

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus gonensis G2^T CTP SENTETAZ GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE
AMONYAK-BAĞIMLI CTP SENTETAZ AKTİVİTESİNİN
KARAKTERİZASYONU

Ayşegül SARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus gonensis G2^T CTP SENTETAZ GENİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE
AMONYAK-BAĞIMLI CTP SENTETAZ AKTİVİTESİNİN
KARAKTERİZASYONU

Ayşegül SARAL

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anoxybacillus gonensis G2T CTP SENTETAZ GENİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE AMONYAK-BAĞIMLI CTP SENTETAZ
AKTİVİTESİNİN KARAKTERİZASYONU

AYŞEGÜL SARAL

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.06.2011

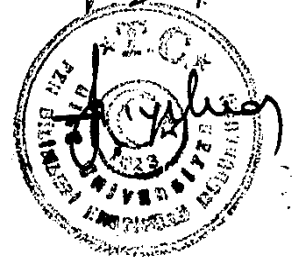
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 15.07.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Fatih YILMAZ



RİZE 2011

ÖNSÖZ

Anoxybacillus gonensis G2^T suşuna ait sitidin 5'-trifosfat sentetazın saflaştırılması ve karakterizasyonu konulu tez çalışması, Rize Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımı yürütürken gerek deneyler sırasında gerekse tezimin yazımı sırasında değerli bilgilerini ve fikirlerini benimle paylaşan, tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI' ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Ayşegül SARAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Enzim Kaynağı Olarak Mikroorganizmaların Kullanılması	2
1.2.1. Termofiller	3
1.2.2. <i>Anoxybacillus gonensis</i>	3
1.3. Glutamin Amidotransferazlar	3
1.4. CTP Sentetaz	5
1.4.1. Ctp Sentetazın Sınıflandırılması.....	5
1.4.2. Ctp Sentetazın Yapısı ve Çalışma Mekanizması.....	5
1.4.3. Ctp Sentetaz İle ilgili Literatür Taraması	10
1.5. Ctp Sentetazın Primidin Biyosentezindeki Rolü	13
1.6. Ctp Sentetazın Fosfolipid Biyosentezindeki Rolü.....	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. <i>Anoxybacillus gonensis</i> Bakterisinin Büyütülmesi	15
2.2. Çalışmada kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyerleri ve Vektörler	15
2.3. Çözeltiler ve Tamponlar	17
2.4. Kompetent Hücre Hazırlanması	17

2.5.	<i>pyrG</i> Geninin Tüm Nükleotit Sırasının Belirlenmesi.....	17
2.5.1.	<i>EcoRI</i> Klonlarının <i>E.coli</i> DH5 α Hücrelerine Transformasyonu ve <i>ctp</i> Sentetaz Genini Taşıyan Hücrelerin Belirlenmesi.....	18
2.6.	<i>pyrG</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	18
2.7.	<i>pyrG</i> Genin (<i>ctp</i> sentetaz) <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Belirlenmesi.....	18
2.7.1.	<i>pyrG</i> Geninin Ekspresyonunun İndüklenmesi.....	18
2.7.2.	<i>pyrG</i> Gen Ürününün (<i>ctp</i> sentetaz) Saflaştırılması	19
2.7.3.	SDS-PAGE Analizi	20
2.8.	Protein Örneğinin Diyalizi.....	21
2.9.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	21
2.10.	Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi	21
2.11.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	21
2.12.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	22
2.13.	Enzimin V_{max} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi	22
2.14.	Enzimin Isıl Kararlılığının Belirlenmesi	22
2.15.	Aminoasit Sıralarının Karşılaştırılması ve Filogenetik Analiz	23
3.	BULGULAR	24
3.1.	<i>pyrG</i> Geninin Nükleotid Dizilimi.....	24
3.2.	<i>pyrG</i> Geninin pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	25
3.3.	<i>E.coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gözlenmesi ve Ctp Sentetaz Enziminin <i>E.coli</i> BL21 Hücrelerinden Saflaştırılması	26
3.4.	Protein Konsantrasyonunun ve Enzim Aktivitesini Belirlenmesi	26
3.5.	Enzime Ait Optimum Sıcaklık Değeri	27
3.6.	Enzime Ait Optimum pH.....	27
3.7.	Enzime Ait V_{max} ve K_m Değerleri.....	28
3.8.	Enzime Ait Isıl Kararlılık	29
3.9.	Aminoasit Sıralarının Karşılaştırılması Filogenetik Benzerliğin Araştırılması	30
4.	TARTIŞMA.....	34
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
	KAYNAKLAR.....	39
	EKLER	43
	ÖZGEÇMİŞ.....	48

ÖZET

Sitidin 5'-trifosfat sentetaz (CTPs) primidin metabolizmasında son basamağı katalizleyen enzimdir. CTPs, ATP tarafından aktifleştirilen UTP'ye amino grubunu aktararak CTP oluşumunu katalizler. Nükleotid biyosentezinin bölünen hücrelerdeki öneminden dolayı CTPs anti-tümöral, anti-parazitik ilaçlar için hedefdir. Bu enzimin moleküler ve biyokimyasal özelliklerinin bilinmesi yeni ilaçların geliştirilmesi açısından önemlidir. Bakterilere ve insana ait CTPs yapısal olarak oldukça benzerdir. Bakterilere ait CTPs ile yapılan çalışmalar, insanlara ait CTPs ile yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Bu çalışmada termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2^T (*Agon*) bakterisinin ctp sentetaz geni (*pyrG*) ürünü biyokimyasal olarak karakterize edildi ve nükleotid ve amino asit benzerliklerinden yararlanılarak akrabalık dereceleri incelendi. Bu amaç doğrultusunda; (1) *Agon* genomik DNA'sı izole edildi ve *EcoRI* enzimi ile oluşturulan genomik kütüphaneden shotgun tekniği kullanılarak *pyrG* gen sırası bulundu, (2) elde edilen nükleotid diziliminden yararlanılarak hem nükleotid hemde aminoasit verileri kullanılarak benzerlik ağaçları oluşturuldu, (3) *pyrG* geni pET-15b vektörüne klonlandı ve *E. coli* (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)pLysS hücrelerine transforme edilerek ekspres edilmesi sağlandı, (4) rekombiant olarak üretilen protein MagneHis Purifikasyon Kiti kullanılarak saflaştırıldı ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) saflığı belirlendi (5) *pyrG* genine ait proteinin biyokimyasal özellikleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuç olarak enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 65⁰C ve optimum pH'sının 9 olduğu belirlendi. Enzimin aktivitesinin 65⁰ C ve yukarısındaki ısı uygulamalarında azaldığı bulundu. K_m değeri yaklaşık 12,415 mM ve V_{max} değeri yaklaşık 0,381 U/L olarak hesaplandı. k_{cat} değeri ise yaklaşık 0,762 s⁻¹ olarak hesaplandı. Benzerlik ağaçlarında ise *Agon* bakterisinin en fazla *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine benzer olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Sitidin 5'-trifosfat sentetaz, *Anoxybacillus gonensis* G2^T, biyokimyasal karakterizasyon, ekspresyon, klonlama.

SUMMARY

Cloning, Expression, Purification of Ctp synthetase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T and Characterization of NH₃-Dependent Activity of Ctp synthetase

Cytidine 5'-triphosphate synthetase (CTPs) catalyzes the last step in the pyrimidine metabolism. In that reaction, UTP was activated by ATP and used for CTP synthesis by CTPs. Because of the importance of nucleotide biosynthesis in dividing cells, CTPs is a goal for anti-tumor and anti-parasitic drugs. Knowledge of the molecular and biochemical properties of this enzyme is important for the development of new drugs. Cytidine 5'-triphosphate synthetase (CTPs) of bacteria and human are structurally very similar to each other. Studies done with bacteria will shed light on future studies about humans CTPs.

In this study, ctp synthetase gene (*pyrG*) product was biochemically characterized from thermophilic *Anoxybacillus gonensis* G2^T (*Agon*) and its nucleotide sequence was used to investigate the genetic similarity. For this purpose; (1) genomic DNA was isolated from *Agon* and cutted by *EcoRI* enzyme to generate genomic library. *pyrG* gene sequences was identified with shotgun method using this library. (2) The genetic similarity was generated by using both nucleotide and amino acid sequences. (3) *pyrG* gene was cloned into pET-15b expression vector and protein was expressed in *E. coli* (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)pLysS strain. (4) The recombinant protein was purified with using MagneHis Purification System (Promega) and its purity was proved with sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). (5) The pure enzyme was biochemically characterized by spectrophotometrically. We found that enzyme has optimum activity at 65 °C and pH:9.0 and it lost its activity after 65 °C. K_m and V_{max} were calculated approximately 12,415 mM, 0,381 U/L respectively. K_{cat} value was calculated approximately 0,762 s⁻¹. The similarity trees showed that *Agon* and *Anoxybacillus flavithermus* were similar to each other much more than the other species.

Keywords: Cytidine 5'-triphosphate synthetase, *Anoxybacillus gonensis* G2^T, biochemical characterization, expression, cloning.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persülfat
Asn	Asparjinin
<i>Agon</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
⁰ C	Derece
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CTP	Sitidin trifosfat
CDP	Sitidin difosfat
CMP	Sitidin monofosfat
Cys	Sistein
DTT	Ditiyoteritol
GTP	Guanozin trifosfat
GATase	Glutamin amidotransferaz
GD-CPSase	Glutamin-bağımlı karbamoil fosfat sentaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim komisyonu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
[E _T]	Toplam enzim
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glisin
HEPES	4-(2-Hidroksil)-1-piperazinetanesülfonik asit
His	Histidin
H ₂ S	Hidrojen sülfür
H ₂ O	Su
IPTG	izopropiltiyo-b-galaktosid
KCl	Potasyum klorür
K _{cat}	Dönüşüm sayısı
L	Litre
LB	Lauria-Bertani

LBA	Lauria-Bertani agar
Leu	Lösin
mM	Milimolar
ml	Mililitre
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klörür
NH ₃	Amonyak
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
OD	Optik yoğunluk
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
ppi	Pirofosfat
pi	Fosfat
purF	Sınıf II amidotransferaz
PRPP	Fosforibozil pirofosfat
RE	Restriksiyon enzimi
Rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
[S]	Substrat derişimi
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
TEMED	Tetrametiletilendiamid
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
U	Enzim ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Ctp sentetazın katalizlediği reaksiyonlar.....	5
Şekil 2. UTP' den CTP sentezinin basamakları	6
Şekil 3. İnsan CTPS sentetaz domaini.....	7
Şekil 4. <i>E. Coli</i> Ctp sentetazı dimer ve monomer formu.....	8
Şekil 5. Dış kaynaklı NH ₃ ' ün girişine yakın bulunan Leu 109' un lokalizasyonu....	9
Şekil 6. CTP sentaz monomerinde meydana gelen yapısal değişimler için bir model.....	10
Şekil 7. <i>pyrG</i> geninin tüm nükleotid sırası	24
Şekil 8. pET15b vektörüne klonlanan <i>pyrG</i> geninin %1,2'lik agaroz jel analizi.....	25
Şekil 9. SDS-PAGE Analizi	26
Şekil 10. Enzim-aktivite grafiği.....	27
Şekil 11. <i>A. gonensis</i> ctp sentetaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi.....	27
Şekil 12. Enzime ait pH' ya bağlı kalan aktivitenin gösterilmesi	28
Şekil 13. Hanes-Woolf grafiği.....	29
Şekil 14. Kalan aktivite-sıcaklık grafiği	30
Şekil 15. Korumuş G...RLG dizisinin gösterilmesi.....	31
Şekil 16. Nükleotid verileri kullanılarak <i>A. gonensis</i> 'in diğer bakteri türleri ile olan yakınlığının gösterilmesi	32
Şekil 17. Amino asit verileri kullanılarak <i>A. gonensis</i> 'in diğer bakteri türleri ile olan yakınlığının gösterilmesi	33

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Farklı türlere ait ctp sentetazın biyokimyasal özelliklerinin Karşılaştırılması.....	12
Tablo 2. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler	17
Tablo 3. SDS-PAGE Bileşenleri	20
Tablo 4. Filogenetik analiz verilerinin GenBank Numaraları	23
Tablo 5. % Kalan Aktivitenin Hesaplanması	29

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ctp sentetaz enzimleri (CTPs), NH_3 veya L-glutamini kullanarak ATP'ye bağımlı UTP' den CTP sentezlenmesini katalizler. GTP, glutamin hidrolizini teşvik eden allosterik aktivatördür. CTP sentetaz enziminin dahil olduğu glutamin amidotransferazlar grubu enzimler iki domainden oluşan bir polipeptid zincirine sahiptir. Proteinin C-terminal glutamin amid transfer domaininde glutamin hidrolizinin katalizlenmesi sonucu amonyak oluşur ve amonyak UTP' nin aminlenmesinin katalizlendiği N-terminal domaine transfer edilir. CTPs sitozin nükleotidlerinin *de novo* sentezinin son basamağını katalizler.

E. coli (*Escherichia coli*) CTP sentetazı kinetik ve fiziksel özellikleriyle birlikte en iyi karakterize edilmiş CTP sentetazdır ve regülasyonu komplekstir. GTP pozitif allosterik efektör olarak glutamin-bağımlı CTP sentezinin etkinliğini 45 kat artırır, fakat NH_3 substratken etkisi önemsizdir. Ayrıca enzimin aktivitesi ürün tarafından inhibe edilir (CTP geri beslemeli inhibisyon). ATP ve UTP enzimin aktif formunun oluşması için gerçekleşen tetramerizasyonu teşvik etmek için sinerjik olarak hareket eder. CTPs' nin dimer formu glutamin hidrolizini katalizleyebilir, yapılan çalışmalarda ATP ve UTP' nin eklenmesi glutaminaz aktivitesini arttırmıştır [1].

CTPs nükleik asitlerin ve zar fosfolipitlerinin biyosentezinde önemli bir role sahiptir. CTPs anti-viral, anti-protozoal ve hücre transformasyonunu inhibe eden ilaçlarının geliştirilmesinde hedefdir. Hücre hayat siklusunda S fazında DNA replike olur. Bunun olması için ortamda pürin ve primidinlerin olması gerekir. Primidin sentezinin son basamağının gerçekleşmesi için CTPs' ye ihtiyaç vardır. Tümör hücreleri çoğaldıkça büyümeleri ve hayatta kalabilmeleri için daha fazla nükleotide ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden tümör oluşumunda nükleotid biyosentezinin önemli bir rolü vardır. Nükleotid biyosentezinde ve modifikasyonunda rol alan enzimler birçok kanser tipinde yüksek oranda üretilirler. Bu yüzden bu enzimler kanser terapisinde hedefdir. Ctp sentetaz aktivitesi sıçan veya insan kanser hücrelerinde artar ve sentetaz aktivitesi antikanser ajanı siklopentenil sitozin ile inhibe edilir [2]. Eğer bu enzimi kodlayan genin moleküler yapısı ve regülasyonu iyice anlaşılırsa anti-tümöral ilaçlar geliştirilebilecektir. Ayrıca gen tedavisi metodlarında geliştirilebilecektir. Gen tedavisi eksik genlerin yerine konması, yanlış veya fazla çalışan genlerin susturulması ve bazı genlerin işlevlerinin değiştirilmesini kapsar [3].

Bakterilerde var olan ctp sentetaz enzimi primidin metabolizmasında görevli bir enzimdir ve bakterinin hayat siklusu için gerekli bir enzimdir. Nükleotitlerin hücrel havuzları (ATP) dışında çok küçüktür ve olasılıkla hücrenin DNA' sını sentezlemek için gerekenin %1' i veya daha azıdır. Dolayısıyla nükleotit sentezi nükleik asit sentezi sırasında devam etmelidir ve bazı durumlarda DNA replikasyonu ve transkripsiyonu hızlarını sınırlayabilir [4]. Bakteriler *de novo* yollar olmadan kurtarma yollarıyla hayat döngülerini tamamlayıp tamamlayamadığını anlamak için *de novo* yolundaki enzimler inhibe edilebilir veya genomdan çıkartılabilir. Bunun için enzimin ve çalışma mekanizmasının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Thermus thermophilus CTP sentetazının üç boyutlu yapısı çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda ATP, UTP, GTP ve glutaminin enzimin hangi bölgelerine bağlandığı bulunmuştur [5]. Bu çalışmada bulunan önemli aminoasitler, ctp sentetazın hücre metabolizmasındaki öneminden dolayı farklı türlerde de korunmuş olabilir.

1.2. Enzim Kaynağı Olarak Mikroorganizmaların Kullanılması

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Ekstremofilik mikroorganizmalar; yüksek ve düşük sıcaklıklarda, pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak üzere adapte olmuşlardır. Bu koşullarda yaşayan bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı oldukları için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmışlardır [6]. Ayrıca mikroorganizmalar bitki ve hayvanlara göre daha kolay genetik manipülasyonlara tabii tutulabilirler [7].

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme

açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir. Enzimler ile katalizlenen reaksiyon 0 – 40 °C arasında reaksiyon hızı yükselir. Fakat 40 °C’ de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C’ de enzim tamamen bozulur. 40 °C bu enzim için optimum ısıdır. Bu noktada çözüm olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir [6].

1.2.1. Termofiller

Sıcak su kaynaklarında ve diğer termal ortamlarda bulunan ve optimum gelişme sıcaklığı 45-80 °C olan organizmalar termofil olarak adlandırılır. Bunların enzim ve diğer proteinlerinin sıcaklığa dayanıklılığı mezofillerinkinden daha fazladır. Bu organizmalar yüksek sıcaklıklarda optimum düzeylerde işlevseldirler. Enzim yapılarında sadece birkaç noktadaki kritik amino asit değişikliği, bu enzimin sıcaklığa dayanıklı üç boyutlu yapı kazanmalarını sağlamaktadır. Termofiller sitoplazmik zarlarının yüksek sıcaklıklarda kararlı ve işlevsel kalmasına olanak verecek şekilde doymuş yağ asitleri bakımından zengin lipidlere sahiptirler [8].

1.2.2. *Anoxybacillus gonensis* G2^T

Balıkesir Gönen Kaplıcası’ndan 2003 yılında Beldüz ve ark. tarafından izole edilerek literatüre kazandırılmış yeni bir termofilik bakteri türü *Anoxybacillus gonensis*’ tir. *Anoxybacillus gonensis* G2^T spor oluşturan, Gram pozitif, çomak şekilli, 0,75 x 5,0 µm büyüklüğünde ve hareketli bir bakteri suşudur. Terminal endospor oluştururlar. Pürüzlü, krem renginde koloni oluştururlar. Zayıf katalaz-pozitifler. Oksidaz pozitifler. Bu izolatin büyümesi için optimum sıcaklık 55-60°C’ dir ve termofiliktir. Fakültatif anaerobtur ve glukoz, nişasta, ksiloz ve mannitol gibi çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilirler. Nitratı nitrite indirgeyemezler. Üreaz, indol ve H₂S üretmezler. %4 NaCl konsantrasyonunda büyüeyebilirler. Büyüdükleri pH aralığı 6.0-10.0’dır. *Bacillus* genusuna aittirler [9].

1.3. Glutamin Amidotransferazlar

Glutamin amidotransferazlar glutaminden amino grubunu alıp, spesifik substratına transfer eder ve böylece yeni bir karbon-nitrojen grubu oluştururlar. Glutamin

amidotransferaz domaini, glutamin amidotransferazlar olduğu gibi tek bir polipeptid zinciri olarak veya CPSase' te olduğu gibi çok fonksiyonlu büyük bir sentaz proteini olarak bulunabilir. GATase (glutamin amidotransferaz) ayrı bir polipeptidik altünite şeklinde veya sentaz domainine birleşmiş büyük bir polipeptid zinciri olarak bulunabilir. İki tip glutamin amidotransferaz vardır: Sınıf I Amidotransferazlar (trpG) ve Sınıf II Amidotransferazlar (purF). Korunmuş Cys/His/Glu katalitik üçlüsü Sınıf I Amidotransferazlar için karakteristiktir. Korunmuş katalitik üçlü, sınıf I amidotransferazların aktif bölgesini oluşturur ve sistein amidotransferaz aktivitesi için gereklidir. Sınıf II Amidotransferazlarda aktif bölge enzimlerin N-terminal ucundaki sistein tarafından oluşturulur. Ayrıca asparjinin (Asn) ve glisin (Gly) tetrahedral formun kalıcı hale gelmesinde rol oynar. Sınıf II Amidotransferazların üç boyutlu yapısı, N-terminal nükleofil hidrolazlarınkine benzer bir katlanmayla alfa-beta-beta-alfadan oluşan dördü bir yapı gösterir. Bu yapı sınıf II amidotransferazlara nükleofilik saldırı yapabilmeyi ve otokatalitik aktiviteyi sağlar. Sınıf II Amidotransferazların N-terminal pozisyonu ve katalitik sisteinin katlanması, sınıf I amidotransferazların aktif bölgesini oluşturan Cys-His-Glu üçlüsünün katlanmasından oldukça farklıdır.

Sınıf I Amidotransferazlar:

- Anthranilate sentaz(AS)
- 4-amino-4-deoksichorismate (ADC)
- GMP sentaz
- Glutamin bağımlı karbamoil-fosfat sentaz (GD-CPSase)
- Fosforibozilformilglisinamidin sentaz
- İmidazol gliserol fosfat sentaz
- CTP sentaz (CTPs) [10].

Sınıf II Amidotransferazlar:

- Amido fosforibozil transferaz
- Glukozamin fruktoz-6-fosfat transferaz
- Asparjin sentetaz
- Glutamat sentaz [11].

1.4. CTP Sentetaz

1.4.1. Ctp Sentetazın Sınıflandırılması

Enzim Komisyonu numarası (EC numarası) enzimleri katalizledikleri kimyasal reaksiyonlarına bağlı bir numaralandırma sistemidir. Enzim adlandırma sistemi sonucunda her EC numarası ona karşılık gelen enzim için bir isimle eşlendirilmiştir.

Ctp sentetaz enziminin sistematığı:

Sistemik adı: UTP amonyum ligaz

Diğer isimleri: Sitidin trifosfat sentetaz, Uridin trifosfat aminaz, Sitidin 5'trifosfat sentetaz.

E.C.6. 3. 4. 2 Ctp Sentetaz

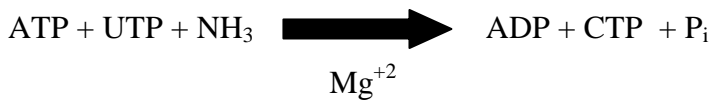
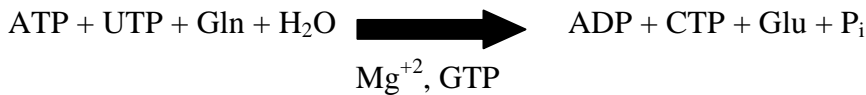
E.C.6 Ligazlar: ATP parçalanmasıyla eş zamanlı olarak yeni C-O, C-S, C-N veya C-C bağlarının oluşumu sonucu iki molekülün birleşmesini sağlarlar.

E.C. 6. 3:Karbon-azot bağlarını oluşturan ligazları içerir.

Reaksiyon: ATP + UTP + NH₃ = ADP + fosfat + CTP [12].

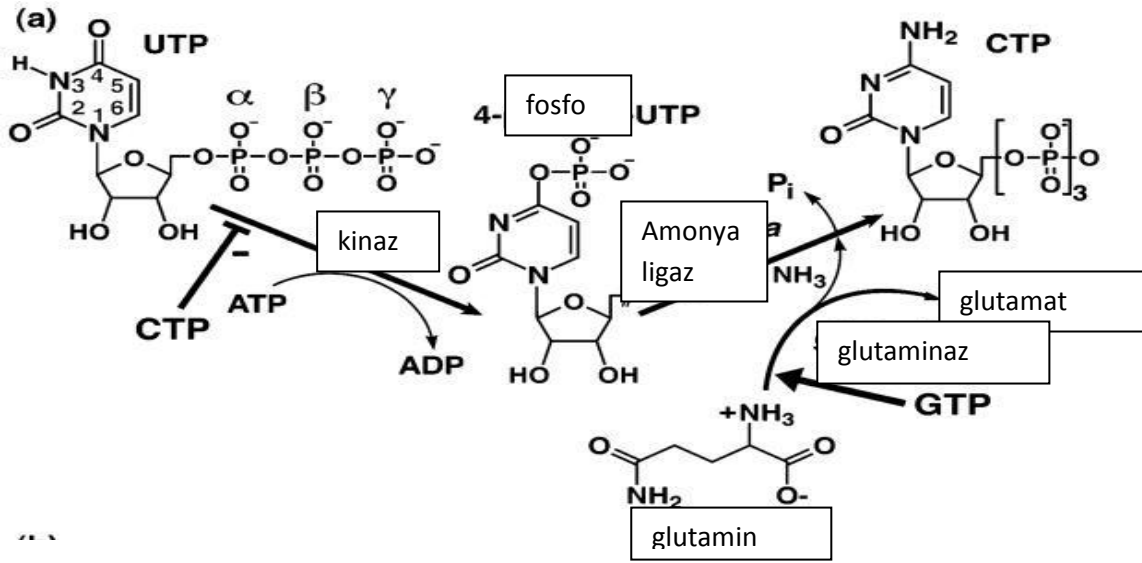
1.4.2. Ctp Sentetazın Yapısı ve Çalışma Mekanizması

Ctp sentetazı kodlayan genler; bakterilerde *pyrG* geni, bazı gram pozitif bakterilerde *ctrA* geni, *Saccharomyces cerevisiae*' de URA7 ve URA8 genleri ve insanlarda CTPS1 ve CTPS2 genleridir [13]. Glutamin bağımlı amidotransferazlardan biri olan CTP sentetaz, glutaminaz ve sentetaz domaini içerir. Enzim, glutaminin veya amonyağın amid bağını kırar ve azotu sentetaz domainine transfer eder ve aminlenmiş ürün oluşur. Ctp sentetaz glutaminaz domaininde Cys-His-Glu üçlüsünün varlığı ile karakterize edilen sınıf I glutamin-bağımlı amidotransferazların üyesidir. Ctp sentetaz CTP biyosentezinin son basamağını katalizler. Glutaminaz domaininde yeni oluşturulan amonyak sentetaz domaininde CTP üretmek için ATP ile fosforillenmiş UTP ile reaksiyona girer.



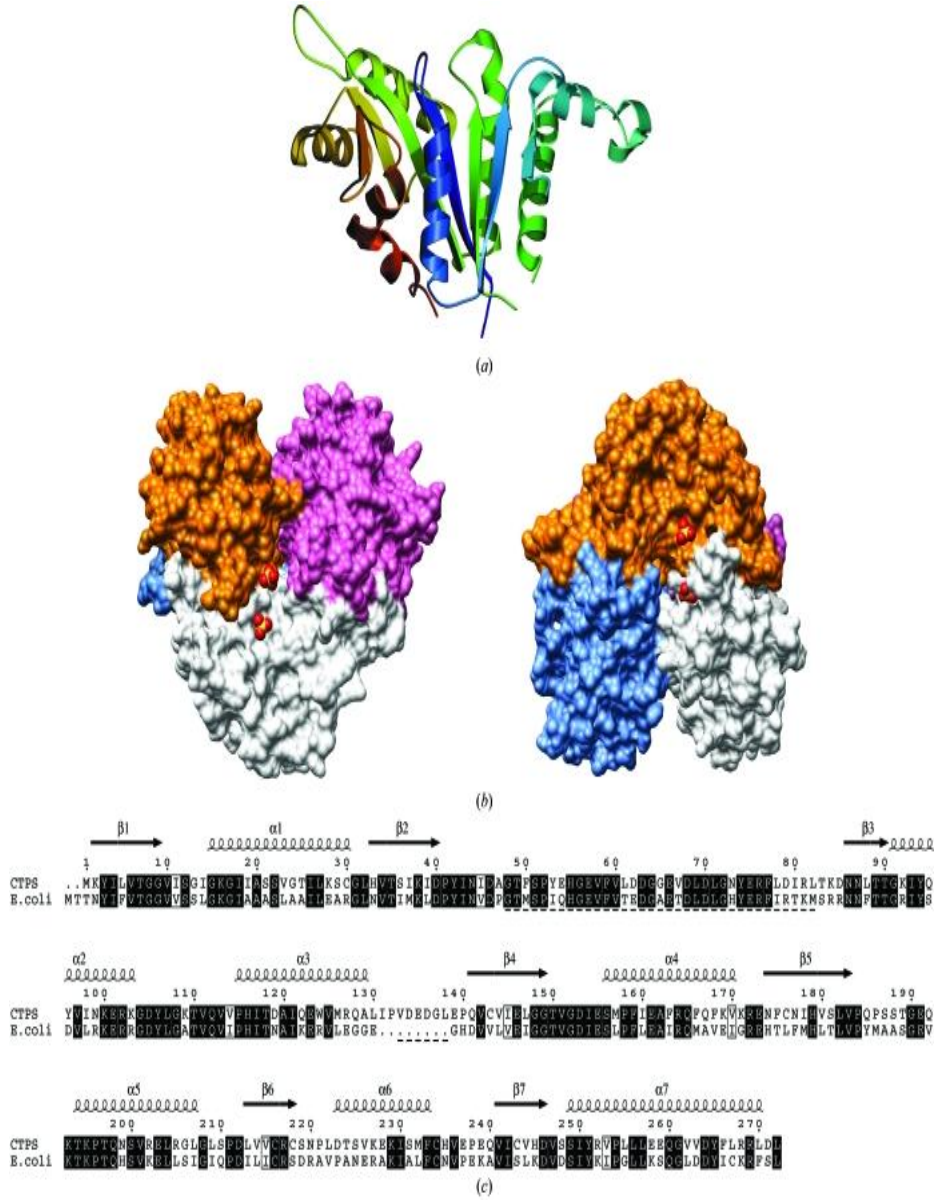
Şekil 1. Ctp sentetazın katalizlediği reaksiyonlar

GTP glutamin-bağımlı ctp sentezinde pozitif allosterik efekördür. Fakat glutamin-bağımlı ctp sentezinde GTP' nin konsantrasyonu 0,15 mM' ın üstündeyse sitidin 5'-trifosfat (CTP) oluşumu ihhibe edillir. GTP'nin bağlanmasının glutamin hidrolizi üzerine etkisi yoktur. Eğer NH₃ dış kaynaklıysa (glutamin hidrolizi sonucu oluşmayıp, reaksiyon ortamından alınıyorsa) GTP enzime bağlandığında CTP oluşmaz. Fakat NH₃ glutamin hidrolizinden açığa çıkarsa, enzime GTP bağlandığında CTP oluşur. GTP enzime bağlandığında eğer substrat dış kaynaklı NH₃ ise GTP aktif bölgeyi kapatabilir fakat substrat glutamin hidrolizi sonucu oluşan NH₃ ise GTP amonyum tüneli oluşturulmasına katkı sağlar ve CTP oluşur. GTP'nin UTP'nin fosforillenmesinde ATP veya UTP ile yarıştığı gözardı edilebilir. Çünkü ATP veya UTP'nin yüksek konsantrasyonları bile GTP inhibisyonunun üstesinden gelemmez. GTP substrat olarak ATP' nin yerine geçemez. ATP ve UTP enzimin aktif formunun oluşması için gerçekleşen tetramerizasyonu teşvik etmek için sinerjik olarak hareket eder [14].

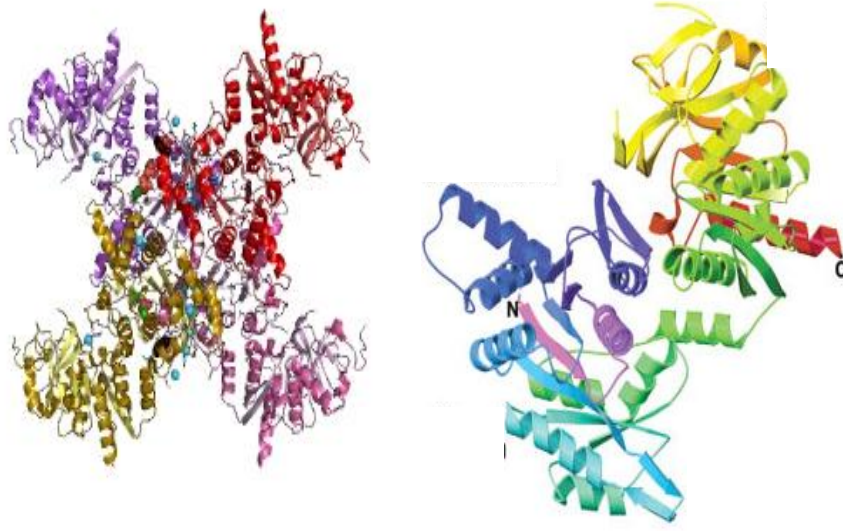


Şekil 2. UTP' den CTP sentezinin basamakları

Yapılan çalışmalarda glutaminaz ve sentetaz domainlerinin üç boyutlu yapısı ve iki domain arasındaki bağlantı çalışılmıştır. İnsan CTP sentetazının sentetaz domainin kristal yapısı bulunmuştur. Sentetaz domaini homotetrameriktir. Ayrıca ATP ve UTP' nin bağlandığı aktif bölgesi de bulunmuştur. Aktif bölgenin bulunmasıyla kanser hücrelerinde CTP sentetaz aktivitesini ihhibe eden ilaçların geliştirilmesi artacaktır. Yapılan çalışmalarda, insan CTPs sentetaz domaini yapısı bakteri CTPs sentetaz domainine benzer olduğu görülmüştür.

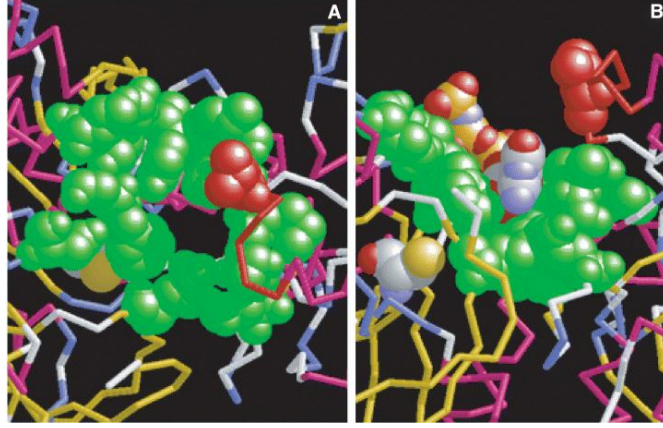


Şekil 3. İnsan CTPS sentetaz domaini. a. Monomerin yapısı. Etrafi helikslerle kaplı beta tabaka yapısındadır. b. Tetramer oluşmu. Tetramerin yüzeyinde aktif bölgeler bulunmaktadır. Monomerlerin renkleri; Beyaz, Mavi, Mor ve Turuncu. Şekil sağa doğru 90^0 döndürülmüştür. c. E. coli ve insan CTPS sekansı [15].



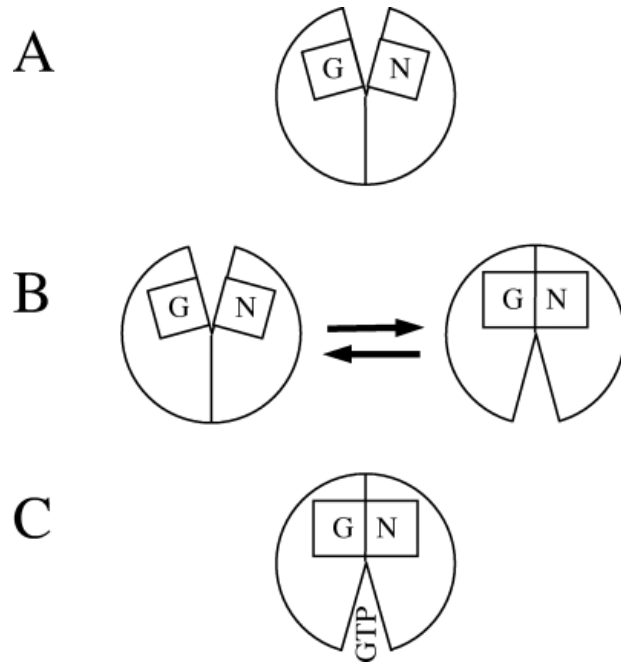
Şekil 4. *E. Coli* Ctp sentetazı dimer ve monomer formu. Monomer formunda; açık mor kısmı enzimin N-terminal ucu, kırmızı kısım C-terminal uç, açık mavi kısım amidoligaz (sentetaz) domaini, koyu mavi kısım iki domaini birbirine bağlayan bölge, yeşil kısım glutamin amidotransferaz domaini göstermektedir [16].

