

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Thermotoga maritima* Sel12A SELÜLAZ
ENZİMİNİN KATALİTİK ÖZELLİKLERİNİN
PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ YOLUYLA
GELİŞTİRİLMESİ**

Handan ÜSTÜKARCI

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 12.09.2014

Bornova-İZMİR

2014

Handan ÜSTÜKARCI tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Thermotoga maritima* Sel12A SELÜLAZ ENZİMİNİN KATALİTİK ÖZELLİKLERİNİN PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ YOLUYLA GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.09.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:Doç. Dr. Serap EVRAN

.....

Raportör Üye

:Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ

.....

Üye

:Doç. Dr. İhsan YAŞA

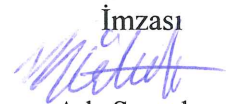
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Thermotoga maritima* Sel12A Selülaz Enziminin Katalitik Özelliklerinin Protein Mühendisliği Yoluyla Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/ 09 / 2014

İmzası

Adı-Soyadı

Handan ÜSTÜKARCI

ÖZET

***Thermotoga maritima* Sel12A SELÜLAZ ENZİMİNİN KATALİTİK ÖZELLİKLERİNİN PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ YOLUYLA GELİŞTİRİLMESİ**

ÜSTÜKARCI, Handan

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap EVRAN

Eylül 2014, 78 sayfa

Selüloz, dünya genelinde en yaygın kullanılan üçüncü endüstriyel enzimdir. Selülozun hidrolizi amacı ile kullanılan selülozların düşük kararlılığı ve yüksek üretim maliyeti, endüstriyel kullanımlarını kısıtlamakta ve selülozun istenilen verimlilikte kullanımını engellemektedir. Bu tez çalışmasında, hipertermofilik *Thermotoga maritima* kaynaklı selüloz 12A enziminde protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak amino asit değişiklikleri gerçekleştirildi. Amino asit değişiklikleri sonucu, optimum pH ve pH kararlılığı özellikleri değiştirilmiş mutant enzimler elde edilmesi amaçlandı. Selülozu kodlayan gende error-prone PCR yoluyla rastgele mutasyonlar oluşturuldu ve gen kütüphanesi *Escherichia coli*'ye aktarıldı. Gen kütüphanesi karboksimetilselüloz agarda Kongo kırmızısı ile boyama yöntemi kullanılarak tarandı. Asidik ve bazik pH değerlerinde doğal enzime kıyasla daha kararlı olan mutant enzimler belirlendi ve bazı enzimatik özellikleri karakterize edildi.

Anahtar Sözcükler: *Thermotoga maritima*, selüloz, Sel12A, error-prone PCR, protein mühendisliği, selüloz

ABSTRACT**IMPROVING THE CATALYTIC PROPERTIES OF *Thermotoga maritima* CEL12A CELLULASE ENZYME BY USING PROTEIN ENGINEERING**

ÜSTÜKARCI, Handan

MSc in Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Serap EVRAN

September 2014, 78 pages

Cellulases are the world's third most widely used industrial enzymes. However, low stability and high production cost limit the utilization of these enzymes in hydrolysis of cellulose. In this thesis, amino acid exchanges were introduced onto cellulase 12A from *Thermotoga maritima* via protein engineering methods. The aim of introducing amino acid exchanges was to obtain mutant enzymes with altered optimum pH and pH stability profiles. A gene library was generated, and random mutations were introduced onto *tmCel12A* gene by using error-prone PCR. The resulting gene library was transformed into *Escherichia coli* cells. The gene library was screened by observing zones after staining carboxymethyl cellulose agar plates with congo red. Mutants, which were more acid and alkali stable than wild-type enzyme were obtained. Then, some of the catalytic parameters were analyzed.

Keywords: *Thermotoga maritima*, cellulase, Cel12A, error-prone PCR, protein engineering, cellulose

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans çalışmalarımda bana yol gösteren, tez danışmanım Doç. Dr Serap EVRAN'a;

Laboratuvarın sadece deney ve ciddiyet yeri değil, aynı zamanda birlikte gülme, düşünme, birbirini destekleme ve birbirine güvenme yeri olduğunu, bilginin paylaştıkça çoğaldığını bana gösteren ve bunu benimle paylaşan, bilgileri ve destekleriyle idollerim olmuş Selin ECE ve Canan ÖZYURT'a;

Laboratuvarımıza renk katan, tıkanıdığımız yerde bize yol gösteren, Arş. Gör. Umut MENGÜLLÜOĞLU, Arş. Gör. Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ ve Uzm. K. Taylan ÖZTÜRK'e;

Bilimin tek bakış açısıyla tek laboratuvarı değil dayanışma ile gerçekleştirildiğini gösteren Biorege ailesine;

Her durumda yanımda olan kardeşim Hakan ÖZTÜRK ile arkadaşlarım Esra FEYZİOĞLU, Görkem BAKIR ve Öznur ERDOĞAN'a;

“Olduramadım” şarkısıyla, olduramadığımız denemelerimizde moral bulmamızı sağlayan Sayın Özkan UĞUR'a;

Hayat macerama atıldığım günden beri yanımda olan, beni destekleyen, yol gösterip kendi kararlarımı almamı sağlayan aileme;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Selüloz	1
1.2 Selüloz Hidrolizinde Görevli Enzimler	3
1.2.1 Selülazların adlandırılması	5
1.2.2 Selülazların etki mekanizmaları	6
1.2.3 Selülazların kullanım alanları	8
1.3 <i>Thermotoga maritima</i> Selülazları	11
1.4 Protein Mühendisliği	13
1.4.1 Rasyonel tasarım	14
1.4.2 Yönlendirilmiş evrim	14
1.5 Selülazlar İle İlgili Gerçekleştirilen Protein Mühendisliği Çalışmaları	16

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
2. MATERYAL	19
2.1 Kullanılan Bakteriler	19
2.2 pET-21a (+) Plazmid Vektörü	20
2.3 PCR Primerleri	21
2.3.1 Vektöre spesifik primerler	21
2.3.2 Gen amplifikasyon ve kütüphane primerleri	22
2.4 DNA ve Protein Standartları.....	22
2.5 Enzimler	22
2.6 Kimyasallar.....	22
2.7 Kitler.....	23
2.8 Diğer Sarf Malzemeleri	23
2.9 Cihazlar.....	23
2.10 <i>E.coli</i> Büyüme Ortamları.....	24
2.11 Tampon ve Çözeltiler	24
2.12 Bilgisayar Yazılımları.....	28
3. METOD	29
3.1 Mikrobiyolojik Metodlar	29

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1 Sterilizasyon.....	29
3.1.2 <i>E.coli</i> hücrelerinin inkübasyonu ve saklama koşulları	29
3.1.3 Kompetent <i>E.coli</i> hücrelerinin hazırlanması	29
3.2 Moleküler Biyoloji Metodları.....	31
3.2.1 <i>E.coli</i> hücrelerinden plazmid izolasyonu	31
3.2.2 PCR.....	32
3.2.3 Agaroz jel elektroforezi	37
3.2.4 DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu	37
3.2.5 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	37
3.2.6 Çift iplikli DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla kesimi.....	37
3.2.7 Ligasyon.....	39
3.2.8 Kimyasal kompetent <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyon.....	40
3.2.9 Elektroporasyon	41
3.2.10 DNA dizi analizi	42
3.3 Gen Kütüphanesinin Transformasyonu	42
3.3.1 Gen kütüphanesinin büyüklüğünün belirlenmesi	42
3.4 Gen Kütüphanesine Uygulanan Tarama Yöntemi.....	43

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

3.4.1 Kütüphane tarama yönteminin optimizasyonu	44
3.5 Gen Kütüphanesi Varyantlarının Taranması	45
3.6 Heterolog Gen Ekspresyonu ve Protein Saflaştırılması	46
3.6.1 Proteinlerin küçük ölçekte (test) ekspresyonu	46
3.6.2 Proteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu	46
3.6.3 Metal şelat afinite kromatografisi	47
3.7 Analitik Yöntemler	48
3.7.1 Protein konsantrasyonunun tayini.....	48
3.7.2 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE).....	48
3.8 <i>TmSel12A</i> Aktivite Tayini	49
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	51
4.1 <i>tmSel12A</i> Geninin Klonlanması ve Rekombinant Üretimi	51
4.2 Gen Kütüphanesinin Oluşturulması.....	53
4.3 Gen Kütüphanesinden <i>TmSel12A</i> Varyantlarının Taranması	55
4.4 DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	56
4.5 Varyantların Heterolog Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	59
4.6 Doğal <i>TmSel12A</i> ve N143K+F246L ve D11G+L23P+K29R Varyantlarının Enzimatik Karakterizasyonu	60

İÇİNDEKİLER(devam)**Sayfa**

4.6.1 Optimum sıcaklık tayini.....	60
4.6.2 Optimum pH tayini	61
4.6.3 Termal stabilite tayini	61
4.6.4 pH stabilite tayini.....	62
4.6.5 Kinetik parametrelerin tayini	63
5. DEĞERLENDİRME.....	68
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Selüloz zincirinin genel yapısı	1
1.2 Selüloz yapısında bulunan hidrojen bağları	2
1.3 Selülozun enzimatik hidrolizinde görevli enzimler	7
1.4 Selülazların etki mekanizmaları	8
1.5 Rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrimin izlediği yollar	15
2.1 pET-21a(+) vektör haritası	21
3.1 Metal şelat affinite kromatografisi matriksi	47
3.2 Somogyi-Nelson indirgen şeker tayin yönteminin çalışma prensibi..	50
4.1 <i>tm</i> Sel12A kodlayan gen fragmentinin agaroz jeldeki görüntüsü	51
4.2 DNA dizi analizinin sonuçları	52
4.3 Doğal <i>Tm</i> Sel12A enziminin saflaştırılmasına ilişkin SDS-PAGE görüntüsü	53
4.4 Error-prone-PCR sonrası elde edilen fragmentlerin agaroz jel görüntüsü	54
4.5 Gen kütüphanesinin CMC agar petrilerde taranması ve zon oluşumu	56
4.6 N143K+F246L varyantının içerdiği amino asit değişiklikleri	57
4.7 D11G+L23P+K29R varyantının içerdiği amino asit değişiklikleri	58
4.8 <i>Tm</i> Sel12A sekonder yapı içeriğinin şematik gösterimi	58

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 Saflaştırılan N143K+F246L (a) ve D11G+L23P+K29R (b) mutantlarının SDS-PAGE görüntüleri	59
4.10 Optimum sıcaklık grafiği	60
4.11 Optimum pH grafiği.....	61
4.12 Termal stabilite grafiği.....	62
4.13 pH stabilite grafiği.....	63
4.14 Doğal <i>TmSel12A</i> enzimi için Michaelis-Menten grafiği	64
4.15 N143K+F246L mutanıtı için Michaelis-Menten grafiği.....	64
4.16 D11G+L23P+ K29R mutanıtı için Michaelis-Menten grafiği	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Selülitik mikroorganizmalara örnekler	3
1.2 <i>T.maritima</i> endoglukanazları	12
3.1 Doğal <i>tmSel12A</i> geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımı	33
3.2 DNA dizi analizleri için hazırlanan PCR karışımı	34
3.3 Koloni PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı	35
3.4 epPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı	36
3.5 Restriksiyon enzimi reaksiyon karışımları	38
3.6 Restriksiyon enzimi reaksiyon karışımları	39
3.7 Doğal <i>tmSel12A</i> klonlanması için hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımlarının içerikleri	40
3.8 Gen kütüphanesinin klonlanması için için hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımlarının içerikleri	40
3.9 %12,5 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	49
4.1 Doğal ve mutant enzimlerin kinetik parametreleri.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$\text{\AA}$	Ångström (1×10^{-10} m).
bp	Baz çifti.
$^{\circ}C$	Derece Celsius.
dk	Dakika.
kb	Kilobaz çifti (1×10^3 baz çifti).
kDa	Kilodalton (1×10^3 g/mol).
M	Molar
mA	Miliamper (1×10^{-3} amper).
mM	Milimolar (1×10^{-3} molar).
μm	Mikrometre (1×10^{-6}).
MPa	Megapaskal (1×10^6).
ms	Milisaniye (1×10^{-3} saniye).
nM	Nanomolar (1×10^{-9} molar).
nm	Nanometre (1×10^{-9} metre).
U	Unit.
V	Volt.

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat.
CMC	Karboksimetilselüloz
DNA	Deoksiribonükleik asit.
dNTP	Deoksinükleotitfosfat.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	İzopropil– β – D- tiyogalaktopiranozid.
k_{cat}	Turnover sayısı
K_M	Michaelis-Menten sabiti.
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu.
PES	Polietersülfon
PS	Polistiren
rpm	Devir/ dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
tRNA	Transfer RNA

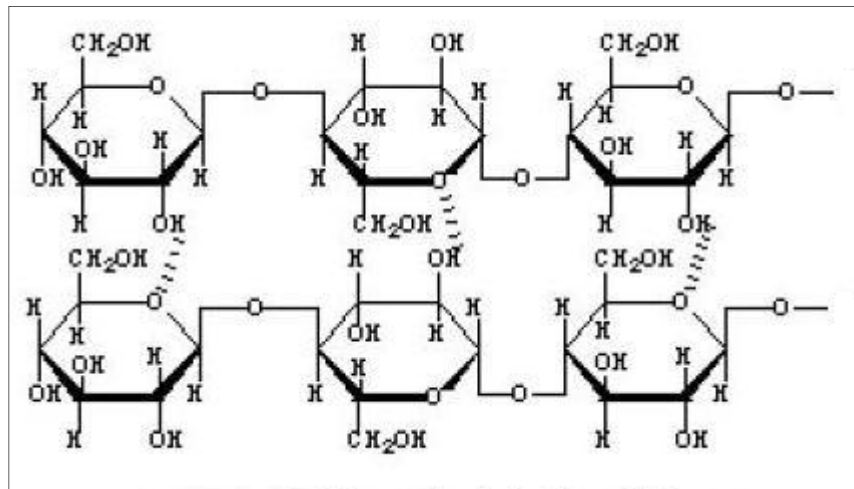
1. GİRİŞ

1.1 Selüloz

Selüloz bütün yüksek bitkilerin, birçok alg ve bazı mantarların hücre duvarını oluşturan temel bileşendir ve bitki kuru ağırlığının yaklaşık %35-50'sini oluşturmaktadır (Cheng et al., 2011). Biyosferde en fazla bulunan organik bileşiklerden birisidir ve yeryüzündeki en büyük organik karbon rezervidir (Yang et al., 2010; Pereira et al., 2010). Bu polisakkaritin, dünyadaki toplam miktarının 7×10^{11} ton olduğu tahmin edilmektedir (Coughlan, 1985). Bu açıdan, yenilenebilir enerji kaynağı olarak muazzam bir potansiyeli vardır (Yang et al., 2010).

Selüloz renksiz, tatsız, hidrofilik, suda ve çoğu organik çözügeinde çözünmeyen, kiral, büyük bir kimyasal çeşitliliğe sahip, çözünmez bir polisakkarittir. Biyolojik degradasyona karşı doğal bir dirençlilik sağlayan rijit yapısı ve çözünmez oluşu ile diğer polisakkaritlerden ayrılmaktadır (Yang et al., 2010).

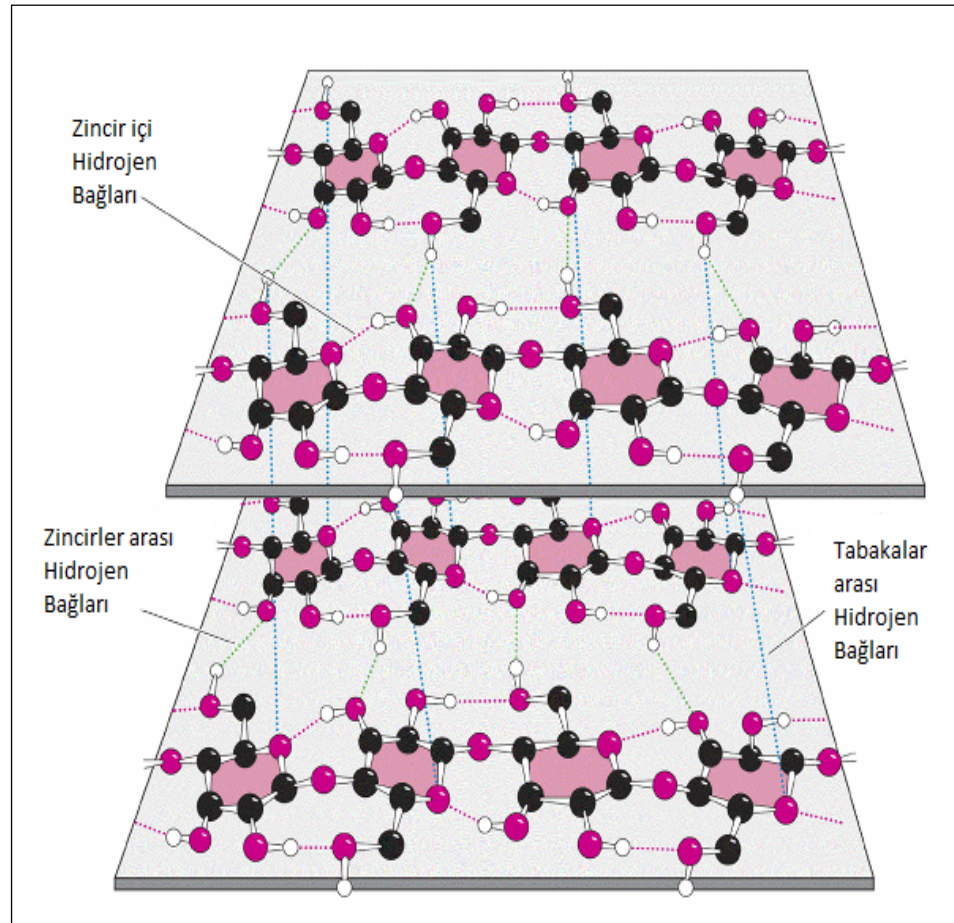
Bitkiler tarafından üretilen selüloz çoğunlukla hemiselüloz, lignin, pektin ve başka maddelerden oluşan bir polimer matriksi içinde bulunur ve lignoselülozik biyokütle olarak tanımlanır. Mikrobiyal selüloz ise oldukça saf, daha yüksek su içerikli ve uzun zincirlerden oluşan bir yapıya sahiptir (Morana et al., 2011). Selüloz zincirinin genel yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Karapınar, 2002).



Şekil 1.1. Selüloz zincirinin genel yapısı

Selüloz düz zincirli bir polimerdir ve $(C_6H_{10}O_5)_n$ genel formülü ile ifade edilmektedir. Sayıları birkaç yüz ile 10.000 arasında değişen 1,4- β -D- glukoz birimi, C4 ile C1 atomlarının ekvatoryal hidroksil (-OH) grupları arasındaki asetal fonksiyonel grupları ile bağlantılıdır (Şekil 1.1) (Jagtap and Rao, 2005). Birkaç yüz nm uzunluğunda olan bu zincirler elektron mikroskobu yardımı ile gözlenebilmektedir (Karaçalı, 2006).

Selülozun yapısında üç farklı hidrojen bağı bulunmaktadır. Zincir içerisindeki hidrojen bağları, tekli zincirin konformasyonunu ve selülozun dayanıklılık derecesini belirlemektedir. Zincirler arası hidrojen bağları, selülozun tekli zincirlerinin yan yana durmasını sağlamaktadır. Tabakalar arası hidrojen bağları ise tabakalı yapıdan sorumludur (Watanabe and Tokuda, 2001; Klemm et al 2002, 2005). Selülozda bulunan hidrojen bağları şekil 1.2’de gösterilmiştir (Fidancı, 2009).



Şekil 1.2 Selüloz yapısında bulunan hidrojen bağları

1.2 Selüloz Hidrolizinde Görevli Enzimler

Selülozun hidrolizinde görevli enzimler, genel olarak selülaazlar olarak adlandırılmaktadır ve glikozil hidrolaz sınıfına (EC 3.2.1.x) ait enzimlerdir.

Çok sayıda selülotik organizma karakterize edilmiştir. Bu organizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik veya termofilik karakterdedir. Çizilge 1.1’de selülotik mikroorganizmalara örnekler gösterilmiştir (Morana et al., 2011).

Çizelge 1.1 Selülotik mikroorganizmalara örnekler

Mikroorganizma	Gram reaksiyonu	Büyüme sıcaklığı (°C)	Büyüme koşulu
Mezofilik selülotik bakteri			
<i>Bacillus pumilus</i>	+	30	Aerobik
<i>Clostridium josui</i>	-	45	Anaerobik
<i>Erwinia carotovora</i>	-	26	Aerobik
Hipertermofilik selülotik bakteri ve Archaea			
<i>Thermotoga maritima</i>	-	80	Anaerobik
<i>Thermobifida fusca</i>	+	50-55	Aerobik
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-	85	Aerobik
Mezofilik selülotik fungus			
<i>Aspergillus niger</i>		30	Aerobik
<i>Piramyces equi</i>		39	Anaerobik
<i>Trichoderma reesei</i>		24	Aerobik
Termofilik selülotik fungus			
<i>Chaetomium thermophilum</i>		45-55	Aerobik
<i>Scytalidium thermophilum</i>		40	Aerobik

Selülaazların büyük çoğunluğu, fungi ve bakterilerde bulunmakla birlikte, protozonlar, bitkiler ve bazı hayvanlar tarafından da sentezlenmektedir (Lee and Koo, 2001; Tomme et al.,1995). Ortamda glukozun bulunması durumunda, selülaaz sentezi baskılanır. Glukozun tükenmesi veya ortamda indükleyicilerin (selülozik materyal vb.) bulunması durumunda selülaaz üretilmektedir (İlmén, 1997).

Genel olarak mikroorganizmalarda, bitki hücre duvarının degradasyonu için iki sistem bulunmaktadır. Birinci sistemde, mikroorganizma selülozu parçalamak için sinerjetik olarak çalışan bir grup serbest enzim üretmektedir. İkinci sistemde ise, degradasyonu sağlayan enzimler selülozom adı verilen bir enzim kompleksi şeklindedir. Aerobik bakteriler ve funguslar çok az düzeyde selülaz üretirler. Anaerobik bakteriler ve funguslar daha yüksek düzeyde selülaz üretmektedirler (Morana et al., 2011).

Selülazlar, selülozda bulunan 1,4- β -D-glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Selülozun geri dönüşümü ve karbon döngüsünde selülazlar doğada önemli bir rol oynamaktadır (Morana et al., 2011). Bu bağların enzim katalizi olmadığı koşulda ve 25°C'deki yarı ömrü 5-8 milyon yıldır (Wolfenden and Snider, 2001).

Selülozun, tamamen sellobioz ve β -glukoz gibi çözünebilir şekerlere parçalanabilmesi için birkaç hidrolitik enzim sinerjetik olarak çalışmaktadır. Selülazlar dört ana grupta sınıflandırılmaktadır (Bhat and Bhat, 1997).

i. Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4)

Çoğunlukla karboksimetilselülazlar olarak bilinen bu enzimler selülozun iç bölgesinde bulunan amorf bölgelerdeki selüloz fibrillerine rastgele saldırarak glikozidik bağları hidrolizlemektedirler. Bunun sonucunda, farklı uzunluklarda oligosakkaritler ortaya çıkarak yeni zincir sonları oluşmaktadır (Lynd et al., 2002; Morana et al., 2011). Bu kataliz polimer uzunluğunda hızlı bir düşüşe ve indirgen şeker konsantrasyonunda hızlı bir artışa neden olmaktadır. Endoglukanazlar, biyokütle dönüşümü ve başka endüstriyel prosesler için önemlidir (Vlasenko et al., 2010).

ii. Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.74)

Mevcut selülazın %40-70'ini oluşturan bu enzimler, mikrobiyal selülaz sistemlerinin temel bileşenidir. Kristal yapıli selülozu yüksek derecede hidrolizleyebilmektedirler. Bu enzimler, polimer zincirlerin indirgen ve indirgen olmayan uçlarından β -glukoz ve sellobioz birimlerini ortaya çıkarmaktadırlar.

iii. Sellobiyohidrolazlar (EC 3.2.1.91)

İndirgen ve indirgen olmayan uçtan iki birim glukoz (sellobioz) ayırarak selüloz zincirini hidrolizlemektedirler. Bu kataliz indirgen şekerin hızlı salınımını sağlarken, polimer uzunluğunda küçük değişimlere neden olmaktadır.

iv. β -glikozidazlar (EC 3.2.1.21)

Bu enzimler glukoz dimerlerini hidrolizleyerek ve bazı durumlarda sellobiyo-oligosakkaritlere etki ederek glukoz birimlerini açığa çıkarmaktadırlar.

