Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi

Aktivite ölçümleri, 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponuna artan konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları (0.5-1-2-3-5-7.5-10 mM) ilave edilerek gerçekleştirildi. Kontrol olarak metal içermeyen, yani sadece 1 mM EDTA içeren, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu içerisinde yaban tip ve mutant lipazların aktiviteleri ölçüldü. Ölçümler aynı zamanda 130 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda 5 veya 2.5 µL (0.05 veya 0.025 µg) enzim ve substrat olarak *p*NPP (0.2 mM) kullanılarak gerçekleştirildi Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplanarak, ortamda serbest halde bulunan, artan iyon konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizildi. Elde edilen grafikler BiDoseResp veya Hill1 denklemine fit edilerek K_a, yarı maksimal aktivasyon değerleri hesaplandı. K_a değeri, maksimum enzim aktivitesinin yarıya ulaştığı kalsiyum konsantrasyonunu vermektedir.

2.2.6.2. Ca^{2+} ve Mn^{2+} İyonları Varlığında Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi

Sıcaklığın lipaz üzerine etkisi iki aşamada incelendi. Öncelikle yaban tip lipaz enzimi için 10-90 ^{o}C sıcaklık aralığında, 1 mM EDTA ve 10 mM Ca^{2+}, 4 mM Mn^{2+}, 10 mM Ca^{2+}+4 mM Mn^{2+} iyonları içeren 50 mM Tris- HCl (pH 8.0) tamponunda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. 5 µL veya 2.5 µL (0.05 µg veya 0.025 mg) enzim ve substrat olarak *p*NPP (0.2 mM) kullanıldı.

İkinci aşamada mutantlar üzerine sıcaklık etkisini incelemek üzere, yaban tip, M287P ve D365A lipaz enziminin 10-90 ºC sıcaklık aralığında aktiviteleri sadece EDTA veya 10 mM Ca^{2+} iyonu içeren tampon içerisinde ölçüldü. Ölçümler 130 mM NaCl içeren 50 mM Tris- HCl (pH 8.0) tamponunda 5 veya 2.5 µL (0.05 veya 0.025 µg) enzim ve substrat olarak *p*NPP (0.2 mM) kullanılarak gerçekleştirildi. Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplanarak artan konsantrasyona karşı aktivite grafiği çizildi.

2.2.6.3. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipazın Sıcaklık Stabilite Deneyleri

Sıcaklık stabilite deneyleri, farklı sıcaklıklarda inkübe edilen lipazın zamana karşı aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. Yaban tip lipaz üç farklı sıcaklıkta (65-70-75 °C) 90 dakika boyunca sadece EDTA, 5 veya 10 mM Ca^{2+} , 4 mM Mn^{2+} veya 5 mM Ca^{2+}+4 mM Mn^{2+} iyonları içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. 5 mM Ca^{2+}, 4 mM Mn^{2+}, 0.5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda aktiviteleri ölçüldü. Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplandı.

M287P ve D365A lipazın termal stabilitesi sadece EDTA veya 10 mM Ca^{2+} varlığında belirlendi. M287P lipaz 60 °C'de ve D365A lipaz 60 °C ile 70 °C'de belirtilen tamponlar içeriside 90 dk boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen örneklerin 130 mM NaCl, 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda zamana karşı aktiviteleri ölçüldü. Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplandı.

2.2.7. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının CD ile İncelenmesi

Lipaz enzimlerinin CD Spektra analizleri JASCO-815 CD spektrofotometre cihazı ile yapıldı. Ölçümler için 0.1 cm kalınlığında küvet kullanıldı.

2.2.7.1. Kalsiyum ve Mangan İyonunun Yaban Tip, M287P ve D365A Lipazın İkincil (Sekonder) Yapısına Etkisi

CD ölçümleri için 0.1 mg/mL enzim kullanılarak küvetin son hacmi 250 µL olarak belirlendi. Termal denatürasyon deneyleri 222 nm'de 30 ile 80 ºC arasında

yaban tip lipazın sadece EDTA, 5 mM Ca^{2+} ve 4 mM Mn^{2+} iyonları içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda; M287P lipazın 130 mM NaCl varlığında veya yokluğunda, sadece EDTA, 15 mM Ca^{2+} ve 4 mM Mn iyonu^{2+} içeren 10 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda; D365A lipazın 130 mM NaCl varlığında veya yokluğunda, sadece EDTA ve 15 mM Ca^{2+} içeren 10 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda α-heliks yapılarının takip edilmesiyle gerçekleştirildi. Elde edilen termal denatürasyon grafkleri ile yaban tip, M287P ve D365A lipazın T_m değerleri bulundu. T_m değeri, ortamda bulunan enzimlerin, %50'sinin doğal, %50'sinin ise denatüre halde bulunduğu sıcaklıktır.

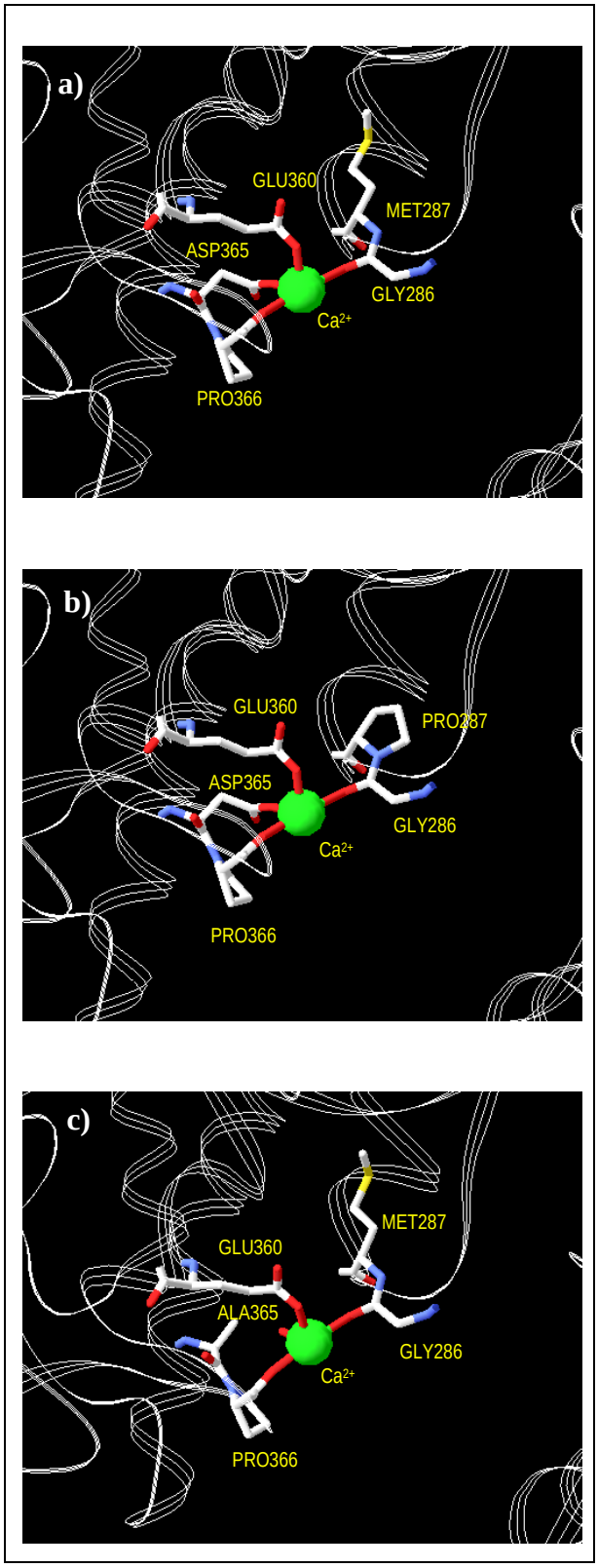
Termal denatürasyon deneyleri yapılırken, aynı zamanda spektrumlarda alındı. CD Spektra ölçümleri farklı sıcaklıklarda 200-250 nm dalgaboyu arasında yapıldı. Ölçümler kapaklı 0.1 cm kalınlığındaki kuvars küvette, 30 ve 80 ^{o}C arasında onar derecelik artışlarla, 4 kez tekrarlanarak alındı.

3. SONUÇLAR

3.1. Mutasyonların Seçimi

Lipaz enziminin Ca^{2+} bağlanma bölgesinde iki nokta mutasyon gerçekleştirdik. İlk olarak Ca^{2+}'a koordine olan Asp365'i alanine; ikinci olarak ise yine Ca^{2+}'a koordine olan Gly286'nın yanında bulunan Met287 rezidüsünü proline çevirdik. I.5 lipaz sınıfına ait *G. thermocatenulatus* (BTL2) [24,55], *B. subtilis* (lip A) [56-60], *B. stearothermophilus* lipaz (L1 ve P1) [17, 23, 26, 54] enzimlerinin üç boyutlu yapıları X-ışınları yöntemiyle aydınlatılmıştır. Lipaz yapısında Ca^{2+}- ile Zn^{2+}- bağlanma bölgelerinin olduğu gösterilmiştir. Glu360 ve Asp365'in yan zincirlerindeki karboksilik gruplar ile Gly286 ve Pro366 rezidülerinin karbonil oksijenleri Ca^{2+} iyonu ile etkileşim içinde olan ligandlardır [18]. Met287 rezidüsü ise, Gly286 ile birlikte, β-dönüş üzerinde yer almaktadır (Şekil 3.1). Tez çalışmamızda Asp365 ve Met287 rezidüsünü mutasyona uğratarak enzimin aktivitesine ve stabilitesine etkilerini inceledik.

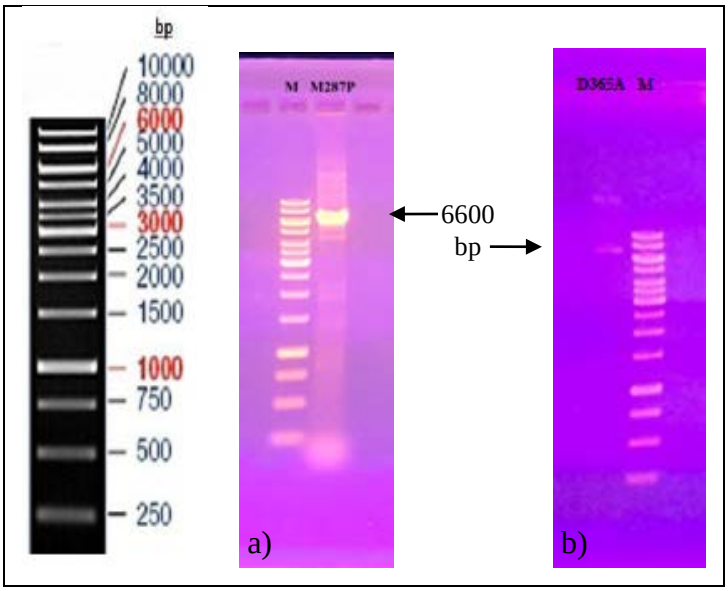
Metiyonin oksidasyona uğrayan bir rezidü olup, hem enzim aktivitesini hem de stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Oksidasyonun sebep olduğu inaktivasyonu ortadan kaldırabilmek için metiyonin rezidüleri mutasyon ile oksidatif-dirençli rezidülere çevrilmektedir [76, 77, 78]. Çalışmamızda, Met287, β-dönüş bölgesinde olduğu için Pro rezidüsüne dönüştürerek bu bölgenin stabilitesini arttırmak istedik.



Şekil 3.1: a) *Bacillus stearothermophilus* L1 lipazın kalsiyum bağlanma bölgesindeki rezidülerin (Gly^{286}, Glu^{360}, Asp^{365}, Pro^{366}) Ca^{2+} ile koordinasyonu ve Met^{287}'nin bu bölgedeki konumu (pdb: 1KU0), b) Met^{287} rezidüsünün proline çevrilmesi, c) Asp^{365} rezidüsünün alanine çevrilmesi.

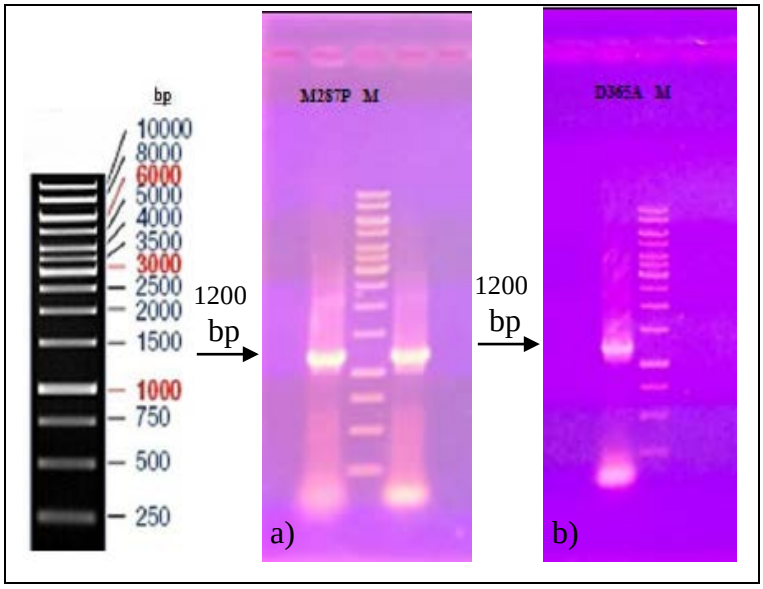
3.2. Mutasyonların Gerçekleştirilmesi

Mutasyonlar, Bölüm 2.2.3'de belirtildiği şekilde, mutasyonları içeren primerler kullanılarak lipaz geni içeren *p*ET22b(+) vektörü üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen jel görüntülerine göre, lipaz geni içeren *p*ET22b(+) vektörünün teorik olarak 6600 bp büyüklüğünde olması beklenilen M287P ve D365A PCR ürünü bandları bu değerlerde elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Mutasyonu içeren primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. a) M287P mutasyonu; b) D365A mutasyonu; M marker.

M287P ve D365A-lipaz geni içeren *p*ET22b(+) vektörleri XL-1 Blue hücrelerine aktarıldı. XL-1 Blue hücresinden plazmid izolasyonu yapılarak, PCR ile M287P ve D365A lipaz genleri çoğaltıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Elde edilen jel görüntülerine göre beklendiği gibi 1200 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: XL-1 Blue hücrelerinden saflaştırılan mutant plazmitler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. a) M287P mutasyonu; b) D365A mutasyonu; M marker.

3.3. Mutasyonların DNA Sekuans Analizi ile Doğrulanması

Mutasyonları doğrulamak için, M287P ve D365A lipaz genlerini içeren plazmitler DNA sekuans analizine gönderilmiştir. Analiz sonucu veriler *Expasy translate tool* programı ile her bir amino asiti kodlayan baz dizisine çevrilmiştir. M287P ve D365A lipaz mutasyonlarının sekuans analizi sonuçları Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de gösterilmektedir. Sekuans analizi sonucuna göre, M287 rezidüsü proline ve D365 rezidüsü alanine çevrilmiştir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Baz dizilerinde, M287P ve D365A lipaz genlerine ait kısım sırasıyla 149. ve 145. rezidüden itibaren başlamaktadır. Ayrıca kodladığı amino asit dizisi alt kısımda verilmiştir.

```
gaaggtggacatcattttgtgttgagtgtgacgaccatcgccactcctcatgacgggacg  168
 E  G  G  H  H  F  V  L  S  V  T  T  I  A  T  P  H  D  G  T

acgcttgtcaacatggttgatttcaccgatcgctttttgacttgcaaaaagcggtgttg  188
 T  L  V  N  M  V  D  F  T  D  R  F  F  D  L  Q  K  A  V  L

gaagcggcggctgtcgccagcaacgcgccgtacacaagcgaaatatacgattttaagctc  208
 E  A  A  A  V  A  S  N  A  P  Y  T  S  E  I  Y  D  F  K  L

gaccaatgggggctgcgccgcgagccaggcgaatcgttcgaccattattttgaacggctc  228
 D  Q  W  G  L  R  R  E  P  G  E  S  F  D  H  Y  F  E  R  L

aagcgctcccctgtctggacatcgaccgataccgcccgctacgatttatccgttcccggg  245
 K  R  S  P  V  W  T  S  T  D  T  A  R  Y  D  L  S  V  P  G

gctgagacgttgaatcgatgggtgaaagccagcccgaatacgtattatttgagcttttct  268
 A  E  T  L  N  R  W  V  K  A  S  P  N  T  Y  Y  L  S  F  S

accgaacggacgtatcgaggagctctgacaggcaactattatcccgaacttggaccgaac  288
 T  E  R  T  Y  R  G  A  L  T  G  N  Y  Y  P  E  L  G  P  N

gcattcagcgcgattgtctgcgccccgtttctcggctcgtaccgcaatgcggcgcttggc  308
 A  F  S  A  I  V  C  A  P  F  L  G  S  Y  R  N  A  A  L  G

attgacagccattggcttgagaacgacggcattgtcaataccatttcgatgaacggtccg  328
 I  D  S  H  W  L  E  N  D  G  I  V  N  T  I  S  M  N  G  P

aagcgtggatcaagcgatcggatcgtaccgtatgacggggcgttgaaaaaaggggtttgg  348
 K  R  G  S  S  D  R  I  V  P  Y  D  G  A  L  K  K  G  V  W

aatgacatgggaacgtacaatgtcgaccatttggaaatcatcggcgttgacccgaatccg  368
 N  D  M  G  T  Y  N  V  D  H  L  E  I  I  G  V  D  P  N  P

tcatttgatattcgcgccttttatttgcggcttgccgagcagttggcgagcttgcaacct  388
 S  F  D  I  R  A  F  Y  L  R  L  A  E  Q  L  A  S  L  Q  P

taa
 -
```

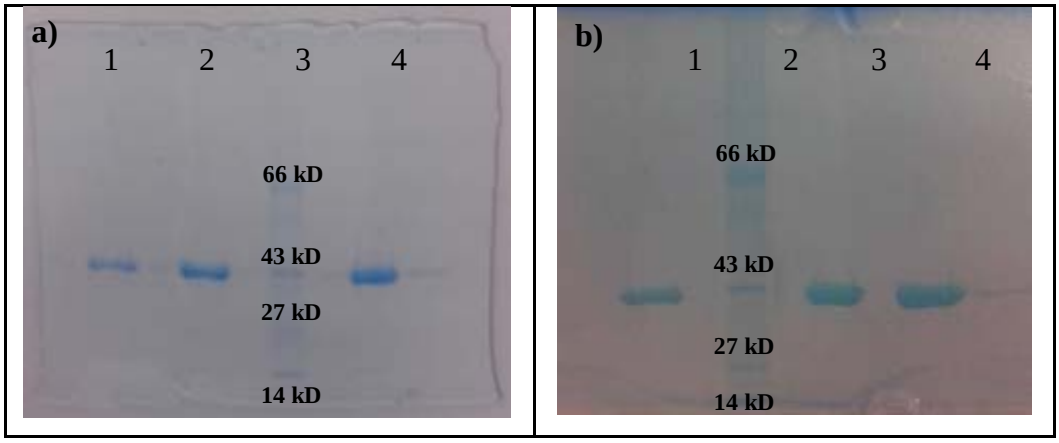
Şekil 3.4: DNA dizi analizi sonucunda elde edilen M287P lipazın baz dizisi. T7 Reverse primer kullanılarak elde edilen sonuç (149. rezidüden itibaren) gösterilmektedir.

```
tcgccgttgtttgaaggtggacatcattttgtgttgagtgtgacgaccatcgccactcct  164
 S  P  L  F  E  G  G  H  H  F  V  L  S  V  T  T  I  A  T  P

catgacgggacgacgcttgtcaacatggttgatttcaccgatcgctttttgacttgcaa  184
 H  D  G  T  T  L  V  N  M  V  D  F  T  D  R  F  F  D  L  Q

aaagcggtgttggaagcggcggctgtcgccagcaacgcgccgtacacaagcgaaatatac  204
 K  A  V  L  E  A  A  A  V  A  S  N  A  P  Y  T  S  E  I  Y

gattttaagctcgaccaatgggggctgcgccgcgagccaggcgaatcgttcgaccattat  224
 D  F  K  L  D  Q  W  G  L  R  R  E  P  G  E  S  F  D  H  Y

tttgaacggctcaagcgctcccctgtctggacatcgaccgataccgcccgctacgattta  244
 F  E  R  L  K  R  S  P  V  W  T  S  T  D  T  A  R  Y  D  L

tccgttcccggggctgagacgttgaatcgatgggtgaaagccagcccgaatacgtattat  264
 S  V  P  G  A  E  T  L  N  R  W  V  K  A  S  P  N  T  Y  Y

ttgagcttttctaccgaacggacgtatcgaggagctctgacaggcaactattatcccgaa  284
 L  S  F  S  T  E  R  T  Y  R  G  A  L  T  G  N  Y  Y  P  E

cttggaatgaacgcattcagcgcgattgtctgcgccccgtttctcggctcgtaccgcaat  304
 L  G  M  N  A  F  S  A  I  V  C  A  P  F  L  G  S  Y  R  N

gcggcgcttggcattgacagccattggcttgagaacgacggcattgtcaataccatttcg  324
 A  A  L  G  I  D  S  H  W  L  E  N  D  G  I  V  N  T  I  S

atgaacggtccgaagcgtggatcaagcgatcggatcgtaccgtatgacggggcgttgaaa  344
 M  N  G  P  K  R  G  S  S  D  R  I  V  P  Y  D  G  A  L  K

aaaggggtttggaatgacatgggaacgtacaatgtcgaccatttggaaatcatcggcgtt  364
 K  G  V  W  N  D  M  G  T  Y  N  V  D  H  L  E  I  I  G  V

gcccgaatccgtcatttgatattcgcgcctttatttgcggcttgccgagcagttggcg  384
 A  P  N  P  S  F  D  I  R  A  F  Y  L  R  L  A  E  Q  L  A

agcttgcaacctaa                                              388
 S  L  Q  P  -
```

Şekil 3.5: DNA dizi analizi sonucunda elde edilen D365A lipazın baz dizisi. T7 Reverse primer kullanılarak elde edilen sonuç (145. rezidüden itibaren) gösterilmektedir.