E. coli ile yapılan çalışmada farklı substratların ve mutasyonunun etkisiyle amonyak tünelinin oluşumu çalışılmıştır. *E. coli*' de Leu109, glutamin amidotransferaz ve sentetaz domainleri ayıran yarığı içeren alt ünitenin bitişiğinde bulunan bir aminoasittir. Bu aminoasitte mutasyon yapılarak enzimin yapısı daha ayrıntılı olarak çalışılmıştır. GTP bağlanmasının enzimde konformasyonel değişimlere neden olduğu *E. coli* ve *L. lactis*' te (*Lactococcus lactis*) görülmüştür. GTP bağlanması enzimin iki domainini bir araya getirir. GTP bağlanmasıyla meydana gelen konformasyonel değişimler ve lösinin, alanin aminoasit ile yer değiştirmesi sonucu NH_3 tüneli daralır ve düğümler oluşur. Bu değişimler Gln-bağımlı reaksiyonda glutamin hidrolizi boyunca sürer. Bunla ilgili model Şekil 5' te gösterilmektedir. Leu109 mutasyonu kataliz için gerekli konformasyonel değişimleri geciktirebilir ya da çok fazla düğüm oluşur. Düğüm dış kaynaklı NH_3 ' ün giriş yolunda olabilir [17].



Şekil 5. Dış kaynaklı NH_3 ' ün girişine yakın bulunan Leu 109' un lokalizasyonu. a. Yeşil renkle gösterilenler dış kaynaklı NH_3 ' ün gireceği girişi oluşturan aminoasitlerdir. Sarı renkte gösterilen katalitik nükleofil Cys379' dur. Kırmızı renkte gösterilen Leu109 bitişiğindeki alt ünedir. b. Dış kaynaklı NH_3 ' ün üzerinde Leu109 askıda kaldığı gösterilmiştir. GTP yarığı kapatır ve GTP üzerine Leu109' un kapanması gösterilmiştir. Bunun sonucunda amonyağın girmesi için oluşan yarık kapanır [17].

GTP *E. Coli*' de glutamin hidrolizini aktive ederken, *L. lactis*' te (*Lactococcus lactis*) glutamin hidrolizini aktive etmesinin yanında UTP fosforilasyonunu koordine ederek CTP sentezini de uyarır. Fosforillenmiş UTP, CTP sentezinde koaktivatördür. *L. lactis*' e ait ctp sentetaz enziminin monomeri ile ilgili çalışmalar yapılmış ve monomerde meydana gelen yapısal değişimlerle ilgili bir model oluşturulmuştur. Bu model Şekil 6' da gösterilmektedir.



Şekil 6. CTP sentetaz monomerinde meydana gelen yapısal değişimler için bir model. a. Glutaminaz ve sentetaz domaini birleşmemiş, CTP oluşumu gerçekleşmez. Nükleotidler yokluğunda yapısal değişimler olmaz. b. GTP yokluğunda Ctp sentezi. GTP yokluğunda enzimde yapısal değişimler az seviyede oluşur ve enzim aktif formunu kazanır. c. GTP varlığında CTP sentezi. GTP enzimi aktif formuna dönüştürür. Ayrıca ctp sentezi için gerekli olan fosforillenmiş UTP' nin oluşumu için yan zincirlerin bir araya gelmesi bu konformasyonel değişimler sonucu meydana gelir. Amonyak-bağımlı sentez A'da gösterilen enzim modeli tarafından gerçekleştirilir. G, glutaminaz domaini; N, CTP sentetaz domaini [13].

1.4.3. Ctp Sentetaz İle ilgili Literatür Taraması

Ctp sentetaz aktivitesi ilk olarak 1955 yılında Liebermann tarafından ortaya çıkarılmıştır. Liebermann *E. coli* ekstraktlarının glutamin, UTP, ATP ve GTP' ye ihtiyaçları olduğu bulunmuştur. Chakraborty ve Hulbert enzimin in vitro olarak NH_3 ' ten direkt olarak yararlanabileceğini ortaya koymuştur. *E. Coli* CTPs Long ve Pardee tarafından saflaştırılmıştır. Ayrıca substrat tarafından uyarılan allosterik etkiyi, CTP tarafından inhibisyonu ve GTP' nin allosterik aktivasyonunu çalışmışlardır. Glutamin hidrolizi reaksiyonu, substrat-bağımlı oligomerizasyonu ve GTP' nin kinetik etkileri Long, Levitzki ve Koshland tarafından çalışılmıştır. Substrat spesifikliği Scheit ve Linke tarafından keşfedilmiştir. UTP' nin aktivasyonunda ATP' nin rolü Villafranca, Anderson ve çalışma

arkadaşları tarafından bulunmuştur. Anderson ve arkadaşları saflaştırmayı geliştirmişlerdir ve substratların oligomerizasyon üzerine etkisi daha iyi karakterize etmişlerdir [18].

Çeşitli prokaryotik ve ökaryotik canlılara ait ctp sentetaz enzimi çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda enzimin yapısı, çalışma mekanizması, enzimin çalıştığı pH aralığı ve sıcaklık aralığı, enzimin inhibitörleri ve aktivatörleri hakkında bilgi elde edilmiştir. Tablo 1' de yapılan bazı çalışmaların sonuçlarını bulunmaktadır.

Tablo 1. Farklı türlere ait ctp sentetazın biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

	İnhibitör	Kofaktör	Aktivatör	K _m (mM)	Moleküler ağırlık	K _i (mM)	Spesifik aktivite (µmol/min/mg)	pH Aralığı	Sıcaklık Aralığı	Saklama Koşulları	Referans
<i>Bos taurus</i>	3-Deazaürüdin 5'-trifosfat, cyclopentylcytosine triphosphate			0.07	263000 dimer		0.015				[19]
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CTP			0.097							[20]
<i>Escherichia coli</i>	1-metilürük asit, 1,7-dimetilürük asit	ATP	GTP	Gln 0,424	210000 tetramer	3,36 10mM UTP	5,8	7.3-10.3	37	-20 C	[21], [22], [23], [24], [25]
<i>Homo sapiens</i>	Siklopentenil sitozin	ATP	GTP	0.002			0,0025	8	37		[26], [27]
<i>Lactococcus lactis</i>	adenozin [beta,gamma-imido]trifosfat	5'-	GTP	0,259 Gln 30C pH 8.0	280000 tetramer	0,182				-20 C	[28], [29], [30]
<i>Mus musculus</i>	CTP		GMP		118000	1.1	0.06	7.3-9.5		2-merkapt etanol	[31], [32]
<i>Rattus norvegicus</i>				0.07				7-9			[33]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CTP	ATP	2-merkapt etanol	0.04			0.66	7.5-9		-80 ⁰ C 6 ay	[34], [35], [36], [37]
<i>Trypanosoma brucei</i>	asivisin			0.26 Gln		0.0023	0.5515	7.3	37		[38]

1.5. Ctp Sentetazın Primidin Biyosentezindeki Rolü

Nükleotidler, nükleik asitlerin yapı taşları olarak besinlerde bulunur. Hücre içeren besinlerle alınan nükleik asitler, mide enzimlerinden etkilenirler ve duodenumda pankreas nükleazlarının etkisiyle parçalanırlar. Pankreas ribonükleazı, RNA'yı, pirimidin mononükleotidleri ve pirimidin 3'-fosfat kalıntısı ile son bulan oligonükleotidleri serbestleştirmek suretiyle hidroliz eder. Deoksiribonükleaz, Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonları varlığında etki gösterir ve spesifik olarak DNA'yı oligonükleotidlere hidroliz eder. İnce bağırsak mukozasında oluşan diesterazların oligonükleotidleri mononükleotidlere hidroliz ettiğine inanılmaktadır. İnce bağırsakta serbestleşen mononükleotidler, bağırsak fosfatazları veya nükleotidazları tarafından hidroliz edilirler; nükleozid ve fosfat'a ayrılırlar. Nükleozidler, olasılıkla bağırsakta hidroliz edilmeden emilirler. Nükleozidlerin N-glikozid bağı, dalak, karaciğer, böbrek, kemik iliği gibi çeşitli dokularda spesifik nükleozid fosforilazlar tarafından katalize edilen bir reaksiyonda koparılır.

Vücutta serbest bazlar ve nükleozidlerden nükleotidlerin kurtarılma yolunda yeniden nükleotid oluşturulabilir. Ayrıca prekürsör amino asitler, riboz-5-fosfat, CO_2 ve NH_3 ' tan *de novo* olarak pürin ve pirimidin nükleotidleri sentezlenebilir. Pirimidin nükleotidlerinin *de novo* sentezi PRPP (fosforibozil pirofosfat), glutamin, CO_2 , aspartat ve timin nükleotidleri için H_4 -folat türevleri gereklidir. Ancak pürin nükleotidlerinin *de novo* sentezi riboz-5-fosfat ile başlayıp riboz-5-fosfat ile ilerlediği halde pirimidin nükleotidlerinin *de novo* sentezinde riboz-5-fosfat, pirimidin bazı oluşuktan sonra PRPP' tan transfer edilerek baza eklenir. Pirimidin halkasının atomları, aspartat, CO_2 ve glutaminden sağlanır [39]. Aspartattan UTP oluşumunda çeşitli enzimler görevlidir ve oluşan ara metabolitler şunlardır: N-karbamoylaspartat, L-dihidroorotat, Orotat, Orotidilat ve Üridilattır. Primidin metabolizmasında son basamağı Ctp sentetaz katalizler. UTP' nin aminlenmesiyle CTP oluşur [4].

1.6. Ctp Sentetazın Fosfolipid Biyosentezindeki Rolü

Fosfolipidler, iki basamakta sentezlenir. Birinci basamak, triaçilgliserol senteziyle ortaktır. L-gliserol 3- fosfatın 1. ve 2. karbonu, yağ açıl grupları ile esterifiye edilir. 2. basamakta ise, polar baş grubu, spesifik kinazlar aracılığı ile fosfodiester bağı ile moleküle eklenir. İki (-OH) grubu, fosfodiester bağı ile birleştirilir. Bu (-OH)' lerden biri polar baş grupta bulunan (-OH) grubu, diğeri de gliserolün 3. karbonundaki (-OH) grubudur. Bu sırada H_2O açığa çıkar. Fosfolipidlerin sentezinde, sitidin difosfatın (CDP), moleküle

yapışması ile aktivasyon meydana gelir. CDP, ya diaçilgliserole yapışır (CDP-diaçilgliserol oluşur) ya da baş grubunun (-OH) kısmına yapışır. Her iki durumda da oluşan bu bileşikler aktifleşmiş bir ara madde durumundadır. Bu yapışma sırasında da, diğer (-OH) grubu ile CMP hemen yer değiştirir ve sonuç olarak gliserofosfolipid oluşur. Sitozin monofosfat (CMP) fosfoliserit sentezinde bir yan ürün olarak oluşur. Ökaryotik hücreler her iki yolu da kullanırken, prokaryotik hücreler sadece ilk yolu (CDP, diaçilgliserole yapışır) kullanır.

Sitidin nükleotidlerinin lipid biyosentezinde kullanıldığını ilk kez 1960' li yıllarda Eugena P. Kennedy bulmuştur. *E. coli*, fosfolipidlerin sentezi sırasında CDP-diaçilgliserolü kullanır. *E. coli*' de, fosfatidik asit, CTP ile kondense olur ve sonuç olarak CDP-diaçilgliserol oluşur. Bu reaksiyonda pirofosfat açığa çıkar. Daha sonra CMP, gliserol 3-fosfatın 1. karbonundaki (-OH) grubu ile veya serinin (-OH) grubu ile yer değiştirir (nükleofilik yapışma). Sırasıyla fosfatidilgliserol 3-fosfat ve fosfatidilserin meydana gelir. Daha sonra fosfatidilgliserol 3-fosfattan fosfat monoesteri (Pi)' nin ayrılması ile fosfatidilgliserol meydana gelir. Bu reaksiyonu, fosfatidil 3-fosfat fosfataz katalizler [40].

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Anoxybacillus gonensis* Bakterisinin Büyütülmesi

Anoxybacillus gonensis (Agon) bakterisi 3 mL LB broth besiyerine gliserol stoktan ekim yapılarak 55 °C’de 16 saat inkübe edilerek büyütüldü [41].

2.2. Çalışmada kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyerleri ve Vektörler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir: agaroz (Sigma), akrilamid (Sigma), bisakrilamid (Sigma), amonyum persülfat (Merck), asetik asit (Sigma), glasiyel asetik asit (Sigma), gliserol (Sigma), glisin (Sigma), glukoz (Merck), dNTP (Fermentas), rNTP (Fermentas), brom fenol mavisi (BioRad), coomassie brilliant blue-R 250 (Sigma), coomassie brilliant blue G (Bio Rad), etidyum bromür (BioRad), ampisilin (USB), metanol (Sigma), etanol (Sigma), TEMED (BioRad), SDS (Merck), NaCl (Fluka), KCl (Merck), MgCl₂ (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), Agar (Merck), NH₄Cl (Merck), HEPES (Sigma).

Çalışma kapsamında kullanılan enzimler aşağıdaki gibidir: lizozim (Sigma), RNase A (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), *Eco*RI (Fermentas), *Xho*I (Fermentas), T4 DNA ligaz (Biolabs).

Çalışmada kullanılan LB besiyerleri Maniatis ve arkadaşlarına göre hazırlandı [41]. LB (Lauria-Bertain) besiyeri 5 gr maya özütü, 10 gr tripton ve 5 g NaCl 1 litrede suda çözülerek hazırlandı. LBA ise 1 litre LB besiyerine 16 g agar ilavesi ile hazırlandı. 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kitler ve vektörlere ait bilgiler şu şekildedir: Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), pGEM-T Easy Vector TA Cloning Kit (Promega), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), QIAquick PCR Pruduct Purificayion Kit (Qiagen) ve Ni Histaq Protein Purification Kits (Promega), pET-15b (Novagen).

Çalışmada kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler şu şekildedir: Diyaliz membranı ve Whatman 3 MM paper (Whatman).

Bu tez kapsamında *Anoxybacillus gonensis* (Agon) bakterisi; ctp sentetaz genini klonlanması için genomik DNA’nın temini için; *E. coli* DH5α hücreleri (F⁻, ø80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *hsd*R17(rK⁻, mK⁺), *pho*A,

supE44, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) ara klonlamaların transformasyonu için ve *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri rekombinant ctp sentetaz genininin ekspresyonu için (pLysS (F-, *ompT*, *hsdSB*(rB-, rB-), *dmc*, *gal*, l(DE3), pLysS, Cmr) kullanıldı.

Sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlandı ve filtre ederek kullanıldı. Hazırlanan tamponlar otoklavlandı. Sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

- **%30' luk Akrlamidin Hazırlanışı:** 100 g akrilamid ve 2.65 g bisakrilamid tartıldı. Saf su ile 250 ml' ye tamamlandı. Karanlıkta 4⁰C' de saklandı.
- **%10 SDS' nin Hazırlanışı:** 10 g SDS tartıldı ve saf su ile 100 ml' ye tamamlandı. Karanlıkta, oda sıcaklığında saklandı.
- **%10 APS' nin Hazırlanışı:** 5 g APS tartıldı ve üzeri 50 ml saf su ile tamamlandı. 4⁰C' de saklandı.
- **4X Ayırma Jeli Tamponunun Hazırlanışı (1.5 M Tris, pH 8.8):** 36.3 g Tris-Base tartıldı ve biraz saf su eklendi. pH HCl ile 8.8' e ayarlandı. Saf su ile 200 ml' ye tamamlandı. 4⁰C' de saklandı.
- **4X Yükleme Jeli Tamponu Hazırlanışı (0.5 M Tris, pH 6.8):** 15.1 g Tris tartıldı. HCl ile PH 6.8' e ayarlandı. Saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.
- **2X Örnek Yükleme Boyasının Hazırlanışı:** 2.5 ml 4X Yığıma jel tamponu, 2 ml %20 'lik gliserol, % 0.02 Bromofenol mavisi 40 μ l ve 5.5 ml deiyonize su karıştırılarak elde edildi.
- **Yürütme Tamponunun Hazırlanışı:** Glisinden 28.8 g ve Tris-Base' den 6 g tartıldı. Son hacim 2 litre olacak şekilde deiyonize su eklendi. Bu karışımın ayarlanmadan pH' sı yaklaşık 8.3 olmalıdır.
- **Boyama Solusyonunun Hazırlanışı:** 0.25 g Coomassie Brilliant Blue R250, 125 ml metanol, 25 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml deiyonize eklenerek karışım hazırlandı. İlk önce boya metanolde çözüldü, daha sonra asit ve su eklendi.
- **Yıkama Solusyonunun Hazırlanışı:** 50 ml etanol, 10 ml glasiyal asetik asit ve 40 ml deiyonize su karıştırılarak elde edilir [43].

2.3. Çözeltiler ve Tamponlar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 2' deki gibidir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler

Kullanılan Çözelti	Kullanım Amacı
50 mM Hepes Tamponu (pH:8.0)	Diyaliz Tamponu
60 mM Hepes Tamponu (pH: 9.0)	ctp sentetaz aktivite tamponu
165 mM EDTA	4 X sonlandırma solusyonu (Protein örneklerinin analizi için)
600 mM NH ₄ Cl	Substrat (Enzim aktivite deneyleri için)
100 mM KCl	İyonik gücün devamlılığını sağlayan çözelti (Enzim aktivite deneyleri için)
100 mM MgCl ₂	İyonik gücün devamlılığını sağlayan çözelti (Enzim aktivite deneyleri için)
Tris-Base tamponu	SDS-PAGE tamponu

2.4. Kompetent Hücre Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* DH5 α ve BL21(DE3)pLysS suşlarına ait komponent hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı [42]. Öze ile 3 mL LB besiyerine 1 gece önceden tek bir koloni seçilerek ekim yapıldı ve sıvı kültür gece boyunca 37 °C' de 200 rpm' de sallanarak büyütüldü. Hazırlanan gece kültürünün yoğunluğu 600 nm' de ölçülerek belirlendi ve 0,1 olacak şekilde yeniden 30 ml LB besiyerine ekildi. Optik yoğunluk 600 nm' de 0,4–0,6 arasına ulaşınca hücreler 4 °C' de 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 10 mL soğuk 0,1 M CaCl₂ ilave edilerek çözüldü ve 30 dakika buz içinde bekletildi. Sonrasında 4 °C' de 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltilinde süspansiyon edilerek 200 μ L hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanıldı.

2.5. *pyrG* Geninin Tüm Nükleotit Sırasının Belirlenmesi

Shotgun tekniği kullanılarak ctp sentetaz geninin tüm nükleotit dizilimi *Agon* bakterisinden tanımlandı. Bunun için 2 μ g *Agon* DNA' sı *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile gece boyu kesildi. Kesim ürünleri, PZR temizleme kiti (Qiagene) kullanılarak temizlendi. Temizleme işlemini üretici firmanın belirttiği yöntem takip edilerek yapıldı. pUC18 vektörü de aynı şekilde *EcoRI* ile kesilerek jelden jel ekstraksiyon kiti (Qiagene) kullanılarak temizlendi ve her ikisi 10 ünite T4 DNA ligaz ile (Fermentas) 10 μ l hacimde

1X T4 ligasyon tamponu kullanılarak 16 °C’ de gece boyu inkübe edilerek ligasyonu sağlandı. Elde edilen ligasyon ürünü transformasyon deneylerinde kullanıldı.

2.5.1. EcoRI Klonlarının *E.coli* DH5a Hücrelerine Transformasyonu ve ctp Sentetaz Genini Taşıyan Hücrelerin Belirlenmesi

Agon bakterisine ait pUC18 kütüphanesi, kompetent *E.coli* DH5a hücrelerine transforme edildi ve ampisilin, IPTG ve X-gal içeren petrilere yayıldı. 37⁰C’ de gece inkübasyon sonrası pozitif koloniler mavi-beyaz koloni oluşumuna göre seçildi [42]. Belli sayıda koloniden plazmit izole edilerek baz dizin analizi edildi ve *pyrG* genini taşıyan klonlar belirlendi. Bu hücrelerin taşıdığı plazmit tam baz dizin analizi edilerek *pyrG* geninin tam nükleotid sırası belirlendi. Elde elden nükleotid sırası Expasy Proteomic Server kullanılarak amino asit sırasına dönüştürüldü. Veriler GenBank’a kaydedildi.

2.6. *pyrG* Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Agon pyrG geni ekspresyon için pET15b ekspresyon vektörünün *XhoI* bölgesine klonlandı. Bu bölgeye klonlamanın yapılabilmesi için *pyrG* geni ctp_*XhoI*_Fw: 5’-ATACTCgAgATgACAAAATATATTTTTgTAACAgg-3’ ve ctp_*XhoI*_Rw: 5’-CAgCTCgAgTCATCCgggCAgCgTgTCgAgCgC-3’ primerleri kullanılarak *Agon* genomundan PZR ile çoğaltıldı. Primerlerin 5’ uçlarına klonlamayı kolaylaştırmak için *XhoI* restriksiyon enzimi eklendi. PZR ürünü ve pET15b vektörü *XhoI* ile kesilerek ligasyon için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlandı ve ekspresyon hücresi olan *E. coli* BL21 hücrelerine transfer edildi.

2.7. *pyrG* Genin (ctp sentetaz) *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Belirlenmesi

2.7.1. *pyrG* Geninin Ekspresyonunun İndüklenmesi

Agon ctp sentetaz genini içeren plazmitin transfer edildiği *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerinden rastgele tek bir koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyonun için seçilen tek bir koloni gece boyunca büyütüldükten sonra tekrardan iki tüpe yeniden ekildi ve 3 saat 37⁰C’ de inkübe edildikten sonra tüplerden bir tanesi IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek, diğeri ise indüklenmeden 3 saat daha büyütüldü.

İndükleme sonrasında hücreler santrifüj ile çökeltilerek her ml’ si 2 mg lizozim içeren Fast Cell Break (Promega) ve 1 mM DTT’ den oluşan tamponda çözülerek sonikatör ile patlatıldı. 20 dakika 52 °C’ de bekletildikten sonra 12.500 rpm’ de 20 dakika

santrifüj edilerek pellet uzaklaştırıldı. Süpernatant %12' lik SDS-PAGE'de yürütülerek sonuçlar gözlendi. SDS-PAGE analizi Maniatis ve arkadaşlarına göre yapıldı [42].

2.7.2. *pyrG* Gen Ürününün (ctp sentetaz) Saflaştırılması

Ekspresyonun gözlendiği *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücresi seçilerek 5 ml gece kültüründe büyütüldü. Sonrasında 200 mL 50 µg/ml ampisilin içeren taze besiyerine OD 600nm' de 0,1 olacak yoğunlukta seyreltilerek yeniden ekildi. OD 600'da hücre yoğunluğu 0,6 olana kadar hücreler büyütüldü ve son hacim 1 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklendi. İnkübasyona 4 saat daha devam edildi. Hücreler santrifüj ile toplandı ve pellet protein saflaştırma için kullanıldı. Üretilen rekombinant *Agon* ctp sentetaz enziminin saflaştırılma basamakları aşağıda verilmiştir.

- Pellete 600 µl MagneHis Purification System Lizis solusyonundan ve 10 mg/ml' lik lizozim solusyonundan 100 µl konuldu. -20°C' de 1 saat bekletildi.
- Sonikatör yardımıyla hücreler parçalandı (10 sn-3 kez).
- Elde edilen ekstrakt 14.000 rpm' de 20 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant yeni ependorf tüpüne aktarıldı. Böylece hücre ekstraktı uzaklaştırılmış oldu.
- 52°C' de 10 dk bekletildi. Bu işlemle *E. coli* ' ye ait proteinler denatüre oldu. *pyrG* gen ürü termofilik olduğundan denatüre olmadı.
- 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak denatüre olmuş proteinler ortamdan uzaklaştırıldı.
- Elde edilen süpernatantdan MagneHis Purification System (Promega) kullanılarak ctp sentetaz enzimi saflaştırıldı. Bunun için ısı şoku yapılarak *E.coli* ' den gelen proteinlerin kısmen uzaklaştırılmış olduğu ependorf tüp içindeki 1 ml ham özüte 120 µl vortekslenmiş Ni ilave edilip, oda sıcaklığında 2 dk alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem ile N-ucunda bulunan histidinden dolayı rekombinant protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak özütten ayrıldı.
- Ni parçalarını tüpün kenarına toplamak için tüp manyetik tutucuya yerleştirildi ve 30 sn bekledikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Manyetik tutucudan alınan ependorf tüp içine 1000µl Bağlama/Yıkama tamponu ilave edildi. 2 dk boyunca alt üst edilerek Ni parçalarının yıkanması sağlandı ve tüp 30 sn manyetik tutucuda tutulduktan sonra süpernatant atıldı.

- Yıkama işlemi 750µl Bağlama/Yıkama tamponu kullanılarak iki defa daha tekrarlandı.
- Ni parçaları üzerine 250µl elüsyon tamponu ilave edildi ve tüp oda sıcaklığında 2 dk alt üst edildikten sonra süpernatant yani saf enzim elde edildi. Enzim diyaliz edilerek (50 mM HEPES pH: 8.0) -20⁰C' de saklanır [7].

2.7.3. SDS-PAGE Analizi

Bileşenleri Tablo 3' de verilen oranlara göre hazırlanan ayırma jeli karışımı (%12'lik), elektroforez aletinin aparatında, sandviç şeklinde hazırlanmış iki cam (jel kaseti) arasına doldurularak polimerizasyona bırakıldı. Jel karışımı kaset içine döküldüğünde, üst yüzeydeki gerilim nedeniyle ortaya çıkan eğimli yüzey, bant dağılımının bozuk olmasına yol açar. Hem bunu, hem de yüzeyin hava ile temasını önlemek için polimerizasyon başlamadan önce jelin yüzeyi çok ince bir su veya su ile doyurulmuş n-bütanol tabakası ile kapatılır. APS (Amonyum persülfat) polimerizasyonu başlatır. TEMED ise polimerizasyon katalizörüdür [43].

Tablo 3. SDS-PAGE Bileşenleri

Bileşenler	%5' Yıgma (4ml)	lik Jeli	%12' lik Ayırma Jeli (10ml)	%8' Ayırma (10ml)	lik Jeli
Saf su	2,7		3,3	2,3	
%30 Akrilamid	0,67		4	1,3	
0.5 M Tris pH 6.8	0,5		-	-	
1.5 M Tris pH 8.8	-		2,5	1,3	
%10 SDS	0,04		0,1	0,05	
%10 APS	0,04		0,1	0,05	
TEMED	0,004		0,004	0,005	

Ayırma jeli polimerizasyonu tamamlandıktan sonra yıgma jeli döküldü ve tarak yerleştirildi. Bu sırada örnekler hazırlandı. Protein örneğinden 20 µl ve yükleme boyasından 10 µl alındı, 95 ⁰C' de 5 dakika bekletildi. 6 µl marker ve 10 µl boyaya da aynı işlem uygulandı. Yıgma jeli polimerize olunca tarak çıkarıldı, kuyucuklar oluştu. Jel kaseti tankın içine yerleştirildi, tankın içi (Bio-Rad Mini-Protean Sistem) yürütme tamponu ile dolduruldu ve örnekler kuyucuklara yüklendi. Tank kapağı kapatıldı ve güç kaynağına bağlandı. 58 mA geçmeyecek şekilde voltaj ayarlandı. 1.30-2 saat yürütme sonrasında güç

kaynağı durduruldu. Jel kasetinden jel çıkarıldı ve hazırlanan boyada yarım saat tutuldu. Daha sonra proteine bağlanmayan boyaları uzaklaştırmak, bantları görünür hale getirmek için jel yıkama solusyonunda bekletildi.

2.8. Protein Örneğinin Diyalizi

Diyaliz saflaştırmanın belli aşamalarında tuzların uzaklaştırılması veya tamponun değiştirilmesinde kullanılır. Diyaliz için diyaliz membranının hazırlanması gerekmektedir. Bunun için öncelikle 100ml saf su ve 2 ml gliserol manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra bu karışımın içine diyaliz membranı konuldu ve kaynatıldı. Diyaliz membranının içi ve dışı saf su ile yıkandı. Diyaliz membranının kenarları diyaliz kısıkaçlarıyla kapatıldı ve içine saflaştırılan protein mikropipet yardımıyla konuldu. Diyaliz tamponu olarak 50 mM HEPES tamponu (pH: 8.0) kullanıldı. Hazırlanan diyaliz membranı diyaliz tamponu içerisine bırakıldı ve 1 gece manyetik karıştırıcıda, 4⁰ C' de diyaliz gerçekleştirildi.

2.9. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu NanoDrop (Spectrophotometer 2000) cihazı kullanılarak belirlendi. Öncelikle 50 mM HEPES tamponundan 2 µl alınarak cihazda ölçüm yapıldı ve kör hazırlanmış oldu. Daha sonra saflaştırılan protein örneğinden 2 µl alındı ve 280 nm' de ölçüm yapıldı.

2.10. Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi

Enzimin aktivitesinin gösterilmesi için negatif kontroller (enzimin olmadığı ve substratın olmadığı-ayrı ayrı) ve reaksiyon bileşenlerinin tümünü içeren (60 mM HEPES tamponu pH: 8.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP; UTP, 25 mM KCl) pozitif kontrol 200 µl son hacimde hazırlanarak deneyler yapıldı. Reaksiyonlar 10 µl (~20 µg protein) enzim ilavesi ile başlatıldı. Hazırlanan karışımlar 48⁰ C' de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 20 µl EDTA (165 mM) ile reaksiyon sonlandırıldı. Aktivite, 291 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi (Molecular Device, SpectraMax).

2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimin en iyi çalıştığı sıcaklığı bulmak için farklı sıcaklıklarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. 60 mM HEPES tamponu (pH:8.0), 0.5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM

ATP, 1 mM UTP ve 60mM NH₄Cl karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. İyonik gücün devamlılığı için reaksiyon ortamına KCl eklendi. Reaksiyonlar 10 µl (~20 µg) enzim eklenmesiyle başlatıldı. Reaksiyonlar 22 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C ve 80 °C’ de inkübe edilerek, enzim aktivite yönteminde belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 20 µl EDTA (165 mM) çözeltisi eklenerek sonlandırıldı. Her bir sıcaklıkta yapılan aktivite deneyleri 291 nm dalga boyunda ölçüldü (Molecular Device, SpectraMax) ve her bir sıcaklıkta gerçekleşen aktiviteler belirlendi. Gözlenen aktivitelerden yararlanarak değerler grafiğe dönüştürüldü (Excel). Enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine pH’ nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH’ nın etkisini incelemek amacıyla belirli pH’ larda (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) HEPES (60mM) tamponu kullanılarak optimum sıcaklık değerinde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 165 mM EDTA ile sonlandırıldı. Aktivite ölçümlerinin değerlendirilmesi ile optimum pH değerleri belirlendi. Gözlenen aktivitelerden yararlanarak değerler grafiğe dönüştürüldü (Excel). Enzim aktivitesi için belirlenen optimum pH değeri daha sonraki deneylerde kullanıldı.

2.13. Enzimin V_{max} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi

NH₄Cl, 0-200 mM konsantrasyonlarında hazırlandı ve bu substratlarla 60°C’ de 30 dakikada reaksiyonlar (su banyosunda) gerçekleştirildi. Spektrel yöntemle absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerleriyle, Michealis-Menten eşitliğinden elde edilen Hanes-Woolf eşitliği kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı. Ayrıca dönüşüm sayısı olarak bilenen k_{cat} değeri de belirlendi.

2.14. Enzimin Isıl Kararlılığının Belirlenmesi

A. gonensis G2^T Ctp sentazının ısıl kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 60, 65, 70, 75, 80°C’ lerde 5’er dakika inkübe edildi. Daha sonra buza konularak enzimin çalışması için optimum şartlar hazırlandı. 60 mM HEPES tamponu (pH:8.0), 0.5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM UTP ve 60mM NH₄Cl karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. İyonik gücün devamlılığı için reaksiyon ortamına KCl eklendi. Reaksiyonlar ısı uygulaması yapılmış enzim özütlerinden ve ısı uygulaması yapılmamış enzim özütünden 10’ ar µl (~20 µg) eklenmesiyle başlatıldı. Kontrol 10µl su

ile başlatıldı. Spektrofotometrik yöntemle aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı.

2.15. Aminoasit Sıralarının Karşılaştırılması ve Filogenetik Analiz

Ctp sentetaz genine ait nükleotid sırası, Tablo 4’ de listelen bakterilerin aynı gene ait nükleotid sıraları GenBank’ tan elde edilerek filogenetik ilişkiyi göstermek için kullanıldı. Filogenetik ilişki hem nükleotid hem de amino asit verileri kullanılarak oluşturuldu. Filogenetik ağaç BioEdit ve Mega 5.0 programlarının yardımı ile oluşturuldu. Ayrıca türlere ait aminoasit sıraları Clustal W programıyla karşılaştırıldı.

Tablo 4. Filogenetik analiz verilerinin GenBank Numaraları [44]

Bakteri Türü	Nükleotid GenBank No	Amino asit Gen Bank No
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	EU675940.1	ACD45983.1
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	CP000922.1	ACJ35085.1
<i>Geobacillus kaustophilus HTA426</i>	BA000043.1	BAD77674.1
<i>Geobacillus sp.Y412MC61</i>	CP001794.1	ACX79994.1
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	BA000028.3	BAC14963.1
<i>Geobacillus thermodinitrificans NG80-2</i>	CP000557.1	ABO68673.1
<i>Geobacillus sp. WCH70</i>	CP001638.1	ACS25977.1
<i>Staphylococcus lugudensis HKU 09-01</i>	CP001837.1	ADC87035.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens LL3</i>	CP002634.1	AEB65389.1
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	CP002394.1	ADU32338.1
<i>Bacillus thuringiensis str. Al. Hakam</i>	CP000485.1	ABK88016.1
<i>Bacillus atropheus 1942</i>	CP002207.1	ADP34226.1
<i>Bacillus halodurans</i>	BA000004.3	BAB07511.1
<i>Bacillus cereus E3LL</i>	CP000001.1	AAU15242.1
<i>Bacillus licheniformis DSM13</i>	AE017333.1	AAU42777.1
<i>Brevibacillus NBRC 10599</i>	AP008955.1	BAH46469.1
<i>Enterococcus faecalis 62</i>	CP002491.1	ADX79824.1
<i>Escherichia coli str. K12</i>	U00096.2	AAC75822.1
<i>Thermus aquaticus Y51MC3</i>	ABVK02000001.1	EED11320.1

3. BULGULAR

3.1. *pyrG* Geninin Nükleotid Dizilimi

Shotgun yöntemi kullanılarak *pyrG* geninin tüm nükleotid diziliminin belirlenmesine yönelik çalışmalar neticesinde tüm genin nükleotid dizilimi belirlenmiş ve stop kodunu ile birlikte 1593 nükleotitten oluşan bir gen olduğu belirlenmiştir. Nükleotid dizilimi aminoasit dizilimine dönüştürüldüğünde 530 amino asitlik bir protein olduğu belirlenmiştir. Elde edilen nükleotid dizilimi Şekil 7’ deki gibidir ve nükleotid dizilimi EU675940.1 numarası ile, aminoasit dizilimi ise ACD45983.1 numarası ile GenBank’ a sunulmuştur.

```
atgacaaaatataatTTTTGtaacaggtggcgtcgtatcatcgcttgggaaaggaattacg
M T K Y I F V T G G V V S S L G K G I T
gctgcttacttggcgttattataaaaaatcgcggttgaagtgaccattcaaaaattt
A A S L G R L L K N R G L K V T I Q K F
gatccgtacattaacgttgacccaggaacgatgagtcctgatcaacatggagaagtgtt
D P Y I N V D P G T M S P Y Q H G E V F
gtcacagatgacggggcgaaacggacttagattaggccattacgagcgtttattgac
V T D D G A E T D L D L G H Y E R F I D
attaatttaaaacaaatacagcaacgtcacaacaggaaaaaatttattccaccgtattgaaa
I N L N K Y S N V T T G K I Y S T V L K
aaagaacgtcgcggcgattattaggaggaacggtacaagttattccgcacattacgaac
K E R R G D Y L G G T V Q V I P H I T N
gaaattaagagcgtgtgttttagggcaggacgtgagacgaatgcggatgttgttattacc
E I K E R V F R A G R E T N A D V V I T
gaaatcgggtggaacgggttggcgacattgaatctcttccatttttagaggccattcgtcaa
E I G G T V G D I E S L P F L E A I R Q
attaagcgtatgctgcgcgacaatgtgatgtacattcatgtacacttgtgccgtatatt
I K A M S S R Q C D V H S C T L V P Y I
aaagcggcaggtgaaatgaaaacgaaaccgacgcaacatagcgtcaaagaattgvcgacg
K A A G E M K T K P T Q H S V K E L R S
ttaggtattcagccaaacgtcatcgtcgtgcgcacagaaatgccgatgtctcaagatag
L G I Q P N V I V V R T E M P M S Q D M
aaagataaaattgctttgttctgcgacatcgatccgaaagcggttattgaagcgcgcgat
K D K I A L F C D I D P K A V I E A R D
gccgatacgtatatacgtgtaccgcttatgcttcaagaacaaaaattagatcaaattggt
A D T L Y A V P L M L Q E Q K L D Q I V
tgtgaacattttaaactaaactgcaacgaagcggatgatgacagagtgggttgcgcttgtt
C E H L K L N C N E A D M T E W V A L V
gaaaaagtgcgcaacttatcaacaaaaacgacgattgcgctcgttggaaaatagttgaa
E K V R N L S N K T T I A L V G K Y V E
ctacaagatgcgtatatttctgctcgaagcgttacgtcatgcaggatagtcctttgat
L Q D A Y I S V V E A L R H A G Y A F D
gctgacatcgatattcgttggattaactccgagcatgtcgatcgaacaatgtcgcctcag
A D I D I R W I N S E H V D R N N V A Q
ttgcttcaaggggtaaattggtattctcgttccgggcgatttggcgaccgcgcatcgaa
L L Q G V N G I L V P G G F G D R G I E
```

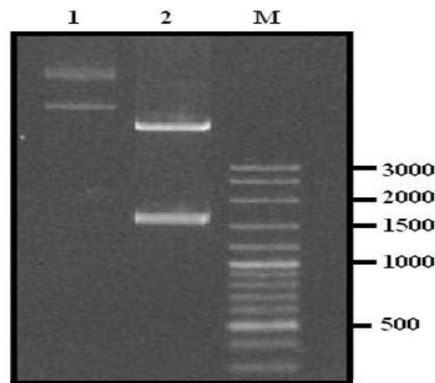
Şekil 7. *Anoxybacillus gonensis*’ e ait *pyrG* geninin nükleotid diziliminin amino asit dizilimi ile gösterilmesi (Expasy Proteomik Server kullanılarak çizilmiştir.)