Bu enzimlerin tümü selülozdaki 1,4- β -D-glikozidik bağlarını hidrolizlemektedirler. Ancak yapının makroskopik özellikleri bakımından spesifiklikleri farklıdır. Bu enzimler, bir polisakkarit zinciri ile sürekli olarak etkileşim içinde olduklarında aktiftir. Polisakkarit zinciri ile kısa süreli bir etkileşim sonrasında veya polisakkarit zincirinin bir başka polisakkarit zinciri ile etkileşmesi durumunda inaktif enzimlerdir (Morana et al., 2011).

Selülozun çözünmez oluşu selülaz sistemleri için bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle, çoğu selüloolitik enzim katalitik domainlerine ek olarak katalizde görevli olmayan, ancak substratı bağlayan veya hücre yüzeyine bağlanmayı sağlayan selüloz bağlayıcı domainler (cellulose binding domains, CBDs) içermektedir. Bu domainlerin, enzimlerin katalitik bölgelerini selüloza yaklaştırarak degradasyona yardımcı olduğu düşünülmektedir (Tomme et al., 1995).

1.2.1 Selülazların adlandırılması

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) esasları temel alınarak, substrat spesifikliklerine göre numaralandırılmaktadır. Selülazlar, hemiselülazlar ve başka birçok polisakkaridaz ile birlikte O-glikozid hidrolazlar şeklinde sınıflandırılmaktadır (EC 3.2.1.x).

Her bir enzim için substrat çeşitliliği tam olarak belirlenememiştir ve substrat spesifikliğini esas alan sınıflandırma bu nedenle zordur. Bundan dolayı, glikozid hidrolazlar (GH) için amino asit dizi benzerliklerine dayalı alternatif bir sınıflandırma önerilmiştir. Bu sınıflandırmada glikozid hidrolazlar

ailelere ayrılmaktadır (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993; Henrissat and Bairoch, 1996). Bir GH ailesine mensup olan üyeler, aynı protein katlanmasına, genel bir katalitik bölge motifi ve aynı reaksiyon mekanizmasına sahiptirler. Bu sınıflandırmaya göre, farklı aktivitelere ve substrat spesifikliğine sahip bakteri, fungus, bitki ve hayvan enzimleri aynı ailede bulunabilmektedir. Bununla birlikte belirli bir aktivite, birkaç farklı ailede bulunabilir. β -1,4-endoglukanazlar (EG) bu duruma bir örnektir. Yaklaşık 12 GH ailesi tanımlanmıştır: GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 26, 44, 45, 48, 51 ve 74. Benzer özelliklere sahip olan bazı GH aileleri klan adı verilen grupları oluşturmaktadır. Örneğin, GH 11 ve 12 aileleri GH klan-C (GH-C) şeklinde gruplandırılmaktadır (Henrissat and Bairoch, 1996).

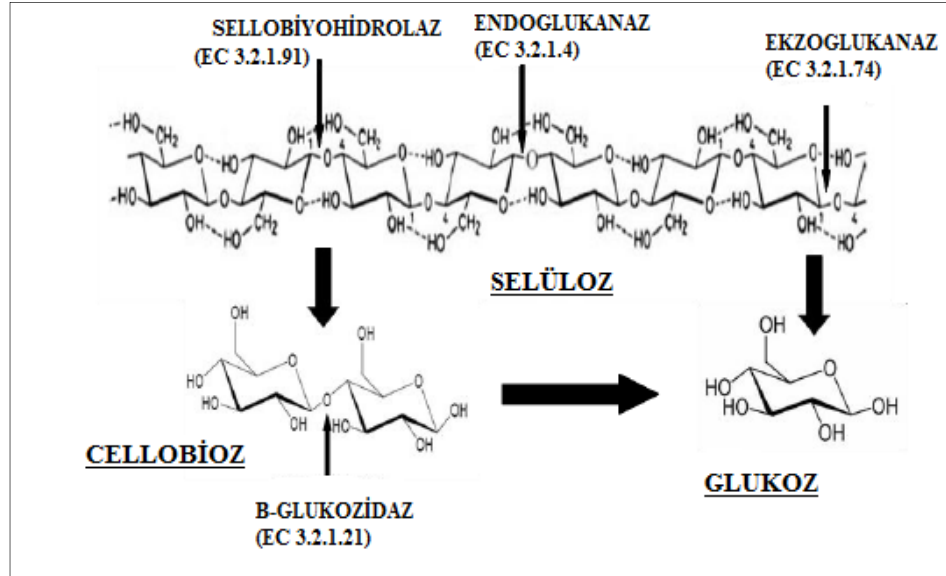
Sınıflandırmaya ek olarak, yeni bir adlandırma şeması da önerilmiştir (Henrissat et al., 1998). Bu adlandırmaya göre, ilk iki harf enzimin ait olduğu organizmayı, ardından gelen üç harf tercih edilen substratı, verilen numara üyesi GH ailesini ve takip eden büyük harf enzimin organizmada rapor edildiği sırayı belirtmektedir. *TmSel12A* şeklindeki adlandırmada, *Tm*, enzimin *Thermotoga maritima* kaynaklı olduğunu, *Sel* enzimin tercih ettiği substratı (selüloz); 12 enzimin GH12 ailesine üye olduğunu; *A* ise *Thermotoga maritima*'da rapor edilmiş ilk GH12 selülaz olduğunu göstermektedir.

GH sınıfı enzimlerinin sayısının giderek artması nedeni ile, Coutinho ve Henrissat tarafından sürekli güncellenen bir veritabanı oluşturulmuştur (<http://www.cazy.org/>) (Coutinho and Henrissat, 1999). Bu veritabanında, 2500'den fazla organizmanın karbohidrat aktif enzimleri, 115 aile şeklinde gruplandırılmıştır.

1.2.2 Selülazların etki mekanizmaları

Kristal yapıli selülozun yıkımı üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada, endoglukanaz internal selüloz zincirlerine etki etmektedir. Daha sonra sellobiyazlar uçlara saldırarak sellobioz açığa çıkarmaktadırlar. Son aşamada, sellobioz ve sello-oligosakkaritler β -glikozidazlar tarafından glukoz oluşturmak üzere hidrolizlenmektedir (Nakazawa et al., 2009). Bu etkileşimlerin karmaşık yapısı nedeni ile selülozdaki herhangi bir modifikasyon, sterik substitusyon veya -OH uzaklaşması, katalizi etkileyebilir (Canterel et al., 2009). Endo ve ekzoglukanazların enzimatik depolimerizasyon adımları, selüloz yıkımında hızı

belirleyici adımlardır (Zhang, 2006). Selülozun enzimatik hidrolizinde görevli enzimler Şekil 1.3'te gösterilmiştir (Morana et al., 2011).

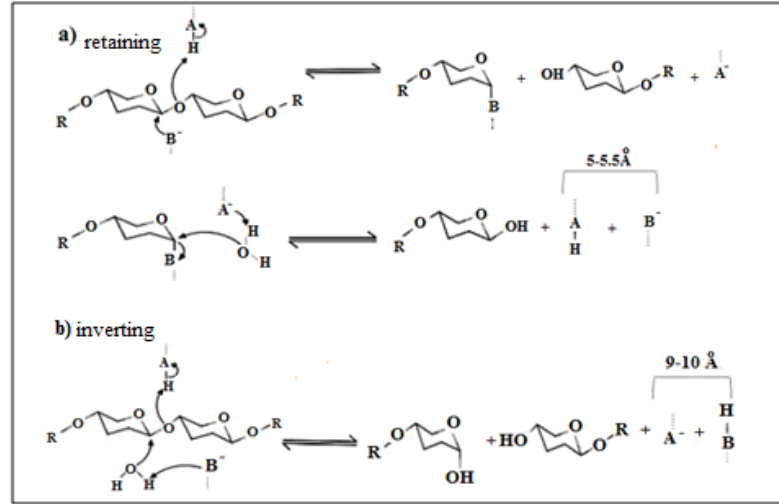


Şekil 1.3 Selülozun enzimatik hidrolizinde görevli enzimler

Selülazların katalitik mekanizması, β -1,4-glikozidik bağlarına nükleofilik saldırı ve asit- baz reaksiyonu içermektedir (Birsan et al., 1998; Vocadlo and Davies, 2008). Glikozidik bağların yıkımı, glikozil-okzokarbokasyon ara ürünü ve katalitik asit/nükleofil olarak görev yapan iki asidik amino asit yan grubunun katılımı ile, anomerik karbonun konformasyonunu aynı tutan veya ters çeviren mekanizmalara göre gerçekleşmektedir (Vlasenko et al., 2010). Koshland, glikozid hidrolazların katalitik aktivitesine ilişkin iki ayrı etki mekanizması öne sürmüştür (Koshland, 1953). Selülazların önerilen katalitik mekanizmaları Şekil 1.4'te gösterilmiştir (Morana et al., 2011). Önerilen birinci etki mekanizmasının (retaining mekanizması) ilk basamağında, karboksilat gruplarından biri asit katalizörü (AH) gibi davranır ve glikozidik oksijeni protonlar. Eş zamanlı olarak ikinci karboksilat olan baz (B⁻) ise anomerik karbona nükleofilik saldırıyı gerçekleştirerek glikozil-enzim ara ürününü oluşturur. İkinci adım olan deglikozilasyonda, oluşan glikozil-enzim bir su molekülü ile hidrolizlenir ve anomerik karbondaki bu ikinci nükleofilik substitusyon sonucu başlangıçtaki substratla aynı stereokimyada ürün oluşur (Kelly et al., 1979; Davies and Sinnott, 1997, McCarter and Withers, 1994).

Önerilen ikinci mekanizmaya (çevrilme (inverting) mekanizması) göre, substratın yıkımı sonrasında anomerik karbon (C1) atomunun konfigürasyonunda

net bir dönüşüm oluşur. Örneğin, β -glikozidik bağın hidrolizi sonucu α - konfigürasyonuna sahip bir ürün oluşur. Yıkım tekli nükleofilik yer değiştirme mekanizması ile gerçekleşir. Bu katalitik mekanizma iki katalitik karboksilat grubu içermektedir. Glikozidik oksijen bir asit yan grubu tarafından protonlanır ve ayrılma reaksiyonuna baz (B^-) tarafından aktive edilmiş bir su molekülünün saldırısı eşlik eder. Bu tekli substitüsyon sonucunda substrat ile ters stereokimyaya sahip ürün oluşur.



Şekil 1.4 Selülozların etki mekanizmaları

GH12 ailesi enzimlerinin glikozidik bağları retaining mekanizması ile hidrolizlemesi sonucu başlangıçtaki substratla aynı stereokimyada ürün oluşur ve bu enzimler çoğunlukla transglikozilasyon özelliklerine sahiptir (Davies and Sinnott, 1997; McCarter and Withers, 1994).

1.2.3 Selülozların kullanım alanları

Selülozlar, 30 yılı aşkın süredir ticari olarak kullanılmaktadır (Kuhad et al., 2011). Dünyada en fazla kullanılan üçüncü enzimdir (Pereira et al., 2010). Selülozlar gıda, tekstil, deterjan, kağıt, küspe, hayvan yemi, çevre koruması ve atık yönetimi, farmasötik, biyoenerji, biyoyakıt, meyve suyu, zeytin yağı, şarap ve bira endüstrilerinde kullanılmaktadır (Lin et al., 2011; Yang et al., 2010; Pereira et al., 2010; Kuhad et al., 2011). Lignoselüloolitik biyoyakıt yenilenebilir ve sürdürülebilir olması nedeni ile fosil yakıta iyi bir alternatiftir (Wang et al., 2012). Selülozik atıklardan etanol üretim maliyeti düşürüldüğü takdirde, selüloz ve selülozün pazardaki oranının çarpıcı bir şekilde artacağı belirtilmektedir (Cherry and Fidantsef 2003; Pereira et al., 2010).

1.2.3.1 Kağıt ve küspe endüstrisi

Selülozlar bu endüstrinin farklı uygulamalarında 10 yıldır kullanılmaktadır (Kuhad et al., 2011). Bu uygulamalar arasında, biyomekanik prosesler, kağıt geri dönüşümünde mürekkep uzaklaştırılması gibi uygulamalar bulunmaktadır (Bhat, 2000). Selülozların kullanıldığı proseslerde %20-40 arasında enerji tasarrufu sağlanmaktadır (Bhat, 2000; Kuhad et al., 2011; Morana et al., 2011). Bunun yanında, selüloz uygulamaları ile elde edilen kağıtların beyazlık ve parlaklık derecelerinin arttığı gözlenmiştir (Singh et al., 2007). Mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılmasının temel avantajları, alkali kullanımını düşürmesi ya da tamamen ortadan kaldırması, lif parlaklığını ve dayanıklılığını arttırması ve daha temiz bir görünüm sağlamasıdır. Asidik koşullarda mürekkep uzaklaştırılması alkali sararmayı önlemekte, mürekkep uzaklaştırma işlemini basitleştirmekte, gerekli kimyasal miktarını ve çevre kirliliğini azaltmaktadır (Stork and Puls, 1996; Kuhad, 2011).

1.2.3.2 Tekstil endüstrisi

Selüloz temelli tekstillerin kalitelerini arttırma ve görünümelerini güzelleştirme amacını taşıyan işlemlerde en başarılı şekilde kullanılan enzimler selülozlardır (Kuhad et al., 2011). Kotların, pamuk ve diğer selülozik kumaşların biyotaşlanması ve biyocilalanmasında selülozlar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ponza taşı kullanılarak yapılan taşlama işlemi liflerin zarar görmesine, makinelerin çabuk aşınmasına, güvenli olmayan çalışma koşullarına, cep ile kumaş katlarının arasındaki taşların el ile çıkarılması gerekliliğinden dolayı iş yüküne neden olmaktadır. Volkan taşı yerine selülozların kullanımı ile bu dezavantajlar bertaraf edilmiş ve çevrenin daha az zarar görmesi sağlanmıştır (Bhat, 2000; Kuhad et al., 2011). Asidik selülozların kullanımı, yumuşaklığı ve liflerin su tutabilirliğini arttırmakta, pamukçuk oluşum eğilimini güçlü bir şekilde azaltmakta ve daha az tüylü, pürüzsüz, yumuşak ve parlak, temiz yüzey yapısı sağlamaktadır (Sreenath et al., 1996).

1.2.3.3 Deterjan endüstrisi

Selülozların deterjanlarda kullanılmalarının en önemli sebebi biyoçözünür olmaları ve çok az miktarlarının, çok büyük miktarlardaki kimyasal katalizör yerine geçmesidir (Morana et al., 2011). Selülozlar pamuk içeren kumaşlarda renk parlaklığını, dokunuşu ve kir çıkarıcılığını arttırmaktadır. Alkali selülozlar,

deterjan sanayisinde potansiyel bir deterjan katkı maddesidir. Bu enzimler, fibrillerin iç kısımları ile etkileşerek fibriller arasındaki alanda biriken kirin geleneksel deterjanların varlığında uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır (Sukumaran et al., 2005; Singh et al., 2007; Kuhad et al. 2011).

1.2.3.4 Gıda işleme endüstrisi

Gıda işleme endüstrisinde selülozlar; hemiselülozlar, pektinazlar ve ksilanazlar ile birlikte maserasyon enzimleri olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Meyve ile sebze sularının elde edilmesi, meyve nektar ve pürelerinin üretimi, zeytinyağı ve karotenoid ekstraksiyonu gibi uygulamalarda işlev göstermektedirler. Selülozlar, diğer maserasyon enzimleri ile birlikte, ekstraksiyonu ve berraklaştırmayı kolaylaştırmakta, verimi ve ek bir sermaye yatırımı gerektirmeden proses performansını arttırmakta, tropikal meyvelerin nektar ve pürelerinin viskozitesini azaltmaktadır (Kuhad et al., 2011; Bhat 2000).

1.2.3.5 Ziraat endüstrisi

Selülozların, hemiselülozlar ve pektinazların farklı oranlarda birleşimlerinden oluşan enzim preparatları, ekinlerin büyümesini arttırıcı ve bitki hastalıklarını kontrol edici özellikleri dolayısı ile ziraat alanında kullanılmaktadır. Selülozlar aynı zamanda, toprak kalitesinin artırılması amacı ile de kullanılmaktadır (Kuhad et al., 2011).

1.2.3.6 Hayvan yemi endüstrisi

Selülozların ve hemiselülozların kullanımı, yem miktarını ve hayvan performansını arttırmadaki potansiyelleri dolayısı ile dikkat çekicidir (Dhiman et al., 2002; Kuhad et al., 2011). Bu enzimlerin kullanımı, tavukta ve domuzda sindirimi ve adsorpsiyonu arttırdığı için ağırlık artışı sağlayabilmektedir (Singh et al., 2007; Bhat, 2000; Kuhad et al., 2011). Yem stok üretiminde termofilik selülozların kullanımı potansiyel patojenleri azaltabileceği gibi, yemin besin değerini ve sindirimini de arttırmaktadır (Bhat, 2000).

1.2.3.7 Şarap ve bira endüstrisi

Selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazların kullanımı, bira üretimi ve şarap biyoteknolojisinde son ürün kalitesini arttırmak ve kimyasal madde kullanımını

ortadan kaldırmak amacı ile kullanılmaktadır. Enzim kullanımı, lapanın vizkositesini düşürmekte ve tüm prosesin verimini artırmaktadır. Selülitik ve hemiselülitik enzimler, parçalanamayan lignoselülozik biyokütlenin, fermente edilebilen şekerlere dönüşümünü ve alkol düzeyini fark edilebilir oranda arttırmaktadır. Ürünün kalitesi artarken tüm prosesin maliyeti azalmaktadır (Morana et al., 2011).

1.2.3.8 Biyoetanol üretimi

Biyoetanol üretimi, üç aşamada gerçekleşmektedir. Birinci adımda selüloz ve hemiselülozun ligninden ayrılması için delignifikasyon gerçekleştirilir. İkinci adımda sakkarifikasyon gerçekleştirilir ve polisakkaritler fermente edilebilir şekerlere dönüştürülür. Bu aşamada endoglukanaz, β -glukozidaz, ksilanaz, α -arabinozidaz, β -ksilozidaz gibi birkaç enzimin birlikte çalışması gerekir. Üçüncü adımda da maya veya başka mikroorganizmalar, açığa çıkan heksoz veya pentoz şekerleri kullanarak etanol üretimini gerçekleştirir (Morana et al., 2011).

1.2.3.9 Atık yönetimi

Ormanlar, zirai alanlar ve endüstriler büyük miktarda, çevre kirliliğine neden olan selüloz üretmektedir (Milala et al., 2005; Kuhad et al., 2011). Günümüzde selülitik enzimlerden yararlanarak bu atıkların kullanılması ve enzim, şeker, biyoyakıt ve kimyasal madde üretimi ya da fermentasyon için ucuz enerji kaynakları sağlanmaktadır. Hayvan yemi ve gıda maddeleri gibi değerli ürünler elde edilmektedir (Kuhad et al., 2011).

1.3 *Thermotoga maritima* Selülazları

Anaerobik *Thermotoga maritima* genomu tamamen aydınlatılmış ilk organizmalardan biridir. Hipertermofilik bir organizma olan *T. maritima* geniş bir pH aralığına sahip (5,5-9) ve sıcaklıkları 55-90°C (optimum 80°C) olan sıcak su kaynaklarında bulunmaktadır. Bu mikroorganizma, çeşitli basit ve kompleks karbohidratları (glukoz, sükroz, nişasta, selüloz ve ksilanı) metabolize edebilmesi dolayısı ile dikkat çekmektedir (Liebl et al., 1997; Lim et al., 2003; Huber et al., 1986). Diğer arkea ve bakteri genomları ile karşılaştırıldığında, en fazla glikozid hidrolaz çeşidine sahip olan mikroorganizmadır (Chhabra et al., 2003) *T.maritima* genlerinin %7'sinin karbohidrat kullanımı, yıkımı ve metabolize edilmesi ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir (Nelson et al., 1999).

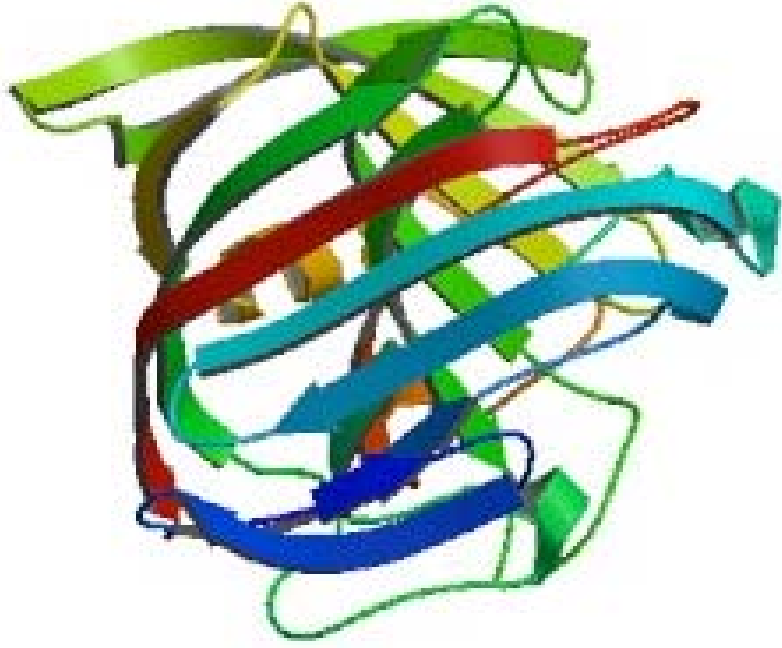
T.maritima'nın genomu incelendiğinde, glikozid hidrolaz aileleri içinde sınıflandırılabilen birkaç endoglukanaz varlığı görülmektedir. Bronnenmeier et al. (1995) tarafından ilk olarak selüloz I ile selüloz II izole edilmiştir. Bu çalışmanın ardından, Liebl et al. (1996) tarafından selüloz I'in Sel12A (Tm1524), Connors et al. (2006) tarafından selüloz II'nin Sel12B olduğu gösterilmiştir. Bu enzimler ile birlikte *T.maritima*'nın Sel5A, Sel5B, Sel74 ve β -1,4-glukanazları taşıdığı gösterilmiştir. Sel12B ile Sel74 endoglukanazları N-terminallerinde bulunan sinyal dizileri nedeni ile ekstraselüler enzimlerdir. Sel5A, Sel5B ve Sel12A intraselüler enzimlerdir (Chhabra and Kelly, 2002). *T. maritima*'dan karakterize edilmiş endoglukanazlara ait bazı özellikler çizelge 1.2'de verilmiştir (Chabba et al., 2002a, Khan et al., 2007, Liebl et al., 1996, Chabba et al., 2002b).

Çizelge 1.2 *T.maritima* endoglukanazları

	İçerdiği amino asit sayısı	Molekül ağırlığı (kDa)	Opt. pH	Opt. T	Katalitik amino asitler
<i>TmSel5A</i> (TM1751)	317	37.3	6	80°C	Glu137/Glu253
<i>TmSel5B</i> (TM1752)	329	39.3	6.6	70°C	Glu139/Glu259
<i>TmSel12A</i> (TM1524)	258	29.8	6	95°C	Glu134/Glu 231
<i>TmSel12B</i> (TM1525)	274	31.7	6	85°C	Glu152/Glu250
<i>TmSel74</i> (TM0305)	707	79.4	6	90°C	Asp x/ Asp x

258 amino asitten oluşan *T. maritima* selüloz 12A (*TmSel12A*), GH12 glikozid hidrolazlar ailesi içinde yer almaktadır ve bir β -1,4-endoglukanazdır (Liebl et al., 1996). Selülozu daha küçük fragmentlere retaining mekanizmasını kullanarak parçalayan, karbohidratın kullanımını kolaylaştıran bir enzimdir. Hipertermofilik doğası nedeni ile endüstriyel uygulamalar açısından avantajlıdır. GH12 ailesi, GH11 ailesi ile yakın ilişkilidir ve birlikte klan C'yi oluşturmaktadırlar (Cheng et al., 2010; Cheng et al., 2012).