3.4. M287P ve D365A Lipazın *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerinde Ekspresyonu ve Saflaştırılması

M287P ve D365A mutant lipaz genlerini içeren pET22b(+) vektörleri *E.coli* BL21(DE3) hücresine transforme edilerek, ekspresyonları ve saflaştırılması, daha önce belirtildiği şekilde yaban tipi gibi gerçekleştirilmiştir [27]. Saflaştırma sonunda elde edilen fraksiyonların farklı miktarlarda yüklenerek elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Jel görüntüsü sonucuna göre M287P ve D365A lipazın ~43 kDa büyüklüğünde olduğu ve >%90 saflıkta elde edildiği görülmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Saflaştırılan M287P lipaz ve D365A lipazın SDS-PAGE jel görüntüsü. a) M287P lipaz, 1, 2.5 µg; 2, 5 µg; 3, 'Marker'; 4, 7.5 µg; b) D365A lipaz, 1, 3.5 µg; 2, 'Marker'; 3, 7.1 µg; 4, 10.6 µg.

3.5. Kalsiyumun, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi

Kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekleştirdiğimiz mutasyonların, enzimin Ca^{2+} iyonuna olan afinitesini görmek için, yaban tip ve mutant lipazların, kalsiyum için yarı-maksimal aktivasyon değerlerini, K_a (half-maximal activation values for Ca^{2+}) belirledik. K_a değeri, maksimum enzim aktivitesinin yarıya ulaştığı kalsiyum konsantrasyonunu vermektedir.

Şekil 3.7a ve b; sırasıyla NaCl yokluğunda ve varlığında, artan kalsiyum konsantrasyonlarında, yaban tip, M287P ve D365A lipaz aktivitelerini göstermektedir. NaCl yokluğunda, yaban tip ve mutant lipaz aktiviteleri için, artan kalsiyum konsantrasyonuna karşı iki aşamalı artış (biphasic response) görülmektedir (Şekil 3. 7a). Yani, hem yaban tip lipaz hem de mutant lipazların Ca^{2+} için iki ayrı K_a değerleri olduğu görülmektedir. Şekil 3.7a'daki veriler, eşitlik 3.1'de verilen BiDoseResp denklemine fit edildi. Elde edilen $log_{x^{01}}$ ve $log_{x^{02}}$ değerleri K_a değerlerini vermektedir.

$$y = A1 + (A2 - A1)[\frac{p}{1 + 10^{(log_{x^{01}} - x)h1}} + \frac{1 - p}{1 + 10^{(log_{x^{02}} - x)h2}}] \quad (3.1)$$

Yaban tip ve mutant lipazların K_a değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Yaban tip lipazın Ca^{2+} için K_a değerleri, 0.63 mM ve 8.15 mM bulundu. M287P mutant lipaz için ise K_a değerleri 0.0056 mM ve 7.14 mM olarak hesaplandı. D365A mutant lipaz için K_a değerleri 0.2 mM ve 7.4 mM olarak bulundu. Bu sonuçlar, NaCl yokluğunda, yaban tip ve D365A mutantın Ca^{2+} için K_a değerleri hemen hemen aynı iken, M287P mutant lipazın ilk K_a değerinin oldukça düşük, fakat ikinci K_a değerinin yaban tip ve D365A mutant lipazın K_a değerine oldukça yakın olduğunu göstermektedir (Tablo 3.1).

NaCl varlığında ise artan kalsiyum konsantrasyonuna karşı yaban tip ve M287P mutant lipaz aktiviteleri için tek aşamalı artış (monophasic response), D365A mutant lipaz aktivitesi için iki aşamalı artış (biphasic response) görülmektedir (Şekil 3.7b). NaCl varlığında D365A lipaz iki K_a değerine sahipken, yaban tip ve M287P lipaz Ca^{2+} için tek bir K_a değerine sahiptir. Şekil 3.7b'deki veriler eşitlik 3.2'de

verilen Hill1 denklemine fit edildi. Elde edilen hız sabiti (k), K_a değerini vermektedir.

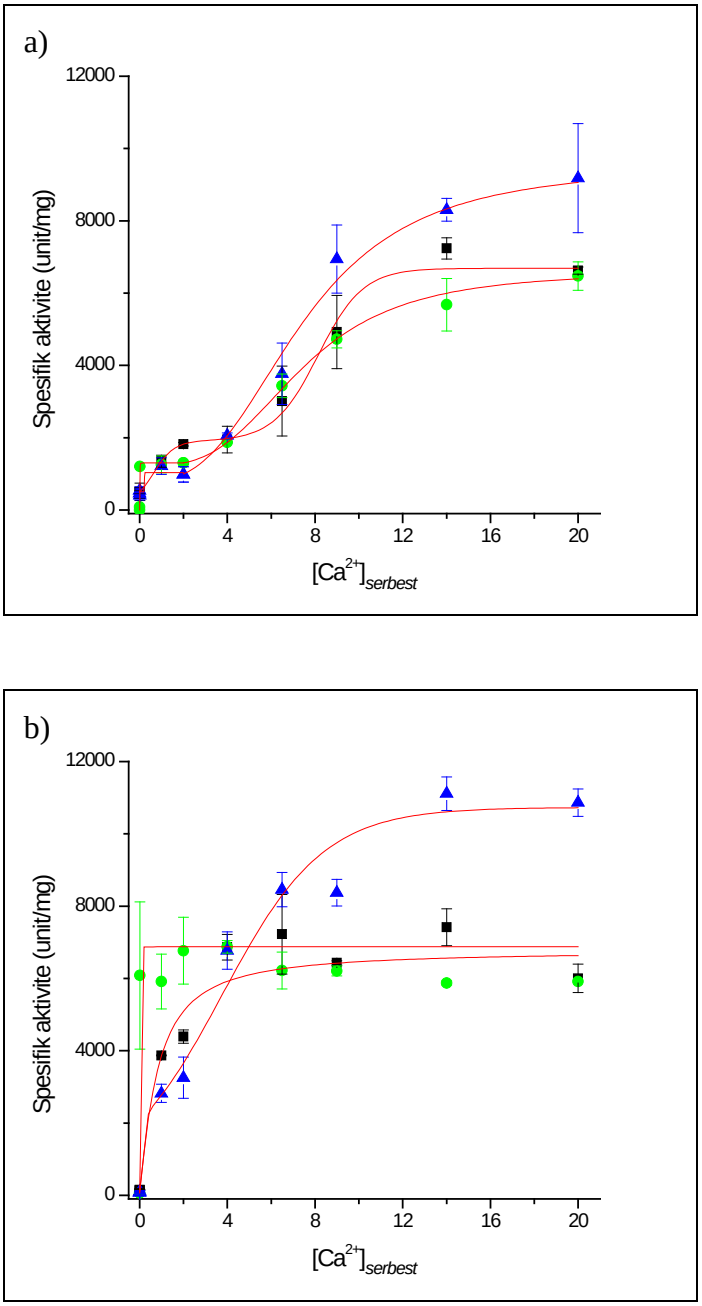
$$y = START + (END - START)\frac{x^n}{k^n + x^n} \tag{3.2}$$

NaCl varlığında hesaplanan K_a değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Yaban tip ve M287P lipaz için K_a değerleri sırasıyla 0.8 mM ve 0.006 mM bulundu. D365A lipaz için K_a değerleri 0.1 mM ve 3.7 mM olarak hesaplandı (Tablo 3.1). Bu sonuçlara göre, NaCl yaban tip ve mutant lipazların kalsiyuma olan afinitelerini arttırmaktadır. Yaban tip ve M287P lipaz aktiviteleri için K_a değerleri, NaCl yokluğundaki ilk K_a değerlerine yakınken, aktivite artışındaki ikinci aşama kaybolmuştur ve Ca^{2+} için doygunluk konsantrasyonları azalmıştır. M287P lipazın Ca^{2+} için K_a değeri oldukça düşüktür. D365A lipaz için K_a değeri NaCl yokluğundaki K_a değerlerine göre azalmıştır.

Tablo 3.1: Yaban tip ve mutant lipazların Ca^{2+} için K_a (*half-maximal activation value*) değerleri.

Lipaz tipi	**NaCl yokluğunda**	**NaCl varlığında**
	K_a değeri* (mM)	K_a değeri** (mM)
Yaban tip lipaz	K_{a1}= 0.63 ± 0.08 $K_{a\,2}$= 8.15 ± 1.1	K_a = 0.8 ± 0.03
M287P mutant lipaz	$K_{a\,1}$= 0.005 ± 0.0001 $K_{a\,2}$= 7.4 ± 0.2	K_a = 0.006 ± 0.0002
D365A mutant lipaz	$K_{a\,1}$= 0.2 ± 0.05 $K_{a\,2}$= 7.4 ± 0.9	K_a = 0.1 ± 0.01 K_a = 3.7 ± 0.2

* K_a değerleri, Şekil 3.7a'daki verilerin eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine fit edilmesiyle bulunmuş değerlerdir.
** K_a değerleri, Şekil 3.7b'deki verilerin eşitlik 3.2'deki Hill denklemine fit edilmesiyle bulunmuş değerlerdir.



Şekil 3.7: Kalsiyumun yaban tip ve mutant lipazlar üzerine etkisi. a) NaCl yokluğunda, b) NaCl varlığında, yaban tip (■), M287P lipaz (●) ve D365A lipazın (▲) artan konsantrasyonlarda serbest Ca^{2+} iyonuna karşı spesifik aktivite grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda, artan konsantrasyonlarda Ca^{2+} eklenerek gerçekleştirilmiştir ve ortamdaki serbest Ca^{2+} iyon konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.6. Manganın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Aktivitesine Etkisi

Mn^{2+}'ın klonladığımız *G. kaustophilus* lipazın aktivitesini, Ca^{2+} gibi artırdığı bu laboratuvardan Kübra Ekşiler'in tez çalışmasında gösterilmişti [27]. Hazırladığımız mutant lipazların Mn^{2+}'a olan ilgisini görmek üzere, Mn^{2+} için K_a değerlerini de belirledik.

Şekil 3.8, artan mangan konsantrasyonlarının, NaCl yokluğunda ve varlığında, yaban tip, M287P ve D365A lipaz aktivitelerine etkisini göstermektedir. NaCl yokluğunda, yaban tip ve mutant lipaz aktiviteleri, Ca^{2+}'a benzer şekilde, artan mangan konsantrasyonuna karşı iki aşamalı artış görülmektedir (Şekil 3. 8a). Buna göre, yaban tip lipaz ve mutant lipazların Mn^{2+} için de iki ayrı K_a değerleri olduğu görülmektedir. Şekil 3. 8a'daki veriler, eşitlik 3.1'de verilen Hill1 denklemine (Bölüm 3.5) fit edilerek K_a değerleri hesaplandı. Yaban tip ve mutant lipazların Mn^{2+} için K_a değerleri Tablo 3.2'de görülmektedir. Yaban tip lipazın Mn^{2+} için K_a değerleri, 0.01 mM ve 5.11 mM bulundu. M287P mutant lipaz için ise K_a değerleri 0.01 mM'dan az ve 6.6 mM olarak hesaplandı. D365A mutant lipaz için K_a değerleri 0.01 mM'dan az ve 2 mM olarak bulundu (Tablo 3.2). Bu sonuçlara göre, ilk K_a değerleri karşılaştırıldığında, M287P ve D365A mutantın Mn^{2+} için K_a değerleri hemen hemen aynı ve yaban tip lipaza göre daha düşüktür. İkinci K_a değerleri karşılaştırıldığında, yaban tip ve M287P lipazın Mn^{2+} için K_a değerleri hemen hemen aynı iken, D365A lipazın Mn^{2+} için K_a değerinin daha düşük ve mangana olan afinitesinin yüksek olduğu görülmektedir.

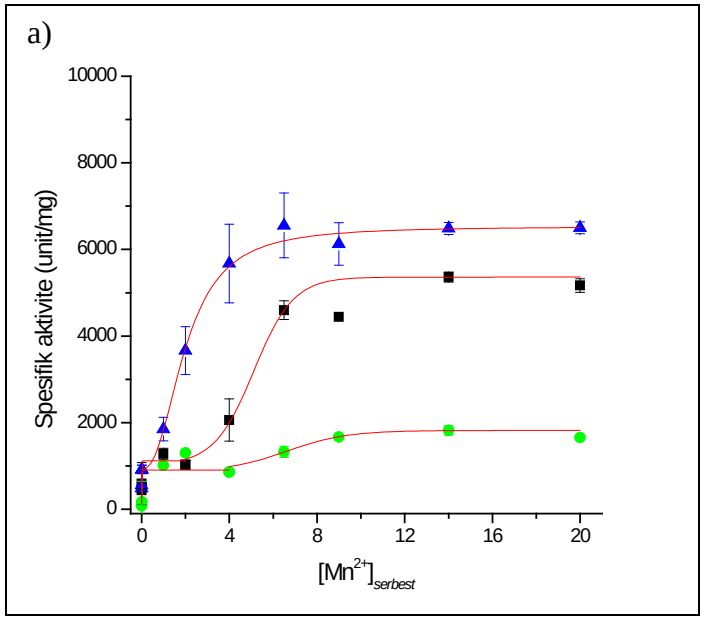
NaCl varlığında ise artan mangan konsantrasyonuna karşı, kalsiyuma benzer şekilde, yaban tip ve M287P lipaz aktiviteleri için tek aşamalı artış, D365A lipaz aktivitesi için iki aşamalı artış görülmektedir (Şekil 3.8b). D365A lipaz iki K_a değerine sahipken, yaban tip ve M287P lipaz Mn^{2+} için tek bir K_a değerine sahiptir. Şekil 3. 8b'deki veriler eşitlik 3.2'de verilen Hill1 denklemine (Bölüm 3.5) fit edilerek K_a değerleri hesaplandı. NaCl varlığında hesaplanan Mn^{2+} için K_a değerleri Tablo 3.2'de görülmektedir. Yaban tip ve M287P lipaz için K_a değerleri sırasıyla 1.01 ve 4.5×10^{-4} mM bulundu. D365A lipaz için K_a değerleri 0.01 mM'dan az ve 0.8 mM olarak hesaplandı (Tablo 3.2). Bu sonuçlara göre, NaCl yaban tip ve mutantların mangana olan afinitelerini arttırmıştır. Ayrıca NaCl varlığında, yaban tip ve M287P

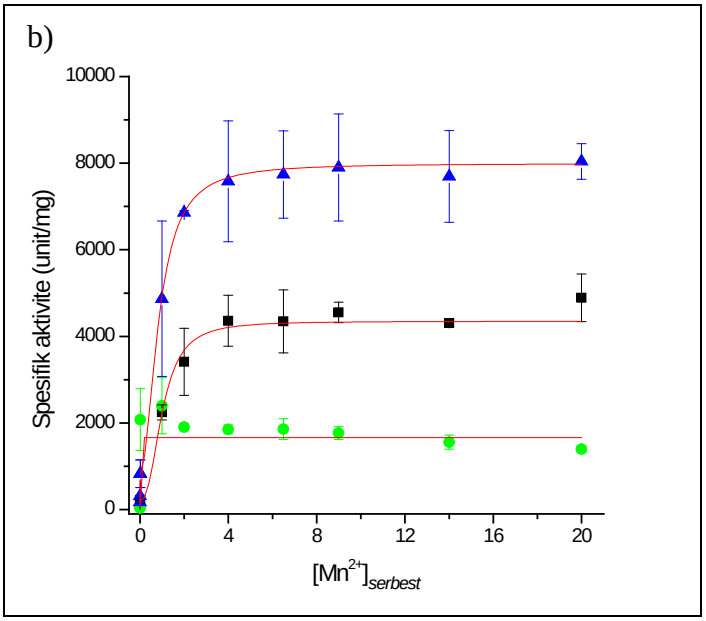
lipazın Mn^{2+} için doygunluk konsantrasyonları azalmıştır. NaCl varlığında M287P lipazın Mn^{2+} için K_a değeri oldukça düşüktür.

Tablo 3.2: Yaban tip ve mutant lipazların Mn^{2+} için K_a* (*half-maximal activation value*) değerleri.

Lipaz tipi	**NaCl yokluğunda**	**NaCl varlığında**
	K_a değeri (mM)	K_a değeri (mM)
Yaban tip lipaz	K_{a1}= 0.01 ± 0.002 $K_{a\,2}$= 5.11 ± 0.1	K_a= 1.01 ± 0.04
M287P mutant lipaz	$K_{a\,1}$= 0.001 ± 2.4x10^{-15} $K_{a\,2}$= 6.6 ± 0.03	K_a= 4.5x10^{-4} ± 0.7 x10^{-8}
D365A mutant lipaz	$K_{a\,1}$= 0.004 ± 0.00002 $K_{a\,2}$= 2 ± 0.1	K_{a1}= 0.005 ± 0.00003 K_{a2}= 0.8 ± 0.08

* K_a değerleri, Şekil 3.8'deki verilerin eşitlik 3.2'deki Hill denklemine fit edilmesiyle bulunmuş değerleridir.



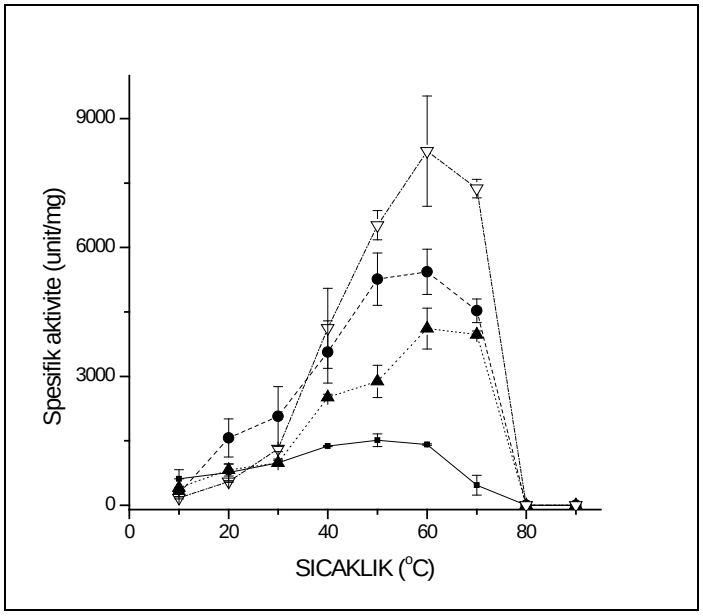


Şekil 3.8: Manganın yaban tip ve mutant lipazlar üzerine etkisi. a) NaCl yokluğunda, b) NaCl varlığında, yaban tip (■), M287P lipaz (●) ve D365A lipazın (▲) artan konsantrasyonlarda serbest Mn^{2+} iyonuna karşı spesifik aktivite grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda, artan konsantrasyonlarda Mn^{2+} eklenerek gerçekleştirilmiştir ve ortamdaki serbest Mn^{2+} iyon konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.7. Sıcaklığın Yaban Tip ve Mutant Lipazların Aktivitesine Etkisi

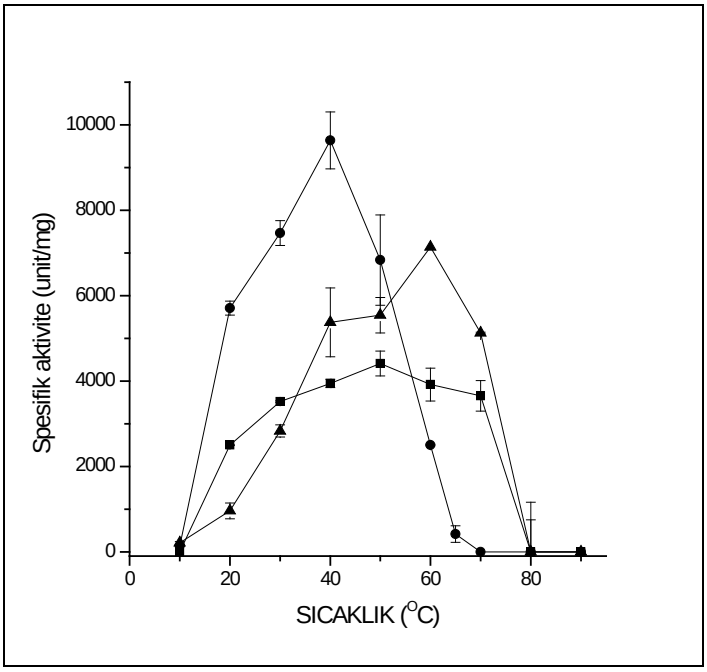
Kalsiyumun, *G. kaustophilus* lipazın optimum sıcaklığını ve aktivitesini arttrdığı Kübra Ekşiler'in tez çalışmasında ve literatürde yapılan bazı çalışmalarda belirtilmiştir [27, 35]. Kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekleştirdiğimiz mutasyonların, enzimin optimum sıcaklığı üzerine etkisini incelemek için; öncelikle yaban tip lipaz üzerine sıcaklık etkisini Ca^{2+} ve Mn^{2+} varlığında, ardından mutantlar üzerine sıcaklık etkisini Ca^{2+} iyonu varlığında inceledik.

Bölüm 3.5 ve 3.6'da, yaban tip lipaz için Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının doygunluk konsantrasyonları, NaCl yokluğunda, sırasıyla 10 ve 4 mM olarak bulundu (Şekil 3.7a ve 3.8a). Bu sebeple sıcaklık etkisinin inceleneceği Ca^{2+} ve Mn^{2+} konsantrasyonları 10 mM ve 4 mM olarak belirlendi. Şekil 3.9, yaban tip lipaz enzimi üzerine sıcaklık etkisini göstermektedir. Elde edilen grafiğe göre, 0.5 mM EDTA varlığında yaban tipin optimum sıcaklığı 40-60 °C arasındadır. Mangan, yaban tip lipaz aktivitesini 3-4 kat arttırırken, kalsiyum iyonu aktiviteyi 4-5 kat arttırmaktadır. Reaksiyon ortamına hem Ca^{2+} hem de Mn^{2+} iyonları eklendiğinde, aktivite 7-8 kat artış göstermektedir Yaban tip lipaz kalsiyum varlığında 50-70 °C sıcaklık aralığında; mangan varlığında 60-70 °C sıcaklık aralığında yüksek aktiviteye sahiptir (Şekil 3.9). Bu sonuçlar, özellikle kalsiyum olmak üzere, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının yaban tip lipazın aktivitesini ve optimum sıcaklığını arttırdığını göstermektedir. Yaban tip lipaz, metal varlığında veya yokluğunda, 80 °C'de aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Yaptığımız CD ölçümlerinde, yaban tip lipaz yapısının 70 °C'de bozulmaya başladığını ve 80 °C'de denatüre olduğunu gördük (Bölüm 3.9). CD çalışmaları 80 °C'de aktivitenin aniden düşüşünü doğrulamaktadır.



Şekil 3.9: Sıcaklığın yaban tip lipaz aktivitesi üzerine etkisi. Sadece EDTA (■), 10 mM Ca^{2+} (●), 4 mM Mn^{2+} (▲) ve 10 mM Ca^{2+} + 4 mM Mn^{2+} (Δ) metalleri varlığında sıcaklığa karşı elde edilen aktivite grafikleri. Ölçümler 0.5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponuna gösterilen konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve Mn^{2+} eklenerek gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 3.6 ve 3.7'de, yaban tip ve mutant lipazların artan Ca^{2+} konsantrasyonuna karşı, NaCl varlığında aktivitelerinin daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 3.7 ve 3.8). Elde edilen grafiklere göre mutantlar üzerine sıcaklık etkisinin inceleneceği Ca^{2+} konsantrasyonu, NaCl varlığında, 10 mM olarak belirlendi. 0.5 mM EDTA varlığında reaksiyonun ilk saniyelerinde görülen ani sıçramanın ardından enzim aktivitesi sıfırlanmaktadır. 0.5 mM EDTA varlığında enzim aktivitesi görülmediği için, sıcaklığa karşı aktivite grafiği çizilememiştir. Şekil 3.10, NaCl içeren tamponda kalsiyum varlığında sıcaklığın yaban tip ve mutant lipazlar üzerine etkisini göstermektedir. Yaban tip 30-70 °C arasında yüksek aktiviteye sahipken, M287P lipaz 30-50 °C sıcaklık aralığında ve D365A lipaz 50-70 °C sıcaklık aralığında yüksek aktiviteye sahiptir (Şekil 3.10). Bu sonuçlar, yaban tip lipazın aktivite gösterdiği geniş bir sıcaklık aralığına sahipken, M287P lipazın düşük sıcaklıklarda ve D365A lipazın yüksek sıcaklıklarda aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca yaban tipin NaCl varlığında yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının, NaCl yokluğunda yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığına göre daha geniş olduğu görülmektedir. Bölüm 3.5'te NaCl varlığında artan Ca^{2+} konsantrasyonuna karşı yapılan aktivite ölçümlerinde en yüksek aktiviteyi sırasıyla D365A lipaz, yaban tip lipaz ve M287P lipaz gösterirken (Şekil 3.7b), sıcaklığa karşı yapılan ölçümlerde, 50 °C'de, M287P lipazın diğerlerine göre aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 3.10). Bunun sebebi, enzimlerin birden fazla kullanımı ile aktivitelerinin azalması ve farklı zamanlarda gerçekleştirilen ölçümlerde enzim aktivitesinde farklı sonuçlar görülebilmesidir.



Şekil 3.10: Sıcaklığın yaban tip ve mutant lipaz aktiviteleri üzerine etkisi. 10 mM Ca^{2+} varlığında yaban tip (■), M287P-lipaz (●) ve D365A-lipazın (▲) sıcaklığa karşı elde edilen aktivite grafikleri. Ölçümler 1 mM EDTA, 130 Mm NaCl, 10 mM Ca^{2+} içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda gerçekleştirilmiştir.

3.8. Yaban Tip, M287P Lipaz ve D365A Lipazın Sıcaklık Karalılığı

G. kaustophilus lipaz termofilik bir enzim olup stabilitesini yüksek sıcaklıklarda koruyabilmektedir. Kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekleştirilen mutasyonların, lipazın termal stabilitesi üzerine etkisini incelemek için sıcaklık stabilite deneylerini gerçekleştirdik.

3.8.1. Yaban Tip Lipazın Sıcaklık Kararlılığı

Yaban tip lipaz için üç farklı sıcaklıkta (65-70-75 °C) stabilite deneyleri yapılarak yarı-ömür, $t_{1/2}$ (half-maximal value) hesaplandı. Yarı-ömür ($t_{1/2}$) , enzimin ilk andaki aktivitesinin yarısını kaybetmesi için geçen süredir.

Şekil 3.11, yaban tip lipazın 65, 70 ve 75 °C'deki sıcaklık stabilite grafiklerini göstermektedir. 65 °C'de sadece EDTA, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında stabilite deneyleri yapıldı. 60 dakika sonunda, 0.5 mM EDTA varlığında aktivitesinin %33'ünü korurken, 4 mM Mn^{2+} varlığında %40'ını ve 5 mM Ca^{2+} varlığında aktivitesinin %44'ünü korumaktadır. 90 dakika sonunda ise, 0.5 mM EDTA varlığında aktivitesinin %18'ini korurken, 4 mM Mn^{2+} varlığında %20'sini ve 5 mM Ca^{2+} varlığında aktivitesinin %40'ını korumaktadır (Şekil 3.11a). Aynı zamanda yaban tipin stabilitesinin incelendiği her ortamda yarı-ömrü,

$$\ln\left(\frac{At}{A0}\right) = -kt \tag{3.3a}$$

$$t\left(\frac{1}{2}\right) = ln2/k \tag{3.3b}$$

formülleri kullanılarak hesaplandı. Şekil 3.12a'da verilerin, eşitlik 3.3a'da verilen $\ln(A_t/A_0)$ formülüne dönüştürülmesiyle oluşturulan grafikler görülmektedir. A_t, t. zamandaki aktiviteyi; A_0, 0. dakikadaki aktiviteyi göreceli aktivite cinsinden (%) belirtmektedir. Her bir grafik lineer fit edilerek birinci dereceden hız sabiti (k değeri) belirlendi. Birinci dereceden hız sabiti, eşitlik 3.3b'de yerine yazıldığında elde edilen sonuç yarı ömrü ($t_{1/2}$) vermektedir. Yaban tip lipazın 65 °C'deki yarı ömürleri Tablo 3'de gösterilmiştir. 0.5 mM EDTA varlığında yaban tipin yarı ömrü 36 dk iken, Ca^{2+}

varlığında 61 dk ve Mn^{2+} varlığında 43 dakikadır (Tablo 3.3). Bu sonuçlar, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında lipazın yarı-ömrünün arttığını, özellikle kalsiyumun lipazın termal stabilitesine yüksek oranda katkı sağladığını göstermektedir.

65 ^{o}C'de yaban tip lipaz kararlı olduğu için, stabilitesi 75 ^{o}C'de de incelendi. Şekil 3.11c'de yaban tip lipazın 75 °C'deki sıcaklık stabilite grafiği görülmektedir. 75 °C'de stabilitesi sadece EDTA, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında incelendi. Sadece EDTA varlığında lipaz aktivitesini 10 dakikada, 4 mM Mn^{2+} varlığında 20 dakikada kaybetmektedir. 5-10 mM Ca^{2+} iyonu varlığında 90 dakika sonunda aktivitesinin %20'sini korumaktadır. 5 mM Ca^{2+}+4 mM Mn^{2+} iyonları varlığında 90 dakika sonunda aktivitesinin %10'unu korumaktadır (Şekil 3.11c). Yukarıda belirtildiği şekilde eşitlik 3.3a ve b'den yararlanılarak, Şekil 3.12c'deki grafikler elde edildi ve yarı-ömürler hesaplandı. Yaban tip lipazın 75 °C'de hesaplanan yarı-ömürleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Sadece EDTA varlığında aktivitesini çok kısa sürede kaybettiği için yarı-ömrü hesaplanamamıştır. 4 mM Mn^{2+} varlığında yaban tip lipazın yarı-ömrü, 3.5 dakikadır. Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında hesaplanan yarı-ömürleri hemen hemen aynı olup 5 mM Ca^{2+} varlığında 37 dk, 10 mM Ca^{2+} ve 5 mM Ca^{2+}+4 mM Mn^{2+} varlığında 31 dakikadır. Bu sonuca göre, manganın lipazın yarı-ömrünü az miktarda arttırırken kalsiyumun lipazın yarı-ömrünü önemli ölçüde arttırdığı ve yüksek sıcaklıklardaki stabilitesi için gerekli olduğu görülmektedir (Tablo 3.3). CD deney sonuçları da Ca^{2+} varlığında T_m değerinin, Mn^{2+} varlığındakine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Bölüm 3.9.1). Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının aynı bölgeye bağlandığı tahmin edilmektedir. Ancak bu iki metal iyonunun stabiliteye farklı etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir.

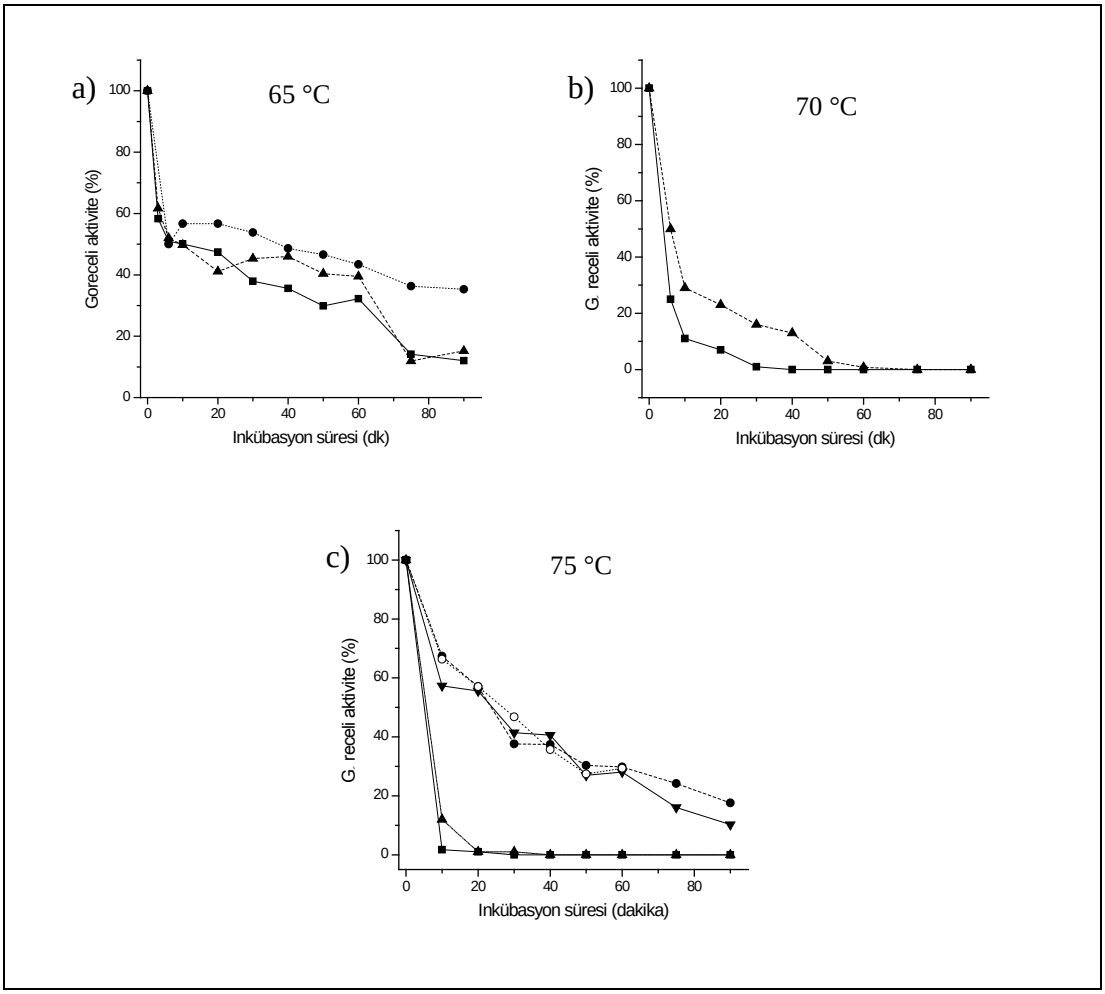
Mn^{2+}'ın tek başına 75 ^{o}C'de etkisi çok düşük olduğu için 70 ^{o}C'deki etkisini görmek istedik. Bunun için 70 °C'de sadece EDTA ve Mn^{2+} varlığında stabilite deneyleri gerçekleştirildi. 3.11b'de yaban tip lipazın 70 °C'deki sıcaklık stabilite grafiği görülmektedir. Yaban tip lipazın 70 °C'deki stabilitesi, 0.5 mM EDTA varlığında lipaz 10 dakikada aktivitesinin %90'ını ve 30 dakikada tamamını kaybetmektedir. 4 mM Mn^{2+} iyonu varlığında 10 dakikada lipaz aktivitesinin %75'ini ve 60 dakikada tamamını kaybetmektedir (Şekil 3.11b). Ayrıca yukarıda belirtildiği şekilde eşitlik 3.3a ve b'den yararlanılarak, Şekil 3.12b'deki grafikler elde edildi ve yarı-ömürler hesaplandı. Yaban tip lipazın 70 °C'de hesaplanan yarı-

ömürleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir. 0.5 mM EDTA varlığında yarı-ömrü 5.7 dk iken, 4 mM Mn^{2+} varlığında 10 dakikadır (Tablo 3.3).

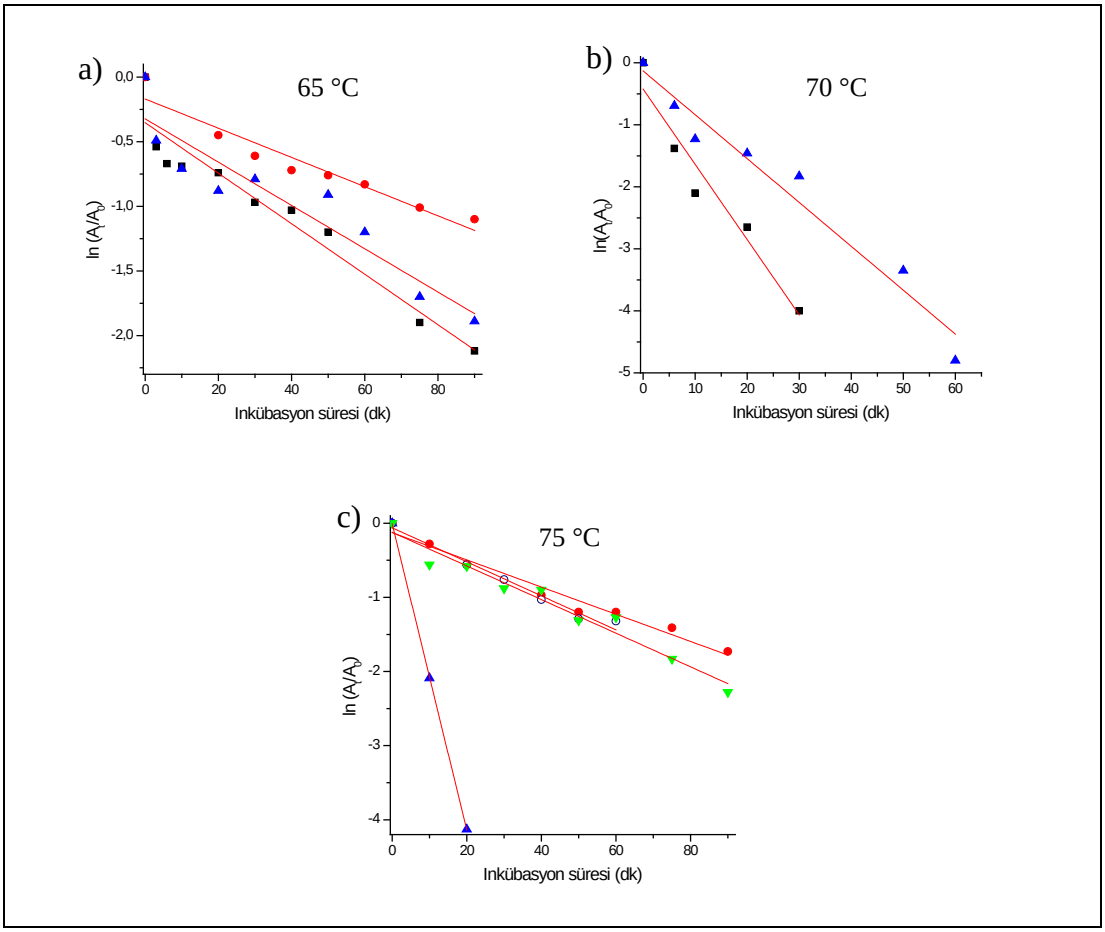
Tablo 3.3: Yaban tip lipazın yarı-ömür değerleri. Şekil 3.12'deki veriler lineer fit edilerek yarı ömürler hesaplanmıştır.

Lipaz tipi	**İnkübe edilen tampon ortamı**	**Yarı ömür ($t_{1/2}$) (dk)**		
		İnkübasyon Sıcaklığı (°C)		
		65 °C	70 °C	75 °C
Yaban tip Lipaz	EDTA alone	36	5.7	< 2*
	5 mM Ca^{2+}	61	-	37
	10 mM Ca^{2+}	-	-	31
	4 mM Mn^{2+}	43	10	3.5
	5 mM Ca^{2+} + 4 mM Mn^{2+}	-	-	31

***** 75 °C'de aktivitesini çok kısa sürede kaybettiği ve yeterli sayıda ölçüm alınamadığı için bu sıcaklıktaki yarı ömür hesabı için lineer grafik çizilememiştir.



Şekil 3.11: Yaban tip lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen kararlılık grafikleri. a) 65 °C, b) 70 °C, c) 75 °C'de; 0.5 mM EDTA (■), 5 mM Ca^{2+} (●), 10 mM Ca^{2+} (○), 4 mM Mn^{2+} (▲) ve 5 mM Ca^{2+} + 4 mM Mn^{2+} (▼) varlığında zamana karşı elde edilen göreceli aktivite grafikleri. 75 °C'de inkübe edilen örnekler belirtilen zamanlarda alınıp 15 dk oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonra aktivite 50 °C'de 0.5 mM EDTA, 5 mM Ca^{2+}, 4 mM Mn^{2+} içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda ölçüldü.



Şekil 3.12: Yaban tip lipazın lineer grafiğe dönüştürülmesiyle elde edilen kararlılık grafikleri. a) 65 °C, b) 70 °C, c) 75 °C'de; 0.5 mM EDTA (■), 5 mM Ca^{2+} (●), 10 mM Ca^{2+} (○), 4 mM Mn^{2+} (▲) ve 5 mM Ca^{2+} + 4 mM Mn^{2+} (▼) varlığında elde edilen grafikler lineer fit edilerek birinci dereceden hız sabiti, *k değeri* bulundu. Hız sabiti, $t_{1/2}$= ln2/k formülünde yerine yazılarak yarı-ömürler hesaplandı.

3.8.2. M287P ve D365A Mutant Lipazların Sıcaklık Kararlılığı

Kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekleştirdiğimiz mutasyonların, lipazın stabilitesine etkisini görmek için, Ca^{2+} varlığında ve yokluğunda sıcaklık stabilite deneylerini gerçekleştirdik ve mutantların yarı ömürlerini belirledik.

M287P ve D365A mutant lipazların sıcaklık stabilitesi Şekil 3.13'de görülmektedir. Bölüm 3.7'de M287P lipazın 70 °C'de aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Bölüm 3.7, Şekil 3.10). Bu sebeple M287P lipazın stabilitesi 60 °C'de incelendi. Şekil 3.13a'da M287P lipazın EDTA ve Ca^{2+} varlığında elde edilen sıcaklık stabilite grafiği görülmektedir. Bu sonuca göre, M287P mutant sadece EDTA varlığında 90 dakika sonunda aktivitesini %35 korurken, Ca^{2+} varlığında aktivitesinin %12'sini korumaktadır (Şekil 3.13a). Ayrıca M287P lipazın yarı-ömrünün belirlenmesi için, eşitlik 3.3a ve b'de verilen formüllerden (Bölüm 3.8.1) yararlanılarak Şekil 3.14a'da görülen grafikler çizildi ve yarı-ömürler hesaplandı. M287P lipazın 60 °C'de yarı-ömürleri Tablo 3.4'de gösterilmiştir. Sadece EDTA varlığında M287P lipazın yarı-ömrü 63 dk iken, Ca^{2+} varlığında 30 dakikadır. Bu sonuçlara göre, M287P mutantın stabilitesinin yaban tipe göre daha düşük olduğu ve kalsiyumun M287P mutantın stabilitesini azalttığı görülmektedir (Tablo 3.4).

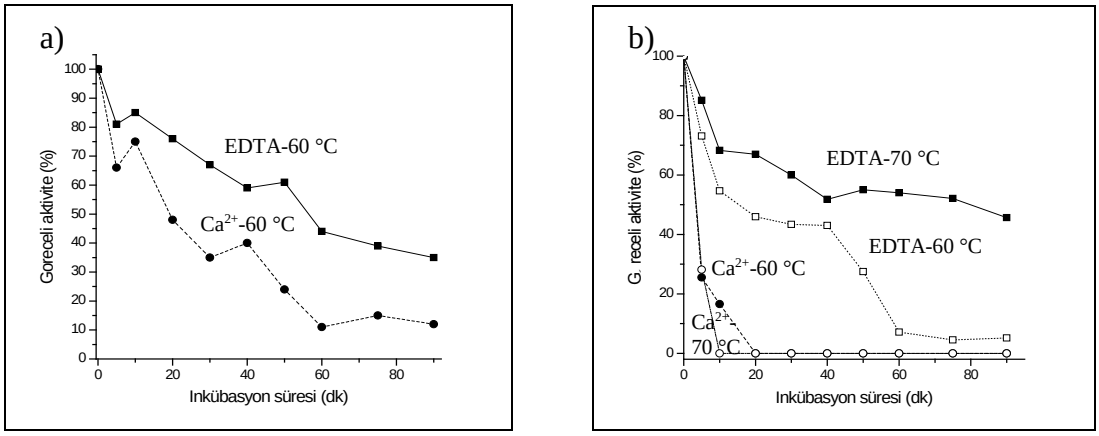
Bölüm 3.7'de D365A lipazın 60 ve 70 °C'de yüksek aktivite gösterdiği, 80 °C'de ise aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir. Bu sebeple D365A lipaz için sıcaklık stabilite deneyleri 60 °C ve 70 °C'de gerçekleştirildi. D365A lipazın sıcaklık stabilitesi Şekil 3.13b'de görülmektedir. Elde edilen grafiğe göre, 60 °C'de, sadece EDTA varlığında 90 dakika sonunda 40% aktivitesini korurken, 10 mM Ca^{2+} iyonu varlığında 20 dakikada aktivitesini kaybetmektedir. 70 °C'de ise sadece EDTA varlığında 60 dakikada, 10 mM Ca^{2+} varlığında ise 10 dakikada aktivitesini kaybetmektedir (Şekil 3.13b). D365A lipaz için, veriler eşitlik 3.3a ve b'de verilen formüllere göre (Bölüm 3.8.1) çizilerek Şekil 3.14b'deki grafikler elde edildi ve yarı-ömürler hesaplandı. D365A lipazın 60 ve 70 °C'de yarı-ömürleri Tablo 3.4'de gösterilmiştir. 60 °C'de sadece EDTA varlığında yarı-ömrü 85 dk ve Ca^{2+} varlığında 3.7 dk iken, 70 °C'de sadece EDTA varlığında 18.2 dk ve Ca^{2+} varlığında 1.7 dakikadır (Tablo 3.4). Bu sonuçlar, kalsiyumun hem M287P hem de D365A mutant lipazları destabilize ettiğini göstermektedir. Kalsiyum bu mutantların aktivitesini

arttırmakta, ancak termal stabilitesini de düşürmektedir. Bunun nedeni mekanistik olarak henüz bilinmemektedir.

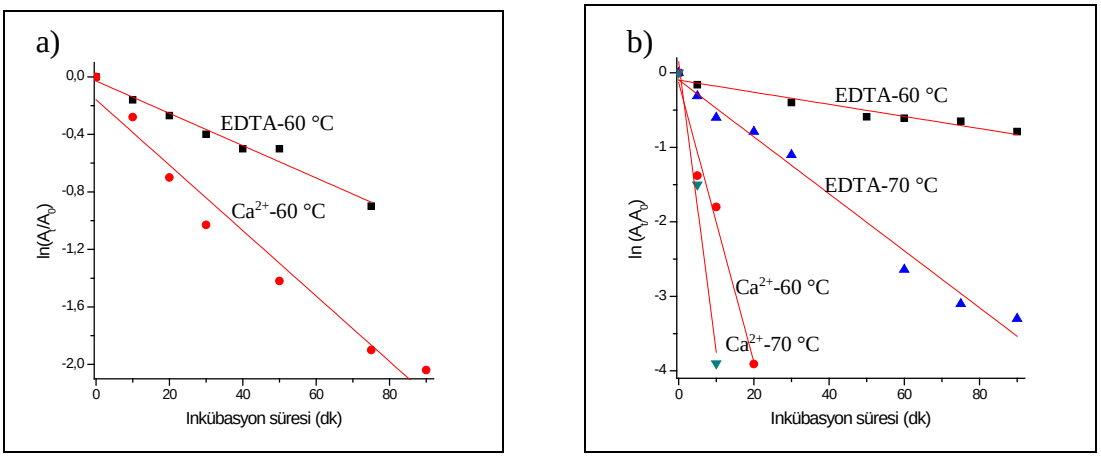
Tablo 3.4: Mutant lipazların yarı-ömür değerleri. Şekil 3.14'deki veriler lineer fit edilerek yarı ömürler hesaplanmıştır.

Lipaz tipi	**İnkübe edilen tampon ortamı**	**Yarı ömür ($t_{1/2}$) (dk)**	
		İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	
		60 °C	70 °C
M287P mutant	EDTA alone	63	-
	10 mM Ca^{2+}	31	-
D365A mutant	EDTA alone	85	18
	10 mM Ca^{2+}	3.7	1.7

***** 70 °C'de M287P lipaz aktivite göstermediği için sıcaklık stabilite deneyleri yapılamamıştır.



Şekil 3.13: Mutant lipazların farklı sıcaklıklarda elde edilen kararlılık grafikleri. a) M287P lipazın 60 °C'de, b) D365A lipazın 60 °C ile 70 °C'de sıcaklık stabilite grafikleri. 60 °C'de sadece EDTA (■) ve 10 mM Ca^{2+} (●), 70 °C'de sadece EDTA (□) ve 10 mM Ca^{2+} (○) içeren tamponda inkübe edilen örnekler belirtilen zamanlarda alınıp 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra aktivite 50 °C'de 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda ölçüldü.



Şekil 3.14: Mutant lipazların lineer grafiğe dönüştürülmesiyle elde edilen kararlılık grafikleri. a) M287P lipazın 60 °C'de, b) D365A lipazın 60 °C ile 70 °C'de elde edilen grafikleri. 60 °C'de sadece EDTA (■) ve 10 mM Ca^{2+} (●), 70 °C'de sadece EDTA (▲) ve 10 mM Ca^{2+} (▼) varlığında elde edilen grafikler lineer fit edilerek birinci dereceden hız sabiti, *k değeri* bulundu. Hız sabiti, $t_{1/2}$= ln2/k formülünde yerine yazılarak yarı ömürler hesaplandı.

3.9. Yaban Tip, M287P ve D365A Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının Sirküler Dikroizm ile İncelenmesi

Sirküler Dikroizm spektroskopisi, proteinlerin omurga konformasyonunun far-UV ve near-UV bölgesinde absorblanması esasına dayanan bir uygulamadır (65). CD ölçümleri çoğunlukla helikal yapılar, β-sheet yapıları ve proteinin düzensiz konformasyonları arasındaki dengenin takibini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (66). CD spektroskopisi ile proteinlerin sekonder yapıları hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Tez çalışmamızda, kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekletirdiğimiz mutasyonların, lipazın ikincil yapısına ve termal kararlılığına etkisini Sirküler Dikroizm Spektroskopisi ile analiz ettik. Öncelikle yaban tip ve mutantların belirli sıcaklıklar arasında 200-250 nm dalgaboylarında spektrumları alındı, ardından termal denatürasyon deneyleri ile T_m değerleri belirlendi.

$$(fu) = ([\theta 222] - [\theta N])/([\theta U] - [\theta N]) \tag{3.4}$$

Termal denatürasyon deneyleri ile molar eliptisite cinsinden elde edilen veriler eşitlik 3.4'deki formülde yerine yazılarak denatürasyon oranı (f_U) ve aynı zamanda HT(V) grafikleri çizildi. θ_N, doğal halin molar eliptisitisi; θ_U, ise denatüre halin eliptisitidir. Denatürasyon oranı (f_u), ikincil (sekonder) yapıdaki değişimlerin takibini sağlarken, Dynode voltage (HT(V)) grafiği proteinin agregasyonunu göstermektedir. Veriler, BiDoseResp denklemine fit edilerek yaban tip ve mutantların T_m değerleri belirlendi. T_m değeri, ortamda bulunan enzimlerin, %50'sinin doğal, %50'sinin ise denatüre halde bulunduğu sıcaklıktır. Termal denatürasyon deneyleri ile aynı zamanda belli sıcaklıklarda 200-250 nm dalgaboyları arasında CD spektrumları ölçüldü. Ayrıca, Kübra Ekşiler'in tez çalışmasında yaban tip lipazın termal kararlılığının NaCl varlığında incelenmesi [27] ve bu çalışmada NaCl'ün lipaz aktivite ve stabilitesi üzerine etkisinin incelenmesi sebebiyle (Bölüm 3.5 ve 3.6), CD ölçümleri mutantlar için NaCl varlığında da gerçekleştirildi.

3.9.1. Yaban Tip Lipazın İkincil Yapısının İncelenmesi

Yaban tip lipazın termal kararlılığı sadece EDTA, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında incelendi. Şekil 3.15a, yaban tip lipazın sadece EDTA varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. CD spektrumlarına göre, ikincil (α-helikal) yapı 60 °C'de bozulmaya başlamakta, özellikle 70 °C'de ve sıcaklık arttıkça denatürasyona gitmektedir. Şekil 3.15'teki denatürasyon eğrileri eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine (Bölüm 3.5) fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır. Yaban tipin T_m değerleri Tablo 3.5'de görülmektedir. Sangeeta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HT(V) grafiği ile T_m değerinin belirlenmesinin daha doğru olduğu rapor edilmiştir [88]. Yaban tip lipazın metaller varlığında T_m değeri denatürasyon oranı grafiğine bakılarak hesaplanırken, sadece EDTA varlığındaki T_m değeri, düşük sıcaklıkta yapının kısmi korunmasına rağmen aniden agregasyona gitmesinden dolayı HT(V) grafiği ile belirlenmiştir. Yaban tip lipazın sadece EDTA varlığında T_m değeri 70 °C'dir (Tablo 3.5). HT grafiği de, proteinin 70 °C'de agregasyona gittiğini göstermektedir. Yani denatürasyon ve agregasyon aynı zamanda gerçekleşmektedir (Şekil 3.15a). Sadece EDTA varlığında yaban tip lipaz oldukça küçük taneli çökelti oluşturmaktadır. Denatürasyon ölçümleriyle beraber aynı zamanda belli sıcaklıklarda yapılan CD spektrumları Şekil 3.16a'da görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 60 °C'de bozulmaya başlamaktadır. Artan sıcaklıklığa karşı yaban tip denatüre olmaktadır. 90 °C'de yapının neredeyse tamamı bozulmuştur (Şekil 3.16a).

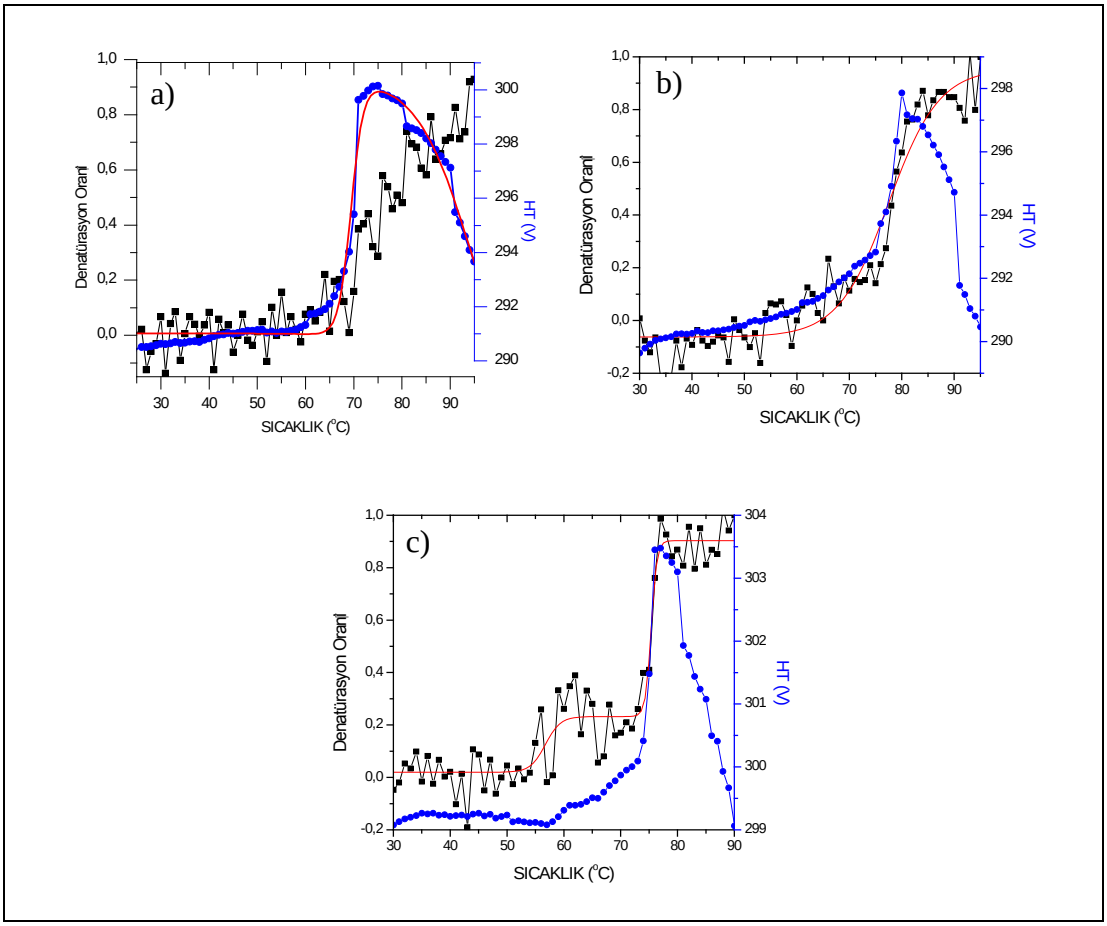
Şekil 3.15b, yaban tip lipazın Ca^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. Bu sonuç, 60 °C'de yapının bozulmaya başladığını ve 75 °C'de hızla denatürasyona gittiğini göstermektedir. Yaban tip lipazın kalsiyum varlığında hesaplanan T_m değeri 77.5 °C'dir (Tablo 3.5). Sadece EDTA varlığında görülen yavaş bozulmanın aksine, kalsiyum varlığında keskin bir denatürasyon eğrisi görülmektedir. HT grafiği, yaban tipin 78 °C'de agregasyona uğradığını göstermektedir. Oluşan agregat çözünür değildir (*insoluble agregate*), protein çökmektedir (Şekil 3.15b). Kalsiyum varlığında agregasyon oluşturma, sadece EDTA varlığında görülenin aksine, düşük sıcaklarda başlamakta ve yavaş gerçekleşmektedir. Yaban tip lipazın kalsiyum varlığında elde edilen CD spektrumları Şekil 3.16b'de görülmektedir. Elde edilen sonuca göre, 60 °C'de bozulmaya başlayan yapı 75 °C'de yüksek oranda korunurken, 80 °C'de denatüre

olmuştur (Şekil 3.16b). Bu sonuçlar kalsiyumun yaban tip lipazın termal kararlılığını arttırdığını göstermektedir.

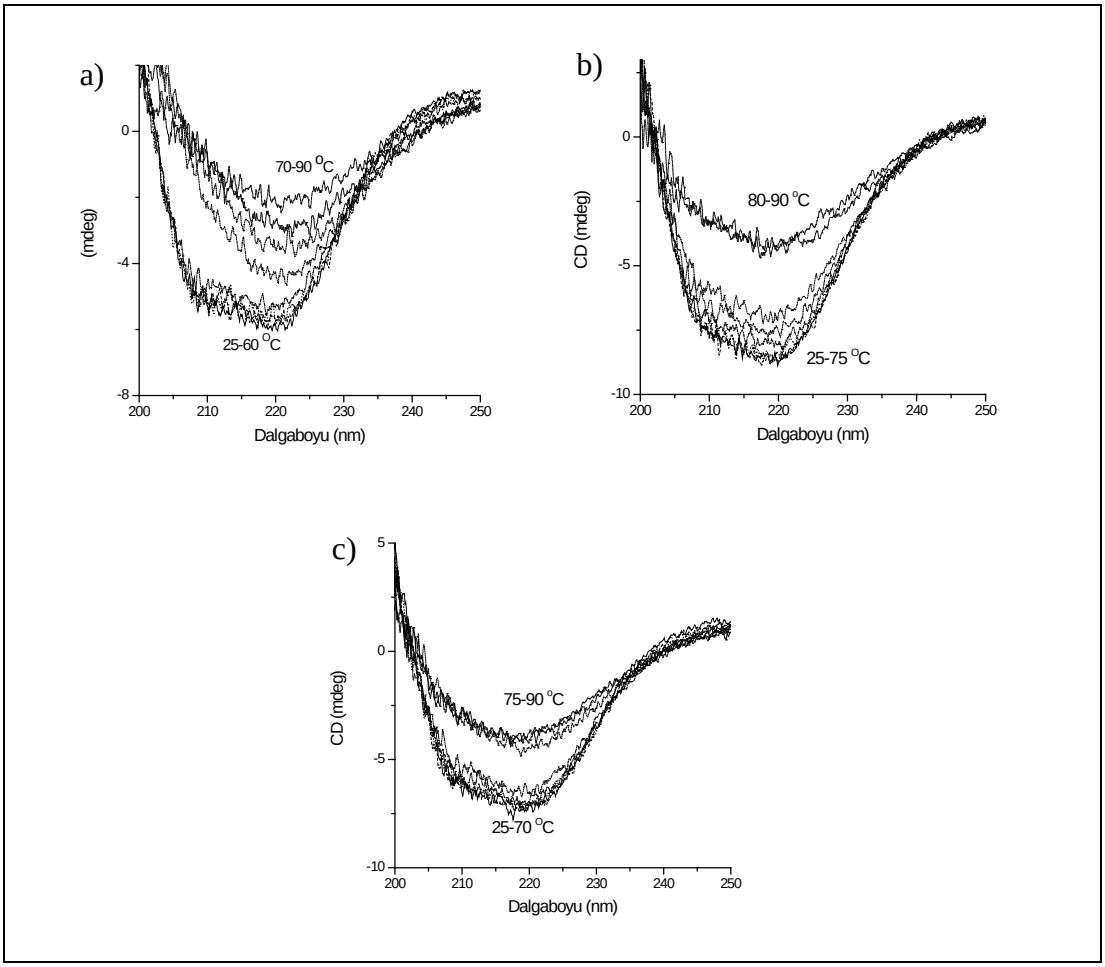
Yaban tip lipazın Mn^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiği Şekil 3.15c'de görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 60 °C'de bozulmaya başlamaktadır ve 75 °C'de denatürasyona gitmiştir. Yaban tip lipazın mangan varlığında hesaplanan T_m değeri 75.3 °C'dir (Tablo 3.5). HT grafiği de, proteinin 75 °C'de agregasyona gittiğini göstermektedir (Şekil 3.15c). Kalsiyum gibi, mangan varlığında da proteinin denatürasyonunun ani olması, sadece EDTA ile metal varlığındaki denatürasyon ve agregasyon davranışlarının faklı olduğunu göstermektedir. Şekil 3.16c, mangan varlığında elde edilen CD spektrumları göstermektedir. Bu sonuca göre yapı 70 °C'de yüksek oranda korunurken, 75 °C'de denatüre olmuştur (Şekil 3.16c).

Tablo 3.5: Yaban tip lipazın T_m değerleri. Şekil 3.15'deki denatürasyon eğrileri eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır.

Lipaz Tipi	**Tampon Ortamı**	**T_m Değeri (°C)**
Yaban tip	EDTA alone	70.2 ± 1.16
	Ca^{2+}	77.5 ± 0.79
	Mn^{2+}	75.3 ± 0.24



Şekil 3.15: Yaban tip lipazın termal denatürasyon grafiği. a) Sadece EDTA, b) Ca^{2+}, c) Mn^{2+} varlığında 30-90 °C arasında 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle molar eliptisite cinsinden elde edilen denatürasyon oranı (■) ve HT (●) grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.16: Yaban tip lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Spektrumlar a) sadece EDTA, b) Ca^{2+}, c) Mn^{2+} varlığında 200-250 nm dalgaboyu arasında alınmıştır. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. M287P Lipazın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, İkincil Yapısının İncelenmesi

Şekil 3.18a, M287P lipazın sadece EDTA varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. Bu sonuca göre, ikincil (*a*-helikal) yapı 60 °C'de bozulmaya başlamaktadır, 70 °C'de kısmi denatürasyona gitmektedir. Yani yapı sadece EDTA varlığında yüksek oranda korunmaktadır. Şekil 3.17'deki grafikler eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine (Bölüm 3.9.1) fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır. M287P lipaz için hesaplanan T_m değerleri Tablo 3.6'da görülmektedir. M287P lipazın metaller ve NaCl varlığında T_m değeri denatürasyon oranı grafiğinden hesaplanırken, sadece EDTA varlığındaki T_m değeri yaban tipi gibi HT grafiğine bakılarak belirlenmiştir ve 70 °C'dir (Tablo 3.6). HT grafiği, proteinin 70 °C'de agregasyona gittiğini göstermektedir. Sadece EDTA varlığında oluşan agregat çözünürdür (*soluble agregate*) (Şekil 3.18a). Denatürasyon ölçümleriyle beraber aynı zamanda belli sıcaklıklarda alınan CD spektrumları Şekil 3.18b'de görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 60 °C'de bozulmaya başlamıştır ve 70-80 °C'de kısmi olarak denatüre olmuştur (Şekil 3.18b).

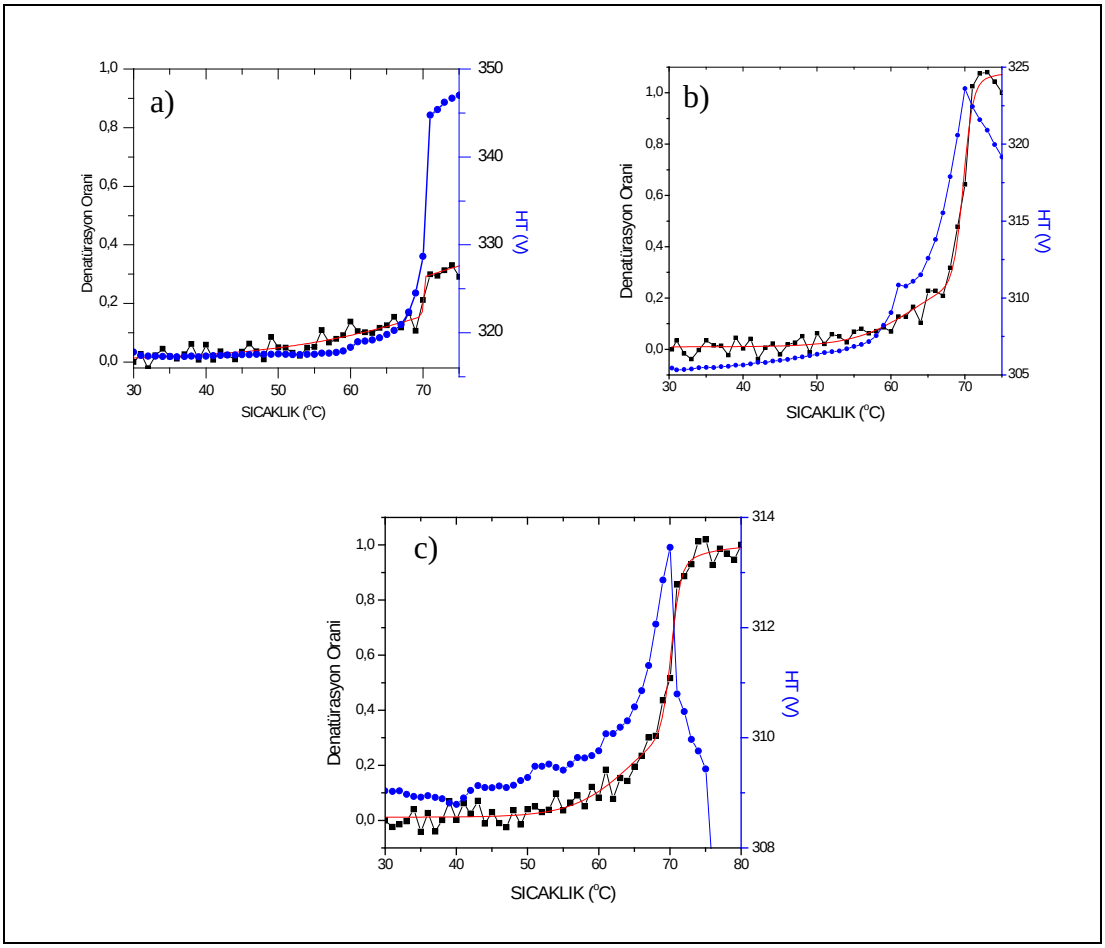
Şekil 3.19a, M287P lipazın Ca^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. Bu sonuç yapının, 68 °C'de bozulmaya başladığını göstermektedir. M287P mutantın kalsiyum varlığında T_m değeri 69.7 °C'dir (Tablo 3.6). HT grafiği de, proteinin 60 °C'de agrege olmaya başladığını ve 70 °C'de tamamen agrege olup çöktüğünü göstermektedir. M287P lipazın kalsiyum varlığında agregasyon eğilimi, yaban tipi gibi artmaktadır. Kalsiyum varlığında agregasyon oluşturmaya düşük sıcaklıkta, 60 °C'de, başlamaktadır. Oluşan agregat çözünür değildir, protein çökmektedir (Şekil 3.19a). M287P lipazın kalsiyum varlığında elde edilen CD spektrumları Şekil 3.19b'de görülmektedir. Elde edilen sonuca göre, 60 °C'de bozulmaya başlayan helikal yapı 70 °C'de yüksek oranda, 75 °C'de ise tamamen denatüre olmuştur (Şekil 3.19b). Bu sonuç, kalsiyumun M287P lipazın termal stabilitesine etki etmediğini göstermektedir.

M287P lipazın Mn^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiği Şekil 3.20a'da görülmektedir. Elde edilen sonuca göre, helikal yapı 65 °C'de bozulmaya başlamaktadır ve 70 °C'de agregasyona gitmektedir. M287P lipazın mangan varlığında T_m değeri 70 °C'dir (Tablo 3.6). HT grafiği de, M287P lipazın 70 °C'de agregasyona gittiğini göstermektedir. Mangan varlığında görülen agregasyon,

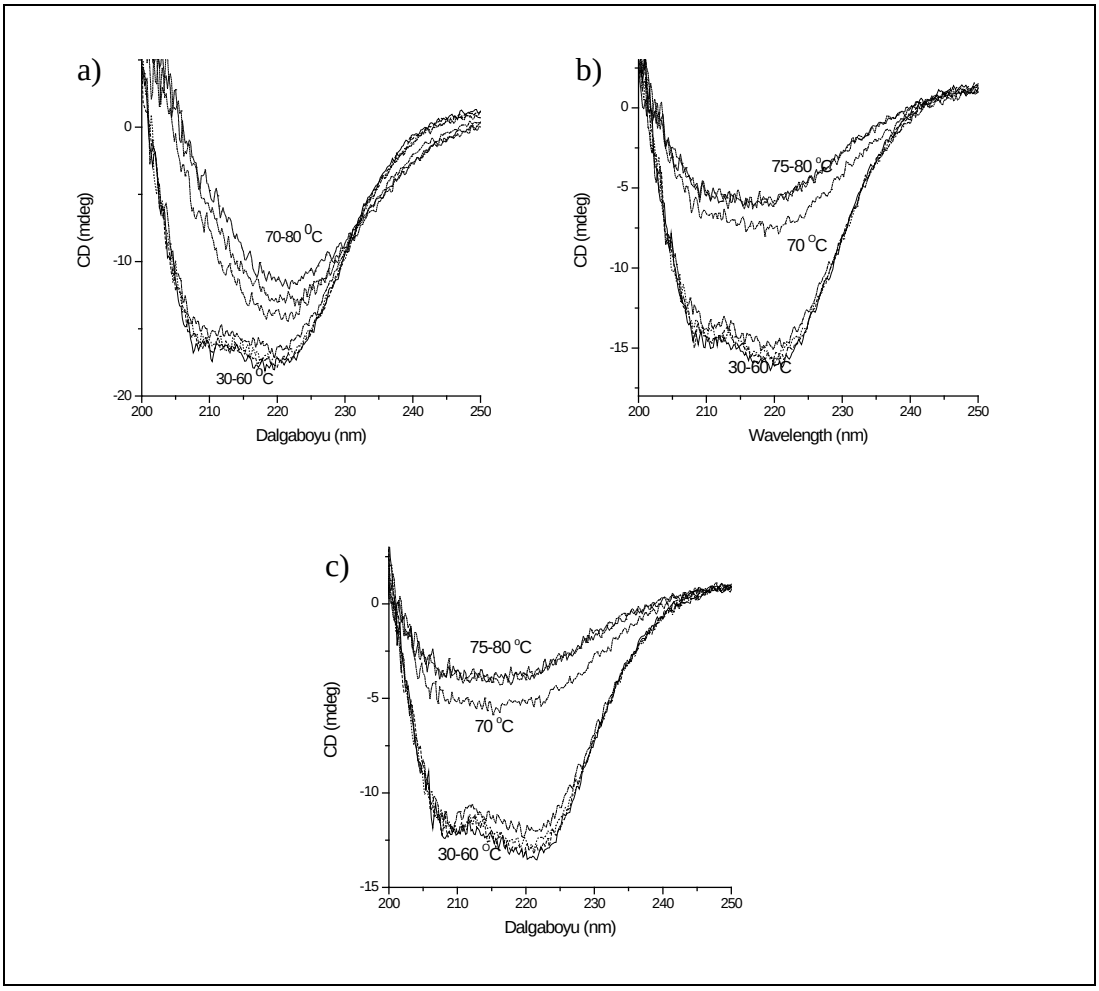
kalsiyuma benzer şekilde düşük sıcaklıkta, 60 °C'de başlamaktadır. Oluşan agregat çözünür değildir ve protein çökmektedir (Şekil 3.20a). M287P lipazın mangan varlığında elde edilen CD spektrumları, Şekil 3.20b'de görüldüğü gibi, kalsiyum varlığında elde edilen ölçümlerle hemen hemen aynıdır. 60 °C'de bozulmaya başlayan helikal yapı 70 °C'de yüksek oranda, 75 °C'de ise tamamen denatüre olmuştur (Şekil 3.20b).

Tablo 3.6: M287P lipazın T_m değerleri. Şekil 3.17 ve Şekil 3.19'daki denatürasyon eğrileri eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır.

Lipaz Tipi	**Tampon Ortamı**	**T_m Değeri (°C)**	
		NaCl Yokluğunda	**NaCl Varlığında**
M287P mutant	EDTA alone	70.0 ± 0.33	68.8 ± 0.12
	Ca^{2+}	69.7 ± 0.11	67.4 ± 0.19
	Mn^{2+}	69.1 ± 0.25	



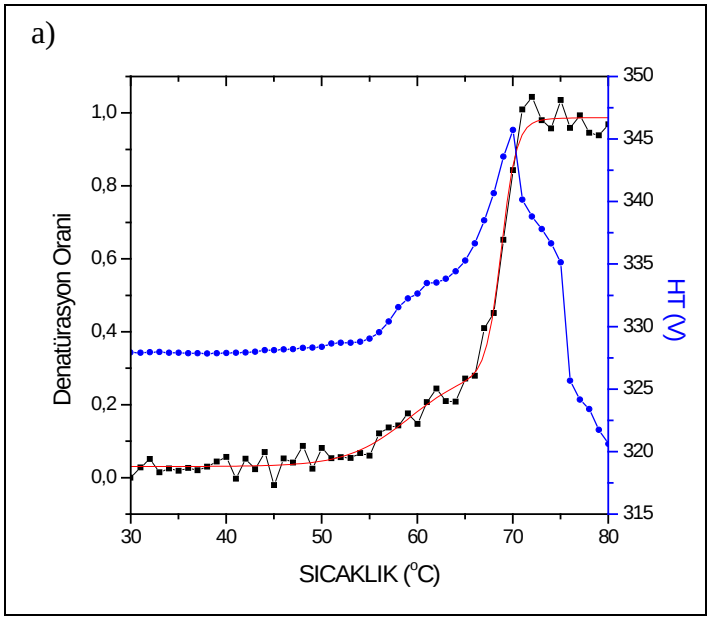
Şekil 3.17: M287P lipazın termal denatürasyon grafiği. a) Sadece EDTA, b) Ca^{2+}, c) Mn^{2+} varlığında 30-80 °C arasında 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

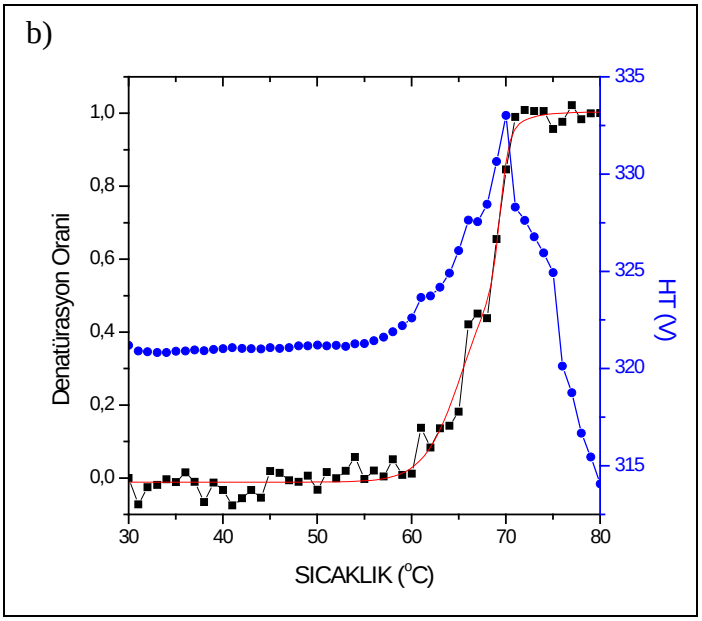


Şekil 3.18: M287P lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Spektrumlar a) sadece EDTA, b) Ca^{2+}, c) Mn^{2+} varlığında 200-250 nm dalgaboyu arasında alınmıştır. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

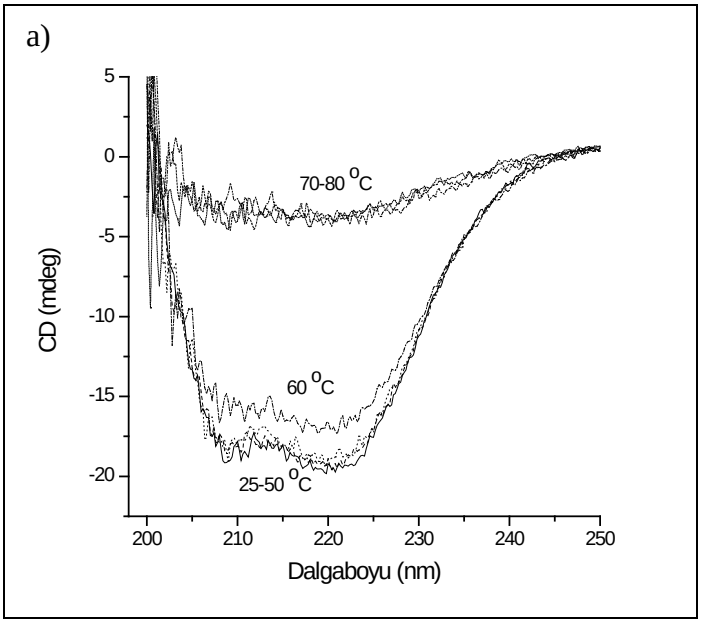
M287P lipazın NaCl içeren tamponda, sadece EDTA varlığında termal denatürasyon grafiği Şekil 3.19a'da görülmektedir. CD spektrumlarına göre, 55 °C'de bozulmaya başlayan yapı 67 °C'de denatürasyona gitmiştir. Şekil 3.19'daki grafikler eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine (Bölüm 3.9.1) fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır. M287P mutantın NaCl içeren tamponda sadece EDTA varlığında T_m değeri 68.8 °C'dir (Tablo 3.6). NaCl varlığında T_m değeri düşmüştür. HT grafiği, proteinin iki aşamalı agregasyonunu göstermektedir. 55 °C ile 60 °C arasında agregasyonunu ilk aşaması görülürken, 62 °C ile 69 °C arasında ikinci agregasyon aşaması gerçekleşmektedir. Oluşan agregat çözünür değildir, yani protein çökmektedir (*insoluble*) (Şekil 3.19a). NaCl varlığında agregasyon oluşumu, kalsiyum varlığında görülene benzer şekilde, düşük sıcaklıkta başlamaktadır. Bu sonuç, NaCl'ün enzimin agregasyon oluşturma eğilimini arttırdığını göstermektedir. M287P lipazın NaCl içeren tamponda, sadece EDTA varlığında elde edilen CD spektrumları Şekil 3.20a'da görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 60 °C'de yüksek oranda korunurken, 70 °C'de denatüre olmuştur (Şekil 3.20a). Bu sonuçlar NaCl'ün, mutantın termal kararlılığını azalttığını ve agregasyonu arttırdığını göstermektedir.

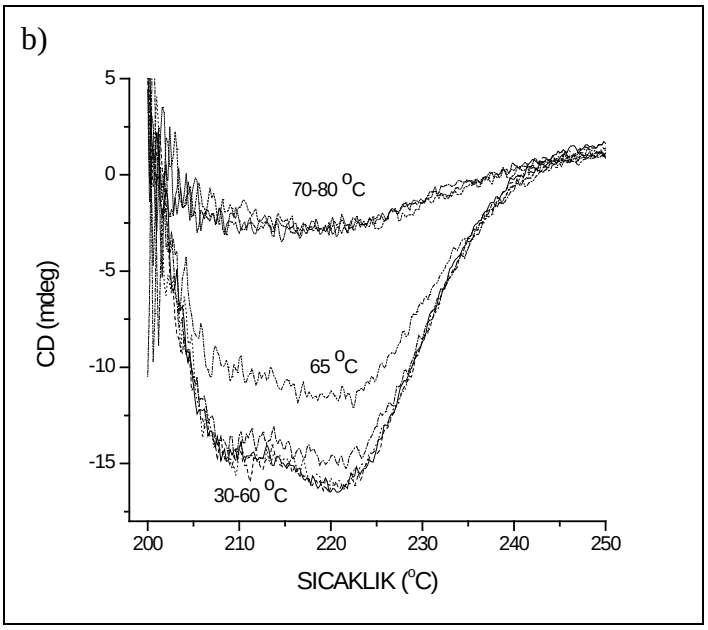
Şekil 3.19b, M287P lipazın NaCl içeren tamponda Ca^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. Elde edilen CD spektrumları, yapının 60 °C'de bozulmaya başladığını ve 67 °C'de denatürasyona gittiğini göstermektedir. M287P mutantın NaCl içeren tamponda kalsiyum varlığında T_m değeri 69.3 °C'dir (Tablo 3.6). HT grafiği de, proteinin 70 °C'de agrege olduğunu ve çöktüğünü göstermektedir (Şekil 3.19b). Agregasyon 60 °C'de başlamıştır ve NaCl içeren tamponda sadece EDTA varlığında görülene benzer şekilde iki aşamalıdır. 60 °C ile 65 °C arasında agregasyonunu ilk aşaması görülürken, 67 °C ile 69 °C arasında ikinci agregasyon aşaması gerçekleşmektedir. M287P lipazın NaCl içeren tamponda kalsiyum varlığında elde edilen CD spektrumları Şekil 3.20b'de görülmektedir. Bu sonuca göre 60 °C'de bozulmaya başlayan yapı 65 °C'de kısmi olarak korunurken, 70 °C'de tamamen denatüre olmuştur (Şekil 3.20b). Bu sonuçlar, NaCl'ün M287P lipazın termal kararlılığını kalsiyum varlığında da azalttığını göstermektedir.





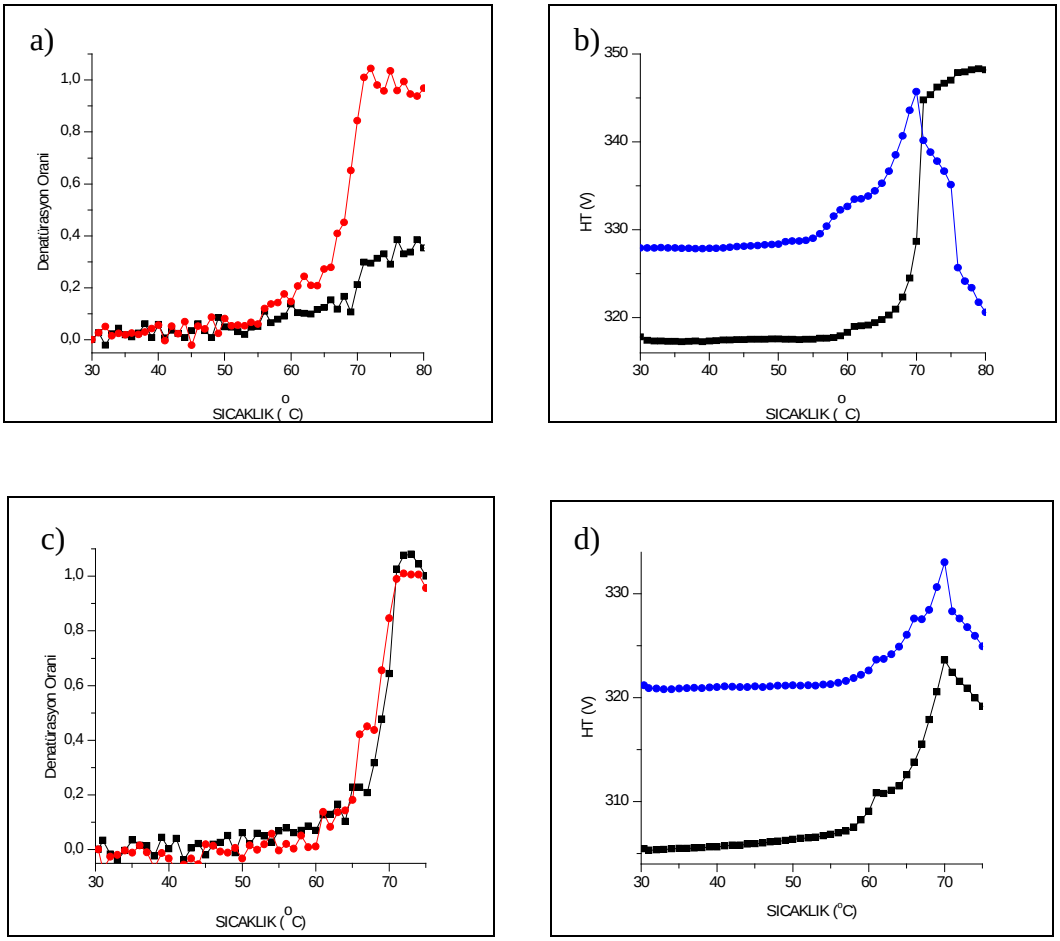
Şekil 3.19: M287P lipazın NaCl varlığında termal denatürasyon grafiği. a) Sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 30-80 °C arasında 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.





Şekil 3.20: M287P lipazın NaCl varlığında farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Spektrumlar a) sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 200-250 nm dalgaboyu arasında alınmıştır. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.21, M287P lipazın, NaCl içeren ve içermeyen tampon ortamında elde edilen termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Şekil 3.21a ve b'de, sadece EDTA varlığında, NaCl yokluğunda yapının kısmi denatüre olduğu ve yüksek oranda korunduğu görülmektedir. HT grafiği de 70 °C'de aniden agregasyona uğradığını göstermektedir, oluşan agregat çözünürdür (soluble). NaCl varlığında da, 70 °C'de tamamen agregasyona uğramıştır, fakat oluşan agregat çözünür değildir (insoluble), protein çökmüştür. NaCl varlığında agregasyon yüksek oranda, NaCl yokluğunda görülenden farklı olarak, düşük sıcaklıkta, 55 °C'de, başlamaktadır (Şekil 3.21a ve b). Bu sonuçlar, NaCl'ün M287P mutantın termal kararlılığını azalttığını göstermektedir. 3.21c ve d'de ise kalsiyum varlığında elde termal denatürasyon grafikleri görülmektedir. Hem NaCl varlığında hem de yokluğunda, M287P lipaz 70 °C'de denatüre olmaktadır. HT grafiği de mutantın her iki durumda, 60 °C'de agregasyonun başladığını ve 70 °C'de çöktüğünü göstermektedir. (Şekil 3.21c ve d). Kalsiyum varlığında hem NaCl içeren hem de içermeyen tampon ortamında agregasyon, iki aşamalı gerçekleşmektedir.



Şekil 3.21: M287P lipazın NaCl varlığında ve yokluğunda termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılması. Sadece EDTA varlığında a) denatürasyon oranı garfiği, b) HT grafiği; Ca^{2+} varlığında c) denatürasyon oranı grafiği, d) HT grafiği. NaCl içermeyen (■) ve içeren (●) tamponda 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafikleri. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

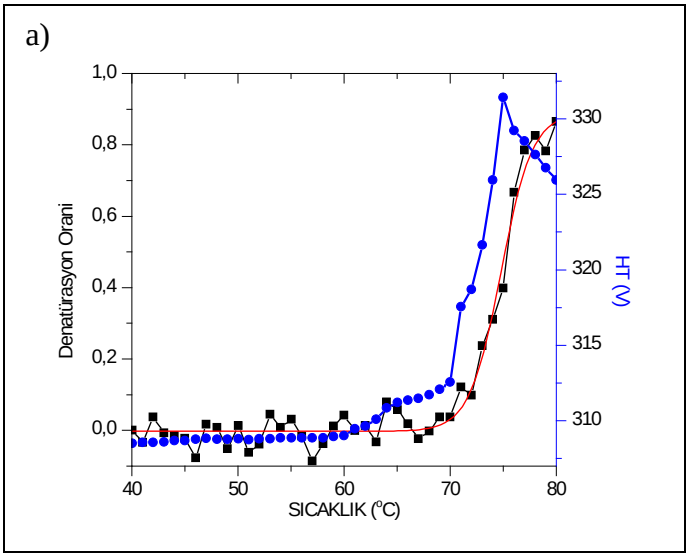
3.9.3. D365A Lipazın, NaCl Varlığında ve Yokluğunda, İkincil Yapısının İncelenmesi

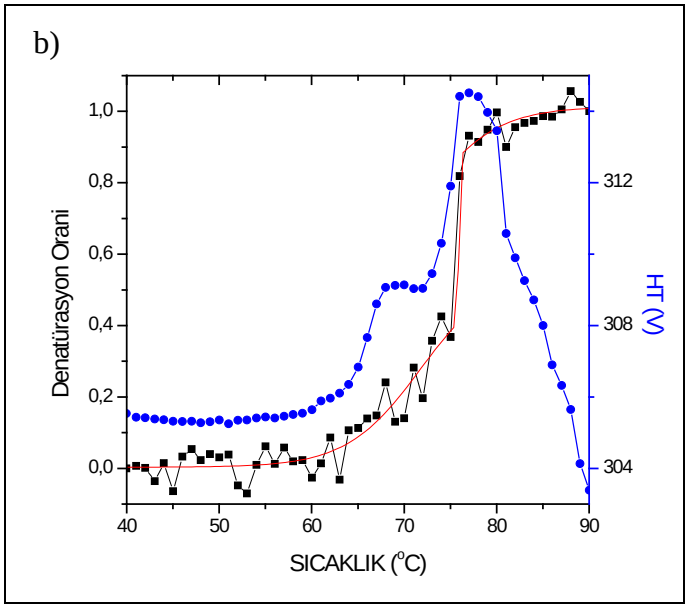
D365A lipazın sadece EDTA varlığında termal denatürasyon grafiği Şekil 3.22a'da görülmektedir. Bu sonuca göre, D365A lipaz yaklaşık 75 °C'de denatürasyona gitmektedir. Şekil 3.22'deki grafikler eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine (Bölüm 3.9.1) fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır. D365A lipazın T_m değerleri Tablo 3.7'de görülmektedir. D365A lipazın sadece EDTA varlığında T_m değeri 74.7 °C'dir. HT grafiği de, proteinin 70 °C'de agregasyona gittiğini göstermektedir. Sadece EDTA varlığında oluşan agregat çözünürdür (*soluble*) (Şekil 3.22a). Denatürasyon ölçümleriyle beraber aynı zamanda belli sıcaklıklarda yapılan CD spektrumları Şekil 3.23a'da görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 70 °C'de yüksek oranda korunurken, 75 °C'de büyük bir kısmı ve 80 °C'de tamamen denatüre olmuştur (Şekil 3.23a).

Şekil 3.22b, D365A lipazın Ca^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. CD spektrumlarına göre, 65 °C'de bozulmaya başlayan yapı 75 °C'de aniden denatürasyona gitmektedir. D365A lipazın kalsiyum varlığında T_m değeri 75.9 °C'dir (Tablo 3.7). HT grafiği, D365A lipazın iki aşamalı (biphasic) agregasyonunu göstermektedir. 65 °C ile 67 °C arasında agregasyonun ilk aşaması görülmektedir. Burada yapı bir süre korunurken, 72 °C ile 76 °C arasında ikinci agregasyon aşaması gerçekleşmektedir (Şekil 3.22b). Tamamen denatüre olan mutant, çözünür olmayan agregat oluşturmaktadır Bu sonuca göre, kalsiyum varlığında D365A mutantın yapısı daha düşük sıcaklıkta bozulmaya başlamaktadır. D365A mutantın kalsiyum varlığında elde edilen CD spektrumları Şekil 3.23b'de görülmektedir. Elde edilen sonuca göre, 70 °C'de yapı yüksek oranda korunurken, 75 °C'de büyük bir kısmı ve 80 °C'de tamamı denatüre olmuştur (Şekil 3.23b).

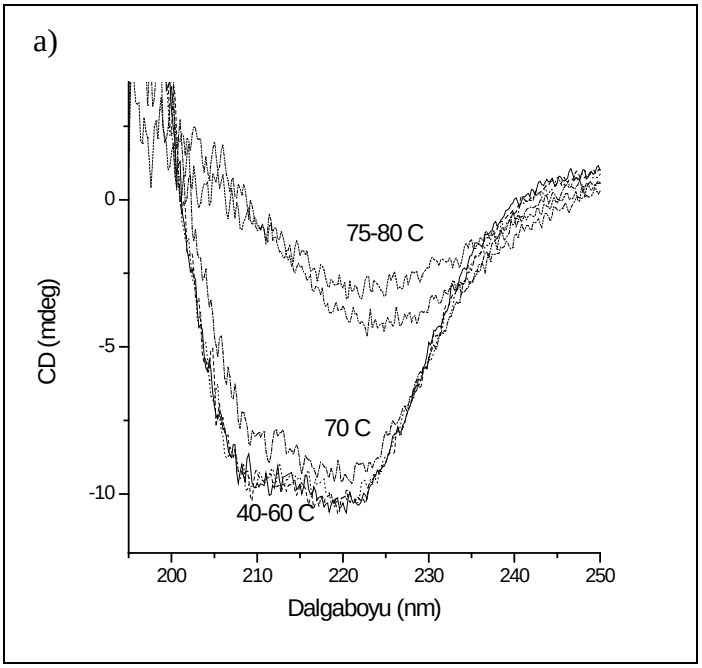
Tablo 3.7: D365A lipazın T_m değerleri. Şekil 3.22 ve Şekil 3.24'deki denatürasyon eğrileri eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır.

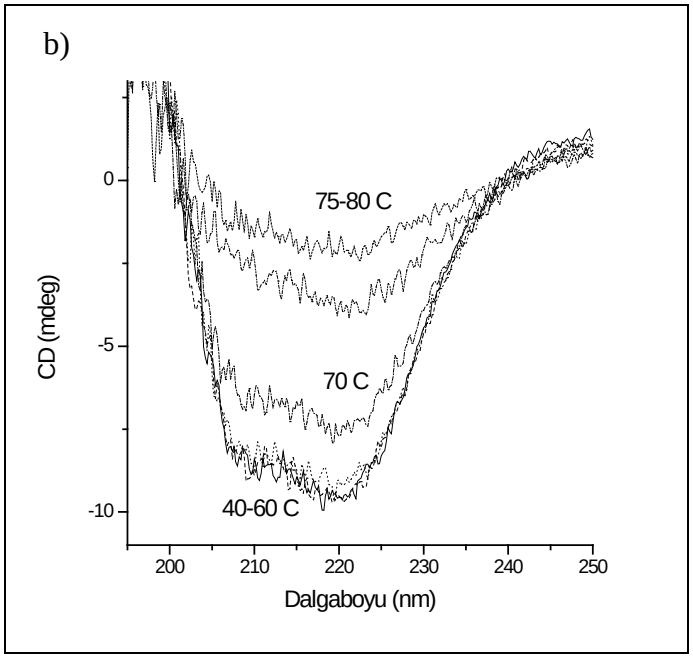
Lipaz Tipi	**Tampon Ortamı**	**T_m değerleri (°C)**	
		NaCl Yokluğunda	**NaCl Varlığında**
D365A mutant	EDTA alone	74.7 ± 0.23	74.0 ± 0.62
	Ca^{2+}	75.5 ± 0.43	75.4 ± 0.14





Şekil 3.22: D365A lipazın termal denatürasyon grafiği. a) Sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 30-80 °C arasında 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

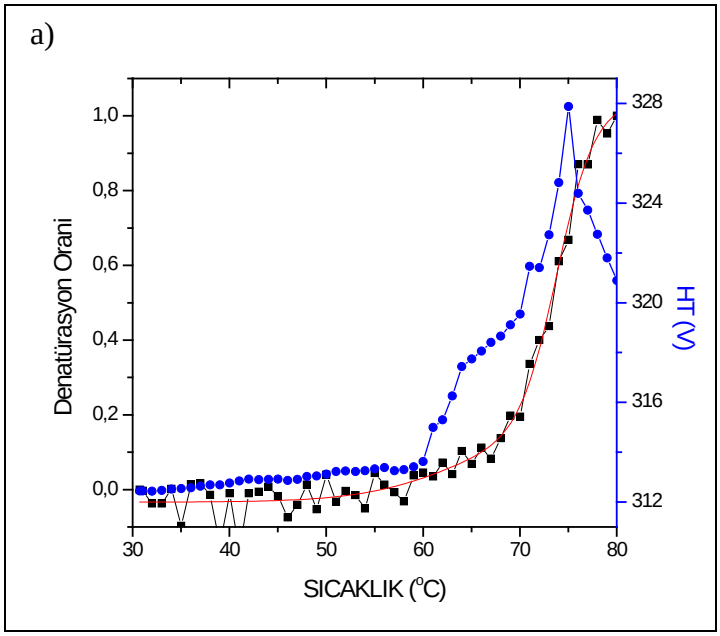


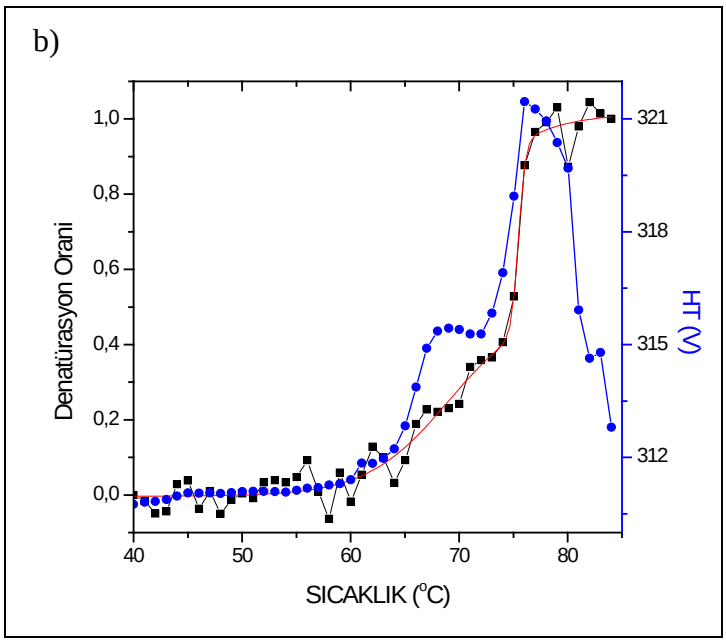


Şekil 3.23: D365A lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Spektrumlar a) sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 200-250 nm dalgaboyu arasında alınmıştır. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

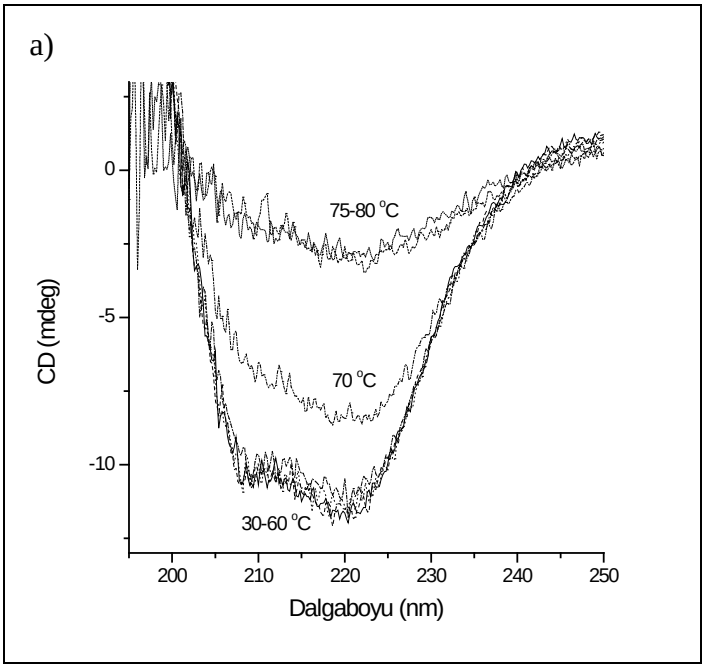
D365A lipazın NaCl içeren tamponda, sadece EDTA varlığında termal denatürasyon grafiği Şekil 3.24a'da görülmektedir. CD spektrumlarına göre, 60 °C'de bozulmaya başlayan helikal yapı 70 °C'de denatürasyona gitmektedir. Şekil 3.24'deki grafikler eşitlik 3.1'deki BiDoseResp denklemine (Bölüm 3.9.1) fit edilerek T_m değerleri hesaplanmıştır. D365A mutantın NaCl içeren tampon içerisinde sadece EDTA varlığında hesaplanan T_m değeri 74 °C'dir (Tablo 3.7). HT grafiği, NaCl yokluğunda görülenin aksine, iki aşamalı agregasyonu göstermektedir. 60 °C ile 70 °C arasında ilk aşama, 70 °C ile 75 °C'de arasında ikinci agregasyon aşaması görülmektedir (Şekil 3.24a). Oluşan agregat çözünür değildir, protein çökmüştür. Denatürasyon ölçümleriyle beraber aynı zamanda belli sıcaklıklarda alınan CD spektrumları Şekil 3.25a'da görülmektedir. Bu sonuca göre, yapı 70 °C'de kısmi olarak korunurken, 75 °C'de denatüre olmuştur (Şekil 3.25a). Bu sonuçlar, hem M287P mutant hem de D365A mutant için NaCl'ün özellikle sadece EDTA varlığında termal kararlılığı azalttığını ve çözünür olmayan agregat oluşumuna sebep olduğunu göstermektedir.

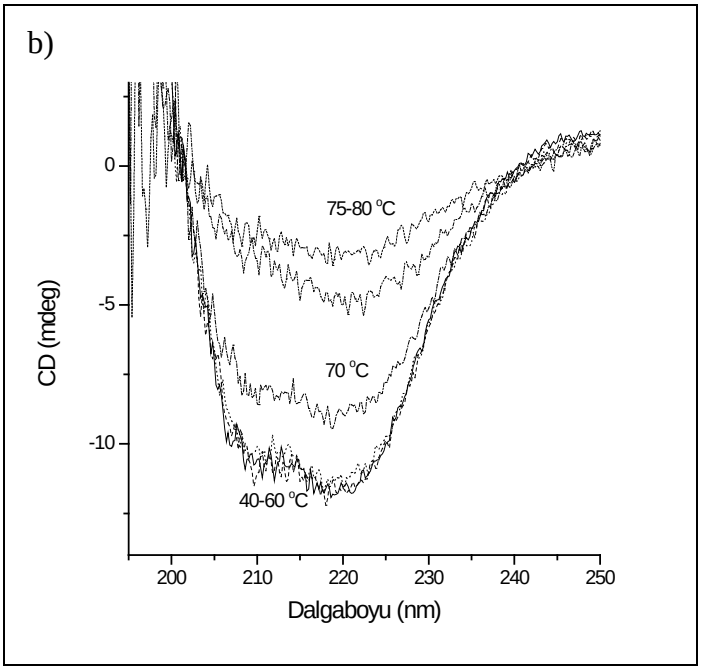
Şekil 3.24b, D365A lipazın NaCl içeren tamponda Ca^{2+} varlığında termal denatürasyon grafiğini göstermektedir. Elde edilen CD spektrumları, yapının 65 °C'de bozulmaya başladığını ve 75 °C'de aniden denatürasyona gittiğini göstermektedir. D365A mutantın NaCl içeren tampon içerisinde kalsiyum varlığında hesaplanan T_m değeri 75.4 °C'dir (Tablo 3.7). HT grafiği NaCl'süz ortamda olduğu gibi, kalsiyum varlığında iki aşamalı agregasyonu göstermektedir. 65 °C ile 68 °C arasında agregasyonun ilk fazı görülmektedir. 72 °C'de ikinci faz agregasyona uğrayan mutant 76 °C'de çökmektedir (Şekil 3.24b). Kalsiyum varlığında oluşan agregat çözünür değildir (*insoluble*), protein çökmektedir. Aynı zamanda belli sıcaklıklarda alınan CD spektrumları Şekil 3.25b'de görülmektedir. CD spektrumları, termal denatürasyon grafiklerinde olduğu gibi, NaCl yokluğunda elde edilen verilerle hemen hemen aynıdır. D365A mutant yapısı 70 °C'de kısmi olarak korunurken, 75 °C'de büyük bir kısmı ve 80 °C'de tamamı denatüre olmuştur (Şekil 3.25b).





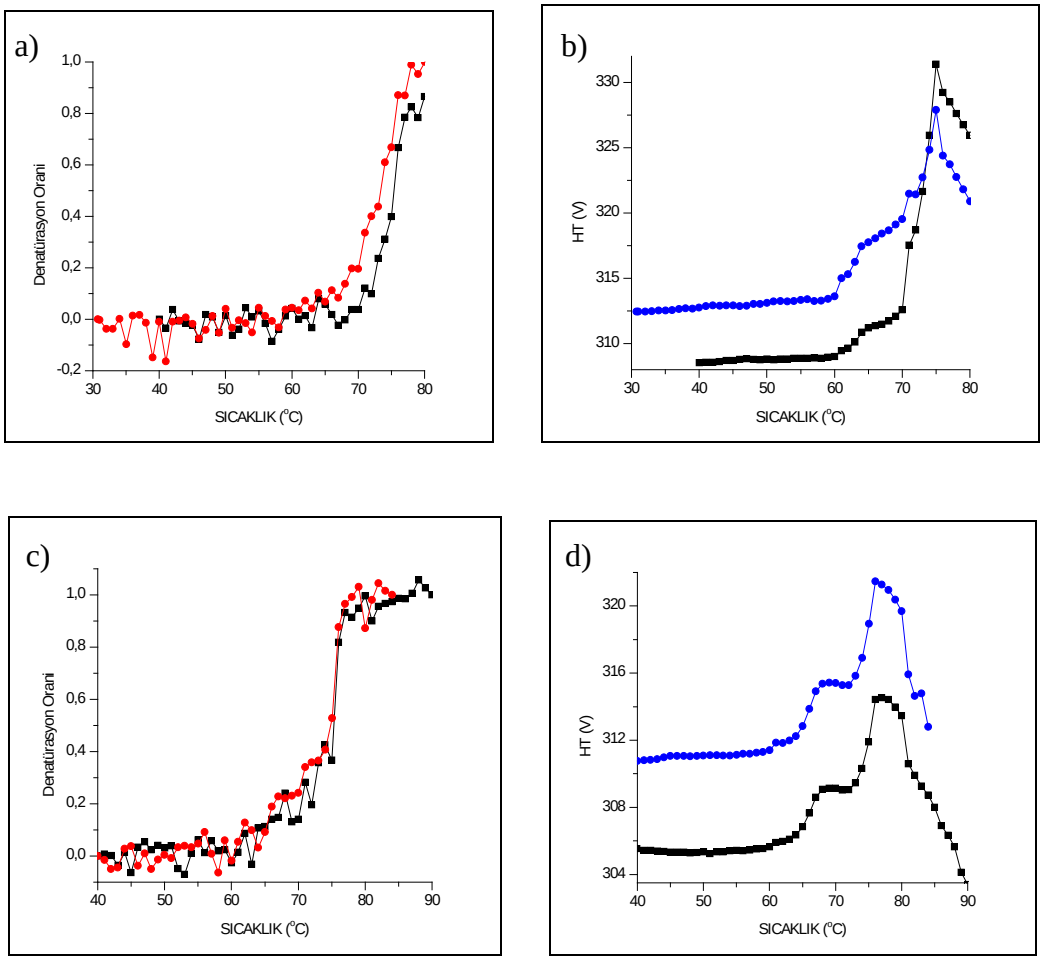
Şekil 3.24: D365A mutantın NaCl varlığında termal denatürasyon grafiği. a) Sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 30-80 °C arasında 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafiği. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.





Şekil 3.25: D365A lipazın NaCl varlığında farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Spektrumlar a) sadece EDTA, b) Ca^{2+} varlığında 200-250 nm dalgaboyu arasında alınmıştır. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.26, D365A mutantın, NaCl içeren ve içermeyen tampon ortamında elde edilen termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Şekil 3.26a ve b'de, sadece EDTA varlığında elde edilen grafikleri görülmektedir. NaCl yokluğunda yapı 70 °C'de denatürasyona gitmektedir. NaCl varlığında ise yapı 60 °C'de bozulmaya başlamıştır ve 70 °C'de denatürasyona gitmiştir. HT grafiği her iki durumda agregasyonun 60 °C'de başladığını ve 75 °C'de D365A mutantın tamamen agrege olduğunu göstermektedir. NaCl yokluğunda çözünür agregat oluşurken (soluble), NaCl varlığında oluşan agregat çözünür değildir (insoluble). (Şekil 3.26a ve b). Bu sonuçlar, NaCl'ün D365A mutantın termal kararlılığını azalttığını göstermektedir. 3.26c ve d'de ise kalsiyum varlığında elde termal denatürasyon grafikleri görülmektedir. Hem NaCl varlığında hem de yokluğunda görülen denatürasyon ve agregasyon davranışı hemen hemen aynıdır. 65 °C'de bozulmaya başlayan helikal yapı, her iki durumda 75 °C'de aniden denatürasyona gitmektedir. HT grafiği de her iki durumda, D365A mutantın iki aşamalı (biphasic) agregasyonunu göstermektedir. 60 °C'de başlayan agregasyon sonrası, 70 °C'de yapı bir süre korunmakta ve ikinci faz agregasyondan sonra 76 °C'de tamamen agrege olup çökmektedir (Şekil 3.26c ve d).



Şekil 3.26: D365A lipazın NaCl varlığında ve yokluğunda termal denatürasyon grafiklerinin karşılaştırılması. Sadece EDTA varlığında a) denatürasyon oranı grafiği, b) HT grafiği; Ca^{2+} varlığında c) denatürasyon oranı grafiği, d) HT grafiği. NaCl içermeyen (■) ve içeren (●) tamponda 222 nm'de α-heliks yapısının takip edilmesiyle elde edilen molar eliptisite cinsinden denatürasyon oranı ve HT grafikleri. Ölçümler 1 mM EDTA içeren 10 mM Tris-HCl tamponunda gerçekleştirilmiştir.

4. YORUMLAR

Bu çalışmada, daha önce bu laboratuvarda Kübra Ekşiler [27] tarafından, *p*ET22b(+) vektörüne klonlanan *G. kaustophilus* lipazın kalsiyum bağlanma bölgesinde mutasyonlar gerçekleştirilerek aktivite ve stabiliteye etkileri incelenmiştir. *G. kaustophilus* lipazın Ca^{2+}'a koordine olan rezidülerinden Asp365 alanine; ikinci olarak ise yine Ca^{2+}'a koordine olan rezidülerden Gly286'nın yanında bulunan, β-dönüş bölgesindeki Met287 rezidüsü proline çevrilmiştir (Şekil 3.1).

Lipazlar hidroliz, esterleşme, transesterifikasyon gibi pek çok reaksiyonu katalizleyebilmektedirler. Özellikle mikrobiyal termostabil lipazlar aktivitelerini yüksek pH ya da yüksek sıcaklık gibi ekstrem koşullarda koruyabildikleri için endüstride geniş kullanım alanına sahiplerdir. Yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları ile, endüstride gereksinimi duyulan daha kararlı enzimlerin geliştirilebilmesi amaçlanmaktadır. Bu da yapı-fonksiyon ilişkisinin iyi aydınlatılmasına bağlıdır. Dror ve arkadaşları, I.5 sınıfına ait bir lipaz olan *G. stearothermophilus* T6 lipaz yapısında H86Y/A269T/R374W üçlü mutasyonunu gerçekleştirerek, biyodizel üretiminde metanolün inaktive edici etkisini ortadan kaldırmak için, metanol dirençli mutant elde ettiklerini rapor etmişlerdir [79]. H86 Zn^{2+} bağlanma bölgesine, A269 ve R374 ise Ca^{2+} bağlanma bölgesine yakın rezidülerdir. Mutasyonlar sonucunda bu bölgelere yapısal su moleküllerinin (*structural water molecules*) bağlanması ve dolayısıyla hidrojen bağlarının artmasıyla lipazın 70% metanol içerisindeki stabilitesi arttırılmıştır. *G. kaustophilus* lipaz da I.5 sınıfına ait bir enzim olup, bu sınıfa ait lipazların yapısında Ca^{2+}- ve Zn^{2+}- bağlanma bölgeleri bulunmaktadır [18, 26]. Kalsiyumun aktivite ve stabilite için gerekliliği bilinmektedir; fakat kalsiyumun etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Kalsiyum bağlanma bölgesinde gerçekleştirdiğimiz mutasyonlar sonucunda, her iki metal iyonu için yaban tip ve mutant lipazların iki K_a değeri olduğu görülmüştür. Yani aktivitedeki artış iki aşamalıdır (*biphasic response*). Metallerin, enzim yapısında birden fazla bölgeye bağlanma ihtimali, aktivitedeki aşamalı artışın açıklaması olabilir. Yaban tip ve mutant lipazların kalsiyum için K_a değerleri hemen hemen aynıdır (Tablo 3.1). Yalnız K_{a1} değerleri birbirine yakın olmasına rağmen, sırasıyla M287P ve D365A lipazın kalsiyuma olan afinitelerinin, yaban tip lipaza göre artmış olduğu söylenebilir. Matsumura ve arkadaşlarının *G. zalihae* T1 lipaz ile yaptıkları bir

çalışmada, katyon-π etkileşimlerinin proteinlerin tersiyer ve kuaterner yapılarında önemli rol oynadıkları rapor edilmiştir [67]. Elektronca zengin aromatik halkalar ile özellikle Na^+ ve K^+ gibi alkali katyonlar arasında oluşan nonkovalent etkileşimlerin, canlı sistemlerdeki fizyolojik rolünden bahsedilmiştir. Na^+-π etkileşimlerinin incelendiği çalışmada, aktif bölgenin yakınındaki F16 rezidüsünün Na^+ iyonu ile etkileşimi, yönlendirilmiş mutasyon çalışması ile doğrulanmıştır. Modelleme çalışmaları ile, yaban tip lipaz yapısında 1148 su molekülü varken F16L lipaz yapısında 686 su molekülünün bulunduğu görülmüştür. Beklenmedik bir şekilde hem yaban tip lipaz hem de F16L lipazda Cl^- iyonunun Arg227, Arg214 ve Gln216 rezidüleriyle koordinasyon içerisinde yapıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca Na^+ katyonunun aktif bölgede, katalitik üçlü rezidülerinden olan Ser113 ve His358'in yan zincirleri ile etkileşime girerek lipazın katalitik aktivitesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda da görüldü ki, NaCl varlığında, yaban tip ve mutant lipazların aktivitesi ve aynı zamanda metal afinitesi de artmaktadır. NaCl varlığında yaban tip ve M287P lipaz için tek-aşamalı, D365A lipaz için ise iki-aşamalı artış görülmektedir. Özellike M287P lipazın ilk K_a değeri, NaCl yokluğundaki gibi, oldukça düşmektedir (Tablo 3.1). Yaban tip ve mutant lipazların mangana karşı afinitesi, kalsiyuma göre daha fazladır. Mn^{2+} varlığında da aktivitedeki artış iki-aşamalıdır. M287P lipaz ve D365A lipazın K_{a1} değerleri hemen hemen aynı ve yaban tip lipazınkinden düşük iken, yaban tip lipaz ve M287P lipazın K_{a2} değerleri birbirine yakın ve D365A lipazınkinden yüksektir (Tablo 3.2). NaCl varlığında ise, kalsiyumda görüldüğü gibi, yapan tip ve M287P lipaz için tek-aşamalı, D365A lipaz için ise iki-aşamalı artış görülmektedir. M287P lipazın ilk K_a değeri oldukça düşmektedir (Tablo 3.2). Ayrıca NaCl, mangan afinitesini kalsiyuma göre daha çok arttırmaktadır. Manganın atom hacminin kalsiyuma göre küçük olması, mangana olan afinitenin daha çok artmasında etkili olabilir. NaCl varlığında, yaban tip ve mutant lipazların düşük iyon konsantrasyonlardaki aktiviteleri ve Ca^{2+} ile Mn^{2+}'a karşı afiniteleri artmaktadır.

Literatürde Ca^{2+} iyonunun lipaz enzimine bağlanması ile optimum sıcaklığını ve stabilitesini arttırdığı bilinmektedir [35]. Sıcaklık etkisini incelemek üzere yapılan çalışmalarda, yaban tip lipaz aktivite gösterdiği geniş bir sıcaklık aralığına sahipken, M287P lipaz düşük sıcaklıklarda ve D365A lipaz ise yüksek sıcaklıklarda maksimum aktivite göstermektedir. Kalsiyum varlığında yaban tip lipazın optimum sıcaklığı 30-

70 °C iken; 70 °C'de aktivitesi sıfırlanan M287P lipazın optimum sıcaklığı 40 °C'ye düşmüştür ve D365A lipazın optimum sıcaklığı 50-70 °C arasındadır.

Kalsiyuma bağlı stabilite çalışmalarında, kalsiyum bağlanma bölgesi ve aktif bölge arasındaki mesafeden dolayı, kalsiyumun aktivitede direk rol almadığını, daha çok lipaz stabilitesini arttıran yapısal bir rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir [3]. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda görüldü ki, *B. stearothermophilus* lipazın kalsiyum varlığında 66 °C'de yapısı bozulmaya başlarken, kalsiyum yokluğunda ise 58 °C'de bozulmaya başlamıştır [18]. Bu çalışmada gerçekleştirilen sıcaklık stabilite deneyleri ile de kalsiyumun yaban tipin yarı ömrünü arttırdığı, diğer yandan mutantların yarı ömürlerini azalttığı görülmüştür (Tablo 3.3 ve 3.4). Özellikle D365A lipazın 70 °C'de kalsiyum varlığında yarı ömrü oldukça kısadır (<5 dk). Kalsiyum yaban tip lipazın stabilitesi için gerekli iken, mangan stabiliteyi az miktarda arttırmaktadır. Bu sonuç, kalsiyumun hem aktivite hem de stabillitede etkili olduğunu gösterirken; manganın aktivitede etkili olduğunu, fakat stabilitede kalsiyum kadar etkili olmadığını göstermektedir.

Yaban tip ve mutantların termal kararlılığını incelemek için gerçekleştirdiğimiz Sirküler Dikroizm (CD) deneyleri, sıcaklık stabilite çalışmalarını desteklemektedir. Kalsiyum varlığında yaban tip lipazın T_m değeri artmaktadır. Yaban tipin sadece EDTA, Ca^{2+} ve Mn^{2+} varlığında T_m değerleri sırasıyla 70, 77.5 ve 75.3 °C'dir (Tablo 3.5). Kalsiyum bağlanma bölgesi, lipaz yapısındaki en esnek (*flexible*) bölgelerdendir. Kalsiyumun, bu bölgedeki rezidülerle oluşturduğu iyonik etkileşimler yapıya daha sıkılık (*rigidity*) ve kararlıklık sağladığı için kalsiyum varlığında T_m artmaktadır. Ca^{2+} ve Mn^{2+} varlığında, termal denatürasyon sonucunda lipaz agregasyona uğramaktadır, oluşan agregat çözünür değildir (*insoluble*). Agregasyonun termal stabiliteye katkı sağladığı pek çok çalışmada rapor edilmiştir [87, 89, 90]. Sezerman ve Timuçin'in yaptığı çalışmada, *B. thermocatenulatus* (BTL2) lipazda korunmuş Trp211 rezidüsünün mutasyon ile alanine çevrilmesi sonucu agregasyon eğiliminin azaldığı, buna bağlı olarak termal stabilitenin de azaldığı rapor edilmiştir [86]. Kalsiyum yaban tip lipazın termal kararlılığını arttırırken mutant lipazları etkilememektedir. M287P lipazın sadece EDTA, Ca^{2+} ve Mn^{2+} varlığında T_m değerleri sırasıyla 70, 69.7 ve 69.1 °C'dir. D365A lipazın sadece EDTA ve Ca^{2+} varlığında T_m değerleri sırasıyla 74.7 ve 75.5 °C'dir. Özellikle D365A lipazın Ca^{2+} varlığındaki agregayonunun iki aşamalı olduğu görülmektedir

(*biphasic response*). Kalsiyumun yapıda birden fazla bölgeye bağlanma ihtimali ve mutasyon ile bozulduğu düşünülen Ca^{2+} koordinasyonunun, yapının bozulması ile iki aşamalı agregasyona sebep olduğu düşünülebilir. NaCl ise yaban tip ve mutant lipazların, metal varlığında veya yokluğunda, T_m değerini birkaç derece düşürmektedir. NaCl'ün destabilizasyonu sadece EDTA varlığında daha fazladır, kalsiyum bu etkiyi azaltmaktadır. NaCl, aktiviteyi ve metal afinitesini arttırmasına rağmen, yaban tip ve mutantların termal kararlılığını azaltmaktadır. Yapıda sağladığı etkileşimler ile aktivite ve metal ilgisini arttırırken, kalsiyum bağlanma bölgesindeki rezidülerin yapıda korunan su molekülleriyle olan etkileşimini engelleyerek stabilitenin azalmasına sebep olabilir.

Metaller ve NaCl varlığında lipazın yapı-fonksiyon ilişkisinin ve aktivite-stabilite mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için, daha fazla yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca bölgesel dizayn ve modelleme çalışmaları ile belirli parametreler tahmin edilerek mutasyonlara yön verilebilir. Bu sayede mutasyonlar ile endüstride gereksinimi duyulan ekstrem koşullara daha dayanıklı termostabil enzimlerin geliştirilebilmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

[1] Li H., Zhang X., (2005), ‘‘Characterization of thermostable lipase from thermophilic Geobacillus sp. TW1’’, Protein Expression and Purification, 42 (1), 153-9.

[2] Lopes D. B., Fraga L. P., Fleurı L. F., (2011), ‘‘Lipases and esterases’’, Ciênc Tecnol Aliment Campinas, 31 (3), 608-613.

[3] Öztürk B., (2012), ‘‘Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları’’, Gıda Mühendisliği Dergisi, 16 (2), 20-23.

[4] Rubin B., (1997), ‘‘Lipases: part B. Enzyme characterization and utilization’’, 1st Edition, Methods in Enzymology.

[5] Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G., (1999), ‘‘Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application’’, Applied Microbiology and Biotechnology, 51 (6), 711-29.

[6] Rubin B., Dennis E., (1997), ‘‘Lipases: part B. Enzyme characterization and utilization’’, 1st Edition, Methods in Enzymology.

[7] Kauffmann I., Schmidt-Dannerti C. (2001), ‘‘Conversion of Bacillus thermocatenulatus lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design’’, Protein Engineering, Design and Selection, 14 (11), 919-928.

[8] Nagya V., T″oke E., Keong L. C., (2006) ‘‘Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermantation’’, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 39, 141–148.

[9] Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G., (1999), ‘‘Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application’’, Applied Microbiology and Biotechnology, 51 (6), 711-29.

[10] Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., (2001), ‘‘Production, purification, characterization and applications of lipases’’, Biotechnology Advances, 19 (8), 627-62.

[11] Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., (1992), ‘‘The alpha/beta hydrolase fold’’, Protein Engineering, 5 (3), 197-211.

[12] Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., (1993), ‘‘Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography’’, Nature, 29, 362 (6423), 814-20.

[13] Metzler D., (2003), ‘‘Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells’’, 2nd Edition, Journal of Natural Products, 66 (9), 1297–1297.

[14] Brzozowski A.M., Derewenda U., (1991), ‘‘A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex’’, Nature. 351 (6326), 491-4.

[15] Egloff M.P., Marguet F., (1995), ‘‘The 2.46 A resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate’’, Biochemistry. 34 (9), 2751-62.

[16] Sarda L., Desnuelle P., (1958), ‘‘Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions’’, Biochimica et Biophysica Acta, 30 (3), 513-21.

[17] Tyndall J.D., Sinchaikul S., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P., Walkinshaw M.D., (2002), ‘‘Crystal structure of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1’’, Journal of Molecular Biology, 323 (5), 859-69.

[18] Kim M.H., Kim H.K., Lee J.K., Park S.Y., Oh T.K., (2000), ‘‘Thermostable lipase of Bacillus stearothermophilus: High-level production, purification, and calcium-dependent thermostability’’, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64 (2), 280-6.

[19] Noble M.E., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R., Frenken L.G., (1993), ‘‘The cyrstal structure of triacylglycerol lipase from Pseudomonas glumae reveals a partially redundant catalytic aspartate’’, FEBS Letters, 331 (1-2), 123-8.

[20] Heikinheimo P., Goldman A., Jeffries C., Ollis D.L., (1999), ‘‘Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases’’, Structure, 7 (6), 141-6.

[21] Derewenda Z.S., Sharp A.M., ‘‘News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases’’, Trends in Biochemical Sciences, 18 (1), 20-5.

[22] Van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.E., Dijkstra B.W., (1993), ‘‘The cyrstal structure of Bacillus subtilis lipase: a minimal a/β hydrolase fold enzyme’’, Journal of Molecular Biology, 25, 309 (1), 215-26.

[23] Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T., (1999), ‘‘Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases’’, Annual Review of Microbiology, 53, 315-51.

[24] Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stöcklein W., (1994), ‘‘Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from Bacillus thermocatenulatus’’, Biochimica et Biophysica Acta, 25, 1214 (1), 43-53.

[25] Sinchaikul S., Sookkheo B., Phutrakul S., Wu Y.T., Pan F.M., Chen S.T., (2001), ‘‘Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1’’, Biochemical and Biophysical Research Communications, 283 (4), 868-75.

[26] Jeong S.T., Kim H.K., Kim S.J., Chi S.W., Pan J.G., Oh T.K., Ryu S.E., (2002), ‘‘Novel zinc-binding center and a temperature switch in the Bacillus stearothermophilus L1 lipase’’, Journal of Biological Chemistry, 277 (19), 17041-7.

[27] Ekşiler K., (2013), ‘‘Metal iyonlarının ve surfaktanların Geobacillus kaustophilus lipaz aktivitesine ve yapısal kararlılığına etkisinin incelenmesi’’, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[28] Dominguez A., Pastrana L., (2005) ‘‘Lipolytic enzyme production by Thermus thermophiles HB27 ina stirred tank bioreactor’’, Biochemical Engineering Journal, 26 (2-3), 95-99.

[29] Vieille C., Zeikus G.J., (2001), ‘‘Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability’’, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65 (1), 1-43.

[30] Becker P., Abu-Reesh I., Markossian S., Antranikian G., Märkl H., (1997), ‘‘Determination of the kinetic parametersduring continuous cultivation of the lipase-producing thermophile Bacillus sp. I HI-91 on olive oil’’, Applied Microbiology and Biotechnology, 48 (2), 184-90.

[31] Gomes J., Steiner W., (2004), ‘‘The biocatalytic potentiol of extremophiles and extremozymes’’, Food Technology and Biotechnology, 42 (4), 223–235.

[32] Benzonana G., Desnuelle P., (1968) ‘‘Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase’’, Biochimica et Biophysica Acta, 164 (1), 47-58.

[33] Gubernator K.,; Miller K., Winkler, Fritz K., (1991), ‘‘The structure of human pancreatic lipase suggests a locally inverted, trypsin-like mechanism’’, Lipases: Structure, Mechanisms And Genetic Engineering, 9-16.

[34] Dünhaupt A., Lang S., Wagner F., (1992), ‘‘Pseudomonas cepacie lipase: studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil’’, Biotechnology Letters, 14 (10), 953-958.

[35] Kim M.H., Kim H.K., Lee J.K., Park S.Y., Oh T.K., (2000), ‘‘Thermotsable lipase of Bacillus stearothermophilus: High-level production, purification, and Calcium-dependent Thermostability’’, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64 (2), 280-6.

[36] Rubin B., (1997), ‘‘Lipases: part B. Enzyme characterization and utilization’’, 1st Edition, Methods in Enzymology.

[37] Jaeger K.E., Reetz M.T., (1998), ‘‘Microbial lipases form versatile tools for biotechnology’’, Trends in Biotechnology, 16 (9), 396-403.

[38] Nagya V., T″oke E.R., Keong L.C., Szatzker G., Ibrahim D., Omarc I.C., (2006) ‘‘Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermantation’’, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 39, 141–148.

[39] Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G., (1999), ‘‘Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application’’, Applied Microbiology and Biotechnology, 51 (6), 711-29.

[40] Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., (2001), ‘‘Production, purification, characterization and applications of lipases’’, Biotechnology Advances, 19 (8), 627-62.

[41] Ahmad S., Rao N.M., (2009), ‘‘Thermally denatured state determines refolding in lipase: Mutational analysis’’, Protein Science, 18, 1183-1196.

[42] Togan V., Daloglu A.T., (2006), ‘‘Optimization of 3D trusses with adaptive approach in genetic algorithms’’, Engineering Structure, 28, 1019-1027.

[43] Maciver B., McHale R.H.; Saul D.J., Bergquist P.L., (1994), ‘‘Cloning and sequencing of a serine proteinase gene from a thermophilic Bacillus species and its expression in Escherichia coli’’, Applied and Environmental Microbiology, 60, 3981-3988.

[44] Petrounia I.P., Arnold F.H., (2000), ‘‘Designed evolution of enzymatic properties’’, Current Opinion in Biotechnology, 11, 325-330.

[45] Ruslan R., Abd Rahman R.N., Leow T.C., Ali M.S., Basri M., Salleh AB., (2012), ‘‘Improvement of Thermal Stability via Outer-Loop Ion Pair Interaction of Mutated T1 Lipase from Geobacillus zalihae Strain T1’’, International Journal of Molecular Sciences, 13 (1), 943-60.

[46] Guerois R., Nielsen J.E., Serrano L., (2002), ‘‘Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: A study of more than 1000 mutations’’, Journal of Molecular Biology, 320, 369-387.

[47] Zhou H., Zhou Y., (2002), ‘‘Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure’’, Protein Science, 11, 2714-2726.

[48] Guncheva M., Zhiryakova D., (2011), ‘‘Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases’’, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68, 1-21.

[49] Rahman R.N.Z.R.A., Fujiwara S., Nakamura H., Takagi M., Imanaka T., (1998), ‘‘Ion pairs involved in maintaining a thermostable structure of glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon’’, Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 920-926.

[50] Kawata T., Ogino H., (2010), ‘‘Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase’’, Biochemical and Biophysical Research Communications, 400, 384-388.

[51] Ghori M.I., Iqbal M.J., Hameed A., (2011), ‘‘Characterization of a novel lipase from Bacillussp. isolated from tannery wastes’’, Brazilian Journal of Microbiology, 42 (1), 22-9.

[52] Nirupama, Dosanjh N.S., Kaur J., (1998), ‘‘A novel thermostable lipase from a thermophilic Bacillus sp. Characterization and esterification studies’’, Biotechnology Letters, 20 (10), 997-1000.

[53] Calabrò V., Ricca E., De Paola M.G., Curcio S., Iorio G., (2010), ‘‘Enzymatic trans-esterification for biodiesel production’’, Bioprocess and Biosystem Engineering, 33 (6), 701-10.

[54] Sinchaikul S., Tyndall J.D., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P., Phutrakul S., Chen S.T., Walkinshaw M.D., (2002), ‘‘Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus P1’’, Acta Crystallographica Section D, 58 (Pt 1), 182-5.

[55] Carrasco-López C., Godoy C., de las Rivas B., Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Martínez-Ripoll M., Hermoso J.A., (2008), ‘‘Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the BTL2 lipase from the extremophilic microorganism Bacillus thermocatenulatus’’, Acta Crystallographica Section F , 64 (11), 1043-5.

[56] Van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.E., Dijkstra B.W., (2001), ‘‘The crystal structure of Bacillus subtilis lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme”, Journal of Molecular Biology, 309, 215–226.

[57] Acharya P., Rajakumara E., Sankaranarayanan R., Rao N.M., (2004), ‘‘Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved Bacillus subtilis lipase’’, Journal of Molecular Biology, 341 (5), 1271-81.

[58] Kawasaki K., Kondo H., Suzuki M., Ohgiya S., Tsuda S., (2002), ‘‘Alternate conformations observed in catalytic serine of Bacillus subtilis lipase determined at 1.3 A resolution’’, Acta Crystallographica Section D, 58 (7), 1168-74.

[59] Rajakumara E., Acharya P., Ahmad S., Shanmugam V.M., Rao N.M., Sankaranarayanan R., (2004), ‘‘Crystallization and preliminary X-ray crystallographic investigations on several thermostable forms of a Bacillus subtilis lipase’’, Acta Crystallographica Section D, 60 (1), 160-2.

[60] Ahmad S., Kamal M.Z., Sankaranarayanan R., Rao N.M., (2008), ‘‘Thermostable Bacillus subtilis lipases: in vitro evolution and structural insight’’, Journal of Molecular Biology, 381 (2), 324-40.

[61] Farokhi A. , Moshtaghi S.A., Ani M., Samani K.G., (2003) ‘‘The effect of manganese on plasma and liver lipoprotein levels and lipoprotein lipase activity in rat’’, Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 5 (2), 35-41.

[62] Balan A., Ibrahim D., Rahim R.A. and Rashid F.A.A., (2012), ‘‘Purification and characterization of a Thermostable Lipase from Geobacillus thermodinitrificans IBRL-nra’’, Enzyme Research, 2012 (2012), 7 pages.

[63] Ohnishi K., Yoshida Y., Toita J., Sekiguchi J., (1994), ‘‘Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from Aspergillus oryzae’’, Journal of Fermentation and Bioengineering, 78 (6), 413-419.

[64] Cheong K.W., Leow T.C., Rahman R.N., Basri M., Rahman M.B., Salleh A.B., (2011), ‘‘Reductive Alkylation Causes the Formation of a Molten Globule-Like Intermediate Structure in Geobacillus zalihae Strain T1 Thermostable Lipase’’, Applied Biochemistry and Biotechnololgy, 164 (3), 362-75.

[65] Sreerama N.; Venyaminov S.Y.; Woody R.W., (2000), ‘‘Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis’’. Analytical Biochemistry, 287, 243-251.

[66] Schröder O., Tippner D., Wagner R., (2001), ‘‘Towards the three-dimensional structure of the Escherichia coli DNA-binding protein H-NS: A CD and fluorescence study’’, Biochemical and Biophysical Research Communications, 282, 219–227.

[67] Matsumura H., Yamamoto T., Leow T.C., Mori T., Salleh A.B., Basri M., Inoue T., Kai Y., Rahman R., (2008) “Novel cation-pi interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase” Proteins, 70, 592-598.

[68] Kalay Ş., (2006) “Lipaz katalizli Ayçiçek yağın metanoliz reaksiyon mekanizmasının HPLC ile incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[69] Marangoni A.G., (2002) “Enzyme Kinetic a Modern Approch.”, Wiley Publishers, Edition: 1, ISBN-10: 0471159859, 978-0471159858.

[70] Goto M., Ogawa H., Isobe T., Kawasaki M., Kometani T., (2003), ‘‘2-propanol treatment of Candida rugosa lipase and its hydrolytic activity’’, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 24 (25), 67-73.

[71] Salgın U., Salgın S., Takaç S., (2007), ‘‘The enentioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester in supercritical $C0_2$ using Candida rugosa lipase’’, The Journal of Supercritical Fluids, 43 (2), 310-316.

[72] Carvalho N.B., Barbosa J.M.P., Oliveira S., Fricks T., Lima A.S., (2013), ‘‘Biochemical properties of Bacillus sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol gel process’’, Quimica Nova, 36 (1), 52-58.

[73] Shariff F.M., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B., (2011), ‘‘A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp.’’, International Journal of Molecular Sciences, 12 (5), 2917-34.

[74] Lesuisse E., Schanck K., Colson C., (1993), ‘‘Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme’’, European Journal of Biochemistry, 216 (1), 155-60.

[75] Alkan H., Baysal Z., Uyar F., Dogru M., (2007), ‘‘Production of lipase by a newly isolated Bacillus coagulans under solid-state fermentation using melon wastes’’, Applied Biochemistry and Biotechnology, 136 (2), 183-92.

[76] Kim Y.H., Berry A.H., Spencer D.S., Stites W.E., (2001), ‘‘Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins’’, Protein Engineering, Design and Selection, 14 (5), 343-7.

[77] Stauffer C.E., Etson D., (1969), ‘‘The Effect on Subtilisin Activity of Oxidizing a Methionine Residue’’, The Journal of Biological Chemistry, 244(19), 5333-5338.

[78] Yang H., Liu L., Wang M., Li J., Wang N.S., Du G., Chen J., (2012), ‘‘Structure Based Engineering of Methionine Residues in the Catalytic Cores of Alkaline Amylase from Alkalimonas amylolytica for Improved Oxidative Stability’’, Applied and Environmental Microbiology, 78 (21), 7519-26.

[79] Dror A., Kanteev M., Kagan I., Gihaz S., Shahar A., Fishman A., (2015), ‘‘Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from Geobacillus stearothermophilus’’, Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (22), 9449-61.

[80] Schlieben N.H., Niefind K., Schomburg D., (2004), ‘‘Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from Bacillus thermocatenulatus’’. Protein Expression and Purification, 34, 103-110.

[81] Rúa M.L., Schmidt-Dannert C., Wahl S., Sprauer A., Schmid R.D., (1997), ‘‘Thermoalkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity’’, Journal of Biotechnology, 56, 89-102.

[82] Kirino H., Aoki M., Aoshima M., Hayashi Y., Ohba M. (1994), ‘‘Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, Thermus thermophilus’’, European Journal of Biochemistry, 220, 275-281.

[83] Arnott M.A., Michael R.A., Thompson C.R., Hough D.W., Danson M.J., (2000), ‘‘Thermostability and thermoactivity of citrate synthases from the thermophilic and hyperthermophilic archaea, Thermoplasma acidophilum and Pyrococcus furiosus’’, Journal of Molecular Biology, 304, 657-668.

[84] Cecchini P., De Franceschi G., Frare E., Fontana A., de Laureto Polverino P. (2012), ‘‘The role of tryptophan in protein fibrillogenesis: relevance of Trp7 and Trp14 to the amyloidogenic properties of myoglobin’’, Protein Engineering, Design and Selection, 25, 199-203.

[85] Taylor D.M., Gibbs B.F., Kabashi E., Minotti S., Durham H.D., (2007), ‘‘Tryptophan 32 potentiates aggregation and cytotoxicity of a copper/zinc superoxide dismutase mutant associated with familial amyotrophic lateral sclerosis’’, Journal of Biological Chemistry, 282, 16329-16335.

[86] Timucin E., Sezerman U., (2013), ‘‘The conserved lid tryptophan, W211, potentiates thermostability and thermoactivity in bacterial thermoalkalophilic lipases’’, PLoS ONE, 8 (12), e85186.

[87] Walden H., Bell G.S., Russell R.J., Siebers B., Hensel R. (2001), ‘‘Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase’’, Journal of Molecular Biology, 306, 745-757.

[88] Benjwal S., Verma S., (2006), ‘‘Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments’’, Protein Science, 15, 635–639.

[89] Kirino H., Aoki M., Aoshima M., Hayashi Y., Ohba M., (1994), ‘‘Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to thethermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, Thermus thermophilus’’, European Journal of Biochemistry, 220, 275-281.

[90] Arnott M.A., Michael R.A., Thompson C.R., Hough D.W., Danson M.J., (2000) ‘‘Thermostability and thermoactivity of citrate synthases from the thermophilic and hyperthermophilic archaea, Thermoplasma acidophilum and Pyrococcus furiosus’’, Journal of Molecular Biology, 304, 657-668.

ÖZGEÇMİŞ

Atike Nur SEYİTOĞLU 1991 yılında Güngören'de doğdu. 2008 yılında, yabancı dil ağırlıklı bir lise olan Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi'ni bitirdi. Aynı yıl içerisinde, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında bölüm 4.sü olarak mezun oldu. 2012 yılında lisans dönemi içerisinde Pedagojik Formasyon Eğitimi aldı. Lisansı bitirdiğinde Türkiye genelinde dereceye giren öğrenciler için başlatılan En İyi Onlar Projesi'ne dahil edildi. 2013 yılında Gebze Teknik Üniveritesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında, 01/2015-06/2015 tarihleri arasında, Erasmus programı dahilinde yurt dışı üniversiteler arası öğrenci değişimi programına katıldı. İngiltere'de Southampton University'de, Assoc. Prof. Eugen Stulz'un çalışma grubuna katılarak, '*Research Study*' programı dahilinde laboratuvar araştırmalarında yer aldı.