

***Tetrahymena thermophila* KATALAZ GENİNİN
mRNA İFADESİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE
ÇEŞİTLİ STRESLER ALTINDA
KISMİ KARAKTERİZASYONU**

Ozan KILIÇKAYA

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Temmuz-2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ozan KILIÇKAYA'nın "*Tetrahymena thermophila* Katalaz Geninin mRNA İfadesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Çeşitli Stresler Altında Kısmi Karakterizasyonu" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans tezi 11/06/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. MUHİTTİN ARSLANYOLU
Üye	: Yard. Doç. Dr. ZERRİN SALTAN
Üye	: Yard. Doç. Dr. BURÇİN MUTLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tetrahymena thermophila KATALAZ GENİNİN mRNA İFADESİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE ÇEŞİTLİ STRESLER ALTINDA KISMİ KARAKTERİZASYONU

Ozan KILIÇKAYA

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

2009, 118 sayfa

Katalazın (E.C. 1.11.1.6) hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene yüksek hızda yıkımı, enzimin gıda, optik ve tekstil gibi endüstriyel alanlarda kullanımına yol açmıştır. *T. thermophila* göl, tatlı su ve su birikintilerinde yaşayan sili bir protozoandır. *T. thermophila* katalaz (*TtCAT1*) geninin dizisi Tetrahymena Genom Veritabanından elde edilmiştir. TtCAT1p amino asit dizisinin diğer katalazlar ile dikey hizalanması korunmuş katalaz aktif bölge motifinin (FDRERIPERVHAKGAG), katalaz hem ligandı bağlanma bölgesi motifinin (RLSYPDTH) ve peroksizomal lokalizasyon sinyalinin (SNL) varlığını göstermiştir. Katalaz geninin mRNA'sının farklı stresler altında Northern Blot analizi, 23°C ile 30°C'de varlığını, aç hücrelerde ise yokluğunu göstermiştir. *E. coli*'de TtCat1p'nin rekombinant protein olarak ifadesi için gerekli 10 farklı nokta mutasyonu PZR yöntemiyle yerleştirilmiş ve DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir. Rekombinant proteinin *E. coli*'de üretilip üretilmediği SDS-PAGE ve Western Blot ile anti-GST monoklonal antikor ile anti-sığır katalaz poliklonal antikorları kullanılarak araştırılmıştır. Glutasyon sefaroz 4B afinite boncukları ile saflaştırılmış rekombinant proteinin DOĞAL-PAGE ile katalaz aktivite testi gerçekleştirilmiş, fakat her iki analiz rekombinant GST-TtCat1p proteinin beklenen büyüklükte üretilmediğini ve üretilen ~60 kDa ve ~28 kDa'luk proteinin ise katalaz aktivitesinin bulunmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, katalaz geninin açlık şartlarında mRNA'sının bulunmamasının moleküler kontrol mekanizmasının çalışması için iyi bir deneysel alt yapı oluşturabileceği ortaya konulmuştur. Biyoteknolojik olarak ise TtCat1p'in değerlendirilebilmesi rekombinant protein üretim deneylerinin tekrarlanmasını gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Rekombinant Katalaz, *T. thermophila*, Northern Blot

ABSTRACT**Master of Sciences Thesis****PARTIAL CHARACTERIZATION OF *Tetrahymena thermophila*
CATALASE GENE mRNA EXPRESSION UNDER DIFFERENT STRESS
CONDITIONS WITH POLYMERASE CHAIN REACTION****Ozan KILIÇKAYA****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Advance Technologies Program****Biotechnology****Supervisor: Asist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU****2009, 118 pages**

The high rates of decomposition of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen by catalase (E.C. 1.11.1.6) causes it to be used in food processing, optics and textile industries. *T. thermophila* is a ciliated protozoon that inhabits the lakes, fresh waters and ponds. The complete sequence of *T. thermophila* catalase (*TtCAT1*) gene was received from Tetrahymena Genome Database. Multiple sequence alignment of TtCat1p amino acid sequence with other catalases showed the existence of conserved catalase active site motif (FDRERIPERVVHAKGAG), catalase hem ligand binding domain motif (RLSYPDTH) and peroxisomal localization signal (SNL). The analysis of catalase gene mRNA expression by Northern Blot revealed the existence of TtCAT1 mRNA at 23°C and 30°C grown cells but the absence of its mRNA in starved cells. The necessary ten point mutations for the expression of TtCAT1p as recombinant protein, were incorporated by in vitro PCR methods and their incorporation confirmed by DNA sequencing. The expression of recombinant GST-TtCat1p protein was analyzed with SDS-PAGE and Western blot by using anti-GST monoclonal antibody and anti-bovine cat polyclonal antibody. The purified recombinant GST-TtCat1p analyzed with PAGE gel assay. Both methods showed that the expected size recombinant protein was absent but the two truncated forms of ~60 and ~28 kDa proteins was expressed. In conclusion, the absence of catalase gene mRNA in starved cells suggests that it could be a good assay system to study the molecular control mechanisms of the cat mRNA expression. In term of Biotechnology, the expression of recombinant TtCat1p ought to be repeated to get a fully expressed TtCat1p to study its activity.

Keywords: Recombinant catalase, *Tetrahymena thermophila*, Northern Blot

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, uygun bir çalışma ve laboratuvar imkânı sağlayan hocam Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na;

Lisans ve yüksek lisans boyunca her anlamda bilgisiyle, tecrübesiyle, arkadaşlığıyla bana destek olan, tezin oluşması ve deneysel adımlarda düşünce ve tecrübesini eksik etmeyen çalışma arkadaşım, hocam, sevgili dostum Mehmet Taha YILDIZ'a;

Laboratuardaki her türlü teknik desteği ve yardımı için Nurçin KÜÇÜKOĞLU'na;

Hayatıma kattığı ve katacağı güzelliklerden ötürü Kamile GÜNER'e;

Beni bu günlere getiren ve her şartta destekleyen ailem Nurten ve Kazım KILIÇKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Temmuz 2009

Ozan KILIÇKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Katalazlar	4
1.1.1. Katalaz enzim ailesinin katalaz ve peroksidaz aktiviteleri	5
1.1.2. Katalazların biyoteknolojik kullanım alanları	9
1.2. Çalışma Organizması <i>Tetrahymena thermophila</i>	10
1.3. Çalışma Öncesine Ait Bulgular	11
1.4. Amaç	14
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Çalışmada kullanılan organizmalar	15
2.1.2. Çalışmada kullanılan plazmid DNA'lar	16
2.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri	18
2.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	19
2.1.5. Çalışmada kullanılan cihazlar	23
2.1.6. Çalışmada kullanılan kitler	23
2.1.7. Çalışmada kullanılan enzim setleri	23
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> hücrelerinden genomik DNA izolasyonu	24

2.2.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> hücrelerinden toplam RNA izolasyonu	25
2.2.3. Toplam RNA'ya DNase uygulanması.....	28
2.2.4. İzole edilen DNA ve RNA'ların spektrofotometrik analizleri.....	29
2.2.5. Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi	29
2.2.6. Katalaz geninin cDNA'sının ve genomik kopyasının üretilmesi için gerekli gene özgül primerlerin tasarlanması.....	30
2.2.7. Katalaz geninin genomik kopyasının üretilmesi.....	30
2.2.8. Katalaz geninin cDNA'sının üretilmesi	31
2.2.9. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi.....	31
2.2.10. PZR ürünlerinin klonlama plazmitine aktarılması	33
2.2.11. <i>Escherichia coli</i> kompetent hücre hazırlığı	34
2.2.12. Plazmidin kompetent hücrelere transformasyonu	35
2.2.13. Plazmid izolasyonu.....	36
2.2.14. Restriksiyon enzim analizi.....	38
2.2.15. <i>Escherichia coli</i> 'de protein ifadesi için gerekli nokta mutasyonları içeren primerlerin tasarlanması.....	39
2.2.16. Nokta mutasyonların kontrolü için gerekli DNA dizi analizi reaksiyonu	43
2.2.17. Rekombinant proteinlerin üretilmesi ve toplam protein izolasyonu	45
2.2.18. Toplam protein içerisinde rekombinant proteinlerin saflaştırılması.....	47
2.2.19. SDS-PAGE ile proteinlerin analizi	49
2.2.20. Western Blot analizi	50
2.2.21. Northern Blot analizi	52
2.2.22. Katalaz Proteininin DOĞAL-PAGE tabanlı aktivite analizi	56
2.2.23. Biyoinformatik Analizler	58

3. BULGULAR.....	60
3.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> Katalaz Geni Tek Kopyadır	60
3.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> Katalaz Geni mRNA'sının	
5' Bölgesi Analizi ve B1868 suşu ile Benzerlik Analizi	62
3.4. <i>Tetrahymena thermophila</i> Katalaz Geninin Filogenetik Analizi	64
3.5. <i>Tetrahymena thermophila</i> Katalaz Protein Dizi Bilgisinin Analizi	68
3.6. <i>Tetrahymena thermophila</i> Katalaz Proteininin	
Olası 3 Boyutlu Yapısı	69
3.7. Nokta Mutasyonların Yerleştirilmesi	71
3.8. Nokta Mutasyonların Dizi Analizi ile Gösterilmesi.....	73
3.9. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	75
3.10. Northern Blot Analizi	80
3.11. DOĞAL-PAGE Jeli ile Aktivite Analizi	82
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR.....	88
Ek-1	96
Ek-2	97
Ek-3	99
Ek-4	102
Ek-5	106
Ek-6	107
Ek-7	108
Ek-8	117

Ek-9 118

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Katalaz enzim ailesinin üyelerinin üç boyutlu yapıları.....	8
1.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> B1868 ırkı katalaz mRNA bilgisi	12
1.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> katalaz proteininin Western Blot Deneyi ile gösterimi.....	13
1.4. Katalaz geninin Southern Blot analizi.....	14
2.1. pGEM-T Easy vektör DNA yapısı.....	17
2.2. pGEX 4T-1 vektör DNA yapısı.....	18
2.3. Nokta mutasyon taşıyan parçaların üretimi	41
2.4. Nokta mutasyon parçalarının birleştirilmesi.....	42
2.5. Nokta mutasyon birleştirme PZR haritası	43
3.1. Katalaz geninin TGD veritabanından alınan bilgileri	60
3.2. Katalaz geninin genomik kopyasının TGD’de <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> enzimleri ile biyoinformatik kesim analizi	61
3.3. TtCAT1 gDNA ve cDNA’larının <i>HindIII</i> enzimi ile analizi	62
3.4. <i>Tetrahymena thermophila</i> katalaz mRNA’sının 5’ bölgesine eşleşen EST dizileri.....	63
3.5. <i>Tetrahymena thermophila</i> katalaz geninin 5’ mRNA bölgesinin dikey hizalama ile analizi	63
3.6. TtCAT1p katalaz alt gruplarından gerçek katalaz grubunun üyesidir	65
3.7. Gerçek katalazlara ait Filogenetik Ağaç	67

3.8. <i>TthCat</i> aminoasit dizisinin korunmuş bölgelerin	
dikey hizalama ile gösterilmesi	69
3.9. TtCat1p enziminin Swiss-Model programı	
ile yapılan 3 boyutlu modeli.....	70
3.10. <i>TthCat</i> geni üzerinde oluşturulan mutasyonlar	71
3.11. Nokta mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesi.....	72
3.12. Nokta mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesi I	73
3.13. Nokta mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesi II	73
3.14. Katalaz geni üzerindeki nokta mutasyonların	
dizi analizi sonuçları	74
3.15. Katalaz geni üzerindeki nokta mutasyonlardan	
9. ve 10. mutasyon yerindedir	75
3.16. TthCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin SDS-PAGE Sonucu	75
3.17. GST TtCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin	
Western Blot Analizi	76
3.18. Rekombinant Protein Üretiminden İzole Edilen	
Toplam Proteinler	77
3.19. GST TtCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin	
SDS-PAGE Sonucu II.....	77
3.20. SDS-PAGE jelinde pozitif olduğu düşünülen	
protein bandının büyüklük analizi	78
3.21. Dizi analizi sonuçları.....	79

3.22. Katalaz geni Northern Blot analizi.....	80
3.23. Katalaz geni Northern Blot analizi II	81
3.24. Northern Blot katalaz mRNA büyüklük grafiği	82
3.25. Rekombinant TtCat1p enziminin aktivite analizi	83
4.1. TtCat1p ve Sığır Karaciğer Katalazı 3 Boyutlu Yapısı.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Biyoteknolojinin alt grupları	2
1.2. Endüstriyel boyutta üretilen enzimler ve kullanım alanları	3
2.1. Katalaz geninde nokta mutasyon oluşturmak için tasarlanan komplementer primer çiftleri	41
2.2. SDS-PAGE analizinde kullanılacak jel yüzdeleri.....	49
2.3. DOĞAL-PAGE jeli hazırlanması için jel yüzdeleri	53

1. GİRİŞ

Günümüzde biyoteknoloji bilim dalı biyoloji/canlı biliminin bir alt disiplini olmaktan çıkarak disiplinler arası bir yere gelmiş olsa da, temelde yaklaşık 10.000 yıl önce yapılmaya başlanan tarım ve yaklaşık 6.000 yıl önce üretilmeye başlanan fermantasyon ürünlerinin ilk biyoteknolojik uygulamalar olduğu görülmektedir [1, 2].

Biyoteknoloji en genel anlamı ile “herhangi bir teknolojik uygulamanın; biyolojik sistemleri, organizmayı veya organizma kaynaklı yapıları; bir ürünün üretiminde, değiştirilmesinde veya özel bir süreçte kullanması” olarak tanımlanır [3]. Fakat 1970’lerden sonra gelişen “rekombinant DNA” teknikleri ile Biyoteknoloji bilim dalı yeni bir boyut kazanmıştır. 2000 yılında Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu Cartagena Protokolünde yeni nesil Biyoteknoloji kavramını “Modern Biyoteknoloji” olarak şu şekilde tanımlar;

Modern Biyoteknoloji;

- Rekombinant DNA’yı içeren in-vitro nükleik asit tekniklerinin ve nükleik asitlerin organel veya hücrelere direk aktarımının ya da
- Taksonomik ailelerin ötesinde oluşturulan hücre birleştirmelerinin canlılığın doğal fizyolojik gelişimini ya da rekombinant engellerini aşan ve geleneksel beslenme ve eleme ile üretilmeyen uygulamalarıdır [4].

Artık günümüz Biyoteknoloji kavramı araştırma ve uygulama alanlarına göre farklı sayılabilecek disiplinlerden birçok araştırmacı ve üreticinin içerisinde yer aldığı bir ara disiplin haline gelmiştir. Bu alanlara göre de çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Alt grupların oluşmasında üretilen ürünlerin kullanıldığı alanlar ile ürünün üretiminde kullanılan hammaddeler belirleyici olmaktadır. Biyoteknoloji günümüzde 10 farklı alt araştırma grubuna ayrılmaktadır [5]. Alt gruplar Çizelge 1.1.’de verilmiştir.

Verilen alt gruplardan en önemlilerinden birisi kuşkusuz sürdürülebilir/yenilenebilir enerji ihtiyacını karşılama amacıyla olan Beyaz/Endüstriyel Biyoteknolojidir. Beyaz biyoteknoloji rekombinant DNA teknikleri kullanarak canlının doğal yollarla kazanamayacağı özellikleri canlıya vererek canlının endüstriyel boyutta ürün üretmesini sağlamaktadır [6].

Çizelge 1.1. Biyoteknolojinin alt grupları: Çizelgede biyoteknolojinin farklı disiplinlere ayrılmış çalışma alanları ve bu alanlara ait uygulama ve araştırma konuları verilmiştir.

BİYOTEKNOLOJİNİN ALT GRUPLARI	UYGULAMA ve ARAŞTIRMA ALANLARI
Kırmızı Biyoteknoloji	İnsan Sağlığı, İlaç, Tanı Teknikleri
Beyaz Biyoteknoloji	Gen Tabanlı Biyoendüstriler
Mavi Biyoteknoloji	Akuakültür, Kıyı ve Deniz Biyoteknolojileri
Gri Biyoteknoloji	Klasik Fermantasyon ve Biyosüreç Biyoteknolojileri
Sarı Biyoteknoloji	Besin ve Yiyecek Biyoteknolojileri
Yeşil Biyoteknoloji	Tarım, Çevre Biyoteknolojisi, Biyoyakıt, Biyokirlilik
Kahverengi Biyoteknoloji	Kurak Bölgeler ve Çöl Biyoteknolojisi
Siyah Biyoteknoloji	Biyoterörizm, Biyosilah, Biyosuç, Anti-Ekin Silahlar
Mor Biyoteknoloji	Patent, Yayın, Buluş, Fikri Mülkiyet Hakları
Altın Biyoteknoloji	Biyoinformatik, Nanobiyoteknoloji

Beyaz biyoteknolojinin öneminin son dönemde bu kadar artmasının ve insan sağlığı çalışmalarını yapan Kırmızı Biyoteknolojiden ve bitki ıslahı ile GDO (genetiği değiştirilmiş organizma) çalışmaları yapan Yeşil Biyoteknolojiden ayrılmasının nedeni kimyasal madde, malzeme ve enerji üretimine yönelik çalışmalarının olmasıdır [7, 8]. Bu çalışmalarda petrol tabanlı ürün üretiminin yerine canlı/enzim tabanlı biyo-bozunabilen yapıların oluşturulması ve endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılması amaçlanmaktadır. ABD hükümetinin endüstriyel/beyaz biyoteknolojini geliştirilmesi için ödenek ayırması ve Avrupa Birliği'nin de yine endüstriyel/beyaz biyoteknolojini gelişimi için birlik içerisinde örgütlenmeye gitmesi dünyada bu alana olan eğilimi ve önemi göstermektedir [9, 10].

Gen tabanlı çalışan bir endüstri olan Beyaz Biyoteknolojinin araştırma ve uygulama alanlarının geniş bir kısmını ise rekombinant enzimlerin üretimi oluşturmaktadır. Üretilen enzimler geçtiğimiz yüzyıl içerisinde fermantasyona dayalı, verimli, seçilmiş canlı ırkları üzerinden yapılsa da, artık üretim modern biyoteknolojik yöntemler ile tam kontrollü olarak yapılmaktadır. Çizelge 1.2.'de endüstriyel süreçlerde en çok kullanılan ve üretimi yapılan enzim sınıfları verilmiştir.

Çizelge 1.2. Endüstriyel boyutta üretilen enzimler ve kullanım alanları: Çizelgede en çok üretilen enzimler ile bunların kullanım ve uygulama alanları verilmiştir.

Enzimin Adı	E.C. No	Endüstriyel Kullanım Alanı	Uygulama alanı
Glukoz Oksidaz	1.1.3.4	Piştirme Süreçleri	Nişasta oranı düşük ekmek üretimi, hamur sertliği ayarlanması [11, 12]
		Kişisel Bakım	Ağartma ve anti mikrobiyal özellik [11]
		Mayalanmış Gıdalar	Raf ömrünün uzatılması [11, 12]
		Tekstil	Dolaylı enzimatik beyazlatma [11]
Katalaz	1.11.1.6	Mayalanmış Gıdalar	Raf ömrünün uzatılması [11, 12]
		Süt ve Süt Endüstrisi	Süt Bozulmasının engellenmesi [11, 12]
		Tekstil	Beyazlatmanın durdurulması ve Hidrojen peroksitin uzaklaştırılması [11-13]
		Çevre	Atık su temizliği ve hidrojen peroksitin uzaklaştırılması [11]
Peroksidaz, Lakto-peroksidaz	1.11.1.7	Piştirme süreçleri	Hamur sertliğinin ayarlanması [11, 12]
		Süt ve Süt Endüstrisi	Sütün bozulmaya karşı korunması [11, 12]
		Kişisel Bakım	Anti mikrobiyal özellik [11]
		Tekstil	Artık boyanın giderimi [11, 12]
Proteaz	3.4.X.X	Tekstil	İpeğin zamkının giderilmesi, yün topaklaşmasının engellenmesi [11]
		Deterjan Sektörü	Protein giderilmesi [11, 12]
		Yakın ve Biyo-yakıt	Yakıt içeriği olarak [11, 12]
		Besin ve Süt Endüstrisi	Tatlandırıcı, düşük alerjikte bebek maması, sütün bozulmaya karşı korunması [12]
		Piştirme Süreçleri	Bisküvi ve kurabiye üretimi [11]
		Kâğıt Sektörü	Biyofilmin giderilmesinde [12]
		Deri Sektörü	Temizleme ve inceltme [11]
Alfa ve Beta Amilaz	3.2.1.1 3.2.1.2	Deterjan Sektörü	Glikoz içeren boyaların giderilmesi [11, 12]
		Piştirme Süreçleri	Bira yapımında maltın suyla karıştırılması ve pişirilmesi, bayatlama süresinin uzatılması [11]
		Tekstil	Yeniden boyutlandırma [11]
		Petrol Endüstrisi	Petrol kuyularında viskozite kontrolü [11]
		Beslenme	Meyve suyu üretimi [11, 12]
Lipaz	3.1.1.3	Süt ve Süt Endüstrisi	Peynir üretimi ve tatlandırılması [11, 12]
		Piştirme Süreçleri	Ekmek üretiminin iyileştirilmesi [11, 12]
		Deterjan Sektörü	Yağların giderilmesinde [11, 12]
		Kâğıt Sektörü	Pürüzlerin giderilmesi, atık temizleme [11]
		Deri Sektörü	Matlaştırma [11]
Pektinaz	3.1.1.11	İçecek	Meyve suyu üretimi [11, 12]
Lakkaz	1.10.3.2	Tekstil	Enzimatik taşlamada boyamanın engellenmesi, beyazlatma [11]
		İçecek	Berraklaştırma, tatlandırma, mantar gelişiminin engellenmesi [11]
		Kâğıt Endüstrisi	Kâğıt hamurunun beyazlatılması [11]
		Orman ve Ağaç	Lignin ağaç plakaların oluşturulması [11]

Sonuç olarak Beyaz/Endüstriyel Biyoteknoloji günümüzde enerji, kimyasal madde ve malzeme üretiminde petrol tabanlı üretim yapan kimya endüstrisine karşı, sürdürülebilirlik, geri dönüşüm ve çevre sorunları açısından tercih edilmesi zorunlu bir seçenek haline gelmiştir. Bu nedenle biyoteknolojini bu alanına yapılacak yatırımların ülkeler için hem ekonomik hem de çevre açısından uygulanması artık bir zorunluluk haline gelmektedir.

Endüstriyel süreçlerde kullanılan enzimlerden biri olan katalaz ise sahip olduğu yüksek substrat özgülüğü ve hızı ile önemli oranda peroksidaz aktivitesine sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle enzim, endüstriyel üretimde önemli bir kullanıma sahiptir.

1.1. Katalazlar

Yirminci yüzyılın ilk yılında “katalaz” olarak isimlendirilen [16] ve günümüzde hidroperoksidazlar ya da hidrojen peroksit oksidoredüktazlar olarak da bilinen katalaz enzimi üzerine günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır [17].

Katalazların tarihi 1811 yılında Jacques Thenard’ın hidrojen peroksidi keşfi ile başlar. Thenard ayrıca bu maddenin canlı dokularda özel bir yapı ile parçalanmasının gerekli olduğunu da göstermiştir. Metabolizmada hidrojen peroksit yıkımını sağlayan bu özel madde ise 1863 yılında Christian Friedrich Schönbein tarafından bulunmuştur fakat isimlendirilmemiştir. 1900 yılında ise Oscar Loew tarafından katalaz olarak isimlendirilen [16] özel maddenin merkezinde demir olduğu 23 yıl sonra Otto Warburg tarafından gösterilmiştir. Sonrasında sırasıyla 1947 ve 1949 yıllarında Britton Chance katalazın hidrojen peroksit ile yaptığı birincil ve ikincil yapıları göstermiştir. [18-21]. Chance’a göre katalaz enzimi hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonlarında peroksidaz, yüksek konsantrasyonlarında ise katalaz aktivitesi göstermektedir [22]. 1952 yılında ise Chance enzimin aktif olmayan formu olarak nitelediği üçüncül yapıyı göstermiştir [23].

Yüzyılın yarısından günümüze kadar geçen sürede ise birçok canlıda katalaz enzimi araştırılmıştır. Enzimin üç boyutlu yapısı, işleyiş mekanizması ve hücresel lokalizasyonu üzerine araştırmalar yapılmıştır. Çalışmanın yapıldığı tarihe kadar (Mart 2009) PeroxiBase veritabanında farklı canlı gruplarında

yaklaşık 600 farklı katalazın homolog protein dizileri bulunmaktadır [24]. Ayrıca PDB veritabanında (Mart 2009) 79 farklı katalaz 3 boyutlu yapısı bulunmaktadır [25].

Katalaz enzim ailesi tüm oksijenli solunum yapan canlılarda, bazı fakültatif aeroblarda ve birçok oksijensiz solunum yapan canlıda gösterilmiştir. [26-28]. Canlı gruplarında enzim iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; i) gerçek ya da “mono-fonksiyonel” katalazlar ve ii) katalaz peroksidazlardır. Her iki sınıf ta yüksek oranda katalaz aktivitesine sahiplerdir, fakat bunun dışında birbirlerinden nükleotid dizileri, protein bölgeleri ve protein üçüncül/dördüncün yapıları düzeyinde farklılık göstermektedir [26, 29, 30]. Üçüncü sınıf olarak kabul edilen mangan katalazlar ise “yalancı katalazlar” olarak adlandırılır, demir yerine mangan içerirler ve günümüze kadar sadece bakterilerde bulunmuştur [17, 26, 29, 30].

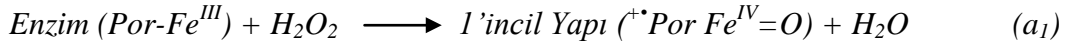
1.1.1. Katalaz enzim ailesinin katalaz ve peroksidaz aktiviteleri

Katalaz enzim ailesi içerisinde bulunan üç sınıfta (mono-fonksiyonel katalazlar, katalaz-peroksidazlar ve mangan katalazlar) hücrel fonksiyonların devamı için yeterli derecede hidrojen peroksit parçalayabilme kabiliyetine sahiptirler. Aşağıda, enzim ailesinin hidrojen peroksidi parçalaması toplam reaksiyonu verilmiştir (a). Toplam reaksiyon iki basamakta gerçekleşir ve bütün katalazlar için mekanizma aynıdır.

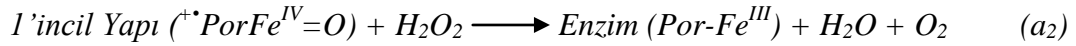


Katalaz enzim ailesi dışında teorik olarak içerisinde demir bulduran diğer proteinlerin de belirli oranda katalaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [26, 29-32]. Araştırmanın konusunu katalaz enzim ailesi oluşturduğu için bu çalışmada diğer proteinlere detaylı olarak değinilmeyecektir.

Katalazın hidrojen peroksidi iki basamakta parçalarken enzim 1'incil yapıyı oluşturur. 1'incil yapı oluşurken enzimin yapısında bulunan hem demir grubu hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Bu durumda oksijen-oksijen bağı kırılır ve bir oksijenin hem grubuna bağlanarak demiri indirger. Diğer oksijen ise su molekülü oluşturarak salınır (a_1) [18-21, 26, 29, 30, 32].

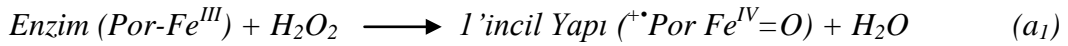


(a_1) reaksiyonunda oluşan 1'incil yapı bir ara yapı olarak görülebilir. 1'incil yapı ikinci bir hidrojen peroksit molekülü ile reaksiyona girdiğinde, üzerindeki oksijeni hidrojen peroksit vererek su ve moleküler oksijen oluşturur (a_2). Sonuç olarak 1'incil yapı yapısında bulunan oksijeni verdiği için doğal haline gelmiştir ve yeni bir hidrojen peroksit parçalayabilir.

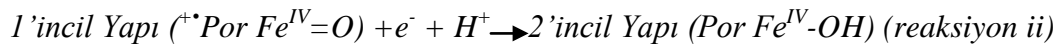
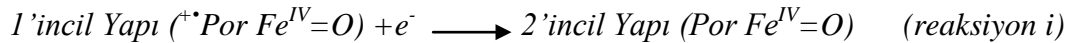


Burada hidrojen peroksit, enzimin doğal hali için indirgeyici ve 1'incil hali için ise yükseltgeyici bir ajan olarak görev yapar. Bu nedenle enzimin 1'incil hali doğal halin uyarılmış halini oluşturacağından ara bir yapı olarak görülmelidir.

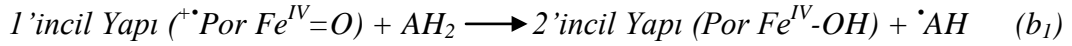
1'incil yapı hidrojen peroksidin düşük yoğunluklarında peroksidaz aktivitesi gösterir. Burada gerçek katalazlar düşük oranda, katalaz-peroksidazlar ise yüksek oranda peroksidaz aktivitesi gösterir. Peroksidaz aktivitesi ise üç basamakta gerçekleşir. Öncelikle enzimin doğal hali bir hidrojen peroksit molekülü ile reaksiyona girerek 1'incil yapıyı oluşturur (a_1).



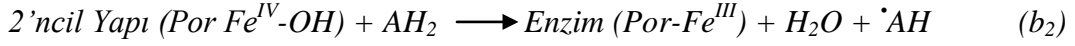
1'incil yapının oluşmasından sonra enzim 2'incil yapıyı oluşturur. Bu yapı enzimin bir proton varlığında veya yokluğunda, bir elektron alarak indirgenmesi ile de oluşabilir (*reaksiyon i ve ii*) [29]. Oluşan 2'incil yapının enzimin doğal haline gelmesi çok yavaş olduğu için bazı katalazlarda NADPH enzim üzerine sıkıca bağlanarak elektron geçişini sağlar ve enzimi doğal haline geri getirir [26, 33].



Buna karşın katalaz-peroksidazların peroksidaz aktivitesi göstermesi 1'incil yapı oluştuktan sonra (a_1), bir elektron vericisinin (AH_2) elektron vererek bir radikal (b_1) ve 2'cil yapıyı oluşturması ile başlar.



Sonraki basamakta 2'incil yapı bir elektron vericiden daha elektron alarak enzimin doğal hale gelmesini sağlar.



Enzim bu şekilde doğal haline gelerek başka bir hidrojen peroksidi parçalamaya hazır hale gelir.

Mono-fonksiyonel Katalazlar (Gerçek Katalazlar)

Gerçek katalazlar prokaryotik ve ökaryotik genomlar içerisinde hidrojen peroksit parçalayan en büyük enzim sınıfıdır [26, 28]. Enzim çok yüksek miktarda katalaz aktivitesine ve düşük miktarda substratlar için peroksidad aktivitesine sahiptir.

Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) veritabanında PF00199 ulaşım kodu ile kayıtlı olan (Mart 2009) gerçek katalazların 1178 DNA dizisinde, gerçek katalaz DNA dizi motifleri taşıdığı gösterilmiştir [34]. PeroxiBase (<http://peroxibase.isb-sib.ch/>) veritabanında da (Mart 2009) 240 gerçek katalaz enziminin homolog protein dizileri bulunmaktadır [24]. PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) veritabanında ise (Mart 2009) 14 farklı katalaz enziminin 3 boyutlu kristal yapıları çıkarılmıştır [25].

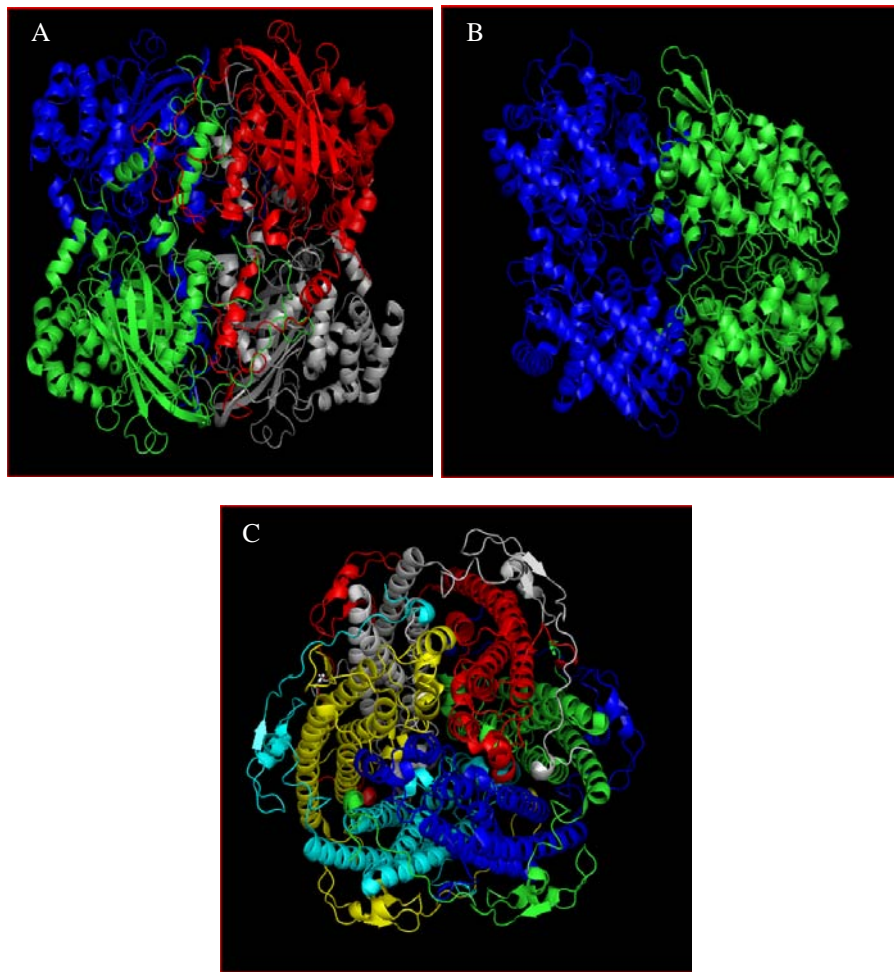
Gerçek katalazlar yapılarında protoporfirin halkası ve bu halkanın merkezinde de demir atomu bulundurlar. Alt gruplarına göre hem grubu olarak *hem b* veya *hem d* bulundurlar. Enzim monomer olarak üretilir fakat bu şekilde aktif değildir. Organizmada homo-tetramer bir yapı oluşturarak görev yapar (Şekil 1.1. A).

DNA/protein dizi bilgisi analizleri ve 3 boyutlu kristal yapıların analizi gerçek katalazların 3 alt gruba ayrıldıklarını göstermektedir [17, 26, 28, 29]. Alt Grup 1 küçük alt üniteye sahip (56-69 kDa) bitki, mantar ve öbakteriyel katalazları içerir. Bu gruptaki prostetik grup *hem b*'dir.

Alt Grup 2 ise büyük alt üniteye (75-84kDa) sahip katalazların bulunduğu gruptur. Öbakteriyel ve mantar katalazları yer alır. Prostetik grup olarak ise çoğunlukla *hem d* bulunur. Bu grupta küçük alt ünitelerden farklı olarak

proteinin karboksil ucunda “flavodoksin-benzer” bir bölge bulunur. Bu bölgenin görevi henüz aydınlatılamamıştır fakat nükleik asitler ile birlikte görev yapan ya da nükleik asitleri kullanan diğer proteinlerin nükleik asit bağlanma bölgelerine benzerlik göstermektedir [17, 32].

Alt Grup 3 ise gerçek katalazların en geniş grubudur. Bu grubun bireyleri arkebakterilerde, mantarlarda, protistada, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur. Küçük alt üniteye (43-75 kDa) sahiptirler ve prostetik grup olarak *hem b* taşırlar. Bunların dışında birçoğunun yapısında bulunan NAPDH, 2'ncil yapının enzimin doğal haline geri getirilmesini de sağlarlar [26, 29, 33, 35].



Şekil 1.1. Katalaz enzim ailesinin üyelerinin üç boyutlu yapıları: (A) İnsan Eritrosit Katalazı (PDB No: 1QQW) (gerçek katalaz) tetramerik yapısı, (B) *Burkholderia pseudomallei* (PDB No: 2FXG) (katalaz-peroksidaz) dimerik yapısı ve (C) *Lactobacillus planatarum* (PDB No: 1JKU) (mangan katalaz) heksamer yapısı. Her bir alt ünite farklı renklerle gösterilmiştir (www.rscb.org/pdb) [25].

Katalaz-Peroksidazlar (İki Fonksiyonlu Katalazlar)

Gerçek katalazlardan sonra hidrojen peroksit parçalayan en büyük enzim sınıfı olan katalaz-peroksidazlar, katalaz aktivitelerinin yanı sıra peroksidaz aktivitesine de sahiptirler. Bakteri, arkebakteri ve mantarlarda varlığı gösterilmiştir. Prostetik grup olarak *hem b* taşır, genellikle dimerik ve tetramerik yapılarda (Şekil 1.1. B) bulunan katalaz-peroksidazların alt ünite büyüklükleri 80 kDa civarındadır [29]. Her bir alt ünite veya alt ünite çifti bir birine çok benzeyen dizilere sahiptirler. Bu benzerliğin gen duplikasyonu ya da gen kaynaşması şeklinde olduğu düşünülmektedir [17, 36, 37].

Mangan Katalazlar (Yalancı Katalazlar)

Mangan katalazlar katalaz ailesinin çok küçük bir kısmını kapsar. Günümüze kadar bu sınıfta bulunan enzimlerin hepsi bakteriyel kökenlidir. Yapılarında enzimin aktif bölgesinde demir atomu yerine mangan atomu bulundurulur. Yapı olarak aileden farklı olarak homo-pentamer ya da homo-hekzamer yapı oluştururlar (Şekil 1.1. C) [17, 26, 38].

1.1.2. Katalazın biyoteknolojik kullanım alanları

Katalazlar, hidrojen peroksidi parçalamada sahip oldukları yüksek hız ile endüstriyel süreçlerde tek başına ya da başka enzimler ile birlikte kullanılmaktadır. Katalaz enzimi doğrudan bir antioksidan olarak kullanılabilirdiği gibi hidrojen peroksidin kullanıldığı endüstriyel süreçlerde de temizleme aracı olarak da kullanılmaktadır.

Katalaz enziminin en etkin kullanıldığı endüstrilerin başında tekstil sektörü gelmektedir. Katalazın tekstil sektöründe en çok kullanıldığı alan ise kumaşların ağartılmasında kullanılan hidrojen peroksidin işlem sonrası giderilmesidir [11, 39]. Normalde hidrojen peroksidin giderilmesi için çok yüksek miktarda saf su veya kimyasal maddeler kullanılmaktadır, fakat bu yolla yapılan temizlik kimyasal madde kullanımına dayalı ek masraflar ve aşırı su tüketimi getireceğinden burada enzimatik temizlik yapılması daha verimlidir [40-42]. Dahası katalaz enziminin hidrojen peroksitde özgülüğü işlem sonrası katalazın

giderilmesi gerekliliğini de ortadan kaldırmaktadır. Katalaz enzim hidrojen peroksit kullanan endüstrilerin atık sularındaki kirliliğin giderilmesinde de kullanılmaktadır. [11].

Enzimin tekstil sektörü dışında diğer bir kullanım alanı ise optik sektörüdür. Göz sağlığı açısından lenslerin temizliği önemlidir. Bu nedenle hidrojen peroksit içerikli temizleme çözeltileri kullanılmaktadır, fakat hidrojen peroksit artıklarının temizlenmesi gerekliliğinden katalaz içerikli çözeltiler temizleme malzemesi olarak kullanılmaktadır [14, 15].

Katalaz, gıda sektöründe konserve gıdaların veya şişelenmiş içeceklerin raf ömrünü uzatmak ve bakteri oluşumunu engellemek için glikoz oksidaz ile birlikte de kullanılır [11, 43]. Ayrıca içeceklerin renklendirilmesinde ve antimikrobiyal/antifungal bir madde olarak ta kullanımı mevcuttur [43]. Katalaz peynir üretiminde de kullanılan bir proteindir. Belirli peynir çeşitlerinin üretiminde tatlandırma ve mayalanmada gerekli olan hidrojen peroksidin ortamdan uzaklaştırılmasında da kullanılır [44].

Katalaz enzimini bir diğer kullanım alanı da biyosensör uygulamalarıdır [43]. Katalaz enzimi elektrokimyasal tanıda elektro yüzeyine immobilize edilerek hidrojen peroksidin tayini yapılabilir [45, 46]. Enzim biyosensör uygulamaları dışında tümör hücrelerinin tedavisinde de kullanılmaktadır [47].

1.2. Çalışma Organizması *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila, tatlı sularda, göllerde ve havuzcularda yaşayan, spor üretmeyen, patojen olmayan, tek hücreli, sili bir ökaryotik canlıdır. 12 - 41 °C'ler arasında yaşayabilir. Sistematikte, Alveolatlar içerisinde yer alır. Alveolatlar; Siliyatlar (*Paramecium*, *Tetrahymena*), Dinoflagellatlar (*Symbiodinium*, *Alexandrium*) ve Apicompleksa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*) olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır [48, 49].

Tetrahymena ilk kez 1923 yılında Andre Lwoff tarafından kültüre edilmiştir [48, 50, 51]. 1940 yılında ağız yapısının (oral apparatus) dört zarlı bir yapı olduğunu tanımlayan Furgason, organizmaya “dört zarlı” anlamında “*Tetrahymena*” cins ismini vermiştir. 1951 yılında eşleşme tiplerinin David

Gruchy tarafından tanımlanması ile *Tetrahymena* üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaşmış ve 1976'da Nanney ve McCoy yüksek sıcaklığa toleransı ile diğer *Tetrahymena* türlerinden ayrılarak *Tetrahymena thermophila* olarak isimlendirmiştir.

Hücre yapısı olarak 40-50 µm uzunluğa ve maksimum 20-30 µm genişliğe sahiptir. Bir hayvan hücresinde olması gereken yapılara sahiptir, fakat intermediate filametlerden yoksundur. Buna karşın bir bitki hücresinde bulunan plastid, kloroplast, hücre duvarı gibi yapılara da sahip değildir. Çekirdek de hayvan hücresinden farklılık göstererek ikiye ayrılmıştır. Mikronukleus (MİK) $2n=10$ kromozoma sahiptir ve transkripsiyonel olarak aktif değildir, sadece eşeyli üremede etkinlik gösterir. Makronukleus (MAK) ise yaşamsal olayları kontrol eder ve transkripsiyonel olarak aktiftir. MAK, MİK'ten yaklaşık olarak %15'lik oranda genetik bilginin atılması ile oluşturulmuş bir yapıdır. Yapısında 45 kopya (ploid) halinde ~255 mini kromozom bulunur [48]. Kromozomlar bir sentromere sahip değildir ve bölünerek çoğalmada MAK kendini boğumlayarak eşler [48, 49].

Çalışmada kullanılan *Tetrahymena thermophila* ırkı genom projesinde de kullanılan SB 210 ırkıdır [52, 53]. İrk biyolojik temel bilgilere birçok katkıda bulunmuştur. Tip-1 intron çıkarılması mekanizması, moleküler motor dyenin ve telomer/telomeraz aktivitesi bu canlı model alınarak yapılan deneyler sonucunda aydınlatılmıştır [54]. Ayrıca *Tetrahymena*'nın ekonomik olarak uygun besi ortamlarında büyük miktarlarda ve kısa zamanda üretilebiliyor olması endüstriyel biyoteknoloji alanında homolog ve heterolog protein üretimi için aday bir organizma olmasına sebep olmuştur [55].

1.3. Çalışma Öncesine Ait Bulgular

Tetrahymena cinsinde katalaz üzerine yapılan ilk çalışma 1971 yılında yayınlanmıştır. Çalışma *Tetrahymena pyriformis* katalaz enziminin biyokimyasal analizi üzerinedir. Çalışmanın sonuçlarına göre *T. pyriformis* katalaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin memeli karaciğer katalazına benzediği gösterilmiştir. Enzim geniş bir pH aralığında aktiviteye sahip olduğu ve aktivitenin ise sıcaklık

artışı streslerinden 1 saat sonrasına kadar arttığı bildirilmiştir. Sonrasında ise aktivitenin hücrelerin ölmeye başladığı zaman aralığında azalmaya başladığı bildirilmiştir [56].

Çalışmanın yapıldığı tarihe kadar *Tetrahymena thermophila* katalaz geni ile ilgili araştırmaya rastlanmamıştır. Fakat Dr. Muhittin Arslanyolu'na ait *Tetrahymena thermophila* B1868 ırkına ait katalaz geninin kopya sayısının, 3' ve 5' bölgelerinin, protein büyüklüğünün ve kısmi mRNA ifadesinin analizlerinin yapıldığı yayımlanmamış veriler mevcuttur [57].

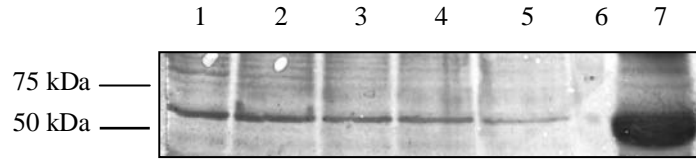
Verilere göre *TtCAT1* geninin cDNA kopyasına gen bankasında AY378080.1 ulaşım numarası ile ulaşılmaktadır. Genin 3' bölgesinde 46 bazlık transkribe edilmeyen bölge, 1464 bazlık protein kodlayan bölge ve 5' bölgesinde 127 bazlık transkribe edilmeyen bölge Şekil 1.2.'de gösterilmiştir [57].

```
GCAAATAATTATCAATTAATTAAGAAAACTGAAGGAAAGAAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTA
TTGACAACCTCTACTGGTCTCCAGTTGATGACAACCAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCT
TATTATAAGACTTCCATCTTATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCCA
CGCCAAAGGTGCTGGTCTTGGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTC
TTCGAAACTGTTGGTAAGAGAATCCCGTCTTACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTAAAAGGGTCTGCTG
ATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGAGTCAAGTTCTACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTGGTAA
CAACACTCCCGTCTTCTTCATTAGAGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAAAGAGAAACCTT
CAAACCAACCTCAAGTGCCTAACATGTTCTGGGACTTCTTTGGTCTGAATCTGCTCACTAGGTTACCATTT
TGTTCTCTGACAGAGTACTCCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTACTCTTCTCACACCTCAAGTGGGT
TAATGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGAACTTCACTGCT
GCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAACCTGACTACGCTACTGAAGACCTTCAAGCACATTGCTTAAAG
GTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACAT
TTTCGATGTTACCAAGGTCTGGCCCATGGTGACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGTCTTAAACAGA
AATCCTGAAAACCTACTTTGCTGAAAACGAATAATCTGCTTTCTCTCCTTCCCACTTAGTCCCTGGTATGGAAC
CCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAGGTCGTCTTCTCTTATCCCGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAA
CTACGATCAAATTCGGTTAACTGCCCCTACAGAGCCAGAGTATCCAACAACCTAACGTGATGGTCCCATGTGC
GTCAACGGTAATCAAGGATCTAAAGTCAACTACGAACCTACCACCTTCCACAACCTACAAGGTTAGACCCGAAA
CCAAGCTCTTACCCAAACACTCACTGGTTTAGTTGGTTCGTTTCAAACCCGCTCACCCCAACGATGACTTCTC
TCAACCCGGTGTCTTTCGGTAAGGTCATGTGAGATAAGGATAAATCTAACACCGTAAGCAACATTGTTGGC
CACATTAAGAATGCTAACAGAGATATCCAAGAAAAGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACG
GTTCAAAGATTGCTACCGCTCTCGGCTTCCCTGCTAACAGATCTAACCTCTGATTAATTTATAAAAATTTCCA
ATCAAATAATTCATTCATTATTAGTTAGTACTTTCATAATATCTATGTACCAGTAGTTAGTTTATATAAAA
ATATGCTTCATTAAAAA
```

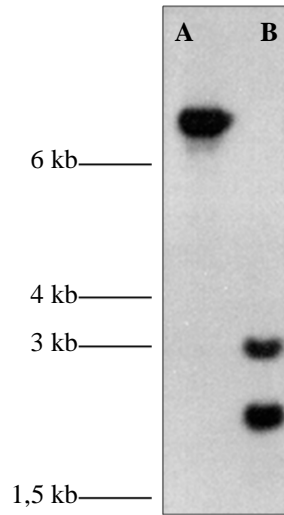
Şekil 1.2. *Tetrahymena thermophila* B1868 ırkı katalaz mRNA bilgisi: Katalaz geni mRNA'sının 3' protein kodlamayan bölgesi gri renk, 5' protein kodlamayan bölgesi ise koyu gri renk ile gösterilmiştir. Arada kalan reklendirilmemiş bölge ise katalaz geninin protein kodlayan kısmını göstermektedir [57].

Tetrahymena thermophila hücrelerinden izole edilen toplam protein ile yapılan Western Blot deneyinde ise katalaz proteininin ~57,5 kDa olduğu gösterilmiştir. Deneyde birincil antikor olarak “insan anti katalaz poliklonal

antikoru” kullanılmıştır. Büyüklük olarak sığır karaciğer katalazı ile yaklaşık olarak aynı büyüklükte olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. *Tetrahymena thermophila* katalaz proteininin Western Blot deneyi ile gösterimi: 1-5’inci kuyucuklarda farklı sıcaklıklarda büyütülmüş hücrelerden izole edilen toplam protein örnekleri bulunmaktadır. 6’ncı kuyuda protein marker, 7’nci kuyuda ise sığır karaciğer katalazı pozitif kontrol olarak verilmiştir. Sonuçlara göre *TthCat* proteininin yaklaşık olarak 57,5 kDa olduğu görülmektedir [57]



Şekil 1.4. Katalaz Genini Southern Blot Analizi: *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA kuyucuğu (A), *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA kuyucuğu (B). Sol tarafta DNA büyüklüğü markör ile kb (kilo baz çifti) olarak gösterilmiştir [57]

Southern Blot deneyinde katalaz geninin kopya sayısı üzerine yapılan analizde ise genin genomda tek kopya ile temsil edildiği gösterilmiştir. (Şekil 1.4.). Southern Blot analizinde genomik DNA ayrı reaksiyonlar ile *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Sonuçlara göre *EcoRI* enzimi genin genomik kopyasını içten kesmemektedir ve tek bant görülmektedir. *HindIII* enzimi ise genin genomik kopyasını içten kesmektedir. Bu nedenle sonuçta iki

bant oluşmaktadır. Fakat çalışmanın yapıldığı tarihte *Tetrahymena thermophila* genom bilgisi henüz tamamlanamadığı için ve katalaz geninin genomik DNA dizi analizi de yapılmadığı için *HindIII* enzimi ile kesim sonucunda genin genomda iki kopya ile temsil edilip edilmediğı tam olarak netlik kazanmamıştır.

1.4. Amaç

Çalışmanın amacı tek hücreli, silli bir ökaryot olan *Tetrahymena thermophila*'nın katalaz enziminin farklı stres şartları altında mRNA varlığının gösterilmesidir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan organizmalar

Çalışma Organizması: *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena Makronükleer Genom projesinde çalışılan *Tetrahymena thermophila* SB210 ırkı tez boyunca biyolojik kaynak organizma olarak kullanılmıştır. Organizma Dr. Orias Eduardo'dan (Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology University of California, Santa Barbara/USA, orias@lifesci.ucsb.edu) temin edilmiştir.

Klonlama Konakçısı: *Escherichia coli* XL I – Blue Irkı

Klonlama konakçısı olan rekombinant *Escherichia coli* XL I – Blue ırkı satın alınarak çalışmada kullanılmıştır (Stratagene, 2000249). Bu ırkın özelliği uygun vektörler ile pozitif kolonilerin seçilmesi için mavi/beyaz tarama yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Bu sayede klonlama verimi ve pozitif klon sayısı kolaylıkla analiz edilebilir.

Irka ait rekombinasyon (*recA*) ve endonükleaz (*endA*) aktivitelerini sağlayan enzim sistemleri baskılanmıştır. Konakçının bu özelliği, vektöre klonlanan parçanın değiştirilmeden kararlı olarak muhafazasını sağlar. Ayrıca mavi/beyaz taramaya izin verecek bölgede (*lacI^qZAm15*) konakçı genomuna yerleştirilmiştir. Bu suş besi yerinde pozitif kolonilerin seçimi için mavi/beyaz tarama kolaylığının yanında tetrasikline direnç özelliğine de sahiptir [58].

Protein İfade Konakçısı: *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS Irkı

Protein ifade konakçısı olarak *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS ırkı satın alınarak kullanılmıştır (Promega, L1191). Bu rekombinant ırkta, protein ifadesi vektördeki T7 promotörünün kontrolü altında T7 RNA polimerazı tarafından yapılır. Bakteri genomuna ise IPTG ile kontrol edilebilen yani uyarılabilen transkripsiyonu gerçekleştirilebilen T7 RNA polimeraz genini rekombinant olarak bulundurmaktadır.

Burada kontrol edilebilen promotörün kullanılması rekombinant proteinin istenildiği anda üretilmesini sağlar. Vektörün üzerindeki bölgenin baskılanması ise *lac repressör proteini* tarafından yapılır. Vektörde ve *E.coli* genomunda bulunan her iki T7 promotörünün kontrolü *lac repressör* proteinine bağlanarak onu inhibe eden yapay laktoz analogu olan IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopirinosidaz) ile yapılabilir. *E.coli* laktoz bulunmayan ortamda büyütüldüğünden *lac repressör proteini* laktoz ile inhibe edilemediğinden sürekli olarak her iki promotora bağlanarak hedef protein ile T7 RNA polimeraz genlerinin transkripsiyonunu engeller. Ortama IPTG eklendiğinde, *lac repressör proteini* IPTG'ye bağlanarak transkripsiyonel baskılamayı kaldırır ve T7 RNA polimeraz proteini üretilbildiğinden hedef rekombinant proteininin üretimi gerçekleştirilmiş olur [59].

2.1.2. Çalışmada kullanılan plazmid DNA'lar

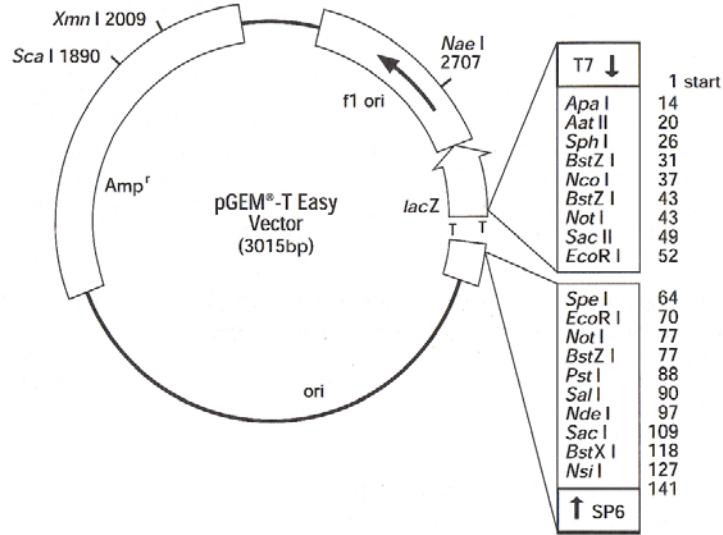
Genin klonlanması ve rekombinant proteinin ifadesi için iki farklı plazmid DNA ticari olarak satın alınarak çalışmada kullanılmıştır.

pGEM[®]-T Easy Vector System I Klonlama Vektörü

pGEM-T Easy plazmidini PZR ile üretilen genlerin klonlanması amaçlanarak üretilmiştir (Promega, A1360). Plazmidin klonlama bölgesinin 3' uçlarına bir adet ekstra timin bazı yerleştirilmiştir ve plazmid üzerinde bulunan 5' uçların fosfat grupları çıkarılmıştır. Bu sayede plazmidin ligasyon esnasında halkasal yapı oluşturması engellenerek klonlama etkinliği artırılmıştır. Bu tür plazmitlere yapılacak olan klonlanmanın gerçekleşebilmesi için klonlanacak parçanın 3' kısmında sarkan adenin bazı (karşı iplikte tamamlayıcısı olmayan) olmalıdır. Böylelikle klonlanacak parçada bulunan sarkan A bazı ile plazmitte bulunan sarkan T bazı ligasyon ile hibridize olur. Fosfat eksikliğinden dolayı birleşmeyen diğer uçlar ise transformasyondan sonra konağın DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır, böylelikle tam bir halkasal DNA molekülü oluşmuş olur.

Klonlama bölgesi vektör üzerindeki β -galaktosidaz enzimini üreten *lac-Z* geni içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede pozitif klonların taranması kolonilerdeki

renk farklılığına göre yapılabilmektedir. Klonlama 3' sarkık timin bazları ile yapılabileceği gibi istenirse vektörün çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzimleri vasıtasıyla da gerçekleştirilebilir (Şekil 2.1.) [60, 61].



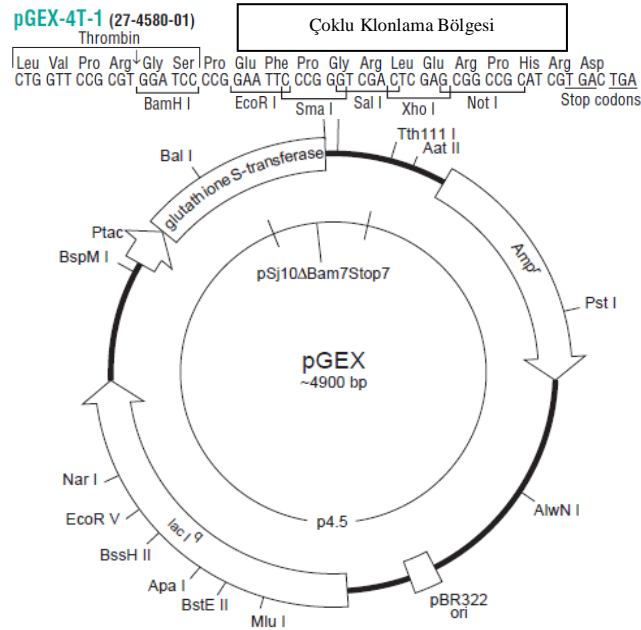
Şekil 2.1. pGEM®-T Easy vektör DNA yapısı [62]: *lacZ* bölgesi çoklu klonlama bölgesini (dikdörtgen kutu içinde) de içeren mavi/beyaz seçilimin oluşması için β -galaktosidaz kodlayan genidir. Amp^r amfisilin antibiyotikine karşı direnç genidir ve ori bölgeleri vektör DNA'nın konakçı içerisinde çoğalması için gerekli replikasyon başlangıç noktalarıdır [60, 61].

pGEX 4T-1 Protein İfadesi Vektörü

pGEX 4T-1 plazmidi rekombinant olarak üretilmek istenen proteinin N terminal bölgesine, 26 kDa büyüklüğündeki GST (glutasyon S-transferaz) proteinine rekombinant olarak bağlanması (füzyonu) ile üretilmesini sağlayan bir protein ifade vektörüdür (GE Healthcare, 27-4580-01).

Vektör üzerinde protein ifadesi *tac* promotörü altında sıkı (sızıntısız transkripsiyon) bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu promotör bölge laktoz analogu olan izopropil- β -D-tiogalaktosidaz (IPTG) ile indüklenerek protein ifadesi başlatılır. Üretilen protein GST proteinine bağlı olarak üretilir ve saflaştırılması adımı sadece GST proteinine bağlanabilen glutasyon partikülleri kullanılır. Bu sayede füzyon proteininin GST kısmı bu partiküller tarafından

tutularak ifadesi yapılmış olan proteinin saflaştırılması sağlanır. Eğer istenirse füzyon proteini trombin proteaz enzimi ile kesilerek GST proteininin üretilen proteinden ayrılması da sağlanabilir [63].



Şekil 2.2. pGEX 4T-1 protein ifade vektör yapısı [62]: Amp^r; amfisilin antibiyotiğine karşı direnç genidir. **Çoklu klonlama bölgesi;** GST proteinini kodlayan bölgeden hemen sonra gelmektedir. **Ori;** vektör DNA'nın konakçı içerisinde çoğalması için gerekli replikasyon başlangıç noktasıdır [63].

2.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

LB (Luria-Bertani) Broth (Sıvı) Besiyeri

Besiyeri hazırlığında 10 gr. Tryptone (Fluka, T9410), 5 gr. Yeast Extract (Sigma, Y1625), 5 gr. NaCl (Merck, 567441) bir erlende tartılır ve 600 ml dH₂O eklenir. Maddeler çözüldükten sonra 1 lt'ye tamamlanır. İstenilen miktarlarda erlenlere aktararak bölünür. 121 °C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

LB (Luria-Bertani) Agar (Katı) Amfisilin Besiyeri

LB Agar ve 1000X amfisilin stok Solüsyonu kullanılmıştır. LB Agar'dan 37 gr. tartılır ve dH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir. 50°C'ye soğutulduktan sonra 1000x stok amfisilinden 1 ml. eklenerek son hacimdeki amfisilin miktarı 1000/ml olacak şekilde besiyeri hazırlanır. Steril petri tabaklarına uygun miktarlarda (yaklaşık olarak 20-25ml) dökülür ve çeker ocakta kapakları yarı açık bırakılarak nem uzaklaştırıldıktan sonra gece boyu oda sıcaklığında donmaya bırakılır. Donduktan sonra petriler hava almayacak şekilde poşetlenerek 4 °C'de 1 ay ya da oda sıcaklığında 1 hafta saklanır.

PPY Besiyeri

Proteaz Pepton'dan 10 gr. ve 1,5 gr. Yeast Extract bir erlende, 600 ml dH₂O ile manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. Daha sonra üzerlerine 1 ml 10 mM FeCl₂.6H₂O eklenir, pH 7'ye ayarlanır ve dH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. İstenilen miktarlarda erlenlere aktarılır. 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir.

2.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- Amfisilin, (Sigma, A0104): 1000X stok solüsyon için 1ml steril dH₂O'da 100 mg amfisilin çözülür, filtre ile steril edilir ve 100 - 500 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanır.
- Etidyum bromür, (Sigma, E8751): Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 500µl'lik hacimlerde dH₂O'da çözülerek stok solüsyon olarak hazırlanır ve 4 °C'de saklanır. Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde kullanılır.
- X-Gal, (Bio Basic, 12872): 100mg X-Gal 2 ml N,N'-dimethylformamid'de son hacim 50 mg/ml olacak şekilde çözülerek alüminyum folyo ile kaplanmış ependorflarda -20 °C'de saklanır.
- Gliserol (Sigma, G2289; Merck, 1.04092): % 80 oranında steril dH₂O ile seyreltilerek kullanılmıştır.
- Trizma Base (Applichem, A2264)
- Tris HCl (Sigma, 05432)

- EDTA (Fluka, 03620)
- TE Tamponu (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl pH 7,4 ile 1 mM EDTA, pH 8,0 eşit hacimlerde karıştırılır.
- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA): 108 gr trizma base ve borik asit 600 ml dH₂O da çözüldükten sonra 40 ml 0,5 M EDTA eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.
- TES Tamponu: 100 mM Tris HCl (pH 7,5), 100 mM EDTA ve 100 mM NaCl olacak şekilde istenilen hacimde hazırlanır.
- PBS Tamponu: 8 gr. NaCl; 0,2 gr. KCl; 1,44 gr. Na₂HPO₄ ve 0,24 gr. KH₂PO₄ 800 ml dH₂O'da çözülür. pH 7,4'e ayarlanır ve 1 litreye dH₂O ile tamamlanır. Otoklav ile steril edilir.
- 2X SDS Yükleme tamponu: 250 µl Tris-HCl pH 6,8; 200 µl % 20 SDS; 200 µl Gliserol; 100 µl 2-merkaptto etanol; 0,1 gr Bromfenol Blue, dH₂O ile 1 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
- Doğal-PAGE Yükleme Tamponu: 1,25 ml Tris-HCl pH 6,8; 3 ml gliserol; 0,2 ml Bromfenol Blue (% 0,5); 5,55 ml dH₂O. Oda sıcaklığında bekletilir.
- 10X Native Page Tank Tamponu: 30,3 gr. Tris Base ve 144,41 gr. glisin tartılır ve 1 litreye dH₂O ile tamamlanır. Oda sıcaklığında bekletilir.
- Western Blot Transfer Tamponu: 3 gr Tris-HCl; 14,4 gr Glisin ve 200 ml Metanol, dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanarak hazırlanır.
- Etanol (Riedel, 071029): Farklı konsantrasyonlarda etanollar kullanılmıştır (% 70, % 75, % 90 ve % 100).
- Metanol (Rieledel de-Haen, 24229).
- Kalsiyum Klorit, CaCl₂ 2H₂O (Sigma, C1016; Duchefa C0504): 7.34 gr CaCl₂ üzerine 1 lt steril su ile hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır.
- İzopropanol (Riedel, 24137).
- Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (Sigma, P2069): Birçok amaç için kullanılan bu solüsyon Equilibration Buffer içermektedir. Genomik DNA izolasyonu gibi yüksek pH gerektiren uygulamalarda Equilibration Buffer ile fenolik fazın pH'sı 8 civarına yükseltilmelidir (Fenolik faz sarı ya da kahverengi ise kullanılmamalıdır). Bunun için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol solüsyonuna Equilibration Buffer'ın tümü katılarak yavaşça

karıştırılır ve yaklaşık 2-4 saat içinde (tercihen gece boyu) fazlar ayrıldıktan sonra DNA izolasyonunda kullanılabilir. Sonuçta pH, 6.7 ± 0.2 'den 8.0 ± 0.2 ye yükselecektir. Tampon eklendikten sonra ışıktan koruyarak -20° 'de 1 yıl saklanabilir. için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol'ün pH'sı pH metre ile doğru şekilde ölçülmesi çok güçtür, bunun yerine pH kağıtları kullanılabilir.

- Kloroform (Sigma, C2432).
- TRIZOL Reagent (Sigma, T9424).
- % 30'luk Akrilamid çözeltisi: 87,6 gr. Akrilamid ve 2,4 gr Bis-akrilamid 300 ml dH₂O içerisinde çözülür. Filtre ile steril edilerek ışık görmeyecek bir şekilde 4°C 'de saklanır.
- 1X SDS-Page Tank Tamponu: 3,03 gr. Tris-Base; 14,41 gr. Glisin ve 1 gr. SDS 1 lt dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanır. İsteğe bağlı olarak 10X stok tampon da hazırlanabilir.
- TRI Reagent (Fluka, 93289).
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), (Applichem, A2263).
- Akrilamid (Applichem, A3812).
- Bis-akrilamid (Applichem, A3636).
- Glisin (Merck, 5.00190).
- APS (Amonyum Persülfat), (Applichem, 2941).
- 2-Merkapto-Etanol (Sigma, M3140).
- TEMED (N-N-N'-N'-Tetrametiletildiamin) (Sigma, T9281)
- 10X TBS Tamponu
- 1X TBS-T Tamponu: 1X TBS tamponuna son hacimde % 5 olacak şekilde Tween-20 eklenmesi ile hazırlanır.
- Lizozim (Lysozyme from henn egg white) (Fluka, 62971).
- Tween-20 (Polietilen Sorbitan Monolaurat) (Sigma P9416).
- Triton X-100 (Sigma, T8787).
- Magnezyum Klorür.
- Borik Asit (BioBasic, BB0044).
- BSA (Albumin from Bovine Serum) (Fluka, 62971; Sigma, A2153).

- 4CN (4-Cloro-1-Naphtol) (Fluka, 25328).
- PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas, R0579).
- Glikojen (Glykogen from oyster) (Sigma, G8751).
- Agaroz A (BioBasic, D0012).
- MOPS (Applichem, A2947).
- 10X MOPS Tamponu: 200 mM morpholineopropanesulfonic acid (MOPS), 50 mM sodyum asetat, 20 mM EDTA ile hazırlanır. NaOH kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanır ve otoklavlanır. Otoklavlandıktan sonra çözelti sarıya dönüşecektir ancak bu durumun performans üzerinde bir etkisi yoktur. RNA koşma tamponu için 1:10 oranında seyreltilmelidir.
- 20x SSC: 3M NaCl ve 0,3 M sodyum sitrat (Trisodium citrate dihydrate) kullanılır, pH 7'ye ayarlanarak otoklavlanır.
- Low stringency yıkama tamponu: 2x SSC (Stok 20x SSC'nin 1:10 dilüsyonu), % 0.1 SDS (Stok % 10 SDS'nin 1:100 dilüsyonu).
- High stringency yıkama tamponu: 0.1x SSC (Stok 20x SSC'nin 1:200 dilüsyonu), 0.1% SDS (Stok % 10 SDS'nin 1:100 dilüsyonu).
- Maleic Asit Tamponu: 0,1 M Maleik asit ve 0,15 M NaCl kullanılarak hazırlanır. pH, katı NaOH kullanılarak 7,5'a ayarlanır.
- Deteksiyon Tamponu: 0,1M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9.5
- Yıkama Tamponu: 0,1 M Maleik asit, 0,15 M NaCl; pH 7.5; %0.3 (v/v) Tween 20
- RNA yükleme tamponu: 250 µl, %100 deiyonize formamid, 83 µl, %37'lik formaldehit, 50 µl 10x MOPS tamponu, 10 µl, %12,5 bromphenol blue, 50 µl RNase-free 100% gliserol ve DEPC'li su ile 500 µl'ye tamamlanır.
- Sodyum Klorür NaCl (Merck, 1.06400).
- Sodyum Florit NaF (Applichem, A0401).
- Bromfenol Blue (Sigma, B6131).
- Maleik Asit (Maleic Acid Disodium Salt Hydrate) (Aldrich, 234575).

2.1.5. Çalışmada kullanılan cihazlar

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj: (Thermo IC, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Avanti J 30I), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC25090), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), UV Cross Linker (Stratalinker UV Crosslinker, Model 2400), pH Metre (Orion), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Nanodrop spektrofotometre (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV-2101 PC Shimadzu), Terazî (Ohaus pro AV812), Mini-Protean[®] Tetra Cell Protein Elektroforezi (BioRad, katalog no 165-8000/165-8001).

2.1.6. Çalışmada kullanılan kitler

QIAquick PCR purification kiti (Qiagen, 268106), QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123), pGEMTeasy vektör sistemi (Promega, 212440), RNeasy Midi Kit (Qiagen,75144), RevertAid first strand cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622), Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, K0519), Bulk GST Purification Module, Glutasyon sefaroze 4B partikülleri içerir (GE Healthcare, katalog no 27-4570-01)

2.1.7. Çalışmada kullanılan enzim setleri

Taq DNA Polymerase, (Fermentas, EP0401), Pfu DNA Polymerase (Fermentas, EP0501), SpeedSTAR[®] HS DNA Polymerase (Takara, RR070A), PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Takara, R010A), Rnase A Solution (BioBasic), RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega, M610A),

2.2. Yöntem

2.2.1. *Tetrahymena thermophila* hücrelerinden genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu katalaz geninin genomik kopyasının üretilmesi amacı ile yapılmıştır. Üretilen bu genomik kopya ile Southern Blot deneyi, DNA parmak izi analizi ve ekson/intron analizi yapılabilir. Genomik DNA izolasyonu için “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” kitabı temel alınarak oluşturulan Dr. Harry van Keulen'nin laboratuvar protokolleri uygulanmıştır [64]. Taze olarak 30 ml steril PPY besiyerine ekimi yapılan hücre kültürü gece boyunca çalkalamalı etüvde 120 rpm'de çalkalamayla büyütülmüştür. Ertesi sabah bulanıklık, koku ve mikroskopik gözlem kriterlerine göre kontaminasyon gözlenmeyen kültürlerden genomik DNA izolasyonuna geçilmiş ve bunun için *T. thermophila* hücreleri öncelikli olarak 7000 rpm'de santrifüjlenerek toplandıktan sonra üst sıvı dökülmüş ve elde edilen hücre çökeltisi kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA; sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü ile RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

Aşağıdaki protokolda Thermo IC marka santrifüj cihazı kullanılmıştır.

- 1) PPY besiyerine ekilen *T. thermophila* hücreleri gece boyu 37°C ve 120 rpm'de büyütülür.
- 2) Gelişim istenilen düzeye erişince, 25 ml'lik hücre kültürü alınır ve 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ile yıkanır.
- 3) 25 ml'lik yıkanmış hücre kültürü 7.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir. Az bir miktar süpernatant tüpte bırakılır ve geri kalan dökülür.
- 5) Hücre peleti kalan sıvı içerisinde yavaş bir biçimde çalkalanarak çözülür.
- 6) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilir ve yavaşça ters-düz edilerek karıştırılır.

- 7) Hücre süspansiyonu 15 dakika süre ile 3.500 rpm'de santrifüj edilir.
- 8) Santrifüj sonrası üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle (veya ağız jilette kesilen 1000 µl'lik mikropipetle) alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.
- 9) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek yavaşça ters-düz edilir (ikinci phenol:chloroform saflaştırması).
- 10) Karışım 15 dakika 3.500 rpm de santrifüj edilir.

8, 9 ve 10'uncu adımlar iki kere daha tekrarlanır. Toplamda 3 kez fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) muamelesi yapılır.

- 11) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle yeni bir tüpe alınır.
- 12) alınan miktar kadar izopropil alkol ilave edilir ve karıştırılır.
- 13) Karışım 13.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 14) Üst faz dökülür ve pelet kurumaya bırakılır.

Burada peletin tamamen alkolden arınmış olması gerekir. Bu nedenle alkol çeker ocağa ya da konsantratörde de uçurulabilir.

- 15) Pelet kuruduktan sonra 100 µl TE ile çözülür.
- 16) Elde edilen genomik DNA agaroz jel elektroforezinde ve spektrofotometrede analiz edilerek kalitesi ölçülür.

2.2.2. *Tetrahymena thermophila* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyonu katalaz geninin cDNA'sının oluşturulması ve gen ifadesinin seviyesinin belirlenmesi ile gen ifadesinin varlığını/yokluğunu gösterilmesi için yapılan Northern Blot deneyinde kullanılması amacı ile yapılmıştır. Deneyin amacına göre klasik yöntem (Trizol) ve kitle (Qiagen RNeasy Mini Kit, 74104) gerçekleştirilmiştir.

Toplam RNA İzolasyonu – Qiagen RNeasy Mini Kit

Aşağıdaki protokolda Thermo IC marka santrifüj cihazı kullanılmıştır.

- 1) PPY besiyerinde 24 saat gelişen *T.thermophila* hücrelerinden 1-3 ml alınarak 15.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 2) Pelet 350µl RLT tamponu ile iyice pipetlenir.
- 3) Taze hazırlanmış %70'lik alkolden 350µl eklenerek iyice kaıştırılır.
- 4) Karışımdan en fazla 700µl alınarak RNeasy spin kolonlarına aktarılır ve hemen 23 saniye süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir ve dipte kalan sıvı atılır.
- 5) Kolona 700 µl RW1 aktararak hemen 23 saniye süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir ve dipte kalan sıvı atılır.
- 6) Kolona 500 µl RPE katır ve 23 saniye süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir. Dipte kalan sıvı atılır.
- 7) Kolona tekrar 500 µl RPE katır ve 2 dakika süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir. Dipte kalan sıvı atılır.
- 8) Kolon kitte bulunan biriktirme tüpüne aktarılarak 15000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir, kalan etanol uzaklaştırılır.
- 9) Kolon yeni bir ependorf tüpüne (kitte bulunmuyor) yerleştirilir ve kolonun tam ortasına yavaşça kitte bulunan Rnzsız sudan 35 µl eklenir ve 1 dakika süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir.
- 10) Santrifüj sonunda toplanan sıvı tekrar kolona yüklenir ve bir kez daha 1 dakika süre ile 13.200 rpm'de santrifüj edilir.

Toplam RNA İzolasyonu – TRI Reagent (*Tetrahymena thermophila*): TRIzol RNA'nın bütünlüğünü korur ve diğer hücresel yapıların parçalanmasını sağlar. İzolasyonda TRIzol RNA'ya bağlanarak RNA'nın sulu fazda kalmasını sağlar. Geriye kalan organik fazda ise DNA ve protein bulunur. Bu faz istenirse saklanarak DNA ve protein izolasyonları için kullanılabilir [65].

TRIZol yöntemi ile toplam RNA izolasyonu adımları aşağıda verilmiştir.

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) *Tetrahymena thermophila* 20 ml PPY içerisinde gece boyu 37 °C ve 140 rpm'de büyütülür.
- 2) 3 ml hücre 7.500 rpm'de 10 dk santrifüj ile peletlenir.
- 3) Süpernatant atılır ve pelet üzerine 1 ml TRI Reagent eklenir ve pelet pipetlenerek iyice karıştırılır.
- 4) Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 5) Sonrasında karışıma TRI'nin her 1 ml'si için 200 Kloroform eklenir. Örnek ağzı sıkıca kapalı olarak 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalanır. Bu adımda kesinlikle vorteks kullanılmaz.
- 6) Karışım 2-15 dk oda sıcaklığına bırakılır. Sonrasında 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dk süre ile santrifüj edilir.
- 7) Renksiz sıvı üst faz dikkatlice alınır ve yeni bir tüpe aktarılır. İleride DNA ve proteinlerin izolasyonu için, ara-faz ve organik faz 4°C'de saklanabilir.
- 8) Üst faza 3. Basamakta kullanılan TRI'nin her 1ml'si için 500 µl izopropil alkol eklenerek RNA çökeltilir.
- 10) Karışım 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilir. Sonrasında 4°C'de 12.000 rpm'de 8 dk santrifüj edilir.
- 11) RNA peleti tüpün dip kısmında jelimsi bir hal ile görünür olmalıdır.
- 12) Süpernatant atılır ve RNA peleti 3. adımda kullanılan TRI'nin her 1ml'si için en az 1ml %75'lik etil alkol ile vortekslenerek yıkanır.
- 13) Yıkamadan sonra örnek 4°C'de 7.500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek peletin tüpün dibine oturması sağlanır. Eğer pelet hareketli ise santrifüj işlemi 4°C'de 12.000 rpm'de 5 dk olarak tekrarlanır.
- 14) Süpernatant dökülerek ve pelet çeker ocakta 15-20 dk kurutularak etil alkol uzaklaştırılır ve RNA peleti 50-100 µl dH₂O ile çözülür.

2.2.3. Toplam RNA'ya DNaz uygulanması

Total RNA'dan DNA uzaklaştırılması işleminin yapılması üretilecek cDNA kopyalarının RNA kalıbından üretilmesini sağlar. Aksi halde üretilen cDNA'lar içeriklerinde gDNA'dan gelecek kopyaları da taşıyabilirler. Bu durumda gen ifadesi veya gen varlığı/yokluğu durumları için yorum yapılamaz. Çünkü üretilen cDNA kaynağı belli değildir. Bu nedenle toplam RNA içerisindeki tüm genomik DNA'ların temizlenmesi gereklidir.

Bu amaçla Promega RQ1 RNase-Free DNase enzimi toplam RNA örneklerinden DNA'ların giderilmesi amacı ile uygulanmıştır. Üretici firmanın tavsiye ettiği ve uygulanan protokol şu şekildedir.

Aşağıdaki protokole Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) Toplam RNA 1-8 µl, RQ1 RNase-Free DNase 10x Tamponu 1 µl, RQ1 RNase-Free DNase 1 U/µg RNA eklenir ve nükleazsız su ile son hacim 10 µl'ye tamamlanır.
- 2) 37°C'de 30 dakika inkübe edilir (Not: Kullanılan RNA'nın µg'ı başına 1 ünite DNaz kullanılır).
- 3) İnkübasyon sonunda 1µl RQ1 DNaseStop Solution eklenerek reaksiyon durdurulur.
- 4) Reaksiyon 65°C'de 10 dakika inkübasyona tutularak DNase enzimi inaktive edilir.

Bu protokole alternatif olan ve daha az enzim kullanılarak gerçekleştirilebilecek klasik protokol ise aşağıdaki gibidir:

- 1) Total RNA örneği miktarı ne ise 250 µl'ye dH₂O ile tamamlanır.
- 2) 50 mM Tris-HCl'den (pH=8,8) 80 µl eklenir. Daha sonra 5,5 µl RQ1 Rnase-Free Dnase eklenir.
- 3) Su banyosu ya da PZR cihazında 38 °C'de 45 dakika bekletilir.
- 4) Sonra DNaz enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dakika bekletilir.

- 5) Üzerine 33 µl, 0,3 M NaOAc ve 660 µl % 95'lik EtOH eklenir. -20°C'de gece boyu RNA çöktürülmesi yapılır.
- 6) Ertesi gün 7.500 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek peletin tüpün dibine oturması sağlanır. Eğer pelet hareketli ise santrifüj işlemi 12.000 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile tekrarlanır.
- 7) RNA peleti 50-100 µl dH₂O ile çözülür. Elde edilen RNA, agaroz jel elektroforezinde ve spektrofotometrede analiz edilerek kalitesi ölçülür.

2.2.4. İzole edilen DNA ve RNA'ların spektrofotometrik analizleri

DNA ve RNA örneklerinden μ 5 kullanılarak nanodrop'ta uygun programlar (DNA için Double Stranded DNA, RNA için RNA) seçilerek ölçümler yapılmıştır.

Klasik spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak RNA ve DNA miktarı saptanmıştır.

- RNA miktarı= OD₂₆₀ değeri x dilüsyon katsayısı x 40µg /ml
- DNA miktarı= OD₂₆₀ değeri x dilüsyon katsayısı x 50µg /ml

2.2.5. Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi

Toplam RNA içerisinde katalazın cDNA'sının oluşturulması için mRNA'lar hedeflenerek mRNA'lardan cDNA'lar üretilir. Bu toplam cDNA havuzu kullanılarak istenilen genin mRNA kopyası DNA olarak oluşturulabilir. cDNA sentezi adımları aşağıda verilmiştir. Reaksiyonda Fermentas "RevertAid[®] First Strand cDNA Synthesis Kit" kullanılmıştır.

- 1) Aşağıda verilen maddeler uygun miktarda buz üzerinde hazırlanır.
 - Total RNA 10ng-5µg
 - oligo(dT)18 primer (0.5 µg/µl) 1 µl
- 2) Karışım dH₂O ile 12 µl'ye karıştırılarak tamamlanır.
- 3) 70 °C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra buza alınır.

4) Buz üzerinde aşağıdakiler verilen miktarlarda eklenir.

- 5x M-MLV Rtase Buffer 5µl
- Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (20 u/µl) 1 µl
- 10 mM dNTP mix 2 µl

Yavaşça karıştırılır ve 37 °C 5 dk su banyosunda inkübe edilir.

5) RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (200 u/µl) enziminden 1 µl eklenerek, 42 °C'de 60 dk su banyosunda inkübe edilir.

6) Reaksiyon 70 °C'de 10 dk inkübe edilip buza alınması ile sonlandırılır.

2.2.6. Katalaz geninin cDNA'sının ve genomik kopyasının üretilmesi için gerekli gene özgül primerlerin tasarlanması

Klonlamada kullanılacak primer çifti *Tetrahymena thermophila* SB 210 ırkının genom projesi bilgisinden alınarak tasarlanmıştır [53]. Klonlama için tasarlanan primer çifti aşağıda verilmiştir.

Katalaz Gen Spesifik İleri Primeri:

FCat: Primerin oturma sıcaklığı 50 mM Na⁺ 61,33 oC

5'-GATCCCGGGAATTCATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTG-3'

Katalaz Gen Spesifik Geri Primeri:

RCat: Primerin oturma sıcaklığı 50 Mm Na⁺ 64,33 oC

5'-AACCATGTCGACTCAGAGGTTAGATCCGTTAGCAGGGAAGCC-3'

Klonlama ve gen ifadesinin yapılabilmesi için primerlerin uç kısımlarına ileri primer için EcoRI (GAATTC) ve geri primer için SalI (GTCGAC) restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenmiştir.

2.2.7. Katalaz geninin genomik kopyasının üretilmesi

Genomik kopyanın çoğaltılması için kurulan PZR reaksiyonunda katalaz genine özgül primerler (Fcat ve Rcat) kullanılmıştır. Reaksiyon fermentas DNA polimeraz enzim seti ile şu şekilde kurulmuştur;

2,5 µl 10X tampon; 2,5 µl 25 mM MgCl₂; 2 µl 2,5 µM dNTP karışımı; 2,5 µl Fcat primeri; 2,5 µl Rcat primeri; 0,5 µl genomik DNA (1,220 ng/µl); 0,2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) ve üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12,3µl ddH₂O eklenerek hazırlanmıştır.

PZR reaksiyonu ise;

94 °C 1 dakika (1 döngü); 94 °C 1 dakika, 56 °C 30 saniye, 72 °C 1,5 dakika (30 döngü); 72 °C 2 dakika ve 4 °C sabit (1 döngü) olacak şekilde programlanmıştır.

2.2.8. Katalaz geninin cDNA'sının üretilmesi

cDNA üretimi için katalaz gen özgül primerleri (Fcat ve Rcat) kullanılmıştır. Reaksiyon Fermentas DNA polimeraz enzim seti ile şu şekilde kurulmuştur;

2,5 µl 10X tampon; 2,5 µl 25 mM MgCl₂; 2 µl 2,5 µM dNTP karışımı; 2,5 µl Fcat primeri; 2,5 µl Rcat primeri; 0,5 µl cDNA; 0,2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) ve üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12,3µl ddH₂O eklenerek hazırlanmıştır.

PZR reaksiyonu ise;

94 °C 1 dakika, 56 °C 30 saniye, 72 °C 1,5 dakika (30 döngü); 72 °C 2 dakika ve 4 °C sabit (1 döngü) olacak şekilde programlanmıştır.

2.2.9. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi

PZR ile elde edilen genomik ve cDNA kopyaları agaroz jelde yürütülerek UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde elde edilen parçalar kesilerek saflaştırılmaya alınmıştır. Saflaştırma için QIAquick Gel Extraction Kit kullanılmıştır. Protokol

adımları aşağıda verilmiştir [66]. Yapılan değişiklikler adımın altına italik olarak eklenmiştir.

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) İstenilen DNA bantları agaroz jelden steril bir bisturi ile kesilerek alınır.
- 2) Kesilen jel parçası tartılarak mg miktarı kadar QG tamponundan 3 hacim eklenir (100mg ~ 100µg).
- 3) Tüp 50 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek jelin çözünmesi sağlanır, 2-3 dakikada bir vorteks ile karıştırılmalıdır.

Jelin tamamen çözünmesi 10 dakikadan fazla zaman alabilir, bu nedenle süre uzatılabilir.

- 4) Jel tamamen çözüldükten sonra karışımın renginin sarımtırak olması gereklidir. Karışım üzerine 2'nci adımda tartılan jel miktarına göre 1 hacim izopropil alkol eklenir ve pipetlenerek karıştırılır.
- 5) Karışım 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş kolon üzerine eklenir ve 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 6) Tüpün içindeki karışım dökülür ve kolona 0,5 ml QG tamponu eklenir, 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 7) Tüpün içindeki karışım dökülür ve kolona 0,75 ml PE tamponu eklenerek kolon 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüjlenerek yıkanır.

Adımda PE tamponu eklendiğinde 2-5 dakika beklenebilir. Bu yıkamanın oranını artırabilir.

- 8) Tüpün içindeki karışım dökülerek kolon boş olarak maksimum hızda 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 9) Kolon 1,5 ml'lik tüpe alınır ve kit içeriğindeki EB'den 50 µl eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.

Burada EB tamponu yerine dH₂O'de kullanılabilir. Burada en düşük 30 µl hacim kullanılabilir ve tampon (veya su) eklendikten sonra 2-5 dakika beklenebilir.

10) İzole edilen DNA agaroz jelde ve nanodropta kontrol edilir.

2.2.10. PZR ürünlerinin klonlama plazmitine aktarılması

cDNA parçasının klonlanması için Promega “pGEM-T[®] Easy Vector System I” kullanılmıştır [61]. Vektör sistemi klonlama için klonlanacak parçaların uç kısımlarında A bazına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle klonlanacak parçaların uç kısımlarına A bazı eklenmesi gereklidir. *Thermus* cinsine ait birçok polimeraz enziminin 3' ucuna polimerizasyon sonrasında ekstradan bir baz ekleme (genellikle adenin) özelliği vardır. Burada polimeraz enzimini bu özelliği kullanılarak vektör DNA'ya klonlanacak parça yerleştirilir [67].

3' A Ekleme Reaksiyonu

PZR ürünlerine A ekleme reaksiyonunda kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.

- 1 µl 10X Taq Polimeraz tamponu
- 1 µl 25 mM MgCl₂
- 0,5 µl 2,5 µM dATP
- 6.5 µl PZR ürünü
- 1 µl Taq DNA Polimeraz ile hazırlanan karışım 70°C'de 30 dakika süre ile PZR cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur.

3' ucuna A bazı eklenmiş olan DNA parçaları herhangi bir saflaştırmaya alınmadan doğrudan ligasyon reaksiyonuna alınır [68]. Ligasyon reaksiyonunda klonlanacak DNA parçasının nanogram miktarı hesaplanır. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$x = \frac{\text{Vektör (ng)}}{\text{Vektör Büyüklüğü (kbç)}} \times \frac{\text{Klonlanacak DNA (mol)}}{\text{Vektör (mol)}}$$

Hesaplamaya göre klonlanacak DNA miktarı (x) nanogram olarak bulunur. Kullanılması gereken klonlanacak DNA miktarı yukarıda formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon aşağıda verilen şekilde kurulur:

2X Rapid Ligation Bufer	5 μ l
pGEM-T Easy Vektör (50ng/ μ l)	1 μ l
Klonlanacak DNA	x μ l
T4 DNA Ligase (5u/ μ l)	1 μ l
Deiyonize su	10 μ l'ye tamamlanmıştır.

Reaksiyon, 16 °C'de PZR cihazında maksimum 18 saat süre ile reaksiyona sokulmuştur.

2.2.11. *Escherichia coli* kompetent hücre hazırlığı

Çalışmada kullanılan klonlama konakçısı *Escherichia coli* XL I – Blue ve protein ifade konakçısı *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS ırklarının klonlama öncesinde dışarıdan yabancı DNA alabilecek yapı kazanmaları, yani kompetent hale getirilmeleri gerekmektedir. Hücrelere kompetent özellik kazandırmak için aşağıdaki protokol takip edilmiştir [64].

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) Kompetent yapılmak istenen hücre tipi LB agar besiyerine ekilir ve yayılır. Oluşan tek kolonilerden LB Broth besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de 120 rpm'de inkübe edilir.
- 2) Ertesi gün canlılığı yüksek olan hücre kültüründen 0,3-0,5 ml alınarak 100 ml'lik taze LB Broth besiyerine ekilir. 120 rpm, 37 °C'de inkübasyona devam edilir.
- 3) Erken logaritmik faza erişen kültürün 550 nm'deki OD alınarak hücre yoğunluğu ölçülür. OD 0,4 ila 0,6 arasında olmalıdır. Bu işlem için, inkübasyon başlamasından 70-80 dakika sonra spektrofotometrik ölçümler

belirli aralıklarla yapılmaya başlanır. Spektrofotometri ölçümleri için kör olarak dH₂O kullanılmıştır.

- 4) İstenilen OD aralığına ulaştığında, kültür 6.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Hücre miktarı fazla ise peletleme birkaç adımda yapılır.
- 5) Santrifüj sonunda süpernatant dökülür ve pelet 7,5 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülür ve 15 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda karışım tekrar 6.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 7) Santrifüj sonunda üst faz dökülür ve hücre peleti 0,25 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile yavaşça çözülür. Bu adımda hücreler kırılabilir oldukları için pipetlemede dikkatli olunması gereklidir.
- 8) Eğer hücrelere hemen DNA transformasyonu yapılacaksa hücreler 50 µl hacimlerde bölünerek transformasyona geçilir. Fakat hücreler saklanacaksa 0,25 ml hücre için 0,6 ml % 80'lik gliserol eklenerek karıştırılır ve 30 µl hacimlere bölünerek -86 °C'ye kaldırılır.

2.2.12. Plazmidin kompetent hücrelere transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmidin çoğaltılması veya protein ifadesinin gerçekleştirilmesi için kompetent hücrelere plazmidin aktarımı gereklidir. Transformasyon protokolünde aşağıdaki adımlar takip edilir [64].

- 1) Kompetent hücreler -80 °C'den alınır ve buzda 5 dakika süre ile bekletilir.
- 2) Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenir ve buzda 30 dakika süre ile bekletilir.
- 3) Süre sonunda örnekler buzdan alınır ve 42 °C'ye ayarlanan ısı bloğuna yerleştirilir.
- 4) Hücreler ısı bloğunda 2 dakika süre ile bekletilir ve sonrasında hemen buza alınarak 3 dakika da buzda bekletilir.

Burada 42 °C ve buzda bekletilme süreleri önemlidir ve aşılmamalıdır.

- 5) Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 500 µl LB Broth eklenir ve 37 °C’de 30 dakika süre ile inkübe edilir.

Burada 30 dakikalık süre çok fazla aşılmamalıdır. Aksi takdirde hücreler katı besiyerine ekildiklerinde çok fazla üremeye bağlı petri yüzeyini kaplayarak, halı oluşturabilir ve bu nedenle tek koloniler seçilemez.

- 6) Bu süre içinde ekim yapılacak LB Agar petrilere 40 µl X-Gal eklenir ve besiyerinin çözeltiyi çekmesi beklenir.
- 7) Hücreler süre bittikten sonra 8.000 rpm de 2 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 8) Tüp içerisindeki yaklaşık 50 µl sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür.
- 9) Pelet kalan sıvı içerisinde çözülür, sonra LB-agar-ampisilin-X-Gal tabağının yüzeyine yayılır ve bir gece boyu 37 °C’de inkübe edilir.

Eğer mavi/beyaz seçim yapılıyorsa beyaz renkli olan kolonilerden 10-20 adet koloni seçilerek numaralandırılır ve öze yardımıyla alınarak, önceden hazırlanmış olan 40 µl X-Gal içeren LB Agar Amfisilin (100µg/µl) petril erine çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturulur. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 ml’lik 100 µg/µl amfisilinli LB medium besiyerine ekim yapılır. X-Gal içeren LB Agar amfisilin tabakları ve LB Broth besiyerleri 37 °C’de bir gece inkübe edilir. Ertesi gün sıvı besiyerinden vektör DNA izolasyonu yapılarak klonlamanın olup olmadığı restriksiyon enzim analizi ile kontrol edilir.

2.2.13 Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ya da plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapılabilir. Bunu dışında klonlanan parçanın kalıp olarak kullanılarak üzerinde değişiklik yapılması veya tekrar çoğaltılması amacıyla da plazmit izolasyonu yapılabilir. Plazmit izolasyon protokolü adımları aşağıda verilmiştir [64, 69].

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) İstenilen vektörü taşıdığı düşünülen koloni LB Broth ampisilin besiyerine ekilerek gece boyu 37 °C, 120 rpm'de büyütülür.
- 2) Sabah besiyeri yoğunluğuna göre 1-5 ml hücre alınarak 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 3) Üst faz dökülür ve hücre peleti 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 ile yıkanarak çözülür. Tekrar 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 4) Üst faz dökülür ve hücre peleti üzerine
 - 150 µl 10mg/µl Lizozim
 - 20 µl 0,5 M EDTA pH 8
 - 10 µl RNase A Solution

Eklenerek pipet yarpımı ile çözülür.

- 5) Karışım 30 dakika süre ile buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda 2000 µl, 0,2 M NaOH ve 200 µl % 1'lik SDS eklenir ve dikkatlice alt/üst edilerek karıştırılır.

SDS taze olarak hazırlanmalıdır. Aksi takdirde havadan nem alarak bozunabileceğinden çözelti bayat olabilir.

- 7) 5 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 8) Süre bitiminde hemen 300 µl 7,5 M NH₄Ac eklenir ve dikkatlice alt/üst edilerek karıştırılır. Devamında 10 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 9) Süre sonunda 15 dakika süre ile 15.000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üst faz yeni tüpe aktarılır.

- 10) Alınan üst faz hacmi kadar Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1), eklenir ve tüp güçlü bir şekilde yaklaşık 10 saniye boyunca çalkalanarak karıştırılır. Sonrasında 10 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanır.
- 11) Sonrasında tür 15.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edilir ve santrifüj sonrası oluşan sıvı üst faz yeni bir tüpe alınır. Burada alınan hacim belirli olmalıdır.
- 12) Alınan miktarın 0,6 katıkadar İzopropanol eklenerek pipet yardımı ile karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 13) İnkübasyon sonrası tüp 15,000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 14) Üst faz altılır ve pelet 200 µl 0,3 M NaAc ile dikkatlice çözülür.
- 15) Gece boyu -20 °C'de bekletilir. Ertesi gün tüp 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 16) Üst faz atılır ve pelet kurumaya bırakılır. Sonrasında pelet 10 µl dH₂O ile çözülür.
- 17) Restriksiyon enzim analizi, agaroz jel analiziz ve miktar analizi yapılarak saflığı ve kalitesi kontrol edilebilir.

2.2.14. Restriksiyon enzim analizi

Restriksiyon enzimler DNA zincirini istenilen özgül noktadan kesmek için kullanılan enzimlerdir. Bu enzimler hedef DNA'nın Vektör DNA içerisine klonlanması ve hedef DNA'nın tekrar çıkarılması için kullanılabileceği gibi [70], DNA parmak izi çıkarılmasında ve Southern Blot deneyinde genomik DNA'nın parçalanmasında da kullanılabilir.

İzole edilen vektör DNA'nın analizi için ise aşağıda verilen reaksiyon hazırlanır.

1 µl restriksiyon enzimi, 1 µl 10X enzim tamponu, vektör DNA yoğunluğuna göre 1-8 µl eklenir ve artan hacim 10 µl'ye dH₂O ile tamamlanır.

Eğer vektör DNA'nın kesim reaksiyonu iki farklı restriksiyon enzim ile yapılacaksa, bu enzimler için ortak bir tamponun seçilmesi gereklidir. Ortak tampon seçildikten sonra yukarıda verilen reaksiyona diğer enzim 1 µl olarak eklenir ve toplam hacim yine 10 µl'ye dH₂O ile tamamlanır. Uygun tampon bulunamazsa kesim reaksiyonu iki basamakta yapılır. Tampon içeriğinde daha az tuz bulunan enzim ilk olarak kesim reaksiyonuna eklenir, 2-4 saat reaksiyon sürmesi beklenir, daha sonra tuz miktarı yüksek olan ikinci enzimin tamponu ve ikinci enzim eklenerek kesime devam edilir. Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da enzimlerin çalışma sıcaklıklarıdır. Çoğu restriksiyon enzim 37 °C'de çalışırken bazı restriksiyon enzimleri daha yüksek veya daha düşük sıcaklıklarda çalışabilirler. Kesim reaksiyonu istenilen şartlarda 2-18 saat arası devam ettirilir. Sonrasında ise agaroz jele doğrudan yüklenerek analizi yapılır.

2.2.15. *Escherichia coli*'de protein ifadesi için gerekli nokta mutasyonları içeren primerlerin tasarlanması

Tetrahymena thermophila iyi bir model organizma olmasına [54] karşın kodon kullanımının standart kodon sözlüğüne uymaması *Tetrahymena* proteinlerinin ifadesi için zorluk oluşturmaktadır. Siliyat kodon sözlüğüne göre TAA ve TAG kodonları glutamin (Q, Gln) aminoasidini kodlamaktadır, fakat bu kodonlar standart kodon sözlüğünde protein yapımını sonlandıran "DUR" kodonuna karşılık gelmektedir [48, 71]. Bu nedenle protein ifadesi standart kodon sözlüğü kullanan *Escherichia coli*'de yapılacaksa bu kodonlarda nokta mutasyon oluşturularak müdahale edilmesi gereklidir.

Tetrahymena thermophila katalaz geninin (NCBI ulaşım numarası XP_001026590,2) üzerinde glutamin kodlaması gereken, fakat standart kodon sözlüğüne göre "DUR" anlamına gelen 10 tane nokta mutasyon bulunmaktadır. Bu nedenle bu 10 nokta mutasyon taşıyan bölgeye 8 çift primer tasarlanmıştır. Bu primer çiftlerinden iki tanesi (F2 ve F4 seti) iki nokta mutasyon taşımaktadır. Bu primer çiftleri çizelge 2.1.'de verilmiştir. Primer çiftleri nokta mutasyonların olduğu noktalarda dizideki T yerine C ve A yerine G nükleotidi taşırlar.

Burada “örtüşen bölgelerin uzaması (splicing of overlap extension PCR/SOEing PCR)” tekniği kullanılarak katalaz geni cDNA’sı içerisinde PZR ile çoklu mutasyonlar yerleştirilmiştir [72-74]. Tasarlanan nokta mutasyon primerleri için belirli noktalara dikkat edilmesi gereklidir. Bu noktalar şunlardır;

- Tasarlanan primer 1 nokta mutasyon içeriyorsa 15-18 bazdan oluşmalıdır. Eğer daha fazla mutasyon içeriyorsa daha uzun olabilir.
- Nokta mutasyon bölgesinde tasarlanan primer çiftinin örtüşme bölgeleri 15-20 baz olmalıdır.
- Mutasyon bölgesi veya noktası tasarlanan primerin 3’ ucuna 12-15 baz uzakta olmalıdır.
- İki farklı primer tasarlamak için mutasyonlar arası en az 70-80 baz olmalıdır. Aksi takdirde ya bu iki mutasyon aynı primer içerisine alınır ya da mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesinde farklı stratejiler kullanılır.

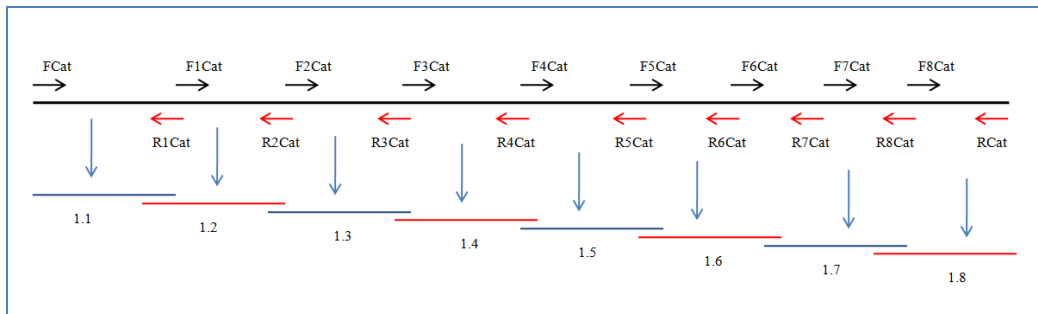
Nokta mutasyon oluşturulması için iki adımlı PZR deneyi kurulur. İlk adımda klasik PZR yapılarak nokta mutasyonlu parçalar üretilir. PZR deneyinde proofreading aktivitesine sahip polimeraz enzimleri kullanılmalıdır. Şekil 2.1.’de katalaz geni üzerine yapılan nokta mutasyonlar için üretilen parçalar ve primer çiftleri verilmiştir. Bu ilk aşamada primerler sahip oldukları mutasyonları ürettikleri parçalara yerleştirirler.

Mutasyonları içeren parçaların üretiminden sonra bu parçaların birleştirilmesi gereklidir. Burada primerler tasarlanırken oluşturulan örtüşen bölgeler birleştirme reaksiyonunun olmasını sağlar. Şekil 2.2.’de 1.1 ve 1.2 parçalarının birleştirilmesi reaksiyonunun adımları verilmiştir. Buradaki polimeraz zincir reaksiyonunun yapısı özeldir. Ortama kalıp olarak birleştirilmesi istenilen iki parça da konulur. Parçaların mol ve baz çifti büyüklükleri üzerinden denk miktarlarda kullanılması gerekmektedir.

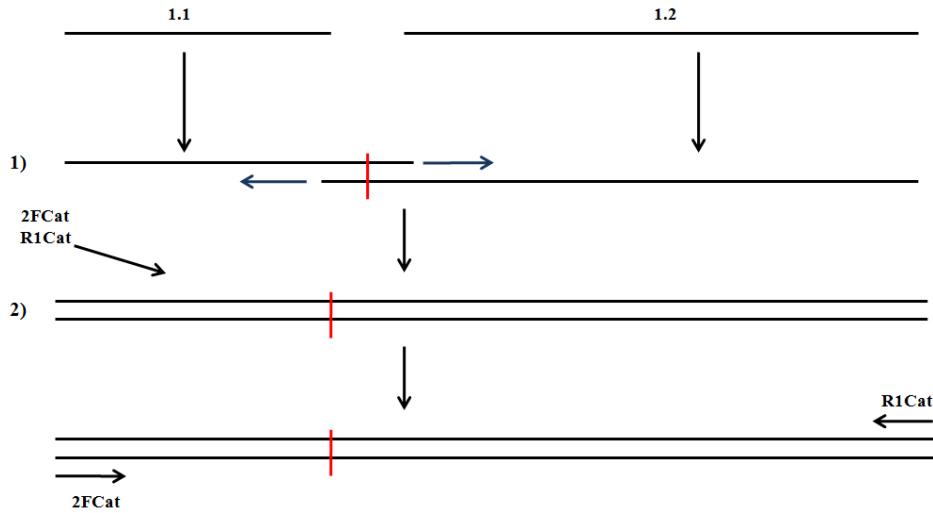
Çizelge 2.1. Katalaz geninde nokta mutasyon oluşturmak için tasarlanan komplementer primer çiftleri: Nokta mutasyon oluşturacak baz altı çizgili olarak gösterilmiştir. Ayrıca dış primer çiftleri de tablonun sonunda verilmiştir.

Adı	Dizi Bilgisi
F1Cat	5'-GTCTTATTACAAGACTTCATCTTATTGATAAG-3'
R1Cat	5'-GTCTTGTAAATAAGACGGGACCGTATTC-3'
F2Cat	5'-CTTTCC ^C AGGTTCTGAATCTGCTCACC ^C AGGTTACCATT-3'
R2Cat	5'-AACCT ^G GGTGAGCAGATTCAGGAACCT ^G GGAAAGGAAGTC-3'
F3Cat	5'-AATGAA ^C AAGGTGAAGCCTTCTGG-3'
R3Cat	5'-ACCTT ^G TTCATTAACCCACTT-3'
F4Cat	5'-GCT ^C AAGGTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGTCC ^A AAGTTATGCCC-3'
R4Cat	5'AAC ^T TGGACGTTAAGGTCCAAGAAGCGCTACCACCT ^T GAGCAATGTG-3'
F5Cat	5'-ACTGAA ^C AATCTGCTTTCTCTCCT-3'
R5Cat	5'-AGCAGATT ^G TTCAGTTTCAGC-3'
F6Cat	5'-ATGCTC ^C AAGGTCGTCTCTTCTCT-3'
R6Cat	5'-ACGACCT ^T GAGCATATTATCCAAAGA-3'
F7Cat	5'-AACAA ^C CAACGTGATGGTCCCATG-3'
R7Cat	5'-ACGTT ^G GTTGTTGGATACTCTGGC-3'
F8Cat	5'-GAAAG ^A CAAGTCAGAATCTTCTAC-3'
R8Cat	5'-GACTT ^G TCTTTCTTGGATATC-3'
Fcat	5'-GATCCCGGGAATTCATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTG-3'
Rcat	5'-AACCATGTGCGACTCAGAGGTTAGATCCGTTAGCAGGGAAGCC-3'

Reaksiyonun ilk 4-7 döngüsü ortamda dış primerler bulunmadan gerçekleştirilir (şekil 2.2. 1. Adım). Burada kullanılan kalıp DNA'ların örtüşen bölgelerinden birbirleri hibridize olmaları sonucunda 3' OH⁻ ucu oluşmuş olur. Bu da DNA polimerazın primer olarak kullanabileceği bir yapı olduğundan polimerizasyon başlar.



Şekil 2.3. Nokta mutasyon taşıyan parçaların üretimi: Katalaz cDNA'sı üzerinde oluşturulan nokta mutasyonların üretilmesi ve parçaların üretimi için kullanılan primer çiftleri.



Şekil 2.4. Nokta mutasyon parçalarının birleştirilmesi: Nokta mutasyon yerleştirilmiş parçaların birleştirilmesi. Burada iki adımlı polimeraz zincir reaksiyonu kurulur. İlk adım primersiz geçilir ve parçaların birleştirilmesi sağlanır (1). Daha sonra ise klasik PZR devam eder ve oluşturulan parçayı çoğaltır (2).

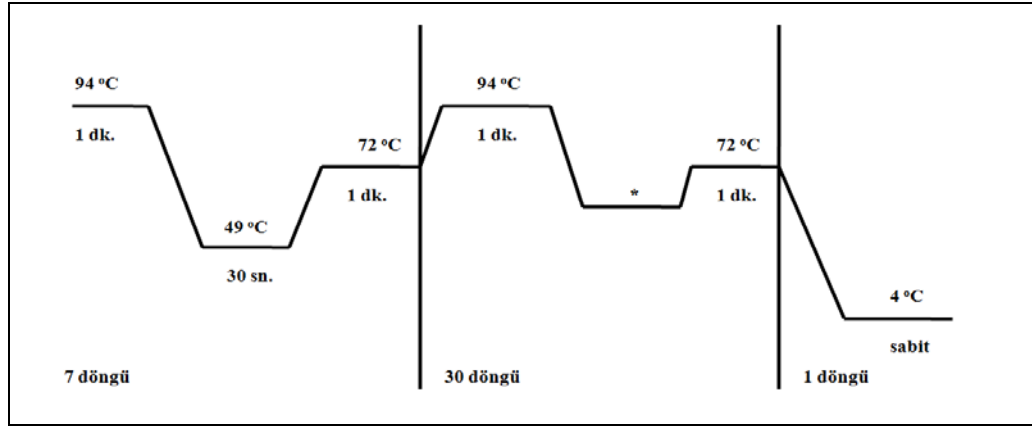
Polimerizasyon ile nokta mutasyonu taşıyan tüm parça elde edilmiştir. Daha sonra eklenen (şekil 2.2. 2. Adım) dış primerler ile (Fcat ve R1Cat) nokta mutasyon içeren parçanın çoğaltılması sağlanarak bir nokta mutasyon son üründe gen parçasının içerisine yerleştirilmiş olur.

Nokta mutasyon oluşturulmasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu şartları ve reaksiyon içeriği aşağıda verilmiştir.

10X Pfu DNA Polimeraz Enzimi tamponu (Fermentas)	2,5 µl
dNTP (2.5 mM)	2,0 µl
Pfu DNA Polimeraz (2.5u/µl)	0,3 µl
Kalıp 1	0,5 – 2 µl
Kalıp 2	0,5 – 2 µl
dH ₂ O	20 µl'ye tatamlanır

Yukarıda hazırlanan reaksiyon 94 °C'de 1 dakika, 49 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika süre ile 7 döngü reaksiyon kurulmuştur. 7 döngü sonunda ise dış primerlerden 2,5 µl eklenerek iyice karıştırılır ve reaksiyona klasik PZR olarak devam edilir. Burada oturma sıcaklığı eklenen primerlerin oturma sıcaklıklarına

göre belirlenir. Nokta mutasyon içeren iki DNA parçasının birleştirilmesi PZR haritası şekil 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Nokta mutasyon birleştirme PZR haritası: Nokta mutasyon içeren ve örtüşen bölgelere sahip iki parçanın birleştirilme PZR'u adımları. Yıldız (*) ile gösterilen yere kullanılan dış primerlerin oturma sıcaklıkları ve oluşacak tüm parçanın kbç büyüklüğüne göre oturma süresi verilir.

2.2.16. Nokta mutasyonların kontrolü için gerekli DNA dizi analizi reaksiyonu

DNA dizi analizi en genel kullanımda bir DNA parçasının dizisinin dizi bilgisinin edinilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu işlem haricinde daha birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Çalışmada bu farklı kullanım alanlarından biri olan nokta mutasyonların bulunması amacıyla kullanılmıştır.

Üzerinde mutasyonlar oluşturulmuş *TthCat* cDNA'sı doğrudan ya da klonlama vektörü aracılığı ile DNA dizi analizi reaksiyonuna sokulabilir. Dizi analizi reaksiyonu öncesinde parçanın PZR ile çoğaltılması gerekmektedir. PZR reaksiyonuna girecek DNA miktarı büyüklüğünü bağlı olarak fmoL olarak hesaplanmalıdır ve bu hesap kadar DNA alınarak PZR reaksiyonunda çoğaltılır. Alınacak DNA miktarı EK-1'de ki çizelgede verilmiştir.

Dizi analizine girecek DNA'dan gerekli miktarda alınarak dH₂O ile 10 µL hacme tamamlanır. Eğer dizi analizi vektör ile yapılacaksa tüp 94 °C'de 4 dakika süre ile PZR cihazında bekletilir. Sonrasında oda sıcaklığına gelmesi beklenir ve 8 µL DTCS ile 2 µL primer eklenir. Reaksiyon her bir döngüde 96 °C'de 20 saniye,

50 °C'de 20 saniye ve 60 °C'de 4 dakika olacak şekilde 35 döngü olarak devam ettirilir.

Eğer dizi analizi doğrudan PZR ürünü olan DNA parçasından yapılıyorsa PZR'de 94 °C'de 4 dakika olan ilk adım yapılmaz ve reaksiyon son hacimde 20 µl olarak DTCS ve primer ile birlikte hazırlanır.

Etanol çöktürmesi: Çalışmada kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) DNA dizi analizi cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PZR ürünlerinin etanolle çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

Protokole aşağıdaki adımlar ile devam edilir.

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) Durdurma Çözeltisi (Stop Solution) hazırlanır çözeltiden 4 µl PCR ürünlerine eklenir ve 1 µl 20 µg/µl glikojen eklenerek iyice karıştırılır.

***Stop Solüsyonu:** 3 M Sodyum Asetat (pH: 5,2) ile 100 mM Na₂EDTA (pH: 8,0) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım oda sıcaklığında yapılmış ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır*

- 2) Taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilmiş % 95'lik etanoldan 60 µl pelete zarar vermeden yavaşça eklenir.
- 3) Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir ve dipte oluşan pelet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırılır.
- 4) Pelete 200 µl taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilen % 70'lik etanoldan pelet hareket ettirilmeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakılır.

- 5) Tüpler 14.000 rpm'de 4C'de 2 dakika süre ile santrifüj edilir ve dipte oluşan pelet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır.
- 6) Süpernatant dökülür, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40°C'de 10 dakika süre ile konsantratörde alkol uçurulur.
- 7) Pelet 40 µl SLS (Sample Loading Solution) eklenir ve iyice çözülür. Daha sonra Beckman dizi analiz aletinde kullanılan örnek yükleme mikro-tabaklarına yerleştirilir.
- 8) Yerleştirme işleminde örnek tabağına 40µl SLS çeren örnekler sırasıyla eklenir ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatılır.
- 9) Tampon tablasına da kit içinde bulunan ayırma tamponu, kuyucukların %70'ini dolduracak kadar eklenerek analiz başlatılır.
- 10) Sonuçlara cihazın bilgisayarından ulaşılabilir.

2.2.17. Rekombinant proteinin üretilmesi ve toplam protein izolasyonu

Nokta mutasyonlar yerleştirildikten sonra elde edilen katalaz cDNA parçası pGEX 4T-1 vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan vektör *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS ırkına transforme edilmiştir. Pozitif koloniler vektör DNA'sı izole edilerek, restriksiyon enzim kesimi ile kontrol edilmiştir. Pozitif koloniler belirlendikten sonra protein üretimi ve izolasyonu için aşağıda verilen adımlar takip edilmiştir [75].

UYARI: Bu uygulamada kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanış şekilleri, stok konsantrasyonları ve ticari olarak kullanılan çözeltilerin bilgisi bölüm 2.1.4.'te verilmiştir.

Aşağıdaki protokolda Thermo IC ve +4 °C için Bechman Coulter Microfuge 22R marka santrifüj cihazları kullanılmıştır.

- 1) Pozitif olduğu bilinen kolonilerden 10 ml LB Broth ampisilin besiyerine ekilir ve gece boyu 37 °C'de 120 rpm'de inkübe edilir.
- 2) Hücreler sabah son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG eklenerek protein üretimi yapmaya başlaması sağlanır. 37 °C'de 120 rpm'de en az 3 saat daha inkübe edilir.
- 3) Süre sonunda hücre yoğunluğuna göre 5-10 ml hücre 6.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Sonrasında üst faz dökülür.
- 4) Hücre peleti 1 ml TES tamponu ile yıkanır. Tekrar 6.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Sonrasında üst faz dökülür.
- 5) Hücre peleti 180 µl TES tamponu ile çözülür.
- 6) Karışım üzerine 2 µl 10 mg/ml lizozim çözeltisi eklenir ve karıştırılır.

Lizozim çözeltisi 0,02 gr lizozim 50mM Tris-HCl içerisinde 2 ml hacimde çözülerek hazırlanır.

- 7) Daha sonra karışıma 10 µl deterjan kokteyli eklenir ve pipetlenerek yavaşca (genomik DNA'yı kırmayacak şekilde) karıştırılır.

Burada kullanılacak proteinler iyonik yapıda olmamalıdır. Deterjan kokteyli Tween-20 ve Triton X-100 deterjanlarının eşit hacimlerde karıştırılması ile elde edilir.

- 8) Karışım 20 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 9) Süre sonunda karışım üzerine
 - 50 µl 50 mM Tris-HCl pH 8
 - 0,8 µl Endonükleaz
 - 1,5 µl MgCl₂ eklenir ve karıştırılır.
- 10) Karışımın akışkanlığı artıncaya kadar yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

- 11) Süre sonunda karışım alınarak -86 °C'ye kaldırılır ve 10-15 dakika süre ile donması beklenir. (Bu adımda hücre karışımı -86 °C'de bir gece de kalabilir)
- 12) Donma işlemi gerçekleştikten sonra çıkarılarak oda sıcaklığında erimesi beklenir. Eridikten sonra dondurma işlemi bir kez daha tekrarlanır.

Burada yapılmak istenen kısa zaman aralıklarında hücre karışımını dondurup çözerek fiziksel parçalanmanın gerçekleşmesini sağlamaktır.

- 13) İkinci dondurma/çözülme işlemi de bittikten sonra örnek 4°C'de 14.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj yapılarak peletlenir.
- 14) Santrifüj sonrası oluşan pelette çözünmeyen proteinler ve hücre artıkları bulunurken, üst sıvı fazda çözünür proteinler bulunmaktadır. Deneyin devamında yapılacak analize göre istenilen faz alınarak deneye devam edilir.

2.2.18. Toplam protein içerisinde rekombinant proteinlerin saflaştırılması

pGEX 4T-1 vektörü ile rekombinant olarak üretilen proteinler GST proteini ile füzyon yapıda bulduklarından, proteinlerin saflaştırılması için GST proteinine afinite gösteren "Glutathione Sepharose 4B" partikülleri kullanılır. Partiküller kolon oluşturularak kullanılabilceği gibi kolon kullanmaksızın da saflaştırma aşağıdaki gibi yapılabilir [76].

- 1) "Bulk GST purification module" içerisinde bulunan glutatyon sefaroze 4B boncuklarından 50 µl bir tüpe alınır.

Boncuklar % 20 etanol içerisinde muhafaza edildikleri için istenilen hacim alınmadan önce şişe çalkalanarak etanol ile boncukların süspansiyon oluşturup homojen hale gelmesi sağlanır.

- 2) Boncuklar 0,5 ml PBS tamponu ile yıkanır ve 5.000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek boncukların yüzeylerinin aktiflenmesi ve alkolün temizlenmesi sağlanır.

- 3) Santrifüj sonrasında üst sıvı faz atılır ve boncuklar 2 kez daha 1. ve 2. adımlardaki işlemlere tabi tutulur.

Santrifüj sonrası boncuklar tabana çöktüklerinden tüp yavaşça çıkarılmalı ve üst fazı alınmalıdır. Aksi takdirde boncuklar havalanarak sıvı faza karışabilir ve bu nedenle boncuk miktarı azalabilir.

- 4) Boncuklar aktif hale getirilip alkolden temizlendikten sonra, toplam protein izolasyonundan elde edilen sıvı üst faz boncuklar üzerine boşaltılır.
- 5) 4°C’de gece boyu orbital karıştırıcıda yatay olarak boncuklar ile proteinler inkübasyona bırakılır. İşlem oda sıcaklığında 1 saat süre ile de yapılabilir fakat bu şekilde saflaştırma verimi düşebilir.
- 6) Gece boyu inkübasyondan sonra tüp 4°C’de 5.000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edilir. Üst faz başka bir tüpe alınarak SDS-Page ve Western blot analizlerinde kullanılabilir.
- 7) Boncukların üzerine 0,5 ml PBS tamponu eklenerek 4 °C’de 5.000 rpm’de 5 dakika süre ile yıkanır ve süre sonunda üst faz atılır. Bu işlem 5 defa tekrar edilir.

Eğer sonuçlarda rekombinant protein zayıf görünüyorsa yıkama işlemi 3 defa yapılarak boncukların yüzeyi kirli bırakılabilir.

- 8) Boncuklar üzerindeki rekombinant proteinin doğal-PAGE ile analizi yapılmak isteniyorsa kit içeriğinde 50 µl boncuk için 100 µl “reduced glutathion” çözeltisinden eklenir ve oda sıcaklığında 15 dakika süre ile inkübasyona bırakılır. Süre sonunda 5.000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek üst faz alınır. Alınan üst fazda rekombinant protein bulunmaktadır.
- 9) Eğer protein SDS-Page analizine alınacaksa boncuklar üzerine 2X SDS yükleme tamponundan 100 µl eklenecek hafif kaynamakta olan suda 3-5

dakika süre ile kaynatılır. Sonrasında tüpler 5.000 rpm'de 3 dakika süre ile santrifüj edilir. Üst faz alınarak SDS-PAGE analizinde kullanılır.

2.2.19. SDS-PAGE ile proteinlerin analizi

Proteinlerin denatüre edilerek büyüklüklerine göre ayrılması SDS-PAGE yöntemi ile yapılır. Bu yöntem ile proteinler dimer, tetramer ya da moleküler kompleks oluştursalar bile denatüre formlarında ve monomer yapıları gözlenir. Yöntem ile oluşturulan jel proteinlerin büyüklük hesaplamasında ve Western Blot Deneyinden kullanılabilir.

SDS-PAGE jeli iki farklı özellikte jelden oluşur. Bunlardan ilki ayırma jelidir ve proteinlerin asıl olarak ayrımının yapıldığı jeldir. Sahip olduğu por çapı dar olan bu jel genellikle % 8-12 oranında hazırlanır. Diğer jel ise paketleme jelidir. Bu jel daha geniş por büyüklüğüne sahiptir. SDS'in proteinleri tam olarak kaplaması ve aynı hızda ayırma jeline yönlendirmesi amacı ile kullanılır. Genellikle % 4-5 oranında hazırlanır. SDS-PAGE deneyinin adımları aşağıda verilmiştir.

- 1) Öncelikle jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurularak su ile test edilir. Sızdırma yapmıyorsa jel hazırlanmaya başlanır.
- 2) Ayırma ve paketleme jellerinin içerikleri şekil 2.2.'deki gibi hazırlanır.

Çizelge 2.2. SDS-PAGE analizinde kullanılacak jel yüzdeleri: Ayırma ve paketleme jellerinin hazırlanmasında kullanılacak maddelerin miktarları.

Jel Yüzdesi	dH ₂ O (ml)	% 30'luk Akrilamid (ml)	Jel Tamponu (ml)	% 10'luk SDS (ml)
% 5	5,7	1,7	2,5	0,1
% 6	5,4	2,0	2,5	0,1
% 8	4,7	2,7	2,5	0,1
% 10	4,1	3,3	2,5	0,1
% 11	3,7	3,7	2,5	0,1

- 3) Çalışmada ayırma jeli için % 10'luk oran ve paketleme jeli için de % 5'lik oran kullanılmıştır. Jel tamponu olarak ayırma jeli için 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; paketleme jeli için ise 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 kullanılmıştır.

- 4) Jeller hazırlandıktan sonra ayırma jeli içersine 50 µl % 10'luk APS (amonyum p e rsülfat) ve 5 µl TEMED ek len ir ve k arıştırılır. Sonra jel aparatına dökülür. Üst kısımda paketleme jelinin dökülmesi 2-3 cm'lik bir mesafe için bırakılır. Boşluk ise jelin üğst kısmının düz olması için su ile tamamlanır. 15-20 dakika jelin donması için beklenir.
- 5) Jel donduktan sonra üstündeki su dökülür. Hazırlanan paketleme jeline 50 µl APS ve 10 µl TEMED eklenerek karıştırılır ve ayırma jelinin üstüne dökülür. Sonrasında proteinin yükleneceği yerleri olutmak için tarak takılarak jel donmaya bırakılır.
- 6) Jel donduktan sonra SDS-PAGE tankına alınır ve üzerine 1x SDS-PAGE tank tamponu boşaltılır.
- 7) Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak "BioRad SDS-PAGE Standarts Wide Range" markerı kullanılmıştır.

2.2.20. Western Blot analizi

Western Blot deneyi bir dokudan veya toplam protein içersinden istenilen proteinin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Analiz için öncelikle proteinler denatüre edici şartlarda SDS-PAGE ile ya da 3 boyutlu yapı korunarak, denatüre etmeyen şartlarda DOĞAL-PAGE (Native) ile elektroforetik olarak ayrılırlar. Proteinler jelde ayrıldıktan sonra membrana (PVDF, nitroselüloz) aktarılırlar. Sonrasında ise uygun antikolar ile istenilen protein renklenme veya radyoaktif yöntem ile belirlenir [77].

- 1) SDS-PAGE ile ayrılan proteinler tanktan alınır ve jelin üst kısmı olan paketleme jeli kesilerek alınır.
- 2) Sonrasında yürütme jeli western blot transfer tamponuna alınarak en az 30 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak şişmesi beklenir.

Eğer büyük molekül ağırlığına sahip proteinler blotlanacak ise transfer tamponuna % 1 oranında SDS eklenmesi etkinliği artırır. Ayrıca blotlama problemi mevcutsa da bu işlem uygulanabilir.

- 3) Süre sonunda jelin alanı hesaplanarak blotlamada kullanılacak mAmp değeri hesaplanır. Buna göre jelin eni x boyu x 0,8 uygulanması gereken mAmp değerinin verir.
- 4) Sonrasında jel semi-dry cihazına yerleştirilerek blotlama yapılır.
- 5) Blotalama sonunda membran 1X TBS-T ile 1 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak yıkanır.
- 6) Sonrasında membran % 5'lik yağsız süttozu içeren 1X TBS-T ile 30 dakika boyunca bloklanır.

Süttozu yerine % 5'lik BSA da (Albumin from Bovine Serum) eklenebilir. Bu adımın amacı membranın yüzeyinin 1'incil ve 2'ncil antikolar tarafından spesifik olmayan şekilde görülmesini engellemek içindir.

Western blot deneylerinin bir kısmında ProteoQwest™ Colorimetric Western Blotting Kit (Sigma, PQ 0101) içersinde bulunan bloklama çözeltisi kullanılmıştır.

- 7) Bloklama bittikten sonra membran % 1 yağsız süttozu içeren 10 ml TBS-T içerisine uygun miktarda 1'incil antikor eklenir.

1'incil antikolar western blot deneyi için 1:1,000 ile 1:10,000 oranında kullanılabilir. Fakat üreticinin tavsiyesi dikkate alınmalıdır.

- 8) 1'incil antikor ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakılır.
- 9) Süre sonunda membran 1X TBS-T'de 4-6 defa 5'er dakika süre ile orbital karıştırıcıda yıkanır.
- 10) Sonrasında membran uygun miktarda 2'ncil antikor içeren 10 ml TBS-T içerisine alınır.

2'ncil antikorlar western blot deneyi için farklı oranlarda kullanılabilir. Fakat üreticinin tavsiyesi dikkate alınmalıdır.

- 11) Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakılır.
- 12) Süre sonunda membran 4-5 defa 5'er dakika süre ile 1X TBS'de yıkanır.
- 13) Membran 4-kloro-1-naphthol çözeltisi eklenerek 15 dk bekletilir. Bantlaşmalar belirginleşince tampondan alınır ve dH₂O ile yıkanarak, kurutulur. Membranın fotoğrafı alınarak kaydedilir.

4-kloro-1-naphthol çözeltisi 1 membran için 40 ml TBS, 10 ml metanol, 0,03 gr 4-kloro-1-naphthol ve 30 µl H₂O₂ ile hazırlanır. Öncelikle 10 ml metanol buzda veya buzdolabında soğutulur, sonrasında 0,03 gr 4-kloro-1-naphthol metanole eklenerek karıştırılır. Sonrasında çözelti 40 ml TBS içerisine boşaltılır. Membrana dökülmeden hemen önce ise 30 µl H₂O₂ eklenir. H₂O₂ eklendikten sonra çözeltinin sıcaklığının artması gerekir, aksi takdirde reaksiyon çalışmayabilir.

2.2.21. Northern Blot analizi

Northern Blot deneyinde prob olarak Southern Blotlamada kullanılan DIG işaretli DNA problemleri kullanılmıştır. Takip edilen protokol aşağıdaki verilmiştir.

RNA'nın Jel'de Ayrılması

- 1) 1x MOPS solüsyonu ile % 1-2'lik jel hazırlanır: % 1-2 olacak miktardaki agaroz, 1xMOPS ile mikrodalga fırın ya da ısıtıcıda çözülür. Jel çözüldükten sonra 55-60 °C'de iken son hacim % 2 olacak şekilde % 37'lik formaldehit çeker ocakta jele yavaşça eklenerek karıştırılır. Jel tanka yüklendikten sonra donması için en az 1 saat beklenmelidir.
- 2) Taze hazırlanmış iki hacim yükleme tamponu ile bir hacim RNA karıştırılır. Yüklenecek RNA miktarı, 5µg toplam RNA, ya da 500 ng

mRNA olmalıdır. (DIG etiketli RNA Probları Kullanılacaksa μg toplam RNA ya da 100 ng mRNA) DIG etiketli RNA marker kullanılacaksa 5 μl marker yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklenmelidir.

- 3) RNA yükleme tamponu karışımı 65 °C’de 10 dakika süre ile inkübe edilir.
- 4) Denatüre edilen örnekler hemen buza alınır ve 1 dakika süre ile inkübe edilir. Örnekler kuru jele yüklenir.
- 5) Kuyucuklara dikkatlice koşma tamponu ile doldurulur.
- 6) Tank koşma tamponu ile tamamen doldurulur. Bu işlem yapılırken kuyucukların üstünden dökülmemelidir. Jelin sadece üstünü örtecek kadar doldurulmalıdır.
- 7) Jel en yüksek voltajda (en az 3-4 V/cm) yaklaşık 10 dakika koşturulup durdurulur. Jeli tamamen gömmek için ilave tampon eklenir.
- 8) 3-4 V/cm’de en az 2 saat (tercihen gece boyu) koşturulur.
- 9) Jel 0,25– 0,50 $\mu\text{g/ml}$ Etidyum Bromid ile kısaca (15-30 dk) boyanıp UV’de görüntülenir (EtBr’in Northern Etkinliğini azalttığı düşünülmektedir mümkünse katılmamalıdır)

RNA’nın Membrana Aktarılması

- 1) Formaldehiti uzaklaştırmak için jel 2 kez 15 dakika süre ile 20X SSC’de inkübe edilir.
- 2) Jel üst yüzeyi altta kalacak şekilde 20X SSC tamponu ile ıslatılmış 3MM Whatman kâğıdının üzerine yerleştirilir.
- 3) RNA Jeli blotlama aparatı kurularak 20X SSC ile membrana transfer edilir
- 4) Blotlama bittikten sonra membran kurumadan 2X SSC ile ıslatılmış 3MM whatman kâğıdının üzerine RNA’lı tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilir ve UV kros link yapılır (120 mJ) Autocroslink-Stratalinker.
- 5) Membran steril ddH₂O ile kısaca yıkanır.

- 6) Nemli membran iki adet 3MM Whatman kâğıdı arasında, mühürlü poşet içinde 4 °C'de saklanabilir.

Prehibridizasyon

- 1) Kitte bulunan plastik şişedeki DIG Easy Hyb. Granulleri'ne 64 ml steril DEPC'li su eklenir ve 5 dakika 37 °C'de karıştırılarak çözülür.
- 2) Kullanılacak Hibridizasyon tamponunun miktarı belirlenir. İşlemler hibridizasyon poşetleri kullanılarak yapılacaksa, membranın her 100 cm²'si için prehibridizasyonda 10-15 ml, hibridizasyonda ise 3,5 ml hibridizasyon tamponu kullanılmalıdır. (Midi jelde maksimum membran büyüklüğü 60 cm²).
- 3) Belirlenen miktarda pre-hibridizasyon tamponu steril bir tüpe konulduktan sonra 50 °C'ye ayarlı su banyosuna alınır ve membran hibridizasyon poşetine aktarılır.
- 4) Uygun miktarda önceden ısıtılmış pre-hibridizasyon tamponu hibridizasyon poşetine aktararak mühürlenir. Poşet son hali ile hafif kabarık görülmelidir.
- 5) Hibridizasyon fırınında 30 dakika 50 °C'de hafif çalkalama ile inkübe edilir. Bu esnada hibridizasyon solüsyonu hazırlanmalıdır.

Hibridizasyon

- 1) Eğer bulucu DNA ilk kez hibridizasyon tamponuna katılacaksa son hacimde kullanılacak probun miktarı 20-50 µl olacak şekilde hibridizasyon tamponu hazırlanmalıdır. Gerekli miktarda bulucu DNA, önceden içine 50 µl Rnase olmayan su eklenmiş tüpe alınır. Tüp kaynamakta olan su içinde 5 dakika inkübe edilir. Süre sonunda hemen buza kaldırılır ve kısaca santrifüjlenerak sıvının tüpün dibine toplanması sağlanır. Önceden miktarı ayarlanmış ve ısıtılmış hibridizasyon tamponuna hemen aktarılır ve ters-düz edilerek karıştırılır.

Eğer önceden hazırlanmış Probu Hibridizasyon tamponu kullanılacaksa problu tampon (-20'de saklanır) kullanılmadan önce 10 dakika 50 °C'de inkübe edilir. Hibridizasyon işlemleri aşağıdaki sıra ile yapılmalıdır:

- 2) Prehibridizasyon solüsyonunu boşaltmak için poşet kesilir ve hemen önceden ısıtılmış DNA problu hibridizasyon tamponundan gereken miktar poşetin içine aktarılır ve poşet tekrar mühürlenir.
- 3) Membran içeren poşet hibridizasyon fırınında 50°C'de gece boyu inkübe edilir.

Membranın Yıkanması

- 1) Hibridizasyon kabı membranı tamamen örtecek kadar 2X SSC ile doldurulur (Low Stringency Buffer).
- 2) Poşet kesilir ve Hibridizasyon Tamponu -20'de saklamak üzere kaldırılır.
- 3) Membran hemen 2X SSC içeren kaba alınır ve oda sıcaklığında 5 dakika çalkalamalıda inkübe edilir. İşlem 2 defa tekrarlanır. İnkübasyon esnasında High Stringency Buffer (% 0,1 SDS içeren 0,1X SSC) tamponu 50 °C su banyosunda inkübe edilmelidir.
- 4) 2X SSC uzaklaştırılır ve kap hızlı bir biçimde 50 °C'ye ısıtılmış High Stringency Buffer ile doldurulur ve 50 °C'de çalkalanarak inkübe edilir. İşlem 2 defa tekrarlanır.

Membranın Görüntülenmesi

- 1) Membran 100 ml yıkama tamponu içeren plastik kapa aktarılır ve oda sıcaklığında 1-5 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak inkübe edilir ve süre sonunda tampon dökülür.
- 2) 100 ml bloklama solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 30 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak inkübe edilir (bu süre 3 saati geçmemelidir). Süre sonunda solüsyon uzaklaştırılır.

- 3) Membran 20 ml antikor çözeltisinde oda sıcaklığında 30 dakika süre ile orbital karıştırıcıda inkübe edilir ve süre bitiminde solüsyon uzaklaştırılır.
- 4) Membran iki kez 15 dk 100 ml'lik yıkama tamponu ile yıkanır.
- 5) Membran 2-5 dakika süre ile 20 ml deteksiyon tamponunda inkübe edilir.
- 6) Membran hibridizasyon poşetine (ya da uygun bir kaba) RNA'lı yüzeyi üste gelecek şekilde aktarılır.
- 7) Sonrasında membran 10 ml taze hazırlanmış renklendirme substratı ile karanlıkta muamele edilir. Renklenme başladığında alınarak distile suda yıkanır ve kurutularak kaydedilir.

2.2.22. Katalaz proteininin Doğal-PAGE tabanlı aktivite analizi

Jel tabanlı enzim aktivitesinin analizi için proteinlerin bozulmadan izole edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle protein izolasyonu ve jel analizinde denatüre edici maddeler kullanılmamalıdır.

Jel SDS-Page'den farklı olarak sadece ayırma jeli halinde tek kat dökülmelidir ve hiçbir şekilde hiçbir çözelti içerisinde SDS bulunmamalıdır. Aktivite jeline koşturulacak proteinler büyük oldukları için düşük akrilamid yüzdeli jeller dökülmelidir. Uygun jel yüzdeleri ve hazırlığı çizelge 2.2.'de verilmiştir. Protokolün devamı aşağıda verilmiştir.

- 1) Çizelge 2.2.'ye göre uygun yüzdede (katalaz için % 6 alınmıştır) jel dökülür [78-80].
- 2) Protein örnekleri ve kontroller jele yüklenerek 120 voltta yaklaşık 1 saat süre ile koşturulurlar.
- 3) Yürütme işlemi bittikten sonra jel çıkarılarak dH₂O ile 5 dakika yıkanır.

Burada jel yüzdesi düşük olduğu için jeli yırtmamaya dikkat etmek gerekir.

Çizelge 2.3. DOĞAL-PAGE jeli hazırlanması için jel yüzdeleri: Çizelgeden uygun jel yüzdesi seçilerek jel hazırlanır. Büyük proteinler için yüzde düşürülür, küçük proteinler için yüzde artırılır [78, 80].

Jel Yüzdesi	dH ₂ O (ml)	% 30'luk Akrilamid (ml)	1,5 M Tris-HCl pH= 8,8 (ml)
% 5	5,8	1,3	2,5
% 6	5,5	2,0	2,5
% 7	5,2	2,3	2,5
% 8	4,8	2,7	2,5
% 9	4,5	3,0	2,5
% 10	4,2	3,3	2,5

Devam eden protokol adımları aktivitenin gösterilmesi için gerekli adımlardır. Adımlarda katalaz aktivitesi oksijen çıkışının belirlenmesi ile yapılır [78, 79].

- 4) Jel % 3'lük H₂O₂ çözeltisi ile 15 dakika boyunca inkübe edilir.
- 5) İnkübasyon adımında % 2'lik FeCl₃ ve % 2'lik K₃Fe(CN)₆ 20'şer ml hacimlerde hazırlanır.
- 6) H₂O₂ çözeltisi ile inkübasyon bittikten sonra hazırlanana % 2'lik FeCl₃ ve % 2'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltileri jelin üstüne boşaltılır.

Çözelti içerisinde iyon yapıda bulunan demir katalaz reaksiyonu sonucu ortaya çıkan oksijen ile birleşerek renk değişimini ve bu sayede katalaz aktivitesi olan bölgeyi gösterir.

- 7) Katalaz aktivitesi mor/mavi arka plan üzerinde hava kabarcıklarının çıktığı sarı renkte ya da renksiz bant bölgelerinde görülür.
- 8) Sarı reaksiyon bantları görünür olduğunda, reaksiyon çözeltisi tehlikeli siyanit içermesinden dolayı kapalı kaba alınarak, biyolojik atık çöpüne atılır ve jel dH₂O içerisine alınarak yıkanır, sonuç görüntüleme sistemleri ile kaydedilir.

2.2.23. Biyoinformatik analizler

Tetrahymena thermophila katalaz geninin biyoinformatik analizlerinde kullanılan dizi bilgileri NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ttg/>) ve Tetrahymena Genom Veritabanından (<http://www.ciliate.org/>) elde edilmiştir.

Filogenetik Ağaç Analizleri:

Filogenetik ağaç analizlerinde ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) programı filogenetik ağaçta kullanılacak dizilerin dikey hizalanması için kullanılır. Filogenetik ağaç analizi yapılırken seçilen diziler FASTA formatında olacak şekilde yukarıda verilen veritabanlarından alınarak analiz edilir. ClustalW2'nin çıktı ayarları "pir" formatında olacak şekilde ayarlanır, diğer ayarlar varsayılan olarak bırakılır. Dikey hizalama çıktısı "pir" formatında alınarak MEGA 4.1 (<http://www.megasoftware.net/>) filogenetik ağaç programı ile analiz edilerek filogenetik ağaçlar oluşturulur. Programda Neighbour-joining (komşuların birleştirilmesi-NJ) metodu kullanılmıştır. Ağaçdaki dallanmanın istatistiksel yüzde hesabının yapılabilmesi için boot-strap (çöz-bağla) değerleri kullanılmıştır. Bu değer dallanmanın % olarak ne kadar güvenilir olduğunu göstermektedir ve 5000 tekrar ile yapılmıştır. Bunun dışında MEGA 4.1 içerisinde p-distance özelliği seçilerek evrimsel farklılaşmada alınan mesafe de hesaplanmıştır. Dikey hizalama yapıldıktan sonra Gblocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) programı ile dikey hizayı bozan kısımlar çıkarılmış fakat ağaç topolojisinde farklılık gözlenmediği için bu analiz tekrarlanmamıştır.

GeneTool (sürüm, 1.1 lite): Gen restriksiyon haritası çıkarılması, kodlanan protein dizisinin oluşturulması, nokta mutasyonların belirlenmesi ve primer tasarımı için kullanılır.

Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>): İnternet tabanlı program verilen protein dizisine göre olası 3 boyutlu protein yapısını oluşturur. Analizde protein dizileri PDB veritabanında 3 boyutlu yapısı belirli olan protein dizileri ile hizalanarak en yakın yapı bulunmaya çalışılır.

Analizde veritabanı içerisinde bulunan proteinler ile analiz yapıldığı için 3 boyutlu yapı sonuçları protein dizisinin tümü için temsiliyet sağlamaz.

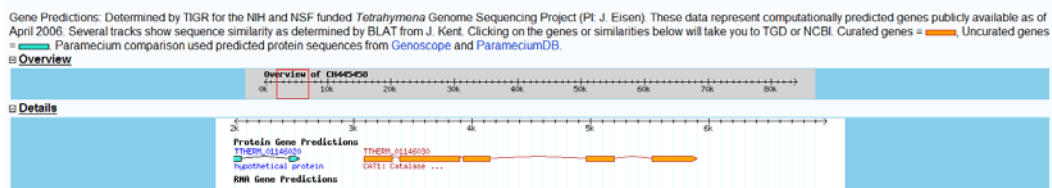
ExPASy (<http://www.expasy.org/>) Protein imzaları ve protein ailelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Protein dizileri program ile analiz edilerek olası korunmuş bölgelerin gösterilmesi sağlanır.

Box-shade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html): İnternet tabanlı program dikey hizaların yayınlanabilir formata dönüştürülmesinde kullanılır. Burada dikey hizadaki amino asitler gri, siyah ve beyaz renk skalasına göre ayırt edilir. Analiz yapılırken çıktılar RTF formatında istenmeli ve Courier yazı karakteri kullanılmalıdır. Eğer düzen

3. BULGULAR

3.1. *Tetrahymena thermophila* Katalaz Geni Genomda Tek Kopyadır

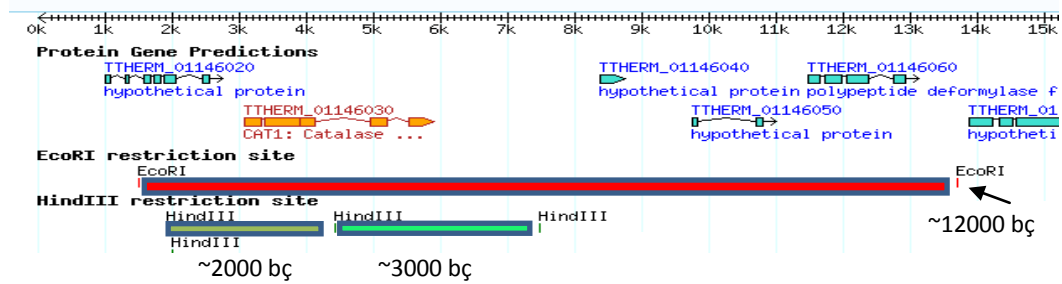
Tetrahymena thermophila katalaz geni genomda tek kopya ile temsil edilmektedir. TGD (*Tetrahymena* Genom Veritabanı) ve NCBI içerisinde yapılan analize göre katalaz genine sırasıyla, THERM_01146030 ve XM_001026590.2 ulaşım numarası ile erişilebilmektedir. TGD verilerine göre katalaz geni genomik kopyası 4 tane intron içermektedir ve büyüklüğü 2811 baz çiftidir (Şekil 3.1.). Katalaz mRNA'sının protein kodlayıcı dizisi ise 1473 baz çifti büyüklüğe sahiptir. Genom projesi öncesinde teslim edilen *T. thermophila* B1868'den klonlanmış tümsel katalaz mRNA'sı, NCBI'da AY378080.1 ulaşım numarası ile bulunmaktadır. Bu ırka ait katalaz ile SB210 ırkına ait katalaz genlerinin cDNA'larının protein kodlayan kısımları ikili-dikey-hizalaması yapılarak karşılaştırılmış ve iki dizinin % 99 oranında benzer olduğu görülmüştür. Hizalama Ek-2'de verilmiştir. Bu hizalamadan 550 civarındaki bir noktada SB210 ırkına ait 6 bazlık bir ilave dizi ile iki dizinin 6 değişik noktasında bulunan bazlarda farklılık bulunmaktadır. Veri tabanlarında bulunan bu iki dizi aşağıdaki bölümlerde açıklandığı gibi gerçek katalazlar grubundan bir gen olup gen için "Tetrahymena thermophila katalaz-1" isminin (TtCAT1), proteininin ise TtCat1p şeklinde Tetrahymena ve Paramecium gen isimlendirme kurullarına göre isimlendirilmesi önerilmiştir [81].



Şekil 3.1. Katalaz geninin TGD veritabanından alınan bilgileri: Verilere göre katalaz genine TGD içerisinde THERM_01146030 ulaşım numarası ile erişilebilir. TtCAT1 geni genomik kopyası 4 adet intron içermektedir ve toplam büyüklüğü 2811 baz çiftidir.

Bu tezden önceki dönemde *T. Thermophila* B1868 ırkının *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş genomik DNA'sıyla yapılan Southern blot araştırması sonucu; *EcoRI* kesimi TtCAT1'in genomda tek kopya olduğunu önerirken, *HindIII* kesimi ise çift bant verdiğiinden 2 kopya olabileceğini

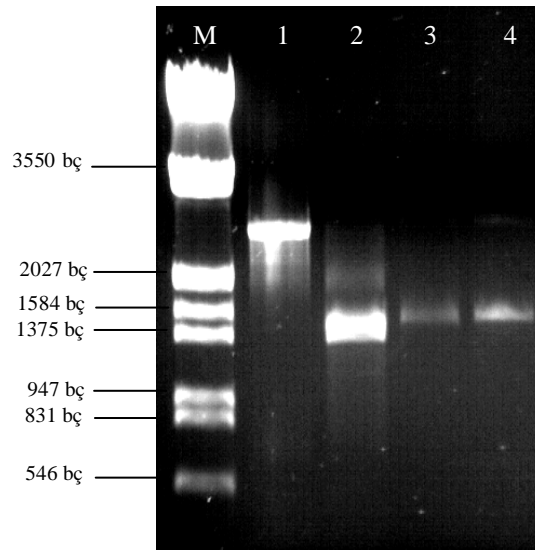
önermiştir (Bölüm 1.3.). Bu problem; her iki ırkın genlerinin baz dizinin % 99 oranında aynı olması gen öncesi ve sonrası genom dizilerinin de aynı olabileceği hipotezinden yola çıkılarak, biyoinformatik ve deneysel olarak çözülebileceği düşünülmüştür. Buna dayanarak; TGD’de katalaz geninin genomik kopya bölgesinin (Şekil 3.2.’de katalaz geninin eksonları turuncu olarak, intronları ise ince çizgi şeklinde gösterilmiştir) *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilip kesilmediği biyoinformatik olarak analiz edilmiş ve Şekil 3.2’de bu analizin sonucu verilmiştir. Şekil 3.2.’den de anlaşılacağı üzere, *EcoRI* enziminin geni içten kesmediği fakat gen dışı bölgelerden katalaz genini de içine alacak şekilde genom DNA’sını kestiği, bu *EcoRI* DNA parçasının da yaklaşık 12000 bç olduğu, *HindIII* enziminin ise geni eksondan değil 2.intron bölgesinden ve gen dışı bölgelerden kestiği ve bu bölgedeki katalazın bir kısmını içeren *HindIII* kesim parçalarının büyüklükleri yaklaşık 2.000 ve 3.000 bç olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.2. Katalaz geninin genomik kopyasının TGD’de *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile biyoinformatik kesim analizi: Katalaz genomik DNA kopyası *HindIII* enzimi ile 2. introndan kesilerek iki genomik parçaya bölünür. *EcoRI* enzimi ile gen içinden kesilmezken gen dışı bölgelerden kesilerek 12 kbç’lik bir ürün vermektedir. Katalaz geni turuncu renk ile gösterilmiştir. *HindIII* kesim bölgesi ise ikinci intron içerisinde bulunmaktadır.

Yukarıda verilen biyoinformatik analizlerin öne sürdüğü *HindIII* kesim hipotetik bulgusu, deneysel anlamda test edilebilir. Bu nedenle; *TtCAT1* geninin genomik kopyası ile mRNA kopyasının protein kodlayıcı DNA bölgesi PZR ile üretilmiş, jel analizinden sonra saflaştırılmış ve *HindIII* enzimi ile kesilerek tekrar agaroz jel ile analiz edilmiştir. Buna göre kesime alınmamış kontrol gDNA ~2800 bç civarında bant verirken (Şekil 3.3.; kuyu 1), *HindIII* ile kesime alınmış gDNA ~1375 ile ~1400 bç iki bant oluşturmuştur (Şekil 3.3.; kuyu 2). Katalaz geni

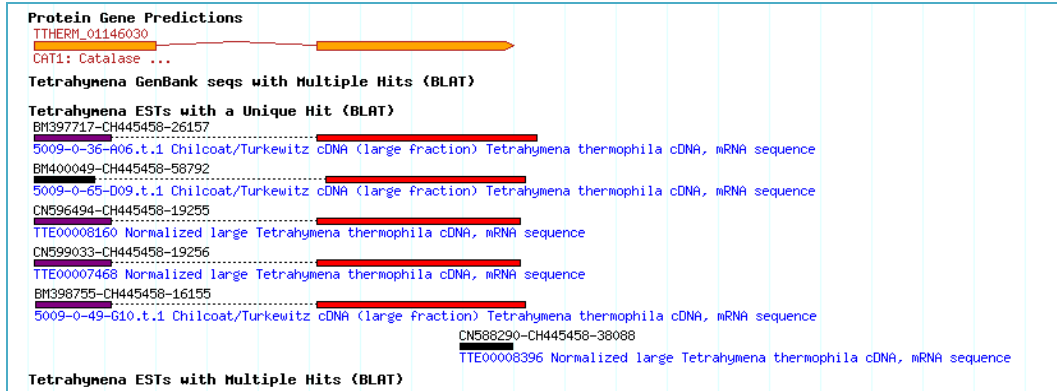
kontrol cDNA'sı *HindIII* enzimi ile kesime alınmadan jele yüklenmiş ve büyüklüğünün ~1500 baz çifti olduğu görülmektedir (Şekil 3.3.; kuyu 3). Katalaz geni cDNA'sı *HindIII* enzimi ile kesime alındığında ise bu enzim tarafından protein kodlayıcı bölge DNA'sını biyoinformatik analiz bulguları paralelinde kesmediği bulunmuştur (Şekil 3.3.; kuyu 4). Bu bölümde yapılan biyoinformatik analiz ve kesim deney bulguları, Southern blot deneyi ile elde edilen verilerin çelişkili olmadığını ve *TtCAT1* geninin tek kopya olduğunu desteklemektedir.



Şekil 3.3. *TtCAT1* gDNA ve cDNA'larının *HindIII* enzimi ile kesim analizi: Analiz sonucuna göre; (1) kesilmemiş katalaz gDNA'sı, (2) *HindIII* enzimi ile kesilmiş katalaz gDNA'sı, (3) kesilmemiş katalaz cDNA'sı ve (4) *HindIII* ile kesilmiş katalaz cDNA'sı. (M) Lamda EcoRI/*HindIII* (Fermentas) markır DNA bantlarını göstermektedir.

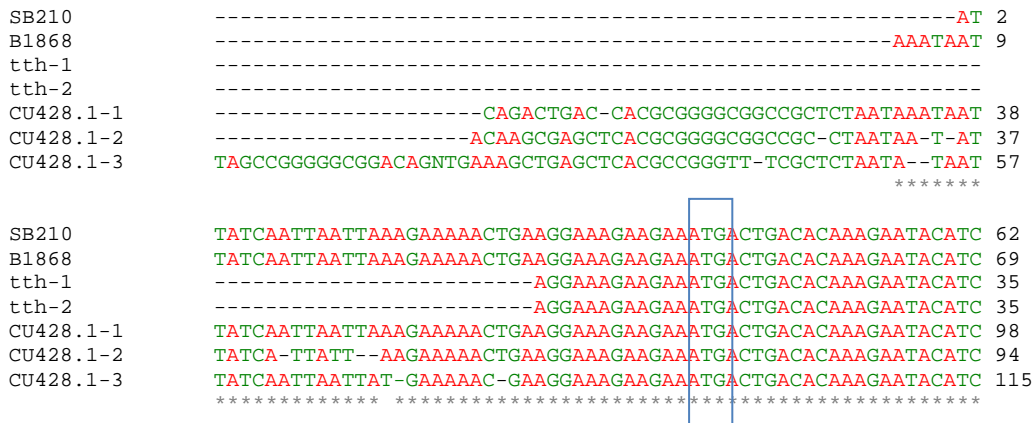
3.2. *Tetrahymena thermophila* Katalaz Geni mRNA'sının 5' Bölgesi Analizi ve B1868 Irkı ile Benzerlik Analizi

Tetrahymena thermophila katalaz geninin 5' bölgesi analizi için TGD veritabanında bulunan EST (mRNA olarak ifade edilen genlerin cDNA'larının uç dizi bölgeleri) verilerinden yararlanılmıştır. Veritabanına göre katalaz mRNA'sının 5' bölgesine ait 6 farklı dizi bulunmuştur (Şekil 3.4; kırmızı bölge).



Şekil 3.4. *Tetrahymena thermophila* katalaz mRNA'sının 5' bölgesine eşleşen EST dizileri:
TGD veritabanı sonuçlarına göre katalaz genine ait 6 farklı EST dizisine (siyah ve kırmızı renk) ulaşılmıştır.

Elde edilen parçalar SB210 ve B1868 Irklarına ait katalaz mRNA dizileri ile dikey hizalanarak 5' bölgenin dizi bilgisine ulaşılmıştır. Kullanılan dizilerin 3 tanesi *T.thermophila* CU428.1 ırkına aittir. Diğer 3 parçanın ait olduğu *T.thermophila* ırk bilgisi ise mevcut değildir. Dikey hiza analizinde kullanılan DNA parçalarının dizi bilgileri ve gen bankası ulaşım numaraları Ek-3'te verilmiştir.



Şekil 3.5. *Tetrahymena thermophila* katalaz geninin 5' mRNA bölgesinin dikey hizalama ile analizi: B1868, SB210 ve CU428.1 ırklarına ait katalaz mRNA dizileri ile ırk bilgisi belli olmayan tth-1 ve tth-2 bilgilerinin hizalamasında – ile hizalama optimize edilmiştir. Başlangıç kodonu olan “ATG” mavi çerçeve içerisine alınmıştır. Yıldızlar (*) bütün hizada korunmuş bazıları göstermektedir.

Şekil 3.5'te verilen dikey hizalama sonuçlarına göre SB210, B1868 ve CU428.1 ırklarına ait diziler ile 3 farklı bilinmeyen ırka ait katalaz mRNA 5'

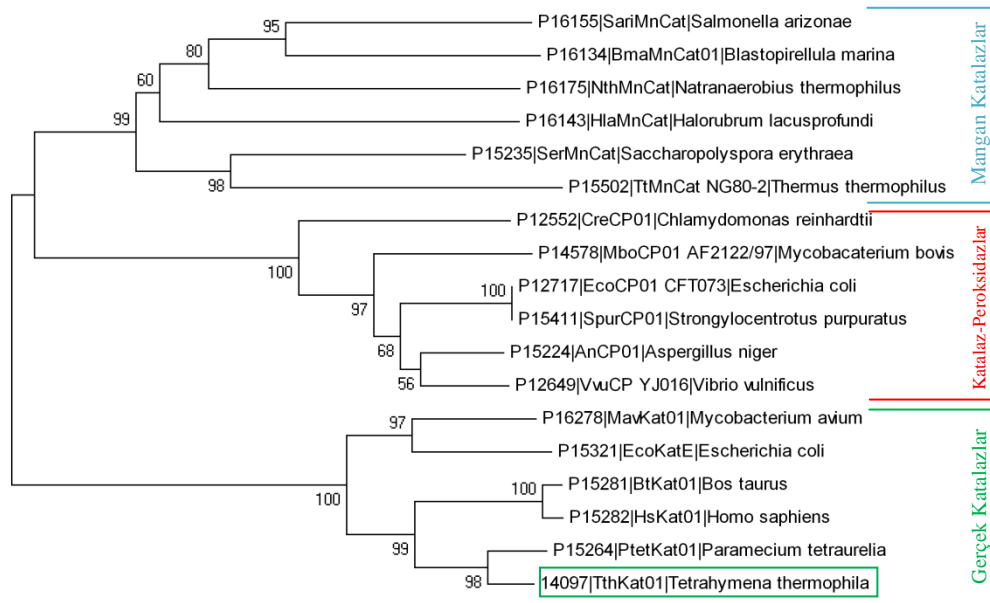
bölgesi bazıları SB210 ve B1868 UTR'ı dikkate alınarak oldukça iyi hizalanmıştır. Özellikle ATG kodonundan sonra gelen bölgede 3'ü bilinen toplam 6 farklı irkin dizi bilgilerinin %100 oranında eşleştiği görülmektedir. Fakat diğer ırklardan gelen UTR öncesi dizilerin SB210 ve B1868'den gelen dizilerle teyit edilememesinden dolayı gen bankasındaki kayıtlı 5'UTR bilgisinin doğruluğu kabul edilmiştir.

3.3. *Tetrahymena thermophila* Katalaz Geninin Filogenetik Analizi

Filogenetik ağaç analizi TtCAT1 enziminin farklı katalaz grupları içerisinde hangi grup içerisinde yer aldığı gösterilmesi amaçlanarak yapılmıştır. Bunun için 3 farklı katalaz grubunu (gerçek katalazlar, katalaz-peroksidazlar ve mangan katalazlar) temsil eden protein dizileri Peroxibase veritabanından alınmıştır [24]. Ağaç, 5 gerçek katalaz, 6 katalaz-peroksidaz ve 6 mangan katalaza ait enzimlerin protein dizileri ile TtCat1p protein dizisi kullanılarak oluşturulmuştur. Kullanılan dizilerin dizi bilgileri ve Peroxibase ulaşım numaraları Ek-4'te verilmiştir. Filogenetik ağaç yapımında kullanılacak katalaz grubu öncelikle ClustalW2 programı ile dikey hizalanmıştır. Sonrasında çıkan hizalanmış üyeler Mega 4.1 programı kullanılarak Komşuların Birleştirilmesi (Neighbour-Joining NJ) metodu ile ağaç yapısı oluşturulmuştur (Şekil 3.6). Ağaç topolojisi, Seç Bağla (boot strap) yöntemi ile 5000 tekrarlı istatistik analiziyle test edilmiştir. Ağaç topolojisi ayrıca p-mesafe (p-distance) modellemesiyle evrimsel açıdan analiz edilmiştir. Ağaç Maksimum parsimoni ve minimum evolution metotları ile aynı hizalama kullanılarak oluşturulmuş, fakat ağaç topolojisinin köke yakın ana yapısında herhangi bir farklılık görülmemiştir (oluşturulan ağaçlar Ek-5 ve Ek-6'da verilmiştir).

Komşuların Birleştirilmesi ağaç analizine göre katalazların üç alt gruba ayrıldığı ağaç yapısından da anlaşılmaktadır. Bu üç ana grubun birbirinden ayrılma noktalarında (nod) çöz-bağla değerlerine Şekil 3.6'da % 50'nin altında kalmasından dolayı verilmemiştir. Seç-bağla değerlerinin bu noktalarda düşük olması ana grupların birbiriyle olan ağaç topolojisinde ki konumların değişebileceğini ima etmektedir. Buna karşılık, bu üç ana grubun (klad) kendi içinde dallanma noktalarındaki seç-bağla değerlerinin çok yüksek olması ana

grupların topolojisinin kararlı olduğunu göstermektedir. Ana gruplar içinde bulunan üyelerin enzim aktiviteleri ve 3B yapılarına bakıldığında birbirlerine benzemelerinden dolayı bunlara ortolog adı verilir. En içte yer alan ana grup üyeleri incelendiğinde üyelerin tümünün mangan katalaz motif ve enzimatik karakter taşıdığı dolayısıyla bu kladın Mangan Katalaz kladını oluşturduğu; buna dış komşu olan ana grubun ise Katalaz peroksidaz, en dışta bulunan grubun ise Gerçek Katalaz kladı olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Ağaç yapısında, TtCat1p enzimine bakacak olursak gerçek katalazlar içerisinde yer aldığı görülmektedir. Gerçek katalazlar içerisinde TtCat1p'nin bakteri katalazlarına göre omurgalı katalazlarına daha yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 3.6. TtCAT1p katalaz alt gruplarından gerçek katalaz grubunun üyesidir: Ağaç herhangi bir dış grup kullanılmaksızın yapılmıştır. Toplam 17 katalaz ClustalW2 programı ile dikey hizalanmış ve hizalanmış üyeler Mega 4.1 programı kullanılarak Komşuların Birleştirilmesi (Neighbour-Joining NJ) metodu ile ağaç analizine alınmıştır. Ağaç topolojisi, Seç Bağı (boot strap) yöntemi ile 5000 tekrarlı istatistik analizden geçirilmiş ve bulgular % olarak nodlara yerleştirilmiştir. Ayrıca ağaca p-mesafe (p-distance) modellemesi uygulanmıştır. Ağaç üyelerinin GanBankası erişim numaraları EK-4'de verilmiştir.

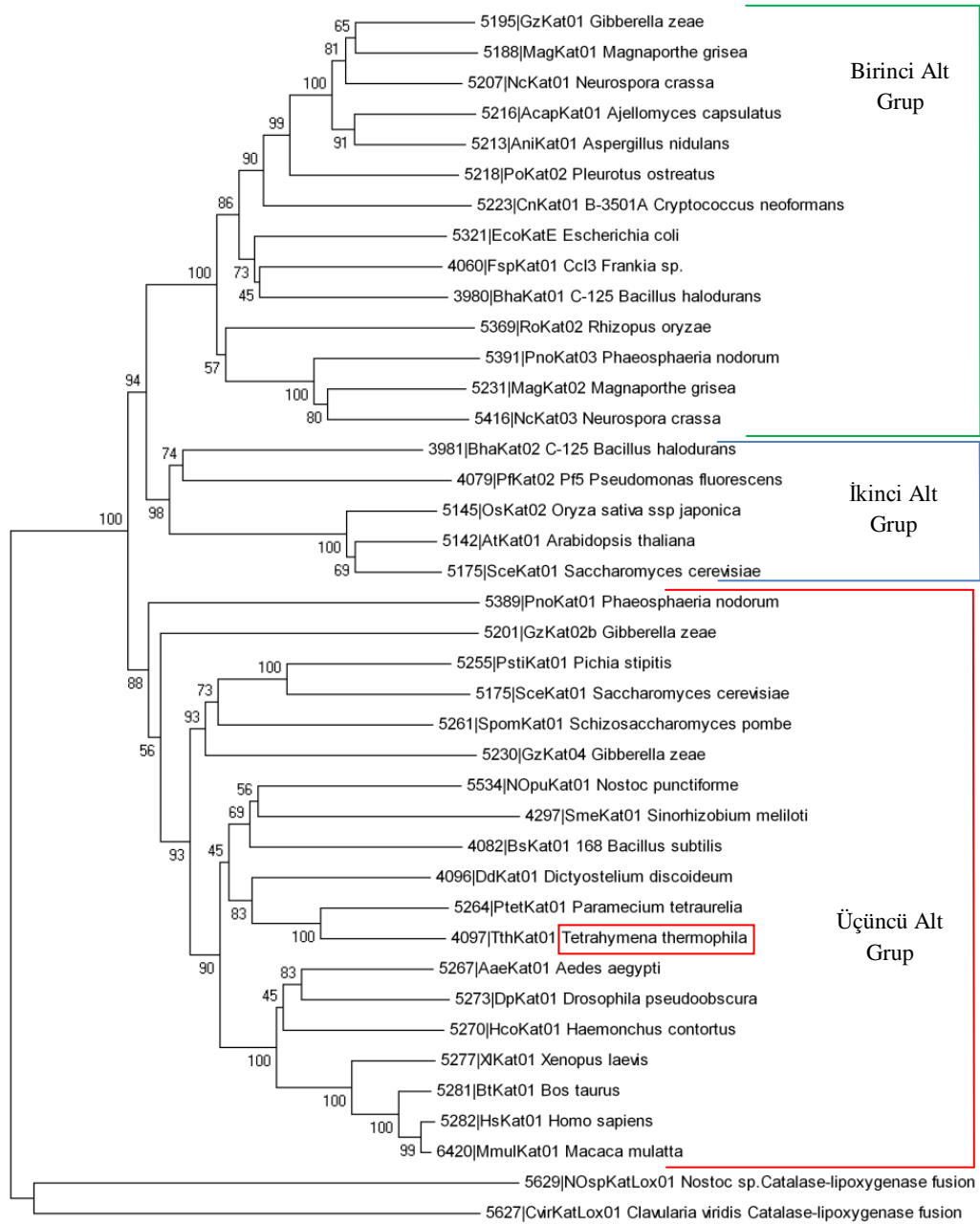
Gerçek katalazlar, homotetramerik protein kompleksi yapısında olup bu kompleksin üyelerinin protein büyüklüğü ile yapılarında taşıdıkları hem gruplarına göre 3 alt gruba ayrılmaktadır. 1. alt grubun protein kompleksinin

üyelerini 55-69 kDa büyüklüğünde bitki katalazları, algisel katalazlar ve bakteriyel katalazların bir dalı oluşturur. Bu alt grup hem b grubu bulundurmaktadır ve NADPH ile kompleks oluşturarak aktif duruma geçebilir [26, 27, 29, 30]. 2. alt grup ise 75-84 kDa alt üniteye sahip büyük alt üniteli katalazları içerirler. Bu grup içerisinde bakteriyel, fungal ve arkebakteriyel üyeler bulunmaktadır. Hem d grubu taşırlar. C-ucunda ise flavodoksin benzer bir bölge bulunmaktadır [26, 27, 29, 30]. 3. alt grupta tüm canlı grubu katalazları temsil edilmektedir. NADP ile bağ oluşturabilen ve oluşturamayan çeşitleri bulunmaktadır. Aktif merkezinde hem b taşırlar ve alt ünite büyüklükleri 43-75 kDa arasındadır [26, 27, 29, 30]. Bu alt gruplar enzim aktivitesi açısından farklılaşmış olmayıp, yapısal anlamda bazı değişikliklere sahiptirler.

Ağaç oluşturulurken EBI ClustalW2 programında çıktı formatı “pir” olarak değiştirilmiş diğer ayarlar varsayılan olarak bırakılmıştır. Sonuçlar GBlocks [82, 83] programı ile düzenlenmiştir, fakat ağaç topolojisinde düzenlenmemiş verilere göre bir değişiklik oluşmamıştır. Programın varsayılan ayarları kullanılmıştır. Sonuçta oluşan diziler alınarak MEGA ile analiz edilmiştir [84, 85]. Programda Neighbor-Joining (komşuların birleştirilmesi) metodu kullanılmıştır [86]. Seç-Bağla (Boot-strap) değerleri 5000 tekrar ile oluşturulmuştur ve amino asit modellemesinde “p-distance” seçeneği kullanılmıştır.

TtCat1p'nin gerçek katalazların bu 3 alt grubundan hangisine girdiği sorusu filogenetik araçlarla analiz edilmiştir. Analiz için Peroxisome [24] veritabanından gerçek katalazlara ait 38 amino asit dizisi seçilmiştir. Dış grup olarak katalaz lipoksigenaz füzyon genleri kullanılmış olup bu genler katalaz süper ailesi içine dâhildir fakat katalazların atasına yakın gruplardan bir tanesidir [26]. Seçilen tüm amino asit dizileri ve Peroxisome ulaşım numaraları Ek-7'te verilmiştir. (Şekil 3.7.). Ağaç topolojisine bakıldığında katalaz lipoksigenaz füzyon proteinlerinin dış grup olarak çıktığını görmekteyiz. Ağaçta Gerçek Katalazların dallanmasına bakıldığında üç alt grup oluşumu görülmektedir. Canlılar âleminde en çok dağılım gösteren ve en fazla üyeyi bulduran grup olarak üçüncü alt grup görülmektedir.

Bitki, alg ve bakteri katalazlarını içeren birinci alt grup ve aynı kök üzerinden türevlenen ikinci alt grup da ağaç topolojisinden görülmektedir.



Şekil 3.7. Gerçek Katalazlara ait Filogenetik Ağaç: Ağaç 38 farklı katalaz geni ve 2 farklı katalaz lipoksigenaz füzyon genlerinin protein dizileri ile komşuların birleştirilmesi (Neighbor-Joining) metodu ile oluşturulmuştur [86]. Dizi bilgileri PeroxiBase veritabanından alınmıştır. Dizi bilgileri ile ulaşım numaraları Ek-7’de verilmiştir. Ağaç topolojisinde katalazlar 3 temel gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu üç alt grup içerisinde *ThCat* enzimi 3’üncü alt grup içerisinde bulunmaktadır.

Ağacın genel yapısında gerçek katalazların 3 alt grubu da seçilmektedir. TtCat1p omurgalı katalaz gruplarına yakın çıkmıştır ve 3'üncü alt grup içerisinde yer almaktadır. Alt ünite büyüklüğüne bakıldığında TtCat1p küçük alt üniteye sahip katalazlar içerisinde olduğu ağaç yapısına da uygundur.

Nighbour-Joining metodu ile yapılan ağaç minimum evolution ve maksimum parsimony metodları ile de yapılmış ve ağaç yapısında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Oluşturulan diğer ağaçlar Ek-8 ve Ek-9'da verilmiştir.

3.4. *Tetrahymena thermophila* Katalaz Protein Dizi Bilgisinin Analizi

TtCat1p'nin filogenetik analiz bulguları olasılıkla bu enzimin Gerçek Katalaz alt grubuna girdiğini önermektedir. Gerçek katalazlar aileye ait özel motifler ile de sınıflandırılabilir [87]. Gerçek katalazları ayırt etmede kullanılan motifler iki adettir. Katalazların tetramer yapı oluşturabilmesi için gerekli demir bağlanma heme motifi; [DET] - [LIVMTA] - {NSYL} - {RPFC} - [LIVM] - [LIVMSTAG] - [SAG] - [LIVMSTAG] - H - [STA] - [LIVMFY] ile aktif bölge motifi; [SGATV] - {D} - x(2) - [LIVMA] - R - [LIVMA] - x - [FW] - H - {V} - [SAC]. Protein dizisinin motif açısından analizi ExPASy içerisinde bulunan Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>) aracı ile yapılmıştır. ExPASy, TtCat1p amino asit dizisi içinde iki temel motif bulmuştur. Bunlar, TtCat1p'de Gerçek Katalazların aktif kısım motifine karşılık gelen FDRERIPERVVHAKGAG ile Hem Ligandı Bağlanma Bölgesi motifi olan RLFSYPDTH'dir (Çizelge 3.1.). TtCat1p'nin bu iki motifinin protein içindeki lokalizasyonu Çizelge 3.1'de verilmiştir. Katalazların bir kısmı sitoplazmik, diğer kısmı ise peroksizomal, diğer bir kısmı ise mitokondriyal hücre içi bölgelerde görev üstlenirler [88]. TtCat1p'nin böyle bir lokalizasyona sahip olup olmadığı yine motif analizi ile araştırılabilir çünkü bu bölgelerde görev yapan katalazların C-terminal uçlarında lokalizasyon sinyal motifi bulunmaktadır. Örneğin, peroksizom da görev yapan enzimlerde ise "peroksizoma transfer sinyal motifi-1" canlılar aleminde bulunan bu enzimlerde (STAGCN) - (RKN) - (LIVMAFY) şeklindedir [17, 89]. TtCat1p, peroksizoma transfer sinyal motifi-1' bulmada kullanılan PTS1 predictor software (<http://mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp>) ile analiz edildiğinde C-terminal ucunda yer alan son 12 amino asit dizisi ile bu dizinin uç

kısmında yer alan SNL dizisi olası “peroksizoma transfer sinyal motifi-1” olarak bulunmaktadır.

[DET]-[LIVMTA]-{NSYL}-{RPFC}-[LIVM]-[LIVMSTAG]-[SAG]-[LIVMSTAG]-H-[STA]-[LIVMFY]

Aktif Bölge İmzası

5282 HsKat01	1	LVQDVVFTDEMAHFDREERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVF
5281 BtKat01	1	LVQDVVFTDEMAHFDREERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVF
5275 MmKat01	1	LVQDVVFTDEMAHFDREERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVF
5277 XlKat01	1	LVQDVVFTDEMAHFDREERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITQYCKAKVF
5264 PtetKat01	1	LLQDTHLIDKLAHFDREERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTCGDTVTKYTKAKFL
4097 TthKat01	1	LLQDFHLIDKLAHFDREERIPERVVHAKGAGAWGYFEVTHDVTKECKAKVF

[SGATV] - {D} - x(2) - [LIVMA] - R - [LIVMA] - x - [FW] - H - {V} - [SAC] Hem Grubu

Bağlanma İmzası

5282 HsKat01	350	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYLHI PVNCPYRARVANY
5281 BtKat01	350	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYLQI PVNCPYRARVANY
5275 MmKat01	350	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYLQI PVNCPYRARVANY
5277 XlKat01	350	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYLQI PVNCPYRARVANY
5264 PtetKat01	332	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYTLQI PVNCPYRARVANY
4097 TthKat01	331	LQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYDQI PVNCPYRARVSN

(STAGCN) - (RKN) - [LIVMAFY] Peroksizomal Lokalizasyon sinyali

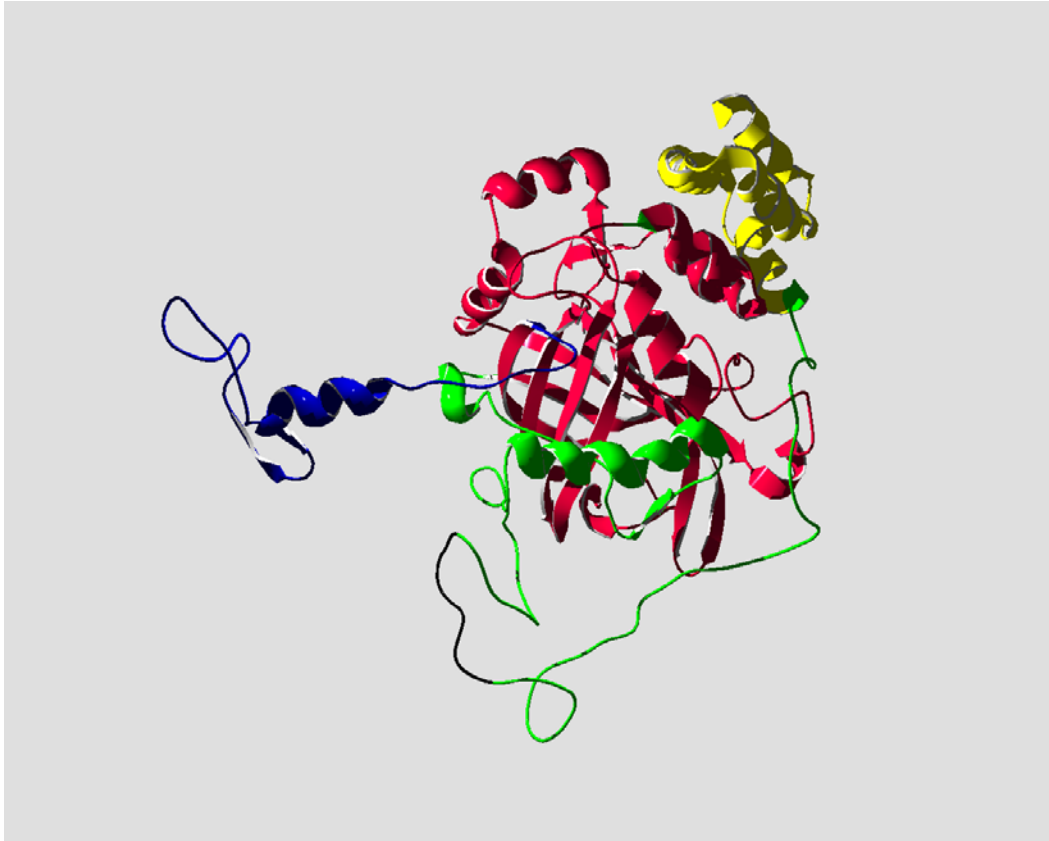
5282 HsKat01	499	YNAE-KPKNAIHTVQSGSHLAAREKANL	527
5281 BtKat01	499	YNAE-KPKNAVHTVQSGSHLSAREKANL	527
5275 MmKat01	499	YNAE-KPKNAIHTVQSGSHMAAKGKANL	527
5277 XlKat01	499	HNAKCTKKECARPNTQHSYLTSEKSNL	528
5264 PtetKat01	480	-----FPNNKARL	488
4097 TthKat01	480	-----FPANRSNL	488

Şekil 3.8. *TtCat* amino asit dizisinin korunmuş bölgelerinin dikey hizalama ile gösterilmesi: Katalaz proteinlerinde belirlenen korunmuş bölgelerin *TtCat1p* ile dikey hizalanmış bilinen diğer gerçek katalazlar ile gösterilmesi.

3.5. *Tetrahymena thermophila* Katalaz Proteininin Olası 3 Boyutlu Yapısı

TtCat1p proteininin olası 3 boyutlu yapısı, Swiss-Model programı ile sığır karaciğer katalazı temel alınarak Şekil 3.6’de görüldüğü gibi oluşturulmuştur [90-92]. Programa, *TtCat1p*’in tüm amino asit dizisi analiz için verildi fakat program özellikle N- uç bölgesinde bulunan bazı amino asit dizilerini model oluştururken benzerliği az olmasından dolayı kullanmamış, dolayısıyla model üzerinde bu bölgeler bulunmaktadır.

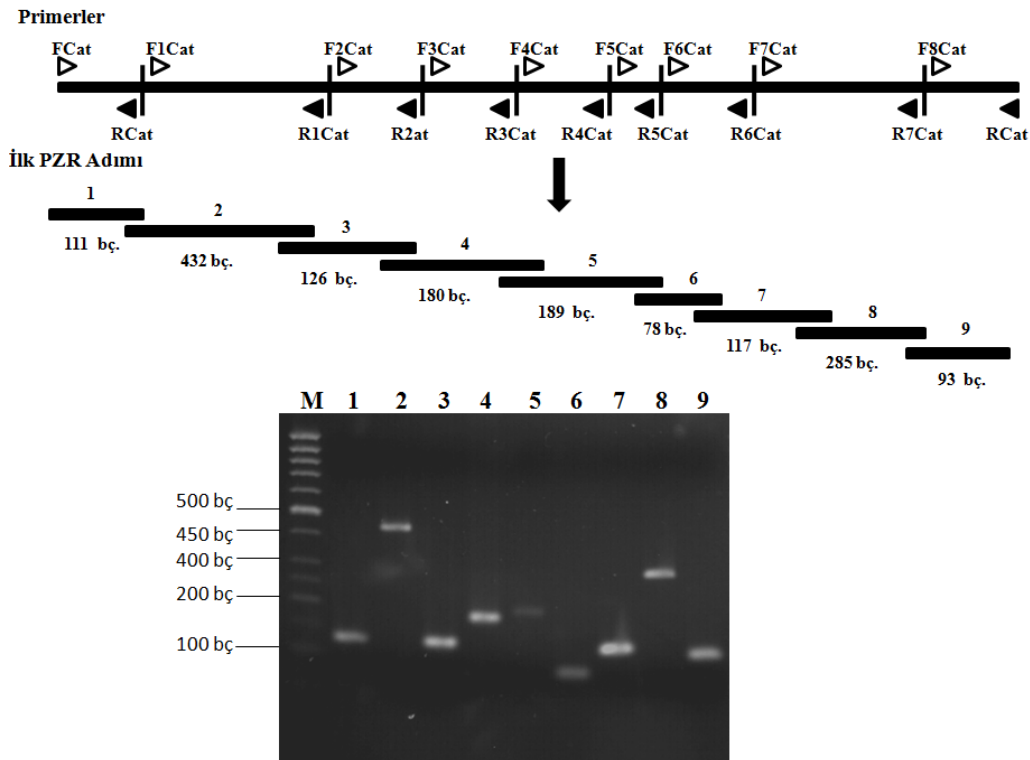
Modellemeye göre protein yapısının N-ucundan yaklaşık 70 amino asitlik bir bölge aktif bölgeyi ve N' ucunu içermektedir (mavi renk), sonrasında yaklaşık 70-320 amino asitlik bir bölge ise β tabakaları yapılarını göstermektedir (kırmızı renk), bu bölgeyi yaklaşık olarak 320-430'uncu amino asitler arası katlanma bölgelerini ve α heliks yapılarını içermektedir (yeşil renk). Bu bölgede katalaz hem grubu bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Son 100-150 amino asit ise C' ucu bölgesini göstermektedir (sarı renk). Bu bölgede peroksizomal lokalizasyon aminoasit kodu taşımaktadır. Büyük alt üniteye sahip katalazlarda ise bu bölge flavodoksin bağlanma bölgesine benzer bir yapı gösterir. Bu yapı nükleik asitlere bağlanma bölgesi olarak başka proteinlerde bulunmaktadır [17].



Şekil 3.9. TtCat1p enziminin Swiss-Model programı ile yapılan 3 boyutlu modeli: Katalaz aktif bölge ve N' ucu (mavi renk), katalaz domeini α -sarmal ve β tabaka yapıları (kırmızı renk), heme bağlanma domaini serbest-dönüş bölgeleri ile α heliks yapıları (yeşil renk). C-ucu son 100-150 amino asit dizisi (sarı renk).

3.6. Nokta Mutasyonların Yerleştirilmesi

TtCat1p enziminin *Escherichia coli*'de rekombinant olarak üretilmesi için gen üzerinde bulunan 10 farklı noktada nokta mutasyon oluşturulması gerekmektedir. Şekil 3.10.'nun en üst bölgesinde yer alan yatay bir çizgi üstünde bu mutasyonları taşıyan birbiriyle örtüşen primer setlerinin yeri verilmiştir. İlk PZR adımında üretilmesi gereken DNA parçaları 1-9 arasında numaralandırılmış olup her parçanın altında beklenen ürün büyüklüğü verilmiştir. İlk adım PZR ile amaç uç kısımlarında nokta mutasyonlar içeren parçaların oluşturulmasıdır. Elde edilen nokta mutasyonlu İlk PZR adım ürünleri agaroz jel ile analiz edildiğinde beklenen büyüklüklerde olduğu görülmüştür. Örneğin; Şekil 3.8'de ki agaroz jelinin 1. kuyucuğa bakıldığında FCat ve R1Cat primerleri ile üretilen ürün büyüklüğünün 110 bç civarında olduğu bulunmuş, bu ise beklenen 111 bç ürün büyüklüğündedir.

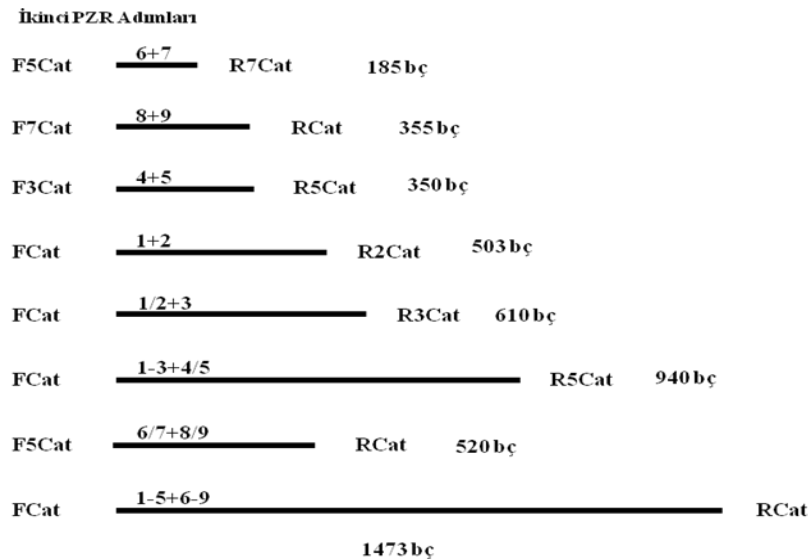


Şekil 3.10. *TtCAT1* Geni Üzerinde Oluşturulan Mutasyonlar: *TtCAT1* geni toplamda 10 farklı mutasyon içermektedir ve bu 10 mutasyon 8 çift nokta mutasyon ve 1 çift dış primer ile gene yerleştirilmiştir. PZR sonucunda ilk adım reaksiyonlardan elde edilen parçalar ve beklenen büyüklükler şekilde görülmektedir.

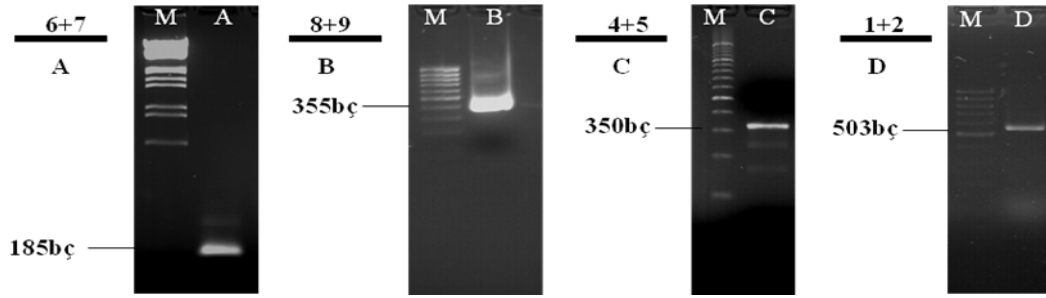
Aynı şekilde 2. Kuyucuktaki beklenen ürün büyüklüğü 432 baz çifti olarak verilmiş, ve jel analizi sonuçlarına göre yaklaşık olarak 450 baz çifti civarında ürün gözlenmiştir. Bu basamak Şekil 3.8.'de ilk PZR adımı olarak gösterilmiştir. Mutasyonların yerleştirilmesi için gereken ilk adım nokta mutasyon taşıyan parçaların elde edilmesidir.

Parçalar üretildikten sonra herhangi bir şekilde mutasyon oluşturma adımı yoktur. Oluşturulan parçalar sırayla birbirlerine örtüşen bölgeleri kullanarak birleştirilirler. Bu durum Şekil 3.11.'de ikinci PZR olarak gösterilmiştir. En sonunda ise mutasyonları taşıyan tüm cDNA parçası elde edilmiştir.

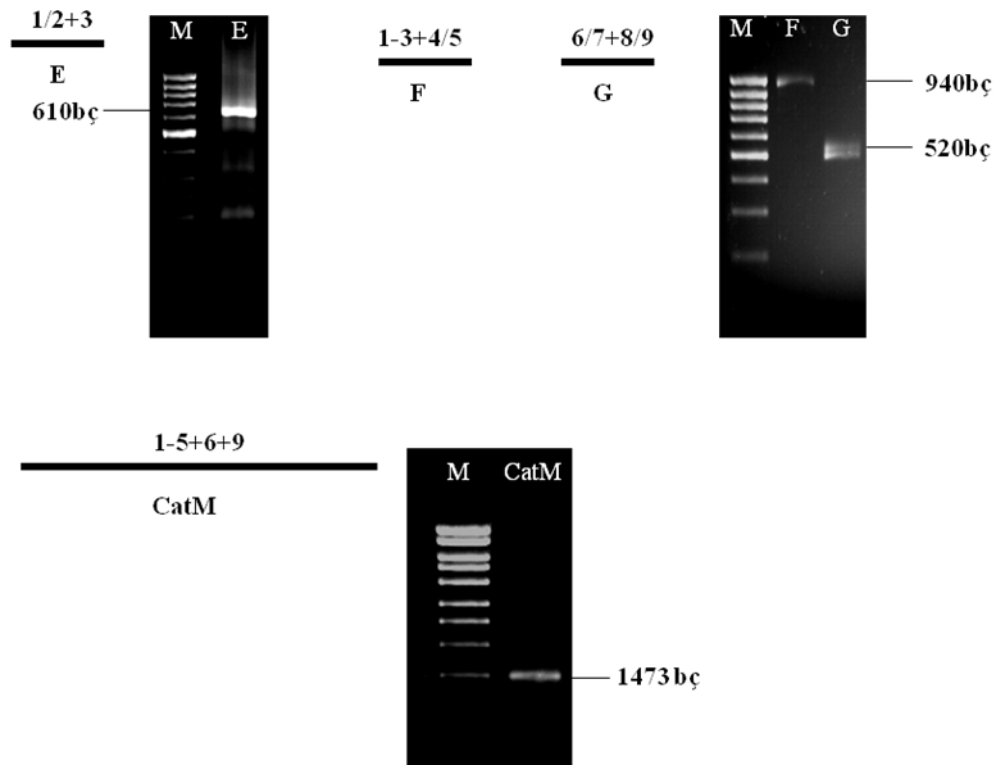
Birleştirmede oluşan yeni parçalar ve büyüklükleri Şekil 3.12.'da verilmiştir. Birleştirmede genin uç kısımlarından başlanarak 2'li gruplar halinde birleştirme reaksiyonları kurulmuştur. Birleştirme yapılırken parçalar birleştirilecek iki parça arasındaki baz çifti farkının çok fazla olmamasına dikkat edilerek seçilmiştir. Sonraki adımlarda üretilen cDNA mutasyonları taşıyıp taşımadığının analizi dizi analiz yöntemi ve rekombinant protein üretim ürettirme denemeleriyle test edilmiştir.



Şekil 3.11. Nokta Mutasyon Taşıyan Parçaların Birleştirilmesi: İkinci PZR adımıyla ise oluşturulmuş olan bu parçaların birleştirilmesinin adımları verilmiştir. Burada parçaların sahip olduğu örtüşen diziler kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Nokta Mutasyon Taşıyan Parçaların Birleştirilmesi I: İlk PZR adımında oluşturulan parçalar ikinci PZR adımında birleştirilmiştir. Şekilde oluşturulan ilk 4 parça görülmektedir.



Şekil 3.13. Nokta Mutasyon Taşıyan Parçaların Birleştirilmesi II: İlk 4 parça üretildikten sonra sağ ve sol uçlardan parçalar birbirine eklenerek 10 mutasyon taşıyan CatM cDNA parçası elde edilmiştir.

3.7. Nokta Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi

Dizi analizi oluşturulan mutasyonların kontrolünün yapılması amacı ile uygulanmıştır. Bunun için seçilen ileri ve geri primerler ile lineer polimerizasyon yapacak şekilde istenilen parçalar üretilir. Üretimi yapılan parçalar ise işaretli bazlar sayesinde dizi analizi tarafından okunur ve gen dizisine yerleştirilmiş

mutasyonlar okunabilir. DNA dizi analizi sonuçlarına göre 10 farklı mutasyonun genin içerisine yerleştirildiği gösterilmiştir. Şekil 3.14.'te tüm nokta mutasyonlar gösterilmektedir. Dizilemede R7Cat, FCat, F1Cat, F6Cat ve F7Cat primerleri kullanılmıştır. Geri primerin okuduğu diziler analiz edilirlen dikey hizalama için ters çevrilerek karşılığı alınmış ve bu şekilde diziye komplementer olması sağlandıktan sonra analiz edilmiştir.

TthCatSB210	GGTGAATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATTG-ATAAGTTGGCTCACTT	179
FCat	GGTGAATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATTGGACAAGTTGGCTCACTT	104

TthCatSB210	TGCGCTAACATGTTCTGGGACTTCCTTTCC	2
F1cat	TGCGCTAACATGTTCTGGGACTTCCTTTCCAGSTTCCCTGAATCTGCTCACC-GGTTACC	374

TthCatSB210	ATGAATAAGGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGA	718
R7Cat	ATGAACAAGGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGA	304

TthCatSB210	ACTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAACCCTGACTACGCTACTGAAG	778
R7Cat	ACTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAACCCTGACTACGCTACTGAAG	364

TthCatSB210	ACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAAGGTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGCTTAAAGTTA	838
R7Cat	ACCTCTTCAAGCACATTGCTCAAAGGTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGCTCAAAGTTA	424

TthCatSB210	TGCCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTTACCAAGGTCTGGC	898
R7Cat	TGCCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTTACCAAGGTCTGGC	484

TthCatSB210	CCCATGGTGACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGTCTTAAACAGAAATCCTGAAA	958
R7Cat	CCCATGGTGACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGTCTTAAACAGAAATCCTGAAA	544

TthCatSB210	ACTACTTTGCTGAAACTGAAATAA	7
R7Cat	ACTACTTTGCTGAAACTGAAACAATCTGCTTTCTCTCCTTCCCACTTAGTCCCTGGTATGG	604

TthCatSB210	AACCCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAAGTCGTCTCTTCTTATCCCGATACCCACAGAC	1078
R7Cat	AACCCTCTTTGGATAAGATGCTCAAAGTCGTCTCTTCTTATCCCGATACCCACAGAC	664

Şekil 3.14. Katalaz Geni Üzerindeki Nokta Mutasyonların Dizi Analizi Sonuçları: Gen üzerinde kutular içinde gösterilen bölgelerde sırasıyla yerleştirilmiş 10 farklı mutasyon gösterilmiştir. Burada timin (T) bazlarının yerine sitozin (C) bazları yerleştirilerek TAA/TAG kodonunun yerine CAA/CAG konu getirilmiştir. Bu kodonlar da standart kodon sözlüğüne göre glutamin amino asidini kodlamaktadır.

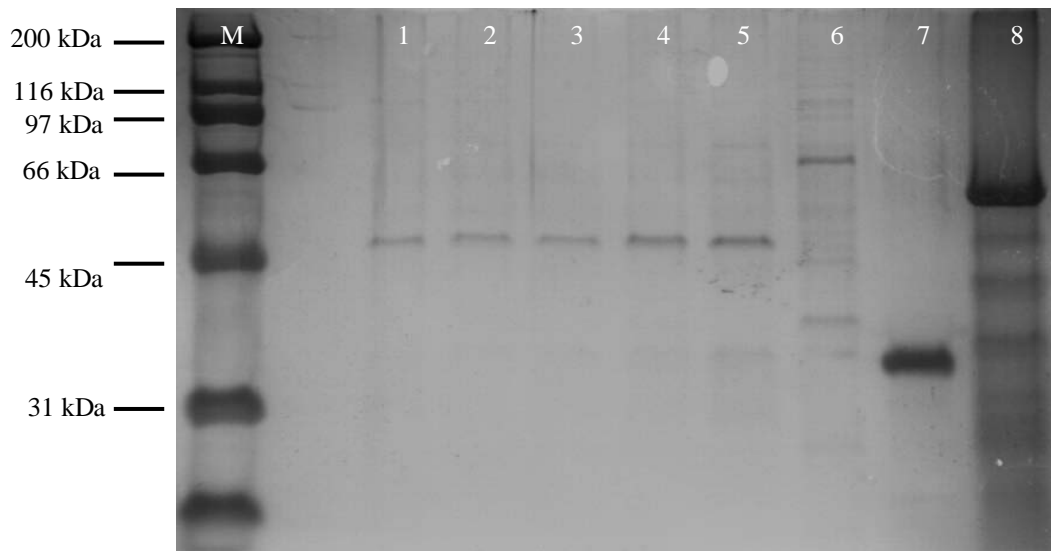
TthCatSB210	CCCTACA-GAGCCAGAGTATCCAACAAC ⁹ TAA ⁹ CGT ⁹ GATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAA 1139
F6Cat	CCCTACAAGAGCCAGAGTATCCAACAACCAA ⁹ CGT----- 39
	***** *****

TthCatSB210	AGATAA ¹⁰ STCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAA-GATTGCTACCGC 1439
F7cat	AGACAA ¹⁰ STCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAAAGATTGCTACCGC 296
	***** *****

Şekil 3.15. Katalaz geni üzerindeki nokta mutasyonlardan 9. ve 10. mutasyon yerindedir:
Burada timin (T) bazlarının yerine sitozin (C) bazları yerleştirilerek TAA/TAG kodonunun yerine CAA/CAG kodonu getirilmiştir.

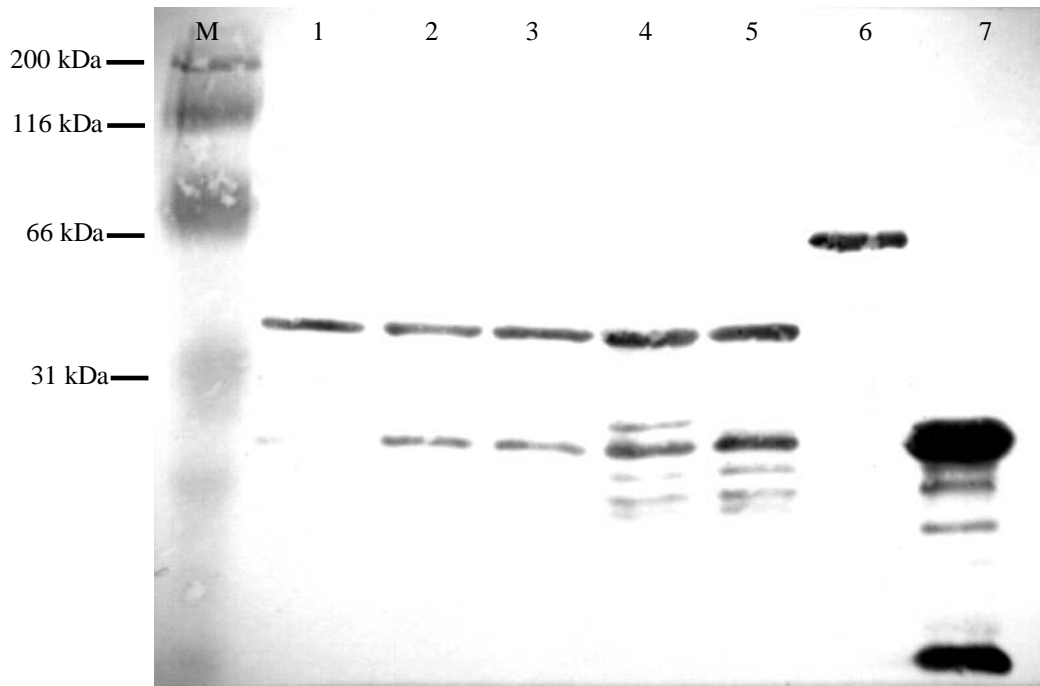
3.8. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

Üretimi yapıldığı düşünülen rekombinant TthCat1p enziminin rekombinant olarak üretilmesinden sonra protein üretim konakçısı olan *Escherichia coli* BL-21 (DE3) pLysS ırkından toplam protein izolasyonu yapılmıştır. Üretilen rekombinant proteinler GST takısına sahip oldukları için GST'ye afinite gösteren "Glutasyon Sefaroz 4B" partikülleri ile toplam protein içerisinden rekombinant protein saflaştırılmıştır. Sonuçlar SDS-Page jelinde analiz edilmiştir.



Şekil 3.16. TthCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin SDS-PAGE Sonucu: (M) BioRad Standarts Broad Range Marker, (1-5) *TthCat* GST rekombinant füzyon proteini, (6) *G. intestinalis* Mpk2 kontrol [75], (7) *TthGSTz* [93] kontrol ve (8) Mikroorganizma kaynaklı katalaz (Fluka, 60633). Jel komassie mavisi ile boyanmıştır.

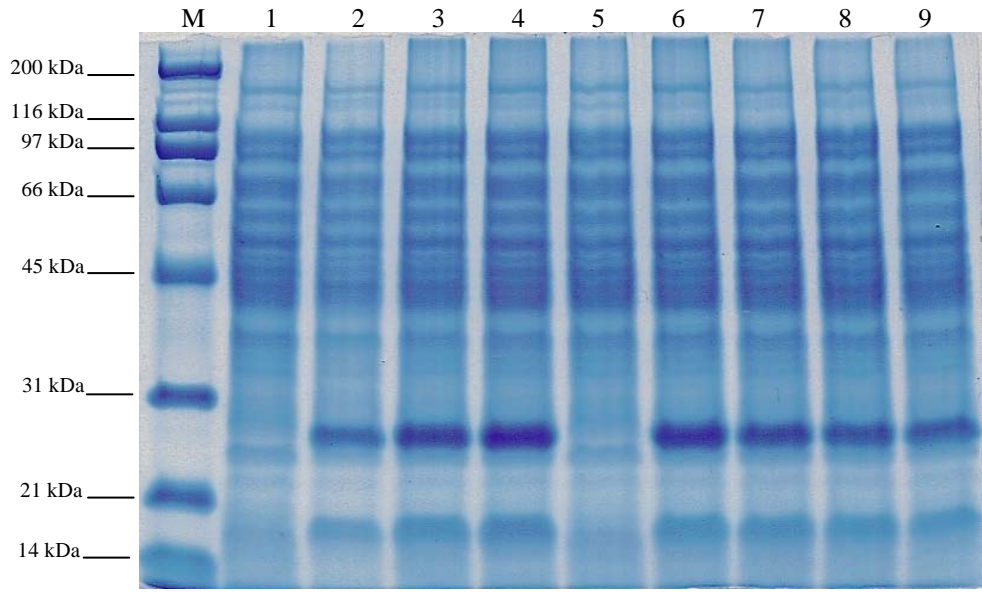
TthCat GST füzyon proteininin büyüklüğünün yaklaşık olarak 82 kDa olması gerekmektedir. SDS-Page analizine göre yaklaşık 50 kDa civarında (1-5 kuyucukları) bantlar görülmüştür. 6'ncı kuyucukta GST-*Gimpk4* [75] yaklaşık 72 kDa civarında ve 7'nci kuyucukta 6XHis-*TthGSTz* [93] 26 kDa büyüklüğünde görülmektedir. 8'inci kuyucukta ise mikroorganizma kaynaklı katalaz yaklaşık 56-58 kDa civarında görülmektedir. Sonuç olarak füzyon proteinin istenilen büyüklük olan 80 kDa civarında bant vermediği görülmüştür. Üretilen proteinin rekombinant formda olup GST takısını taşıyıp taşımadığını görmek için western blot deneyi yapılmıştır.



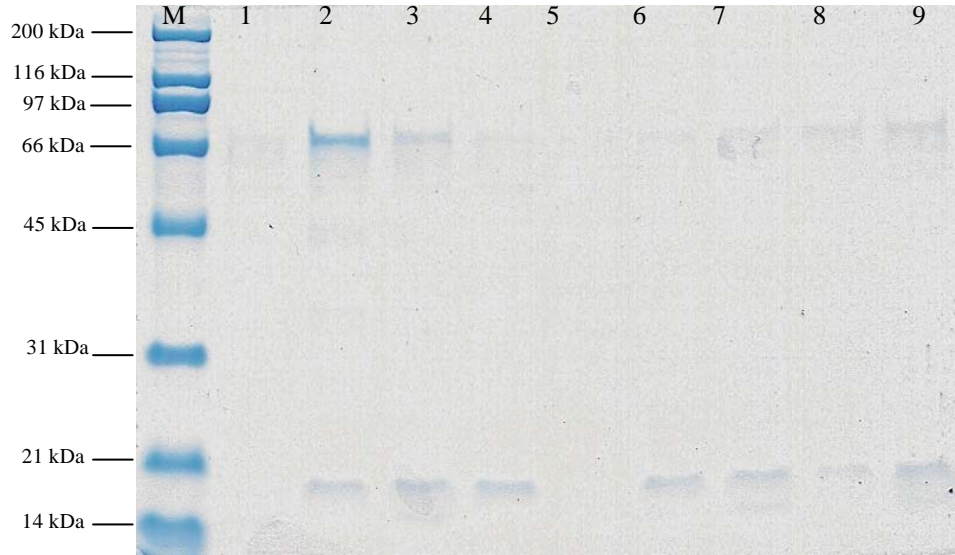
Şekil 3.17. GST TtCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin Western Blot Analizi: (M) BioRad Kaleidoscope Prestained Marker, (A-E) 6XHis-*TthCat* GST Füzyon Proteini, (F) GST-*Gimpk4* [75] ve (G) *TthGSTz* [93]. Western blot analizinde birincil antikor olarak Mouse Monoclonal Anti-Glutathione-S-Transferase (GST) IgG (Sigma, G 1160); ikincil antikor olarak Anti Mouse (Rabbit) IgG HRP-conjugated (Sigma, A 5525) kullanılmıştır.

Western Blot ve SDS-Page analizlerine göre üretilen rekombinant protein yarım olarak üretilmektedir ve bu da nokta mutasyonlarda eksikliğin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle kalıp gen dizisi üzerinde yenilenen nokta mutasyon deneylerinden sonra yeniden rekombinant protein üretimine geçilmiştir. Üretilen rekombinant proteinler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Sonuçlar toplam protein

(Şekil 3.17.) ve saflaştırılmış protein (Şekil 3.18.) olarak jele yüklenmiş ve analizler tekrarlanmıştır.

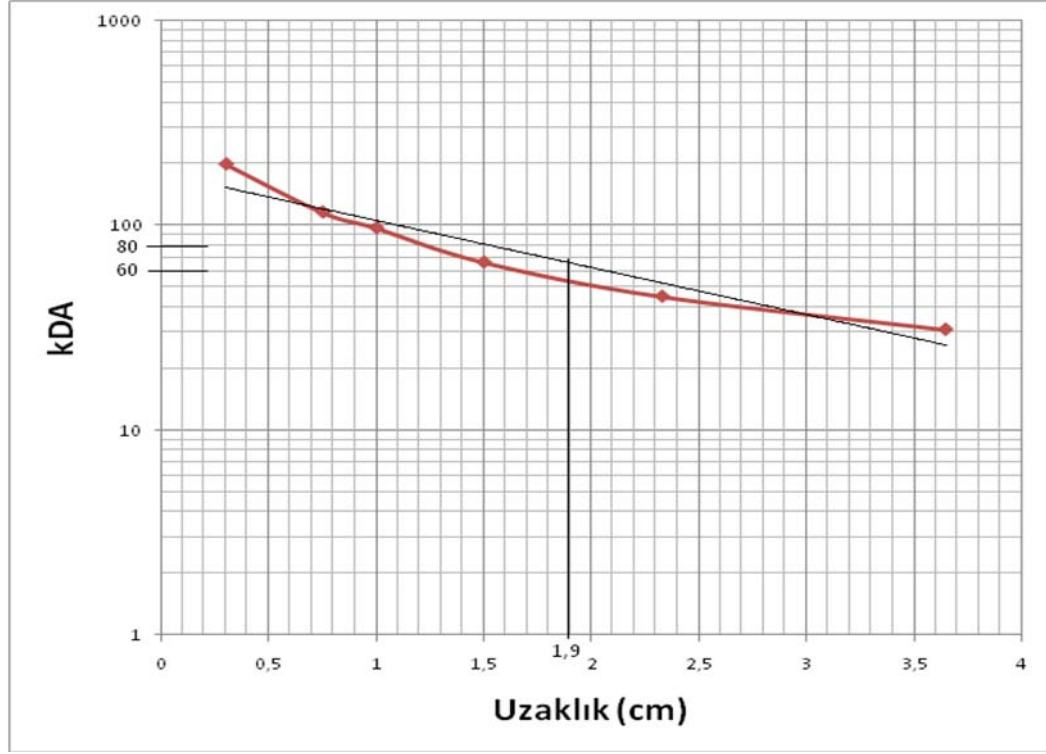


Şekil 3.18. Rekombinant Protein Üretiminden İzole Edilen Toplam Proteinler: (M) BioRad Standarts Broad Range Marker, (A-I) Farklı kolonilerden gelen toplam protein örnekleri.



Şekil 3.19. GST TtCat1p Rekombinant Füzyon Proteininin SDS-Page Sonucu II: (M) BioRad Standarts Broad Range Marker, (1-9) Farklı kolonilerden gelen saflaştırılmış protein örnekleri. 2 ve 3 kuyucuğunda daha belirgin olmak üzere yaklaşık 80 kDa civarında GST TtCat1p Rekombinant Füzyon Proteini olduğu düşünülen bantlar.

Yapılan ikinci SDS-PAGE analizi 68-70 kDa büyüklükte bir proteinin üretildiğini göstermektedir. Bu nedenle proteinin tam büyüklüğünün bulunması için grafik analizi yapılmıştır (Şekil 3.18.). göre yerleştirilen nokta mutasyonlarda hata olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3.20. SDS-PAGE jelinde pozitif olduğu düşünülen protein bandının büyüklük analizi:

Şekilde markör bantlarının yükleme noktasına olan uzaklığı ile markör bantlarının büyüklüğü arasında ilişkiyi gösteren grafik görülmektedir. Rekombinant katalaz+GST proteini ise 1,9 cm'de görülmektedir. Grafığe göre 68-70 kDa civarında bir büyüklüğe sahip olduğu görülmektedir.

Üretimi yapılan rekombinant proteinin (Katalaz+GST) büyüklük analizine göre proteinin yaklaşık olarak 68-70 kDa büyüklüğe sahip olarak üretildiği görülmektedir. Fakat rekombinant proteinin 80-82 kDa büyüklüğe sahip olması gerekmektedir. Bu durumda protein üretimi için yerleştirilen nokta mutasyonlardan son 2 tanesinde eksiklik olduğu düşünülmüştür. Eksikliğin var olup olmadığının kontrolü için mutasyonlara sahip katalaz cDNA'sını taşıyan plazmit DNA dizi analizine alınmıştır. Dizi analizi sonuçları şekil 3.20. ve 3.21'de verilmiştir.

TthCatSB210	CCCTACAGAGCCAGAGTATCCAACAAC ⁹ TAACGTGATGGTCCC-ATGTGCGTCAACGGTAA	1139
F6cat	-----AACAAACCAACGTGATGGTCCCCATGTGCGTCAACGGTAA	39
	***** ¹⁰ *****	
TthCatSB210	AAGAAAGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAAGATTGCTA	1435
F6cat	AAGAAAGACAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAAGATTGCTA	339

TthCatSB210	CCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAAGTGGTAGCGCTTCTTGG	780
R8cat	CCTGANTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTCAAGTGGTAGCGCTTCTTGG	66

TthCatSB210	ACC-TTAAACGCTAAAGTTATGCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTT	839
R8cat	ACCCTTAAACGCTCAAAGTTATGCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTT	126
	*** *****	
TthCatSB210	CGATGTTACCAAGGTCTGGCCCCATGGTACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGT	899
R8cat	CGATGTTACCAAGGTCTGGCCCCATGGTACTATCCTCTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGT	186

TthCatSB210	CTTAAACAGAAATCCTGAAAACCTACTTTGCTGAAAACGAAATAA ⁷ TCTGCTTCTCTCCTTC	959
R8cat	CTTAAACAGAAATCCTGAAAACCTACTTTGCTGAAAACGAAATAA ⁷ TCTGCTTCTCTCCTTC	246

TthCatSB210	CCACTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAAGTTCGCTCTTCTC	1019
R8cat	CCACTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAAGTTCGCTCTTCTC	306

TthCatSB210	TTATCCCGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAACTACGATCAAAT ⁸ CCCGTTAACTG	1079
R8cat	C-----CTC-----	310

TthCatSB210	CCCTACAGAGCCAGAGTATCCAACAAC ⁹ TAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAA	1139
R8cat	-----CCAGAGTATCCAACAAC ⁹ TAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAA	359

TthCatSB210	TCAAGGATCTAGAGTCAACTACG-AACCTACCCTTTCCACAACCTACAAGGTTAGACCCG	1198
R8cat	TCAAGGATCTAGAGTCAACTACGGAACCTACCCTTTCCACAACCTACAAGGTTAGACTCG	419

TthCatSB210	AAACCAAGCTCTTACCCAAAGAGTCACTGGTTTAGTTGGTCGTTTCAAACCCGCTCACC	1258
R8cat	AAACCAAGCTCTTACCCAAAGAGTCACTGGTTTAGTTGGTCGTTTCAAACCCGCTCACC	479

TthCatSB210	CCAACGATGACTTCTCTCAACCCGGTGTCTTGTCCGTAAGGTCATGTGAGATAAGGATA	1318
R8cat	CCAGCGATGACTTCTCTCAA-----	499
	*** *****	

Şekil 3.21. Dizi analizi sonuçları: 5-9 arası mutasyonların cDNA üzerine yerleştirildiği görülmektedir.

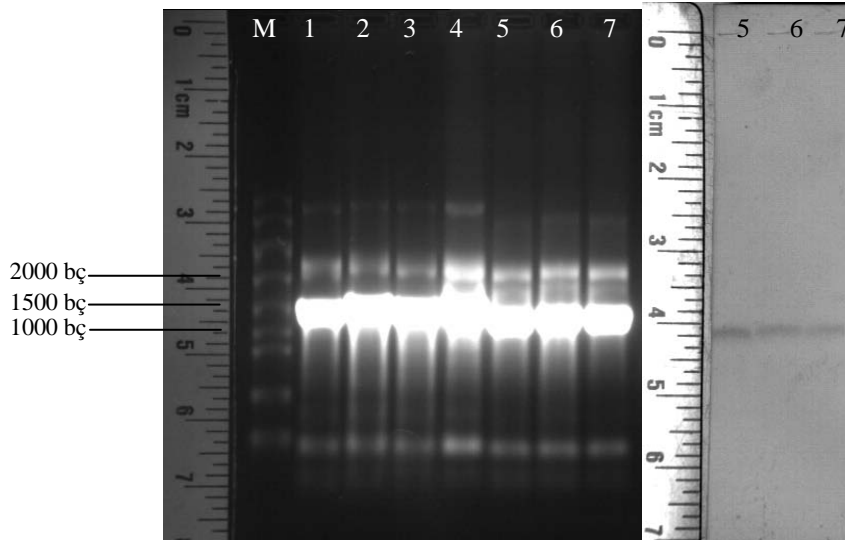
Dizi analizi sonuçlarına göre eksik olduğu düşünülen son iki mutasyonun (9'uncu ve 10'uncu mutasyonlar) ve ondan önce gelen dört mutasyonun da katalaz cDNA'sı üzerine yerleştirildiği görülmüştür. Farklı iki dizi analizi sonucuna göre 9'uncu mutasyonun iki farklı primer ile doğru yerde oldu kontrol edilerek gösterilmiştir. Buna göre üretilen rekombinant proteinde eksiklik olmadığı, üretilen parçanın ise kırılmalara bağlı olarak kısa görünebileceği düşünülmektedir.

3.9. Northern Blot Analizi

Northern Blot analizi katalaz mRNA'sının farklı stres şartları altında mRNA varlığının gösterilmesi ve transkribe edilen kopya sayısının bulunması amacıyla yapılmıştır. Deneyde 30 °C'de büyütülüp 37 °C'ye alınarak strese alınan hücrelerde zamana bağlı olarak katalaz mRNA'sının varlığına bakılmıştır. İkinci deneyde ise oda sıcaklığı, 30 °C'de büyütülen hücrelerde ve açlık stresine alınan hücrelerde katalaz mRNA varlığına bakılmıştır.

İlk deneye göre 30 °C'de büyütülmüş hücreler 37 °C'ye alınmıştır. Alınmadan önce, 15 ve 30'uncu dakikalarda hücre örnekleri alınarak bunlardan toplan RNA izolasyonu yapılmış ve deneyde kullanılmıştır. Şekil 3.22.'de 1-7 kuyucuklarına toplam RNA örnekleri yüklenmiş ve 5-7 kuyucukları katalaz probu ile blotlanmıştır.

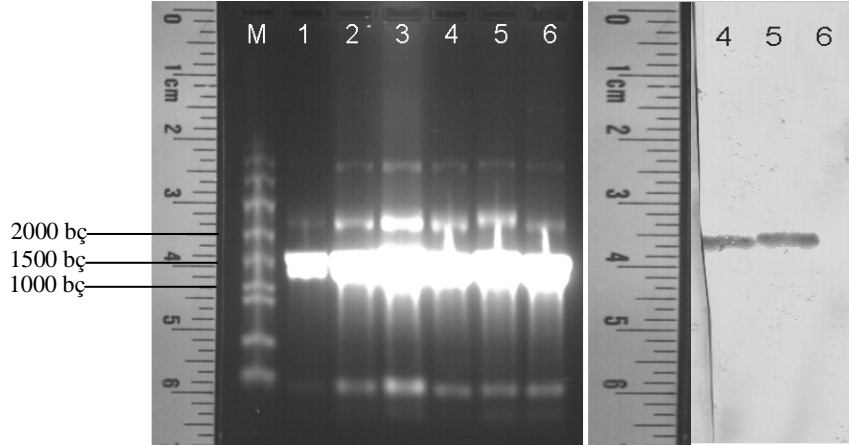
İlk analiz sonuçlarına göre katalazın sıcaklık artış streslerinde sıcaklık artışı öncesi (0 zamanı – 5'inci kuyucuk), ve sonrasında (6'ncı ve 7'nci kuyucuklar) mRNA'sının üretildiği gösterilmiştir.



Şekil 3.22. Katalaz geni Northern Blot analizi: Analizde 30 °C'de büyütülen hücreler 37 °C'ye alınmış ve 15'inci ila 30'uncu dakikalardan hücreler alınarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. 5-7 kuyucuklarına sırasıyla 0'ıncı dakika, 15'inci dakika ve 30'uncu dakika örneklerinden elde edilen RNA'lardan 5 µg yüklenmiştir.

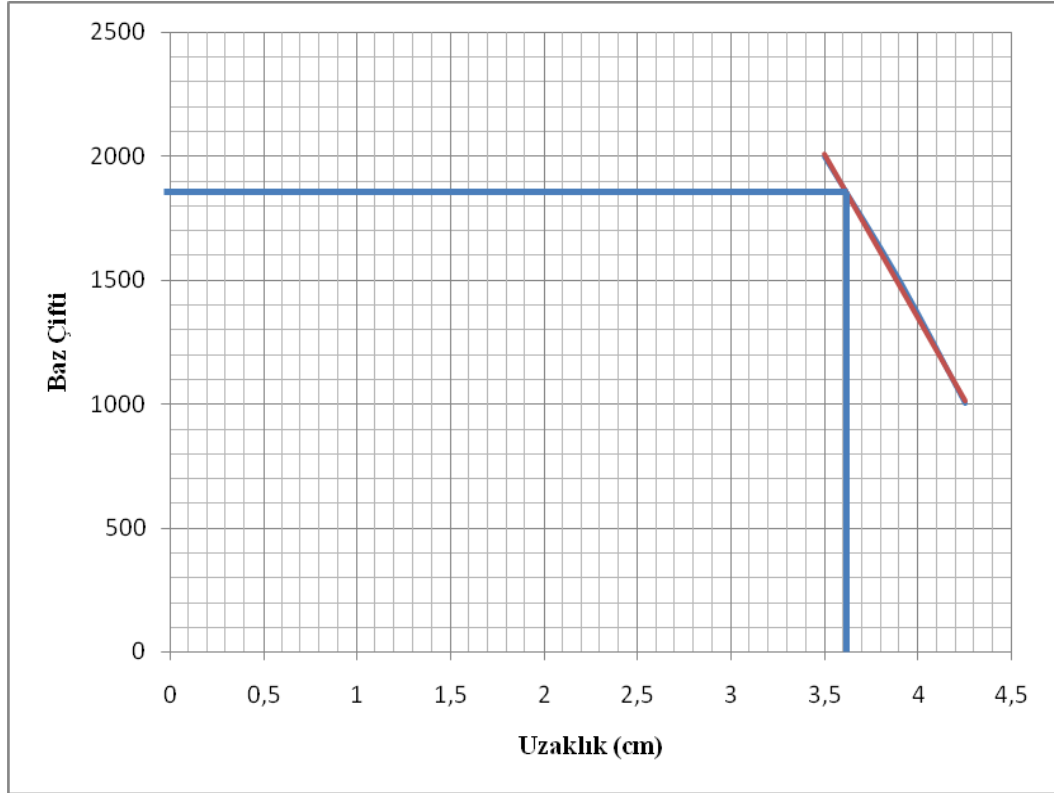
İkinci analizde ise katalaz mRNA'sının 30 °C ve oda sıcaklığında büyütülen hücrelerdeki varlığına bakılmıştır. Ayrıca gece boyu açlığa alınan hücrelerdeki katalaz mRNA varlığını da aynı deneyde analiz edilmiştir.

Şekil 3.23.'de katalaz mRNA'sı 30 °C ve oda sıcaklığında mevcutken açlık stresine alınan hücrelerde katalaz mRNA'sına rastlanmıştır.



Şekil 3.23. Katalaz geni Northern Blot analizi II: Analizde 4'üncü kuyuda oda sıcaklığı, 5'inci kuyuda ve 6'ncı kuyuda ise açlığa alınmış hücrelerden gelen RNA'lar bulunmaktadır.

Northern blot analizine göre katalaz mRNA'sının sıcaklığa bağlı stresler ve farklı sıcaklıklar altında transkribe edildiği gösterilmiştir. Katalaz mRNA'sına sadece açlığa alınmış hücrelerde rastlanmamıştır.

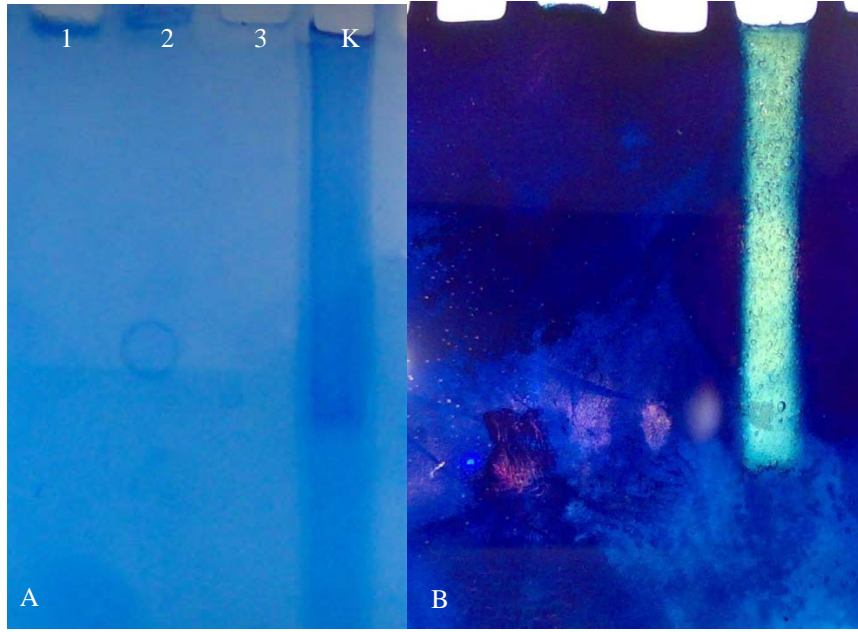


Şekil 3.24. Northern Blot katalaz mRNA büyüklük grafiği: Grafik analizine göre katalaz mRNA'sı yaklaşık olarak 1800-1850 bç büyüklükte olduğu görülmüştür.

Katalaz mRNA büyüklüğü 3' ve 5' bölgelerdeki baz sayıları ile birlikte yaklaşık olarak 1700-1800 baz çifti büyüklüğe sahip olması gerekmektedir. Burada poli A kuyruğunun uzunluğu yaklaşık olarak 200 bç olarak alınmıştır [57, 94].

3.10. DOĞAL-PAGE Jeli İle Aktivite Analizi

Üretilen rekombinant TtCat1p proteininin aktivite gösterip göstermediğinin analizi için DOĞAL-PAGE jeli üzerinde aktivite deneyleri yapılmıştır. Buna göre saflaştırılan rekombinant protein jelde yürütülerek hidrojen peroksit ile muamelesi sonucu aktivite gösterip göstermediğine bakılır. Deneyde pozitif kontrol olarak katalaz aktivitesine sahip ve jelde renk değişimi gösteren mikroorganizma kaynaklı katalaz kullanılmıştır.



Şekil 3.25. Rekombinant TtCat1p enziminin aktivite analizi: (A) 1-3'üncü kuyucuklar saflaştırılmış rekombinant GST-TtCat1p proteini K ise kontrol katalazıdır (Fluka, 60633). (B) A jelinin aktivite fotoğrafı.

Aktivite deneyinde kontrol haricinde deney grubunda (1-3) hiçbir renklenme ve ya renkte açılma gözlenmemiştir. Bunun nedeni rekombinant proteinlerin saflaştırmasının başarılı olmamasıdır. A şeklinde 1-3 kuyucuklarına toplam proteinden saflaştırılan rekombinant katalaz enziminin yüklenmiştir. Fakat jelin komassie boyaması sonucu herhangi bir bant görülmemektedir. Bu nedenle rekombinant katalaz proteininin aktivitesi hakkında bir fikir edinilememiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tetrahymena thermophila çevre ile doğrudan ilişki içerisinde olan tek hücreli bir canlı olduğu için, hücrenin çevre ile etkileşimi anlamada ve genom projesi bittiği için çeşitli gen gruplarının araştırılmasında kullanılabilinecek önemli bir organizmadır [48, 49, 51, 52, 54]. Katalaz enzimi, hücre içi veya hücre dışı hidrojen peroksid bulunma stres şartlarında, hidrojen peroksidi parçalayarak organizmanın zarar görmesini engelleyen ana enzimlerden bir tanesidir [26, 27, 29, 30, 32]. Biyoteknolojik olarak birçok alanda kullanımı bulunan katalaz farklı organizmalardan ilave ortolog genlerinin [11, 13-15, 40, 44, 47] araştırılması, endüstriyel işlemlerde ihtiyaç duyulan daha uygun enzimlerin bulunması yardımcı olabilir. Bu hedef doğrultusunda, *Tetrahymena thermophila* katalaz geni klonlanarak rekombinant protein ifadesi ve mRNA analizleri yapılarak kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

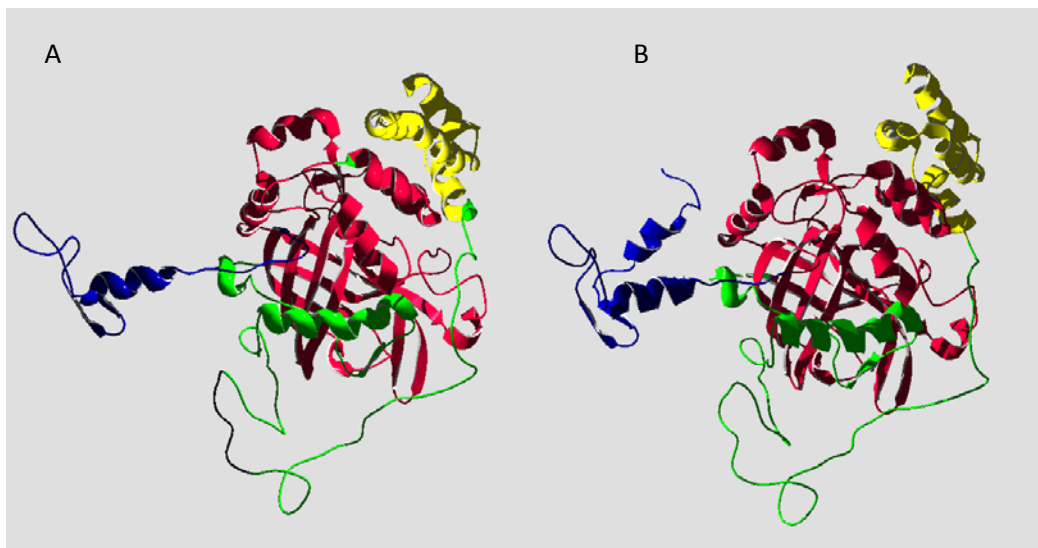
Biyoinformatik analizlere göre, *Tetrahymena thermophila* katalaz geninin gerçek katalazlarda bulunması gereken katalaz aktif bölge motifine ([IF]-x-[RH]-x(4)-[EQ]-R-x(2)-H-x(2)-[GAS]-[GASTFY]-[GAST]) ve hem bağlanma motifine (R-[LIVMFSTAN]-F-[GASTNP]-Y-x-D-[AST]-[QEH]) sahip olduğu bulunmuştur [17, 26]. Bunun dışında hücre içerisinde peroksizomlara lokalizasyon için gerekli olan (STAGCN) - (RKN) - (LIVMAFY) [89] motifine de sahip olduğu görülmektedir. Motif analizinin dışında katalaz protein dizisinin diğer gerçek katalazlar ile dikey hizalanması sonucunda bu korunmuş dizilerin diğer katalazlarda da yaklaşık aynı bölgeler üzerinde olduğu görülmektedir (Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.) bu bulgulardan hareketle TtCat1p proteininin Gerçek Katalazlar alt ailesinin bir üyesi olduğu bu tez çalışmasıyla önerilmiştir. Protein motiflerine dayalı analiz sonrası katalaz proteinini olası üç boyutlu yapısı oluşturularak gerçek katalazlara benzerliği analiz edilmiştir (şekil 3.9.) [91, 92]. Buna göre *TthCat* sığır karaciğer katalazına benzemektedir. Şekil 4.1.'de *TthCat* ve sığır karaciğer katalazının üç boyutlu yapısı verilmiştir. Buna göre yapısal olarak fazla bir farklılık gözlenmemektedir. N' ucunda sığır karaciğre katalazında **bi**heliks fazlalığı görülmektedir. Bunun dışında proteininβ katlanma yapılarında (kırmızı) ve C' ucunda herhangi bir değişiklik bulunmamaktadır. Katalazların sahip olduğu

aktif bölge ve hem bağlanma bölgelerinin iki modelde de benzerliklerini yüksek oluşları ve eksik bölgelerin aktif bölgeye etki etmemesi *TthCat* proteininin gerçek katalazlar içerisinde olduğunu göstermektedir.

Katalaz geninin ırklar arasındaki benzerlik analizi ise 5' kısımlarının dikey hizası ile yapılmıştır. Analize göre 3 farklı suştan gelen dizi bilgileri ile suş bilgisi bulunmayan 3 farklı dizinin dikey hizalaması sonucu bu bölgenin suşlar arasında çok büyük bir farklılığa sahip olmadığını göstermiştir. Bu 6 farklı suşun katalaz geni 5' bölgelerinin birbirleri arasında korunduğu gözlenmesi katalazın alelik olarak veya suşlar arasında bir fark bulunmadığını önermektedir.

Katalaz geni 5' bölgesi üzerine yapılan analizden alınan sonuca göre SB210 veb1868 suşları arasında dizi benzerliklerinin yüksek yüzde ile korunmuş olması çalışma öncesinde B1868 suşuna ait bulguların SB210 içinde kullanılabilceğini önermektedir.

Katalaz geni kopya sayısı üzerine yapılan Biyoinformatik ve deneysel bulgular genin tek kopya olduğunu ve B1868 suşu için yapılan tek kopya önermesinin doğru olduğunu göstermektedir. bunu dışında yapılan Northern blot analizi sonuçlarında kullanılan katalaz probunun tek bant oluşturması da genin tek bir transkripti olduğunu dolayısıyla genomda tek bir kopya ile temsil edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. TtCat1p (A) ve Sığır Karaciğer Katalazı (B) 3 Boyutlu Yapısı:

TthCat genini rekombinant protein ifadesi için 10 farklı mutasyon oluşturulmuştur [73, 74]. Mutasyonların oluşturulmasında kullanılan primer tasarımları birleştirme reaksiyonlarının etkin çalışmamasına yol açmıştır. Diğer bir durumda da oluşturulan nokta mutasyonlar dizi analizi ile kontrol edildiklerinde mutasyonların yerleştirilemediği fakat mutasyon deneyinin tekrarlanıp sonuçların dizi analizi ile kontrol edildiklerinde yerleştikleri de görülmüştür.

Örtüşmenin başarısız olduğu durumlarda öncelikle ilk birleştirme reaksiyonu için oturma sıcaklığında gradiyent yapılmıştır. Örtüşme için 45-55 °C'ler arası tavsiye edilmektedir [73, 74, 95]. Bu deney sonucunda oturma sıcaklığı 49 °C olarak katalaz geni parçaları için optimal oturma sıcaklığı değeri olarak kullanılmıştır. Fakat diğer bir problem primer tasarımından kaynaklanmaktadır. Primerler tasarlanırken oluşturulan örtüşen bölgeler olması gereken en düşük değere çok yakındır. Bu nedenle spesifiklik çok düşük olacağından bu bölgelerin en az 18-20 baz çifti olması gerekmektedir [73, 74, 95]. Bu bölgeler uzatılarak parçaların belirli bir strateji kullanılmadan, bir tüp içerisinde hepsinin sırasıyla birleştirilmesini sağlayan yöntemler de mevcuttur [96, 97].

TthCat enziminin filogenetik analizi enzimin gerçek katalaz grubu içerisinde yer aldığını göstermektedir. Gerçek katalazlar içerisinde yapılan filogenetik ağaç analizine göre ise enzimin omurgalı gruplarına yakın olduğunu görülmektedir. Filogenetik ağaç sonuçlarına göre gerçek katalazların 3 alt grubu da ayırt edilmektedir. Buna göre *TthCat* 3'üncü alt grup içerisinde yer alan küçük alt üniteli katalazlar arasında yer almaktadır. Bu grupta sadece omurgalı grupları değil bakteriyel ve maya katalazları da yer almaktadır [28-30].

TthCat rekombinant proteini üretilerek SDS-Page ve Western Blot analizleri yapılmıştır. İlk yapılan deneyde proteinin kısa üretildiği gösterilmiştir. Bu durum nokta mutasyonlarda eksiklik olduğunu göstermektedir. Bir diğer durum ise protein kırılmasıdır. Burada üretilen protein GST ile füzyon oluşturduğu için 3 boyutlu yapısında stabilizasyon eksikliğinden kaynaklı kırılmalar olabilir. Bu nedenle protein kırık şekilde görülebilir. Fakat burada nokta

mutasyonlardan kaynaklı bir sorun olduğu düşünülmüş ve mutasyonlar baştan yapılmıştır. Protein analizi SDS-Page ile tekrarlanmıştır. Buna göre 68-70 kDa civarında GST-*TthCat* rekombinant protein bandı oluşmuştur.

İlk protein ifade deneyinde dayalı yapılan Western Blotta yüzeyin antikolar tarafından görülmemesini sağlamak için kullanılan süttozu yağ içerdiğinden hedef proteinlerin kullanılan antikolar tarafından görülmesi de engellenmiştir. Kullanılan süttozu içeriğinde yağ bulunduğu için süttozu bütün yüzeyi bloklayarak deteksiyonu engellemiştir. Bu nedenle yüzeyin bloklanmasında yağsız süttozu ve ya alternatif maddeler kullanılmalıdır.

TthCat mRNA ifadesi ve transkriptom sayısı Northern Blot deneyi ile analiz edilmiştir. Normalde sürekli ifade edilen bir gen olarak davranan katalaz [98, 99] *Tetrahymena thermophila*'nın açlık koşullarında mRNA üretmemiştir. Bu durum yüklenen mRNA'ların yetersiz ve ya kalitesinde düşük olduğunu gösterebilir, fakat RNA jeli fotoğraflarında herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Ayrıca yüklenen RNA miktarları da diğer stres şartları için aynıdır. Bu durum *Tetrahymena thermophila* açlık koşullarında bazal metabolizma seviyesine indiği ve sadece hayatsal enzimlerin üretildiği yaklaşımı ile de açıklanabilir [48, 100]. Açlık şartlarında sadece canlının hayatta kalması için gerekli enzimler sentezlenir. Bu nedenlerden dolayı katalaz geni mRNA'sının gözlenemediği düşünülmektedir.

TthCat rekombinant proteininin aktivite analizi jel tabanlı yapılmıştır. Deneyde kontrol katalazın aktivitesinin görülmesi deneyin kontrol boyutunda çalıştığını göstermiş fakat deney boyutunda çalışmamıştır. İzole edilen proteinler jelde boyanarak bakıldıklarında izolasyonun başarısız olduğu görülmüştür. Bu nedenle aktivite hakkında net bir fikir bulunmamaktadır.

Sonuç olarak *Tetrahymena thermophila* SB210 suşuna ait katalaz geninin gerçek katalazlar içerisinde yer aldığı, genomda tek kopya olarak temsil edildiği, okuma çerçevesinin 1473 baz çifti olduğu gösterilmiştir. Enzim rekombinant olarak üretimi yapılmıştır fakat aktivitesi gösterilmemiştir. Enzimin farklı şartlar altında mRNA'sının üretildiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Strickland, D., *Guide to Biotechnology*. 2007, Biotechnology Industry Organization. 136.
- [2] Schmid, R.D., *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*. 1. 2003, Darmstadt, Wiley-VCH. 2-3.
- [3] Diversity, C.o.B. *Convention on Biological Diversity* 2009 [Nisan 2009], <http://www.cbd.int/convention/articles.shtml?a=cbd-02>.
- [4] Diversity, S.o.t.C.o.B., *Catagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes*. 2000, Convention on Biological Diversity, Montreal.
- [5] Dasilva, E.J., *The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind*. Electronic Journal of Biotechnology, 2005. 7(3).
- [6] Sijbesma, F. ve H. Schepens, *White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future*. 2003, Lyon EuropaBio
- [7] Soetaert, W. ve E. Vandamme, *The Impact of Industrial Biotechnology*. Biotechnology Journal, 2006. 1(7-8), p. 756-769.
- [8] Frazetto, G., *White Biotechnology*. Science & Society. Vol. 4. 2003, EMBO. 3.
- [9] Sijbesma, F., *Industrial (White) Biotechnology - An Effective Route to Increase EU Innovation and Sustainable Growth*. 2004, DSM.
- [10] Lorenz, P. ve H. Zinke, *White biotechnology: Differences in US and EU approaches?* Trends in Biotechnology, 2005. 23(12), p. 570-574.
- [11] Aehle, W., *Enzymes in Industry - Production and Applications*. 3 ed. 2007, Wiley.
- [12] Kirk, O., T.V. Borchert, ve C.C. Fuglsang, *Industrial Enzyme Applications*. Current Opininion in Biotechnology, 2002. 13, p. 345-351.
- [13] Christensen, B.E., N.K. Lange, ve K. Daimon, *Catalase Its Production and Use*, N. Nordisk, Editor. 1992, Danimarka.
- [14] Giefer, G., *Method for Disinfecting Contact Lenses*. 1982, Almanya.
- [15] Cook, J.N. ve J.L. Worsley, *Composition and Method for Destroying Hydrogen Peroxide on Contact Lens*, A. Inc., Editor. 1994, ABD.

- [16] Loew, O., *A New Enzyme of General Occurrence in Organisms*. Science, 1900. **11**(279), p. 701-702.
- [17] Zamocky, M. ve F. Koller, *Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis*. Progres in Biophysics & Molecular Biology, 1999. **72**, p. 19-66.
- [18] Chance, B., *The Primary and Secondary Compounds of Catalase and Methyl or Ethyl Hydrogen Peroxide. II. Kinetics and Activity*. J. Biol. Chem., 1949. **179**(3), p. 1341-1369.
- [19] Chance, B., *The Primary and Secondary Compounds of Catalase and Methyl or Ethyl Hydrogen Peroxide. I. Spectra*. J. Biol. Chem., 1949. **179**(3), p. 1331-1339.
- [20] Chance, B., *The Primary and Secondary Compounds of Catalase and Methyl or Ethyl Hydrogen Peroxide. IV. Reactions with Hydrogen Peroxide*. J. Biol. Chem., 1949. **180**(3), p. 947-959.
- [21] Chance, B., *The Primary and Secondary Compounds of Catalase and Methyl or Ethyl Hydrogen Peroxide. III. Reactions in Concentrated Alkyl Hydrogen Peroxide Solutions*. J. Biol. Chem., 1949. **180**(2), p. 865-873.
- [22] Chance, B. ve N. Oshino, *Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction*. Biochem. J., 1971. **122**(2), p. 225-233.
- [23] Chance, B., *On the Evidence for a Ternary Complex of Catalase Hydrogen Peroxide with Alcohols*. J. Biol. Chem., 1950. **182**(2), p. 643-648.
- [24] Passardi, F., ve ark., *PeroxiBase: The peroxidase database*. Phytochemistry, 2007. **68**(12), p. 1605-1611.
- [25] Berman, H.M., ve ark., *The Protein Data Bank*. Nucl. Acids Res., 2000. **28**(1), p. 235-242.
- [26] Zamocky, M., P.G. Furtmüller, ve C. Obinger, *Evolution of Catalases from Bacteria to Humans*. Antioxidants & Redox Signaling, 2008. **10**(9), p. 1527-1548.
- [27] Switala, J. ve P.C. Loewen, *Diversity of Properties Among Catalases*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002. **401**(2), p. 145-154.

- [28] Mate, M.J., ve ark., *Heme-catalases*, in *Handbook of Metalloproteins*, A. Messerschmidt, et al., Editors. 2001, John Wiley and Sons.
- [29] Nicholls, P., I. Fita, ve P.C. Loewen, *Enzymology and Structure of Catalases*. *Advances in Inorganic Chemistry*, 2000. **51**, p. 51-106.
- [30] P.Chelikani, I. Fita, ve P.C. Loewen, *Diversity of Structure and Properties Among Catalases*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004. **61**(2), p. 192-208.
- [31] Thomas, J.A., D.R. Morris, ve L.P. Hager, *Chloroperoxidase. VII. Classical Peroxidatic Catalytic and Halogenating forms of the Enzyme*. *J. Biol. Chem.*, 1970. **245**(12), p. 3129-3134.
- [32] Loewen, P.C., M.G. Klotz, ve D.J. Hassett, *Catalase - an Old Enzyme that continues to surprise us*, in *American society for Microbiology News*. 2000. p. 76-82.
- [33] Kirkman, H., S. Galiano, ve G. Gaetani, *The function of catalase-bound NADPH*. *J. Biol. Chem.*, 1987. **262**(2), p. 660-666.
- [34] Finn, R.D., ve ark., *The Pfam protein families database*. *Nucl. Acids Res.*, 2008. **36**(suppl_1), p. D281-288.
- [35] Hillar, A., ve ark., *NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and Escherichia coli enzymes*. *Journal of Biochemistry*, 1994. **300**(2), p. 531539.
- [36] Singh, R., ve ark., *Comparative Study of Catalase-Peroxidases (KatGs)*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008. **471**, p. 207-214.
- [37] Passardi, F., ve ark., *Phylogenetic Distribution of Catalase-Peroxidases: Are there patches of order in chaos?* *Gene*, 2007. **397**, p. 101-113.
- [38] Barynin, V.V., ve ark., *Crystal Structure of Manganese Catalase from Lactobacillus plantarum*. *Structure*, 2001. **9**(8), p. 725-738.
- [39] Auterinen, A.-L., *White Biotechnology & Modern Textile Processing*, in *TextileWord.com*. 2006. p. 40-44.
- [40] Cavaco-Paulo, A., ve ark., *Textile Processing with enzymes*. 1 ed, A. Cavaco-Paulo ve G.M. Gübitz. 2003, Cambridge: Woodhead 228.
- [41] Kumar, G.V.N.S., *Scope of Biotechnology in Textiles*. *Journal of Textile Association*, 2007. **March/April 2007**, p. 263-266.

- [42] Costa, S.A., ve ark., *Immobilization of catalases from Bacillus SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents*. Enzyme and Microbial Technology, 2001. **28**(9-10), p. 815-819.
- [43] Polaina, J. ve A.P. MacCabe, *Industrial Enzymes Structure Function and Applications*. 2007, Springer.
- [44] Phillips, T. *Enzymes Used in the Dairy Industry*. 2009 20 Nisan 2009 <http://biotech.about.com/od/casestudies/a/dairyenzymes.htm>.
- [45] Sezgintürk, M.K., T. Göktug, ve E. Dinçkaya, *A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **21**(4), p. 684-688.
- [46] Varma, S. ve B. Mattiasson, *Amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide using catalase modified electrodes in polyacrylamide*. Journal of Biotechnology, 2005. **119**(2), p. 172-180.
- [47] Ballagh, R.H. ve J.B. Jones, *Method of Treating Tumour Cells Using Catalase*. 1998, Kanada.
- [48] Asai, D.J. ve J.D. Forney, *Tetrahymena thermophila*. Methods in Cell Biology, ed. L. Wilson and P. Matsudaira. Vol. 62. 2000, Academic Press.
- [49] Collins, K. ve M.A. Gorovsky, *Tetrahymena thermophila*. Current Biology, 2005. **15**(9), p. R317-R318.
- [50] Orias, E., *Sequencing the Tetrahymena thermophila Genome - A White Paper*. 2002, The Whitehead Institute Center for Genome Research.
- [51] Coyne, R. ve E. Orias, *Tetrahymena Comparative Genomics Sequencing Project-A Revised White Paper Submitted to the NHGRI*. 2007, Comparative Genome Evolution Working Group.
- [52] Stover, N.A., ve ark., *Tetrahymena Genome Database (TGD): a new genomic resource for Tetrahymena thermophila research*. Nucl. Acids Res., 2006. **34**(suppl_1), p. D500-503.
- [53] Eisen, J.A., ve ark., *Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate Tetrahymena thermophila, a Model Eukaryote*. PLoS Biology, 2006. **4**(9), p. e286.

- [54] Turkewitz, A.P., E. Orias, ve G. Kapler, *Functional genomics: the coming of age for Tetrahymena thermophila*. Trends in Genetics, 2002. **18**(1), p. 35-40.
- [55] Weide, T., ve ark., *Secretion of functional human enzymes by Tetrahymena thermophila*. BMC Biotechnology, 2006. **6**(1), p. 19.
- [56] Chou, S.C., ve ark., *Biochemical characterization of Tetrahymena pyriformis catalase*. International Journal of Biochemistry, 1971. **2**(12), p. 705-710.
- [57] Arslanyolu, M., *Molecular Cloning and Partial Characterization of Tetrahymena thermophila Catalase gene*. 2004.
- [58] Stratagene. *XLI-Blue Competent Cells*. 2009 [Nisan 2009] <http://www.stratagene.com/manuals/200249.pdf>.
- [59] Promega. *BL21(DE3)pLysS Competent Cells*. 2009 [Nisan 2009] http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_1005.
- [60] Promega. *Technical Manual - pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. 2009 [Mayıs 2009] <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>.
- [61] Promega. *Abstract for pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. 2009 [Nisan 2009] <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>.
- [62] AddGene. *Vectorpedia*. 2009 [cited 2009 Mayıs 2009]; Available from: <http://www.addgene.org/pgvec1>.
- [63] Biosciences, A., *GST Gene Fusion System*, Amersham Biosciences.
- [64] Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
- [65] Chomczynski, P. ve N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry, 1987. **162**(1), p. 156-159.
- [66] Qiagen. *Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol*. 2009 [Nisan 2009] <http://molecool.wustl.edu/>
- [67] Kobs, G., *Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM-T Vector systems*, in *Promega Notes Magazine* 1997, Promega. p. 15-19.

- [68] Sugino, A., ve ark., *Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends*. J. Biol. Chem., 1977. **252**(11), p. 3987-3994.
- [69] Guerry, P., D.J. LeBlanc, ve S. Falkow, *General Method for the Isolation of Plasmid Deoxyribonucleic Acid*. J. Bacteriol., 1973. **116**(2), p. 1064-1066.
- [70] Mertz, J.E. ve R.W. Davis, *Cleavage of DNA by R1 Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1972. **69**(11), p. 3370-3374.
- [71] Horowitz, S. ve M.A. Gorovsky, *An unusual genetic code in nuclear genes of Tetrahymena*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(8), p. 2452-2455.
- [72] Hemsley, A., ve ark., *A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction*. Nucl. Acids Res., 1989. **17**(16), p. 6545-6551.
- [73] Ho, S.N., ve ark., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 1989. **77**(1), p. 51-59.
- [74] Ge, L. ve P. Rudolph, *Simultaneous Introduction of Multiple Mutations Using Overlap Extension PCR*. BioTechniques, 1997. **22**(1), p. 28-30.
- [75] Arslanyolu, M., *Characterization of Putative Mutagen Activated Protein Kinase from Tetrahymena thermophila*, in *Biology*. 2001, Cleveland State, Cleveland. p. 100.
- [76] Frangioni, J.V. ve B.G. Neel, *Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins*. Analytical Biochemistry, 1993. **210**(1), p. 179-187.
- [77] Towbin, H., T. Staehelin, ve J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(9), p. 4350-4354.

- [78] Perisic, T., M. Sreckovic, ve G. Matic, *An imbalance in antioxidant enzymes and stress proteins in childhood asthma*. *Clinical Biochemistry*, 2007. **40**(15), p. 1168-1171.
- [79] Eisenthal, R. ve M.J. Danson, *Enzyme Assays*. Robert Eisenthal. 2002, Oxford University Press. 282.
- [80] BioRad, *Mini Protean Tetra Cell* 2009.
- [81] Allen, S.L., ve ark., *Proposed Genetic Nomenclature Rules for Tetrahymena thermophila, Paramecium primaurelia and Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, 1998. **149**(1), p. 459-462.
- [82] Castresana, J., *Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis*. *Mol Biol Evol*, 2000. **17**(4), p. 540-552.
- [83] Talavera, G. ve J. Castresana, *Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments*. *Syst Biol*, 2007. **56**(4) p. 564-577.
- [84] Kumar, S., ve ark., *MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences*. *Brief Bioinform*, 2008. **9**(4), p. 299-306.
- [85] Tamura, K., ve ark., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. *Mol Biol Evol*, 2007. **24**(8), p. 1596-1599.
- [86] Saitou, N. ve M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol Biol Evol*, 1987. **4**(4), p. 406-425.
- [87] Expasy. *Database of protein domains, families and functional sites*. 2009, <http://www.expasy.ch/prosite/>.
- [88] Bai, J. ve A.I. Cederbaum, *Mitochondrial Catalase and Oxidative Injury*. *Biological Signals and Receptors*, 2001. **10**, p. 189-199.
- [89] Neuberger, G., ve ark., *Prediction of Peroxisomal Targeting Signal 1 Containing Proteins from Amino Acid Sequence*. *Journal of Molecular Biology*, 2003. **328**(3), p. 581-592.
- [90] Arnold, K., ve ark., *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(2), p. 195-201.

- [91] Kopp, J. ve T. Schwede, *The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models*. Nucl. Acids Res., 2004. **32**(suppl_1), p. D230-234.
- [92] Schwede, T., ve ark., *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server*. Nucl. Acids Res., 2003. **31**(13), p. 3381-3385.
- [93] Öziç, C., *Tetrahymena thermophila Glutasyon-S-Transferaz Zeta Geninin Klonlanması Biyoinformatik ve Deneysel Karakterizasyonu, Biyoteknoloji*. 2008, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir. p. 129.
- [94] Liu, X. ve M.A. Gorovsky, *Mapping the 5' and 3' ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE)*. Nucl. Acids Res., 1993. **21**(21), p. 4954-4960.
- [95] *Protocol Online*. 2009; www.protocol-online.com.
- [96] Hiraga, K. ve F.H. Arnold, *General Method for Sequence-independent Site-directed Chimeragenesis*. Journal of Molecular Biology, 2003. **330**(2), p. 287-296.
- [97] Volkov, A.A., ve ark., *Methods for in vitro DNA recombination and random chimeragenesis*, in *Methods in Enzymology*. 2000, Academic Press. p. 447-456.
- [98] Luo, D. ve T.A. Rando, *The regulation of catalase gene expression in mouse muscle cells is dependent on the CCAAT-binding factor NF-Y*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **303**(2), p. 609-618.
- [99] Thomas, L.D., ve ark., *Catalase immunization from Pseudomonas aeruginosa enhances bacterial clearance in the rat lung*. Vaccine, 2000. **19**(2-3), p. 348-357.
- [100] Csaba, G., P. Kovács, ve É. Pállinger, *Increased hormone levels in Tetrahymena after long-lasting starvation*. Cell Biology International, 2007. **31**(9), p. 924-928.

Ek-1 Dizi Analizinde Kullanılacak DNA Miktarının Belirlenmesi İçin Gerekli Tablo

Büyüklik(kb)	25 fmol'e denk gelen değer (ng)	50 fmol'e denk gelen değer (ng)	100 fmol'e denk gelen değer (ng)
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	100	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390
8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.0	790	1500	1500

Ek-2 *Tetrahymena thermophila* B1868 ve SB210 Katalaz Dizilerinin Dikey Hizalanması

B1868	ATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGAC	60
SB210	ATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGAC	60

B1868	AACCAAAATTCCTGCTCACTGCAGTGAATACGGTCCCGTCTTATATAAGACTCCATCTT	120
SB210	AACCAAAATTCCTGCTCACTGCAGTGAATACGGTCCCGTCTTATATAAGACTCCATCTT	120

B1868	ATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCCACGCCAAA	180
SB210	ATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCCACGCCAAA	180

B1868	GGTGTGGTGTCTTGGGGTTACTTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCC	240
SB210	GGTGTGGTGTCTTGGGGTTACTTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCC	240

B1868	AAGGTCTTCGAAACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAGATTCTTACCGTTGGT	300
SB210	AAGGTCTTCGAAACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAGATTCTTACCGTTGGT	300

B1868	GGTGAAGGGTCTGCTGATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTCTTAC	360
SB210	GGTGAAGGGTCTGCTGATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTCTTAC	360

B1868	ACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGAC	420
SB210	ACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGAC	420

B1868	CCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAAAGAGAAACCCTCAAACCACTCAAG	480
SB210	CCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAAAGAGAAACCCTCAAACCACTCAAG	480

B1868	TGCGCTAACATGTTCTGGGACTTCTTT-----GGTTCTGAATCTGCTCACTAGGTTACC	534
SB210	TGCGCTAACATGTTCTGGGACTTCTTT-----GGTTCTGAATCTGCTCACTAGGTTACC	540

B1868	ATTTTGTCTCTGACAGAGGTTACCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTTACTCTTCT	594
SB210	ATTTTGTCTCTGACAGAGGTTACCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTTACTCTTCT	600

B1868	CACACCTCAAGTGGGTTAATGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAG	654
SB210	CACACCTCAAGTGGGTTAATGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAG	660

B1868	ACTGACTCTGGTATTAAGAACTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAAC	714
SB210	ACTGACTCTGGTATTAAGAACTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAAC	720

B1868	CCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGG	774
SB210	CCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGG	780

B1868	ACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCATTAAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTC	834
SB210	ACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCATTAAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTC	840

B1868	GATGTTACCAAGGTCTGGCCCATGGTACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGTC	894
SB210	GATGTTACCAAGGTCTGGCCCATGGTACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCGTC	900

B1868	TTAAACAGAAATCCTGAAACTACTTTGCTGAAACTGAATAATCTGCTTCTCTCCTTCC	954
SB210	TTAAACAGAAATCCTGAAACTACTTTGCTGAAACTGAATAATCTGCTTCTCTCCTTCC	960

B1868	CACTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAGGTCGTCTCTTCTCT	1014
SB210	CACTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAGGTCGTCTCTTCTCT	1020

B1868	TATCCCGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAACTACGATCAAATCCCGTTAACTGC	1074
SB210	TATCCCGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAACTACGATCAAATCCCGTTAACTGC	1080

B1868	CCCTACAGAGCCAGAGTATCCAACAATAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAAT	1134
SB210	CCCTACAGAGCCAGAGTATCCAACAATAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAAT	1140

B1868	CAAGGATCTAAGTCAACTACGAACCTACCACCTTCCACAACCTACAAGGTTAGACCCGAA	1194
SB210	CAAGGATCTAAGTCAACTACGAACCTACCACCTTCCACAACCTACAAGGTTAGACCCGAA	1200

B1868	ACCAAGCTCTCTACCCAAACACTCACTGGTTTAGTTGGTTCGTTTCAAACCCGCTACCCC	1254
SB210	ACCAAGCTCTCTACCCAAAGAGTCACTGGTTTAGTTGGTTCGTTTCAAACCCGCTACCCC	1260

B1868	AACGATGACTTCTCTCAACCCGGTGTCTTGTCCGTAAGGTCATGTGAGATAAGGATAAA	1314
SB210	AACGATGACTTCTCTCAACCCGGTGTCTTGTCCGTAAGGTCATGTGAGATAAGGATAAA	1320

B1868	TCTAACACCGTAAGCAACATTGTTGGCCACATTAAGAATGCTAACAGAGATATCCAAGAA	1374
SB210	TCTAACACCGTAAGCAACATTGTTGGCCACATTAAGAATGCTAACAGAGATATCCAAGAA	1380

```
B1868      AGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAAGATTGCTACCGCT 1434
SB210      AGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCATGCTGAATACGGTTCAAAGATTGCTACCGCT 1440
           *****
B1868      CTCGGCTTCCCTGCTAACAGATCTAACCTCTGA 1467
SB210      CTCGGCTTCCCTGCTAACAGATCTAACCTCTGA 1473
           *****
```

Ek-3 Katalaz mRNA 5' bölge analizinde kullanılan diziler

>gi|146183613|ref|XM_001026590.2| Tetrahymena thermophila catalase family protein, mRNA

```
ATTATCAATTAATTAAGAAAAAAGTGAAGGAAAAGAAATGACTGACACAAAAGAATACATCAGTA
TTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGACAACCAAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGT
CCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAAGAATCCCT
GAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCTGGTGCTTGGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGACGTTACC
AAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAAACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAGATTCTCT
ACC GTTGGTGGTGAAGGGTTCTGCTGATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTTC
TACACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTCATTAGAGACCCC
ATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAAAGAGAAAACCCCAAAACCAACCTCAAGTGCCTAAC
ATGTTCTGGGACTTCCTTTCTAGGTTCTGAACTGCTCACTAGGTTACCATTTTGTCTCTGAC
AGAGGTAATCCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTTACTCTTCTCACACCTTCAAGTGGGTTAAT
GAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGAACTTCACT
GCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAACCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCAC
ATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCATTAACGATGGCTAC
AAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTTACCAAGGTCTGGCCCATGGTGACTATCCTTTGATCCCT
GTTGGTAAGCTCGTCTTAAACAGAAATCCTGAAAACACTACTTTGCTGAAAACCTGAATAATCTGCTTTC
TCTCCTTCCCCTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAGGTGCTCTCTTC
TCTTATCCCAGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAACTACGATCAAATTCCCGTTAACTGCCCC
TACAGAGCCAGAGTATCCAACAATAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAATCAAGGATCT
AGAGTCAACTACGAACCTACCACTTTCCACAATAACAAGGTTAGACCCGAAAACCAAGCTCTCTACC
CAAAGAGTCACTGGTTTAGTTGGTGGTTCCTTCAAACCCGCTCACCCCAACGATGACTTCTCTCAACCC
GGTGTCTTGTTCGGTAAGGTGATGTCAGATAAGGATAAAATCTAACACCGTAAGCAACATTTGTTGGC
CACATTAAGAATGCTAACAGAGATATCCAAGAAAAGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCAGATGCT
GAATACGGTTCAAAGATTGCTACCGCTCTCGGCTTCCCTGCTAACAGATCTAACCTCTGA
```

>gi|36309599|gb|AY378080.1| Tetrahymena thermophila putative catalase (CAT) mRNA, complete cds

```
GCAAATAATTATCAATTAATTAAGAAAAAAGTGAAGGAAAAGAAATGACTGACACAAAAGAATAC
ATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGACAACCAAAAATTCGGTCACTGCAGGTGA
ATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAAG
AATCCCTGAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCTGGTGCTTGGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGA
CGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAAACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAG
ATTCTCTACCGTTGGTGGTGAAGGGTTCTGCTGATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGT
CAAGTTCTACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTCATTAG
AGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAAAGAGAAAACCCCAAAACCAACCTCAAGTG
CGCTAACATGTTCTGGGACTTCTTTGGTCTGAACTGCTCACTAGGTTACCATTTTGTCTCTGA
CAGAGTACTCCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTTACTCTTCTCACACCTTCAAGTGGGTTAA
TGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAGCTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGAACTTCACT
TGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCTACCAACCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCA
CATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGGACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCATTAACGATGGCTA
CAAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTTACCAAGGTCTGGCCCATGGTGACTATCCTTTGATCCC
TGTTGGTAAGCTCGTCTTAAACAGAAATCCTGAAAACACTACTTTGCTGAAAACCTGAATAATCTGCTTT
CTCTCCTTCCCCTTAGTCCCTGGTATGGAACCTCTTTGGATAAGATGCTCTAAGGTGCTCTCTT
CTCTTATCCCAGATACCCACAGACACAGACTCGGTGCTAACTACGATCAAATTCCCGTTAACTGCCCC
CTACAGAGCCAGAGTATCCAACAATAACGTGATGGTCCCATGTGCGTCAACGGTAATCAAGGATC
TAAAGTCAACTACGAACCTACCACTTTCCACAATAACAAGGTTAGACCCGAAAACCAAGCTCTCTAC
CCAAACACTCACTGGTTTAGTTGGTGGTTCCTTCAAACCCGCTCACCCCAACGATGACTTCTCTCAACC
CGGTGCTTTGTTCCGTAAGGTGATGTCAGATAAGGATAAAATCTAACACCGTAAGCAACATTTGTTGG
CCACATTAAGAATGCTAACAGAGATATCCAAGAAAAGATAAGTCAGAATCTTCTACAAGTGCAGATGC
TGAATACGGTTCAAAGATTGCTACCGCTCTCGGCTTCCCTGCTAACAGATCTAACCTCTGATTACT
TTATAAAATATTCCAATCAAATAATTCATTATTATTAGTTAGTACTTCATAATATCTATGTACC
AGTAGTTAGTTTTTTTTATAAAATATGCTTCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```


>gi|18197770|gb|BM397717.1|BM397717 5009-0-36-A06.t.1
 Chilcoat/Turkewitz cDNA (large fraction) Tetrahymena thermophila
 cDNA, mRNA sequence

CAGACTGACCACGCGGGGCGGCCGCTCTAATAAATAATTATCAATTAATTAAGAAAAACTGAAGG
 AAAGAAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGAT
 GACAACCAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATT
 GATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCTGGT
 GCTTGGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAAACT
 GTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTGAAAAGGGTTCTGCTGAT
 ACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTTCTACACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTT
 GGTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAA
 AAGAGAAACCCTCAAACCAACCTCAAGTGCCTAATGTTCTGGGACTTCCCTTTCTAAGTTCCCT
 GAATCTGCTCACTAGGTTACCATTTTGTCTCTGACAGAGGTAATCCCGATGGTTACAGAAGAATG
 ACGGGTACTCTTTACACCTTCAGTGGGTTAATGATTACGTGAGCCTTCTGGTTAGTCAATTCAG
 AATGCCCTGGTTTAGAAGTTCCCTGCGCTAAGCGATCCTTAGTACACGCCGATAGTAGAGGCCTTTG
 CTTTGTATGGTTTCTCTCTTCTTCTTTTATCCATAGGGTACAAAAGAAATGAACAGAGCCGAGA
 TCACACGGAGCAGACAAACGAGAAGTCACCAGAGAGAGA

>gi|18198808|gb|BM398755.1|BM398755 5009-0-49-G10.t.1
 Chilcoat/Turkewitz cDNA (large fraction) Tetrahymena thermophila
 cDNA, mRNA sequence

ACAAGCGAGCTCACGCGGGGCGGCCCTAATAATATTATCATTATTAAAGAAAAACTGAAGGAAAG
 AAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGACA
 ACCAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATATGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTTATTGATA
 AGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCTGGTGCTT
 GGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAAACTGTTG
 GTAAGAGAACTCCAGTCTTCACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTGAAACAGGGTTCTGCTGATAC
 TGAACGTGATCCATCGTGGTTTCGCAGTCAAGTTCTACACTGAAGAAGGCAATTGGGATATGGTTG
 GTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACCCAAA
 AGAGAAAACCTCAAACCAACCTCAAGTGCCTAATGTTCTGGGACTTCCCTTTCTAGGTTCCCTG
 AATCTGATCACT

>gi|18200102|gb|BM400049.1|BM400049 5009-0-65-D09.t.1
 Chilcoat/Turkewitz cDNA (large fraction) Tetrahymena thermophila
 cDNA, mRNA sequence

TAGCCGGGGCGGACAGNTGAAAGCTGAGCTCACGCCGGGTTTCGCTCTAATAATAATTATCAATTA
 ATTATGAAAAACGAAGGAAAGAAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTA
 CTGGTTCTCCAGTTGATGACAACCAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCTTATTAT
 AAGACTTCCATCTTATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAGAGTCGTCC
 ACGCCAAAGGTGCTGGTGGTGGGGTTACTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAATG
 CCAATGTCTTCGAAACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTCACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTG
 AAAAGGGTTCTGCTGATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCCAGTTCTTACACTGAAAA
 AGGGCATTGGGGAAATGGGTGGGTAACAACATTCCGGTTTCTCCTTAAAAAACCCCATCAAATTC
 CCTGAACCTTCATTCACACCCAAAAGAAAAACCTCAAACCAACCTCAAGTGCCTAATGTTCTG
 GGACTTCCCTTTCTAGGTTCTGAATCTGCTCACTAGGTTACCATTTGGTACTCTGACAGAGGTAC
 TCCCGATGGTTACAGAAGAATGAACGGTTACTCTTCTCACACCTTCAAGTGGGTTAATGAATAAGG
 GGAAGCCTTCTGGGGTTAAGCTCCAATTCAAGAATGACTCTGGACATTAGAATCCCTGCTGGCGA
 AACGAAGCCAGAGATTACAAAACCGATAACCCACGAAAACCGTTCAAGAGCGAGGGAAAGGGTG
 AACGCACGTGGACCTAAAAAGCCAAAGTAGCCCAT

>gi|47040092|gb|CN588290.1|CN588290 TTE00008396 Normalized large
 Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

GACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTTGATGACAACCAAAA
 TTCCGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCTTATTA

>gi|47048298|gb|CN596494.1|CN596494 TTE00008160 Normalized large
Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

AGGAAAGAAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTT
GATGACAACCAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTT
ATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCT
GGTGCTTGGGGTACTTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAA
ACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTGAAGGGTTCTGCT
GATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTTCTACACTGAAGAAGGCAATTGGGATATG
GTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACC
CAAAGAGAAAACCTCAAACCAACCTCAAGTGCCTAACATGTTCTGGGACTTCCTTTCTAGGTT
CCTGAATCTGCTCACTAGGTTACCATTTTGTCTCTGACAGAGGTAATCCCGATGGTTACAGAAGA
ATGAACGGTTACTCTTCTCACACCTTCAAGTGGGTTAATGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAG
CTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGAAGTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCT
ACCAACCCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGG
ACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTT
AC

>gi|47050837|gb|CN599033.1|CN599033 TTE00007468 Normalized large
Tetrahymena thermophila cDNA, mRNA sequence

AGGAAAGAAGAAATGACTGACACAAAGAATACATCAGTATTGACAACCTCTACTGGTTCTCCAGTT
GATGACAACCAAAATTCGGTCACTGCAGGTGAATACGGTCCCGTCTTATTATAAGACTTCCATCTT
ATTGATAAGTTGGCTCACTTTGACAGAGAAAGAATCCCTGAAAAGAGTCGTCCACGCCAAAGGTGCT
GGTGCTTGGGGTACTTTCGAAGTTACCCATGACGTTACCAAGTTCTGCAAGGCCAAGGTCTTCGAA
ACTGTTGGTAAGAGAACTCCCGTCTTACCAGATTCTCTACCGTTGGTGGTGAAGGGTTCTGCT
GATACTGAACGTGATCCTCGTGGTTTCGCAGTCAAGTTCTACACTGAAGAAGGCAATTGGGATATG
GTTGGTAACAACACTCCCGTCTTCTTATTAGAGACCCCATCAAATTCCTGACTTCATTCACACC
CAAAGAGAAAACCTCAAACCAACCTCAAGTGCCTAACATGTTCTGGGACTTCCTTTCTAGGTT
CCTGAATCTGCTCACTAGGTTACCATTTTGTCTCTGACAGAGGTAATCCCGATGGTTACAGAAGA
ATGAACGGTTACTCTTCTCACACCTTCAAGTGGGTTAATGAATAAGGTGAAGCCTTCTGGGTTAAG
CTCCACTTCAAGACTGACTCTGGTATTAAGAAGTTCACTGCTGCTGAAGCTGATGCCCTTAAGTCT
ACCAACCCTGACTACGCTACTGAAGACCTCTTCAAGCACATTGCTTAAGGTGGTAGCGCTTCTTGG
ACCTTAAACGTCTAAGTTATGCCCATTAACGATGGCTACAAGTACAGATGGAACATTTTCGATGTT
ACCAAGGTCTGGCCCCATGGTACTATCCTTTGATCCCTGTTGGTAAGCTCG

Ek-4 Filogenetik Ağaç Analizinde Kullanılan diziler I

>6278|MavKat01|[Mycobacterium avium]|Actinobacteria| Catalase; complete.

MVLPHGRKGRKERQHMATDHTSDAPDPKQRDLESARFRRDTGYLTTQQGVRVDHTDDALTVGERGP
 TLLEDFHAREKITHFDHERIPERVVHARGAGAYGYFEPYDDRLAQYTAAKFLTSPGTRTPVVFVRS
 TVAGSRGSADTVRDVRFATKIFYTEQGNVDLVGMNFPVFFIQDGIKFPDFVHAVKPEPHNEIPQAQ
 SAHDTLWDFVSLQPETLHAIMWLMSTRALPRSRYRMMQGFVHTFRLVNRAGEGTFVKFHWKPRLGV
 HSLIWDECQKIAGKDPDYNRRDLWEAIESGQYPEWELGVQLVAEDDEFSDFDLLDATKIIPPEEQV
 PVLVPGKMLNRPNDNFFAETEQVAFHTANVVPGIDFTNDPLLQFRNFSYLDLTLRLGGPNFAQL
 PVNRPVQAQVRTNHDGYGQHAIPQGRSSYFKNSIGGGCPALADEVFRHYTQRVDGQTMKRRAEAF
 QNHYGQARMFFKSMSPVEAEHIVAFAFELGKVENPEIRSAVVAQLARVDDQLAAQVAAKLGLPEP
 PEEQVDESAPVSPALSQVTDGGDTIASRRIAVLAADGVVVGTRQRFTELMEQRGAVVEVLAPVAGG
 TLAGGSGGELRVDRSFTTMAVLYDAVVVACGPRSVSTLSDDGYAVHFVTEAYKHLKPIGAYGAGV
 DLLRKAGIGNRLAEDTDVLNDQAVVTTKAAADELPERFAEEFAAALAQHRCWQRRTDAVPA

>5321|EcoKate|[Escherichia coli]|Gammaproteobacteria| Catalase; complete.

MSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSLAPEDGSHRPAAEPTPPGAQPTAPGSLKAPDTRNEKLN
 SLEDVRKGSSENYALTTNQGVR IADDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREKITHFDHERIPERIVHARGS
 AAHGYFQPYKLSLSDITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVQGGAGSADTVRDIRGFATKIFYTEEGIFDL
 VGNNTPIFFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAIPOGQSAHDTFWDYVSLQPETLHNVWAMSDRGIPR
 SYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATFVRFHWKPLAGKASLVWDEAQKLTGRDPDFHRRRELWEAIEAGD
 FPEYELGFLIPEEDEFKFDLDDPTKLIPEELVVPVQVRVGMVLRNRPNDNFFAENEQAAPHGHI
 VPGLDFTNDPLLQGRFLSYTDTQISRLGGPNFHEIPINRPTCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYEP
 NSINDNWPRETTPGPKRGGFESYQERVEGNKVRERSPSFGEYYSHPRFLFWSLQTPFEQRHIVDGF
 FELSKVVRPYIRERVVDQLAHIDLTLAQAVAKNLGIELTDDQLNITPPPDVNGLKKDPSSLYLAIP
 DGDVKGRRVVAILLNDEVRSADLLAILKALKAKGVHAKLLYSRMGEVTADDGTVLPIAATFAGAPSL
 TVDAVIVPCGNIAADIADNGDANYYLMEAYKHLKP IALAGDARKFKATIKIADQGEEGIVEADSADG
 SFMDELLTLMAHRVWSRIPKIDKIPA

>5281|BtKat01|[Bos taurus]|Deuterostomia| Catalase; complete.

MADNRDPASDQMKHWKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDRPRGF
 AVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDALLFSPFIHSQKRNPTHLKDPDMVWDFWSLRPESLHQVSF
 LFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLAHEDPDYGIRD
 LFNAIATGNYPSTWLYIQVMTFSEAEIFPFNPFDLTKVWPHGDYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAEVE
 QLAFDPSNMPPGIEPSPDKMLQGRFLFAYPDTHRHRLLGPNYLQIPVNCYPYRARVANYQRDGPMMMD
 NQGGAPNYPNSFSAPEHQPSALEHRTHFSGDVQRFNSANDDNVTQVRTFYLVNNEEQRKRRCEN
 IAGHLKDAQLFIQKKAVKNFSDVHPEYGSRIQALLDKYNEEKPKNAVHTYVQHGSHLSAREKANL

>5282|HsKat01|[Homo sapiens]|Deuterostomia| Catalase; complete.

MADSRDPASDQMKHWKEQRAAQKADVLTGGAGNPVGDKLNVITVGPGRGPLLVQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDRPRGF
 AVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPIILFSPFIHSQKRNPTHLKDPDMVWDFWSLRPESLHQVSF
 LFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLSQEDPDYGIRD
 LFNAIATGKYPSTWLYIQVMTFNQAEITFPFNPFDLTKVWPHKDYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAEVE
 QIAFDPSNMPPGIEASPDKMLQGRFLFAYPDTHRHRLLGPNYLHPIVNCYPYRARVANYQRDGPMMMD
 NQGGAPNYPNSFSAPEHQPSALEHSIQYSGEVRRFNTANDDNVTQVRAFVNVNNEEQRKRRCEN
 IAGHLKDAQLFIQKKAVKNFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAEKPKNAIHTFVQSGSHLAAREKANL

>5264|PtetKat01|[Paramecium tetraurelia]|Ciliophora| Catalase; complete.

MSDNSDNVLTQSTGCPVDDNQNSLTAGEYGPILLQDTHLIDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAYGY
 FEVTGDTVTKYTKAKFLDTVGKRTPIFTRFSTVGGKEKGSADSERDPRGFVAVKIFYTEEGNYDMTGNNT

PVFFIRDPSKFPDFIHTQKRNPQTNLKDANMFWDFLSLVPESAHQVTILFSNRGTPNGYRHMNGYT
 SHTFRWVNKEGEAFWIKLHFKTDSGKNTFTGAEADELKRNTADYATQDLFEHLATGKTATWTVQVQ
 VMPEQDGFYKWNIFDVTKVWPHSDYPCLNFGKMLVLRNRPENYFQEVESAFSPGHLVPGIEPSLD
 KMLQGRFLSYPDTHRHLGTNYTQLPVNCPYRVRVINQQRDGPQSYNNQGNRPNYEPNSFQPLKMI
 PETKTSQYRVTGLIGRYKPSHPNDDFAQPGVLYRKVMNDFERQWLIITNIVGNLKNANRVIQERQVK
 VFTKCDPEYGEKIAQQLGFPNNKARL

>4097|TthKat01|[Tetrahymena thermophila]|Ciliophora|Catalase;
 complete.

MTDTKNTSVLTTSTGSPVDDNQNSVTAGEYGPVLLQDFHLIDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAWG
 YFEVTHDVTKFKAKVFETVGRKTPVFTFRFSTVGGGKGSADTERDPRGFVAVKFTYEEGNWDMVGN
 TPVFFIRDPIKFPDFIHTQKRNPQTNLKCANMFWDFFGSESAAHQVTILFSDRGTDPGYRRMNGYSS
 HTFKWVNEQGEAFWVWKLHFKTDSGIKNFTAEEADALKSTNPDYATEDLFXHIAQGGASWTLNVQV
 MPINDGYKYRWNIQDVTKVWPHGDYPLIPVGLVLRNRPENYFAETEQAFAFSPSHLVPGMEPSLDK
 MLQGRFLSYPDTHRHLGANYDQIPVNCYRVRVSNQDGPVNVGNQGSKNYEPFTFHNYKVR
 PETKLSQTTLTGLVGRFKPAHPNDDFSQPGALFRKVMKDKSNTVSNIVGHKKNANRDIQERQVR
 IFYKCDAEYGSKIATALGFPANRNL

>4578|MboCP01_AF2122/97|[Mycobacterium bovis]|Actinobacteria|
 Catalase peroxidase; complete.

MPEQHPPITETTTGAASNGCPVVGHMKYVVEGGNQDWWPNRLNLKVLHQNPVAVDPMGAADFYAA
 EVATIDVDALTRDIEEVMTTSQPWWPADYGHYGLPIRMAWHAAGTYRIHDGRGGAGGMQRFAPL
 NSWPDNASLKDARRLLWPVKKKYGKLSWADLIVFAGNCALESMGFKTFGFGFGRVDQWEPDEVYW
 GKEATWLGDERYSGRDLENPLAAVQMGLIYVNPEGPNPDPMAAAVDIRETFRRMAMNDVETAA
 LIVGGHTFGKTHGAGPADLVGPEPEAAPELQMGGLGWKSSYGTGTGKDAITSGIEVVTNTPTKWDN
 SFLEILYGYEWELTKSPAGAWQYTAKDAGAGTIPDPFGGPRSPMTLATDLSLRVDPYERITRR
 WLEHPEELADEFAKAWYKLIHRDMGPVARYLGLVLPKQTLWQDPVPAVSHDLVGEAEIASLKSQI
 LASGLTVSQLVSTAWAAAASSFRGSDKRGANGGRIRLQPVQVWVNDPDGDLRKYVIRTLEEIQESF
 NSAAPGNIKVSFADLVVLGGCAAIEKAAKAAGHNIIVPFTPGRTDASQEQTDVESFAVLEPKADGF
 RNYLGKGNPLPAEYMLLDKANLLTSLAPEMTVLVGGRLVGLGANYKRLPLGVFTEASESLTNDFFVN
 LLDMGITWEPSPADDGTYQKDGSGKVKWTGSRVDLVFGSNSSELRALVEVYGADDAQPKFVQDFVA
 AWDKVMNLDLRFVDR

>2717|EcoCP01_CFT073|[Escherichia coli]|Gammaproteobacteria|
 Catalase peroxidase; complete.

MYRNGNTVEGSTLMSTSDDIHNTTATGKCPFHQGGHDQSAGGGTTTRDWPNQLRVLDLLNQHSNRS
 NPLGEDFDYRKEFSKLDYYGLKDLKALLTESQPWWPADWGSYAGLPIRMAWHGAGTYRSIDGRGG
 AGRGQQRFAPLNSWPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGQKISWADLILAGNVALENSGFRTFGFGAGR
 EDVWEPDLVNWGDEKAWLTHRHPALAKAPLGATEMGLIYVNPEGPDHSGEPLSAAAAIRATFGN
 MGMNDEETVALIAGGHTLGKTHGAGPTSNVGPDPPEAAPIEEQGLGWASTYGSVGVGADAITSGLEV
 WTQTPTQWSNYFFENLFKYEWVQTRSPAGAIQFEAVDAPEIIPDPFDPKSKRKPMTLVTDLTLRFD
 PEFEKISRRFLNDPQAFNEAFARAWFKLTHRDMGPKSRYIGPEVPKEDLIWQDPLPQPIYNPTEQD
 IIDLKFAIADSGLSVSELVSAWASASTFRGGDKRGANGARLALMPQRDWDVNAAAVRALPVLEK
 IQKESGKASLADIIVLAGVVGVEKAASAAGLSIHVPFAPGRVDARQDQTDIEMFELLEPIADGFRN
 YRARLDVSTTESLLIDKAQQLTLTAPEMTALVGGMRVLGANFDGSKNGVFTDRVGVLSNDFVNL
 DMRYEWKATDESKELFEGRDRETGEVKYATASRADLVFGSNSVLRVAEYVYASSDAHEKFKDFVAA
 WVKVMNLDLRFDLL

>2649|VvuCP_YJ016|[Vibrio vulnificus]|Gammaproteobacteria|
 Catalase peroxidase; complete.

MEHKPTHTSGQCPVMHGGATSSNSSNVAWWPKALNLDILHQHDRKSNPMGADFSYREELKKLDVEA
 LKRDALKALMTDSQDWWPADWGHYGLMIRMAWHSAGSYRVGDGRGGADTGNQRFAPLNSWPDNANL
 DKARRLLWPIKQKYGNKISWADLMILAGNMAYESMGLKTFGFAFGREDIWHPEKDIYWGAEQEWLA
 PSGAENSRYSGERDLENPLAAVMMGLIYVNPEGVDGNPDPLKTAKDMRVTFARMGMNDEETVALTA
 GGHTVKGAKHNGNAANLADPEASADLEEQGLGWNNHKSRIGRDVTVSGIEGAWTINPTQWNGFF
 HLLFSYDWWLQKSPAGAWQWEPVNIKEEDKPVVDEPTIRHNPIMTDADMALKLDPEYRKISERFHH

KDPAYFSETFARAWFKLTHRDMGPKARYFGPDVPEELIWQDPVPTGRKDYDVDAVKAKIIASGLS
 TGELVSTAWDSARTFRNSDKRGGANGARIRLAPQKDWLGNEPEKLAKVNLVLEAIASEFNISVADT
 IVLAGNVGVEQAAKAAGIAITVPFAAGRGDATIVEQTDVESFEVLEPIADGFRNWQKHAYVNPEEL
 LLDRAQLLGLSAPEMTVLIGGLRVIGTNHGDNKHGVFTDNVVALSNDFFVNLTMRYTWKPTGRNS
 YDIVERNSGNVKTATRVDLVFGSNSILRAYAEVYAQDDNKEKFKDFVAAWTKVMNADRFDI

>5224|AnCP01|[*Aspergillus niger*]|Ascomycota| Catalase peroxidase;
 complete.

MAEAKCPFSQSRSNANVAGGGTRNTDWWPDQLNLGILRQHAPASNPFERDFDYTAAFNSLDYYALK
 KDLHALMTDSQDWWPADFGHYGGLFIRMAWHSAGTYRVFDGRGGGGQGGQRFAPLNSWPDNASLKD
 ARRLWPIKQKYGAKISWADLMLLAGNVALESMGFKTYGFSGGRADTWEADESVYWGGESTMWGN
 VRYSDGFPVTKHGALSDEPPHRIHTRDLEKPLAASHMGLIYVNPEGPDGNPDPVAAAARDIRTT
 FGRMGMNDEETVALIAGGHSFGKTHGAASSENVDVEPAAAGLENQGLGWSNRYQSGKGPHTITSGI
 EVTWTKTPTKWSHAFLEYLFRFDWELTKSPGGANQWQAKNTEAIPDAYDPSKKHLPKMLTTDLSL
 RYDPAYEKIARRFLDHPDEFADAFSRAWFKLLHRDMGPRTRYIGPEAPTEDLIWQDPIPAVNHTLV
 DANDIAALKRTILDGTGLNKSNFVSTAWASASTFRGTDKRGGANGARIRLAPQRQWEVNNQPWLEET
 LSALEKIQKDFNDRVSSTGKKISLADLIVLAGCAAVEKAAQEAGQITVFPFPGRMDSQEQTEVE
 SFSHLEPVADGFRNYGKSSRVRAEHYLVKAHLLTLTAPEMTVLVGGLRVLNTNYDGSKHGVLTS
 SPGRLTNDFFTNVLDMNTAWKAKDGGRDLYEGTDRKGTGQPKWTATRADLVFGSHAELRALAEVYGS
 SDGQEKFKDFVSAWDKVMNLDLDFDLKSGSIARSKL

>5411|SpurCP01|[*Strongylocentrotus purpuratus*]|Deuterostomia|
 Catalase peroxidase; partial.

MSTDDIHNTTATGKCPFHQGGHDQSAGAGTTTRDWWPNQLRVDLLNQHSNRSNPLGEDFDYRKEF
 SKLDYYGLKDLKALLTESQPWWPADWGSYAGLFIRMAWHGAGTYRSIDGRGGAGRGQRFAPLNS
 WPDNVSLDKARRLLWPIKQKYGQKISWADLILAGNVALENSGFRTFGFGAGRETS

>2552|CreCP01|[*Chlamydomonas reinhardtii*]|Chlorophyta| Catalase
 peroxidase; complete.

MRRRLAFLSTVATVSGLPAAYPLTPCLFPVLYDRAAAAKLDLAAVRADLTALMTDSQDWWPADWG
 HYGPLLVRQAWHCAGSYRSDGRGGCDGGRQRFDPERSWDDNTNLKAKALLWPIKQKYGAALSWG
 DLIILAGDVAISSMGGPVLGFCGGRIDDLGDESVPGLGPSPEQEALMPCPVQGDQCQSPGLQNTLGL
 IYVNPEGPMGQPLPERSAAQIREVFGRMGMDDAETVALIGGGHAFGKAHGACPTGPGPSPREAPDA
 PWPGTCDGDRGNRTFTSGFEGPWTTTPTAWDNQYFQMLTTDVALHDDSYRALVGLFAANLTALEH
 SFKHAWYKLVTRDMGPVTRCLGPDVPPPQPFQDPLPPPPPGPAPDYARLARDIARALRRPSPAEP
 DTVHGRPHYGALFVTLAWQCASTFRETDYSGGCNGARIRFAPQKDWPNAYMDSVLAVLEPLKAA
 YPPTLSSADLIVLAGTVALQEALAEAEAAAGCQGGTGPCTAAPGSGSGVRLRF CGGRVDAVEGG
 QAGHAQPPRVLADKILQVRDVAHVMSLSLREAVALAARPRSPSQRRLLGYSGAWTPAPSRLSNQYF
 KVLLGEAWQRGYSSEGLEEFSAAGGGKGLFMTPSDLAIKWDAEMLAIAQEFASDNTAFQTFAAAW
 TRLMNADRFDGPDGNLCNDDEGGELAGALLGAAVAEEGARAASEKAAAVVQLVLEASYGAAARV
 EEEFVEL

>5235|SerMnCat|[*Saccharopolyspora erythraea*]|Actinobacteria|
 Manganese Catalase; complete.

MFYHVQRMINEIVPEPDPGAANALQEGLGGQFGEMRTMMQYLFQSFNFRGAEAKPYRDLHLHGIGT
 EEISHVELIATTIARLLDGSPPRYQGNPTELDEPAAGGGTPLSNALSQGNIIHHFLVGAQGAMPVDAV
 GNPWGSYVYNSGNLVLDLLYNLMLESTGRLQKCRITYEMSSNRTLRSVSYLIVRDQAHENAYAKA
 LESLGVDWGRTPPKTRAERYPEVAALLEQGLENRQYTFSLDNLSEAGKLFRAFATSPSDGDKTLST
 AQAPEGVPIEIIADPRPEEFSPGLDPALLELVQATAEQELAEAEPEVRYGSTS

>6175|NthMnCat|[*Natranaerobius thermophilus*]|Firmicutes| Manganese
 Catalase; complete.

MFNHDKQLLQQVKVDRPNPTYAAMLQEQLGGPNGELKAAMQYISQSFRIKDPEIKDLFLDIGAEEL
 SHMEMVAATINMLYGHDPATTSVRAGNVEPQVVGGLTPLLQDASGNPWSAQYVNSTGDLAADLLSN

IAAEQRAKVVVEYLRYQINDNGVRETIDFLLNREEAHNALFREALNKVQSKGSNKDFGVDQDARLY
FDLSTPGQHFSAPQTPPAFQTPRRN

>6155|SariMnCat|[Salmonella arizonae]|Gammaproteobacteria|
Manganese Catalase; complete.

MFRHVKQLQYTVRVSEPNPGLANLILLEQFGGPOGELAAACRYFTQGLSDDDAGRREMLMDIATEEL
SHLEIIGSLVGMNLKGAKEGTESEAELYRSLTQNGNSHITSLLYGGGPALTNSSGGVPWTAA
YIDTIGEVTADLRSNIAAEARAKIYERLINLTDDPGVKDTLSFLMTREVAHQLSFEKALYSIRNN
FPPGKLPVVEQYTDVYYNMSQGDDPRGWSNSDENFNYYIAEPMPAVDGGDLATVKLPREQLALLKA
MAERTKSDLTVDPLTGAELGCGEPKEDK

>6134|BmaMnCat01|[Blastopirellula marina]|Other Bacteria|
Manganese Catalase; complete.

MYHHVKKLMYTVDVGTDPDRFGKMLLEQFGGANGELAAALQYSIQGINCEDPKRKDLLLDIGTEEL
SHLEVIGSLARMHLKPLKDGDRDEAEADPLIIVVGGGGVSLNNSQGNPWTADYLKVTGQLEVDLRS
NMAAEARAKITYERLIQYCDPDKALKFLMTREITHMKAFGIALESMDGKPLEIGDMPVDEYV
NQFYNDSTGEGEMGEDLDGPWNSGKEWKRVDNPAFEMYQNGAASKAGTKKKAKKKAKKAAK

>5502|TtMnCat_NG80-2|[Thermus thermophilus]|Other Bacteria|
Manganese Catalase; complete.

MFQRIDRLAIELPPPKYADANAAAQVQELLGGRFGEMSTLNMYLFQSFNFRQKSKLRPFYELVASI
TAEFGHVELVANTINLCLTGTTHPGDPDCTPMREAKDKRNSYHF IATAQTAFPGDSMGNPWKGEY
VFNSGNLILDLLHNFLECGARTHMKMRVYEMTNHPTAREMIGYLLVRRGGVHILAYAKALEVATGVD
VKKMLPIPCLDNRAFDEARKYEDQGLHRRLYTFSDRYKELARIWHGTHPSDQPLEVVEGAPQGG
TIPDLDAVPEEFAPGISMEDFLDIGKRLMRSAGL

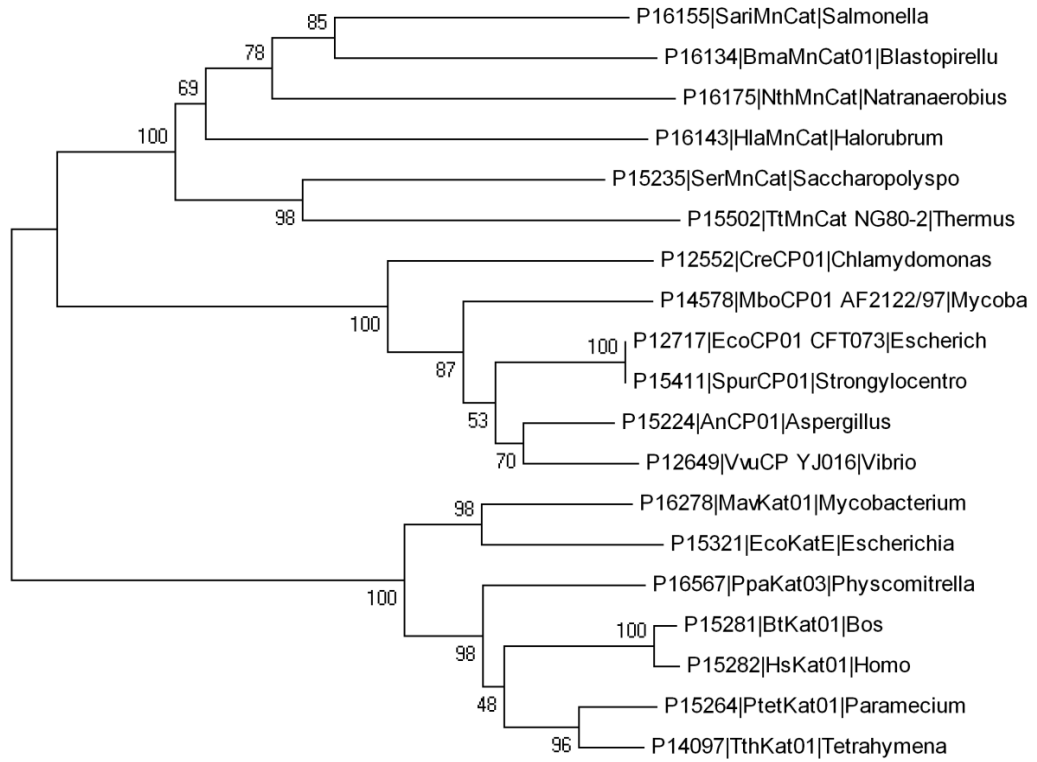
>6143|HlaMnCat|[Halorubrum lacusprofundi]|Archaea| Manganese
Catalase; complete.

MNSDDPFNTVFYHDDQLQFEVEVENPDPHFAMKLQQAIGGAEGEIRVALQYMFQAFVPAEKQEIR
QFLMETATEELGHIEMLATAVAKNLEGASEDARESAREDP I IDEMMRTGQPRQALSAGLHAMPVDS
NGVPFTGNYVVASGNLAADLYANVMAESTGRVLATRLYEFTDDPGMKEMLEYLIARDTMHQNQWHA
ALEDLGEHRPVPASFDQEENQEYNYSFMSTTREERDDPKQPWTQGEAPDGKGEFSYTPRQPGGGA
PDLKAVIDEMYNEVQ

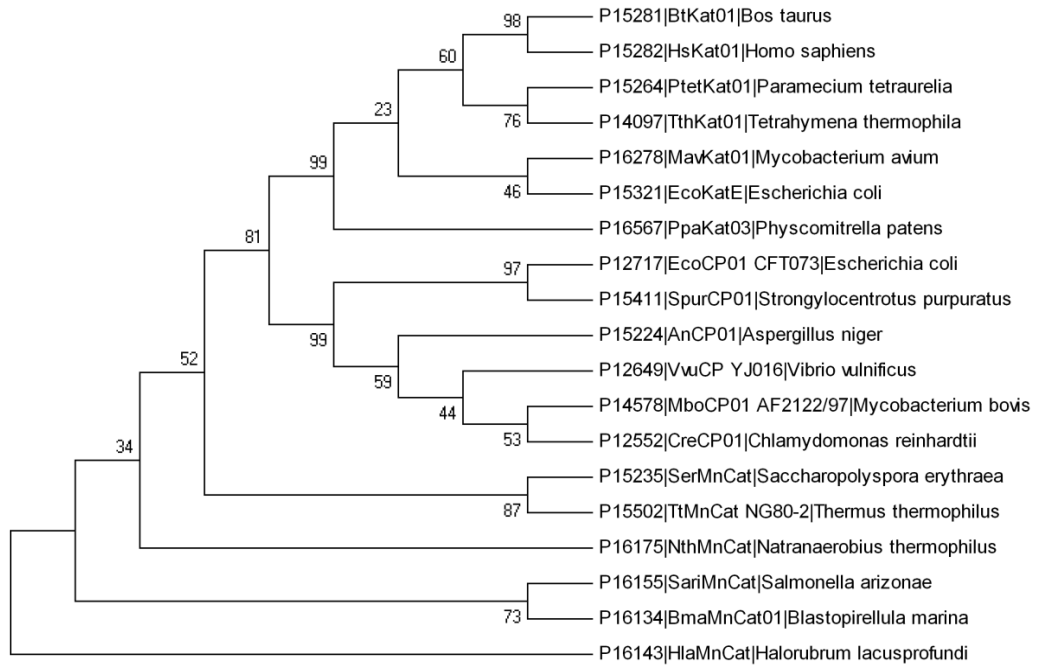
>6567|PpaKat03|[Physcomitrella patens]|Cryptogam| Manganese
Catalase; complete.

MFLNPLALNLSLTVGESGTVTLEDLHLFEKNAHFNRERVPERVVHAKGAGAHGYFEVTKDVSDLCK
AGLFSEVGKRTPVFARFSTVTGESGYADTARDPRGFSCLKFYTEEGNWDVMGNTPVFFVRDAAKFP
DLIHSQKRNPQTHMKDPNAFWDFLSLVPESLHQVLIITFSRPGVDPGHRHMHGYGSHTFKWVNKEGK
AHWVKFHFISDQGIKNLTHRAVELAGINPDYSTEDLQNIQNGNGPSWTFKVVQVMPLEDAPSYRW
DPFDLTKVWPHADYPLREVGLKLDNRNPTNYFAEVEQASFSAPAHMVPGIEASPDRLVQFRLFAYDD
AARYRIGGNYLQVPINQCPFAKVQNYSRDGMVTVDNNGGSKPNYYPNSHEELPRPDP SQPEVHPYE
HAGGTVSKAPPRKWEQDDYEQRMLWQKMSKEDQGTAKNIAGHIQGAKESI IERQMVGFRRCDP
SLADKVEEMLGMKKKSEDPYTMVA

Ek-5 Minimum Evolution ile oluşturulan ağaç



Ek-6 Maksimum Parsimoni ile oluşturulan ağaç



Ek-7 Filogenetik Ağaç Analizinde Kullanılan diziler II

>4060|FspKat01_CcI3 [*Frankia* sp.] Catalase; complete.

MTDPGTSRLPRDDAKQQQLDAVRIGDDGARMTTDQIGIGVEHTDDSLAAGERGPTLLEDHFHFREKLT
 RFDHERIPERVVHARGAGAYGYFEAYESLADVTRAHFLGEDGRRTPVVFVRFSTVGGSRGSADTVRD
 VRGFAVKFYTEEGNFDLVGNNMPVFFIQDGIKFPDFVHAVKPEPHNEIPQASSAHNTLWDFVSLVP
 ESMHMMWMLMSDRALPRSRYMMQGGFVHTFRFVDAAGQGTFFVKFHWPKLGTSLVWDETKIAGK
 DPDFNRRDLWESIENGTFFPEWELGVQLVPESEHAFFDFDLDDATKIIPPEERVPVRPVGRLVLRNP
 GNFFAETEQVAFVCVQNVVPGIDFTNDPLLQARLFSYLDLTLIRLGGPNFAQLPVNRPVAAVHNNSR
 DGYGQHRIQQSQTSYFPNSISGGCPVLSDBAHGGYVHYAERVDGNTIRKRSESFKDFYSQATLFWN
 SMSSWERRHIVDAFSFELGKVDYDTQIKERVLGHLAQVDHELAAGVAENLGLPVPPPESTPNHGRSSP
 ALSQADQPSGVATRRIAVALAADGVDEVALRSATAALREQGAILEVLAPHGMLATVSGDALPVDRT
 LVTMSVLYDAVFPVAPGERGVTALHTHNGEAVHYVGEAYKHAKPIGAVGAGVSLLEIASLPGARVAD
 QGDVAVSDRGIVTVRDLAGPSVLGDFGSAFATAVAHRHFDRALEAVAA

>5281|BtKat01 [*Bos taurus*] Catalase; complete.

MADNRDPASDQMKHWKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPRGPLLQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDRPGRF
 AVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDALLFPSFIHQSQRNPQTHLKDPMVWDFWSLRPESLHQVSF
 LFSDRGIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLAHEDPDYGLRD
 LFNAIATGNYPSTWTLYIQVMTFSEAEIFPFNPFDLTKVWPHGDYPLIPVGLVLRNRPVNYFAEVE
 QLAFDPSNMPPGIEPSPDKMLQGRLEFAYPDTHRHRLLGPNYLQIPVNCYRARVANYQRDGPMMMD
 NQGGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHRTHFSGDVQRFSANDDNVTQVRTFYLVNNEEQRKRRCEN
 IAGHLKDAQLFIQKKAVKNFSDVHPEYGSRIQALLDKYNEEKPKNAVHTYVQHGSHLSAREKANL

>5534|NOpuKat01 [*Nostoc punctiforme*] Catalase; complete.

MTEPQNLTTADGIPVSDNQNSLTAGARGPVLIQDFHLIEKLAHFNRRERIPERVVHAKGAAAHGTLT
 ITNDITRYSKAKLSEIGKKTTELILRFSTVGGKEKSADAERDPRGFSLKIFYTEEGNWDLVGNNTPI
 FFIRDPLKFPDFIHTQKRNPQTNCKDQNAKWDFWSLSPESLHQVTILFSDRGIPKTHRHMDFGSH
 TFSLINAEGDRVWCKFHFKTLQGHQTLTEESAKIKGEDPDHATHDLFEAIAKKDYPKWRMCIQVM
 TEEQAEEKHPDNPFDLTKVWKQGEYPLIEVGILELNRNPNENYFAEVEQAAFPSAVVPGVSFSPDKM
 LQARIFSYPPDAQRRLGGNYQQLPVNQPKCPVMHYQRDGFMASGNNGGSPVNYEPNSAEGTPKENP
 AYAEPSSHLDGVTVDRYSHREGNDDYTQAGNLYRLLTPEQQRERLAKNIVGSLSQAREDIQMRQLCH
 FFRADVSYGRRVAEGLGIAIDPSMFSHDAQPVGNW

>3980|BhaKat01_C-125 [*Bacillus halodurans*] Catalase; complete.

MDKDQQGTESENKNEQLEPFKVDHKNTKLTNNQGVVSDTDDSLKAGDRGPTLMEDHFHFREKMT
 HFDHERIPERVVHARGFGAHGYFQVYEPMTTEYTKASFLQDPNVKTPVVFVRFSTVVGSRGSADTVRD
 VRGFATKFYTEDGNVDLVANNIPFFIQDAIKFPDVVHALKPEPHNEIPQASAAHDTFVDFVVSNT
 ETAHMIMWLLSDRAIPRSFRMMEGFGVNTFRFVNEQGKARFVKFHWKPKLGVHSLVWDEAQKLAGK
 DPDFHRRDLWEAINMGEYPEYELGVQMIIEEDEFSDFDILDPTKFWPEEMVPVKLIGKMTLNRNQ
 DNFFAETEQVAFHAGNVVPGIDFSNDPLLQGRLEFYSYLDLTLRLSGPNFHEIPINRPIAPVNNNQ
 DGFHRMTIDKGAVSYSNTLRNNSPEPASDQEHGYVHYMEKVEGQKIRRSESFNDHFSQATLFWN
 SLSTAEEKQHLIKAFHFEVGSVKDKNLKQRVVEMFNQVDGKLAAEIAKIGVNPPTTPGGTGTASS
 PAVSQENTIKLARTRKVAVLIDHGFAFDEVSQVVTALQSAGLGVDLVSKQLGMISSAEAGEQLEANK
 SFATTGAIMYDALYIGGGAQSISSLNLYSESKTFVDEAFKHAKTIGATNEGIELLIAAQVQGITFA
 GPDSNDHVVDLGIITIQTDKDFKAFTDEMIHAIAQHRHWMREFKDGKLSG

>3981|BhaKat02_C-125 [*Bacillus halodurans*] Catalase; complete.

MKDQNDPNKRSNETDETLNROGHPVTNNQHVRTVGDGRGPTTLENYDFLEKISHFDRERIPERV
 VHARGAGAHGYFESYGTYGDEPISKYTRAKVFTTEKKGQTPVVFVRFSSVIHGGHSPETLRDRPGRFAV
 KFYTEDGNWDLVGNLKIIFIRDPLKFPDLVHAFKPDVTVNQDGERIFDFISQTPPEAMHMITFLF
 SPWGI PANRMMQGSVNTYKVVNEEGNAVLVKYHWEPKQGIKNLTQKEAEAIQAKNFNHAATLDLY
 EAIEDGDYPEWELVYQIMSDDAHPDLDFDPLDPTKLWYKQDFPWPVVGMRMVLNKNPNENYFAEVEQA
 AFGTGVLVDGLDFSDDKLLQGRTFSSYSDTQRVYRVGANYLQLPINAPKRVATNQRDGQMEYHVDIG

PKQNPVNYEPLLNGLKEAKQDGDHTPYVEGELQRASIDRQNDYGQAGETYRRLSDWERDDLIL
NLVNTLAPCHEDIQKQ MIDHFSQCDPEYGRRVKEGLEKQKGADTHRQPQGGADGDAAMHAAEALGH
PSDPY

>4082|BsKat01_168 [*Bacillus subtilis*] Catalase; complete.

MSSNKLTTSWGAPVGDNQNMSMTAGSRGPTLIQDVHLLLEKLAHFNRERVPERVVHAKGAGAHGYFEV
TNDVTKYTKAAFLSEVGKRTPLFIRFSTVAGELGSADTVRDRGFAVKFYTEEGNYDIVGNNTPVF
FIRDAIKFPDFIHTQKRDPKTHLKNPTAVWDFWLSLSPESLHQVTILMSDRGIPATLRHMHGFGSHT
FKWTNAEPEGVWIKYHFKTEQGVKNLDVNTAAKIAGENPDYHTEDLFNAIENGDPYPAWKLYVQIMP
LEDANTYRFDPFDVTKVWSQKDYPLIEVGRMVLDRNPENYFAEVEQATFSPGTLVPGIDVSPDKML
QGRLFAYHDAHRYRVGANHQALP INRARNKVNNYQRDGMRFDDNGGGSVYYPNSFGGPKESPED
KQAAYPVQGIADSVSYDHYDHYTQAGDLYRLMSEDERTRLVENIVNAMKPVEKEEIKLRQIEHFYK
ADPEYGRVAEGLGLPIKKDS

>4297|SmeKat01 [*Sinorhizobium meliloti*] Catalase; complete.

MPPPLPERRHLICACVGTTCGCGSNPPSGSSPFVPASFFVPAEGTAEPRCGGVSSPRSRAGFSPRI
RALISSPVSVSYSSKPSARATNSLTAGPRGGIMLQDYQLIEKLAHQNRERIPERVVHAKGWGAFGS
LKITGDISQYTRAKCLQPGAETPMLARFSTVAGEQGAADHERDVRGFALKFYTDEGNWDLVGNNTPV
VFIIRDYPKFPDFIHTQKRHPKTNLRSATAMQDYWLSLSPESLHQVTILMSDRGLPQTPMHMNGYGS
HTYSFVNDAGERYVVKFHFKTQQGHKFFFTNEEGEAVIGKTREGYQESLIFYA IENGEFPRWTVQVQI
MPELDVEKTPYNPFDLTKVWPHADYPPVEIGVLELNRNPENYFAE IENAAFSPSNIVPGIGFSPDK
VLQARIFSYADAHRYRLGTHYEHIPVNQPRCPVHHYHRDGMNTYGGIRTGNDPDAYYEPNSFNGPA
EQPLAKEPPLRIDGMSRYDHRVGNDDYVQVRALFGLFDEGQKSRSLFSNIAAAMGGVPEG I IERQL
IHFARVHPEYEAGVRQALKTAHGYEADTISTAAE

>5321|EcoKatE [*Escherichia coli*] Catalase; complete.

MSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSLAPEDGSHRPAAEPTPPGAQPTAPGSLKAPDTRNEKLN
SLEDVRKGSENYALTTNQGVR IADDDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREKITHFDHERIPERIVHARGS
AAHGYFQPYKLSLSDITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVQGGAGSADTVRDIRGFATKFYTEEGIFDL
VGNNTPIFFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAI PQGQSAHDTFWDYVSLQPETLHNVMWAMSDRGIPR
SYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATFVRFHWKPLAGKASLVWDEAQKLTGRDPDFHRRELWEAIEAGD
FPEYELGFQLIPEEDEFKDFDLDLDP TKLIPEELVPVQRVGMVLRNRPDNFFAENEQAAFHPGHI
VPGLDFTNPLQGR LFSYTD TQISRLGGPNFHEIP INRPTCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYEP
NSINDNWPRETTPPGPKRGGFESYQERVEGNKVRERSPSFGEYYSHPRLFWLSQTPFEQRHIVDGF
FELSKVVRPYIRERVVDQLAHIDLTLAQAVAKNLGIELTDDQLNITPPPVDVNGLKKDP SLSLYAIP
DGDVKGRVVA ILLNDEVRSADLLAILKALKAKGVHAKLLYSRMGEVTADDGTVLP IAAATFAGAPSL
TVDAVIVPCGN IADIADNGDANYYLMEAYKHLKP IALAGDARKFKATIK IADQGE EGIVEADSADG
SFMDELLTLMAHRVWSRIPKIDKIPA

>4079|PfKat02_Pf5 [*Pseudomonas fluorescens*] Catalase; complete.

MLSLSVQAATLTRDNGAAVGDNQN SQTAGATGPVLLQDVQLIQKLQRFDRERIPERVVHARGTGAAH
GTFTVTDNLTDL TRAKVFAAGEVTPV FVRFSAVVHGNHSPETLRDRGFAVKFYTEDGNWDLVGN
FPTFFIRDAIKFPDMVHAFKPDPRTNLDDDSRRFDFFSHVPEATR TLTELYSNSGTPASYREMDGN
GVHAYKLINAKGEVHYVKFHWKSLQGLKNLDPKQVVEVQGRDYSHMTNDLVTHINKGDFPKWDLV
QVLKPEDLAKFDFDPLDATKIWPGVPERKVGQMVLRNRPANVVFQETEQVAMAPANLVPGIEPSEDR
LLQGRVFSYADTQMYRIGANALQLPINAPKNPVNNGNQD GAMNLGHSSTGVNYQPSRLMPREEPQT
ARYSQMALAGSTQQAQAKIQREQNFKQAGDLYRSFSKKERQDLIDSFGGSLATTTDDESKHIMLSFLYK
ADPEYGTGVTKVAKGDLARVKALAAKLS

>5216|AcapKat01 [*Ajellomyces capsulatus*] Catalase; complete.

MTSKVEEGLQRVKELVENMQPGEQKVADLARDTTD VNGCLPFTTTDHGVKVSNTDFWLRLASENQTG
PLLEDQIAREKIHRFDHERIPERVVHARGTGAFGHFKLFESAADVTSAGVLTDTSTRTPV FVRF
TVQGSKGSFDTVRDVRGFATKFYTEEGNWDLVGN NIPVFFIQDAVKFPDFVHAVKPEPHNEVPQGG
TAHNNFVDFVYMHPEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTFVLV NKQGRHFVKFHWMP ELGV
HSLVPDESFKLGGQDPDFHRKDLME AIDNKVYPKWKFGIQVLP EEKEHDFDFDILDPTKIWPESLI

PVRYIGEMELNRNVDEFFPQTEQVAFCTAHIVPGIEFSGDPLLQGRNFSYFDTQITRLGVNWEELP
 INRPVPCVPMNHRDGMARHKITQGTVNYWPNRFEACPPKPEDGGFVYTPQKVEQSIKARMLSSKF
 REHINQAQLFYNSLSEYEKLVNNAFCFELDHCDP I VYNRLVSR I SEIDHALAQAVAVKVGAPTP
 PRPGRDNPQGTTINLSQKYINDRQLSSPTIKGRR IAILIGDGYDSVAFGTVIAAVSAMGALPFIIG
 TKRQPIFADDEDRNHSKGVTPNHNYTSQRSTCFDATFIPGGSHIKELSQLGLIQHWVAEQFGHCKA
 IGATGEAINLIVQALSNLDPLEVASASSGHPVDWYGVVTSSKLEHPSLTEGIKLFPEASDFLGKL
 FYQISQHRNYEREMAGLTDKVPF

>5213|AniKat01 [Aspergillus nidulans-Emericella nidulans]
 Catalase; complete.

MATSITAGLQKAQQAVQDTATKNKKIVDISHDTVNVHTDQEQRDFGVAITDPDHWLRVTNETHSG
 PSLLEDHIARER IHRFDHER IPERVVHARGTGAYGNFTLKESIEDLTYAGVLTDTSRNTPVVFVRF
 TVQGSRGASADTVRDVRGFAVKFYTDEGNWDIVGNNIPVFFIQDAIKFPDFVHAVKPEPHNEVPQAQ
 TAHNNFWDVYVYLHPEATHMFMWAMSDRAIPRSYRMMQGFVNTFSLVNKEGKRHFVKFHWI PHLGV
 HSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLMEAI DNKAYPKWDFAIQAIPEEDQDKFEFDIFDATKVVPEEQV
 PLRVVGELELNRNIDEFFPETEQVAFCTSHIVPGIDFSDDPLLQGRNFSYQDTQISRLGVNWEELP
 INRPVCPFLNHRDGAKRHRITKGTVNYWPNRFEANPPASDKGFKSHPAPITGRKRRDLTPKFKEY
 HNQAQLFYNSLSEVEKVHVKKAFFSFDLHCDDP I VYERLAGQRLAEIDLPLAQVAEMVGAPIPTK
 ALRDNHGKTSVRLSQFDFTPKAPGIIISRR IAI IIGDGYDKIAFNGMKAAILAAQALPFVIGTKRSA
 IYAQGEDKNSSKGVIPDHMYDGMSTMFDAIFIPGGSHIETLQKNGQIRYWIAETFGHLKALGAMG
 EAAQLVKEVLGNVMGVQIAGADSAEPVEWYGVVTARGPESAESLSEGFKVLKDAGDFTSKFFYQIS
 QHRNWQRELDGLASTVAF

>5195|GzKat01 [Gibberella zeae] Catalase; complete.

MTEQVTGAIKHAVMGHKNDKIDQLKANMVEPNENSRIITSDYGVKQNNTDQWLRVASEDQTGPSLLE
 DAFGREKIHFRFDHER IPERVVHARGAGAHGTFRLLFESAADVTKAGLFTDTSRETVPVVFVRFSTVLGS
 RGSADTVRDVRGFAIKFYTQEGNFDIPGNIPVFFIQDAMKFPDVIHAGKPEPNNEVPQAQTAHNN
 FWFDMFEHPEATHMHTWAMSDRTIPRSYRMMQGFVNTYTLVNEKGERRFVKFHWTPELGVHSLVW
 DEALKLAGQDPDFHRKDLQEAIEGAFPKWKFQIQLVDESQEHDFDFDILDATKVVPEDLIPVRYI
 GELELNQTVDEYFTQTEQVAFCTSHLVPGIGHSDPLLQGRNFSYQDTQLSRLGTVNWEELPINKPV
 CPVMFNHRDGMARHTITKGVNYWPNRFSHOPPATESEGAYVDYAAKIVGMKQRTLSKKFKDHFQ
 AQLFYNSLSEIEKSHVQAAYSFELDHCD EAI VYERLTERLGEIDGDLANTIAEMVGGKKPANPKPN
 AGKKAKNLSQLDFVPETPTIKSRRIAI I IADGYDPVAFNAMYGAIKAQSALPFVIAPRRAPIFSAA
 EDSSSSKGIFFPDHHLLEGQRSTMFDAIFVPPGAKS IETLSKNGRALHYIREAFGHLKTIIGGTGEAVE
 FINKAIQLSEVALSSTDGSGVVDSYGVVTLKNASPDTLKEIATVASDAKGFLEKFFVYVNSCHRNVQ
 RELDGLSTMVAY

>5201|GzKat02b [Gibberella zeae] Catalase; complete.

MTSSAKLGENPISTLANGOPTENPGSTQQIRYQSNGLVVLSDTQTIEILAHFARERIPERSVHA
 KAAGATGEFEVLELSDITDANFLSEKGGKTPMLMRISTVGGKGSADTVRDVRGWSTKLYTEEGI
 QDFVFNDLPVFFIREPIKFP SMNRS HKRHRPTNVPDNAMFWDYHVNNPEGIHALMHLFGQRGIPAS
 LRHISGFGVHTYTLNKADGSYVYVVKWHYKPEGGIETMDSETAARLAGTDPDYHVKDLFNAIEKGDY
 PSWIVYIQVMRPEEVMAAPIDIFDCTYTPHEKYPLRRVGMQLKKNPDNYFQDIEQACFSPSNMV
 PGIGPSADPVLQARMFSYPDAHRYRVGPNYFQLPPNRPRNQVYAPCVRDGPMTMNGNYGGDPDYVF
 SQLRPVSVSKRVQVPTHEHFDGKVTSVVTEFTDKDYVQARELWKIICGEDKGRQFFNNIAPT IKD
 LPVKLQGVVGRF ILEYMAVTPNTKAERVVGLVLTGYRLPFWSGSRNQDNSYSSYELVNLWKYIYR
 WLLL

>5230|GzKat04 [Gibberella zeae] Catalase; complete.

MAPSADTSFSAHVASQFQSYEEDRQSASKESTYATSNGVPVAHAYEAQRCGENGPLLLQDFHLIDL
 LSHFDRER IPERVVHAKGSGAHGFFECTDPLDDLCLADIFSAKGGKCPVSMRFSSTVGGESGSHDMA
 RDPRGFSVKMRTEEGYLTVTGTHLTHADDSFAFWDYLSQNPESIHQVMILMGRGIPKGYRKMHG
 SGHTFKLVNKAGDWVYTIHLSKMQGTDFVVTQEDSADYSPDFSQKDLYEAIQNGDYPKWTLLEVQTM
 TPKEAEELWEKEKINVFDLTHVWPQKQFPRRKVGEFTLNENAINYFAEVEQIAFNPAHLPPGIEPS
 ADPVLQSRFLSYPDTHRHRIGVNYQQLPVNATRGTGYKFGNFQRDGMFAFYNGARPNYLS SIDPIK
 FRTRTVLDLKTGHGHTGEAITFLTAIRPEDFNAPRALWRNVFDEPARERFINNVGTGKMKLCKQEEP

LKRQIAIFREVDPEIADRLEKSTGIKGYDGIADMKFNGSHNCMNGEMKLANDIIANKGKSATARNG
APAKGCHSRLETNGHLNGTNGK

>5188|MagKat01 [Magnaporthe grisea] Catalase; complete.

MASLKDIGDTLSKGGKSYVMHSQGDKISDLARNTVTPDEKGRQTTDAGVRITNPDDWLRVTSNDQIG
PSLLEDQIAREKIHRFDHERIPERVVHARGTAAHGKFTLHKSIEHLTTAGVLTDTTSRETPVFLRFS
TVLGSRGSAADTVRDVRGFAVKFYTPPEGNWDIVGNNIPVFFIQDSMKFPDVIHAGKPEPDNEVPQAQ
SAHNNFWDFFMYQHSEATHMFMWAMSDRTI PR.SYRMMQGFVNTYTLINAKGERHFVKFHFTPELGV
HSLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLMEAIANGAFPRWKFGVQVLPESREHEFDFDILDATKVPEDLI
PVDYIGTLELNRNIDEFFPETEQVAYCTSHVVPGIGFSDDPLLQGRNFSYFDTQISRLGINWEELP
INRPVCPVLSFNRDGQSRHTITKGVNYWPNRFVGNAPADGVKEGGYVEHATKVGQIKARTKSAKF
LDHISQAQLFFNSMSDVEKRLHMLAAFSFELDHCEEEVVYNNLVSRLTQIDIGLAQQVAEMVGAQIP
DKATKENKGIKAKGLSQFDLFPENPTIASRKVAI IADGYDSVQFRAVKAALSAAQAIPLVIAPRR
SPIYAAGETKGSAGLKPDDHLEGFRSTMVDAVYVPGGAESIKTLSKNGRALHYVREAFGHLKAI
GASGEGVELVKLAVTLEPVTVSSADVMESYGVVTVRNVQADSLKEVVDLAKGGKDFLDQFFHSIAM
HRNWAREADGLNSQVAY

>5231|MagKat02 [Magnaporthe grisea] Catalase; complete.

MPRSSMLGLWASLVWIAQAGCPYADPAALRPREEHTDDYLAQFSVDDQDKFLTSDVGGPIGDQRSL
KAGARGSTLLEDVFRQKITHFDHERVPERAVHARGAGAHGTFTSYGDFSNITSASFVNSAGKRT
VFVRFSTVAGSRAIPTRAILDAIQFPDLVHAVKPSPDKEIPTAATGKRDPYKPNPDATHDSA WDF
SQSSSLHALFWAMSGYGI PR.SYRHMDGFGVHTFRMVADNGESRLVKFHFKTKQKASLIWEEAQV
LSGKNPDFHRQDLWDAIEAGHGPEWFEFGVQVNEEDALRFGFDMLDPTKILPEDLVPHPLGLLKL
DRNPINIFYAETEQIMFQPGHLVIRGIDFTEDPLLQGRVFSYLDLQTLNRHNGPNFEQLP INRPRVTVH
NNNRDGSQGNFIHKNIHYPYTPSALNEFPKQADDDQGRGFMTPRRRTQDAALVRELSETFDDHWTQ
PRLFWNSITPAEQQILVNAIRFETSNIIVNTHVRQKVLQQLNRISDELAGRVAQALGMEAPAPEPAF
YHENTTIGLSIFGIKLPKIKTLRVGLASTGNVASLSQAADLKARFMGDGVAVAVLGETQVEGVDV
TYSQSDATVFDGIIIAAGAEGLVAKDAPASALFPIGRPQQLVVDSFRWGP IGLAAASDDSANIFS
SLGTTGPGVFSGDLDLGVLVTDKFEGLSTYKFFVERFPMDS

>5207|NcKat01 [Neurospora crassa] Catalase; complete.

MSNII SQAGQKAKEALTSAPSSKKVDDLKNEFKETDKSARLT TDYGVKQT TADDWLRIVSDDKIGP
SLLEDPFARERIMRFDHERIPERVVHARGSGAFGKFKVYESASDLTMAPVLTDTTSRETPVFRVRFST
VLGSRGSAADTVRDVRGFAVKFYTEEGNWDLVGNNIPVFFIQDAIKFPDVIHAGKPEPHNEVPQAQS
AHNNFWDFFQFNHTEATHMFTWAMS DRAIPRSLRMMQGFVNTYTLINAQGRHFVKFHWTPPELGVH
SLVWDEALKLAGQDPDFHRKDLWEAIEGAYPKWKFQIQAIAEEDHFKFDFDILDATKIWPEDLVP
VRYIGEMELNRNPDEFFPQTEQIAFCTSHVNGIGFSDDPLLQGRNFSYFDTQISRLGVNFQELPI
NRPVCPVMNFRDGMARHTISRGTVNYYPNRFDACPPASLKEGGYLEYAQKVAGIKARARS AKFKE
HFSQAQLFYNSMSPIEKQHMINAFGFELDHCEDPVYGRMVQRLADIDLGLAQ TIAEMVGGEAPT
TNHPNHGRKTINLSQTEFPATPTIKSRRVAI IADGYDNVAYDAAYAAISANQAIPLVIGPRRSK
VTAANGSTVQPHHLEGFRSTMVDAIFIPGGAKAAETLSKNGRALHWIREAFGHLKAI GATGEAVD
LVAKAIALPQVTVSSEAEVHESYGVVTLKVKPE SFTDAVKIAKGAAGFLGEGFFYAI AQHRNWDR
LDGLHSMIAY

>5416|NcKat03 [Neurospora crassa] Catalase; complete.

MRVNALLPLSGLIGTALAACPFAADPSALGRRRAEGGEVDARQLKEVEVDNDGQFMTTDFGGNIEEQ
FSLKAGGRGSTLLEDVIFRQKLQHF DHERIPERVVHARGAGAHGIFTSYGDWSNITAASF LGAKDK
QTPVFRVRFSTVAGSRGSAADTVRDVHGFATRFYTDDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIRFPDLIHSVKPS
PDNEVPQAATAHDSA WDFSSQPSALHTLFWAMSGNGIPR.SYRHMDGFGIHTFRLVTEGDKSKLVK
WHWKTKQKGAALVWEEAQVLAGKNADFHRQDLWDAIESGNAPSWE LAVQLIDEDKAQAYGF D LLD
TKFLPEEFAPLQVLGEMTLNRNPMNYFAETEQISFQPGHIVRGVDFTEPDLQGRLYSYLDLQTLNR
HRGPNFEQLP INRPVSGVHNNHRDGGQAWIHKNIHHSYPSYLNKGYP AQANQTVGRGF TTPGRT
ASGVLNRELSATFDDHYTQPRLLFFNSLTPVEQQFVINAIRFEASHVTNEQVKNVLEQLNKISNDV
AKRVAVALGLEAPQDPDTPYYHNNVTRGVSIFNESLPTIATLRVGVLS TTKGSLDKAKALKEQLEK
DGLKVTVIAEYLAGVDQTYSAADATAF DAVVAEGAERVFSGKGAMSP LFPAGRPSQILLTDGYRW
GKPVAAVGS AKKALQSIGVEEKEAGVYAGA QDEVIKGVEEGLKVFKFLERFAVDGDDEE

>5389|PnoKat01 [*Phaeosphaeria nodorum*] Catalase; complete.

MGSANEGPADIIAKVSGAVQGGKREDDGPYFTNNEGIPYDPDPAHASKNIGGIPVASDVFLFQKQQTFR
 NRSKNLERMVHPCGSGAFGYFETTKDVSNTLTKANFLGSGVEKTPIFVRFSTVTVGREYDPLARNPR
 GFAIKFYTQEGNYDIVGLNFPVFFCRDPLQGPVIRSQARNPRNFLPDYDALFDLLANTPEGNHAG
 LMFSDHGTGPKGWRYEHGYGCHTFKWVNAEGKFVYIKYHFIAKHGQKQFTQEEATRMCGEDPDYSK
 RDLWEAIEKGEEIEWTAMVQVMEPQDADPEKLGFDPFVTKVWPRSQFPMHEFGRLVLNKNPENFH
 RDVEQAAFSPGSMVPGIEDSPDPLLQFRMFFYRDAQYHRIGVNLHQVPVNCPFMAKQFATLNFQDQ
 MRVDANHAGNKQYAPNSFAHKFRPDVAEAPYVSDNVVSRKSHYYHEGKKSQYATLWLRVMT
 QQRKNTIKNTGNMLKFFVGYPEIQVYNVGTDYAQGIYDMLPSPEFQFAEVEKLAETAQEWYKEKKFQ
 PSTENKLRGDAPWYN

>5391|PnoKat03 [*Phaeosphaeria nodorum*] Catalase; complete.

MVNFRVTFLLACAGLAAASCPYMENEAPIKRDGAAQSPKSTDEFMAQYEVDDKDVYLTNGFGGPVED
 MESLSAGERGPTLLEDFIFREKIMHFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYADWSNITGASFLNKPS
 KETPVFIRFSTVAGSRGSPDSVRDVRGFAVRFYTDENFDIVGNNIPVFFIQDAIKFPDLIHAVKP
 RQDNEIPQAATAHDSAWDFFSQQPSSMHTLFWAMSGHGTVRSYRHMWDGCVHTFRLVTDGKTKLV
 KFRFRTOQGLASRLWEEQQHAAGMNADTRQDLWDAIENGYPEWIFEAQIMDEEDQLRFGFDLLD
 PTKIVPEDLVPFTPLGKLTNLRNPRNYFAETEQVMFQVGHIVRGIDFTEDPLMQGRIFS YLDTQLN
 RHGGPNFEQLPINQPRRDGAGQMYIPLNAPYSPNTLNAGSPKAPANQTQGRGFFSAPNRSTGGRLV
 RAVSSTFADVWSQPRLFFNSLLPVEQQMVINAMRFETAQLTSEVVKNVLIQLNRVSHDIAVRVAE
 ALDMTAPAADDTYYHDNKTTGISVAEKLLKLDGLKVGYLSSVSSNGDTAAALKTALNDLKVRFVSV
 VGERLKGIDQTVSATFAGQFDIVVDGQAEALFMPAGSLANSNTTANATKAYTTLYPAGRPLSIL
 QTGYQWGAQVGVIGSSSAAFSAAGLQAGTPGVYHFEAGNSTKAIVDQLAEGLRTRFRFLDRQLDERE
 FVCGVTFDQDA

>5255|PstiKat01 [*Pichia stipitis*] Catalase; complete.

MAPVFTNSNGCPIPGDAFATQIRIGKHGPLLLQDFNLIDSLAHFDRERIPERVVHAKGSGAYGVFEV
 TDDITDVCGA AFLDTIGKKTQVTRFSTVGGEGSADTARDPRGFATKPHYTEEGNLDLVYNNTPVFF
 FIRDPSKFPHF IHTQKRNPETHLKDANMFWDYLTNTQEAIHQVCILFSDRGTTPASYREMNGYSGHT
 YKWSNKKGEWFYVQVHFISDQGIKTLNNEEAGALAGSNPDYAEQEDLFKNIAAGNGPSWTCYVQTM
 QEQAKNAPFSVFDLTKVWPHSDYPLRRFGKQNLNENPKNYFAEVEQAAFSPAHTVPYMEPSADPVL
 QSRLFSYADTHRHRLGTNYTQIPVNCVPTGAVYNPHMRDGHMNVNGNLGSTPNYLDTSKPVFEKQF
 ALQEEQEVWEGAACPFWHWKYTDEDFKQATALYNVLRKRYPNQQAHLAHNVSVHVAADAHAHQDRVFE
 MFSKVHPDLGAAIKKETLQLSPRK

>5175|SceKat01 [*Saccharomyces cerevisiae*] Catalase; complete.

MSKLGQEKNEVNYSDVREDRVVTNSTGNPINEPFVTRQIRIGEHGPLLLQDYNLIDSLAHFNRENIPQ
 RNPFAHSGSAGFYFEVTDITDICGSAMFSKIGKRTKCLTRFSTVGGDKGSADTVRDPGRGFATKPHY
 TEEGNLDWYNNTPVFFIRDPSKFPHF IHTQKRNPQTNLRDADMFWDFLTTPENQVAIHQVMILFS
 DRGTPANYRSMHGYSGHTYKWSNKNGDWHYVQVHIKTDQGIKNLTI EEATKIAGSNPDYCCQDLFE
 AIQNGNYPSTVYIQTMTTERDAKKLPLFSVFDLTKVWPPQGFPLRRVGKIVLNENPLNFFAQVEQAA
 FAPSTTVPYQEASADPVLQARLFSYADAHRYRLGPNFHQIPVNCVYASKFFNPAIRDGPMNVNGNF
 GSEPTYLANDKSYTYIQQDRPIQQHQEVWNGPAIPYHWATSPGDVDFVQARNLYRVLGKQPGQQKN
 LAYNIGIHVEGACPIQQRVYDMFARVDKGLSEAIKKVAEAKHASELSSNSKF

>5261|SpomKat01 [*Schizosaccharomyces pombe*] Catalase; complete.

MNSKDSNTVPVYTTNTGCPIFNPMAAARVGGKGPVLLQDSHLIDVFQHFDRERIPERVVHAKGSGA
 FGEFECTDDITKYTKHTMFSKVGKTPMVARFSTVGGERTPDTARDPRGFALKFYTDEGIFDMVG
 NNTPVFFLRDPAKFPLFIHTQKRNPQNDMKDATMFWDYLSQNAESI HQVMILFSDLGGTPYSYRFM
 DGFSSHTYKFNVDKGEFYCKWHFITNQGTKGLTNEEAAAALDGSNPDHARQDLFEAIERGDYPSWT
 LYVQVMTPEAEKYRYNIFDLTKVWPHKDVPMQRVGRFTLNQNPNTNFFADIEQAGFSPSHMVPVIE
 VSADPVLQVRTFSYPDTHRHRLGANFEQIPVNSPKCPVFNYSRDGMNVNGNQGNWPNYPSSIRPL
 AKVQYEPDEGHEKQVQVYHMDIITDVFQEPRAFVQNVLGKKGQDQNFVKNVAGHLSGAIISPV
 RERQYGVFTRVDSSELGRRIREATEAEVKKMEEKAPKPKINKGEPHMFQSS

>5223|CnKat01_B-3501A [Cryptococcus neoformans] Catalase; complete.

MAQMLNQA VTA VTDGAKYRQMAENTIEQTSKTPLTTYFGVKVPETDVALRAGARGPTLLED FHNRE
 KIQHFDHERIPERVVHARGSAAHGEFKLHTPLTGITTA KVLTDTSKVVPAYVRFSTVVGSRGSADT
 VRDVRGFATR FYTDEGNWDLVGN NIPVFFIQDAIKFPDVIHALKPEPHNEMPQAQTAHDNAWDFIS
 LHQQATHMQQWVTS DRAIPRSYRMMQGFVHTFRLINEEGKSTFVKYHWI PHLGIHSLVWDEALKI
 AGQDPDFHRRDLWDAIEAKAYPKWELGVQLIKEEDEHKDFDILDSTKI IPEELVPVQKIGTTLTLT
 RNPVDFFAEVEQVAFCTQHIVPGMDFTD DPLLAGRNF SYADTQISRLGANWHDLPI NRPICPVMTN
 RFDGQMSMF SKTNRTPYHPNRHDSLPLTSSNNGGFQSYREKISGVKERLNGPKFQEFYSQATLFWN
 SMSETEREHI IAAYNFELSHCAEDIVI QNVINS LNEIDHGLATSVHATFPHLTLPEAKPTHNKKSE
 YLSQINGKHQVFTASGRRIGIYLVPGYTYSQVVPLLA AFEADGCMVKF IGPTLGP IKASNGQSFTA
 EFTFEGCRTTFFDAIVFVGGPDDSFIAKLKIGRLIHAAREAYMHLKPIGV LGNATQWMVNTCLPGD
 FSEKTKTESSVVVENG VVFAPGDPTLHSIKFAKQFLEGVV AHRVWDRQVAHIAA

>5218|PoKat02 [Pleurotus ostreatus] Catalase; complete.

MSSVTA AAKQAVSSITDNAKMASLTQFRVEC GPSQRMTT DQGLHVADTDNCNSNVGPALLE DH IAR
 EKIMRFDHERIPERVVHARGAGAHGYFKAYDSSAEQWTKAKVLM DP SRTTPV FVRFSTVQGSRGSA
 DTVR DVRGF AVK FYTEEGNWDIVGN NIPVFFIQDAIKFPDI IHAVKPEPHNEVPTGQSAHNNWFDF
 VGLQPE SAHMIMWVMS DRAIPRSYRMMQGFVNTYTLLNATG EKHFVKFHWIPELGVHSLVWDEAL
 KIAGQDPDFHRKDLNEAIE SGAYPKWR LALQVISEKDEHNDFDILDATKI WPEELVPLHFV GEMV
 LNKVVDEYFAEVEQVAFCTSNIVPGI GFSDDPLLQGRNF SYLDTQLSRLGINWQQIPI NRPVCPVM
 FNRQDGMQMKIHKGTVNYWPNRQEAVQPVAVSEGGYDDHVRKISGIAQRMRGPKFNEHYSQAQLF
 YNSLSPTEQTHLQSALAFELSHCEDPAVYRNYINILNNIDYQLAKYVAVAVGGDV PDASAKPNEGN
 KSARLSQVYYAPKEPTIKGRRIAILLADGFDKAEVVAIKALIT SASANAFVIGPRRGKVYAAGEKI
 GVEGGGIDADHHFEGQRSTMF DALVIPSGEHVALLMKS GRAVHWLREAFGHCKAIGAVGEA IILFVQ
 QAINLPEVQYADPTDSSMEVVASYSVVTTAHYGVSTAIGDATKMTL NIGEKGFMERFAYEVSKHRC
 FKREEDGLTARIAY

>5369|RoKat02 [Rhizopus oryzae] Catalase; complete.

MSNP THSSSQPPITNVNTVVDNQGTQETTQFGTKVDTRDSL TAGERGP IIMEDFAFREKITHFGTI
 PERVVHARGFGVHGYFQPYKDWSELTC AKFLCDPNKKT P V FVRFSTV LGNRGSSD TVR D VRGFATR
 FYTEEGNF DLVGN DVAPFFVQDAIKFVDLIHAAKPEPNKDVPQAATAHNTAYDFFSRQPESIHTVL
 WALSGRGT PKSLRQVEGFVHTMRLINEQGKSVFVKFHWKPCQGLNCL EWDEAKKINGNDP DFHRN
 DMYT AIEKGHYPEYEFVQI IPEEDEDKFEFDLLDSTKIVPE SLVPVTP L GKMLVLRNRPDDFFGES
 EQVTFHVAHIVRIGITDDPLLQGR LFSYTD TQINRMNSANYHQIPI NRPI TPVHNNNREGFMNFN
 VHKGAVSYYPNAMQNNKPEPVSPKDG GYIEPPQRVNGIKQRGKHGKKLEYFAQAQLFYNSLT THEQ
 QLLINNTRFELGKCTDLNVRQNFV TLLNHVDFNLAVRVANGIGVKAPEK PANENK KQT SVGLS IEN
 YKRPNHIAKAKTVAIIVAPGIDV NQASDMYKFLSNEGALVDYVGP TVGDFEGLPIKQTF LTSSSVLY
 DAVFVPNGEADAFYKMLEPCPAFPYGEPIQFIFD TYRHGKPLAVSGNATGLLKA AHVPVYNSKEDQ
 EKYGICTADDLNQLKADFKKAI I IQRFWARIPLDPDAKESPTAASIV IEN

>5282|HsKat01 [Homo sapiens] Catalase; complete.

MADSRDPASDQM QHWKEQRAAQKADVLT TGAGNPVGD KLNVIITVGP RGPLLVQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDRPRGF
 AVK FYTEDGNWDLVGN NTPIFFIRDPILFPSFIH SQKRN PQTHLKD PDMVWDFW SLRPESLHQV SF
 LFS DRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLSQEDPDYGI RD
 LFNAIATGKYPSWTFYIQVMTFNQAETFPFN PFDLTKVWPHKDYPLIPV GKLVLRNRPVNYFAEVE
 QIAFDPSNMPPGIEASPDKMLQGR LFAYPDTHRRLGPNYLHI PVNCPYRARVANYQRDGP MCMQD
 NQGGAPNYYPNSFGAPEQQPSALEHSIQYSGEVRRFNTANDDNVTQVRAFVNVNLNEEQRKRLCEN
 IAGHLKDAQIFIQKKAVKNFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAEKPKNAIHTFVQSGSHLAAREKANL

>6420|MmulKat01 [Macaca mulatta] Catalase; complete.

MADSRDPASDQM KHWKEQRAAQKADVLT TGAGNPVGD KLNVIITVGP RGPLLVQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDRPRGF
 AVK FYTEDGNWDLVGN NTPIFFIRDPILFPSFIH SQKRN PQTHLKD PDMVWDFW SLRPESLHQV SF

LFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFVKLVNAEGKAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLSQEDPDYGIRD
 LFNAIATGNYPSSWTFYIQVMTFNQAETFFPNPFDLTKVWPHKDYPLIPVGLKLVNRPVNYFAEVE
 QIAFDPSNMPPGIESSPDKMLQGRLFAYPDTHRHRLLGPNYLQIPVNCYPYRVRVANYQRDGPMMQD
 NQGGAPNYYPNPNSFGAPEQQPSVLEHSTQYSGEVRRFNTANDDNVTQVRAFVYVNLNEEQRRKRCEN
 IAGHLKDAQIFIQKAVKNFTFVHPEYGSRIQTLLEDKYNKAEKPKNAIHTFVQSESHLAAREKANL

>5277|XlKat01 [*Xenopus laevis*] Catalase; complete.

MANNKEKADTQMNQWKETRGSQKPNVLTGAGHPVGDKNLNLTVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDR
 ERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITQYCKAKVFEKVGKRTPVAAARFSTVAGEAGSPDTRDPRGF
 AVKMYTEDGNWDLTGNNTPIFFIRDAILFSPFVHSQKRNPOTHMKDPNMVWDFWTLRPESLHQVSF
 LFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFVKLVNCKDEAVYCKFHFKTDQGIRNLTVERAEQLAASDPDYGIRD
 LYEAIAAGNYPSSWTLYIQTMTFQQAEEKFPNPFVTKVWPHGDYPLIPVGMVLSQNPKNYFAEVE
 QLAFDPSNMPPGIEPSPDKMLQGRLFSYDPDTHRHRLLGPNYLQIPVNCYPYRVRVANYQRDGPMMQD
 NQGGAPNYYPNPNSFSAPEQQPQFKEHKFRVSADVDYNSAVDDNVTVRDFYVNLNEEQRRKRCEN
 LAGHLKCEQLFIQKRAVKNFSDVHLDYGSRIQALLDKHNAKCTKKECARPNTQHSSYLTSKEKSNL

>5267|AaeKat01 [*Aedes aegypti*] Catalase; complete.

MSRNPAENQLNLFKESQKDKSVATTGNGAPLGTKTATATVGERGPVVLQDVHFLDEMAHFDRERIP
 ERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITQYCAAKVFEKVGKKTPLAVRFSTVGGESGSADTARDPRGFVAVK
 YTDGVDLWLVGNNTPIFFIRDPILFSPFIHTQKRNPATHLKDADMFWDFISLRPESTHQVMFLFAD
 RGIPDGYRFMNGYGSHTFVKLVNAQKPVYCKFHFKSNQGIKNLEARRADELAGSDPDYSIRDLYNA
 IAKGECPSWNLKIQVMTFEQAEQHSFNPFVTKVWPNQNEFPLIPVGRMVLDRNPNYFAEVEQIAF
 APSHLVPGIEASPDKMLQGRLFSYADTHRHRLLGANYLQIPVNCYPYRVSMMKNYQRDGPMMVTDNQQG
 APNYYPNPNSFGGPEPCGFAHKLQNSKFNVSQDVNRVESGETEDNFAQPGIFYRRVLDEAARERMITN
 MVNHMSAASPFIQERAVQNFQVDADFGRRLTEGLKLRSAKM

>5273|DpKat01 [*Drosophila pseudoobscura*] Catalase; complete.

MAARDAASNQLIDYKNTQTVSPGSIITGHGSPIGIKDATQTVGPRGPVLLQDVNFLDEMAHFDRERIP
 IPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDISKYCAAKMFDKVKKRTPLAIRFSTVGGESGSADTARDPRGFVAVK
 KFYTEDGVDLWLVGNNTPIFFIRDPILFSPFIHTQKRNPATHLKDPMFWDFLTLRPESTHQVCFLE
 GDRGTPDGYCHMNGYGSHTFVKLVNAKGEPIYAKFHMKTQDQGIKNLDVKADELASSDPDYSIRDLY
 NRIKTCCKFPSSWTFYIQVMTFEQAEAKKFKYNPFVTKVWVSHKEFPLIPVGLKLVLDNRPNYFAEVEQI
 AFSPAHLVPGIEPSPDKMLQGRLFSYSDTHRHRLLGPNYLQIPVNCYPYRVRVNNFQRDGLMNVTDNQ
 DGAPNYFPNSFNGPQECPRARALSTCCPVTGDVYRYSSGDTEDNYGQVTDVFWHTLNDNCARKRLVA
 NIAGHLNNASQFLQERAVKNFTQVHADFGRMLTEALNLAKSSKF

>5270|HcoKat01 [*Haemonchus contortus*] Catalase; complete.

MPKYDPSDLQLQNYKSGQPNPKVMTTNSGAPIANKTNVLTGPRGPMLMQDVVFMDEMAHFDRERIP
 PERVVHAKGGGAHGI FEVTHNITKYCKADIFSKIGKQTPCFVRFSTVGGESGSADTARDPRGFVAVK
 FYTEEGNWDIVGNNTPIFFIRDPMQFPNFIHTQKRNPATHLKDPMWDFWGLRPESTHQVMFLMS
 DRGTPDGFRRMNGYGSHTFVKLVNAKGEPIYAKFHMKTQDQGIKNLSAEDAARLSGEDPDYSIRDLYNA
 IERGDFFQWKLHIQVMTFEQAEWRNLNPFVTKVWPHSEFPLIPVGTMTLNRNPNYFAEVEQAAF
 SPAHVVPGIEFSPDKMLQGRLFSYTDTHFHRLLGPNYNQLPINCPRARAHNTQRDGAACYDNQNA
 PNYFPNSFNGGVECTRSAESRWSTAGDVARHESIDENNFEQPRLFWKVLNNDERERLVENIFSTM
 KDCKQFIQDRAIQNFTKVHPDFGNKLRKKIDAYNSNRGIRHHI

>5264|PtetKat01 [*Paramecium tetraurelia*] Catalase; complete.

MSDNSDNVLTQSTGCPVDDNQNSLTAGEYGPILLQDTHLIDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAYGY
 FEVTGDTVTKYTKAKFLDVTGKRTPIFTRFSTVGGEEKGSADSERDPRGFVAVKFYTEEGNYDMTGNNT
 PVFFIRDPKSKFPDFIHTQKRNPATHLKDANMFWDFLSLVPESAHQVTILFSNRGTPNGYRHMNGYT
 SHTFRWVNKEGEAFWIKLHFKTDSGNKTFGTGAEADELKRTNADYATQDLFEHLATGKTATWTVQVQ
 VMPEQDGFYKWNIFDVTKVWPHSDYPCLNFGKMLNRPENYFQVEVQSAFSPGHLVPGIEPSLD
 KMLQGRLFSYDPDTHRHRLLGTYTQLPVNCPYRVRVINQQRDGPQSYNNQGNRPNYEPNSFQPLKMI
 PETKTSQYRVVTGLIGRYKPSHPNDDFAQPGVLYRKMNDFERQWLITNIVGNLKNANRVIQERQVK
 VFTKCDPEYGEKIAOQGLGFPNNKARL

>4097|TthKat01 [Tetrahymena thermophila] Catalase; complete.

MTDTKNTSVLTTSTGSPVDDNQNSVTAGEYGPVLLQDFHLIDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAWG
 YFEVTHDVTKFKAKVFETVVGKRTPVFTRFSTVGGGKGSADTERDPRGFVAVKFYTEEGNWDVMVGN
 TPVFFIRDPIKFPDFIHTQKRNPQTNLKCANMFWDFFGSESAHQVTILFSDRGTDPGYRRMNGYSS
 HTFKWVNEQGEAFVWKLHFKTDSGIKNFTAEEADALKSTNPDYATEDLDFKHIAQGGASWTLNVQV
 MPINDGYKYRWNI FVDVTKVWPHGDYPLIPVGGKLVLRNPNPENYFAETE QSAFSPSHLVPGMEPSLDK
 MLQGRLFSYPDTHRHRGLGANYDQIPVNCOPYRARVSNNQRDGPVCVNGNQGSKVNYEPTTFHNYKVR
 PETKLSTQTLTGLVGRFKPAHPNDDFSQPGALFRKVMSDKDKSNTVSNIVGHIKNANRDIQERQVR
 IFYKCDAEYGSKIATALGFANRNL

>4096|DdKat01 [Dictyostelium discoideum] Catalase; complete.

MSAPVLTSSGSPIDNNLNSMTAGVNGPILIQDFTLIDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAHGYFEV
 TSSDVPKCKAKFLNKVGRTPIFTRFSTVGGGKGSDDSERDPRGFVAVKFYTEEGNFDVMGNNTPV
 FFIRDPSKFPDFIHTQKRNPQTNCKDPNMFWDFLGQTPPESTHQVSILFSDRGTPKSYRHMHGFSH
 TLKFNVAQGKPYWVKLHFTSETGIQNYTAEAAKMSMNDDPSATRDLEFETIAKGGEPWVKVSIQLM
 EFEDALKYRFNPFVTKIWSHKDYPLIQIGRMVLRNPNPENYFAEVEQAAFSPSHMPGIEPSPDKM
 LQGRLFSYPDTHRHRGLGVNYQQIPVNCOPYFAVKGKGVNYQRDGFMAVNGNGGKGPNYQPNFSGGPEP
 HPEFAQHKFDVSGFAARQPNHPNDDFVQPGDLYRLMSEDAKSRFVSNLVGHMSGVTIKEIQVRAV
 SNFYKADKDLGARLCKGLGIDVNDVIKFAARNL

>5142|AtKat01 [Arabidopsis thaliana] Catalase; complete.

MDPYRVRPSSAHDSPFFTTNSGAPVWNNSSLTVGTRGPILLEDYHLLLEKLANFDRERIPERVVHA
 RGASAKGFFEVTHTDITQLTSADFLRGPVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGN
 FDLVGNFVFFVVRDGMKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRILDFSSHPELHMFSLFDDLGIPQD
 YRHMEGAGVNTYMLINKAGKAHYVVKFHWKPTCGIKCLSDEEAIIRVGGANHSATKDLYDSIAAGNY
 PQWNLVQVMDPAHEDKFDPLDVTKIWPEDILPLQPVGRLVLRNKNIDNFFNENEQIAFCPALVV
 PGIHYSDDKLLQTRIFSYADSQRHRLGPNYLQLPVNAPKCAHHNNHHDGFMNFMHRDEEVNYFPSR
 LDPVRHAEKYPTTPIVCSGNREKCFIGKENNFKQPGERYRSWSDRQERFVKRFVEALSEPRVTHE
 IRSIWISYWSQADKSLGQKLATRLNVRPNF

>5625|NtKat01 [Nicotiana tabacum] Catalase; complete.

MDPYKYRPSAFAFNSPFCSTNSGAPVFNNSSLTVGARGPVLLEDYHLLVEKLANFDRERVPERVVHA
 RGASAKGFFEVTHTDITHLTCADFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGN
 FDLVGNFVFFVIRDGMKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRVLDFFSHVPESLHMFSLFDDIGIPQD
 YRHMDGSGVHTFTLINKAGKSTYVVKFHWKPTCGVKSLLLEEAARIGGANHSATQDLYDSIAAGNY
 PEWKLFIQTMDDHEDRFDFDPLDVTKTWPEIDILPLQPVGRLVLRNKNIDNFFNENEQLAFCPISIV
 PGVYYSDDKMLQTRIFSYSDTQRYRLGPNYLQLPANAPKCAHHNNHYDGSMMNFMHRDEEIDYFPSR
 YDPVRHAEKYPIPTMCTGKREKCVIQKENNFKQPGDRYRSFTPDQRERFIRRWVEALSDPRITYE
 IRTIWIWISYWSQADKSLGQKLASRLNVRPSI

>5145|OsKat02 [Oryza sativa ssp japonica cv Nipponbare] Catalase; complete.

MDPYKHRASSGSNSTFWTTNSGAPVWNNNSALTVGERGPILLEDYHLIEKLAQFDRERIPERVVHA
 RGASAKGFFEVTHTDISHLTCADFLRAPGVQTPVIVRFSTVVHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGN
 FDLVGNMPPGFFIRDGMKFPDMVHAFKPSPKTNMQENWRIVDFFSHHPESLHMFSLFDDVGIPLN
 YRHMEGFGVNTYTLINKDGKPHLVKFWKPTCGVKCLLDEAVTVGGTCHSHATKDLTDSIAAGNY
 PEWKLYIQTIIDPDHEDRFDFDPLDVTKTWPEIDILPLQPVGRMVLNKNIDNFFAENEQLAFCPAIIIV
 PGIHYSDDKLLQTRIFSYADTQRHRLGPNYLMPLVNAPKCAHHNNHHDGSMNFMHRDEEVNYFPSR
 FDAARHAEKVPIPPRVLTGCREKCVIDKENNFQQAGERYRSFDPARQDRFLQRWVDALSDPRITHE
 LRGIWISYWSQCDASLGQKLASRLNLKPNM

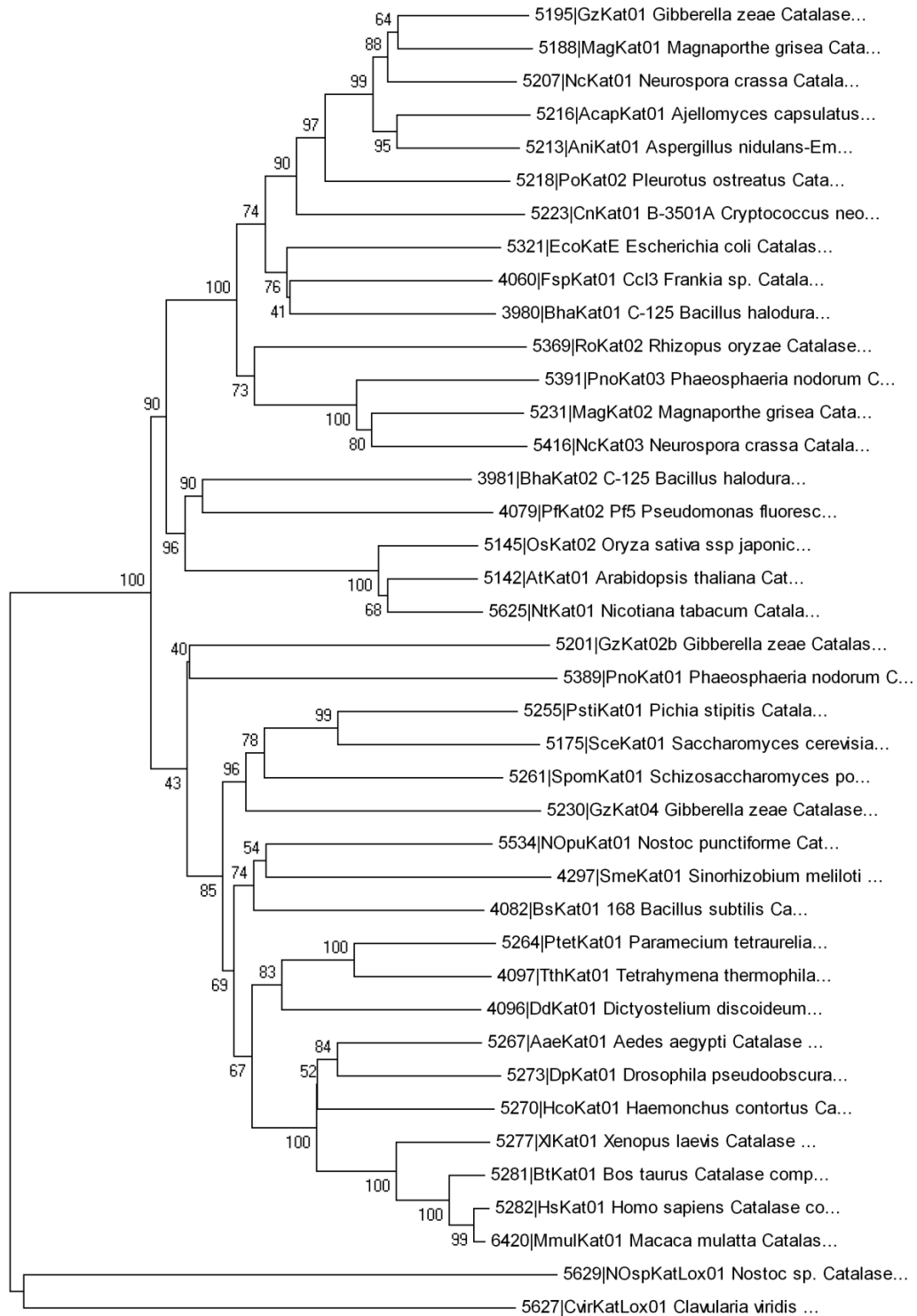
>5629|N0spKatLox01 [Nostoc sp.] Catalase-lipoxygenase fusion; complete.

MDLNITYLKLNLNLLDSESQIMLELQAMFSAAGLALRGRGTHTDGIIVKGNLTVLHSSDVPSHSLFT
 PGKKYDVIFRHANIVGGAKDDALINGRGSAIRIGNIGDDLKPRLLDLVLTGVEVGLPTARLYHQ
 FFGSDFHQKSDMLASGSLRRYAVEAALRNPDSTFTELYYHTQLCYEWVDSKSKSRARFRLLNPNQS
 TEGGLLDDSVEIGPRLVLPKRKRGDTREKNYLNRNEFRQRLTDGNIVEYVLQAQFRSIEDVAVDCSNI
 WDPNTYPWLDIAAIVLNQDESENDYYQEIAYNPGNTHYDLKLPNSYSVDDFASLGVSGALVHYFGS
 IVRAERTQYLYGSKDDLPGKPVYFPLPVTEIPSKRFLFLLEKYNFLT DNSYPSDGEHDKIEALVSA
 MPTTALDLAVGTTDPTDIPDSYFLERRLNGYNPGAIRESSGQEGWTHELTHNLAKYDIKPGLHFPD
 FVQCRLFVDKQNGVKLHSIKIDDHEITPCQEQWQYAKRTYLQAEFLSQELKLHLARCHFNIEQYVM
 AIKRLAPTHPVRAF INPHLEGLIFINSSAVPKIIGSTGFIPIASMLTQGSIVDVMKNELSKLSYM
 WNPIADLPRDIPGDLFTPAATAYWELLNMYVEQGLLQPFEDLRTEVNAIQVDELFAELKERSLYS
 GDQPPKYDSSELKSLLMYIIYHSSFLHSWANFKQYDDAGNPNHVSMDGYSQYDQQTQDKIRFSQRS
 LTWVLSIRYNSVAVYGSDDLKQLIREKSSILEPGLPLEDLMMSINI

>5627|CvirKatLox01 [Clavularia viridis] Catalase-lipoxygenase
 fusion; complete.

MVWKNYGFEIFAEKFGKEELEKRIQDELKPPADAPLFGRLKLMKKEKFKSLFLLGTTLKGFRRAT
 HTVGTGGFGEIKIVDNPKFPEHEFFTAGRKFPARLRHGDLDKFMDDAGSDARSFSIKFADSDSE SPL
 DIIMNTGEANIFWDTESLEDFVPVKEGDTAKEYVFKNPYYYYNLI EALRRAPDTFAHLYYYSQLTM
 PFKAKDGKVRYCRYRAIPGDVDIKEEDESGRLETEEQRKIWIWFSRHEDEKRPVDYLQQEYVERLTK
 GPVNYRLQIQIHEESPNDTATIFHAGILWDKETHPWFDLATVTITTPPLSPDLERTGFNIVNQPDS
 LGLFDAKSPEDYNSIGEIRVAVYSFVQHVRKLRGSLIPAGQNANYNIEIETGDREHAGTDATITI
 RITGAKGRTDYLLKDKWFHNDFERGSKDSYQVEAFDVGDIQLIEIHSQGGYWSGDPDFVNVKVI
 MSSSQDRVYSFPCYRWI IKDIVLFPGEATLFPFYQVPAIVSEQRQRELEQRKVTYQWDYVSDMPGN
 IKAAKHSDLPRDVQFTDEKRSYQESRKEALVNLGIGSFFTLFEDWDDYDDYHILYRNWILGDTPN
 MASKWNEDRWFGYRFLNGANPVVLRNCDALPDNFPVTNDDVSASLDRGKTLKEEIEDGHIYLADFK
 ILEGARCYGGPIVEDSGYSVPDELNNDEADVRYCAAPLALLYVNVKVGHLMPIAIQINQDPGPENPI
 WTPHEPNEHDWMLAKFWLAVAESNFHQLNTHLLRTHLTTESFALSVWRNLASHPVFKLLQPHIYG
 VLAIDTIGRKELIGSGGIVDKSLSLGGGGHVEFMEKCFKTVNLQDYNLPLKLLKRGVDDSSKLPGY
 YYRDDGLALWETIEILVTDIIGIYYKNDDVVKRDNEIQSWIYDVHKNGRVNPGHEDHGVPASIVS
 REHLIEILTSLIFTFSCQHAAVNFSQKDHFGFTPNAPAILRQPPPKKKGDAKLSIMSTLPSKAQA
 AKAIATVYIILTKFSEDERYLGNYSSSTAWEDNEALDAINRFQDRLEDISMKIKERNKNLEVPYYYLL
 PERIPNGTAI

Ek-8 Minimum Evolution ile Oluşturulan Filogenetik Ağaç



Ek-9 Maksimum Parsimoni ile Oluşturulan Filogenetik Ağaç