TmSel12A'nın β -sandviç yapısının iç kısmı hidrofobik amino asitlerce zengindir ve protein çekirdeğini oluşturmaktadır. Hidrofobik amino asitlerin yanında aromatik amino asitler de (özellikle fenilalanin) bulunmaktadır. Protein çekirdeğinin merkezi birkaç triptofan ve tirozin yan grubu tarafından çevrelenmektedir (Trp26, Trp75, Trp118, Trp138, Trp176, Trp178 ile Tyr61, Tyr65, Tyr180). Substrat bu amino asit artıkları ile etkileşmektedir. Glu134 ve Glu231 katalitik amino asitlerdir. *TmSel12A*'nın katalitik etkinliği, substrat bağlama ve ürün serbest bırakma arasındaki hassas dengeye bağlıdır (Cheng et al., 2010). *TmSel12A* enzim yapısının ribbon gösterimi Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.5 *T.maritima* Sel12A enziminin ribbon gösterimi (PDB kodu: 3AMH)

1.4 Protein Mühendisliği

Bir proteinin özelliklerinin geliştirilmesi amacı ile yapısı üzerinde değişiklikler yapılmasına yönelik gerçekleştirilen uygulamalar protein mühendisliği olarak adlandırılmaktadır. Protein mühendisliği, özellikle endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler için önemlidir. Yüksek sıcaklık, organik çözügen, yüksek derecede asidik veya bazik ortam gibi koşullarda gerçekleşen endüstriyel proseslerde birçok enzimin aktivitesi düşer ya da enzim tamamen inaktivasyona uğrar. Protein mühendisliği kullanılarak, enzimlerin bu gibi koşullarda çalışabilecek şekilde geliştirilmesi ve maliyet azaltılması mümkündür (Cherry and Fidantsef, 2003). Bir enzimin özelliklerinin geliştirilmesi için

rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrim olmak üzere iki strateji mevcuttur (Zhang et al., 2006b).

1.4.1 Rasyonel tasarım

Rasyonel tasarım 20 yıl önce kullanılmaya başlanmış ilk protein mühendisliği yaklaşımıdır. Bu strateji için protein yapısı, biyolojik katalizin yapısal temelleri ve yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında detaylı bilgi gerekmektedir (Zhang et al., 2006b). Rasyonel tasarım doğal enzimlerin termal kararlılık gibi özelliklerini geliştirmek için biyoteknolojide kullanılmaktadır (Leisola and Turunen, 2007).

Rasyonel tasarım prosesi uygun enzimin seçimi, amino asit değişikliklerinin yüksek çözünürlüklü kristal yapısı temel alınarak tanımlanması ve mutantların karakterizasyonu aşamalarından oluşmaktadır. Modifikasyon yapılacak protein bölgesinin tanımlanması, sadece bölgenin var olan fonksiyon bilgisini değil aynı zamanda istenilen yeni fonksiyonun da bilgisini gerektirmektedir (Zhang et al., 2006b). Bu bilgiler doğrultusunda, bilgisayar simülasyonları yardımı ile aktif merkez özellikleri, substrat bağlanması, termal kararlılık ve protein katlanması incelenabilir (Leisola and Turunen, 2007). Ancak, birçok enzim için yapı ve mekanizma bilgisi bulunmamaktadır. Hedef enzim ile ilgili yapı ve katalitik mekanizma bilgisi olsa da, istenilen özelliği kazandırmak için gerekli moleküler modifikasyon için yeterli bilgi olmadığı durumlar mevcuttur (Arnold, 2001).

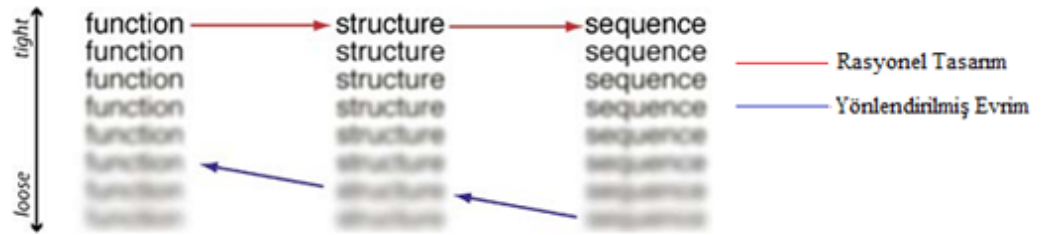
Rasyonel tasarım, aktif merkez yakınında veya substrat bağlayıcı cepte bulunan amino asit yan gruplarının üç boyutlu yapıya etkilerini incelemek için uygulanabilir bir yoldur (Bromscheuer and Pohl, 2001). Bununla birlikte, birçok önemli enzimatik özelliğin az sayıdaki katalitik amino asit yan grupları ile sınırlı olmadığı ve proteinin başka bölgelerinde de lokalize olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, rasyonel tasarımın başarısı yalnızca iyi bilinen reaksiyon ve enzimler ile sınırlı kalmıştır. (Zhang et al., 2006b)

1.4.2 Yönlendirilmiş evrim

Kararlı, çözünür formda, substrata bağlanabilen ve katalitik grupların geçiş durumunu yönlendirebilen bir enzimi rasyonel tasarım ile elde etmek çok zordur. Bunun yanında, yeni fonksiyonel proteini oluşturmak için doğru protein katlanmasını tanımlamayı sağlayacak teorik bir taslak çalışmanın olmaması,

enzim mühendislerini yönlendirilmiş evrim çalışmalarına yöneltmektedir (Leisola and Turunen, 2007).

Rasyonel tasarım çalışmalarının izlediği yol fonksiyondan yapıya, yapıdan diziye doğrudur. Yönlendirilmiş evrimde ise yol bunun tam tersidir (Leisola and Turunen, 2007).



Şekil 1.5 Rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrimin izlediği yollar

Rastgele mutajenez veya yönlendirilmiş evrimde protein yapısında rastgele değişiklikler oluşturabilmek için, oluşan yeni protein varyantları arasından etkin seçim yapabilen tekniklere gereksinim duyulmaktadır. Oluşturulan varyantlar, spesifik bir özelliğe göre seçilmektedirler. Bu seçimin istenilen fonksiyona yönelik olmasından dolayı, yönteme yönlendirilmiş evrim adı verilmiştir (Leisola and Turunen, 2007).

Farinas et al. (2001), başarılı bir yönlendirilmiş evrim için gereksinimleri şu şekilde belirtmiştir:

- i. Hedeflenen fonksiyon, fiziksel, biyolojik ve evrimsel olarak gerçekleştirilebilir olmalıdır.
- ii. Hedeflenen fonksiyonu içerecek şekilde, yeteri büyüklükte bir mutant kütüphanesi oluşturulmalıdır.
- iii. Hedeflenen fonksiyonu yansıtacak şekilde hızlı bir tarama veya seçim yöntemi geliştirilmelidir.

Yönlendirilmiş evrim çalışmaları genel olarak dört adımdan oluşmaktadır (Wang et al., 2012). İlk adım atasal proteinin seçimini kapsar. Bu protein çoğunlukla hedeflenen fonksiyona benzer bir fonksiyona sahiptir, ancak istenilen

uygulama için en uygun olanı değildir. İkinci adımda, atasal protein temel alınarak bir mutant kütüphanesi oluşturulur. Mutant kütüphanesi oluşturmak için birçok yöntem mevcuttur. Kimyasal mutajenez, mutator suş kullanımı, error-prone PCR, DNA karıştırma (Labrou, 2010; Wen et al., 2009) yaygın olarak kullanılmaktadır. Kütüphane oluşturulması nispeten kolaydır, ancak kritik bir adımdır. Üçüncü adım, varyantlar arasında hedeflenen özelliği gelişmiş olan varyantı bulmaktır. Bu, yönlendirilmiş evrim deneylerinde en zorlayıcı adımdır (Seeling, 2011). Son adım, tüm süreci istenilen fonksiyonu elde edene veya daha çok geliştirmek mümkün olmayıncaya kadar tekrarlamaktır. Genellikle, böyle bir döngünün haftalar ile aylar sürebilmesi yönlendirilmiş evrim için bir dezavantajdır (Wang et al., 2012).

Yönlendirilmiş evrimin en büyük avantajı, enzim yapısı ve enzim ile substrat arasındaki etkileşim bilgisinden bağımsız olmasıdır. Çözülmesi gereken en büyük sorun ise, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak geliştirilen mutantların performanslarını doğru şekilde değerlendirecek araçların geliştirilmesidir. Yönlendirilmiş evrim deneylerinin başarısı, en iyi mutant enzimi bulmak için kullanılan metoda bağlıdır (Zhang, 2006).

1.5 Selülaazlar İle İlgili Gerçekleştirilen Protein Mühendisliği Çalışmaları

Yönlendirilmiş evrim uygulamaları, selülaazların özelliklerini geliştirmek için kullanılan en etkili yöntemlerden biridir. Selülaazlar, düşük kararlılığa ve yüksek üretim maliyetine sahiptir. Bu da enzimin endüstriyel uygulamalarını kısıtlamaktadır. Yüksek adsorpsiyon kapasitesi, yüksek katalitik etkinlik ve termal kararlılık, düşük ürün inhibisyonu ve düşük maliyet gibi özelliklere sahip selülaazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Lin et al., 2011).

Selülaazların çeşitli özelliklerinin geliştirilmesine yönelik yönlendirilmiş evrim çalışmaları mevcuttur. Nakazawa et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Trichoderma reesei* QM9414 suşunun Sel12A enziminin kararlılığı ve spesifik aktivitesi, error-prone PCR kullanılarak artırılmış ve ekspresyon etkinliği optimize edilmiştir. İki döngü sonucunda 2R4 (G41E/ T110P/ K173M/ Y195F/ P201S/ N218I) varyantı elde edilmiştir. Bu mutantın, doğal enzime kıyasla geniş bir pH aralığında (doğal enzim pH 4.4-5.2; 2R4 pH 4.4-8.8) aktivite gösterdiği ve termal kararlılığının daha yüksek olduğu (55°C’de doğal enzimin inaktivasyonu 30 dk; 2R4 varyantı 30 dk inkübasyon sonunda aktif) belirlenmiştir. 2R4

varyantının karboksimetilselüloza karşı k_{kat} değeri 1,4 kat artarken, K_M değeri 2 kat artmıştır.

Liang et al., (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 suşunun Sel5A enzimi için üç döngü error-prone PCR gerçekleştirilmiş ve doğal enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösteren mutant varyantlar elde edilmiştir. Bu varyantların, *Escherichia coli* sistemindeki ekspresyon düzeylerinin arttığı ve karboksimetilselüloza karşı doğal enzimden daha yüksek spesifik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Bunun yanında, doğal enzimin optimum sıcaklığı olan 75°C-80°C'den düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösteren mutantlar belirlenmiştir.

Lin et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* BME-15 suşunun Sel5A enzimi için error-prone PCR ve DNA karıştırma yöntemleri uygulanmış ve doğal enzime göre kıyasla yüksek aktivite gösteren birkaç mutant elde edilmiştir. Bu varyantların karboksimetilselüloza karşı 2,03-2,68 kat daha yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunun yanında, bir varyantın daha yüksek termal kararlılık ve daha geniş pH toleransı özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur.

Qin et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Trichoderme reesei* endoglukanaz II enziminin 342. amino asidi nokta mutasyonları ile değiştirilmiştir. Nokta mutasyonu içeren mutant daha sonra rastgele mutajenez ve iki döngü DNA karıştırma işlemine maruz bırakılmıştır. M342V mutantının optimum pH'ının, doğal enzime kıyasla bir birim kayarak pH 5,8 değerine değiştiği belirlenmiştir. Bunun yanında, mutantın pH 6,2'deki katalitik etkinliğinin (k_{cat}/K_M) doğal enzime kıyasla 1,5 kat arttığı gösterilmiştir. N342R/ L218H, Q139R/ N342T ve Q139R/ L218H/ W276R/ N342T varyantlarının doğal enzimden daha yüksek aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir.

Bu konuda tamamlanmış bir doktora tezinde (Zhang, 2006), *B.subtilis* ZJF-IAS suşunun β -glukanaz enziminde error-prone PCR ve DNA karıştırma yöntemleri uygulanmıştır. Bunun sonucunda, termal kararlılıkları doğal enzime kıyasla 3-5°C artmış olan EGs1 ile EGs2 mutantları elde edilmiştir. Bunun yanında, mutant enzimlerin optimum sıcaklığının 5°C arttığı ve EGs2 varyantı için optimum pH'ın 6,5'dan 7'ye değiştiği bulunmuştur.

Bu tez çalışmasının amacı, error-prone PCR kullanılarak, hipertermofilik *T.maritima*'nın Sel12A enziminin pH kararlılığını arttırmak ve farklı endüstriyel alanlarda kullanıma uygun bir mutant elde etmektir.

2. MATERYAL

2.1 Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada klonlama amacıyla kullanılan bakteriler aşağıda belirtilmiştir:

E. coli XL1 Blue MRF (STRATAGENE, Santa Clara, Kaliforniya, ABD)

$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 } supE44 \text{ thi-1 } recA1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac } [F' \text{ proAB } lacI^qZ\Delta M15 \text{ Tn10 } (Tet^r)]$. Bu hücreler tetrasiklin dirençlidir ve bilinen tüm restriksiyon sistemleri yönünden kusurludur.

E. coli Turbo (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main, Almanya)

$F' \text{ proA+B+ } lacI^q \Delta \text{ lacZ } M15/ \text{ fhuA2 } \Delta(lac\text{-}proAB) \text{ glnV } gal \text{ R}(zgb\text{-}210::Tn10)Tet^S \text{ endA1 } \text{ thi-1 } \Delta(hsdS\text{-}mcrB)5$. Bu hücreler NEB Turbo olarak da bilinir ve T1-faj dirençlidir. *E. coli* Turbo hücreleri 37°C'de inkübasyonun sekizinci saatinde görünür koloniler oluşturmaktadır.

Bu çalışmada protein ekspresyonu amacıyla kullanılan bakteriler aşağıda belirtilmiştir:

E.coli Rosetta™ (DE3) (NOVAGENE, Darmstadt, Almanya)

$F' \text{ ompT } hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal \text{ dcm } (DE3) \text{ pRARE}^2 (\text{Cam}^R)$, *E.coli* tarafından nadiren kullanılan kodonları içeren ve BL21 suşundan türevlendirilmiş bir suştur. Rosetta suşu AUA, AGG, AGA, CUA, CCC ve GGA kodonlarına tRNA sağlayan kloramfenikol dirençli pRARE plazmidini içerir. Bu sayede Rosetta suşu, *E.coli* kodon kullanımı tarafından kısıtlanacak olan translasyon limitini aşar. tRNA genleri doğal promotorları tarafından kontrol edilir.

E.coli BL21 (DE3) codon plus RP (STRATAGENE, Santa Clara, Kaliforniya, ABD)

$F' \text{ ompT } hsdS(r_B^- m_B^-) \text{ dcm}^+ \text{ Tet}^r \text{ gal } \lambda(DE3) \text{ endA } Hte [argU \text{ proL } Cam^r]$. Bu suş *argU* ve *proL* genlerinin ekstra kopyalarını içerir. Bu genler, arginin kodonları olan AGA ve AGG ile prolin kodonu olan CCC kodonlarını tanıyan tRNA'ları kodlar.

E.coli BL21 (DE3) codon plus RIPL (STRATAGENE, Santa Clara, Kaliforniya, ABD)

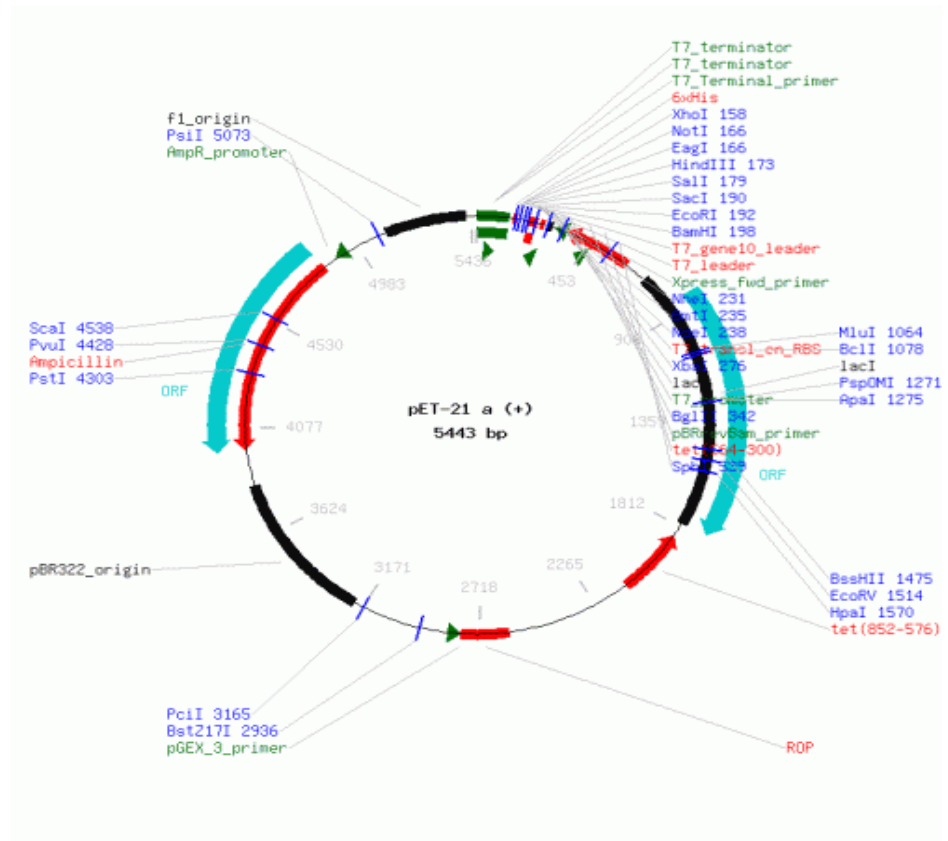
F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA metA::Tn5(kan^r) Hte [argU proL Cam^r]. Bu suş, fazladan *argU*, *ileY*, *leuW* ve *proL* tRNA genlerini içerir. Genomu AT- veya GC- açısından zengin organizmaların heterolog protein ekspresyonları için kullanılır.

E.coli BL21 (DE3) codon plus RP ile *E.coli* BL21(DE3) codon plus RIPL hücreleri, heterolog proteinlerin *E.coli*'de yüksek düzeyde üretimine imkan tanımaktadır. Heterolog proteinlerin *E.coli* hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyonu, çoğunlukla heterolog proteinlerin bulunduğu organizmaya özgü olan nadir tRNA'lar tarafından kısıtlanır. BL-21 codon plus suşları, *E.coli* hücrelerinde heterolog protein ekspresyonunu en çok kısıtlayan tRNA'ları kodlayan genlerin ekstra kopyalarını içermektedir.

2.2 pET-21a (+) Plazmid Vektörü

pET sisteminde (NOVAGEN, Darmstadt, Almanya), *E.coli* promotorlarına dayalı sistemlerden (*lac*, *tac*, *pL*) farklı olarak T7 promotoru bulunur ve hedef genin transkripsiyonu *E. coli* RNA polimeraz yerine T7 RNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Bu amaçla kromozomunda T7 RNA polimeraz genini taşıyan özel *E.coli* suşları hazırlanmıştır. Bu suşlarda T7 RNA polimeraz geni *lac* promotorun aşağı akış (downstream) bölgesine klonlanmıştır ve transkripsiyon izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid (IPTG) ile indüksiyon sonucu gerçekleşmektedir. Hedef genin transkripsiyonu vektördeki *lac* operatörü, *lacI* ve büyüme ortamına eklenen IPTG tarafından kontrol edilmektedir (Studier *et al.*, 1990).

Polibağlayıcı bölgenin 3' bölgesinde altı histidin kodonu bulunmaktadır. C-terminalde altı histidin ((His)₆-tag) içerecek şekilde ifade edilen protein, nikel-şelat afinite kromatografisinden yararlanılarak saflaştırılabilir. pET-21a(+) plazmid vektörü beta-laktamaz kodlayan ampisilin dirençlilik geni (*bla*) içermektedir ve vektörü taşıyan hücreler bu şekilde seçilebilir. Şekil 2.1'de pET-21 a(+) vektörü haritası gösterilmiştir.



Şekil 2.1 pET-21a(+) vektör haritası

2.3 PCR Primerleri

Gerekli restriksiyon enzim tanıma bölgelerini içerecek şekilde tasarlanan primerler METABION (Martinsried, Almanya) firmasından temin edildi. Aşağıda nükleotid dizileri verilen primerlerde, restriksiyon enzim tanıma bölgeleri alt çizgi ile gösterilmiştir.

2.3.1 Vektöre spesifik primerler

Aşağıdaki primerler koloni PCR ve klonlanan genin DNA dizi analizi amacı ile kullanıldı.

5' T7 Promotor

5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

3' T7 Terminatör

5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

2.3.2 Gen amplifikasyon ve kütüphane primerleri

5' - *TmCel12A Hind III*

5' - CCC AAG CTT ATG GTG GTA CTG ATG-3'

3' - *TmCel12A NotI*

5' - ATA GTT TAG CGG CCG CTT CTC TCA CCT CC-3'

5' - *Lib TmCel12A HindIII*

5' - GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT G-3'

3' - *Lib TmCel12A NotI*

5' - GTG GTG GTG GTG CTC GAG TGC GGC CGC-3'

2.4 DNA ve Protein Standartları

Agaroz jel elektroforezinde DNA standardı olarak HelixRuler™ 100 bp DNA Ladder (100-1000 bç), HelixRuler™ 1 kb⁺ (I) DNA Ladder (100-12000 bç) (NANOHELIX, Daejeon, Güney Kore), GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder (100-3000 bç) ve GeneRuler™ Express DNA Ladder (100-5000 bç) (THERMO SCIENTIFIC, Massachusetts, ABD) kullanıldı.

SDS-PAGE elektroforezinde protein standardı olarak Unstained Protein MW Marker (THERMO SCIENTIFIC, Massachusetts, ABD) kullanıldı. İçerdiği proteinler: β -galaktozidaz (116 kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), laktat dehidrogenaz (35 kDa), restriksiyon endonükleaz Bsp981 (25 kDa), β - laktoglobülin (18,4 kDa), lizozim (14,4 kDa).

2.5 Enzimler

DNA polimeraz (Dream Taq DNA polimeraz ve Fermentas Taq polimeraz) ve T4-DNA Ligaz, THERMO SCIENTIFIC'den (Waltham, Massachusetts, ABD) *HindIII*-HF ve *NotI*-HF restriksiyon endonükleaz enzimleri NEW ENGLAND BIOLABS'dan (Frankfurt am Main, Almanya) temin edildi.

2.6 Kimyasallar

Analitik saflıktaki kimyasallar şu firmalardan temin edildi:

APPLICHEM (Darmstadt, Almanya), CARL ROTH (Karlsruhe, Almanya), FLUKA (Neu-Ulm, Almanya), MERCK (Darmstadt, Almanya), ROCHE

DIAGNOSTICS (Mannheim, Almanya), SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Almanya), THERMO SCIENTIFIC (Waltham, Massachusetts, ABD), CHEM CRUZ (Heidelberg, Almanya), CONDA & PRONADISA (Madrid, İspanya).

2.7 Kitler

GeneJET™ Gel Extraction Kit, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit ve GeneJET™ Plazmid Midiprep Kit THERMO SCIENTIFIC'den (Waltham, Massachusetts, ABD) temin edildi.

2.8 Diğer Sarf Malzemeleri

Elektroporator küvetleri (2 mm) PEQLAB'dan (Erlangen, Almanya), nitroselüloz filtre (Ø13 mm) MILLIPORE'dan (Eschborn, Almanya), His Trap FF 5 ml nikel-şelat affinite kolonları GE HEALTHCARE'den (München, Almanya), 50 ml steril falkonlar, SARSTEDT'den (Nümbrecht, Almanya), 0,2 µm PES steril şırınga filtreleri SANTA CRUZ'dan (Heidelberg, Almanya), steril PS petriler (Ø 90 mm, H 14 mm) CARL ROTH'dan (Karlsruhe, Almanya) temin edildi.

2.9 Cihazlar

Termal cycler, (APPLIED BIOSYSTEMS Veriti 96 Well, ABD ve BIO-RAD iCycler, Hercules, Kaliforniya, ABD), agaroz jel elektroforezi (HOEFER Pharmacia Biotech, Massachusetts, ABD ve EMBITEC, San Diego, Kaliforniya, ABD), SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (HOEFER Pharmacia Biotech, Massachusetts, ABD), elektroporator 2510 (EPPENDORF, Hamburg, Almanya), Cary 60 UV-Vis spektrofotometre (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, Kaliforniya, ABD), 5810R santrifüj (EPPENDORF, Hamburg, Almanya), MIKRO 200R santrifüj (HETTICH, Kirchlingern, Almanya), masaüstü santrifüj (P-SELECTA, Barcelona, İspanya), VibraCell™ sonikatör (SONICS, Newtown, Connecticut, ABD), jel görüntüleme cihazı ve kamera (VILBERLOURMAT, Marne La Vallée, Fransa), UV star iluminatör (BIOMETRA, Göttingen, Almanya), Econo Gradient Pump peristaltik pompa (BIO-RAD, Hercules, Kaliforniya, ABD), Bio-TDB-100 DryBlockHeating Thermostat termal blok (BİOSAN, Riga, Letonya), Multiscan FC microplate okuyucu (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, ABD), inkübatörler InnovaR 40 ve 44 (INNOVA, Cambridge, İngiltere), inkübatör Excella E24

(NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Enfield, Connecticut, ABD), QuantiFluor™ florimetre (PROMEGA, Madison, Wisconsin, ABD) cihazları kullanıldı.

2.10 *E.coli* Büyüme Ortamları

Hazırlanan büyüme ortamlarının sterilizasyonu otoklavda (121 °C, 2 bar, 20 dk) gerçekleştirildi. Seçici katı agar ortamların hazırlanması için ortamların sıcaklığı yaklaşık 60°C'ye soğutuldu. 1000X stok konsantrasyonda hazırlanmış ve steril filtreden geçirilmiş antibiyotik çözeltisi eklendi. Kullanılan büyüme ortamları ve içerikleri (Sambrook et al., 1989) aşağıda listelenmiştir.

Luria-Bertani- Sıvı Besi Ortamı (LB)

% 0,5 (w/v) maya ekstraktı, % 1 (w/v) NaCl, % 1 (w/v) tripton

LB-Agar

LB-sıvı besiy ortamı ve %1,5 (w/v) bacto-agar

SOB

%0,5 (w/v) maya ekstraktı, % 0,05 (w/v) NaCl, % 2 (w/v) tripton

Otoklavlandıktan sonra 10 mM MgSO₄ (steril), 10 mM MgCl₂ (steril) ve 2,5 mM KCl (steril) çözeltileri eklendi.

SOC

Otoklavlanmış SOB ortamına steril filtreden geçirilmiş 20 mM glukoz çözeltisi eklendi.

SOC-Agar

SOC ortamına %1,5 (w/v) Bacto-Agar ilave edildi.

2.11 Tampon ve Çözeltiler

Aksi belirtilmediği takdirde kullanılan tüm çözeltiler steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı. Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su veya destile H₂O kullanıldı.

Primer çözeltileri (50 pmol/ul)

Liyofilize formdabulunan primer steril ultra saf suda, son konsantrasyon 50 pmol/ul olacak şekilde özüldü ve -20 °C'de saklandı.

PCR-dNTP çözeltisi (10 mM)

Her bir dNTP (N = A, C, G ve T) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde ultra saf suda çözöldü ve -20°C’de saklandı.

PCR- dNTP çözeltileri (Error-prone PCR için)

dATP, dCTP, dGTP son konsantrasyonları 10 mM ve dTTP son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde ultra saf suda seyreltildi ve -20 °C’de saklandı.

MgCl₂ (error-prone PCR için)

50 mM MgCl₂ kullanıldı ve -20 °C’de saklandı.

MnCl₂ (error-prone PCR için)

MnCl₂ son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum bromür stok çözeltisi

1 mg/ml etidyum bromür (EtBr) kullanıldı.

Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu

40 mM Tris, 20 mM asetik asit ve 1 mM EDTA olacak şekilde ultra saf suda hazırlandı. Bu tampon agaroz jellerin hazırlanmasında ve agaroz jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanıldı.

Agaroz jel

%1, %1,7 veya %2 (w/v) oranlarında hazırlanan agaroz jel için gerekli miktarlarda agaroz tartıldı ve TAE tamponunda ısıtılarak çözöldü.

Ampisilin stok çözeltisi (1000X)

Ampisilin (Na-tuzu), konsantrasyonu 50 mg/ml olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

Kanamisin stok çözeltisi (1000X)

Kanamisin, konsantrasyonu 75 mg/ml olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

Tetrasiklin stok çözeltisi (1000x)

Tetrasiklin, konsantrasyonu 12,5 mg/ml olacak şekilde etanolde çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

Kloramfenikol stok çözeltisi (1000X)

Kloramfenikol, konsantrasyonu 34 mg/ml olacak şekilde etanolde çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

Streptomisin stok çözeltisi (1000x)

Streptomisin, konsantrasyonu 25 mg/ml olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) stok çözeltisi

IPTG, konsantrasyonu 0,5 M olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve -20°C’de saklandı.

MgCl₂ ve CaCl₂ içeren çözelti

80 mM MgCl₂ ve 20 mM CaCl₂ içeren çözelti hazırlandı. İlgili kimyasallar ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve +4°C’de saklandı. Çözelti kimyasal transformasyon için kullanıldı.

CaCl₂ çözeltisi

CaCl₂ konsantrasyonu 0,1 M olacak şekilde ultra saf suda çözöldü, steril filtreden geçirildi ve +4°C’de saklandı. Çözelti kimyasal transformasyon için kullanıldı.

RF1 çözeltisi

100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM potasyum asetat (CH₃CO₂K), 10 mM CaCl₂, %15 (v/v) gliserin, 0,2 M asetik asit (C₂H₄O₂) içeren çözelti (pH 5,8) hazırlandı. Steril filtreden geçirildi ve +4°C’de saklandı.

RF2 çözeltisi

10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, %15 (v/v) gliserin içeren çözelti (pH 7,0) hazırlandı. Steril filtreden geçirildi ve +4°C’de saklandı.

Glukoz (SOC ortamı için)

2 M glukoz çözeltisi ultra saf suda hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

KCl (SOB ortamı için)

0,5 M KCl çözeltisi ultra saf suda hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

MgCl₂ (SOB ortamı için)

2 M MgCl₂ çözeltisi ultra saf suda hazırlandı, steril filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

MgSO₄ (SOB ortamı için)

1 M MgSO₄ çözeltisi ultra saf suda hazırlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

***E.coli* hücre süspansiyon ve homojenizasyon tamponu**

50 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 5,0 mM imidazol içeren çözelti (pH 7,8) ultra saf suda hazırlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Metal-şelat afinite kromatografisi tamponları

- Yürütücü tampon (A tamponu): 50 mM KH₂PO₄ (pH 7,4), 500 mM NaCl, 20 mM imidazol
- Elüsyon tamponu (B tamponu): 50 mM KH₂PO₄ (pH 7,4), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol

HisTrap FF Crude kolonların rejenerasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

- 1,5 M NaCl
- 1 M NaOH
- %30 (v/v) izopropanol
- Strip tamponu: 20 mM KH₂PO₄, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 7,4
- 0,1 M NiCl₂
- %20 (v/v) etanol

SDS-PAGE tamponları ve çözeltileri

- APS çözeltisi: Konsantrasyonu %10 (w/v) olacak şekilde her kullanımdan önce taze hazırlandı.
- Ayırma jeli tamponu: % 0,4 (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- Üst Jel tamponu: % 0,4 (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- SDS – PAGE Yürütme Tamponu (10X): %1 SDS, 2 M glisin, 0.25 M Tris-HCl (pH 8,5)

•**Örnek Tamponu (2X):** 0,25 M Tris-HCl, % 20 gliserin, % 4 SDS , % 0,04 bromfenol mavisi, % 5 merkaptotanol (pH 6,8)

•**SDS-PAGE boya çözeltisi:** % 0,2 (w/v) G250 Coomassie Brilliant Blue, % 0,2 R250 Coomassie Brilliant Blue, %50 etanol, %10 glasiyal asetik asit

Bradford Reaktifi

40 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml % 95 (v/v) etanol, 55 ml % 85 (v/v) fosforik asit ve dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

Triton SDS liziz tamponu

%2 (v/v) Triton X-100, %1 (v/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA

SDS çözeltisi

%1 (w/v) suda çözöldü.

Kongo kırmızısı çözeltisi

%0,1 (w/v) Kongo kırmızısı çözeltisi suda hazırlandı.

Somogyi-Nelson Reaktifleri

•**Alkali bakır tartarat reaktifi:**

- **A tamponu:** 2,54 g susuz sodyum karbonat, 2 gr sodyum bikarbonat, 2,5 gr potasyum sodyum tartarat ve 20 gr susuz sodyum sülfat, 80 ml saf suda çözölüp 100 ml'ye tamamlandı.
- **B tamponu:** 15 g bakır sülfat az miktar saf suda çözölüp 1 damla sülfirik asit damlatılarak su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Kullanımdan hemen önce 4 ml B ile 96 ml A karıştırıldı.

•**Arsenomolibdat reaktifi:** 2,5 g amonyummolibdat 45 ml suda çözöldü ve 2,5 ml sülfirik asit eklendi. Ardından 25 ml suda çözönmüş 0,3 gr disodyum hidrojen arsenat eklenip iyice karıştırıldı ve 37°C'de 24-48 saat arasında inkübe edildi.

2.12 Bilgisayar Yazılımları

- | | |
|---------------------------------|------------------------------|
| • Bioedit V.7.0.9 | © IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall |
| • Deep View Swiss PDB sürüm 4.1 | © Guex & Peitsch 1997 |
| • Sigma Plot 8.0/1.0 | © 2004/2006 SPSS INC. |

3. METOD

3.1 Mikrobiyolojik Metodlar

3.1.1 Sterilizasyon

Büyüme ortamları, ısıya dayanıklı çözeltiler, pipet uçları, DNA ve hücre ile teması olacak ısıya dayanıklı her türlü malzeme sterilizasyon amacı ile otoklavlandı (30 dk, 121°C ve 2 bar). Otoklavlanan pipet uçları 65°C'de kurutuldu. Sıcaklığa dayanıklı olmayan çözeltiler, stok çözelti olarak hazırlandı ve 0,2 µm membran filtreden geçirildi.

3.1.2 *E.coli* hücrelerinin inkübasyonu ve saklama koşulları

Protein ekspresyonu için sıvı LB besi ortamına inoküle edilen *E.coli* hücreleri, sıcaklığın değiştirildiği koşullar dışında 37°C'de inkübe edildi. Karıştırma hızı 170 rpm (800 mL kültür için) ve 220 rpm (50 ve 250 ml kültür için) olarak uygulandı. Plazmid taşıyan hücreleri içeren büyüme ortamlarına ilgili antibiyotikler (150 µg/ml ampisillin, 34 µg/ml kloramfenikol, 12,5 µg/ml tetrasiklin, 25 µg/ml streptomisin, 75 µg/ml kanamisin) eklendi. Inkübasyon sonrasında hücre süspansiyonundan az bir miktar alınarak ilgili antibiyotiği içeren katı agar (LB-Agar) petrilere yayıldı ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Bu petrilere tek düşen koloniler belirlendi ve kısa süreli depolama için petrilere +4°C'de saklandı. Uzun süreli depolama için, steril tüpte 1:1 oranında hücre sıvı kültürü ile %87 (v/v) gliserin karıştırıldı ve -80°C'de saklandı.

3.1.3 Kompetent *E.coli* hücrelerinin hazırlanması

Bakterilerin çoğu, yabancı DNA moleküllerini büyüme ortamından hücre içine alabilir. Ancak bu şekilde hücre içine alınan yabancı DNA, hücre tarafından parçalanır. DNA molekülünün bir plazmid olması durumunda ise, plazmidin replikasyon orjini konakçı tarafından tanınıyorsa, plazmid hücrede çoğalabilir. DNA bağlanması ve bunların hücre içine alınması için özel mekanizmalara sahip olan birkaç bakteri türü (*Bacillus* ve *Streptococcus*) laboratuvar koşullarında DNA alımını kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Buna karşın, normal koşullarda *E.coli* ve diğer birçok bakteri türünün hücre içine alabileceği DNA miktarı sınırlıdır.

Hücre içine DNA alımını artırmak için, kompetent hücreler oluşturulur. Kompetent hücreler kimyasal veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilir.

3.1.3.1 Kimyasal kompetent hücre hazırlanması

Kimyasal işlemler ile kompetent hücrelerin elde edilmesi fiziksel işlemlere kıyasla daha basit ve ucuzdur (Inoue et al., 1990). Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanmasında RbCl ve CaCl₂ metodları yaygın olarak kullanılmaktadır (Kuk 2003). Bu tuzların DNA'nın negatif yükünü nötralize ettiği ve uygulanan ısı şokunun da hücre duvarında porların açılmasını sağladığı düşünülmektedir. DNA'nın hücreye girişi 42°C'de gerçekleştirilen ısı şoku ile sağlanmaktadır (Brown, 2006).

•MgCl₂ metodu ile kimyasal kompetent hücre hazırlanması

İlgili antibiyotiği içeren 50 mL LB ortamında 37°C'de gece boyu inkübe edilen *E.coli* hücrelerinden, 1 mL alındı ve antibiyotik içermeyen 50 mL LB ortama inoküle edildi. 37°C'de OD₆₀₀ 0,6 oluncaya kadar inkübasyona devam edildi. Bu süre sonunda inkübatordan alındı ve buzda 15 dk bekletildi. 5 ml hücre süspansiyonu 4000 rpm'de, 4°C'de 1 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pellete 1 ml soğuk MgCl₂:CaCl₂ çözeltisi eklendi. 4000 rpm'de 4°C'de 1 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Son olarak, 0,1 M CaCl₂ (100 µl) eklenerek süspanse edildi.

•RbCl metodu ile kimyasal kompetent hücre hazırlanması

LB ortamında 37°C'de gece boyu inkübe edilen *E.coli* hücreleri, 100 ml antibiyotiksiz ortama inoküle edildi ve OD₆₀₀ 0,3-0,4 ulaşana kadar 37°C'de inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonrasında 15 dk buz üzerinde bekletildi. 6000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve hücreler 20 ml soğuk RF1 ile süspanse edildi. Ardından, 15 dk buz üstünde bekletildi. 6000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve hücreler 20 ml soğuk RF2 ile süspanse edildi. 15 dk buzda bekletilen hücrelerden 50 µl alınarak 1,5 ml'lik tüplere bölüştürüldü. Sıvı azot yardımıyla hızlıca dondurularak -80°C'de depolandı.

3.1.3.2 Elektrokompetent *E.coli* hücrelerinin hazırlanması

Elektrokompetent hücrelerin hazırlanması kimyasal kompetent hücrelere kıyasla daha pahalı ve zordur. Ancak elektrokompetent hücrelerin transformasyon etkinlikleri daha yüksektir.

E.coli Turbo hücreleri 50 ml LB ortamında, 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Gece kültüründen alınan örnek 200 ml SOB ortamına inoküle edildi ve OD₆₀₀ 0,6 değerine ulaşana kadar 37 °C’de inkübasyona devam edildi. 30 dk buzda bekletilen hücre kültürü santrifüjlendi (4000 rpm, 4°C, 10 dk) ve süpernantant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 50 ml steril soğuk ultra saf su ile süspanse edildi ve 15 dk buzda bekletildi. Santrifüj işlemi (4000 rpm, 4°C, 10 dk) tekrarlandı ve süpernantant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 20 ml steril soğuk ultra saf su ile süspanse edildi ve 15 dk buzda bekletildi. Santrifüjlenen örnekten (4000 rpm 4°C, 10 dk) süpernantant uzaklaştırıldı ve hücreler 10 ml steril soğuk ultra saf su ile süspanse edildi. 15 dk buz üzerinde inkübasyonun ardından santrifüj (4000 rpm, 4°C, 10 dk) gerçekleştirildi. Süpernantant uzaklaştırıldı ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak toplam hacim 1-4 ml olacak şekilde steril soğuk ultra saf su ile süspanse edildi. Elektrokompetent hücrelerden 100 µl alındı ve eppendorf tüplerine paylaştırıldı.

Elektrokompetent *E.coli* Turbo hücreleri her kullanımdan önce taze hazırlandı (Dower et al., 1988).

3.2 Moleküler Biyoloji Metodları

3.2.1 *E.coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu

E.coli hücre sistemlerinden plazmid DNA izolasyonunda, alkali liziz prensibi kullanılmaktadır (Le Gouill et al., 1994). Hücre liziz tamponunda SDS ve NaOH kullanılmaktadır. NaOH kullanılmasının amacı plazmid ve genomik DNA’nın denatürasyonunu sağlamaktır. NaOH hücre duvarının parçalanmasında da görev alır. SDS, protein denatürasyonuna neden olarak proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Amonyum asetat eklenmesi ile tek zincirli DNA’nın renatürasyonu gerçekleştirilir. Bu adım sayesinde plazmid DNA ile genomik DNA birbirinden ayrılır. Genomik DNA’nın renatürasyonu küçük dairesel plazmid DNA’ya kıyasla daha zordur. Liziz sırasında çok hızlı karıştırma genomik DNA’nın kolayca renatüre olabilen küçük zincirlere parçalanmasına

neden olur. Bu da plazmid DNA'nın saflığını etkiler. Çift zincirli DNA kolaylıkla suda çözünebilir. Tek zincirli genomik DNA ise SDS ve denatüre proteinler ile hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla bir araya gelir ve beyaz bir çökelek oluşur. Bu yapı santrifüj ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir.

3.2.1.1 Plazmid DNA izolasyonu (Mini-prep)

E. coli hücrelerinden plazmid DNA izolasyonu için GeneJET™ Plazmid Miniprep kit (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanıldı. 50 ml gece kültüründen alınan 5 ml örnek, 8000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi. İzolasyon, plazmid DNA izolasyon kitinde önerilen protokole göre yapıldı. Kolondan elüsyon için, 35 µl steril H₂O kullanıldı. Plazmid DNA -20 °C'de saklandı.

3.2.1.2 Plazmid DNA izolasyonu (Midi-prep)

Gen kütüphanesi oluşturulması adımı büyük petrilerde (Ø 14,5 cm) gece boyu inkübe edilen hücreler, petrinin yüzeyinden steril bir spatül kullanılarak sıvı LB besi ortamına aktarıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan plazmid DNA izolasyonu için, GeneJet™ Plazmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanıldı.

3.2.2 PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) DNA fragmentlerinin *in vitro* amplifikasyonu gerçekleşir. DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve enzimatik DNA sentezi (uzama) adımlarının tekrarlanmasıyla DNA fragmentleri eksponansiyel olarak çoğaltılır.

Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı (T_B) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Burada; T_{B1} ve T_{B2}, reaksiyonda kullanılan 5' ile 3' primerlerinin erime sıcaklıklarıdır.

$$T_B = \frac{T_{B1} + T_{B2}}{2} - 3^{\circ}\text{C}$$

Formül 3.1 Optimum bağlanma sıcaklığı (°C)

Uzama süresinin uzunluğu, DNA fragmentinin uzunluğuna bağlıdır ve 1 kbç için 1 dk olarak hesaplanmaktadır.

3.2.2.1 DNA fragmentlerinin standart PCR ile amplifikasyonu

Selülaı kodlayan *tmSel12A* (Genbank kodu: CAA 93273.1) geninin amplifikasyonu için standart PCR kullanıldı. Reaksiyon karışımı 5' ve 3' primerler (50 nM), dNTP karışımı (0,2 mM), MgCl₂ (2,5 mM) içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyonda 1,25 U Taq DNA polimeraz kullanıldı. Reaksiyonlar termal cykler (kapak sıcaklığı 105 °C) kullanılarak gerçekleştirildi.

tmSel12A geninin (795 bç) 5'-*TmCel12A HindIII* (T_m= 65°C) ve 3'- *TmCel12A NotI* (T_m= 73°C) primerleri ile amplifikasyonunda optimum bağlanma sıcaklığının belirlenmesi amacı ile 60 ile 70°C arasında grandient PCR gerçekleştirildi. Grandient PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendi ve optimum primer bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlendi. *tmSel12A* geninin amplifikasyonu için hazırlanan reaksiyon karışımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Doğal *tmSel12A* geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
Kalıp DNA (<i>T. maritima</i> genomik DNA)	0,5
3' primer (3'- <i>TmCel12A NotI</i>)	1
5' primer (5'- <i>TmCel12A HindIII</i>)	1
dNTP	1
Taq DNA polimeraz (Fermentas)	0,25
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas)	5
10X tamponu (Fermentas) (+KCl -MgCl ₂)	5
H ₂ O	36,25
TOPLAM	50

Standart PCR programı ;

1. Denatürasyon (95 °C, 3 dk)
2. Denatürasyon (95 °C, 45 s)
3. Primer bağlanması (60°C, 45 s)

4. Uzama (72 °C, 45 s)
 5. Son uzama (72 °C, 10 dk)
 6. 4°C, ∞.
- 2-3-4. adımlar 30 kez tekrarlandı.

DNA dizi analizi için örnek hazırlanması amacı ile analizlenecek DNA fragmentini taşıyan plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Primer olarak, bu plazmid vektörüne özgü olan 5' T7 Promotor ($T_m = 54^\circ\text{C}$) ve 3' T7 Terminatör ($T_m = 57^\circ\text{C}$) primerleri kullanıldı. DNA dizi analizine gönderilecek örnekler için hazırlanan PCR karışımları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 DNA dizi analizleri için hazırlanan PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
Kalıp DNA (plazmid DNA)	2
3' primer (3'- T7 Terminatör)	2
5' primer (5'- T7 Promotor)	2
dNTP	2
dreamTaq DNA polimeraz	0,6
Dream taq10x tamponu	10
H ₂ O	81,4
TOPLAM	100

DNA sekans analizi örnekleri için PCR programı ;

1. Denatürasyon (95 °C, 3 dk)
 2. Denatürasyon (95 °C, 45 sn)
 3. Primer bağlanması (60°C, 45 sn)
 4. Uzama (72 °C, 1dk 10sn)
 5. Son uzama (72 °C, 10 dk)
 6. 4°C, ∞.
- 2-3-4. adımlar 30 kez tekrarlandı.

3.2.2.2 Koloni PCR

Koloni PCR, çoğaltılmak istenilen DNA fragmentini içeren vektörü taşıyan hücrelerin taranmasında kullanıldı. Transformasyon sonrasında hücreler seçici antibiyotik içeren petrilerde inkübe edildi. Tek düşen koloniler steril bir kürdan yardımı ile ayrı PCR tüplerine alındı ve her bir koloniye, hazırlanan reaksiyon karışımından 5-10 µl eklendi. Hazırlanan standart reaksiyon karışımı çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Koloni PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
3' primer (3' - T7 Terminatör)	1
5' primer (5' - T7 Promotor)	1
dNTP	1
FermentasTaq DNA polimeraz	0,25
Go taq 5x tamponu	10
H ₂ O	36,75
TOPLAM	50

Koloni PCR programı ;

1. Denatürasyon (95 °C, 5 dk)
 2. Denatürasyon (95 °C, 45 s)
 3. Primer bağlanması (55°C, 45 s)
 4. Uzama (72 °C, 1dk 15 s)
 5. Son uzama (72 °C, 10 dk)
 6. 4°C, ∞.
- 2-3-4. adımlar 30 kez tekrarlandı.

Hücrelerin parçalanması için, kullanılan diğer PCR programlarından farklı olarak, ilk denatürasyon 95 °C'de 5 dk olarak değiştirildi ve pET21a(+) vektörüne spesifik 5' - T7 Promotor ile 3' - T7 Terminatör primerleri kullanıldı.

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünleri, UV ışık altında incelenerek, klonlanan geni içeren vektörleri taşıyan koloniler belirlendi. PCR

sonucunda hedef geni almamış vektörlerden yaklaşık 200 bç büyüklüğünde fragmentler oluşmaktadır. Hedef geni almış vektörler ise daha büyük fragmentler (*tmSel12A* için yaklaşık 1100 bç) oluşturmaktadır.

3.2.2.3 Error-prone PCR ile rastgele mutasyonların oluşturulması

Error-prone PCR (epPCR) yöntemi, gen üzerinde rastgele mutasyonların oluşturulması amacı ile kullanıldı (Leung *et al.*, 1989). Fermentas Taq DNA polimeraz enzimi 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip değildir ve bu nedenle bir nükleotid başına ortalama 8×10^{-6} - 2×10^{-4} hata oranına sahiptir (Eckert and Kunkel, 1990). Hata oranını artırmak için, her bir dNTP farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir (Fromant *et al.*, 1995; Vanhercke *et al.*, 2005), karışıma $MnCl_2$ eklenebilir (Beckmann *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1989), döngü sayısı arttırılabilir, uzama süresi uzatılır veya tüm değişiklikler birlikte yapılabilir. Hata oranını artırmak için yapılan bu değişiklikler, kütüphanesi oluşturulacak genin özelliklerine bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Tez çalışmasında kullanılan epPCR bileşimi aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 epPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
Kalıp DNA (<i>tmSel12A</i>)	5
5' primer (5' <i>TmCel12A</i> lib <i>HindIII</i>)	5
3' primer (3' <i>TmCel12A</i> lib <i>NotI</i>)	5
dCTP (10 mM)	10
dATP (10 mM)	8,75
dGTP (10 mM)	5
dTTP (50 mM)	6,75
$MnCl_2$ (5 mM)	37,5
$MgCl_2$ (50 mM) (Finnzymes)	12,5
5x Green GoTaq tamponu	50
Taq DNA polimeraz (Fermentas)	1,25
H ₂ O	110,75
TOPLAM	250

epPCR programı ;

1. Denatürasyon (95 °C, 3 dk)
2. Denatürasyon (95 °C, 45 s)

3. Primer bağlanması (70°C, 45 s)
 4. Uzama (72 °C, 1dk)
 5. Son uzama (72 °C, 10 dk)
 6. 4°C, ∞.
- 2-3-4. adımlar 35 kez tekrarlandı.

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

DNA fragmentleri, agaroz jel elektroforezinde boyutlarına göre ayrılır ve etidyum bromür eklenmesiyle gerçekleşen interkalasyon sayesinde UV ışık altında görünür hale gelirler (Sharp et al., 1973).

Farklı miktarlardaki agaroz (% 1, %1,7, %2, w/v), TAE tamponunda kaynatılarak çözüldü. 50-60 °C'ye soğutulmasının ardından 1 mg/ml stok EtBr çözeltisinden eklendi. Jel ünitesine yayılan agarozun katılaşması beklendi ve üzerine TAE tamponu eklendi. DNA örnekleri DNA yükleme boyası ile karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez 100 volt.saat uygulandı. DNA fragmentleri 365 nm dalga boyundaki UV ışıkta, UV star Illuminator (Biometra, DE) sistemi yardımı ile belirlendi.

3.2.4 DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

UV ışıkta gözlenen DNA fragmentleri temiz bir neşter yardımıyla jelden kesildi ve bir eppendorf tüpüne alındı. GeneJET™DNA extraction kiti (THERMO SCIENTIFIC, US) kullanılarak, DNA'nın jelden ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı.

3.2.5 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile QuantiFluor™ p florimetre (Promega, US) kullanıldı. Hoechst boyası ile karıştırılan örneklerin floresans değerleri ve standart grafik yardımı ile DNA konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.6 Çift iplikli DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla kesimi

Palindromik dizileri tanıyan restriksiyon endonükleaz tip II enzimleri kullanılarak çift zincirli DNA'nın kesimi gerçekleştirildi (Sambrook et al., 1989). Restriksiyon enzimleri deoksiriboz ile fosfat grupları arasındaki fosfodiester

bağlarına etki etmektedir ve bu nedenle kesim sonucu 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçları oluşmaktadır.

Restriksiyon endonükleazları olarak *Hind*III-HF (5'-A↓AGCTT -3') ve *Not*I-HF(5'-G↓CCCGG-3') enzimleri kullanıldı. Bu iki restriksiyon enziminin birlikte kullanılmaları durumunda üretici firma tarafından önerilen NEB4 tamponu kullanıldı (50 mM potasyum asetat, 20 mM Tris-asetat, 10 mM magnezyum asetat, 1 mM DTT; pH 7,9). *Not*I-HF enzim aktivitesi için reaksiyon ortamına son konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde sığır serum albumini ilave edildi. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin toplam hacmi, reaksiyon hacminin % 10'unu aşmayacak şekilde hesaplandı. Bu sayede, depolama için kullanılan gliserinin restriksiyon enzimlerinin aktivitelerini etkilemesinin önüne geçildi.

Doğal *tmSel12A* geni, ep-PCR ile elde edilen *tmSel12A* DNA fragmentleri ve pET21a(+) vektörü restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Çizelge 3.5'te doğal *tmSel12A* ve Çizelge3.6'da ep-PCR ile elde edilen *tmSel12A* DNA fragmentleri için, restriksiyon enzimleri ile kesim için hazırlanan reaksiyon karışımlarının içeriği verilmiştir. Bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları 37°C'de inkübe edildi.

Çizelge 3.5 Restriksiyon enzimi reaksiyon karışımları

	DNA Fragmenti (µl)	pET21a(+) (µl)
DNA	24	24
<i>Not</i> I- HF	1	1
<i>Hind</i> III-HF	1	1
10x tampon	3	3
BSA	1	1
TOPLAM	30	30
37°C'de gece boyu inkübasyon		

Çizelge 3.6 Restriksiyon enzimi reaksiyon karışımları

	DNA Fragmenti (µl)	pET21a(+) (µl)
DNA	24	24
<i>Hind</i> III-HF	1	1
10X tampon	3	3
37°C’de 1.5 saat inkübasyon		
<i>Not</i> I- HF	1	1
BSA	1	1
TOPLAM	30 µl	30 µl
37°C’de 1.5 saat inkübasyon		

Restriksiyon enzimleri ile muamele sonrasında, reaksiyon karışımları agaroz jel elektroforezine uygulandı. UV ışık altında görüntülenen fragmentler, agaroz jel ekstraksiyon kiti yardımı ile jelden ekstrakte edildi.

3.2.7 Ligasyon

Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen ve jelden ekstrakte edilen gen fragmentlerinin ve vektörün DNA konsantrasyonları QuantiFluor™ (Promega) cihazı ile florimetrik olarak tayin edildi. Formül 3.2’deki denkleme göre ligasyon reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarları hesaplandı ve buna göre reaksiyon karışımları hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımlarında kullanılan T4 DNA ligaz enzimi için üretici firma tarafından temin edilen 10X tamponu (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) kullanıldı.

$$L_f = 3 \times L_v \times \frac{S_f}{S_v} \times \frac{C_v}{C_f}$$

Formül 3.2 Ligasyon reaksiyon karışımında kullanılacak DNA miktarlarının belirlenmesi

Bu formülde f simgesi fragmenti, v simgesi vektörü belirtmektedir. L, hacim; S, DNA molekülünün bç uzunluğu; C, DNA konsantrasyonunu göstermektedir. Vektör: fragmet mol oranının 1:3 olması durumunda formülde 3 sayısı kullanılmaktadır. Ancak bu oran 1:5 şeklinde de kullanılabilir. Çizelge 3.7 ve 3.8’de doğal *tm*Sel12A geni ve gen kütüphanesi oluşturulması aşamasında hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımları verilmiştir. Reaksiyon karışımları gece boyu buz üzerinde inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.7 Doğal *tmSel12A* klonlanması için hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımlarının içerikleri

Reaksiyon no	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Vektör (µl)	5	5	8	8	0,5	1
Fragment (µl)	2,2	3,7	3,5	5,8	9	10
10xtampon (µl)	2	2	2	2	2	2
T4DNA ligaz (µl) (1U)	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (µl)	9,8	8,3	5,5	4,2	7,5	6
TOPLAM (µl)	20	20	20	20	20	20

Çizelge 3.8 Gen kütüphanesinin klonlanması için için hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımlarının içerikleri

Reaksiyon no	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
Vektör (µl)	7,7	7,6	10,4	7,7	7,6
Fragment (µl) (ep-PCR sonucu elde edilen)	4,7	5,5	6,6	7,9	9,1
10xtampon(µl)	2	2	2	2	2
T4 DNA ligaz(µl)	1	1	1	1	1
H ₂ O(µl)	4,6	3,9	-	1,4	0,3
TOPLAM(µl)	20	20	20	20	20

3.2.8 Kimyasal kompetent *E.coli* hücrelerine transformasyon

Transformasyon için saf plazmid DNA veya ligasyon karışımı kullanıldı. Transformasyondan önce, T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu amacı ile ligasyon karışımı 65°C’de 10 dk inkübe edildi.

3.2.8.1 MgCl₂ metodu ile kimyasal kompetent hücrelere transformasyon

Kimyasal kompetent hücelere, 5 µl ligasyon karışımı veya 1 µl plazmid DNA eklendi. 5 dk buz üstünde inkübe edildi ve 42°C’de 30 s ısı şoku gerçekleştirildi. Isı şokunun ardından 2 dk buz üstünde inkübe edilen tüplere 0.8 ml LB ortamı eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Inkübasyonun ardından 50 µl hücre süspansiyonu seçici antibiyotik içeren petriye (LB-Agar) yayıldı. Kalan hücre süspansiyonu 4000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi ve

hücre pelleti 50 µl LB sıvı ortamında süspanse edildi. Hücre süspansiyonu seçici antibiyotik içeren petriye (LB-Agar) yayıldı ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

3.2.8.2 RbCl metodu ile kimyasal kompetent hücrelere transformasyon

-80°C’de depolanan kompetent hücreler 15 dk buzda bekletildi. Ligasyon karışımından 5 µl veya plazmid DNA’dan 1 µl eklenerek 30 dk buzda bekletildi. Ardından 42°C’de 30 s ısı şoku uygulandı. Sonrasında 2 dk buz üstünde inkübe edildi. 0,2 ml LB sıvı ortamı eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından 50 µl hücre süspansiyonu seçici antibiyotik içeren petriye (LB-Agar) yayıldı. Kalan hücre süspansiyonu 4000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi ve hücre pelleti 50 µl LB’de süspanse edildikten sonra petriye yayıldı.

3.2.9 Elektroporasyon

3.2.9.1 Elektroporasyon için DNA’nın hazırlanması

Elektroporasyonda kullanılacak DNA çözeltisinin mümkün olduğu kadar az miktarda iyon içermesi gerekmektedir. İyonlar elektroporasyon kuvvetinde elektrik akımı ile birlikte elektrik arkına neden olurlar ve bu nedenle (örneğin ligasyon tamponundan gelen) tuzları içeren DNA çözeltisi, suya karşı diyalizlenmelidir. Bu amaçla, ultra saf su içeren küçük bir petri kabına parlak yüzeyi üstte olacak şekilde nitroselüloz filtre (MILLI PORE) yerleştirildi. Filtrenin yüzeyine bırakılan 10-20 µl DNA çözeltisi en az 1 saat diyalizlendi (Evrans, 2009). T4 DNA ligazın inaktivasyonu için, ligasyon karışımı diyalizden önce 65°C’de 10 dk inkübe edildi.

3.2.9.2 Elektrokompotent *E. coli* hücrelerine transformasyon

Elektrokompotent hücre süspansiyonuna (250 µl), diyalizlenmiş ligasyon karışımından 15µl ilave edildi. Buzda 5 dk inkübe edildikten sonra, önceden soğutulmuş elektroporasyon kuvvetlerine alındı (aralık genişliği 2 mm). Elektroporatörde, elektrik pulsü (2500 V, 25 µF, 200 Ω) uygulandı ve zaman sabitinin 4,0-6,0 ms olmasına dikkat edildi. Hemen ardından elektroporatör kuvveti 1,5 ml SOB ortamı (3 x 0,5 ml) ile yıkandı ve toplanan hücre süspansiyonu 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Hücre süspansiyonu seçici agar ortamlarına yayıldı ve 37 °C’de gece boyu inkübe edildi.

Bu transformasyon yöntemi gen kütüphanesi oluşturulması aşamasında kullanıldı.

3.2.10 DNA dizi analizi

Vektörlere klonlanan genlerin dizi analizleri İYTE BİYOMER laboratuvarında gerçekleştirildi. BİYOMER laboratuvarına gönderilen örnekler 150-250 ng/μl DNA içerecek şekilde hazırlandı ve 10 pmol/μl konsantrasyonda hazırlanan vektöre spesifik primer ile birlikte gönderildi. Analizler ABI3130x1 DNA dizi analizleyicisi kullanılarak gerçekleştirildi. DNA dizileri BioEdit programı yardımı ile analizlendi.

3.3 Gen Kütüphanesinin Transformasyonu

Gen kütüphanesinin elektroporasyon yoluyla transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon etkinliğinin kontrol edilmesi amacı ile pET21a(+) plazmidi de transforme edildi.

1 saatlik inkübasyon sonrasında, SOC ortamı (ampisilin ilave edilmiş) içeren büyük petrilerin (Ø 15 cm, 38 adet) her birine hücre süspansiyonundan 400 μl yayıldı.

Gece boyunca inkübe edilen petrilere büyüyen hücreler steril yayma çubukları yardımıyla LB ortama alındı. Hücre süspansiyonu santrifüjlendi ve plazmid izolasyonu GeneJet™ Plazmid Midiprep Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirildi.

3.3.1 Gen kütüphanesinin büyüklüğünün belirlenmesi

Gen kütüphanesinin büyüklüğünün belirlenmesi amacı ile hücre süspansiyonundan 100 μl alınarak uygun seyrelme oranları hazırlandı (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6}). Her bir dilüsyondan alınan 100 μl, ampisilin içeren SOC agarlı ortamlara (Ø 9 cm) yayıldı. Aynı işlemler kontrol pET21a(+) plazmidi için de uygulandı. 37 °C’de gece boyunca inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayıldı ve transforme olan hücrelerin sayısı (CFU) aşağıdaki Formül 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$n_T = \frac{n_K \cdot f \cdot V_T}{0.1}$$

Formül 3.3 Transforme hücrelerin sayısının hesaplanması.

n_T :Transforme hücrelerin sayısı (CFU), n_K : Oluşan koloni sayısı, f: Seyrelme faktörü, V_T : Transforme hücrelerin toplam hacmi

Seyrelme petrilerinden rastgele seçilen 15 koloni için koloni PCR yapıldı ve ligasyon etkinliği aşağıdaki Formül 3.4'e göre hesaplandı:

$$L = \frac{n_p}{n_s} \cdot 100$$

Formül 3.4 Ligasyon etkinliğinin hesaplanması.

L: Ligasyon etkinliği (%), n_p : Hedef geni içeren vektörü taşıyan pozitif kolonilerin sayısı, n_s : Koloni PCR'da analizlenen toplam koloni sayısı

Gen bankasının büyüklüğü transforme hücrelerin sayısı ve ligasyon etkinliği dikkate alınarak aşağıdaki Formül 3.5 ile hesaplandı:

$$G = n_T \cdot L$$

Formül 3.5 Gen bankasının büyüklüğünün hesaplanması.

Formülde, n_T : Transforme hücrelerin sayısını (CFU), L: Ligasyon etkinliği (%) ifade etmektedir.

3.4 Gen Kütüphanesine Uygulanan Tarama Yöntemi

Bu çalışmada, tarama yöntemi olarak Kongo kırmızısı zon yöntemi (Teather and Wood,1982) kullanıldı. Kongo kırmızısı 1,4-β-D-glukopiranozil birimleri ile güçlü, 1,3-β-D-glukan birimleri ve hemiselülozik galaktoglukomannan birimleri ile kayda değer bir etkileşimde bulunmaktadır. Kongo kırmızısı ile muamele sonucu polisakkaritler kırmızı renkte görünmektedirler. Enzimatik hidroliz sonucunda ise bu renk ortadan kaybolmaktadır ve hidroliz büyüme ortamında zonlar şeklinde belirlenmektedir.

3.4.1 Kütüphane tarama yönteminin optimizasyonu

Kongo kırmızısı zon yönteminin optimizasyonu amacı ile doğal *tmSel12A* genini taşıyan plazmid *E.coli* BL21(DE 3)C+ RP hücrelerine transforme edildi ve ilgili antibiyotikleri içeren petrilere inkübe edildi. Koloniler bu kez, ilgili antibiyotikleri ve 0,3 mM IPTG içeren petrilere steril kürdanlar yardımı ile noktalar şeklinde aktarıldı ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi. Bu hücreler daha sonra çeşitli optimizasyonlar için kullanıldı.

Kongo kırmızısı zon yönteminin kullanılması amacı ile aşağıda belirtilen optimizasyonlar gerçekleştirildi.

3.4.1.1 Üst agar, agar miktarının optimizasyonu

Üst agardaki agar miktarının optimizasyonu için %0,5 (w/v) karboksimetilselüloz (CMC) içeren ve %0,35, %0,5 ve %0,8 oranlarında agar içeren üst agarlar hazırlandı. Kolonileri içeren petriye dökülüp 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Suda hazırlanmış %0,5 (w/v) kongo kırmızısı çözeltisi agar üzerine döküldü ve oda sıcaklığında belirli aralıklarla karıştırılarak 15 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda Kongo kırmızısı agar üzerinden alındı ve 1 M NaCl çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

3.4.1.2 Üst agar öncesi liziz tamponu seçimi

TmSel12A’nın hücre içi bir enzim olması nedeni ile substrat içeren agar ile muamele öncesi hücreler lizize uğratıldı. Bu aşamanın optimizasyonu amacı ile %1 SDS (w/v) ve Triton SDS liziz tamponlarının etkinliği karşılaştırıldı. Bu amaçla, üst agar dökülmeden önce petrilere her bir koloniye dört farklı miktarda liziz tamponu (30, 60, 90 ve 120 µl) damlatıldı farklı sürelerde (30 dk, 1 saat, 1,5 saat ve 2 saat) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından petrilere fosfat tamponu (50mM, pH 7,0) ile yıkandı ve üzerine %0,5 (w/v) CMC ve %0,8 (w/v) agar içeren üst agar döküldü. Petrilere 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda %0,5 (w/v) Kongo kırmızısı döküldü ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 1 M NaCl ilave edildi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Oluşan zonlar karşılaştırıldı.

3.4.1.3 Kongo kırmızısı yüzdesinin optimizasyonu

Petriler farklı konsantrasyonlardaki (%0,1 - %0,5) Kongo kırmızısı çözeltisi ile muamele edildi. Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonun ardından çözelti uzaklaştırıldı ve 1 M NaCl eklenerek 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan zonlar karşılaştırıldı.

3.4.1.4 Substrat miktarı optimizasyonu

Substrat miktarının belirlenmesi amacı ile üst agardaki CMC konsantrasyonları %0,5 ve %1 (w/v) şeklinde değiştirildi. Diğer parametrelerin sabit tutulduğu koşullarda oluşan zonlar karşılaştırıldı.

3.4.1.5 İnkübasyon süresinin optimizasyonu

Oluşan zonlar arasındaki farkların daha iyi ayırt edilebilmesi için, üst agar ile 37°C'deki inkübasyon süresi optimize edildi. Bu amaçla, petriler 37°C'de 1, 3 veya 5 saat inkübe edildi. Oluşan zonlar karşılaştırıldı.

3.4.1.6 Kongo kırmızısı ve NaCl ile inkübasyon süresinin optimizasyonu

Petriler kongo kırmızısı ile farklı sürelerde (10, 15, 20, 30 ve 45 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından NaCl ile 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan zonlar karşılaştırıldı.

Kongo kırmızısı ile inkübasyon süresinin optimizasyonunun ardından, petriler bu kez NaCl ile farklı sürelerde (10, 15, 20, 30 ve 45 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oluşan zonlar karşılaştırıldı.

3.5 Gen Kütüphanesi Varyantlarının Taranması

Gen kütüphanesini taşıyan plazmid DNA karışımı, RbCl metodu ile kompetent hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3)C+RIPL hücrelerine transforme edildi. Pozitif kontrol olarak doğal enzimi kodlayan plazmid ve negatif kontrol olarak *TmSel12A* kodlayan geni içermeyen pET21a (+) plazmidi için de transformasyon gerçekleştirildi.

Isı şoku ve buzda inkübasyon adımlarının ardından, hücreler 37°C’de 1 saat inkübe edildi ve ilgili antibiyotikleri içeren LB agar petrilere (Ø 9cm) aktarıldı. 37°C’de gece boyu inkübe edilen kütüphane varyantları 70 kareye bölünmüş büyük petrilere (Ø 15cm), her petride iki pozitif kontrol ve iki negatif kontrol olacak şekilde nokta fiksasyonu gerçekleştirildi. Aynı zamanda kütüphane varyantlarının saklanması amacı ile ilgili antibiyotikleri içeren LB petrilere çizgi ekimleri gerçekleştirildi.

Kütüphane, pH 5 ve pH 9’da aktivite gösteren varyantlar için tarandı. Asidik veya bazik pH değerlerinde tarama yapmak için, karboksimetilselüloz (CMC) substratı fosfat tamponunda (50 mM, pH 5,0) veya borat tamponunda (50 mM, pH 9,0) hazırlandı. İki farklı pH değerinde hazırlanan substratlar agar ile karıştırıldı ve üst agar olarak kullanıldı.

3.6 Heterolog Gen Ekspresyonu ve Protein Saflaştırılması

3.6.1 Proteinlerin küçük ölçekte (test) ekspresyonu

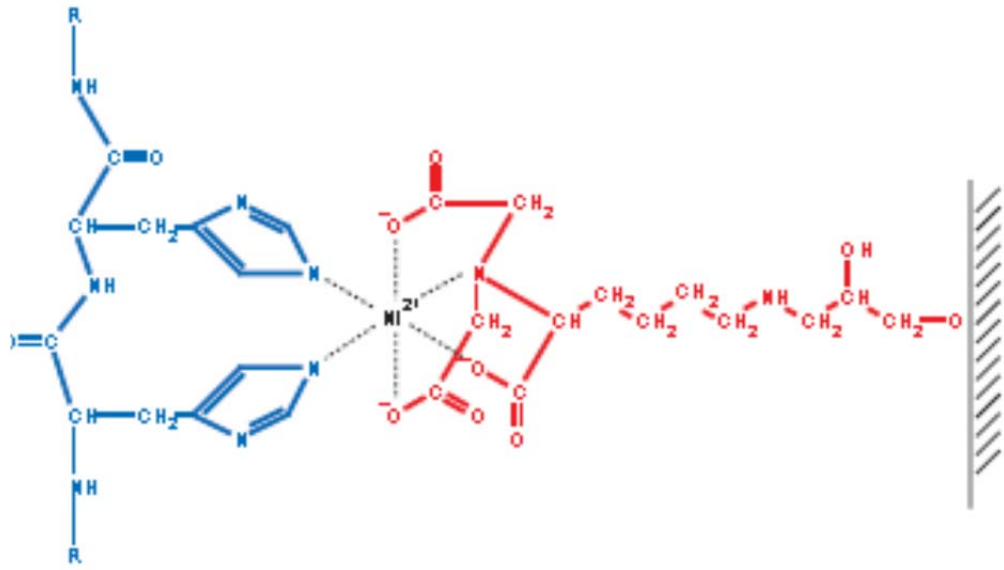
Rekombinant proteinlerin optimum ekspresyon koşullarının belirlenmesi amacı ile küçük ölçekte “test” ekspresyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla *E.coli* suşu, IPTG konsantrasyonu, sıcaklık, süre gibi parametreler değiştirildi. Transformasyonun ardından petriden dört koloni seçildi ve antibiyotikli büyüme ortamlarına (50 ml) inokule edilerek 37 °C’de geceboyu inkübe edildi. Gece kültürü 50 ml LB büyüme ortamına inokule edildi. Kültür, OD₆₀₀ 0,4-0,6 değerine ulaşıncaya kadar 37 °C’de inkübe edildi. Son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde IPTG eklenerek hücrelerdeki protein ekspresyonunun indüklenmesi amaçlandı. Hücreler 37°C’de 3 saat veya 30°C’de geceboyu inkübe edildi.