Şekil 7' nin devamı

```
ggaaaaattgaggcgattcgctatgcgcggtgaacagcgtatccattccttggcatttgt
G K I E A I R Y A R E Q R I P F L G I C
ttaggtatgcagctagcgtctgtcgagttcgctcgtcatgtcgtcggcttaaaagggtgcg
L G M Q L A S V E F A R H V V G L K G A
cattcagcggaaatcgatccaagcacaccgcatccaattattgacttattgccagaacia
H S A E I D P S T P H P I I D L L P E Q
aaggacattgaagatttaggtggaacgcttcgcctcggcttataatccgtgcaagcttgtg
K D I E D L G G T L R L G L Y P C K L V
gaaggaacgaaagcgtacgacgcataatcaagatgaggtcgtttatgaacgcatcgccat
E G T K A Y D A Y Q D E V V Y E R H R H
cgttatgagtttaacaacgagtaccgtacgatgatggaagagaacggttttgttttttca
R Y E F N N E Y R T M M E E N G F V F S
ggtacaagcccagatggccgtcttgtcgaattgtcgaattgaaagatcacccatggttt
G T S P D G R L V E I V E L K D H P W F
gttgcgacagttccatccggagtttacatctcgtccgacgcgtccacagccgcttttc
V A A Q F H P E F T S R P T R P Q P L F
cgcgaatttattcgcgcacatcgttgcaaaaataa
R E F I R A S L Q K -
```

3.2. *pyrG* Geninin pET-15b Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

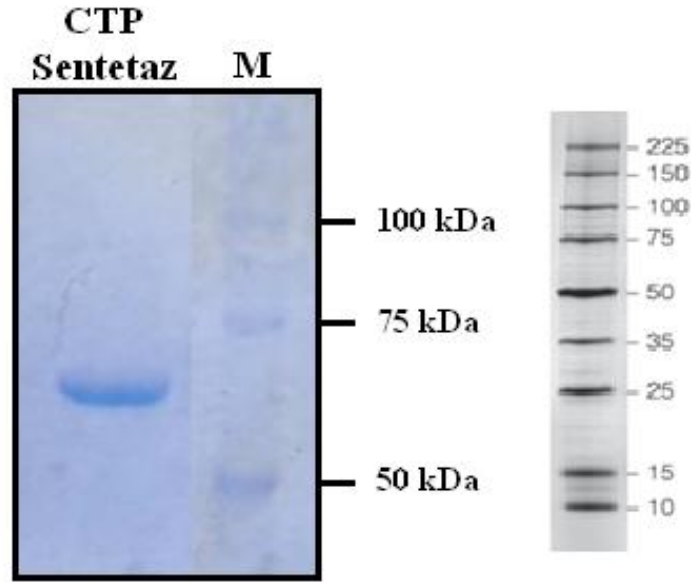
Baz dizilimi belirlenen *A. gonensis* G2^T *pyrG* geni ctp_XhoI_Fw ve ctp_XhoI_Rw primerleri kullanılarak pET-15b ekspresyon vektörüne HisTag kuyruğu içerecek şekilde klonlandı. Bu gen *E.coli* BL21(DE3) suşunda ekspres edildi. *PyrG* geni içeren rekombinant vektörün *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edilip edilmediğini doğrulamak için plazmit izolasyonu yapıldı. Şekil 8' de 1 nolu sütun, rekombinant plazmiti göstermektedir. 2 nolu sütun, bu rekombinant plazmitin *XhoI* ile kesim sonucunu göstermektedir. pET-15b vektörü yaklaşık 5500 baz çifti uzunluğundadır. *pyrG* geni ise 1593 baz çifti uzunluğundadır.



Şekil 8. pET15b vektörüne klonlanan *pyrG* geninin %1,2'lik agaroz jel analizi. M. Moleküler Ağırlık Standartları, 1: Rekombinant pET-15b vektörünün izolasyon sonucu, 2: Rekombinat pET-15b vektörünün *XhoI* ile kesim sonucu.

3.3. *E.coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gözlenmesi ve ctp Sentetaz Enziminin *E.coli* BL21 Hücrelerinden Saflaştırılması

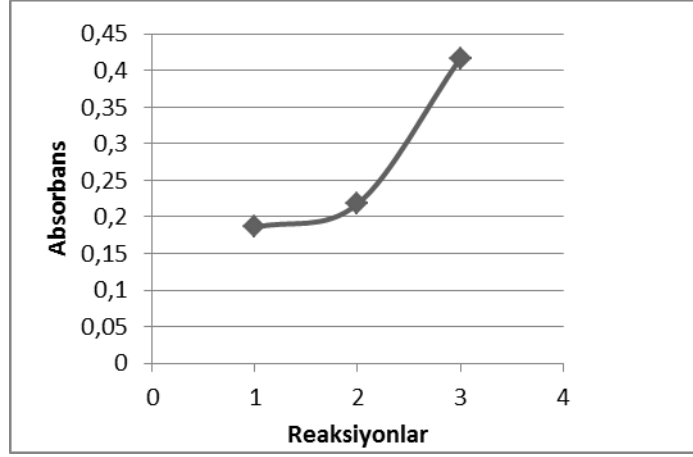
Ctp sentetaz enzimi IPTG ile indükleme sonucunda üretilmiştir. *E.coli*'den gelen proteinler ısı uygulaması ile uzaklaştırıldı. *E.coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edilen ctp sentetaz proteini N-ucunda 6 tane histidin içerdiğinden dolayı nikel parçacıkları kullanılarak saflaştırıldı. Ctp sentetazdaki bu histidin birimlerinin azotları, nikel parçacıkları ile etkileşerek ctp sentetazın diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır [7]. Saflaştırılan protein örneğinden 20 µl, % 12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez yapıldı. Elektroforez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda ctp sentetaz proteininin *E. coli*'de ekspres edildiği ve kullanılan kit ile etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9. *E. coli* BL21 (pLys) ekspresyon hücrelerinden saflaştırılan saf ctp sentetaz enziminin (% 12' lik) SDS-PAGE Analizi

3.4. Protein Konsantrasyonun ve Enzim Aktivitesini Belirlenmesi

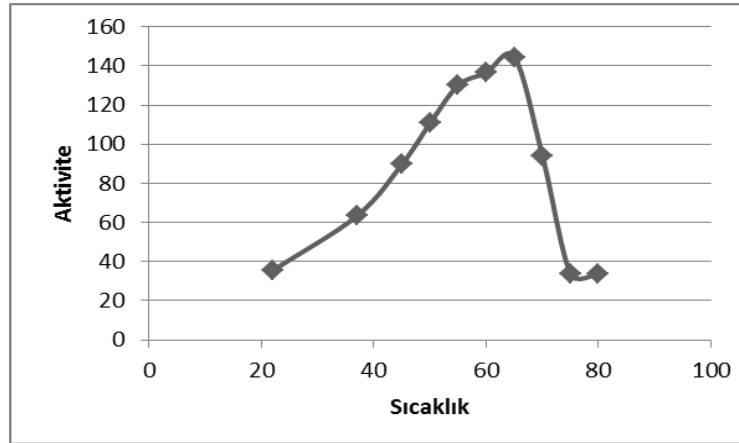
Protein konsantrasyonu 0,510 mg/ml olarak bulundu. 48 °C' de 30 dakika gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen absorbans değerlerine göre enzimin aktivite gösterdiği belirlendi. Kontrollerde 291 nm' de ölçülen absorbans değerlerinin, enzimin ve substratın bulunduğu karışımın absorbans değerinin yaklaşık yarısı kadar olduğu gözlemlendi. Saflaştırılan enzimin aktivitesi Şekil 10' da gösterilmektedir.



Şekil 10. Enzimin aktivitesinin gösterilmesi

3.5. Enzime Ait Optimum Sıcaklık Değeri

22-80 °C sıcaklık aralığında reaksiyonlar gerçekleştirildi. Enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Negatif reaksiyon örneğinin absorbansı 0,186 olarak bulundu. Farklı sıcaklıklarda elde edilen absorbanstan negatif örneğin absorbansı çıkarıldı. Elde edilen sonuçlarla sıcaklık-aktivite grafiği çizildi (Şekil 11). Enzim aktivitesinin 65 °C'ye kadar yükseldiği ve bu sıcaklıkta maksimum olduğu gözlemlendi. 65 °C' den sonra enzim aktivitesinde belirgin bir azalma gözlemlendi.

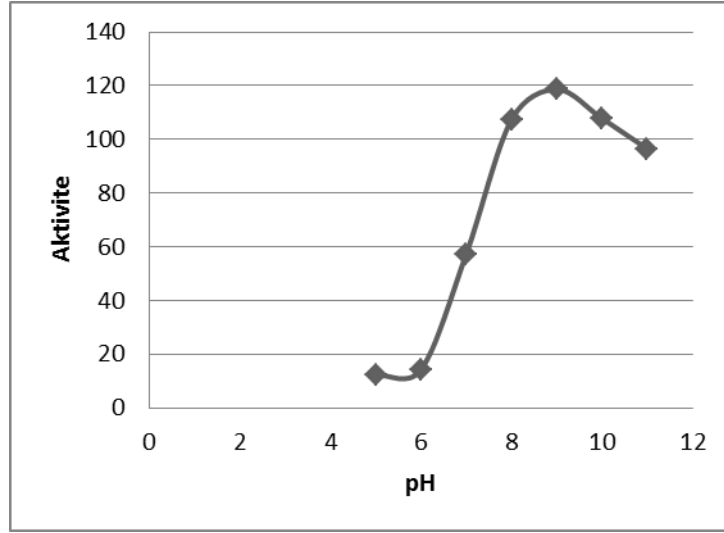


Şekil 11. *A. gonensis* ctp sentetaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığa ait grafik

3.6. Enzime Ait Optimum pH

Enzim aktivitesi üzerine pH' ın etkisi ve en yüksek etkinlik gösterdiği pH' ın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, pH 5,0-11,0 arasında tamponlarla reaksiyon karışımları hazırlandı. Her bir tamponla hazırlanan reaksiyon karışımları için aktivite

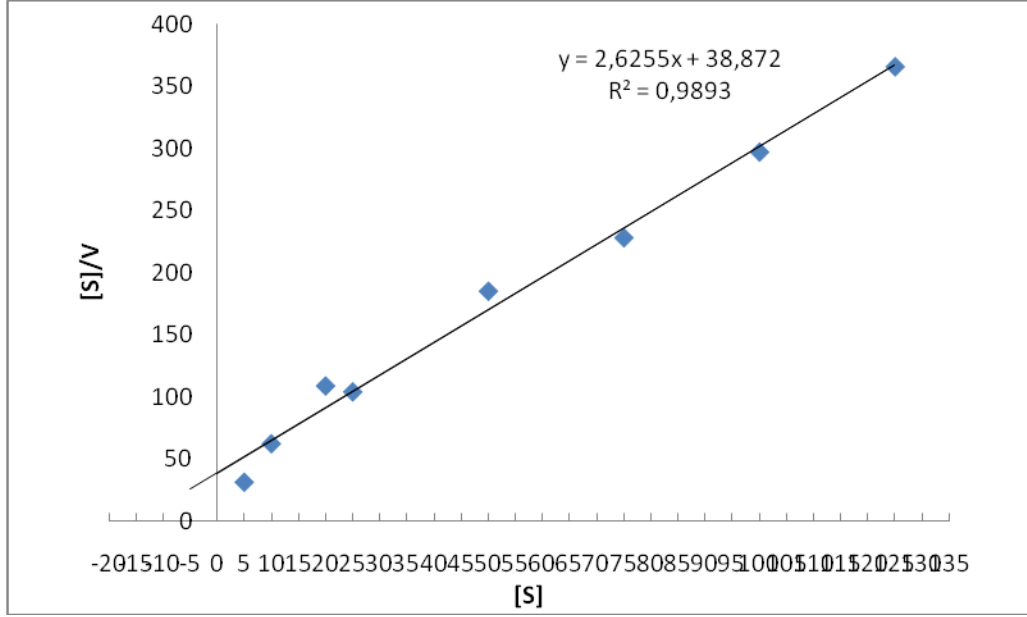
belirlenerek pH değerlerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH-% Aktivite grafiği elde edildi (Şekil 12). Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 9,0 olarak belirlendi.



Şekil 12. Enzime ait pH'ya bağlı kalan aktiviteyi gösteren grafik

3.7. Enzime Ait V_{max} ve K_m Değerleri

Ctp sentetaz aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle ifade edilmesi amacı ile sabit enzim konsantrasyonunda ve 0-200 mM NH_4Cl konsantrasyonunda aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak Hanes-Woolf (Şekil 13) grafiği çizildi. Bu grafik Michealis-Menten eşitliğinin ters çevrilmesi ve substrat konsantrasyonu [S] ile çarpılması sonucu elde edilen formüle göre elde edilir. Grafikten yararlanılarak yaklaşık V_{max} değeri 0,381 ve K_m değeri 12,415 mM olarak hesaplandı. K_{cat} değeri $0,762 s^{-1}$ olarak hesaplandı. 100 mM substrat konsantrasyonu değerine kadar aktivitede bir artışın gözlemlendiği, ancak daha yüksek substrat konsantrasyon değerlerinde ise enzimin doygunluk noktasına ulaşması nedeniyle aktivitenin bu optimum değerde sabit kaldığı gözlemlendi.



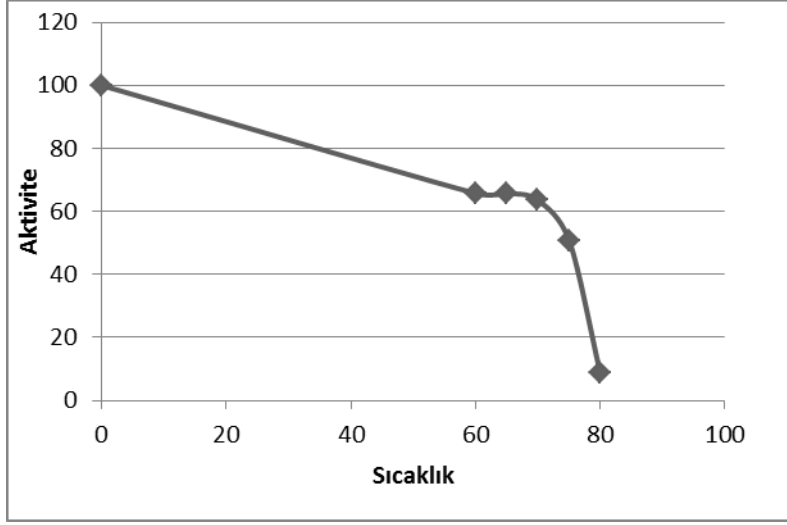
Şekil 13. Hanes-Woolf grafiği

3.8. Enzime Ait Isıl Kararlılık

Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin 60 ve 65⁰ C' de % kalan aktivitenin aynı olduğu ve ısı uygulanmamış enzimin aktivitesine yakın aktivite gösterdiği bulundu. 65⁰ C' den sonra aktivitenin iyice azaldığı gözlemlendi. Tablo 5' te yapılan aktivite ölçümü sonucunda elde edilen değerler verilmiştir. Bu değerlere göre kalan aktivite hesaplandı ve Şekil 14' te verilen grafik elde edildi.

Tablo 5. % kalan aktivitenin hesaplanması

	Absorbans	Aktivite	% Aktivite
Kontrol (Enzim yok)	0,181	0	0
Isı uygulaması yok	0,362	0,181	% 100
60⁰ C	0,300	0,119	% 65
65⁰ C	0,300	0,119	% 65
70⁰ C	0,296	0,115	% 63
75⁰ C	0,273	0,092	% 50
80⁰ C	0,197	0,016	% 8



Şekil 14. Isı uygulaması yapılmış ctp sentetaz proteininde gözlenen kalan enzimatik aktiviteye ait sıcaklık grafiği

3.9. Aminoasit Sıralarının Karşılaştırılması Filogenetik Benzerliğin Araştırılması

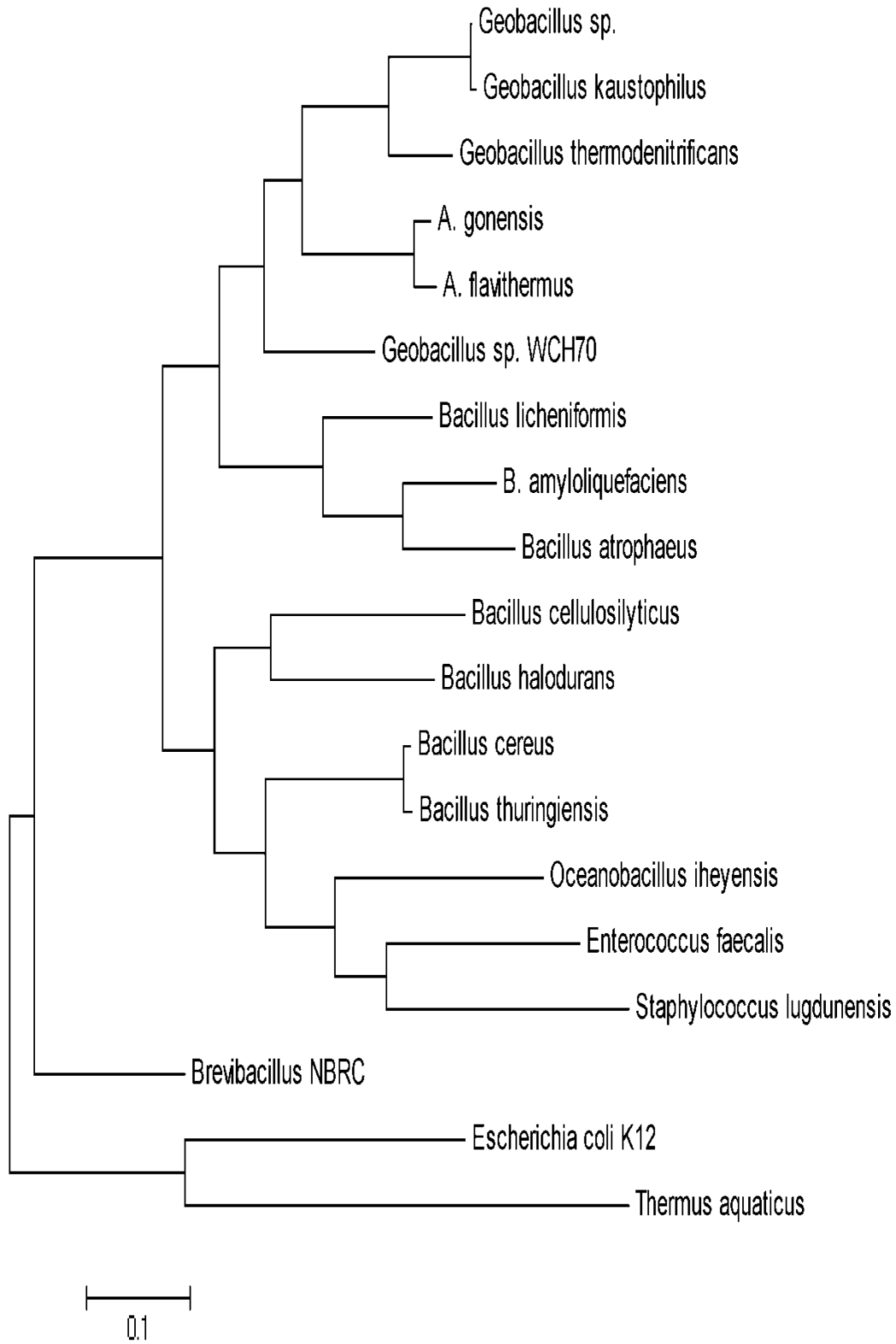
Clustal W programından elde edilen sonuç Ek 1’ de verilmiştir. Mevcut çalışmalar da ctp sentetaz proteinlerinin korunmuş amino asit dizilimleri araştırıldığında ve *Agon* ctp sentetaz amino asit sırası ile karşılaştırıldığında, katalitik amino asitleri korunduğu bulunmuştur. Glutaminaz domaininde korunmuş olan katalitik Cys391-His522-Glu524 üçlüsünün karşılaştırma yapılan 9 türde de korunmuş olduğu bulundu. *E. coli* ile yapılan bir çalışmada L109’un amonyak tünelinin oluşmasındaki önemi bulunmuştur. Clustal W sonuçlarına göre bu amino asitinde 9 türde korunmuş olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada ctp sentetaz enziminin glutamin amidotransferaz domaininde korunmuş olan GXXXRLG dizisinden bahsedilmiştir [45]. Bu dizinin karşılaştırma yapılan türlerde de korunmuş olduğu bulundu. Ayrıca farklı prokaryotik ve ökaryotik türlere ait ctp sentetaz aminoasit sıraları GenBank’tan bulunarak, Clustal W programıyla analiz edildi ve GXXXRLG dizisinin korunmuş olduğu görüldü (Şekil 15). Dendogramlar *Anoxybacillus gonensis* G2^T suşunun en çok *Anoxybacillus flavithermus* türüne benzediğini göstermiştir ve hem nükleotid verileri ile hem de amino asit verileri ile yapılan karşılaştırmalarda *Anoxybacillus* cinsinin diğer cinslerden çok net bir şekilde ayrıldığı gözlemlendi.

```

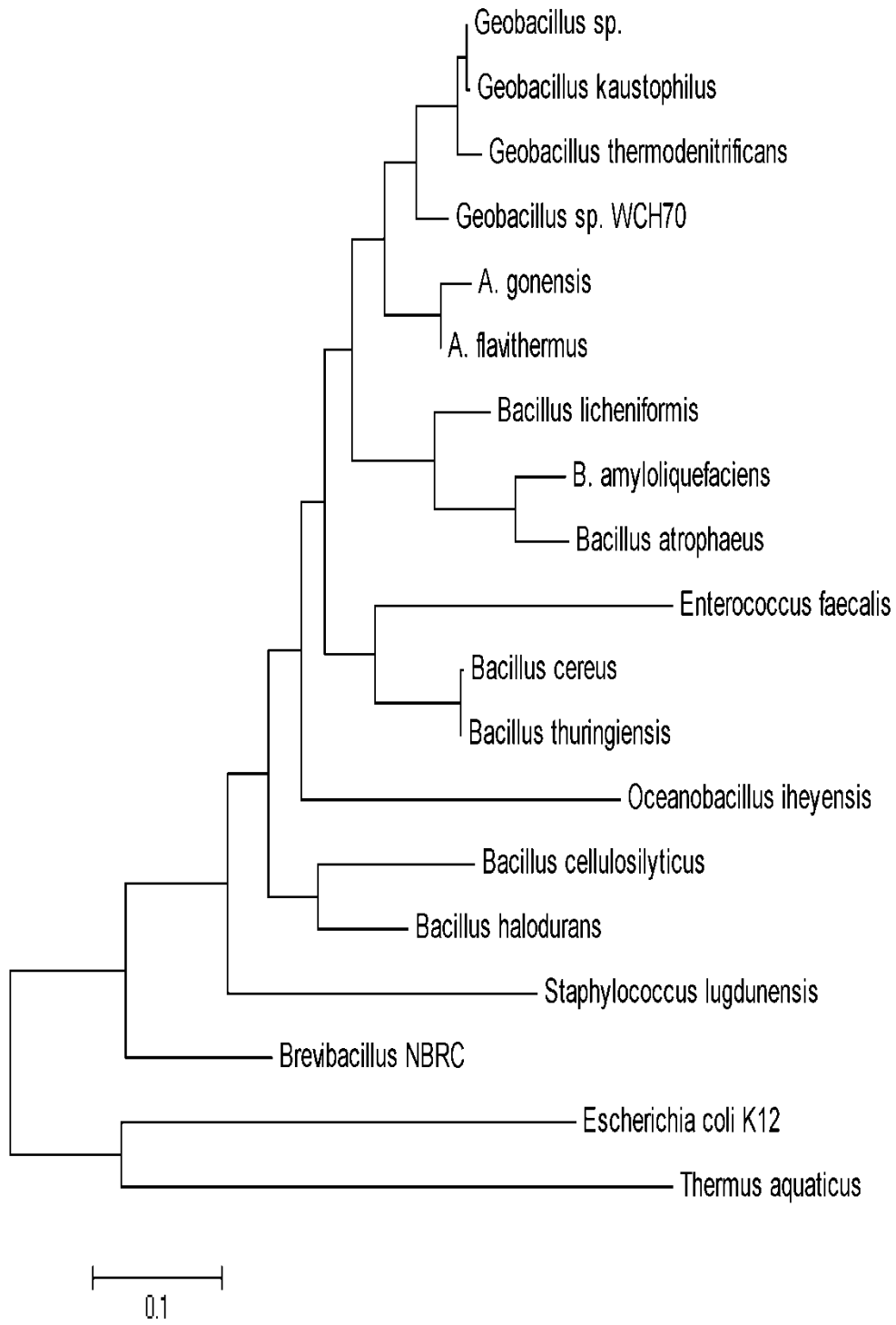
Bsub  STQYPIIDLLPEQ-----KDVEDLGGTLRLGLYPCKLEEGT
Llac  ETKYPVIDIMRDQ-----VDVEDMGGTLRLGLYPAKLKNGS
Mjan  NTKYPVVDLLPEQ-----KEIDAKGGTMRLGAYPAILMEGT
Scit  ETKNAIIDIRGK-----DKTDALGGTLRLGNYKTTFPNT
Syne  ETPNPVINLLPEQQ-----DVVD----LGGTMRLGLYPCRIAPDT
Mbov  DTPDPVIATMPDQE-----EIVAGEADLGGTMRLGSPAVLEPDS
Ctra  ETPDPVVCMMEGQ-----DSVVK-----GGTMRLGAYPCRIAPGS
Hinf  DCEQPVALITEWQDAEGNTEVRTDES DLGGTMRLGAQQCHLVSGS
Ecol  DCKYPVALITEWRDENG NVEVRSEKSDLGGTMRLGAQQCQLVDDS
Neur  DTPYPVLGLITEWRDRCGRVEKRS AQTDLGGTMRLGGQECLLKPH
Abra  NPVVGLLGLMTEWMRGN-SLEKRTEGTDVGGTMRLGTYPAKLVPGS
Gint  ETTNPVIATIISEDVKAANPLAATLIRSGGSMRLGACNCTLLNGT
Hpyl  -CEYPVVYLIGDFMDQNHQKQVRTYNSPLGGTMRLGEYECEIMPNS
Bbur  PLKSPVIHLLPEQK-----GIKDKGATMRLGGYPVILKKNT
Cgri  ---HPVVIDMPEHN-----PGQMGGMRLGKSRTL FQTKN
Mmus  ---HPVVIDMPEHN-----PGQMGGMRLGKRRTL FQTKN
Hsap  ---HPVVDMPEHN-----PGQMGGMRLGKRRTL FQTKN
Atha  ---DPVVIFMPEGS-----RTHMGSTMRLGSRRTHLHNRD
Scer  ---DPSSHIHAEID-----KEHMGGMRLGLRPTIFQPNS
Pfal  DNNNVIISMSEFKG-----DDNKGGMRLGVKQSKIIDKD

```

Şekil 15. Korumuş GXXXRLG dizisine ait amino asit dizilimleri. *Gint* [*Girardia intestinalis* (AAB41453.1)], *Syne* [*Synechococcus* (Q54775)], *Scit* [*Spiroplasma citri* (P52200)], *Syne* [*Synechocystis* (P74208)], *Bsub* [*Bacillus subtilis* (P13242)], *Mbov* [*Mycobacterium bovis* (AAB48045.1)], *Mjan* [*Methanococcus jannaschii* (Q58574)], *Ctra* [*Chlamydia trachomatis* (Q59321)], *Hinf* [*Haemophilus influenzae* (P44341)], *Neur* [*Nitrosomonas europaea* (AAC33441.1)], *Abra* [*Azospirillum brasilense* (P28595)], *Hpyl* [*Helicobacter pylori* (O25116)], *Bbur* [*Borrelia burgdorferi* (O51522)], *Cgri* [*Cricetulus griseus* (P50547)], *Mmus* [*Mus musculus* (P70698)], *Hsap* [*Homo sapiens* (NP_001896.1)], *Atha* [*Arabidopsis thaliana* (AAC78703.1)], *Scer* [*Saccharomyces cerevisiae* H (URA-8, P38627)], *Llac* [*Lactococcus lactis* (CAA09021.2)], and *Ecol* [*Escherichia coli* (AAA69290.1)] .



Şekil 16. Nükleotid verileri kullanılarak *A. gonensis*' in diğer bakteri türleri ile olan benzerliğini gösteren dendrogram



Şekil 17. Amino asit verileri kullanılarak *A. gonensis*' in diğer bakteri türleri ile olan benzerliğini gösteren dendrogram

4. TARTIŞMA

Ctp Sentaz geninin tamamının pET-15b' ye klonlanarak elde edilen rekombinant vektör, *E. coli* BL21 hücrelerine aktarıldı ve IPTG ile indüklenerek ekspresyon gözlemlendi. Protein ekstraksiyonunun ilk aşamalarındaki işlemler, söz konusu proteinin hücrenin içinde mi, dışında mı olduğuna, içindeyse bulunduğu yere göre değişir. Eğer intrasellüler bir enzim ise öncelikle hücre çeperi engeli aşılmalıdır. Hücrelerin parçalanmasında değişik yöntemler vardır. Lizozim ile parçalama, ses dalgalarıyla ve basınç ile parçalama bunlardan birkaçıdır. Bu yöntemler bazen beraberinde uygulanabilir [38]. *pyrG* gen ürünü hücre içi bir proteindir ve bu proteinin ekstraksiyonu için lizozimle enzimatik parçalama ve sonikatör ile mekanik parçalama yöntemleri kullanıldı. Daha sonra *E. coli*' den gelen proteinlerin sıcaklık uygulaması ile uzaklaştırılarak magneHis Purification System (Promega) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi SDS-PAGE yöntemiyle doğrulandı.

Enzim kinetiği bir reaksiyonun hızını belirleyen etmenleri inceler. Bir enzime ait kinetik ölçülerin saptanmasının çeşitli yararları bulunur; enzimin hücre içinde katalizlediği reaksiyon hızının belirlenmesi, metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayan kontrol noktalarının saptanması, farklı doku veya organizmalarda işlev gören izoenzimlerin karşılaştırılması, enzim aktivitesi üzerinde inhibitör veya aktivatör olarak etki gösterme kapasitesi bulunan maddelerin saptanması, enzimin aktif yerinde bulunan amino asitlerin R yan gruplarının belirlenmesi, enzimin kataliz mekanizmasının aydınlatılması gibi. Enzimatik bir reaksiyonun temel bileşenlerini enzim ve substratlar oluşturur. Reaksiyon hızı, bu maddelerin derişimlerine, ortamın sıcaklık, iyonik güç ve pH' sına, aktivatör ve inhibitörlerin varlığına bağlıdır [43].

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve enzimin ısı kararlılığı incelendi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 22, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C gibi farklı sıcaklık değerlerinde aktivite deneyleri yapıldı ve en yüksek aktivite 60-65 °C arasında elde edildi. 75 °C' den sonraki sıcaklıklarda aktivitenin azaldığı belirlendi. Farklı türlere ait enzimlerin aktivite gösterdiği sıcaklık 37 °C' dir [21, 22, 38]. Isıl kararlılık için 60°C' den 80°C' ye kadar sıcaklıklarda 5' er dakika bekletilip, buz üzerinde soğutulan enzim örnekleri kullanıldı. 65°C' den sonraki sıcaklıklarda enzimin aktivitesini iyice kaybettiği gözlemlendi. 60-65°C sıcaklık değerlerinde bekletilen enzimlerin aktivitelerini korudukları gözlemlendi.

Enzimin en iyi çalıştığı pH' yı belirlemek için enzim ile farklı pH' lardaki tamponlarda aktivite deneyleri gerçekleştirildi. Enzimin en yüksek aktiviteyi pH 9' da gösterdiği belirlendi. pH 10' dan sonra enzimin kalan aktivitesinin azaldığı gözlemlendi. *Anoxybacillus gonensis* G2^T ctp sentetazın aktivite gösterdiği optimum pH değeri 9 olarak bulundu. Farklı türlere ait ctp sentetazların optimum aktivite gösterdiği pH aralığı 7-9 arasındadır [33].

Bir ünite enzim (U) , bir dakikada bir mikromol ürünün oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır. Enzimatik reaksiyonda oluşan ürün spektral yöntemle kolaylıkla izlenir ve enzim aktivitesi Beer-Lambert yasasına dayanan aşağıdaki formülle hesaplanır: Aktivite= Absorbans X Reaksiyon hacmi/ Enzim hacmi X İnkübasyon süresi. Enzim aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik (özgün) aktivitedir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktivite enzim ünitesinin protein miktarına bölünmesiyle elde edilir. Literatürde bulunan spesifik aktivite değerleri 0,0025-0,6 µmol/min/mg arasındadır [31, 38]. *Agon'* a ait en yüksek spesifik aktivite bu değerler arasındadır. V_{max} Michealis-Menten eşitliğine göre; enzimin substratla doyduğu durum yani sabit durumdaki hızıdır. K_m değeri, maksimum hızın yarısındaki substrat konsantrasyonudur. Dönüşüm sayısı ise enzim substrat ile doygunken birim zamanda enzim tarafından ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısıdır. Michealis-Menten eşitliği, $V=V_{max} \cdot [S]/K_m+[S]$ formülüyle ifade edilir. k_{cat} değerinin hesaplanması için kullanılan formül; $V_{max}=k_3 \times [E_T]$ dır. Formülde k_3 ile gösterilen enzim-substrat kompleksinin ayrılma sabiti, k_{cat} değerine eşittir [43]. Enzime ait yaklaşık V_{max} değeri 0,381, K_m değeri 12,415 mM ve k_{cat} değeri 0,762 s⁻¹ olarak bulundu. Bir enzimin substrata olan ilgisi ne kadar büyükse K_m değeri o kadar küçüktür. K_m değeri yükseldikçe enzimin substrata ilgisi azalacağından, dönüşüm sayısının değeri azalacaktır. Farklı türlere ait K_m değerleri 0.002-0,424 mM arasındadır[26, 27]. *Agon* ctp sentetazın K_m değeri 0,381'dir. *Homo sapiens* ctp sentetazın K_m değeri *Agon'* dan daha düşüktür yani *Agon* ctp sentetazın substrata olan ilgisi, insan ctp sentetazının substrata olan ilgisinden daha azdır.

Aminoasit sıralarının karşılaştırılması sonucu türler arasında benzer dizilerin olduğu görülmüştür [15, 17, 45]. Bu benzer dizilerin enzimin aktif bölgelerindeki önemli aminoasitler olduğu enzime ilgili yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu diziler enzimin aktivitesinde önemli olduğu için türler arasında korunmuştur. Prokaryotik ve ökaryotik türlerde enzimin yapısal olarak birbirine benzer olduğu yapılan çalışmalar sonucunda

bulunmuştur. Ayrıca korunmuş diziler enzimin çalışma mekanizmasının da türler arası benzer olduğunu gösterir. Sonuç olarak bakteriye ait enzimle yapılan bir çalışmadan alınan sonuçlar insana ait enzim ile ilgili çalışmalara da uyarlanabilir. Enzimin nükleotid biyosentezindeki önemi ve nükleotid biyosentezinin, hücre metabolizmasındaki önemi bu korunmuşluğun nedenini ortaya koymaktadır.

Ctp sentetazın türler arası genetik yakınlığı ortaya koymak için MEGA 5.0 programıyla aminoasit ve nükleotid dendrogramları çizildi. Maximum Likelihood metoduyla çizilen dendrogramların dalların uzunluğu genetik yakınlığın azaldığını gösterir. Kısa dallar ise genetik yakınlığın arttığını belirtir. Hem nükleotid hem de aminoasit dendrogramları incelendiğinde, *Anoxybacillus gonensis*' e genetik olarak en yakın türün *Anoxybacillus flavithermus* olduğu görülmüştür. *Geobacillus* türlerinin genetik olarak bir grupta toplandığını ve *Anoxybacillus* türlerinden ayrıldığı görülmektedir. Bir nokta baz alınarak dendrogram incelendiğinde *Anoxybacillus*'ların ve *Geobacillus*'ların birbirine yakın olduğu, Basillerden ayrıldığı görülmektedir. *Brevibacillus* ise bu cinslerden genetik olarak daha uzaktır. *Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* birbirine genetik olarak yakındır. *Oceanobacillus* türü *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve *Bacillus* türlerine genetik olarak daha uzaktır. *Bacillus amyloliquefacians* ve *Bacillus atropheus* genetik olarak yakındır. Diğer bir tür *Bacillus licheniformis* bu iki türden genetik olarak ayrılmıştır. *Thermus aquatis* ve *E. coli*' nin diğer türlere olan yakınlıkları benzerdir. Aminoasit ve nükleotid dendrogramlarında bazı türlerin yerinde değişme vardır. Bunun nedeni bir aminoasitin birden fazla kodon tarafından kodlanması sonucu, farklı nükleotid sıralarından aynı aminoasit sıralarının oluşabilmesi olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan 'Anoxybacillus gonensis G2^T ctp sentetaz geninin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve amonyak-bağımlı ctp sentetaz aktivitesinin karakterizasyonu' başlıklı çalışmasından şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Anoxybacillus gonensis G2^T bakterisinin ctp sentaz geninin tüm nükleotid sırası belirlendi.
2. Ctp sentetaz geni pET-15b ekspresyon vektörüne klonlanarak T7 promotorunun altında ekspres edilerek proteine dönüştürüldü.
3. Rekombinant protein magneHis Purification System kullanılarak saflaştırıldı.
4. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 60-65 °C olduğu, 75 °C üzerindeki sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybettiği belirlendi.
5. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı 9-10 olarak bulundu.
6. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerine göre diğer deneyler gerçekleştirildi.
7. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi belirlendi. K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Enzime ait yaklaşık V_{max} değeri 0,381, K_m değeri 12,415 mM ve k_{cat} değeri 0,762 s⁻¹ olarak bulundu.
8. Genin nükleotit ve amino asit diziliminin genetik benzerlikte ayırt edici olarak kullanılabileceği belirlendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda ctp sentetaza ait bazı aminoasit sıralarının korunmuş olduğu görülmüştür. Bu korunmuş aminoasitler enzimin katalitik aktivitesinin gerçekleştiği bölgelerde bulunduğu bilinmektedir. Korunmuş olan ve hakkında çalışma yapılmayan aminoasitlerin önemi mutasyonla araştırılabilir. Ctp sentetaz geni, gen delesyonu ile genomdan silinip bakteri için önemi araştırılabilir. Bakterinin de novo nükleotid biyosentezi olmadan, kurtarma yoluna bağımlı olarak yaşayıp yaşayamayacağı belirlenebilir.

Ctp sentetazın *in vitro* inhibisyonuna neden olan moleküller araştırılabilir. İnhibisyon deneyleri *in vivo* olarak yapılabilir. Enzimi ihhibe eden ajanlar tıbbi açıdan değerlendirilebilir.

Yapılan deneylerde substrat olarak NH₄Cl kullanılmıştır. Enzimin diğer bir substratı olan glutamin de kinetik deneylerde kullanılabilir. İki farklı substratla yapılan deneylerdeki benzer ve farklı sonuçlar değerlendirilebilir.

Bazı türlere ait enzimin kristal yapısı çalışılmıştır. Enzim üzerindeki substratların bağlandığı bölgeler bulunmuştur. Bu çalışmalar *Anoxybacillus gonensis* G2^T, ye ait ctp sentetaz için de yapılabilir.

Anoxybacillus cinsine ait *pyrG* genine sahip olmayan tür olup olmadığı araştırılabilir. Diğer *Anoxybacillus*' larda bu gen tanımlanabilir ve karakterize edilebilir. *Anoxybacillus*'a ait türlere ait karakterizasyon çalışmalarından elde edilen verilere göre enzimin farklı türlerdeki biyokimyasal özelliklerindeki farklılıklar tartışılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Iyengar, A., Bearne, S.L., Aspartate-107 and leucine-109 facilitate efficient coupling of glutamine hydrolysis to CTP synthesis by *Escherichia coli* CTP synthase, Biochemistry J., 369 (2003) 497-507.
- [2] Fruta, E., Okuda, H., Kobayashi, A. and Watabe, K., Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. Biochimica et Biophysica Acta, 1805 (2010) 141-152.
- [3] Kars, A., Gen Tedavisi, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma, 59-63, (2004).
- [4] Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayınevi, Ankara s. 1264, 2005.
- [5] Goto, M., Omi, R., Nakagawa, N., Miyahara, I. and Hirotsu, K., Crystal structures of CTP synthetase reveal ATP, UTP and glutamine binding sites, Elsevier, 12 (2004) 1413-1423.
- [6] Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil N., Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9 (2006) 12-19.
- [7] Faiz, Ö., Termofilik *Geobacillus caldxylophilus* TK4 Suşundan Glukoz İzomeraz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2008.
- [8] Madigan, M. T., Martingo, J. M., Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayınevi, Ankara s. 992
- [9] Beldüz, Ali O., Dülger, S. ve Demirbağ, Z., *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53 (2003) 1315-1320.
- [10] <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR017926> (22 Haziran 2011, 19:35).
- [11] <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR017932> (22 Haziran 2011, 19:40).
- [12] <http://en.wikipedia.org/wiki/CTP-synthetase> (14 Nisan 2011, 10:30).
- [13] Willemoes, M., Sigurskjod, B.W., Steady-state kinetics of the glutamine reaction of CTP synthase from *Lactococcus lactis*, Biochemistry J., 269 (2002) 4772-4779.
- [14] MacDonnell, J. E., Lunn, F.A. and Bearne S.L., Inhibition of *E. coli* CTP synthase by the “ positive “ allosteric effector GTP, Biochimica et Biophysica Acta, 1699 (2004) 213-220.

- [15] Kursula, P., Flodin, S., Ehn, M., Hammarström, S.H., Nordlund, P. and Stenmark, P., Structure of the synthetase domain of human CTP synthetase, a target for anticancer therapy, Struct. Biol. Cryst. Commun., 62 (2006) 613-617.
- [16] [http:// biocyc.org/ META/ NEW-IMAGE?type=NIL&object=PWY-5687](http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=NIL&object=PWY-5687)(22 Haziran 2011, 19:30).
- [17] Lunn, F.A., Bearne S.L., Alternative substrates for wild-type and L109A *E. coli* synthetases: kinetic evidence for a constricted ammonia tunnel, Biochemistry J., 271 (2004) 4204-4212.
- [18] Endrizzi, J.A., Kim, H., Anderson, P.M. and Baldwin, E.P., Crystal structure of *Escherichia coli* cytidine triphosphate (CTP) synthetase, a nucleotide-regulated glutamine amidotransferase/ATP-dependent amidoligase fusion protein and homologue of anticancer and antiparasitic drug targets, Biochemistry J., 43(2004) 6447-6463.
- [19] Savage, H., Weinfeld, C.R. and McPartland, R.P., CTP synthetase of bovine calf liver, Methods Enzymol., 51 (1978) 84-90.
- [20] Wylie, J.L., Berry, J.D. and McClarty, G., *Chlamydia trachomatis* CTP synthetase: molecular characterization and developmental regulation of expression, Mol. Microbiol., 22 (1996) 631-642.
- [21] MacLeod, T.J., Lunn, F.A. and Bearne, S.L., The role of lysine residues 297 and 306 in nucleoside triphosphate regulation of *E. coli* CTP synthase: inactivation by 2,3-dialdehyde ATP and mutational analyses., Biochim. Biophys. Acta., 1764 (2006) 199-210.
- [22] Zalkin, H., CTP synthetase, Methods Enzymol. Jr., 113 (1985) 282-287.
- [23] Long, C., Koshland, D.E., Cytidine triphosphate synthetase, Methods Enzymol. Jr., 51 (1978) 79-83.
- [24] Anderson, P.M., CTP synthetase from *Escherichia coli*: an improved purification procedure and characterization of hysteretic and enzyme concentration effects on kinetic properties, Biochemistry, 22 (1983) 3285-3292.
- [25] Roy, A.C., Lunn, F.A. and Bearne, S.L., Inhibition of CTP synthase from *Escherichia coli* by xanthines and uric acids, Bioorg. Med. Chem. Lett., 20 (2010) 141-144.
- [26] Higgins, M.J., Loiselle, D., Haystead, T.A. and Graves, L.M., Human cytidine triphosphate synthetase 1 interacting proteins, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 27 (2008) 850-857.
- [27] Chang, Y.F., Martin, S.S., Baldwin, E.P. and Carman, G.M., Phosphorylation of human CTP synthetase 1 by protein kinase C: identification of Ser(462) and Thr(455) as major sites of phosphorylation, J. Biol. Chem., 282 (2007) 17613-17622.

- [28] Willemoes, M., Sigurskjold, B.W., Steady-state kinetics of the glutaminase reaction of CTP synthase from *Lactococcus lactis*. The role of the allosteric activator GTP incoupling between glutamine hydrolysis and CTP synthesis, Eur. J. Biochem., 269 (2002) 4772-4779.
- [29] Willemös, M., Competition between ammonia derived from internal glutamine hydrolysis and hydroxylamine present in the solution for incorporation into UTP as catalysed by *Lactococcus lactis* CTP synthase, Arch. Biochem. Biophys., 424 (2004) 105-111.
- [30] Wadskov-Hansen, S.L., Willemoes, M., Martinussen, J., Hammer, K., Neuhard, J. And Larsen, S., Cloning and verification of the *Lactococcus lactis* pyrG gene and characterization of the gene product, CTP synthase, J. Biol. Chem., 276 (2001) 38002-38009.
- [31] Kizaki, H., Ohsaka, F. and Sakurada, T., CTP synthetase from Ehrlich ascites tumor cells. Subunit stoichiometry and regulation of activity, Biochim. Biophys. Acta, 829 (1985) 34-43.
- [32] Kizaki, H., Ohsaka, F. and Sakurada, T., Role of GTP in CTP synthetase from Ehrlich ascites tumor cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 108 (1982) 286-291.
- [33] Williams, J.C., Kizaki, H., Weber, G. and Morris, H.P., Increased CTP synthetase activity in cancer cells, Nature, 271 (1978) 71-73.
- [34] Chang, Y.F., Carman, G.M., CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Prog. Lipid Res., 47 (2008) 333-339.
- [35] Yang, W.L., McDonough, V.M., Ozier-Kalogeropoulos, O., Adeline, M.T., Flocco, M.T. and Carman, G.M., Purification and characterization of CTP synthetase, the product of the URA7 gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochemistry, 33 (1994) 10785-10793.
- [36] Park, T.S., O'Brien, D.J. and Carman, G.M., Phosphorylation of CTP synthetase on Ser36, Ser330, Ser354, and Ser454 regulates the levels of CTP and phosphatidylcholine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 278 (2003) 20785-20794.
- [37] Pappas, A., Park, T.S. and Carman, G.M., Characterization of a novel dUTP-dependent activity of CTP synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*, Biochemistry, 38 (1999) 16671-16677.
- [38] Fijolek, A., Hofer, A., Thelander, L., Expression, purification, characterization, and in vivo targeting of trypanosome CTP synthetase for treatment of African sleeping sickness, J. Biol. Chem., 282 (2007) 11858-11865.
- [39] [http:// www. mustafaaltinisik. org. uk/ 89-2-14.pdf](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-14.pdf) (14 Nisan 2011, 15:24).

- [40] Başkol G., Fosfolipidlerin Sentezi. Ders Notları, Erciyes Üniversitesi, 1-9.
- [41] Sandallı, C., Termofilik *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşundan DNA Polimeraz I'ın Klonlanması ve Ekspresyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2007.
- [42] Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [43] Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya T.A. ve Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.
- [44] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (22 Haziran 2011, 19:10)
- [45] Simard, D., Hewitt K.A., Lunn F., Iyengar A. and Bearne S.L., Limited proteolysis of *Escherichia coli* cytidine 5'-triphosphate synthase. Identification of residues required for CTP-formation and GTP-dependent activation of glutamine hydrolysis, Eur. J. Biochem., 270 (2003) 2195-2206.

EKLER
EK-1

Agon	-MTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TAASLGRLK	NRGLKVTIQK	FDPYINVDPG
Afla	-MTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TAASLGRLK	NRGLKVTIQK	FDPYINVDPG
Bhal	MTTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TAASLGRLK	NRGMKVTIQK	FDPYINVDPG
Brev	-MTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TAASLGRLK	NRGLKVTIQK	CDPYINVDPG
Gkau	-MTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TAASLGRLK	NRGLNVTIQK	FDPYINVDPG
Blic	-MTKYIFVTG	GVVSSLGKGI	TASSLGRLK	NRGLNVTIQK	FDPYINVDPG
Ecol	MTTNYIFVTG	GVVSSLGKGI	AAASLAAILE	ARGLNVTIMK	LDPYINVDPG
Taqu	----MFVTG	GVVSSLGKGI	LTSSLGALLR	ARGYRVTAIK	IDPYVNV DAG
Oihe	--MTKYFVTG	GVVSSLGK-G	TAASLGRLK	NRGLSVTIQK	DP--YNVDPG
Clustal Co	****	*****	::*.*:*.:	** **	***.*

Agon	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLNKYSNV	TTGKIYSTVL
Afla	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLNKYSNV	TTGKIYSTVL
Bhal	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLNKNSNV	TTGKIYSSVL
Brev	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLSANSNM	TTGRIYSTVI
Gkau	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLNKYSNV	TTGKIYSAVI
Blic	TMSFYQHGEV	FVTDDGAETD	LDLGHYERFI	DINLNKYSNV	TTGKIYSTVL
Ecol	TMSPIQHGEV	FVTEDGAETD	LDLGHYERFI	RTKMSRRNNF	TTGRIYSDVL
Taqu	TMRPYEHGEV	FVTADGAETD	LDIGHYERFL	DMDLSRGNNL	TTGQVYLSVI
Oihe	TMSFYQHGEV	FVTQDGAETD	LDLGHYERFD	NLNKYSN---	TTGKVYSSVR
Clustal Co	** * :****	*** *****	** :*****	.	***:.* *

Agon	KKERRGDYLG	GTVQVIPHIT	NEIKERVFRA	GRETNADVVI	TEIGGTVGDI
Afla	KKERRGDYLG	GTVQVIPHIT	NEIKERVFRA	GRETNADVVI	TEIGGTVGDI
Bhal	KKERRGDYLG	GTVQVIPHVT	NEIKERVFRA	GRETNADVVI	TEIGGTVGDI
Brev	AKERRGDYLG	GTVQVIPHIT	NEIKDRIFRA	GRETGADVVI	TEIGGTVGDI
Gkau	RKERRGDYLG	GTVQVIPHIT	NEIKERVFRA	GRETNADVVI	TEIGGTVGDI
Blic	KKERRGDYLG	GTVQVIPHIT	NEIKDRVFRA	GKETHADVVI	TEIGGTVGDI
Ecol	RKERRGDYLG	ATVQVIPHIT	NAIKERVLEG	G--EGHDVVL	VEIGGTVGDI
Taqu	QKERRGEYLS	QTVQVIPHIT	DEIKDRIRKV	AEDQRAEIAV	VEVGGTVGDI
Oihe	-KERRGDYLG	GTVQVPHTNE	---KDQVFRA	GEATGADVVT	EGG---TVGD
Clustal Co	*****:**.:	****	*::: .	. :..	. .

