

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T
BAKTERİSİNİN *ptps* GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU
VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

EFSUN ÇELİK

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU

YRD. DOÇ. DR. DERYA EFE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2018

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T BAKTERİSİNİN *ptps*
GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ danışmanlığında, Efsun ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/01/2018 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Derya EFE	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Termofilik *anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^t bakterisinin *ptps* geninin klonlanması, ekspresyonu ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu adlı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın hazırlanmasında her türlü yardım ve desteklerini şahsıma esirgemeyen danışmanın Sayın Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım esnasında tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Derya EFE, hocalarıma ve çalışmalarımı yürüttüğüm Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndaki tüm arkadaşlarıma, Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan HPLC analizleri için Araş. Gör. Dr. Emine KILIÇKAYA SELVİ'ye ve Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Genetik Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgi ve destekleriyle yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 113Z811 nolu proje ile desteklenmiştir.

Efsun ÇELİK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T Bakterisinin *pts* Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin, 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. 24/01/2018

Efsun ÇELİK

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 flavithermus* DSM 2641^T BAKTERİSİNİN *ptps* GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE ENZİMİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Efsun ÇELİK

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

Fenilketonüri (FKÜ), yenidoğan bebeklerde fenilalanin hidroksilaz enzim yetersizliğinden kaynaklanan ve tedavi edilebilir zekâ geriliklerinin en önemli nedeni olan bir hastalıktır. Hastalığın nedenlerinden biri de, bu metabolik yolda yer alan PTPS enzimine ait kusurlardan ileri gelir. Hastalığın tedavisi mümkün olmayıp, kronik hastalarda ömür boyu tetrahydrobiopterin yüklemesi yapılmaktadır. Günümüzde tetrahydrobiopterin maddesi kimyasal olarak sentezlenmektedir. Kimyasal sentezin uzun sürmesi, masraflı olması ve de kimyasal kirleticilere maruz kalması nedeniyle biyolojik olarak üretim farklı bir bakış açıdır. Bu nedenle, termofilik *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T bakterisine ait *ptps* geni PZR yöntemiyle tespit edildi ve pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. *E. coli* BL21(DE3)pLys konak hücrelerinde gerçekleştirilen ekspresyon sonrasında Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzime ait biyokimyasal ve kinetik parametreler, ters faz HPLC sistemi ile belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda 438 bç'lik genin, 145 amino asitlik 17 kDa büyüklüğünde bir enzimi ürettiği görüldü. Enzimin optimum pH'sı 8,8, optimum çalışma sıcaklığı ise 65°C olarak belirlendi. Sepiapterin dönüşüm aktivitesi bulunmayan enzimin, NTP-H₂ aktivitesinde ise maksimum hızı (*V*_{max}) 0,0081 ± 0,00017 µmol/dak/mg protein ve *K*_m'si ise 0,261 ± 0,007 mM olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda 5 mM K⁺'un % 9, 10 mM Ca⁺²'nin % 5 oranında aktiviteyi arttırdığı, 1, 5, 10 mM Al⁺³'ün % 2, 1 mM Zn⁺²'nin % 5,5 oranında, 5 mM DTT'nin ise % 50 inhibe ettiği bulundu.

2018, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus flavithermus*, PTPS, BH₄, termofilik enzim.

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF *pts* GENE FROM THERMOPHILIC *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ITS ENZYME

Efsun ÇELİK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Phenylketonuria (FKU) is a disease caused by phenylalanine hydroxylase enzyme deficiency in newborn infants and is the most important cause of treatable mental retardation. One of the causes of the disease comes from the defects of the PTPS in the metabolic pathway of phenylalanine metabolisms. Treatment of the disease is not feasible, and life-time tetrahydrobiopterin loading is performed in chronic patients. Today, tetrahydrobiopterin is chemically synthesized. Biological production is a different point of view due to the long duration of chemical synthesis, costs and exposure to chemical pollutants. For this reason, the *pts* gene from the thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T was identified by PCR method and cloned into the expression vector, pET28a(+). After the gene expression in *E. coli* BL21(DE3)pLys host cells, the enzyme was purified by Ni-NTA affinity chromatography. Biochemical and kinetic parameters of the enzyme were determined by reverse phase HPLC system. As a result of the studies, it was seen that the genome of 438 bp produced an enzyme with a size of 17 kDa of 145 amino acids. The optimum pH of the enzyme was determined as 8.8 and the optimum temperature was 65°C. The maximum rate (V_{max}) and K_m for NTP-H₂ activity 0.0081 ± 0.00017 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein and 0.261 ± 0.007 mM, respectively. The enzyme has not sepiapterin conversion activity. In the studies, 5 mM of K⁺ and 10 mM of Ca⁺² were increased the enzyme activity as 9% and 5%, although 1, 5, and 10 mM of Al⁺³, 1 mM of Zn⁺², and 5 mM DTT were inhibited as 2%, 5.5%, and 50%, respectively.

2018, 57 pages

Key words: *Anoxybacillus flavithermus*, PTPS, BH₄, thermophilic enzyme.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Literatür Özeti.....	6
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Materyal.....	14
2.2. Metod.....	16
2.2.3. <i>ptps</i> Gen Ürününün Ekspresyonu.....	24
2.2.4. PTPS'nin Saflaştırılması.....	25
2.2.4.1. Isı Şoku ile Saflaştırma.....	25
2.2.4.2. PTPS'nin Ni-NTA Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	25
2.2.5. PTPS'nin Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	27
2.2.5.1. PTPS'nin Sepiapterin Aktivitesi.....	27
2.2.5.2. PTPS'nin NTP-H ₂ Aktivitesi.....	27
2.2.5.2.1. PTPS Substratının Hazırlanması.....	27
2.2.5.2.2. Substratın Denenmesi.....	29
2.2.6. PTPS'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	30
2.2.6.1. Optimum pH.....	30
2.2.6.2. Optimum Sıcaklık.....	30

2.2.6.3.	Kinetik Çalışmalar	30
2.2.6.4.	PTPS Üzerine Aktivatör ve İnhibitör Etkilerin Belirlenmesi.....	31
3.	BULGULAR	32
3.2.	<i>ptps</i> Gen Ürününün Ekspresyonu ve Ekspresyon Sıcaklığının Belirlenmesi.	34
3.3.	PTPS'nin Saflaştırılması	35
3.3.1.	Isı Şoku ile Saflaştırma	35
3.3.2.	PTPS'nin Ni-NTA Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	35
3.4.	PTPS Aktivitesi	36
3.4.1.	PTPS'nin Sepiapterin Aktivitesi.....	36
3.4.2.	PTPS'nin NTP-H ₂ Aktivitesi.....	36
3.1.6.	PTPS'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu	39
3.1.6.1.	Optimum pH.....	39
3.1.6.2.	Optimum Sıcaklık	40
3.1.6.3.	Kinetik Çalışmalar	41
3.1.6.4.	PTPS Üzerine Aktivatör ve İnhibitör Etkilerin Belirlenmesi.....	42
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	43
5.	ÖNERİLER	46
	KAYNAKLAR	47
	ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. GTP'den BH4 biyosentezini gösteren yol	4
Şekil 2. <i>Afpts</i> 'ye ait PZR sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüleri	32
Şekil 3. <i>Afpts</i> 'ye ait DNA dizi analizi sonucu	33
Şekil 4. <i>Afpts</i> 'ye ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri	34
Şekil 5. <i>Afpts</i> geninin pET28a(+) vektörü ile ekspresyon sonrası oluşacak proteindeki 6xHis kuyruğunun oluşumu	34
Şekil 6. Saflaştırılmış AFPTPS'nin % 12 SDS-PAGE görüntüsü	36
Şekil 7. Substrat olarak kullanılan GTP'ye ait ters faz HPLC piki	37
Şekil 8. Neopterin'e ait ters faz HPLC piki	38
Şekil 9. GTP'den NTP-H ₂ oluşumuna ait ters faz HPLC piki	38
Şekil 10. PTPS reaksiyonuna ait ters faz HPLC piki	39
Şekil 11. PTPS aktivitesine pH etkisi	39
Şekil 12. PTPS'nin Tris tamponunda (pH 8,8) NTP-H ₂ 'den 6-provoil 5,6,7,8-tetrahidropterin dönüşümünün reverse faz HPLC sonucu	40
Şekil 13. PTPS'nin NTP-H ₂ 'den 6-provoil 5,6,7,8-tetrahidropterin dönüşümünün reverse faz HPLC sonucu	40
Şekil 14. Optimum sıcaklık	41
Şekil 15. PTPS'nin Michaelis-Menten eğrisi	41
Şekil 16. Metal, DTT ve EDTA Etkisi	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. β -Glukozidazgeni için kullanılan primerler	17
---	----



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	Mikro Litre
<i>A. flavithermus</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
APS	Amonyum Persülfat
ATP	Adenozin Trifosfat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bç	Baz Çifti
BH4	Tetrabiopterin
DHPR	Dihidropteridin Redüktaz
DHPR	Dihidropteridin Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DTT	Dikloro Difenil Trikloroethan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAH	Fenilalanin Hidroksilaz
FKÜ	Fenilketonüri
GCH	Guanozin Trifosfat Siklohidrolaz
GTP	Guanozin Trifosfat
His	Histidin Amino Asidi
HPA	Hiperfenilalanemia
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	İsopropyl-Trigalactosidose
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten Sabiti
LB	Lauria-Bertani
LBA	Lauria-Bertani Agar
MES	Manufacturing Execution System
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	3-(N-morfolino) Propansülfonik Asit

NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
Ni-NTA	Nikel-Nitrilotriasetik Asit
nM	Nanomolar
NTP-H ₂	Dihidroneopterin Trifosfat
OD	Optical Density
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Chain Reaction
pDNA	Plazmit DNA
pmol	Pikomol
PTPS	6-Pirovil Tetrahidropterin Sentaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolution Per Minute
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Gel Elektroforezi
spr	Sepiapterin Redüktaz
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-Etilendiamin
V _{max}	Maksimum Hız
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tetrabiopterin (BH4), yüksek organizmalarda fenilalanin hidroksilaz, tirozin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve nitrit oksit sentazın üç izoformu gibi birçok enzim tarafından kullanılan esansiyel bir kofaktördür. Bu kofaktör, insan fizyolojisinde büyük öneme sahiptir. Yapılan son çalışmalarda, dopa-responsive dystonia ve Parkinson hastalıklarının da içeren bazı nörolojik hastalıklarda kullanımının gerekli olduğu belirtilmiştir. “Sapropterin hidroklorit” generik adıyla bilinen BH4, DHPR (dihidropteridin redüktaz) ve hiperfenilalanemia (veya fenilketonüri) hastalarının tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır.

Fenilketonüri (FKÜ), yenidoğan bebeklerde fenilalanin hidroksilaz enzim yetersizliğinden kaynaklanan ve tedavi edilebilir zekâ geriliklerinin en önemli nedeni olan bir hastalıktır.

Fenilketonüri, otozomal resesif geçişli, kanda fenilalanin yüksekliğine yol açan, fenilalanin hidroksilaz enzim eksikliğine bağlı görülen bir metabolizma hastalığıdır (Demirkol 2010, Törüner 2012). Fenilalanin hidroksilaz enzimi; protein oluşumunda gerekli amino asit metabolizmasını sağlar (Törüner 2012). FKÜ görülme sıklığı etnik gruplara göre değişmekte; beyaz ve yerli Amerikalılarda yüksek, siyahlarda, Asyalılarda ve İspanya’da ise daha düşük olduğu belirtilmektedir (Scriver, Kaufman 2001). Dünyada yaklaşık 1:12000 görülmekte iken; ülkemizde akraba evliliklerin sık olması nedeniyle bu oran 1:4200 olarak karşımıza çıkmaktadır. FKÜ; klasik, hafif, FKÜ dışı hiperfenilalaninemi (hafif hiperfenilalaninemi) ve BH4-yanıtlı hiperfenilalaninemi/FKÜ olarak karşımıza çıkar. Klasik FKÜ, fenilalanin hidroksilaz enziminin tam ya da tama yakın eksikliği söz konusudur. Klasik FKÜ’lü bebeklerde tanıda gecikme olursa ve buna bağlı olarak erken tedavi başlanmazsa mental gerilik ve gelişme geriliği yaşanır. Tedavi edilmeyen olgularda kan fenilalanin düzeyi çok yüksektir ($\geq 1200\mu\text{mol/L}$; $\geq 20\text{ mg/dL}$). Doğumda bebek normal olmasına karşın ilk aylardan sonra psikomotor gerilik görülmeye başlanır. Hafif FKÜ, plazmafenilalanin düzeyi 10-20 mg/dL’dir. Fenilalanin düzeyi 6-10 mg/dL arasında olan bebeklerin yakın izlemi gerekir. FKÜ dışı

hiperfenilalaninemi (hafif hiperfenilalaninemi) de ise plazma fenilalanin düzeyi 6-10 mg/dL'nin altında olmasıdır. Fenotip normaldir. BH4-yanıtlı hiperfenilalaninemi/FKÜ, plazma fenilalanin düzeyi >360 µmol/L olan hiperfenilalaninemi olgularının bir kısmında fenilalanin hidroksilaz enzimi tetrahydropterin (BH4)'e yanıtlıdır (Demirkol 2010). Günümüzde fenilketonüri (FKÜ), diğer bir deyişle hiperfenilalanemia, HPA) en ayrıntılı çalışılmış doğumsal metabolik hastalık olup, fenilalanin hidroksilaz (FAH) enzimi aktivitesinin yokluğu sonucu gelişen, otozomal resesif, erken dönemde tedavi edilmediğinde ağır motor ve mental gerilik ile karakterize edilmiştir (Muntau vd, 2002, Özer, 2004). Genel görülme sıklığı 1/10.000 olmasına rağmen Sağlık Bakanlığı'nın desteği ile yapılan araştırmalarda ülkemizde bu oran 1/4.500'dür. Her yıl ülkemizde 250-300 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır yani Türkiye'de her 20-25 kişiden biri bu hastalığı taşımaktadır. FKÜ ya da HPA oluşumunun primer nedenlerinden biri, tetrahydropterin metabolizması bozukluklarıdır (Kure vd, 1999, Muntau vd, 2002, Spaen vd, 2001, Kendirci, 2006). Bu bozukluklar, dihydropteridin redüktaz, GCH I, pterin-4-8-karbinolamin dehidrataz ve 6-pirovil tetrahydropterin sentaz (PTPS) defekti olarak da tanımlanabilir ve karaciğer, böbrekler, beyin ve kan dokusu etkilenir (Blau ve Burgard, 2005). Tetrahydropterin (BH4) metabolizması bozukluğunun nedeniyle oluşan hastalıkların genel görülme sıklığı dünyada % 1-3 iken bu oran Türkiye'de % 15'tir. Bu sonuç, ülkemizde FKÜ'nün sık rastlandığını göstermektedir.

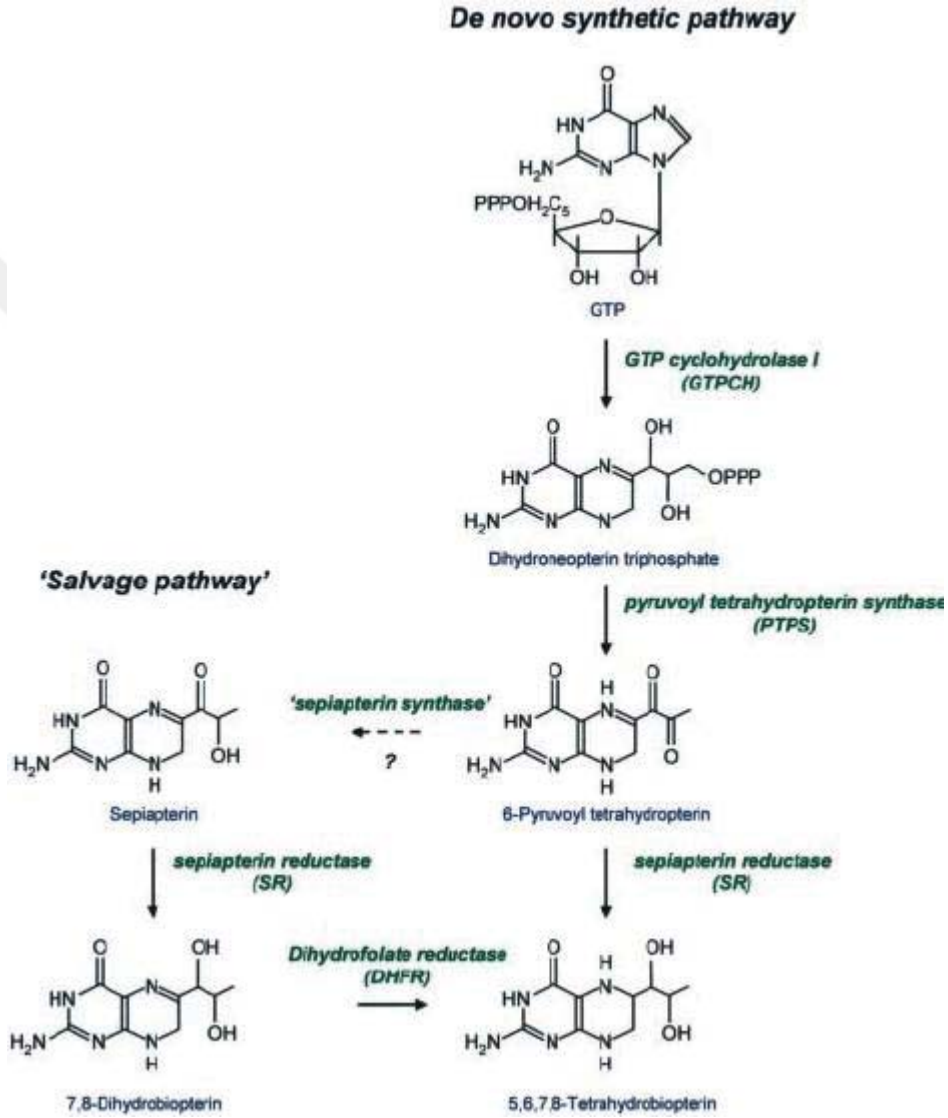
BH4, konjuge olmayan pterinlerden olup biyolojik olarak aktif özelliğindedir (Blau vd, 2001). BH4 gibi tetrahydropterinler, solüsyonda kararsızdır ve oksijen, süperoksit ve peroksinitrit gibi bileşiklerle reaksiyon verirler. Bu nedenlerden ötürü, BH4'ün oksidatif zararlara karşı hücreleri korumada görevli oldukları düşünülmektedir. Oksitlenmiş formlarından BH4'ün yeniden üretimi, biyolojik sistemler için oldukça önemlidir. Aerobik solunumda BH4'ün oksidasyonu, pH, sıcaklık, tampon ve reaksiyona giren madde konsantrasyonu gibi etkilere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Wei vd, 2003). BH4, serotonin ve dopamin nörotransmitterlerinin biyosentezinde ve fenilalanin, tirozin, triptofan katabolizmasından sorumlu enzimler gibi aromatik aminoasit hidroksilazların protein olmayan temel olarak en iyi tanımlanmış kofaktörüdür. Üstelik nitrik oksit sentazın üç izoformunun ve alkil-eter metabolizmasında yer alan gliseril eter monooksijenaz enzimlerinin de kofaktörüdür.

Yüksek organizmalarda yer alan her bir hücre veya dokunun hücresel fonksiyonlar veya metabolik fonksiyonları yerine getirmek için BH4 içerdiği muhtemeldir. BH4, büyüme faktörü olarak, nöronlarda serotonin ve dopamin salınımı ile ilgili olarak karşımıza çıkmaktadır (Kolinsky ve Gross, 2004, Ponzzone vd, 2004). BH4'ün rol aldığı reaksiyonların içerisinde en önemli olanı fenilalanin hidroksilasyon sistemidir. Bu sistem içerisinde BH4, substrat olarak rol oynar ve yine bağlı reaksiyonlar sonucunda yeniden elde edilir. Fenilalanin hidroksilaz, fenilalanin tarafından konformasyonel değişim yoluyla aktive edilir. BH4 sentezinde, döngüde veya fenilalanin hidroksilaz enzimideki bir eksiklik veya kusur, hiperfenilalaninemiyanın artmasına yani fenilketonüriye neden olur (Demos vd, 2005, Blau vd, 2001).

BH4'ün biyosentez mekanizmasında, guanozin trifosfat siklohidrolaz I (*gchI*), 6-pirovil tetrahidropterin sentaz (*ptps*) ve sepiapterin redüktaz (*spr*) genleri tarafından kodlanan ve sırasıyla her biri bir önceki enzimin dönüştürdüğü kimyasal maddeyi kullanarak GTP'den sentezlenmektedir. Fenilketonüri ve DHPR eksikliği hastalıklarında gerekli sürekli kullanımlardan dolayı ilk defa 1992 yılında doğal BH4 kimyasal olarak sentezlenmiştir. 3 asimetrik karbon atomuna sahip olan BH4'ün kimyasal olarak sentezlenmesi oldukça zordur. Kullanılan karmaşık prosedürler, birçok sentetik basamağın uygulanması, pahalı materyallerin kullanımı gibi gereklilikler doğurmaktadır. BH4'ün kimyasal sentezine alternatif olarak, biyosentez yolunda rol oynayan genlerin kullanılmasıyla mikroorganizmada üretimi gösterilebilir.

Hücreler BH4'ü iki farklı yol ile oluştururlar. *De novo* biyosentez yolunda, prekürsör olarak GTP kullanılır, *salvage* yolundaysa, önceden ortamda var olan dihidropterinler kullanılır.(Şekil 1)*De novo* biyosentezi yolu üç ana enzim ile gerçekleşir ve *in vivo* ve *in vitro* şartlarda da durum aynıdır. Bu enzimler sırasıyla, GCH I, PTPS ve SPR'dır. Bu enzimlerin ilk ikisinden sorumlu genlerde görülen genetik kusurlar, hayati öneme sahip hastalıklar olarak karşımıza çıkar. Elde bulunan verilere göre konjenital hastalıklarda BH4'e bağımlı kusurların % 58'i *ptps*, % 4'ü *gchI* ve % 0,9'u ise *spr* genlerindeki kusurlardan kaynaklanmaktadır (Ponzzone vd, 2004). Şekil 1'de GTP'den BH4 biyosentezi gösterilmektedir. GCHI enzimi (EC: 3.5.4.16), BH4 biyosentezinin ilk enzimidir (Hwu vd, 2003, Blau vd, 2001). Birçok farklı organizmadan elde edilmiş (bakteri, mantar, sinek, tavuk, insan) ve incelenmiştir.

Enzim, GTP'yi dihidroneopterin trifosfata dönüştürür. İnsanda tek kopya halinde ilgili genden kodlanan 250 aminoasit içeren enzim, diğer canlılarda da benzerlik gösterir (Blau vd, 2001, He ve Rosazza, 2003, Woo vd, 2002a). Protein yapısı itibariyle farklı canlılarda dimer, tetramer, pentamer, octamer hatta decamer yapıda olabilmektedir (URL-1, 2013).



Şekil 1. GTP'den BH4 biyosentezini gösteren yol (Nicholas ve Channon, 2004)

PTPS enzimi (EC: 4.2.3.12), birçok canlıdan ve dokudan izole edilmiş korunmuş bir protein olarak karşımıza çıkmaktadır. PTPS, dihidroneopterin trifosfatı 6-pirovoil tetrahydropterine dönüştürür. Magnezyum bağımlı bir enzim olan PTPS, oldukça iyi bir şekilde karakterize edilmiş ısıya dayanıklı Zn^{+2} metalloprotein içeren bir proteindir

(Ploom vd, 1999). 145 aminoasitlik bir ORF'ye sahiptir. İnsanda 11q22.3-22.3 pozisyonunda 6 ekzonlu genden kodlanır (Blau vd, 2001, Woo vd, 2002a). Protein yapısı itibariyle farklı canlılarda monomer, dimer, tetramer, pentamer, hexamer yapıda olabilmektedir (URL-2, 2013).

Biyosentetik üretim için, GTP'den BH4'ün biyosentez yolunda görevli olan yukarıda bahsi geçen üç enzimin klonlanması ve ekspresyonu gereklidir.

Bu tez çalışmasında, *A. flavithermus* DSM 2641^T kökenli *ptps* geni kullanıldı. *ptps* geninin pGEM/T-Easy vektöründen alınarak ekspresyon vektörüne klonlanarak ekspresyon hücresi *E. coli* BL21(DE3) pLys'e aktarılmasını, sonrasında gen ekspresyonu sağlanarak enzim üretimi ve saflaştırma işlemlerini ve de enzimin biyokimyasal karakterizasyonu ile kinetik parametrelerinin belirlenmesini, böylece *de novo* yoluyla BH4 üretimi için termofilik genler kullanılarak BH4 üretimini ve karakterizasyonunu sağlamayı amaçladık. Bu tür üretimlerin daha büyük çaplarda yapılmasında istenen genel bir özellik de kullanılan enzimin çevresel şartlardan etkilenmesini minimum düzeye indirmektedir. Bu çevresel şartların en önemlisi elbette ki sıcaklıktır.

Sıcaklığın artmasına bağlı olarak birçok enzim bozulmaktadır ve aynı zamanda endüstriyel olarak maliyeti de arttırmaktadır. İnsan vücut sıcaklığının 37°C olduğu varsayılırsa, termofilik bir bakteriden izole edilen bu enzimlerin dayanıklılığı daha fazla olacaktır. Sahip olduğumuz enzimlere ait gen ve aminoasit sıralarının diğer organizmalarla benzerliklerinin yüksek olması avantajı kullanılarak, enzimlerin ısıya dayanıklı bir mikroorganizmadan elde edilmesi bu dezavantajı ortadan kaldıracaktır. Böylece kaynak organizmadan gelen ısıya dirençlilik özelliği istenen ürünün sentezinde ısıdan kaynaklanan istenmeyen defektleri engellemiş olacaktır. Sonuç olarak gen ürünlerinin, biyolojik ve tıbbi uygulama alanlarında kullanılmak üzere biyoteknoloji ve endüstri pazarına kazandırılması hedeflenmektedir.

1.2. Literatür Özeti

İlgili hastalıkların tedavilerinde kullanılan yöntemlerden en önemlisi ve yaygını, BH4 metabolizmasının bozukluğundan kaynaklandıklarından dolayı hastaya dışarıdan BH4 yüklemesi yapmaktır (Kendirci, 2006, Blau vd., 2001, Blau ve Burgard, 2005, Kure vd., 1999, Muntau vd., 2002, Spaen vd., 2001).

BH4'e bağımlı olan hastalıklardan HPA tedavisinde tüm yaşlardaki hastalar için 5-20 mg/kg/gün, PTPS eksikliğinde 5-10 mg/kg/gün, ılımlı PTPS eksikliğinde 2 doz halinde 5-10 mg/kg/gün BH4 tedavisi uygulanması önerilmektedir. Hastalığın tedavisi sırasında BH4 yüklemeleri, 0-3 yaş arasında haftalık, 4-9 yaş arasında 2 haftada bir, 10-15 yaş arasında aylık, 15 yaş üzerinde 1-2 aylık ve maternal hastalık durumunda ise yaşa bakılmaksızın haftalık olarak BH4'ün etkisi için fenilalanin ve tirozinin biyokimyasal olarak izlenmesi gereklidir. (Blau ve Burgard, 2005).

İlgili hastalıkların tedavilerinde yalnızca BH4 veya nörotransmitter katkılı ikili tedavi şekli yaygındır (Schircks, 2013). Bu tedavilerde kullanılan BH4 tabletleri genellikle 10, 50 veya 100 mg'lık dozlar halinde BH4 (ve eşdeğer miktarda askorbik asit) içermektedir (Blau ve Burgard, 2005, Schircks, 2013). Bu tabletlerin sürekli bir şekilde oral olarak 1-20 mg/kg/gün olarak alınmaları gereklidir. Tabletlerin -20°C'de depo gereksinimleri, oda sıcaklığında yalnızca 2 ay dayanabilmeleri hem kullanımlarında hem de maliyet açısından yük getirmektedir. Örneğin, 2017 yılı verilerine göre ticari olarak piyasaya sürülen -sipariş miktar farkı, vergi ve taşıma giderleri hariç tutularak ele alınırsa- 10 mg BH4 707\$, 50 mg 2118\$'dir (Schircks, 2017).

Linscheid vd., (1998), insan vasküler endotelial hücrelerindeki PTPS aktivitesinin sitokinin bağımlı olarak düzenlendiğini ve GCH-I'in BH4 üretiminde kısıtlayıcı basamak olmasına rağmen PTPS'nin BH4 bağımlı nitrit oksit üretiminde sitokinlerce kontrolünün sağlandığını ilk kez göstermişlerdir.

Franscini vd, (2003), endotelial PTPS'nin transkripsiyonal düzenlenmesinde interlökin-1 β 'nın kritik rolü olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında, interlökin (IL)-1 β /tümör nekrozis faktör- α /interferon- γ kullanarak real time PZR ile PTPS'de 4 kat

artış sağlamışlardır. Dolayısıyla tetrahidropterin sentezinde rol alan PTPS'nin IL-1 β tarafından kontrol edildiğini göstermişlerdir.

Kao vd. (2004), insanda PTPS eksikliğinin beyin fonksiyon yitimine sebep olduğunu motor hareketler ve nörofizyolojik testlerle ortaya koymuşlardır.

Demos vd. (2005), insanda PTPS eksikliğinin yumuşak huylu hiperfenilalanemiya neden olduğunu birkez daha ortaya koymuşlardır. Buna göre, bu enzimin eksik olduğu 8 yaşındaki kız çocuklarında büyüme geriliği, inme ve geç çocukluk dönemlerinde hiperfenilalanemiya bağlı distonya görüldüğünü kaydetmişlerdir. Hastalarda tedavi için yapılan klinik uygulamalarda oral yoldan tetrahidrobiopterin, levo-dopa/carbidopa ve 5-hidroksitriptofan tedavisini uygun görmüşlerdir. Böylece hiperfenilalanemi etkisini normal seviyelere çekmeyi başarmışlardır.

BH4'ün kimyasal olarak sentezinin oldukça zor olması, kullanılan yöntemlerin karmaşıklığı, birçok sentetik basamağın uygulanması, yukarıda da açıklandığı üzere pahalı materyallerin kullanımı ile maliyeti oldukça yüksektir. BH4 ün kimyasal sentezine alternatif olarak hedef genleri kullanarak mikroorganizmada üretimi gösterilebilir. Bu konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Hatakeyama vd.,'nin 1993 yılında yaptığı çalışma konu ile ilgili ilk çalışma olup GTP'den BH4 sentezinde gen kaynakları olarak *E. coli*'den *gchI* geni, fareden ise *ptps* ve *spr* genleri klonlanarak enzimatik olarak radyoaktif GTP'den BH4 dönüşümü sağlanmıştır. Konu ile ilgili bir diğer çalışma da Yamamoto vd, tarafından 2003 yılında yapılmış, *ptps* ve *spr* genleri klonlanmış ve *gchI* yerine homolog bir gen ile birlikte değerlendirilmiştir. Gen kaynakları *ptps* ve *spr* için fare ve *gch I* analogu için *mtrA* geni, gen kaynağı olarak da *B. subtilis* kullanılmıştır (Yamamoto vd., 2003).

Takikawa vd. (1986), insan karaciğerinden elde ettiği PTPS'yi saflaştırmış ve karakterize etmiştir. 83 kDa'luk enzimin magnezyum bağımlı olduğunu ve optimum 7,5 pH ortamında reaksiyon verdiğini göstermiştir. Enzimin K_m 'sinin 10 μ M olduğunu da göstermiştir.

Van vd. (1988), biopterin sentezi yolağındaki PTPS'nin rolünü göstermişlerdir. Sentezin ilk adımında GTP'nin zincir açılım reaksiyonu ile PTPS'nin subtratına (NH₂TP) dönüştüğünü ve bu subtratında yine zincir kırılım reaksiyonları ile pterin ve biopterine dönüştüğünü ortaya koymuşlardır.

Hasler ve Curtius (1989), som balığının PTPS'sini saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. Doğal enzimin 16 ve 17 kDa'luk alt birimlerden oluşan 68 kDa büyüklüğünde olduğunu belirtmişlerdir. Magnezyum bağımlı olan enzimin optimum 7,5 pH'da olduğunu ve 80°C de ısıya dayanıklı olduğunu göstermişlerdir.

Kerler vd. (1989), [2'-³H]dihidroneopterin 3'-trifosfatın subtrat olarak kullanıldığı hassas bir PTPS aktivite belirleme yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde işaretli timidin kullanılmış, bunu da işaretli glukozun GCH reaksiyonundan reaksiyona dâhil etmiştir. Enzimin, ilgili mekanizmasında bu substrattan suyu ayırdığını ortaya koymuştur.

Inoue vd. (1991), rat PTPS'sine ait cDNA üzerinden geni klonlamış ve enzimi saflaştırmıştır. 140 amino asitlik enzimin jel filtrasyonda 83 kDa ve SDS-PAGE analizinde de alt birim büyüklüğünün 17 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Thöny vd. (1992), insan PTPS enzimine ait cDNA ve rat cDNA'sı kullanarak insan *ptps*genini klonlamışlar ve ilgili enzimi karakterize etmişlerdir. 145 amino asit büyüklüğündeki enzimin 16387 Da büyüklüğünde olduğunu belirtmişlerdir. Rat PTPS'sinin amino asit dizisi ile % 82 benzerlikte olduğunu da göstermişlerdir. Spesifik aktiviteyi ise 1,32 nmol/mg protein/dakika olarak belirtmişlerdir.

Ashida vd. (1993), insandan *ptps*genini klonlamış ve insan PTPS'sini karakterize etmişlerdir. 435 bç'lik genin fare cDNA'sı kullanılarak çapraz hibridizasyon ile elde etmişlerdir. Enzimin doğal büyüklüğünün 90 kDa olduğu, 17 kDa'luk alt birimlerden oluştuğunu göstermişlerdir.

Thöny vd. (1994), tetrahidropterin mekanizmasındaki kusurlardan kaynaklanan hiperfenilalanemia araştırmalarında *ptps*geninde yaptıkları mutasyonlar ile ilk kez BH4

eksikliđinin bu genden kaynaklanabileceđini ortaya koymuřlardır. İnsan karaciđerinden elde ettikleri cDNA'dan yola çıkararak PTPS aktivitesini gstermiřler ve gende yaptıkları R25Q, R16C ve K120→Stop mutasyonları ile enzimatik aktivitenin dūřtūđunu gstermiřlerdir.

Būrgisser vd. (1994), rekombinant insan ve rat PTPS çalıřmalarında bōlge spesifik mutasyon ile aktif bōlgede yer alan sistein biriminin deđiřtirilmesinin enzim aktivitesini inhibe ettiđini gstermiřlerdir.

Būrgisser vd. rat PTPS'sini cDNA yōntemiyle elde etmiř ve bōlge spesifik mutasyonlarla enzimin aktif merkezini, metal bađlanma bōlgesini ve enzim-substrat etkileřimini arařtırmıřtır (1995). Yaptıkları alıřma sonucunda, rat PTPS'sinin 23, 48 ve 50. noktalarında yer alan ũ histidinin geçici metal bađlanma bōlgesi olduđunu, bu histidinlerin mutasyonlar ile deđiřtirilmesi sonucunda enzim aktivitesinin dūřtūđunu ispatlamıřlardır.

Bracher vd. (1998), pteridin biyosentezinden sorumlu ũ enzimin (GTP siklohidrolaz, PTPS ve sepiapterin redũktaz) reaksiyon mekanizmalarını NMR alışmaları ile ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri verilerde, PTPS ile katalize edilen reaksiyonun, ōzũcũ protonlarının, enzim ũrũnũn C-6 ve C-3 pozisyonlarına dahil edilmesine yol açtığını ortaya çıkarmışlardır.

Lee vd. (1999), *Synechocystis* sp. PCC 6803 siyanobakterisinden klonladıkları pteridin metabolizması genlerini kullanarak pteridin biyokimyasal yolağını ortaya koymuşlardır. İlgili genleri T7 promotoru altında *E. coli*'de ekspres etmişler ve bir prokaryottan ilk defa PTPS karakterizasyonu sağlamışlardır.

Woo vd. (2002a), insan *ptps* ile siyanobakter (*Synechocystis* sp. strain PCC 6803)*gch-I* genlerinin *E. coli*'de eř ekspresyonu başarmıştır. Çalışma sonucunda *E. coli*'de sepiapterin ũretimini gstermişlerdir.

Woo vd. (2002b), *E. coli* putativ geni *ygcm*'nin PTPS'ye ortolog bir enzim kodladığıını yaptıkları çalışma ile gstermişlerdir. Enzimin beklenmedik şekilde

kofaktör olmaksızın sepiapterini 7,8-dihidroneopterinine dönüştürdüğünü göstermişlerdir. Üstelik enzimin mezofilik bir konaktan elde edilmesine rağmen 60-80°C aralığında 3,2 kat daha aktif olduğunu da göstermişlerdir.

Ben vd. (2003), lepistes balığında (*Poecilia reticulata*) renk oluşumunu incelemek amacıyla *ptps* genini klonlamışlar ve doku spesifik ekspresyon düzeylerine bakmışlardır. Özellikle kırmızı kuyruklu lepisteslerde pterin ve pteridin üretiminin PTPS ekspresyonuyla doğrudan ilgili olduğunu ve bu türlerde yüksek seviyede ekspresyona rastladıklarını bildirmişlerdir.

Leitner vd. (2003), tetrahidrobiopterin sentezinden sorumlu ikinci enzim olan PTPS'nin hücrelerde oldukça zor belirlenebildiğini, kan hücreleri, fibroblastlar ve endotelial hücrelerde *ptps*'nin ekzon 3'ü içeren mRNA'larda bulunduğunu göstermişlerdir.

Yamamoto vd. (2003), tetrahidrobiopterin sentezinden sorumlu üç enzimi bir araya getirerek sentezi *in vitro*'da başarmıştır. Çalışmasında, *E. coli*'den *folE* genini (GCHI için), fareden *ptps* ve *spr* genlerini bir vektörde ayrıca, yine *B. subtilis*'ten *mtrA* genini (GCHI için) ve diğerlerini yine fareden alarak farklı bir vektörde bir araya getirmiştir. Yaptığı modifikasyonlardan sonra 4 g biopterin/L kültür oranında üretimi başarmıştır.