3.6.2 Proteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu

Proteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu için ilgili antibiyotik/leri içeren 0,8L LB sıvı besi ortamı, 3 L hacimdeki cam erlene alındı. Büyüme ortamına, tek koloniden oluşturulmuş taze kültür inokule edildi ve 37 °C’de inkübe edildi. IPTG indüksiyonunun gerekli olduğu durumlarda OD₆₀₀ 0,4-0,6’ya ulaştığında son konsantrasyon 0,5mM olacak şekilde IPTG eklendi. İndüksiyon sonrasında hücreler, 30°C’de gece boyu inkübe edildi.

3.6.3 Metal şelat afinite kromatografisi

Metal şelat afinite kromatografisi (Porath et al., 1975) HisTrap™ FF crude kolon (GE HEALTHCARE; kolon hacmi: 5 ml; maksimum basınç: 0,3 MPa) kullanılarak Econo Gradient Pump peristaltik pompa (BIO-RAD, US) sisteminde gerçekleştirildi. Bu kolonlarda, Sefaroz 6'ya (fast flow) kovalent bağlı iminodiasetik asit (IDA), matriks olarak kullanılmaktadır. İminodiasetik asit, metal iyonlarını (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} veya Fe^{3+}) şelatlamaktadır (Şekil 3.2). Protein moleküllerinin yüzeyinde bulunan amino asitler arasında, elektronca zengin olanlar (histidin imidazol halkası, triptofan indol halkası ve sistein sülfidril grubu) metal iyonu ile etkileşmektedir ve proteinler immobilize metal iyonuna olan afinitelerine göre ayrılmaktadır. Rekombinant olarak üretilen ve N- veya C-terminalinde $(\text{His})_6$ -tag bulunan proteinler, kolona uygulandığında metal iyonu (bu çalışmada Ni^{2+} iyonu) ile etkileşmekte ve kolonda spesifik olarak tutunmaktadırlar. İmidazol gradienti ile proteinlerin elüsyonu sağlanmaktadır.



Şekil 3.1 Metal şelat affinite kromatografisi matriksi

Gradient Pump, peristaltik pompa (BIO-RAD, US) sisteminde şu protokol uygulandı: Akış hızı 4 ml/dk (5 ml kolon) olarak belirlendi. Kolon, 10 kolon hacmi tampon A (50 mM KP, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) ile dengelendi ve homojenizasyon tamponunda (50 mM KP, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,4) hazırlanmış hücre homojenatı uygulandı. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacı ile kolon, 10 kolon hacmi tampon A ile yıkandı. Ardından tampon B (50 mM KP, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH

7,4) uygulanarak elüsyon gerçekleştirildi. Kolon, 10 kolon hacmi tampon B ile yıkandıktan sonra, 10 kolon hacmi tampon A ile tekrar dengelendi. Kolonun temizlenmesi için 10 hacim H₂O ve % 20 (v/v) etanol ile yıkandı. Kolon oda sıcaklığında etanolde saklandı. Elde edilen fraksiyon SDS-PAGE'e uygulandı.

3.7 Analitik Yöntemler

3.7.1 Protein konsantrasyonunun tayini

Protein tayinleri, boya bağlama temelli yöntemlerden birisi olan Bradford (1976) yöntemi kullanılarak (mikroplaka formatında) gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) Commassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik grupları ile etkileşerek renk oluşturmaya dayanmaktadır. Bu yöntemde standart olarak 25-175 µg/ ml sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

10 µl örnek, 200 µl Bradford reaktifi ile birlikte mikroplaka kuyucuklarına pipetlendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 595 nm'deki absorbanlar kaydedildi. Standart grafiği yardımıyla seyreltme faktörleri de dikkate alınarak protein konsantrasyonları hesaplandı. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.7.2 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), saflaştırılan proteinlerin rölatif molekül ağırlıklarının belirlenmesi ve saflıklarının kontrolü için kullanılan bir yöntemdir. Jel, bir çapraz bağlayıcı (N'-N'- metilen bis akrilamid) ile bir monomerin (akrilamid) farklı yüzdeleriyle hazırlanmaktadır.

SDS ile proteindeki yüklerin maskelenmesi sonrasında, proteinlerin elektriksel alanda ayrımı prensibine dayanmaktadır.

SDS-PAGE (Laemmli, 1970) için kullanılan jel, Çizelge 3.9'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Çoklu jel dökme sistemi kullanılarak 10 jel hazırlandı.

Çizelge 3.9 %12,5 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

	Alt Jel (%12,5)	Üst jel (%6)
Alt veya üst jel tamponu	19,5 ml	7,38 ml
%30(w/v)akrilamid/metilen bisakrilamid çözeltisi (37,5:1 oranında)	26,2 ml	5,9 ml
H ₂ O	31,58 ml	15,95 ml
Tetrametiletilediamin (TEMED)	89 µl	29 µl
Amonyum persülfat (APS) (% 10)	195 µl	89 µl

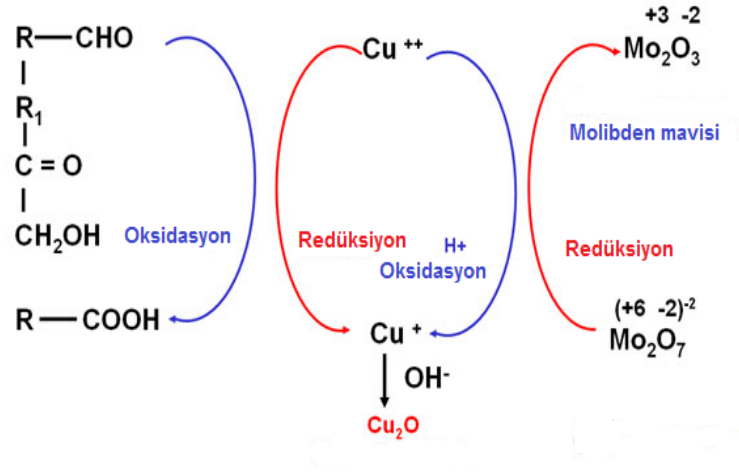
SDS-PAGE'e uygulanacak örneklerin elde edilmesi için ilk olarak hücrelerin parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla, hücreler santrifüjlendi (4000 rpm, 4°C, 30 dk) ve süpernatant atıldı. Hücre pelleti, gram başına 5 ml homojenizasyon tamponu olacak şekilde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu buzda bekletilen tüpe alındı. Ultrasonik homojenizatör ile parçalama işlemi, küçük ölçekli üretimler için (% 20, 10 s aralıklarla toplam 2 dk) şeklinde ve büyük ölçekli üretimler için (% 40, 10 s aralıklarla toplam 5 dk) şeklinde uygulandı. Homojenat santrifüjlendi (13,000 rpm, 4°C, 30 dk) ve süpernatant (çözünür fraksiyon) toplandı. Çözünür fraksiyon (süpernatant) ve çözünmez fraksiyon (çökelek) SDS-PAGE'e uygulandı.

SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler 1:1 oranında 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dk inkübe edildi. SDS-PAGE'e 10-15µl örnek uygulandı ve 30 mA, 150 V altında yaklaşık 45 dk yürütüldü. Bu süre sonunda jel ve boyama çözeltisi 20 dk oda sıcaklığında karıştırıldı (50 rpm). Boya çözeltisinden alınan jel, saf su içeren bir beher içinde mikrodalga fırında kaynatıldı.

3.8 *TmSel12A* Aktivite Tayini

Rekombinant üretimi gerçekleştirilen ve metal-şelat afinite kromatografisi yoluyla saflaştırılan *TmSel12A* enziminin aktivite tayini, Somogyi-Nelson indirgen şeker tayin yöntemi (Somogyi, 1952) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntem, indirgen şeker tayini için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Yöntem, indirgen şekerin alkali bakır tartarat reaktifi ile ısıtılması sonucu Cu⁺²'nin Cu⁺¹'e indirgenmesi ve oluşan Cu₂O'nin arsenomolibdik asit ile muamelesi sonrasında molibdik asittin molibden mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.2). Oluşan mavi renk 600 nm'de spektrofotometrik

olarak izlenmektedir. Arsenomolibdik asidin eklenmesi sonucu, maksimum renk yoğunluğunun elde edilmesi 12-15 dk sürmektedir ve renk ~40 dk stabildir.

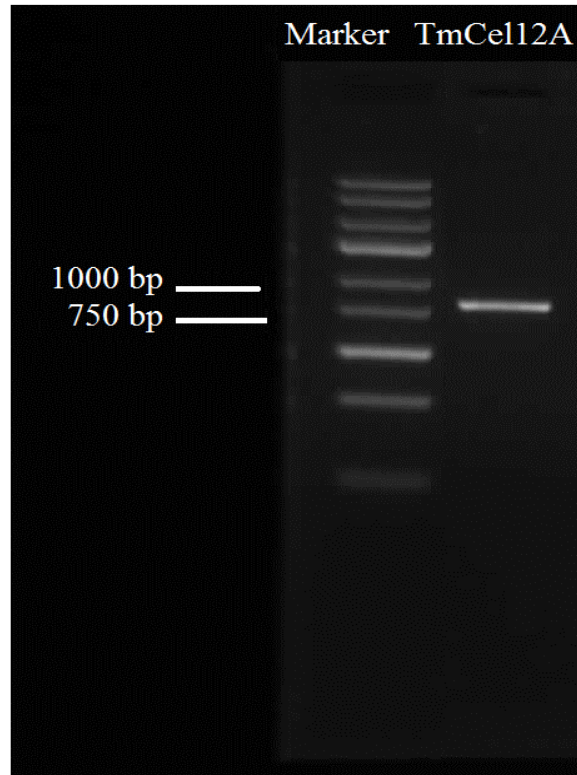


Şekil 3.2 Somogyi-Nelson indirgen şeker tayin yönteminin çalışma prensibi

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 *tmSel12A* Geninin Klonlanması ve Rekombinant Üretimi

tmSel12A geninin amplifikasyonu için kalıp olarak *T. maritima* genomik DNA'sı kullanıldı. 5'- *TmCel12A HindIII* ve 3'- *TmCel12A NotI* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrasında gen fragmentleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 795 bp uzunluğundaki DNA fragmentleri UVStar Illuminator 365 nm sistemi yardımı ile görüntülendi (Şekil 4.1)

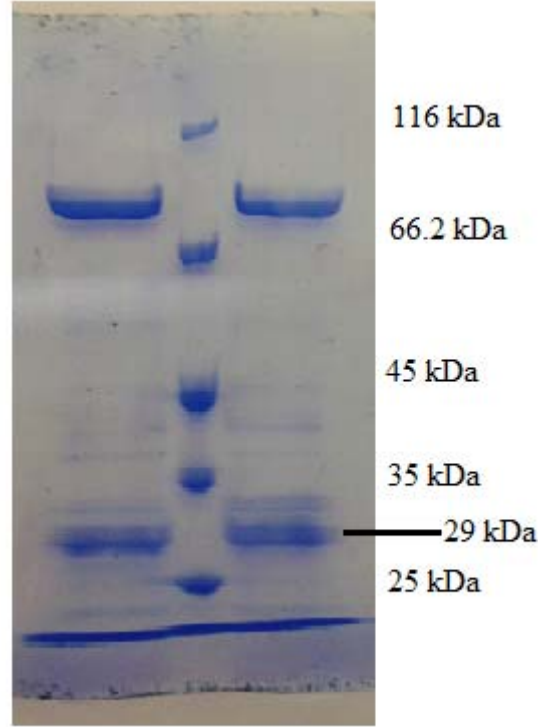


Şekil 4.1 *tmSel12A* kodlayan gen fragmentinin agaroz jeldeki görüntüsü

DNA fragmentleri agaroz jelden GeneJET™ Gel Extraction Kit kullanılarak izole edildi. DNA fragmentleri ve pET21a(+) plazmid vektörü *HindIII*-HF ve *NotI*-HF restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Reaksiyon sonunda örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve agaroz jelden izolasyon gerçekleştirildi. DNA konsatrasyonları QuantiFluor™ ile tayin edildi ve ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında, her bir ligasyon karışımı kimyasal kompetent *E.coli* XL1 Blue hücrelerine transforme edildi. 37°C'de gece boyu inkübasyonun ardından plazmid taşıyan 50 koloni seçilerek koloni PCR gerçekleştirildi. İncelenen kolonilerden 40 tanesinin taşıdığı plazmid DNA'nın

kromatografisine uygulandı ve doğal *TmSel12A* enzimi kolondan elüe edildi. Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu 0,6 mg/ml olarak tayin edildi.

Bu elüattan örnek alınarak SDS-PAGE'e uygulandı. Şekil 4.3'te SDS-PAGE uygulamasının sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.3 Doğal *TmSel12A* enziminin saflaştırılmasına ilişkin SDS-PAGE görüntüsü

4.2 Gen Kütüphanesinin Oluşturulması

Gen kütüphanesi oluşturulması amacı ile gerçekleştirilen ep-PCR'da, kalıp DNA olarak 48. koloniden izole edilen plazmid kullanıldı. PCR için 5'-Lib *TmCel12A HindIII* ve 3'-Lib *TmCel12A NotI* primerleri kullanıldı. ep-PCR sonrasında gen fragmentleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 1095 bp uzunluğundaki DNA fragmentleri UVStar Illuminator 365nm sistemi kullanılarak görüntülendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Error-prone-PCR sonrası elde edilen fragmentlerin agaroz jel görüntüsü

DNA fragmentleri agaroz jelden GeneJET™ gel extraction kit kullanılarak ekstrakte edildi. DNA fragmentleri ve pET21a(+) plazmid vektörü *Hind*III-HF ve *Not*I-HF restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Reaksiyon sonunda örnekler agaroz jel elektroforezde kontrol edildi. Doğrulukları tespit edilen örneklerin DNA konsantrasyonları QuantiFluor™ spektrofotometri ile tayin edildi ve farklı oranlar kullanılarak ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu sonunda, 65°C’de 10 dk inkübasyon ile T4 DNA ligazın inaktivasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon karışımları daha sonra nitroselüloz filtreler kullanılarak diyalizlendi. Diyalizlenen örneklerin elektrokompotent *E.coli* Turbo hücrelerine elektroporasyonu gerçekleştirildi. Gen kütüphanesinin büyüklüğünü belirlemek ve koloni PCR gerçekleştirmek için belli oranlarda seyreltilmiş hücre süspansiyonu ilave edilmiş petriler hazırlandı. 37°C’de gece boyu inkübasyonları gerçekleştirilen bu petrilerden 15 koloni seçilerek koloni PCR gerçekleştirildi. Agaroz jele uygulanan 15 koloni PCR örneğinden 14 tanesinin selülaı kodlayan geni taşıdığı belirlendi. Formül 3.2 kullanılarak gen kütüphanesi için transformasyon etkinliğı $2,25 \times 10^5$ CFU, ligasyon etkinliğı formül 3.3 ile hesaplanarak %93 olarak bulundu. Bu değerlerden yararlanılarak gen kütüphanesinin büyüklüğü $2,1 \times 10^5$ olarak belirlendi. Hücrelerin inkübe edildiğı

büyük petrilere, GenJET™ Plasmid Midiprep Kit kullanılarak plazmid ekstrasyonu gerçekleştirildi.

RbCl metodu ile hazırlanmış *E.coli* BL21 (DE3) kodon plus RIPL kompetent hücrelerine, kütüphane varyantlarını taşıyan plazmid, doğal enzimi kodlayan geni taşıyan plazmid (48. koloni) (pozitif kontrol) ve *tmSel12A* genini taşımayan pET21a(+) plazmidi (negatif kontrol) ayrı ayrı transforme edildi. Ampisilin, kloramfenikol ve streptomisin içeren LB agar petrilere 37°C’de gece boyu inkübe edildi. 37°C’de gece boyu inkübe edilen *E.coli* BL21 (DE3) kodon plus RIPL hücreler ampisilin, kloramfenikol, streptomisin ve 0,5 mM IPTG içeren LB agar petrilere (Ø 15cm) steril bir kürdan yardımı ile noktalar şeklinde ekildi. Her bir koloninin ekimi, petri yüzeyinde karelerle sınırlandırılmış alanda gerçekleştirildi. Her petriye, pozitif (selülaz geni taşıyan plazmid transforme edilmiş) ve negatif kontrol (boş plazmid) hücrelerinin de ekimi gerçekleştirildi. Replika için aynı hücrelerin ampisilin, kloramfenikol ve streptomisin içeren LB agar petrilere de çizgi ekimleri gerçekleştirildi. Tüm petrilere geceboyu 37°C’de inkübe edildi. Replika petrilere 4°C’de saklandı.

4.3 Gen Kütüphanesinden *TmSel12A* Varyantlarının Taranması

Kütüphane tarama yönteminin optimizasyonu yoluyla liziz tamponu içeriği belirlendi. Kütüphane varyantlarını içeren ve gece boyu 37°C’de inkübe edilen petrilere, koloni başına 60 µl olacak şekilde %1 (w/v) SDS çözeltisi ilave edildi. Petrilere 37°C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası agar yüzeyi fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) ile yıkandı.

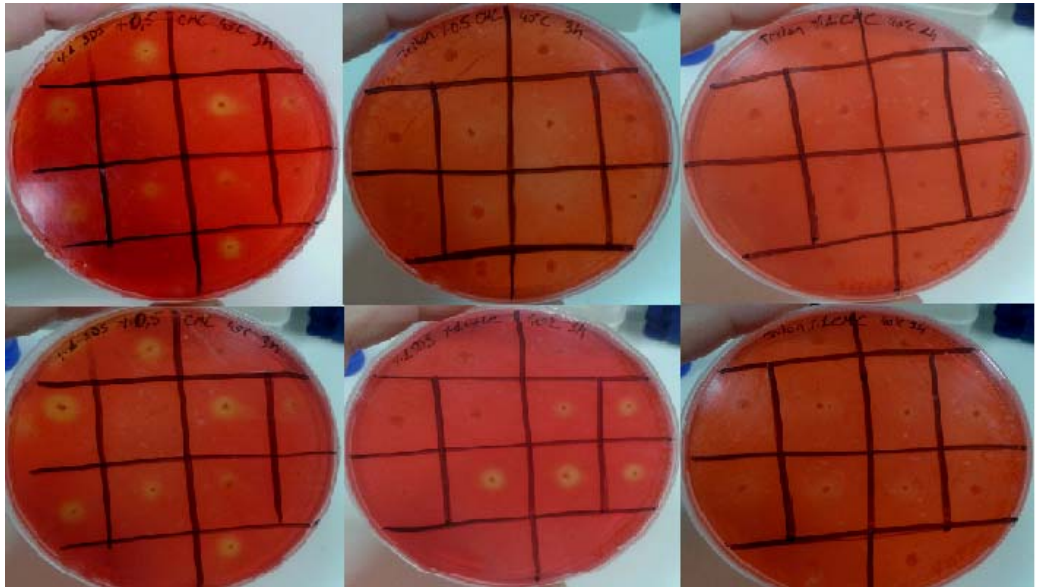
Bazık koşullarda yapılacak tarama için borat tamponunda (50 mM, pH 9,0), asidik koşullarda gerçekleştirilecek tarama için fosfat tamponunda (50 mM, pH 5,0) hazırlanmış %1 (w/v) CMC kullanıldı. Farklı pH değerlerine sahip CMC çözeltisi %0,8 (w/v) agar ile karıştırıldı ve üst agar hazırlandı. Her bir petriye 35ml üst agar döküldü ve agarın donması beklendi. Ardından 40°C’de 3 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında petri yüzeyleri, suda hazırlanmış olan %0,1 (w/v) Kongo kırmızısı (20 ml) ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Ardından Kongo kırmızısı uzaklaştırıldı ve 1 M NaCl ile 2 defa yıkandı. Yıkama sonrası, ikinci kez 1 M NaCl (20 ml) ilave edildi ve oda sıcaklığında 20

dk bekletildi. İnkübasyon sonrasında NaCl uzaklaştırıldı ve oluşan zonlar karşılaştırıldı (Şekil 4.5).

Bu yöntem ile 2350 varyant asidik ve bazik koşullarda tarandı. İlk tarama sonucunda zon oluşturan varyantlar arasında karşılaştırma yapabilmek için, CMC içeren agarda tarama işlemi tekrarlandı. Bazik koşullarda gerçekleştirilen ilk taramada 165 adet varyantın gözle ayırt edilebilir zon oluşturduğu tespit edildi. Gerçekleştirilen tekrarlar tutarlı sonuçlar veren 13 varyant belirlendi. Bu varyantlar arasında, en büyük zonları oluşturan 3 varyant tespit edildi ve bu hücrelerden plazmid DNA izole edildi. DNA dizi analizi için İYTE BİYOMER'e gönderildi.

Asidik koşullarda gerçekleştirilen taramada ilk aşamada 249 adet varyantın zon oluşturduğu görüldü. Gerçekleştirilen tekrarlar tutarlı sonuçlar veren 52 varyant tespit edildi. Bunların arasından 2 varyant belirlendi ve DNA dizi analizi gerçekleştirildi.



Şekil 4.5 Gen kütüphanesinin CMC agar petrilerde taranması ve zon oluşumu

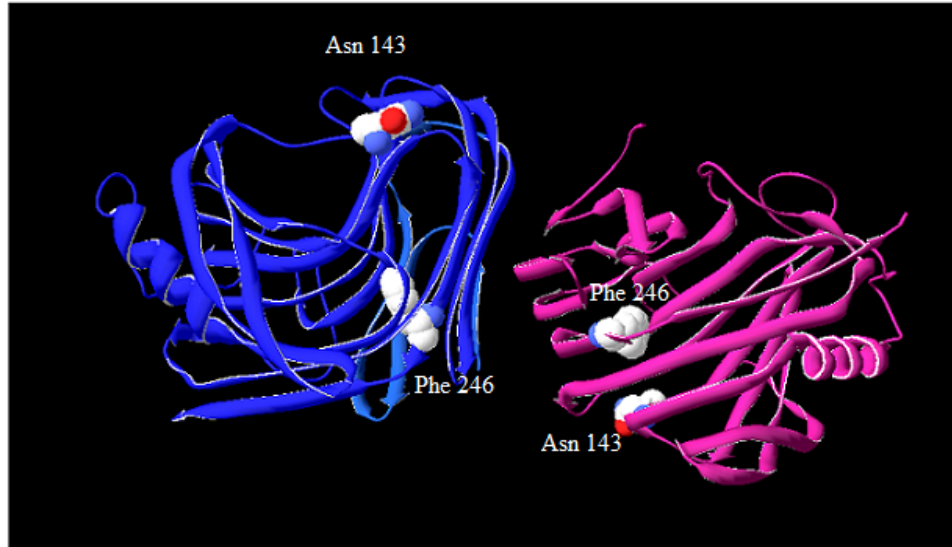
4.4 DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kütüphane içinden seçilen 5 varyantın DNA dizi analizleri İYTE BİYOMER laboratuvarında gerçekleştirildi. DNA dizi analizi sonuçları, Bioedit V.7.0.9 ile karşılaştırıldı. İncelenen dizilerde; mutasyon sıklığı 5,25 mutasyon/kbç, GC değişikliklerinin oranı %10, AT değişikliklerinin oranı ise

%90 olarak hesaplandı. Bu değişimlerin %95'i transisyon tipi mutasyonlar, % 5 ise transversiyon tipi mutasyon olduğu görüldü.

