



T.C
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin Isıl Kararlı
Guanozintrifosfat Siklohidrolaz-I Geninin Klonlanması ve
Ekspresyonu**

Özlem HIZAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

RİZE 2013

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus flavithermus Bakterisinin Isıl Kararlı
Guanozintrifosfat Siklohidrolaz-I Geninin Klonlanması ve
Ekspresyonu

Özlem HIZAL

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2013

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

Anoxybacillus flavithermus Bakterisinin Isıl Kararlı Guanozintrifosfat Siklohidrolaz-I
Geninin Klonlanması ve Ekspresyonu

Özlem HIZAL

Yüksek Lisans

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.07.2013

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 25.07.2013

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Fatih YILMAZ



RİZE 2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda “*Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin Isıl Kararlı Guanozintrifosfat Siklohidrolaz-I Geninin Klonlanması ve Ekspresyonu” başlıklı yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, danışmanlığımı üstlenen hocam Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ, çalışmalarında yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen Doç. Dr. Cemal SANDALLI, Yard. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU ve Yard. Doç. Dr. Serdar ÜLKER başta olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ederim. Laboratuvar arkadaşlarım Araş. Gör. Ayşegül SARAL'a, Esma AKYILDIZ'a verdikleri destekler nedeniyle teşekkür ederim. Ayrıca gerek deneysel çalışmalarım gerekse manevi desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Pınar YEŞİLGİL ATASOY'a teşekkür ediyorum ve rahmetle anıyorum.

Ayrıca bu zamana kadar maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, RTEÜ-BAP birimi tarafından 2011.102.03.4 nolu proje ile desteklenmiştir.

Özlem HIZAL

Rize, 2013

ÖZET

***Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin Isıl Kararlı Guanozintrifosfat Siklohidrolaz-I Geninin Klonlanması ve Ekspresyonu**

Bu çalışma, termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine ait guanozin trifosfat siklohidrolaz I enziminin karakterizasyonunu içermektedir. Klonlanan *gchl* geni 603 baz çifti büyüklüğünde toplam 200 amino asidi kodlayan tek bir açık okuma dizinidir. GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşümünü katalizler. Enzim ekspresyonu pET28a(+) vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresinde 1 mM IPTG indüksiyonu ile tamamlanmış, saflaştırılması için 6xHis kuyruğuna özel Ni-NTA kolonu kullanılmıştır. Yapılan karakterizasyon sonucunda enzimin 24 kDa büyüklüğünde olduğu SDS-PAGE analizi ve amino asit sekansı hesaplamaları doğrulanmıştır. Enzim en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 65°C ve en uygun pH değeri ise 8,0 olarak belirlendi. Enzime ait kinetik verilere bakıldığında, V_{maks} 'ı $100,93 \pm 3,5$ nM/dk/mg protein ve K_m 'si $243 \pm 23,25$ µM olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus flavithermus*, GTP, GTP siklohidrolaz I, enzim karakterizasyonu.

SUMMARY

Cloning and Expression of Guanosin triphosphate Cyclohydrolase-I from *Anoxybacillus flavithermus*

This study was included the characterization of guanosin triphosphate cyclohydrolase I from thermophilic bacteria, *Anoxybacillus flavithermus*. We cloned the *gchI* gene that was 603 bp and its open reading frame has 200 amino acids. This enzyme catalyzed from GTP to dihydroneopterin triphosphate. We cloned into pET28a(+) expression vector with 6xHis tags and transform in *E. coli* BL21(DE3)pLysS host cells to express with 1 mM IPTG induction. We purified the enzyme with Ni-NTA resin. We determined that GCH-I is 24 kDa, its optimum pH is 8.0 and temperature is 65°C. Under optimal conditions, GCH-I exhibited a low enzymatic activity with K_m - and V_{max} - values of $243 \pm 23,25 \mu\text{M}$ and $100,93 \pm 3,5 \text{ nM/min/mg protein}$, respectively.

Key Words: *Anoxybacillus flavithermus*, GTP, GTP cyclohydrolase I, enzyme characterization.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. BH4 ve Sentezi	2
1.3. GCHI Enzimi.....	3
1.4. Termofilik Bakteriler ve Enzim Biyoteknolojisindeki Rollerini.....	4
1.5. <i>Anoxybacillus flavithermus</i>	6
1.6. Literatür Özeti.....	6
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	11
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri	11
2.2. Metod.....	12
2.2.1. Kaynak Bakterinin Kültüre Edilmesi ve Genomik DNA İzolasyonu.....	12
2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	13
2.2.3. <i>gchI</i> Geninin Tespiti ve Klonlanması.....	14
2.2.3.1. <i>gchI</i> Genine Ait Primerlerin Dizaynı ve PZR ile Tespiti	14
2.2.3.2. PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Yapıştırılması ve <i>E. coli</i> JM101 Konak Hücreye Aktarılması.....	15
2.2.3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi.....	20
2.2.3.4. <i>gch I</i> Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi.....	20
2.2.4. Genin Ekspres Edilmek Üzere Uygun Vektöre Aktarımı	20
2.2.5. <i>gchI</i> Geninin Ekspresyonu	24
2.2.6. Proteinin Saflaştırılması	24
2.2.6.1. Proteinin Ni-NTAKolon İle Saflaştırılması.....	24

2.2.6.2. SDS-PAGE Analizi	25
2.2.7. Proteinin Biyokimyasal Karakterizasyonu	26
2.2.7.1. Enzim Aktivitesine pH Etkisi	27
2.2.7.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	27
2.2.7.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	27
3. BULGULAR	28
3.1. Kaynak Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu ve <i>gchI</i> Geninin PZR ile Tespiti.....	28
3.2. PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Klonlanması.....	28
3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi	29
3.4. <i>Afgch I</i> Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi	29
3.5. <i>AfgchI</i> Geninin Eksprese Edilmek Üzere pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	30
3.6. Proteinin Ni-NTA Kolon ile Saflaştırılması.....	32
3.7. Proteinin Biyokimyasal Karakterizasyonu	33
3.7.1. Enzim Aktivitesine pH Etkisi	33
3.7.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	34
3.7.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	34
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	36
5. ÖNERİLER	38
6. KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. GTP'den BH4 biyosentezini gösteren yol.....	2
Şekil 2. GCHI enziminin GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşüm mekanizması.	4
Şekil 3. pGEM-T Easy vektör sistemi ve klonlama bölgesi.....	17
Şekil 4. Ekspresyon için kullanılan pET28a(+) vektörü ve klonlama bölgesi	23
Şekil 5. <i>A. flavithermus gch I (AfgchI)</i> geninin PZR sonucu	28
Şekil 6. <i>AfgchI</i> genini taşıyan pGEM-T/Easy plazmidinin <i>NcoI</i> ve <i>XhoI</i> enzimleri ile kesimi	29
Şekil 7. <i>AfgchI</i> geninin klonlama sonrası orijinal <i>A. flavithermus</i> WK1 <i>gchI</i> sırası ile karşılaştırılması	30
Şekil 8. pET28a(+)/ <i>AfgchI</i> 'nin kesim ile doğrulanması.....	32
Şekil 9. Proteinin Ni kolon ile saflaştırılmasının SDS-PAGE analizi.....	33
Şekil 10. Enzime ait pH'ya bağlı aktivite grafiği.	34
Şekil 11. Enzime ait sıcaklık-bağıl aktivite grafiği.	34
Şekil 12. GCH-I enzimine ait aktivite grafiği.....	35

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Mikroorganizmaların sıcaklık ihtiyacına göre sınıflandırılması	5
Tablo 2. <i>A. flavithermus</i> WK1 bakterisine ait gchI genine ait DNA baz sırası.....	14
Tablo 3. Kullanılan SDS-PAGE bileşenleri	26
Tablo 4. AFGCHI enzimine ait amino asit sırasının NCBI verilerine göre protein-BLAST karşılaştırmasının benzerlik sonuçları	31

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
<i>Af</i>	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
Amp	Ampisilin
Bp	Baz çifti (base pairs)
dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FKU	Fenilketonüri
GCHI	Guanozin trifosfat siklohidrolaz-I
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
GTP	Guanozin trifosfat
HPA	Hiperfenilalanemia
IPTG	İzopropiltiyo-beta-galaktozid
Kan	Kanamisin
Kb	Kilobaz
LB	Lauria Bertani
LBA	Lauria Bertani Agar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
OD	Optik yoğunluk (optic density)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilediamin
U	Ünite
UV	Ultraviolet
BH4	Tetrahidrobiopterin
pDNA	Plazmid DNA

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde fenilketonüri (FKÜ veya 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 edilen bir hastalıktır (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 hastalığa sahip olarak doğmaktadır yani Türkiye'de her 20–25 kişiden biri bu hastalığı taşımaktadır (URL-1).

FKÜ ya da HPA oluşumunun primer nedenlerinden biri, tetrahidrobiopterin (BH4) metabolizması bozukluklarıdır (Kure vd., 1999, Muntau vd., 2002, Spaaen vd., 2001, URL 1 ve 2, 2006). Bu bozukluklar, dihidropteridin redüktaz, GCHI, pterin–4–8-karbinolamin dehidrataz ve 6-pirovil tetrahidropterin sentaz (*ptps*) defekti olarak da tanımlanabilir ve karaciğer, böbrekler, beyin ve kan dokusu etkilenir (Blauve Burgard,2005). Tetrahidrobiopterin metabolizması bozukluğunun nedeniyle oluşan hastalıkların genel görülme sıklığı dünyada % 1–3 iken bu oran Türkiye'de % 15'tir (URL 1, 2006). Bu sonuç, ülkemizde FKÜ' nün oldukça sık rastlandığını göstermektedir.

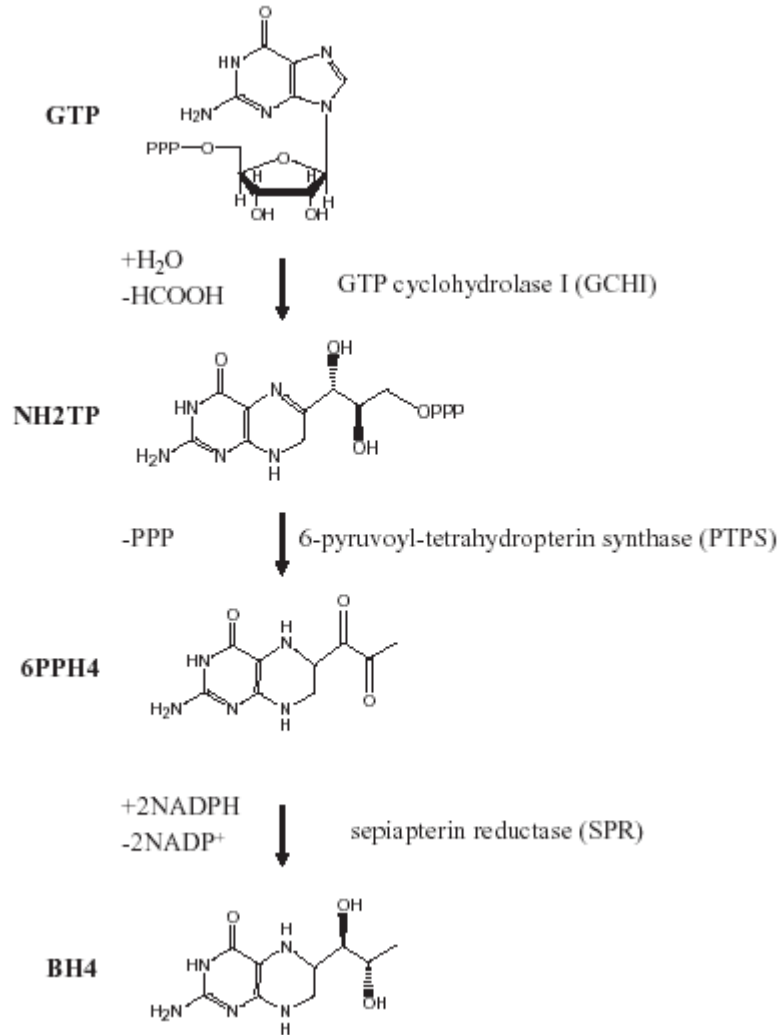
İlgili hastalıkların tedavilerinde kullanılan yöntemlerden en önemlisi ve yaygını, BH4 metabolizmasının bozukluğundan kaynaklandıklarından dolayı hastaya dışarıdan BH4 yüklemesi yapmaktır (URL 1 ve 2, 2006; Blau vd., 2001; Blau ve Burgard, 2005; Kure vd., 1999; Muntau vd., 2002; Spaaen vd., 2001). BH4'e bağımlı olan hastalıklardan FKÜ 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).

BH4 sentezinde, döngüde veya fenilalanin hidroksilaz enzimindeki bir eksiklik veya kusur, hiperfenilalanineminin artmasına yani fenilketonüriye neden olur (Demos vd., 2005; Blau ve vd., 2001). Elde bulunan verilere göre konjenital hastalıklarda BH4'e

bağımlı kusurların % 58'i *ptps*, % 4'ü *gchl* ve % 0,9'u ise *spr* genlerindeki kusurlardan kaynaklanmaktadır (Ponzzone vd., 2004).

1.2. BH4 ve Sentezi

Hücreler BH4'ü iki farklı yol ile oluştururlar. *De novo* biyosentez yolunda, öncü olarak GTP kullanılır, *Salvage* yolundaysa, önceden ortamda var olan dihidropterinler kullanılır. *De novo* biyosentezi yolu üç ana enzim ile gerçekleşir ve *in vivo* ve *vitro* şartlarda da durum aynıdır. Bu enzimler sırasıyla, GCHI, PTPS ve SPR'dir. Bu enzimlerin ilk ikisinden sorumlu genlerde görülen genetik kusurlar hayati öneme sahip hastalıklar olarak karşımıza çıkar. GTP'den BH4 biyosentezi, Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. GTP'den BH4 biyosentezini gösteren yol (Yamamoto vd., 2003)

1.3. GCHI Enzimi

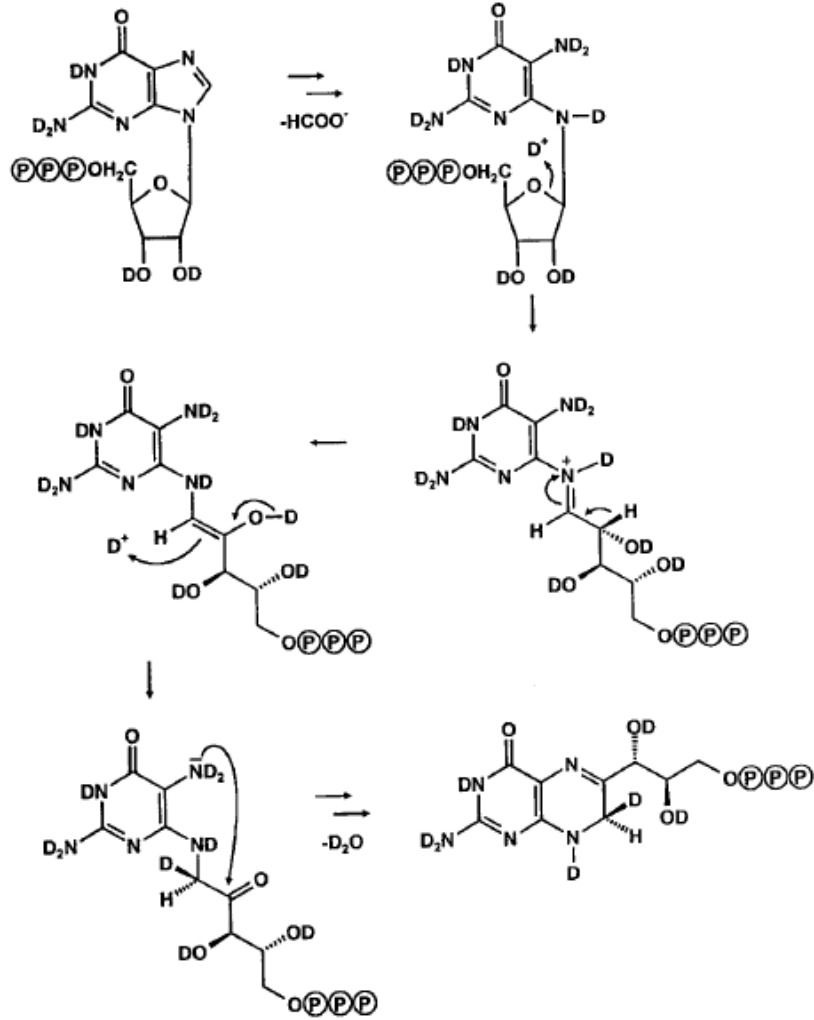
GCHI enzimi (EC: 3.5.4.16), BH4 biyosentezinin öncü enzimidir (Blau ve vd., 2001). Birçok farklı organizmadan elde edilmiş (bakteri, mantar, sinek, tavuk, insan) ve incelenmiştir. Enzim, GTP'yi dihidroneopterin trifosfata dönüştürür (Şekil 2). GCHI, 30 kbp büyüklüğünde bir enzimdir. İnsanda tek kopya halinde ilgili genden kodlanır. 250 aminoasit içeren enzim, diğer canlılarda da benzerlik gösterir (Blau vd., 2001; Woo vd., 2002). GCHI'in aktivitesi, memelilerde büyük oranda interferon-gama tarafından stimüle edilir (Schoedon vd., 1986).

Günümüze kadar konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, biopterin ve tetrahidrobiopterinlerin FKÜ üzerine etkisi, hastalıkların görülme sıklıkları ve tedavide BH4 kullanımı üzerine yoğunlaşmaktadır (Kure vd., 1999; Koch vd., 2002; Trefz ve Blau, 2003; Pey vd., 2004; Koch vd., 2005; Muntau vd., 2002; Liu vd., 2001; Blau vd., 2001; Blau ve Burgard, 2005; Demos vd., 2005; Özer, 2004; Ponzzone vd., 2004; URL 1 ve 2, 2006).

BH4 biyosentezinde rol oynayan enzimlerden ağırlıklı olarak çalışılan, sentez yolunun ilk basamağından sorumlu olan GCHI enzimidir. Yapılan çalışmalardan biri GCHI'in metabolizma üzerindeki etkisi ve hastalıkların ortaya çıkışındaki rolü (Kaindl vd., 2005; Blau vd., 2001; Blau ve Burgard, 2005; Bauer vd., 2002), diğeri klonlama, ekspresyon ve kristallendirme ile yapısının aydınlatılması (Hynes vd., 2003; Witter vd., 1996; Serova vd., 2004; Suzuki vd., 2004; Woo vd., 2002) ve bir diğeri mutasyon çalışmalarıdır (Garavaglia vd., 2004; Kikuchi vd., 2003). GCHI'e nazaran PTPS ve SPR enzimleri hakkında yapılan çalışmalar nispeten daha azdır. PTPS üzerine genel olarak hastalıkların tanımlanmalarını içeren çalışmalar göze çarpmasına rağmen, GCHI'ya nazaran az da olsa karakterizasyon çalışmaları (Demos vd., 2005; Leitner vd., 2003; Woo vd., 2002) yer almaktadır. SPR çalışmalarında ise, SPR bozukluklarının neden olduğu hastalık tanımlamalarında ağırlık varken az da olsa karakterizasyon çalışmalarına rastlamaktayız (Blau vd., 2001; Elzouk vd., 2002; Fujimoto vd., 2003; Steinberger vd., 2004; Tiefenbacher vd., 2003; Woo vd., 2002).

BH4'ün kimyasal olarak sentezinin oldukça zor olması, kullanılan yöntemlerin karmaşıklığı, birçok sentetik basamağın uygulanması, pahalı materyallerin kullanımı ile maliyeti oldukça yüksektir. BH4 ün kimyasal sentezine alternatif olarak hedef genleri kullanarak mikroorganizmada üretimi gösterilebilir. Bu konuyla ilgili olarak yapılan tek çalışma Yamamoto vd. (2003) tarafından yapılmıştır. Çalışmada *ptps* ve *spr* genleri

klonlanmış ve *gchI* yerine homolog bir gen ile birlikte değerlendirilmiştir. Gen kaynakları PTPS ve SPR için fare ve GCHI analoğu için (*mtrA*) *B. subtilis* kullanılmıştır. Oluşturulacak rekombinant bir plazmit aracılığıyla bu işlem daha az maliyetle başarılabilir.



Şekil 2. GCHI enziminin GTP'den dihidroneopterin trifosfat dönüşüm mekanizması (Bracher vd., 1998).

1.4. Termofilik Bakteriler ve Enzim Biyoteknolojisindeki Rollerini

Mikroorganizmalar, yaşam sıcaklığı ihtiyacına göre genel olarak mezofiller, psikrofiller ve termofiller olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Tablo 1). Termofilik bakteriler ilk kez 1879 yılında Miquel tarafından izole edilmiştir. Miquel, toprak, toz, dışkı, kanalizasyon ve nehir çamurundan izole ettiği bakterilerin 72°C'ye kadar yaşayabildiğini göstermiştir. Daha sonraları bu oda sıcaklığında yaşayamayan fakat yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen bakteriler termofilik bakteriler olarak adlandırılmıştır.

Tablo 1. Mikroorganizmaların sıcaklık ihtiyacına göre sınıflandırılması (Arda, 2000'den değiştirilerek)

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C	
Psikrofilik	(-5)-5	15-30	19-35	
Mezofilik	10-15	30-45	35-47	
Termofilik	Fakültatif	37	45-55	70
	Zorunlu	40-45	55-75	60-80
	Ekstrem	60	75-80	85-110

Genel anlamda termofilik organizmalarında içerisinde bulunduğu ekstremofilik organizmalar, volkanlar veya gayzerler gibi yüksek sıcaklık kaynaklarından, buzul kütleleri gibi oldukça düşük sıcaklığa sahip habitatlara kadar, tuz ve soda gölleri gibi yüksek tuz konsantrasyonlarına ve çok düşük ya da çok yüksek pH değerlerine kadar farklı ekstrem şartlarda yaşayabilmektedirler.

Bu canlılar, kendi DNA, protein ve lipid yapılarını bu ortamlarda rakatlıkla yaşayabilecekleri şekilde adapte etmişlerdir. Örneğin termofilik organizmaların hücre membranlarında doymuş yağ asitleri yer alır. Bu sayede normal ortamda yaşayan mezofiliklere göre daha fazla hidrofobik ortam oluşturarak yüksek sıcaklıklarda hücre membranı yapısını dolayısıyla hücre yapısını istikrarlı yapar. Termofilik organizmaların ayrıca sahip oldukları proteinler de bu sıcaklıkta hem denatüre olmamasına hem de aktif olmalarına uygundur. Bu organizmalardan elde edilen enzimler mezofiliklerden elde edilenlere göre daha dayanıklıdır (Güven, 2011, Haki and Rakshit, 2003, Kristjansson and Asgeirsson, 2002).

Günümüzde biyoteknolojik uygulamalarda termofilik organizmalardan oldukça sıklıkla yararlanılmaktadır. Termofilik bakterilerde bulunan enzimlerin sert endüstriyel uygulamalara dayanıklılığı tercih edilen bir unsurdur. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- Reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi,
- Genel mezofiliklerin ortamı kontamine etme riskinin azalması,
- Organik bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmasıyla bileşiğin ortamdaki mevcudiyetinin artışı,
- Genel denatüran şartlara ve ajanlara karşı daha dayanıklı olmaları,

- Viskozitenin azalması sebebiyle reaksiyon hızlarının artması,
- Substratların difüzyon katsayındaki artış sebebiyle reaksiyon hızlarının artması,
- İstenmeyen yan ürün oluşturmamaları,
- Substratların ve ürünlerin çözünürlüklerinin arttırması,
- Endotermik reaksiyonlarda tercih edilen denge değişimleri oluşturularak daha fazla verimlilik elde edilmesi.

Yukarıda sıralanan özelliklerinden dolayı ısı kararlı enzimlerin, ısı kararlılığın ve ısı aktivitenin anlaşılabilmesinde ve protein mühendisliği için modeller oluşturmaktadır. Bu gibi nedenlerden ötürü bu tip bakterilerin enzim kaynağı olarak değerlendirilmesi kuvvetle önerilmektedir (Andrade vd., 1999, Güven, 2011, Hartley vd., 2000, Taylor vd., 2004, URL-4).

Termofilik bakterilerden elde edilen termostabil enzimlerin veya termozimlerin başında, galaktozidazlar, amilazlar, pullunazlar, kitinazlar, ksilinazlar, pektinazlar ve sellülazlar gelmektedir. Bu adı anılan enzimler özellikle gıda, farmasötik, kimya ve çevre biyoteknolojisi alanında kullanıma sahiptirler (Güven, 2011).

1.5. *Anoxybacillus flavithermus*

Anoxybacillus flavithermus bakterisi fakültatif anaerobik, alkalifilik, orta derecede termofilik, sporlu bir bakteridir. Süt tozu ve jelatinin en önemli kontaminasyon aracıdır. Tip suşu olan WK1 (DSM 21510), Yeni Zelanda'da bulunan Wairakei jeotermal kaynağında yer alan atık su kaynaklarından izole edilmiştir.

Gram-pozitif, hareketsiz çubuk şeklinde olup hücre membranında karetenoid pigment biriktirmesinden dolayı koyu sarı renkte kolonizasyona sahiptir. Büyüme sıcaklığı 37-66°C (en iyi 62°C) ve pH aralığı 8,0-10,5 (optimum sıcaklık 9,5-9,7)'dir.

Karbon ve enerji kaynakları d-glikoz, sakkaroz, d-fruktoz, d-trehaloz ve nişastadır. Genom bilgisine göre Bacillaceae ailesinin diğer üyeleri ile karşılaştırıldığında *Anoxybacillus/Geobacillus* dalında yerleşiktir (Pikute vd., 2000; Saw vd., 2008).

1.6. Literatür Özeti

Bugüne kadar GCH-I enzimi ile ilgili olarak yapılan çalışmaları enzim karakterizasyonu ve bağlı bulunduğu metabolik hastalıkların görülme sıklıklarıyla ilgili

çalışmalar olarak ayırabiliriz. Çalışmamız gen klonlama ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu içermektedir.

GTP siklohidrolaz I geni ilk defa Yim ve Brown tarafından 1976 yılında *E. coli* bakterisinden klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmaya göre, doğal hali 210 kDa ağırlığındaki proteinin SDS-PAGE'deki analizinde ise tek banda karşılık gelen 25,5 kDa olduğunu göstermişlerdir. Bu aslında proteinin aynı büyüklükte 8 alt üniteye sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmada enzimin K_m değeri 0,02 μM , ATP ve dGTP'nin asıl substrat olan GTP ile yarışabildiği ve yarışmalı inhibitör olduğu belirlenmiştir. Enzimin yarı ömrünün 82°C'de 7 dakika olduğu da belirtilmiştir.

Suzuki vd. 1979 yılında yaptıkları çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 8005 bakterisinin GCH-I enzimini karakterize etmişler ve optimum 60-65°C lik ısıda ve 8,0-8,4 pH aralığında aktivite gösterdiğini, K_m değerinin ise 980 μM olduğunu tespit etmişlerdir.

Hatakeyama vd. (1989), fare GTP siklohidrolaz I enziminin SDS-PAGE analizinde 30 kDa olduğunu ve V_{max} 'ının ise 45 nmol/dakika/mg protein olduğunu göstermiştir. KCl konsantrasyonuna bağı olarak kinetik özelliği değişmeksizin yarılanma ömrünün uzadığını belirtmiştir.

Cha vd. (1991), fare karaciğerinden elde ettikleri GCH-I enzimini karakterize etmişlerdir. 55,7 kDa ağırlığındaki enzimin optimum aktivitesinin 60°C'de ve pH 8,0-8,5 de olduğu K_m değerinin 17,3 μM olduğunu göstermişlerdir.

Yine Hatakeyama vd. (1991), fare GTP siklohidrolaz I genine ait cDNA'yı klonlayarak sekans bilgisine ulaşmıştır. Buna göre 1,2 kilobazlık tek bir mRNA'dan üretildiğini bulmuştur. cDNA'nın ise 1024 baz çifti büyüklüğünde olduğunu belirtmiştir.

Babitzke vd. (1992), *Bacillus subtilis* tarafından kodlanan GTP siklohidrolaz I *mtrAB* operonunu çalışmışlardır. Operonda yer alan *mtrA* geninin GCH-I enzimini kodladığını, ikinci enzim olan *mtrB*'nin ise triptofan genlerinin transkripsiyonal atenuasyonundan sorumlu olduklarını bulmuşlardır.

Schoedon vd. (1992), *E. coli* GCH-I'i üzerine yaptıkları araştırmada farelerde bulunan enzim ile % 42 benzerlik sergilediğini, GTP yanında UTP'yi de sybstrat olarak kullanabildiğini (K_m 'leri 100 ile 110 μM) ve aktivitesini Michaelis-Menten Eğrisi yerine sigmoidal olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca tetrabiopterinin sentezinde yer alan bu ilk enzimin, son ürün olan tetrabiopterin sayesinde 100 μM 'de % 50 inhibe olduğunu göstermişlerdir.

De Saizieu vd. (1995), *Bacillus subtilis* GTP siklohidrolaz I genini PCR ile yakaladıktan sonra ekspres etmişler ve enzimin, 100 mM potasyum varlığında 4 μ M K_m değerine sahip olduğunu ve aktivitenin 80 nmol/dakika/mg protein olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca GTP siklohidrolaz I seviyesinde kalsiyum iyonlarının ve UTP'nin rolü olabileceğini de önermektedirler.

Nar vd. (1995), *E. coli* GCH-I'i üzerine yaptıkları araştırmada enzimin homodekamer yapıda olduğunu göstermişlerdir. Bu topoloji çalışmasında enzimin her birinin 10 Å derinlikte cebe sahip 10 eşit büyüklükte aktif merkezinin yer aldığını gösterdiler. İmidazol zincirinin yıkılmasında, His-179 amino asidi tarafından N7'nin protonlandığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca enzimin yapısındaki Cys-110/Cys-181 bağlanmasının da reaksiyonla alakalı olabileceğini de ileri sürmüşlerdir.

Witter vd. (1996), *Dictyostelium discoideum* (tek hücreli cıvık mantar) üzerinde yaptıkları araştırmada 855 baz çiftlik cDNA'yı klonlamış ve mRNA'nın 232 amino asitlik GCH-I enzimini ürettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca 101 baz çiftlik introna sahip olduğunu kalan ekzonların baz sırasının ise insan GCH-I'ine % 47 ve % 49'lük bir benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. *E. coli*'de eksprese edilen genin 68 kDa büyüklükte bir protein ürettiğini ve maksimum aktivitesinin 60°C'de görüldüğünü dolayısıyla ısıya dayanıklı bir enzim olduğunu kanıtlamışlardır.

Yoo vd. (1998) *Streptomyces tubercidicus* GCH-I enzimini karakterize etmişler ve enzimin doğal halinin 230 kDa büyüklükte olduğunu 58 kDa'luk 4 alt birimden oluştuğunu göstermişlerdir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum 7,5-8,5 pH aralığında ve 40-42°C 'de aktif olduğunu, K_m değerinin 80 μ M, v_{max} değerinin ise 90 nmol/dakika/mg protein olduğunu tespit etmişlerdir.

Auerbach vd. (2000), insan ve *E. coli* kaynaklı GCH-I enziminin aktivasyonunda çinkonun önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Enzimin substratı olan GTP'nin imidazol halkasındaki 8. karbon atomuna nükleofilik atağında rol oynadığını açıklamıştır.

Lee vd. (2002), yine *E. coli* GCH-I enziminin oligomerizasyonunu karakterize etmiş ve beş dimerli yapıdan onlu yapıya kadar enzim kompleksinin oligomerizasyonunda Lys136, Arg139 ve Glu152 nolu amino asitlerinin rol oynadığını bulmuşlardır.

Woo vd. (2002), bir siyanobakteri olan *Synochocystis* sp. PCC 6803 suşunun GTP siklohidrolaz I geni ile *E. coli* bakterisine ait 6-piroviltetrahidropterin sentaz genini yine *E. coli*'de eş zamanlı olarak eksprese ederek sepiapterin üretimini başarmışlardır.

He ve Rosazza (2003), *Nocardia sp.* suşlarını kullanarak yaptığı çalışmada GCH-I enziminin BH4 biyosentezinde nitrik oksit sentaz için gerekli kofaktör olduğunu göstermişlerdir. Enzimin optimum 7,8 pH da ve 56°C'de aktif olduğunu, potasyum iyonu varlığında aktivitesinin arttığını fakat kalsiyum, bakır, çinko ve civa iyon konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitenin azaldığını belirtmiştir. DAHP'ın besiyerindeki NO₂⁻ ve NO₃⁻ konsantrasyonunu arttırarak aktiviteyi inhibe ettiğini ancak BH4'ün bu etkiyi kırıcı fonksiyonu bulunduğunu açıklamıştır.

He vd. (2004), *Nocardia sp.* NRRL 5646 de yaptığı araştırma neticesinde 684 nükleotit büyüklüğe sahip 227 amino asitlik bir protein kodlayan *gchI* genini belirlemişlerdir. 24,5 kDa ağırlığındaki enzimin, dekamer olduğu ve doğal halinin 0,071 nmol/saat/mg protein aktiviteye sahip olduğu rekombinant olarak tasarlanmış halinin ise (*E. coli* BL21(DE3) hücresinde pHAT227 plazmidi ile) 52,86 nmol/saat/mg protein olduğu tespit etmişlerdir. Rekombinant enzimin doğal enzime göre 744 kat daha fazla spesifik aktivitesinin bulunduğunu göstermişlerdir. Enzimin *K_m* değerinin ise 7,0 µM olarak tespit etmişlerdir.

Kolinsky ve Gross (2004), GCH-I ve GTPCH Feedback Regulatory Protein'in (GFRP) kaynağı olarak sıçan aort düz kas hücrelerinden elde ettiği cDNA kütüphanesini kullanarak GTP siklohidrolaz I'in inhibisyonu üzerine 2,4-diamino-6-hidroksipirimidin (DAHP) etkisini göstermiş ve prototipik inhibitör olarak adlandırmışlardır. DAHP'ın GTPCH üzerine direk etkide bulunmadığını ancak GFRP üzerine etki ederek biyosentez mekanizmasını inhibe ettiğini bulmuştur.

Suzuki vd. (2004), *E. coli* GCH-I enzimi kullanarak yaptıkları çalışmalarında Mg iyonu olmaksızın substrat olarak kullanılan GTP'nin konsantrasyonuna bağlı olarak aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Mn⁺², Co⁺² ve Zn⁺² gibi Mg⁺² iyonunun da metalsiz GTP'nin substrat olarak kullanıldığı durumlarda iyon konsantrasyonuna bağlı olarak inhibisyon gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır. Çinkonun olduğu durumlarda dekamerik protein katlanmasının olduğunu tekrar göstermişlerdir.

Tanaka vd. (2005), bir hipertermofil olan *Thermus thermophilus* kaynaklı GTP siklohidrolaz I geni üzerinde yaptıkları yüksek çözünürlüklü X-Ray kristallendirme çalışması ile reaksiyon mekanizmasına ışık tutmuşlardır. Buna göre substrat olarak kullandıkları 8-oxo-GTP ve 8-oxo-dGTP'nin enzim tarafından 2,0 ve 1,8 Å yakınlıkta ile tutulduğunu ayrıca substratsız formunda 2,2 Å rezolüsyona sahip olduğunu göstermişlerdir. Substratı yakalayan grupların ise cys108, His111 ve Cys179 amino asitleri

olduğunu keşfetmişlerdir. Ayrıca, *Thermus thermophilus* kaynaklı GTP siklohidrolaz I amino asit sırasının *E. coli*, fare ve insan kaynaklı olanlar ile benzer korunmuş bölgelere sahip olduğunda göstermişlerdir.

El Yacoubi vd. (2006) yaptıkları çalışmada *E. coli* bakterisine ait GCH-I enzimini kodlayan *folE* genine ortolog olan *Thermotoga maritima*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baylyi* ve *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerine ait COG1469 ailesi üyelerini PCR yolu ile klonladıktan sonra ekspres etmiş ve hem kinetik karakterizasyonunu hem de diğer türlerdeki ortologları ile biyoinformatik karşılaştırmasını ele almıştır. Buna göre, COG1469'nin 32 farklı organizmanın sahip oldukları GCH-I proteinini kodlayan genlerin dâhil oldukları FolE, FolK ve FolP ile ortolog oldukları ve folat biyosentez genlerine dâhil olduğunu göstermiştir. İlgilenilen proteinlere ait amino asit sekanslarının da ortak bölgeler içerdiği ve enzimatik olarak 2,3-5,3 nmol/dakika/mg protein GCH-I aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Grochowski vd. 2007 yılında yayınladıkları çalışmalarında bir termofilik arkebakteri olan *Methanococcus janaschii* MJ0775'in GCH-I enzimini karakterize etmişlerdir. *E. coli* BL21 konağında yapılan ekspresyon sonucunda enzimin 37 kDa'luk iki alt birimden oluşan 84 kDa büyüklükte bir homodimer olduğunu, optimum aktivitesinin pH 6,5 ve 70°C'de gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzimin V_{max} 'ının 0,003 μ M/dakika/mg protein olduğunu da göstermişlerdir.

Chettri vd. (2008), *E. coli* bakterisine ait GCH-I enzimini kodlayan yaklaşık 670 baz çifti büyüklüğündeki *folE* genini pET43a(+) ekspresyon vektörüne klonlamıştır. Burada 13 *E. coli* suşunu karşılaştırmış ve bu gen kullanılarak bir dendrogram yapılmıştır. Suşların hepsinde de yaklaşık olarak 26 kDa'luk protein SDS-PAGE ile belirlenmiştir.

Sankaran vd. 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında, *B. subtilis* GCH-IA izozimi olan GCH-IB enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. *E. coli* B834(DE3) bakterisinde ekspreslenen enzimin GCH-IA homodekamerik yapısının aksine homotetramerik olduğu, pH 8,0 da 37°C'deki K_m 'si 9,87 μ M olarak bildirilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

Çalışmamız sırasında kullanılan kimyasal maddeler, enzimler, gerekli sarf malzemeler, gen aktarımında kullanılan plazmit vektörleri, konak bakteri suşları ve çeşitli gen çoğaltım çalışması için gerekli primerler ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve ilgili bilgileri şu şekildedir. β -merkaptotanol (Merck, 805740), agaroz type II medium EEO (Biomax, 124543PR), agar (Merck, VM259713), akrilamid (Sigma, A8887), amonyum persülfat (Merck, A734116), amonyum sülfat (Sigma, A4418), ampisilin (AppliChem, A0839.0100), bromofenol mavisi (Sigma, B5525), bisakrilamid (Sigma, M2022), CaCl_2 (Merck, 137923), Coomassie Brilliant Blue G (Fluka, 27815), Coomassie Brilliant Blue R (Fluka, 27816), dNTP (Promega, U120-4B), EDTA (Merck, K90262021), etanol (Sigma, A3678-1000), etidyum bromür (Sigma, E7637), glasiyel asetik asit (Merck, K19581956), gliserol (Riedel-deHaën, 15524), glisin (Sigma, G7126), glukoz (Roche, 1929526), HEPES (Sigma, H0891), Taq DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas), IPTG (Sigma, I5502), izopropanol (Riedel-deHaën, 24137), KCl (Merck, K23759135), KH_2PO_4 (AppliChem, A2945,100), maya özütü (Sigma, Y4000), MES Na tuzu (AppliChem, A3101.0025), metanol (J. T. Baker, TBF0196396 1499), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, TA682332), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED, Janssen Chimika, 13.84571), Na_2CO_3 (Merck, A339898), Na_2HPO_4 (Merck, A664174), NaCl (AppliChem, A2942,5000), *NcoI* restriksiyon enzimi (New England Biolabs), *XhoI* restriksiyon enzimi (New England Biolabs), pepton (Oxoid, L37), SDS (Amresco, 0227), sodyum asetat (Merck, TA404965), T4 DNA ligaz enzimi (Promega, M1804), T4 DNA ligaz tamponu (Promega, C1263), tripton (Merck, V441613949), Tris-HCl (Sigma, T1503), X-gal (AppliChem, A1007.0005), O'RangeRuler 100+500bp DNA Ladder (MBI Fermentas, SM0653).

Çalışmada kullanılan besi yerleri, içeriklerine göre laboratuarda hazırlandı. Kullanılan besi yerleri, LB (Lauria-Bertani) besi yeri litrede 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl içerecek şekilde saf su ile hazırlandı ve pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında 15 dakika tutularak steril edildi. LBA besi yeri 1 litre LB besi yerine 12 g agar ilavesiyle aynı şekilde hazırlandı ve steril edildi. Kullanılan

bir diğerk besiyeri olan SOC besiyeri ise litrede % 2 tripton, % 0,5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glukoz olacak şekilde saf su ile hazırlandı ve pH'sı 7,4 olacak şekilde hazırlandı. Otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında 15 dakika tutularak steril edildi.

Çalışmada kullanılan kitler ve ilgili bilgiler şu şekildedir. Genomik DNA izolasyonu için Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120), elde edilen PCR ürünlerinin klonlama ve DNA dizi analizi uygulamaları için saf olarak eldesinde PCR QIAquick Purification Kit (Qiagen, 28106) ve DNA Extraction Kit (MBI Fermentas, K0513), çalışmada elde edilen rekombinant plazmit DNA'larının izolasyonları için Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330), PCR ürünlerinin klonlanması amacıyla pGEM-T/Easy TA Cloning Kit (Promega, A1360), rekombinant proteinin saflaştırılmasında MagneHis™ Protein Purification System (Ni-NTA Resin, Promega, V8500) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan vektörler ve bunların aktarımında kullanılan bakteri suşları şunlardır. PCR ürünlerinin klonlanması için TA klonlama vektörü olarak pGEM-T Easy (Promega, A1360), bu plazmidin transformasyonu ve çoğaltımı için *E. coli* JM101 (NEB, E4106S), GCHI proteininin (enzimin) üretilebilmesi amacıyla ekspresyon vektörü olarak pET28a(+) ve bu vektörün aktarımı ve gen ekspresyonunu sağlamak için *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega, P9811) konak hücre olarak kullanıldı.

2. 2. Metod

2. 2. 1. Kaynak Bakterinin Kültüre Edilmesi ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan *A. flavithermus* bakterisine ait -20°C'de saklanan gliserol stoğundan 5 ml sıvı LB (Lauria Bertani, 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 5 g NaCl olarak hazırlandı, pH 7,0'a ayarlandıktan sonra 121°C'de 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklav ile steril edildi) besiyerine ekim yapıldı ve gece boyunca 55°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kültür 14000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldü ve elde edilen pelletten Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile aşağıdaki şekilde kullanılarak genomik DNA (gDNA) izole edildi.

- Çöktürülen bakteri pelleti 480 µL 50 mM EDTA (pH 8,0) ile çözüldü,
- Elde edilen süspansiyona 120 µL lizozim (10 mg/mL) eklendikten sonra 60 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi,

- 2 dakika boyunca 14000 rpm de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı,
- Pellete 600 µL Nuclei Lysis Solüsyonu eklendi ve pipetle nazik bir şekilde çözüldü,
- 5 dakika boyunca 80°C’de inkübe edildikten sonra oda ısısına inene kadar beklendi,
- Karışıma 3 µL RNaz solüsyonu ilave edildi ve 1 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi,
- Oda sıcaklığına kadar soğutulan süspansiyona 200 µL Protein Precipitation Solution eklendi ve hafifçe vortekslendi,
- 5 dakika buzda inkübe edilen süspansiyon 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi,
- Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 600 µL oda ısısına sahip isopropanol eklendi ve karıştırıldı,
- Tekrar 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant döküldü,
- Pellet üzerine 600 µL oda ısısında % 70 etanol eklendi, alt üst edildikten sonra tekrar santrifüjlendi,
- Süpernatant kısmı atıldıktan sonra 37°C’lik etüvde kalan rezidüel etanolün tamamen uzaklaşması beklendi,
- Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellete 100 µL Rehydratation Solution eklendi, hafifçe tilt edildikten sonra gDNA’nın daha iyi çözünmesini sağlamak için 1 saat boyunca 65°C’de ve sonrasında da gece boyunca 4°C’de inkübe edildi.
- İzolasyon sonrası elde edilen gDNA, % 1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.
- İzole edilen gDNA, herhangi bir işleme tabi tutulana kadar -20°C’de saklandı.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışma boyunca izole edilen genomik ve plazmit DNA (pDNA) örneklerinin, restriksiyon endonükleaz kesimleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonuçlarının görüntülenmesinde agaroz jel elektroforezi tekniği uygulandı.

Jel elektroforezinde genellikle % 0,7'lik agaroz oranı tercih edildi. Öncelikle istenen hacimde uygun miktarda agaroz (Type II, Medium EEO, Sigma) tartılıp bir erlene dökülerek üzerine istenen hacimde tampon % 1 TAE tamponu (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Asetik asit, 2 mM EDTA içerek şekilde 5X stok olarak hazırlandı) eklendi ve mikrodalga fırında kaynatılarak polimerleştirildi. Elle tutulacak kadar (yaklaşık 45-50°C) soğutulan jel solüsyonuna son hacimde 0,5 µg/ml etidyum bromür (stok 10 mg/ml) eklenerek kabarcık oluşturmuyacak şekilde istenen jel tepsinine döküldü.

Jele uygulanacak DNA örneğinden 5 µL alınıp 1 µl yürütme boyası (% 0,25 bromofenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol, % 30 gliserol) eklenerek pipetör yardımıyla kuyulara yüklendi. Jelin hazırlandığı tampondan içeren jel tankına konularak yürütme 150 V akım ile yapıldıktan sonra, Jel Görüntüleme Sistemi (UVP) yardımıyla UV ışıktaki görüntü alındı ve ayrıca bilgisayara kaydedildi.

2. 2. 3. *gchI* Geninin Tespiti ve Klonlanması

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

gchI geninin PZR ile yakalanması için kullanılacak olan primerler, "Direct Submission" olarak NCBI Gen Bank'a CP000922 Accession Numarası (URL 4, 2010) ile kayıt altında olan gen sırası kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 2. *A. flavithermus* WK1 bakterisine ait *gchI* genine ait DNA baz sırası (URL- 4, 2010)

```
5' -ATGCTAGAATCGGATTACGTGAAGTTGAATGCTAGGAGGATGAACCAAATGAATGTACAACAAATTGAAC
AAGCGGTTTCGCTTAATTTTAGAAGCGATTGGCGAAGATCCAAATCGTGAAGGGTTGCTCGATACACCGAAGCG
GGTAGCAAAAAATGTATGCGGAAGTGTTCCTGTTTAAACCGAAGATCCGAAAGTGCACCTTGCAAACGGTATTT
AGTGAAGACCATGAAGAACTTGTCTCGTCAAAGACATTCGGTTTTACTCAATGTGTGAACATCATCTCGTTTC
CGTTTTTTGGTGTGGCCACGTGCGATACATTCCACGTGGCGGAAAAGTAACTGGATTGAGCAAACCTAGCACG
AACGGTTGAAACTGTTGCGCGACGACCGCAATTACAAGAACGAATTACAGCAACGGTAGCCGATGCCATTATG
GAGACCCTTGAACCACATGGGGTCATGGTTCGTTGTCGAAGCTGAACATATGTGCATGACGATGCGCGGTGTGA
AAAAACCGGGAGCGAAAAACGGTGACAACTGACAGTACGTGGCAGCTTGAACAGATGAAAAAGCGCGTGCAGA
AATATTAGCGCTGATTAAATAG - 3'
```

Bu sıraya göre, genin PZR ile yakalanabilmesi için 5' ucuna komplementer olan ve daha sonraki aşamalarda ekspresyon vektörüne klonlama için de kullanılacak olan, forward primeri *NcoI* restriksiyon enzim bölgesi (5'-C[↓]CATGG-3') içeren, 5'-CCA TGG TAG

AAT CGG ATT ACG-3' primeri ve karşıt yönde yer alan, *XhoI* restriksiyon kesim bölgesi (5'-C[↓]TCGAG-3') içeren 5'-CTC GAG CTA TTT AAT CAG CGC-3' sırasına sahip reverse primeri ile primerlerin *T_m* sıcaklığına ve elde edilmek istenen bölgenin uzunluğuna (603 bp) bağlı olarak tasarlanan PZR ile yakalandı.

Buna göre uygulanacak olan PZR şartları El Yacoubi vd.'ne göre (2006) 50 µL son hacimde olmak üzere řu şekilde yapıldı.

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

PZR döngü şartları ise:

94°C de 1 dakika,
30 döngü olarak
94°C de 1 dakika,
50°C de 2 dakika,
72°C de 1 dakika,
72°C de 4 dakika

şeklinde belirlenerek yapıldı.

2.2.3.2. PZR ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Yapıştırılması ve *E. coli* JM101 Konak Hücreye Aktarılması

Reaksiyon sonucunda elde edilecek olan PZR rnleri, DNA ladder eşliğinde % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile aşağıdaki şekilde kullanılarak temizlendi (saflaştırıldı).

- Yapılan PZR reaksiyonunun tümü temiz steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra aynı hacimde Membrane Binding Solution eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı,
- Bu karışım daha sonra Toplama Tüpü'nn üzerine eklenmiş olan kolona boşaltıldı ve bir dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi,

- 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve Toplama Tüpü'nde biriken sıvı kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı, kolon tekrar bu tüpe yerleştirildi,
- Üzerine 700 µL Membrane Wash Solution eklendi ve tekrar aynı hız ve sürede santrifüjlendi,
- Alta geçen sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem 400 µL ile tekrarlandı,
- Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra rezidüel etanol kalıntısının atılabilmesi için kolon ve tüp boş olarak tekrar santrifüjlendi,
- Kolon temiz steril bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi ve membrana zarar vermeden 50 µL nükleazsız su ilave edildi,
- Oda sıcaklığında 1 dakika beklendikten sonra aynı süre ve hızda santrifüjlendi,
- Kolon atılarak elde edilen saf PZR ürünü agaroz jelde doğrulanarak kullanıma kadar 4°C'de saklandı.

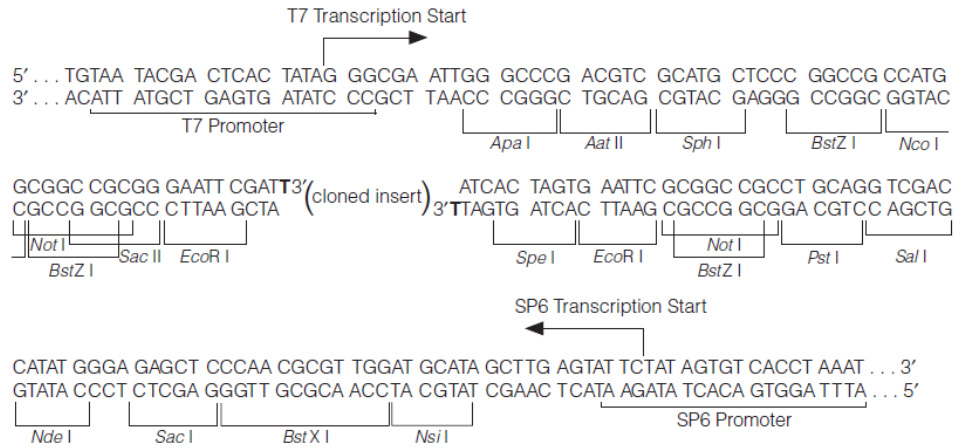
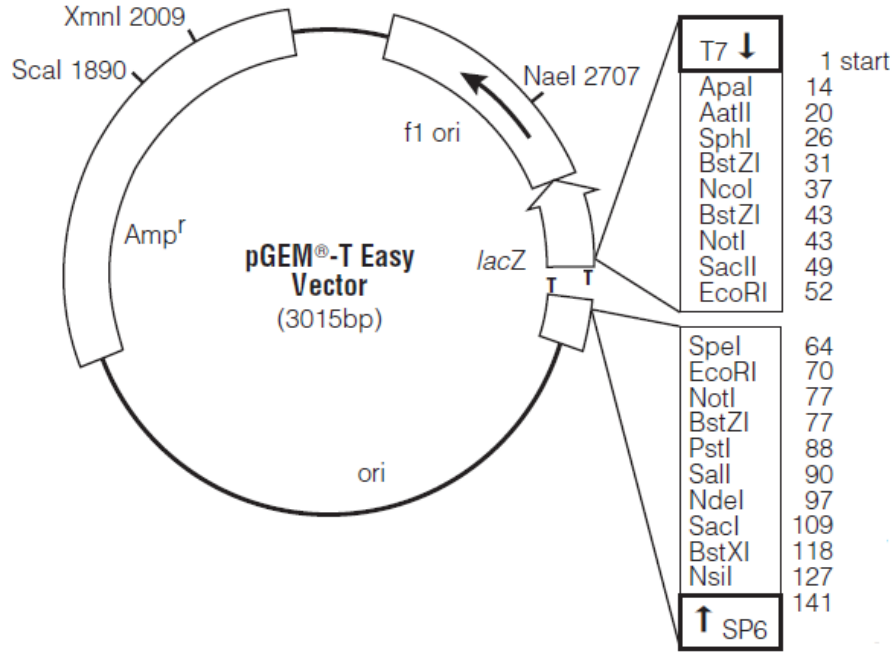
Saflaştırılmış PZR ürününün sahip olduğu restriksiyon bölgelerinden daha kolay bir biçimde kesilerek ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için aracı olarak pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega Co., Medison, USA) kullanıldı (Şekil X).

Bunun için üretici firmanın 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 4°C'de bir gece tutulduktan sonra uygun bir konak hücre olan *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

Rekombinant vektörün konak hücreye aktarılmasından önce, konak hücre soğuk CaCl₂ yöntemiyle alıcı (kompetan) duruma getirildi. Bunun için aşağıdaki yöntem kullanıldı.

- Gece boyu inkübasyona bırakılan *E. coli* JM101 kültürü, 100 ml LB besiyerine 1/100 oranında seyreltildi,
- Tekrar büyümeye konan kültürün yoğunluğu OD₆₀₀: 0,45-0,55 olana dek inkübe edildi,
- İnkübasyon sonrası 4500 g'de 10 dakika 4°C'de çöktürüldü,
- Elde edilen bakteri pelletine 10 ml soğuk steril 100 mM CaCl₂ eklendi ve süspanse edildi,

- Bakteri süspansiyonu 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra aynı şartlarda çöktürüldü,
- Pellet üzerine 2 ml soğuk steril 100 mM CaCl₂ eklenerek tekrar süspansiyon edildi ve kullanıma kadar 4°C’de saklandı.



Şekil 3. pGEM-T Easy vektör sistemi ve klonlama bölgesi (Promega TM042’den değiştirilerek)

Rekombinant vektörün alıcı konak hücreye aktarımında Promega firmasının öngördüğü şekilde yapıldı. Buna göre,

- 2 µl ligasyon ürünü 50 µl alıcı hücre ile 1,5 ml ependorf tüp içerisinde karıştırıldı,
- Karışım buz içerisinde 20 dakika inkübe edildi,
- İnkübasyon sonrası 42°C’de 45-50 saniye süre ile yeniden inkübe edildi,
- Isı muamelesinden sonra reaksiyon tüpü 2 dakika boyunca buzda bekletildi,
- Tüp içerisine 950 µl SOC medyum eklenerek 37°C’de 150 rpm hızda 1,5 saat inkübe edildi,
- İnkübasyon sonrası kültürün 100 µl’si daha önce hazırlanan X-gal/IPTG ve ampisilin antibiyotiği içeren LB agar petrilere steril baget yardımıyla ekildi,
- Petriler gece boyu mavi-beyaz koloni seçimi için 37°C’de inkübe edildi.

Petrilerden seçilen beyaz koloniler, plazmit DNA’larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besi yerine ekim yapılarak 37°C’de 200 rpm’de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu, Birnboim ve Doly’e (1979) göre aşağıdaki şekilde izole edildi.

- Öncelikle her bir beyaz koloniden ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere bir adet mavi koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren LB besi yerine (3 mL) 37 °C’de gece kültürü atıldı,
- Kültür, 1,5 mL Eppendorf tüpüne aktarıldı ve yüksek hızda 1 dakika çöktürüldü. Süpernatant kısmı döküldü,
- Pellete kalın kültür eklenerek yukarıdaki işlem yenilendi,
- Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 100 µL Resuspension Buffer eklendi ve hücre pelleti tamamen çözünene kadar vortekslenerek süspanse edildi,
- Süspansiyon üzerine 100 µL Lysis Buffer eklendi ve nazikçe 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı.
- Üzerine 150 µL Neutralizing Solution eklendi ve birkaç defa alt üst edildi,
- Bekletilmeden 10 dakika yüksek hızda santrifüjlendi,
- Süpernatant kısmı yeni bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne 100-1000 µL’lik pipetör yardımıyla aktarıldı,

- Elde edilen hacmin 2,5-3 katı soğuk etanol eklendi ve birkaç defa alt üst edildi,
- Tekrar yüksek hızda 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı,
- Rezidüel etanolün tamamen uzaklaşması için 37°C’lik etüvde örnekler ağzı açık şekilde bekletildi,
- DNA pelleti 50 µL TE çözeltisinde çözüldü,
- RNA kontaminasyonunun önlenmesi için bu çözeltiliye 3 µL 1 mg/mL RNaz eklendi ve sonrasında 15-30 dakika boyunca 37°C’lik etüvde RNA yıkımı için inkübe edildi,
- Agaroz jel elektroforezinde tespit edilen plazmit DNA’lar kısa süreli depolama için 4°C’ye kondu.

Yukarıda uygulanan yöntem için gerekli solüsyon ve tamponlar ise şu şekilde hazırlandı:

Resuspension Buffer: 50 mM glukoz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8.0. Hazırlandıktan sonra buzdolabında (4°C) saklandı.

Lysis Buffer: 0,2 N NaOH, % 1 SDS. Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklandı.

Neutralizing Solution: 3 M KOAc, pH 6,0. 100 ml solüsyon için 60 ml 5 M potasyum asetat (49,07 g potasyum asetat 100 ml H₂O’da çözülerek hazırlandı), 11,5 ml glacial asetik asit ve 28,5 ml H₂O ile hazırlandı. Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklandı.

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.

Doğru DNA parçasını alıp almadıklarının test edilmesi için, aynı enzimlerle kesim işlemi yapıldı. Kesim sonucu doğrulanan kolonilerden tekrar gece kültürü yapılarak Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Co., Medison, USA) kiti firmanın önerdiği şekilde kullanılarak pDNA izolasyonu tamamlandı.

Elde edilen pDNA’lar % 1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Doğru klon seçimi için agaroz jel elektroforezinden sonra restriksiyon kesimi yapılarak ilgili geni taşıyıp taşımadığı belirlendi. Doğru klon tespit edildikten sonra taze kültür hazırlandı ve gliserol stoğu halinde -20°C’de saklandı.

2.2.3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Doğru koloninin seçimi için hazırlanan reaksiyon,
1 µg rekombinant pDNA,
1X ikili kesim (double digest) tamponu,
1 ünite *NcoI* restriksiyon enzimi,
1 ünite *XhoI* restriksiyon enzimi,
Son hacim 50 µl olacak şekilde steril distile su
steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konduktan sonra ile tamamlandıktan sonra
37°C'de 2 saat inkübe edilerek tamamlandı.

Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünü, pozitif kontrol olarak PZR ürünü ve negatif kontrol olarak kesilmemiş pDNA ürünü kullanılarak % 1'lik agaroz jelde tespit edildi.

2.2.3.4. *gch I* Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi

Doğru plazmidi taşıyan plazmidi içeren kültürden kit yardımıyla saf olarak izole edilen pGEM-T/*gchI* rekombinant pDNA'sı ilgili firmanın öngördüğü şekilde hazırlanarak dizi analizi için Macrogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi. Kesim sonuçlarının ve DNA dizi analizi ile ilgili genin aktarıldığının doğrulanmasından sonra gen ürününün ekspresyonuna ve ekspresyon parametrelerinin belirlenmesi işlemlerine geçildi.

2.2.4. Genin Ekspres Edilmek Üzere Uygun Vektöre Aktarımı

Genin bir ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için pGEM-T/Easy/*gchI* rekombinant plazmidinden restriksiyon kesimi ile alınması gereklidir. Bunun için *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak ortak tampon ile ikili kesim yapıldı. Bunun için kullanılacak enzimi sağlayan firmanın "double digest" tamponunda reaksiyon yürütüldü. Reaksiyon için,

1 µg rekombinant pDNA,
1X double digest tamponu,
1 ünite *NcoI* restriksiyon enzimi,
1 ünite *XhoI* restriksiyon enzimi,
Son hacim 50 µl olacak şekilde steril distile su

steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konduktan sonra reaksiyon 37°C'de 2 saat inkübe edilerek tamamlandı.

Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünü % 1'lik agaroz jelde tespit edildikten sonra, aktarılmak istenen DNA fragmenti (*NcoI* ve *XhoI* bölgesi taşıyan *gchI* geni) Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile aşağıdaki şekilde izole edildi.

- % 1'lik agaroz jel elektroforezi için jel dökülmeden önce, toplam kesim sonuçlarını alacak kadar bir kuyu oluşturmak için jel tarakları el değmeden bant ile bantlandı. Oluşan büyük kuyuya tüm PZR sonucu yüklendi,
- Yürütme işlemi sonrasında elde edilen DNA bandı UV ışık altında steril bir neşter veya jilet yardımıyla kesildi ve steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne kondu,
- Boş tüpün önceden darası alınarak içerisindeki bandın ağırlığı terazi yardımıyla tartılarak hesaplandı,
- 10 mg banda karşılık 10 µL Membran Binding Solution eklendi ve tüp, içerisindeki agaroz jeli tamamen eriyene değin 55-60°C'de çalkalamalı termoblokda inkübe edildi,
- Erime sonrasında tüpte yer jel karışımı, Toplama Tüpü'nün üzerine eklenmiş olan kolona boşaltıldı ve bir dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi,
- 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve Toplama Tüpü'nde biriken sıvı kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı, kolon tekrar bu tüpe yerleştirildi,
- Üzerine 700 µL Membrane Wash Solution eklendi ve tekrar aynı hız ve sürede santrifüjlendi,
- Alta geçen sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem 400 µL ile tekrarlandı,
- Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra rezidüel etanol kalıntısının atılabilmesi için kolon ve tüp boş olarak tekrar santrifüjlendi,
- Kolon temiz steril bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi ve membrana zarar vermeden 50 µL nükleazsız su ilave edildi,
- Oda sıcaklığında 1 dakika beklendikten sonra aynı süre ve hızda santrifüjlendi,

- Kolon atılarak elde edilen saf PZR ürünü agaroz jelde doğrulanarak kullanıma kadar 4°C’de saklandı.

Uygulanan bu reaksiyon, ekspresyon vektörü olarak kullanılması planlanan pET28a(+) (Novagen, USA) plazmidi de (Şekil 4) aynı enzimlerle aynı şekilde kesilerek alıcı plazmid haline sokuldu. Bunun için firmanın (Novagen, USA) yönergesine göre;

- 3 µg pET28a(+) vektörü,
- 3 µl 10X restriksiyon enzim tamponu,
- 1 ünite *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimi,
- 3 µl 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) ve son hacim 50 µl’ye tamamlanana kadar nükleazsız su

steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpüne konuldu ve reaksiyon 37°C’de 4 saat tutularak tamamlandı. Kesim ürünü % 1’lik agaroz jel elektroforezinde tespit edildikten sonra gereken fragment Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Medison, USA) kiti kullanılarak yukarıdaki şekilde saflaştırıldı.

Genin ekspresyon vektörüne yapıştırılmasında pET vektör kullanımına uygun olarak firmanın öngördüğü şekilde reaksiyon şartları hazırlandı. Bunun için,

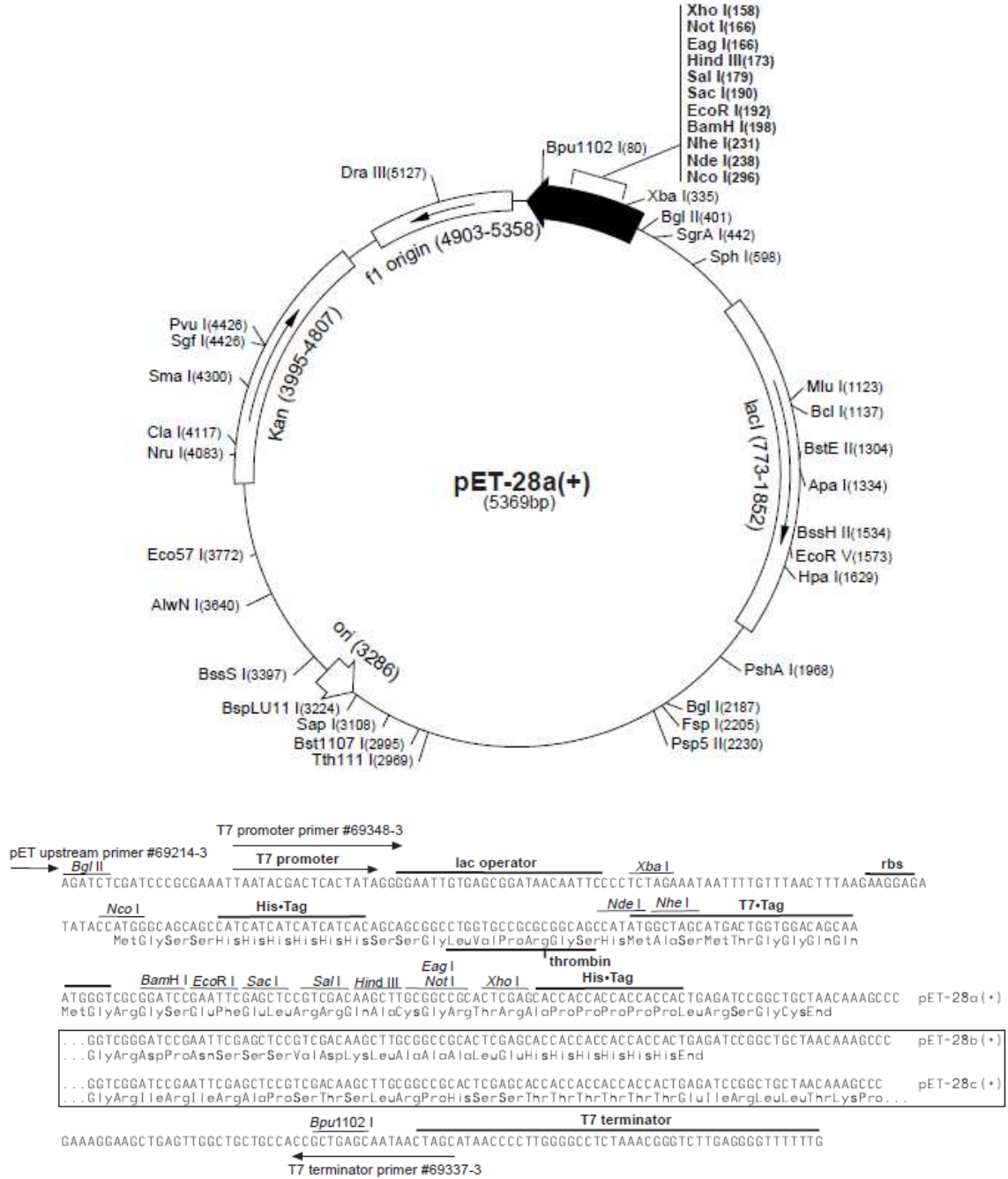
- 2 µl 10X ligaz tamponu,
- 2 µl 100 mM DTT,
- 1 µl 10 mM ATP,
- 2 µl 50 ng/µl hazırlanmış pET28a(+) vektörü,
- 1 µl T4 DNA ligaz enzimi,
- 0.2 pmol insört DNA (*NcoI* ve *XhoI* bölgesi taşıyan *gchI* geni),
- 20 µl son hacim olacak şekilde nükleazsız su

steril 1,5 mL Eppendorf tüpüne konularak hazırlandı ve reaksiyon 16°C’de gece boyu inkübe edilerek tamamlandı.

Ligasyon işleminden sonra rekombinant plazmitler, yukarıda belirtildiği gibi 100 mM soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresine ısı şoku ile aktarıldı. Elde edilen klonlar bir önceki koloni seçiminde olduğu gibi izole edilerek doğru klon tespit edildi.

Doğru klonun tespitinde restriksiyon enzim kesimi (*NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile) ve başlangıçta kullanılan primerler ile PZR yapılarak doğruluğu bir kez daha kanıtlandıktan sonra elde edilen pDNA (pET28a(+)/*gchI*) DNA dizi analizine tabi tutuldu.

Uygun plazmidi içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS kültürü ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere 30 µg/µL kanamisin içeren LBA petrisine ekim yapılarak 37°C’de bir gece inkübasyondan sonra +4°C’de ve gliserol stoğu halinde ise -20°C’de saklandı.



Şekil 4. Ekspresyon için kullanılan pET28a(+) vektörü ve klonlama bölgesi (Novagen TB074’ten değiştirilerek)

2.2.5. *gchI* Geninin Ekspresyonu

Gen ekspresyonunun başlangıcında en iyi ekspresyon şartlarının belirlenmesi için uygun ekspresyon sıcaklığı belirlendi. Sonrasında proteinin denatürasyon sıcaklık derecesi ve süresi belirlendi.

Bunun için *E. coli* BL21(DE3)pLysS kültürü ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ve 30 µg/µL kanamisin içeren LB ekim yapılarak hem 28°C hem de 37°C'de bir gece inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrası, 1 litrelik erlende 400 mL kanamisinli LB besiyerine OD₆₀₀ değeri 0,1 olacak şekilde seyreltilerek gece kültürü ekildi ve 37°C'de inkübasyona devam edildi. Kültürün OD₆₀₀ değeri 0,45-0,55 aralığına geldiğinde son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG eklenerek indüklemeye yapıldı.

Her iki sıcaklık değerinde de pET28a(+) vektörüne uygun olacak şekilde üretici firmanın öngördüğü gibi 4 saat inkübasyon yapıldıktan sonra protein saflaştırılması yapıldı.

2.2.6. Proteinin Saflaştırılması

2.2.6.1. Proteinin Ni-NTAKolon İle Saflaştırılması

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

- Rekombinant plazmidi içeren hücre kültürü 4500 rpm'de soğutmalı santrifüjde çöktürüldü,
- Elde edilen pellet, 5 mL Ni Binding Buffer kullanılarak çözüldü,
- Daha sonra 3 dakika % 30 amplitude, 30 saniye ON/OFF şartlarında buz içerisinde sonikatör ile parçalandı,
- Sonikasyon sonrası -20°C'de donduruldu ve tekrar oda sıcaklığında tamamen çözünmesi beklendi,
- Erime sonunda tekrar aynı şartlarda sonike edildi,
- 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı,
- Süpernatant 70°C'de 15 dakika inkübe edilerek konak hücreden gelebilecek kontamine proteinler ortadan kaldırıldı,
- İnkübasyon sonrası tekrar 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alındı.

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

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

Tamponlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki 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 bağlanma tamponu eklendi,
- Sonrasında sonikasyonda elde edilen lizat yavaşça kolona yüklendi,
- Kolonun akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlandı,
- Lizatın akışı tamamlandıktan sonra kolon hacminin 10-20 katı yıkama tamponu ile yıkandı. Bunun için önce 10 mM imidazol ieren 100 mM HEPES (pH 7,5) kolondan geçirildi sonrasında hazırlanan diğer seriler kolona tatbik edildi,
- Yıkama sonrasında, yukarıdaki gibi düşük konsantrasyondan başlanarak sıra ile elüsyon tamponları kolondan geçirildi.

Uygulama sonrası % 12'lik SDS-PAGE ile protein tespit edildi.

2.2.6.2. SDS-PAGE Analizi

Protein ekspresyonu ve saflaştırılması ile ilgili özelliklerinin belirlenmesi esnasında Maniatis ve ark.'na (1982) göre % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Elektroforez, 0,75 mm kalınlığında % 5'lik yükleme ve % 12'lik ayırma jeli olacak şekilde hazırlandı (Tablo 3) ve elde edilen jel, Coomassie-Blue boyası ile boyanarak sonuçlar tespit edildi. Uygulanan yöntem şu şekildedir.

Poliakrilamid jel elektroferezine tabi tutulacak örnekler belirtilen miktarlarda alınarak bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. İçerisine 1:1 oranında yükleme tamponu (150 mM Tris-HCl pH 6,8, % 4 SDS, % 0,1 bromofenol mavisi, % 20 gliserol, % 6 β -

merkaptotanol) eklendi ve örnekler ısıtıcı blok ünite (Eppendorf Thermomixer Comfort 1,5 ml) 95°C’de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi.

Hazırlanan jel donduktan sonra üretici firmanın öngördüğü şekilde tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu (25 mM Tris bazı, 250 mM glisin, % 0,1 SDS, pH 8,3) ile dolduruldu. Pipetör yardımı ile ilk kuyuya 5 µl protein markırı olmak üzere örnekler kuyulara yüklendi. Boya, jelden çıkana kadar 1 saat 27 mA’de (150 V) yürütüldü.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, Coomassie Brilliant mavisini içeren “boyama çözeltisi” (% 0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 10 glasiyel asetik asit, % 50 metanol) içinde hafifçe sallanacak şekilde yaklaşık 2-3 saat bekletildi. Boyanan jel daha sonra “boya uzaklaştırma çözeltisi” (% 36 metanol, % 9 glasiyel asetik asit) ile gece boyu yıkanarak protein bantlarının görünür hale geçmesi sağlandı. Elde edilen sonuçlar bir bilgisayar tarayıcısı ile taranarak görüntülendi.

Tablo 3. Kullanılan SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	Yükleme Jeli (% 5)	Ayırma Jeli (% 12)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl pH 6,8)	1,25 ml	---
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	---	2,5 ml
% 10 SDS	0,1 ml	0,1 ml
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	1,67 ml	4 ml
ddH ₂ O	6,87 ml	3,29 ml
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,1 ml	0,1 ml
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0,01 ml	0,004 ml

2.2.7. Proteinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

GCH I enziminin aktivitesinin belirlenmesi için, Tanaka vd.’ne göre (2005) 37°C ve bakteri büyüme sıcaklığı olan 55°C’de aktivite deneyleri yapıldı. Standart yöntem olarak 100 µL son hacimde 50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP ve 0.2 µM enzim içeren reaksiyon ilgili sıcaklıklarda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 30 µL oksidasyon solüsyonu (% 1 I₂ ve % 2 KI içeren solüsyon) eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda bekletildi. 15 µL % 2’lik askorbik asit solüsyonu eklendikten

sonra spektroflorometrede 350 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boylarında ölçüm alındı. Standart olarak dihidroneopterin kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda enzimin her iki sıcaklık değerinde de aktif olduğu belirlendi.

2.2.7.1. Enzim Aktivitesine pH Etkisi

Enzimin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için, pH 5,5 ve 6,0 için MES, pH 5,8-6,6-7,2 ve 8,0 için potasyum fosfat, pH 7,5-8,0 ve 8,8 için Tris-HCl ve son olarak da pH 9,0 için Glisin NaOH tamponları hazırlandı ve yukarıdaki reaksiyon bu tamponlarda tekrarlandı.

2.2.7.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Optimum pH belirlendikten sonra enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değerini belirlemek için yukarıda belirlenen tamponun kullanıldığı standart reaksiyon, 37-45-50-55-60-65-70-75-85°C'lerde yenilendi ve en uygun çalışma sıcaklığı belirlendi.

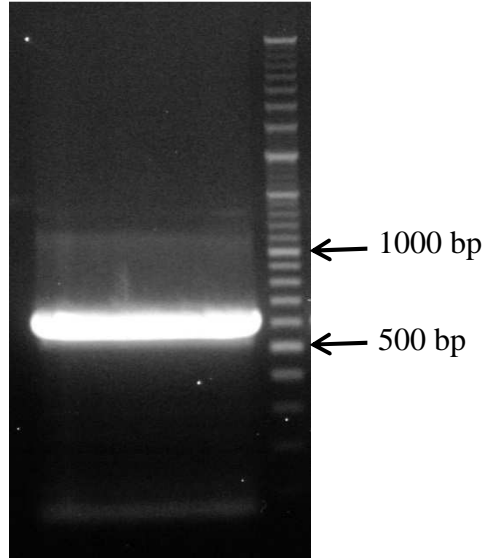
2.2.7.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzime ait kinetik verileri olan V_{max} ve K_m 'yi bulmak üzere yukarıdaki standart reaksiyon kullanılarak substrat (GTP) kullanım konsantrasyonu değiştirildi. Bunun için reaksiyona 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 ve 500 μ M ve 1, 3, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda GTP eklenerek deneyler yapıldı.

3. BULGULAR

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

Çalışmada kullanılan *A. flavithermus* bakterisine ait -20°C’de saklanan gliserol stoğundan 5 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldıktan sonra elde edilen kültür 14000 rpm’de 2 dakika boyunca çöktürüldü ve pelletten Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile üretici firmanın öngördüğü şekilde kullanılarak genomik DNA (gDNA) izole edildi. İzolasyon sonrası elde edilen gDNA, % 1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. İzole edilen gDNA, herhangi bir işleme tabi tutulana kadar -20°C’de saklandı. Sonrasında *gch1* geninin PZR ile yakalanması için dizayn edilen primerler kullanıldı ve yapılan bu PZR sonucunda, 603 bp büyüklüğünde olduğu bilinen gen tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 5. *A. flavithermus gch I (AfgchI)* geninin PZR sonucu (MBI Fermentas O’RangeRuler 100+500bp DNA Ladder)

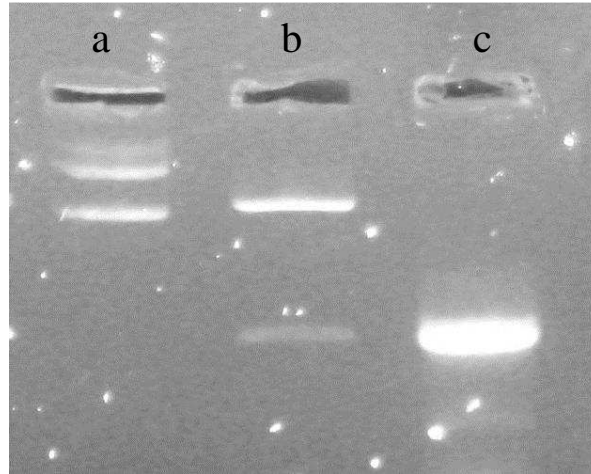
3.2. PZR Ürününün pGEM-T/Easy Vektörüne Klonlanması

Reaksiyon sonucunda elde edilen PZR ürünü, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Co., Medison, USA) kiti ile üretici firmanın öngördüğü şekilde kullanılarak temizlendi (saflaştırıldı). Saflaştırılmış PZR ürününün 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. Yapılan ligasyon sonrası ligasyon ürünü, *E. coli* JM101 hücrelerine aktarıldı. Aktarım sonrası mavi-beyaz koloni ayırımına göre seçilen kolonilerden tekrar plazmit izolasyonu Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Co., Medison, USA) kiti firmanın önerdiği şekilde kullanılarak pDNA izolasyonu tamamlandı.

3.3. Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Doğru koloninin seçimi için hazırlanan kesim reaksiyonunda primerlerdeki bölgeler kullanılarak yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen kesim ürünü, pozitif kontrol olarak PZR ürünü ve negatif kontrol olarak kesilmemiş pDNA (pGEM-T/Easy/*AfgchI*) ürünü kullanılarak % 1'lik agaroz jelde tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. *AfgchI* genini taşıyan pGEM-T/Easy plazmidinin *NcoI* ve *XhoI* enzimleri ile kesimi (a: kesilmemiş rekombinant plazmit, b: kesim ürünü, c: kontrol olarak PZR ürünü)

3.4. *Afgch I* Geninin DNA Baz Sırasının Belirlenmesi

Doğru plazmidi taşıyan plazmidi içeren kültürden kit yardımıyla saf olarak izole edilen pGEM-T/Easy/*AfgchI* rekombinant pDNA'sı ilgili firmanın öngördüğü şekilde hazırlanarak dizi analizi için MacroGen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi. Elde edilen sonucun yapılan çalışmayı doğruladığı görüldü (Şekil 7 ve Tablo 4).


```

AfgchI: 24 atgaatgtacaacaaattgaacaagcggttcgccttaatTTTtagaagcgattggcgaagat 83
Wk1gchI: 1083782 atgaatgtacaacaaattgaacaagcggttcgccttaatTTTtagaagcgattggcgaagat 1083841

AfgchI: 84 ccaaatcgtgaagggttgctcgatacaccgaagcggtagcaaaaatgtatgcggaagt 143
Wk1gchI: 1083842 ccaaatcgtgaagggttgctcgatacaccgaagcggtagcaaaaatgtatgcggaagt 1083901

AfgchI: 144 ttttctggtttaaccgaagatccgaaagtgcacttgcaaacggtatTTtagtgaagaccat 203
Wk1gchI: 1083902 ttttctggtttaaccgaagatccgaaagtgcacttgcaaacggtatTTtagtgaagaccat 1083961

AfgchI: 204 gaagaacttgctcctcgtcaaagacattccgTTTTactcaatgtgtgaacatcatctcgtt 263
Wk1gchI: 1083962 gaagaacttgctcctcgtcaaagacattccgTTTTactcaatgtgtgaacatcatctcgtt 1084021

AfgchI: 264 ccgTTTTTggtgtggcccacgtcgcatacattccacgtggcggaaaagtaactggattg 323
Wk1gchI: 1084022 ccgTTTTTggtgtggcccacgtcgcatacattccacgtggcggaaaagtaactggattg 1084081

AfgchI: 324 agcaaaactagcacgaacggTTgaaactgttgcgcgacgaccgcaattacaagaacgaatt 383
Wk1gchI: 1084082 agcaaaactagcacgaacggTTgaaactgttgcgcgacgaccgcaattacaagaacgaatt 1084141

AfgchI: 384 acagcaacggtagccgatgccattatggagacccttgaaccacatggggatcatggtcggt 443
Wk1gchI: 1084142 acagcaacggtagccgatgccattatggagacccttgaaccacatggggatcatggtcggt 1084201

AfgchI: 444 gtcgaagctgaacatatgtgcatgacgatgcgcggtgtgaaaaaccgggagcgaaaaacg 503
Wk1gchI: 1084202 gtcgaagctgaacatatgtgcatgacgatgcgcggtgtgaaaaaccgggagcgaaaaacg 1084261

AfgchI: 504 gtgacaactgcagtacgtggcagcgttgcaacagatgaaaaagcgcgtgccgaaatatta 563
Wk1gchI: 1084262 gtgacaactgcagtacgtggcagcgttgcaacagatgaaaaagcgcgtgccgaaatatta 1084321

AfgchI: 564 gcgctga 570
Wk1gchI: 1084322 gcgctga 1084328

```

Şekil 7. *AfgchI* geninin klonlama sonrası orijinal *A. flavithermus* WK1 *gchI* sırası ile karşılaştırılması

3.5. *AfgchI* Geninin Eksprese Edilmek Üzere pET28a(+) Vektörüne Klonlanmasında Ekspresyonu

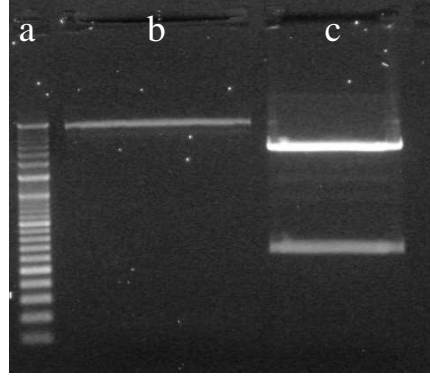
Doğruluğu tespit edilen klon ve pET28a(+) plazmidi aynı enzimlerle ayrı ayrı kesilerek jelden saflaştırıldıktan sonra üretici firmanın öngördüğü şekilde ligasyon ile birleştirildi. Ligasyon ürünü ekspresyon çalışmasını yapmak üzere 100 mM soğuk CaCl₂ ile alıcı hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarıldı. Elde edilen klonlar bir önceki koloni seçiminde olduğu gibi izole edilerek doğru klon tespit edildi. *E. coli*

BL21(DE3)pLysS/pET28a(+)/AfgchI hücresi ekspresyon için hazırlanmış oldu. Klonlama yukarıda olduğu gibi kesim ve PZR ile doğrulandı (Şekil 8).

Tablo 4. AFGCHI enzimine ait amino asit sırasının NCBI verilerine göre protein-BLAST karşılaştırmasının benzerlik sonuçları (tüm karşılaştırmalar dahil edilmemiştir fakat son veri en düşük benzerliği göstermektedir)

Sıra	Organizma	Pozitiflik Oranı (%)	Benzerlik Oranı (%)
1	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1	100	100
2	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	99	98
3	<i>Anoxybacillus</i> sp. DT3-1	99	98
4	<i>Anoxybacillus</i> sp. SK3-4	98	98
5	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	94	89
6	<i>Geobacillus</i> sp. Y4.1MC1	93	87
7	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	92	87
8	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	93	87
9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	95	86
10	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	92	86
11	<i>Bacillus cereus</i>	93	86
12	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	91	86
13	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5	91	86
14	<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391-98	92	85
15	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	92	85
16	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	92	85
17	<i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam	92	85
18	<i>Bacillus megaterium</i> WSH-002	91	83
19	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580	90	82
20	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	91	82
21	<i>Bacillus halodurans</i> C-12	89	81
22	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	88	78
23	<i>Clostridium ultunense</i>	87	75
24	<i>Marinococcus halotolerans</i>	87	75
25	<i>Thermincola potens</i> JR	87	75

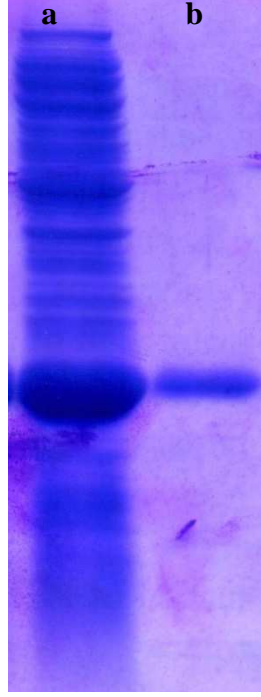
26	<i>Desulfurispora thermophila</i>	85	72
----	-----------------------------------	----	----



Şekil 8. pET28a(+)/*AfgchI*'nin kesim ile doğrulanması (a: MBI Fermentas O'RangeRuler 100+500bp DNA Ladder, b: pET28a(+) *NcoI/XhoI* kesimi, c: pET28a(+)/*AfgchI*'nin *NcoI/XhoI* kesimi)

3.6. Proteinin Ni-NTA Kolon ile Saflaştırılması

Rekombinant protein His Link™ Protein Purification System (Promega) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma sonrası %12'lik SDS-PAGE yapılarak saflaştırmanın olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 9).



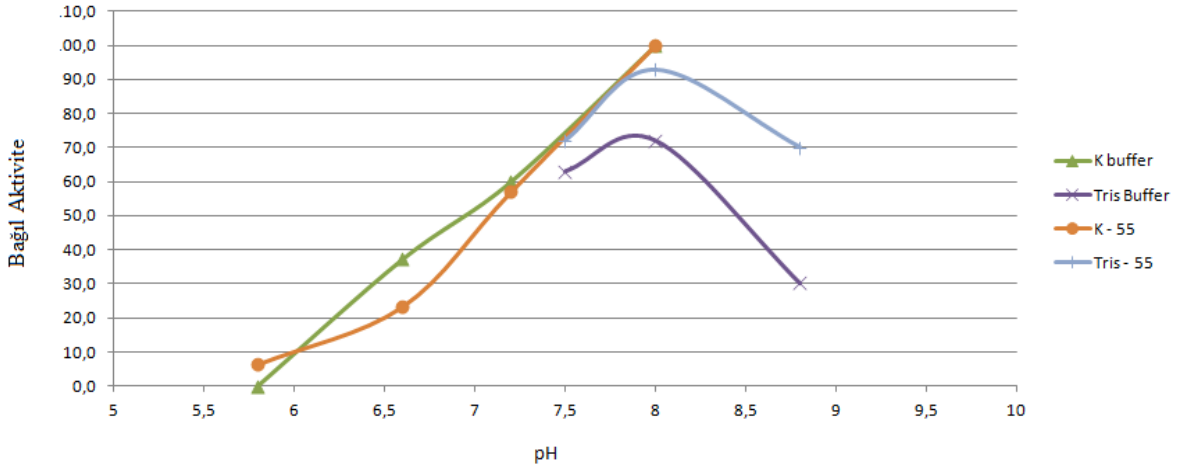
Şekil 9. Proteinin Ni kolon ile saflaştırılmasının SDS-PAGE analizi (a: Ekspresyon sonrası ham özüt, b: Kolondan elde edilen saf AfGCHI enzimi)

3.7. Proteinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

GCH I enziminin aktivitesinin belirlenmesi için, 37°C ve bakteri büyüme sıcaklığı olan 55°C’de aktivite deneyleri yapıldı. Standart yöntem olarak 100 µL son hacimde 50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP ve 0.2 µM enzim içeren reaksiyon ilgili sıcaklıklarda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 30 µL oksidasyon solüsyonu (% 1 I₂ ve % 2 KI içeren solüsyon) eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda bekletildi. 15 µL % 2’lik askorbik asit solüsyonu eklendikten sonra spektrofloreometrede 350 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boylarında ölçüm alındı. Standart olarak dihidroneopterin kullanıldı. Bu reaksiyon sonucunda enzimin her iki sıcaklık değerinde de aktif olduğu belirlendi.

3.7.1. Enzim Aktivitesine pH Etkisi

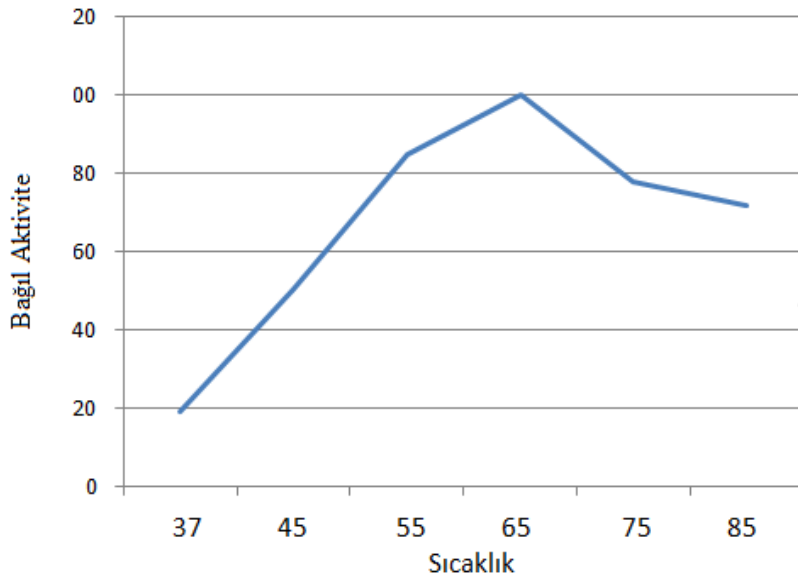
Enzimin en iyi çalıştığı pH değerini belirlemek için yapılan çalışma sonucunda enzimin MES ve glisin NaOH’da dolayısıyla pH 5,8’in altında ve pH 9,0’ın üzerinde çalışmadığı, en uygun pH’nın ise 8,0 olduğu belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Enzime ait pH'ya bağlı bağıl aktivite grafiği.

3.7.2. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Optimum pH belirlendikten sonra enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değerini belirlemek için yukarıda belirlenen tamponun kullanıldığı standart reaksiyon, 37-85°C'lerde yenilendi ve en uygun çalışma sıcaklığının 65°C olduğu belirlendi (Şekil 11).

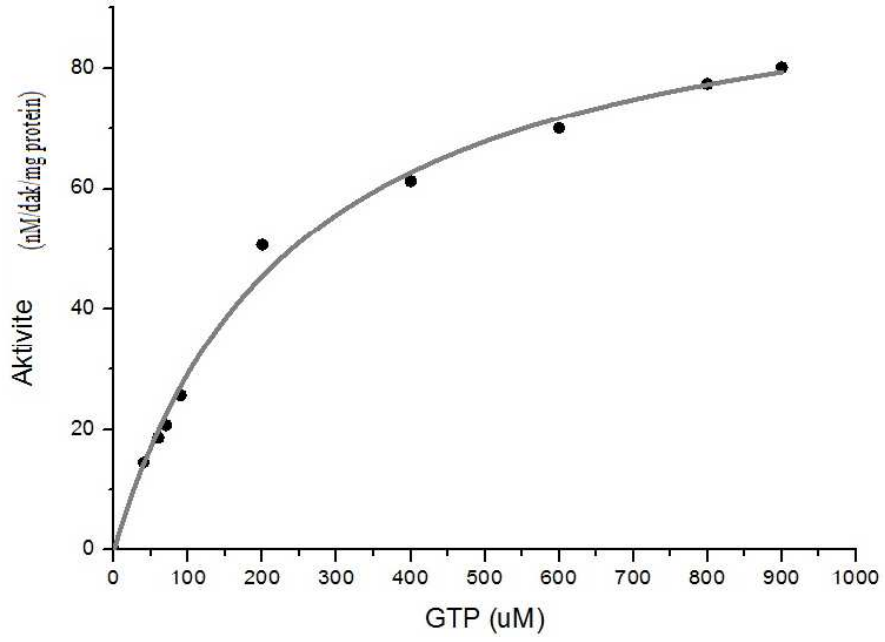


Şekil 11. Enzime ait sıcaklık-bağıl aktivite grafiği.

3.7.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzime ait kinetik verileri olan V_{max} ve K_m 'yi bulmak üzere yukarıdaki standart reaksiyon kullanılarak substrat (GTP) kullanım konsantrasyonu değiştirildi. Bunun için

reaksiyona 10-20-30-40-50-100-200-300-500 μM -1-3-5-10 mM konsantarsyonlarda GTP eklenerek deneyler yapıldı. Elde edilen sonuçlar ORIJIN programı sayesinde okundu ve enzimin V_{max} 'ı $100,93 \pm 3,5$ nM/dak/mg protein ve K_m 'si $243 \pm 23,25$ μM olarak bulundu. Şekil $R^2 = 0,9914$ değerine sahip aktivite grafiğini göstermektedir (Şekil 12).



Şekil 12. GCH-I enzimine ait aktivite grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Ülkemizde görülme sıklığı 1/4500 olan ve her yıl 20-25 çocuktan birinin yakalandığı fenilketonüre hastalığının tedavisinde kullanılan BH4 maddesinin kimyasal sentezine alternatif olarak bakterilerde yapabilmek için kullanılması zorunlu enzimlerden biri GCH-I'dir. Termofilik karakterde olan enzimler ise daha önce bahsedilen sebeplerden ötürü endüstriyel uygulamalarda tercih sebebidir (Andrade vd., 1999; Hartley vd., 2000; Taylor vd., 2004; URL-3).

Çalışmamızda, termofilik karakterde olan *A. flavithermus* bakterisine ait GCH-I enziminin karakterizasyonunu tamamladık. Daha önce genom analizi tamamlanmış olan *A. flavithermus* WK1 bakterisine ait NCBI verileri kullanılarak enzimi kodlayan gene ait verilere ulaşıldı. Bu veriler doğrultusunda dizayn edilen primerler ile PZR yoluyla yakalanan enzimin orijinal suşta olduğu gibi 603 baz çifti olduğu bulundu. Toplam 200 amino asit büyüklüğe sahiptir.

Enzim büyüklüğü olarak yakın akraba türlerle karşılaştırıldığında, *Bacillus anthracis* strain A0248, *B. cereus* strain Q1 ve AH820, *B. weihenstephanensis* strain KBAB4, *B. huringiensis* subsp. *konkukian* strain 97-27 ve 189, *B. amyloliquefaciens* strain FZB42 ve *B. subtilis* strain 168'de 190, *Geobacillus* sp. strain WCH70'de 188, *Bacillus halodurans* strain ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125'lerde 299 amino asittir. Diğer termofilik bakterilerde de büyüklük bakımında değişikendir örneğin; *Thermotoga maritima* strain ATCC 43589 / MSB8 / DSM 3109 / JCM 10099'lerde 259, *Thermodesulfovibrio yellowstonii* strain ATCC 51303 / DSM 11347 / YP87'lerde 188, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* strain ATCC 33223 / 39E'lerde 188, *Thermotoga neapolitana* strain ATCC 49049 / DSM 4359 / NS-E'lerde 259 aa'tir.

Enzimin optimum pH'sı 8,0 olarak bulundu. BRENDA verilerine ve literatüre göre optimum pH *Methanocaldococcus jannaschii*'de 6,5 ila *E. coli*'de ise 9,0 arasında değişken olduğu görülmektedir (Grochowski vd., 2007; Lee vd., 2002). Yakın türlerde ise optimum pH'nın *B. subtilis* ve *Geobacillus sterothermophilus*'ta 8,0 ve *Thermus thermophilus*'ta ise 8,5 olduğunu görmekteyiz (sırasıyla De Saizieu vd., 1995; Suzuki vd., 1979; Tanaka vd., 2005).

Enzimin optimum sıcaklık değeri yaptığımız çalışmada 65°C olarak bulundu. Literatür verilerine göre ise GCH-I enziminin çalışma sıcaklığı 26-90°C arasında

değişmektedir. Yine yakın türlerden *B. subtilis*'te 37°C, *E. coli*'de 42°C ve *Geobacillus stearothermophilus*'ta 37-78°C olarak tespit edilmiştir (sırasıyla De Saizieu vd., 1995; Yim ve Brown, 1976; Suzuki vd., 1979).

Enzime ait kinetik verilere bakıldığında, V_{max} 'ı $100,93 \pm 3,5$ nM/dak/mg protein ve K_m 'si $243 \pm 23,25$ µM olarak bulundu. Literatür ile karşılaştırıldığında, K_m değerlerinin *Thermotoga maritima* COG1469'un 0,0023-0,0053 µM (El Ycoubi vd., 2006), *E. coli*'de 2,9 µM (Yim ve Brown, 1976), *Thermus thermophilus*'un 4,2 µM (Tanaka vd., 2005), *B. subtilis*'in 4,0 µM (De Saizieu vd., 1995), *Streptomyces tubercidicus*'un 80 µM (Yo vd., 1998) ve *Geobacillus stearothermophilus*'un ise 980 µM (Suzuki vd., 1979) olduğu bildirilmiştir. Bilindiği üzere bir enzimin substrata olan ilgisi arttıkça K_m değeri azalmaktadır. Literatür verilerine göre enzimimizin K_m değeri diğer çalışılmış olan farklı kaynaklardan elde edilmiş GCH-I enzimleri ile karşılaştırıldığında substrata ilgisi düşüktür. Sadece benzer termofilik karakterde olan *G. stearothermophilus*'un aynı enzimine oranla yüksektir.

Günümüzde enzimlerin kullanım alanı başta deterjan, gıda ve tıp endüstrisi olmak üzere her geçen gün artmaktadır. Memeli, bakteri, bitki gibi hatta farklı sıcaklıklarda yaşayabilen bakteriler gibi farklı karakterde kaynaklardan elde edilebilen enzimlerin kullanımları onların öncelikle karakterizasyonunu gerektirmektedir.

Çalışmamızda yenidoğan tarama testlerinde zorunlu olarak yapılan fenilketonüre hastalığının metabolik yollarından biri olan GTP siklohidrolaz I enzimini ele aldık. Kısaca GCH-I olarak da adlandırılan enzimin bozukluğu halinde ilgili hastalık kalıcı bir şekilde ortaya çıkmakta ve birey hayatı boyunca bu yolağın son ürününü yani BH₄'ü içeren ilaçları almak zorunda kalmaktadır. Çalışmamızın ana konusu olan GCH-I'in BH₄ üretiminde kullanılabilmesi için ilk adım bu enzimin klonlanması ve saflaştırılması akabinde de biyokimyasal olarak karakterizasyonudur. Özellikle endüstriyel olarak termofilik enzimlerin tartışılmaz üstünlüğünden yola çıkarak ilgili geni termofilik bir bakteri olan *A. flavithermus* WK1 suşunun genom verileri kullanılarak laboratuvar stoklarımızda bulunan *A. flavithermus* suşundan klonlamayı başardık. Sonraki aşamada istenilen enzimin elde edilebilmesi için pET28a(+) vektörüne, üretimi için ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS konak hücrelerine aktardık. Ekspresyon sonrası saflaştırmada kolaylık sağlayan Ni-NTA kolonundan yararlandık. Böylece iyon değişim kromatografisi gibi zahmetli ve pahalı işlemlerden daha çabuk ve nispeten ucuza saflaştırma yapıldı.

5. ÖNERİLER

Her ne kadar çalışmamız tamamlanmış olsa da konu ile ilgili olarak planlanacak sonraki çalışmalar için aşağıdaki öneriler sunulabilir;

1. Enzime etki eden metallerin etkilerinin incelenmesi ve literatür verilerinde yer almasa da farklı substratların denenmesi kinetik çalışmalara yarar sağlayacaktır,
2. Benzer mikroorganizmalarda aynı genin varlığı 15 farklı termofilik bakteri (*Anoxybacillus* ve *Geobacillus*) taranmış ve belirlenmiştir. Bu veriler kullanılarak yapılacak karakterizasyon çalışmaları ile diğer türlerle karşılaştırma yapılabilir,
3. Korunmuş bölgeler incelenerek yapılacak mutasyonlar ile enzimin aktivitesinde ne gibi değişiklikler olduğu incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Andrade, C., Pereira, N., and Antranikian, G., 1999.** Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30, 287-298 .
- Arda, M., 2000.** Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi no:46, Ankara.
- 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.
- Blau, N., Thöny, B., Cotton, R. G. H., and Hyland, K., 2001.** Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Vale, D., Childs, B., Vogelstein, B. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1725–1776.
- 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, pp 25-34.
- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Gotze, E., Herrmann, A., Gutlich, M., and Bacher, A., 1998.** Biosynthesis of Pteridines, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 43, Issue of October 23, pp. 28132–28141.
- Brock, T. D., 1985.** Life at High Temperatures, *Science*, Vol. 158, 1012-1019.
- 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.
- 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. *Ann Neurol*; 58: 164–167.
- De Saizieu, A., Vankan, P., and van Loon, A., 1995.** Enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* GTP cyclohydrolase I. *Biochem. J.* 306, 371-377.
- 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* Eds.: Milstien, S., Kapatos, G., Shane, B., Levine, R.A.

- 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. *Inherit. Metab. Dis.* 27, 455-463.
- Grochowski, L.L., Xu, H., Leung, K., and White, R.H., 2007.** Characterization of an Fe(2+)-dependent archaeal-specific GTP cyclohydrolase, MptA, from *Methanocaldococcusjannaschii*. *Biochemistry* 46, 6658-6667.
- Güven, R. G., 2011.** Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 09: 1, 1-10.
- Hartley, B. S., Hanlon, N., Jackson, R. J., and Rangrajan, M., 2000.** Glucose isomerase: insight into protein engineering for increased thermostability. *Biochem Biophys Acta* 1543, pp. 294–335.
- Haki, G.D. and Rakshit, S., 2003.** Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review. *Bioresour Technol.* 89, 17–34.
- 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*, Vol. 69, No. 12, 7507–7513.
- 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.
- 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.
- 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.
- Karaoğlu, Hakan., 2004.** *Anoxybacillus gonensis* D-Glukoz (D-Ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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 GTP Cyclohydrolase I, Causing Recessive

- Hyperphenylalaninemia, Is Responsible for Dopa-Responsive Dystonia With Parkinsonism: A Case Report. *Movement Disorders*, Vol. 19, No. 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.
- Kristjansson, M.M. and Asgeirsson, B., 2002.** Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology. Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, p.77-99.
- 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* Vol: 135(3). 375-378.
- Lee, S., Ahn, C., Park, E., Hwang, D.S., and Yim, J., 2002.** Biochemical characterization of oligomerization of *Escherichiacoli* GTP cyclohydrolase I. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 255-261.
- 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. *Biochem. J.* 373, 681–688.
- 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.
- Muntau, A. C., Röschinger, M., Habich, M., Demmelmair, H., Hoffmann, B., Sommerhoff, C. P., And Roscher, A. R., 2002.** Tetrahydrobiopterin As An Alternative Treatment For Mild Phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.*, Vol. 347, No. 26, 2122-2132.
- Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, V. W. 1993.** Harper'ın Biyokimyası. Çev.: Gülriz Menteş ve Biltan Ersöz. Barış Kitabevi. İstanbul. 913 sayfa.
- Özer, Işıl., 2004.** Fenilketonüri Örneğinde Doğumsal Metabolik Hastalıklarda Genel Tedavi Yaklaşımı. *Klinik Pediatri* 3(1), 26-30.
- 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. *J. Mol. Biol.* 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*, Vol. 24, No. 2; 127-150.
- 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 Biol.* 9 (11), R161.
- Schoedon, G., Troppmair, J., Fontana, A., Huber, C., Curtius, H.C., and Niederwieser, A., 1987.** Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and Mouse, *European Journal of Biochemistry*, Volume 166, Issue 2, pages 303–310.
- 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.
- Spaaen, 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. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24; 352-358.
- Steinberger, D., Blau, N., Goriunov, D., Bitsch, J., Zuker, M., Hummel, and S., 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. *Eur. J. Biochem.* 271, 349–355.

- Suzuki, Y., Yasui, T., and Abe, S., 1979.** Occurrence of GTP cyclohydrolase I in *Bacillusstearothermophilus*. *J. Biochem.* 86, 1679-1685.
- Tanaka, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., and Masui, R., 2005.** Novel reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. High-resolution X-ray crystallography of *Thermusthermophilus* HB8 enzyme complexed with a transition state analogue, the 8-oxoguanine derivative. *J. Biochem.* 138, 263-275.
- 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* Vol. 32, Part 2, 290-292.
- Tiefenbacher, C. P., Lee, C. H., Kapitza, J., Dietz, V., and Niroomand, F., 2003.** Sepsis reduces postischemic injury in the rat heart. *Eur. J. Physiol.* 447:1-7.
- Trefz, F. K., and Blau, N., 2003.** Potential Role of Tetrahydrobiopterin in the Treatment of Maternal Phenylketonuria. *Pediatrics* Vol. 112 No. 6, 1566-1569.
- URL-1, 2006.** http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/cocuk/Ders_Konulari/SEMINER_PANELLER/ESKI_YILLAR/YENIDOGANLARDA-METABOLIK-TARAMA.ppt#302, (26 Nisan 2011).
- URL-2, 2006.**
http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Dahili_Tip/Cocuk_Sagligi/Mustafa_Kendirci/Do%20C4%9Fu%20C5%9Ftan%20Kal%20B1tsal%20Metabolik%20Hastal%20C4%B1kl ar.ppt (6 Haziran 2011).
- URL-3, 2013.** <http://www.schircks.com/pteridines/PtePrices/PtePricesAlphLinked.pdf>, Tetrahydrobiopterin Tablets (5 Mart 2013).
- URL-4, 2013.** http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.5.4.16 (2 Mart 2013).
- URL-5, 2013.** http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=4.2.3.12, (2 Mart 2013).
- URL-6, 2013.** http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.1.1.153 (2 Mart 2013).
- URL-7, 2013.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/212637849> (1 Mart 2013).
- URL-8, 2013.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/212637849?from=1083734&to=1084336&report=gbwithparts> (1 Mart 2013).
- URL-9, 2013.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/374294493?report=fasta> (1 Mart 2013).

- Wei, C. C., Crane, B. R., and Stuehr, D. J., 2003.** Tetrahydrobiopterin Radical Enzymology, *Chem. Rev.* 103, 23565-2383.
- Witter, K., Cahill, D. J., Werner, T., Ziegler, I., Rödl, W., Bacher, A., And Gütlich, M., 1996.** Molecular cloning of a cDNA coding for GTP cyclohydrolase I from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 319, 27-32.
- Woo, H. J., Kang, J. Y., Choi, Y. K., and Park, Y. S., 2002.** Production of Sepiapterin in *Escherichia coli* by Coexpression of Cyanobacterial GTP Cyclohydrolase I and Human 6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 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., 2002.** *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.
- Yoo, J.C., Han, J.M., Ko, O.H., and Bang, H. J., 1998.** Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from *Streptomyces tubercidicus*, a producer of tubercidin. *Arch. Pharm. Res.* 21, 692-697.

ÖZGEÇMİŞ

18 Temmuz 1984 yılında Rize’de doğdu. İlköğrenimini 50. Yıl İlkokulu’nda ve ortaöğrenimini Şevket Yardımcı İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini de Fener Lisesi’nde (Yabancı dil ağırlıklı) tamamladı. 2003’de KTÜ Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2007 bahar yarıyılında aynı üniversiteden mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü OFMA Biyoloji Öğrenimi Tezsiz Yüksek Lisans’a başladı ve 2009 yılında mezun oldu. Eylül 2009’da Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.