Kong vd. (2006), *Synechococcus* sp. PCC 7942'den PTPS ortologlarını elde etmişlerdir. Bakterilerde tetrahidrobiopterin sentezinden tek ya da çift alanlı yapının 6-Pyruvoiltetrahidropterin sentaz ortologları sorumlu olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bagautdinov vd. (2007), *Pyrococcus horikoshii* OT3 arke bakterisinden elde ettikleri PTPS'nin kristallendirmiş ve 3 boyutlu yapı analizini ortaya koymuşlardır. 13,51 kDa büyüklüğündeki enzimin X-ray kristalografisi ile 3 boyutlu verilerini sunmuşlardır.

Dittrich vd. (2008), malarya paraziti *Plasmodium falciparum*'a ait folat biosentez yolağındaki dihidroneopterin aldolaz (DHNA) geninin kusurlu olduğunu ve

bu enzimden kaynaklanan eksikliğin ise PTPS bypassı ile kapatıldığını göstermişlerdir. Böylece GTP'den dihidrofolat dönüşümü tamamlanır. Yapılan çalışmada malaryal PTPS'sinin insan ve diğer konaklardan farklı olarak aktif bölgesinde sisteinin glutamata dönüşümünden kaynaklandığını bulmuşlardır.

Seo vd. (2008), *E. colibakterisine* ait PTPS'nin X-ray kristallendirmesi ile 3 boyutlu yapısını açığa çıkarmışlardır. Enzimin kristal görüntüsünün altıgen olduğunu belirtmişler ve enzime ait kristallografik dataları ortaya koymuşlardır.

Spoonamore vd. (2008), *Streptomyces coelicolor* SCO 6650'a ait PTPS'nin kristallendirmesini ve yapısını aydınlatmışlardır. Ancak ilgili enzimin, aktif bölgesinde çinko bağlanma domaininin ve PTPS aktivitesinin eksik olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma sadece ilgili organizmadan genin klonlanması, enzimin üretimi ve saflaştırmasını sonuç olarak da kristallendirilerek X-ray kristalografisi ile üç boyutlu yapısının aydınlatılmasını içermektedir.

McCarty vd. (2009), *E. coli* QueD enziminin memelilerdeki PTPS'nin homoloğu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca enzimin sadece piruvoiltetrahidropterin (PPH4) dönüşümünü değil aynı zamanda da sepiapterini, 6-karboksi-5,6,7,8-tetrahidropterine (CPH4) dönüştürdüğünü de göstermişlerdir.

Wang vd. (2011), *Mortiella alpina* mantarının tetrahidropterin yolağını incelemişler ve yolakta yer alan üç enzimi de hem biyokimyasal hem de kinetik yönden incelemişlerdir.

Miles vd. (2014), *E. coli* ve memeli PTPS'sine ait varyantları karşılaştırmıştır. Çalışma sayesinde ökaryotik ve prokaryotik PTPS varyantlarının aktif bölgelerin neredeyse aynı biçimlendiği ortaya konmuştur. Bakteriyal PTPS'lerde aktif bölgede bulunan aspartik asit ve Histidin diyadının farklı olarak ökaryotik varyantlarında bulunmadığına dikkat çekmişlerdir.

Seo vd. (2014), memeli PTPS'sinden farklı bir bakteriyal homoloğunun kristallendirilmesi üzerine çalışmışlar ve X-ray verilerini yayınlamışlardır.

Park vd. (2015), *E. coli*'de sepiapterin üretimi için hem GCH 1 hem de PTPS enzimlerini kullanmışlar ve reaksiyon şartlarını optimize etmişlerdir. 30°C'de 0,1 mM IPTG varlığında maksimum verimin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Termofilik bakterilerde bulunan enzimlerin sert endüstriyel uygulamalara dayanıklılığı tercih edilen bir unsurdur. Bunlar, reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi, genel mezofiliklerin ortamı kontamine etme riskinin azalması, organik bileşiklerin çözünürlüğünü artırmasıyla bileşiğin ortamdaki mevcudiyetinin artışı, viskozitenin azalması ve sübstratların difüzyon katsayısındaki artış sebebiyle reaksiyon hızlarının artması, sübstratların ve ürünlerin çözünürlüklerinin artırması ve endotermik reaksiyonlarda tercih edilen denge değişimleri oluşturularak daha fazla verimlilik elde edilmesi, yarılanma ömürlerinin uzun oluşu gibi nedenlerden dolayı ısı kararlı enzimlerin, ısı kararlılığın ve ısı aktivitenin anlaşılabilmesinde protein mühendisliği için modeller oluşturmaktadır. Bu gibi nedenlerden ötürü, termofilik bakterilerin enzim kaynağı olarak değerlendirilmesi kuvvetle önerilmektedir (Andrade vd., 1999, Arnold vd., 2001, Bergquist vd., 2013, Bouzas vd., 2006, Brock, 1967, Demirjian vd., 2001, Egorova ve Antranikian. 2005, Eichler, 2001, Gomes ve Steiner, 2004, Haki ve Rakshit, 2003, Hartley vd., 2000, Holst vd., 1997, Hough ve Danson, 1999, Jaenicke, 1991, Kikani vd., 2010, Kumar vd., 2001, Li vd., 2005, Morozkina vd., 2010, Niehaus vd., 1999, Nigam 2013, Synowiecki, 2010, Taylor vd. 2004, Vieille ve Zeikus, 1996 ve 2001). Termofilik enzimlerin çalışılması esnasında klonlanan genin ve/veya genlerin ekspresyonunu ve saflaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla mezofilik bir konağa (örneğin *E. coli*'ye) aktarılması daha uygun ve akılcı bir yaklaşımdır. Mezofilik organizmaların termofiliklere nazaran daha düşük sıcaklık istekleri, daha hızlı üremeleri (dolayısıyla ekspresyon esnasında daha fazla ürün eldesi) ve büyüme besiyerlerinin daha az karmaşık oluşları nedeniyle termofilik genlerin ekspresyonunda ve enzim üretiminde kullanılmaktadırlar. Üstelik proteinlerin saflaştırılması esnasında, mezofilik konak hücreden gelen proteinlerinin bertaraf edilmesinde kullanılacak olan ısı şoku (yüksek sıcaklık) uygulamasına ve tuzla çöktürme yöntemlerine termofilik karakterleri gereği dayanıklı olacaklarından oldukça kolaylıklar sağlamaktadırlar (Bouzas vd., 2006, Frock ve Kelly, 2012, Haki ve Rakshit, 2003, Holst vd., 1997, Jaenicke, 1991, Ramchuran vd., 2002, Turner vd., 2007, Vieille ve Zeikus, 2001). Bu tür kolaylıklar aynı zamanda laboratuvar işlerini azaltmakta ve dolayısıyla harcanan zaman ve maliyeti

düşürmektedir. İlave olarak termofilik bir enzimin çalışılmasında ortam ya da reaksiyon sıcaklığının düşürülmesi de inhibisyon etkisi yaptığından dolayı ilave maddelere/substratlara ihtiyaç duyulmaksızın çalışmayı sağlamaktadır (Synowiecki, 2010, Vieille ve Zeikus, 2001).

Ayrıca günümüz moleküler biyoloji teknikleri konak hücre teknolojisini de geliştirmiştir. Günümüzde ekspresyon için kullanılan birçok ekspresyon vektörü (çalışmamızda seçilen pET28a(+) da dâhil) pLac, pTac, T7 RNA polimeraz promotörü gibi kuvvetli promotörler içermektedir. Bu promotörler, mezofilik konaklarda özellikle de *E. coli* B suşundan türetilmiş olan *E. coli* BL21(DE3) veya BL21(DE3)pLys gibi konak hücrelerde sorunsuz çalışmakta ve istenilen ekspresyonu sağlamaktadırlar. Üstelik ekspresyon sistemi bilindiği üzere IPTG indüksiyonu ile de istenildiğinde uyarılarak başlatılabilmektedir (Bouzas vd., 2006, Turner vd., 2007, Yıldırım vd., 2010). Günümüzde termofilik, hipertermofilik ve arkebakterial genler de bu sayede mezofilik konaklarda rahatlıkla ekspres edilebilmektedir.

Çalışmada gen/enzim kaynağı olarak termofilik bakteri *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T, (gram pozitif, fakültatif anaerob, termofilik basildir) kullanıldı. Optimum büyüme sıcaklığı 55°C'dir. 2.683 protein kodladığı tahmin edilen *A. flavithermus* DSM 2641^TWK1 suşunun 2.846.746 baz çifti (bç) uzunluğunda genoma sahip olduğu tespit edilmiştir (Saw vd., 2008). İlgili bakteride *gchI* genine ait DNA baz dizilimi belirlenerek "Direct Submission" olarak NCBI Gen Bank'a CP000922 Accession No ile kaydı yapılmıştır (NCBI-1, 2013, NCBI-2, 2013).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve ilgili bilgileri şu şekildedir. β -merkptoetanol (Merck, 805740), agaroz type II medium EEO (Sigma, A6877), agar (Merck, VM259713), akrilamid (Sigma, A8887), amonyum persülfat (Merck, A734116), ampisilin (Sigma, A1593), bromofenol mavisi (Sigma, B5525), bisakrilamid (Sigma, M2022), Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka, 27816), EDTA (Merck, K90262021), etanol (Sigma, A3678-1000), etidyum bromür (Sigma, E7637), gliserol (Riedel-deHaën, 15524), glisin (Sigma, G7126), glukoz (Roche, 1929526), HEPES (Sigma, H0891), IPTG (Sigma, I5502), KCl (Merck, K23759135), metanol (J. T. Baker, TBF0196396 1499), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED, Janssen Chimika, 13,84571), Na₂CO₃ (Merck, A339898), Na₂HPO₄ (Merck, A664174), NaH₂PO₄ (Merck, 567545), NaCl (Merck, 567441), SDS (Amresco, 0227), sodyum asetat (Merck, TA404965), tripton (Merck, V441613949), Tris-HCl (Sigma, T1503), X-gal (AppliChem, A1007.0005). Eksik olan diğer kimyasallar Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü ve Su Ürünleri Fakültesi Genetik Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Çalışmada kullanılan besi yerleri içeriklerine göre laboratuarda hazırlandı. Kullanılan besi yerleri, LB (Lauria-Bertani) besi yeri için litrede 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl saf suda karıştırıldı ve pH'sı 7,4'e ayarlanarak hazırlandı. LBA besi yeri ise 1 litre LB besi yerine 12 gram agar ilavesiyle hazırlandı. Tüm besiyerleri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

Yapılan PZR çalışmalarında ve DNA dizi analizi sırasında kullanılan primerlerin adları, 5' → 3' yönünde DNA sıraları ve sentez ettirildikleri firmalar ile ilgili bilgiler ise şu şekildedir. Forward (-24) primeri (5'-CCCATGGTCCAACAAATTTATCCG -3', Macrogen Inc, Hollanda), Reverse (-25) primeri (5'-GCTCGAGTTGTTTCCCTGCTTTCGG -3', Macrogen Inc, Hollanda).

Çalışmamız esnasında, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Medison, ABD), pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Co., Medison, ABD), Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Co., Medison, ABD), GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Lithuania), His Link™ Protein Purification System (Promega, Medison, WI, ABD) gibi kitler kullanıldı.

Gen izolasyonlarında laboratuvar stoklarımızda bulunan *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T, klonlama çalışmalarında ise yine stoklarımızda bulunan *E. coli* DH5α ve *E. coli* BL21(DE3)pLys hücreleri kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan besiyerleri, kimyasallar ve diğer sarf malzemeler yurt içi alımlar ile temin edildi. Çalışmada *NdeI*, *NcoI*, *XhoI*, *EcoRI*, *Sall*, *BamHI*, T4 DNA ligaz, *Pfu* DNA polimeraz (Promega Corp., Medison, ABD), GoTaq DNA polimeraz (Promega Corp., Medison, ABD), iProof High-Fidelity DNA polimeraz (Bio-Rad Laboratories, CA, ABD) ve standart DNA polimerazlar enzim olarak kullanıldı. Kesim enzimleri ve standart DNA polimerazlar Thermo Scientific (Lithuania) firmasından temin edildi.

Çalışmada kullanılan cihazlar, TÜBİTAK (113Z811) ve RTEÜ BAP birimi desteği (2014.102.03.06) ile Bio-Rad firmasından fraksiyon toplayıcı ünite, peristaltik pompa, UV Vis dedektör içeren LP System Protein Saflaştırma Cihazı ve Mini Protean Tetra Cell SDS-PAGE ünitesidir. Çalışmamızda kullandığımız diğer cihazlar (kuru sallayıcı inkübatör, etüvler, termal döngüleyici, steril kabin vd.) laboratuvarımızda mevcuttur. Yine çalışmada kullanılan Ultra HPLC sistemi (Thermo Inc., Lithuania) bölümümüz Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi.

2.2. Metod

2.2.1. *A. flavithermus* DSM 2641^T Bakterisinin Genomik DNA İzolasyonu

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Labrotuarı bakteri stoklarında yer alan *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^TWK1 suşunun gDNA'sını temin etmek için öncelikle gliserol stoğundan 100 µL alınarak 3 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Ardından 16 saat boyunca 55°C'de kuru havalı çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tazelenen kültürden tekrar aynı şekilde kültür atıldı ve 14000 rpm'de 2 dakika çöktürülerek elde edilen pelletten Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega Co., Medison, USA) protokolü uygulanarak aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Pellet, 480 µL 50 mM EDTA içinde çözüldü.
2. Süspansiyona, 120 µL lizozim eklendi ve pipetleme ile karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30-60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında 2 dakika maksimum hızda (14000 rpm) santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
4. Pellet üzerine 600 µL Nuclei Lysis solüsyonu eklendi ve pipetleme ile pellet çözüldü.
5. Süspansiyon, 80°C'de 5 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğutuldu.
6. 3 µL RNaz solüsyonu eklenerek 2-5 kez alt üst edildi ve 37°C'de 15-60 dakika inkübe edildi. Sonrasında oda sıcaklığına kadar soğutuldu.
7. Üzerine 200 µL Protein Precipitation solüsyonu eklendi ve 20 saniye vortekslenerek karışması sağlandı. Örnekler buz içinde 5 dakika inkübe edildi.
8. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant kısmı yeni tüplere aktarıldı ve üzerine 600 µL oda ısısında izopropanol eklendi.
9. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 2 dakika 14000 rpm'de santrifüjlendi.
10. Üst sıvısı dökülen örneklere % 70 etanolden 600 µL eklendi ve aynı şartlarda santrifüjlenerek üst sıvı atıldı.
11. Pelletler, etanol uzaklaşana değin kurumaya bırakıldı ve sonrasında 100 µL DNA Rehidration Solüsyonuyla çözüldü.

İzolasyon sonrası örnekler % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

2.2.2. *ptps* Geninin PZR ile Tespiti ve Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Çalışmamızda ele alınmış olan *ptps* geni termofilik *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisinden elde edildi. PZR'de kullanılan primerler bakteriye ait NCBI GenBank verilerinden yola çıkılarak tasarlandı. Bu primerler de diğerlerinde olduğu gibi 5' ucunda *Nco*I, 3' ucunda *Xho*I restriksiyon enzimi kesim bölgesi taşımaktadır. Buna göre forward primer olarak, 5'-CCCATGGTCCAACAAATTTATCCG-3' (altı çizili kısım *Nco*I kesim bölgesi) ve reverse primer olarak 5'-GCTCGAGTTGTTTCCCTGCTTTCGG-3' (altı çizili kısım *Xho*I kesim bölgesi) olarak tasarlandı ve sentezletirildi (Tablo 1).

Tablo 1. β-Glukozidazgeni için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer sırası (5'→3')	Nükleotid Uzunluğu	Tm Derecesi (°C)
<i>Afpt28F</i>	CCCATGGTCCAACAAATTTATCCG	24	63,5
<i>Afpt28R</i>	GCTCGAGTTGTTTCCCTGCTTTCGG	25	69,1

Genin çoğaltılmasında Taq DNA polimeraz yerine proofreading aktivitesi yüksek olan (polimerizasyon esnasında hata payı daha düşük) *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Böylece genin PZR yoluyla çoğaltılması esnasında olası bir nükleotit değişiminin ve hatalı bir nükleotit eklenmesinin önüne geçilmiş oldu. Çalışmada kullanılan PZR şartları 50 µL son hacimde olmak üzere, 10 µL reaksiyon tamponu (iProof™ HF, Bio RAD), 3 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL genomik DNA, 1 µL her bir primerden, 2,5 µL 10mM dNTP ve 0,5µL iProof DNA polimeraz (iProof™ HF DNA Polymerase, Bio RAD) son hacim 50 µL olacak şekilde dH₂O ilave edilerek yapıldı. PZR döngü şartları ise 95°C de 3 dakika, 35 döngü olarak 94°C de 2 dakika, 47°C de 1,5 dakika, 75°C de 1,5 dakika ve 75°C de 10 dakika olarak gerçekleştirildi.

Görüntülenme işlemi gerçekleştirmek için hazırlık safhası şu şekilde gerçekleştirildi. % 1'lik jel hazırlamak için 100 mL 10X TAE tamponuna 1 g agaroz eklendi ve çözünmesi için ısıya tabi tutuldu. Çözelti oda sıcaklığına geldiğinde 10

mg/mL konsantrasyonda 4 µL ethidium bromid eklenerek agaroz jel tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra 5µL DNA örneği 2,5 µL yükleme boyası ile karıştırıldı ve 1kb büyüklüğündeki DNA marker (Thermo Scientific, Litvanya) ile beraber jelin kuyucuklarına pipet yardımıyla aktarıldı. Yürütme tamponu yardımıyla 30 dakika 160 V da yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi bitikten sonra UV ışığında görüntüleme işlemi yapılarak tamamlandı. Yürütme işlemi sonucu 438baz çifti büyüklüğünde DNA fragmenti görüldü.

Elde edilen PZR ürünü % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, EU, Lithuania) kiti ile üretici firmanın öngördüğü şekilde kullanılarak temizlendi (saflaştırıldı). Buna göre;

1. PZR ürünü üzerine 1:1 oranında Binding Buffer eklendi, tilt edildi.
2. GeneJET purification kolonuna aktarıldı. 30-60 saniye santrifüj edildi.
3. Saklama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon aynı tüp üzerine koyuldu.
4. Üzerine 700 µL Wash Buffer eklendi. 30-60 saniye santrifüj edildi.
5. Saklama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon aynı tüp üzerine koyuldu.
6. Tekrar 1 dakika santrifüj edildi.
7. Filtre yeni bir edpendorf üzerine alındı.
8. 50 µL Elution Buffer eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında beklendi.
9. 2 dakika santrifüj edildi.

Saflaştırılmış PZR ürünü sahip olduğu restriksiyon bölgelerinden daha kolay bir biçimde kesilerek ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için aracı olarak pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Co., Medison, USA) kullanıldı.

Bunun için üretici firmanın (Promega Corp., Madison, ABD) öngördüğü yönteme göre, 3 µL saflaştırılmış PZR ürünü, 1 µL (50 ng) pGEM®-T Easy vektör, 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL (3 U/µL) T4 DNA ligaz enzimi son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı 16°C'de bir gece tutulduktan sonra konak hücre *E. coli* DH5α'ya aktarıldı.

Rekombinant vektörün konak hücreye aktarılmasından önce, konak hücre soğuk CaCl₂ yöntemiyle alıcı (kompetant) duruma getirildi. Bunun için;

- *E. coli* DH5 α petrisinden bir tane koloni alınarak, 3 mL LB besiyerine gece boyu 37°C’de 200 rpm’de çalkalayıcı kuru havalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

- Üretilen *E. coli* DH5 α kültürü, OD₆₀₀ değeri okunarak uygun bir erlen içerisinde 100 mL LB besiyerine 0,1 değeri olacak şekilde seyreltildi ve OD₆₀₀ değeri, 0,45-0,55 olana dek inkübe edildi.

- Sonra 4500 g’de 10 dakika 4°C’de çöktürdü ve pellet, 10 mL 100 mM soğuk steril CaCl₂ eklenerek süspanse edildi.

- Bakteri süspanسیونu 30 dakika buz içerisinde bekletildi. Sonra aynı şartlarda çöktürüldü.

- Son olarak elde edilen pellet, 2 mL 100 mM soğuk steril CaCl₂ eklenerek tekrar süspanse edilerek kullanıma kadar 4°C’de tutuldu.

Rekombinant vektörün alıcı konak hücreye aktarımında, 2 μ L ligasyon ürünü 100 μ L alıcı hücre ile 1,5 mL Eppendorf tüp içerisinde karıştırıldı, karışım buz içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra 42°C’de 45-50 saniye süre ile tutulup yeniden 2 dakika süre ile buza alındı. Daha sonra bu süspanسیون steril cam tüp içersine 1000 μ L LB besiyeri ile karıştırılarak 37°C’de 150 rpm hızda 1,5 saat inkübe edildi. Oluşan kültürün 100 μ L’si daha önce hazırlanan X-gal/IPTG sürülmüş 50 μ g/mL ampisilin içeren LB agar petrilere yayma ekim ile ekildi. Petriler gece boyu 37°C’de inkübe edildikten sonra mavi-beyaz koloni seçimine göre değerlendirildi.

Seçilen beyaz koloniler ve negatif kontrol amaçlı olarak mavi koloniler, plazmit DNA’larını izole etmek için 50 μ g/mL ampisilin içeren LB besi yerine ekim yapılarak 37°C’de 200 rpm’de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Lithuania) ile firmanın önerdiği şekilde kullanılarak aşağıdaki şekilde tamamlandı.

1. Öncelikle gece boyu inkübasyonu tamamlanan kültürler, 14000 rpm’de 2 dakika boyunca çöktürüldü ve pelletler elde edildi.

2. Her bir suşun pelletinin bulunduğu ependorfa 250 µL Reuspension Solution eklenir. İyice vortekslendi.
3. 250 µL Lysis Solution eklendi, 10 kez alt üst edildi.
4. 350 µL Neutralization Solution eklendi.
5. 5 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant filtreli tüpe aktarıldı.
6. 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı filtre aynı tüp üzerine konuldu.
7. 500 µL Wash Solution eklendi, 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi.
8. Koleksiyon tüpündeki sıvı atıldı ve tekrar 500 µL Wash Solution eklendi.
9. 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi.
10. Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. 50 µL Elution Buffer eklendi.
11. 2 dakika odasıcaklığında beklendikten sonra 2 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi.

Elde edilen pDNA’lar % 1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve doğru klon seçimi için restriksiyon enzim kesimi ve klonlama için kullanılan primerler ile PZR yapılarak ilgili geni taşıyıp taşımadığı belirlendi. Doğru klon tespit edildikten sonra taze kültür hazırlanarak ampisilin içeren LBA petrisine ekim yapıldı, 37°C’de bir gece inkübasyondan sonra +4°C’de ve LB sıvı besiyerine de ekilerek gliserol stoğu halinde ise -20 ve -80°C’lerde saklandı (Burada uygulanan kompotent hücre hazırlama tekniği ve aktarımı, daha sonra yapılan aktarımlarda da aynı şekilde uygulanmıştır).

Doğru plazmidi taşıyan plazmidi içeren kültürden kit yardımıyla saf olarak izole edilen plazmitler (pGEM-T/Easy/*Afpts*) sonra DNA dizi analizine tabi tutulmak üzere Macrogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi.

Daha önce *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisinden PZR yoluyla yakalanarak pGEM-T/Easy vektörüne klonlanan *pts* geninin buradan alınarak ekspresyon vektörü olan pET28a(+)'ya aktarıldı. Bunun için, rekombinant plazmidi taşıyan *E. coli* DH5a/ pGEM-T/Easy/*Afpts* bakterisine ait gliserol stoğundan 50 µg/mL ampisilin içeren 3 mL LB besiyerine 37°C’de starter kültür atıldı. Daha sonra bu kültürden tekrar aynı şartlarda kültür yapıldı ve bu son kültürden plazmit DNA (pDNA) izolasyonu, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Lithuania) yardımıyla firmanın önerdiği

gibi kullanılarak izole edildi. İzole edilen pDNA, daha önce PZR reaksiyonu için tasarlanan ileri ve geri primerlerinin taşıdığı restriksiyon enzim bölgelerine göre uygun restriksiyon enzimleri ile (*NcoI* ve *XhoI*) eş zamanlı olarak ikili kesim yapıldı. Bunun için,

- 1 µg rekombinant pDNA(pGEM-T/Easy/Afpts),
- 5 µL 10X CutSmart tamponu (Thermo Scientific, Lithuania),
- 1'er ünite restriksiyon enzimi (*NcoI* ve *XhoI*, Thermo Sci., Lithuania)
- Son hacim 50 µL olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı.

37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde tespit edildikten sonra, aktarılmak istenen DNA fragmenti, GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Lithuania) ile üretici firmanın öngördüğü şekilde agaroz jelden aşağıdaki şekilde saflaştırıldı.

1. Jelden bistüri yardımı ile kesilen, istenilen DNA fragmentinin olduğu jel parçası ependorf tüpe konuldu.
2. Üzerine 1:1 oranında Binding Buffer eklendi. (örnek; 100mg için 100µl)
3. 10-15 dk 50-65°C' ye tabi tutuldu.
4. Tüm karışım filtreli tüpe aktarıldı. 14000 rpm de 1dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant uzaklaştırıldı. 700 µL Wash Buffer eklendi.
6. 14000 rpm de 1dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
7. 14000 rpm de 1dk boş olarak santrifüj edildi. Filtre yeni bir ependorf tüp üzerine alındı.
8. Üzerine 50 µL Elution Buffer eklenip 2 dk beklendi.
9. 14000 rpm de 2 dk santrifüj edildi.

Üretici firmanın öngördüğü şekilde agaroz jelden saflaştırılan aktarılmak istenen DNA fragmenti, izolasyonun gerçekleştiğini doğrulama amaçlı % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu.

Yapılan bu reaksiyon, ekspresyon vektörü olarak kullanılacak olan pET28a(+) (Novagen, USA) plazmidi için de tekrarlandı. Bunun için satın alınan pET28(+) plazmidinin 1 µL'si CaCl₂ ile kompotent hale getirilmiş *E. coli* DH5α hücrelerine

transforme edildi. Elde edilen kolonilerden Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Co., Medison, USA) kiti ile firmanın önerdiği şekilde plazmit DNA izole edildi. Aşağıdaki reaksiyon uygulanarak kesim yapıldı.

5 µg plazmit DNA,
5 µL 10X restriksiyon enzim tamponu (CutSmart Thermo Sci., Lithuania),
1'er ünite *NcoI* ve *XhoI* (Thermo Sci., Lithuania)
Son hacim 50 µL olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı.

37°C'de 15 dakika tutuldu. Kesim ürünü % 1'lik agaroz jel elektroforezinde tespit edildikten sonra klonlamada kullanılacak olan büyük fragment GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Lithuania) kullanılarak üretici firmanın öngördüğü şekilde saflaştırıldı.

Genin ekspresyon vektörüne yapıştırılmasında pET28a(+) vektör kullanımına uygun olarak firmanın (pET System Manual, Novagen, USA) öngördüğü şekilde reaksiyon şartları hazırlandı. Bunun için,

- 2 µL 10X T4 DNA ligaz tamponu,
- 2 µL 100 mM DTT,
- 1 µL 10 mM ATP,
- 2 µL 50 ng/µl kesilerek saflaştırılmış pET28a(+) vektörü,
- 1 µL T4 DNA ligaz enzimi,
- 0,2 pmol insört DNA (jelden saflaştırılan *NcoI* ve *XhoI* bölgesi taşıyan *ptps* geni),
- son hacim 20 µL olacak şekilde nükleazsız su (DNA RNA free water) kullanılarak reaksiyon hazırlandı.

Reaksiyon 16°C'de gece boyu inkübe edildi.

Ligasyon işleminden sonra soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3)pLys hücrelerine aktarıldı.

Bunun için 3 µL ligasyon ürünü 50 µL kompotent hücre içerisine steril kabin içerisinde eklendi ve tilt edildi. Buz içerisinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 42°C'de 1 dakika inkübe edilerek tekrar 2 dakika buz içerisinde tutuldu. Daha sonra bu karışım, 1 mL LB içeren tüplere eklendi ve 1,5 saat süre ile 37°C'de 150 rpm çalkalamalı olarak inkübe edildi. Süre sonunda elde edilen kültürün 50 µL'si 30 µg/mL kanamisin içeren LBA petrisine ekildi. Petriler tekrar 37°C'de gece boyu inkübe edilerek koloni büyümesi gerçekleştirildi.

Elde edilen kolonilerden tekrar 30 µg/mL kanamisinli 3 mL sıvı LB besiyerine kültüre edilerek plazmit DNA izolasyonu, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Lithuania) yardımıyla firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Agaroz jel elektroforezinden sonra doğru olması muhtemel kolonilerin doğru parçayı içerip içermediği daha önce genin tespitinde kullanılan PZR şartlarıyla belirlendi. Bunun için ilk klonlamada gerçekleştirilen reaksiyon yapıldı.

Bu reaksiyonda 50 µL son hacimde, 1 µL pDNA, 10 µL 5X GreenTaq Buffer, 4 µL MgCl₂ (stok 25 mM), 1 µL dNTP (stok 10 mM), 1'er µL forward ve reverse primer (stok 200 nM) ve 1 ünite Green Taq DNA polimeraz ilavesiyle yapıldı.

Reaksiyon daha sonra 95°C de 3 dakika, 35 döngü 94°C'de 2 dakika, 47°C'de 1,5 dakika, 72°C'de 1,5 dakika ve son olarak son sentez basamağı için 72°C'de 10 dakika ile BioRad T100 Termal Cyler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Burada kullanılan forward primer, *ptps* geninin 5' ucuna komplementer ve *NcoI* kesim bölgesi, reverse primer ise genin 3' ucuna komplementer olup *XhoI* kesim bölgesi içermektedir. Reverse primer, ekspresyon sonrası histidin kuyruğu taşıyabilmesi için stop kodonu içermeyecek şekilde tasarlandı. Sonuç olarak tek bir koloni belirlendi ve bu koloniden yukarıda bahsedilen kit ile tekrar plazmit izolasyonu yapıldı ve MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasına DNA sıra analizine gönderildi. Aynı zamanda doğru klonu içeren koloni daha sonra 30 µg/mL kanamisin içeren LBA petrisine ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyondan sonra +4°C'de ve LB sıvı besiyerine de ekildi, ayrıca gliserol stoğu halinde -20 ve -80°C'lerde depolandı.

2.2.3. *ptps* Gen Ürününün Ekspresyonu

Bu amaç için *Afptps* genini taşıyan pET28a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3)pLys kültürü, kanamisin içeren LB besiyeri içeren tüplerde, 200 rpm'de hem 28°C'de hem de 37°C'de bir gecelik büyümeye kondu. Elde edilen kültürler, 500 mL erlen içerisinde 600 nm'de 0,1 OD değeri elde edilecek şekilde seyreltildi ve OD600 = 0,6 olana kadar büyütüldü. İstenen büyüme noktasına ulaşan kültürlerle, son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde IPTG ilave edilerek uyarıldı. Novagen firmasının önerdiği şekilde ekspresyon için uyarımdan sonra 4 saat boyunca inkübe edildi ve süre sonunda hücreler çöktürüldü. Elde edilen pellet, 1X PBS (10X PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na₂HPO₄-7H₂O, 2,4 g KH₂PO₄/L, pH 7,4) tamponu içerisinde çözüldü. Hazırlanan bu örnek, -80°C'de dondurulacak oda sıcaklığında tekrar çözünmeye bırakıldı ve dondurma eritme işlemi 2 defa tekrarlandı. Sonrasında sonikatör (Bandelin SonoPuls, Berlin, Germany) yardımıyla 15'er mL olarak hazırlanan örnek, 4 dakika süre ile 20 saniye pulse ON, 20 saniye pulse OFF olarak % 30 amplitude şartında sonike edildi. Pellet ve süpernatant örnekleri, % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu ve bu sayede genin uygun ekspresyon sıcaklığı belirlendi.

SDS-PAGE analizinde aşağıda verilen jel karışımları hazırlandı ve Bio-RAD Mini Protean Jel Sistemi kullanılarak yürütüldü.

% 10'luk üst jel (2 mL)

- 1,40 mL saf su,
- 0,33 mL % 30'luk akrilamid çözeltisi,
- 0,25 mL 1,0 M Tris (pH 6,8),
- 0,02 mL % 10'luk SDS,
- 0,02 mL % 10'luk APS,
- 0,002 mL TEMED.

% 12'lik alt jel için (5 mL)

- 1,60 mL saf su,

- 2.00 mL % 30'luk acrylamide,
- 1,30 mL 1,5 M Tris (pH 8,8),
- 0,05 mL % 10'luk SDS,
- 0.05 mL % 10'luk APS,
- 0.002 mL TEMED.

SDS-PAGE jelinde 15 µL yükleme boyası (8 mL % 10'luk SDS, 2,5 mL pH 6,8 Tris HCl, 4 mL gliserol, 2 mL 2-β-merkaptotanol, 0,04 g bromofenol blue ve 20 mL'ye dH₂O ile tamamlanıp stok hazırlandı) ve 25 µL örnek yüklenip protein bant analizi yapıldı.

2.2.4. PTPS'nin Saflaştırılması

Proteinin termofilik bir kaynaktan alınmış olmasından dolayı öncelikle ısı şoku uygulaması ile saflaştırma işlemine başlandı. Sonrasında Ni-NTA afinite kromatografisi yapıldı.

2.2.4.1. Isı Şoku ile Saflaştırma

Termofilik genlerin mezofilik organizmalarda ekspresyonundan sonra yapılacak ısı şoku ile konaktan gelen proteinlerin büyük bir bölümünün elimine edilmesini sağlanacağından, bu basamak saflaştırma işlerini azaltmaktadır. Bu nedenle konak hücre proteinlerinin denatürasyon sıcaklığının belirlenmesi için 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ve 90°C'ler olmak üzere dokuz sıcaklık değerinde ve farklı sürelerde ısı uygulaması yapıldı. Tüm bu uygulamaların ardından muamelelere ait örnekler, 14000 rpm'de 15 dakika boyunca çöktürüldü ve elde edilen süpernatant, % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu.

2.2.4.2. PTPS'nin Ni-NTA Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Daha sonra PTPS'nin sahip olduğu 6 Histidin amino asidi kullanılarak Ni-NTA kolonu ile saflaştırılması firmanın öngördüğü şekilde yapıldı. Öncelikle ilgili klonu taşıyan bakteriden 37°C'de gece kültürü atıldı. Bu gece kültürü daha sonra 1 L'lik

erlende 30 µg/mL kanamisinli 400 mL sıvı LB besiyerine OD600, 0,1 olacak şekilde seyreltilerek ekildi. OD600, 0,6 olduğunda son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde indüklenerek 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür çöktürüldü ve pellet, 2 mg/mL lizozim içeren aşağıda verilen dengeleme tamponu (50 mM Tris (pH 7,0), 500 mM NaCl ve 10 mM imidazol) ile çözüldü. Yarım saat buzda bekletildikten sonra sonike edildi (4 dakika boyunca, % 30 amplitude, 20 saniye ON, 20 saniye OFF; Bandelin SonoPuls, Berlin, Germany). Sonikasyon ürünü 14.000 rpm de 15 dakika çöktürüldü ve elde edilen süpernatant kullanıma kadar -20°C’de bekletildi.

Saflaştırmada kullanılan tamponlar, Ni-NTA saflaştırma protokolü (MagneHis™ Protein Purification System, Promega, Medison, USA) üretici firmanın öngördüğü şekilde hazırlandı ve uygulandı. Bunun için aşağıdaki tamponlar hazırlandı:

- Dengeleme tamponu: 50 mM Tris (pH 7,0), 500 mM NaCl, 10 mM imidazol.
- Elüsyon tamponları: sırasıyla 25, 100, 150, 200 ve 300 mM imidazol içeren dengeleme tamponu.
- Yıkama tamponu: 500 mM imidazol içeren dengeleme tamponu.

Öncelikle daha önce hazırlanan Ni-NTA kolonuna 10 mL dengeleme tamponu uygulandı. Sonrasında yukarıda elde edilen süpernatant kolondan geçirildi. Sonrasında tekrar 10 mL dengeleme tamponu ile kolon yıkandı. Sırasıyla elüsyon tamponları ve sonrasında 3 hacim yıkama tamponu kolondan geçirildi. Her bir fraksiyon ayrı tüplerde biriktirildikten sonra bu tüplerden alınan 10 µL örnek % 12’lik SDS-PAGE’e tabi tutuldu.

Ni-NTA saflaştırma işleminden ortamda istenmeyen imidazolden kurtulmak için diyaliz yapıldı. Bunun için, 50 mM Tris (pH 7,0) ve 500 mM NaCl içeren tampon hazırlandı. 0,45 µm por çapına sahip önceden hazırlanmış diyaliz tüpleri 2 litrelik beher kullanılarak manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyu diyaliz edildi.

2.2.5. PTPS'nin Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi

PTPS aktivitesi çalışılırken Woo vd. (2002a ve b) çalışması temel alınarak NTP-H₂'den PPH₄ oluşumunun belirlenmesi ile tespit edildi. Daha sonra bu aktiviteye enzimin sepiapterini 7,8-dihidroneopterinine dönüştürme aktivitesi de ilave edildi.

2.2.5.1. PTPS'nin Sepiapterin Aktivitesi

Reaksiyon karışımı, 50 mM Tris (pH 7,0), 3 mM sepiapterin, 10 µg PTPS olarak 50 µL son hacimde hazırlandı. Reaksiyon 37°C'de 20 dakika süreyle yapıldı. Sonrasında 50 µL % 10'luk soğuk TCA ilavesiyle reaksiyon durduruldu. 10 dakika buzda bekletmenin ardından 14000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü ve süpernatant yeni bir tüpe alındı. Süpernatant, steril ddH₂O ile 10 kat seyreltildikten sonra kalan sepiapterinin ölçülebilmesi için SpektraMax (Molecular Devices, CA, USA) spektroflorede 420 nm'de ölçüm alındı. Kör olarak enzim içermeyen karışım kullanıldı.

2.2.5.2. PTPS'nin NTP-H₂ Aktivitesi

PTPS aktivitesi için substrat olarak NTP-H₂ kullanımı gereklidir. Satın alınması planlanan bu kimyasal, 7,8-dihidro-*D*-neopterin-3'-trifosfat olarak anılmakta olup sadece Schricks Lab. (İsviçre) tarafından üretilmekteydi ancak çalışmanın başladığı zamanda laboratuvar üretimden vazgeçtiği için *guanozin trifosfat siklohidrolaz-I (gch-I)* genince kodlanan GCH-I tarafından, GTP'den dönüştürerek elde ettik. İlgili gen daha öncetarafımızdan yine *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisinden PZR ile tespit edilerek pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21(DE3)pLys hücrelerine aktarılmıştı. Sonrasında biyokimyasal karakterizasyonları tarafımızdan tamamlanmıştı (Hızal, 2013). Bu amaç doğrultusunda ilgili enzimin eldesi için aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

2.2.5.2.1. PTPS Substratının Hazırlanması

Ekspresyon için seçilen klon (pET28a+)/*AfgchI* plazmidi içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS), uygun besi yeri içeren tüpte 200 rpm'de 37°C'de bir gecelik

büyümeye kondu ve elde edilen kültür, 500 mL erlen içerisinde 100 kez seyreltildi ve OD₆₀₀, 0,6 olana kadar büyütüldü. İstenen büyüme noktasına ulaşan kültüre, son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek uyarıldı ve uyarımdan sonra 4. saatte örnekler alınarak hücreler çöktürüldü.

Elde edilen pellet, Ni Binding Buffer içerisinde çözüldü ve -80°C’de dondurularak oda sıcaklığında tekrar çözülmeye bırakıldı ve bu işlem 2 defa tekrarlandı. Sonrasında sonikatör yardımıyla (15’er mL olarak hazırlanan örnek, 3 dakika süre ile 20 saniye pulse ON, 20 saniye pulse OFF olarak % 30 amplitudde şartında) parçalandı. 14000 rpm’de 15 dakika süre ile çöktürüldü ve süpernatant alındı. SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. SDS-PAGE’de ekspresyonu tespit edilen protein daha sonra 70°C’de 15 dakika inkübe edilerek konak hücreden gelen proteinler mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. İnkübasyon sonrası tekrar 14000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı.

Sonikasyon sonrasında rekombinant protein His Link™ Protein Purification System (Promega, Medison, WI, USA) kullanılarak üretici firmanın öngördüğü şekilde saflaştırma yapıldı. Buna göre, öncelikle aşağıdaki tamponlar hazırlandı.

Dengeleme tamponu olarak 10 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5),
Elüsyon tamponları olarak 10-500 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5) serileri,
Yıkama tamponu olarak ise 1000 mM imidazol içeren 100 mM HEPES (pH 7,5).

Tamponlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki yöntemle 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 dengeleme 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 katı dengeleme tamponu ile yıkandı. Sonrasında hazırlanan diğer seriler kolona tatbik edildi,

- Elüsyon sonrasında, yıkma tampon ile kolon yıkandı. Uygulama sonrası % 12'lik SDS-PAGE ile protein tespit edildi.

Saflaştırma işleminden sonra GTP'den NTP-H₂ dönüşümü için standart yöntem olarak Wang vd. (2011) metodu optimize edilerek uygulandı (Hızal, 2013). Bunun için 100 µL son hacimde 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP ve 2 µL enzim içeren reaksiyon 65°C'de 16 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 14000 rpm'de 15 dakika çöktürüldü ve süpernatant yeni bir tüpe alındı. Spektroflorometrede 350 nm excitation ve 450 nm emission dalga boylarında ölçüm alındı. Dönüşümün gerçekleştiği aynı zamanda HPLC analizi ile belirlendi. Bunun için süpernatant örneği fosfat tamponu ile 100 kez seyreltildikten sonra, aynı fosfat tamponu ile dengelenmiş 4,6x250 mm COSMOSIL 5C18-ARC18 (ACE, Aberdeen, Scotland) reversed-faz kolonuna yüklendi. 10 mM Na₂HPO₄ (pH 6,0) tamponunda, 1,2 mL/dakika akışla yürütme yapıldı. 350 nm eksitasyon, 450 nm emisyon limitlerinde ölçüm alındı. Mobil faz olarak % 10 metanol kullanıldı. GTP ve neopterin standart grafikleri kullanıldı. Burada bahsedilen yöntemde elde edilen substratın depolanma imkânı olmadığından, her lazım olduğunda tekrar kültür atıldı, ekspresyon yapıp saflaştırma işlemlerinden sonra dönüşüm reaksiyonu yapılarak HPLC analizlerinden sonra taze olarak kullanıldı.

2.2.5.2.2. Substratın Denenmesi

PTPS aktivitesi ise Woo vd. (2002a ve b) çalışması baz alınarak NTP-H₂'den PPH₄ oluşumu ile tespit edildi. Bunun için 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM NTP-H₂, 10 mM MgCl₂ ve rekombinant enzim karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Karışım, 1 saat boyunca farklı sıcaklık değerlerinde inkübe edildi. Reaksiyon eş hacimde asidik iyodin solüsyonu (% 1 I₂, % 2 KI ve 1 N HCl) eklenerek sonlandırıldı. Daha sonra % 2'lik askorbik asit solüsyonu ilave edildi ve 14000 rpm'de

15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı. Elde edilen süpernatant hem 350 nm excitation 450 nm emission dalga boylarında hem de reverse faz HPLC’de kullanıldı.

2.2.6. PTPS’nin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Enzim için uygun reaksiyon şartlarının belirlenmesi (uygun sıcaklık ve pH) ve biyokimyasal karakterizasyonlarının tamamlanması için, yukarıdaki şartlar esas alınarak enzim aktivitesi üzerine etki edebilecek diğer parametreler belirlendi.

2.2.6.1. Optimum pH

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH değerini tespit etmek için, başlangıçta kullandığımız pH değerlerinden kademeli olarak bazik ve asidik pH’larda aktivasyon deneyleri yapıldı. Bu nedenle, pH 5,0 için sodyum asetat, pH 6,0-6,5 aralığı için MES, pH 6,5-7,0-7,5 aralığı için MOPS, pH 7,0-7,5-8,0-8,8 aralığı için Tris, pH 9,5 için glisin-NaOH tamponları kullanıldı.

2.2.6.2. Optimum Sıcaklık

Enzimin termofilik bir bakteriden izole edilmesinden dolayı bakterinin büyüme sıcaklığı olan 55°C’de veya daha yukarı sıcaklık değerlerinde beklenen aktiviteden çok aktivite göstermesi doğaldır. Bu nedenle çalışma sıcaklığı, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65°C değerinde deneyler yapıldı. İnkübasyonlar sırasında belli zaman aralıklarında her bir sıcaklıktaki tüpler alındı ve bu tüplerdeki aktivite standart metoda göre belirlendi.

2.2.6.3. Kinetik Çalışmalar

Enzimin kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{max} değerlerinin) belirlenmesi için 100 mM Tris-Cl (pH 8,8), 10 mM $MgCl_2$, substrat konsantrasyonu 4,34-26,4 μM aralığında 5 μL PTPS (0,5 mg/mL son hacimde) ile 100 μL son hacimde reaksiyon gerçekleştirildi. 1 saat 65°C’de inkübe edildikten sonra reaksiyona 30 μL asidik iyodin solüsyonu (% 1 I_2 , % 2 KI ve 1 N HCl) eklenerek sonlandırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika karanlık

ortamda inkübasyondan sonra 15 µL % 2'lik taze askorbik asit solüsyonu ilave edildi. Kahverengi reaksiyon rengi açıldıktan sonra 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant yeni tüpe alındı. Elde edilen süpernatant reverse faz HPLC'de yürütüldü. Elde edilen ürünler, neopterin standart grafiği kullanılarak Origin 8.1 programı ile hesaplandı.

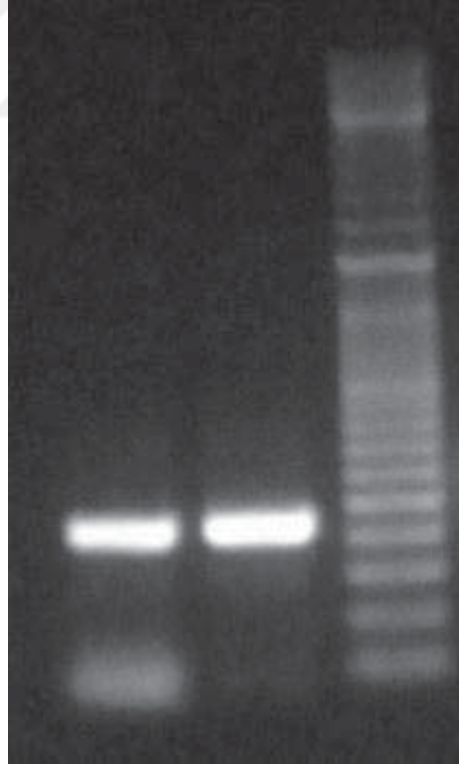
2.2.6.4. PTPS Üzerine Aktivatör ve İnhibitör Etkilerin Belirlenmesi

PTPS aktivitesine etki edebilecek olan metaller ve inhibitör maddeler literatür ve BRENDA verileri kullanılarak belirlenmişti. Bunun için K^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} , gibi metaller ve EDTA ve 4-vinilpiridin seçildi. Denemeler, daha önce bahsedilen optimum şartlarda gerçekleştirildi. Kullanılacak olan substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten eğrisine göre belirlendi. Yapılan reaksiyonlar, aynı şartlar altında ters faz HPLC'ye tabi tutuldu.

3. BULGULAR

3.1. *Afpts* Geninin PZR ile Tespiti ve Klonlama Basamakları

Çalışmamızda ele alınmış olan *ptps* geni termofilik *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisinden elde edildi. PZR’de kullanılan primerler bakteriye ait NCBI GenBank verilerinden yola çıkılarak tasarlandı. Yapılan PZR taramaları sonucunda 438 nükleotitik kısım elde edildi (Şekil 2). Rekombinant vektör alıcı *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi. Elde edilen klonlardan plazmit DNA izolasyonu, GeneJET PlasmidMiniprep Kit (Thermo Scientific, Lithuania) kiti firmanın önerdiği şekilde kullanılarak tamamlandı. Doğrulanmış plazmitler (pGEM-T/Easy/*Afpts*) DNA dizi analizine tabi tutuldu (Şekil 3). Elde edilen sonuçlara göre, hedeflenen DNA bölgesinin klonlandığı tespit edildi.

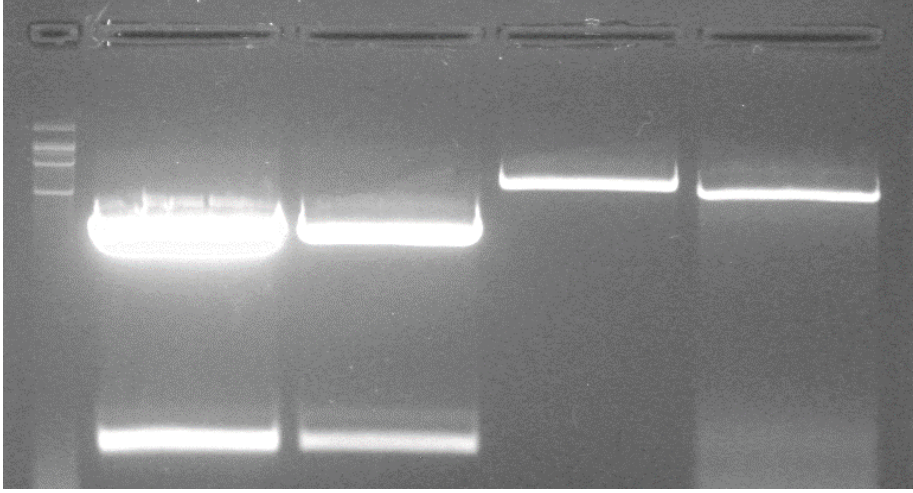


Şekil 2. *Afpts*’ye ait PZR sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüleri (a ve b. PZR sonucu, c: Marker, Kontrol grubu burada verilmemiştir)

```
atgatccaacaaatattatccgcaagtcattcaccggttccgctatgagctaaataaaga
tatgcaaatacgcgggcggcgcaactttattccacatgaagcagccggacgatgtgccaacg
tgcacggacatacgtatatttatcaacattaccggttgctggtgacgagctggatgattcc
ggttttttaattaactttcaacagttaaaaaaacttatccaccatcgttttgaccatac
gttaaatgaacgatcataccgatgtattagcaaacacgcaggcgggaacatttcccgcgca
cagaagtcgtagcgcgcaaaattgctgaaatcgtgcaacaacatttagatacgttgcca
aacaaccgacatgctgttcaagtgtttgtacgggagtcggcgacaagctatgtcgtata
tcgtccgaaagcagggaaacaataa
```

Şekil 3. *Afpts*'ye ait DNA dizi analizi sonucu

A. flavithermus DSM 2641^T bakterisinden PCR yoluyla yakalanarak pGEM-T/Easy vektörüne klonlanan *afpts* geninin buradan alınarak ekspresyon vektörü olan pET28a(+)'ya aktarıldı. Bunun için izole edilen pGEM-T/Easy/*Afpts* plazmidi uygun restriksiyon enzimleri ile (*Nco*I ve *Xho*I) ortak tampon (double digest tamponu) kullanılarak ikili kesim yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde tespit edildikten sonra, aktarılmak istenen DNA fragmenti, GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Lithuania) ile üretici firmanın öngördüğü şekilde agaroz jelden saflaştırıldı. Aynı şekilde yapılan bu reaksiyon, ekspresyon vektörü olarak kullanılacak olan pET28a(+) (Novagen, USA) plazmidi için de tekrarlandı (Şekil 4). Ligasyon işleminden sonra soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3)pLys hücrelerine aktarıldı. Şekil 5'de ise pET28a(+) vektörüne klonlama sonucu 6xHis kuyruğunun yerleşimi gösterilmektedir.



Şekil 4. Afpts'ye ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri (a.Kesilmemiş PGEM-T Easy/Afpts, b ve c: *NcoI* ve *XhoI* ile kesilmiş pGEMT/Easy/Afpts, d. *NcoI* ile kesilmiş pET28a(+), e. *NcoI* ve *XhoI* ile kesilmiş pET28a(+))

```

atggtccaacaaatztatccgcaagtcattcaccggtttcgctatgagctaaataaagat
M V Q Q I Y P Q V I H P F R Y E L N K D
atgcaaatcgcgggcgcactttattccacatgaagcagccggacgatgtgcaacgtg
M Q I A A A H F I P H E A A G R C A N V
cacggacatacgtatztatcaacattaccgttgctggtgacgagctggatgattccggt
H G H T Y F I N I T V A G D E L D D S G
ttttaattaactttcaacagttaaaaaacttatccaccatcgtttgaccatacgtta
F L I N F Q Q L K K L I H H R F D H T L
atgaacgatcataccgatgtatntagcaacacgcaggcggaaacatttcccgcacagaa
M N D H T D V F S N T Q A E H F P T T E
gtcgtagcgcgcaaaattgctgaaatcgtgcaacaacatttagatacgttgccaaacaaa
V V A R K I A E I V Q Q H L D T L P N K
ccgacatgcgttcaagtgtttgtacgggagtcgccgacaagctatgtcgtatatcgtccg
P T C V Q V F V R E S P T S Y V V Y R P
aaagcagggaacaaactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaa
K A G K Q L E H H H H H H D P A A N K
XhoIHis TagSTOP

```

Şekil 5. Afpts geninin pET28a(+) vektörü ile ekspresyon sonrası oluşacak proteindeki 6xHis kuyruğunun oluşumu

3.2. *pts* Gen Ürününün Ekspresyonu ve Ekspresyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Afpts genini taşıyan pET28a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3)pLys kültürü, Novagen firmasının önerdiği şekilde ekspresyon için 1 mM IPTG uyarımından sonra 4 saat boyunca inkübe edildi. Buna göre genin ekspresyonunda 28°C ile 37°C

arasında bir fark görülmedi ve bundan sonraki işlemlerde uygulanan kültüre etme sıcaklığı, 37°C temel alınarak devam edildi.

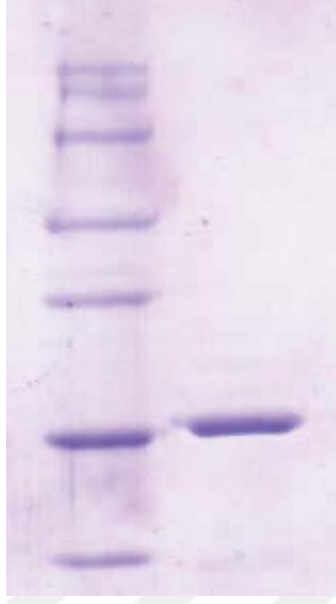
3.3. PTPS'nin Saflaştırılması

3.3.1. Isı Şoku ile Saflaştırma

Termofilik genlerin mezofilik organizmalarda ekspresyonundan sonra yapılacak ısı şoku ile konaktan gelen proteinlerin büyük bir bölümünün elimine edilmesini sağlanacağından, bu basamak saflaştırma işlerini azaltmaktadır. Bu nedenle konak hücre proteinlerinin denatürasyon sıcaklığının belirlenmesi için 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ve 90°C'ler olmak üzere dokuz sıcaklık değerinde ve her bir sıcaklık değerinde 15, 30, 45, 60, 120, 180 dakika ve gece boyu olmak üzere 7 farklı sürede ısı uygulaması yapıldı. Tüm bu uygulamaların ardından muamelelere ait örnekler, 14000 rpm'de 15 dakika boyunca çöktürüldü ve elde edilen süpernatant, % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Buna göre PTPS'ye etki etmeyen ancak konak hücreden gelen proteinlerin en aza indirildiği en ideal denatürasyon sıcaklığı ve süresi, 70°C'de 30 dakika olarak belirlendi.

3.3.2. PTPS'nin Ni-NTA Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

PTPS'nin sahip olduğu 6 Histidin amino asidi kullanılarak Ni-NTA kolonu ile saflaştırılması yapıldı (Şekil 6). Saflaştırma işlemleri sonrasında yapılan diyaliz sonrasında proteinin konsantrasyonu Lowry vd. (1951) metoduna göre 8,8 mg/mL olarak ölçüldü.



Şekil 6. Saflaştırılmış AFPTPS'nin % 12 SDS-PAGE görüntüsü

3.4. PTPS Aktivitesi

PTPS aktivitesi Woo vd. (2002a ve b) çalışması temel alınarak NTP-H₂'den PPH₄ oluşumunun belirlenmesi ile tespit edildi. Daha sonra bu aktiviteye enzimin sepiapterini 7,8-dihidroneopterine dönüştürme aktivitesi de ilave edildi.

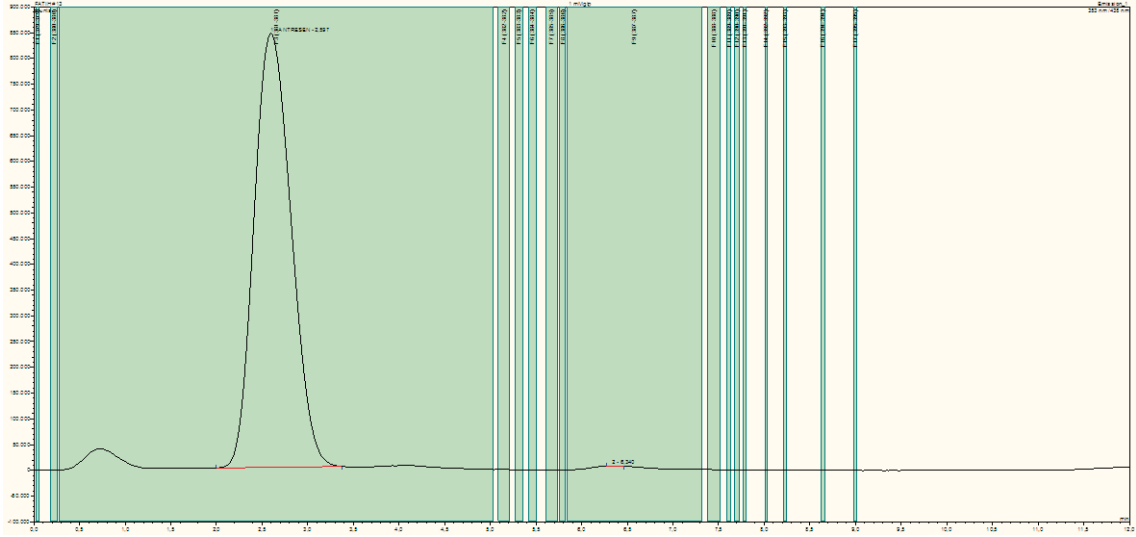
3.4.1. PTPS'nin Sepiapterin Aktivitesi

Literatürde sadece *E. coli* *ygcM* geni tarafından kodlanan PTPS ortoloğu proteinde tespit edilen sepiapterin aktivitesi, bakterimizce kodlanan PTPS'de gözlenmedi.

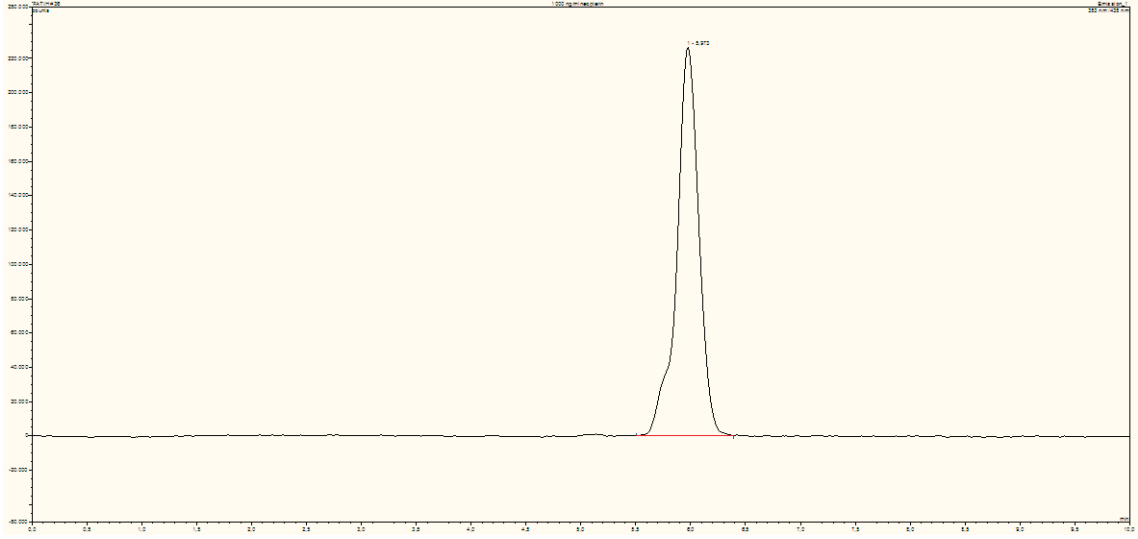
3.4.2. PTPS'nin NTP-H₂ Aktivitesi

PTPS aktivitesi için substrat olarak NTP-H₂ kullanımı gereklidir. Yöntem kısmında bahsedildiği üzere substratı kendimiz dönüştürdük ve bunu kullandık. Yapılan aktivite denemelerinde Şekil 7'de görüldüğü üzere substrat olarak kullanılan GTP'ye ait pik, 2,6 mL fraksiyonu içinde gelmektedir. GTP'den NTP-H₂'ye dönüşüm piki ise 3,6 mL fraksiyonunda gözlenmektedir. Bu iki arasında yer alan pik, GTP'den NTP-H₂'ye

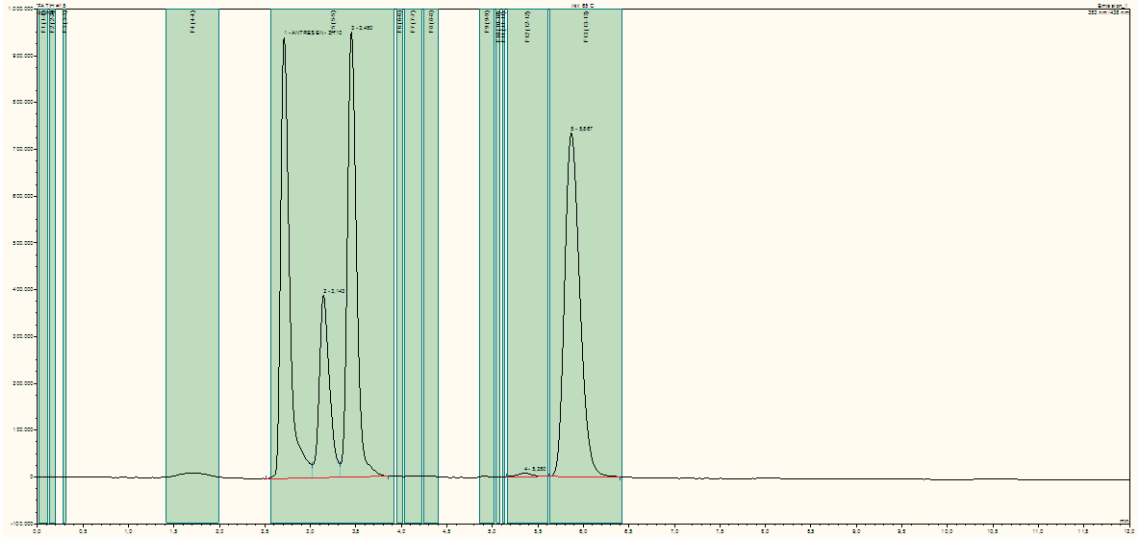
enzimatik dönüşümün yan ürünleri olarak karşımıza çıkmaktadır. 6,3 mL fraksiyonundayer alan pik ise neopterin pikidir. GTP'den başlanarak neopterine dönüşüm bilindiği üzere 3 ana enzim ile (GCH-I, PTPS ve SPR) ile başarılmaktadır. Ancak kullanılan yöntemde, GTP'den elde edilen dihidroneopterin trifosfatın (NTP-H₂, 7-8, dihidroneopterin trifosfat) I₂/KI oksidasyon solüsyonu ile oksitlenme esnasında non-enzimatik dönüşüm olarak bilinen oksitlenme ile eser miktarda neopterin dönüşümü gözlemlenebilmektedir. Sonuç olarak GCH-I ile GTP'den NTP-H₂ dönüşümü yapıldı ve substrat kaynağı olarak PTPS karakterizasyonunda kullanıldı (Şekil 8, 9, 10).



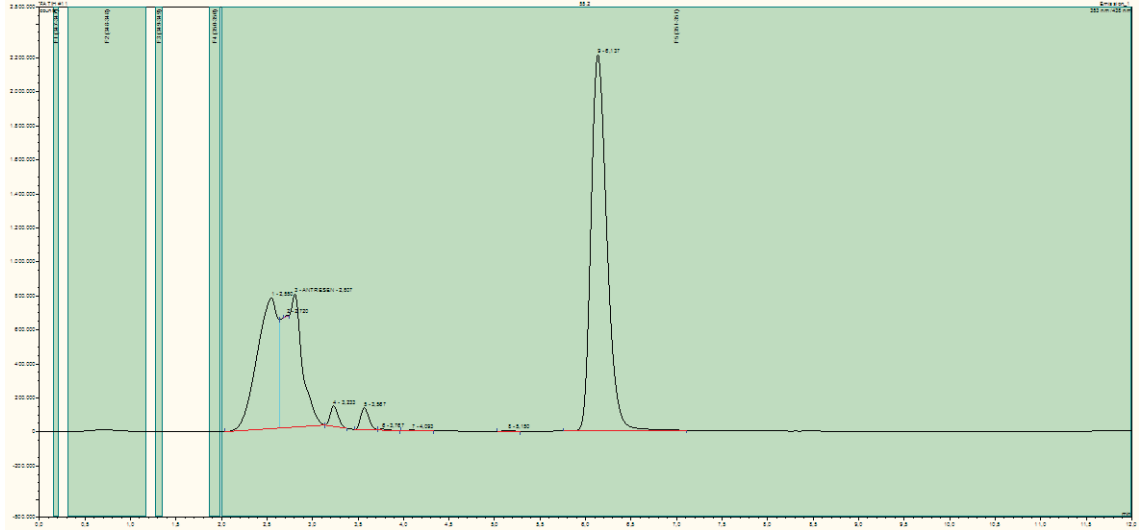
Şekil 7. Substrat olarak kullanılan GTP'ye ait ters faz HPLC piki



Şekil 8. Neopterine ait ters faz HPLC piki



Şekil 9. GTP'den NTP-H₂ oluşumuna ait ters faz HPLC piki

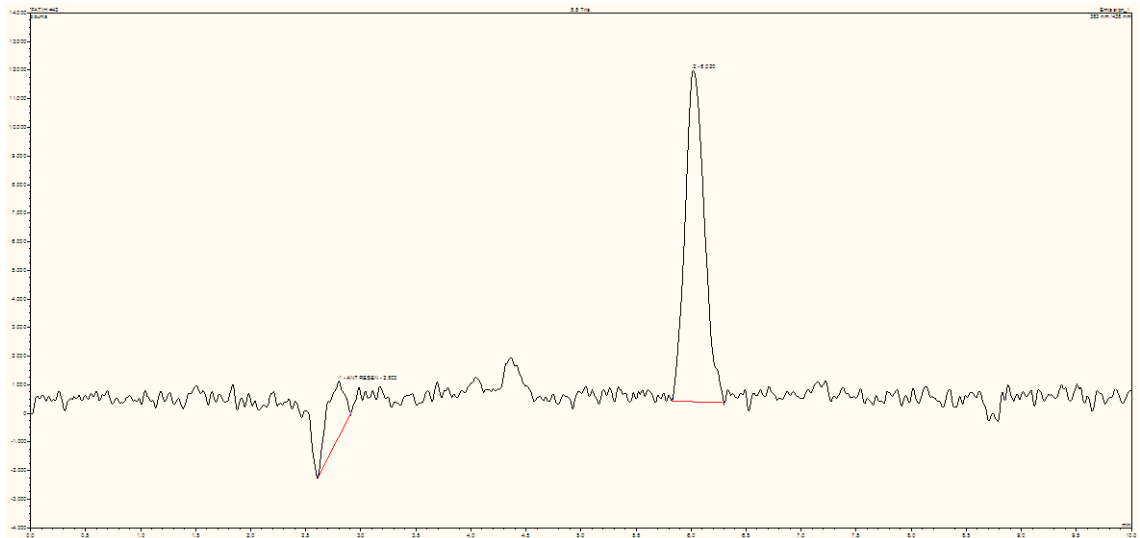


Şekil 10. PTPS reaksiyonuna ait ters faz HPLC piki

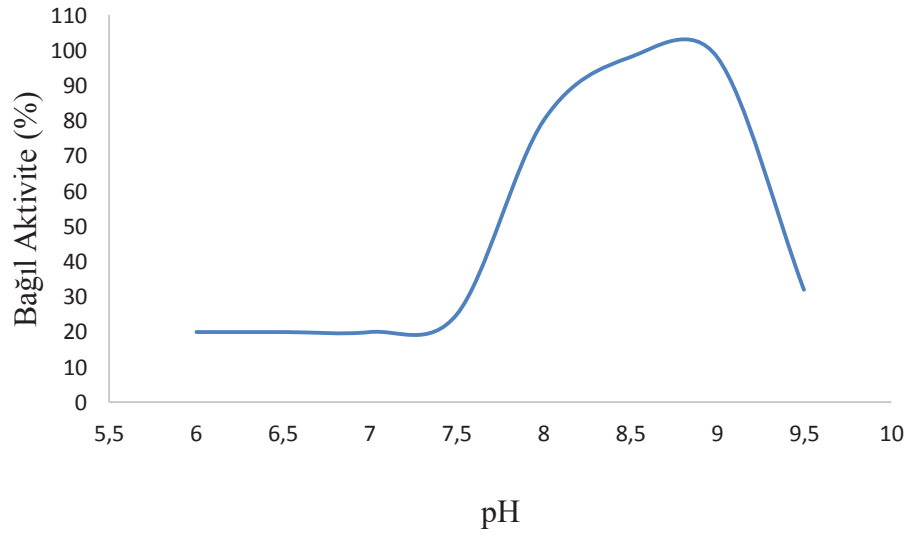
3.1.6. PTPS'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.1.6.1. Optimum pH

PTPS için optimum pH 8,8 olarak tespit edildi (Şekil 11). Ayrıca yapılan HPLC analizinde de en yüksek dönüşümün bu pH'da olduğu teyit edildi (Şekil 12).



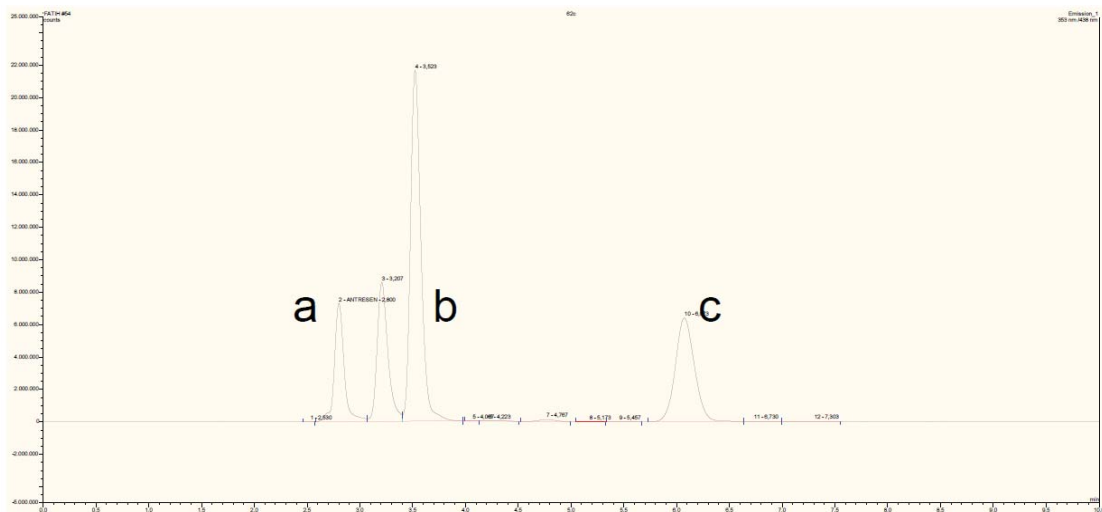
Şekil 11. PTPS aktivitesine pH etkisi



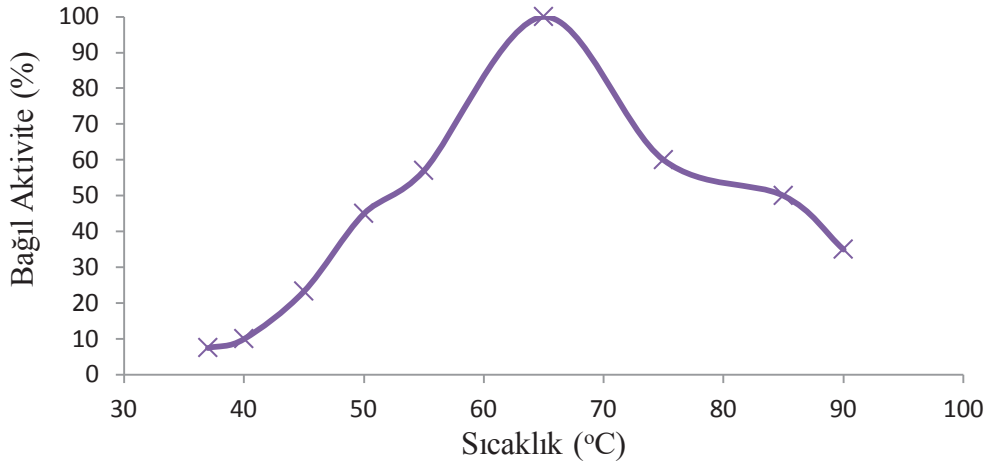
Şekil 12. PTPS'nin Tris tamponunda (pH 8,8) NTP-H₂'den 6-provoil 5,6,7,8-tetrahidropterin dönüşümünün reverse faz HPLC sonucu

3.1.6.2. Optimum Sıcaklık

Yapılan HPLC analizleri sonucunda(Şekil 13) ürüne dönüşümün en fazla olduğu PTPS'nin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 65°C olarak belirlendi (Şekil 14).



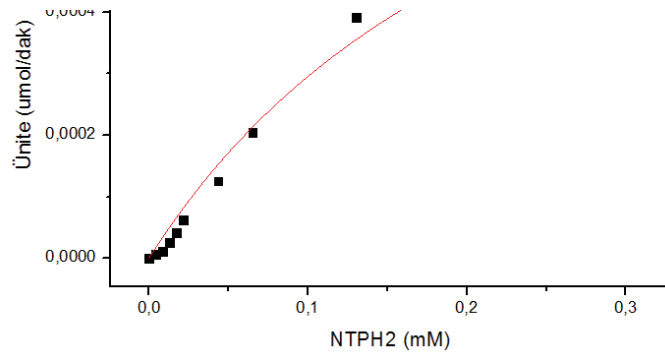
Şekil 13. PTPS'nin NTP-H₂'den 6-provoil 5,6,7,8-tetrahidropterin dönüşümünün reverse faz HPLC sonucu (sırasıyla a: GTP, b: NTP-H₂, c: 6-provoil 5,6,7,8-tetrahidropterin)(37-90°C arasında pH 8,8'de)



Şekil 14. Optimum sıcaklık

3.1.6.3. Kinetik Çalışmalar

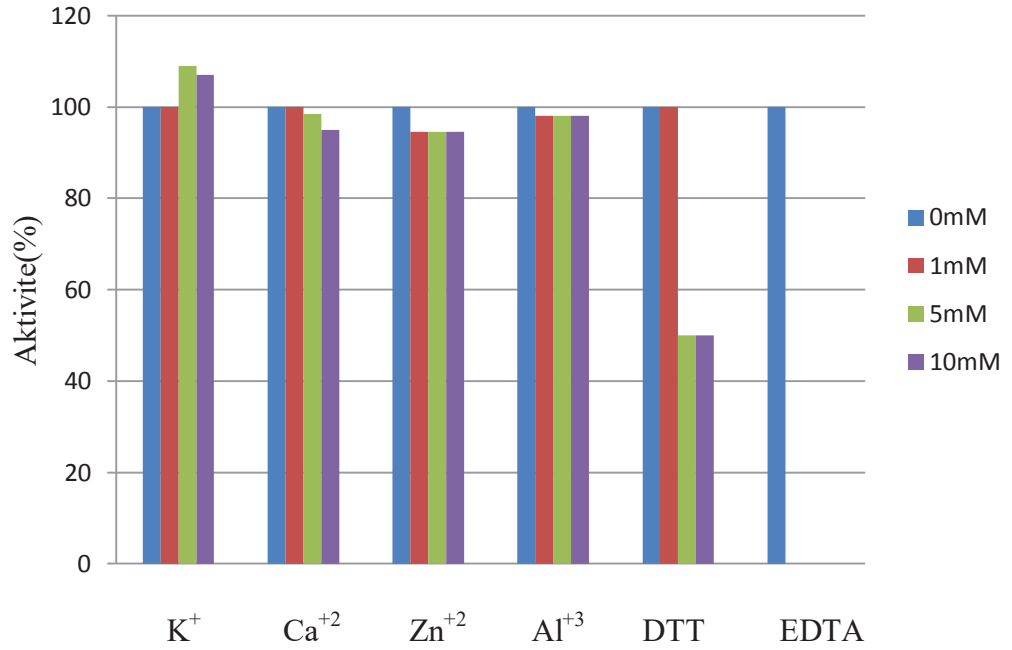
Yapılan kinetik çalışmalarında reaksiyon ürünlerine ait süpernatantlar reverse faz HPLC’de yürütüldü. Elde edilen ürünler, neopterin standart grafiği kullanılarak Origin 8.1 programı ile hesaplandı (Şekil 14). Buna göre enzimin maksimum hızı (V_{max}) $0,0081 \pm 0,00017 \mu\text{mol/dak/mg}$ protein ve K_m ’si ise $0,261 \pm 0,007 \text{ mM}$ olarak belirlendi (R^2 değeri, 0,98).



Şekil 15. PTPS'nin Michaelis-Menten eğrisi

3.1.6.4. PTPS Üzerine Aktivatör ve İnhibitör Etkilerin Belirlenmesi

PTPS aktivitesine etki edebilecek olan metaller ve inhibitör madde denemelerimiz esnasında Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+3} ve vinilpiridin ile reaksiyon karışımı çökeltme gösterdiğinden dolayı iptal edildi. Denemeler, daha önce bahsedilen optimum şartlarda gerçekleştirildi. Substrat konsantrasyonu $43,4 \mu M$ olarak Michaelis-Menten eğrisine göre belirlendi. Yapılan reaksiyonlar, aynı şartlar altında ters faz HPLC'ye tabi tutuldu. Yaptığımız çalışmaların sonucunda göre, K^{+} 'nin 5 mM konsantrasyonunun aktiviteyi % 9, 10 mM konsantrasyonunun ise % 7 arttırdığı bulundu. Ca^{+2} 'nin ise 5 mM'da % 1,4, 10 mM'da ise % 5; 1 mM Zn^{+2} 'nin % 5,5; Al^{+3} 'ün 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında % 2 inhibisyon görüldü. EDTA'nın tüm konsantrasyonlarda tam inhibisyonu gözlemlendi. DTT'nin ise 1 mM'da aktiviteye etkisi yokken, 5 mM konsantrasyonunda aktiviteyi % 50 oranında inhibe ettiği bulundu. (Şekil 16)



Şekil 16. Metal, DTT ve EDTA Etkisi

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Tetrabiopterin (BH4), yüksek organizmalarda fenilalanin hidroksilaz, tirozin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve nitrit oksit sentazın üç izoformu gibi birçok enzim tarafından kullanılan esansiyel bir kofaktördür. Bu kofaktör, insan fizyolojisinde büyük öneme sahiptir. Projemize konu olan ve “sapropterin hidroklorit” generik adıyla bilinen BH4, DHPR (dihidropteridin redüktaz) ve hiperfenilalanemia (veya fenilketonüri) hastalarının tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. BH4’ün biyosentez mekanizmasında, guanozin trifosfat siklohidrolaz I (*gchI*), 6-pirovil tetrahydropterin sentaz (*ptps*) ve sepiapterin redüktaz (*spr*) genleri tarafından kodlanan ve sırasıyla her biri bir önceki enzimin dönüştürdüğü kimyasal maddeyi kullanarak GTP’den sentezlenmektedir. Fenilketonüri ve DHPR eksikliği hastalıklarında gerekli sürekli kullanımlardan dolayı ilk defa 1992 yılında doğal BH4 kimyasal olarak sentezlenmiştir. 3 asimetrik karbon atomuna sahip olan BH4’ün kimyasal olarak sentezlenmesi oldukça zordur. Kullanılan karmaşık prosedürler, birçok sentetik basamağın uygulanması, pahalı materyallerin kullanımı gibi gereklilikler doğurmaktadır. BH4’ün kimyasal sentezine alternatif olarak, biyosentez yolunda rol oynayan genlerin kullanılmasıyla mikroorganizmada üretimi gösterilebilir.

Biyosentetik üretim için, GTP’den BH4’ün biyosentez yolunda görevli olan bahsi geçen üç enzimin klonlanması ve ekspresyonu gereklidir. Şimdiye kadar 2011.102.03.4 Nolu BAP Projemiz kapsamında yaptığımız çalışmalarda, *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisinin *gch I* genini klonlayarak ekspresyonunu başardık ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu ile enzim kinetiği çalışmalarını tamamladık. Bu proje ile bu yolakta görevli olan ikinci gen *ptps* ele alındı. genin kaynak organizmadan PZR ile yakalanması, klonlanması, ekspresyonu, enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlandı.

PTPS’nin elde edilmesinde kaynak organizma olarak *gchI*’de olduğu gibi *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisi kullanıldı. Tasarlanan primerler ile yapılan PZR sonucunda 438 nükleotitlik gen elde edildi. pGEM-T/Easy klonlama vektörüne klonlandı ve *E. coli* DH5 α alıcı hücrelerine aktarıldı. *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisi *ptps*’si 438 bp ve 146 amino asit büyüklüğündedir. *E. coli*’ye ait putativ *ycgM* geni *ptps*

ile ortologdur ve 366 bp büyüklüğündedir ve 122 aa kodlamaktadır (Woo vr ark., 2002). İnsanda, 145 aminoasitlik bir ORF'ye sahiptir ve 11q22.3-22.3 pozisyonunda 6 ekzonlu genden kodlanır (Blau vd, 2001, Woo vd, 2002a). Daha çok ökaryotlarda (*Homo sapiens*, *Drosophila*, *Rattus*, *Salmo*, *Bombyx*, *Mortierella* gibi) belirlenmiş olan *ptps* geni, bakterilerde *Streptomyces* türlerinde 398 bp, *Thermococcus peptonophilus*'da 347, *Bacillus anthracis str. Ames*'de 491, *Geobacter sulfurreducens* PCA'da 368, *Pyrococcus horikoshii*'de 348 bp büyüklüğündedir (Wu vd, 2012; Methe vd, 2003; Read vd, 2003, Bagautdinov vd, 2007). AfPTPS'si 18 kDa büyüklüğündedir. *E. coli*'de 18,6 kDa'dur (Woo vd., 2002b). İnsanda ise farklı araştırmacılar farklı büyüklükte rapor etmişlerdir. Guzman vd. (1992) enzimin 68 kDa, Ashida vd. (1993) 90 kDa, Takikawa vd. (1986) ise 83 kDa olarak bulmuşlardır.

Yapılan koloni seçimlerinden sonra rekombinant plazmit, primer tasarımı esnasında eklediğimiz kesim bölgeleri kullanılarak *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Aynı zamanda ekspresyon vektörü olan pET28a(+) vektörü de aynı enzimlerle kesildi. Yapılan ligasyon sonrasında ekspresyon konak hücresi olan *E. coli* BL21(DE3)pLys hücrelerine aktarıldı. Bu hücre daha sonra uygun şartlarda ekspresyon için kullanıldı. 37°C'de 1 mM IPTG varlığında 4 saat boyunca yapılan ekspresyon sonrasında üretilen enzimin 17 kDa büyüklüğünde olduğu SDS-PAGE ile belirlendi. Enzim, mezofilik konaktan kaynaklanan proteinlerden başlangıçta 70°C'de 30 dakika ısı şoku ile temizlendi akabinde taşıdığı 6 Histidinli kuyruk sayesinde Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırıldı. Enzim 7,8-dihidroneopterin trifosfatı, 6-pyruvoyl-5,6,7,8-tetrahidropterine çevirmektedir. Substrat olarak kullanılan 7,8-dihidroneopterin trifosfat maddesi, sadece İsviçre'de bulunan Schiricks Laboratuvarı'na üretilmekteydi. Ancak kararsız yapıya sahip olması dolayısıyla taze olarak hazırlanması gibi gerekliliklerden dolayı firma madde satışını durdurduğundan, biz kendi GCH-I'ımızla ürettik. Bunun için yine *A. flavithermus* DSM 2641^T bakterisine ait *gchI* genini kullandık. İlgili gen daha önce yüksek lisans öğrencim tarafından çalışılmıştı. Bu nedenle, pET28a(+)/*AfgchI* rekombinant plazmidi kullanıldı. Tekrar saflaştırma işlemleri yapıldı ve GTP'den dönüşüm sağlandı.

Ters faz HPLC analizleri ile dönüşüm hesaplandı. Sustrat olarak GTP'den elde edilen 7,8-dihidroneopterin trifosfat maddesi kullanıldı. HPLC ünitesinin separasyon

kısmı olmadığından ürün ayrılmadı. Bu nedenden dolayı, her ne zaman substrat ihtiyacımız olduğunda işlemler yenilendi ve taze substrat hazırlandı. Substratın satın alınamayışı, projemizde zaman alıcı ayrı bir yük olarak karşımıza çıktı. Neticede PTPS'nin karakterizasyonu bu substrat kullanılarak tamamlandı. AfPTPS, optimum 8,8 pH'da ve 65°C sıcaklıkta maksimum aktivite göstermektedir. BRENDA verileri incelendiğinde, optimum pH'ların 6,5-8,5 arasında, sıcaklığın ise 37-80°C arasında olduğu görülmektedir (URL-2, 2016). Benzer olarak *E. coli*'de optimum pH 6,5-7,0 arasındadır. Çalışma sıcaklığı ise doğal olarak 37°C'dir (Woo vd, 2002). Dolayısıyla AfPTPS'nin optimum pH isteği diğer PTPS'lere nazaran ortalamanın üzerindedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre AfPTPS'nin spesifik aktivitesi 8,1 nmol/dak/mg protein olarak belirlenmiştir. Bu değer *E. coli*'de 1,13, *Synecocystis sp.* PCC 6803'de 0,39 ve insanda 13,03'dür (Woo vd, 2002). Dolayısıyla *E. coli* ve *Synecocystis* PTPS'sinden daha iyi durumdadır. AfPTPS'nin sepiapterini 7,8-dihidropterine dönüştürme aktivitesi saptanamamıştır. Bu konuda yapılan tek çalışma Woo vd. (2002b) tarafından yapılmış ve aktivite 151,3 nmol/dakika/mg protein olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya dayanarak yaptığımız denem sonucunda AfPTPS'nin sepiapterin dönüştürmeaktivitesinin olmadığını tespit ettik. Enzimin metal iyonları ile yapılan etki çalışmalarında, 5 mM K⁺'nin aktiviteyi % 9, 10 mM da ise % 7 arttırdığını tespit edildi. Aynı şekilde 5 mM Ca⁺²'nin % 1,4, 10 mM'da % 5, 1 mM Zn⁺²'nin % 5,5 aktiviteyi arttırdığını, Al⁺³'ün denenen tüm konsantrasyonlara aktivitede inhibisyona sebep olduğunu görüldü. Yine bir şelatör olan EDTA'nın tüm konsantrasyonlarında inhibisyona sebep olduğunu, DTT'nin ise 5 mM konsantrasyonunda aktiviteyi yarıya düşürdüğünü görüldü. Woo vd. (2002b)'nin yaptığı *E. coli* PTPS'nin sepiapterin aktivitesi çalışmasında kofaktöre ihtiyaç duymadığını belirtmişlerdir. Ancak denemelerinde 10 mM Mg⁺² kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda da bu çalışma baz alınmıştır ve yapılan Mg denemelerinde en iyi sonucu 10 mM MgCl₂ ile aldığımızdan bu şekilde kullanılmıştır. Bu çalışmaya göre, EDTA'nın denenen konsantrasyonlarında (1-5 mM) aktiviteyi hafif bir şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Ancak bizim denemelerimizde tüm EDTA konsantrasyonlarında aktivite tamamen inhibe olduğundan enzimin metal bağımlı olduğunu söyleyebiliriz. Benzer duruma, insan PTPS'sinde de magnezyum iyonu ile etkileştiklerinden dolayı aynı sonuca varıldığına rastlamaktayız (Taikawa vd., 1986).

5. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının geliştirilebilmesi ve proje amacına ve çıktılarına göre şunları da önerebiliriz.

1. Saflaştırmada kolaylık sağlayan histidin kuyrukları eklenmeyebilir. Genel kanının, kuyruğun eklenmesi ile işlerin ve sarfiyatın azaltılması yönünde olsa da doğal hali ile proteinler saflaştırılarak kullanılabilir. Böylece 6xHis kuyruklu olan ve olmayan proteinlerin karşılaştırılması yapılabilir.

2. Aynı bakteriden daha önce elde ettiğimiz *gch-I* ile birlikte koekspresyon çalışması ile birlikte çalışıp çalışmadığına bakılabilir.

3. Farklı *Anoxybacillus* türlerinde de belirlediğimiz genlerin ekspresyonu tamamlanıp, daha kaliteli benzer enzim üzerinde çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Andrade, C., Pereira, N. and Antranikian, G. 1999.** Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30, 287-298.
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. and Gershenson, A. 2001.** How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2), 100-106.
- Ashida, A., Hatakeyama, K. and Kagamiyama, H., 1993.** cDNA Cloning, Expression in *Escherichia Coli* and Purification of human 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 195, No. 3, 1386-1393.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. 2004.** Recombinant protein folding and misfolding in *E. coli*. *Nature Biotechnology*, 22, 1399-1408.
- Bauer, M., Suppmann, S., Meyer, M., Hesslinger, C., Gasser, T., Widmer, H.R. and Ueffing, M. 2002.** Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. *Journal of Neurochemistry*, 82, 1300–1310.
- Ben, J., Lim, T.M., Phang, V.P.E. and Chan, W-K., 2003.** Cloning and Tissue Expression of 6-Pyruvoyl Tetrahydropterin Synthase and Xanthine Dehydrogenase from *Poecilia reticulata*. *Marine Biotechnology*, 5, 568–578.
- Bergquist, P.L., Lov, D.R., Croft, J.E., Streiff, M.B., Daniel, R.M. and Morgan, W.H., 1987.** Genetics and Potential Biotechnological Applications of Thermophilic and Extremely Thermophilic Microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1), 199-244.
- Blau, N. and Burgard, P., 2005.** Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*, N. Blau, G. Hoffmann, J. Leonard and J. Clarke. Heidelberg, Springer (B. Ed.) 25-34
- Blau, N., Thöny, B., Cotton, R.G.H. and Hyland, K., 2001.** Disorder tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. 1725-1776. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Vale, D., Childs, B., Vogelstein, B. McGraw-Hill (B. Ed.) 8th edn , New York, ABD.
- Bouzas, T.M., Barros-Velázquez, J. and Villa, T.G., 2006.** Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. *Protein & Peptide Letters*, 13, 645-651.
- Bowden, G.A. and Georgiou G., 1988.** The effect of sugars on β -lactamase aggregation in *E. coli*. *Biotechnology Progress*, 4, 97-101.

- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Herrmann, A., Gütlich, M. and Bacher, A., 1998.** Biosynthesis of Pteridines. NMR Studies on The Reaction Mechanisms of GTP Cyclohydrolase I, Pyruvoyltetrahydropterin Synthase, and Sepiapterin Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 43(23), 28132–28141.
- Brock, T.D., 1985.** Life at High Temperatures. *Science*, 158, 1012-1019.
- Burgess, R.R. 2009.** *Methods in Enzymology*. Vol. 463, Guide To Protein Purification, 2nd Edition, Chapter Seventeen: Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins, Elsevier Inc., USA, 259-282.
- Bürgisser, D.M., Thöny, B., Redweik, U., Hunziker, P., Heizmann, C.W. and Nar, H., 1994.** Expression and characterization of recombinant human and rat liver 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. Modified cysteine residues inhibit the enzyme activity. *European Journal Biochemistry*, 219, 497-502.
- Bürgisser, D.M., Thöny, B., Redweik, U., Hess, D., Heizmann, C.W., Huber, R. and Nar, H. 1995.** 6-Pyruvoyl Tetrahydropterin Synthase, An Enzyme With a Novel Type of Active Site Involving Both Zinc Binding and an Intersubunit Catalytic Triad Motif; Site-directed Mutagenesis of the Proposed Active Center, Characterization of the Metal Binding Site and Modelling of Substrate Binding. *Journal of Molecular Biology*, (1995) 253, 358–369.
- Cho, S.H., Na, J.U., Youn, H., Hwang, C.S., Lee, C.H. and Kang, S.O. 1999.** Sepiapterin reductase producing L-threo-dihydrobiopterin from *Chlorobium tepidum*. *Biochemical Journal*, 340, 497-503.
- Choi, Y.K., Jun, S.R., Cha, E.Y., Park, J.S. and Park, Y.S., 2005.** Sepiapterin reductases from *Chlorobium tepidum* and *Chlorobium limicola* catalyze the synthesis of L-threo-tetrahydrobiopterin from 6-pyruvoyltetrahydropterin. *FEMS Microbiology Letters*, 242, 95–99.
- Demirjian, D.C., Morís-Varas, F. and Cassidy, C.S., 2001.** Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144–151.
- Demirkol M., 2010.** Aminoasit Metabolizması Bozuklukları. Neyzi O, Ertuğrul T. (Eds.) *Pediyatri*. 4. Baskı. Cilt 2, Nobel Matbaacılık, İstanbul. 2010; 787-791.
- Demos, M.K., Waters, P.J., Vallance, H.D., Lillquist, Y., Makhseed, N., Hyland, K., Blau, N. and Connolly, M. B., 2005.** 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase Deficiency with Mild Hyperphenylalaninemia. *Annals of Neurology*, 58, 164–167.
- Demos, M.K., Waters, P.J., Vallance, H.D., Lillquist, Y., Makhseed, N., Hyland, K., Blau, N. and Connolly, M.B., 2005.** Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase Deficiency with Mild Hyperphenylalaninemia. *Annals of Neurology*, 58, 164–167.

- Egorova, K. and Antranikian, G., 2005.** Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 649–655.
- Eichler, J., 2001.** Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19, 261–278.
- Elzaouk, L., Osmani H., Leimbacher, W., Romstad, A., Friedman, J., Maccollin, M., Thöny, B. and Blau, N., 2002.** Sepiapterin Reductase Deficiency: Molecular Analysis in A New Case Presenting With Neurotransmitter Deficiency Without Hyperphenylalaninemia. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*, 277-284.
- Franscini, N., Blau, N., Walter, R.B., Schaffner, A. and Schoedon, G., 2003.** Critical Role of Interleukin-1 β for Transcriptional Regulation of Endothelial 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 23, 50-53.
- Frock, A.D. and Kelly, R.M., 2012.** Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1, 1–10.
- Fujimoto, K., Sakurai, M., Kawase, M. and Katoh, S., 2003.** Effect of antisense oligodeoxynucleotide for sepiapterin reductase on the viability of PC12 cells in the presence of exogenous carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 583-586.
- Garavaglia, B., Invernizzi, F., Carbone, A., Viscardi, Y., Saracino, F., Ghezzi, D., Zeviani, M., Zorzi, G. 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. *The Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27, 455-463.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004.** The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnol*, 42(4), 223–235.
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K., 2003.** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, 17–34.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R. J. and Rangrajan, M. 2000.** Glucose isomerase: insight into protein engineering for increased thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1543, 294–335.
- Hasler, T. and Curtius, H.C., 1989.** Purification and characterization of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase from salmon liver. *European Journal of Biochemistry*, 180, 205-211.
- Hatakeyama, K., Hoshiga, M., Suzuki, S. and Kagamiyama, H., 1993.** Enzymatic synthesis of 6R-[U-14C]tetrahydrobiopterin from [U- 14C] GTP. *Analytical Biochemistry*, Feb 15, 209(1), 1-5.

- He, A. and Rosazza, J.P. N., 2003.** GTP Cyclohydrolase I: Purification, Characterization, and Effects of Inhibition on Nitric Oxide Synthase in *Nocardia* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7507–7513.
- Hoist, O., Manelius, A., Krahe, M., Miirkl, H., Rawen, N. and Sharp, R., 1997.** Thermophiles and Fermentation Technology, *Camp. Biochemical Physiology*, 118A(3), 415-422.
- Hough, D.W. and Danson, M. 1999.** Extremozymes, *J Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 39–46. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.1.1.153, Son Erişim Tarihi: 2 Mart 2013.
- Hwu, W.L., Yeh, H.Y., Fang, S.W., Chiang, H.S., Chiou, Y.W. and Lee, Y.M., 2003.** Regulation of GTP cyclohydrolase I by alternative splicing in mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 937–942.
- Hynes, S.O., Smith, L.A., Richardson, D.M., Kovesdi, I., O'Brien, T. and Katusic, Z. S., 2003.** In vivo expression and function of recombinant GCHI in the rabbit carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*, 286, H570–H574.
- Inoue, Y., Kawasaki, Y., Harada, T., Hatakeyama, K. and Kagamiyama, H., 1991.** Purification and cDNA Cloning of Rat 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 31: 20791-20796.
- Jaenicke, R., 1991.** Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal Biochemistry*, 202, 715 – 728.
- Kaindl, A.M., Steinberger, D., Heubner, G., Miller, U., Blaue, N., Neubert, K., Kunath, B. and von der Hagen, M., 2005.** Phenotype of five patients with dopa-responsive dystonia and mutations in *GCH I*. *Journal of Pediatric Neurology*, 3, 83-87.
- Kao, C.D., Niu, D.M., Chen, J.T., Shan, D.E., Lin, Y.Y., Wu, Z.A. and Liao, K.K., 2004.** Subtle brain dysfunction in treated 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency: relationship to motor tasks and neurophysiological tests. *Brain & Development*, 26, 93–98.
- Kendirci, M., 2006.** Doğuştan kalıtsal metabolik hastalıklar. http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Dahili_Tip/Cocuk_Sagligi/Mustafa_Kendirci/Do%C4%9Fu%C5%9Ftan%20Kal%C4%B1tsal%20Metabolik%20Hastal%C4%B1klar.ppt (21.07.2006)
- Kerler, F., Schwarzkopf, B., Katzenmaier, G., Van, Q.L., Schmid, C., Ziegler, I. and Bacher, A., 1989.** Biosynthesis of tetrahydrobiopterin: a sensitive assay of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase using [2'-3H]dihydroneopterin 3'-triphosphate as substrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 990, 15-17.
- Kikani, B.A., Shukla, R.J. and Singh, S.P. 2010.** Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Current Research, Technology and*

Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, 1000–1007.

- Kikuchi, A., Takeda, A., Fujihara, K., Kimpara, T., Shiga, Y., Tanji, H., Nagai, M., Ichinose, H., Urano, F., Okamura, N., Arai, H. and Itoyama, Y., 2003.** Arg(184)His Mutant GTPCyclohydrolase I, Causing Recessive Hyperphenylalaninemia, Is Responsible for Dopa-Responsive Dystonia With Parkinsonism: A Case Report. *Movement Disorders*, 19(5), 590-593.
- Koch, R., Guttler, F. and Blau, N., 2002.** Mental Illness in Mild PKU Responds to Biopterin. *Molecular Genetics and Metabolism*, 75, 284–286.
- Koch, R., Moseley, K. and Guttler, F., 2005.** Tetrahydrobiopterin and maternal PKU. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, 139–141.
- Kolinsky, M.A. and Gross, S.S., 2004.** Biochemical analysis of a mechanism of potent GTP cyclohydrolase I inhibition by 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine: requirement of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein. *JBC Papers*, 40677-40682.
- Kong, J.S., Kang, J.Y., Kim, H.L., Kwon, O.S., Lee, K.H., Park, Y.S., 2006.** 6-Pyruvoyltetrahydropterin synthase orthologs of either a single or dual domain structure are responsible for tetrahydrobiopterin synthesis in bacteria. *FEBS Letters* 580, 4900–4904.
- Kumar, S., Tsai, C.J. and Nussinov, R., 2001.** Thermodynamic Differences among Homologous Thermophilic and Mesophilic Proteins. *Biochemistry*, 40, 14152-14165.
- Kure, S., Hou, D.C., Ohura, T., Iwamoto, H., Suzuki, S., Sugiyama, N., Sakamoto, O., Fujii, K., Matsubara, Y. and Narisawa, K., 1999.** Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 135(3), 375-378.
- Lee, S.W., Lee, H.W., Chung, H.J., Kim, Y-A., Kim, Y.J., Hahn, Y., Chung, J.H. and Park, Y.S., 1999.** Identification of the genes encoding enzymes involved in the early biosynthetic pathway of pteridines in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 176: 169-176.
- Leitner, K.L., Meyer, M., Leimbacher, W., Peterbauer, A., Hofer, S., Heufler, C., Müller, A., Heller, R., Werner, E.R., Thöny, B. and Werner-Felmayer, G., 2003.** Low tetrahydrobiopterin biosynthetic capacity of human monocytes is caused by exon skipping in 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biochemical Journal*, 373, 681–688.
- Li, W.F., Zhou, X. X. and Lu, P., 2005.** Structural features of thermozymes, *Biotechnology Advances*, 23, 271–281.

- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934.** The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3), 658–666.
- Linscheid, P., Schaffner, A., Blau, N. and Schoedon, G., 1998.** Regulation of 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase Activity and Messenger RNA Abundance in Human Vascular Endothelial Cells. *Circulation*. 98, 1703-1706.
- Liu, T.T., Chiang, S.Z., Wu, S.J. and Hsiao, K.J., 2001.** Tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemia in the Chinese. *Clinica Chimica Acta*, 313, 157–169.
- McCarty, R.M., Somogyi, A. and Bandarian, V., 2009.** *Escherichia coli* QueD is a 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterinsynthase. *Biochemistry*. 24;48(11):2301-3.
- Miles, Z.D., Roberts, S.A., McCarty, R.M. and Bandarian, V., 2014.** Biochemical and Structural Studies of 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin Synthase Reveal the Molecular Basis of Catalytic Promiscuity within the Tunnel-fold Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 289, No. 34, 23641–23652.
- Morozkina, E.V., Slutskaya, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I. and Koroleva, O.V., 2010.** Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 1–14.
- Muntau, A.C., Röschinger, M., Habich, M., Demmelair, H., Hoffmann, B., Sommerhoff, C.P. and Roscher, A.R., 2002.** Tetrahydrobiopterin As An Alternative Treatment For Mild Phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine*, 347(26), 2122-2132.
- NCBI-1, 2013.** *Anoxybacillus flavithermus* WK1, complete genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/212637849>, Son Erişim Tarihi: 1 Mart 2013.
- NCBI-2, 2013.** *Anoxybacillus flavithermus* WK1, complete genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/212637849?from=1083734&to=1084336&report=gbwithparts>, Son Erişim Tarihi: 1 Mart 2013.
- NCBI-3, 2013.** *Clostridium clariflavum* DSM 19732, complete genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/374294493?report=fasta>, Son Erişim Tarihi: 1 Mart 2013.
- Nicholas, J.A., Keith M. Channon, 2004.** Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004;24:413-420.)
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G., 1999.** Extremophiles As A Source Of Novel Enzymes For Industrial Application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51, 711-729.

- Nigam, P.S., 2013.** Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 3, 597-611.
- Özer, I., 2004.** Fenilketonüri Örneğinde Doğumsal Metabolik Hastalıklarda Genel Tedavi Yaklaşımı. *Klinik Pediatri*, 3(1), 26-30.
- Park, E.H., Lee, W.H., Jang, M.H. and Kim, M.D., 2015.** Optimization of Expression Conditions Enhances Production of Sepiapterin, a Precursor for Tetrahydrobiopterin Biosynthesis, in Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(10), 1709-1713.
- Pey, A.L., Pérez, B., Desviat, L.R., Martýnez, M.A., Aguado, C., Erlandsen, H., Ga´mez, A., Stevens, R.C., Thórołfsson, M., Ugarte, M. and Martýnez, A., 2004.** Mechanisms Underlying Responsiveness to Tetrahydrobiopterin in Mild Phenylketonuria Mutations. *Human Mutation*, 24, 388-399.
- Ploom, T., Thöny, B., Yim, Lee, S., Nar, H., Leimbacher, W., Richardson, J., Huber, R. and Auerbach, G., 1999.** Crystallographic and Kinetic Investigations on the Mechanism of 6-Pyruvoyl Tetrahydropterin Synthase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 286, 851-860.
- Ponzone, A., Spada, M., Ferraris, S., Dianzani, I. and Sanctis, L. 2004.** Dihydropteridine Reductase Deficiency in Man: From Biology to Treatment. *Medicinal Research Reviews*, 24(2), 127-150.
- Ramchuran, S.O., Karlsson, E.N., Velut, S., de Mare, L., Hagander, P. and Holst, O., 2002.** Production of Heterologous Thermostable glycoside hydrolases and The presence of Host-cell Proteases in Substrate limited Fed-batch Cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3), *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60, 408-416.
- Saw, J.H., Mountain, B.W., Feng, L., Omelchenko, M.V., Hou, S., Saito, J. A., Stott, M.B., Li, D., Zhao, G., Wu, J., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Rigden, D.J., Dunfield, P.F., Wang, L. and Alam, M., 2008.** Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biology* 9(11), R161.
- Schircks Lab, 2013.** Tetrahydropterin Tablets. <http://www.schircks.com/pteridines/PtePrices/PtePricesAlphaLinked.pdf>, 2013.
- Scriver R.C. and Kaufman S., 2001.** Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th ed), New York, McGraw-Hill Inc, 2001; 16671724.
- Seo, K.H., Supangat, Kim, H.L., Park, Y.S., Jeon, C.O. and Lee, K.H., 2008.** Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a6-pyruvoyltetrahydropterin synthase homologue from *Escherichia coli*. *Acta*

- Seo, K.H., Zhuang, N., Park, Y.S., Park, K.H. and Lee, K.H., 2014.** Structural basis of a novel activity of bacterial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase homologues distinct from mammalian 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase activity. *Acta Crystallographica Section D Biology Crystallographica*. 70 (Pt 5), 1212-1223.
- Serova, L.I., Maharjan, S., Huang, A., Sun, D., Kaley, G. and Saban, E. L., 2004.** Response of tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase I gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration. *Brain Research*, 1015, 1– 8.
- Shiratori, H., Sasaya, K., Ohiwa, H., Ikeno, H., Ayame, S., Kataoka, N., Miya, A., Beppu, T. and Ueda, K., 2009.** *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. *IJSEM*, 59, 1764–1770.
- Spaen, L.J. M., Bakker, J.A., Velter, C., Loots, W., Rubio-Gonzalbo, M.E., Forget, P.P., Dorland, L., De Koning, T.J., Poll-The, B.T., Ploos Van Amstel, H.K., Bekhof, J., Blau, N. and Duran, M., 2001.** Tetrahydropterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Dutch neonates. *The Journal of Inherited Metabolic Disease*. 24, 352-358.
- Spoonamore, J.E., Roberts, S.A., Heroux, A. and Bandarian, V., 2008.** Structure of a 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase homolog from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, F64, 875–879.
- Steinberger, D., Blau, N., Goriunov, D., Bitsch, J., Zuker, M., Hummel S. and Muller, U., 2004.** Heterozygous mutation in 5'-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics*, 5, 187–190.
- Suzuki, T., Inagaki, H., Yamakuni, T., Nagatsu, T. and Ichinose, H. 2002.** Enhanced Expression of GTP Cyclohydrolase I in V-1-overexpressing PC12D Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 962–968.
- Suzuki, T., Kurita, H. and Ichinose, H., 2004.** GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate. *European Journal of Biochemistry*, 271, 349–355.
- Swietnicki, W., 2006.** Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 367-372.
- Synowiecki, J., 2010.** Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7020-7025.
- Takikawa, S.I., Curtius, H.C., Redweik, U., Leimbacher, W. and Chisla, S., 1986.** Biosynthesis of tetrahydrobiopterin. Purification and characterization of 6-

- pyruvoyl-tetrahydropterin synthase from human liver. *European Journal of Biochemistry*, 161, 295-302.
- Taylor, I.N., Brown, R.C., Bycroft, M., King, G., Littlechild, J.A., Lloyd, M.C., Praquin, C., Toogood, H.S. and Taylor, S.J.C., 2004.** Application of thermophilic enzymes in commercial biotransformation processes. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 290-292.
- Tiefenbacher, C.P., Lee, C.H., Kapitza, J., Dietz, V. and Niroomand, F., 2003.** Sepsiapterin reduces postischemic injury in the rat heart. *European Journal of Physiology*, 447, 1-7.
- Thöny, B., Leimbacher, W., Bürgisser D. and Heizmann, C., 1992.** Human 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase: cDNA Cloning and Heterologous Expression of the Recombinant Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 189, No. 3: 1437-1443.
- Thöny, B., Leimbacher, W., Blau, N., Harvie, A. and Heizmann, C.W., 1994.** Hyperphenylalaninemia Due to Defects in Tetrahydrobiopterin Metabolism: Molecular Characterization of Mutations in 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase. *The American Journal of Human Genetics*, 54: 782-792.
- Törüner E.B., 2012.** Büyükgönenç L. Çocuk Sağlığı Temel Hemşirelik Yaklaşımları. Göktuğ Yayıncılık, Ankara, 2012; 917-922.
- Trefz, F.K. and Blau, N., 2003.** Potential Role of Tetrahydrobiopterin in the Treatment of Maternal Phenylketonuria. *Pediatrics*, 112(6), 1566-1569.
- Turner, P., Mamo, G. and Karlsson, E. N., 2007.** Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6(9), 1-23.
- Upadhyay, V., Singh, A. and Panda, A.K., 2016.** Purification of recombinant ovalbumin from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 117, 52-58.
- URL-1, 2013.** Information on EC 3.5.4.16 - GTP cyclohydrolase I. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.5.4.16 (2 Mart 2013)
- URL-2, 2016.** Information on EC 4.2.3.12 - 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=4.2.3.12 (25 Eylül 2016)
- URL-3, 2016.** Information on EC 1.1.1.153 - sepiapterin reductase (L-erythro-7,8-dihydrobiopterin forming <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.153> (25 Eylül 2016)
- Van, Q.L., Katzenmeier, G., Schwarzkopf, B., Schmid, C. and Bather, A., 1988.** Biosynthesis of biopterin studies on the mechanism of 6-

pyruvoyltetrahydropteridine synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 151 No. 1; 512-517.

- Vera, A., Gozales-Montalban, N., Aris, A. and Villaverde, A., 2006.** The conformation quality of insoluble recombinant proteins in enhanced at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 1101-1106.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J., 1996.** Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *TIBTECH*, 14, 183-190.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001.** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1-43.
- Wang, H., Yang, B., Hao, G., Feng, Y., Chen, H., Feng, L., Zhao, J., Zhang, H., Chen, Y.Q., Wang, L. and Chen, W., 2011.** Biochemical characterization of the tetrahydrobiopterin synthesis pathway in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 157, 3059–3070.
- Wei, C.C., Crane, B.R. and Stuehr, D.J., 2003.** Tetrahydrobiopterin Radical Enzymology. *Chemical Reviews.*, 103, 23565-2383.
- Witter, K., Cahill, D.J., Werner, T., Ziegler, I., Rödl, W., Bacher, A. and Gütllich, M., 1996.** Molecular cloning of a cDNA coding for GTP cyclohydrolase I from *Dictyostelium discoideum*. *The Biochemical Journal*, 319, 27-32.
- Woo, H.J., Kang, J.Y., Choi, Y.K. and Park, Y.S., 2002a.** Production of Sepiapterin in *Escherichia coli* by Coexpression of Cyanobacterial GTP Cyclohydrolase I and Human 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3138–3140.
- Woo, H.J., Hwang, Y.K., Kim, Y.J., Kang, J.Y., Choi, Y.K., Kim, C.G. and Park, Y.S., 2002b.** *Escherichia coli* 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase ortholog encoded by *ygcM* has a new catalytic activity for conversion of sepiapterin to 7,8-dihydropterin. *FEBS Letters*, 523, 234-238.
- Yamamoto, K., Kataoka, E., Miyamoto, N., Furukawa, K., Ohsuye, K. and Yabuta, M., 2003.** Genetic engineering of *Escherichia coli* for production of Tetrahydrobiopterin. *Metabolic Engineering*, 5; 246–254.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2010.** Moleküler Biyoloji. Geliştirilmiş 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 510-512, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Efsun ÇELİK, 16/05/1989 tarihinde Ankara/Altındağ'da doğdu. İlköğretimini 1995/97 yıllarında Kastamonu/Merkez İlinde Şehit Şerife Bacı İlkokulu'nda, 1997/98 yılında Rize/Merkez İlinde Şevket Yardımcı İlköğretim Okulu'nda, 1998/2000 yıllarında Rize/Pekmezli Özel İlgı Koleji'nde burslu olarak, 2000/2003 yıllarında Rize/Merkez TOBB İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2007 yılında Rize/Merkez İlinde Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 10/09/2007 tarihinde başladığı lisans eğitimini 12/07/2013 tarihinde 19 Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nde tamamladı. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimi halen devam etmektedir. Rize Güçlü İdeal Dershanesi ve Rize İhtiyaç Akademi Kurumu'nda Biyoloji Öğretmeni olarak 2012/2014 yılı itibariyle ve Rize İMKB Teknik Endüstri Meslek Lisesi'nde ücretli Biyoloji Öğretmeni olarak 2014/2015 yılı tarihlerinde görev yapmıştır. Orta seviyede İngilizce bilen Efsun ÇELİK, evli ve 1 çocuk annesidir.