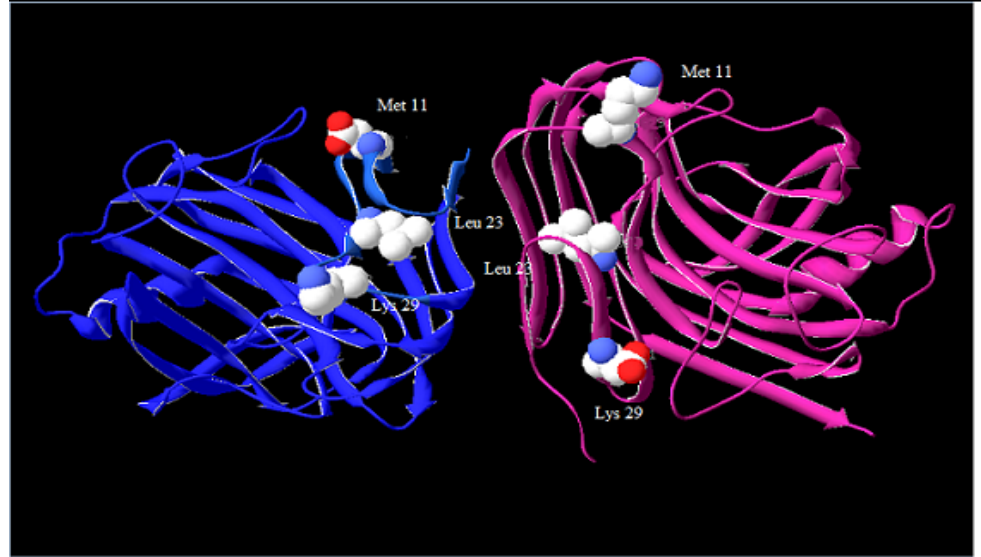
Taq DNA polimerazın kullanıldığı yöntemlerde ağırlıklı olarak, purin(A,G)→pürin(A,G), primidin(T,C)→primidin(T,C) değişimlerini ifade eden transisyon tipi mutasyonlar gözlenmektedir. Wong et al., 2007'de gerçekleştirdikleri çalışmada ep-PCR'da Taq DNA polimeraz kullanıldığı durumlarda AT→GC değişimlerine eğilim olduğu belirtilmiştir (Evrar, 2009). Kool tarafından 2002'de yapılan çalışmada purin-primidin yanlış eşleşme geometrisinin, purin-purin veya primidin-primidin yanlış eşleşmelerine kıyasla, polimeraz aktif merkezi ile daha uyumlu olduğu belirlenmiştir (Evrar, 2009). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç bu bulgu ile uyumludur.

Bazik tarama sonucu elde edilen varyantın N143K ve F246L amino asit değişikliklerini içerdіęi belirlendi. Bu mutasyonların üç boyutlu yapıdaki pozisyonları Şekil 4.6'de gösterilmiştir.

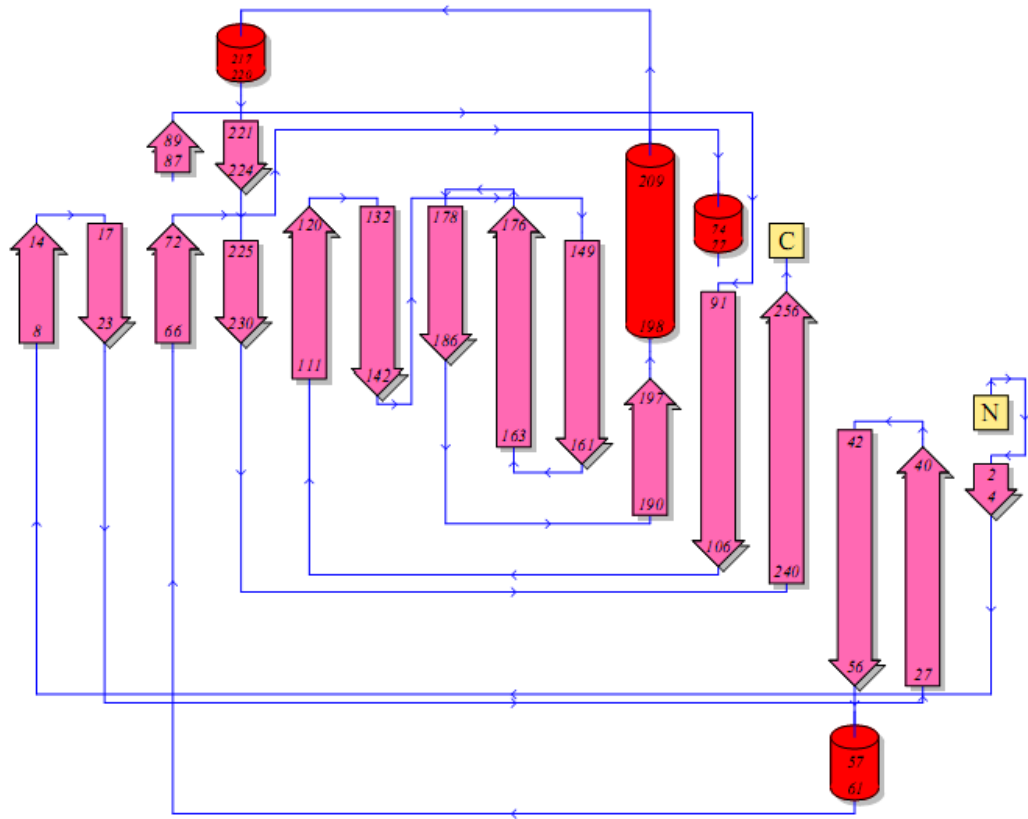


Şekil 4.6 N143K+F246L varyantının içerdіęi amino asit değişiklikleri

Asidik tarama sonucu elde edilen varyantın D11G, L23P ve K29R amino asit değişikliklerini içerdіęi belirlendi. Bu mutasyonların üç boyutlu yapıdaki pozisyonları Şekil 4.7'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7 D11G+L23P+K29R varyantının içerdiği amino asit değişiklikleri

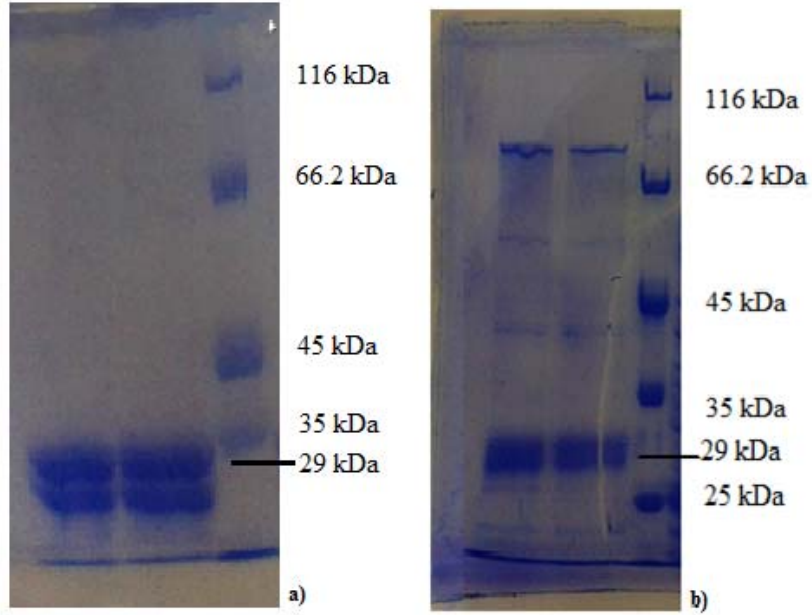


Şekil 4.8 *TmSel12A* sekonder yapı içeriğinin şematik gösterimi

Cheng et al. (2010) tarafından kristal yapısı aydınlatılmış olan *TmSel12A* enziminin sekonder yapısı şematik olarak şekil 4.8’de gösterilmiştir (EMBL-EBI, 2014).

4.5 Varyantların Heterelog Ekspresyonu ve Saflaştırılması

E.coli BL21 (DE3) codon plus RIPL hücrelerinde bulunan varyantlardan tek koloni alınarak, ampicilin, kloramfenikol ve streptomisin içeren LB sıvı ortamında geceboyu 37°C’de inkübe edildi. Ardından aynı antibiyotikleri içeren 4,8L sıvı LB ortamına inoküle edilerek 37°C’de OD₆₀₀ 0,4-0,6’ya ulaşınca kadar inkübe edilip son konsantrasyon 0,5 mM olacak şekilde IPTG ile indüksiyonu gerçekleştirilerek 30°C’de geceboyu inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreler 4000 rpm’de, 30 dk, 4 °C’de santrifüjlendi (Eppendorf 5810R santrifüj). Ardından hücre pelleti her 1 gram için 5 ml homojenizasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu buz üzerine alındı ve sonikasyon (% 40; 10 s aralıklarla toplam 5 dk, x2) uygulandı. Homojenat 13000 rpm’de, 30 dk, 4°C’de santrifüjlendi (Hettich MIKRO 200R santrifüj) ve çözünür fraksiyon metal şelet afinite kolonuna uygulandı. Kolondan elüe edilen enzimlerin Bradford yöntemiyle protein tayinleri gerçekleştirildi. Her 2 varyantın protein konsantrasyonları 0,6 mg/ml olarak hesaplandı. Saflaştırılmış olan enzimlerden örnekler alınarak SDS-PAGE’e uygulandı. Şekil 4.10’da N143K+ F246L ve D11G+L23P+K29R mutantlarının SDS-PAGE görüntüleri verilmiştir.



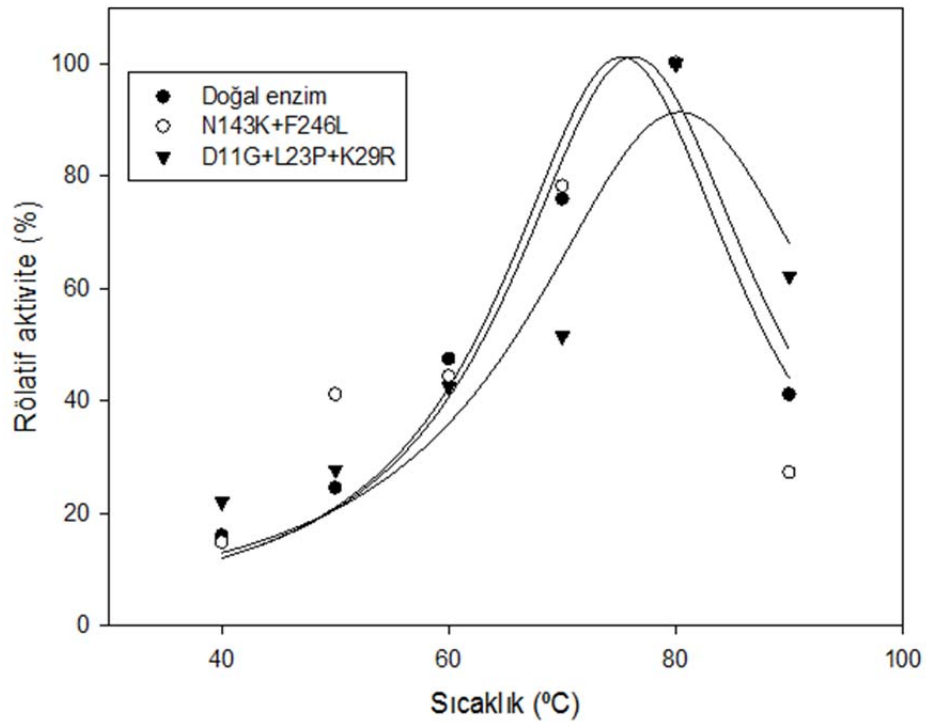
Şekil 4.9 Saflaştırılan N143K+F246L (a) ve D11G+L23P+K29R (b) mutantlarının SDS-PAGE görüntüleri

4.6 Doğal TmSel12A ve N143K+F246L ve D11G+L23P+K29R Varyantlarının Enzimatik Karakterizasyonu

Reaksiyon karışımları, aksi belirtilmediği koşullarda, son enzim konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Enzim ve substrat 80°C’de 15 dk inkübe edildi ve ardından reaksiyon hacmi kadar alkali bakır tartarat reaktifi eklenip vorteks ile karıştırıldı. 95°C’de 20 dk inkübasyonun ardından, arsenomolibdat reaktifi eklendi ve gaz çıkışı bitinceye kadar vortekslendi. Ardından santrifüjlendi (oda sıcaklığı, 2500 rpm, 10 dk) ve 600 nm’deki absorbans değerleri belirlendi.

4.6.1 Optimum sıcaklık tayini

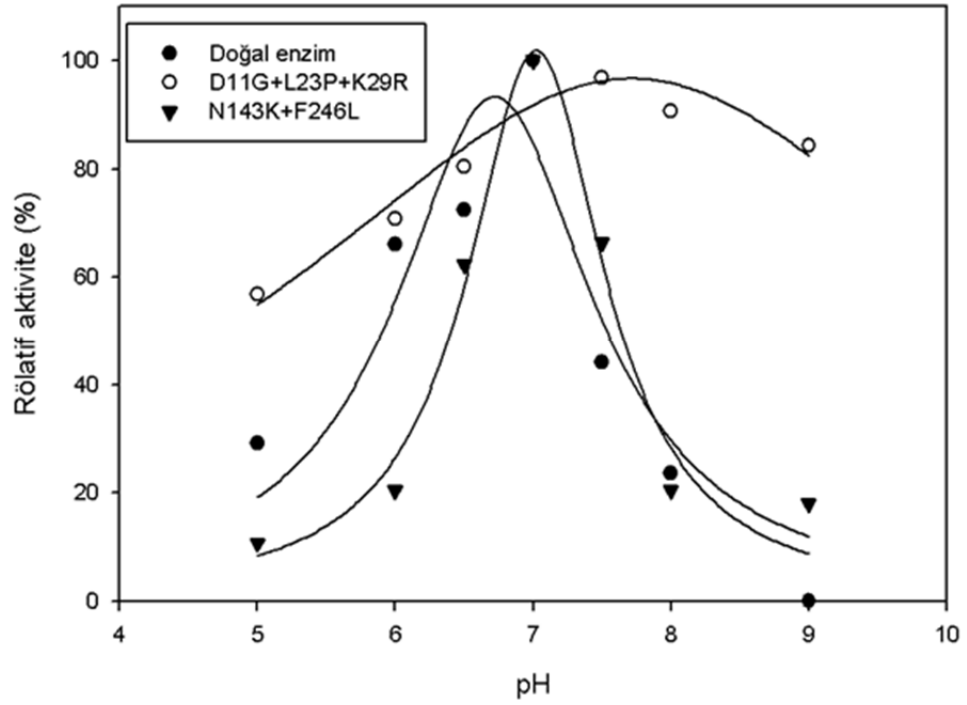
Reaksiyon karışımları, fosfat tamponu (250 mM, pH 7.0), bu tamponda hazırlanmış %1 CMC ve enzim içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımları farklı sıcaklıklarda (40-90°C) 15 dk inkübe edildi. Aktivite ölçümü yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Optimum sıcaklık grafiği

4.6.2 Optimum pH tayini

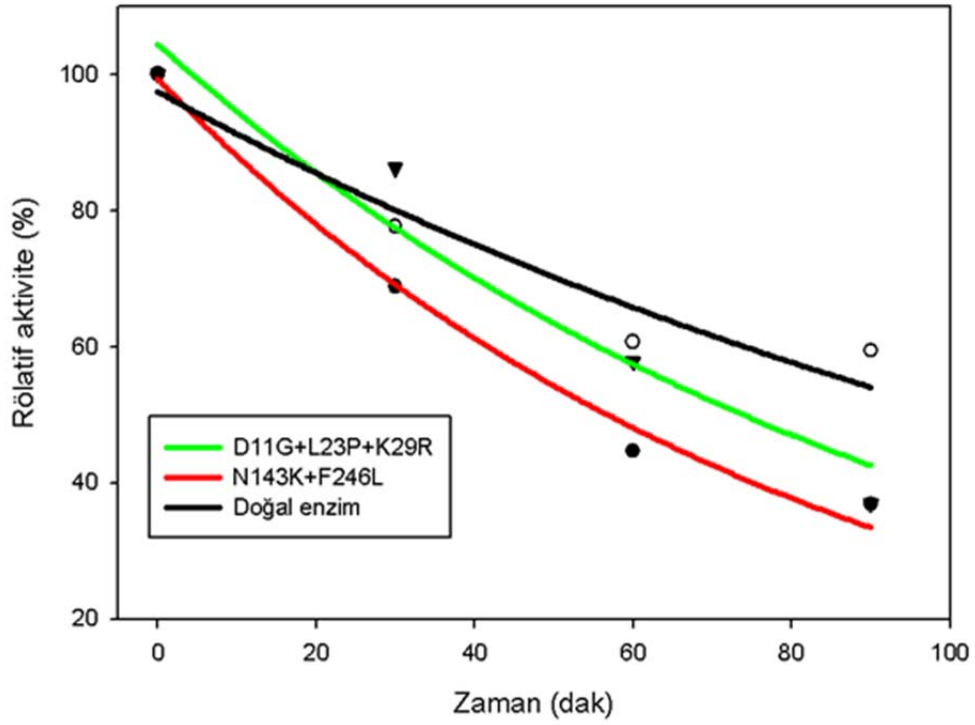
Aktivite ölçümleri, farklı pH değerlerindeki tampon ortamlarında ve %1 CMC varlığında belirlendi. Bu amaçla 250 mM sitrat (pH 5,0), fosfat (pH 6,0), Tris (pH 7,0) ve borat (pH 9,0) tamponları kullanıldı. Aktivite ölçümü yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Optimum pH grafiği

4.6.3 Termal stabilite tayini

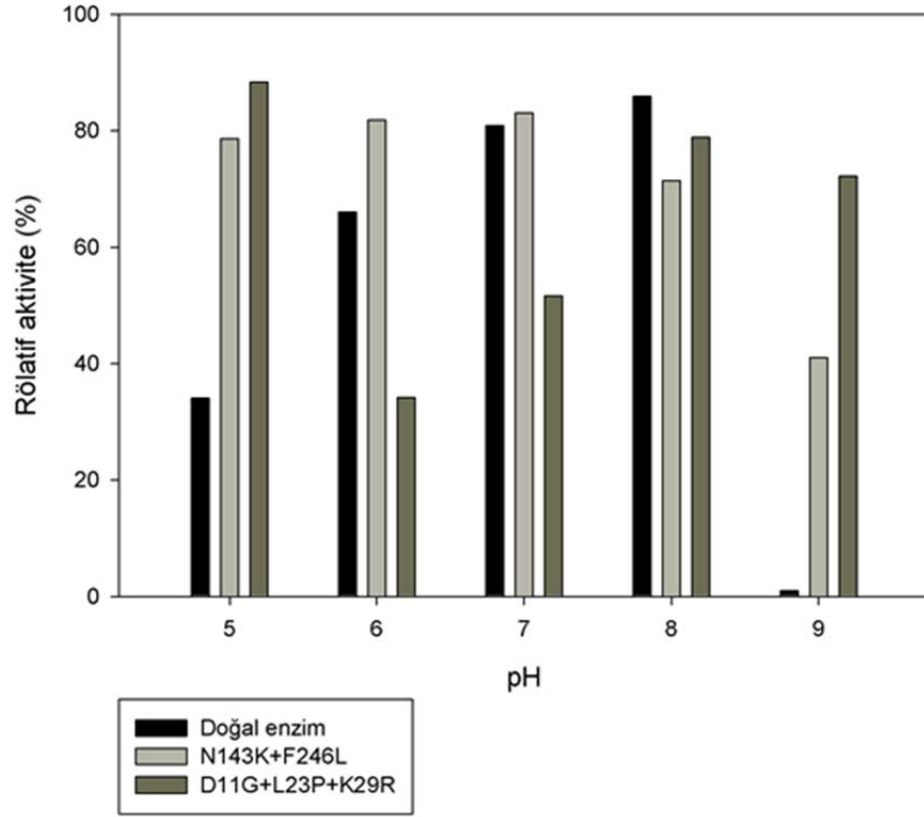
80°C'de farklı sürelerde (0-90 dk) inkübe edilen enzimlerden alınan örneklerde standart koşullarda (pH 7, %1 CMC) aktivite tayini gerçekleştirildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Termal stabilite grafiği

4.6.4 pH stabilite tayini

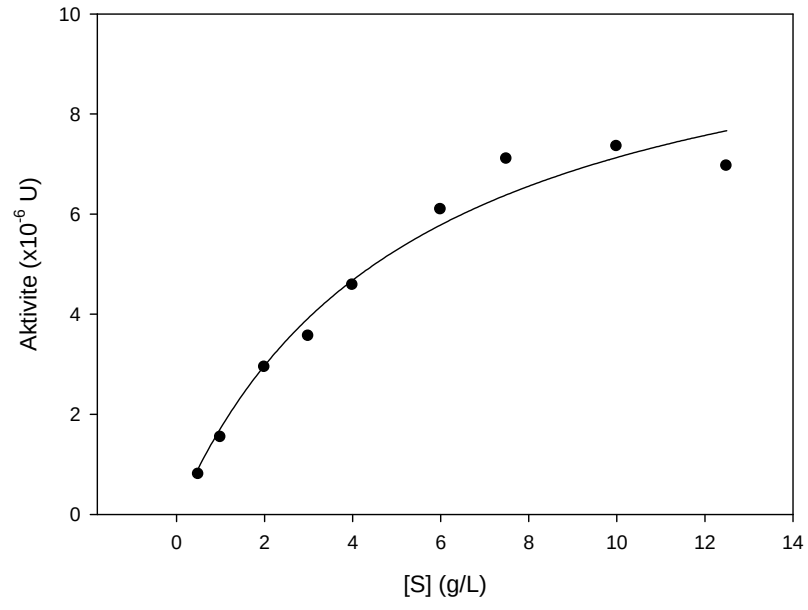
Doğal enzim ve mutant enzimler konsantrasyonları 0,6 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 100 µl enzim örneğine eşit hacimde farklı tamponlar eklendi. pH stabilitesinin belirlenmesi amacı ile 250 mM sitrat (pH 5,0) fosfat (pH 6,0), Tris (pH 8,0) ve borat (pH 9,0) kullanıldı. Enzim ve tampon karışımları oda sıcaklığında 4 saat bekletildi. Kontrol olarak aynı tamponların kullanıldığı reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite ölçüldü. Farklı tamponlardaki inkübasyon sonrasında kalan aktivite, başlangıçtaki (kontrol örneğinin aktivitesi) aktivite ile karşılaştırıldı (Şekil 4.13).



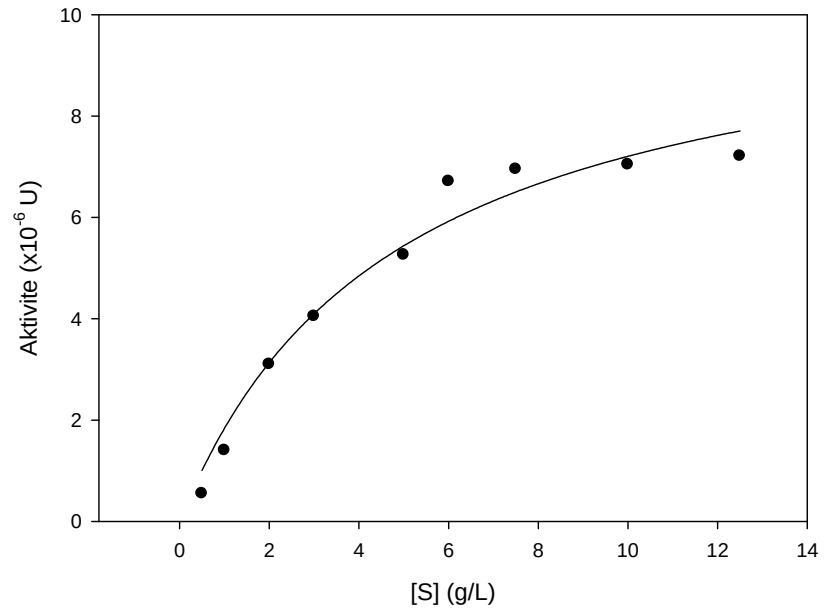
Şekil 4.13 pH stabilite grafiği

4.6.5 Kinetik parametrelerin tayini

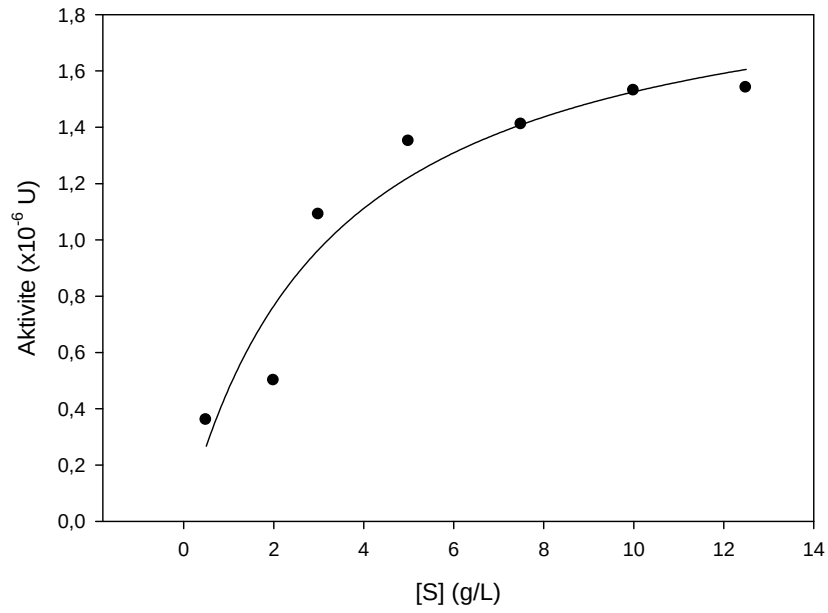
Reaksiyon karışımları farklı konsantrasyonlarda substrat (%0,05-1,25 CMC) içerecek şekilde hazırlandı ve aktivite tayini gerçekleştirildi (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.14 Doğal *TmSel12A* enzimi için Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4.15 N143K+F246L mutan için Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4.16 D11G+L23P+ K29R mutantı için Michaelis-Menten grafiği

Sigma-Plot hiperbolik fonksiyonu kullanılarak Çizelge 4.1’de belirtilen K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.1 Doğal ve mutant enzimlerin kinetik parametreleri

	$V_{max} (x 10^{-6} U)$	$K_M (g/L)$
Doğal <i>TmSel12A</i>	10,96±1,07	5,36±1,17
D11G+L23P+K29R	2,03±0,26	3,30±1,22
N143K+F246L	10,67±1,04	4,81±1,11

Doğal enzim ve mutant enzimler ile ilgili yapılan karakterizasyon denemeleri sonucunda, optimum pH, pH stabilite ve termal stabilite gibi özelliklerde bazı farklılıklar tespit edildi. Özellikle, mutant enzimlerin pH 5, pH 6 ve pH 9’da gerçekleştirilen inkübasyon sonucu yapısal kararlılıklarını korudukları belirlendi. Benzer şekilde, enzimlerin optimum pH profillerinde de farklılıklar gözlemlendi. Termal stabilite açısından, gerçekleştirilen amino asit değişikliklerinin termofilik kaynaklı olan enzimin termal stabilitesinde az da olsa düşüşe neden

olduğu belirlendi. Hipertermofilik enzimler, mezofilik enzimlere kıyasla daha rigid bir yapıya sahiptir (Vieille and Zeikus, 2001). Bu nedenle, termal stabilitenin korunması için gerçekleştirilen amino asit değişikliklerinin rigid yapıyı etkilememesi gerekmektedir. D11G+L23P+K29R varyantında, asidik karakterdeki aspartat daha az hacimli ve yüksüz glisin ile değiştirilmiştir. Hidrofobik amino asit yerine, heliks kırıcı özellikteki prolin amino asiti bulunmaktadır. Lizin yerine daha güçlü bir baz olan arginin bulunmaktadır. N143K+F246L varyantında polar karakterde ve yüksüz olan asparagin, pozitif yüklü bazik bir amino asit ile değişmiştir. Fenil alaninin lösin mutasyonunun ise çok önemli bir etki oluşturmayacağı öne sürülebilir. Ancak, bu mutasyonların enzimin katalitik özelliklerine ve kararlılığına olan etkisinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. D11G+L23P+K29R varyantı için üç amino asit değişikliğinin tekli nokta mutasyonları ile incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapı-fonksiyon ilişkisine göre, proteinlerin fonksiyonel özellikleri, yapısal özelliklerine bağlıdır. Stabilite ile ilgili olarak, genellikle yüzeysel hidrofilik veya gömülü hidrofobik bölgelerin etkileri, tuz köprüleri, Van der Waals etkileşimleri, iyon çiftlerinin durumu, disülfid köprülerinin varlığı, sekonder yapıda gözlenen motifler, molekül içinde ve çevresindeki su ile etkileşimi, H bağları gibi birçok parametre işlev görmektedir. Proteinlerin karmaşık yapıları, çeşitlilik ve özgünlükleri termal stabilitede etkili olan faktörlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Termal stabilitenin artırılması, protein mühendisliğinin en zor problemlerinden biridir.

Termal stabilitenin artırılması amacı ile çeşitli stratejiler uygulanmıştır. Bu çalışmalarda çoğunlukla yapıya prolin amino asidinin eklenmesi, disülfid bağlarının oluşturulması gibi genel yöntemler kullanılmıştır. Termofilik proteinler ile yapılan denemelerde, stabiliteyi arttırdığı bilinen yöntemlerin sonuç vermediği belirlenmiştir (Nemeht et al. 2001). Bunun yanında, bir amino asit değişiminin, özellikle bu amino asit proteinin iç bölgesinde yer alıyorsa, olası tüm etkilerinin değerlendirilemeyeceği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada, stabiliteyi artırması beklenen ve yüzeyde oluşturulan iyon çiftleri için suyun yüksek dielektrik sabiti ve iyon çiftleri ile suyun etkileşime geçmesi gibi öngörülemeyen faktörlerin olduğu ve beklenmeyen şekilde destabilizasyona neden olduğu belirtilmiştir.

Trichoderma reesei endoglukanaz III enziminin pH aktivite profilinin değiştirilmesine ilişkin çalışmada, 321.pozisyondaki asparagin artığının pH profili

için önemli olduğu belirlenmiştir (Wang et al., 2005). N321D değişikliği sonucu enzim optimum pH'ı 4,8'den 4,0'e değiştirilmiştir.

Cellulomonas fimi selüloz A enziminin pH aktivite profilinin değiştirilmesine ilişkin çalışmada, protein yüzeyindeki yüklü grupların mutasyona uğratılması sonucu optimum pH'da kayma gerçekleştiği gösterilmiştir (Cockburn and Clarke, 2011). Bu tez çalışmasında elde edilen varyantlar da pozitif ve negatif yüklü amino asit değişiklikleri içermektedir.

5. DEĞERLENDİRME

Bu tez kapsamında, $2,1 \times 10^5$ varyant içeren gen kütüphanesinden 2350 varyant asidik ve bazik koşullarda tarandı. Kütüphaneden daha fazla varyant taranmasına imkan veren mikropilaka temelli ve robotik sistemlere kıyasla, agar-petri tarama yöntemi basit ve ucuzdur. Bununla birlikte, taranabilecek varyant sayısı sınırlıdır. Agar petri yönteminin diğer dezavantajları, koloniler arasındaki protein ekspresyon düzeyi farklılıklarından etkilenmesi ve varyantlar arasındaki farkların kalitatif olarak değerlendirilmesidir.

Bu tez çalışmasında kütüphaneyi oluşturan varyantların yaklaşık %1'i CMC agar petri lerde tarandı. Taranan varyant sayısı az olmakla birlikte, termofilik sel12A enziminin pH profilinin protein mühendisliği yoluyla değiştirilebileceğini göstermesi açısından literatüre katkı yapacaktır. Amino asit değişikliklerinin aktiviteye etkisinin daha detaylı karakterizasyonu, yapı-fonksiyon çalışmaları için veri sağlayacaktır. Bu çalışmada elde edilen gen kütüphanesi yalnızca enzimin pH özellikleri açısından taranmıştır. İleriye yönelik çalışmalarda, elde edilen kütüphanenin diğer enzimatik özellikler (aktivite, termal stabilite, organik çözen stabilitesi vb.) için de taranmasına devam edilmesi planlanmaktadır. Selülozın geniş endüstriyel uygulamaları dikkate alındığında, asidik/bazik ortamlarda aktivitesini koruyabilen mutantların geliştirilmesi, endüstriyel uygulamalara katkı yapacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arnold, F.H.**, 2001, Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design, *Nature*, 409:253-257p.
- Beckmann, R.A., Mildvan, A.S. and Loeb, L.A.**, 1985, On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis *in vitro*, *Biochemistry*, 24(21): 5810-5817p.
- Bhat, M.K. and Bhat, S.**, 1997, Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnology Advances*, 15:585-620p.
- Bhat, M.K.**, 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18:355-383p.
- Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., Macleod, A., McIntosh, L., Monem, V., Nitz, M., Rose, D.R., Tull, D., Wakorchuch, W.W., Wang, Q., Warren, R.A., White, A. and Wither, S.G.**, 1998, Mechanism of cellulases and xylanases, *Biochemical Society Transactions*, 26:156-160p.
- Bornschever, U.T. and Pohl, M.**, 2001, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:137-143p.
- Bradford, M.M.**, 1976, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Chemistry*, 72: 248-254p.
- Bronnenmeier, K., Kern, A., Liebl, W. and Staudenbauer, W.L.**, 1995, Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4):1399-1407p.
- Brown, T.A.**, 2006, Gene cloning and DNA analysis an introduction, Wiley-Blackwell, 408p.
- Canterel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B.**, 2009, The carbohydrate- active enzymes database (Cazy): an expert resources for glycogenomics, *Nucleic Acids Research*, 37:233-338p.
- Cheng, Y.S., Ko, T.P., Wu, T.H., Ma, Y., Huang, C.H., Lai, H.L., Wang, A.H., Liu, J.R. and Guo R.T.**, 2010, Crystal structure and substrate-

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- binding mode of cellulase 12A from *Thermotoga maritima*, *Proteins*, 79: 1193-1204p.
- Cheng, Y.S., Ko, T.P., Huang, J.W., Wu, T.H., Lin, C.Y., Luo, W., Li, Q., Ma, Y., Huang, C.H., Wang, A.H.J., Liu, J.R. and Guo, R.T., 2011,** Enhanced activity of *Thermotoga maritima* cellulase 12A by mutating a unique surface loop, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3):661-669p.
- Cherry, J.R. and Fidantsef, A.L., 2003,** Directed evolution of industrial enzymes: an update, *Current Opinion In Biotechnology*, 14:438-443p.
- Chhabra, S.R., Shockley, K.R., Conners, S.B., Scott, K.L., Wolfinger, R.D. and Kelly, R.M., 2003,** Carbohydrate-induced differential gene expression patterns in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *The Journal of Biological Chemistry*, 278:7540-7552p.
- Chhabra, S.R. and Kelly, R.M., 2002,** Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without a carbohydrate binding module (CBM), *FEBS Letters*, 531:375-380p.
- Chhabra, S.R., Shockley, K.R., Ward, D.E. and Kelly, R.M., 2002a,** Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan and mannan based polysaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2):545-554p.
- Chhabra, S.R. and Kelly, R.M., 2002b,** Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without a carbonhydrate binding module (CBM), *FEBS Letters*, 531:375-380p.
- Cockburn, D.W. and Clarke, A.J., 2011,** Modulating the pH-activity profile of cellulase A from *Cellulomonas fimi* by replacement of surface residues, *Protein Engineering Design Selection*, 24(5):429-37p.
- Conners, S.B., Mongodin, E.F., Johnson, M.R., Montero, C.I., Nelson, K.E., and Kelly, R.M., 2006,** Microbial biochemistry, physiology and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species, *FEMS*, 30:872-905p.
- Coughlan, M.P., 1985,** The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3: 39-109p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Coutinho, P.M. and Henrissat, B.,** 1999, Carbohydrate-active enzymes; an integrated database approach, 3-12, Recent Advances In Carbohydrate Bioengineering, H.J. Gilbert, G.Davies, H. Henrissat and B.Svensson (Eds.), The Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 312p.
- Davies, G.J., Sinnott, M.L.,** 1997, Glycosyl transfer, 119-208p Comprehensive Biological Catalysis 1, Sinnott, M.L. (Ed.), Academic Press, New York, 652p.
- Dhiman, T.R., Zaman, M.S., Gimenez, R.R., Walters, J.L. and Treacher, R.,** 2002, Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding, *Animal Feed Science And Technology*, 101(1-4): 115-125p.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W.,** 1988, High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage elektroporation, *Nucleic Acids Research*, 6(13): 6127-6145p.
- Eckert, K.A. and Kunkel, T.A.,** 1990, High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Nucleic Acids Research*. 18(13):3739-3744p.
- Evran, S.,** 2009, Rasyonel ve Evolusyoner Enzim Dizaynı Yolu İle İki ($\beta\alpha$)8-Barrel Enziminin Katalitik Aktivitelerinin Değiştirilmesi, Doktora Tezi, EÜ Biyokimya AD, İzmir, 164s (yayınlanmamış).
- Farinas, E.T., Bulter, T. and Arnold, F.H.,** 2001, Directed enzyme evolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 12:545-551p.
- Fidancı,U.R.,**“Karbohidratlar”,80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Karbohidratlar.html ; Erişim tarihi: 17/06/2013
- Fromant, M., Blanquert, S. and Plateau, P.,** 1995, Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 224(1): 347-353p.
- Henrissat, B.,** 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, 280:309-316p.
- Henrissat, B. and Bairoch, A.,** 1993, New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, 293:781-788p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Henrissat, B. and Bairoch, A.,** 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, 316: 695-696p.
- Henrissat, B., Teen, T.T. and Women, R.A.J.,** 1998, A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants, *FEBS Letters*, 425: 352-354p.
- Huber, R., Langworthy, T.A., Konig, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. and Stetter, K.O,** 1986, *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C, *Archieves of Microbiology*, 144:324-333p.
- Ilmén, M.,** 1997, Molecular Mechanism Of Glucose Repression In The Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*, PhD Thesis, VTT Publication no.315, Technical Reseach Center of Finland, Finland, 187p.
- Inoue, H., Nojima, H. And Okayama, H.,** 1990, High efficiency trasnsformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, 96(1): 23-28p.
- Jagtap, S. and Rao, M.,** 2005, Purification and properties of a low molecular weight 1,4-β-D-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonopora Sp.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 111-116p.
- Karaçalı, S.,** 2006, Sitoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi No:93, Ege Üniversitesi, İzmir,100s.
- Karapınar, E.,** 2002, Pamuklu Mamüllerin Hidrofilleştirilmesinde Enzim Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, DEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 129s (yayınlanmamış)
- Kelly, J.A., Sielecki, A.R., Sykes, B.D. and Philips, D.C.,** 1979, X-Ray crystallography of the binding of the bacterial cell wall trisaccharide NAM-NAG-NAM to lysozyme, *Nature*, 282: 875-878p.
- Khan, M.A.S., Akbar, M., Kitaoka, M. and Hayashi K.,** 2007, A unique thermostable lickenase from *Thermotoga maritima* MSB8 with divergent substrate specificity, *Indian Journal of Biotechnology*, 6 :315-320p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A.,** 2005, Cellulose: fascinating, biopolymer and sustainable raw material, *Journal of Polymer Science*, 44: 3358- 3393p.
- Klemm, D., Schmauder, H.P. and Heinze, T.,** 2002, Cellulose, 275-319, Biopolymers, Vol. 6. Polysaccharides II, 275-319, E. Vandamme, A. De Baets and A. Stein Büchel (Eds.), Wiley-Blackwell, Weinheim, 644p.
- Koshland, D.E.,** 1953, Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions, *Biological Reviews*, 28:416-436p.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. and Singh, A.,** 2011, Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Research*, Doi: 10.4061/2011/280696.
- Kuk, S.,** 2003, *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, FÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji AD, Elazığ, 61s (yayımlanmamış).
- Labrou, N.E.,** 2010, Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution, *Current Protein and Peptide Science*, 11: 91-100p.
- Laemli, U. K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259):680-685p.
- Lee, S.M. and Koo, Y.M.,** 2001, Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* rut C-30 in fed-batch mode, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 229-233p.
- Legouill, C., Parent, J.L., Rolapleszeznski, M. and Stankova, J.,** 1994, Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method, *Analytical Biochemistry*, 219(1): 164p.
- Leisola, M. and Turunen, O.,** 2007, Protein engineering: opportunities and challenges, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6): 1225-1232p.
- Leung, D., Chen, C. and Goeddel, D.,** 1989, A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction, *Technique*, 1:11-15p.
- Liang, C., Fioroni, M., Rodriguez-Ropero, F., Xue, Y., Schwaneberg, U. and Ma, Y.,** 2011, Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile, *Journal of Biotechnology*, 154:46-53p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liebl, W., Ruile, P., Brannenmeier, K., Riedel, K. and Lottspeich, F., 1996,** Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, CelA and CelB, and characterization of the recombinant enzymes, *Microbiology*, 142: 2533-2542p.
- Liebl, W., Stemplinger, I. and Ruile, P., 1997,** Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium, *Journal of Bacteriology*, 179:941-948p.
- Lim, W.J., Park, S.R., An, C.L., Lee, J.Y., Hong, S.Y., Shin, E.C., Kim, E.J., Kim, J.O., Kim, H. and Yun, H.D., 2003,** Cloning and characterization of a thermostable intracellular alphaamylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8, *Research in Microbiology*, 154: 681-687p.
- Lin, L., Meng, X., Liu, P., Hong, Y., Wu, G., Huang, X., Li, C., Dong, J., Xiao, L. and Liu, Z., 2009,** Improved catalytic efficiency of endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:671-679p.
- Lin, H., Li, W., Guo, C., Qu, S. and Ren, N., 2011,** Advances in the study of directed evolution for cellulases, *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 5(4):519-525p.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J. and Van Zyl, W.H., 2002,** Microbial cellulose utilization, fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577p.
- McCarter, J.D. and Withers, S.G., 1994,** Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Current Opinion in Structural Biology*, 4:885-892p.
- Milala, M.A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A.C. and Wafor, J.A., 2005,** Studies on the use of agricultural wastes for cellulose enzyme production by *Aspergillus niger*, *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 1: 325-328p.
- Morana, A., Maurelli, L., Lonata, E., La, C.F. and Rossi, M., 2011,** Cellulases from fungi and bacteria and their biotechnological applications, 1-79, Cellulase Types and Action, Mechanism and Uses, Adam E. Golan (Ed.), Nova Science Publishers, New York, 306p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Mullis, K. B. and Faloona, F.A.**, 1987, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, 155: 335-350p.
- Nakazawa, H., Okada, K., Onodera, T., Ogasawara, W., Okada, H. and Morikawa, Y.**, 2009, Directed evolution of endoglucanase III(cel12a) from *Trichoderma reesei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 649-657p.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A. and Gill, S.R.**, 1999, Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*, *Nature*, 399, 323-329p.
- Pereire, J.H., Chen, Z., Mcandrew, R.P., Sapra, R., Chhabra, S.R., Sale, K.L., Simmons, B.A. and Adams P.D.**, 2010, Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*, *Journal of Structural Biology*, 172:372-379p.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G.**, 1975, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*, 258:598-599p.
- Qin, Y., We, X., Song, X. and Qu, Y.**, 2008, Engineeing endoglucanase 11 from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum, *Journal of Biotechnology*, 135:190-195p.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.**, 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239(4839):487-491p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.**, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York 545p.
- Seeling, B.**, 2011, mRNA display for the selection and evolution of enzyme from *in vitro*-translated protein libraries, *Nature Protocols*, 6:540-552p.
- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J.**, 1973, Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical

KAYNAKLAR (devam)

agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry*, 12(16):3055-3063p.

Singh, A., Kuhad, R.C. and Ward, O.P., 2007, Industrial application of microbial cellulases, 345-358p, *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, R.C. Kuhad and A. Singh (Eds.), I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 392p.

Somogyi, M., 1952, Notes on sugar determination, *The Journal of Biological Chemistry*, 195:19-23p.

Sreenath, H.K., Shah, A.B., Yang, V.W., Gharia, M.M. and Jeffries, T.W., 1996, Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics, *Journal of Fermentation And Bioengineering*, 81(1):18-20p.

Stork, G. and Puls, J., 1996, Changes in properties of different recycled pulps by endoglucanase treatments, 145-150, *Proceedings of The International Conference on Biotechnology In The Pul and Paper Industry: Recent Advances In Applied and Fundamental Research*, E.Srebotnik and K.Messner (Eds), Facultas Universitatsverlag, Vienne, 267p.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorf, J.W., 1990, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods in Enzimology*, 185:60-89p.

Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R. and Pandey, A., 2005, Microbial cellulases production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11): 832-844p.

Teather, R.M. and Wood, P.J., 1982, Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4): 777-780p.

Tomme, P., Wamen, R.A. and Gilkes, N.R., 1995, Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, *Advances in Microbial Physiology*, 37:1-81p.

Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L. and Denolf, P., 2005, Reducing mutational bias in random protein libraries, *Analytical Biochemistry*, 339(1): 9-14p.

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

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Vlasenko, E., Schüle, M., Cherry, J. and Xu, F.,** 2010, Substrate specificity of family 5,6,7,9,12 and 45 endoglucanases, *Bioresource Technology*, 101: 2405-2411p.
- Vocadlo, D.J. and Davies G.J.,** 2008, Mechanistic insights into glycosidase chemistry, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12:539-555p.
- Watanabe, H. and Tokuda, G.,** 2001, Animal cellulases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1167-1178p.
- Wen, F., Nair, N.U. and Zhao, H.M.,** 2009, Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production, *Current Opinion in Biotechnology.*, 20:412-419p.
- Wang, M., Si, T. and Zhao, H.,** 2012, Biocatalyst development by directed evolution, *Bioresource Technology*, 115: 117-1125p.
- Wang, T., Liu, X., Yu, Q., Zhang, X., Qu, Y., Gao, P. and Wang T.,** 2005, Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*, *Biomolecular Engineering*, 22(1-3):89-94p.
- Wolfenden, R. And Snider, M.J.,** 2001, The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts, *Accounts of Chemical Research*, 34: 938-945p.
- Yang, D., Weng, H., Wong, M., Xu, W., Li, Y. and Yang, H.,** 2010, Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain 15, *Molecular Biology Reports*, 37:1923-1929p.
- Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R.,** 2006a, Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 24:452-481p.
- Zhang, Y.H.P., Cui, Y.B., Lynd, L.R. and Kuang, L.R.,** 2006b, A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphonic acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure biomacromolecules, *Biotechnology for Biofuels*, 7(2): 644-648p.
- Zhang, X.Y.,** 2006, Studies on the directed evolution and thermostability of β -glucanase, PhD Thesis., Zhejiang University, 136p.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim:

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD
(Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) (2011- 2014)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (2007- 2011)

Anadolu Üniversitesi, İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümü
(Onur öğrencisi olarak mezuniyet) (2008-2013)

Lise: İzmir Anadolu Lisesi (2002-2006)

Uluslararası bilimsel toplantılarda yayınlanmış bildiri:

Selin Ece, Canan Özyurt, Handan Öztürk, Serap Evran, Azmi Telefoncu;
Recombinant CFP-MerR Fusion Protein as a Mercury İon Biosensor, Mayıs 2013;
3rd International Conference on Bio-Sensing Technology, İspanya

Selin Ece, Handan Öztürk, Serap Evran. Site-directed Mutagenesis of
Methionine Residues on Amylase from *Thermotoga maritima*. Mayıs 2011; The
International Congress on Bioinformatics and Biomics; Türkiye

Uluslararası dergilerde bulunan yayınları:

Öztürk, H., Ece, S., Gündeğer, E., Evran, S., Site-directed mutagenesis of
methionine residues for improving the oxidative stability of α - amylase from
Thermotoga maritima, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, DOI:
10.1016/j.jbiosc.2013.04.018.