Agon	ESLPFLEAIR	QIKAMSSR-Q	CDVHSC TLVP	YIKAAGEMKT	KPTQHSV KEL
Afla	ESLPFLEAIR	QIKSDVGRDN	VMIHCT LVP	YIKAAGEMKT	KPTQHSV KEL
Bhal	ESLPFLEAIR	QIKSDIGVDN	VMIHCT LIP	YLAAAGEMKS	KPTQHSV KEL
Brev	ESLPFLESIR	QIKSDIGREN	VMIHVTLVP	YIKAAGEMKT	KPTQHSV KEL
Gkau	ESLPFLEAIR	QIKSDVGRDN	VMIHCT LVP	YIKAAGEMKT	KPTQHSV KEL
Blic	ESLPFLEAIR	QIKSDVGRDN	VMIHCT LVP	YLKAAGEMKT	KPTQHSV KEL
Ecol	ESLPFLEAIR	QMAVEIGREH	TLFMHL TLVP	YMAASGEVKT	KPTQHSV KEL
Taqu	ESLPFLEAIR	QFRFDEGEDN	TFYLHL TLVP	YLETSEEFKT	KPTQHSV ATL
Oihe	ESLPFLEAR-	-QKSDVGRDS	VMYVHCT LVP	YKAAG-EMKT	KPTQHSV KEL
Clustal Co	*****:	.	**:*	* :. *.*:	***** *

Agon	RSLGIQPNVI	VVRTEMPMSQ	DMKD KIALFC	DIDPKAVIEA	RDADTLYAVP
Afla	RSLGIQPNVI	VVRTEMPMSQ	DMKD KIALFC	DIDPKAVIEA	RDADTLYAVP
Bhal	RSLGIQPNVI	VVRTEKPVPE	EMKE KIALFC	DIRKDSVIEA	RDADTLYEVP
Brev	RSLGIQPNVI	VTRTEQPMTQ	EMKDKLALFC	DIDKNAVVEC	VDADSLYDVP
Gkau	RSLGIQPNVI	VVRTEMPMPQ	EMKE KIALFC	DIDPKAVIEA	RDADTLYAVP
Blic	RSLGIQPNVI	VVRTEMPISQ	DMKD KIALFC	DIDPKAVIEA	GDADTLYSIP
Ecol	LSIGIQPDIL	ICRS DRAVPA	NERAKIALFC	NVPEKAVISL	KDVDSIYKIP
Taqu	RGVGIQPDAL	VLRS AKPVPE	EVRKKVALFT	NVRPGHV FSS	PNVEHLYEVP
Oihe	RSLGQPD---	-AVLRTEMAS	KDMKEKALFC	DDDKS--VEM	RDADTLYQVP
Clustal Co	.*	..	. : ***	: ..	::: .* *

Agon	LMLQEQKLDQ	IVCEHLKLN	NEADMTEWVA	LVEKVRNLSN	KTTIALVVGKY
Afla	LMLQEQKLDQ	IVCEHLKLN	NEADMTEWVA	LVEKVRNLSN	KTTIALVVGKY
Bhal	LDLQAQNLDE	IVCDHLNLS	QEADMTEWKS	LVEKVKNLSG	LVKIALVVGKY
Brev	LQLQAQGLDD	YVCRHLGLTC	QDADMTEWKS	LVTKIKNLSK	TTTIAIVGKY
Gkau	LMLQEQKLDQ	IVCEHLRLNC	READMTEWKA	LVEKVRNLSK	TTKIALVVGKY
Blic	LDLQKQGLDS	LVCSHLKLDC	READMEEWKE	LVKKVKNLSK	TVTIALVVGKY
Ecol	GLLKSQGLDD	YICKRFSLNC	PEANLSEWEQ	VIFEEANPVS	EVTIGMVGKY
Taqu	LLLEEQGLGR	VVERALGLEP	VFPNLAFWQE	AARVLKNPER	TVRIAIAGKY
Oihe	ALQEEK--LD	QTCNHFGLD	PEADMEEWKG	LVNKVRNLS-	KTTHGLVGKY
Clustal Co	: :	: *	:: :	* *	. .:***

Agon	VELQDAYISV	VEALRHAGYA	FDADIDIRWI	NSEHVDRNNV	AQLLQGVNGI
Afla	VELQDAYISV	VEALRHAGYA	FDADIDIRWI	NSEHVDRNNV	AQLLQGVNGI
Bhal	VALPDAYLSV	AEALRHAGYA	FDADINIKWV	DSEDVTAENV	AEQLQGVNGI
Brev	VELHDAYLSV	AEALYHGGYA	NDSKVEIKWV	HAEVTPENV	GELLGDVNGI
Gkau	VELPDAYISV	VEALRHAGYA	FDTDIDIQWI	NAEHVTRDNV	ADLLKDADGI
Blic	VELPDAYISV	VESLRHAGYA	FDADIQVKWI	NAEVTEDNV	ADLVQNADGI
Ecol	IELPDAYKSV	IEALKHGGGLK	NRVSVNIKLI	DSQDVETRG-	VEILKGLDAI
Taqu	VKMPDAYLSL	LEALKHAGIK	NRARVEVKWV	DAESLEAADL	DEAFADVAGI
Oihe	VELPDAYLSV	VESLKHAGYD	YDTDVKHWNS	---ELLSEEQ	KEELSKVDGV
Clustal Co	: : *** *:	*.* *.* *	:: :	: :	: . .:

Agon	LVPGGFGDRG	IEGKIEAIRY	AREQRIPFLG	ICLGMQLASV	EFARHVVLGK
Afla	LVPGGFGDRG	IEGKIEAIRY	AREQRIPFLG	ICLGMQLASV	EFARHVVLGK
Bhal	LVPGGFGDRG	IEGKIEAIRY	AREQKIPFLG	ICLGMQLASI	EFARNVLGLE
Brev	LVPGGFGDRG	IEGKIIATRY	ARENKVPFLG	ICLGMQIAVI	EFARHVAGMD
Gkau	LVPGGFGDRG	VEGKIEAIRY	AREQRVPFLG	ICLGMQLASI	EFARHVVLGS
Blic	LVPGGFGDRG	VEGKITTVKY	AREQKIPFFG	ICLGMQVASI	EYARNVLGLE
Ecol	LVPGGFGYRG	VEGMITTARF	ARENNIPYLG	ICLGMQVALI	DYARNVANME
Taqu	LVPGGFGVRG	IEGKVRAAQY	ARERKIPYLG	ICLGLQIAVI	EFARNVAGLK
Oihe	LVPGGFGDRG	DG---KEARY	ARENNPFFG-	-CLGMQLASV	EFARNVVLGS
Clustal Co	***** **	:: :	***.. :	***:*** :	::***: * ..

Agon	GAHSAEIDPS	TPHPIDLLP	EQKDI-----	-----EDLGG	TLRLGLYPCK
Afla	GAHSAEIDPS	TPHPIDLLP	EQKDI-----	-----EDLGG	TLRLGLYPCK
Bhal	GAHSAEINPD	TPHPIDLLP	EQKDV-----	-----EDMGG	TLRLGLYPCK
Brev	GANSSEINPN	TAYPVIDLLP	EQKDI-----	-----EDKGG	TMRLGLGPTK
Gkau	GAHSSEFDPN	TPHPIDLLP	EQKDV-----	-----EDLGG	TLRLGLYPCK
Blic	GAHSAEIDPS	TPYPIDLLP	EQKDI-----	-----EDLGG	TLRLGLYPCK
Ecol	NANSTEFVPD	CKYPVVALIT	EWRDENG NVE	VRSEKSDLGG	TMRLGAQQCQ
Taqu	GANSTEFDPY	TPHPVIDLMP	EQLEVEG---	-----LGG	TMRLGDWPMR
Oihe	QAHSANPHT	PHP--VDLLP	EQKDE-----	-----DLGG	TLRLGAYPCK
Clustal Co	*:*:*	:*:. *	: :	**	*:*** :

Agon	LVEGTKAYDA	YQDEVVYERH	RHRYEFNNEY	RTMMEENG FV	FSGTSPDGR-
Afla	LVEGTKAYDA	YQDEVIYERH	RHRYEFNNEY	RTMMEENG FV	FSGTSPDGR-
Bhal	LKNGTLAQSA	YNDQVIYERH	RHRYEFNNQY	REQMEAKGFM	FSGTSPDGR-
Brev	VEEGTLTEAA	YGSTLVYERH	RHRYEFNNEY	RDQLAQMGLR	FAGTTPDGR-
Gkau	LQEGTLAYAA	YGDEVYIYERH	RHRYEFNNQY	RPIMEEHGFV	FSGTSPDGR-
Blic	LQEGSKAYQA	YENEVVYERH	RHRYEFNNEF	RQQMEEAGFV	FSGTSPDGR-
Ecol	LVDDSLVRQL	YNAPTIVERH	RHRYEVNML	LKQIEDAGLR	VAGRSGDDQ-
Taqu	IRPGTLLHRL	YGREEVLERH	RHRYEVNPLY	VDELERAGLV	ISAITPGMKG
Oihe	LVDGTKAKEA	YDGADVEERH	RHRYEFNNVY	RDQMAEKGFV	FSGTSPDGR-
Clustal Co	: .:	* : ***	*****.*	: *	... : . :


```

Agon      ----LVEIVE LKDHPWFVAA QFHPEFTSRP TRPQPLFREF IRASLQK---
Afla      ----LVEIIE LKDHPWFVAA QFHPEFTSRP TRPQPLFREF IRASLQK---
Bhal      ----LVEIVE LGDHPFFIAS QFHPEFVSRP TRPQPLFREF IQASLRK---
Brev      ----LVEIVE VPEHPWYVAT QFHPEFTSRP NRPQPLFRDF VKASLNK---
Gkau      ----LVEVIE LKDHPWFVAA QFHPEFTSRP TRPQPLFREF VRASLKE---
Blic      ----LVEIIE LKDHPWFVAS QFHPEFTSRP TRPQALFRDF VHASLKTSEK
Ecol      ----LVEIIE VPNHPWFVAC QFHPEFTSTP RDGHPLFAGF VKAASEFQKR
Taqu      RGAGLVEAIE LQDHPFFLAL QSHPEFKSRP MRPSPPFAGF VEAAIRFAEG
Oihe      ----LVEIIE VKDHPWFVAC QFHPEFTSRP TRAQSLFKGF GASVDYRKG-
Clustal Co  ***  *  :  :*:::*  *  *****  *  *  .  *  *  :

```

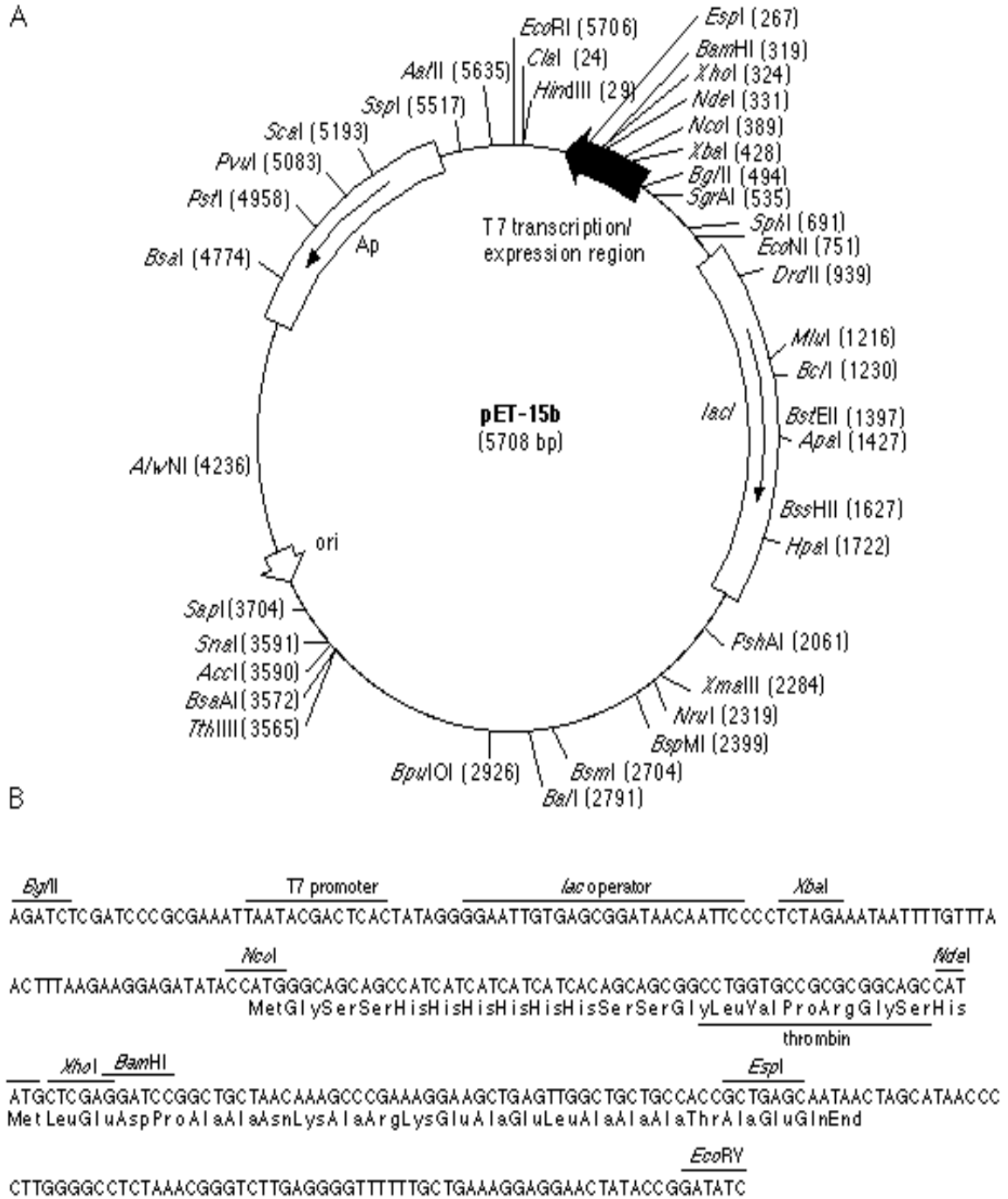
```

Agon      ---
Afla      ---
Bhal      ---
Brev      ---
Gkau      ---
Blic      L--
Ecol      QAK
Taqu      G--
Oihe      ---
Clustal Co

```

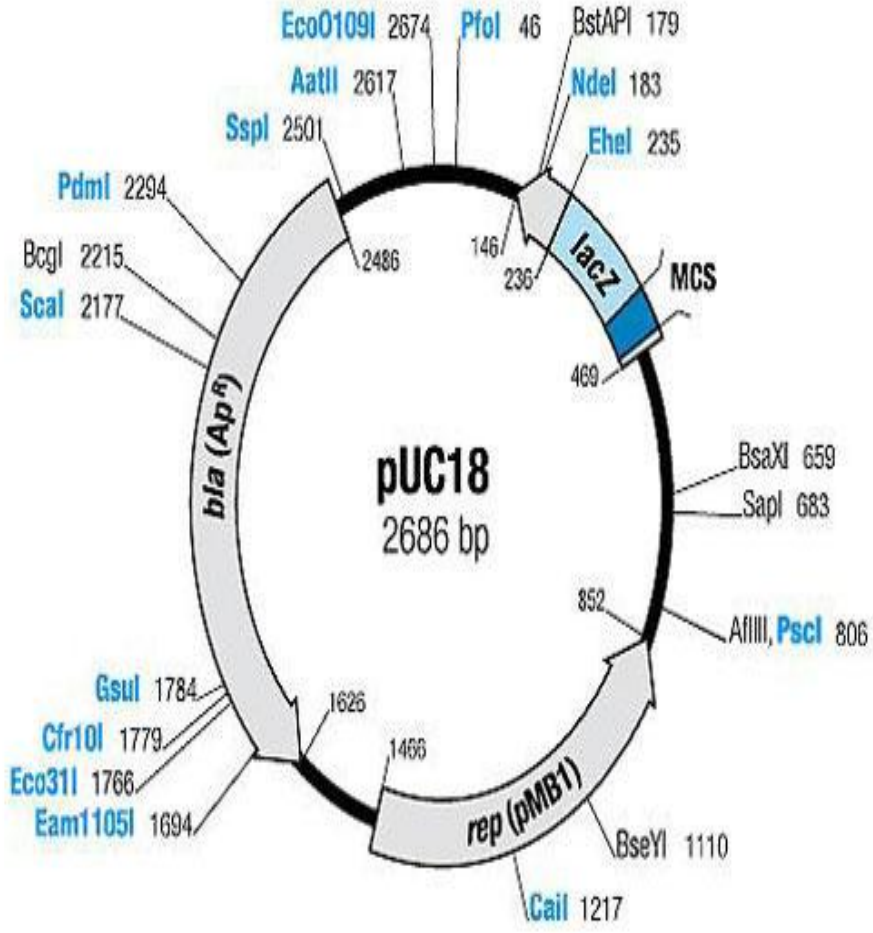
Şekil 1. *Agon* (*Anoxybacillus gonensis*), *Afla* (*Anoxybacillus flavithermus*), *Bhal* (*Bacillus halodurans*), *Brev* (*Brevibacillus NBRC*), *Gkau* (*Geobacillus kaustophilus*), *Blic* (*Bacillus licheniformis*), *Ecol* (*Escherichia coli*), *Taqu* (*Thermus aquaticus*), *Oihe* (*Oceanobacillus iheyensis*) türlerine ait ctp sentetaz enziminin aminoasit sıralarının karşılaştırılması ve benzer sıraların gösterilmesi.

EK-2



Şekil 2. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-15b' nin enzim kesim bölgeleri ve nükleotid sıraları

EK-3



M13/pUC sequencing primer (-20), 17-mer 399 HindIII PaeI SdaI BveI PstI HincII Sall XmiI XbaI BamHI SmaI KpnI Acc65I Eco88I Ecl136II Eco24I SacI XapI 455

5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGC CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT CGT
 3' C ATT TTG CTG CCG GTC ACG GTT CGA ACG TAC GGA CGT CCA GCT GAG ATC TCC TAG GGG CCC ATG GCT CGA GCT TAA GCA
 LacZ ← Val val Ala Leu Ala Ser Ala His Arg Cys Thr Ser Glu Leu Pro Asp Gly Pro Val Ser Ser Ser Asn Thr
 AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'
 TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'
 Ile Met Thr Met

← M13/pUC reverse sequencing primer (26), 17-mer

Şekil 3. Anoxybacillus gonensis' e ait genomik kütüphanenin oluşturulmasında kullanılan pUC18' in enzim kesim bölgeleri ve nükleotid sırası

ÖZGEÇMİŞ

17.12.1986 tarihinde Samsun'da doğdu. İlköğretimini Güzide Yılmaz İlköğretim Okulu' nda, lise öğrenimini Hayrullah Kefoğlu Süper Lisesi' nde gördü. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2009 yılında Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında Artvin Çoruh Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı.