

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMOFİLİK *Anoxybacillus amylolyticus* BAKTERİSİNİN *gchI*
GENİNİN KLONLANMASI VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU

Müride KALEMCI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

JÜRİ ÜYELERİ

Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN

Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK

RİZE-2020

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus Amylolyticus* BAKTERİSİNDEN *gchI* GENİNİN
KLONLANMASI VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ danışmanlığında, Müride KALEMCI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından 31/01/2020 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı Soyadı

İmza

Başkan

: Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ



Üye

: Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN



Üye

: Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK



Doç. Dr. Berhat KALAYCI
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ


Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında “Termofilik *Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinden *gchI* Geninin Klonlanması ve Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, danışmanlığımı üstlenen hocam Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ, çalışmalarında yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hakan KARAOĞLU’na ve Dr. Öğr. Üyesi Esmâ AKYILDIZ’a teşekkür ederim. Bu süreç boyunca yanımda olan başta Züleyha AKPINAR olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma verdikleri destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca bu zamana kadar maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Müride KALEMCİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Termofilik *Anoxybacillus amylolyticus* Bakterisinden *gchI* Geninin Klonlanması ve Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 09/01/2020


Müride KALEMCI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TERMOFİLİK *Anoxybacillus amylolyticus* BAKTERİSİNİN *gchI* GENİNİN KLONLANMASI VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Müride KALEMÇİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Bu çalışma, fenilketonüri metabolizmasında görevli birinci enzim olan GTP siklohidrolaz I'in termofilik *Anoxybacillus amylolyticus* bakterisinden klonlanmasını, ekspresyonunu ve enzimin saflaştırılarak biyokimyasal karakterizasyonunu içermektedir. *A. amylolyticus* bakterisinden PZR ile tespit edilen *gchI* geni 561 baz çifti büyüklüğünde toplam 186 amino asidi kodlayan tek bir açık okuma dizisidir. GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşümünü katalizleyen enzim gen ekspresyonu pET28a(+) vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresinde 1 mM IPTG ile induksiyonu sağlandı. Enzimin saflaştırılması için Ni-NTA afinite kolonu kullanıldı. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda enzimin V_{max} 'ı $6,9 \times 10^{-5} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ $\mu\text{M}/\text{dk}/\text{mg}$ protein ve K_m 'si $7,0 \pm 1,4$ mM olarak bulundu. Enzim en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 70°C ve en uygun pH değeri ise 7,0 olarak belirlendi.

2020, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: *A. amylolyticus*, GCHI, BH4, Termozim.

ABSTRACT

CLONING OF *gchI* GENE FROM THERMOPHILIC BACTERIUM, *Anoxybacillus amylolyticus* AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Müride KALEMCI

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

This study was included the cloning, expression and biochemical characterization of *gchI* that was coded the first enzyme responsible for phenylketonuria pathway, from thermophilic *Anoxybacillus amylolyticus*. This gene was 561 basepairs by detected PCR and its open reading frame has 186 amino acids. This enzyme catalyzed from GTP to dihydroneopterin triphosphate. We cloned into pET28a(+) expression vector and transform in *E. coli* BL21(DE3)pLysS host cells to express with 1 mM IPTG induction. The purification of the enzyme was achieved by Ni-NTA affinity column chromatography. We determined that its optimum pH was 7.0 and temperature is 70°C. Under optimal conditions, GCH-I exhibited a low enzymatic activity with K_m - and V_{max} - values of $7.0 \pm 1,4$ mM and $6,9 \times 10^{-5} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ $\mu\text{M}/\text{dk}/\text{mg}$ protein, respectively..

2020, 61 pages

Keywords: *A. amylolyticus*, GCHI, BH4, Thermozymes.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	11
1.1. Giriş.....	11
1.2. Literatür Özeti.....	12
1.3. BH4 ve Sentezi.....	15
1.4. GCH I Enzimi.....	16
1.5. Termofilik Bakteriler ve Enzim Biyoteknolojisindeki Rollerini.....	18
1.6. <i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri.....	20
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	20
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	21
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	21
2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Kaynak Bakterinin Kültüre Edilmesi ve Genomik DNA İzolasyonu.....	22
2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	23

2.2.3.	<i>gchI</i> Geninin Tespiti ve Klonlanması.....	23
2.2.4.	Genin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	29
2.2.5.	<i>gchI</i> Geninin Ekspresyonu.....	33
2.2.6.	Proteinin Saflaştırılması	33
2.2.7.	Proteinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
3.	BULGULAR.....	39
3.1.	Kaynak Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu ve <i>gchI</i> Geninin PZR ile Tespiti.....	39
3.2.	PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Klonlanması.....	39
3.3.	Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi.....	40
3.4.	<i>AagchI</i> Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi	40
3.5.	<i>AagchI</i> Geninin Ekspres Edilmek Üzere pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu.....	41
3.6.1.	Enzimin Aktivitesine pH Etkisi	43
3.6.2.	Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	44
3.6.3.	Enzimin Kinetik Parametre Değerleri	45
3.6.3.	Enzimin Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi	47
3.6.4.	Enzimin Aktivitesi Üzerine Diğer Adjuvantların Etkisi	50
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	52
5.	ÖNERİLER.....	55
	KAYNAKLAR	56
	ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fenilalaninin, fenilalalinhidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüşümü.....	11
Şekil 2. GTP'den BH4 biyosentezi.....	16
Şekil 3. GCHI enziminin GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşüm mekanizması.	17
Şekil 4. pGEM-T/Easy vektör sistemi ve klonlama bölgesi.....	26
Şekil 5. Ekspresyon için kullanılan pET28a(+) vektörü ve klonlama bölgesi	31
Şekil 6. <i>A. amylolyticus gchI</i> geninin PZR sonucu.....	39
Şekil 7. <i>A. amylolyticus gchI</i> genini taşıyan pGEM-T/Easy plazmidinin <i>NcoI</i> ve <i>XhoI</i> enzimleri ile kesimi	40
Şekil 8. pET28a(+)/AagchI'nin kesim ile doğrulanması.....	42
Şekil 9. PAGE Jel Elektroforez Görüntüsü.	42
Şekil 10. Enzime ait pH grafiği	44
Şekil 11. Optimum sıcaklık bağıl aktivite grafiği.....	45
Şekil 12. GCH-I enzimine ait aktivite grafiği.....	46
Şekil 13. NH ₂ TP (nM) Standart grafiği.....	46
Şekil 14. K ⁺ un enzim aktivitesine etkisi	47
Şekil 15. Mg ⁺² un enzim aktivitesine etkisi	47
Şekil 16. Ca ⁺² un enzim aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 17. Fe ⁺³ ün enzim aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 18. Na ⁺ un enzim aktivitesine etkisi.....	49
Şekil 19. Cu ⁺² ın enzim aktivitesine etkisi	49
Şekil 20. Zn ⁺² nun enzim aktivitesine etkisi	50
Şekil 21. EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi	50
Şekil 22. SDS'in enzim aktivitesine etkisi	51

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>A. amylolyticus</i> DSM15939 bakterisine ait <i>gchI</i> 'e ait DNA baz sırası.....	24
Tablo 2. <i>AagchI</i> 'e ait DNA ve aminoasit sırası	41



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ L	Mikrolitre
amp	Ampisilin
<i>A. amylolyticus</i>	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>
APS	Amonyum Persülfat
bp	Baz Çifti (basepairs)
BH4	Tetrahidrobiopterin
dak	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FKU	Fenilketonuri
GCHI	Guanozin Trifosfat Siklohidrolaz-I
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
GTP	Guanozin Trifosfat
HPA	Hiperfenilalanemia
IPTG	İzopropiltiyu-beta-galaktozid
kan	Kanamisin
kb	Kilobaz
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani Agar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
OD	Optik Yoğunluk (optic density)
pDNA	Plazmid DNA
PTPS	Pirüvoil-Tetrahidropiterin Sentaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı (revolutions per minute)
rRNA	Ribozomal RNA
SDS-PAGE	Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA

TEMED

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

U

Ünite

UV

Ultraviolet



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Fenilketonüri (FKU) hastalığı, otozomal resesif olarak aktarılan metabolik bir rahatsızlıktır. Bu hastalık bir karaciğer enzimi olan fenilalaninhidroksilazın (PAH) sentezlenememesi veya enzimin yeterince aktivite gösterememesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 1). Hasta bireyler fenilalanin amino asidini metabolize edemezler. Bunun sonucunda fenilalaninin tirozine dönüşmesi engellenir. Kanda ve diğer vücut sıvılarında çoğalmış fenilalanin ve onun ürünleri farklı dokularda, beyin-omurilik sıvısında (BOS) toplanarak hasara neden olmaktadır (Kazancı, 2018). Hastalık diyet tedavisi ile engellenebilen önemli genetik rahatsızlıklardan birisidir. Ülkemizde görülme sıklığı oldukça yüksek olan bu hastalığın Avrupa ülkelerindeki görülme oranı ortalama 1/10.000 iken (Almanya 1/9.000, İngiltere 1/10.000, Fransa 1/18.000, İtalya 1/7000) Türkiye’de görülme oranı 1/4500’dir. Her yıl ülkemizde 250-300 çocuk fenilketonurili doğmaktadır. Her 20-25 kişiden birinin hastalığı taşıyor olması ve ülkemizde akraba evliliklerinin fazla olması fenilketonürinin sık görülmesine neden olmaktadır (Koyuncu, 2010).



Şekil 1. Fenilalaninin, fenilalaninhidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüşümü (Kazancı, 2018)

Fenilalanin hastalığı bir kofaktör olan tetrahidrobiopterin (BH4) sentezinde veya indirgenmesinde rol alan enzimlerin eksikliğinde de ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın en önemli bulguları ağır zihinsel özür, nörolojik ve gelişimsel bozukluklardır. Eğer hasta tedavi edilmezse mental ve motor gerilik gibi klinik bulgular görülmeye başlamaktadır. Bunların yanı sıra bu hastalarda genellikle açık renk saç, açık deri rengi ve mavi gözlerle karakterize pigmentasyon eksiklikleri görülmektedir (Kazancı, 2018).

Hastalıkta çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Hastaya tirozin desteğiyle diyetle fenilalanin kısıtlaması yapılır. Diğer kullanılan tedavi yöntemlerinden en önemlisi ve en yaygın olanı hasta bireylere BH4 (tetrahidrobiprotein-fenilalanin hidroksilaz enziminin kofaktörü) verilmesidir. Hasta bireylere dışarıdan BH4 yükleme testi yapılarak bu tedaviye uyumlu olup olmadığına bakılır (Pehlivan ve Kalkan, 2016). BH4 yüklemesinin yapılabilmesi için de öncelikle hastaların kandaki fenilalanin seviyesine bakılır. Bu seviyenin 400 µmol/L üzerinde olması şarttır. Ayrıca uzmanların önerisine göre bu test genotiplerinde bu tedavi yöntemine yanıt vermesi muhtemel olan hasta bireyler için uygundur (Ülker ve Şanlıer, 2018).

Tedavi edilmemiş kişilerde yüksek derecede fenilalanin çıkmaktadır. Bunun sonucunda ortaya çıkan belirtiler hafif, orta ve şiddetli olarak değişkenlik göstermektedir. Hafif seyredenlerde geçici kas tonusu görülebilir. Şiddetli seyredenlerde ise zihinsel engellilik, hareket bozukluğu, davranış problemleri, nöbet geçirme, yutma zorluğu gibi durumlar görülebilir (URL-1).

1.2. Literatür Özeti

Günümüze kadar GCH I (GTP siklohidrolaz I) enzimi ile ilgili yapılan çalışmaları ikiye ayırabiliriz. Bu çalışmalar enzim karakterizasyonu ve buna bağlı görülme sıklığıyla ilgili çalışmalardır. Çalışmamız gen klonlama ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde yürütüldü. Kullanılan GTP siklohidrolaz I geni ilk defa Yim ve Brown tarafından *E. coli* bakterisinden klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmaya göre doğal hali 210 kDa olan proteinin SDS-PAGE analizi sonucunda 25,5 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Bu da proteinin aynı büyüklükte 8 alt üniteye sahip olduğunun göstergesidir.

Suzuki vd. (2004) yapmış oldukları çalışmada *E. coli*'de ekspres edilen rekombinant insan DNA'sı üzerindeki GCHI'in enzim aktivitesinin etkisini incelediler. Çalışmalarında ilk olarak enzim aktivitesinin Mg^{+2} iyonu olmadan GTP konsantrasyonuna bağlı olarak çalışabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca çalışmada Mn^{+2} , Co^{+2} ve Zn^{+2} gibi katyonlarda metal içermeyen GTP substrat konsantrasyonuna bağlı olarak enzim inhibisyonuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Çinkonun kullanıldığı durumlarda ise enzim aktivitesini uyarıcı etkisinden dolayı tekrardan protein katlanmasının olduğunu göstermişlerdir.

Suzuki vd. (1979) tarafından yapılan araştırmada *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 8005 bakterisinin GCHI enzimini karakterize etmişler. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 60-65°C arasında, optimum pH ise 8,0-8,4 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. *K_m* değerini 980 μM olarak bulmuşlardır.

Hatakeyama vd. (1989), fareler üzerinde yaptığı çalışmada GTP siklohidrolaz I enziminin SDS-PAGE analizi yapmışlardır. Analiz sonrasında ağrılığının 30 kDa olduğunu bulmuşlardır. *V_{max}*'ının ise 45 nmol/dakika/mg protein olduğunu göstermiştir. KCl konsantrasyonuna bakarak kinetik özelliği değişmeden yarılanma ömrünün uzadığını tespit etmişlerdir.

Cha vd. (1991), fare karaciğerinden GCHI enzimini karakterize etmişlerdir. Ağrılığı 55,7 kDa olan enzimin optimum sıcaklık aktivitesinin 60 °C ve pH değerinin ise 8,0-8,5 olduğunu tespit etmişlerdir. *K_m* değerini 17,3 μM olarak bulmuşlardır.

Hatakeyama vd. (1991), ise farelerde GTP siklohidrolaz I genine ait cDNA'yı klonlamışlardır. Klonlama sonucunda sekans bilgisine ulaşmışlardır. Bunun sonucunda 1,2 kilobazlık tek bir mRNA'dan üretildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca cDNA'nın baz çifti büyüklüğünü 1024 baz olarak bulmuşlardır.

Babitzke vd. (1992), *Bacillus subtilis* zerinde yaptıkları çalışmada GTP siklohidrolaz I “*mtrAB*” operonunu çalışmışlardır. Operonda bulunan A geninin GCH-I enzimini kodladığını bulmuşlardır. *mtrB*'nin ise triptofan genlerinin transkripsiyonal atenasyonundan görevli olduklarını tespit etmişlerdir.

Schoedon vd. (1987), çalışmalarında *E. coli* GCHI'i üzerine araştırma yapmışlardır. Yaptıkları araştırmada *E. coli* GCHI'in farelerde bulunan enzim ile %42 oranında benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır. GTP ile birlikte UTP'nin de substrat olarak kullanılabil-diğini ve aktivitesini Michaelis-Menten Eğrisi yerine sigmoidal eğrisi olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda BH4 sentezinde rol oynayan bu ilk enzimin, son ürünü olan BH4 sayesinde 100 μM'de inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Nar vd. (1995), *E. coli* GCHI'i üzerine çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları alışma sonucunda enzimin homodekamer yapıda olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada enzimin her birinin 10 Å derinlikte cebe sahip 10 eşit büyüklükte aktif merkezinin bulunduğunu tespit etmişlerdir. alışmalarında imidazaol zincirini yıkmak için His-179 amino asidinin N7 pozisyonunda protonlandığını belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin yapısında bulunan Cys-110/Cys-181bağlanmasının da reaksiyonla ilgili olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Witter vd. (1996), *Dictyostelium discoideum* (tek hücreli cıvık mantar) üzerinde yaptıkları çalışmada 855 baz çiftlik cDNA'yı klonlamışlardır. Klonlamanın ardından mRNA'nın 232 amino asitlik GCHI enzimini ürettiğini belirlemişlerdir. İntronların 101 baz çiftine sahip olduğunu belirleyerek kalan ekzonların baz sırasının ise insan GCHI'ine %47 ve %49 oranında benzerliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *E. coli*'de ekspres edilen genin 68 kDa büyüklüğünde bir protein ürettiğini belirlemişlerdir. Maksimum aktivitesinin ise 60°C'de olduğunu ve bundan dolayı ısıya dayanıklı bir enzim olduğunu kanıtlamışlardır.

Yoo vd. (1998) yaptıkları araştırmada *Streptomyces tubercidicus* GCHI enzimini karakterize etmişlerdir. Karakterizasyon sonucu enzimin doğal yapısının 230 kDa büyüklükte olduğunu 58 kDa'luk 4 alt birimden oluştuğunu belirlemişlerdir. Ayrıca optimum pH aralığının 7.5-8.5 aralığında ve sıcaklık değerinin 40-42°C'de aktif olduğunu tespit etmişlerdir. K_m değerinin ise 80 Mm, V_{max} değerinin 90 nmol/dakika/mg protein olduğunu göstermişlerdir.

Auerbach vd. (2000), insan ve *E. coli* kaynaklı GCHI enziminin aktivasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada enzimin aktivasyonunda çinkonun önemli bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin substratı olan GTP'nin imidazol halkasındaki 8. karbon atomuna nükleofilik atağında rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Lee vd. (2002), yine *E. coli* GCHI enziminin oligomerizasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Beş dimerli yapıdan onlu yapıya kadar enzim kompleksinin oligomerizasyonunda Lys136, Arg139 ve Glu152 nolu amino asitlerinin rol aldığını belirlemişlerdir.

Woo vd. (2002), *Synochocystis* sp. PCC 6803 suşunun GTP siklohidrolaz I geni ile *E. coli* bakterisine ait 6-piroviltetrahidropterin sentaz genini yine *E. coli*'de eş zamanlı olarak eksprese etmişlerdir. Ekspresyon sonucunda sepiapterin üretimini başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

Hızal (2013) çalışmasında *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine ait GCHI enzimini karakterize etmiştir. NCBI verileri doğrultusunda primer dizayn ederek enzimin 603 baz çifti ve 200 amino asitten oluştuğunu belirlemiştir. SDS-PAGE analizi yaparak enzimin 24 kDa büyüklüğünde olduğunu tespit etmiştir. Enzimin en iyi 65°C sıcaklıkta aktiviteye sahip olduğunu ve en uygun pH değerini ise 8,0 olarak belirlemiştir. Ayrıca enzimin K_m değerini $243 \pm 23.25 \mu\text{M}$, V_{max} değerini ise $100,93 \pm 3,5 \text{ nM/dk/mg protein}$

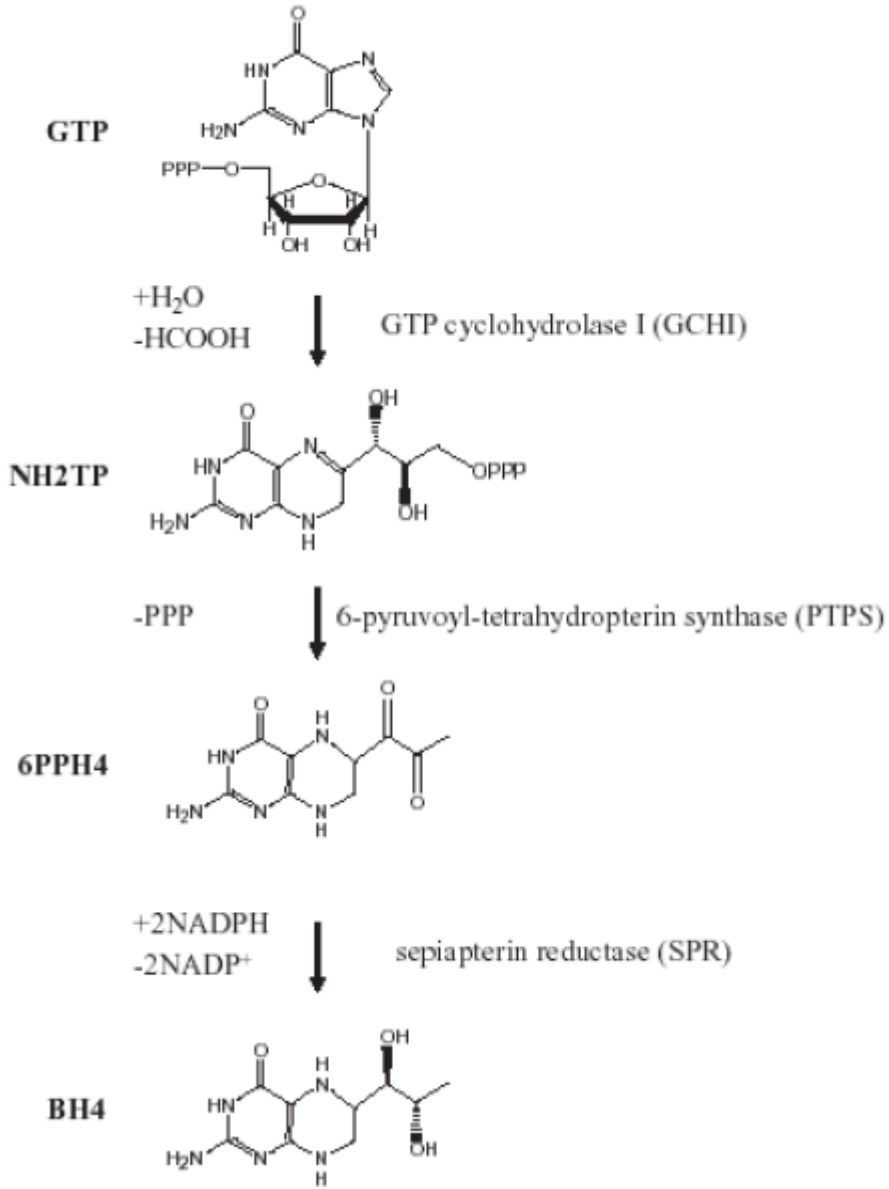
olarak bulmuştur.

Tanaka vd. (2005), çalışmalarında GCH1'in bir geçiş formu analogu olduğunu göstermişlerdir. Sırasıyla 2,0 ve 1,8 Å çözünürlükte 8-okso-GTP ve 8-okso-dGTP ile komplekslenmiş tGTPCH1'in X-ışını kristal yapılarının yanı sıra 2,2 Å çözünürlükte enzimin serbest formunu çözmüşlerdir.

Li vd. (2010), yaptıkları çalışmada S81 fosforilasyonunun GTPCH-1 enzim aktivitesini nasıl değiştirdiğini ve bunun GFRP tarafından nasıl modüle edildiğini tanımlamaya çalışmışlardır. GFRP ile etkileşim yoluyla GTPCH-I'in düzenlenmesi için yeni bir mekanizma sağlamışlardır. Bu mekanizma sayesinde GFRP negatif geri beslemesinden kaçınmasına izin verdiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda laminer kayma gerilmesine yanıt olarak büyük miktarlarda BH4 üretilmesine de izin verdiğini tespit etmişlerdir.

1.3. BH4 ve Sentezi

Tetrahidrobiopterin, guanosintrifosfattan (GTP), GTPsiklohidrolazI (GTPCH), 6-piruviltetrahidropterinsentaz (PTPS) ve sepiapterinredüktaz (SR) enzimlerinin aracılık ettiği üç kimyasal reaksiyonla sentezlenir (Şekil 2) (URL-2). *De novo* biyosentez yolu olarak adlandırılan bu reaksiyonda GCH I ve PTPS görülen genetik kusurlar hayati önem arz etmektedir (Hızal, 2013). Bu sentez yolu Şekil 2'de gösterilmektedir.

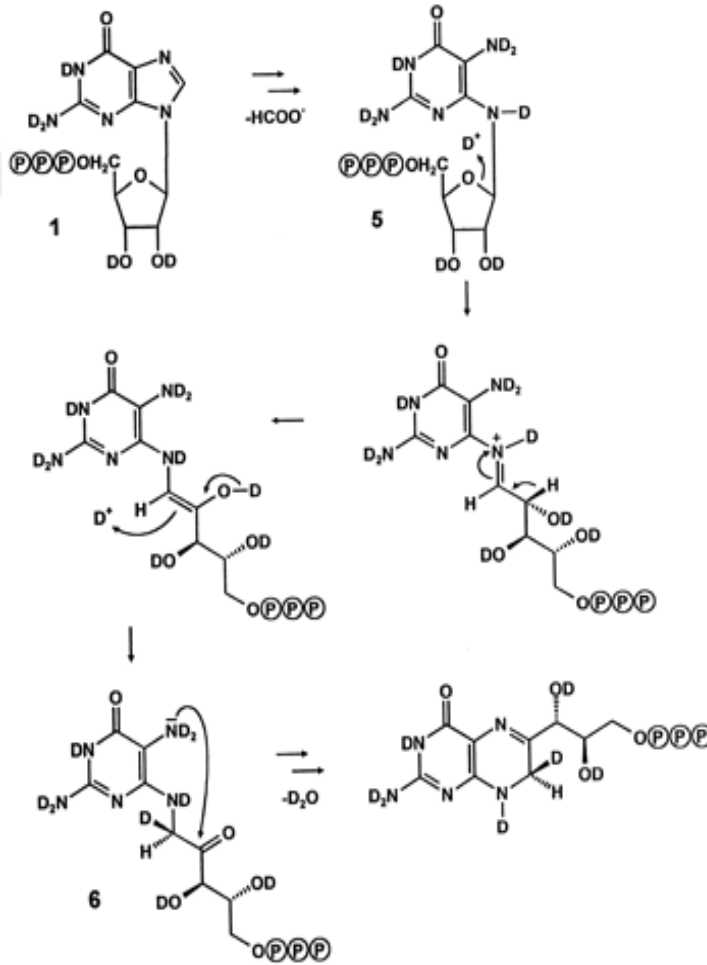


Şekil 2. GTP'den BH₄ biyosentezi

1.4. GCH I Enzimi

GCH I (guanosintrifosfatsiklohidrolaz I) enzimi GTP siklohidrolaz ailesine ait enzimlerdendir. GCH I, tetrahydrobiopterin (BH₄) biyosentezinde GTP siklohidrolaz için kodlama yapar. GTP siklohidrolaz BH₄ biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak rol oynar Vykuntaraju vd. (2019), 30 kb büyüklüğünde olan GCH1 enzimi fare, sıçan, primat, mantar, tavuk, sinek, insan gibi birçok farklı organizmadan elde edilerek

incelenmiştir. Ayrıca GCH 1 enzimi GCH, DYT5a, DYT13, guanozin 5'-trifosfat siklohidrolaz I, GTP-CH-I ve GTP siklohidrolaz I, GTP-CH-I ve GTP olarak da isimlendirilir (URL-3). Bu enzim tetrahydrobiopterin (BH4) üretiminde GTP'nin 7,8-dihidroneopterin trifosfata dönüşümünü kataliz eden ve oranı sınırlayan ilk enzimdir. Diğer enzimler ikinci ve üçüncü sırada üretime katılırlar (Şekil 3) (URL-4). Tetrahydrobiopterin vücuttaki birkaç proteinin yapıtaşının işlenmesinde rol oynar. GCHI geninde 140'tan fazla mutasyonun DOPA'ya cevap veren distoniye sebep olduğu bilinmektedir. Bu durumun oluşmasında, GCH1 genindeki mutasyonların GTP siklohidrolaz 1'in enzimdeki tekli aminoasitleri değiştirmesi neden olmaktadır. Bu durumda üretilen seratonin hareket problemlerine ve dopa duyarlı distoninin diğer karakteristik özelliklerine yol açar. Tetrahydrobiopterin ise GCH1 genindeki en az 7 protein eksikliğinden kaynaklanmaktadır (URL-5).



Şekil 3. GCHI enziminin GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşüm mekanizması (Bracher vd., 1998).

1.5. Termofilik Bakteriler ve Enzim Biyoteknolojisindeki Rollerini

İlk karakterize edilen hipertermofilik bakteri *Thermus aquaticus* bakterisidir. İlk kez 1879 yılında Miquel tarafından izole edilmiştir. Miquel, çamur, toprak, kanalizasyondan izole ettiği bakterileri toplayarak 72°C 'de yaşayabildiğini göstermiştir. Günümüzde ekstrem şartlarda yaşayabilen bakteriler bulunmaktadır. Bunlar termofil ve ekstremofil olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Bu bakteriler volkanlar, yanardağlar gibi yüksek sıcaklıkta yaşayabilen (termofiller), buzullar gibi düşük sıcaklıkta yaşayabilen (psikrofiller) ya da tuz gölü ve çevresi gibi aşırı tuzcul ortamlarda yaşayabilen (halofiller) ekstremofil bakterilerdir (Güven, 2011).

Termofiller ayrıca aşırı derecedeki asidik ve alkali ortamlara karşı da dayanıklıdırlar. Bu bakterilerin hücre zarı doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur. Zardaki bu yağ asitleri hücreye hidrofobik özellik kazandırır ve bu sayede yüksek sıcaklıkta yaşayabilmeleri için hücreyi sıkı ve stabil tutar. Termofillerin DNA'sı, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan DNA giraz bulundurur. Bu da DNA'nın erime noktasını maksimum büyüme sıcaklığına yükseltir (Haliskaranfil, 2012).

Yüksek sıcaklıklarda polimerik substratların çözünürlüklerinin artması ve istenmeyen komplikasyonlara yol açan kontaminasyon riskinin azalması gibi nedenlerden dolayı termofil organizmaların biyoteknoloji ve endüstride kullanımını artmıştır. Günümüzde termofillerin 50'den fazla türü keşfedilmiştir. Keşfedilen bu mikroorganizmalar içerisinde şu ana kadar bilinen en yüksek sıcaklığa sahip olan mikroorganizma *Pyrolobus fumarii*'dir. Bu mikroorganizma 90 derecenin üzerinde yaşamını sürdürebilir (Haliskaranfil, 2012).

Günümüzde termofilik bakteriler birçok alanda kullanılmaktadır. Bu bakterilerin kullanılmasının sebepleri şu şekilde sıralanmıştır;

- Yüksek sıcaklıklara (>50°C) direnç gösterebilen enzim taşımaları,
- Elde edilen termostabil enzimlerinin daha sağlam olması,
- Kontaminasyon risklerinin az olması,
- İstenmedik yan ürün oluşturmamaları,
- Yüksek sıcaklıklarda polimerik substrat çözünürlüklerinin artması,
- Değişik denatüre edici şartlara karşı toleranslarının yüksek olması ve doğal yapılarını korumada rol almaları
- Çözünmeyen çevresel kirlenmelerin oluşumunu engellemesi,

- Daha ucuz ve stabil olmaları,
- Yüksek saflıkta üretilebilmeleri,
- Mezofilik mikroorganizmalara göre üreme hızlarının yüksek olması, gibi nedenlerden dolayı enzim kaynağı olarak kullanılmaları tavsiye edilmektedir (Karaağaç vd., 2004; Fukara vd., 2007; Güven vd., 2011; Hızal vd., 2013),
- Termofilik bakterilerden elde edilen ticari olarak kullanılan enzimlerin başında proteaz, lipaz, amilaz, DNA polimeraz, ksilanaz, β -galaktozidaz gelmektedir (Güven, 2011).

1.6. *Anoxybacillus amylolyticus*

Anoxybacillus amylolyticus bakterisi gram pozitif, çubuk şeklinde, çiftler halinde veya filamentli bir bakteridir. Tip suşu MR3CT olan bakteri Antarktika'daki Rittmann Dağı'nda bulunan jeotermal topraktan izole edilmiştir. Büyüme sıcaklığı 45-65°C (optimum 61°C) ve pH değeri 5,0-6,5 (optimum pH 5,6)'dir. Gen dizisi benzerliği 16S rRNA ve DNA G+C içeriğinin %43,5 mol olması nedeniyle MR3CT suşunun diğer *Anoxybacillus* türleriyle yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Kemotaksonomik veriler majörizoprenoid kinon-menakinon-7; majör yağ asidi-iso-C15: 0 ve iso-C17: 0'dır. Bu verilere göre MR3CT suşu *Anoxybacillus* cinsine bağlanması kabul edilmiştir. DNA-DNA hibridizasyonu ve biyokimyasal testler yapılmış ve bu testlerin sonucunda geçerli olarak yayınlanan *Anoxybacillus* türlerinden MR3CT suşunun fenotipik ve genotipik farklılaşmasına izin verilmiştir. Bu yüzden *Anoxybacillus amylolyticus* sp. No. MR3CT türünde (=ATCC BAA-872T =DSM 15939T = CIP 108338T) önerilmektedir (URL-6).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

Çalışmamız süresince kimyasal maddeler, enzimler, gerekli malzemeler, gen aktarımı için plazmit vektörleri, konak bakteri suşları ve gen çoğaltımı için gerekli primerler kullanıldı. Kullanılan bu malzemelerele ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Akrilamid (Sigma, A8887), amonyum persülfat (Merck, A734116), amonyum sülfat (Sigma, A4418), ampicilin (AppliChem, A0839.0100), bromofenol mavisi (Sigma, B5525), KCl (Merck, K23759135), bisakrilamid (Sigma, M2022), Coomassie Brilliant Blue G (Fluka, 27815), Coomassie Brilliant Blue R (Fluka, 27816), dNTP (Promega, U120-4B), EDTA (Merck, K90262021), etanol (Sigma, A3678-1000), etidyum bromür (Sigma, E7637), glasiyel asetik asit (Merck, K19581956), gliserol (RiedeldeHaën,15524), glisin (Sigma, G7126), glukoz (Roche, 1929526), HEPES (Sigma, H0891), *Taq* DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas), KH_2PO_4 (AppliChem, A2945,100), IPTG (Sigma, I5502), izopropanol (RiedeldeHaën,24137), maya özütü (Sigma, Y4000), MES Na tuzu (AppliChem, A3101.0025), metanol (J. T. Baker, TBF0196396 1499), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED, Janssen Chimika, 13.84571), Na_2CO_3 (Merck, A339898), Na_2HPO_4 (Merck,A664174), NaCl (AppliChem, A2942,5000), *Nco*I restriksiyon enzimi (R0193S), *Xho*I restriksiyon enzimi (R0146S) pepton (Oxoid, L37), SDS (Amresco, 0227), sodyum asetat (Merck, TA404965), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, TA682332), T4 DNA ligaz (Promega, M1804), T4 DNA ligaz tamponu (Promega, C1263), tripton (Merck, V441613949), Tris-HCl (Sigma, T1503), X-gal (AppliChem, A1007.0005), O'RangeRuler 100+500bp DNA Ladder (MBI Fermentas, SM0653), β -merkptoetanol (Merck, 805740), K_2HPO_4 (Merck A0435601 442), kanamisin (Fisher Scientific 134473) ve GTP (Sigma G7127).

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada bakteri üretimi yapmak için besiyeri olarak LB (Lauria-Bertani) besiyeri kullanıldı. Bu besiyerini hazırlamak için 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 5 g NaCl tartıldı ve 1 litre distile su ile tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,4'e ayarlanarak 121°C'de 1,1 atm basınç altında 20 dakika otoklav yapıldı. 4°C'de saklandı. LBA (Lauria-Bertani-Agar) besiyeri hazırlamak için 1 litre LB besiyerine 10 g agar eklenerek aynı şartlarda hazırlandı.

Antibiyotikli besiyerleri, yukarıda hazırlanan besiyerlerine ampisilin için 50 µg/mL ve kanamisin için ise 30 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde soğumakta olan besiyerlerine steril kabin içerisinde ilave edilerek hazırlandı.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler

Genomik DNA izolasyonu için Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120), elde edilen PCR ürünlerinin klonlama ve DNA dizi analizi uygulamaları için saf olarak eldesinde PCR QIA quick Purification Kit (Qiagen, 28106) ve DNA Extraction Kit (MBI Fermentas, K0513), PZR ürünlerinin temizlenmesi için DNA Clean&Concentrator™ (Zymo Research, D4003), PZR ürünlerinin klonlanması için pGEM-T/Easy TA Cloning Kit (Promega, A1360), rekombinant plazmit DNA'larının izolasyonu için ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, D4210) ve kesim ürünlerinde jelden izolasyon yapmak için Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, D4001S) kitleri kullanıldı.

Çalışmada kullanılan vektörler ve bunların aktarımında kullanılan bakteri suşları şunlardır;

PZR ürünlerinin klonlanması için TA klonlama vektörü olarak pGEM-T/Easy (Promega, A1360), plazmit transformasyonu ve çoğaltımı için *E. coli* DH5α, GCHI enzimin üretilebilmesi amacıyla ekspresyon vektörü olarak pET28a(+) ve bu vektörün aktarımı ve gen ekspresyonunu sağlamak için *E. coli* BL21(DE3)pLysS konak hücre olarak kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kaynak Bakterinin Kültüre Edilmesi ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan *A. amylolyticus* bakterisine ait -20°C'deki gliserol stoktan 3 mL sıvı LB besiyerine ekim yapıldı ve gece boyu 55°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür 14000 rpm'de 3 dakika çöktürüldü ve elde edilen pelletten Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile aşağıdaki şekilde genomik DNA (gDNA) izole edildi.

- Eppendorf tüpe çöktürülmüş bakteri pelleti üzerine 480 µL 500 mM EDTA (pH 8,0) eklenerek pellet çözüldü,
- Elde edilen süspansiyona 60 µL lizozim (10 mg/mL) eklendikten sonra 37°C'de 30-60 dakika boyunca inkübe edildi,
- 2 dakika boyunca 13000-16000 rpm de santrifüj edilerek supernatant kısmı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı,
- Pelletin üzerine 600 µL Nuclei Lysis Solüsyonu eklendi ve pipetle dikkatlice süspanse edildi,
- 5 dakika boyunca 80°C'de inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına getirildi,
- Karışıma 3 µL RNaz solüsyonu eklendi ve 37°C'de 15-60 dakika inkübe edildi ve tekrar oda sıcaklığına gelene kadar beklendi,
- Süspansiyona 200 µL Protein Precipitation Solution eklendi ve birkaç kez alt-üst edildi,
- 5 dakika buzda bekletilerek 13000-16000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi,
- Süpernatant yeni bir Eppendorf tüpe aktarılarak üzerine 600 µL oda sıcaklığında isopropanol eklendi ve karıştırıldı,
- Tekrar 3 dakika boyunca 13000-16000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü,
- Pellet üzerine 600 µL oda sıcaklığında %70 etanol eklendi, alt üst edildikten sonra 2 dakika boyunca 13000-16000 rpm'de santrifüjlendi,
- Süpernatant kısmı atıldıktan sonra 37°C'lik etüvde kalan rezidüel etanolün tamamen uzaklaşması beklendi,

- Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellete 100 µL Rehydration Solution eklendi, hafifçe tilt edildikten sonra gDNA'nın daha iyi çözünmesini sağlamak için 1 saat boyunca 65°C'de ve sonrasında da gece boyunca 4°C'de inkübe edildi.

- İzolasyon sonrası elde edilen gDNA, % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.

- İzole edilen gDNA, herhangi bir işleme tabi tutulana kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışmamız süresince izole edilen gDNA ve plazmit DNA (pDNA) örneklerinin saflaştırılması, restriksiyon endonükleaz kesimleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonuçlarının görüntülenmesinde agaroz jel elektroforez metodu kullanıldı.

Agaroz jel elektroforezinde çoğunlukla % 0,1 oranı kullanıldı. Öncelikle istenilen hacimde uygun miktarda agaroz (Type II Medium EEO) tartılıp bir erlene dökülerek üzerine istenilen hacimde tampon % 1 TAE tamponu (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM asetik asit, 2 mM EDTA içeren 10X stoktan hazırlanan 1X solüsyon) eklendi ve mikrodalga fırında kaynatılarak polimerleştirildi. Jel elle tutulabilecek sıcaklığa gelene kadar soğutularak son hacimde 0,5 µg/mL etidyum bromür (stok 10 mg/mL) eklenerek kabarcık oluşturmayacak şekilde jel tankına döküldü.

Jele yüklenecek DNA örneğinden 5 µL alınıp 3 µL yürütme boyası (%0,25 bromofenol mavisi, %0,25 ksilensiyanol ve %30 gliderol) eklenerek pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Jelin hazırlandığı 1X TAE tamponundan jel tankına dökülerek yürütme 110 V akım ile yapıldı ve sonrasında BioDoc Analyze Jel Görüntüleme Sistemi (UVP Co., ABD) cihazıyla UV ışıkta görüntülendi, görüntü bilgisayara kaydedildi.

2.2.3. *gchI* Geninin Tespiti ve Klonlanması

2.2.3.1. *gchI* Genine Ait Primerlerin Dizaynı ve PZR ile Tespiti

gchI geninin PZR ile tespit edilebilmesi için kullanılacak olan primerler, "Direct Submission" olarak NCBI Gen Bank'a CP015438 Accession Numarası ile kayıt altında olan gen sırası kullanılarak dizayn edildi (Tablo 1).

Tablo 1. *A. amylolyticus* DSM15939 bakterisine ait *gchl* genine ait DNA baz sırası

```
ATGGTAAACTACGAACAAATCGAACAAAGCGGTTTCGCTTGATTTTAGAAGCGATTGGCGAAGACCCGAA
TCGCGAAGGGTTATTAGATACGCCAAAACGAGTGGCAAAAATGTATGCAGAAGTATTTTCCGGGATGA
ACGAAGACCCGAAAGAACATTTTCAGACAGTGTTCAGCGAAGAGCATGAAGAGCTCGTGTGGTGAAA
GATATTCGGTTTTTCTCGATGTGCGAACACCATTAGTGCCGTTTTTTGGCGTCGCACACGTGCCTA
CATTCCGCGCGGGCGGAAAAGTAACAGGGCTAAGCAAGCTTGCCCGCGCTGTCGAAGCGGTTCGCACGCC
GTCCGCAGCTGCAAGAACGGATTACGGCAACGGTGGCAGATGCGATTATGGAAACACTCGAGCCTCAC
GGTGCGTTAGTCGTTCGTCGAAGCAGAGCATATGTGCATGACGATGCGCGGCGTGAAAAAACAGGTGC
AAAAACGGTGACAATAGCCGCACGTGGCAGCTTCGAAACCGATCATGTTGCACGCGGCGAAGTGCTTT
CATTAAATTAAGGATAG
```

Yukarıdaki tabloda verilen DNA sırasına göre, genin PZR’da tespit edilebilmesi için 5’ ucuna komplementer olan ve daha sonraki aşamalarda ekspresyon vektörüne klonlama için de kullanılacak olan, forward primeri *NcoI* restriksiyon enzim bölgesi (5’-C_CATGG-3’) içeren, 5’-CCA TGG TAA ACT ACG AAC AAA TCG-3’ primeri ve karşıt yönde yer alan, *XhoI* restriksiyon kesim bölgesi (5’-C_TCGAG-3’) içeren 5’-CTC GAG TCC TTT AAT TTA ATG AAA GCA C-3’ sırasına sahip reverse primeri ile primerlerin Tm sıcaklığına ve elde edilmek istenen bölgenin uzunluğuna (562 bp) bağlı olarak tasarlanan PZR ile tespit edildi.

Buna göre uygulanacak olan PZR şartları 50 µL son hacimde olmak üzere şu şekilde yapıldı.

- 500 ng gDNA,
- 200 µM dNTP,
- 50 pmol forward ve reverse primer,
- 1X PZR Tamponu,
- 2 mM MgCl₂,
- 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi içerecek şekilde hazırlandı.

PZR döngü şartları ise:

- 95°C de 2 dakika,
- 94°C de 1 dakika 30 saniye,
- 48°C de 1 dakika 30 saniye,
- 72°C de 2 dakika,

Bu kısım 5 döngü yapıldıktan sonra; 35 döngü olarak

- 94°C de 1 dakika,
- 54°C de 1 dakika 30 saniye,
- 72°C de 2 dakika,
ve son olarak
- 72°C de 10 dakika ile reaksiyon tamamlandı.

2.2.3.2. PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Yapıştırılması ve *E. coli* DH5a Konak Hücreye Aktarılması

PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen ürünler, DNA ladderla birlikte %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra fragment DNA Clean&Concentrator™ (Zymo Research, ABD) kiti ile firmanın öngördüğü şekilde aşağıda verilen yöntemle temizlendi (saflaştırıldı).

- Yapılan PZR reaksiyonunun tamamı temiz steril bir Eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra tüpün içerisine 50 µL Binding buffer konularak pipet yardımıyla karıştırıldı.

- Bu karışımın tamamı filtreli tüpe aktarılarak 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım pipet yardımıyla uzaklaştırılarak kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi,

- Üzerine 700 mL Membrane Wash Solution eklendi ve tekrar 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi (bu işlem iki kez tekrarlandı).

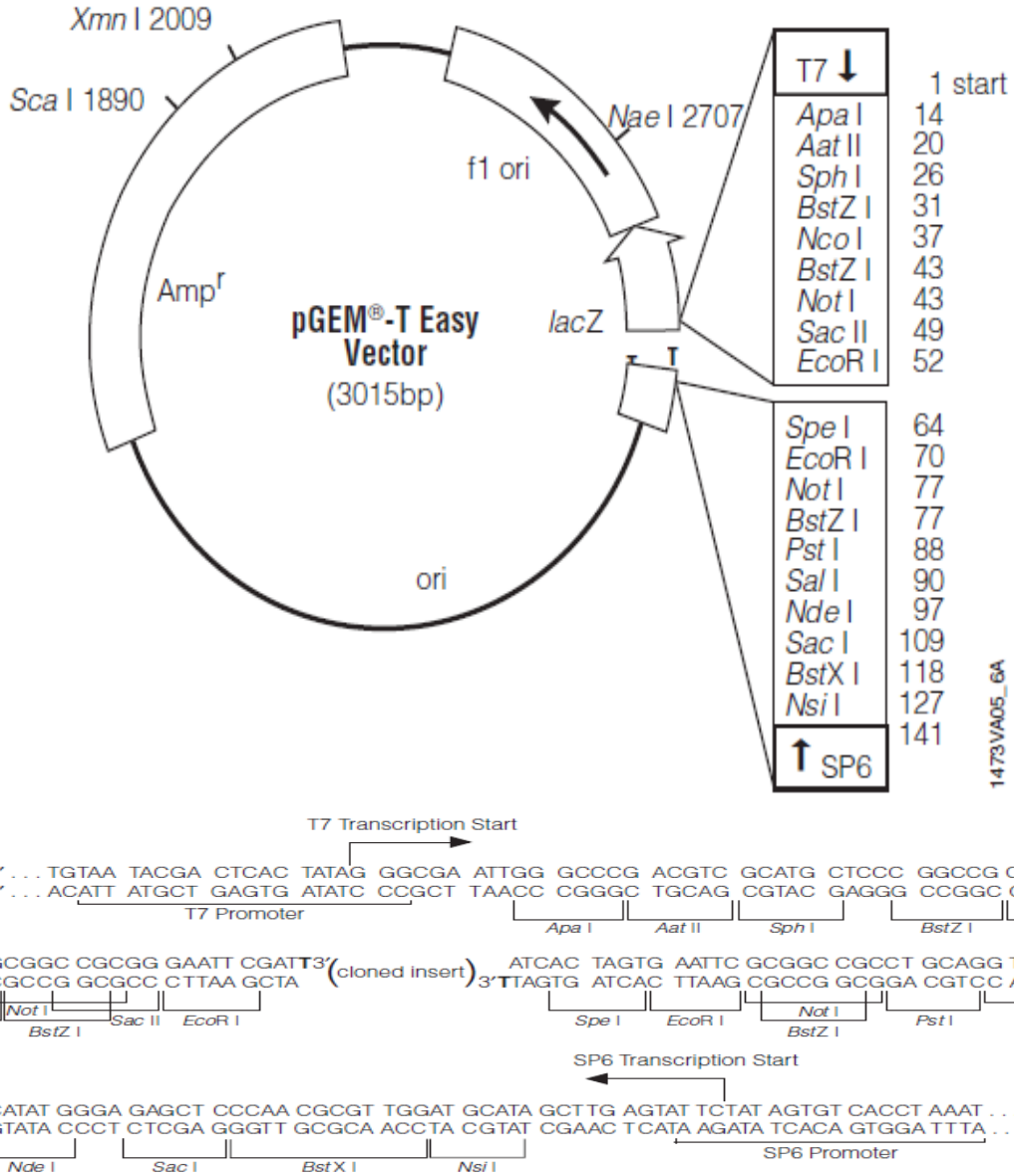
- Alta geçen sıvı kısım atıldıktan sonra kolon Eppendorf tüpe yerleştirilerek tekrar aynı süre ve hızda santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrasında kolon yeni Eppendorf tüpüne aktarılarak üzerine 50 mL Elution buffer eklendi 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Oda sıcaklığında 2 dakika beklendikten 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Kolon atılarak elde edilen saf PZR ürünü agaroz jel elektroforezinde doğrulanarak kullanıma kadar 4°C'de saklandı. Temizlenen PZR ürününün sahip olduğu restriksiyon kesim bölgelerinden daha rahat bir şekilde kesilerek ekspresyon vektörüne transferini

gerçekleştirebilmek için aracı olarak pGEM[®]-T/Easy Vector Systems (Promega Co., Medison, ABD) kullanılarak ligasyon yapıldı (Şekil 3).



Şekil 4. pGEM-T/Easy vektör sistemi ve klonlama bölgesi (Promega Tech, 2012)

Bunun için;

- 3 µl saflaştırılmış PZR ürünü,
- 2 µl sulandırılmış pGEM[®]-T/Easy vektör
- 1 µl T4 DNA ligaz (3 U/µl)
- 1 µl Rapid Ligation Buffer

Son hacim 10 µL olacak şekilde distile su ile tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan karışım 4°C’de bir gece tutulduktan sonra uygun bir konak hücre olan *E. coli* DH5α hücrelerine aktarıldı. Rekombinant vektörün konak hücreye aktarılmasından önce, konak hücre soğuk CaCl₂ yöntemiyle alıcı (kompetan) hale getirildi. Bunun için aşağıdaki yöntem kullanıldı.

- Gece boyu inkübasyona bırakılan *E. coli* DH5α kültürü, 100 mL LB besiyerine 1/100 oranında seyreltildi,

- Gece kültüründen 30 mL LB’ye 1,2 mL konularak 37°C’de yoğunluk OD₆₀₀: 0,45-0,55 olana dek tekrar inkübe edildi,

- İnkübasyon sonrası 10 dakika buzda bekletildikten sonra 4500 rpm’de 8 dakika santrifüj edildi,

- Elde edilen bakteri pelletine 10 mL soğuk steril 100 mM CaCl₂ eklendi ve süspanse edildi,

- Bakteri süspanسیونu 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra tekrar 4500 rpm’de 8 dakika santrifüj edildi,

- Pellet üzerine 2 mL soğuk steril 100 mM CaCl₂ eklenerek tekrar süspanse edildi ve hazırlanan kompetent hücre kullanıma hazır halde 2 saat 4°C’de saklandı.

Rekombinant vektörün alıcı konak hücreye aktarımı aşağıdaki biçimde yapıldı;

- 5 µL ligasyon ürünü 50 µL alıcı hücre ile 1,5 mL Ependorf tüp içerisinde karıştırıldı ve karışım buz içerisinde 30 dakika bekletildi,

- 42°C’de 2 dakika boyunca inkübe edildi, sonra reaksiyon tüpü 2 dakika boyunca buzda bekletildi,

- Tüp içerisine 200 µL LB eklenerek 37°C’de 150 rpm hızda 2 saat inkübe edildi,

- İnkübasyon sonrası kültür 6000 rpm’de 2-3 dakika santrifüj edildi ve 100 µL’si daha önce hazırlanan X-gal/IPTG’ye ampisilin antibiyotiği içeren LB agar petrilere steril baget yardımıyla ekildi,

- Petriler gece boyu mavi-beyaz koloni seçimi için 37°C’de inkübe edildi.

- Petrilere seçilen beyaz koloniler, plazmit DNA’larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapılarak 37°C’de 150 rpm’de gece boyu inkübe edildi.

Elde edilen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu, ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit ile aşağıdaki şekilde izole edildi;

• İlk aşamada çoğalan bütün beyaz kolonilerden ve karşılaştırma yapmak için negatif kontrol olarak, üreyen mavi koloniden bir tane seçilerek 50 µg/ml ampisilin içeren LB besi yerine (3 mL) konularak 37 °C’de gece kültürü atıldı,

• Üreyen kültürler, 1,5 mL Eppendorf tüpüne aktarıldı ve yüksek hızda 1 dakika santrifüj ederek çöktürüldü. Süpernatant kısmı döküldü,

• Çöktürülen bakteri pelleti 250 µL Zymo Pure P1 solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla karıştırıldı.

• Üzerine 250 µL Pure P2 solüsyonu eklenerek 6-8 kez alt üst edildi ve 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

• Sonrasında 250 µL Zymo Pure P3 solüsyonu eklenerek 3-4 kez alt üst edildi ve 5 dakika buzda bekletildi.

• 5 dakika boyunca 16.000 g’de santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni Eppendorfa aktarıldı.

• Üzerine binding buffer eklenerek karıştırıldı ve tamamı koleksiyon tüpüne aktarıldı.

• 1 dakika boyunca 5000 g’ de santrifüj edilerek süpernatant döküldü.

• 800 µl Wash1 solüsyonu eklendi ve 5000 g’ de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant döküldü.

• 800 µl Wash2 solüsyonu eklendi ve 5000 g’ de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant döküldü.

• 200 µl Wash2 solüsyonu eklendi ve 5000 g’ de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant döküldü.

• Koleksiyon tüpündeki filtre yeni Eppendorf tüpe aktarılarak 1 dakika boyunca 10.000 g’de boş olarak santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filtre tekrar yeni Eppendorfa aktarıldı.

• Üzerine 25 µL Elution Buffer eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dakika boyunca 10.000 g’de santrifüj edildi.

• İzole edilen pDNA’lar, agaroz jel elektroforezinde tespit edilerek kısa süreli depolama için +4°C’ye kondu.

Yapılan işlemlerde alınan DNA parçasının doğruluğundan emin olmak için tekrar aynı enzimlerle kesim işlemi yapıldı. Kesim sonucu doğrulanan kolonilerden tekrar gece kültürü yapılarak Zymo PURE™ Plasmid Miniprep Kit ile Elde edilen pDNA’lar % 1’lik

agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Doğru klon seçimi için agaroz jel elektroforezinden sonra restriksiyon kesimi yapılarak ilgili geni taşıyıp taşımadığı belirlendi. Doğru klon tespit edildikten sonra yeni kültür hazırlandı ve gliserol stoğu halinde -20°C’de saklandı.

2.2.3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Doğru koloninin seçimi için hazırlanan reaksiyon;

- 1 µg rekombinant pDNA,
- 1X ikili kesim (double digest) tamponu,
- 1 ünite *NcoI* restriksiyon enzimi,
- 1 ünite *XhoI* restriksiyon enzimi,

son hacim 50 µl olacak şekilde steril distile su ile steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konduktan sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edilerek tamamlandı.

Restriksiyon enzimiyle yapılan kesim işlemi sonucunda elde edilen ürünler pozitif kontrol ile birlikte % 1’lik agaroz jelde yürütüldü. Pozitif kontrol olarak PZR ürünleri kullanıldı.

2.2.3.4. *gchI* için DNA Baz Sırasının Belirlenmesi

Rekombinant plazmidin restriksiyon endonükleazlar ile kesimi sonucunda DNA baz sırasının belirlenmesi için doğrulanan plazmitten atılan kültürden yukarıdaki şekilde ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit ile saf olarak izole edilen pGEM-T/Easy/*gchI* rekombinant pDNA’sı ilgili firmanın önerdiği şekilde hazırlanarak dizi analizinin yapılması için Macrogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi. İlgili firma tarafından doğrulanan kesim sonuçları ve DNA dizi analizinden sonra gen ekspresyonunun sağlanabilmesi için ekspresyon vektörüne klonlama işlemlerine geçildi.

2.2.4. Genin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Gen ekspresyonunda pET28a(+) vektörü kullanıldı. pET28a(+) vektörü, kanamisin direnç geni içermekte olup klonlanacak genin klonlama şartlarına bağlı olarak N ucuna veya C ucuna histidine aminoasitleri ekleyecek şekilde dizayn edilmiştir. Böylece ekspresyon sonucunda üretilen protein ilave olacak olan histidine birimleri sayesinde Ni

veya Cu afinite kromatografisi yöntemiyle kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Kullanılan pET28a(+) vektörü Şekil 5’de gösterilmektedir.

gchI genin ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için pGEM-T/Easy/*AagchI* rekombinant plazmidinden restriksiyon enzimlerle kesilerek alındı. Kesimin yapılabilmesi için gerekli şartlar aşağıdaki gibidir.

- 1 µg rekombinant pDNA,
- 1X double digest tamponu,
- 1 ünite *NcoI* restriksiyon enzimi,
- 1 ünite *XhoI* restriksiyon enzimi,

20 µl son hacimde steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konduktan sonra 37°C’de 25 dakika inkübe edilerek tamamlandı.

Kesim işlemi sonucunda elde edilen kesim ürünü % 1’lik agaroz jelde yürütülerek tespit edildi. Aktarılmak istenen DNA fragmenti (*NcoI* ve *XhoI* bölgesi taşıyan *gchI* geni) Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) ile aşağıdaki gibi jelden izole edildi.

• % 1’lik agaroz jel elektroforezi için jel dökülmeden önce, kesim sonuçlarının tamamının yürütülebilmesi için jel tarakları bant ile bantlanarak büyük kuyucuklar oluşturuldu ve oluşan kuyucuklara kesim ürünleri yüklenerek yürütüldü.

• Yürütme işleminin ardından elde edilen DNA bandı UV ışık altında görüntülenerek steri bir neşter yardımıyla kesildi ve steril bir 1,5 santrifüj tüpüne kondu.

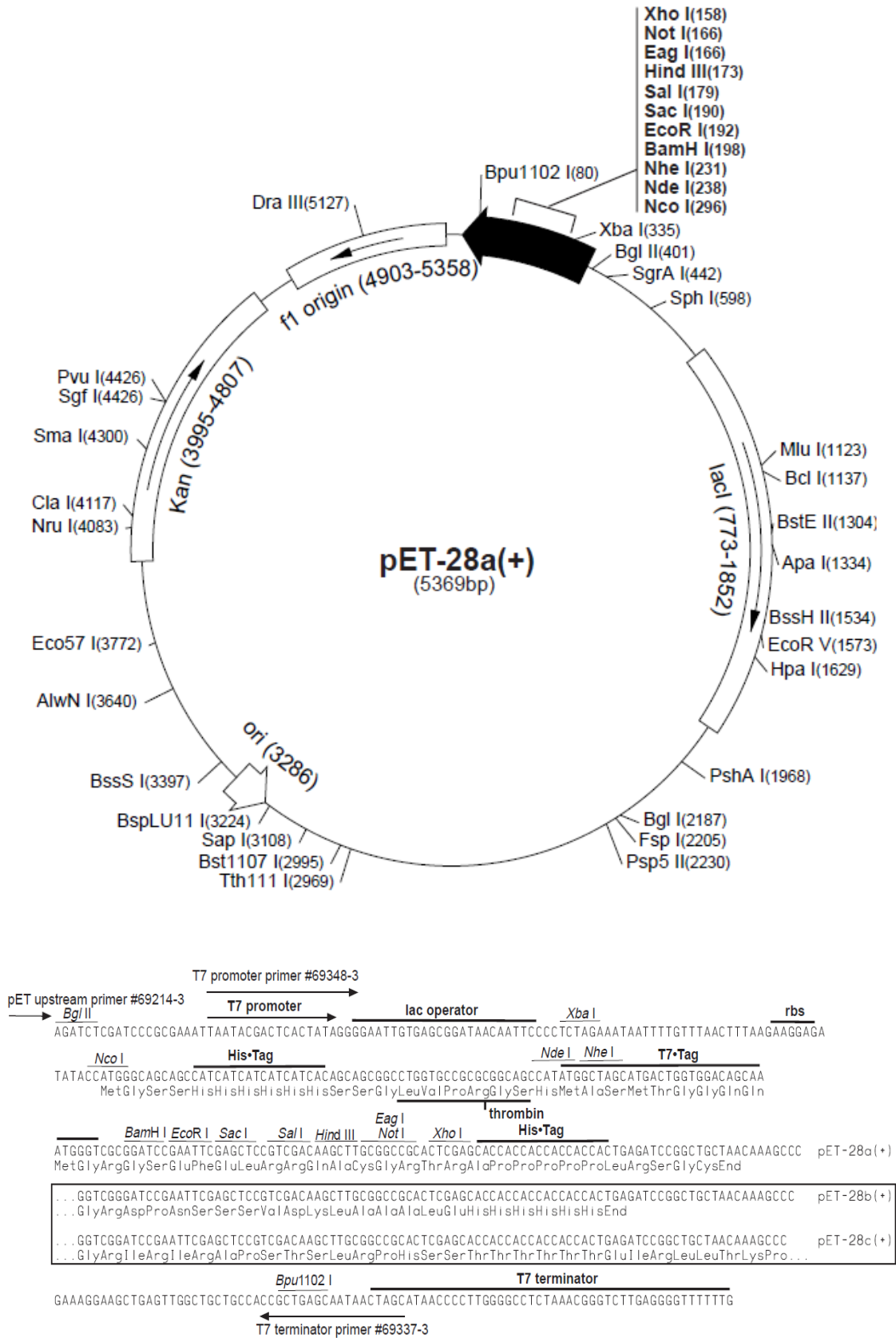
• Santrifüj tüpünün öncelikle boş halde darası alınarak ağırlığı hesaplandı.

• Her jele mg başına 300 µL ADB (Agarose Dissolving Buffer) eklendi ve tüpün içerisindeki agaroz jelin tamamı eriyene kadar 37-55°C’de sallamalı thermoshakerda inkübe edildi,

• Erime tamamlandıktan sonra tüpteki jelin tamamı spin kolona aktarılarak 30-60 sn 10000 g’de santrifüj edilerek altta kalan sıvı pipet yardımıyla atıldı.

• Üzerine 200 µL Wash Buffer eklenerek 30 saniye 10000 g’de santrifüj edildi (Bu işlem iki kez tekrarlandı).

• Spin kolon yeni steril bir 1,5 mL’lik Eppendorf tüpe takıldı. Üzerine 12 µL DNA Elution Buffer eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 10000 g’de 30-60 saniye santrifüj edildi.



Şekil 5. Ekspresyon için kullanılan pET28a(+) vektörü ve klonlama bölgesi (Novagen TB074, 2012'den değiştirilerek)

- Elde edilen saf PZR ürününün 3 µL'si agaroz jelde yürütülerek doğrulandı ve artan ürün bir dahaki kullanıma kadar 4°C'de saklandı.

Bu işlemlerin uygulanmasından sonra ekspresyon vektörü olarak seçilen pET28a(+) (Novagen, USA) vektörü de aşağıdaki şartlarda kesilerek alıcı plazmid haline getirildi.

- 3 µg pET28a(+) vektörü,
- 3 µL 10X restriksiyon enzim tamponu,
- 1 ünite *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimi,
- 3 µL 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) ve son hacim 50 µL'ye tamamlanana kadar DNA eklenmeden steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konuldu ve reaksiyon 37°C'de 30 dakika tutularak gerçekleştirildi.

Kesim ürünü % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek tespit edildikten sonra gereken fragment DNA Clean&Concentrator™ Kit (Zymo Research) kullanılarak yukarıdaki şekilde saflaştırıldı.

Saflaştırılan pET28a(+) genin ekspresyon vektörüne yapıştırılabilmesi için gerekli olan ligasyon şartları kullanıma uygun olarak aşağıdaki gibi hazırlandı.

Bunun için,

- 4µL 10X ligaz tamponu,
- 2 µL 50 ng/µl pET28a(+) vektörü,
- 1 µL T4 DNA ligaz enzimi,
- 3 pmol insört DNA (*NcoI* ve *XhoI* bölgesi taşıyan *gchI* geni),

10 µL son hacim olacak şekilde su eklenmeden steri 1,5 mL Eppendorf tüpüne konularak hazırlandı ve reaksiyon 4°C'de gece boyu inkübe edilerek tamamlandı.

Yapılan ligasyon işleminin ardından rekombinant plazmitler, daha önce hazırlandığı gibi 100 mM soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3) pLysS hücrelerine ısı şoku ile aktarıldı. Aktarım sonucunda petride üreyen kolonilerden seçim yapıldı ve önceki koloni seçim şartlarında olduğu gibi izolasyon yapılarak doğru klon tespit edildi.

Klonların doğruluğundan emin olmak için tekrar restriksiyon enzimlerle kesildi ve başlangıçta kullanılan primerlerle PZR yapılarak doğruluğu kanıtlandı.

E. coli BL21(DE3) pLysS kültürü ekspresyon çalışmalarında 30 mg/mL kanamisin içeren LBA petrisine ekim yapılarak 37°C'de gece boyu inkübasyon yapıldıktan sonra +4°C'de ve gliserol stoğu halinde ise -20°C'de saklandı.

2.2.5. *gchI* Geninin Ekspresyonu

Gen ekspresyonuna başlamadan önce ekspresyon şartları optimize edildi. Bu şartlar uygun ekspresyon sıcaklığı ve sonrasında proteinin denatürasyon sıcaklığı ve süresi olarak belirlendi.

Bunun için *E. coli* BL21(DE3) pLysS kültürü ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ve 30 mg/mL kanamisin içeren LB'ye ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrası, 500 mL'lik erlende 100 mL kanamisinli LB besiyerine OD₆₀₀ değeri 0,1 olacak şekilde seyreltilerek gece kültürü ekildi ve 37°C'de inkübasyona devam edildi. Kültürün OD₆₀₀ değeri 0,8 aralığına geldiğinde son hacim 1mM olacak şekilde 1 M IPTG ilave edilerek 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür falkon tüpe aktarılarak 6000 rpm'de 10°C soğutmalı santrifüjde 8 dakika çöktürüldü. Elde edilen pellet kullanıma hazır -20°C'de saklandı.

2.2.6. Proteinin Saflaştırılması

2.2.6.1. Proteinin Ni-NTA Kolon İle Saflaştırılması

Rekombinant protein His Link™ Protein Purification System (Promega, Medison, WI, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için aşağıdaki yöntem kullanıldı.

- Rekombinant plazmidi içeren hücre kültürü 4500 rpm'de soğutmalı santrifüjde çöktürüldü,
- Elde edilen pellet steril su ile süspanse edildi ve yeniden aynı şartlarda çöktürülerek besiyerinden temizlendi,
- Pellet daha sonra 5 mL 1X PBS içerisinde süspanse edildi,
- Süspansiyon -20°C'de dondurulduktan sonra oda sıcaklığında tekrar çözdürüldü,
- Dondurma çözme işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra 4500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi,
- Elde edilen pellet, 5 mL Ni Binding Buffer kullanılarak çözüldü,
- Daha sonra 3 dakika % 30 amplitude, 30 saniye ON/OFF şartlarında buz içerisinde sonikatör ile parçalandı, Sonikasyon sonrası -20°C'de donduruldu ve tekrar oda sıcaklığında tamamen çözünmesi beklendi

- Erime sonunda tekrar aynı şartlarda sonike edildi,
- 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı,
- Süpernatant 70°C'de 15 dakika inkübe edilerek konak hücreden gelebilecek kontamine proteinler ortadan kaldırıldı,
- İnkübasyon sonrası tekrar 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı.

Sonikasyon sonrasında protein saflaştırılması için üretici firmanın öngördüğü şekilde saflaştırma yapıldı. Buna göre, öncelikle aşağıdaki tamponlar hazırlandı.

1. **Bağlanma tamponu** olarak 10 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5),
2. **Yıkama tamponu** olarak 10-100 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5) serileri,
3. **Elüsyon tamponu** olarak ise 250-1000 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5) serileri kullanıldı.

Tamponlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki yönteme göre protein saflaştırıldı.

- Yukarıda elde edilen lizat kolona uygulanmadan önce kolon Ni-NTA resin ile dolduruldu,
- Kolonun tamamen dengelenmesi beklendi,
- Dengelenme sonrasında kolon hacminin 5 katı hacimde bağlanma tamponu eklendi,
- Sonrasında sonikasyonda elde edilen lizat yavaşça kolona yüklendi,
- Kolonun akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı,
- Lizatın akışı tamamlandıktan sonra kolon hacminin 10-20 katı yıkama tamponu ile yıkandı. Bunun için önce 10 mM imidazol ieren 100 mM HEPES (pH 7,5) kolondan geçirildi sonrasında hazırlanan diğer seriler kolona tatbik edildi,
- Yıkama sonrasında, yukarıdaki gibi düşük konsantrasyondan başlanarak sıra ile elüsyon tamponları kolondan geçirildi.
- Yukarıdaki tüm uygulamalar BioLogic LP System (BioRad, ABD) kullanılarak yapıldı ve elüsyonlar, fraksiyon kollektöründe ayrılarak alındı. Uygulama sonrası %12'lik SDS-PAGE ile protein tespit edildi. Proteinin alındığı fraksiyon örnekleri birleştirildi.
- İçerisinde imidazole içermeyen tamponda (100 mM HEPES, pH 7,5) gece boyu diyaliz yapıldı.

2.2.6.1. SDS-PAGE Analizi

Öncelikle SDS-PAGE analizinin yapılabilmesi için kullanılacak olan tüm çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

%30'luk Akrilamid: 29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid (N-N-dimetilbisakrilamid) tartılarak önce 50-60 mL suda çözülerek 100 ml distile suyla tamamlandı. 4°C'de saklandı.

%10'luk SDS: 10 g SDS tartılarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

%10'luk APS: 0,1 g amonyum persülfat tartıldı ve üzeri 1 mL distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris, pH 8,8): 27,24 g Tris-base tartıldı. 100 mL distile suda çözüldü. pH'sı 8,8'e ayarlandı. Son hacmi saf su ile 150 mL'ye tamamlanarak otoklav yapıldı.

Yığma Jeli Tamponu (0,5 M Tris, pH 6,8): 18,65 g Tris-base tartıldı. 100 mL distile suda çözüldü. pH'sı 6,8'e ayarlandı. Son hacmi saf su ile 150 mL'ye tamamlanarak otoklav yapıldı.

Yürütme Tamponu: 21,6 g glisin ve 4,5 g Trisma-Base tartıldı. Karışım 1,5 mL distile suda çözüldükten sonra 15 mL SDS eklenerek karıştırıldı.

Yıkama solüsyonu-I: 10 mL %10 asetik asit, 50 ml %50 metanol ve 40 mL distile su karıştırılarak elde edildi.

Yıkama solüsyon-II: 10 mL %10 asetik asit, 7,5 mL %7.5 metanol ve 8,5 mL distile su karıştırılarak elde edildi.

Yürütme Boyası: 400 µL %10 SDS, 150 µL Tris-HCl-Buffer (pH 6,8), 250 µL gliserol, 60 µL β-merkaptoetanol ve 140 µL Bromofenol Blue 1,5 mL'lik Eppendorf tüpünde karıştırılarak hazırlandı.

Protein Boyası: 50 mL %50 metanol, 10 mL %10 asetik asit, 0,25 g Coomassil Brilliant Blue R-250 olarak hazırlanan karışım 40 mL distile su ile çözüldükten sonra son hacim 100 mL olacak şekilde hazırlandı ve süzgeçten geçirilerek karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

SDS PAGE için çözeltiler hazırlandıktan sonra analizi aşağıdaki şekilde yapıldı:

Protein ekspresyonu ile ilgili özelliklerinin belirlenmesi esnasından Maniatis ve ark.'na (1982) göre %12'lik SDS-PAGE hazırlandı. Elektroforez, 1 mm kalınlığında

%5'lik yükleme ve %12'lik ayırma jeli olacak şekilde hazırlandı (Tablo 1). Elde edilen jel, Coomassie-Blue boyası ile boyanarak sonuçlar belirlendi. Uygulanan yöntem şu şekildedir;

Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılacak olan örneklerden istenilen miktarlarda alınarak 1,5 mL'lik Eppendorf tüpün içerisine konuldu. İçerisine 1:1 oranında yürütme boyası eklendi ve örnekler ısıtıcı blok ünitede (Eppendorf Thermomixer Comfort 1,5 mL) 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi. Hazırlanan jel donduktan sonra üretici firmanın prosedürüne uygun şekilde yürütme tankına yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Pipetör yardımı ile 30 µL örnek 10 µL yürütme boyası karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Boya, jelden çıkana kadar 1 saat 27 mA'de (150 V) yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, CoomassieBrillant mavisini içeren boyama çözeltisi içinde hafifçe sallanacak şekilde yaklaşık 2-3 saat bekletildi. Boyanan jel daha sonra yıkama çözeltileri ile gece boyu yıkanarak protein bantlarının görünür hale geçmesi sağlandı. Elde edilen sonuçlar bir bilgisayar tarayıcısı ile taranarak görüntülendi.

2.2.6.2. Protein Miktarı Tayini

Çalışma boyunca kullanılan tüm proteinlerin miktarını tayin etmek için Bradford'un (1976) geliştirdiği metod kullanılarak gerçekleştirildi. Bu metoda göre 100 mL Bradford çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

- 5 mL %95'lik etanol içerisinde 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 iyice çözüldü.
- Üzerine 10 mL %85'lik fosforik asit ilave edilerek 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- Çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi.
- Protein miktarı yukarıda hazırlanan çözelti ve standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.
- Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 8, 10, 15, 30, 50, 75, 100, 125, 150 ve 200 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µL'ye tamamlandı.
- Üzerlerine 5 mL boya çözeltisinden ilave edilerek vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Xmark Microplate Spectrophotometer (BioRad, ABD) cihazı ile 595 nm'de standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

- Örneklerin protein miktarı analizi için, BSA yerine analizi yapılacak numune kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi.

2.2.7. Proteinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

GCH I enziminin aktivitesinin belirlenmesi için, aktivite deneyleri yapıldı. Bunun için Hızal, 2013'e göre optimize edilen yöntem aşağıda verilmiştir.

100 µL son hacimde 50 mM Tris HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP ve 5 µL enzim içeren reaksiyon 55°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 30 µL oksidasyon solüsyonu (%1 I₂ ve %2 KI içeren solüsyon) eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda bekletildi. 15 µL %2'lik askorbik asit solüsyonu eklendikten sonra spektrofloretrade 350 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapıldı. Standart olarak dihidroneopterin kullanıldı.

2.2.8. Enzim Optimum pH Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için, pH 5,5 ve 6,0 için MES, pH 5,8-6,6-7,2 ve 8,0 için potasyum fosfat, pH 7,5-8,0 ve 8,8 için Tris-HCl ve son olarak da pH 9,0 için Glisin NaOH tamponları hazırlandı ve yukarıdaki reaksiyon (Başlık 2.2.7) bu tamponlarda tekrarlandı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen grafiğe göre optimum pH değeri belirlendi.

2.2.9. Enzimin Optimum Sıcaklık Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değerini bulabilmek için yukarıda belirlenen tamponun kullanıldığı standart yöntemde, pH 7,2 'lik potasyum fosfat çözeltisi kullanılarak işlem gerçekleştirildi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla reaksiyon 37-45-50-55-60-65-70-75-85°C'lerde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen grafiğe göre sıcaklık değeri belirlendi.

2.2.10. Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzimin K_m ve V_{max} kinetik değerlerini bulmak için yukarıda verilen standart yöntemde pH'sı 7,2 olan potasyum fosfat tamponu kullanıldı ve 70°C'de aktivite tayinleri yapıldı. Bunun için substrat (GTP) kullanım konsantrasyonu değiştirildi. Bu değişim için reaksiyona 10-50 μ M ve 0,1-2 mM konsantrasyonlarda GTP içeren deneyler gerçekleştirildi. Orjin 8.1 programı ile Michaelis-Menten grafiği çizildi.

2.2.11. Enzimin Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi

Metallerin enzim aktivitesine olan etkisini bulabilmek için yine yukarıda verilen standart yöntemde pH 7,2 potasyum fosfat tamponu kullanıldı ve 75°C'de metal aktivitesine bakıldı. Bunun için 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM olacak şekilde Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+3} ve Fe^{+3} metalleri kullanılarak deneyler yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen grafiğe göre aktiviteleri belirlendi.

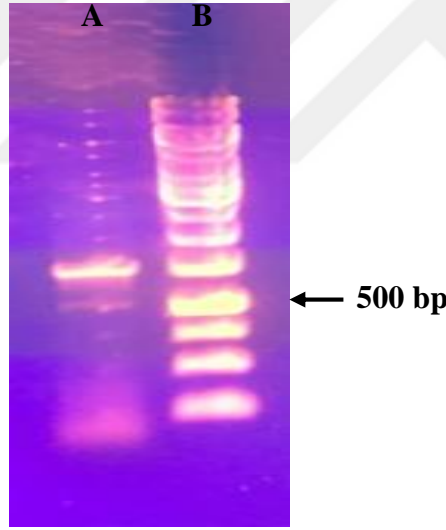
2.2.12. Enzimin Aktivitesi Üzerine Diğer Adjuvantların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisini belirlemek için yine daha önce belirlenen standart aktivite yönteminde pH'sı 7,2 olan potasyum fosfat tamponu ve 75°C sıcaklık kullanıldı. Adjuvant etkisi için SDS, Triton X-100 ve EDTA kullanıldı. SDS için %0,1-0,2 0,3 ve 1, EDTA için %0,5-1-2- 5-10 ve 20, Triton X100 için ise %0,5, 1, 3 ve 5 olacak şekilde deneyler gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Kaynak Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu ve *gchI* Geninin PZR ile Tespiti

Yapılan çalışmada kullanılan *A. amylolyticus* bakterisine ait -20°C'de saklanan gliserol stoğundan 5 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. Sonrasında elde edilen kültür 14000 rpm'de 3 dakika boyunca çöktürüldü ve pelletten Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PromegaCo., Medison, USA) kiti ile üretici firmanın prosedürüne uygun şekilde kullanılarak genomik DNA (gDNA) izole edildi. İzolasyon sonrası elde edilen gDNA, %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İzole edilen gDNA, daha sonra tekrar kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Sonrasında *gchI* geninin PZR ile çoğaltılabilmesi için dizayn edilen primerler kullanıldı ve yapılan bu PZR sonucunda, 561 bp büyüklüğünde olduğu bilinen gen tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. *A. amylolyticus* *gchI* geninin PZR sonucu (A: PZR Ürünü, B: Fermentas Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder SM0311)

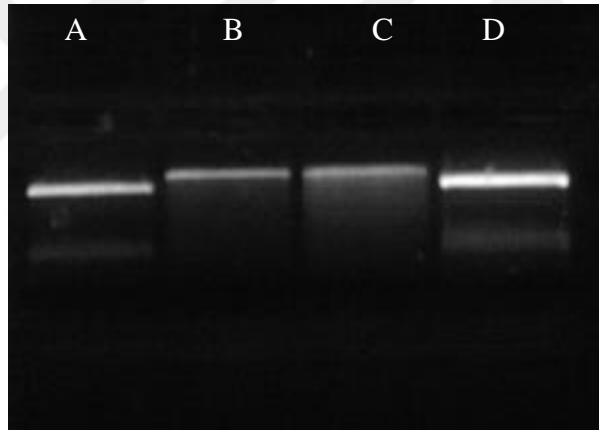
3.2. PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Klonlanması

Reaksiyon sonucunda elde edilen PZR ürünü, DNA Clean&Concentrator™ Kiti (Zymo Research) ile üretici firmanın prosedürüne uygun şekilde jelden temizlendi. Saflaştırılmış PZR ürününün sahip olduğu restriksiyon bölgelerinden kolay bir şekilde kesim yapıp ekspresyon vektörüne aktarabilmek için aracı olarak pGEM®-T/Easy Vector Systems

(Promega Co. Medison, USA) kullanıldı. Yapılan ligasyon sonrası ligasyon ürünü, *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarıldı. Aktarımdan sonra üreyen kolonilerden mavi-beyaz ayırımına göre seçilerek tekrar plazmit izolasyonu yapıldı. Bunun için ZymoPURE™ Plasmid Miniprep (Zymo Research) kiti firmanın prosedürüne uygun biçimde kullanılarak pDNA izolasyonu tamamlandı.

3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Doğru koloninin seçimi için hazırlanan kesim reaksiyonunda primerlerdeki bölgeler kullanılarak yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünü, pozitif kontrol olarak PZR ürünü ve negatif kontrol olarak kesilmemiş pDNA (pGEM-T/Easy/*AagchI*) ürünü kullanılarak %1'lik agaroz jelde tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7. *A. amylolyticus gchI* genini taşıyan pGEM-T/Easy plazmidinin *NcoI* ve *XhoI* enzimleri ile kesimi (A ve D: Kesilmiş pGEM-T/Easy/*AagchI* vektörü, B ve C: Kesilmemiş vektör)

3.4. *AagchI* Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi

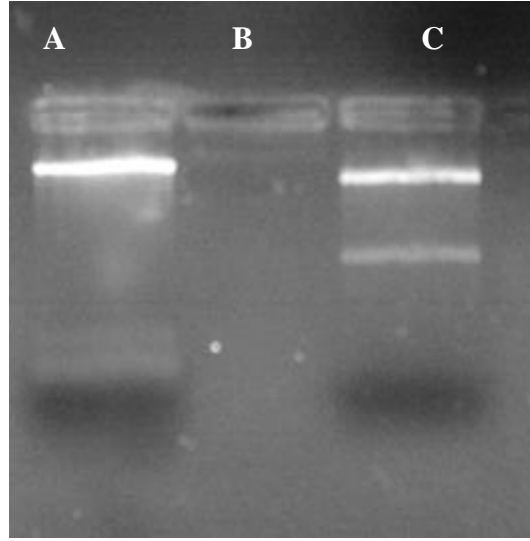
İstenilen plazmidi taşıyan kültürden kit yardımıyla saf olarak izolasyonu yapılan pGEM-T/Easy/*AagchI* rekombinant pDNA'sı ilgili firmanın prosedürüne göre hazırlandı. Dizi analizi yapmak için MacroGen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi. Elde edilen sonucun çalışmayı doğruladığı tespit edildi.

Tablo 2. *AagchI*'e ait DNA ve aminoasit sırası

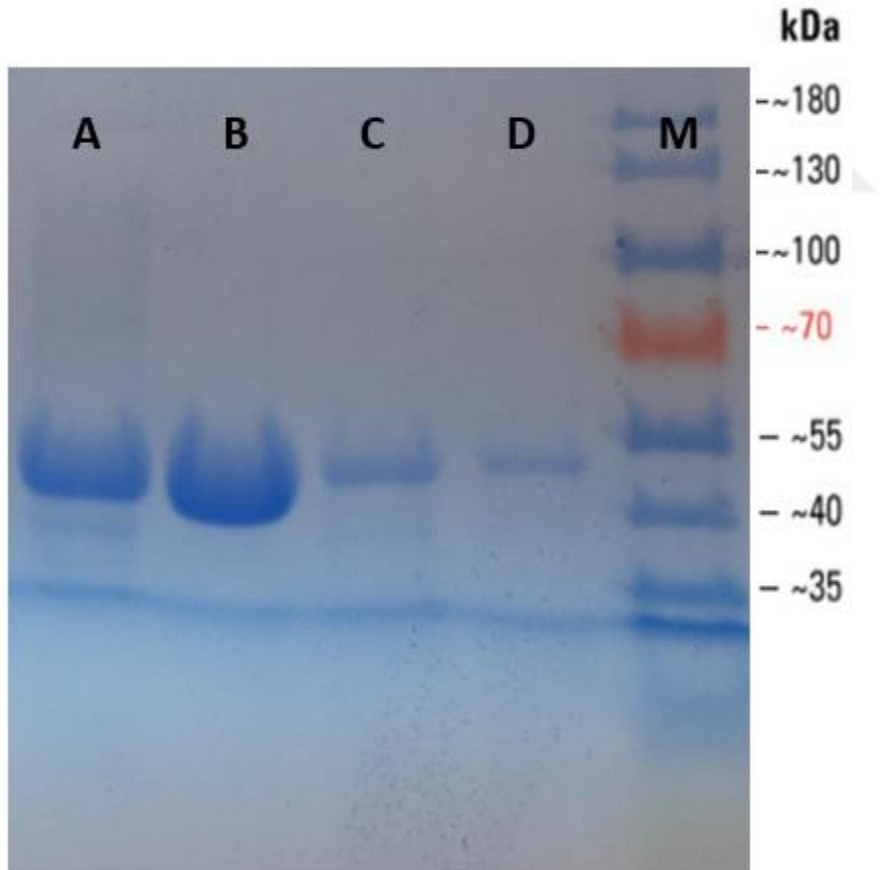
atgaatgtagaacaacgaacaggctgtccgcttaatttttagaagcgattggagaagatcc
gaatcgcgagggttgctcgatacaccgaagcgagtgccgaaaatgatgcagaagtgtttt
caggcttgaatgaagatccgaaaatacatttgcaaacgggtgttagtgaagatcatgaagag
cttgctcctcgtaaagatattccgttttattccatgtgtgaacatcatctcgtcccgttttt
cggcgtggctcatgtcgatacatcccgcgtggcggcaaagtgacaggggtaagcaaactcg
cacgagcagtcgaaacagtgccgcccgtccgcagttacaagaacgaattacggcaacagtc
gctgatgcgattatggagacgctcgagccgcatggagtgatggttggtgctcgaggcagaaca
tatgtgcatgacgatgcgcccgtgaaaaaccaggagcgaaaacggtcacaactgcggttc
gtggaacgcttgcaacggacgagaaagcacgtgctgaaatattagcgcctcattaagtag
MNVEQIEQAVRLILEAIGEDPNREGLLDTPKRVAKMYAEVFSGLNEDPKIHLQTVFSEDHEE
LVLVKDIPFYSMCEHHLVFFGVAVHVAIIPRGKVTGLSKLARAVETVARRPQLQERITATV
ADAIMETLEPHGVMVVVEAEHMCMTMRGVKKPGAKTVTTAVRGTLATDEKARAEILALIK-

3.5. *AagchI* Geninin Ekspres Edilmek Üzere pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

Doğruluğu belirlenen klon ve pET28a(+) plazmidi aynı enzimler kullanılarak ayrı ayrı kesim yapıldı. Kesilen örnekler jelden saflaştırılarak ilgili firmanın prosedürüne göre ligasyon ile yapıştırıldı. Ligasyon ürünü ekspresyon çalışmasını yapmak için 100 mM soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilerek *E. coli* DH5 α hücresine aktarıldı. Aktarım sonrasında üreyen kolonilerden seçim yapılarak daha önce olduğu gibi izole edilerek doğru klon için tespit edildi. *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a(+)/*AagchI* hücresi ekspresyon için hazır hale getirilmiş oldu. Klonlama yukarıda olduğu gibi kesim ve PZR ile doğrulandı (Şekil 8). Sonrasında ekspresyon yapılarak SDS-PAGE'de yürütüldü (Şekil 9).



Şekil 8. pET28a(+)/AagclI'nin kesim ile doğrulanması (A: Kesilmemiş ürün, B: Kontrol, C: Kesilmiş Ürün)



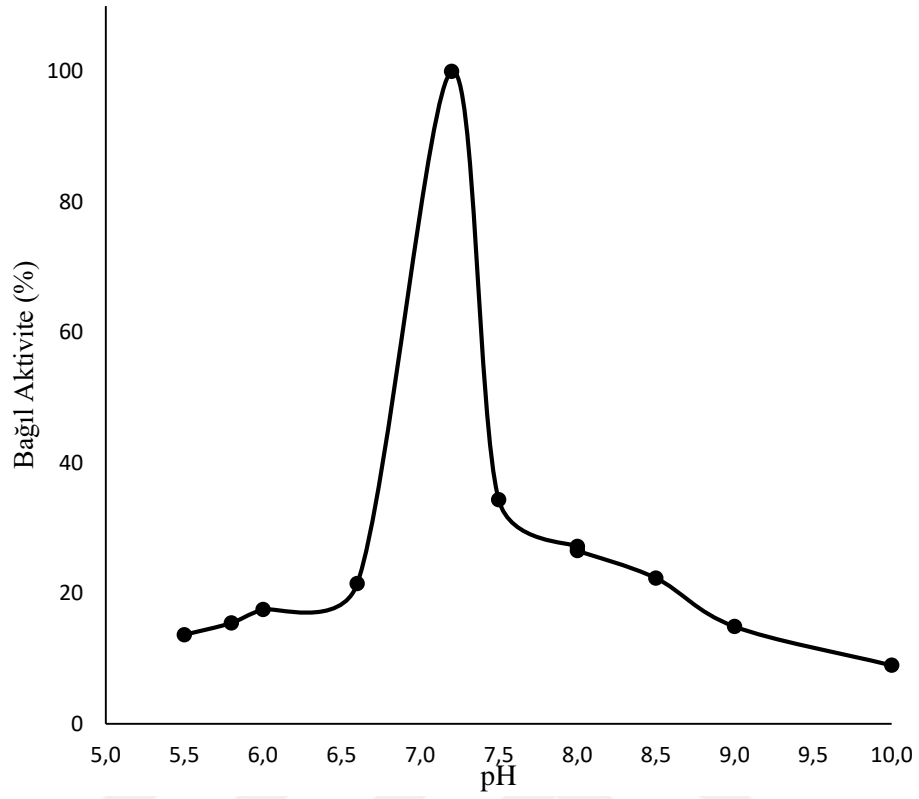
Şekil 9. PAGE Jel Elektrozefrez Görüntüsü (A: kaba ekstrakt, B: Isı muamelesi, C: Ni-NTA afinite kromatografisi, D: Diyaliz, M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, ABD)).

3.6. Proteinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

GCH1 enziminin aktivitesini belirlemek için aktivite deneyi yapıldı. Standart yöntem olarak 100 µL son hacimde 50mM Tris HCl pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP ve 0,2 µM enzim içeren reaksiyon 55°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 30 µL oksidasyon solüsyonu eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda bekletildi. 15 µL % 2'lik askorbik asit solüsyonu eklendikten sonra 14000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Spektroflorometrede 350 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapıldı. Standart olarak dihidroneopterin (NH₂TP) kullanıldı. Reaksiyon sonrasında enzimin bu sıcaklık değerinde aktif olduğu belirlendi.

3.6.1. Enzimin Aktivitesine pH Etkisi

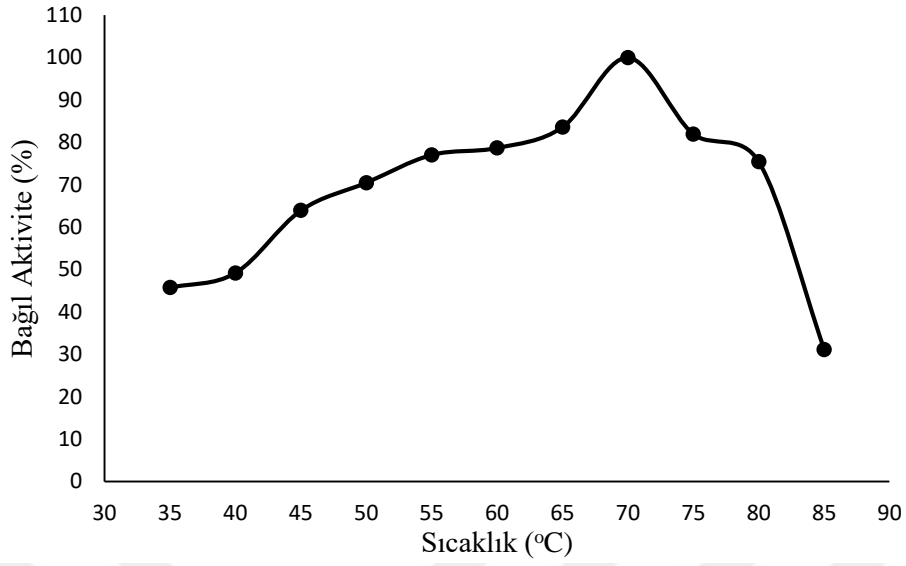
Optimum pH aktivitesini belirlemek için farklı pH değerlerinde bir seri aktivite deneyleri yapıldı. Yapılan deney sonucunda enzimin en iyi aktivite gösterdiği tamponun potasyum fosfat pH 7,2 olduğu belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Enzime ait pH grafiği

3.6.2. Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

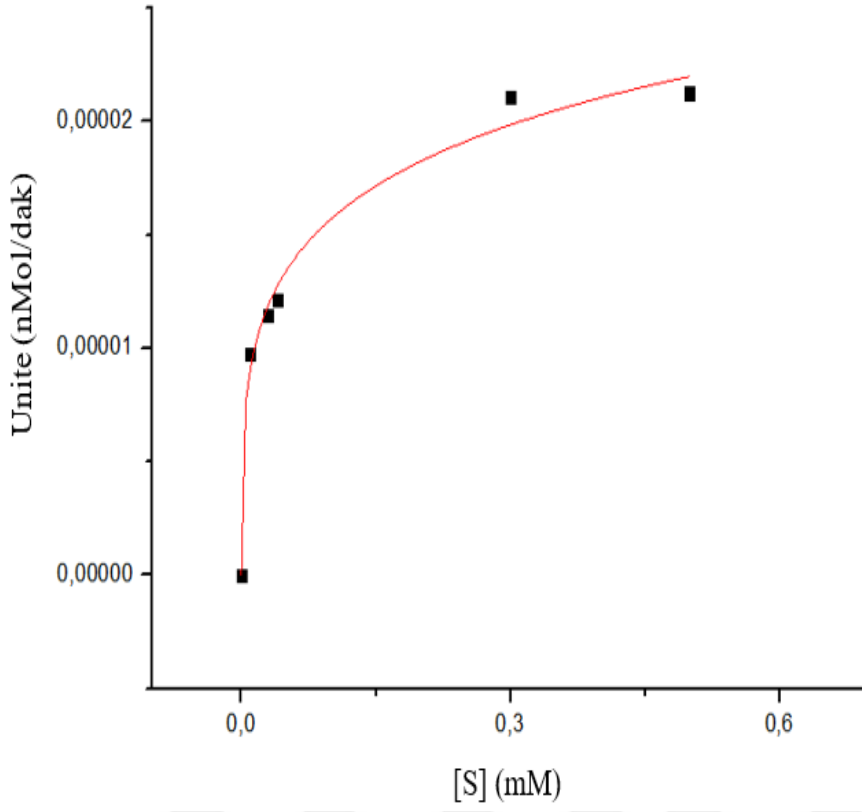
Yapılan deney sonucunda enzimin optimum pH değeri belirlendikten sonra en iyi çalıştığı sıcaklık değerine bakmak için daha önce belirlenen standart reaksiyon 35-85°C'lerde yenilendi ve en uygun çalışma sıcaklığının 70°C olduğu tespit edildi (Şekil 11).



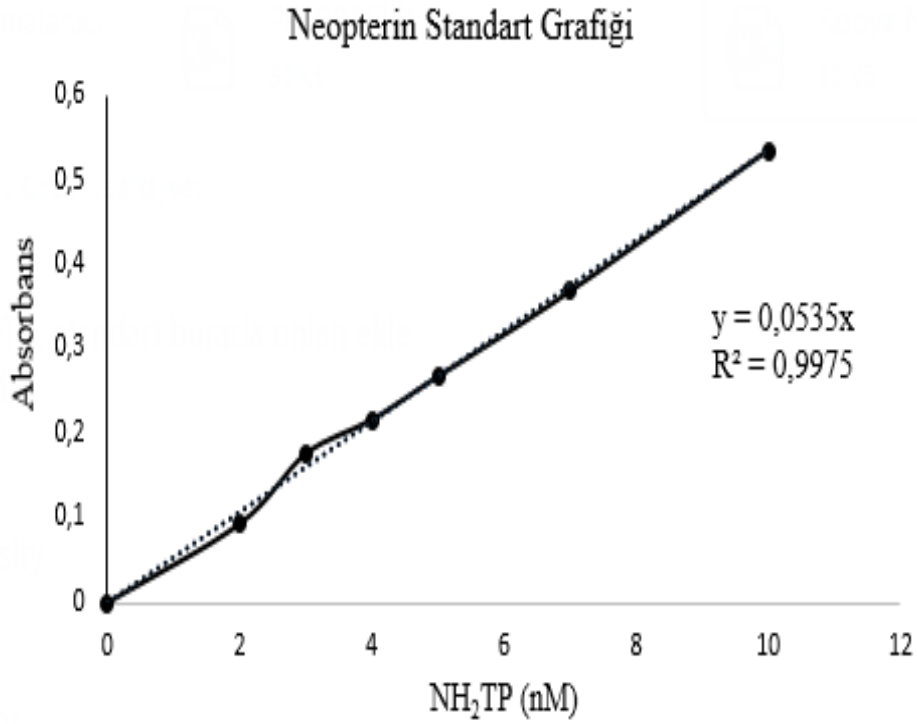
Şekil 11. Optimum sıcaklık bağıl aktivite grafiği

3.6.3. Enzimin Kinetik Parametre Değerleri

Enzimin kinetik verileri olan K_m ve V_{max} değerlerini bulmak için yukarıda verilen standart reaksiyonda substrat (GTP) kullanım konsantrasyonları değiştirilerek deneyler yapıldı. Bunun için reaksiyona 0,01-2 mM konsantrasyonlarda GTP eklenerek deneyler gerçekleştirildi. Bunun sonucunda elde edilen veriler Origin 8.1 programında okunarak değerlendirildi. Enzimin V_{max} 'ı $6,9 \times 10^{-5} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ nM/dak/mg protein ve K_m 'si $7,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (R^2 : 0,96) olarak tespit edildi (Şekil 12). Standart olarak NH_2TP kullanıldı (Şekil 13).



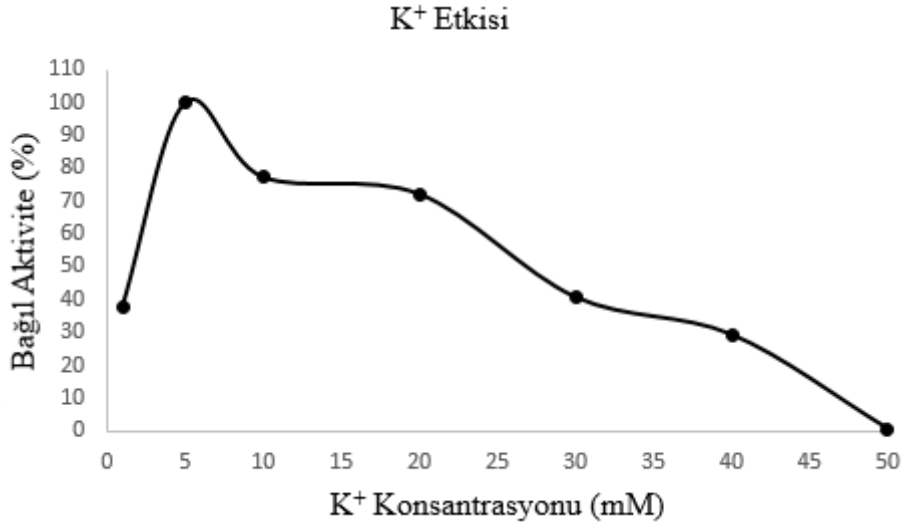
Şekil 12. GCH-I enzimine ait aktivite grafiği



Şekil 13. NH₂TP (nM) Standart grafiği

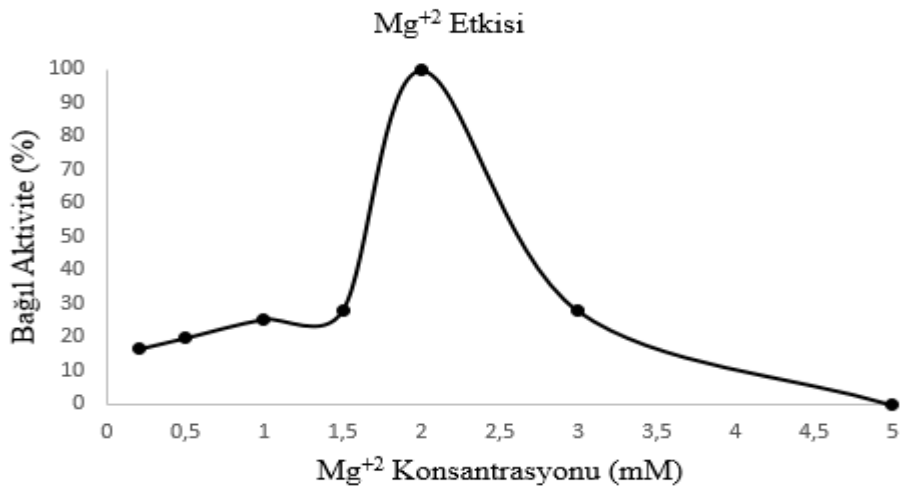
3.6.3. Enzimin Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi

Yapılan deneyde kullanılan metallerin aktivitelerini görmek için daha önce belirlenen standart yöntem kullanıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda grafik çizilerek en iyi değerde çalıştıkları aralıklar belirlendi.



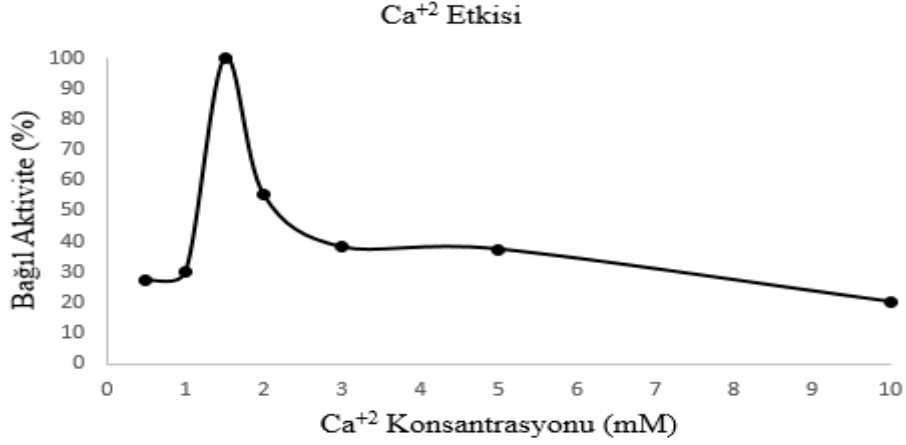
Şekil 14. K⁺'un enzim aktivitesine etkisi

K⁺ iyonunun kullanıldığı durumda en iyi 5 mM'da aktivite göstermiştir ve 50 mM konsantrasyonunda tamamen inhibe olmuştur.



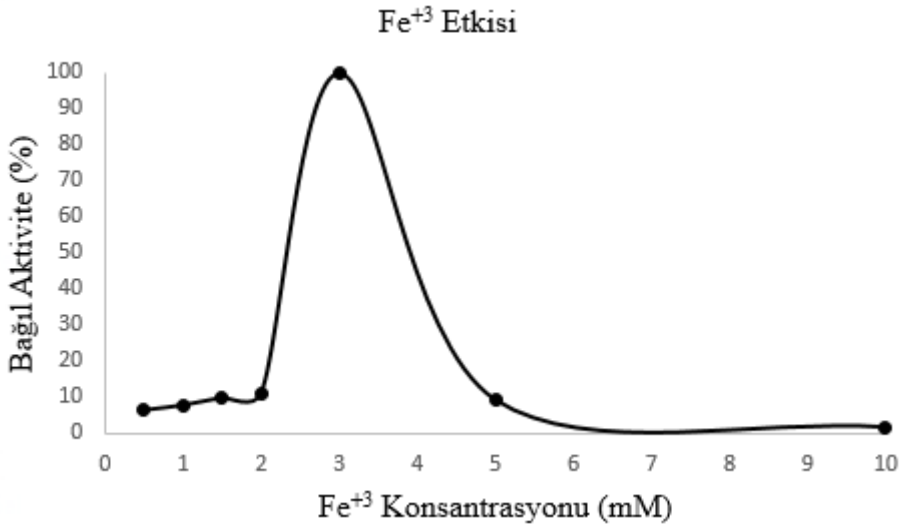
Şekil 15. Mg⁺²'un enzim aktivitesine etkisi

Mg⁺² iyonunun kullanıldığı durumda en iyi 2 mM konsantrasyonunda aktivite göstermiştir ve 5 mM konsantrasyonda tamamen inhibe olmuştur.



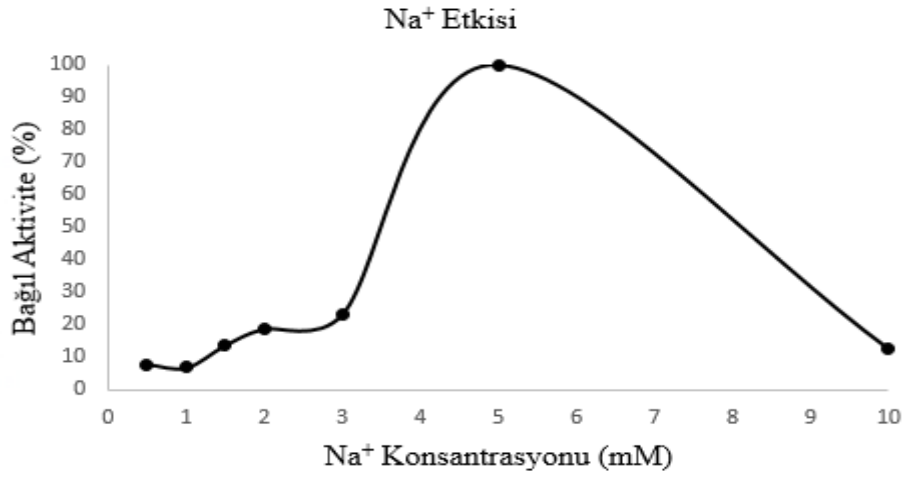
Şekil 16. Ca⁺²'un enzim aktivitesine etkisi

Ca⁺² konsantrasyonunda en iyi aktivite 1.5 mM'da göstermiştir ve molarite arttıkça aktivitesi düşmektedir.



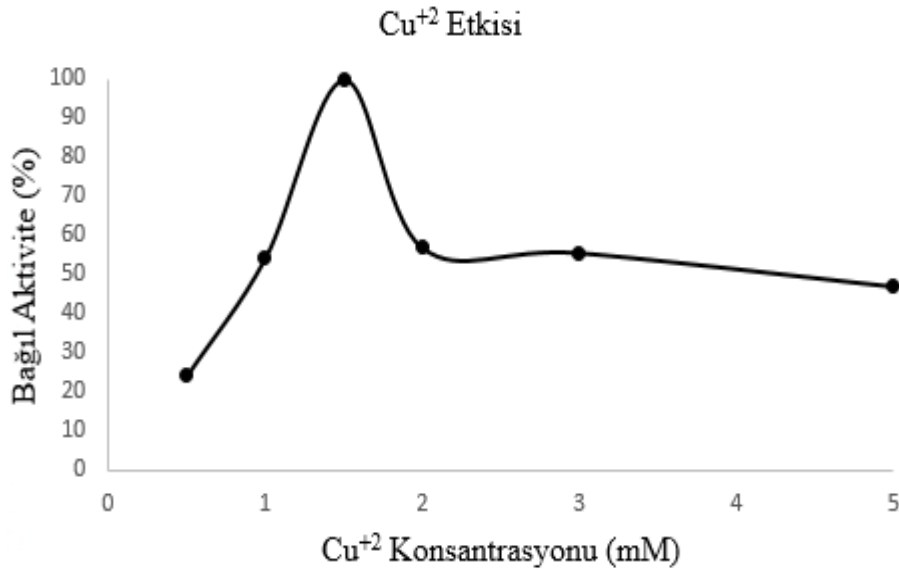
Şekil 17. Fe⁺³ 'ün enzim aktivitesine etkisi

Fe⁺³ konsantrasyon grafiğine göre en iyi aktiviteyi 3 mM' da göstermiş, molarite arttıkça aktivite düşmeye başlamıştır ve 5 mM'dan sonra tamamen inhibe olmuştur.



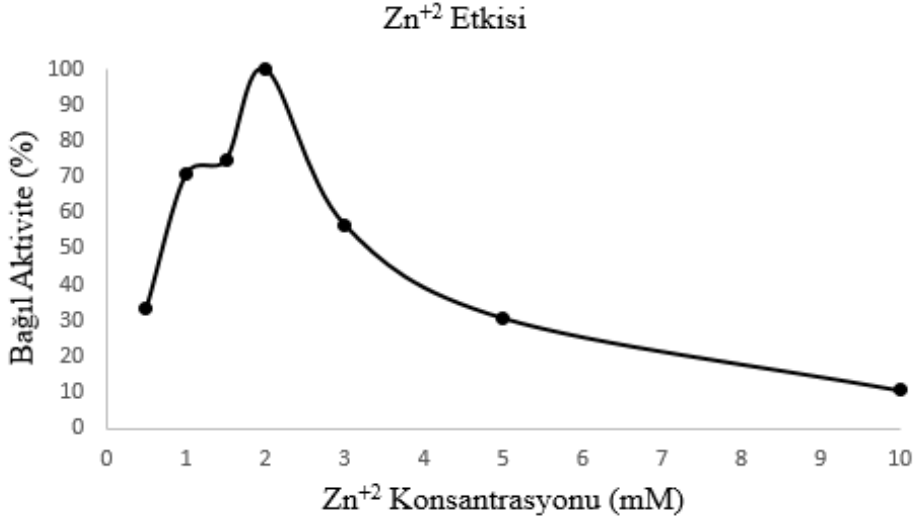
Şekil 18. Na⁺un enzim aktivitesine etkisi

Na⁺ konantrasyon grafiğinde en iyi aktiviteyi 5 mM'da göstermiştir ve yine molarite arttıkça aktivite düşmektedir.



Şekil 19. Cu²⁺'ın enzim aktivitesine etkisi

Cu²⁺ konantrasyonunda en iyi aktiviteyi 1.5 mM'da göstermiştir ve molarite arttıkça aktivite düşmektedir.

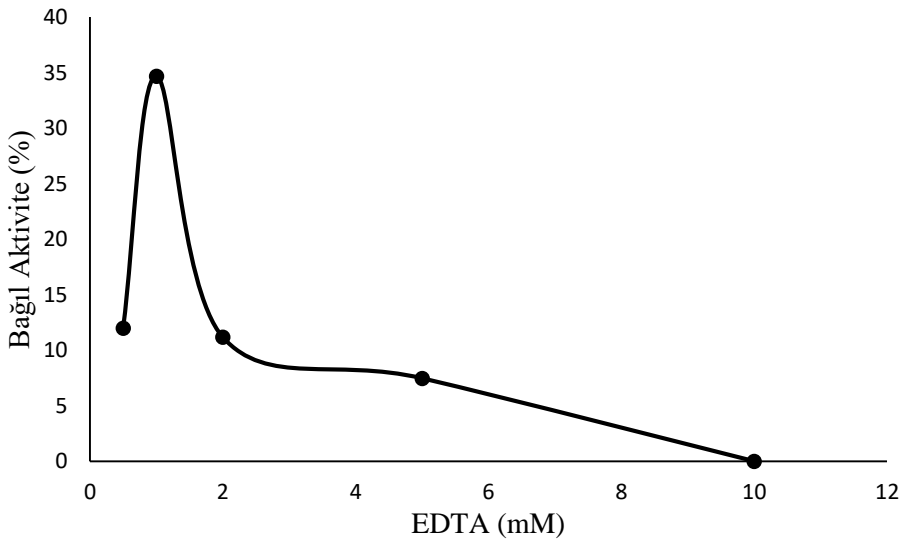


Şekil 20. Zn²⁺'nin enzim aktivitesine etkisi

Zn²⁺ konsantrasyonunda en iyi aktivite değeri 2 mM olarak bulunmuştur. Molarite arttıkça aktivite azalmaktadır.

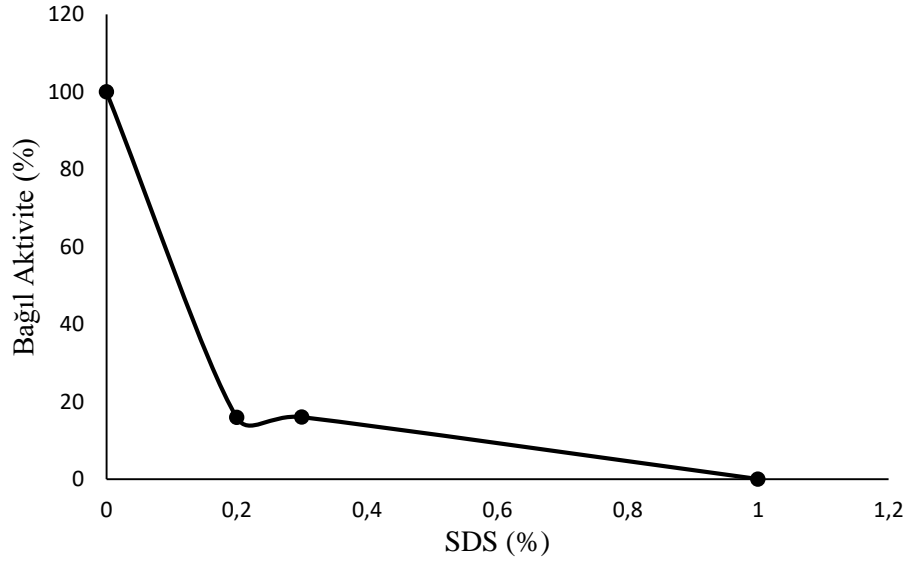
3.6.4. Enzimin Aktivitesi Üzerine Diğer Adjuvanların Etkisi

Yapılan deneyde kullanılan deterjanların enzim üzerine aktivitelerini görmek için daha önce belirlenen standart yöntem kullanıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda grafik çizilerek en iyi değerde çalıştıkları aralıklar belirlendi.



Şekil 21. EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi

EDTA konsantrasyonunda en iyi 1,5 mM'da aktivite göstermiştir. Molarite arttıkça aktivite azalmış ve 10 mM'da tamamen inhibe olmuştur.



Şekil 22. SDS'in enzim aktivitesine etkisi

SDS %0,2 konsantrasyonda %84,1'lik aktivite kaybına uğradığı görüldü. %1'lik konsantrasyonda ise enzim aktivitesi tamamen inhibe olmuştur.

Triton X100 denemelerinde ise herhangi bir ölçüm alınmadı.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Fenilketonurinin ülkemizdeki görülme oranı 1/4500 olan ve her yıl yaklaşık 20-25 çocuktan birinin yakalandığı hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan BH4 maddesinin kimyasal sentezine alternatif olarak bakterilerde ekspreslenen GCH-I enzimidir. Daha önce bahsedilen sebeplerden dolayı termofilik karaktere sahip enzimlerin endüstriyel alanda kullanılmaları tercih edilmektedir (Hızal vd., 2013; Güven vd., 2011; Fukara vd., 2007; Karaağaç vd., 2004). Çalışmamızda termofilik karaktere sahip *A.amyolyticus* bakterisine ait GCH-I enziminin karakterizasyonunu tamamladık. Öncesinde genom analizi tamamlanmış olan WK1 bakterisine ait NCBI verilerini kullanarak bu enzimi kodlayan gene ait veri bilgilerine ulaşıldı. Elde edilen veriler sonucunda primer dizaynı yapıldı. Bu primerler kullanılarak PZR yoluyla tespit edilen enzimin orijinal suşta olduğu gibi 561 baz çiftine sahip olduğu belirlendi. Toplamda 184 aminoasit büyüklüğüne sahiptir. NCBI verilerine göre enzimin büyüklüğü olarak yakın akraba türlerine bakıldığında *Bacillus subtilis* anthracis strain A0248, *B. cereus* strain Q1 ve AH820, *B. weihenstephanensis* strain KBAB4, *B. huringiensis* subsp. konkukian strain 97-27 ve 189, *B. amyloliquefaciens* strain FZB42 ve *B. subtilis* strain 168'de 190, *Geobacillus* sp. strain WCH70'de 188, *Bacillus halodurans* strain ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125'lerde 299 amino asittir. Diğer termofilik bakterilerde de büyüklük bakımından değişkendir. Örneğin; *Thermotoga maritima* strain ATCC 43589 / MSB8 / DSM 3109 / JCM 10099'lerde 259, *Thermodesulfovibrio yellowstonii* strain ATCC 51303 / DSM 11347 / YP87'lerde 188, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* strain ATCC 33223 / 39E'lerde 188, *Thermotoga neapolitana* strain ATCC 49049 / DSM 4359 / NS-E'lerde 259 aa'tir.

Enzimin optimum pH'sı 7,2 olarak bulundu. BRENDA verilerine göre enzimin 6,5 ila 9 pH'larda aktivite verdiği görülmektedir. *Methanococcus janaschii* GCHI'inin 6,5 (Grochowski vd., 2007), *E. coli*'de 7-8,5 (Lee vd., 2002), *Geobacillus stearothermophilus*'da pH 8,0-8,4 (Suzuki vd., 1979), *B. subtilis*'te 8,0 (De Saizieu vd., 1995), *Streptomyces tubercidicus* pH değeri 7,5-8,5 (Yoo vd., 1998), *Thermus thermophilus*'ta 8,5 (Tanaka vd., 2005) ve *A. flavithermus* pH değeri 8,0 (Hızal vd., 2013) olarak tespit edilmiştir. Genel olarak ele alındığında nötr pH ile alkali pH arasında bir pH istemi görülmekte olup *Anoxybacillus amyolyticus* GCH1'i nötr pH isteğine sahiptir.

Enzimin optimum sıcaklık değeri için yaptığımız karakterizasyon çalışmasında

sıcaklığın 70°C olduğunu tespit ettik. Literatür verilerine baktığımızda GCH-I enziminin çalışma sıcaklığının 25-90°C olduğu görülmektedir. Sıcaklık istemi bakımından bakteriyal özelliğinden dolayı termofilik karakter sergilemesi oldukça doğaldır. Termofilik karakterde olmasına rağmen *Thermus thermophilus* GCH1'i 25°C'de optimum aktivite göstermektedir (Tanaka vd., 2005). Optimum sıcaklık istemleri *B. subtilis* GCH1'inde 37°C, *E. coli* GCH1' inde 42°C, *Geobacillus stearothermophilus* GCH1' inde 60-65°C, fareler üzerinde yapılan yapılan çalışmalarda sıcaklık değeri 60°C, *Streptomyces tubercidicus* GCH1'inde 40-42°C, *A. flavithermus* GCH1'inde ise 65°C olarak tespit etmişlerdir (sırasıyla De Saizieu vd., 1995; Yim ve Brown, 1976; Suzuki vd., 1989; Hatakeyama vd., 1979; Yoo vd., 1998; Hızal, 2013). En yakın akraba tür olan *A. flavithermus* GCH1'i ile oldukça yakın sıcaklık istemine sahip olduğunu görmekteyiz. Aradaki fark muhtemelen farklı amino asit içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Enzime ait kinetik parametreleri için yaptığımız karakterizasyon çalışması sonunda ise V_{max} 'ı $6,9 \times 10^{-5} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ nM/dak/mg protein ve K_m 'si $7,0 \pm 1,4$ μ M (R^2 : 0,96) olarak tespit edildi. Literatür ile karşılaştırma yaptığımızda fare karaciğerinde yapılan çalışmada K_m değerini 17,3 μ M, *Streptomyces tubercidicus* üzerine yapılan çalışmada K_m değerinin ise 8,0 μ M, V_{max} değerinin 90 nmol/dakika/mg protein, *A. flavithermus* bakterisinde enzimin K_m değerini $243 \pm 23,25$ μ M, V_{max} değerini ise $100,93 \pm 3,5$ nM/dk/mg protein olarak hesaplamışlardır (Cha vd., 1991; Yoo vd., 1998; Hızal, 2013). BRENDA verilerine göre *Thermus thermophilus* bakterisine ait yaptıkları çalışmada K_m değerini GDP substratı ile 0,0143 mM, GTP substratı ile 0,0042 mM olarak, *Plasmodium falciparum* GTP siklohidrolaz I üzerinde yapılan çalışmada ise K_m değerini 0.0126 mM, *Geobacillus stearothermophilus*'ta ise 980 mM olarak tespit etmişlerdir (Tanaka vd., 2005; Kuemporsin vd.,2014).

Enzimin aktivitesi üzerine metallerin ve çeşitli adjuvantların etkisine bakıldı. Metal aktivitesi sonucunda Mg^{+2} konsantrasyonunda en iyi 2 mM'da aktivite gösterdiği ve 5 mM'da tamamen inhibe olduğu, K^+ konsantrasyonunda 5 mM'da dengeye ulaştığı 50 Mm'da ise tamamen inhibe olduğu, Ca^{+2} konsantrasyonunda en iyi aktivite 1.5 mM'da gösterdiği, Fe^{+3} konsantrasyonunda en iyi aktiviteyi 3 mM' da gösterdiği ve 5 mM'dan sonra tamamen inhibe olduğu, Na^{+2} konsantrasyon grafiğinde en iyi aktiviteyi 5mm'da gösterdiği, Cu^{+2} konsantrasyonunda en iyi aktiviteyi 1.5 Mm' da gösterdiği Zn^{+2} konsantrasyonunda en iyi aktivite değeri 2 mM'da gösterdiği tespit edildi. BRENDA verilerine göre *Bacillus subtilis*'da Fe^{+3} 'de 1mM da %75, Mg^{+2} 0,1 mM'da %43, Zn^{+2} 0,5

mM 'da %14,Co⁺² 0,1mM'da %24 aktivite gösterdiği, Cu⁺², Co⁺³, Ca⁺²'de aktivite göstermediği görülmektedir (Sankaran vd., 2009). *Methanocaldococcus jannaschii*'de 2 mM Mn⁺²'nin aktiviteyi Fe⁺²'ye nazaran daha iyi bir şekilde stümüle ettiğini göstermişlerdir (Grochowski vd., 2007).

Günümüzde enzimler birçok alanda kullanılmaktadır. Bunların başında gıda, deterjan, tıp endüstrisi olmak üzere gittikçe dahada artmaktadır. Memeli, bitki, bakteri gibi canlılarda hatta farklı sıcaklıklarda yaşayabilen bakteriler olduğu gibi farklı karakterdeki kaynaklardan elde edilen enzimlerin kullanılabilmesi için öncelikle karakterizasyon çalışmasının yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda yenidoğan tarama testlerinde yapılması zorunlu olan fenilketonuri hastalığının metabolik yollarından biri olan GTP siklohidrolaz I enzimini kullandık. Bu enzim GCH-I olarak da adlandırılmaktadır. Enzimin bozulması halinde bahsedilen hastalık kalıcı hasarlara neden olmaktadır ve bunun sonucunda kişi hayatı boyunca bu yolağın bir ürünü olan BH₄'ü içeren ilaçları almak zorunda kalmaktadır. Çalışmamızın esas konusu GCH-I'in BH₄ üretiminde kullanılabilmesi için gerekli olan ilk basamak bu enzimin klonlanması ve saflaştırılması ve ardından biyokimsyasal karakterizasyon çalışmasının yapılmasıdır. Termofilik enzimlerin endüstriyel alanda yoğun bir şekilde kullanılması üstünlüğünden yola çıkarak ilgili geni termofilik bir bakteri olan *A. amyloxyticus* suşundan klonlanması gerçekleştirildi. Diğer aşama istenilen enzimin elde edilebilmesi için pET28a(+) vektörüne, üretimi için ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS konak hücresine aktarımını tamamlandı. Gen ekspresyonu sağlandıktan sonra enzim saflaştırıldı ve biyokimyasal karakterizasyonu incelendi. Enzim aktif olup endüstriyel nitelikte olabilmesi için mutasyonlarla iyileştirilmesi gereklidir.

5. ÖNERİLER

Fenilketonüri metabolizması genellikle hastalıklar üzerinden ve de canlıda primer olarak insan öncelikli olmak üzere çalışılan sağlık konularından biridir. Fenilketonüri hastalığının kalıtsal olması nedeniyle önlenmesi yerine hayatı daha iyi idame etme noktasında BH4 katkılı ilaçlar sunulmaktadır. Günümüzde BH4, kimyasal sentez ile oluşturulmaktadır. Bu nedenle BH4'ün biyolojik olarak üretilmesinde metabolik yolda bulunan genler ve ürünleri kullanılmalıdır. Çalışmamız metabolik yolun ilk enzimini kodlayan genin araştırılması üzerinedir. Her ne kadar çalışmamız tamamlanmış olsa da konunun daha ileri götürülmesi için ve endüstriyel uygulanabilirliğini arttıracak çalışmalara da ihtiyacı vardır.

Bu bağlamda aşağıda önerilen çalışmalar yapılabilir.

1. Enzime etki eden ve literatürde yer almasa da farklı substratların denenmesi kinetik çalışmalara yarar sağlayacaktır,
2. Benzer mikroorganizmalarda aynı genin varlığı taranabilir ve yapılacak karakterizasyon çalışmaları ile diğer türlerle karşılaştırma yapılabilir,
3. Korunmuş bölgeler incelenerek yapılacak mutasyonlar ile enzimin aktivitesinde ne gibi değişiklikler olduğu incelenebilir,
4. Metabolik yolda bulunan diğer genlerle ortak ekspresyon çalışmaları ile biyolojik/enzimatik üretimin durumu ortaya konabilir.

KAYNAKLAR

- Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gütlich, M., Fischer, and Huber, R. (2000). Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13567-13572.
- Bak, P. (2017). Anoxybacillus gonensis G2T glukoz izomerazının kinetik ve bazı biyokimyasal parametrelerinin g33d, n138g, t144s, v293ı, v32ı, e373k ve v380ı bölge spesifik mutasyonları ile geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri, Rize, Türkiye 2019 s.
- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., GoTze, E., Herrmann, A., Bacher, A.A. (1998). Nmr studies on the reaction mechanisms of *gtp* cyclohydrolase I. *The Journal Of Biological Chemistry*, 28132-28134
- Campbell, C.M., Edwards, R.R., Carmona, C., Uhart, M., Wand, G., Carteret, A., Kim Y., Frost J. and Campbell, J.N. (2009). Polymorphisms in the *gtp* cyclohydrolase gene (*gch1*) are associated with ratings of capsaicin pain. *PAIN®*, 141(1-2), 114-118.
- Cha, K.W., Jacobson, K., B. and Yim, J. J. (1991). Isolation and characterization of GTP cyclohydrolase I from mouse liver. *Comparison of normal and the hph-1 mutant. Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12294-12300.
- De Saizieu, A., Vankan, P. and van Loon, A.G. (1995). Enzymic characterization of *Bacillus subtilis* GTP cyclohydrolase I. evidence for a chemical dephosphorylation of dihydroneopterin triphosphate. *Biochemical Journal*, 306(2), 371-377.
- Elzaouk, L., Osmani, H., Leimbacher, W., Romstad, A., Friedman, J., Maccollin, M., thöny, N. and Blau, N. (2002). Sepiapterin reductase deficiency: molecular analysis in a new case presenting with neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *In Chemistry And Biology Of Pteridines And Folates* (Pp. 277-284)
- Fukara, G. (2007). Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Ankara, Türkiye 2007 s.
- Garavaglia, B., Invernizzi, F., Carbone, M.A., Viscardi, V., Saracino, F., Ghezzi, D. and Nardocci, N. (2004). GTP-cyclohydrolase I gene mutations in patients with autosomal dominant and recessive *gtp-ch1* deficiency: identification and functional characterization of four novel mutations. *Journal Of Inherited Metabolic Disease*, 27(4), 455-463.
- Grochowski, L.L., Xu, H., Leung, K. and White, R.H. (2007). Characterization of an Fe²⁺-dependent archaeal-specific GTP cyclohydrolase, MptA, from *methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry*, 46(22), 6658-6667.

- Güven, R.G. (2011). Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri . *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 1-10.
- Haliskaranfil, S. (2012). Termoalkalifilik amilaz ve selüloz enzim (multienzim) üreticisi bacillus sp. izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği. *Ç.Ü Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25-27.
- Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M. and Taniguchi, T. (1989). Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science*, 244(4904), 551-556.
- Hatakeyama, K., Inoue, Y., Harada T., Kagamiyama, H. (1991). Cloning and sequencing of cDNA encoding rat GTP cyclohydrolase I the first enzyme of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2), 765-769.
- He, A. and Rosazza, J.P. (2003). gtp cyclohydrolase I: purification, characterization, and effects of inhibition on nitric oxide synthase in nocardia species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7507-7513.
- Hızal, Ö. (2013). Anoxybacillus flavithermus bakterisinin ısıl kararlı guanozintrifosfat siklohidrolaz-I geninin klonlanması ve ekspresyonu . Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü ,Rize, Türkiye 2013 s.
- Karaağaç, S.D. (2004). Ekstrem Termofil Bakterilerin Protein Yapıları Ve Termostabilizasyon Mekanizmaları1. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji* , 19-33.
- Kazancı, P. (2018). Fenilketonüri tanısı için kağıt-tabanlı mikroakışkan analitik cihaz geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik, Ankara, Türkiye 2018 s.
- Koch, R., Guttler, F. and Blau, N. (2002). Mental illness in mild PKU responds to biopterin. *Molecular genetics and metabolism*, 75(3), 284-286.
- Koyuncu, M. (2010). Fenilketonurili Hastalarda Prodilaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa 2010 s.
- Kümpornsinsin, K., Kotanan, N., Chobson, P., Kochakarn, T., Jirawatcharadech, P., Jarupornpan, P., Yuthavong, Y. and Chookajorn, T. (2014). Biochemical and functional characterization of Plasmodium falciparum GTP cyclohydrolase I. *Malaria journal*, 13(1), 150.
- Lee, S., Ahn, C., Park, E., Hwang, D.S. and Yim, J. (2002). Biochemical Characterization Of Oligomerization Of Escherichia Coli. *Journal Of Biochemistry And Molecular*
- Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hösl, C., Ritz, H., Meining, W., Eberhardt, S. and Bacher, A. (1995). Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), 12120-12125.

- Novagen. 2012. pET-28a-c(+) Vectors. TB074, MA, USA.
- Özdemir, S., Kılınç, E., Poli, A. and Nicolaus, B. (2013). Biosorption of heavy metals (Cd²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, and Mn²⁺) by thermophilic bacteria, *Geobacillus thermantarcticus* and *Anoxybacillus amylolyticus*: equilibrium and kinetic studies. *Bioremediation journal*, 17(2), 86-96.
- Pehlivan, M. ve Kalkan, İ. (2016). Fenilketonüri: olgu sunumu . *Aydın Sağlık Dergisi*, 57-62.
- Pey, A.L., Pérez, B., Desviat, L.R., Martínez, M.A., Aguado, C., Erlandsen, H. and Martínez, A. (2004). Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Human Mutation*, 24(5), 388-399.
- Phillips, G., El Yacoubi, B., Lyons, B., Alvarez, S., Iwata-Reuyl, D. Ve De Crécy-Lagard, V. (2008). . Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: a new role for GTP cyclohydrolase I. *Journal of bacteriology*, 190(24), 7876-7884.
- Promega Technical Manual. (2012). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610. Madison, WI, USA.
- Sankaran, B., Bonnett, S.A., Shah, K., Gabriel, S., Reddy, R., Schimmel, P., Rodinov, D. T., Lagard, C.V., Hellman J.D., Reuyl I.D. and Swairjo, M.A. (2009). Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *Journal of bacteriology*, 191(22), 6936-6949.
- Sarıboğa, B. (2008). Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörler Geliştirilmesi. Doktora Tezi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye 2008 s.
- Schoedon, G., Troppmair, J., Fontana, A., Huber, C., Curtius, H.C. and Niederwieser, A. (1987). Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *Eur. J. Biochem.* 166, 303-310.
- Serova, L.I., Maharjan, S., Huang, A., Sun, D., Kaley, G. and Sabban, E.L. (2004). Response of tyrosine hydroxylase and gtp cyclohydrolase 1 gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration. *Brain Research*, 1015(1-2), 1-8.
- Shiratori, H., Sasaya, K., Ohiwa, H., Ikeno, H., Ayame, S., Kataoka, N. and Ueda, K. (2009). *clostridium clariflavum* sp. nov. and *clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1764-1770.
- Smith, S.B., Reenilä, I., Männistö, P.T., Slade, G.D., Maixner, W., Diatchenko, L. Nackley, A.G. (2014). Epistasis between polymorphisms in COMT, ESR1, and GCH1 influences COMT enzyme activity and pain. *PAIN®*, 155(11), 2390-2399.

- Suzuki, T., Kurita, H. and Ichinose, H. (2004). GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate. *European journal of biochemistry*, 271(2), 349-355.
- Suzuki, Y., Yasui, T. and Abe, S. (1979). Occurrence of GTP cyclohydrolase I in *Bacillus stearothermophilus*. *The Journal of Biochemistry*, 86(6), 1679-1685.
- Tanaka, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. and Masui, R. (2005). Novel reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. High-resolution X-ray crystallography of *Thermus thermophilus* HB8 enzyme complexed with a transition state analogue, the 8-oxoguanine derivative. *Journal of biochemistry*, 138(3), 263-275.
- Tiefenbacher, C.P., Lee, C.H., Kapitza, J., Dietz, V. and Niroomand, F. (2003). Sepsiapterin reduces postischemic injury in the rat heart. *Pflügers Archiv*, 447(1), 1-7.
- Zirn, B., Steinberger, D., Troidl, C., Brockmann, K., von der Hagen, M., Feiner C., Henke L. and Müller, U. (2008). Frequency of *gch1* deletions in dopa-responsive dystonia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(2), 183-186.
- URL-1, (2019) https://www.tavsiyedyorum.com/makale_18473.htm (7 Kasım 2019)
- URL-2, (2019) <https://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahydrobiopterin> (7 Kasım 2019)
- URL-3, (2019) https://www.biocampare.com/pfu/110627/soids/22523/elisa_kit/gch1 (8 Kasım 2019)
- URL-4, (2019) https://www.bethly.com/antibody/pca_a-z/gch1 (8 Kasım 2019)
- URL-5, (2019) <https://ghr.nlm.nih.gov/gene> (8 Kasım 2019)
- URL-6, (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682297> (8 Kasım 2019)
- Ülker, İ., ve Şanlıer, N. (2018). Fenilketonüride beslenme ve yeni tedavi yaklaşımları. *Dergipak*, 187-198.
- Gowda, V.K., Nagarajan, B., Srinivasan, V.M. and Benakappa, A. (2019). A novel *gch1* mutation in an indian child with gtp cyclohydrolase deficiency. *The Indian Journal of Pediatrics*, 86(8), 752-753.
- Witter, K., Cahill, D.J., Werner, T., Ziegler, I., Rödl, W., Bacher, A., ve Gütllich, M. (1996).. Molecular cloning of a cDNA coding for GTP cyclohydrolase I from *Dictyostelium discoideum*. *Biochemical Journal*, 319(1), 27-32.
- Woo, H.J., Kang, J.Y., Choi, YK. and Park, Y.S. (2002). Production of sepiapterin in *Escherichia coli* by coexpression of cyanobacterial GTP cyclohydrolase I and human 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6), 3138-3140.
- Yim, J.J. and Brown, G.M. (1976). Characteristics of guanosine triphosphate cyclohydrolase I purified from *Escherichia coli*. *Journal of Biological*

Chemistry, 251(16), 5087-5094.

Yoo, J.C., Han, J. M., Ko, O.H. and Bang, H.J. (1998). Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from *Streptomyces tubercidicus*, a producer of tubercidin. *Archives of pharmacal research*, 21(6), 692-697..



ÖZGEÇMİŞ

07.02.1990 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk öğrenimini Of Şehit Ali Bulut İlkokulunda, ortaöğrenimini İsmail Yıldırım İlköğretim Okulu'nda, lise Öğrenimini ise Özel Fatma Baş Lisesinde tamamladı.2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu.2014 Yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Çayeli Eğitim Fakültesi'nden pedagojik formasyon aldı. 2017 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

