

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİSANSÜSTÜ TEZ SAVUNMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ BAŞLIĞI : Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin *ptps* Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

SUNAN : Efsun ÇELİK

DANIŞMAN : Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

SAVUNMA

TARİHİ : 24.01.2018

SAATİ : 11:00

YERİ : Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kat 4, D405

ÖZET

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 yolakta 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 hücresinde 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.

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