

**Proje III : *Kribbella turkmenica* suşuna ait Nitroredüktaz geninin *Pichia pastoris*'e klonlanması ve ekspresyonu üzerine çalışmalar**

Yürütücü : Nurcihan YAĞCI

Danışmanın Adı Soyadı: Tuğrul DORUK

**Özet:** Son zamanlarda, farklı nitroredüktaz varyantlarının biyolojik keşfi ve protein mühendisliği sayesinde bu enzimlerin istenilen yeteneklerinin geliştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Enzimolojideki bu ilerlemeler, tıbbi biyokimyadaki gelişmelerle paralel olmuştur ve nitroredüktaz önemli avantajlar sunan ikinci ve üçüncü nesil nitroaromatik ön ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır.

Flavin taşıyan nitroredüktazlar (NTR) oksidoredüktaz sınıfına aittirler ve yapısal olarak homolog olan enzim grubudurlar. Bu enzimler bileşiklerdeki nitro grubunun (-NO<sub>2</sub>), hidroksilamin (-NH-OH) üzerinden amin (-NH<sub>2</sub>) grubuna dönüşümünü katalizlerler. NTR'lar hem endüstriyel hemde farmakolojik araştırmalarda özel öneme sahiptir. Çünkü bu enzimler, nitroaromatiklerin biyobozunumunda ve toprak kirliliklerinin biyolojik olarak giderilmesinde, ticari önemi olan materyallerin sentezinde ve en önemlisi kanser tedavileri için geliştirilen ilaç öncü (prodrug) bileşiklerin aktif ilaçlara (drug) dönüştürülmesinde kullanılmaktadır. Termofilik ve mezofilik bakterilerden aktivitesi yüksek yeni nitroredüktazların klonlanması, rekombinant enzim ekspresyonu ve saflaştırılması laboratuvar ölçeğinde yapılabilir. Bu enzimlerin kullanıldığı kanserli hücre hattı çalışmalarında ümit verici sonuçlar alınmıştır ve yeni ilaç öncü bileşikler ve nitroredüktazların kullanıldığı çalışmalar devam etmektedir.

Önerilen projemizde bölümümüz öğretim üyelerinden Prof.Dr. Nevzat Şahin ve ekibinin daha önce yaptığı çalışmada izole ettiği gram pozitif bir bakteri türü olan *Kribbella turkmenica* (Saygin H. ve ark. 2019)'nın genomunda kodlanan Nitroredüktaz proteinine ait genin *Pichia pastoris*'e klonlanması ve ifadesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilecektir. Bu amaç için nitroredüktaz genine uygun primerler dizayn edilecek ve gen PCR yöntemiyle çoğaltılıp, pPIC9K (*Pichia pastoris*) klonlama vektöründeki *EcoRI* klonlama bölgesine aktarılacaktır. Restriksiyon haritalama ve Dizi analizi yöntemiyle doğrulaması gerçekleştirilecek vektör daha sonra *P. Pastoris*'e aktarılacaktır. Ekspresyonu gerçekleştirilecek enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilecektir.