

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Staphylococcus saprophyticus
FOSFOTRANSASETİL AZ'IN KİNETİK VE
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Hamdi YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2011

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Staphylococcus saprophyticus
FOSFOTRANSASETİLİZ'İN KİNETİK VE
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Hamdi YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

GEBZE
2011



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından
..... tarihinde tez savunma sınavı yapılan
.....'ın tez çalışması Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

TEZ DANIŞMANI : Yrd.Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. F.İnci ÖZDEMİR

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

**TEZ KONU BAŞLIĞI: Staphylococcus saprophyticus
FOSFOTRANSASETİLİZ'İN KİNETİK VE MEKANİZMASININ
İNCELENMESİ**

YAZAR ADI: HAMDİ YILDIZ

Bu çalışmamızda, *Staphylococcus saprophyticus*'dan ilk defa bizim laboratuarda klonlanan ve *Escherichia coli*'de exprese edip saflaştırılan fosfotransasetilazın (Pta) kinetik ve mekanizmasını inceledik.

Pta'nın katalizlediği reaksiyonun üçlü kompleks veya ping-pong mekanizmasıyla olup olmadığını ayırt etmek için, farklı substrat konsantrasyonlarında ileri ve geri reaksiyonların başlangıç hızları ölçülerek, $1/v$ 'ye karşı $1/\text{substrat}$ grafiği çizildi. Elde edilen grafiklerin paralel olmayıp kesiştiği görüldü. Bu sonuçlar, Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun mekanizmasının üçlü kompleks mekanizmasıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Pta'nın katalizlediği reaksiyonun üçlü kompleks mekanizmaları olan rastgele (random) ve sıralı (ordered) iki substrat-iki ürün mekanizmasından hangisi olduğunu belirlemek için de ürün inhibisyonu deneyleri yapıldı. Ürün inhibisyon deneyleri sonucunda Pta'nın katalizlediği reaksiyon mekanizmasının rastgele iki substrat-iki ürün (rapid equilibrium random bi-bi) mekanizması olduğu görüldü.

Ayrıca, bazı metabolitlerin (NADH, pirüvat, ATP ve α -ketoglutarat) *S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesi üzerine etkisi de çalışıldı. NADH ve pirüvatın herhangi bir etkisi gözlenmezken, ATP ve α -ketoglutarat'ın ileri ve geri reaksiyonu inhibe ettiği görüldü. ATP'nin CoA'ya karşı yarışmalı, Ac-Pi'ye karşı ise yarışmasız inhibitör olduğu belirlendi. α -Ketoglutarat'ın ise Pta için allosterik bir inhibitör olduğu görüldü; ileri ve geri reaksiyon için yarı-doygun konsantrasyonu 6.5 ± 0.7 mM, ve Hill sabiti, sırasıyla, 2.6 ± 0.8 ve 3.3 ± 0.2 olarak hesaplandı.

SUMMARY

TITLE of THESIS: INVESTIGATION of KINETICS AND MECHANISM of PHOSPHOTRANSASETYLASE (Pta) from Staphylococcus saprophyticus.

AUTHOR NAME: HAMDİ YILDIZ

In this study, we investigated the kinetics and mechanism of Pta which was cloned from *Staphylococcus saprophyticus* by İlknur Aksoy of this laboratory.

The initial velocity pattern of two substrate, two product reaction catalyzed by Pta were investigated in order to differentiate between ternary complex kinetic mechanism and a ping-pong kinetic mechanism. The initial velocity patterns are consistent with a kinetic mechanism that proceeds via formation of ternary complex between Pta and both substrates prior to any chemical step, rather than via a ping-pong mechanism. The product inhibition patterns of the reaction catalyzed by Pta were analyzed to determine if substrate binding and product release are random or ordered. Inhibition of the forward (acetyl-CoA forming) reaction catalyzed by Pta by product inhibitors, acetyl-CoA and inorganic phosphate, was analyzed with respect to various concentrations of the substrates, CoA and acetyl phosphate, using the standard activity assay. Kinetic analysis and product inhibition studies indicated that there is a kinetic mechanism that proceeds through random addition of both substrates to the enzyme prior to any chemical step.

Furthermore, effect of some metabolites on the activity of Pta have been investigated. The enzyme was inhibited in both forward and reverse directions by ATP and α -ketoglutarate but not affected by pyruvate and NADH. ATP was competitive with respect to CoA and noncompetitive with respect to acetyl-phosphate. The inhibition by α -ketoglutarate, however, was allosteric with half-saturations at 6.5 ± 0.7 mM and Hill coefficients of 2.6 ± 0.8 and 3.3 ± 0.2 , in forward and reverse directions, respectively, presenting the first example of allosteric regulation of a member of class I Ptas.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışması için her türlü imkan ve ortamı sağlayan, bilgi ve birikimleriyle tez çalışmamda bana yön veren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a sonsuz teşekkürleri bir borç bilirim.

Ayrıca tez savunma jüri üyelerim Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN, Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e, tez çalışmamda maddi manevi desteklerini esirgemeyen başta İlknur AKSOY olmak üzere bütün Biyokimya laboratuvar arkadaşlarıma ve tez yazımında emeği geçen Ö.Faruk EMİRİK'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi öğrenim sürem boyunca da her türlü desteğini yanımda hissettiğim sevgili aileme ve her zaman her konuda bana güvenen, varlığını hep yanımda hissettiğim hayat arkadaşşıma minnetlerimi sunarım.

Canım annem ve babama...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	V
SUMMARY	VI
İÇİNDEKİLER	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLO DİZİNİ	XIII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. KONUYLA İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Fosfotransasetilaz'ın Genel Özellikleri	3
2.2. Pta'nın Sınıflandırılması	5
2.3. Yönlendirilmiş Mutasyon Çalışmaları ve Pta'nın Kristal Yapısı	7
2.4. Pta İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar	11
2.5. İki Substratlı Enzim Kinetiği Mekanizmaları	14
2.5.1. Rastgele İki Substrat-İki Ürün Mekanizması	14
2.5.2. Sıralı İki Substrat-İki Ürün Mekanizması	15
2.5.3. Ping-Pong İki Substrat-İki Ürün Mekanizması	16
2.6. İki Substrat-İki Ürün Enzim Kinetiği Mekanizmalarının Belirlenmesi	16
2.7. Bu çalışmanın amacı	17
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. Materyal	19
3.2. Metot	20
3.2.1. Fosfotransasetilazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	20
3.2.2. Kinetik Çalışmalar	21

	X
3.2.3. Ürün İnhibisyonu Deneyleri	22
3.2.4. Substratların Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	24
3.2.5. İleri ve Geri Reaksiyona Metabolitlerin Etkisi	25
3.2.6. ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Tamponların Etkisi	26
3.2.8. ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi	27
4. SONUÇLAR	28
4.1. Kinetik Çalışmalarda Kullanılan <i>S. saprophyticus</i> Pta'ın Saflaştırılması	28
4.2. <i>S.saprophyticus</i> Pta'nın Katalizlediği Reaksiyonun Kinetik Mekanizmasının Belirlenmesi	28
4.2.1. İleri Reaksiyonun Mekanizmasının Aydınlatılması	29
4.2.2. Geri Reaksiyonun Mekanizmasının Aydınlatılması	33
4.2.3. İleri Reaksiyon Substratları İçin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi	37
4.2.4. Geri Reaksiyon Substratları İçin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi	40
4.2.5. Ürün İnhibisyonu Çalışmaları	43
4.3. İleri ve Geri Reaksiyona Metabolitlerin Etkisi	49
4.3.1. İleri Reaksiyona NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH Etkisi	50
4.3.2. İleri ve Geri Reaksiyona Pirüvat, α -Ketoglutarat ve ATP Etkisi	51
4.5. ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Tamponların Etkisi	54
4.5. ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi	56
4.5.1. CoA İçin ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi	56
4.5.2. Ac-Pi için ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi	57
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	60
EK 1	65
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Fosfotransasetilaz'ın katalizlediği reaksiyon için önerilen katalitik mekanizma.	9
2.2. <i>B. subtilis</i> 'ten elde edilen fosfotransasetilazın yapısı	10
2.3. Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ilerleme şeması.	13
2.4. Random bi-bi mekanizmasının ilerleme şeması.	14
3.1. Rastgele bi bi enzimatik reaksiyonu için (A) Eğim ve (B) V_{max}^{app} grafiğinden αK^A , K^B , αK^B ve V_{max} değerlerinin grafiksel olarak belirlenmesi.	25
4.1. Ni-NTA kolonuyla saflaştırılan His ₆ -Pta'nın SDS-PAGE (% 12) görüntüsü	28
4.2. Ac-Pi konsantrasyonu sabit tutulup CoA konsantrasyonu değiştirilerek ileri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi.	30
4.3. CoA konsantrasyonu sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirilerek ileri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi.	32
4.4. Pi konsantrasyonu sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirilerek geri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi.	34
4.5. Ac-CoA konsantrasyonunu sabit tutup Pi konsantrasyonunu değiştirerek geri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi.	36
4.6. Ac-Pi konsantrasyonu sabit tutulup CoA konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim (K_{mapp}/V_{maxapp}) (A) ve V_{maxapp} (B) değerlerinin ikincil grafikleri.	38
4.7. CoA konsantrasyonu sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim (K_{mapp}/V_{maxapp}) (A) ve V_{maxapp} (B) değerlerinin ikincil grafikleri.	39
4.8. Pi konsantrasyonu sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim (K_{mapp}/V_{maxapp}) (A) ve V_{maxapp} B değerlerinin ikincil grafikleri.	41
4.9. Ac-CoA konsantrasyonu sabit tutulup Pi konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim (K_{mapp}/V_{maxapp}) (A) ve V_{maxapp} B değerlerinin ikincil grafikleri.	42

4.10. Doygun olmayan CoA konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	44
4.11. Doygun CoA konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	45
4.12. Doygun olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	46
4.13. Doygun olmayan CoA konsantrasyonunda Ac-CoA inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	47
4.14. Doydun olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda Ac-CoA inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	48
4.15. NAD^+ , NADH , NADP^+ ve NADPH 'in <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın aktivitesine etkisi.	50
4.16. Pirüvat'ın <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın aktivitesine etkisi.	51
4.17. α -Ketoglutarat'ın <i>S. saprophyticus</i> Pta aktivitesine etkisi.	52
4.18. ATP'nin <i>S. saprophyticus</i> Pta aktivitesine etkisi.	53
4.19. α -Ketoglutarat'ın <i>S. saprophyticus</i> Pta aktivitesine HEPES ve Tris ortamında etkisi.	54
4.20. ATP'nin <i>S. saprophyticus</i> Pta aktivitesine HEPES, MOPS ve Tris ortamında etkisi.	55
4.21. ATP'nin CoA için inhibitör türünün belirlenmesi.	56
4.22. ATP'nin Ac-Pi için inhibitör türünün belirlenmesi.	57
5.1. <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ilerleme şeması.	58

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Farklı kaynaklardan elde edilen Pta'nın özelliklerinin karşılaştırılması.	7
2.2. <i>C. kluyveri</i> 'den elde edilen Pta'nın ürün inhibitörlerinin inhibisyon türleri.	12
2.3. $E + AX + B \rightarrow E + A + BX$ bi-bi reaksiyonunun mekanizması belirlemek için ürün inhibisyonu tablosu	17
4.1. Şekil 4.2A'deki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.	31
4.2. Şekil 4.3A'deki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.	33
4.3. Şekil 4.4A'deki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.	35
4.4. Şekil 4.5A'deki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.	37
4.5. <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonun (asetil-fosfat + CoA $\rightarrow$ asetil-CoA + fosfat) substratları için ikincil grafikler kullanılarak hesaplanan ayrışma sabitleri.	40
4.6. <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun (asetil-CoA + fosfat $\rightarrow$ asetil-fosfat + CoA) substratları için ikincil grafikler kullanılarak hesaplanan ayrışma sabitleri.	43
4.7. <i>S. saprophyticus</i> Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ürün inhibisyonu sonuçları.	49

KISALTMALAR DİZİNİ

Pta	Fosfotransasetilaz
AckA	Asetil-CoA kinaz
<i>pta</i>	Fosfotransasetilaz geni
<i>eutD</i>	<i>eut</i> geni
CoA	Koenzim A
Ac-CoA	Asetil-CoA
AMP	Adenozin monofosfat
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Ac-Pi	Asetil fosfat
Pi	İnorganik fosfat
DTT	Dithiothreitol
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat akrilamid jel elektroforezi
TCA	Trikarkoksilik asit
KGDH	2-ketoglutarat dehidrogenaz

1. GİRİŞ

Fosfotransasetilaz (Pta, EC 2.3.1.8), asetat kinazla (AckA) birlikte bakterilerde ATP sentezi ve asetil-CoA'nın asetata dönüşümünde önemli rol oynar. Asetil-CoA'nın hem biyolojik olarak sentezlenmesi hem de tüketimi, ökaryot ve prokaryotlarda fizyolojik öneme sahiptir. Asetat bütün fakültatif ve zorunlu anaerob mikroorganizmaların enerji üretim metabolizmasında yer alan yüksek enerjili bir ara üründür [Latimer and Ferry, 1993]. Aerobik koşullar altında asetat birikimi, çoğunlukla bakteriyel suşa bağlı gerçekleşmektedir. Düşük oksijen konsantrasyonunda ve hızlı büyüme sırasında asetat birikimi olmaktadır [Walle and Shiloach, 1998; Ko et al., 1995; Majewski and Domach, 1990]. Ayrıca, TCA döngüsü tamamlanmadığı zaman ve hücredeki karbon akışı, hücrenin ve diğer metabolit yolların kapasitesini aştığı zaman da asetat birikimi meydana gelmektedir [Chang et al., 1999; Farmer and Liao, 1997; Varma and Paulson, 1994]. Asetat birikim yolunun yüksek enerjili ara ürünü olan asetil fosfat hücrede çeşitli düzenleyici işlevlerde önemli rol oynar [Bang et al., 2000; Bang et al., 2002]. Bu nedenle asetil-CoA ve asetil fosfat dengesi önemlidir. Pta, asetil fosfat'tan coenzimA'ya asetil grubunun transferiyle asetil CoA ve inorganik fosfat oluşumunu geri dönüşümlü olarak katalizleyerek bu dengeyi sağlamaktadır.

Bugüne kadar aerob ve anaerob olmak üzere birçok mikroorganizmadan Pta saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan bu Pta'ların biyokimyasal özellikleri çalışılmış, fakat kinetik mekanizmasına dair pek fazla çalışma bulunmamaktadır [Thomas ve Hoch, 1973].

Pta aktivitesi bazı patojenik bakterilerin patojenik etkileri için önemlidir. Üropatojenik *E. coli* CFT073'te Pta-AckA metabolik yolunun bakterilerin idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmasında etkili olduğu belirtilmiştir [Welch et al., 2008]. *Staphylococcus saprophyticus* da bayanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan üropatojen bir bakteridir. *S. saprophyticus* iki tane *pta* geni içermektedir: SSP2124 ve SSP1236 ("truncated" bir Pta kodladığı düşünülen gen) geni [KEGG Database]. SSP2124 geni *S. saprophyticus*'dan ilk kez laboratuvarımızda klonlanmış, *E. coli*'de ekspres edilmiş ve kısmi karakterizasyon çalışması yapılmıştır [Aksoy, 2010].

Literatürde *S. saprophyticus* Pta'nın kinetiği ve mekanizmasına dair her hangi bir yayın bulunmamaktadır.

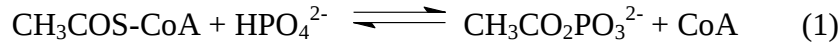
Bu tez çalışmasında *S. saprophyticus* Pta'nın asetil fosfat'tan coenzim A'ya asetil grubunun transferiyle asetil-CoA ve inorganik fosfat oluşumunu geri dönüşümlü olarak katalizlediği reaksiyonun kinetik ve mekanizmasının aydınlatılması için çalışmalar yapılmıştır. Kinetik parametrelerinin ve reaksiyon mekanizmasının aydınlatılması enzimlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bakterilerin enerji metabolizmasında görev alan enzimlerin iyi anlaşılmasının, enerji metabolizmasının da daha iyi anlaşılmasına yardımcı olması beklenmektedir. Bakterilerin enerji metabolizmasının bilinmesi bu bakterilere spesifik ilaç geliştirilmesine de yardımcı olabilir. Ayrıca söz konusu çalışma ile literatürdeki boşluğun doldurulması ve daha sonraki çalışmalara referans olması beklenmektedir.

2. KONUYLA İLGİLİ ÇALIŞMALAR

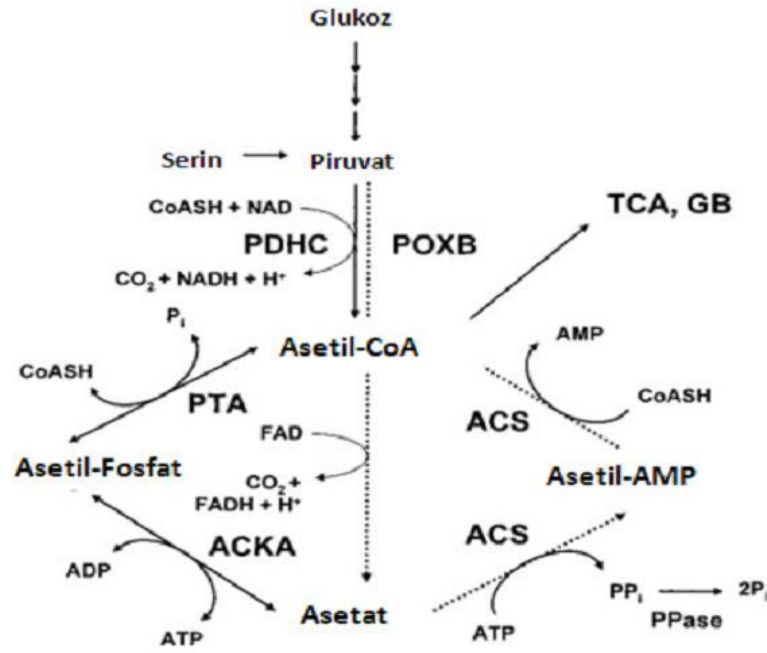
2.1. Fosfotransasetilaz'ın Genel Özellikleri

Fosfotransasetilaz asetil fosfat'tan (Ac-Pi) coenzimA'ya (CoA) asetil grubunun transferiyle asetil CoA ve inorganik fosfat oluşumunu geri dönüşümlü olarak katalizler (1). Asetil-CoA bütün anabolik proseslere direk olarak katılan merkezi bir metabolik ara üründür [Wolfe, 2005].

Fosfotransasetilaz, asetat kinazla (AckA) beraber bakteri domainine ait fermentatif anaeroblarda ATP'nin sentezinde ve asetil CoA'nın asetata dönüşümünde önemli rol oynar [Lawrence and Ferry, 2005].



Asetat yıkımı *E. coli*'de Pta (asetil-CoA: Pi asetiltransferaz; EC 2.3.1.8) [Matsuyama et al., 1994] ve AckA (ATP: asetat fosfotransferaz; EC 2.7.2.1) [Lee et al., 1990] enzimleri tarafından katalizlenmektedir. AckA, asetil-fosfat ve ADP'yi, asetat ve ATP'ye geri dönüşümlü olarak dönüştürürken; Pta, asetil-CoA ve inorganik fosfatı, asetil-fosfat ve CoASH'a geri dönüşümlü olarak dönüştürmektedir. (Şekil 2.1) [Rose et al., 1954]. Bu nedenle; Pta-AckA yolu, karbon ve fosforları enerji metabolizması ile biraraya getirmektedir [Wanner, 1992; Wanner, 1996]. Bu yolak propionil-CoA ve propionat arasında dönüşümü de sağlayabilmektedir [Rose et al., 1954]. α -Ketobutirat metabolizması [Van Dyk et al., 1987], tek karbon ile yağ asitlerinin yıkımı, propionat'ın birikimi ve *Salmonella*'da enerji ve karbon kaynağı olarak 1,2-propandiol üretimini de sağlamaktadır.



Şekil 2.1. Asetatın aktivasyon yolağı. PDHC, pirüvat dehidrogenaz kompleksi; POXB, piruvat oksidaz; PTA, fosfotransasetilaz; ACKA, asetat kinaz; ACS, asetil-CoA sentetaz; PPase, pirofosfataz; TCA, trikarboksilik asit döngüsü; GB, glioksilat yolu [Wolfe, 2005].

Pta ilk defa 1950’li yıllarda fermentatif bir organizma olan *Clostridium kluyveri*’den saflaştırılmıştır. Ayrıca, enzim aktivitesi için potasyum veya amonyum tuzları gerekliken sodyum ve lityum tuzlarının inhibisyona neden oldukları belirtilmiştir [Stadtman, 1952].

Pta aktivitesi bazı patojenik bakterilerin patojenik etkileri için önemlidir. Welch ve arkadaşları üropatojenik *E. coli* CFT073’te Pta-AckA metabolik yolunun bakterilerin idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmasında etkili olduğunu belirtmişlerdir [Welch et al., 2008].

S. saprophyticus bayanlarda idrar yolları enfeksiyonuna sebep olan gram pozitif bir üropatojendir [Kuroda et al., 2005]. Tüm DNA sekuansı belirlenmiştir (KEGG Database). *S. saprophyticus* kromozomunda yukarıda da bahsedildiği gibi SSP2124 ve SSP1236 olmak üzere iki tane *pta* geni bulunmaktadır. *S. saprophyticus*

Pta 328 amino asite sahiptir ve PtaI sınıfına aittir. Bu sınıftaki Pta'lar olan *Methanosarcina thermophila*, *Streptococcus pyogens* ve *Bacillus subtilis* kristal yapılarının homodimer ve birbirleriyle çok benzer olduğu görülmüştür [Iyer et al., 2004; Xu et al., 2004].

2.2. Pta'nın Sınıflandırılması

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, Pta'nın farklı mikroorganizmalardan elde edilen iki türünün olduğunu ortaya çıkarmıştır (PtaI ve PtaII). PtaI *eutD* geniyle kodlanmış ve yaklaşık 350 rezidüye sahipken PtaII *pta* geniyle kodlanmış ve yaklaşık 700 rezidüden oluşmaktadır [Lundie and Ferry, 1989; Campos-Bermudez et al., 2010]. Bazı mikroorganizmalar bu genlerin her ikisini de içermektedir. PtaII'nin C-terminal domaini katalitik domainidir ve PtaI ile homoloji göstermektedir. Pta'nın N-terminal domaini regülatör domainidir. Bu sayede NADH, ATP ve piruvat gibi allosterik efektörlerin aktiviteye etkisinde rol oynar [Brinsmade and Escalente-Semerena, 2007; Campos-Bermudez et al., 2010]. PtaI sınıfından olan *B. subtilis* adenin nükleotidleri, ATP, AMP ve ADP tarafından inhibe edilirken piruvat ve NADH tarafından inhibe edilmediği görülmüştür [Thomas ve Hoch, 1973].

Günümüzde PtaI üyesi olan *M. thermophila*, *B. subtilis* ve *S. pyogens* Pta kristal yapıları aydınlatılmıştır. Fakat PtaII'nin kristal yapısı henüz bilinmemektedir [Iyer et al., 2004; Xu et al., 2005]. *B. subtilis* ve *S. pyogens* *eutD* geniyle kodlanmış; fakat *M. thermophila*'nın her iki genomunun henüz gen dizisi açıklanmamıştır. *B. subtilis* ve *S. pyogens* genomları asetat kinaz (*ackA*) geni içerirler; fakat *pta* geni içermezler. *ackA* ve *eutD* genleri kromozomda uzak yerlere konumlanmışlardır [Presecan-Siedel et al., 1999; Shin and Park, 1999]. Diğer yandan *pta* geni *ackA* geniyle birlikte *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* kromozomlarında tek bir operon olarak düzenlenmiştir [Brinsmade and Escalente-Semerena, 2004]. *S. enterica* ve *E. coli*'den klonlanıp karakterize edilen *eutD* geni yüksek Pta aktivitesi göstermektedir [Brinsmade and Escalente-Semerena, 2004].

S. saprophyticus Pta 328 amino asit rezidüsüne sahip PtaI sınıfına aittir. Pta'nın bu sınıfında şimdiye kadar *M. thermophila*, *B. subtilis* ve *S. Pyogens* Pta'larının

kristal yapıları aydınlatılmış ve bunların homodimer yapıda oldukları ve benzer katlanma gösterdikleri belirtilmiştir [Iyer et al., 2004; Pelroy and Whiteley, 1972; Xu et al., 2004]. BLAST araştırmaları sonucunda *S. saprophyticus* Pta'nın *M. thermophila*, *S. Pyogenes* ve *B. subtilis* Pta'larına sırasıyla %45, %55 ve %67 benzediği görülmüştür. *S. saprophyticus* Pta büyük ölçüde korunumlu rezidüye sahiptir (Şekil 2.2). Ayrıca $\alpha 9$ ve $\alpha 10$ heliksle bağlantılı loop bölgesinde ekstra beş rezidü vardır.

	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\alpha 2$	$\beta 2$	$\alpha 3$	
<i>S.saprophyticus</i>	---MTLLDVLQEKLTGKNVKIVLP	EGED	ERVLEAATQLQGT	DYVSPILLG	NESNIKALAS	57
<i>B.subtilis</i>	--MADLFSTVQEKVAGKDVKIVFP	EGLEDER	ILEAVSKLAGNKVLNPIV	IGNENEIQAKAK		58
<i>S.pyogenes</i>	MSIRSLFGGLREKILGKNMKIVFP	EGNDE	RVVRAAARLKFEGLLEPI	ILGQSEEVNLLT		60
<i>M.thermophila</i>	--MVTFLKISERAKKLNKTIALP	ETEDIR	TLQAAAKILERGIADIVLVG	NEADIKALAG		58
	$\beta 3$	$\beta 4$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	
<i>S.saprophyticus</i>	DKGLEISDLEITDPETSELKQELV	TAFVER	RKKGK-ATEEQ	AQEMLKDVNYFGT	MLVYTGK	116
<i>B.subtilis</i>	ELNLTGGVKIYDPHTYEGMEDLV	QAFVER	RKKGK-ATEEQ	ARKALLDENYFGT	MLVYKGL	117
<i>S.pyogenes</i>	KLGFADQDYTIINPNEYADFDK	MEAFVDI	RKKGK-ATLED	ADKMLRDVNYFG	VMLVKMGL	119
<i>M.thermophila</i>	--DLDLSKAKIVDPKTYEKKDEY	INAFYEL	RKHKGITLENA	AEIMSDYVYFAV	MMAKLGE	116
	$\beta 5$	$\alpha 7$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$	
<i>S.saprophyticus</i>	AEGLVSGAAHSTGDTVRPALQI	IKTKPGVSKTSGIFFMIK	----	D--DKQYIFGD	CAINP	170
<i>B.subtilis</i>	ADGLVSGAAHSTADTVRPALQI	IKTKPGVSKTSGVFMAR	----	G--EEQYVFAD	CAINI	171
<i>S.pyogenes</i>	ADGMVSGAIHSTADTVRPALQI	IKTKPGISRTSGVFLMNR	----	ENTSERVYFAD	CAINI	175
<i>M.thermophila</i>	VDGVVSGAAHSSDTRLRPAVQI	VKTAKGAALASAFFIISVP	DCEYSGDGTFLFAD	SGMVE		176
	$\alpha 8$	$\beta 9$	$\alpha 9$			
<i>S.saprophyticus</i>	TLEAQDLAEIAVESAKS	SAKSGFMS	P-RVAMLSFSTKGS	AKSDDVEKVATAV	NLAQEKIEA	229
<i>B.subtilis</i>	APDSQDLAEIAIESANTAK	MFIDIEP-RVAMLSFSTKGS	AKSDETEKVADAV	KIAKEKAP-		229
<i>S.pyogenes</i>	DPTAQDLAEIAVNTAETAKI	FDIDP-KIAMLSFSTKGS	SGKAPQVDKVR	EATEIAKGLNP-		233
<i>M.thermophila</i>	MPSVEDVANIAVISAKT	FELLVQDVPKVMALS	YSTKGS	AKSKLTEATI	ASTKLAQELAP-	235
	$\alpha 10$	$\alpha 11$	$\beta 10$	$\alpha 12$		
<i>S.saprophyticus</i>	DHLEDVVVDGEFQ	FDA	AIIVPEVAKKAPDAKIQGDAN	VVFPSLEAGNIGYKIA	QRLGEF	289
<i>B.subtilis</i>	----ELTLDGEFQ	FDA	AFVPSVAEKKAPDSEIKGDAN	VVFPSLEAGNIGYKIA	QRLGNF	285
<i>S.pyogenes</i>	----DLALDGEFQ	FDA	AFVPETAAIKAPDSAVAGQANTFI	FPDLQSGNIGYKIA	QRLGMF	289
<i>M.thermophila</i>	----DIAIDGELQ	VDA	AIVPKVAASKAPGSPVAGKANVF	IFPDLNCGNIA	YKIAQRLAKA	291
	$\beta 11$	$\beta 12$	$\beta 13$	$\alpha 13$		
<i>S.saprophyticus</i>	DAVGVPV	LQGLNSPVNDLS	SRGCSKEDVYNLSI	ITAAQSLQ---		328
<i>B.subtilis</i>	EAVGPI	LQGLNMPVNDLS	SRGCNAEDVYNLAL	ITAAQAL---		323
<i>S.pyogenes</i>	DAIGPI	LQGLNKPVNDLS	SRGSSAEDIYKLAI	ITAAQATIESQG		331
<i>M.thermophila</i>	EAYGPI	ITQGLAKPINDLS	SRGCSDEDIVGA	VAITCVQAAAQDK		333

Şekil 2.2. *S. saprophyticus* Pta'nın *M. thermophila*, *S. Pyogenes* ve *B. subtilis* Pta'larıyla dizi uyumu. Dizilerin üzerindeki mavi bar ve kırmızı oklar *B. subtilis* Pta'nın sırasıyla α -heliks ve β -plakası. Mor ve turuncu gösterilen rezidüler Iyer ve arkadaşları tarafından yapılan 32 prokaryotik Pta dizisi boyunca sıralanmasına dayanan korunmuş rezidülerdir [Iyer et al., 2004].

Bilinen birkaç Pta enziminin moleküler ağırlıkları Tablo2.1'de [Lundie and Ferry, 1989] gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Farklı kaynaklardan elde edilen Pta'nın özelliklerinin karşılaştırılması.

Organizma	M _r (kDa)	Spesifik Aktivite (Unite/mg) ^a	K _m CoAS	K _m Ac-Pi	Metal Etkileri
<i>Bacillus subtilis</i>	90	1,371	0,096	0,480	K ⁺ , NH ₄ uyarır; Mn ²⁺ ve Ca ²⁺ inhibe eder.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NR ^b	8-12 ^c	NR ^b	NR ^b	K ⁺ uyarır; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>C. acidurici</i>	63-75	710	NR ^b	NR ^b	Fe ²⁺ gerekli; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>C. kluyveri</i>	60	196	0,12	0,6-1,3	K ⁺ , NH ₄ gerekli; Na ⁺ ve Li ⁺ inhibe eder.
<i>C. thermoaceticum</i>	88 ^d	123	NR ^b	NR ^b	Mg ²⁺ uyarır; AsO ₄ ³⁻ birbirinden ayırır.
<i>E. coli</i>	120-250	333	0,32	3	(NH ₄) ₂ SO ₄ , KPO ₄ inhibe eder.
<i>Lactobacillus fermenti</i>	68	1,124	0,090	NR ^b	K ⁺ , NH ₄ , Rb ⁺ uyarır; Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ ve Li ⁺ inhibe eder.
<i>M. thermophila</i>	43-52	2,496	0,090	0,170	K ⁺ , NH ₄ gerekli; Na ⁺ , AsO ₄ ³⁻ inhibe eder.
<i>R. palustris</i>	55-57	32	0,15	4,70	K ⁺ , NH ₄ uyarır; Na ⁺ , Li ⁺ ve Mg ²⁺ inhibe eder.
<i>V. alcalescens</i>	75-85 ^e	812	NR ^b	NR ^b	Mg ²⁺ ve ATP ile inhibisyon geri çevrilir.

^aBir ünite, dakikada oluşan asetil-CoA'nın 1 µmol'üdür. ^bDeğerler rapor edilmemiştir. ^c1 ünite, dakikada oluşan 1 µmol asetil-CoA'dır, hücre ekstratındaki aktivite. ^dAlt ünite moleküler ağırlığı 22,000 Da olan homotetramer olarak saflaştırılmış enzim. ^eAlt ünite moleküler ağırlığı 32,000- 40,000 Da olan dimer olarak saflaştırılan enzim.

2.3. Yönlendirilmiş Mutasyon Çalışmaları ve Pta'nın Kristal Yapısı

Madeline ve ekibi 1997 yılında *M. thermophila*'dan elde ettikleri fosfotransasetilazın arginin ve sistein rezidülerini incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada dizide yer alan 4 sistein rezidüsünü (C159, C277, C312, C325) alanin ile yer değiştirmiş ve bu şekilde enzim için kinetik parametreleri tanımlamışlardır. Bu çalışma sonucunda enzim aktivitesi için dört sistein rezidüsünden sadece C159 rezidüsünün gerekli olduğu görülmüştür. Ayrıca bu rezidünün enzim kararlılığı içinde gerekli olduğu belirtilmiştir. C159 rezidüsünün serin ile yer değiştirildiğinde

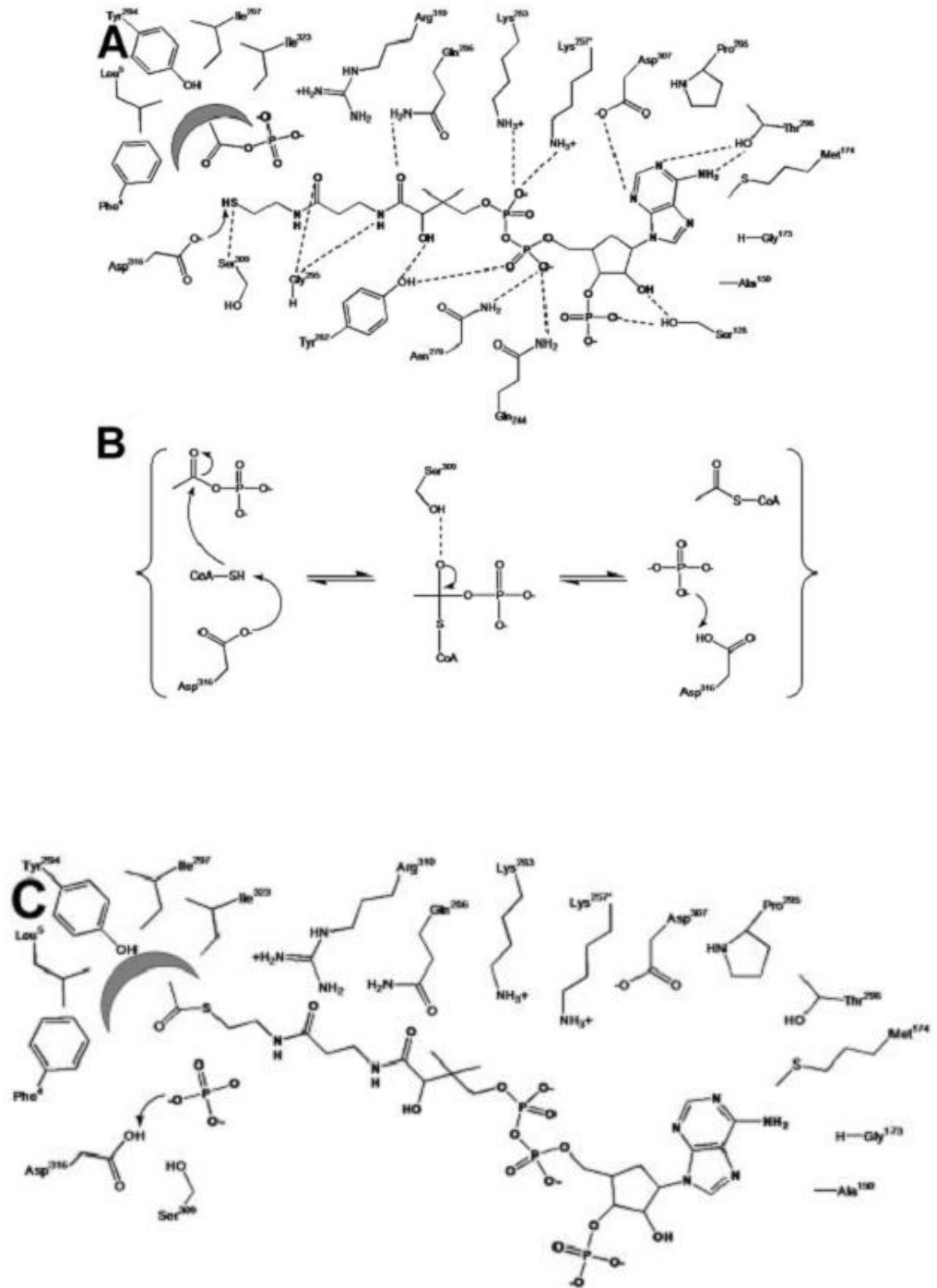
aktivitede önemli artış olduğu görülmüştür. Dört sistein rezidüsünden biri olan C312 rezidüsünün kataliz için gerekli olmadığı fakat enzimin aktif bölgesinde yer aldığı belirtilmiştir.

Pta yapısında bulunan arginin rezidüleri (R28, R87, R133, R287, R310) glutamin ile yerleri değiştirilmiş ve yapılan kinetik analizler sonucunda R310 rezidüsünün enzim aktivitesi için gerekli olduğu görülmüştür. Diğer arginin rezidülerinin (R28, R87, R133, R287) enzim aktivitesi için gerekli olmadığı görülmüştür. R87 rezidüsünün CoA'nın 3¹-fosfatıyla tuz köprüsü oluştururken R133 rezidüsünün CoA'nın 5¹-fosfatıyla etkileşime girdiği ifade edilmiştir [Iyer and Ferry, 2001].

Daha sonra yapılan çalışmalarda CoA ile etkileşim içinde olan R87 ve R133 rezidüleri lizin, alanin, glutamik asit ve glutamin ile yer değiştirilmiş ve her bir yer değiştirme sonunda yapılan kinetik analizler R87 ve R133'ün CoA ile etkileşim içinde olduğunu ispatlamıştır. Bütün R87 ve R133 değişimlerinde yapılan kinetik analizler k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinde büyük düşüşler olduğunu göstermiş bu sayede bu rezidülerin kataliz için önemli olduğu anlaşılmıştır [Iyer and Ferry, 2001].

2001'de Xu ve arkadaşları *S. Pyogenes*'den elde ettikleri Pta'yı kristalize etmişlerdir. Pta'nın kristalize edilme çalışmalarını 2003 yılında *M. thermophila*'nın Iyer ve arkadaşları tarafından kristalize edilmesi izlemiştir. Kristalizasyon yapılan Pta'nın yapı fonksiyon belirleme çalışmaları 2005 yılında Lawrence ve arkadaşları tarafından yapılmış ve Pta için ilk kez bir katalitik mekanizma önerilmiştir [Lawrence et al., 2005].

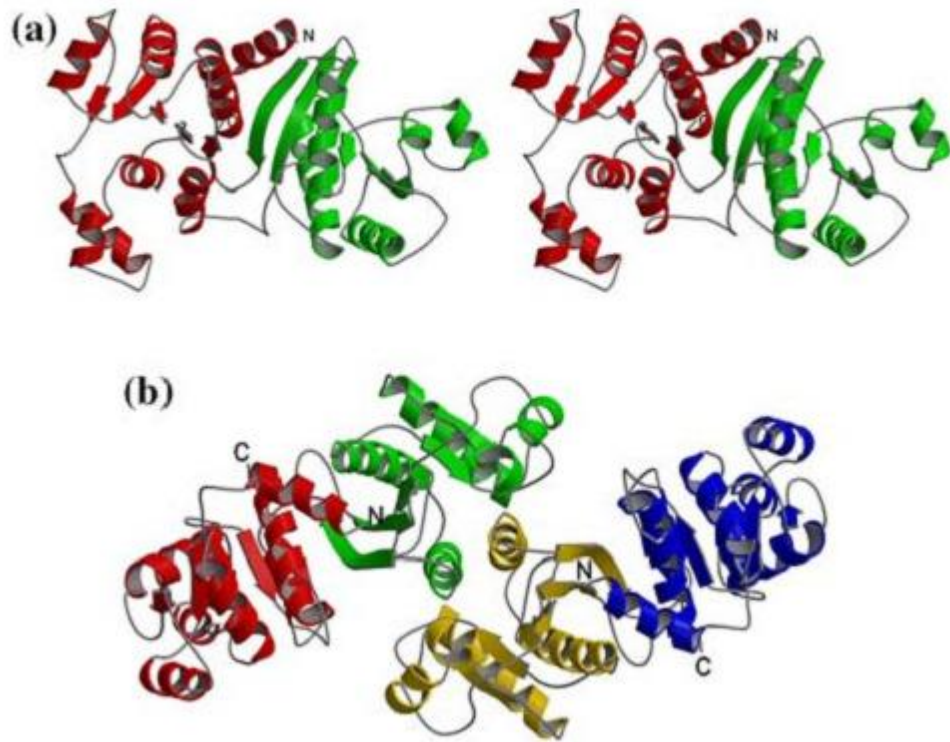
Fosfotransasetilaz için önerilen katalitik mekanizma amino asitlerin yerlerinin değiştirilmesi sonucunda elde edilen kinetik bilgiler, enzimin kristal yapılarından elde edilen enzim aktif bölge bilgileri ve enzim için yapılan kinetik ve mekanik çalışmaların verileri kullanılmıştır. Fosfotransasetilazın aktif bölgesinde bulunan ve katalitik öneme sahip R310'un asetil fosfatın fosfat grubuyla etkileşim içinde olduğu ifade edilirken metil grubunun ise F4, L5, F294, I297 ve I323 ile hidrofobik etkileşim içinde olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 2.1. Fosfotransasetilaz'ın katalizlediği reaksiyon için önerilen katalitik mekanizma. (A) Substratların enzimin aktif bölgesine bağlandığı andaki durumu. (B) Negatif yüklü geçiş hali. (C) Enzimin aktif bölgesine ürünlerin bağlandığı andaki durumu. Burada K257 ve Q244 arasında meydana gelen hidrojen bağı kesikli çizgiyle gösterilmiştir. Elektron akışı okları yönündedir [Lawrence et al., 2005].

Şekil 2.1’de D307, P296, G173, A150 ve S178’in oluşturduğu grupta kalan adenin halkasıyla CoA arasındaki katalitik ilişki ve enzim ile CoA arasındaki hidrojen bağları görülmektedir. Öne sürülen bu mekanizma baz katalizli gerçekleşmektedir. D316’nın CoA’nın sülfidril protonunu koparmasıyla asetil fosfatın karbonil karbonuna direk atak yapılması sağlanmaktadır. (B) Burada asetil-CoA oluşumu gerçekleşmektedir. Daha sonra oluşan PO_4^{3-} iyonu D316’dan proton kopararak fosfatın negatif yüklerinden biri dengeye ulaşır ve bu sayede daha iyi protonlanmaya hazır grup haline gelir [Lewendon et al., 1990; Wu, 2003].

2005 yılında Xu ve arkadaşları *B. subtilis*’ten elde ettikleri fosfotransasetilazı kristalize etmişler ve Pta’nın yapı, fonksiyon çalışmalarına ışık tutmuşlardır (Şekil 2.2) [Xu et al., 2005].



Şekil 2.2. *B. subtilis*’ten elde edilen fosfotransasetilazın yapısı. (a) Kırmızı renkli domain I ve yeşil renkli domain II *B. subtilis* monomerinin stereo ribbon görüntüsü. (b) *B. subtilis*’ten elde edilen dimer Pta’nın yapısı. Monomerlerden biri şekil a’daki gibi diğer monomer domain I (sarı) ve domain II (mavi) ile gösterilmektedir [Xu et al., 2005].

2.4. Pta İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

Fosfotransasetilaz'ın kinetik çalışmaları ilk defa 1972 yılında Pelroy ve Whiley tarafından *Viellonella alcalescens*'ten elde edilen Pta üzerine yapılmıştır. *V. alcalescens*'ten elde edilen Pta'nın bütün substratları için Michaelis-Menten kinetikli reaksiyonu geri dönüşümlü olarak kataliz ettiğini ifade etmişlerdir. Pta tarafından katalizlenen geri reaksiyonun (asetil-CoA + fosfat $\rightarrow$ asetil-fosfat + CoA) hızının ileri reaksiyonun (asetil-fosfat + CoA $\rightarrow$ asetil-CoA + fosfat) hızından 6,5 kat daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun substratları için görünür K_m değerlerini belirlemişlerdir. Geri reaksiyonun substratları olan asetil-CoA ve fosfat için görünür K_m değerleri sırasıyla 8,6 μ M ve 9,3 mM olarak belirlenmiştir. İleri reaksiyonun substratları olan CoA ve asetil fosfat'ın görünür K_m değerleri ise sırasıyla 0,33 mM ve 0,59 mM olarak belirlemişlerdir. Pta'nı katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun mekanizmasının ürün inhibisyonu deneyleri sonucunda random (rastgele) bi-bi mekanizmasıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda enzimin adenosin trifosfat (ATP) ve adenosin difosfat (ADP) tarafından inhibe edildiği fakat piruvat ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid'in (NAD^+) enzim aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada ATP'nin inhibitör türü belirlenmiş ve asetil fosfat için yarışmasız inhibitörken CoA için yarışmalı inhibitör olduğu görülmüştür. ATP ve ADP'nin inhibisyon etkisinin $MgCl_2$ ile ortadan kaldırıldığı belirtilmiştir [Pelroy and Whiteley, 1972].

1973'te Thomas ve Hoch fosfotransasetilaz'ı farklı bir organizma olan *B. subtilis*'ten saflaştırmışlar ve enzimin molekül ağırlığını 90 kDa olarak hesaplamışlardır. *B. subtilis*'ten saflaştırılan Pta'nın Mn^{2+} ve Ca^{2+} ile inhibe edilirken, K^+ ve NH_4^+ ile aktive edildiği belirtilmiştir. Fosfotransasetilaz'ın propiyonil-CoA ve butiril-CoA'yı substrat olarak kullandığı belirtilmiş; fakat bu iki substrata olan ilginin asetil-CoA'ya olan ilgiden daha az olduğu belirlenmiştir. Yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda ATP, ADP ve AMP'nin enzimi inhibe ettiği piruvat ve indirgenmiş piridin nükleotidlerinin ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca palmitil-CoA'nın CoA için yarışmalı inhibitör olduğu ifade edilmiştir [Thomas and Hoch, 1973].

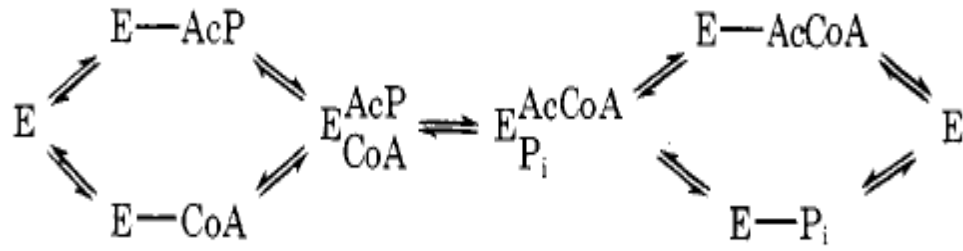
1976 yılında Henkin ve Abeles fosfotransasetilaz'ı *C. kluyveri*'den saflaştırmış ve sodyum dodesil sülfat elektroforeziyle enzimin molekül ağırlığını 70.000 olarak belirlemişlerdir. Fosfotransasetilaz'ın katalizlediği ileri (asetil-fosfat + CoA $\rightarrow$ asetil-CoA + fosfat) ve geri reaksiyonu için (asetil-CoA + fosfat $\rightarrow$ asetil-fosfat + CoA) her bir substratın K_m değeri belirlenmiştir. K_m değerleri sırasıyla asetil fosfat için 0,7 mM, CoA için 0,12 mM, asetil-CoA için 0,2 mM, arsenat için 1,9 mM ve fosfat için 2,6 mM olarak belirlemişlerdir. Başlangıç hızları deneyleri sonucunda reaksiyon mekanizmasının ping-pong mekanizması olmadığını belirledikte sonra ileri ve geri reaksiyon için mekanizmayı tam olarak aydınlatmak için ürün inhibisyonu deneyleri yapmışlardır.

Tablo 2.2. *C. kluyveri*'den elde edilen Pta'nın ürün inhibitörlerinin inhibisyon türleri [Henkin and Abeles, 1976].

İnhibitör	Değişken substrat	Reaksiyon	İnhibitör Türü
Fosfat	Ac-Pi	F	C
Fosfat	CoA	F	NC
Yüksek[Pi]	CoA	F	M
PPi	Ac-Pi	F	C
Arsenat	Ac-Pi	F	M
Ac-CoA	Ac-Pi	F	C
Desülfo-CoA	CoA	F	C
CoA	Ac-CoA	A	C
PPi	Ac-CoA	A	NC

F, asetil-fosfat + CoA $\rightarrow$ asetil-CoA + fosfat; A, Ac-CoA + AsO₄³⁻ $\rightarrow$ CoA + AcOH; C, competitive; NC, non-competitive; M, mixed

Ürün inhibisyonu deneyleri sonuçlarına göre Pta'nın katalizlediği reaksiyonun “random bi-bi” mekanizmasıyla gerçekleştiği belirlenmiş ve reaksiyonun ilerlemesi Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ilerleme şeması.

Lawrence ve Ferry 2005 yılında fosfotransasetilazı farklı bir organizma olan *M. thermophila*'dan klonlamış ve molekül ağırlığını 71 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin daha önce çözelti içinde monomer halde bulunduğu belirtilmesine rağmen [Latimer and Ferry, 1993] yapılan bu çalışmada enzimin çözelti içinde dimer halde bulunduğu belirtilmiştir. *M. thermophila*'dan elde edilen Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasını incelenmiş ve başlangıç hızları ölçümleri sonucu reaksiyonun mekanizmasının ping-pong olmadığı belirlenmiştir. Başlangıç hızları ölçümlerinden Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonun substratları için Michaelis sabitlerini belirlemişlerdir. Michaelis sabitleri asetil fosfat için 186 μM , CoA için 65 μM , asetil-CoA için 96 μM ve fosfat için 742 μM olarak belirlenmiştir ayrıca k_{cat} değeri 1500 s^{-1} olarak belirlenmiştir. Bu değerler *C. kluyveri* ve *V. alcalescens*'dan elde edilen Pta'nın kinetik sabitleriyle benzerlik gösterdiği belirtilmiştir [Henkin and Abeles 1976; Pelroy and Whiteley, 1972].

M. thermophila'dan elde edilen Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasının random (rastgele) veya order (sıralı) olduğunu belirlemek için ürün inhibisyonu deneyleri yapılmıştır. Ürün inhibisyonu deneyleri substratlardan birinin konsantrasyonu doymuş ve doymuş olmayan konsantrasyonlarda sabit tutulup diğer substrat ve inhibitörün konsantrasyonu değiştirilerek yapılmıştır. CoA doymuş (600 μM) ve doymuş olmayan (60 μM) konsantrasyondayken fosfat asetil fosfat için yarışmalı inhibitördür. Asetil fosfat doymuş olmayan (150 μM) konsantrasyonayken fosfat CoA için yarışmasız inhibitörken asetil fosfat doymuş (4 mM) konsantrasyondayken fosfat'ın CoA için inhibisyon etkisi yoktur. Asetil fosfat doymuş konsantrasyondayken Ac-CoA'nın CoA için inhibisyon etkisi yoktur; fakat

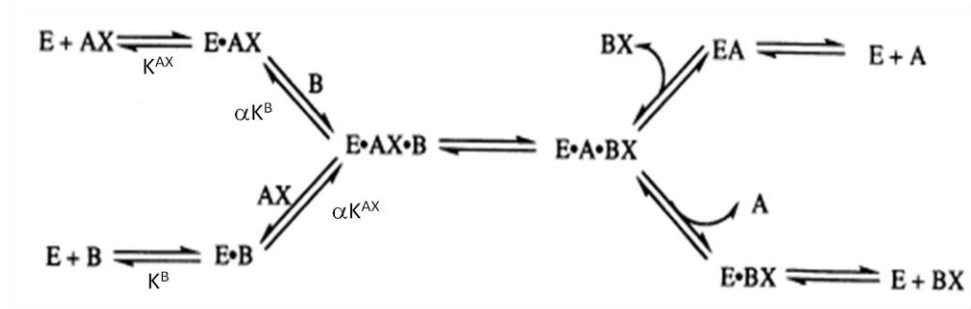
asetil fosfat doygun olmayan konsantrasyondayken Ac-CoA CoA için yarışmalı inhibitördür. Benzer şekilde CoA doygun konsantrasyondayken Ac-CoA'nın asetil fosfat için inhibisyon etkisi yokken, CoA doygun olmayan konsantrasyondayken Ac-CoA asetil fosfat için yarışmalı inhibitör olduğu belirlenmiştir. Ayrıca desülfo-CoA'nın CoA için yarışmalı, asetil fosfat için yarışmasız inhibitör olduğu belirlenmiştir. Desülfo-CoA'nın CoA için inhibitör sabiti $1,3 \mu\text{M}$, asetil fosfat için ise $2,8 \mu\text{M}$ olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *M. thermophila*'dan elde edilen Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasının random (rastgele) bi-bi mekanizması olduğu ifade edilmiştir [Lawrence and Ferry, 2005].

2.5. İki Substratlı Enzim Kinetiği Mekanizmaları

İki substrat-İki ürün (bi-bi) enzim kinetiği mekanizmaları Ping-Pong, rastgele (random) ve sıralı (compulsory) mekanizması olmak üzere üç kısma ayrılır.

2.5.1. Rastgele İki Substrat-İki Ürün Mekanizması

Bu mekanizmada substratlardan herhangi biri enzime önce bağlanabilir ve herhangi bir ürün enzimden diğer üründen daha önce ayrılabilir. Hangi substrat önce bağlanırsa bağlansın reaksiyon $E \cdot AX \cdot B$ üçlü kompleksi oluşumuna ilerler.



Şekil 2.4. Random bi-bi mekanizmasının ilerleme şeması.

Burada K^{AX} ve K^B sırasıyla AX ve B substratlarının serbest enzime bağlanma sabitini gösterir. αK^{AX} ve αK^B ise sırasıyla AX ve B substratlarının enzim-substrat

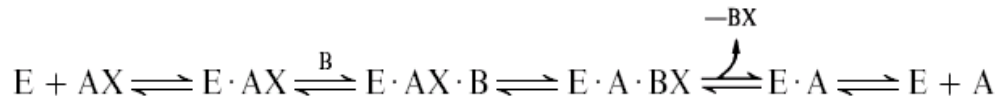
ikili kompleksine bağlanma sabitini göstermektedir. Reaksiyonun hızı aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$v = \frac{V_{max}[AX][B]}{aK^{AX}K^B + aK^B[AX] + aK^{AX}[B] + [AX][B]}$$

B doygun konsantrasyonda olduğu zaman $\alpha K^{AX} = K_m^{AX}$, AX doygun konsantrasyonda olduğu zaman $\alpha K^B = K_m^B$ olur.

2.5.2. Sıralı İki Substrat-İki Ürün Mekanizması

Bu mekanizmada E·AX·B üçlü kompleksinin oluşmasında substratlardan biri enzime diğerinden önce bağlanmak zorundadır. Örneğin AX önce bağlanmak zorunda olduğunda reaksiyon aşağıdaki gibi ilerler.



Eğer E·AX·B ‘nin E·A·BX’e dönüşümü reaksiyonun hız belirleyici basamağı ise E, AX, B ve E·AX·B denge halindedir. Hız ;

$$v = \frac{V_{max}[AX][B]}{K^{AX}K^B + K^B[AX] + [AX][B]}$$

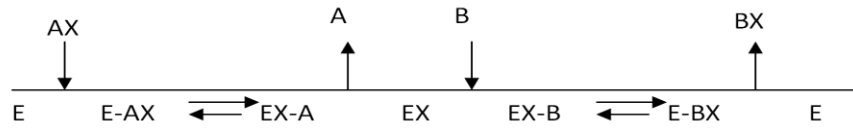
eşitliğiyle hesaplanır.

Eğer E·AX·B ‘nin E·A·BX’e dönüşümü diğer basamaklardan hızlı ise hız steady state (durgun hal) yaklaşımına göre hesaplanır.

$$v = \frac{V_{max}[AX][B]}{K^{AX}K_m^B + K_m^B[AX] + K_m^{AX}[B] + [AX][B]}$$

2.5.3. Ping-Pong İki Substrat-İki Ürün Mekanizması

Bu reaksiyon mekanizmasında transfer olacak grubu taşıyan substrat (AX) enzime önce bağlanır ve birinci ürün (A) oluşur. Birinci ürünün ayrılmasından sonra ikinci substrat (B) bağlanır. İkinci ürünün ayrılmasından sonra reaksiyon sonlanır. Burada E.AX.B üçlü kompleksi oluşmaz. Reaksiyon aşağıdaki gibi ilerler.



Ping-Pong iki substrat-iki ürün mekanizmasıyla gerçekleşen reaksiyonun hızı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır.

$$v = \frac{V_{max} [AX][B]}{K_m^B + K_m^{AX}[B] + [AX][B]}$$

2.6. İki Substrat-İki Ürün Enzim Kinetiği Mekanizmalarının Belirlenmesi

Reaksiyon mekanizmasının Ping-Pong veya üçlü kompleks (rastgele veya sıralı) mekanizması olduğunu belirlemek için başlangıç hızları ölçümü yapılır. Elde edilen veriler Lineweaver-Burk denkleminde uyarlanarak grafiğe aktarılarak lineer fit yapılır. Lineer fit sonunda elde edilen doğrular eğer bir birine paralel ise reaksiyon Ping-Pong mekanizmasıyla ilerler, eğer doğrular kesişiyorsa üçlü kompleks (rastgele veya sıralı) mekanizmasıyla ilerlemektedir.

Lineweaver-Burk grafiği kullanarak mekanizmanın Ping-Pong olup olmadığını belirlemek için, üçlü kompleks mekanizmalarından rastgele veya sıralı mekanizma olduğunu belirlemek için bu grafik yeterli değildir. Rastgele ve sıralı iki substrat-iki

ürün reaksiyonunun mekanizmasını ayırt etmek için ürün inhibisyonu deneylerinden yararlanılır.

Tablo 2.3. $E + AX + B \rightarrow E + A + BX$ bi-bi reaksiyonunun mekanizması belirlemek için ürün inhibisyonu tablosu [Segel, 1975].

Mekanizma	Ürün İnhibitörü	İnhibitör Türü			
		[AX] Değişken		[B] Değişken	
		Doygun Olmayan	Doygun [B]	Doygun Olmayan	Doygun [AX]
Sıralı, [AX] Önce Bağlanır	BX	N	U	N	N
Sıralı, [AX] Önce Bağlanır	A	C	C	N	-
Sıralı, [B] Önce Bağlanır	BX	N	-	C	C
Sıralı, [B] Önce Bağlanır	A	N	N	N	U
Rastgele	A	C	C	N	-
Rastgele	BX	C	-	C	-
Ping-Pong	A	N	-	C	C
Ping-Pong	BX	C	C	N	-

C, competitive (yarışmalı); N, noncompetitive (yarışmasız); U, uncompetitive; - inhibisyon yoktur.

2.7. Bu çalışmanın amacı

Bu tez çalışmasında, üropatojen gram pozitif bir bakteri olan *S. saprophyticus*'dan ilk defa laboratuvarımızda klonlanıp karakterizasyonu yapılan Pta'nın asetil fosfat'tan coenzim A'ya asetil grubunun transferiyle asetil-CoA ve inorganik fosfat oluşumunu geri dönüşümlü olarak katalizlediği reaksiyonun kinetik ve mekanizmasını aydınlatılması amaçlanmaktadır. Enzimlerin kinetik parametrelerinin ve mekanizmalarının bilinmesi enzimlerin de daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu amaçla, bakterilerin enerji metabolizmasında yer alan

enzimlerin özelliklerinin bilinmesi bakterilerin enerji metabolizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Pta aktivitesi bazı patojenik bakterilerin patojenik etkileri için önemlidir. Üropatojenik *E. coli* CFT073'te Pta-AckA metabolik yolunun bakterilerin idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmasında etkili olduğu belirtilmiştir [Welch et al., 2008]. *S. saprophyticus* da bayanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan üropatojen bir bakteridir. *S. saprophyticus* Pta'nın kinetik ve mekanizmasının aydınlatılmasının bu patojenik bakterinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olması beklenmektedir. Ayrıca enzimin kinetik parametrelerinin ve mekanizmasının bilinmesinin patojenik bakteriler için geliştirilecek olan spesifik ilaçlara ışık tutması amaçlanmaktadır. Literatürde *S. saprophyticus* Pta'nın kinetik ve mekanizması hakkında herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Bu çalışma ile literatürdeki boşluğun doldurulması ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara referans olması beklenmektedir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan; MOPS sodium salt (M9024), Sodium dodesily sulfate (L4509), Agarose (A9539), Bradford reagent (SIB6916), Imidazole (I-0125), Potassium chloride (12636), Potassium phosphate (16H1604), Dithiothreitol, Asetyl phosphate (057K5317), Pyruvate (105K0723) ve α -Ketoglutarate (105K5304) Sigmadan; ATP (00911EE) Aldrich, TEMED (1.10732), Triton X-100 (1.08603), Yeast extract granulated (1.03753.0500), 2-mercaptoethanol (8.05740.0250), Acrylamide (8.00830.1000) ve Sodium chloride Merck'ten; 5,5'-Dithiobis (2-nitro benzoic acid) Alfa Aesar'dan, IPTG (12992) Qiagen, Asetyl-Coenzyme A trilithium salt Applichem'den; Tris-HCl (648317) Calbiochem'den, Acrylamide:N,N-methylene bis acrylamide (01706), Agar (05040), Kanamycin sulphate (60615), Peptone Fluka'dan; Coenzyme A Trilithium salt Calbiochem'den satın alınmıştır. Ayrıca *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içeren %50 gliserol stok İlknur Aksoy'dan alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

İnolab WTW Series pH ölçer, Heidolph MR 3004 safety manyetik karıştırıcı, Varioklav Typ 300 Otoklav, SartoriusnBasic marka tartı, Mikro 120 Hettich Zentrifugen santrifüj, New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U410 premium marka -80°C dondurucu, Indesit TN5 (TK) marka -20°C soğutucu, F1 Multy channel Finnpiptette (Thermo), Molecular Devices kuvars plate, Hamilton Şırınga, Spectromax Plus 384 (Molecular Devices) kullanılmıştır. Ayrıca protein saflaştırması için Ni-NTA kolonu kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

Bu tez çalışmasında kullanılan çözelti ve besiyerleri Ek1'de verilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Fosfotransasetilazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

3.2.1.1. *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinde Pta Ekspresyonu

Pta ekspresyonu için öncelikle 500 mL Lauria Bertani (LB) besiyeri hazırlandı. Bundan 5 mL alınıp içine 30 µg/ml kanamisin ve pET28a-Pta vektörü içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içeren %50 gliserol stoğundan 5 µL ilave edilerek 37°C'de 180 rpm'de gece boyu büyümeye bırakıldı. Ertesi sabah büyümeye bırakılan ön kültür 30 µg/mL kanamisin içeren 500 mL LB besiyerine aktarıldı ve OD₆₀₀ 0,6 olana kadar 30°C'de 180 rpm'de inkübe edildi (yaklaşık 3-3,5 saat). OD₆₀₀ 0,6'ya ulaşınca son konsantrasyonu 0,25 mM olacak şekilde IPTG ile uyarıldı ve saat başı SDS-PAGE için 1 mL örnek alındı. İzopropil β-D-1-tiogalaktopiranosit (IPTG) ile uyarılarak eksprese olan hücreler 10.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüjlenerek toplanmıştır.

3.2.1.2. Ni-NTA Kolon Kullanılarak His₆- Pta'nın Saflaştırılması

E. coli BL21 (DE3) hücrelerinden ekprese edilen Pta'nın santrifüjle çöktürülmesinden sonra elde edilen bakteri peleti, hacminin 10 katı kadar liziz tamponunda çözüldü. Elde edilen bakteri çözeltisi buz içerisinde tutularak 25 saniye süre ile %50 güçle 10 kez sonikasyon işlemi yapıldı. Açığa çıkan homojenat atıklar 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj çöktürülerek uzaklaştırıldı. Sonikasyon sonrası elde edilen süpernetantı kolona yüklemeden önce kolon önce 500 mM imidazol içeren 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7,5) tamponuyla, daha sonra imidazol içermeyen yıkama tamponu (50 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7,5)) ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra protein ekstraktı kolona yüklendi ve yüklenen protein ekstraktı kolondan akıtılarak toplandı. Kolon imidazolsüz Tris-HCl tamponunda yıkandı ve önce 10 mM imidazol içeren Tris tamponuyla yıkanıp, 200 mM imidazol içeren Tris-HCl/NaCl tampon ile birer mL'lik fraksiyon toplandı.

Nikel kolonla saflaştırılan proteinlerin miktarı BiORAD yöntemiyle BSA standart olarak kullanılarak tayin edildi.

E. coli BL21 (DE3) hücrelerinden Pta ekspresyonu ve Ni-NTA kolonundan elde edilen fraksiyonların görüntülenmesi %12'lik SDS-PAGE jel ile yapıldı [Laemli, 1970].

3.2.2. Kinetik Çalışmalar

3.2.2.1. İleri Reaksiyonun Başlangıç Hızının Ölçülmesi

S. saprophyticus fosfotransasetilaz'ın (Pta) ileri reaksiyonu için coenzim A (CoA) ve asetil fosfat (Ac-Pi) olmak üzere iki substratı vardır. Başlangıç hızı ölçümleri mekanizmanın ping-pong mekanizması olup olmadığını belirlemek için yapıldı. Pta'nın katalizlediği ileri (asetil-CoA oluşumu) reaksiyonun hızı 25°C'de 233 nanometrede Asetil-CoA'nın tiyoester bağının absorbanası kuvars plaka (plate) ($\epsilon_{233\text{ nm}} = 5,55\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) kullanılarak Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle ölçülerek belirlendi [Lawrence et al., 2005]. Substratlar ve enzim tampon A [50 mM Tris, 150 mM KCl (pH 7,5)] içinde hazırlandı ve reaksiyon hazırlanırken buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun uygun sıcaklığa (25°C) gelmesi için yaklaşık üç dakika bekletildi. Substratlardan birinin konsantrasyonu sabit tutulup diğerinin konsantrasyonu değiştirilerek reaksiyon bir dakika takip edildi.

İlk olarak Ac-Pi konsantrasyonu 150, 300, 500 ve 3000 μM olarak sabit tutulup, CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 400, 600 ve 1000 μM olarak değiştirildi. İkinci olarak CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200 ve 400 μM olarak sabit tutulup, Ac-Pi konsantrasyonu 40, 70, 125, 250, 500, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirildi. Toplam reaksiyon hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B [50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 2 mM DTT (pH 7,5)] kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp reaksiyon enzim ilavesiyle başlatıldı.

3.2.2.2. Geri Reaksiyonun Başlangıç Hızının Ölçülmesi

İleri reaksiyonda olduğu gibi geri reaksiyonda da mekanizmanın ping-pong mekanizması olup olmadığını belirlemek için yapıldı. *S. saprophyticus* Pta'nın geri reaksiyonu için asetil-coenzim A (Ac-CoA) ve inorganik fosfat (Pi) olmak üzere iki substratı vardır. Pta'nın katalizlediği geri (Asetil fosfat oluşumu) reaksiyonun hızı

25°C de 412 nanometrede plaka ($\epsilon_{412\text{ nm}} = 13,6\text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) kullanılarak Spectromax Plus 384 spektrofotometresiyle takip edildi [Lawrence et al., 2005]. Reaksiyon hazırlanırken substratlar ve enzim buz üzerinde tutuldu. Reaksiyonun uygun sıcaklığa (25°C) gelmesi için yaklaşık üç dakika bekletildi. Substratlardan birinin konsantrasyonu sabit tutulup diğerinin konsantrasyonu değiştirilerek reaksiyon bir dakika takip edildi.

Önce, DTNB final konsantrasyonunu 0,2 mM ve Pi konsantrasyonu 1, 2,5, 5 ve 20 mM olarak sabit tutularak Ac- CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 μM olarak değiştirildi. Daha sonra DTNB final konsantrasyonunu 0,2 mM ve Ac-CoA konsantrasyonu 50, 100, 200 ve 400 μM olarak sabit tutulup Pi konsantrasyonu 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 ve 40 mM olarak değiştirildi. Toplam reaksiyon hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon A kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp reaksiyon enzimle başlatıldı.

3.2.3. Ürün İnhibisyonu Deneyleri

Ürün inhibisyonu deneyleri Pta'nın katalizlediği reaksiyonun substratlarının bağlanması ve ürünlerin ayrılmasının mekanizmasının rastgele (random) veya sıralı (compulsory) mekanizma olup olmadığını belirlemek için yapıldı. *S. saprophyticus* Pta'nın ileri reaksiyonu için inorganik fosfat (Pi) ve Ac-CoA olmak üzere iki ürün inhibitörü vardır.

3.2.3.1. İleri Reaksiyon için Pi İnhibisyonu

Ürün inhibisyonu deneylerinde substratlardan her biri (CoA ve Ac-Pi) doymuş ve doymuş olmayan konsantrasyonlarda sabit tutulup diğer substratın konsantrasyonu değiştirildi. İnhibitör olarak 0, 5, 10, 20 ve 40 mM Pi kullanıldı. Substratlar reaksiyon tamponunda Pi ise deiyonize suda hazırlandı.

İlk olarak CoA doymuş olmayan (100 μM) konsantrasyonda ve Pi 0, 5, 10, 20 ve 40 mM olarak sabit tutulup, Ac-Pi konsantrasyonu 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirilerek reaksiyon 25°C'de 233 nanometrede bir dakika takip edildi. Reaksiyonun toplam hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon

tamponu olarak tampon B kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp reaksiyon enzimle başlatıldı. CoA'nın doygun (600 μM) konsantrasyonu için aynı işlemler tekrar edildi.

İkinci olarak Ac-Pi doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda ve Pi 0, 5, 10, 20 ve 40 mM olarak sabit tutulup CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 400, 750 ve 1000 μM olarak değiştirilerek reaksiyon 25°C'de 233 nanometrede bir dakika takip edildi. Reaksiyonun toplam hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp reaksiyon enzimle başlatıldı. Ac-Pi'nin doygun (4 mM) konsantrasyonu için aynı işlemler tekrar edildi.

İnhibitör türünü belirlemek için veriler Lineweaver-Burk grafiğine uyarlandı ve Origin 7,5 kullanılarak doğrusal fit yapıldı.

3.2.3.2. İleri Reaksiyon için Ac-CoA İnhibisyonu

Her bir substratı (CoA ve Ac-Pi) doygun ve doygun olmayan konsantrasyonda sabit tutularak diğer substratın konsantrasyonu değiştirildi. İnhibitör olarak 0, 50, 200, 500 ve 1000 μM Ac-CoA kullanıldı. Substratlar tampon B'de Ac-CoA ise tampon A içinde hazırlandı.

Öncelikle, CoA doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda ve Ac-CoA 0, 50, 200, 500 ve 1000 μM olarak sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu 50, 100, 250, 350, 500, 750, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirilerek reaksiyon 25°C'de 233 nanometrede bir dakika takip edildi. Reaksiyonun toplam hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp reaksiyon enzimle başlatıldı. CoA'nın doygun (600 μM) konsantrasyonu için aynı işlemler tekrar edildi.

Benzer şekilde, Ac-Pi doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda ve Ac-CoA 0, 50, 200, 500 ve 1000 μM olarak sabit tutulup CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 350, 750 ve 1000 μM olarak değiştirilerek reaksiyon 25°C'de 233 nanometrede bir dakika takip edildi. Reaksiyonun toplam hacmi 100 μL olarak belirlendi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. 5 μL enzim (0,025 μg) kullanılıp

reaksiyon enzimle başlatıldı. Ac-Pi'nin doygun (4 mM) konsantrasyonu için aynı işlemler tekrar edildi.

İnhibitör türünü belirlemek için datalar Lineweaver-Burk grafiğine uyarlandı ve Origin versiyon 7,5 (Origin Lab, USA) kullanılarak doğrusal fit yapıldı.

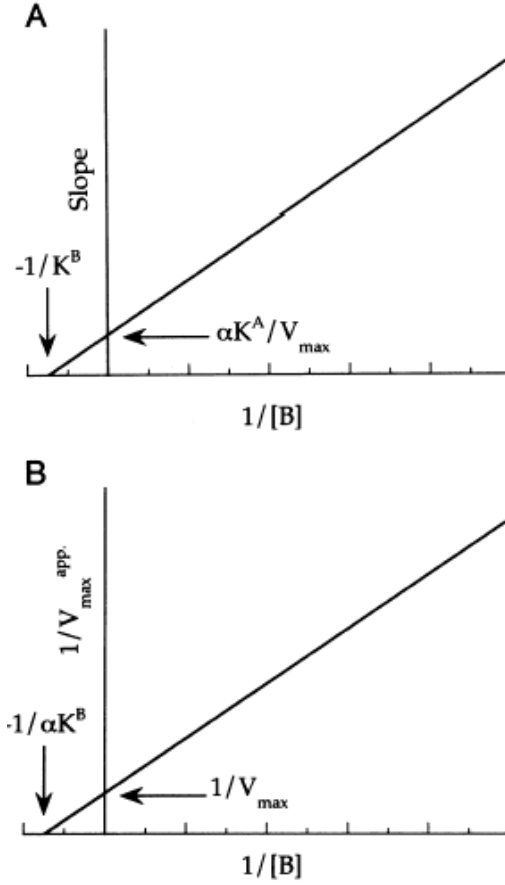
3.2.4. Substratların Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizması ürün inhibisyonu deneyleri sonucunda belirlendikten sonra substratların ayrışma sabitlerini belirlemek için ikinci dereceden (secondary) grafikler çizildi. İkincil grafikler eşitlik (1) ve (2) kullanılarak çizildi.

$$v = \frac{V_{\max}^{\text{app}} [B]}{K_m^{\text{B.app}} + [B]} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{\max} [A]}{aK^A \left(1 + \frac{K^B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{aK^B}{[B]}\right)} \quad (2)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{aK_A}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{aK_B}{[B]}\right) \quad (3)$$



Şekil 3.1. Rastgele bi bi enzimatik reaksiyonu için (A) Eğim ve (B) V_{max}^{app} grafiğinden αK^A , K^B , αK^B ve V_{max} değerlerinin grafiksel olarak belirlenmesi.

Sabit olan substrat konsantrasyonuna karşı eğim (K_m^{app}/V_{max}^{app}) ve $1/V_{max}^{app}$ grafiği çizilerek αK_A , K_B , αK_B ve V_{max} grafiksel olarak belirlendi.

3.2.5. İleri ve Geri Reaksiyona Metabolitlerin Etkisi

3.2.5.1. İleri Reaksiyona NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$ Etkisi

Substratlar ve metabolitler tampon A'da hazırlandı. Reaksiyonlar hazırlanırken substratlar ve metabolitler buz üzerinde tutuldu. CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla $100 \mu M$ ve $500 \mu M$ da sabit tutulup NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ ve $NADPH$ konsantrasyonu 0, 0,5, 1 ve 2 mM olarak değiştirilerek $25^\circ C$ 'de 233 nanometrede bir dakika ölçüm yapıldı. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. Reaksiyon hacmi $100 \mu L$ olarak belirlendi. $5 \mu L$ enzim ($0,025 \mu g$) kullanıldı.

3.2.5.2. İleri ve Geri Reaksiyona ATP, Piruvat ve α -Ketoglutarat Etkisi

Substratlar, ATP, piruvat ve α -ketoglutarat tampon A'da hazırlandı. Reaksiyonlar hazırlanırken substratlar ve metabolitler buz üzerinde tutuldu. His₆-Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 μ M ve 500 μ M da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0, 0,5, 1, 2 ve 3 mM, piruvat 0, 5, 10 ve 15 mM ve α -ketoglutarat 0, 2,5, 5, 7,5 10 ve 15 mM olarak değiştirilerek 25°C'de 233 nanometrede bir dakika ölçüm yapıldı. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. Reaksiyon hacmi 100 μ L olarak belirlendi. 5 μ L enzim (0,025 μ g) kullanıldı.

S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği geri reaksiyon için Ac-CoA, ATP, piruvat ve α -ketoglutarat tampon A'da, DTNB 0,1 M Tris (pH 8)'de ve Pi deiyonize suda hazırlandı. Reaksiyonlar hazırlanırken substratlar, DTNB ve metabolitler buz üzerinde tutuldu. Ac-CoA, Pi ve DTNB konsantrasyonları sırasıyla 125 μ M, 5 mM ve 0,2 mM da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0, 0,5, 1, 2 ve 3 mM; piruvat 0, 5, 10 ve 15 mM; ve α -ketoglutarat 0, 2,5, 5, 7,5 10 ve 15 mM olarak değiştirilerek 25°C'de 412 nanometrede bir dakika ölçüm yapıldı. Reaksiyon tamponu olarak tampon A kullanıldı. Reaksiyon hacmi 100 μ L olarak belirlendi. 5 μ L enzim (0,025 μ g) eklenerek reaksiyonlar başlatıldı.

3.2.6. ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Tamponların Etkisi

S. saprophyticus Pta'nın inhibitörü olan α -ketoglutarat'ın Tris [50 mM Tris, 150 mM KCl, 2 mM DTT (pH 7,5)] ve HEPES [50 mM HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT (pH 8)] tamponlarında, ATP'nin ise Tris, HEPES ve MOPS [50 mM MOPS, 150 mM KCl, 2 mM DTT (pH 8)] tamponlarında aktiviteye etkileri incelendi.

İlk olarak suda hazırlanan α -ketoglutarat'ın HEPES ve Tris tamponlarında Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyona etkisi incelendi. CoA 200 μ M ve Ac-Pi 500 μ M'da sabit tutulup reaksiyon 25°C'de 233 nm'de bir dakika takip edildi. Reaksiyon

tamponu olarak tampon A ve tampon C (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 2 mM DTT (pH 8)) kullanıldı.

İkinci olarak suda hazırlanan ATP'nin HEPES, MOPS ve Tris tamponlarında Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyona etkisi incelendi. CoA 200 μ M ve Ac-Pi 500 μ M'da sabit tutulup reaksiyon 25°C'de 233 nm'de bir dakika takip edildi. Reaksiyon tamponu olarak HEPES, MOPS ve Tris tamponu kullanıldı.

3.2.8. ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

3.2.8.1. CoA İçin ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

CoA ve Ac-Pi tampon A'da, ATP ise deiyonize suda hazırlandı. Ac-Pi konsantrasyonu 2 mM, ATP 0, 1 ve 2 mM da sabit tutulup CoA konsantrasyonunu 50, 100, 200, 400, 600 ve 1000 μ M olarak değiştirildi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. Ortam sıcaklığını 25°C olarak ayarlandı. Reaksiyon hacmi 100 μ L olarak belirlendi. 5 μ L enzim (0,025 μ g) kullanıldı. Reaksiyon enzimle başlatıldı ve 233 nm'de bir dakika ölçüm yapıldı. İnhibitör türünü belirlemek için datalar Lineweaver-Burk grafiğine uyarlandı ve Origin 7,5 versiyonu (Origin Lab, USA) kullanılarak doğrusal fit yapıldı.

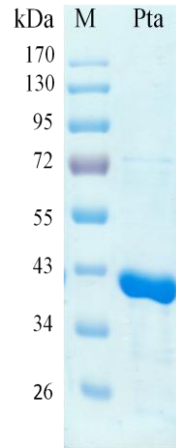
3.2.8.2. Ac-Pi İçin ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

Ac-Pi ve CoA tampon A'da, ATP ise deiyonize suda hazırlandı. CoA konsantrasyonu 200 μ M, ATP 0, 1 ve 2 mM da sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonunu 75, 150, 300, 600 ve 1000 μ M olarak değiştirildi. Reaksiyon tamponu olarak tampon B kullanıldı. Ortam sıcaklığını 25°C olarak ayarlandı. Reaksiyon hacmi 100 μ L olarak belirlendi. 5 μ L enzim (0,025 μ g) kullanıldı. Reaksiyon enzimle başlatıldı ve 233 nm'de bir dakika ölçüm yapıldı. İnhibitör türünü belirlemek için veriler Lineweaver-Burk grafiğine uyarlandı ve Origin 7,5 versiyonu (Origin Lab, USA) kullanılarak doğrusal fit yapıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. Kinetik Çalışmalarda Kullanılan *S. saprophyticus* Pta'nın Saflaştırılması

S. saprophyticus Pta daha laboratuvarımızda İlknur Aksoy tarafından klonlanmış, eksprese edilmiş ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştı [Aksoy, 2010]. Bu tez çalışmasında öncelikle gerekli olan Pta *E. Coli* BL21 (DE3) hücrelerinden eksprese edilip, daha sonra Ni-NTA kolonuyla saflaştırıldı. Elde edilen rekombinant Pta'nın saflığı SDS-PAGE analizi ile kontrol edildi ve en az % 80 saf olduğu görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Ni-NTA kolonuyla saflaştırılan His₆-Pta'nın SDS-PAGE (% 12) görüntüsü. M (markır), Pta (5 µg).

4.2. *S.saprophyticus* Pta'nın Katalizlediği Reaksiyonun Kinetik Mekanizmasının Belirlenmesi

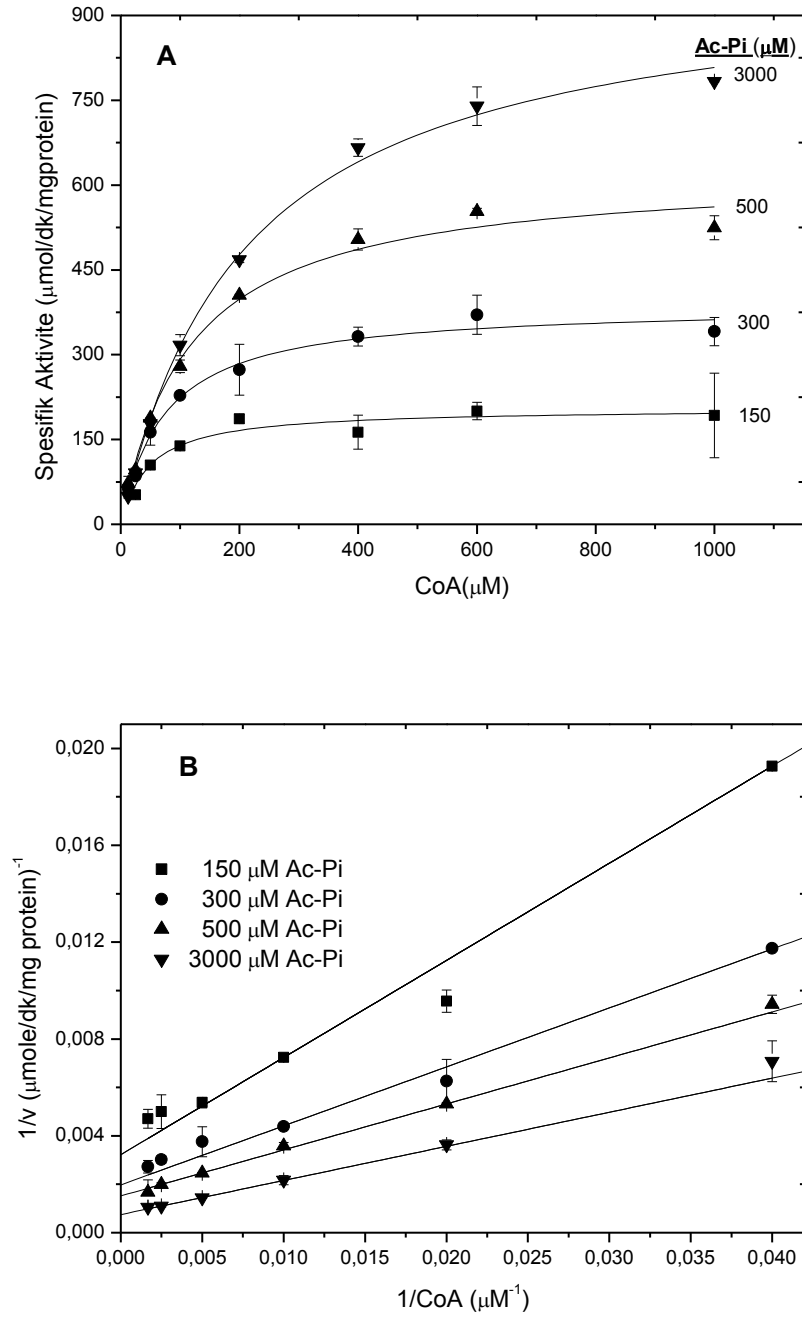
Daha önce belirtildiği gibi, çift substratlı enzim kinetiği üç temel mekanizmaya göre olmaktadır. Bunlar, ping-pong, rastgele ve sıralı mekanizmadır. *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği iki substrat, iki ürün reaksiyonunun mekanizmasını belirlemek için başlangıç hızları incelendi. Pta'nın hem ileri hem de

geri reaksiyonu için mekanizmalar ayrı ayrı incelendi. Enzimin hem ileri (asetil-CoA oluşumu) reaksiyonu, hem de geri (asetil fosfat oluşumu) reaksiyonu klasik Michaelis-Menten kinetiğinin özelliklerini gösterdiği görüldü.

4.2.1. İleri Reaksiyonun Mekanizmasının Aydınlatılması

Başlangıç hızları ölçümleri, mekanizmanın üçlü kompleks mekanizması mı veya ping-pong mekanizması mı olduğunu belirlemek için yapıldı. Substratlardan birinin konsantrasyonu (CoA veya Ac-Pi) birkaç farklı konsantrasyonda sabit tutulup diğer substratın (CoA veya Ac-Pi) konsantrasyonu değiştirilerek başlangıç hızları ölçümü yapıldı.

İlk olarak Ac-Pi konsantrasyonu sabit tutulup, CoA konsantrasyonu değiştirilerek başlangıç hızı ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk denkleminin uyarlanarak grafiğe aktarıldı (Şekil 4.2). Lineweaver-Burk grafiği incelendiğinde doğruların paralel olmayıp kesiştiği görüldü (Şekil 4.2B). Lineweaver-Burk grafiğinde doğruların kesişmesi *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmanın ping-pong mekanizması değil, üçlü kompleks mekanizması olduğunu göstermektedir.



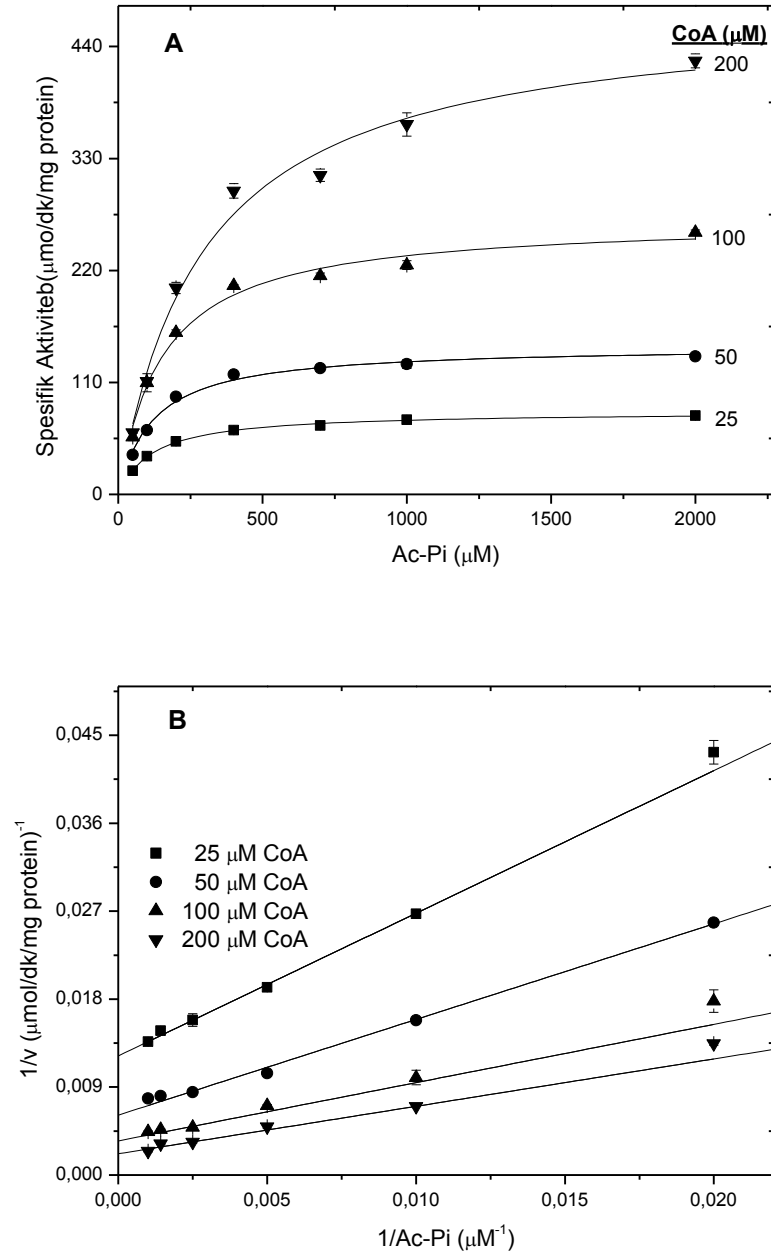
Şekil 4.2. Ac-Pi konsantrasyonu sabit tutulup CoA konsantrasyonu değiştirilerek ileri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi. Ac-Pi konsantrasyonu 150, 300, 500 ve 3000 μM olarak sabit tutulup CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 400, 600 ve 1000 μM olarak değiştirildiğinde gözlenen Pta aktivitesinin Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk (B) grafiği. Diğer deney şartları bölüm 3.2.2.1’de verildiği gibidir.

Kinetik parametreleri (görünür $V_{\max}$ ($V_{\max}^{\text{app}}$) ve görünür K_m (K_m^{app}) değerlerini) belirlemek için, Şekil 4.2A'daki veriler Michaelis-Menten denkleminde nonlineer fit edildi ve hesaplanan kinetik değerler Tablo 4.1'e aktarıldı. Tablo 4.1'deki verilerden de görüldüğü gibi artan sabit substrat (asetil fosfat) konsantrasyonuyla $V_{\max}^{\text{app}}$ ve CoA için K_m^{app} değerlerinin de arttığı görüldü. Bu sonuçlar, asetil fosfatın enzime önce bağlanmasının enzimin CoA'ya karşı olan afinitesini düşürdüğünü göstermektedir.

Tablo 4.1. Şekil 4.2A'deki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlineer fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.

Ac-Pi (μM)	$V_{\max}^{\text{app}}$ ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$)	K_m^{app} (μM)
150	205 ± 12	47 ± 12
300	387 ± 13	73 ± 9
500	625 ± 23	114 ± 15
3000	977 ± 27	210 ± 17

Aynı şekilde, CoA konsantrasyonu sabit tutulup, Ac-Pi konsantrasyonu değiştirilerek başlangıç hızı ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk denkleminde uyarlanarak grafiğe aktarıldı (Şekil 4.3). Lineweaver-Burk grafiği incelendiğinde doğruların paralel olmayıp kesiştiği görüldü (Şekil 4.3B). Kesişen doğrular, yukarıda da belirtildiği gibi, reaksiyon mekanizmasının ping-pong mekanizması değil, üçlü kompleks mekanizması gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. CoA konsantrasyonu sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirilerek ileri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi. CoA konsantrasyonu 25, 50, 100 ve 200 μM olarak sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu 50, 100, 200, 400, 700 ve 1000 μM olarak değiştirildiğinde gözlenen Pta aktivitesinin Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk (B) grafiği. Diğer deney şartları bölüm 3.2.2.1’de verildiği gibidir.

Bu reaksiyon şartlarındaki kinetik parametrelerin ($V_{\max}^{\text{app}}$ ve K_m^{app}) belirlenmesi için de, Şekil 4.3A'daki veriler Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edildi ve elde edilen değerler Tablo 4.2'de verilmiştir. Artan CoA konsantrasyonu ile $V_{\max}^{\text{app}}$ ve asetil fosfat için K_m^{app} değerlerinin de arttığı görüldü. Buradan CoA'nın enzime önce bağlanmasının enzimin asetil fosfata olan afinitesini düşürdüğü görülmektedir.

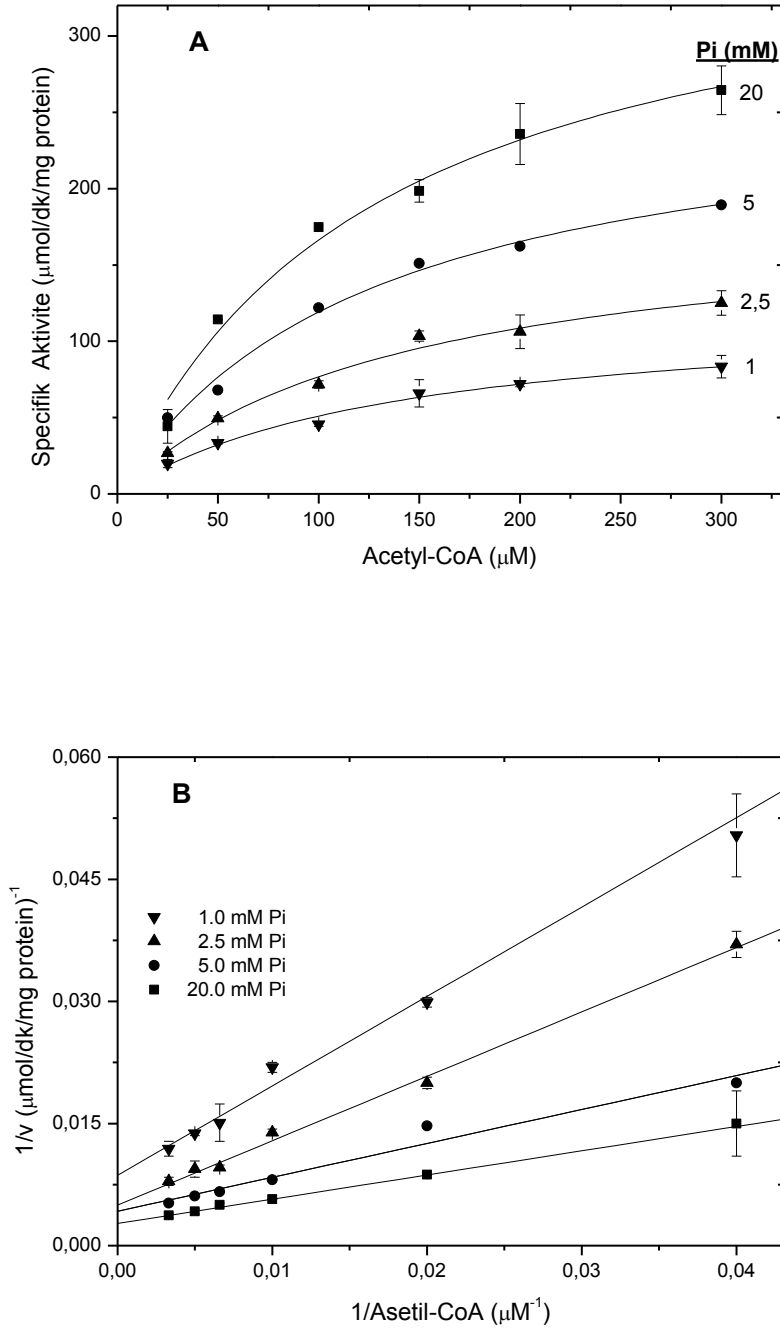
Tablo 4.2. Şekil 4.3A'daki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.

CoA (μM)	$V_{\max}^{\text{app}}$ ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$)	K_m^{app} (μM)
25	81 ± 1	119 ± 6
50	146 ± 4	120 ± 12
100	270 ± 8	152 ± 18
200	779 ± 22	295 ± 42

4.2.2. Geri Reaksiyonun Mekanizmasının Aydınlatılması

İleri reaksiyonda olduğu gibi *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun da mekanizmasının üçlü kompleks mekanizması mı yoksa ping-pong mekanizması mı olduğunu belirlemek için başlangıç hızları ölçümü yapıldı. Geri reaksiyon için başlangıç hızları ölçümünü substratlardan birinin (Ac-CoA veya Pi) konsantrasyonunu sabit tutup diğer substratın (Ac-CoA veya Pi) konsantrasyonunu değiştirerek yapıldı.

Önce, fosfat birkaç farklı konsantrasyonda sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirilerek başlangıç hızı ölçümü yapıldı. İleri reaksiyonda olduğu gibi elde edilen veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk denkleminde uyarlanarak grafiğe aktarıldı (Şekil 4.4). Lineweaver-Burk grafiğinde veriler lineer fit edilerek elde edilen doğruların kesiştiği görüldü (Şekil 4.4B). Doğruların kesişmesi Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun mekanizmasının ping-pong mekanizması değil, üçlü kompleks mekanizması olduğunu göstermektedir.



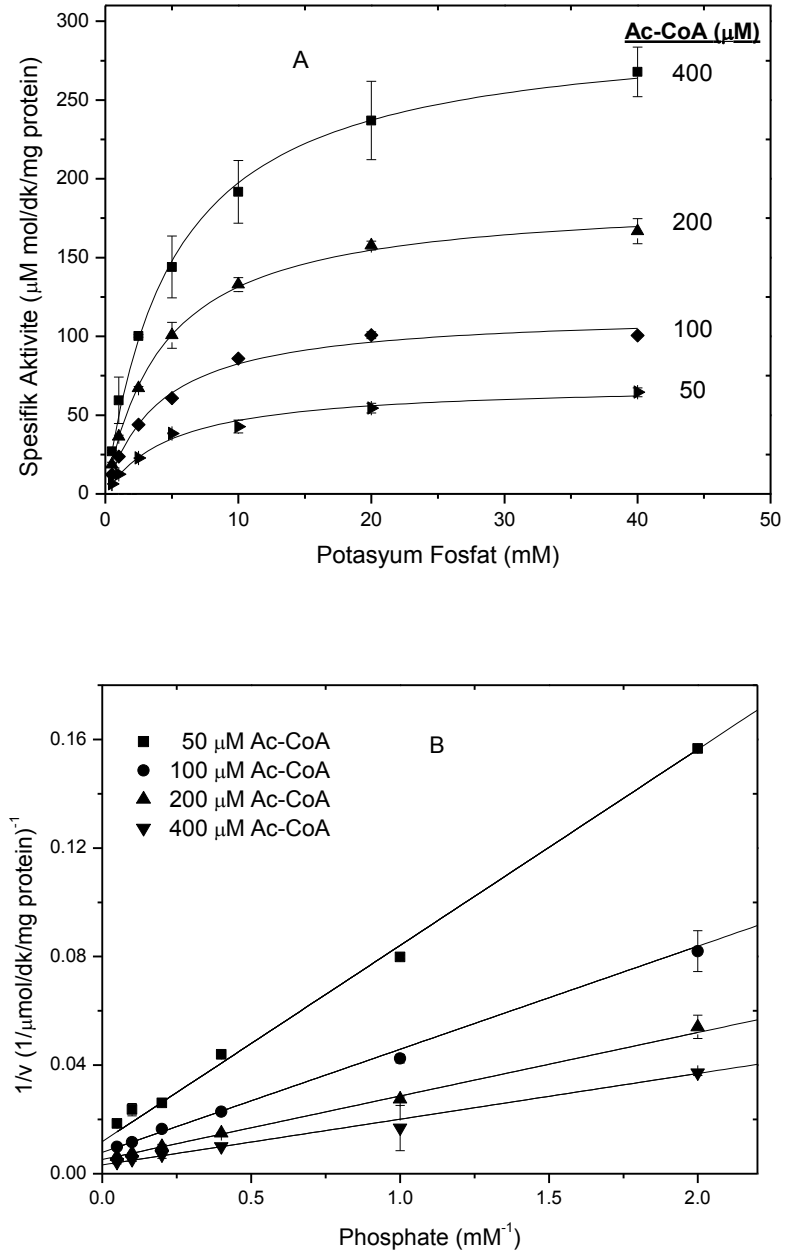
Şekil 4.4. Pi konsantrasyonu sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirilerek geri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi. Pi konsantrasyonu 1, 2,5, 5 ve 20 mM olarak sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 μM olarak değiştirildiğinde gözlenen Pta aktivitesinin Michaelis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk (B) grafiği. Diğer deney şartları bölüm 3.2.2.2’de belirtildiği gibidir.

Kinetik parametreleri belirlemek için Şekil 4.6A'daki veriler Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edildi. Elde edilen veriler Tablo 4.3'e aytarıldı. Pi konsantrasyonu sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirildiğinde artan Pi konsantrasyonlarında $V_{\max}^{\text{app}}$ artarken Ac-CoA için K_m^{app} 'in değişmediği görüldü (Tablo 4.3). Bu sonuçlara göre fosfatın enzime önce bağlanmasının enzimin Ac-CoA'ya olan afinitesini etkilemediği görüldü.

Tablo 4.3. Şekil 4.4A'daki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.

Pi (mM)	$V_{\max}^{\text{app}}$ ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$)	K_m^{app} (μM)
1	122 $\pm$ 10	139 $\pm$ 26
2,5	185 $\pm$ 15	141 $\pm$ 26
5	270 $\pm$ 16	126 $\pm$ 17
20	382 $\pm$ 32	130 $\pm$ 24

Daha sonra Ac-CoA bir kaç farklı konsantrasyonda sabit tutulup fosfat konsantrasyonu değiştirilerek başlangıç hızı ölçümü yapıldı. Yukarıda olduğu gibi elde edilen veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk denkleminde uyarlanarak grafiğe aktarıldı (Şekil 4.4). Lineweaver-Burk grafiğinde veriler lineer fit edilerek elde edilen doğruların kesiştiği görüldü (Şekil 4.4B). Doğruların birbirine paralel olmayıp kesişmesi Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun mekanizmasının ping-pong mekanizması değil, üçlü kompleks mekanizması olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. Ac-CoA konsantrasyonunu sabit tutup Pi konsantrasyonunu değiştirerek geri reaksiyonun başlangıç hızının ölçülmesi. Ac-CoA konsantrasyonu 50, 100, 200 ve 400 μM olarak sabit tutulup Pi konsantrasyonu 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 ve 40 mM olarak değiştirildiğinde gözlenen Pta aktivitesinin Michaelis-Menten (A) Lineweaver-Burk (B) grafiği. Diğer deney şartları bölüm 3.2.2.2’de belirtildiği gibidir.

$V_{\max}^{\text{app}}$ ve K_m^{app} değerlerini belirlemek için Şekil 4.5A'daki veriler yukarıda olduğu gibi Michaelis-Menten grafiğine aktararak nonlinear fit yapıldı. Nonlinear fit sonucunda elde edilen $V_{\max}^{\text{app}}$ ve K_m^{app} değerleri Tablo 4.4'te verildi. Bu tabloda da görüldüğü gibi Ac-CoA konsantrasyonu sabit tutulduğunda $V_{\max}^{\text{app}}$ artarken fosfat için K_m^{app} değerinin değişmediği görüldü (Tablo 4.4). Bu sonuçlara göre Ac-CoA'nın enzime fosfattan önce bağlanması enzimin fosfata olan afinitesini etkilemediği belirlendi.

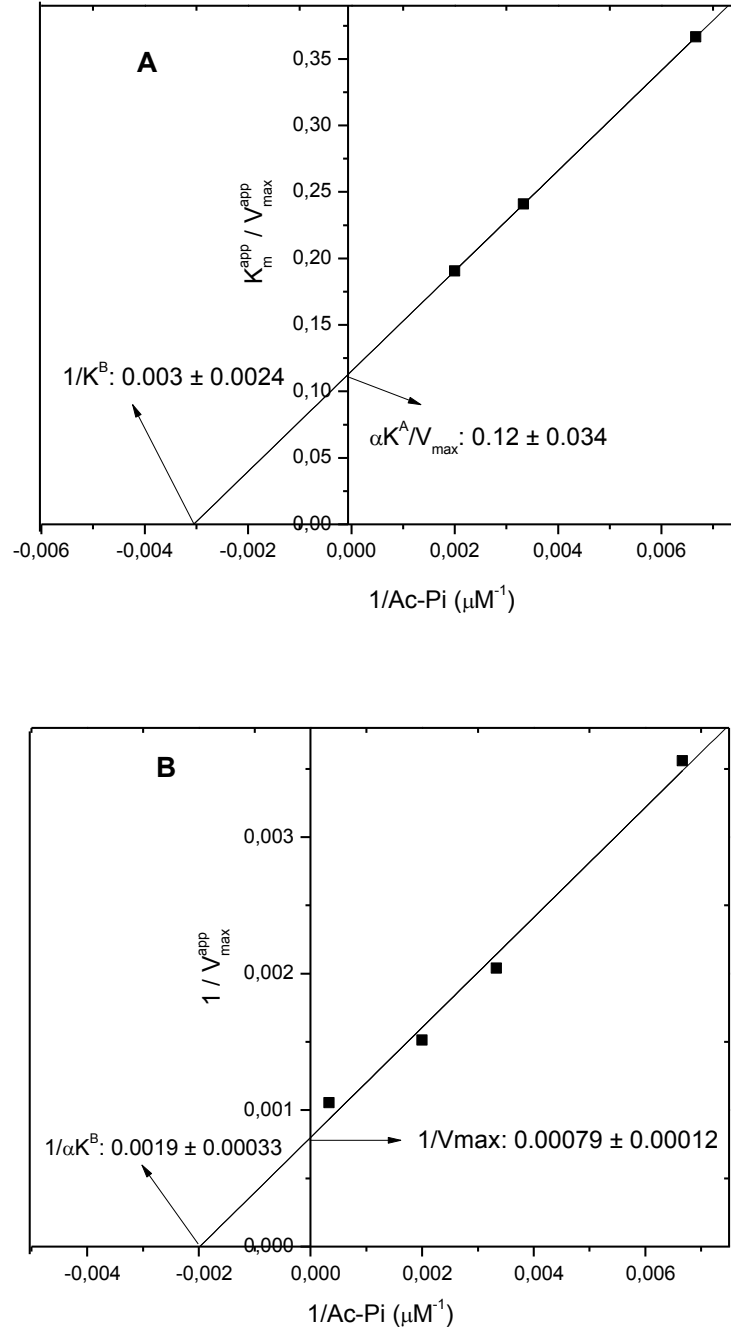
Tablo 4.4. Şekil 4.5A'daki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek hesaplanan kinetik sabitler.

Ac-CoA (μM)	$V_{\max}^{\text{app}}$ ($\mu\text{mol/dk/mg protein}$)	K_m^{app} (μM)
50	70 ± 3	$5 \pm 0,7$
100	116 ± 4	$4 \pm 0,5$
200	188 ± 3	$4,3 \pm 0,2$
400	297 ± 7	$5,1 \pm 0,4$

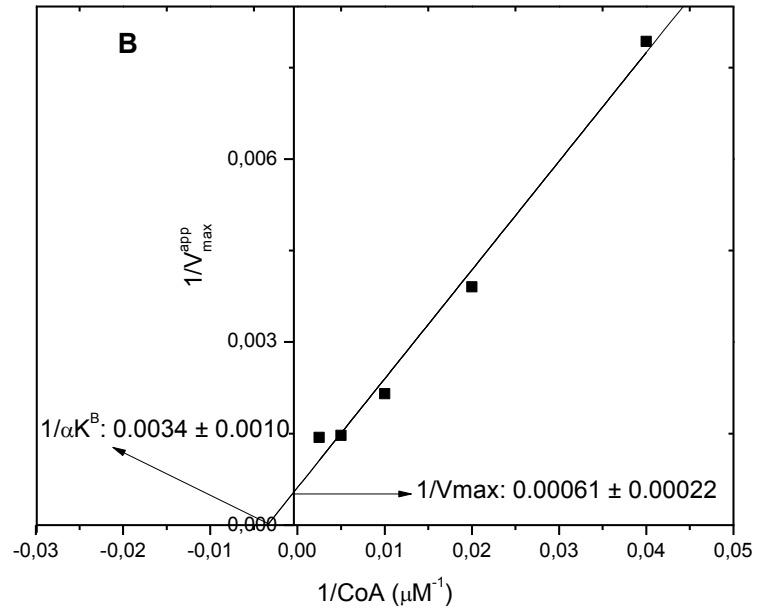
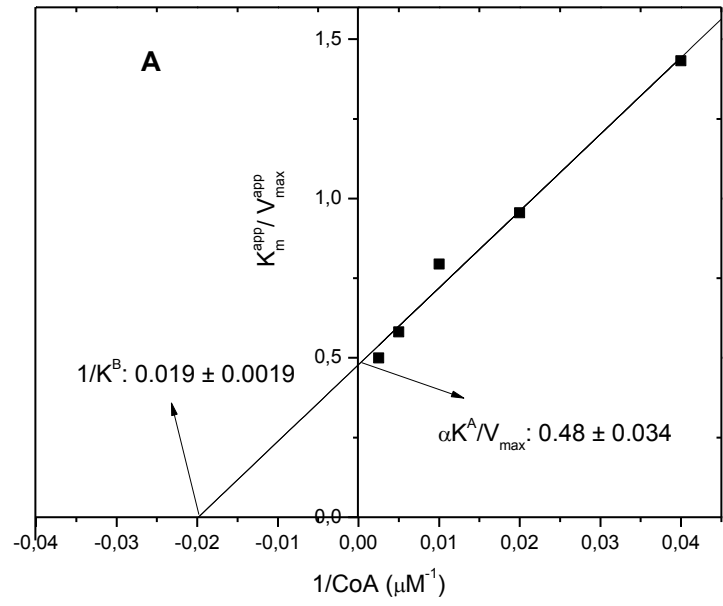
4.2.3. İleri Reaksiyon Substratları İçin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

Başlangıç hızları ölçümü ve ürün inhibisyonu deneyleri sonucunda Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasının hızlı denge rastgele iki substrat, iki ürün mekanizması olduğu belirlendi. Bundan dolayı veriler hızlı denge rastgele bi bi mekanizmasında tanımlanan eşitlik 1 kullanılarak analiz edildi. Konsantrasyonu sabit tutulan her bir substrat için "secondary" grafikleri ($1/V_{\max}^{\text{app}}$ vs $1/B$, ve eğim vs. $1/B$) çizilerek $V_{\max}$, K ve αK değerleri belirlendi [Segel, 1975].

$V_{\max}$ maksimum hız, A ve B değişken ve sabit tutulan substratın konsantrasyonu, αK_A ve K_B sırasıyla A 'nın Enzim-B kompleksine bağlanma sabiti ve B 'nin Enzim-A kompleksine bağlanma sabitidir [Copeland, 2000].



Şekil 4.6. Ac-Pi konsantrasyonu sabit tutulup CoA konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim ($K_m^{app} / V_{max}^{app}$) (A) ve V_{max}^{app} (B) değerlerinin ikincil grafikleri.



Şekil 4.7. CoA konsantrasyonu sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim (K_m^{app}/V_{max}^{app}) (A) ve V_{max}^{app} (B) değerlerinin ikincil grafikleri.

Tablo 4.5. *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonun (asetil-fosfat + CoA → asetil-CoA + fosfat) substratları için ikincil grafikler kullanılarak hesaplanan ayrışma sabitleri.

Substrate	K^1 (μM)	αK^2 (μM)	k_{cat} (s^{-1})
<i>İleri Reaksiyon</i>			
Asetil Fosfat	150 ± 55	503 ± 85	869 ± 132
CoA	51 ± 5	290 ± 41	1130 ± 385

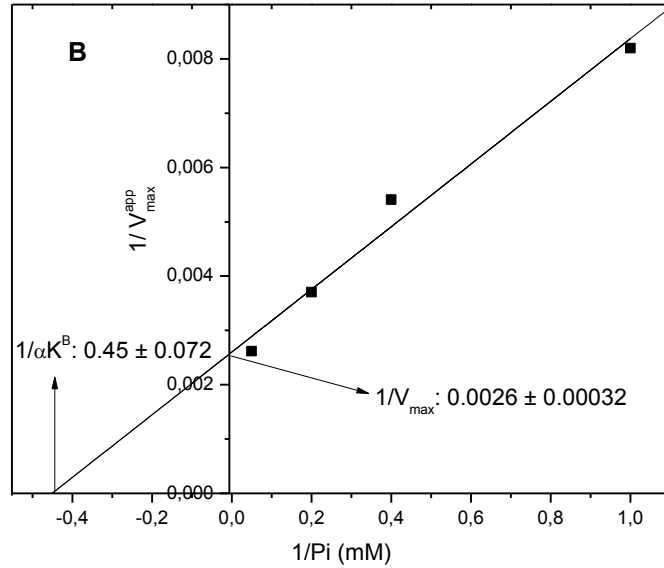
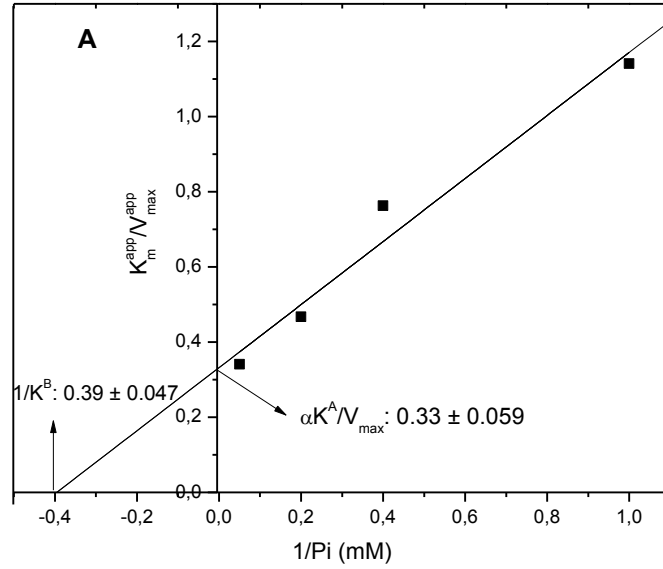
¹Substratın serbest enzime bağlanma sabiti, ²substratın enzim-diğer substrat kompleksine bağlanma sabiti.

S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu için hesaplanan ayrışma sabitleri ve kinetik parametreler Tablo 4.3'te gösterilmektedir. Bu parametrelere göre Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonun substratlarından birinin enzime bağlanması diğer substratın enzime afinitesini ($\alpha \approx 4,5$) düşürdüğü görülmüştür. Bu durum başlangıç hızları ölçümlerinde Lineweaver-Burk denkleminde uyarlanan verilerin lineer fit edildiklerinde elde edilen doğruların paralelmiş gibi (Şekil 4-6) olmasına neden olmuştur. Başlangıç hız ölçümlerinde Lineweaver-Burk grafiklerinde elde edilen doğruların paralelmiş gibi görünmeleri hızlı denge (rapid equilibrium) rastgele sisteminde bir substratın enzime diğerinden önce bağlanmasının diğer substratın bağlanmasını inhibe etmesi sonucunda olmaktadır ($\alpha \gg 1$ durumunda) [Segel, 1975].

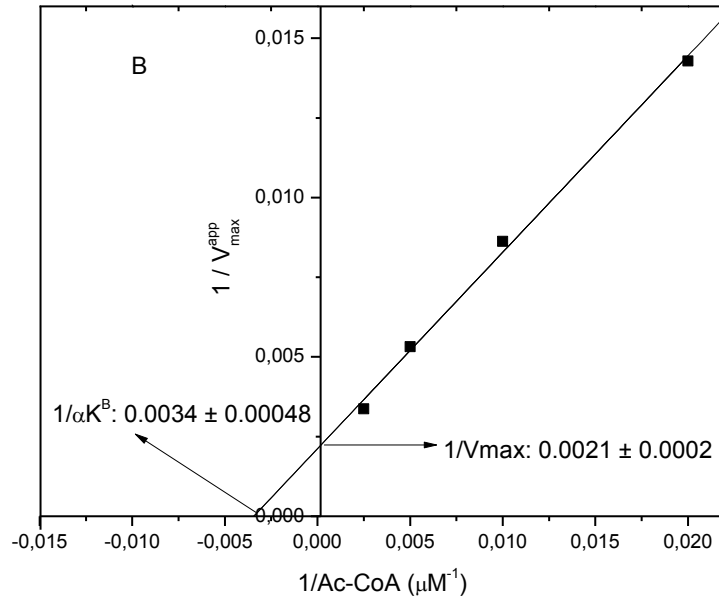
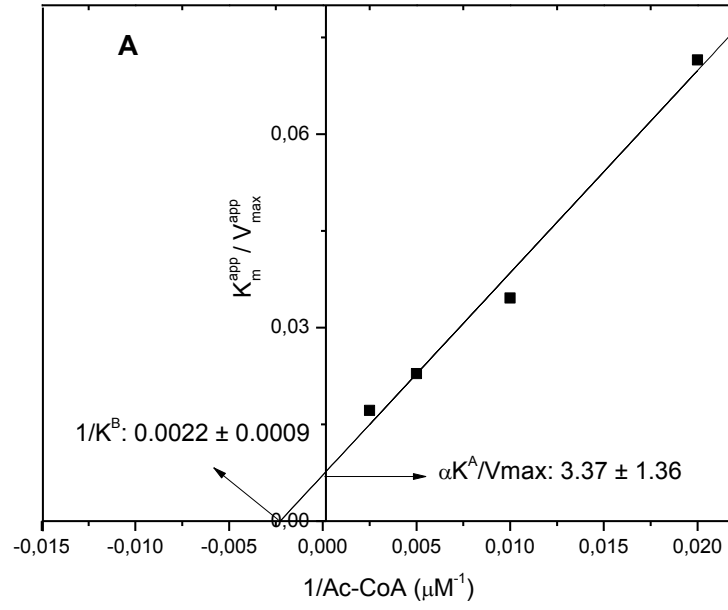
4.2.4. Geri Reaksiyon Substratları İçin Kinetik Sabitlerin Belirlenmesi

S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun (asetil-CoA + fosfat → asetil-fosfat + CoA) başlangıç hızları ölçümü deneyleri (4.2.2) sonucunda His₆-Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasının hızlı denge rastgele iki substrat, iki ürün mekanizması olduğu belirlendi. Bundan dolayı veriler hızlı denge random bi bi mekanizmasında tanımlanan eşitlik 1 kullanılarak analiz edildi. Konsantrasyonu sabit tutulan her bir substrat için secondary grafikleri ($1/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ vs $1/B$, ve eğim vs. $1/B$) çizilerek V_{max} , K ve αK değerleri belirlendi [Segel, 1975].

$V_{\max}$ maksimum hız, A ve B değişken ve sabit tutulan substratın konsantrasyonu, αK_A ve K_B sırasıyla A'nın Enzim-B kompleksine bağlanma sabiti ve B'nin Enzim-A kompleksine bağlanma sabitidir [Copeland, 2000].



Şekil 4.8. P_i konsantrasyonu sabit tutulup Ac-CoA konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim ($K_m^{\text{app}} / V_{\max}^{\text{app}}$) (A) ve $V_{\max}^{\text{app}}$ (B) değerlerinin ikincil grafikleri.



Şekil 4.9. Ac-CoA konsantrasyonu sabit tutulup P_i konsantrasyonu değiştirildiğinde elde edilen eğim ($K_m^{app} / V_{max}^{app}$) (A) ve V_{max}^{app} (B) değerlerinin ikincil grafikleri.

Tablo 4.6. *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonun (asetil-CoA + fosfat → asetil-fosfat + CoA) substratları için ikincil garfikler kullanılarak hesaplanan ayrışma sabitleri.

Substrate	K^1 (μM)	αK^2 (μM)	k_{cat} (s^{-1})
<i>Geri Reaksiyon</i>			
Asetil CoA	439 ± 180	291 ± 41	328 ± 44
Fosfat	2530 ± 305	2200 ± 348	267 ± 31

¹ Substratın serbest enzime bağlanma sabiti, ² substratın enzim-diğer substrat kompleksine bağlanma sabiti.

S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği geri reaksiyonda substratlardan biri (Ac-CoA veya Pi) sabit tutulup diğer substratın (Ac-CoA veya Pi) konsantrasyonu değiştirildiğinde $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ artarken K_m^{app} değişmemektedir. Buradan bu substratlardan birinin enzime bağlanması diğerinin bağlanmasını etkilemediği ($\alpha = 1$ durumunda) görüldü [Segel, 1975].

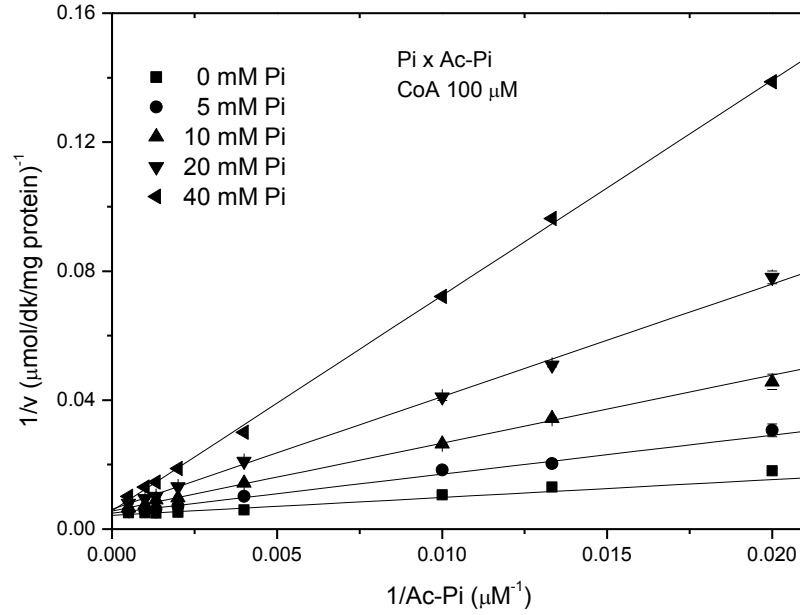
4.2.5. Ürün İnhibisyonu Çalışmaları

Ürün inhibisyonu deneyleri başlangıç hızları ölçümleri sonucunda *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasının üçlü kompleks mekanizması olduğu belirlendikten sonra mekanizmanın rastgele mekanizması mı veya zorunlu sıralı mekanizma mı olduğunu belirlemek için yapıldı.

4.2.5.1. İleri Reaksiyonu İçin Pi İnhibisyonu

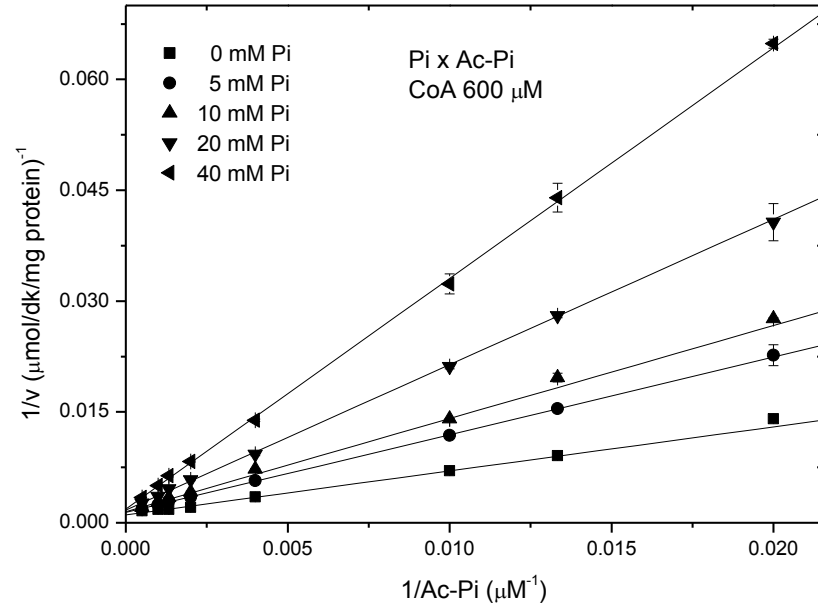
S. saprophyticus Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu için Pi ve Ac-CoA olmak üzere iki ürün inhibitörü vardır. Her bir inhibitörün CoA ve Ac-Pi'nin doymun ve doymun olmayan konsantrasyonlarında inhibisyon etkisi incelendi. Deney sonucunda elde edilen veriler Lineweaver-Burk denkleminde lineer fit edildi. Lineer fitler kullanılarak inhibisyon türleri belirlendi. CoA'nın doymun ($600 \mu\text{M}$) ve doymun olmayan ($100 \mu\text{M}$) konsantrasyonlarında Pi'nin Ac-Pi'ye karşı inhibisyon etkisinin olduğu görüldü.

CoA doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda ve beş farklı konsantrasyonda sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirildiğinde Pi'nin Ac-Pi için yarışmalı inhibitör olduğu görüldü (Şekil 4.10).



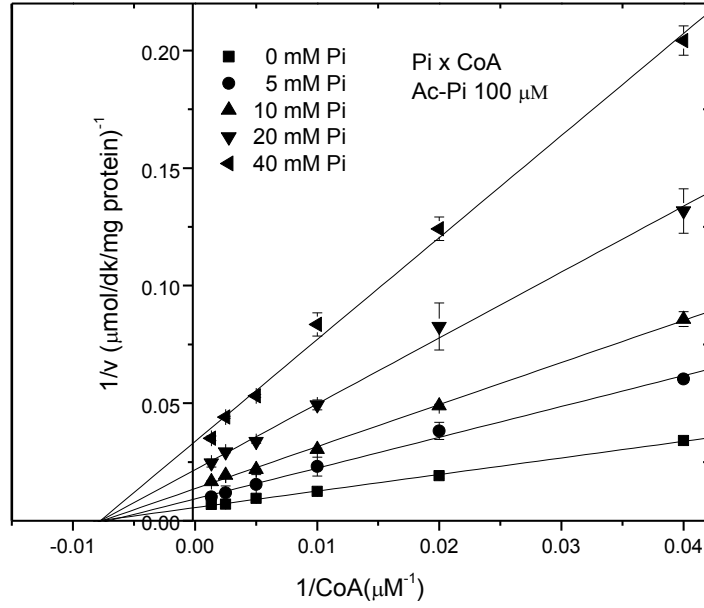
Şekil 4.10. Doygun olmayan CoA konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği. Pi konsantrasyonu 0, 5, 10, 20, 40 mM ve CoA doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirilerek ürün inhibisyonu deneyi yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.3.1’de belirtildiği gibidir.

Benzer şekilde, CoA doygun (600 μM) konsantrasyonda ve Pi beş farklı konsantrasyonda sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu değiştirildiğinde Pi'nin Ac-Pi için yarışmalı inhibitör olduğu görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.11. Doygun CoA konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği. Pi konsantrasyonu 0, 5, 10, 20, 40 mM ve CoA doymuş (600 μM) konsantrasyonda sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirilerek ürün inhibisyonu deneyi yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.3.1’de belirtildiği gibidir.

Daha sonra, Ac-Pi’nin doymuş (4 mM) ve doymuş olmayan (100 μM) konsantrasyonlarında Pi’nin CoA’ya karşı inhibisyon etkisi incelendi. Pi’nin CoA’ya karşı doymuş Ac-Pi konsantrasyonunda inhibisyon etkisi görülmezken doymuş olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda inhibisyon etkisi olduğu görüldü (Şekil 4.11).

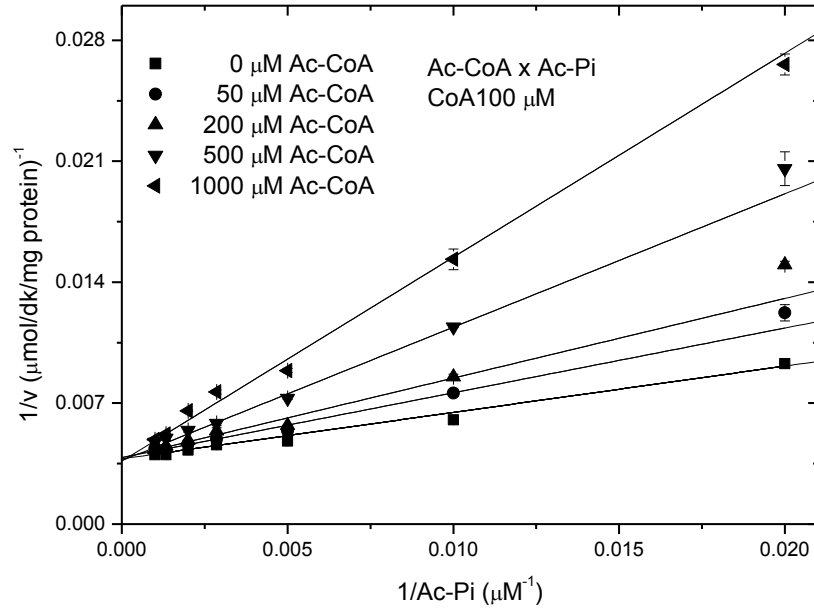


Şekil 4.12. Doygun olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda Pi inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği. Pi konsantrasyonu 0, 5, 10, 20, 40 mM ve Ac-Pi doygun olmayan (100 μ M) konsantrasyonda sabit tutulup CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 400, 750 ve 1000 μ M olarak değiştirilerek ürün inhibisyonu deneyi yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.3.1’de belirtildiği gibidir.

Deney sonucu elde edilen veriler Lineweaver-Burk denkleminde lineer fit edildiğinde doğruların Şekil 4.12’de görüldüğü gibi x-eksini (ikinci bölge) üzerinde kesiştiği görüldü. Buradan Ac-Pi doygun olmayan konsantrasyondayken Pi’nin CoA için yarışmasız inhibitör olduğu belirlendi.

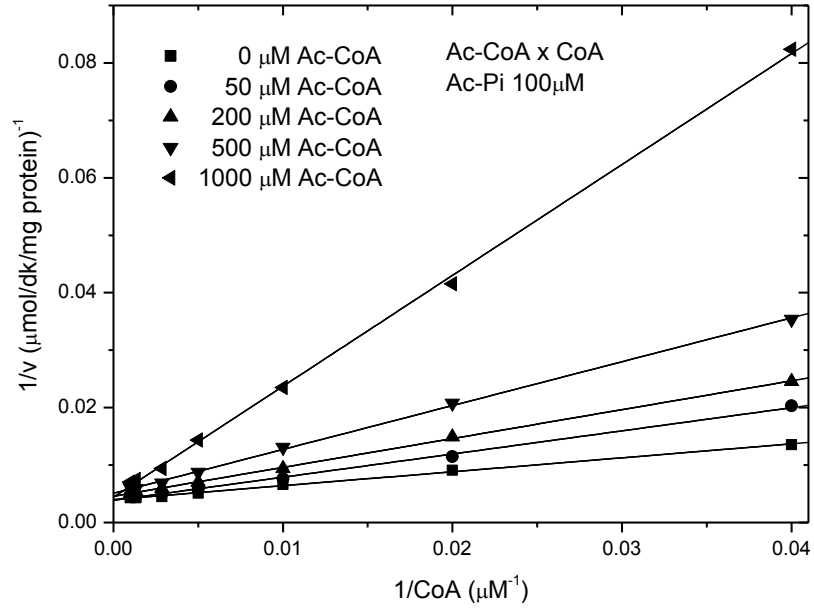
4.2.5.2. İleri Reaksiyonu İçin Ac-CoA İnhibisyonu

Fosfat inhibisyonunda olduğu gibi ileri reaksiyon için Ac-CoA’nın inhibisyon etkisi de CoA ve Ac-Pi’nin doygun ve doygun ve doygun olmayan konsantrasyonlarında incelendi. Veriler Lineweaver-Burk denklemini kullanılarak grafiğe aktarıldı ve lineer fit yapılarak inhibitörlerin inhibisyon türleri belirlendi.



Şekil 4.13. Doygun olmayan CoA konsantrasyonunda Ac-CoA inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği. Ac-CoA konsantrasyonu 0, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM , CoA doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonu 50, 100, 200, 350, 500, 750, 1000 ve 2000 μM olarak değiştirilerek ürün inhibisyonu deneyi yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.3.2’de belirtildiği gibidir.

Fosfat inhibisyonunda olduğu gibi deney sonucu elde edilen veriler Lineweaver-Burk grafiğine aktarılıp lineer fit yapıldığında doğruların y-ekseni üzerinde tek noktada kesiştiği görüldü (Şekil 4.13). Buradan CoA’nın doygun olmayan konsantrasyonunda Ac-CoA’nın Ac-Pi için yarışmalı inhibitör olduğu belirlendi. Buna karşın CoA’nın doygun konsantrasyonunda Ac-CoA’nın Ac-Pi için herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı görüldü.



Şekil 4.14. Doygun olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda Ac-CoA inhibisyonunun Lineweaver-Burk grafiği. Ac-CoA konsantrasyonu 0, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM , Ac-Pi doygun olmayan (100 μM) konsantrasyonda sabit tutulup CoA konsantrasyonu 25, 50, 100, 200, 350, 750 ve 1000 μM olarak değiştirilerek inhibisyon deneyi yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.3.2’de belirtildiği gibidir.

Ac-Pi doygun olmayan konsantrasyonda sabit tutulup Ac-CoA’nın CoA için inhibisyonu incelendiğinde Ac-CoA’nın CoA için yarışmalı inhibitör olduğu görüldü (Şekil 4.14). Fakat, Ac-Pi’nin doygun konsantrasyonunda Ac-CoA’nın CoA için herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı görüldü.

Ürün inhibisyonu çalışmalarının sonuçları özet olarak Tablo 4.7’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre fosfat, doygun ve doygun olmayan CoA konsantrasyonlarında Ac-Pi için yarışmalı inhibitördür. Buna karşın Pi, doygun olmayan Ac-Pi konsantrasyonunda CoA için yarışmalı inhibitörken, doygun Ac-Pi konsantrasyonunda yarışmasız inhibitör olduğu belirlenmiştir. Ac-CoA, doygun olmayan CoA konsantrasyonunda Ac-Pi için yarışmalı inhibitörken, doygun CoA konsantrasyonunda inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde Ac-

Pi'nin doygun olmayan konsantrasyonunda Ac-CoA, CoA için yarışmalı inhibitörken doygun Ac-Pi konsantrasyonunda inhibisyon etkisi görülmemiştir. Ayrıca her bir inhibitörün görünür inhibitör sabiti (K_i) hesaplanarak tabloya aktarılmıştır.

Tablo 4.7. *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ürün inhibisyonu sonuçları.

	Değişken	Sabit	İnhibisyon	Görünür K_i
İnhibitör	Substrat	Substrat	Türü	(mM)
Fosfat	Asetil-Pi	sat.CoA	Yarışmalı	12,0
Fosfat	Asetil-Pi	subsat.CoA	Yarışmalı	8,6
Fosfat	CoA	sat. Asetil-Pi	Yarışmasız	-
Fosfat	CoA	subsat.Asetil-Pi	Yarışmalı	8,2
Asetil-CoA	Asetil-Pi	sat.CoA	Yarışmasız	-
Asetil-CoA	Asetil-Pi	subsat.CoA	Yarışmalı	0,421
Asetil-CoA	CoA	sat. Asetil-Pi	İnhibisyon yok	-
Asetil-CoA	CoA	subsat.Asetil-Pi	Yarışmalı	0,321

Sat. doygun konsantrasyon (K_m değerinin yaklaşık 3-4 katı), subsat. doygun olmayan konsantrasyon (K_m değerinin yaklaşık yarısı).

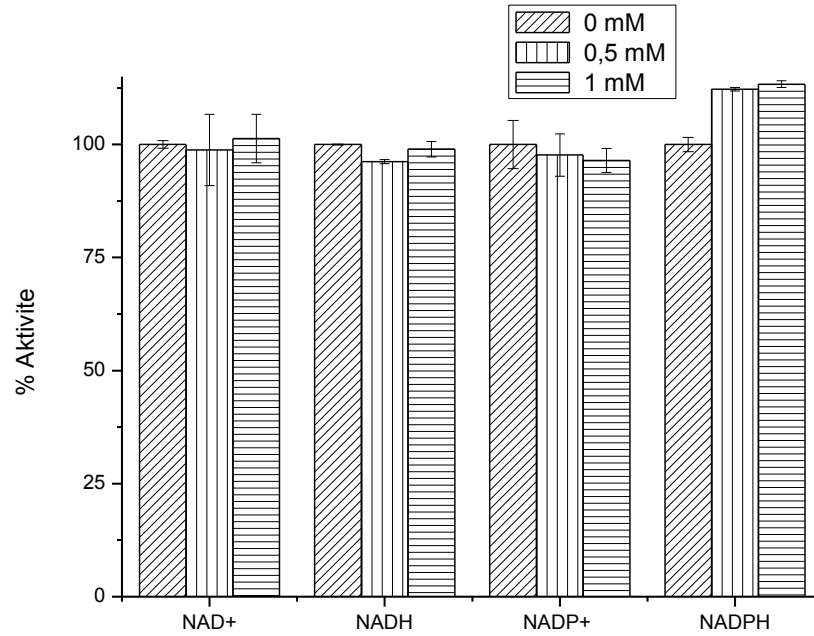
4.3. İleri ve Geri Reaksiyona Metabolitlerin Etkisi

Hücrelerin enerji düzeyi ATP ve NADH varlığıyla ilişkilidir. ATP ve NADH'in fazla olması hücrenin yeterince enerjiye sahip olduğunun bir göstergesidir. Yüksek ATP ve NADH konsantrasyonu enerji metabolizmasında görevli olan

enzimlerin inhibisyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar farklı mikroorganizmalardan elde edilen PtaI sınıfı enzim aktivitelerinin ATP tarafından inhibe edilirken NADH'in aktiviteye etkisi olmadığı belirtilmiştir. Bu amaçla PtaI sınıfı enzimi olan *S.saprophyticus* Pta aktivitesine ATP, NADH, pirüvat ve α -ketoglutarat gibi metabolitlerin etkisini inceledik.

4.3.1. İleri Reaksiyona NAD^+ , NADH, NADP^+ , NADPH Etkisi

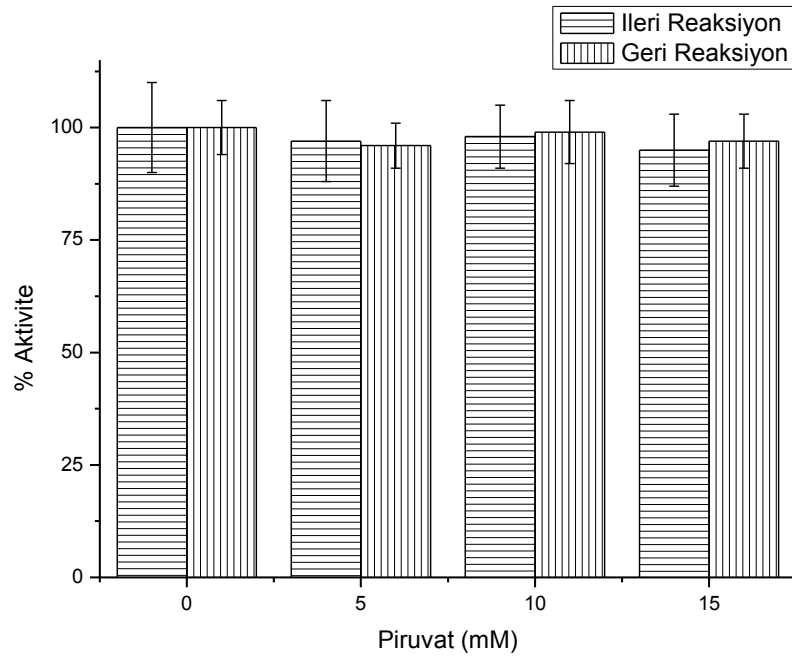
Substrat konsantrasyonu K_m civarında tutup, farklı metabolit (NAD^+ , NADH, NADP^+ ve NADPH) konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Şekil 4.15'ten görüldüğü gibi bu metabolitlerin Pta aktivitesine kayda değer bir etkisinin olmadığı görüldü.



Şekil 4.15. NAD^+ , NADH, NADP^+ ve NADPH'in *S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesine etkisi. CoA (100 μM) ve Ac-Pi (500 μM) konsantrasyonu K_m civarında tutularak, 0, 0,5 ve 1 mM NAD^+ , NADH, NADP^+ ve NADPH'in Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonuna etkisi incelendi. Diğer deney şartları bölüm 3.2.5.1'de verilmiştir.

4.3.2. İleri ve Geri Reaksiyona Pirüvat, α -Ketoglutarat ve ATP Etkisi

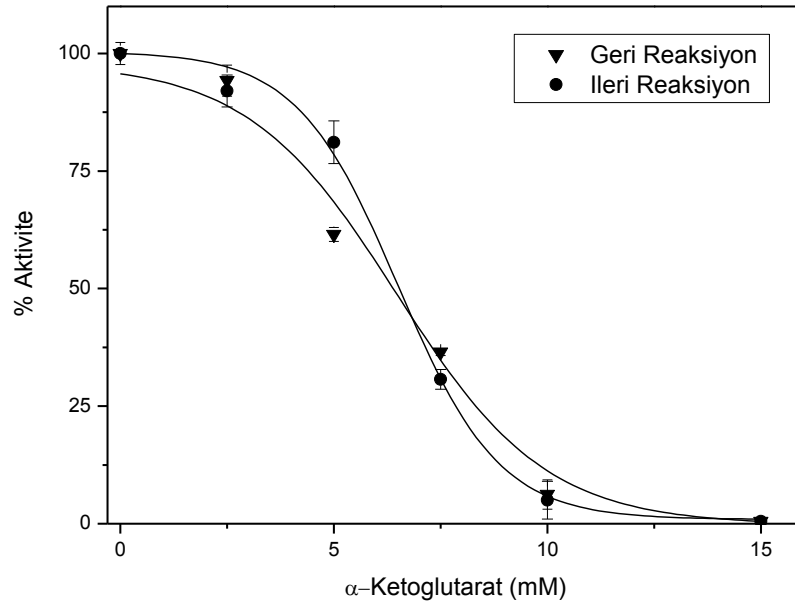
Pirüvatın dört farklı konsantrasyonlarında *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyona etkisi, CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları K_m civarında tutularak incelendi. Pirüvatın Pta'nın katalizlediği geri reaksiyona etkisi ise Ac-CoA ve Pi konsantrasyonu K_m civarında, DTNB konsantrasyonu 0,2 mM'da sabit tutularak incelendi. asyonlarında *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyona Pirüvatın herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Pirüvat'ın *S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup pirüvat konsantrasyonu 5 mM, 10 mM ve 15 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Geri reaksiyon için ise Ac-CoA 125 μ M, Pi 5 mM ve DTNB 0,2 mM'da sabit tutuldu. Diğer deney şartları bölüm 3.2.5.2'de verildiği gibidir.

α -Ketoglutarat'ın altı farklı konsantrasyonlarında Pta aktivitesine etkisi incelendi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları K_m civarında

tutularak incelendi. α -Ketoglutarat'ın Pta'nın katalizlediği geri reaksiyona etkisi ise Ac-CoA ve Pi konsantrasyonu K_m civarında, DTNB konsantrasyonu 0,2 mM'da sabit tutularak incelendi. α -Ketoglutarat'ın Pta aktivitesini hem ileri reaksiyonda hem de geri reaksiyonda inhibe ettiği görüldü. Ayrıca α -ketoglutarat inhibisyonunun sigmoidal olduğu görüldü (Şekil 4.17).

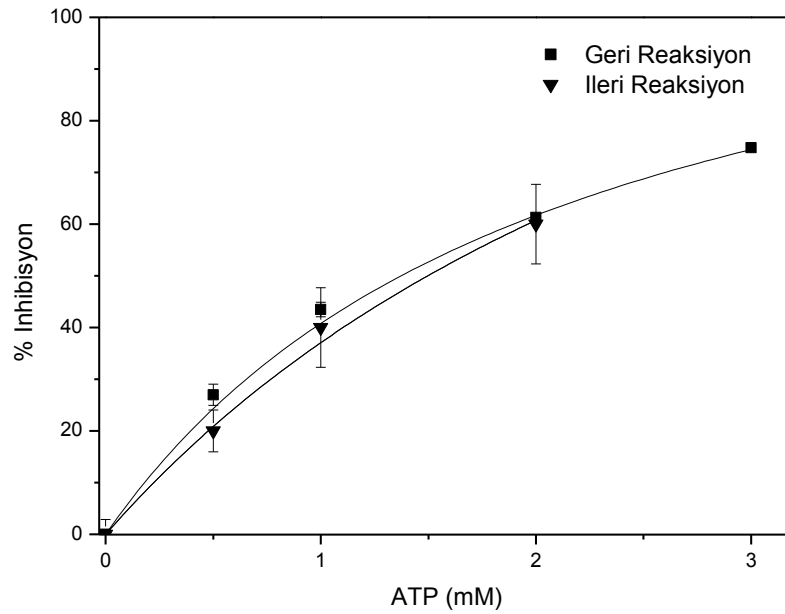


Şekil 4.17. α -Ketoglutarat'ın *S. saprophyticus* Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup α -ketoglutarat konsantrasyonu 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM ve 15 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Geri reaksiyon için ise Ac-CoA 125 μ M, Pi 5 mM ve DTNB 0,2 mM'da sabit tutuldu. Diğer deney şartları bölüm 3.2.5.2'de verilmiştir.

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi 15 mM α -ketoglutarat varlığında *S.saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri ve geri reaksiyonu % 100 inhibe ettiği görüldü.

ATP'nin beş farklı konsantrasyonlarında *S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesine etkisi incelendi İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları K_m civarında

tutularak incelendi. ATP'nin Pta'nın katalizlediği geri reaksiyona etkisi ise Ac-CoA ve Pi konsantrasyonu K_m civarında, DTNB konsantrasyonu 0,2 mM'da sabit tutularak incelendi. ATP'nin inhibisyon etkisinin hiperbolik özellik gösterdiği görüldü (Şekil 4.18). 2 mM ATP'nin Pta aktivitesini yaklaşık % 60 inhibe ettiği görüldü. 3 mM ATP varlığında OD ölçüm yapılamayacak kadar yüksek (2,5'den büyük) olduğundan ölçüm yapılamadı.

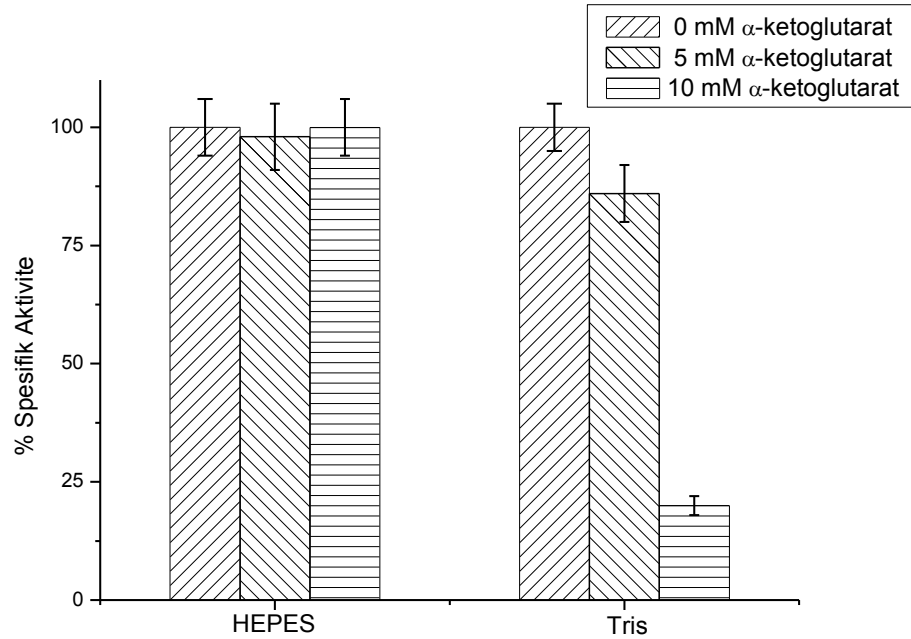


Şekil 4.18. ATP'nin *S. saprophyticus* Pta aktivitesine etkisi. İleri reaksiyon için CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 µM ve 500 µM'da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0,5 mM, 1 mM, 2 mM ve 3 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Geri reaksiyon için ise Ac-CoA 125 µM, Pi 5 mM ve DTNB 0,2 mM'da sabit tutuldu. Diğer deney şartları bölüm 3.2.5.2'de verilmiştir.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi ATP'nin *S. saprophyticus* Pta aktivitesini hem ileri reaksiyonda hem de geri reaksiyonda inhibe ettiği görüldü.

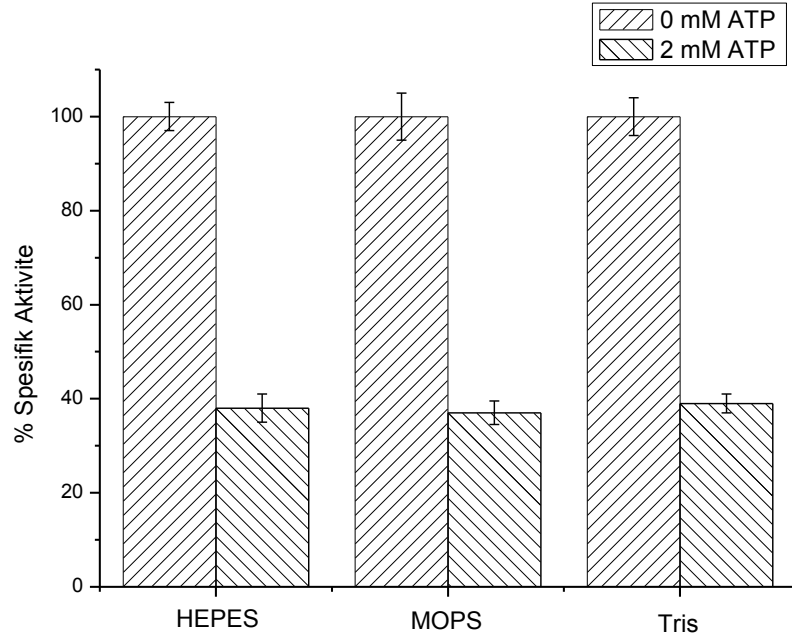
4.5. ATP ve α -Ketoglutarat İnhibisyonuna Tamponların Etkisi

S. saprophyticus Pta'nın inhibitörü olan α -ketoglutarat'ın Tris (pH 7,5) ve HEPES (pH 7,5), ATP'nin Tris, HEPES ve MOPS (pH 7,5) tamponlarında ileri reaksiyona etkileri incelendi. α -Ketoglutarat'ın farklı konsantrasyonlarının CoA ve Ac-Pi konsantrasyonunu K_m civarında sabit tutarak *S. saprophyticus* Pta aktivitesine etkisi HEPES ve Tris tamponları kullanılarak incelendi. α -Ketoglutarat'ın HEPES tamponu kullanıldığında *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyona herhangi bir etkisinin olmadığı görülürken, Tris tamponu kullanıldığında inhibisyon gözlenmiştir. Tris tamponu varlığında 10 mM α -ketoglutarat'ın *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu yaklaşık % 80 inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. α -Ketoglutarat'ın *S. saprophyticus* Pta aktivitesine HEPES ve Tris ortamında etkisi. HEPES ve Tris konsantrasyonu 50 mM olarak ayarlandı (pH 7,5). CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup α -ketoglutarat konsantrasyonu 0 mM, 5 mM ve 10 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Diğer deney şartları bölüm 3.2.6'da verilmiştir.

ATP'nin farklı konsantrasyonlarının CoA ve Ac-Pi konsantrasyonunu K_m civarında sabit tutarak *S. saprophyticus* Pta aktivitesine etkisi HEPES, MOPS ve Tris tamponları kullanılarak incelendi. ATP'nin her üç tampon ortamında da *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.20).



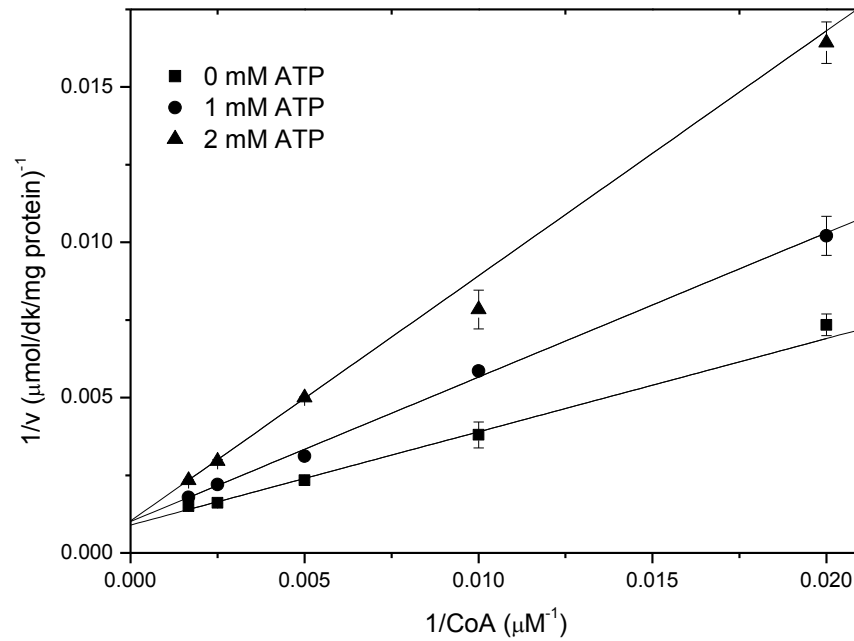
Şekil 4.20. ATP'nin *S. saprophyticus* Pta aktivitesine HEPES, MOPS ve Tris ortamında etkisi. HEPES, MOPS ve Tris konsantrasyonu 50 mM olarak ayarlandı (pH 7,5). CoA ve Ac-Pi konsantrasyonları sırasıyla 100 μ M ve 500 μ M'da sabit tutulup ATP konsantrasyonu 0 mM ve 2 mM olarak değiştirilerek reaksiyon takip edildi. Diğer deney şartları bölüm 3.2.6'da verilmiştir.

2 mM ATP'nin *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonu her üç tampon ortamında da yaklaşık % 62 inhibe ettiği görüldü (Şekil 4.20).

4.5. ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

4.5.1. CoA İçin ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

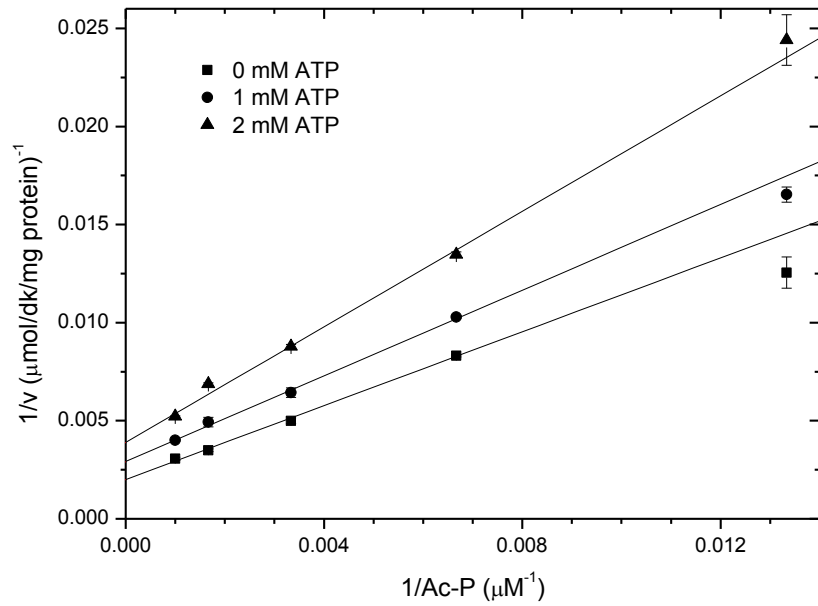
ATP'nin CoA için inhibitör türünün belirlenmesi için Ac-Pi'ı tek konsantrasyonda, ATP'yi üç farklı konsantrasyonda sabit tutup CoA konsantrasyonunu değiştirildi. Veriler Lineweaver-Burk grafiğine aktarılıp lineer fit yapıldı. Lineer fit sonucunda elde edilen doğruların y-ekseninde tek bir noktada kesiştiği görüldü. Buradan ATP'nin CoA için yarışmalı inhibitör olduğu belirlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. ATP'nin CoA için inhibitör türünün belirlenmesi. Ac-Pi konsantrasyonları 500 μM'da sabit tutulup CoA konsantrasyonunu değiştirerek ölçüm yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.8.1'de verilmiştir.

4.5.2. Ac-Pi için ATP'nin İnhibitör Türünün Belirlenmesi

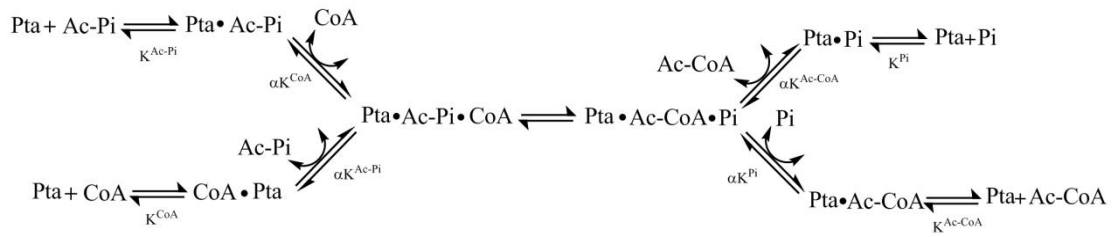
Benzer şekilde ATP'nin Ac-Pi için inhibitör türünün belirlenmesi için CoA'yı tek konsantrasyonda, ATP'yi üç farklı konsantrasyonda sabit tutup Ac-Pi konsantrasyonunu değiştirildi. Veriler Lineweaver-Burk grafiğine aktarılıp lineer fit yapıldı. Lineer fit sonucunda elde edilen doğruların y-ekseninde tek bir noktada kesişmediği görüldü. Buradan ATP'nin Ac-Pi için yarışmsız inhibitör olduğu belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. ATP'nin Ac-Pi için inhibitör türünün belirlenmesi. CoA konsantrasyonları 500 μM'da sabit tutulup Ac-Pi konsantrasyonunu değiştirerek ölçüm yapıldı. Diğer deney şartları bölüm 3.2.8.2'de verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında daha önce *S. saprophyticus*'tan klonlanan Pta'nın kinetik mekanizması incelendi. Kinetik mekanizmayı belirlemek için başlangıç hızı ölçümleri ve ürün inhibisyonu deneyleri yapıldı. Başlangıç hızı ve ürün inhibisyonu deneyleri sonucunda kinetik mekanizmanın üçlü kompleks mekanizmalarından rastgele iki substrat-iki ürün kinetik mekanizmasıyla gerçekleştiği görüldü (Şekil 5.1). Bu sonuçlar *S. saprophyticus*'tan elde edilen Pta'nın katalizlediği reaksiyonun kinetik mekanizmasının daha önceden belirtilen *M. thermophila*, *C. kluyveri* ve *V. alcalescens*'den saflaştırılan recombinant Pta'nın katalizlediği reaksiyonun mekanizmasıyla uyumlu olduğunu göstermektedir. [Lawrence ve Ferry, 2005]. Şekil 5.1'de görüldüğü gibi enzime hangi substrat önce bağlanırsa bağlansın reaksiyon üçlü kompleks oluşumuna ilerlemekte ve üçlü kompleks oluşuktan sonra ürün oluşumu gerçekleşmektedir.



Şekil 5.1. *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği reaksiyonun ilerleme şeması.

Başlangıç hızları ölçümü sonuçları kullanılarak çizilen ikincil grafiklerden, rekombinant *S. saprophyticus* Pta'nın katalizlediği ileri reaksiyonda substratlardan birinin enzime bağlanması diğer substratın enzime bağlanmasında inhibisyon etkisi yaptığı görülürken ($\alpha \approx 4$), geri reaksiyonda substratların birinin enzime bağlanması diğer substratın enzime bağlanmasını etkilemediği görüldü. Ayrıca, CoA ve Ac-Pi'nin görünür Michaelis sabitleri diğer substratın artan konsantrasyonuyla yaklaşık dört kat arttığı görüldü. Bu sonuçlar Helkin ve Abeles'in *C. kluyveri*'den elde ettikleri Pta'nın sonuçlarıyla uyum içindedir [Helkin and Abeles, 1976].

Bu tez çalışmasında ayrıca, bazı metalolitlerin *S. saprophyticus* Pta aktivitesine etkisi incelendi ve Pta aktivitesinin ATP tarafından etkilenirken NADH ve pirüvattan etkilenmediği görüldü. Bu yönüyle *S. saprophyticus* Pta'nın *B. subtilis* ve *V. alcalescens*'ten elde edilen Pta ile benzer özellikte olduğu görüldü [Rado and Hoch, 1973; Pelroy and Whiteley, 1972]. Yaptığımız çalışma sonucunda ATP'nin *S. saprophyticus* Pta inhibisyonunun CoA için yarışmalı iken Ac-Pi için yarışmasız inhibitör olduğu görüldü. ATP'nin benzer etkisi daha önce *V. alcalescens* Pta için belirtilirken, *B. subtilis* Pta için belirtilmemiştir [Rado and Hoch, 1973].

Şimdiye kadar, sadece *E. coli* ve *S. enterica*'dan elde edilen PtaII'lerin NADH, ATP ve pirüvat tarafından düzenlendiği belirtilmiştir [Brinsmade and Escalante, 2007; Compos et al., 2010]. Bu çalışmada ilk kez TCA döngüsünün hız belirleyici enzimlerinden biri olan α -ketoglutarat dehidrogenaz kompleksinin (α -KGDC) substratı olan α -ketoglutarat'ın *S. saprophyticus* Pta aktivitesini ileri ve geri reaksiyonda allosterik olarak inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda α -ketoglutarat inhibisyonunun sigmoidal özellik gösterirken, ATP inhibisyonunun hiperbolik özellik gösterdiği görüldü.

KAYNAKLAR

Aksoy İlknur. (2010). “*Staphylococcus saprophyticus* bakterisinden Fosfotransasetilaz (Pta) geninden klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu.” Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kocaeli.

Ko, Y. F., Bentley, W. E. and Weigand, W. A. (1995). “The effects of cellular energetics on foreign protein production.” *Appl. Biochem. Biohecnol.* **50**: 145-159

Anfora AT, Halladin DK, Haugen BJ & Wech RA (2008). “Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 is adapted to acetogenic growth but does not require acetate during murineurinary tract infection.” *Infect Immun.* **76**, 5760-5767.

Bang, I., B. Kim, J. Foster, and Y. Park. (2000). "OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *J. Bacteriol.* **182**: 2245-2252.

Bang, I. S., J. P. Audia, Y. K. Park, and J. W. Foster. (2002). "Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response." *Mol. Microbiol.* **44**: 1235–1250.

Brinsmade SR & Escalante-Semerena JC (2004). “The *eutD* gene of *Salmonella enterica* encodes a protein with phosphotransacetylase enzyme activity”. *J. Bacteriol.* **186**, 1890-1892.

Brinsmade SR & Escalante-Semerena JC (2007). “In vivo and in vitro analyses of single-amino acid variants of the *Salmonella enterica* phosphotransacetylase enzyme provide insights into the function of its N-terminal domain.” *J. Bio.l Chem.* **282**, 12629-12640.

Campos-Bermudez VA, Bologna FP, Andreo CS & Drincovich MF (2010). "Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation." *FEBS J.* **277**, 11957-1966.

Chang, D.-E., S. Shin, J.-S. Rhee, and J.-G. Pan. (1999). "Acetate metabolism in a pta mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl-CoA flux for the growth and survival." *J. Bacteriol.* **181**: 6656–6663.

Copeland, RA. (2000). "Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis, pp. 352-354. 2nd. Wiley & Sons, Inc. New York.

Farmer, W. R., and J. C. Liao. (1997). "Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3205–3210.

Federico P. Bologna, Valeria A. Campos-Bermudez, Damián D. Saavedra, Carlos S. Andreo, and María F. Drincovich (2010). "Characterization of *Escherichia coli* EutD: a Phosphotransacetylase of the Ethanolamine Operon." *J. Microbiol.* **48**, 629-636

Iyer PP, Lawrence SH, Luther KB, Rajashankar KR, Yennawar HP, Ferry JG & Schindelin H (2004). "Crystal structure of phosphotransacetylase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila*." *J. Structure.* **12**, 559–567.

Jack Henkin and Robert H. Abeles. (1976). "Evidence against an Acyl-Enzyme Intermediate in the Reaction Catalyzed by Clostridial Phosphotransacetylase." *Biochem.* **15**: 3472-3479.

Kuroda M., Yamashita, A., Hirakawa, H. et al. (13 co-authors). (2005). "Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 13272-13277.

Laemmli UK (August 1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*. **227** (5259): 680–685.

Latimer, M. T., and J. G. Ferry. (1993). "Cloning, sequence analysis, and hyperexpression of the genes encoding phosphotransacetylase and acetatekinase from *Methanosarcina thermophila*." *J. Bacteriol.* **175**: 6822–6829.

Lawrence, S. H., Luther, K. B., Schindelin, H. and Ferry, J. G. (2005). "Structural and functional studies suggest a catalysis mechanism for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*." *J. Bacteriol.* **188**: 1143-1154.

Lawrence S.H and James G. Ferry(2005). "Steady State Kinetic Analysis of Phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*." *J.Bakteriol.* **188**: 1155–1158.

Lewendon, A., I. A. Murray, W. V. Shaw, M. R. Gibbs, and A. G. Leslie. (1990). "Evidence for transition-state stabilization by serine-148 in the catalytic mechanism of chloramphenicol acetyltransferase." *Biochem.* **29**: 2075-2080.

Lundie L.L Jr & Ferry JG (1989). "Activation of Acetate by *Methanosarcina thermophila*. Purification and Characterization of Phosphotransacetylase." *J. Biol Chem.* **264**, 18392-18396.

Majewski, R. A., and M. M. Domach. (1990). "Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*." *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 732–738.

Matsuyama, A., H. Yamamoto-Otake, J. Hewitt, R. T. A. MacGillivray, and E. Nakano. (1994). " Nucleotide sequence of the phosphotransacetylase gene of *Escherichia coli* strain K12. ." *Biochim. Biophys. Acta.* **1219**: 559–562.

Rado TA & Hoch JA (1973). "Phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis*: Purification and physiological studies." *Biochim. Biophys Acta.* **321**, 114-125.

- Rose, I. A., M. Grunsberg-Manago, S. R. Korey, and S. Ochoa. (1954). "Enzymatic phosphorylation of acetate." *J. Biol. Chem.* **211**: 737–756.
- Palmer, T. (1981) "Understanding Enzymes." pp. 170-189, Wiley, New York,.
- Pelroy, R. A., and H. R. Whiteley. (1972). "Kinetic properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescens*." *J. Bacteriol.* **111**:47–55.
- Presecan-Siedel, E., Galinier A, Longin R, Deutscher J, Danchin A, Glaser P, & Martin-Verstraete I (1999). "Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **181**, 6889–6897.
- Segel, I. H. (1975). "Enzyme Kinetics." Wiley, New York, pp. 506-883.
- Shin, BS, Choi SK, and Park SH (1999). "Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene." *J. Biochem.* **126**, 333–339.
- Stadtman, E. R. 1952. "The purification and properties of phosphotransacetylase." *J. Biol. Chem.* **196**:527–534.
- Thomas, A. R and Hoch, J. A. (1973). "Phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis*: purification and physiological studies." *Biochimica et Biophysica Acta.* **321**: 114-125.
- Van Dyk, T. K., and R. A. LaRossa. (1987). " Involvement of ack-pta operon products in alpha-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*." *Mol. Gen. Genet.* **207**: 435–440.
- Varma, A., and B. O. Paulson. (1994). "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. ." *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3724–3731.

Walle, M., and J. Shiloach. (1998). "Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation." *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 71–78.

Wanner, B. L. (1992). "Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria?" *EMBO J.* **11**: 265–277.

Whiteley, H. R. and Pelroy, R. A. (1971). "Purification and properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescen.*" *J. Biol. Chem.* **247**: 1911-1917.

Wu, D., L. Govindasamy, W. Lian, Y. Gu, T. Kukar, M. Agbandje-McKenna, and R. McKenna. (2003). "Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer." *J. Biol. Chem.* **278**: 13159- 13165.

Wolfe, A. J. (2005). "The Acetate Switch." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 12–50.

Xu, Q. S., Jancerik, J., Lou, Y., Kuznetsova, K., Yakunin, A. F., Yokota, H., Adams, P., Kim, R., and Kim, S. H. (2005). "Crystal structures of a phosphotransacetylase from *B. subtilis* and its complex with acetyl-phosphate." *J. Struct. Funct. Genomics.* **6**: 269-279.

EK 1

1. Besiyeri ve Hazırlanması

1.1. LB (Luria-Bertani) broth besiyeri

Pepton (10 g/L), maya ekstrakt (5 g/L), NaCl (5 g/L) distile su içerisinde çözülerek pH 7'ye ayarlanır ve 1 L'ye tamamlanır. Otoklavda 121°C'ta 15 dakika sterilize edilir.

2.1. SDS-PAGE'de Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1. % 10'luk APS Çözeltisi

Amonyum persülfat (0,1 g) tartılarak 1 mL saf suda çözülür. Çözelti taze hazırlanmalıdır.

2.2. % 10'luk SDS Çözeltisi

Sodyum dodesil sülfat (5 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve hacim 50 mL'ye tamamlanır.

2.3. % 30'luk Akrilamid Çözeltisi

Akrilamid (30 g) ve bis-akrilamid (0,8 g) tartılarak ve hacim 100 mL'ye tamamlanır.

2.4. 1.5 M Tris Tampon (pH 8)

Tris (36,34 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH 8'e ayarlanır. Destile suyla hacim 200 mL'ye tamamlanır.

2.5. 1 M Tris Tampon (pH 6,8)

Tris (1,11 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür ve pH'sı 6.8'e ayarlanır. Destile suyla hacim 100 mL'ye tamamlanır.

2.6. SDS Yürütme Tamponu

Tris (3,03 g), glisin (14,04 g) ve SDS (1 g) tartılarak bir miktar saf suda çözülür, hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

2.7. 6X Örnek Yükleme Tamponu

Bromophenol blue (6 mg), Tris tampon (0,9 mL, 1 M, pH 6,8), gliserol (3,75 mL), SDS (4,5 mL, % 10 (wt/vol)), destile su (2,1 mL) karıştırılarak hazırlanır. Hazırlanan çözeltiden 375 µL tüplere aktarılır. Kullanılacağı zaman mikrotüpe, 125 µL β-merkaptoetanol ilave edilir.

2.8. Jel Boyama Çözeltisi

250 mL metanol, 50 mL asetik asit ve 0,5g Coomassie brilliant blue destile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

3. Lizozim Çözeltisi

10 mg lizozim 1mL 50mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda hazırlanır.

4. 100 mM IPTG Çözeltisi:

0,12 g IPTG steril su ile 5 mL'ye tamamlanır. -20°Cde saklanır.

ÖZGEÇMİŞ

Hamdi YILDIZ, 1987 yılında Ordu’da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Ordu’da tamamladı. Lise eğitimimi 2000–2003 yılları arasında İzmit Atılım Lisesinde tamamladıktan sonra 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümüne kaydoldu ve 2008 Haziran ayında lisans eğitimini tamamladı. 2009 yılında Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında tezli yüksek lisans öğrenimine başladı.