



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

1997-442

**THERMOPLASMA ACIDOPHILUM SİTRAT SENTAZ
ENZİMİNİN THERMOSTABİLİTESİNDEN SORUMLU
MEKANİZMALARIN GENETİK MÜHENDİSLİĞİ
TEKNİKLERİNDEN YARARLANILARAK
BELİRLENMESİ**

PROJE NO: TBAG-1501

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

1997-442

**THERMOPLASMA ACIDOPHILUM SİTRAT SENTAZ
ENZİMİNİN THERMOSTABİLİTESİNDEN SORUMLU
MEKANİZMALARIN GENETİK MÜHENDİSLİĞİ
TEKNİKLERİNDEN YARARLANıLARAK
BELİRLENMESİ**

PROJE NO: TBAG-1501

ODTÜ Biyoloji Bl

S. 54

**Prof. Dr. SEMRA KOCABIYIK
İPEK ERDURAN**

R. 49

**ARALIK 1998
ANKARA**

İçindekiler:

Özet.....	1
Summary.....	2
Giriş.....	3
Sekil 3. Nitrofobik mühendislikteki IgG mutajenik oligonükleotidler.....	14
2. Materyal ve Metodlar.....	11
2.1. Bakteri Suşları.....	11
2.2. Urasil İçeren ssDNA'nın Hazırlanması.....	11
2.3. Mutajenik Oligonükleotidlerin Dizaynı.....	13
2.4. Bölgeye Özel Mutasyonlar sentaz geninin Tp. Sitrat Sentaz Enzimlerinin.....	13
2.5. Nükleik Asit Dizi Analizi.....	17
2.6. Mutant ve Mutant olmayan Rekombinat <i>Tp.</i> Sitrat Sentaz Enzimlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	18
2.7. Sitrat Sentaz Enziminin Aktivite Tayini ve Kinetik Parametrelerinin Ölçülmesi.....	18
2.8. Termostabilite Çalışmaları.....	19
Sekil 11. Mutant proteinlerin SDS-PAGE'ye profilleri.....	26
3. Sonuçlar.....	20
3.1. Monomer-monomer Etkileşim Yüzeyi ile İlgili Mutasyonlar.....	20
3.1.1. Bölgeye Özel Mutasyon Yöntemi ile Mutant <i>Tp.</i> Sitrat Sentaz Enzim Genlerinin Oluşturulması.....	20
3.1.2. Mutant <i>Tp.</i> Sitrat Sentaz Genlerinin Nükleik Asit Dizi Analizleri.....	20
3.1.3. A97S, A104T, G196V, G209A Mutant ve Mutant olmayan Sitrat Sentaz Enzimlerinin Izolasyonu ve Saflaştırılması	25
3.1.4. Kinetik Parametreler.....	35
3.1.5. Termostabilite analizleri.....	35
3.2. Enzimin İç Oyuklarının Doldurulması ile İlgili Mutasyonlar.....	47
Sekil 18.b. A104T mutant proteinin SDS-PAGE'ye profili.....	54
Tartışma.....	49
Sekil 18.b. A104T mutant proteinin SDS-PAGE'ye profili.....	57
Referanslar.....	51

Şekil Listesi: 97 9 mutant sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi için Lineweaver-Burk eğrisi.....16

Şekil 1. <i>Thermoplasma (Tp.) acidophilum</i> sitrat sentaz enziminin 3 boyutlu yapısunın şematik görüntüsü	18
Şekil 2. PBSK(2CS) rekombinant fazmit vektörünün haritası.....12	
Şekil 3. Hidrofobik interaksiyonlarla ilgili mutajenik oligonükleotidler.....14	
Şekil 4. <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminde iç oyukların doldurulması ile ilgili Ser343→Thr ve Thr346→Tyr mutasyonlarının pozisyonları.....15	
Şekil 5. Enzimin iç oyukları ile ilgili mutajenik oligonükleotidler.....16	
Şekil 6. Nükleik asit dizi analizinde kullanılan primerler.....17	
Şekil 7. Rekombinant <i>Tp.</i> sitrat sentaz genini taşıyan pBSK(2CS) fazmitinin kalıp DNA'sının izolasyonu.....21	
Şekil 8. Bölgeye özel mutasyon22	
Şekil 9. Nükleik asit dizi analizi için mutasyondan sonra rekombinant kolonilerden fazmit DNA izolasyonu.....23	
Şekil 10. Mutasyonların nükleik asit dizi analizi ile belirlenmesi.....24	
Şekil 11. Mutant proteinlerin SDS-PAGE'deki profilleri.....26	
Şekil 12. Moleküler kütle kalibrasyon eğrisi.....27	
Şekil 13. A97S mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi ile saflaştırılması.....30	
Şekil 14. A104T mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi ile saflaştırılması	31
Şekil 15. G196V mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi ile saflaştırılması	32
Şekil 16. G209A mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi ile saflaştırılması	33
Şekil 17. Mutant olmayan <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin afinité kromatografisi ile saflaştırılması	34
Şekil 18.a. A97S mutant proteininin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi.....36	
Şekil 18.b. A104T mutant proteininin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi.....37	
Şekil 18.c. G209A mutant proteininin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi.....38	

Şekil 19.a. A97 S mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi.....	39
Şekil 19.b. A104T mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi.....	40
Şekil 19.c. G209A mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi.....	41
Şekil 20.a. A97S Mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi.....	43
Şekil 20.b. A104T Mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi.....	44
Şekil 20.c. G209A Mutant <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi.....	45
Şekil 20.d. Mutant olmayan <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi.....	46
Şekil 21. Mutant ve mutant olmayan <i>Tp.</i> sitrat sentaz enzimlerinin Arrhenius eğrileri.....	48

Tablo Listesi:

Tablo 1: A97S mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu.....	28
Tablo 2: A104T mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu.....	28
Tablo 3: G196Vmutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu.....	29
Tablo 4: G209A mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu.....	29
Tablo 5: Mutant olmayan sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu.....	29
Tablo 6: Mutant ve mutant olmayan <i>Tp.</i> sitrat sentaz enzimlerinin termostabilite ve katalitik özellikleri.....	42

Önsöz:

Termofilik enzimlerin stabil olmalarının sağladığı birçok avantaj nedeniyle biyoteknolojik uygulamaları giderek yaygınlaşmaktadır. Diğer taraftan bu enzimler, termostabilitenin moleküller mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yürütülen temel araştırmalar için de çok elverişli model sistemler olarak dikkat çekmektedir. Bu projede proteinlerde ısıya dayanıklılığın moleküller mekanizmasını araştırmak üzere bir termoasidofilik Archaeon olan *Thermoplasma (Tp.) acidophilum*'un sitrat sentaz enzimini model olarak seçtik. Bu amaçla izlediğimiz yöntem mezofilik ve termofilik homolog sitrat sentaz enzimlerinin kristal yapılarının karşılaştırması ile termostabiliteden sorumlu olabilecek interaksiyonların tanımlanması ve bu olasılıkların bölgeye özel mutasyon metodu ile sınanması olmuştur. Değişikliklerin Elde ettiğimiz sonuçlar, *Tp.* sitrat sentaz enziminin dimer interfazındaki interaksiyonu güçlendirecek amino asit değişiklerinin termostabiliteyi arttırmada etkin bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Bu genel prensipten hareketle mezofilik proteinlerin endüstriyel prosesler için daha elverişli hale getirilmek üzere manipülasyonu ve stabilitesinin artırılması mümkün olabilecektir. Ayaklarının hecmini azaltmak üzere 2 Söz konusu çalışma, elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, evrensel boyutta, bu alanda yapılan araştırmalara katkıda bulunduğu gibi, ülkemizde, rekombinant DNA teknolojisinin protein mühendisliği alanında uygulamasının da ilk örneğidir. Bu proje için TBAG 1501, AFP-96-01-08-10 ve AFP-98-06-02-04 No'lu projeler kapsamında sağlanan parasal destek dolayısı ile TÜBİTAK ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Prof. Dr. Semra Kocabiyik

Proje Yürüttüsü

Özet:

Proteinlerde yüksek sıcaklığa dayanıklılığın moleküler mekanizmasının araştırıldığı bu projede bir termostabil model sistem olarak *Thermoplasma (Tp.) acidophilum*'dan elde edilen sitrat sentaz enzimi kullanılmıştır. Dimer interfazındaki hidrofobik interaksiyonların etkisini incelemek üzere bölgeye özel mutasyon yöntemi kullanılarak tek amino asit değişikliği yapılarak 4 mutant enzim oluşturulmuştur: Ala97Ser, Ala104Thr, Gly209Ala ve Gly196Val. Bunlardan ilk üç mutasyon *Tp.* sitrat sentaz enziminin termostabilitesini artttirdiği gibi, aynı zamanda da katalitik özelliklerini (K_m , V_{max} , spesifik aktivite) iyileştirmiştir. Termostabilitesi en yüksek olan mutant enzim G209A olup, 85°C'de inaktivasyon yarı ömrü 57 dakikadır. Bu sonuçlar, interfaz hidrofobisitesini arttıran ya da azaltan amino asit değişikliklerinin *Tp.* sitrat sentaz enziminin termostabilitesinin arttırabileceğini göstermiştir. Böylece 70°C'nin üzerinde, proteinlerin sarılmamış formlarının entropisini etkileyen amino asit değişikliklerinin protein termostabilizasyonunda kritik bir faktör olmadığı görülmüştür.

Diğer taraftan *Tp.* sitrat sentaz enziminin iç oyuklarının hacmini azaltmak üzere 2 mutasyon yapılmıştır: S343T ve T346Y. Ancak söz konusu mutasyonlar enzimin termal stabilitesini önemli ölçüde azaltırken, aktivitesini de büyük ölçüde düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Thermoplasma acidophilum*, Sitrat Sentaz, Termostabilite

Summary:

In this project citrate synthase from *Thermoplasma (Tp.) acidophilum* has been used as a thermostable model system to study the molecular mechanisms of resistance to high temperature in proteins. To investigate the effects of hydrophobic interactions in the dimer interface, four mutant enzymes, A97S, A104T, G209A and G196V, were constructed with single amino acid substitutions by site-specific mutagenesis. First 3 mutations, enhanced the thermostability of *Tp.* citrate synthase, while improving its catalytic properties (K_m , V_{max} and specific activity). The highest thermostability was achieved by Gly209→Ala substitution, and the half-life of inactivation at 85°C was about 57 min. These results showed that amino acid substitutions increasing or decreasing interface hydrophobicity could further increase the thermostability of the *Tp.* citrate synthase. Thus, interface substitutions affecting the entropy of the unfolded state shouldn't be so critical in protein thermostabilization at temperatures above 70°C. *On the other hand, to reduce the volume of internal cavities in *Tp.* citrate synthase, we made two mutations: S343T and T346Y. However, these mutations significantly decreased the thermal stability of the enzyme with considerable loss in its activity.*

Key Words: Thermoplasma acidophilum, Citrate Synthase, Thermostability, amino acid substitution, hydrophobic, surface porinum ve mikroöffnungen. Kavunmayaçının sıcaklık稳定性, amino asit değişiklikleri, iç boşluklar. Öte yandan, reaksiyonların yüksek sıcaklığındaki termal stabilitenin azaltılması için de iki mutasyon: S343T ve T346Y. Ancak, bu mutasyonlar enzimin termalstabiliyetini önemli ölçüde düşürdü.

Key Words: *Thermoplasma acidophilum, Citrate Synthase, Thermostability, amino acid substitution, hydrophobic, surface porinum ve mikroöffnungen. Kavunmayaçının sıcaklık稳定性, amino asit değişiklikleri, iç boşluklar. Öte yandan, reaksiyonların yüksek sıcaklığındaki termal stabilitenin azaltılması için de iki mutasyon: S343T ve T346Y. Ancak, bu mutasyonlar enzimin termalstabiliyetini önemli ölçüde düşürdü.*

Özet: Bu projede *Thermoplasma (Tp.) acidophilum* citrat sintazı, proteinlerin yüksek sıcaklıklarda direncini incelemek üzere bir model sistem olarak kullanılmıştır. Dimer arası界面でのydrofobik etkilerin etkisini araştırmak amacıyla, A97S, A104T, G209A ve G196V adlı dört mutant enzim üretilmiştir. İlk üç mutasyon, enzimin termalstabiliyetini artırdı ve katalitik özelliklerini de iyileştirdi (K_m , V_{max} ve özel aktivite). En yüksek termalstabiliyet, G209 → Ala değişikliğiyle elde edilmiştir ve 85°C'da devitalizasyon yarı ömrü 57 dakika civarındadır. Bu sonuçlar,界面 hidrofobikiteyi artırılarak veya azaltılarak enzimin termalstabiliyeti daha da artırılabilir olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, 70°C'ın üzerindeki sıcaklıklarda proteinlerin termalstabiliyetini artırmak için界面 entropisi etkileyen amino asit değişiklikleri çok kritik olmamaktadır. *İç boşlukları azaltmak amacıyla, S343T ve T346Y adlı iki mutasyon yapılmıştır. Ancak, bu mutasyonlar enzimin termalstabiliyetini önemli ölçüde düşürmüştür.*

1. Giriş:

Termostabil enzimler konusunda gerek biyoteknoloji alanında uygulamalarını geliştirmek, gerekse protein yapı/fonksiyon ilişkileri ile ilgili araştırmalarda kullanımlarını artırmak üzere birçok çalışma yürütülmektedir.

Son yıllarda optimum büyümeye sıcaklığı 113°C 'ye kadar çıkan çeşitli termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan birçok stabil enzim izole edilmiştir (Reeve, 1994). Bu mikroorganizmaların büyük bir grubu 'Archae' bakteriler olarak tanımlanmıştır. Ancak, bu mikroorganizmaların yüksek sıcaklık derecelerinde yaşamalarını devam ettirebilmeleri için gerekli özel biyokimyasal mekanizmalar hakkında bilgi çok azdır. Bu nedenle, termofilik organizmalardan elde edilen enzimlerin yapı-fonksiyon ilişkisinin incelenmesi, ekstrem sıcaklığa dayanıklılığın moleküller mekanizmasının aydınlatılabilmesi için gereklidir. Bu araştırmalardan elde edilecek bilgiler, proteinlerin yüksek sıcaklığın ötesinde, birçok endüstriyel proses için gerekli olan daha olumsuz çevre koşullarına uyumlu kılınması için *in vitro* manipulasyonuna yardımcı olacaktır. Birçok özgün özellikleri dolayısıyla termofilik enzimler endüstride yeni potansiyel kaynaklar olarak dikkati çekmektedirler (Hough and Danson, 1989; Lasa and Berenguer, 1993). Bu enzimler yüksek sıcaklığa olduğu kadar birçok kimyasal çözücülere de dayanıklıdır. Öte yandan, reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda yürütülebilmesi, reaksiyon hızını, difüzyon oranını ve çözünürlüğünü artıtırırken, viskoziteyi, yüzey gerilimini ve mikrobiyal kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Termal stabilité, aynı zamanda enzimlerin depolama ve raf ömrünü de artırmaktadır. Termofilik enzimlerin çeşitli parçalama reaksiyonlarında (örneğin, biyolojik deterjan yapımında, gıda sanayinde), sentetik proseslerde (örneğin, farmasötik imalinde) ve immobilize edilmiş hali ile biyosensör yapımında kullanımları söz konusudur. Yukarıdaki biyotransformasyon olaylarında en pahalı eleman enzim olup, proteinlerin termostabil olma özellikleri bu açıdan bir avantaj sağlamaktadır. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan termostabil enzimlere örnek olarak proteazlar, α -amilaz, hidrogenazlar, dehidrogenazlar, redoks proteinleri, ferrodoksine bağımlı oksidoredüktazlar ve DNA/RNA polimerazlar verilebilir (Lasa and Berenuer, 1993; Adams, 1993).

Termofilik enzimler ile mezofilik homologlarının amino asit dizi analizleri ve üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması sonucunda, protein stabilizasyonunda etkili olabilecek genel mekanizmaların ortaya çıkartılabilmesi mümkün görülmektedir. Menendez-Ariast and Argos (1989), mezofillerden termofillere gidildikçe amino asit diziliminde sıcaklığı bağılı değişimlerin bir kurallık dahilinde olduğunu öne sürmüştürlerdir. En çok değişikliğe uğrayan ilk 10 amino asit sıralandığında Lys→ Arg, Ser→ Ala, Gly→ Ala, Ser→ Thr ve Ile→ Val, değişiklikleri ilk sıralarda yer almaktadır. Argos kuralları olarak bilinen bu değişikliklerin termal stabiliteye katkısının heliks yapısının güçlenmesi ve hidrofobisitenin artması şeklinde olduğu ileri sürülmüştür (Jaenicke, 1996). Ancak amino asit dizi analizi sadece istatistiksel bilgi vermektedir ve tek başına termal stabilitet mekanizmasını belirleyici bir yöntem olamaz. Çünkü, dizi analizleri her ne kadar özel amino asit değişikliklerini gösterse de bu değişikliklerin protein yapısına olan yansımaları sadece karşılaştırmalı 3 boyutlu yapı analizi ve onunla birlikte kullanılacak bölgeye özel mutasyon yöntemi ile anlaşılabılır (Moriyama et al., 1995). Buna alternatif olarak, son yıllarda bilgisayar paket programları da mutasyon etkilerinin moleküller dinamiklerinin simülasyonu ve tahmininde yardımcı olmaktadır (Querol, et al., 1996).¹ Başka bir yöntem ise proteinin her üç boyutundaki 3 boyutlu yapı analizi işliğinde bölgeye özel mutasyon yönteminin kullanıldığı çalışmalar, spesifik amino asit yan gruplarının protein stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemekte yararlı olmuştur (Reeve, 1994; Daniel, 1996). Bu çalışmalarda, yapılan tek ya da birkaç amino asit değişikliğinin yol açtığı küçük yapısal farklılıkların bile stabiliteti değiştirdiği gösterilmiştir. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar, protein termostabilitesinin elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, gibi birden fazla kuvvetin toplam etkisinden kaynaklandığını ve böylece protein esnekliğinin azalmış olduğunu göstermiştir (Colacino and Crichton, 1997; Zeikus, 1996; Vogt et al., 1997).² etkili bir yöntem oluşturduğu önceden bilinmemektedir. Oyak et al.³ Protein stabilizasyon mekanizmaları hakkında bilgilerimizin çoğunuğu model enzimler ile yapılan çalışmalardan elde edilmektedir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı küçük, çözünebilir, monomerik yapıda enzimlerdir (lizozim ve ribonükleaz gibi) (Dill, 1990). Elde edilen sonuçlardan proteinin termal stabilitesini artırmak için yeterlik artırmak mümkün olmalıdır.

Termofilik enzimler ile mezofilik homologlarının amino asit dizi analizleri ve üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması sonucunda, protein stabilizasyonunda etkili olabilecek genel mekanizmaların ortaya çıkartılabilmesi mümkün görülmektedir. Menendez-Arias and Argos (1989), mezofillerden termofillere gidildikçe amino asit diziliminde sıcaklığa bağlı değişimlerin bir kural dahilinde olduğunu öne sürmüştür. En çok değişiklikle uğraşan ilk 10 amino asit sıralandığında Lys→ Arg, Ser→ Ala, Gly→ Ala, Ser→ Thr ve Ile→ Val, değişiklikleri ilk sıralarda yer almaktadır. Argos kuralları olarak bilinen bu değişikliklerin termal stabiliteye katkısının heliks yapısının güçlenmesi ve hidrofobisitenin artması şeklinde olduğu ileri sürülmüştür (Jaenicke, 1996). Ancak amino asit dizi analizi sadece istatistiksel bilgi vermektedir ve tek başına termal stabilité mekanizmasını belirleyici bir yöntem olamaz. Çünkü, dizi analizleri her ne kadar, özel amino asit değişikliklerini gösterse de bu değişikliklerin protein yapısına olan yansımaları sadece karşılaştırmalı 3 boyutlu yapı analizi ve onunla birlikte kullanılacak bölgeye özel mutasyon yöntemi ile anlaşılırabilir (Moriyama *et al.*, 1995). Buna alternatif olarak, son yıllarda bilgisayar paket programları da mutasyon etkilerinin moleküler dinamiklerinin simülasyonu ve tahmininde yardımcı olmaktadır (Querol, *et al.*, 1996).

3 boyutlu yapı analizi işliğinde bölgeye özel mutasyon yönteminin kullanıldığı çalışmalar, spesifik amino asit yan gruplarının protein stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemekte yararlı olmuştur (Reeve, 1994; Daniel, 1996). Bu çalışmalarında, yapılan tek ya da birkaç amino asit değişikliğinin yol açtığı küçük yapısal farklılıkların bile stabiliteyi değiştirdiği gösterilmiştir. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar, protein termostabilitesinin elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, gibi birden fazla kuvvetin toplam etkisinden kaynaklandığını ve böylece protein esnekliğinin azalmış olduğunu göstermiştir (Colacino and Crichton, 1997; Zeikus, 1996; Vogt *et al.*, 1997).

Protein stabilizasyon mekanizmalarılarındaki bilgilerimizin çoğunuğu model enzimler ile yapılan çalışmalardan elde edilmektedir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı küçük, çözünebilir, monomerik yapıda enzimlerdir (lizozim ve ribonükleaz gibi) (Dill, 1990). Elde edilen sonuçlardan proteinin termal stabilitesini artırmak için

kullanılabilecek bazı genel prensipler ortaya çıkmıştır (Mozhaev, 1993; Imoto, 1997). Bu prensiplerden bir kısmı aşağıda özetlenmiştir:

Disülfid bağlarının polipeptid zincirleri arasında kovalent bağ kurarak protein yapısının stabilitesini artırmakta rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli proteinlere disülfid bağları eklenerek veya çıkartılarak stabiliteye olası katkıları araştırılmıştır. Fakat bu mutasyonların termal stabiliteye etkisi her zaman aynı olmamıştır. *Bacillus subtilis* nötral proteaz enzimine sistein grubu eklenmesi termal stabiliteyi azaltmıştır (Van der Burg, 1993). T4 lizozim enziminde iki tane eşlenmemiş sistein grubu bulunur ve termal stabilitesi düşüktür. Pozisyon 3'deki ile grubu Cys ile değiştirildiğinde, bu grup pozisyon 97'deki Cys ile disülfid bağı kurabilmiştir (Perry and Wetzel, 1984). Bunun sonucu olarak da enzimin termal stabilitesi artmıştır. Bu artış aynı mutant proteinde pozisyon 54'deki sistein grubunun kimyasal yöntemle bloke edilmesi veya mutasyonla değiştirilmesiyle daha da yükselmiştir (Wetzel et al., 1988). Benzer şekilde *Bacillus stereothermophilus* esteraz enzimindeki serbest sistein gruplarının bölgeye özel mutasyonla değiştirilmesi termalstabiliteyi arttırmıştır (Amaki et al., 1994).

Termalstabiliteyi artırabilecek bir başka yöntem ise proteinin belirli bölgelerindeki amino asitlerin prolin ile değiştirilmesidir. Prolin, pirolidin grubu dolayısıyla sadece belirli konfigürasyonlar alabileceğinden bu amino asidi takip eden amino asidin de hareketini sınırlayacaktır. Bu da proteinin sarılmamış şeklinin entropisini azaltacağından termal stabiliteyi olumlu yönde etkilemesi düşündürmektedir. Araştırmalar, belirli bölgelere yapılan prolin grubu eklemelerinin, termal stabiliteyi eklenen prolin grubu miktarı ile doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir. (Nicholson, 1992; Hardy et al., 1993).

Üç boyutlu yapısı bilinen bazı proteinlerde, entropik etkinin termal stabiliteyi artırmada etkili bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür. Buna örnek, Gly → Ala değişikliğidir (Ganter and Plückthun, 1990). Alanin ile karşılaştırıldığında Gly grubu daha yüksek konfigürasyonel entropiye sahiptir. Bu nedenle sarınma olayında Gly'nin alternatif konformasyonlarının azalması için daha çok serbest enerji gerekmektedir. Bu prensipten hareketle, protein stabilitesini Gly → Ala değişimi yaparak artırmak mümkün olabilmektedir.

Aromatik-aromatik etkileşimler termofilik proteinler için bir başka stabilizasyon mekanizmasıdır (Wrba *et al.*, 1990; Burley and Petsko, 1985). Genel kural olarak, aromatik gruplar (Phe, Tyr, Trp) proteinin iç kısmında, diğer apolar yan grupların yakınında gömülüdür. Hidrofilik gruplar ise daha çok solvente açık yüzeylerde yer alırlar. Bu çeşit aromatik etkileşim bir öbakteri olan *Thermotaga marimata*'dan elde edilen bir ekstrem termostabil enzim olan D-gliseraldehitrifosfat dehidrogenaz enziminde görülmüştür (Burley and Petsko, 1985). Mezofilik *lathomoloğus* ile karşılaştırıldığında termostabil enzimde aromatik yan zincirlerin hidrofobik çevrelerinde birbirleriyle olan etkileşimlerin daha sıkıdır. Artan sıcaklıkla birlikte hidrofobik etkileşimlerin daha da güçlendiği dikkate alındığında, bu proteinde termal bozulmanın nasıl önlenmesini anlamak mümkünür. Çeşitli araştırmalar, tuz köprülerinin proteinleri stabil kıلان genel bir özellik olduğunu ortaya koymuştur. İstatistiksel yöntemler Argos kuralları ile paralel olarak, termostabil proteinlerde mezofil proteinler göre Arg:Lys oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda Arg gruplarının kurduğu tuz köprüsünün daha sağlam olması beklenmektedir, çünkü Arg'in Lys'e göre pKa değeri daha yüksektir. Aynı zamanda sahip olduğu δ-guanido grubu ve Lys'e göre daha uzun olan yan zinciri sayesinde daha fazla sayıda tuz köprüleri kurabilmektedir. Bu da stabiliteyi artırmaktadır (Vielle and Zeikus, 1996). En önemli bir neden de hidrofobik enzimdir. Katalizlediği Daha önceki dephinildiği gibi sarılmış proteinlerde hidrofobik amino asit yan grupları genelde iç kısımlarda gömülüdür ve protein termal stabilitesine hidrofobik etkileşim ile katkıda bulunurlar (Pace, 1995). Ancak, yan zincirler efektif olarak paketlenmiş olsa bile halen bazı iç boşluklar bulunabilir. Bu nedenle, iç boşluklara bakan hidrofobik grupların daha büyük yan zincire sahip amino asitlerle değiştirilebileceği önerilmiştir (Iskikawa *et al.*, 1993). Böylece iç boşlukların doldurulup, proteinin stabilitesinin artması beklenmektedir. Karpuras ve grubu (1989) T4 lizozim'de bulunan iki büyük boşluğu doldurmak için bölgeye özel mutasyon yöntemi ile Leu 33 → Phe ve Ala129 → Val değişikliklerini yapmışlardır. Ancak, protein stabilitesinde kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Bir başka çalışmada ise *E.coli* ribonükleaz HI enzimindeki iç boşluklarının doldurulması stabiliteyi mutant olmayan enzime göre oldukça artırmıştır (Iskikawa *et al.*, 1993). Diğer bir çalışmada da, bölgeye özel

mutasyon yöntemi ile bir *B.stearothermophilus* nötral proteaz enziminin hidrofobik boşlukları doldurulmuştur (Eijsink *et al.*, 1992). Ancak bu mutasyonların termostabilite üzerine etkisi az olmuş ve mutasyonların enzim yapısı üzerine pozitif ve negatif etkilerinin söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür.

Termal stabilité mekanizması ile ilgili çalışmalar içerisinde amino asitlerin spesifik rolünün araştırmasının yanı sıra, hibrid protein yapımı da yeni bir yaklaşım olarak dikkati çekmektedir (Sode *et al.*, 1995). Bir çalışmada izopropil-malat dehidrogenaz enziminin termofilik ve mezofilik enzimlerden alınan bölgeleri birleştirilmiştir (Numata *et al.*, 1995). Hibrid proteinin termal stabilitesinin termofilik proteinden gelen amino asit miktarı ile kabaca doğru orantılı olduğu görülmüştür.

Özetle, bu güne kadar yapılan çalışmalar, protein termal stabilitesinden birkaç etkileşimden ziyade daha global bir mekanizmanın sorumlu olduğunu göstermektedir.

Projenin Amacı ve Kapsamı:

Bu projede, enzimlerde ısuya dayanıklılığın moleküler mekanizmasını araştırmak üzere termoasidofilik bir Archaeon olan, *Thermoplasma (Tp.) acidophilum'* un sitrat sentaz enzimini model protein olarak seçtik. Sitrat sentaz, sitrik asit döngüsüne karbon girişini katalizleyen önemli bir merkezi metabolizma enzimidir. Katalizlediği reaksiyon aşağıda verilmiştir:



Tp. sitrat sentaz, moleküler kütlesi yaklaşık 90,000 Da olan, ve birbirinin aynı 2 monomerden oluşan, dimerik bir enzimdir. Her bir monomerde 384 amino asit bulunmaktadır. Enzimi kodlayan gen klonlanmış ve nükleik asit dizisi saptanmış olup, rekombinant protein *E.coli*'de eksprese edilmiştir (Sutherland,1990; Sutherland,1991). Ayrıca, rekombinant *Tp.* sitrat sentaz enziminin 3 boyutlu yapısı 2.5Å'a kadar çözülmüştür ve böylece enzimin yapısı ile ilgili önemli bilgiler edinilmiştir (Şekil 1) (Russell,*et.al.*,1994). *Tp.* sitrat sentaz enziminin %57'si α -heliks yapıdan oluşmuştur. Her bir monomerin bir büyük bir küçük olmak üzere iki alt 'domain'i vardır. Enzimin aktif merkezi bu alt üniteler arasında yer almaktır, bu



Şekil 1: *Thermoplasma (Tp.) acidophilum* sitrat sentaz enziminin 3 boyutlu yapısının şematik görüntüsü.

merkeze her iki monomerin de fonksiyonel gruplarının katılımı söz konusudur. Dimerin interfaz yüzeyi 4 çift antiparallel heliksten oluşan toplam 8 α -heliks sandviç yapısına sahiptir (FF, GG, LL, MM). *Tp.* sitrat sentaz enzimi amino asit düzeyinde domuz kalp sitrat sentaz enzimi ile %20, hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* (*Pf.*) sitrat sentaz enzimi ile de %42 oranında benzerlik göstermektedir. Her iki enzimde de aktif merkezi oluşturan fonksiyonel grupların korunduğu bulunmuştur. Mezofilik, termofilik, ve hipertermofilik organizmalardan elde edilen sitrat sentaz enzimlerinin kristal yapıları detaylı olarak karşılaştırıldığında göze çarpan ve değişen termal stabilité ile ilişkilendirilebilecek bazı farklılıklar saptanmıştır (Russell and Taylor, 1995; Russell et al, 1997):

1. *Tp.* sitrat sentaz enziminin monomer yapısındaki 16 α -heliks domuz sitrat sentaz ile eşdeğerdir. Farklılık α -heliksleri birbirine bağlayan kıvrımların uzunluğundadır. *Tp.* ve *Pf.* sitrat sentaz enzimlerinde kıvrımların daha kısa olmasının termalstabiliyenin artması ile ilgili olabileceği öne sürülmektedir.
2. Domuz sitrat sentaz enziminin NH₂ ucunda bulunan ilk 35 amino asit *Tp.* ve *Pf.* enziminde yoktur.
3. Termostabil sitrat sentaz enzimindeki α -heliksler arasındaki kıvrılmaların boyunun kısalması, enzimin yapısında bulunan iç boşlukların sayıca ve hacimce azalmasına yansımaktadır. Domuz kalp sitrat sentaz enziminde toplam hacmi 613Å olan 7 iç boşluk, *Tp.* enziminde toplam hacmi 211Å olan 3 iç boşluk bulunmaktadır. Bu nedenle Archae orijinli enzimlerin sıkıca paketlenmesinin termal stabiliteden sorumlu bir diğer faktör olabileceği düşünülmektedir.
4. *Tp.* sitrat sentaz enziminde monomer-monomer etkileşim yüzeyinde bulunan α -heliks yapının alanın içeriği domuz sitrat sentaz enzime göre daha artmış olup, böylece bu bölgede hidrofobisite de yükselmiştir. Güçlenen hidrofobik etkileşimin yüksek sıcaklıklarda iki monomerin, dimer şeklinde kalmasını sağladığı düşünülmektedir. *Pf.* enzimindeki dimer etkileşim yüzeyi ise farklı özelliktedir. Domuz sitrat sentaz enzimi ile karşılaştırıldığında iyon çiftlerinin sayısı belirgin olarak artmıştır. Ancak böyle bir artış *Tp.* enziminde görülmemektedir. Bu da yüksek

sıcaklıklarda dimer bütünlüğünü korumak için alternatif yöntemlerin kullanıldığı göstermektedir.

5. Amino asit dizi analizleri karşılaştırıldığında, *Pf.* sitrat sentaz enziminin Asn ve Gln yüzdesi en azdır ve 1 Cys grubu vardır. *Tp.* sitrat sentaz enziminde hiç Cys grubu yoktur ve aynı şekilde Asn ve Gln gruplarının oranı da azdır. Bu da termostabil proteinlerin yapısında ısiya duyarlı amino asitlerin sınırlı sayıda bulunduğu göstermektedir.

6. Karşılaştırılan her üç enzimin aktif merkezinin yaklaşık aynı konformasyon ve amino asit içeriğine sahip olmasına karşın, substrati bağlayan spesifik grupların değişik pozisyonlarda bulunması, aynı reaksiyonu farklı sıcaklıklarda gerçekleştirebilmek için gereksinim duyulan stabilité ile esneklik arasında kritik dengeyi kurma zorunluluğunu yansımaktadır.

Bu proje kapsamında mezofilik ve termofilik homolog sitrat sentaz enzimlerinin yapısal karşılaştırması sonucu termal stabiliteden sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalardan iki tanesini bölgeye özel mutasyon yöntemi ile test edilmiştir. Üzerinde durduğumuz bu iki mekanizma termofilik enzimde,

1. Monomer-monomer etkileşim yüzeyinde hidrofobisitenin artması,
2. Enzimin iç oyuklarının sayısının azalması ve hacminin küçülmesidir.

Bu mekanizmalarda etkin olabilecek spesifik amino asit değişikliklerinin pozisyonlarını ve cinsini, homolog proteinlerin kristal yapılarının bilgisayar analizi ile saptamış bulunuyoruz. Mutant proteinler *E.coli*'de eksprese edilmiştir. Saflaştırılmış mutant enzimlerin mutant olmayan enzimle karşılaştırmalı olarak kinetik ve termal stabilité özellikleri çalışılmıştır.

2. Materyal ve Metod

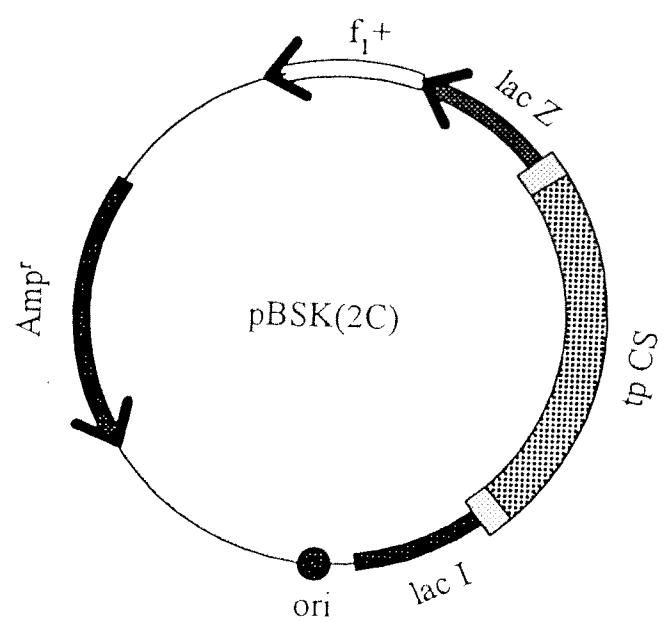
2.1. Bakteri Suşları

Bu çalışmada mutant olmayan rekombinant *Tp.* sitrat sentaz geninin kaynağı olarak pBSK(2CS) rekombinant fazmit vektörü kullanılmıştır (Şekil 2). Bu vektör, daha önce, klonlanmış *Tp.* sitrat sentaz geninin rekombinant plazmit vektör pCSEH19'dan *EcoRI* ve *SphI* enzimleri ile kesildikten sonra pBSK(+) fazmit vektöre bağlanması suretiyle oluşturulmuştur (Kocabiyik et al., 1996). Söz konusu rekombinant fazmit klonlanmak üzere *E.coli* XL-I Blue suşuna transformasyonla aktarılmış ve elde edilen *E.coli* pBSK(2CS), mutant olmayan sitrat sentaz enziminin ve bölgeye özel mutasyon çalışmaları için gerekli olan ssDNA'nın elde edilmesinde kullanılmıştır. Mutant enzimler *E.coli* TG-I suşunda eksprese edilmiştir.

2.2. Urasil içeren ssDNA'nın hazırlanması

Bölgeye özel mutasyon için urasil içeren ssDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve mutajenik oligonükleotidlerden yararlanılan bir yöntem kullanılmıştır.

Rekombinant *Tp.* sitrat sentaz geninin pBSK(+) plazmit vektörde taşıyan *E.coli* pBSK(2CS) suşu kullanılarak mutant olmayan sitrat sentaz geninin ssDNAsı Sambrook et al (1989) tarafından önerilen yöntem esas alınarak saf olarak elde edilmiştir. Bu amaçla önce *E.coli* pBSK (2CS) logaritmik fazdaki kültürü Super Broth içerisinde hazırlanmış ve ayrı ayrı yardımcı faj (helper phage) olarak R408 ya da VCS-M13 ile enfekte edilmek suretiyle oluşan rekombinant fajlardan rekombinant fazmit DNA'sı ssfaj DNAsı olarak elde edilmiştir. Daha sonra bu faj preparasyonu ile *E.coli* CJ236 (*ung*⁻ *dut*⁻) kültürü enfekte edilmiş ve uridin (0.25 μ g/ml) ilavesi ile gelişmeye bırakılmıştır. Böylece yeni sentezlenen faj DNAsına urasil girişi sağlanmıştır. Daha sonra faj bakteriden santrifüj edilerek ayrılmıştır. Süpernatandaki fajlar %15 PEG (8000) + NaCl (2.5M) ile çöktürülmüş ve urasil içeren ss fazmit DNAsı 1 kez fenol, 1 kez de fenol + kloroform karışımı ile ekstre edilmek suretiyle izole edilmiştir.



Şekil 2: pBSK (2CS) rekombinant fazmit vektörünün haritası. E: EcoRI kesme bölgesi, S: Sph I kesme bölgesi.

2.3. Mutajenik Oligonükleotidlerin Dizaynı

Dimer interfazındaki hidrofobik interaksiyonların dimer stabilizasyonunu artırmak yolu ile termostabiliteyi etkilemesi hipotezinden hareketle 4 mutant protein yapımı planlanmıştır. Bunlardan iki tanesinde interfazda iki hidrofobik grup (Alanin 97 ve Alanin 104), sırası ile Serin ve Triyonin ile yer değiştirmek yolu ile *Tp.* sitrat sentaz enzimi bu pozisyonlarda mezofilik domuz sitrat sentaz enzimine benzetilmiştir. Diğer iki mutasyon ise *Tp.* sitrat sentaz enziminin Glisin 196 ve Glisin 209 gruplarının hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* sitrat sentaz enzimindeki (Muir *et al.*, 1995) sırası ile Valin ve Alanin grupları ile yer değiştirmesi şeklinde yapılmıştır.

Bu prensiplere göre dizayn edilen ve Kits and Probes GmbH (Göttingen, Germany) tarafından sentezlenen mutajenik oligonükleotidler Şekil 3'de verilmiştir.

Enzimin iç oyuklarının boyutlarının küçültülmesi yolu ile termostabilitesinin artırılması hipotezinden hareketle de iki mutant protein yapımı planlanmıştır. Bu amaçla enzimin 3 boyutlu yapısının bilgisayar grafik analizi ile amino asit değişiklikleri yapmak için hedef alacağımız pozisyonlar saptanmıştır. Şekil 4'de *Tp.* sitrat sentaz enziminin 3 boyutlu yapısını gösteren diyagramda bu pozisyonlar işaretlenmiştir. Enzimin 343'üncü pozisyonundaki Serin'in Triyonin ile, 346'ncı pozisyonundaki Triyoninin Tirosin ile yer değiştirmesi planlanmıştır. Böylece orijinal enzimde seçilen iç oyuklarda, daha küçük yan gruplara sahip amino asitlerin, mutasyon ile daha büyük yan gruplara sahip amino asitler ile yer değiştirmesi yolu ile oyukların boyutlarının küçültülmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kullanılan oligonükleotidler, Ser343→ Thr (S343T) mutasyonu için tek, Thr346→ Tyr (T346Y) mutasyonu için 3 nükleotid değişikliği yapılarak dizayn edilmiştir (Şekil 5).

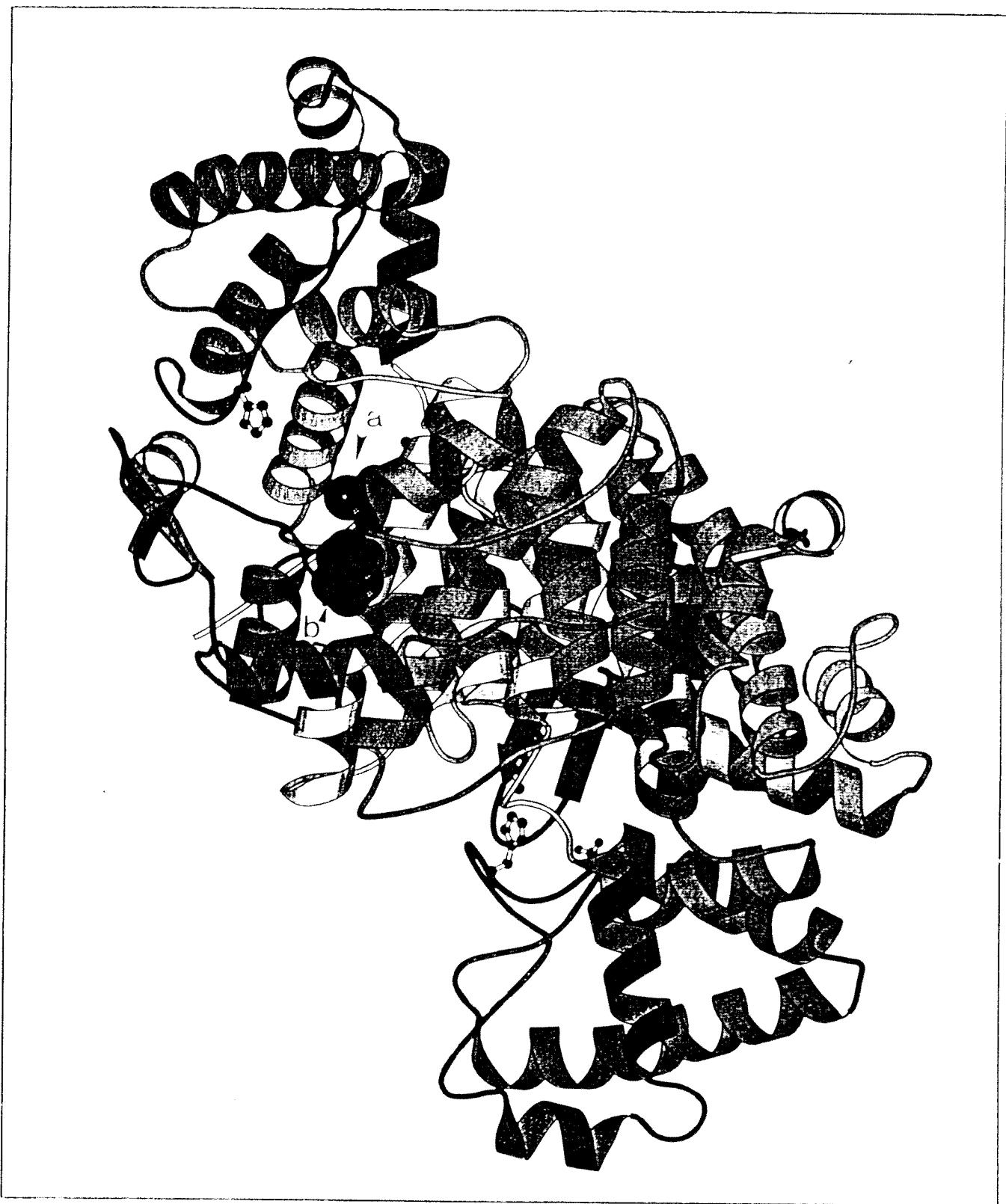
2.4. Bölgeye Özel Mutasyon

Bölgeye özel mutasyon çalışmalarında mutajenik oligonükleotidlerin kullanıldığı ve orijinal olarak Kunkel *et al* (1987) tarafından önerilen ve Kocabiyik ve Perlin (1992) tarafından modifiye edilen bir yöntem kullanılmıştır.

⁵ TCG GAT GTC GTG <u>TCA</u> ATG CAG ATG GCC GCG ³	⇒ mutajenik oligonükleotid ⇒ mutasyon
⁵ ATG GCC GCG GTT <u>ACA</u> GCC ATG GCA GCA TCG ³ GCA (A) ₁₀₄ → ACA (T)	⇒ mutajenik oligonükleotid ⇒ mutasyon
⁵ TCT ACC ACG GCA <u>GTC</u> TTG GTC GCG GTA TCA ³ GGC (G) ₁₉₆ → GTC (V)	⇒ mutajenik oligonükleotid ⇒ mutasyon
⁵ GAC ATG TAC TCC <u>GCC</u> ATA ACT GCA GCT CTT ³ GGC(G) ₂₀₉ → GCC (A)	⇒ mutajenik oligonükleotid ⇒ mutasyon

Şekil 3 . Hidrofobik interaksiyonlarla ilgili mutajenik oligonükleotidler

Şekil 4: (a) etraf serinaz enziminde serin 195'inci pozisyonunda, (a) asparagin (Asp) → Ser ve Thr 349 → Tyr (b) mutasyonların oluşumunu



Şekil 4: *Tp.* sitrat sentaz enziminde iç oyukların doldurulması ile ilgili Ser 343→Thr(a) ve Thr 346→Tyr (b) mutasyonlarının pozisyonları

w.t TCC (Ser)

339 ^{5'}CTC TTC GCG CTA ACC AGG GTT ACA GGG TGG^{3'} 348
 ^{3'}GAG AAG CGC GAT TGG TCC CAA TGT CCC ACC^{5'}

Mutasyon \Rightarrow Ser₃₄₃(TCC) \rightarrow Thr(ACC)

w.t ACA (Thr)

342 ^{5'}CAT TCC AGG GTT TAC GGG TGG CAG GCA CAC^{3'} 351
 ^{3'}GAT AGG TCC CAA ATG CCC ACC GTC CGT GTC^{3'}

Mutasyon \Rightarrow Thr₃₄₆(ACA) \rightarrow Tyr (TAC)

Şekil 5: Enzim iç oyukları ile ilgili mutajenik oligonükleotidler

Bu kapsamda farklı reaksiyon karışımılarında, her bir mutajenik oligonükleotid, urasil içeren *Tp*. sitrat sentaz geninin ssDNAsına hibridizasyon ile bağlandıktan sonra, heterodoubleks fazmit oluşumu T4 DNA polimeraz, 4dNTP ve T4 ligaz kullanılmak suretiyle sağlanmıştır. Reaksiyon karışımının 10 μ l'si kompetan *E.coli* TG1 hücrelerine transformasyon yolu ile aktarılmıştır (Chung et al., 1989). Transformantlar ampisilin (50 μ g/ml) içeren LB agar ortamında tek koloni olarak geliştirilmiştir. Daha sonra her mutasyon için tesadüfi olarak seçilen 12 koloninin fazmit DNAsı izole edilmiş ve DNA dizi anılızi ile mutasyon için taramıştır.

2.5. Nükleik Asit Dizi Analizi

Nükleik asit dizi analizi için mutant olması muhtemel kolonilerden fazmit DNA'sı High Pure Plazmit Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Germany) kullanılmak suretiyle izole edilmiştir. Mutasyonların varlığını göstermek için bu fazmit DNA'larındaki *Tp*. sitrat sentaz genlerinin belirli bölgelerinin nükleik asit dizi analizi 'dideoksi chain termination' yöntemi ile yapılmıştır (Sanger et al., 1977). Bu amaçla Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (UBS, Amersham Life Science, Ohio, USA) kullanılmıştır. Dizi analizinde kullanılmak üzere dizayn ettigimiz primerler (MWG tarafından sentezlenmiştir) Şekil 6'da verilmiştir.

Primer SK-1: $^{5'}\text{- AGA AAA TAC AAG GAA ACC GTC -}^{3'}$

Primer SK-2: $^{5'}\text{- CAA CAT GGC GGG ATC CTT TAT -}^{3'}$

Şekil 6: Nükleik asit dizi analizlerinde kullanılan primerler

2.6. Mutant ve Mutant Olmayan Rekombinant *Tp.* Sitrat Sentaz Enzimlerinin Izolasyonu ve Saflaştırılması

Sitrat sentaz enzim izolasyonu daha önce açıklandığı şekilde (Erduran and Kocabiyik, 1996) ve orijinal olarak James *et al.*, (1994) tarafından önerilen bir yönteme göre yapılmıştır.

Mutant ve mutant olmayan rekombinant *Tp.* sitrat sentaz enzimlerini üreten *E.coli* suşlarının bir gecelik kültürleri ampisilin ($50\mu\text{g} / \text{ml}$) içeren sıvı LB ortamında hazırlanmıştır. 3,500rpm'de 15 dak santrifüj ile çöktürülen hücreler kültür hacminin 1/20'si kadar 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0 tampon çözeltisinde çözülmüş ve sonikasyon yöntemi ile parçalanmıştır. Elde edilen hücre lizatı 65°C 'de 15 dak ısındıktan sonra, hücre kalıntıları santrifüj edilmek suretiyle çöktürülmüştür. Süpernatan afinite kolonundan (Reactive Red A, Sigma Chem. Comp. St. Lois, MI) geçirilmiş ve *Tp.* sitrat sentaz enzimi 5mM OAA ve 1mM Koenzim A içeren yukarıdaki tampon çözelti kullanılarak spesifik olarak kolondan elde edilmiştir. Bir fraksiyon toplayıcı yardımcı ile elde edilen fraksiyonlardan (fraksiyon hacmi: 0.7ml) belirgin sitrat sentaz aktivitesine sahip olanlar birleştirilmiş ve ultrafiltrasyon yöntemi ile (Amicon Centriprep-10 Concentrator, Amicon Inc., Beverly, MI) yıkanmış ve konsantre edilmiştir.

Enzimin çeşitli saflaştırma aşamaları SDS-PAGE (10% w/v) ile izlenmiştir (Laemmli, 1970).

Protein tayini için 235nm ve 280nm dalga boylarında absorbans ölçümüne dayanan, Whiltaker ve Granum (1980) tarafından önerilen bir yöntem kullanılmıştır.

2.7. Sitrat Sentaz Enziminin Aktivite Tayini ve Kinetik Parametrelerin Ölçülmesi

Sitrat sentaz enziminin aktivitesi 412 nm'de Srere *et al.* (1963) tarafından önerilen bir spektrofotometrik yöntem izlenerek ölçülmüştür. Enzim reaksiyonları toplam 1ml hacimdeki 0.2mM oksaloasetat (OAA), 0.1mM asetil koenzimA (asetil-KoA) ve 0.2mM 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoikasit) (DTNB) içeren reaksiyon tamponunda [20mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)] yürütülmüştür. 1 ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dakikada $1\mu\text{mole}$ KoA-SH açığa çıkarılan aktivite olarak tanımlanmıştır.

Enzimlerin OAA ve asetil-KoA için Michaelis sabitleri, OAA'a karşı asetil-KoA konsantrasyonunu değiştirmek, yada asetil-KoA konsantrasyonunu sabit tutup OAA konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle oluşturulan Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilmiştir. Reaksiyonların ilk hız birimleri olarak ΔA_{412} dak^{-1} veya $\mu\text{moles/dak-}mg$ kullanılmıştır.

2.8. Termostabilite Çalışmaları

Saflaştırılmış *Tp.* sitrat sentaz enzimlerinin termostabilite çalışmaları, 1U/ml enzimi içeren reaksiyon tamponu içerisinde yürütülmüştür. Enzim örnekleri 55°C ila 95°C arasında çeşitli sıcaklıklarda 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Örnekler eşit zaman aralıkları ile alınıp hemen buzda soğutuluktan sonra, kalan aktivite ölçümleri standart yöntem kullanılarak yapılmıştır.

Semilogaritmik inaktivasyon eğrilerinin eğimi, Arrhenius eğrilerini çizmek için kullanılan inaktivasyon sabitlerinin (k) elde edilmesinde kullanılmıştır.

3. Sonuçlar:

3.I. Monomer-Monomer Etkileşim Yüzeyi ile İlgili Mutasyonlar:

3.I.1. Bölgeye Özel Mutasyon Yöntemi ile Mutant *Tp.* Sitrat Sentaz Enzim Genlerinin Oluşturulması:

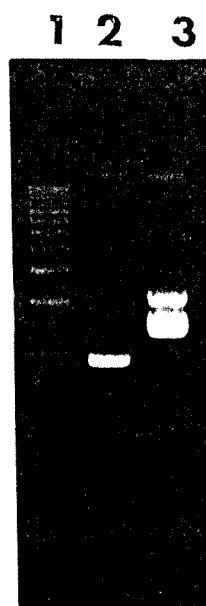
E.coli pBSK(2CS) rekombinant suşu kullanılarak mutant olmayan sitrat sentaz geninin urasil içeren ssDNA'sı Materyal ve Metod'da açıklandığı şekilde elde edilmiştir. Bölgeye özel mutasyon çalışmalarımızda kalıp olarak kullandığımız ve rekombinant *Tp.*sitrat sentaz genini taşıyan bu pBSK(2CS) fazmitin ssDNA'sı Şekil 7'de görülmektedir.

Farklı reaksiyon karışıntılarında, herbir mutajenik oligonukleotid urasil içeren *Tp* sitrat sentaz geninin ssDNA'sına hibridizasyon ile bağlandıktan sonra, bir *in-vitro* DNA sentez sistemi kullanılarak mutant *Tp*.sitrat sentaz genlerini taşıyan heterodupleks fazmitlerin oluşumu gerçekleştirilmişdir (Şekil 8).

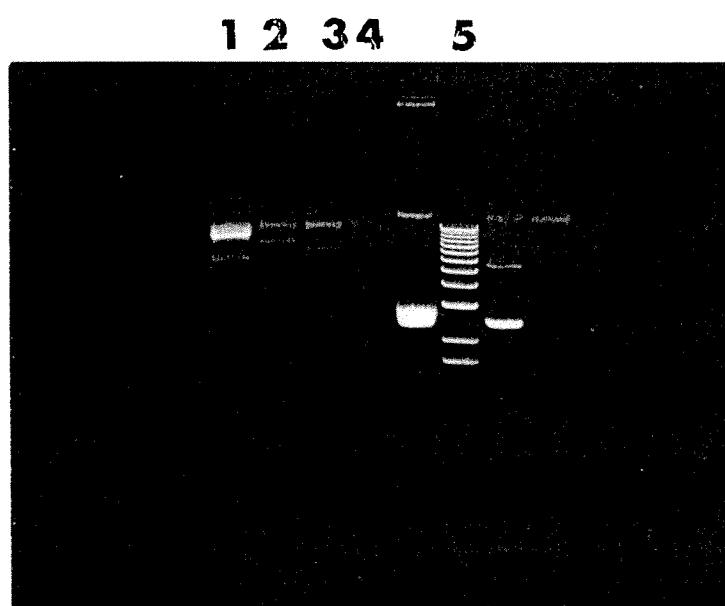
Mutant *Tp*. sitrat sentaz enzimleri *E.coli* TG-I suşunda sentezlenmişlerdir.

3.I.2. Mutant *Tp*. Sitrat Sentaz Genlerinin Nükleik Asit Dizi Analizleri:

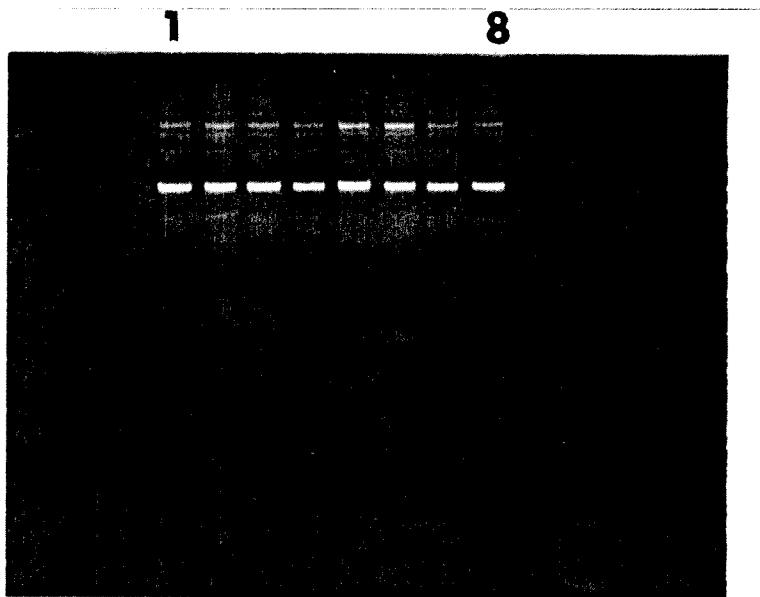
Bölgeye özel mutasyonla oluşturulan mutant *Tp*.sitrat sentaz genlerinde, planlanan mutasyonların hedef alınan pozisyonlarda varlığı nükleik asit dizi analizi ile gösterilmiştir. Bu amaçla her bir mutasyon için 10 tane rekombinant koloniden elde edilen fazmit DNAsında inceleme yapılmıştır. Fazmit DNA'sı saf olarak High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Germany) kullanılmak suretiyle elde edilmiştir (Şekil 9). Mutasyon oranı %50 ile %60 arasında değişmektedir, ki bu oran söz konusu yöntem ile ulaşılabilen en yüksek orandır. Hedeflenen 4 mutasyonun da varlığı rekombinant suşlarda DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Söz konusu mutasyonlar tek nükleik asit değişimi ile gerçekleştirılmıştır. Böylece oluşturulan tek amino asit değişiklikleri: Ala₉₇(GCA)→Ser(TCA), Ala₁₀₄(GCA)→Thr(ACA), Gly₁₉₆(GGC) →Val(GTC) ve Gly₂₀₉(GGC) →Ala (GCC)dir. Şekil 10' da nükleik asit dizi analizini gösteren otoradyografi resimleri görülmektedir.



Şekil 7: Rekombinat *Tp. sitrat* sentaz genini taşıyan pBSK (2CS) fazmitinin ss kalıp DNA'sının izolasyonu. 1. sıra 1 kb DNA marker; 2. sıra: R408 yardımcı fajı kullanılarak elde edilen ss kalıp DNA; 3. sıra: VCS-M13 yardımcı fajı kullanılarak elde edilen ss kalıp DNA.

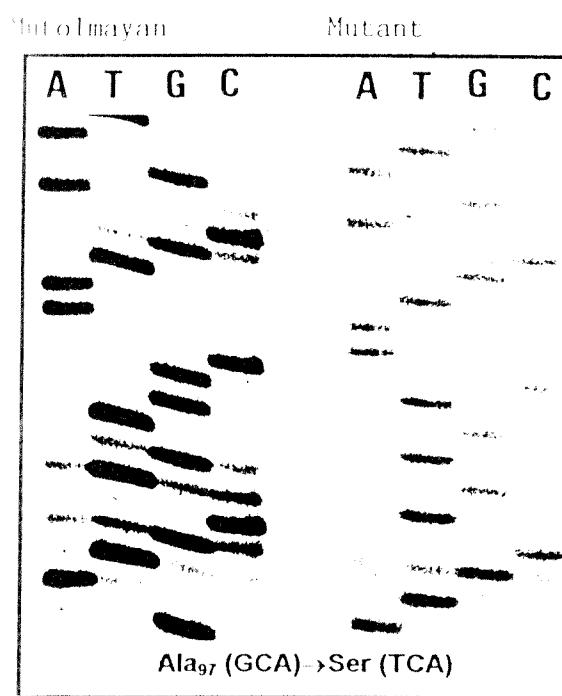


Şekil 8: Bölgeye özel mutasyon. Bu deneylerde kalıp olarak R408 yardımcı fajı kullanılarak elde edilen ss sitrat sentaz DNAsı kullanılmıştır. Sıra 1-4: Şekil 3'deki mutajenik oligonükleotidler kullanılarak oluşturulan ds heterodupleks fazmit DNA'sı; Sıra 5: 1kb DNA marker.

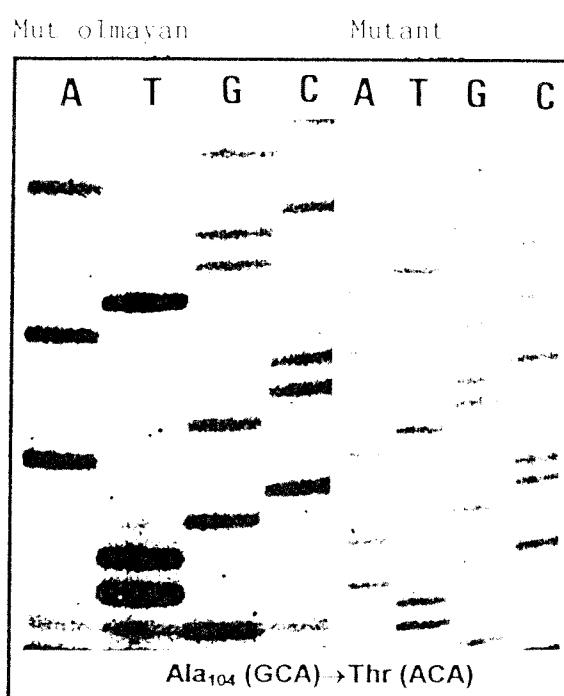


Şekil 9: Nükleik asit dizi analizi için mutasyondan sonra rekombinant kolonilerden fazmit DNA izolasyonu. 1 numaralı mutajenik oligonükleotid kullanılarak yürütülen mutasyon çalışmaları sonucu elde edilen kolonilerden sekiz tanesinden izole edilen fazmit DNA'sı, sıra 1-8'de görülmektedir.

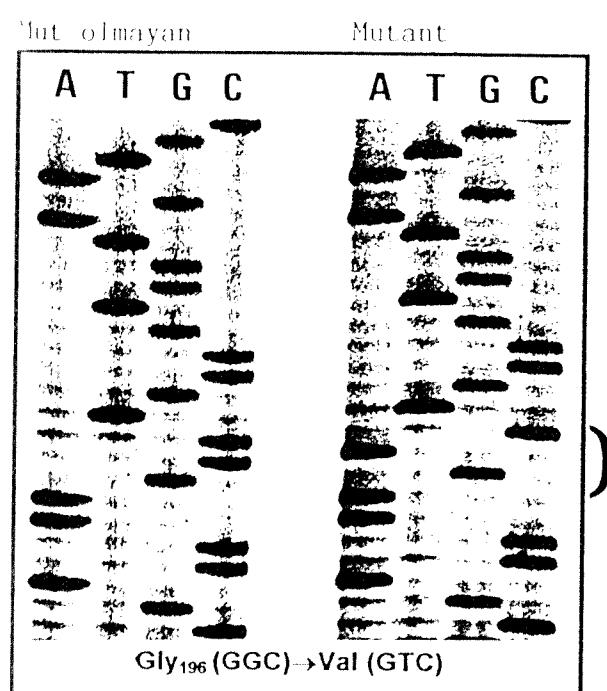
(a)



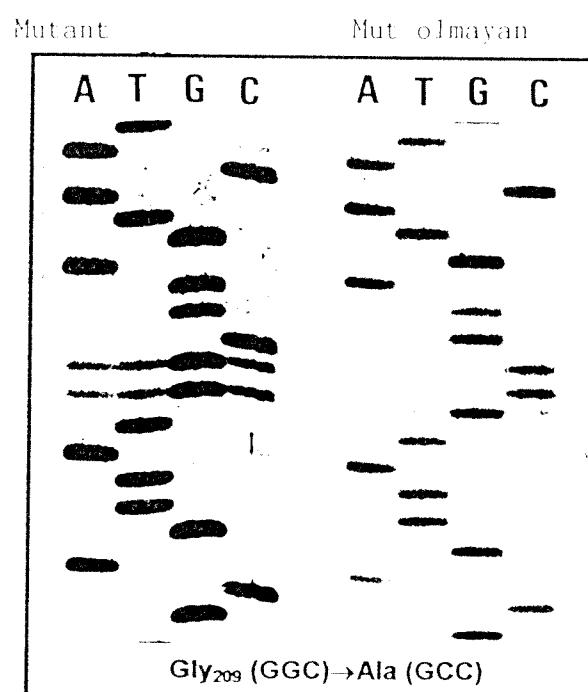
(b)



(c)



(d)



Şekil 10: Mutasyonların nükleik asit dizi analizi ile belirlenmesi. (a) $\text{Ala}97 \rightarrow \text{Ser}$,

(b) $\text{Ala}104 \rightarrow \text{Thr}$, (c) $\text{Gly} 196 \rightarrow \text{Val}$ ve (d) $\text{Gly}209 \rightarrow \text{Ala}$ değişiklikleri.

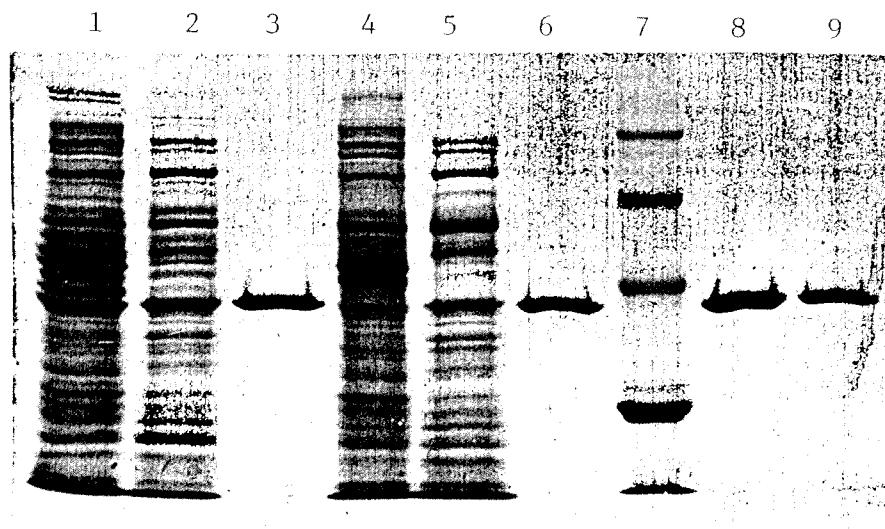
3.I.3 A97S, A104T, G196V, G209A Mutant ve Mutant Olmayan Sitrat Sentaz Enzimlerinin Izolasyonu ve Saflaştırılması:

Enzim izolasyonunda ilk aşama, orijinal enzimin termostabil olması nedeni ile ısı uygulaması olup, böylece ısıya duyarlı *E.coli* proteinleri elimine edilmiştir (Şekil 11 ve Şekil 12). Archaea enzimlerinin eksprese edildiği *E.coli* hücrelerinin lizatları 65°C'de 15 dak inkübe edilerek, konukçu proteinleri denatüre edilmiş ve santrifüje çökertilerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatandaki *Archaeal* protein kolon kromatografisi ile (Reactive Red A kolon), Materyal ve Metod'da açıklandığı şekilde saflaştırılmıştır. Enzimlerin kolon kromatografi profilleri fraksiyonlarda A_{280} ölçümü ve sitrat sentaz aktivite tayini ile elde edilmiştir.

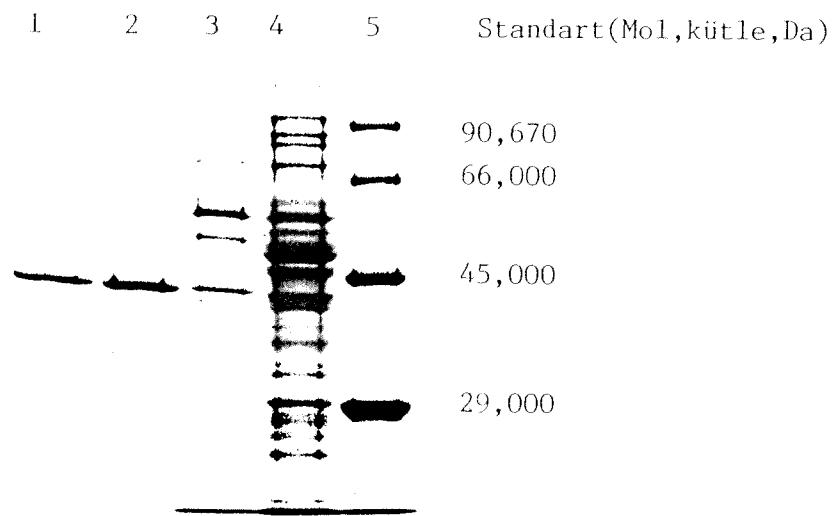
Rekombinant *E.coli* suşlarından elde edilen, A97S, A104T, G196V, G209A mutant ve mutant olmayan sitrat sentaz enzimlerinin saflaştırılmasında izlenen aşamalar sırası ile Tablo 1, 2, 3, 4 ve 5'de özetlenmiş olup, afinité kromatografi profilleri sırası ile Şekil 13, 14, 15, 16 ve 17'de görülmektedir. A97S enziminin saflaştırılmasından sonra %21'i elde edilmiştir. Saf enzimin spesifik aktivitesi 0.136 U/mg'dır. A104T enziminin saflaştırmadan sonra %74'ü elde edilmiş olup, saf enzimin spesifik aktivitesi 0.204 U/mg'dır. G196V enziminin afinité kromatografiden sonra %47'si elde edilmiş olup, saf enzimin spesifik aktivitesi 0.154 U/mg'dır. G209A enziminin afinité kromatografiden sonra %51'ü elde edilmiş olup, saf enzimin spesifik aktivitesi 0.920 U/mg'dır. Mutant olmayan rekombinant sitrat sentaz enziminin afinité kromatografiden sonra %70'i elde edilmiş olup, saf enzimin spesifik aktivitesi 0.083 U/mg'dır.

Proteinlerin saflaştırma aşamaları SDS/poliakrilamid jel elektroforezi ile izlenmiştir. Afinité kromatografi ile izole edilen mutant proteinler SDS/PAGE'de tek protein bandı vermişlerdir (Mr.43,000/monomer) (Şekil 11 ve Şekil 12).

PANEL A



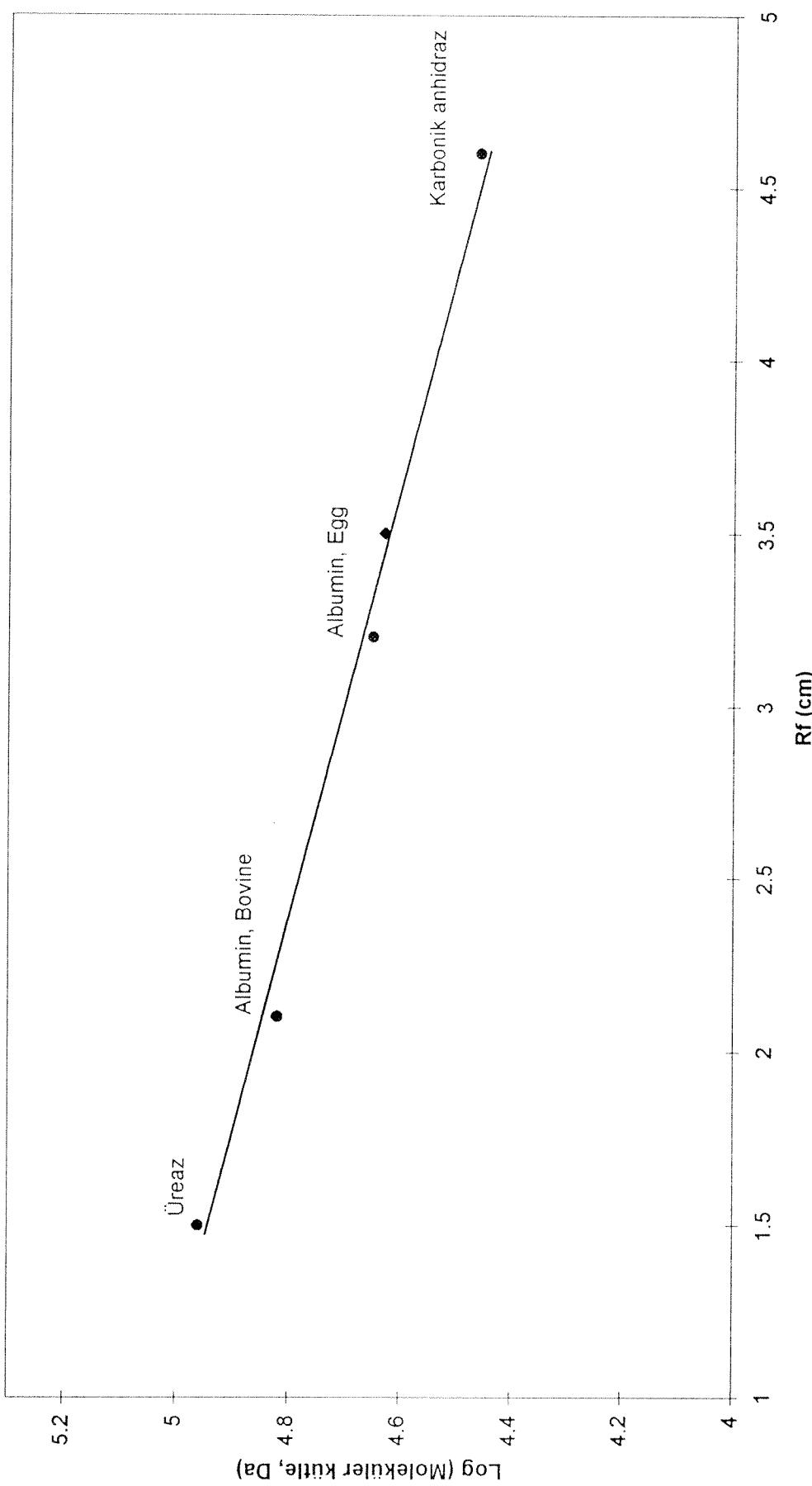
PANEL B



Şekil 11. Mutant proteinlerin SDS-PAGE'deki profilleri.

Panel A: A97S mutant *Tp*. sitrat sentaz, sıra 1: sıcaklık uygulamasından önce, sıra 2: sıcaklık uygulamasından sonra, sıra 3: afinité kromatografisinden sonra; A104T mutant *Tp*. sitrat sentaz, sıra 4: sıcaklık uygulamasından önce, sıra 5: sıcaklık uygulamasından sonra, sıra 6: afinité kromatografisinden sonra; sıra 8: G209A mutant *Tp*. sitrat sentaz afinité kromatografisinden sonra; sıra 9: Mutant olmayan *Tp*. sitrat sentaz; sıra 7: standart protein marker.

Panel B: G196V mutant *Tp*. sitrat sentaz enziminin SDS-PAGE'deki profili. Sıra 1: Afinité kromatografisinden sonra mutant olmayan *Tp*. sitrat sentaz; G196V mutant *Tp*. sitrat sentaz, sıra 2: afinité kromatografisinden sonra, sıra 3: sıcaklık uygulamasından sonra, sıra 4: sıcaklık uygulamasından önce; sıra 5: standart protein marker.



Şekil 12: Moleküler kütle kalibrasyon eğrisi. Kullanılan standart protein karışımı : Üreaz- 90,670Da (monomer),
Albumin Bovine- 66,000 Da, Albumin Egg- 45,000 Da, Karbonik anhidraz- 29,000 Da.

Tablo 1: A97S mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu

	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U)	Sp. Aktivite (U/mg)	Verim (%)
Hücre lizatı	3.0	145.5	21.7	0.149	100
Isı uygulaması (65°C'de, 15 dak)	2.7	121.2	19.5	0.161	90
Afinite	0.77	33.1	4.5	0.136	21
Kromatografisi, ve Ultrafiltrasyon					

Tablo 2: A104T mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu

	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U)	Sp. Aktivite (U/mg)	Verim (%)
Hücre lizatı	2.8	137.20	21.56	0.157	100
Isı uygulaması (65°C'de, 15 dak)	2.5	116.0	18.75	0.162	87
Afinite	1.73	77.85	15.92	0.204	74
Kromatografisi, ve Ultrafiltrasyon					

Tablo 3: G196V mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu

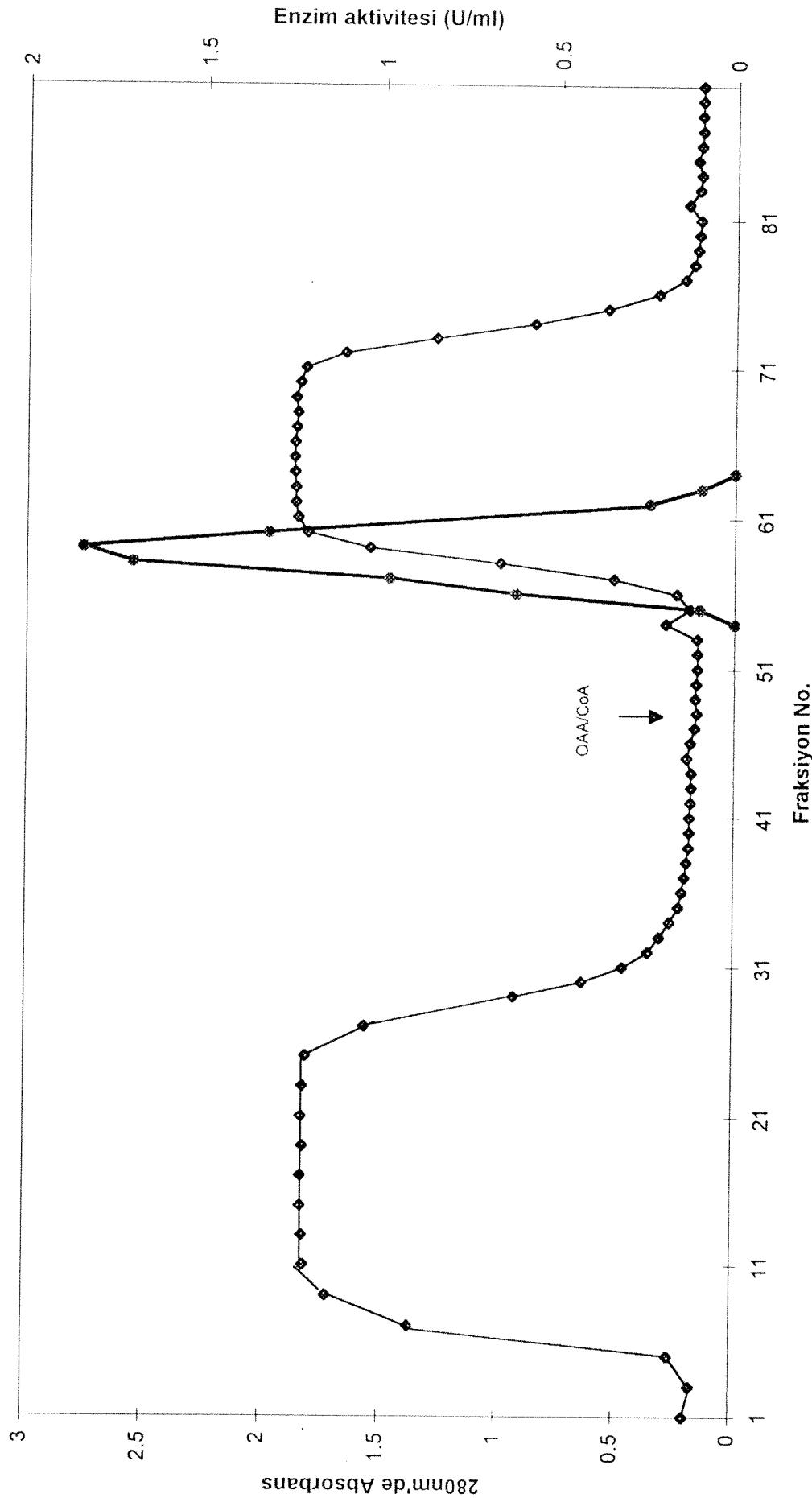
	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U)	Sp. Aktivite (U/mg)	Verim (%)
Hücre lizatı	2.00	83.4	5.5	0.066	100
Isı uygulaması (65°C'de, 15 dak)	1.80	63.0	4.5	0.071	82
Afinite	0.86	16.9	2.6	0.154	47
Kromatografisi, ve Ultrafiltrasyon					

Tablo 4: G209A mutant sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu

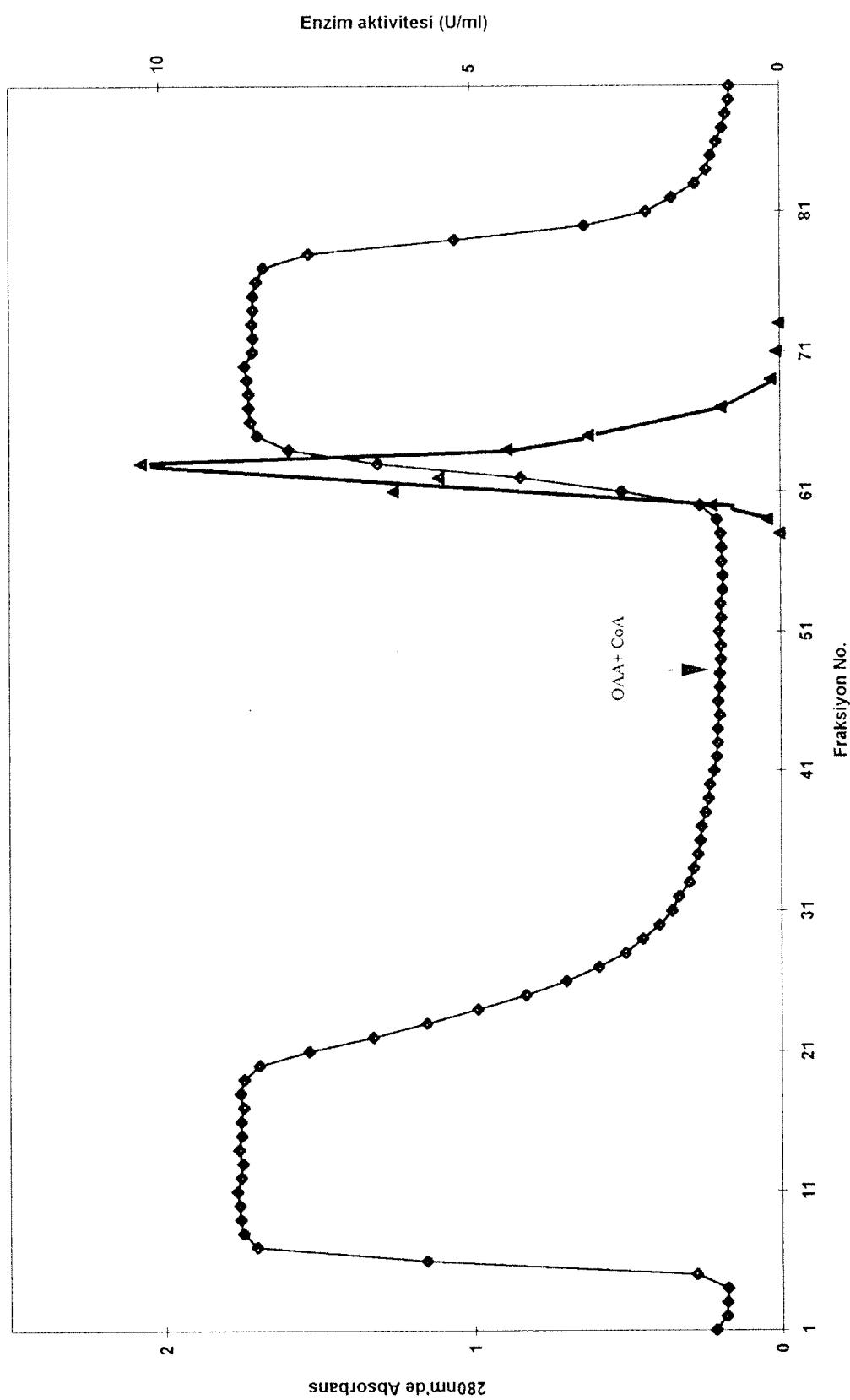
	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U)	Sp. Aktivite (U/mg)	Verim (%)
Hücre lizatı	3.25	158.0	115.2	0.730	100
Isı uygulaması (65°C'de, 15 dak)	3.00	134.4	103.7	0.772	90
Afinite	1.52	64.1	59.0	0.920	51
Kromatografisi, ve Ultrafiltrasyon					

Tablo 5: Mutant olmayan sitrat sentaz enziminin saflaştırma tablosu

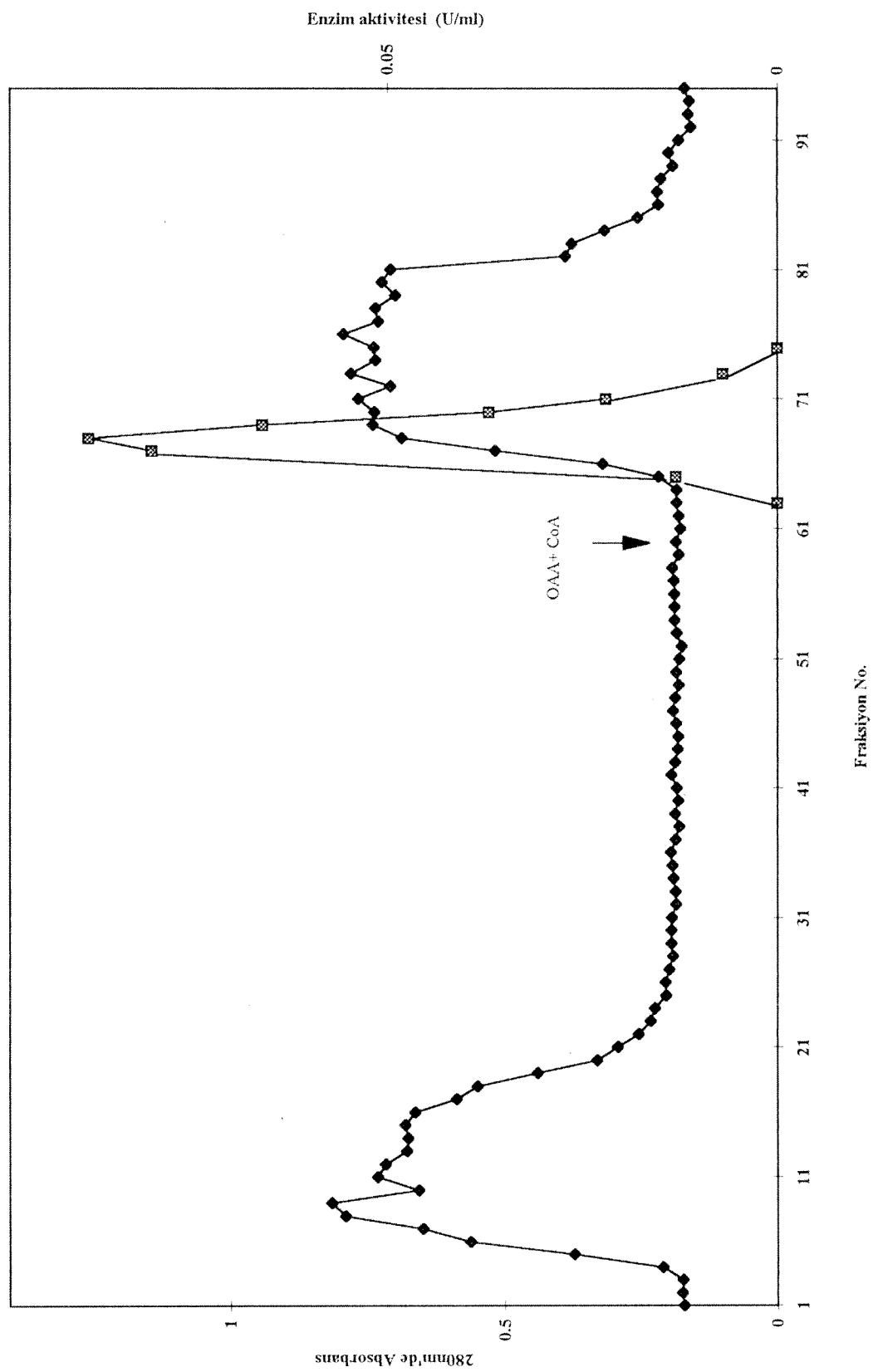
	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U)	Sp. Aktivite (U/mg)	Verim (%)
Hücre lizatı	5.20	253.6	9.20	0.036	100
Isı uygulaması (65°C'de, 15 dak)	5.00	225.9	8.45	0.037	92
Afinite	1.75	77.5	6.44	0.083	70
Kromatografisi, ve Ultrafiltrasyon					



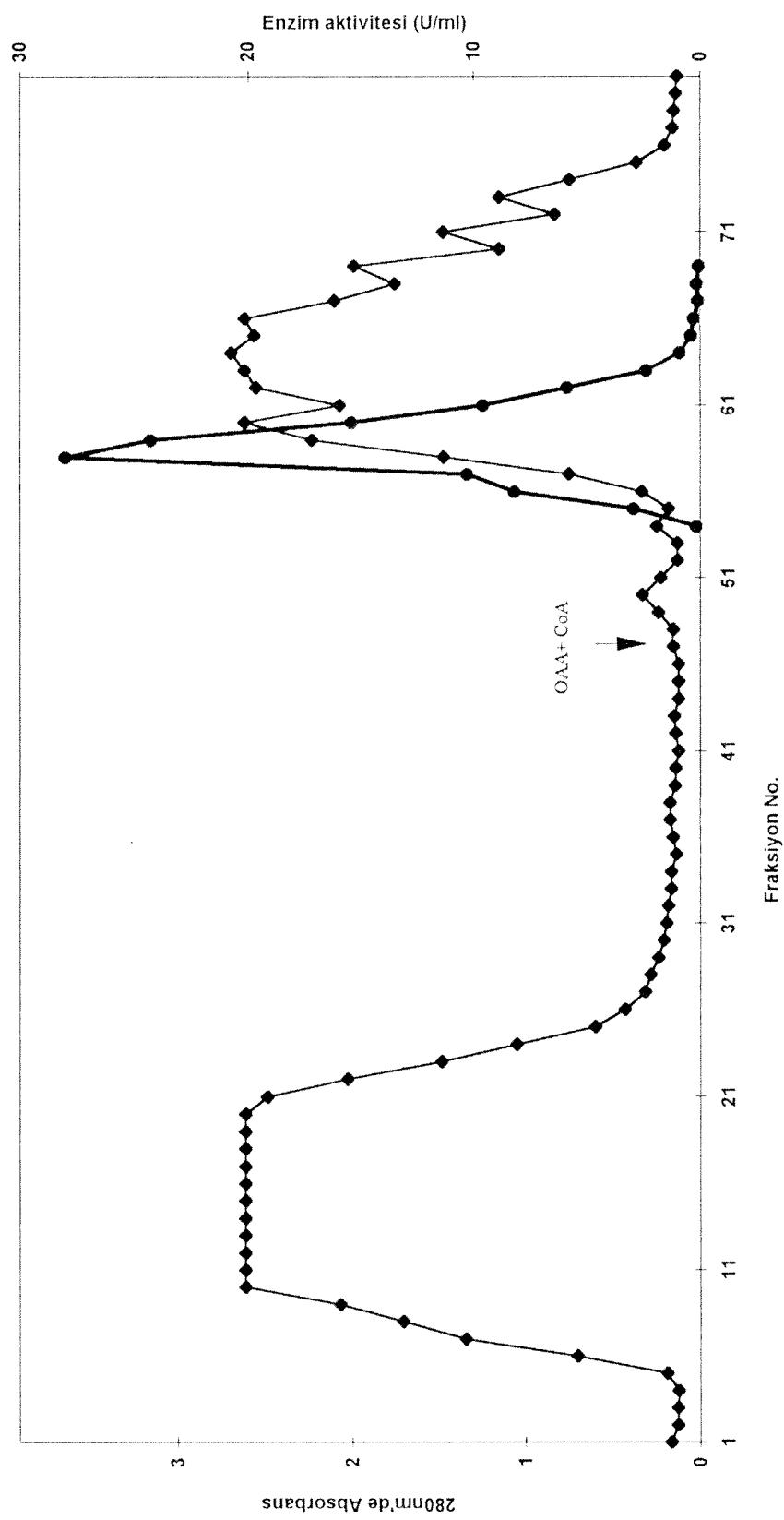
Şekil 13: A97S mutant *Tp*. sitrat sentaz affinité kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 55-63 arasındaki fraksiyonlar toplanmış ve ultrafiltrasyon ile yıkamış konsantr edilmiştir.



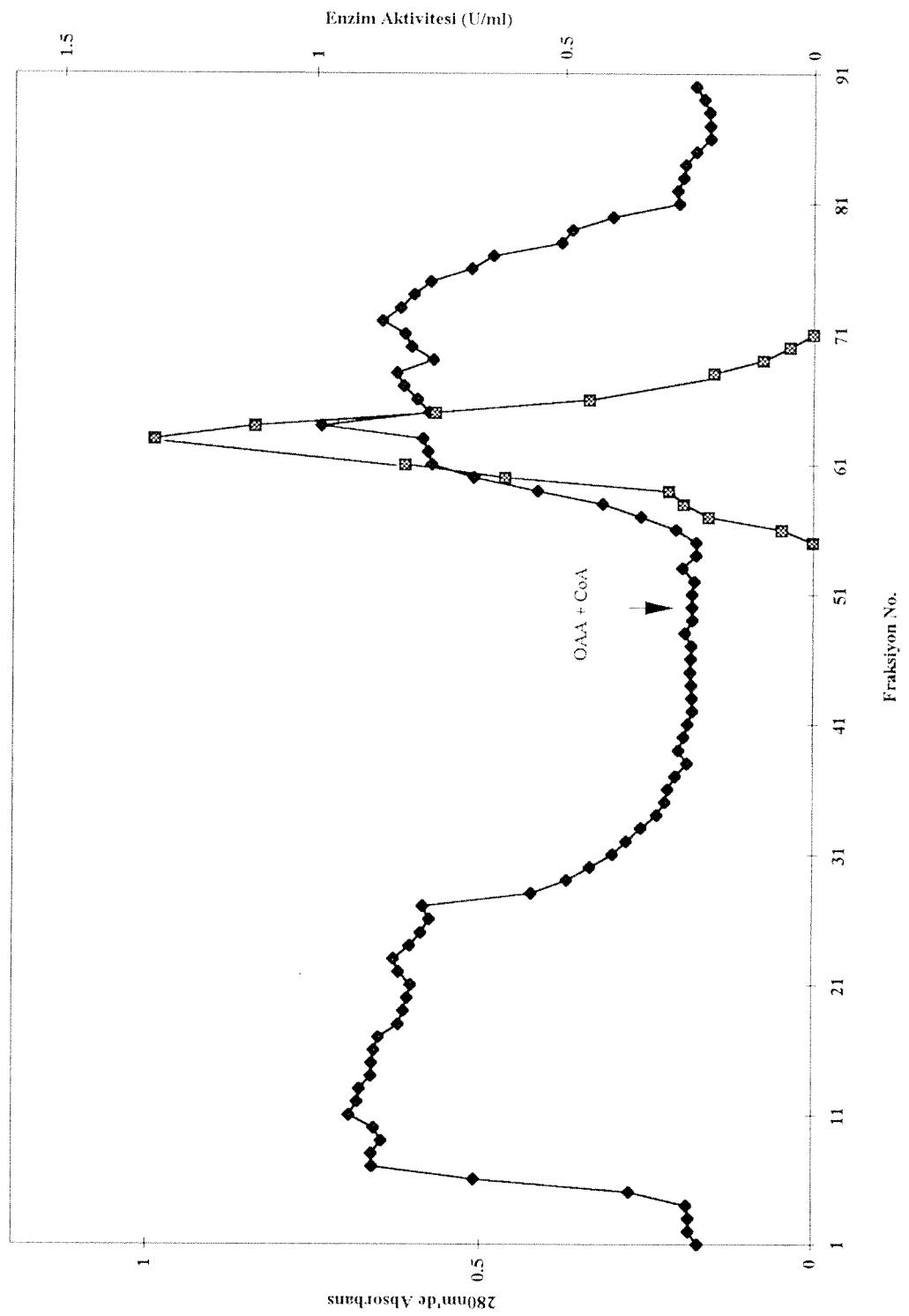
Şekil 14 : A104T mutant *Tp*. sitrat sentaz affinité kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 60-69 arasındaki fraksiyonlar toplanmış ve ultrafiltrasyon ile yıkamış konsantr edilmiştir.



Sekil 15 : G196V mutant olmayan *Tp*. sitrat sentaz affinitet kromatografisi ile saflastirilmistir. 65-73 arasindaki fraksiyonlar toplanmis ve ultrafiltrasyon ile vikanip konsantre edilmistir.



Şekil 16 : G209A mutant *Tp*. sitrat sentaz affinitet kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 54-65 arasındaki fraksiyonlar toplanmış ve ultrafiltrasyon ile yılanın konsantre edilmiştir.



Şekil 17: Mutant olmayan *Tp.* sitrat sentaz affinité kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 55-69 arasındaki fraksiyonlar toplanmış ve ultrafiltrasyon ile yılanın konsantr edilmiştir.

3.I.4. Kinetik Parametreler:

Saflaştırılmış mutant *Tp*.sitrat sentaz enzimlerinin kinetik parametreleri saptanmış ve daha önce saf rekombinant *Tp*.sitrat sentaz enzimi için saptanan değerler (Kocabiyik and Erduran, 1995) ile karşılaştırılmıştır.

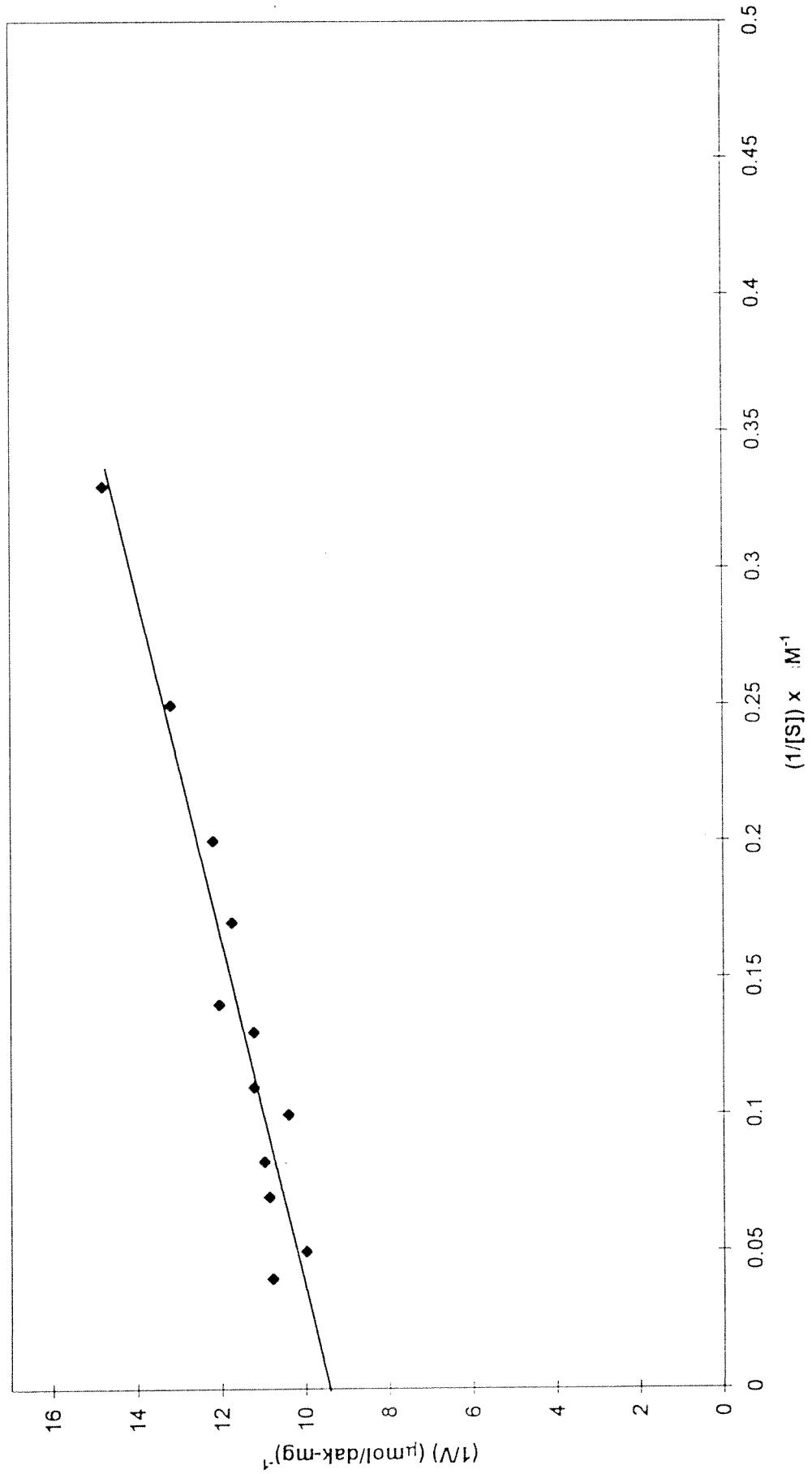
Bu amaçla, sabit tutulan asetil-KoA ($112.5 \mu\text{M}$) ya da OAA ($200 \mu\text{M}$) konsantrasyonuna karşı diğer substrat konsantrasyonu değiştirilerek aktivite ölçümleri alınmıştır. A97S, A104T, G209A enzimleri için bu aktivite ölçümlerinde sırası ile 5.67 nmol/dak ($43 \mu\text{g protein}$), 4.6 nmol/dak ($45.3 \mu\text{g protein}$) ve 9.7 nmol/dak ($42.2 \mu\text{g protein}$) enzim kullanılmıştır.

Tüm mutant enzimlerin reaksiyonu Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır. A97S, A104T, ve G209A mutant *Tp*. sitrat sentaz enzimlerinin OAA için Lineweaver-Burk eğrileri sırası ile Şekil 18 a,b, ve c'de, asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrileri sırası ile Şekil 19 a,b, ve c' de verilmiştir. Bu eğrilerden elde edilen Michaelis parametreleri Tablo 6' da verilmiştir. Bu değerler birbirini doğrulayan 3-4 tekrarın ortalamasıdır. Her 3 mutant enzimin K_m OAA ve K_m Asetil-KoA değerleri mutant olmayan enziminkine göre daha düşük olup, söz konusu 3 aminoasit değişikliği de enzimin OAA ve asetil-KoA'ya olan afinitesini arttırmıştır.

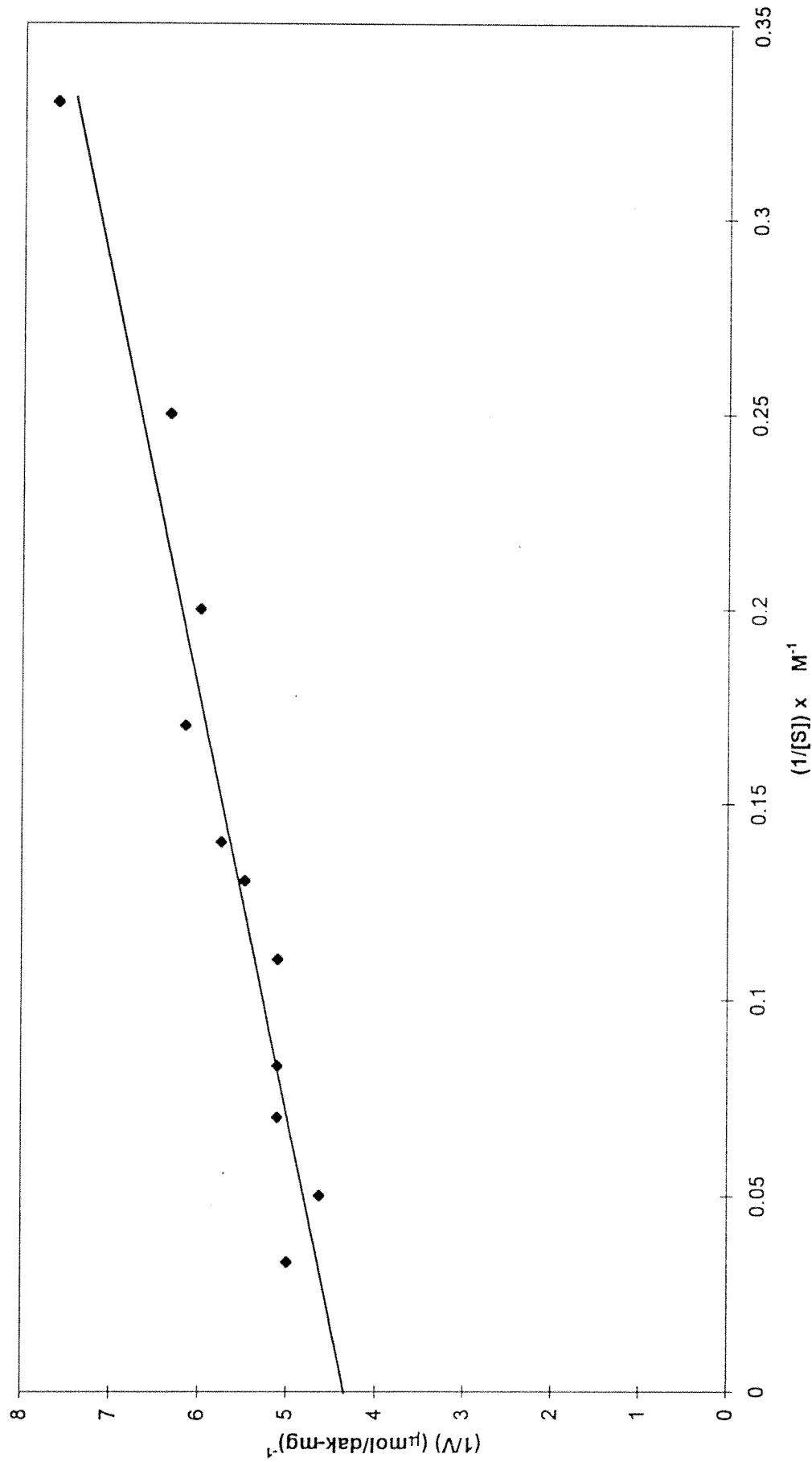
A104T ve G209A mutant enzimlerinin V_{max} (OAA) ve V_{max} (Ac-KoA) değerleri mutant olmayan enzimin değerlerinden sırası ile yaklaşık olarak 3.5 kat ve 15 kat daha yüksektir. A97S enziminin V_{max} değerlerindeki artış ise nisbeten daha azdır (~1.5 kat). A196V mutant enziminin kinetik parametreleri sadece 1 deneyle saptanmış olup, diğer enzimlerde olduğu kadar tekrar yapılmadığı için sonuçlar verilmemiştir.

3.I.5. Termostabilite analizleri:

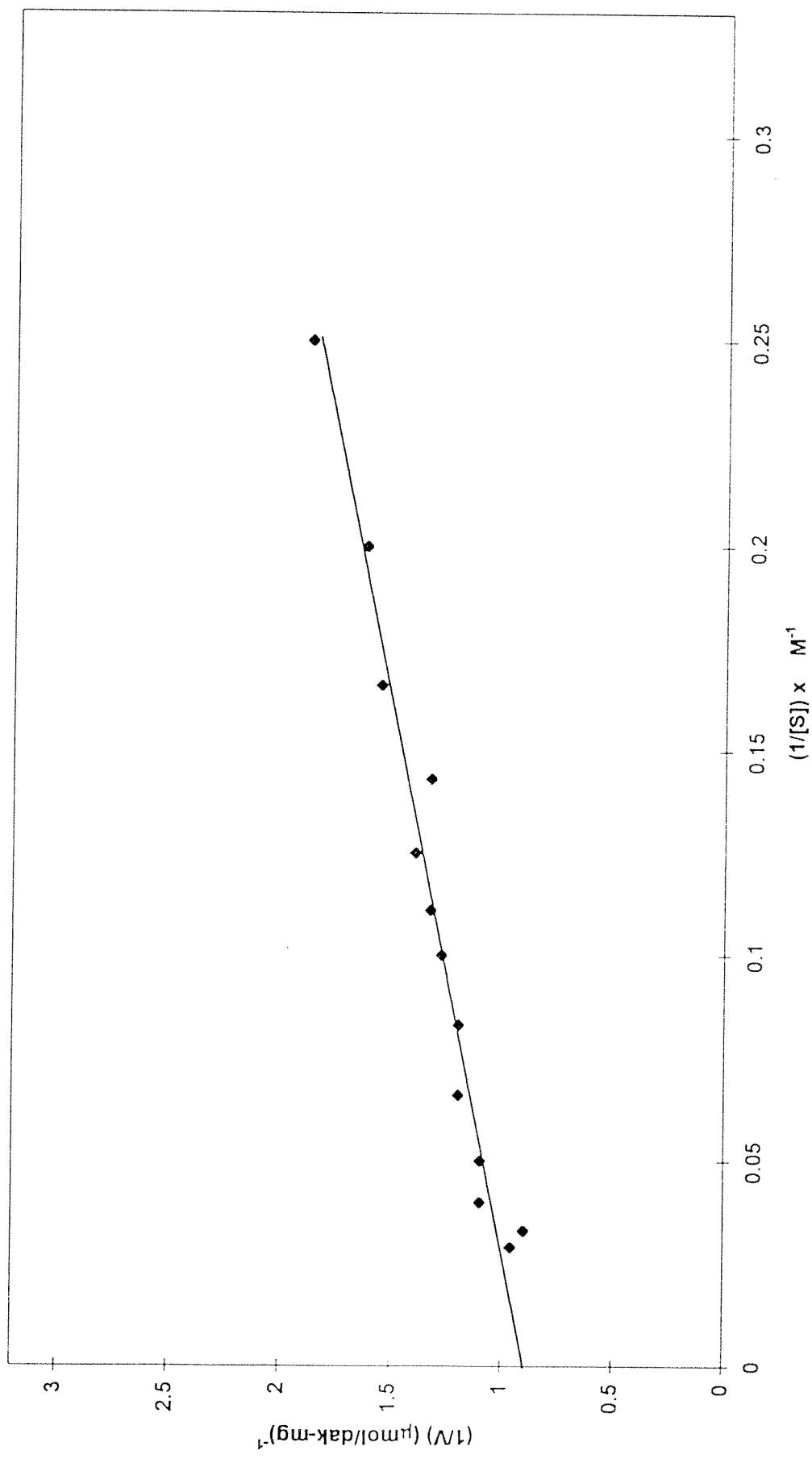
Amino asit değişikliklerinin, mutant enzimle karşılaştırılmış olarak termostabiliteye olan etkilerini incelemek üzere, mutant enzimler 55°C - 95°C arasında çeşitli sıcaklıklarda 60 dakika süre ile inkübe edilmiş ve kalan enzim aktiviteleri standart yönteme göre ölçülmüştür. Termal inaktivasyon yarı ömürleri semilogaritmik inaktivasyon eğrilerinden hesaplanmıştır (Şekil 20).



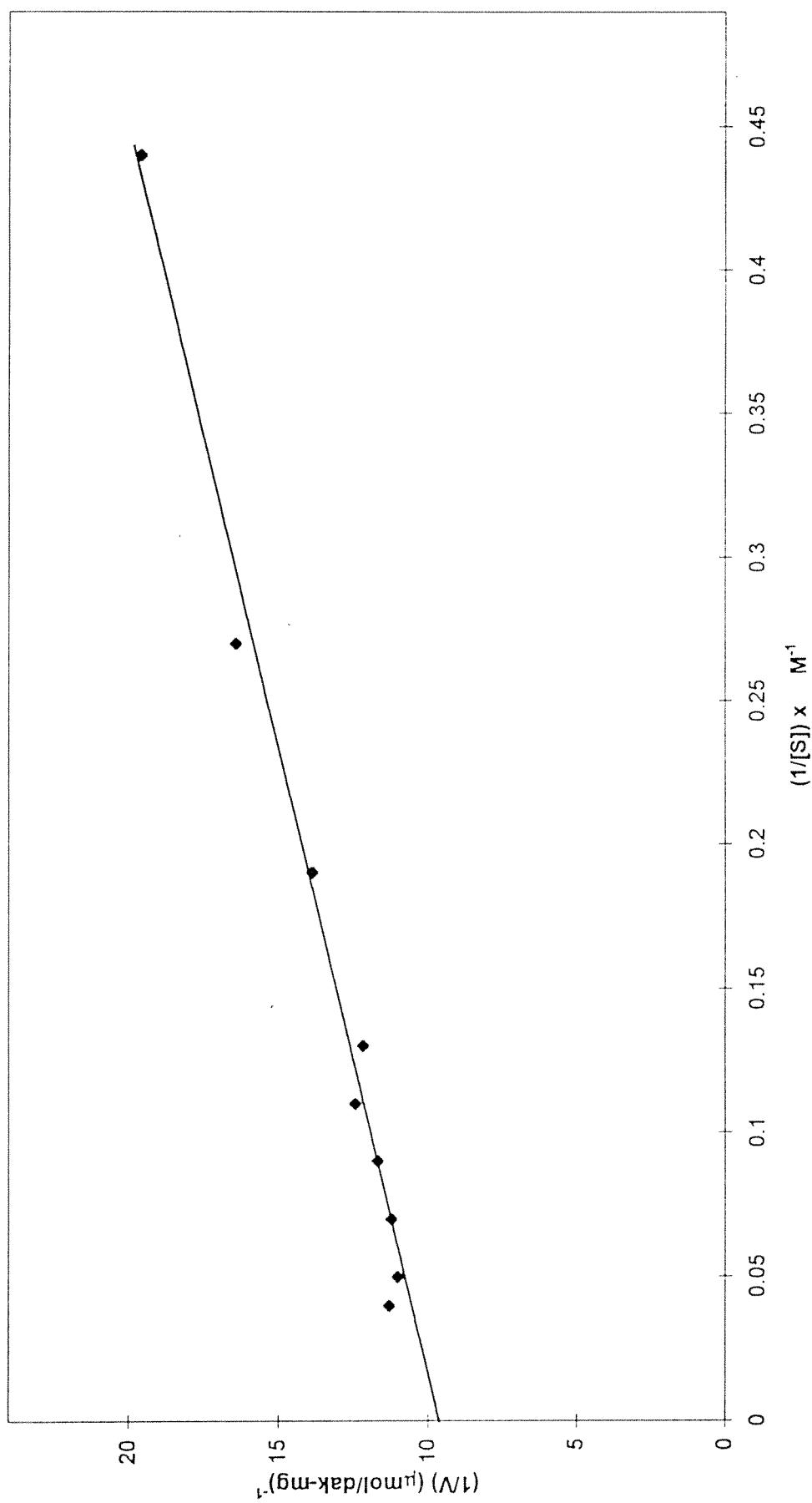
Şekil 18. a: A 97 S mutant proteinin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi



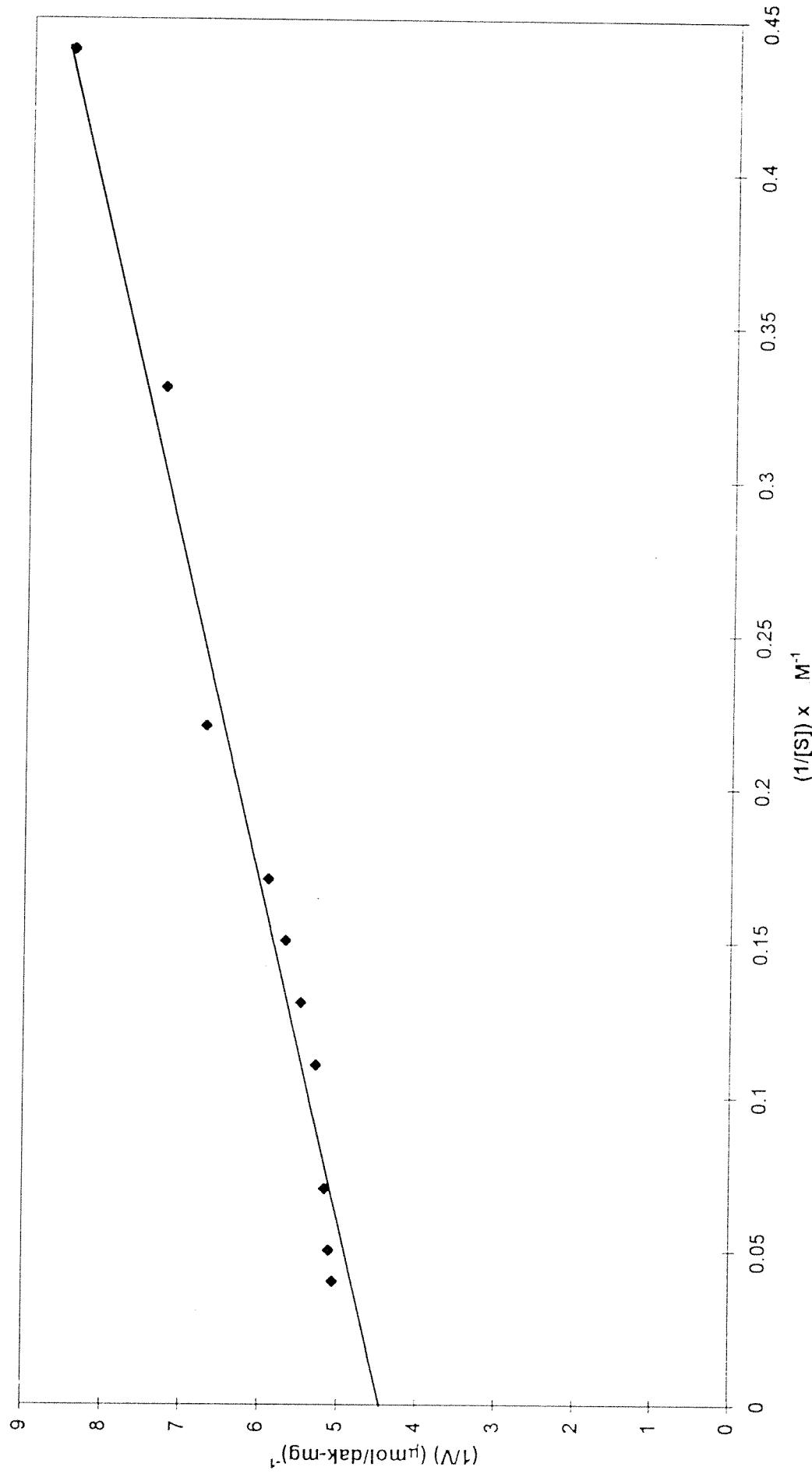
Şekil 18.b: A104T mutant proteinin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi



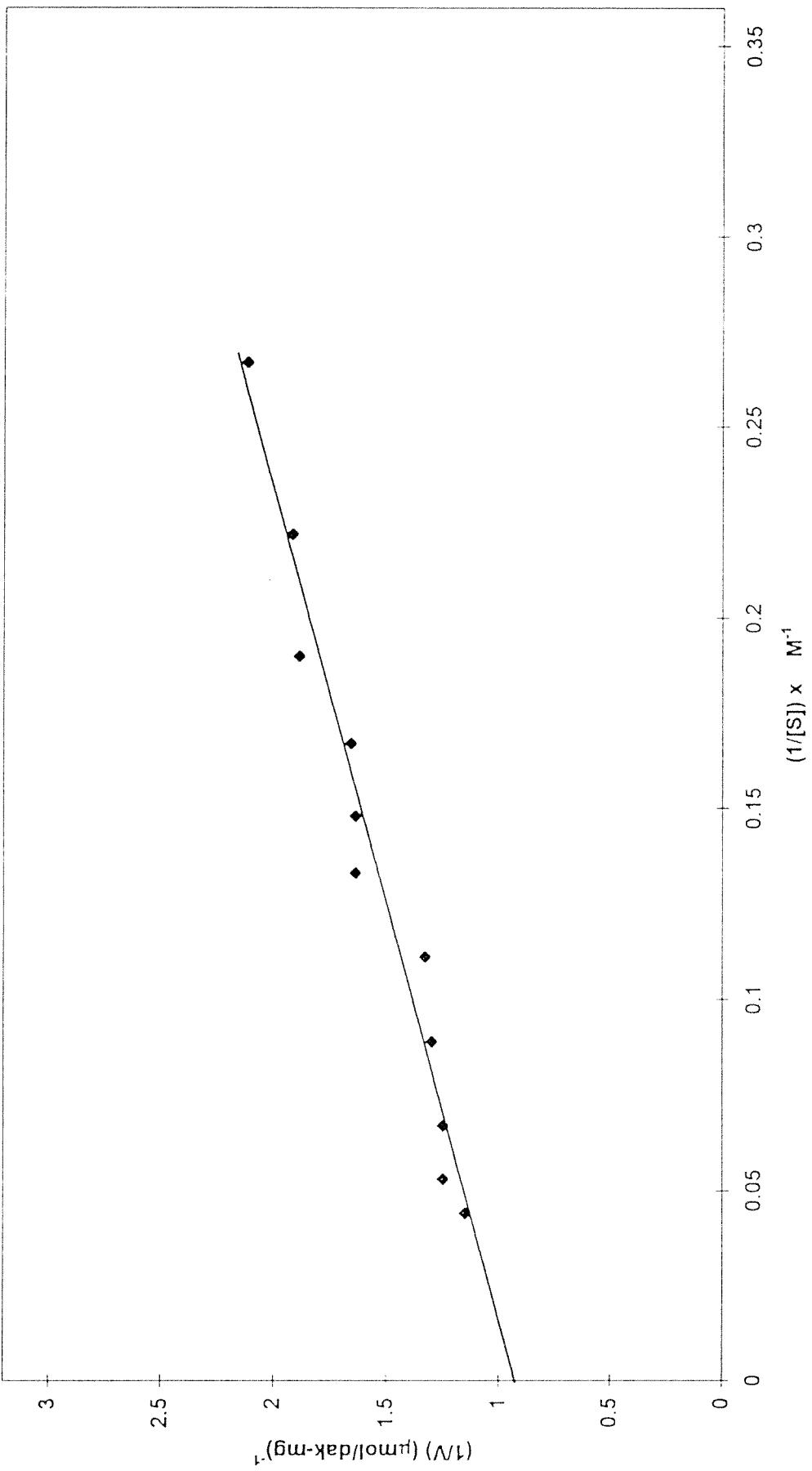
Sekil 18. c: G209A mutant proteinin OAA için Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil19.a: A97S mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 19.b: A104T mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi.

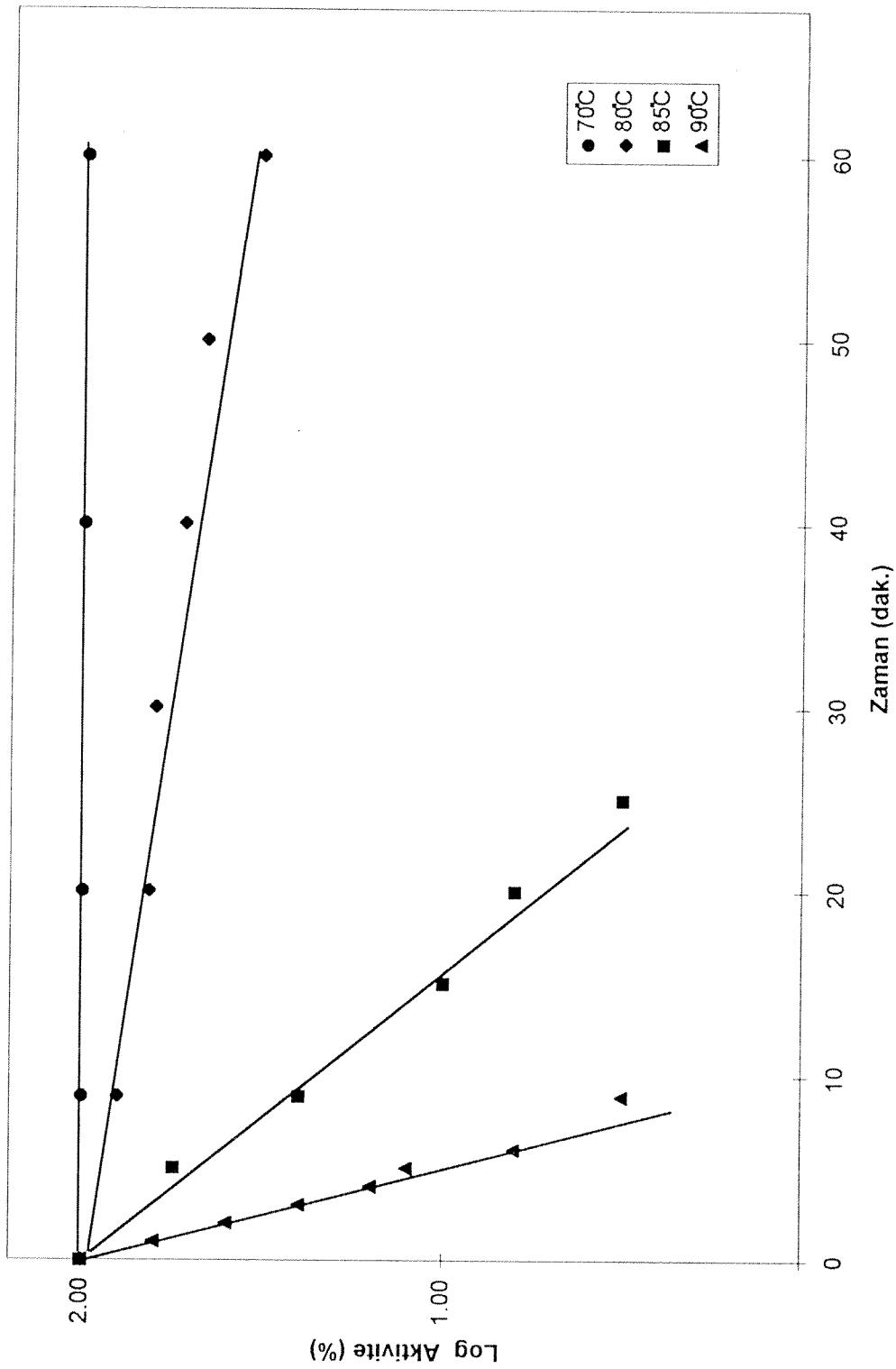


Şekil 19.c: G209A mutant sitrat sentaz enziminin asetil-KoA için Lineweaver-Burk eğrisi

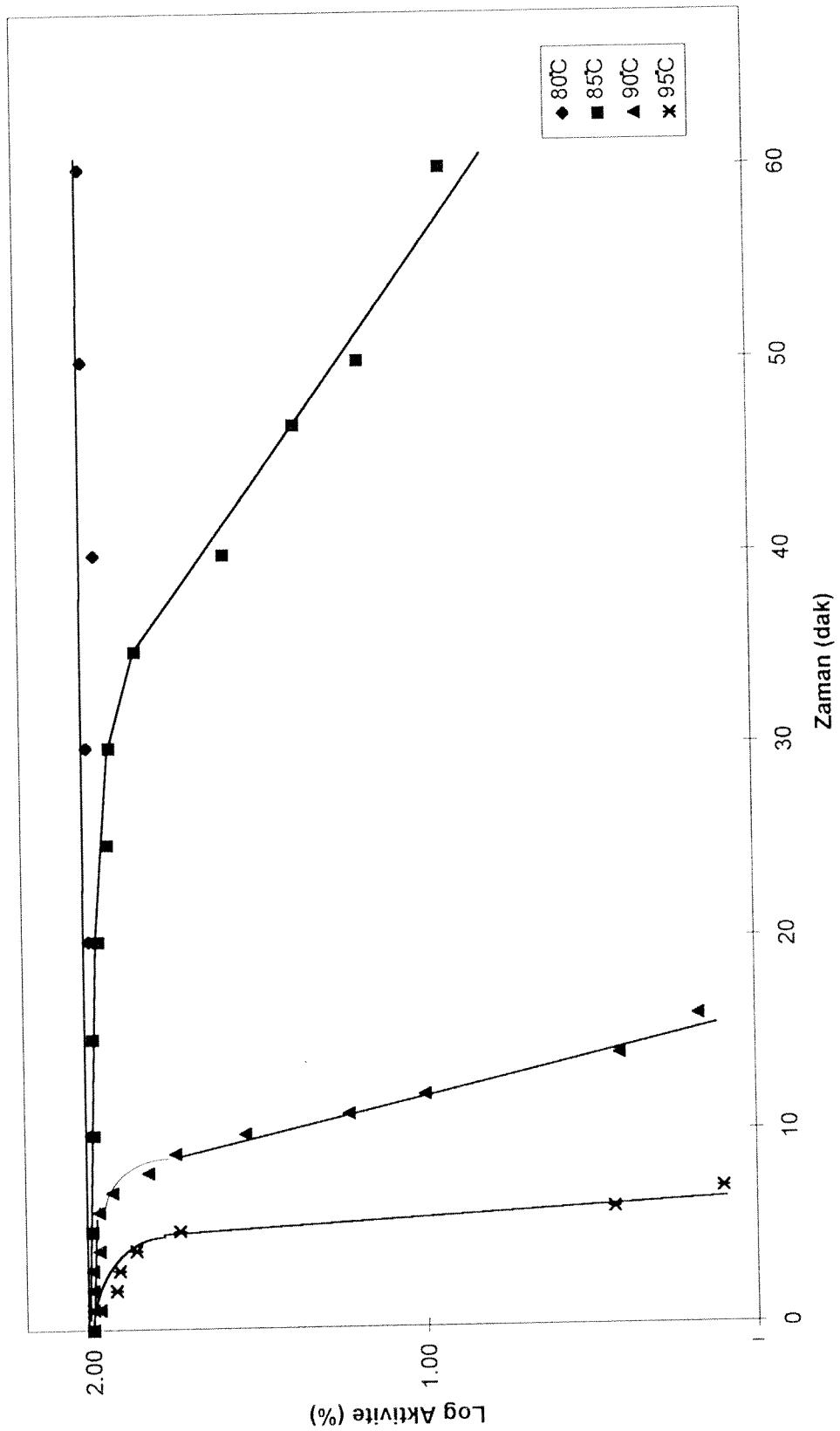
Tablo 6. Mutant ve mutant olmayan *Tp.sitrat sentaz* enzimlerinin termostabilite ve katalitik özellikleri

<i>Tp. acidophilum</i>	Sitrat Sentaz	K _m (μM)		V _{max} (μmoles/ml/min)		t ½ (dak)		
		OAA	AcCoA	OAA	AcCoA	80°C	85°C	90°C
Mutant olmayan*		7.7	10.6	3.16	2.94	10.0	2.5	< 1.0
A97S mutant		2.7	2.4	4.70	4.50	45.0	5.0	1.5
A104T mutant		2.5	2.4	10.50	10.50	>60.0	35.0	7.0
G209A mutant		4.0	4.3	44.42	44.42	>60.0	57.5	9.0

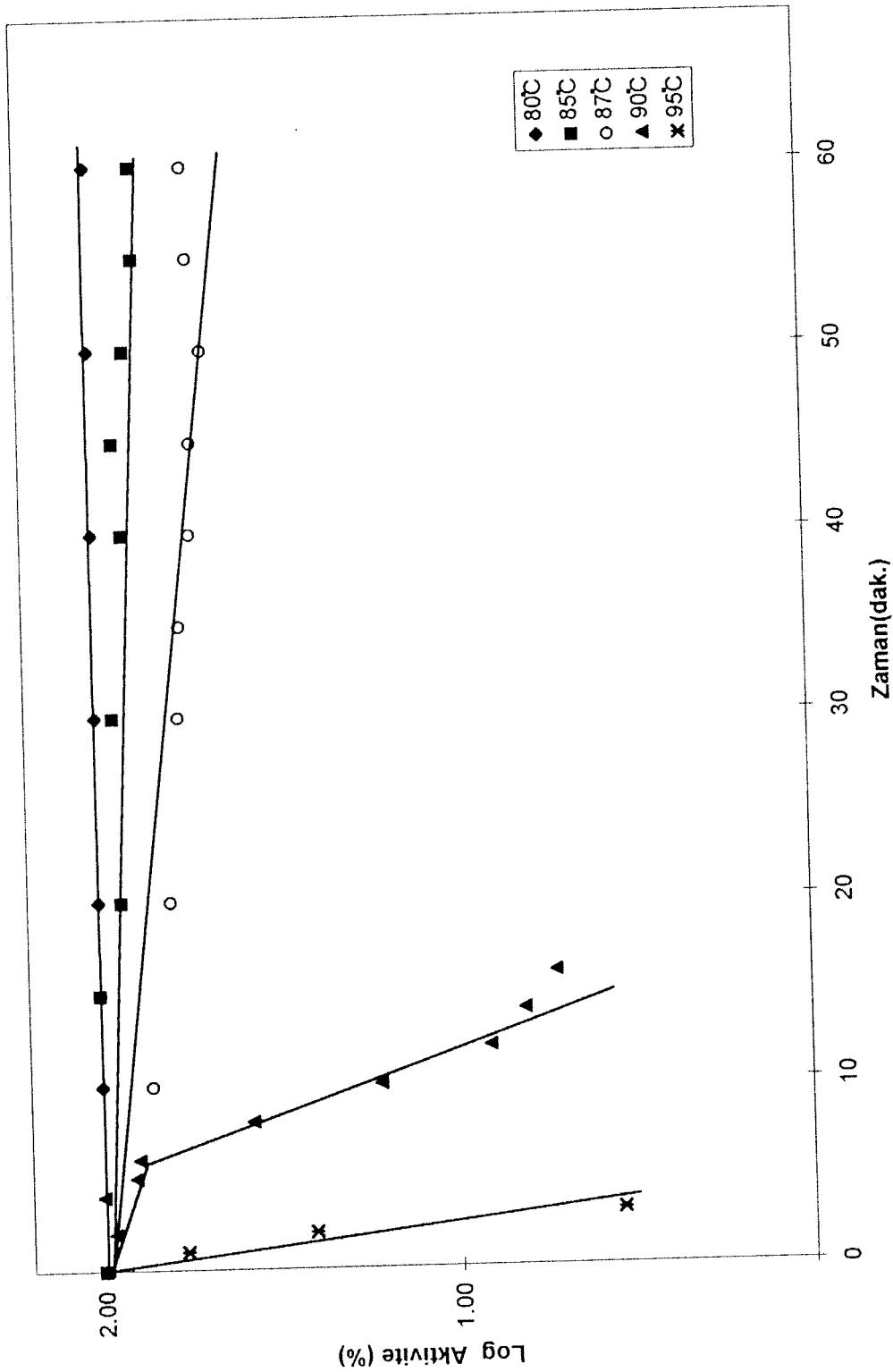
* Kinetik parametereler Kocabıyık *et al.* (1996)'dan alınmıştır.



Sekil 20 (a): A97S Mutant *Tp*. sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi

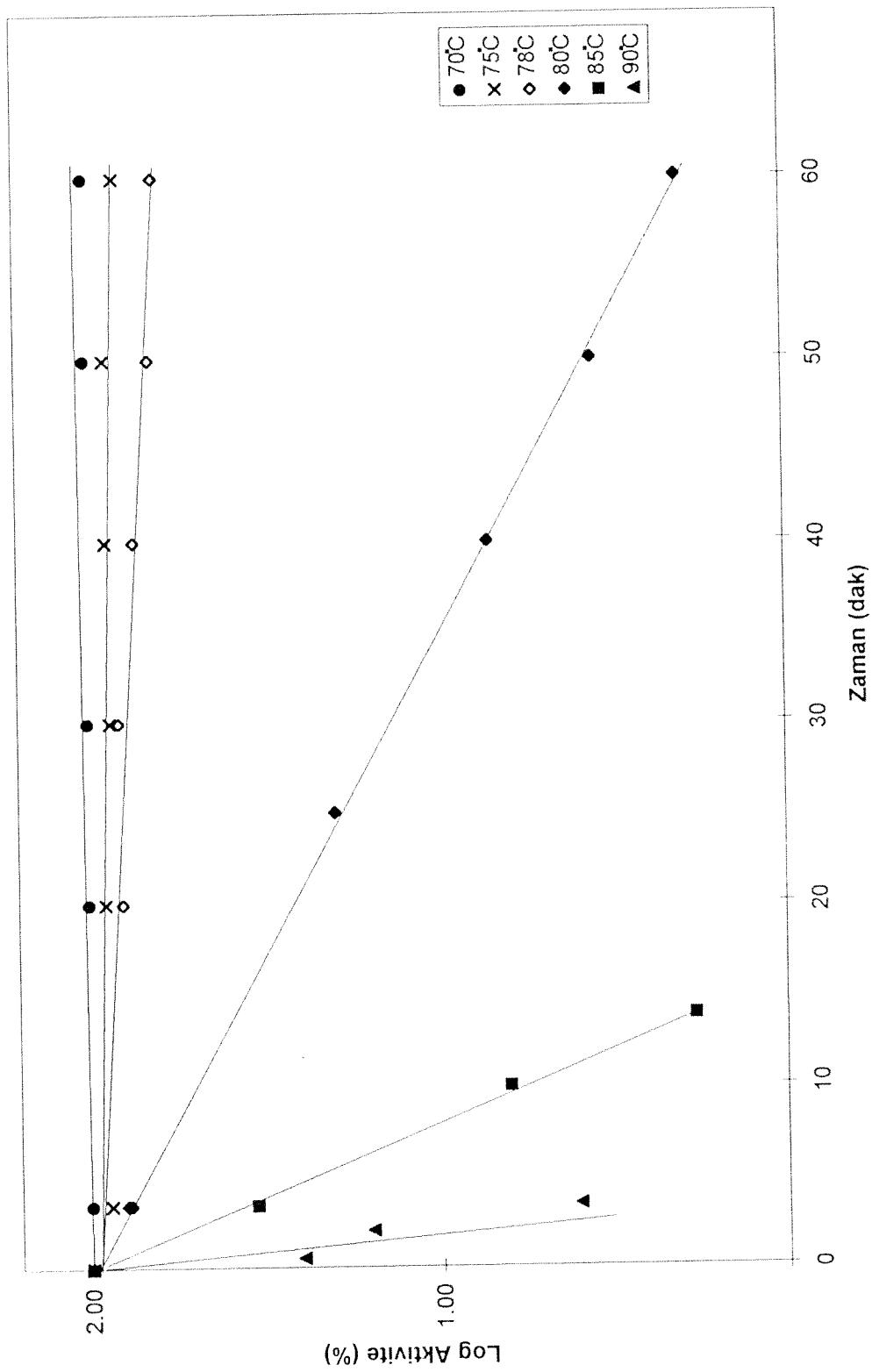


Şekil 20 (b): A104T Mutant T_p . sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi



Şekil 20 (c): G209A Mutant *Tp*. sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi

Şekil 20 (d): Mutant olmayan T_p . sitrat sentaz enziminin termal inaktivasyon eğrisi



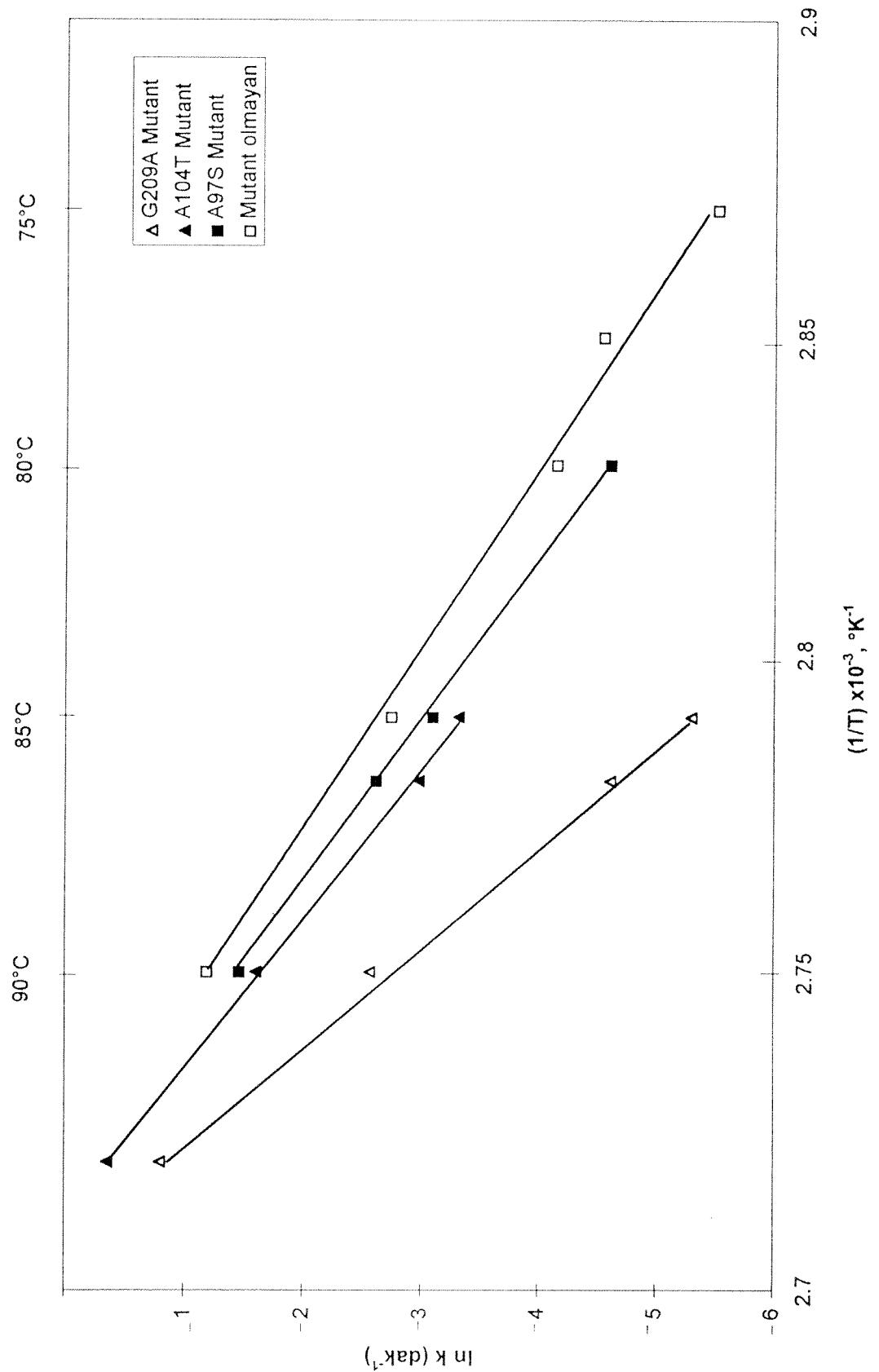
Termal stabilitelerinde önemli ölçüde artış görülen A97S ve A104T mutant enzimlerinin termal inaktivasyonları, yavaş (1. faz) ve hızlı (2. faz) olmak üzere 2 faz göstermektedir. Bu iki enzimin Arrhenius grafiklerinin çizimi için gerekli olan k değerleri hızlı fazı (2. faz) temsil eden inaktivasyon eğrilerinin eğiminden hesaplanmıştır.

Mutant olmayan enzimle karşılaştırıldığında A97S, A104T ve G209A enzimlerinin termostabilitesinde artış olduğu görülmüştür. Her 3 mutant enzimin termal inaktivasyon deneyleri 3 ila 5 kez tekrarlanmıştır. 85°C'de mutant olmayan *Tp.sitrat* sentaz, A97S, A104T ve G209A mutant enzimlerinin yarı ömürleri sırası ile 2.5 dak, 5.0 dak, 35 dak ve 57.5 dak olarak bulunmuştur.

Mutant enzimlerin termal stabilitesindeki artışı Arrhenius eğrilerinden de görmek mümkündür (Şekil 21). A197V mutant enzimin termostabilite deneyleri sadece 1 kez yapmak mümkün olduğu için sonuçlar verilmemiştir.

3.2. Enzim İçoyuklarının Doldurulması ile İlgili Mutasyonlar:

Tp. acidophilum sitrat sentaz enziminin iç oyuklarının boyutlarının küçültülmesi amacı ile, enzimin 3 boyutlu yapısının bilgisayar grafik analizi ile amino asit değişiklikleri yapmak için hedef alacağımız pozisyonlar saptanmıştır. Bölgeye özel mutasyon yöntemi ile, enzimin 343. pozisyonundaki Serin'in Terionin ile, 346. pozisyonundaki Terionin'in Tirosin ile yer değiştirmiştir. Böylece oluşturulan 2 mutant proteinin (S343T ve T346Y) enzimin aktivitesinin çok düşük olması nedeniyle etkin bir izolasyon ve detaylı bir karakterizasyon mümkün olamamıştır.



Şekil 21: Mutant ve mutant olmayan T_p . sitrat sentaz enzimlerinin Arrhenius eğrisi

Tartışma:

Tp. sitrat sentaz enziminin ısıya dayanıklı olması enzimin izolasyonunda ısı uygulamasının ilk aşama olarak kullanılmasına ve ısıya duyarlı *E.coli* proteinlerinin eliminasyonuna olanak sağlamıştır. Archaea orijinli enzimi taşıyan rekombinant *E.coli* hücrelerinin lizatları 65°C 'de 15 dak ıstıldığında konukçu proteinlerinin önemli bir kısmı denatüre olarak çökerken, mutant ya da mutant olmayan *Tp.* sitrat sentaz enzimlerinin aktivitesinde önemli bir kayıp olmamıştır. Daha sonra enzim saflaştırması biyoafinite kromatografi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen enzimlerin homojenliği SDS-poliakrilamid jel elektroforez ile gösterilmiştir.

Mutant olmayan ve mutant sitrat sentaz enzimleri SDS-PAGE'de aynı pozisyonda bant vermiş olup alt ünite moleküller ağırlığı 43,000 Da'dur. Bu sonuçlar Smith et al., (1987); Southerland et al., (1990) ve Kocabiyik et al., (1996) tarafından daha önce orijinal ve rekombinant *Tp.* sitrat sentaz enzimi için rapor edilen değerlerle uyuşmaktadır.

Gly209 → Ala değişikliği, enzimi bu pozisyonda hipertermofilik enzime (*Pf.*sitrat sentaz) benzetmek üzere yapılmış olup termostabiliteyi önemli ölçüde arttırmıştır. Gly209 grubu interfazdaki bir α -helix üzerinde yer almaktır. Ala ile yer değiştirmesinin dimer interfazında hidrofobisiteyi artırmak ve söz konusu α -helix'i stabilize etmek suretiyle enzimin termostabilitesini artırması olasıdır. Enzimlerin belirli gruplarının bölgeye özel mutasyon yöntemi ile hidrofobisitesi yüksek amino asitler ile yer değiştirmesi durumunda termostabilitelerinin arttığı diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Kellis et al., 1989; Matsumura et al., 1989; Imanaka et al., 1986).

Diğer taraftan Ala97 → Ser ve Ala104 → Thr değişiklikleri ile *Tp.* sitrat sentaz enzimi interfazda mezofilik sitrat sentaz enzime (domuz kalp dokusunda elde edilen) benzetilmiştir. Bu amino asit değişiklikleri enzimin dimer interfazındaki hidrofobik boşlukta tolere edilebildiği gibi, aynı zamanda enzimin stabilitesini de artırmıştır. Bu etkide, alanin ile yer değiştiren amino asitlerin daha büyük yan grupları dolayısı ile interfazdaki boşluğun dolması ve daha iyi bir monomer-monomer paketlenmesinin rol oynaması mümkündür. Yapı analizi de mezofilik domuz sitrat sentaz enziminden,

hipertermofilik *Pf.* sitrat sentaz enzimine doğru gidildikçe, monomer-monomer etkileşim yüzeyindeki interaksiyonun daha iyileştiğini ve sıkı bir paketlenmenin olduğunu ortaya koymaktadır (Russel *et al.*, 1997). Gly → Ala yer değişikliği ile benzer etkiler *B.stearothermophilus* nötral proteaz (Imanaka *et al.*, 1986) ve *T.thermophilus* 3-isopropil malat dehidrogenaz enziminde de gözlenmiştir (Kotik ve Zuber, 1992).

Elde ettiğimiz sonuçlar, Ala97 → Ser, Ala 104 → Thr ve Gly209 → Ala mutasyonlarının *Tp.* sitrat sentaz enziminin termostabilitesini arttırmak, aynı zamanda katalitik özelliklerini de iyileştirdiğini göstermiştir. Bu amino asit değişikliklerinin, enzimin aktif bölgesini, ya lokal konformasyonel değişikliklere yol açarak ya da daha iyi monomer-monomer interaksiyonu sağlamak suretiyle etkilemesi olasıdır. Bunlardan ikinci olasılık, sitrat sentaz enziminin her 2 monomerinde aktif bölgeye katkısı olması ve enzimin dimerik formunun fonksiyonel aktif formu olması nedeniyle ağırlık kazanmaktadır (Russell *et al.*, 1994).

Sonuç olarak, protein monomer-monomer interfazında interaksiyonu güçlendirmek üzere yapılacak amino asit değişiklikleri protein termostabilitesini arttırmada geniş olanaklar sağlamaktadır. Bu bölgede hidrofobisiteyi artıracak mutasyonlar kadar, daha sıkı paketlenmeyi mümkün kıracak, yan grupları daha büyük amino asitlerin sokulmasını sağlayan mutasyonların da enzimlerin ısiya dayanıklılıklarını arttırmada önemli olduğu tahmin edilmektedir.

Monomer-monomer interaksiyonunu güçlendirmek yolu ile mezofilik proteinlerin genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak termofilik hale getirilmeleri mümkündür. Bu tezimizi, elde ettiğimiz sonuçlara ek olarak daha da güçlendirmek üzere izole ettiğimiz A197V enziminin karakterizasyonunu tamamlamak ve birden fazla mutasyon içeren yeni mutant proteinler oluşturmak için araştırmalarımız devam etmektedir.

Referanslar:

- Adams, M.W.W., Enzymes and Proteins from Organisms That Grow Near and Above 100°C. Annual Review of Microbiology, 47, 627-658, (1993).
- Amaki, Y., Nakano,H., Yamane,T., Role of Cysteine Residues in Esterase from *Bacillus stearothermophilus* and Increasing its Thermostability by the Replacement of Cysteines. Applied Microbiology an Biotechnology, 40, 664-8, (1994).
- Burley, S.K., Petsko, G.A., Aromatic-Aromatic Interaction: A mechanism of Protein Structure Stabilization. Science, 229, 2328,(1985).
- Colacino, F. and Crichton, R.R., Enzyme Thermostabilization: The State of Art. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 14, 211-275, (1997).
- Daniel, R.M., The Upper Limits of Enzyme Thermal Stability. Enzyme and Microbial Technology, 19, 74-79, (1996).
- Dill, K.A., Dominant Forces in Protein Folding. Biochemistry, 29, 7133-7155, (1990).
- Ganter, C., Plückthun, A., Glycine to Alanine Substitutions in the Helices of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase: Effects on Stability. Biochemistry, 29, 9395-402, (1990).
- Eijsink, V.G.H., Dijkstra, B.K., Vriend, G., van der Zee, J.R., Veltmen, O.R., van der Vinne, B., van der Burg, B., Kempe, S., Venema, G., The Effect of Cavity-filling Mutations on the Thermostability of *Bacillus stearothermophilus* Neutral Protease. Protein Engineering, 5, 421-426, (1992).
- Erduran, İ. and Kocabiyık, S., Purification of the Recombinant Cysteine-43 Mutant of Citrate Synthase from *Thermoplasma acidophilum* and its Modification by 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid). Turkish Journal of Biochemistry, 4, 11-21, (1996).
- Hardy, F., Vriend, G., Veltman, O.R., vander Vinne, B., Venema, G. And Eijsink, V.G.H., Stabilizatin of *Bacillus stearothermophilus* Neutral Protease by Introduction of Prolines. FEBS, 317, 89-92, (1993).
- Hough, D.W. and Danson, M.J., A Review: Archaeabacteria: Ancient Organisms with Commercial Potential. Letters in Applied Microbiology, 9, 33-39, (1989).
- Imanaka, T., Shibasaki, M., Takagi, M., A New Way of Enhancing the Thermostability of Proteases. Nature, 324, 695-697, (1986).
- Imoto, T., Review: Stabilzation of Protein. Cellular and Molecular Life Sciences, 215, 223, (1997).

Isikawa, K., Nakamura, H., Morikawa., Kanaya, S., Stabilization of *Escherichia coli* Ribonuclease H1 by Cavity-Filling Mutations within a Hydrophobic Core. Biochemistry 32, 6171-8, (1993).

Jaenicke, R.H., Schuring, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R, Structure and Stability of Hyperstable Proteins: Glycolytic Enzymes from Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga Maritima*. Advances in Protein Chemistry ,48, 282-96, (1996).

Karpasas, M., Baase,W.A., Matsumura, M., Matthews,B.W., Hydrophobic Packing in T4 Probed by Cavity-Filling Mutants. Proceedings of National Academy of Science USA, 86, 8237-41,(1989).

Kellis, Jr J.T., Nyberg, N., Fersht, A.R. Energetics of Complementary Side-chain Packing in a Protein Hydrophobic Core. Biochemistry, 28, 4914-4922, (1989).

Kocabiyik, S. ve Perlin, S. Site-Specific Mutations of Conserved C-Terminal Residues in Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II: Phenotypic and Structural Analysis of Mutant Enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications 185, 925-931, (1992).

Kocabiyik, S., Erduran, İ., Russell, R.J.M., Danson, M.J., Hough, D.W., The Effect of Cysteine-43 Mutation on Thermostability and Kinetic Parameters of Citrate Synthase from *Thermoplasma acidophilum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 224, 224-228, (1996).

Kotik, M. And Zuber, H., Evidence for Temperature-Dependent Conformational Changes in the L-Lactate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochemistry, 31, 7787-7795, (1992).

Kunkel, T.A., Roberts, J.D. Zakour, R.A., Rapid and Efficient Site-specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. Methods in Enzymology 154, 376-382, (1987).

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head Bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685, (1970).

Lasa, I and Berenguer, J., Thremophilic Enzymes and Their Biotechnological Potential. Microbiologia SEM ,9, 77-89, (1993).

Lebbink, J.H.G., Eggen, R.L.L., Geerlig, A.C.M., Consalvi, V. Chiaraluce, R. Scandurra, R.de Vos, W.M., Exchange of Domains of Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and the Mesophilic Bacterium *Clostridium difficile*: Effects On Catalysis, Thermoactivity and Stability. Protein Engineering, 8, 1287-1294, (1995).

Matsumura, M., Wozniak, J.A., Dao-pin, S., Matthews, B.W., Structural Studies of Mutants of T4 Lysozyme that Alter Hydrophobic Stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 16059-16066, (1989).

Menendez-Arias, I. and Argos, P., Engineering Protein Thermal Stability: Sequence Statistics Point to Residue Substitutions in α -helices. *Journal of Molecular Biology*, 206, 397-406, (1989).

Moriyama, H., Onodera, K., Sakurai, M., Tanaka, N., Kagawa, H., Oshima, T., Katsume, Y., The Crystal Structures of Mutated 3-isopropylmalate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 and their Relationship to the Thermostability of the Enzyme. *Journal of Biochemistry* 117, 408-413, (1995).

Mozhaev, V.V., Mechanism-based strategies for Protein Thermostabilization. *TIBTECH*, 11, 88-94, (1993).

Muir, J.M., Russell, R.J.M., Hough, D.W., Danson, M.J. Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archeon, *Pyrococcus furiosus*. *Protein Engineering* 8 (6), 583-592, (1995).

Nicholson, H., Tronrud, D.E., Becktel, W.J., Matthews, B.W., Analysis of the Effectiveness of Proline Substitutions and Glycine Replacements in Increasing the Stability of Phage T4 Lysozyme. *Biopolymers*, 32, 1431-1441, (1992).

Numata, S., Muro,M., Akutsu,N., Nosoh,T., Yamagishi,A., Oshima,T., Thermal Stability of Chimeric Isoproylmalate Dehydrogenase Genes Constructed from a Thermophile and a Mesophile. *Protein Engineering*, 8, 39-43, (1995).

Pace, C.N., Evaluating Contribution of Hydrogen Bonding to Protein Folding. *Methods in Enzymology*, 259, 538-554, (1995).

Perry, L.J., Wetzel, R., Disulfide Bond Engineered into T4 Lysozyme: Stabilization of the Protein Toward Thermal Inactivation. *Science*, 226, 555-7, (1984).

Querol, E., Perez-Pons, J.A., Mozo-Villarias,A., Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability. *Protein Engineering*, 9:265-71, (1996).

Reeve, J.N., Thermophiles in New Zealand. *AMS News* ,60 (10), 541-5, (1994).

Russell, R.J.M., Hough, D.W., Danson, M.J., Taylor, G.L. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Thermophilic Archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure* 2, 1157-1167, (1994).

Russell, R.J.M. ve Taylor, G.L. Engineering Thermostability: Lessons from Thermophilic Proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 370-374, (1995).

Sambrooke, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition (1989).

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA Sequencing with Chain Termination Inhibitors. Proceedings of National Academy of Science USA 74, 5463-5467, (1977).

Smith, L.D., Stevenson, K.J., Hough, D.W., Danson, M.J., Citrate Synthase from the Thermophilic Archaeabacteria *Thermoplasma acidophilum* and *Sulfolobus acidocaldarius*. FEBS Letters, 225, 277-281, (1987).

Sode, K., Watanabe, K., Ito, S., Matsumura, K., Kikuchi, T., Thermostable Chimeric PQQ Glucose Dehydrogenase. FEBS Letters 364, 325-327, (1995).

Srere, P.A., Brazil, H., Gonen, L., The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Mot Flight Muscle. Acta Chem. Scand. 17, S129-S134, (1963).

Sutherland, K.J., Henneke, C.M., Towner, P., Hough, D.W., Danson, M.J., Citrate Synthase from the Thermophilic Archaeabacterium *Thermoplasma acidophilum*: Cloning and Sequencing of the Gene. European Journal of Biochemistry 194, 839-844, (1990).

Sutherland, K.J., Danson, M.J., Hough, D.W., Towner, P. Expression and Purification of Plasmid Encoded *Thermoplasma acidophilum* Citrate Synthase from *Escherichia coli*. FEBS 282 (1), 132-134, (1991).

Van de Burg, B., Dijkstra, B.W., Van der Vinne, B., Stulp, B.K., Eijsink, G.H., Venema, G., Introduction of Disulfide Bonds into *Bacillus subtilis* Neutral Protease. Protein Engineering, 6(5), 521-7, (1993).

Vielle, C. and Zeikus, J.G., Thermozyomes: Identifying Molecular Determinants of Protein Structural and Functional Stability. TIBTECH, 14, 183-190, (1996).

Vogt, G., Woell, S. And Argos, P. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds and Ion Pairs. Journal of Molecular Biology, 269, 631-643, (1997).

Wetzel, R., Perry, L.J., Baase, W.A., Becktel, W.J., Disulfide Bonds and Thermal Stability in T4 Lysozyme. Proceedings of National Academy of Science USA, 85, 401-405, (1988).

Whittaker, J.R. and Granum, P.E., An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235-280nm. Anal. Biochemistry 109, 156-159, (1980).

Wrba, A., Schweirger, A., Schaultes, Jaenicke, R., Extremely Thermostable D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from the Eubacterium *Thermotoga maritima*. Biochemistry, 29, 7584-7592, (1990).

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TBAG 1501	2- Rapor Tarihi: 1/9/1998
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1/9/1996-1/9/1998	
4- Projenin Adı: Thermoplasma acidophilum Sitrat Sentaz Enziminin Termostabilitesinden Sorumlu Mekanizmaların Genetik Mühendisliği Tekniklerinden Yararlanılarak Belirlenmesi	
5- Proje Yürüttücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof Dr Semra Kocabıyık (Proje Yürüttücüsü) İpek Erduran, Ar Gör (Yardımcı Araştırmacı)	
6- Projenin Yürüttüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 06531, Ankara	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Orta Doğu Teknik Üniversitesi	
8- Öz (Abstract): Proteinlerde yüksek ısıya dayanıklılığın moleküller mekanizmasının araştırıldığı bu projede bir termostabil model sistem olarak <i>Thermoplasma (Tp.) acidophilum</i> 'dan elde edilen sitrat sentaz enzimi kullanılmıştır. Dimer interfazındaki hidrofobik interaksiyonların etkisini incelemek üzere bölgeye özel mutasyon yöntemi kullanılarak tek amino asit değişikliği yapılarak 4 mutant enzim oluşturulmuştur: Ala97Ser, Ala104Thr, Gly209Ala ve Gly197Val. Bunlardan ilk üç mutasyon <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termostabilitesini artırdığı gibi, aynı zamanda da katalitik özelliklerini (K_m , V_{max} , spesifik aktivite) iyileştirmiştir. Termostabilitesi en yüksek olan mutant enzim G209A olup, 85°C'de inaktivasyon yarı ömrü 57 dakikadır. Bu sonuçlar, interfaz hidrofobisitesini artıran ya da azaltan amino asit değişikliklerinin <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin termostabilitesinin artırabileceğini göstermiştir. Böylece 70°C'nin üzerinde, proteinlerin sarılmamış formlarının entropisini etkileyen amino asit değişikliklerinin protein termostabilizasyonunda kritik bir faktör olmadığı görülmüştür. Diğer taraftan <i>Tp.</i> sitrat sentaz enziminin iç oyuklarının hacmini azaltmak üzere 2 mutasyon yapılmıştır: S343T ve T346Y. Ancak söz konusu mutasyonlar enzimin termal stabilitesini önemli ölçüde azaltırken, aktivitesini de büyük ölçüde düşürmüştür.	
Anahtar Kelimeler: Thermoplasma acidophilum, sitrat sentaz, termostabilite	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Ekte	
10- Bilim Dalı: Doçentlik B. Dalı Kodu: 401 02 00 ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu: 401 02 02	
11- Dağıtım (*): <input checked="" type="checkbox"/> Sınırlı <input type="checkbox"/> Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu : <input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil	

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz

Proje ile İlgili Gerçekleştirilen Bilimsel Etkinlikler:

1. Yurt Dışı Makaleler

1.1. Erduran, İ. and Kocabıyık, S., Amino Acid Substitution in the Subunit Interface Enhancing Thermostability of *Thermoplasma acidophilum* Citrate Syntase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 249, 566-571 (1998).

1.2. Erduran, İ. and Kocabıyık, S., Insights into the Molecular Basis of Thermal Stability from Engineering of *Thermoplasma acidophilum* Citrate Synthase. Journal of Protein Chemistry, 17,2, 531-532 (1998).

2. Yurt İçi Makaleler

2.1. Erduran, İ. and Kocabıyık,S., Purification and Characterization of Cysteine-43 Mutant Citrate Synthase from *Thermoplasma acidophilum* (Doğa, TU. J.Biol., in press, 1999).

2.2. Kocabıyık, S. and Erduran, İ., Molecular Basis of Protein Thermostability (Rev. Article, submitted, 1998).

3. Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiri Özetleri

3.1. Erduran, İ. and Kocabıyık,S., The Effect of Hydrophobic Interactions in the Dimer Interface of *Thermoplasma acidophilum* Citrate Synthase on Thermostability. 8th European Congerss on Biotechnology, Aug 18-22, 1997, Budapest, Hungary. Abstract book p.1447 .

3.2. Erduran, İ. and Kocabıyık, S., The Analysis of Dimer Interface Interctions of Citrate Synthase from *Thermoplasma acidophilum* by Site-specific Mutagenesis. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu, 21-27 Eylül, 1997, Kuşadası, İzmir. Abstract kitabı sayfa 4-5.

3.3. Erduran, İ. and Kocabıyık, S., Amino Acid Substitutions in the Subunit Interface Enhancing Thermostability of *Thermoplasma acidophilum* Citrate Synthase. 25th Silver Jubilee FEBS Meeting, July 5-10, 1998, Copenhagen, Denmark. Abstract book p124.

3.4. Kocabıyık, S. and Erduran, İ., Engineering of Citrate Synthase from *Thermoplasma acidophilum* by Site-specific Mutagenesis to Investigate the Mechanism of Thermostability. 18th International Congress on Genetics, Aug 10-15, 1998, Beijing, China. Abstact book p.32.

3.5. Erduran, İ. and Kocabıyık, S., Insights into the Molecular Basis of Thermal Stability from Engineering of *Thermoplasma acidophilum* Citrate Synthase. XII. th International Conference on Methods in Protein Structure Analysis, Sept. 5-10, 1998, Halkiki, Greece.