

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Huri BULUT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

OCAK 2019

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Huri BULUT
(150606221)**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT
İkinci Tez Danışmanı : Doç. Dr. Barış BİNAY**

OCAK 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150606221 numaralı Doktora Öğrencisi Huri BULUT, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. N. Sema GENÇ**

Prof. Dr. Şahabettin SELEK

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üy. İsmail KOYUNCU

Harran Üniversitesi

Teslim Tarihi : 28 Şubat 2019
Savunma Tarihi : 28 Ocak 2019



Sevdiklerime,

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan yardımlarını esirgemeyen, akademik hayatım boyunca kendisini örnek almaktan onur duyacağım sayın hocam Prof. Dr. Abdürrahim Koçyiğit'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışması boyunca tüm bilgisi, birikimi ve vizyonu ile beni destekleyen, güzel ekibi ve kendisini tanımaktan gurur duyduğum sayın hocam Doç. Dr. Barış Binay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması ve öncesindeki süreçte katkı ve faydalarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Şahabettin SELEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Danışmanlarıma yanısıra bana, ekibine katılma fırsatı verip her sorunuma ivedilikle ve içtenlikle yanıt veren sevgili hocam Prof. Dr. Jennifer LITTLECHILD'a ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında emeklerini asla unutmayacağım, Mol. Bio. Büşra YÜKSEL, Mol. Bio. Meryem EREN, Mol. Bio. Mehmet GÜL ve Mol. Bio. Yağmur Öz'e; ayrıca tüm yardım ve destekleri için Bezmialem Vakıf Üniversitesi çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Ezgi BALKAN, Uzm. Bk. Eray Metin GÜLER ve Ecz. Özlem BİLDİK ŞANLI'ya, Gebze Teknik Üniversitesi'ndeki BERC Lab ve Exeter Üniversitesi'ndeki JAL grubundaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve şefkatle yanımda olan, bana inanıp güvenen, sevgili kardeşim Ecz. Leman Ertekin ve çok kıymetli annem Nergüze Dedeakayoğulları'na tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Varlığı ile güç bulduğum, zor dönemlerimde desteğini asla benden esirgemeyen, sevgili eşim Dr. Berk BULUT'a tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 9.2016/10 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2019

Huri BULUT
Uzm. Biyolog

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Huri BULUT



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	x
SEMBOLLER.....	xiii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvi
ÖZET.....	xviii
SUMMARY.....	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Maya <i>Candida boidinii</i>	3
2.1.1 <i>Candida boidinii</i> 'nin genel özellikleri.....	3
2.1.2 <i>Candida boidinii</i> metabolizması.....	3
2.1.2.1 Metanol kullanım yolu (MUT).....	4
2.2 Metabolizmada Formatın Önemi.....	5
2.2.1 Folat bağımlı format üretimi.....	6
2.2.2 Folat bağımsız format üretimi.....	7
2.2.3 Metanol toksisitesi.....	8
2.2.4 Format düzeylerinin klinik önemi.....	8
2.3 Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) Koenzimi.....	9
2.3.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	10
2.3.2 NAD ⁺ biyosentezi.....	11
2.3.2.1 De novo yolağı.....	11
2.3.2.1 Salvage yolağı.....	12
2.3.3 NAD ⁺ 'ın oksidoredüktaz bağlanması.....	12
2.4 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz (FDH) Enzimleri.....	13
2.4.1 Format dehidrogenaz enziminin katalitik özellikleri.....	14
2.4.2 Format dehidrogenaz enziminin yapısal özellikleri.....	14
2.4.3 Format dehidrogenaz enziminin moleküler mekanizması.....	17
2.4.4 Format dehidrogenazın pratik uygulamalarda kullanımı.....	18
2.5 Protein Mühendisliği.....	19
2.5.1 Rasyonel tasarım.....	20
2.5.1.1 Bölgeye yönelik mutagenез.....	20
2.5.1.2 Yönlendirilmiş değişim (rasyonel olmayan tasarım).....	21
2.5.1.2.1 Rekombinatif olmayan tasarım.....	22
2.5.1.2.2 Rekombinatif tasarım.....	22
2.5.2 Yarı Rasyonel Tasarım.....	23
2.5.2.1 Bölge doygunluk mutagenезi.....	23
2.5.3 Rekombinant DNA teknolojisi.....	24
2.5.3.1 Gen klonlama.....	25
2.5.3.1.1 Klonlamada konak hücrelerin seçimi.....	26
2.5.3.1.2 Klonlama ve ifade vektörleri.....	26

2.5.3.1.3 Kesim enzimleri.....	29
2.5.3.1.4 Ligasyon ve transformasyon.....	30
2.5.4 Biyoinformatik Analiz.....	31
2.6 Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi.....	36
2.6.1 Protein ikincil yapısının belirlenmesi.....	37
2.6.2 Termal stabilitenin belirlenmesi.....	39
2.7 Protein Modelleme.....	40
2.7.1 ONIOM (our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics).....	40
2.7.2 MM kuvvet alanları (AMBER).....	41
2.7.3 Temel set (Basis).....	42
2.8 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimi ile İlgili Protein Mühendisliği Çalışmaları.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1 Gereç.....	47
3.1.1 Cihazlar.....	47
3.1.2 Kimyasallar ve kitler.....	48
3.1.3 Enzimler.....	49
3.1.4 Mikroorganizmalar.....	49
3.1.5 Primerler.....	49
3.1.6 Vektör sistemi.....	50
3.1.7 Protein ve DNA belirteçleri.....	51
3.1.8 Tampon ve çözeltiler.....	52
3.1.8.1 Besiyeri çözeltileri.....	52
3.1.8.2 TAE çözeltisi (50x).....	53
3.1.8.3 SDS-PAGE çözeltileri.....	53
3.1.8.4 Western Blot çözeltileri.....	55
3.1.8.5 Protein saflaştırma çözeltileri.....	55
3.1.8.6 Enzim aktivite testi çözeltileri.....	56
3.2 Yöntem.....	57
3.2.1 Gen kaynağı <i>C. boidinii</i> mikroorganizmasının büyütülmesi.....	57
3.2.2 <i>C. boidinii</i> genomik DNA izolasyonu.....	57
3.2.3 PZR ile FDH gen bölgesinin çoğaltılması.....	58
3.2.3.1 Agaroz jelden DNA saflaştırma.....	60
3.2.4 Klonlama işlemleri.....	60
3.2.4.1 CboFDH geninin pET-23b(+) vektörüne aktarılması.....	61
3.2.4.2 CboFDH geninin pET-23b(+) vektörüyle ligasyonu.....	62
3.2.4.3 pET-23b+/FDH ‘nin <i>E.coli</i> DH5- α hücrelerine transformasyonu ve koloni PZR.....	62
3.2.4.4 Plazmidin endonükleazlar ile kesimi.....	63
3.2.4.5 Dizi analizi.....	64
3.2.4.6 pET-23b(+)/FDH ‘nin <i>E.coli</i> BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu.....	65
3.2.5 FDH gen ifadesinin IPTG ile indüklenmesi.....	65
3.2.6 Protein saflaştırma işlemleri.....	66
3.2.7 SDS-PAGE analizi.....	67
3.2.8 Ultrafiltrasyon işlemi.....	68
3.2.9 PD-10 kolon uygulaması.....	69
3.2.10 Protein miktar tayini.....	69
3.2.11 Western Blot analizi.....	69
3.2.12 Yabancı tip CboFDH enzimi aktivite çalışmaları.....	70
3.2.12.1 Farklı pH ve sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.....	70

3.2.12.2 Enzim kinetiği hesaplamaları.....	71
3.2.12.3 Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	75
3.2.12.4 Farklı organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi.....	76
3.2.13 Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi.....	77
3.2.13.1 Proteinin ikincil yapısının belirlenmesi.....	77
3.2.13.2 Termal stabilite tayini.....	78
3.2.14 Yabanıl tip CboFDH'in biyoinformatik analizi ve mutasyonlar için bölgelerin seçimi.....	78
3.2.15 Primerlerin tasarımı.....	79
3.2.16 Bölgeye yönelik mutagenез.....	80
3.2.17 Mutant genlerin KDL reaksiyonu ve transformasyon.....	83
3.2.18 Mutasyonların dizi analizi.....	84
3.2.19 Mutant genlerin <i>E.coli</i> BL21 (D3) hücrelerinde protein ifadeleri.....	85
3.2.20 Mutant proteinlerin saflaştırma işlemleri.....	86
3.2.21 Mutant proteinlerin SDS-PAGE analizleri.....	86
3.2.22 Mutant proteinlerin ultrafiltrasyon işlemleri.....	87
3.2.23 PD-10 kolon uygulaması.....	87
3.2.24 Mutant proteinlerin miktar tayini.....	87
3.2.25 Mutant proteinlerin Western Blot analizi.....	88
3.2.26 Mutant enzimlerin aktivite çalışmaları.....	88
3.2.26.1 Mutant enzimlerde farklı pH ve sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.....	88
3.2.26.2 Mutant enzimlerin kinetik hesaplamaları.....	89
3.2.26.3 Mutant enzimlerde farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	90
3.2.26.4 Mutant enzimlerde farklı organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi.....	91
3.2.27 Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi.....	91
3.2.27.1 Mutant proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi.....	91
3.2.27.2 Mutant proteinlerin termal stabilitelerinin belirlenmesi.....	92
3.2.28 Modelleme çalışmaları.....	92
4. BULGULAR.....	94
4.1 <i>C. boidinii</i> Genomik DNA İzolasyonu Bulgusu.....	94
4.2 PZR ile Çoğaltılan FDH Gen Bölgesi Bulgusu.....	94
4.3 Agaroz Jelden DNA Saflaştırmasına Ait Bulgu.....	94
4.4 FDH geninin pET23b+ Vektörüne Aktarılması Bulgusu.....	95
4.5 pET-23b+/FDH 'in <i>E.coli</i> DH5-α Hücrelerine Transformasyonu Bulgusu.....	96
4.6 pET23b+/FDH Vektörünü Alan Hücrelerin Koloni PZR Bulgusu.....	97
4.7 Plazmidlerin Endonükleazlar ile Kesimleri Bulgusu.....	97
4.8 Dizi Analizi Bulgusu.....	98
4.9 pET-23b+/FDH 'in <i>E.coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu.....	98
4.10 FDH Gen İfadesinin IPTG ile İndüklenmesi ve Protein Saflaştırma Bulguları.....	100
4.11 Yabanıl Tip CboFDH'in SDS-PAGE Analizi Bulgusu.....	101
4.12 Protein Miktar Tayini Bulgusu.....	101
4.13 Yabanıl Tip CboFDH Western Blot Analizi Bulgusu.....	102
4.14 Yabanıl Tip CboFDH Enziminin Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	103
4.14.1 Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	103
4.14.2 Farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	104
4.14.3 Enzim kinetiği hesaplamalarına ait bulgular.....	105
4.14.3.1 Değişen substrat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	106
4.14.3.2 Değişen koenzim konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	108
4.14.3.3 Değişen enzim konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	109

4.14.4 Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi.....	111
4.14.5 Farklı organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi.....	112
4.15 Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi Bulguları.....	113
4.15.1 Yabancı tip CboFDH'in ikincil yapısının belirlenmesi.....	113
4.15.2 Yabancı tip CboFDH'in termal stabilite tayini.....	114
4.16 Gradient PZR Bulguları.....	115
4.17 Bölgeye Yönelik Mutasyonların PZR Bulguları.....	117
4.18 Mutant FDH'lerin <i>E.coli</i> BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu.....	119
4.19 Mutasyonların Dizi Analizi Bulguları.....	120
4.20 Mutant FDH'lerin Protein İfadelerinin Bulguları.....	122
4.20.1 Mutant FDH'lerin SDS-PAGE analizi bulguları.....	123
4.20.2 Mutant FDH'lerin protein miktar tayini bulguları.....	125
4.20.3 Mutant FDH'lerin Western Blot analizi bulgusu.....	125
4.21 Mutant FDH Enzimlerinin Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	126
4.21.1 Farklı pH değerlerinin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	126
4.21.2 Farklı sıcaklık değerlerinin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	128
4.21.3 Mutant enzimlerin kinetik hesaplamalarına ait bulgular.....	130
4.21.3.1 Değişen substrat konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	131
4.21.3.2 Değişen koenzim konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	136
4.21.3.3 Değişen enzim konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	140
4.21.4 Farklı metal iyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	145
4.21.5 Farklı organik çözücülerin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi.....	150
4.22 Mutant FDH Proteinlerinin Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi Bulguları.....	155
4.22.1 Mutant FDH proteinlerinin ikincil yapılarının belirlenmesi.....	155
4.22.2 Mutant FDH proteinlerinin termal stabilite tayini	157
4.23 Protein Modelleme Bulguları.....	159
5. TARTIŞMA.....	162
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	192
KAYNAKLAR.....	194
ÖZGEÇMİŞ.....	209

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
APS	: Amonyum persülfat
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BHMT	: Homosistein metiltransferazın
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albumin
BSA	: Biyolojik dizi analizi
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
<i>C. boidinii</i>	: <i>Candida boidinii</i>
CboFDH	: <i>Candida boidinii</i> Format Dehidrogenaz
CD	: Dairesel dikroizm
CO₂	: Karbondioksit
CuCl₂	: Bakır klorür
DAS	: Dihidroksi aseton sentaz
DHA	: C3-bileşik dihidroksiaseton
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
DMG	: Dimetilglisin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EBI	: Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü
EC	: Enzim komisyonu
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FeCl₃	: Demir klorür
FGH	: S9-formilglutaze hidrolaz
FDH	: Format dehidrogenaz
GAP	: Gliseraldehid 3-fosfat
g	: Gram
GNMT	: Glisin-N-metiltransferaz
GTO	: Gauss tipi işlev
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
His-tag	: Histidin etiketi
IMAC	: İmmobilize-metal-iyon-afinite-kromatografi
IPTG	: İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
kb	: Kilobaz
KCl₂	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
lac	: laktoz
LB	: Luria bertani
LiCl₂	: Lityum Klorür
Mn	: Mangan
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi
MgCl₂	: Magnezyum Klorür

MgSO₄	: Magnezyum Sülfat
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MM	: Moleküler mekanik
mM	: Milimolar
Mo	: Molibdat
MSA	: Çoklu Sıralı Hizalama
NA	: Nikotinik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaAD	: Nikotinik asit adenin dinükleotidi
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Nam	: Nikotinamid
NaMN	: Nikotinik asit mononükleotide
ng	: Nanogram
Ni-NTA	: Nikel-nitriloasetik asit
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NR	: Nikotinamid ribozid
OD	: Optik yoğunluk
PEG	: Polietilen glikol
PseFDH	: <i>Pseudomonas sp.</i> Format Dehidrogenaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
QA	: Kinolinik asidin
QM	: Kuantum mekaniği
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rDNA	: Rekombinant DNA
SA	: Spesifik Aktivite
SAM	: S-adenosilmetiyonin
SAH	: S-adenosyl-L-homocysteine
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SESAM	: Sekans doygunluğu (saturation) mutagenezi
SHMT	: Serin hidroksimetiltransferaz
sn	: Saniye
SNO	: s-nitrosotiol
S.O.C	: Süper Optimal Broth
SSM	: Site saturation mutagenez , Bölge doygunluk mutagenezi
SSS	: Sıralı Arama Hizmetleri
SoyFDH	: Soya FDH
STO	: Slater-tipi orbital
THF	: Tetrahidrofolat
TAE	: Tris asetik asit EDTA
TBST	: Tris tamponlu salin Tween 20
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TM	: Açılma geçişinin orta noktası
Trp	: Triptofan
Tween 20	: Polisorbat 20

UV	: Ultraviole
UV-vis	: Ultraviole görünür ışık
W	: Tungsten
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid
Xu5P	: Ksiluloz 5-fosfat
YM	: Yeast Mold
ZnCl₂	: Çinko Kloro



SEMBOLLER

ΔC_P : Isı kapasitesi

ΔG : Serbest enerji

ΔH : Van't Hoff Entalpi

ΔS : Van't Hoff Entropisi

3D : Üç boyut



TABLO LİSTESİ**Sayfa**

Tablo 2.1	: Protein mühendisliği stratejilerinin karşılaştırılması.....	24
Tablo 3.1	: Kullanılan cihazlar listesi.....	47
Tablo 3.2	: Kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi.....	48
Tablo 3.3	: Klonlama bölgesine ait primerler.....	50
Tablo 3.4	: Mutasyon yapılan bölgelere ait primerler.....	50
Tablo 3.5	: 50x TAE çözeltisi hazırlanışı.....	53
Tablo 3.6	: 6x Örnek tamponu hazırlanışı.....	53
Tablo 3.7	: Tris-Trisin yürütme çözeltisi hazırlanışı.....	54
Tablo 3.8	: CBB boya çözeltisi hazırlanışı.....	54
Tablo 3.9	: Boya giderici çözeltisinin hazırlanışı.....	55
Tablo 3.10	: Metal bileşiklere ait çözeltiler.....	57
Tablo 3.11	: <i>C. boidinii</i> genomik DNA PZR reaksiyonu bileşenleri.....	59
Tablo 3.12	: <i>C. boidinii</i> genomik DNA PZR döngü koşulları.....	60
Tablo 3.13	: CboFDH geninin pET23b+ vektörüyle ligasyonu bileşenleri.....	62
Tablo 3.14	: Koloni PZR reaksiyonu bileşenleri.....	64
Tablo 3.15	: Koloni PZR reaksiyonu döngü koşulları.....	64
Tablo 3.16	: SDS-PAGE için jellerin bileşenleri.....	68
Tablo 3.17	: Değişen substrat konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.....	74
Tablo 3.18	: Değişen koenzim konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.....	75
Tablo 3.19	: Değişen enzim konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.....	75
Tablo 3.20	: Değişen konsantrasyonlardaki farklı metallerin reaksiyon ortamları.....	76
Tablo 3.21	: Değişen konsantrasyonlardaki farklı organik çözücülerin reaksiyon ortamları.....	77
Tablo 3.22	: Değiştirilecek aminoasitlerin tüm organizmalardaki üçlü kodlanma kodonları.....	79
Tablo 3.23	: Değiştirilecek aminoasit bölgeleri için tasarlanan primerler.....	80
Tablo 3.24	: Gradient PZR reaksiyon bileşenleri.....	81
Tablo 3.25	: Gradient PZR reaksiyonu döngü koşulları.....	81
Tablo 3.26	: Mutasyonlar için PZR reaksiyon bileşenleri.....	82
Tablo 3.27	: Val120Thr değişimi için PZR döngü koşulları.....	82
Tablo 3.28	: Phe285Thr değişimi için PZR döngü koşulları.....	82
Tablo 3.29	: Gln287Glu değişimi için PZR döngü koşulları.....	83
Tablo 3.30	: His311Gln değişimi için PZR döngü koşulları.....	83
Tablo 3.31	: Phe285Thr /His311Gln değişimi için PZR döngü koşulları.....	83
Tablo 3.32	: KLD reaksiyonuna ait bileşenler.....	84
Tablo 3.33	: Studier Oto-İndüksiyon media bileşenleri.....	85
Tablo 3.34	: Mutant enzimlerin değişen substrat konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.....	89
Tablo 3.35	: Mutant enzimlerin değişen koenzim konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.....	89
Tablo 3.36	: Mutant enzimlerin değişen enzim konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.....	90
Tablo 4.1	: Yabanıl tip CboFDH için değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.....	106
Tablo 4.2	: Yabanıl tip CboFDH enziminin format kinetik ölçüm değerleri.....	107
Tablo 4.3	: Yabanıl tip CboFDH için değişen koenzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.....	108
Tablo 4.4	: Yabanıl tip CboFDH Enziminin NAD kinetik ölçüm değerleri.....	109

Tablo 4.5	: Yabanıl tip CboFDH için değişen enzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.....	110
Tablo 4.6	: Yabanıl tip CboFDH enzimine ait kinetik ölçüm değerleri.....	111
Tablo 4.7	: mutFDH'ler için değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.....	132
Tablo 4.8	: mutFDH Enzimlerinin Format Kinetik Değerleri.....	136
Tablo 4.9	: Değişen koenzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği....	136
Tablo 4.10	: mutFDH enzimlerinin NAD ⁺ kinetik değerleri.....	140
Tablo 4.11	: mutFDH'ler için değişen enzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.....	141
Tablo 4.12	: mutFDH enzimlerinin kinetik değerleri.....	144
Tablo 4.13	: Mutant FDH enzimlerinin farklı metal konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.....	145
Tablo 4.14	: Mutant FDH enzimlerinin farklı organik çözücü konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.....	150
Tablo 5.1	: FDH'lerde yapılmış mutasyonlar.....	180

Şekil 2.1	: Metilotropik mayalarda metanol kullanım yolağı.....	4
Şekil 2.2	: Format üretiminde folat aracılı tek karbon metabolizması.....	7
Şekil 2.3	: Nikotinamid Adenin Dinükleotidin redoks reaksiyonları.....	10
Şekil 2.4	: NAD ⁺ 'ın Oksidoredüktaz bağlanması.....	13
Şekil 2.5	: CboFDH enziminin NAD ⁺ bağlanma ve katalitik bölgesi.....	16
Şekil 2.6	: Format Dehidrogenaz aktif bölgesi.....	18
Şekil 2.7	: Rekombinant DNA teknolojisi uygulama alanları.....	25
Şekil 2.8	: Gen klonlama basamakları.....	26
Şekil 2.9	: α - Aminoasitlerin genel yapısı.....	33
Şekil 2.10	: Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi.....	37
Şekil 2.11	: CD spektroskopide protein ikincil yapıları.....	38
Şekil 2.12	: CD spektroskopide termal stabilite.....	39
Şekil 3.1	: pET-23b(+) vektörü haritası.....	51
Şekil 3.2	: Belirteçler.....	52
Şekil 3.3	: Michaelis Menten eğrisi.....	72
Şekil 3.4	: Lineweaver-Burk eğrisi.....	73
Şekil 3.5	: FDH genomu dizisi üzerindeki mutasyon yapılan bölgelerin yeri.....	80
Şekil 4.1	: PZR ile çoğaltılan FDH gen bölgesi ürününün UV görüntüsü.....	95
Şekil 4.2	: Agaroz jelden saflaştırılan DNA ürününün UV görüntüsü.....	95
Şekil 4.3	: pET23b+ vektörüne aktarılan FDH gen ürününün UV görüntüsü.....	96
Şekil 4.4	: pET-23b+/FDH 'in <i>E.coli</i> DH5 α hücrelerine transformasyonu.....	96
Şekil 4.5	: pET23b+/FDH vektörünü alan hücrelerin koloni PZR UV görüntüsü.....	97
Şekil 4.6	: Plazmidlerin endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrası UV görüntüsü.....	98
Şekil 4.7	: pET-23b+/FDH vektörünün dizileme sonucu.....	99
Şekil 4.8	: Dizileme sonucu elde edilen rekombinant FDH protein dizisi.....	99
Şekil 4.9	: pET-23b+/FDH 'in <i>E.coli</i> BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu.....	99
Şekil 4.10	: FDH gen ifadesinin IPTG ile indüklenmesi bulgusu.....	100
Şekil 4.11	: Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi görüntüsü.....	101
Şekil 4.12	: Yabanıl tip CboFDH'in Western Blot analizi görüntüsü.....	103
Şekil 4.13	: Farklı pH değerlerinin yabanıl tip CboFDH aktivitesine etkisi	104
Şekil 4.14	: Farklı sıcaklık değerlerinin yabanıl tip CboFDH aktivitesine etkisi....	105
Şekil 4.15	: Değişen substrat konsantrasyonlarında yabanıl tip CboFDH enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	107
Şekil 4.16	: Değişen koenzim konsantrasyonlarında yabanıl tip CboFDH Enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	109
Şekil 4.17	: Değişen enzim konsantrasyonlarında yabanıl tip CboFDH enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	110
Şekil 4.18	: Farklı metal iyonlarının yabanıl tip CboFDH enziminin aktivitesine etkisi	111
Şekil 4.19	: Farklı organik çözücülerin yabanıl tip CboFDH enziminin aktivitesine etkisi	112
Şekil 4.20	: Yabanıl tip CboFDH'e ait α -heliks yapısı.....	114
Şekil 4.21	: Yabanıl tip CboFDH'e ait termal denatürasyon eğrisi.....	115
Şekil 4.22	: Gradient PZR UV görüntüleri.....	116
Şekil 4.23	: Bölgeye yönelik mutasyonların PZR UV görüntüleri.....	118
Şekil 4.24	: Mutant FDH'lerin <i>E.coli</i> BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu.....	120
Şekil 4.25	: Mutasyonların dizileme sonuçları.....	121

Şekil 4.26	: Mutant FDH'lerin SDS-PAGE analizi görüntüleri.....	123
Şekil 4.27	: Mutant FDH'lerin Western Blot analizi görüntüleri.....	126
Şekil 4.28	: Mutant enzimlerde farklı pH değerlerinin aktiviteye etkisi.....	127
Şekil 4.29	: Mutant enzimlerde farklı sıcaklık değerlerinin aktiviteye etkisi.....	129
Şekil 4.30	: Değişen substrat konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.....	132
Şekil 4.31	: Değişen koenzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk Eğrileri.....	137
Şekil 4.32	: Değişen enzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri	141
Şekil 4.33	: mutFDH enzimlerinde farklı metal iyonlarının aktiviteye etkisi.....	147
Şekil 4.34	: mutFDH enzimlerinde farklı organik çözücülerin aktiviteye etkisi...	152
Şekil 4.35	: mutFDH'lere ait α -heliks yapıları.....	155
Şekil 4.36	: mutFDH'lere ait termal denatürasyon eğrileri.....	158
Şekil 4.37	: 285. pozisyondaki fenilalanin.....	159
Şekil 4.38	: Phe285 (TTC853) -> Thr285 (ACC853) mutasyonu	159
Şekil 4.39	: 120. pozisyondaki valin.....	159
Şekil 4.40	: Val120 (GTT358) -> Thr120 (ACC358) mutasyonu.....	160
Şekil 4.41	: 287. pozisyondaki glutamin.....	160
Şekil 4.42	: Gln287 (CAA861) -> Glu287 (CAG861) mutasyonu.....	160
Şekil 4.43	: 311. pozisyondaki histidin.....	161
Şekil 4.44	: His311 (CAT933) -> Gln311 (CAA933) mutasyonu.....	161
Şekil 4.45	: Phe285Thr/His311Gln kombine mutasyonu.....	161

***Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI**

ÖZET

Farklı endüstrilerde geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimler, hastalıkların tanısında kullanılan biyokimyasal analizler için de önemlidir. Format (formik asit) tek karbonlu endojen bir metabolit olup, insan serumunda ve idrarında belirli seviyelerde bulunur. Format düzeylerinin insan serumu ve idrarında özellikle metanol intoksikasyonu, vitamin B eksiklikleri, astım, çeşitli psikiyatrik bozukluklar ve farklı patolojik durumlara bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Format Dehidrogenaz (FDH), format için mutlak özgüllük gösteren ve ortamda bulunan formattan elektronları NAD⁺'ye transfer eden bir enzimdir. Reaksiyonun sonunda oluşan NADH + H miktarı, reaksiyona giren formatın miktarı ile doğru orantılıdır. Tez projesi ile amacımız, NAD⁺ bağımlı FDH enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi, enzim aktivitesinin ve termal stabilitesinin artırılmasıdır.

Çalışmamızda, *Candida boidinii* (Cbo) FDH proteinini kodlayan 1095 baz çift geni, bir şablon olarak kullanılarak Polimez Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Ürün pET-23b (+) ifade vektörüne klonlandıktan sonra ekspresyon için *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildi. Üretilen CboFDH enziminin saflaştırılması için afinite His-Trap kolonu kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri 340 nm'de NADH miktarının fotometrik ölçümü ile gerçekleştirildi. Moleküller arası etkileşimler üzerinde yapılan mutasyonların etkisini tahmin etmek için, Gaussian 09 yazılımına mevcut kristal yapı (PDB: 5DN9) tanıtıldı ve mutasyon yapılacak bölgeler tahmin edildi. Daha sonra, enzim aktivitesini ve termal stabilitesini artırmaya yönelik olarak Val120Thr, Phe285Thr, Gln287Glu, His311Gln ve Phe285Thr/His311Gln mutasyonları gerçekleştirildi. Mutasyonla aminoasitleri değiştirilmiş enzimin yapısı geometrik optimizasyon ile kendi ortamında gerçek forma en yakın şekilde modellendi. Sonuçlar Pymol paket yazılımı ile görselleştirilerek tartışıldı.

Hem yabanıl tip hem de mutant FDH'ler için kinetik ve termostabilite çalışmaları yapıldı. Çalışmada ayrıca, yabanıl tip FDH ve mutant FDH suşlarının enzim aktivitesi üzerinde farklı metal iyonlarının ve organik çözücülerin etkisi araştırıldı. Yabanıl tip ve mutant enzimlerin ikincil yapıları ve termal stabilite çalışmaları dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ile incelendi. Çalışma sonucunda rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen yabanıl tip CboFDH için uygun pH 7.4, optimum sıcaklık ise 40 °C bulunurken; mutant enzimler için optimum pH ve sıcaklıklar, Phe285ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Val120ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Gln287GluFDH için pH 7, sıcaklık 60 °C, His311GlnFDH için pH 7, sıcaklık 65 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için pH 8, sıcaklık 65 °C olarak bulundu. CD cihazı ile α -heliks ikincil yapıları belirlenen yabanıl tip ve mutant enzimlerin termal denatürasyon (T_m) sıcaklıkları yabanıl tip CboFDH için 64 °C, Gln287GluFDH için 70 °C, His311GlnFDH için 77 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 73 °C olarak saptandı. Enzim kinetiği çalışmaları ile yabanıl tip CboFDH için format için K_M değeri 2 mM, K_{cat} değeri 9.2 x 10² S⁻¹, NAD için K_M değeri 1.5 mM, K_{cat} değeri 2.62 x 10⁴ S⁻¹; Phe285ThrFDH için format için K_M değeri 0.97 mM ve K_{cat} değeri 6.23 x 10³ S⁻¹, NAD için K_M değeri 2.3 mM ve K_{cat} değeri 4.59 x 10³ S⁻¹; Val120ThrFDH için format için K_M değeri 1.3 mM ve K_{cat} değeri 6.23 x 10³ S⁻¹, NAD için K_M değeri 7.9

mM ve K_{cat} değeri $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; Gln287GluFDH için format için K_M değeri 1.65 mM ve K_{cat} değeri $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 3.3 mM ve K_{cat} değeri $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.5 mM ve K_{cat} değeri $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 1.6 mM, K_{cat} değeri $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; Phe285Thr/His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.4 mM ve K_{cat} değeri $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 7 mM, K_{cat} değeri $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Farklı konsantrasyonlardaki 11 farklı metalin enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında yabanıl tip CboFDH ve mutant FDH'ler için CuCl_2 harici tüm metallerin aktiviteyi %80'e kadar artırdığı gözlenirken; CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda %77'ye kadar enzim aktivitesini düşürdüğü bulundu. Farklı konsantrasyonlardaki 5 farklı organik çözücünün enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında ise yabanıl tip CboFDH ve tüm mutant FDH'lerde aseton, etanol, metanol ve propanolün enzim aktivitesini %20-%31 aralığında artırdığı ancak kloroformun artan konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %97'ye kadar düşürdüğü bulundu.

Bu çalışma, bazı patolojik durumlardaki seviyeleri önemli bir belirteç olan formata mutlak spesifik ayrıca endüstriyel kullanım alanları geniş NAD^+ -bağımlı FDH enziminin yerli ve büyük ölçekte üretilmesinde veri sağlaması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Candida boidinii*, Format Dehidrogenaz, Format, Protein Mühendisliği, Rekombinant DNA Teknolojisi, Termal Stabilité

PRODUCTION OF NAD⁺ DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE ENZYME FROM *Candida boidinii* AND ENHANCEMENT OF ENZYME ACTIVITY AND THERMAL STABILITY

SUMMARY

Enzymes have a broad range of utility in different industries and they are important for biochemical kits used for diagnostics as well. Formate (formic acid) is an essential endogenous single-carbon metabolite under normal circumstances, it is found in human serum and urine at particular levels. Formate levels were shown to increase in human serum, urine and exhaled breathe condensate due to metabolism of different substances especially in cases of methanol intoxication, vitamins B deficiencies, asthma and various psychiatric disorders. Formate Dehydrogenase (FDH) is an enzyme that shows absolute specificity for formate and removes electrons from the formate ion in the environment and transfers them to NAD⁺. The amount of NADH + H at the end of the reaction is calculated as a direct proportion to the amount of the formate entering the reaction. With the thesis project, our aim is to produce NAD⁺ dependent FDH enzyme by recombinant DNA technology and increase enzyme activity and thermal stability. In our study, 1095 base pair gene encoding the *Candida boidinii* (Cbo)FDH protein was amplified by PCR using the genomic DNA from *C. boidinii* as a template. The product was cloned into pET-23b(+) vector and transferred to *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells for expression. The affinity His-Trap column was used for purification of the enzyme. Enzyme activity measurements were performed spectrophotometrically by monitoring the formation of NADH at 340 nm. To predict the influence of mutations done on intramolecular interactions, we introduced the available crystal structure (PDB:5DN9) to Gaussian 09 software and was changed the mutation cites. Subsequently, we modelled the structure of amino acid substituted enzyme, into almost real form in its environment by geometrical optimization. The results were visualized by pymol software and discussed. The determined mutations were performed by the directed mutation method for increase the enzyme activity and thermal stability. Kinetic and thermostability studies were performed for both the wild type and mutant FDHs. In this study different metal ions and organic solvents effect on enzyme activity of wild type FDH and mutant FDH strains were investigated as well. The thermal stability assays and secondary structures of the enzymes were performed by circular dichroism(CD) spectroscopy.

According to the results of the study, the optimal pH for wild type CboFDH produced by recombinant DNA technology was 7.4 and optimal temperature was 40°C ; pH and temperatures optimal for mutant enzymes were as follows: Phe285ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Val120ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Gln287GluFDH pH 7, temperature 60 °C, His311GlnFDH pH 7, temperature 65 °C and for the Phe285Thr/His311GlnFDH, pH 8 and the optimal temperature was found to be 65 °C. Thermal denaturation (T_m) temperature values of wild type and mutant enzymes with α -helix secondary structures determined by CD device were determined as 64 °C for wild type CboFDH, 70 °C for Gln287GluFDH, 77 °C for His311GlnFDH and 73 °C for Phe285Thr/His311GlnFDH. Enzyme kinetics studies for wild type CboFDH for formate revealed that the K_M value was 2 mM and K_{cat} value was 9.2 x 10² S⁻¹, for NAD the K_M value was 1.5 mM and K_{cat} was 2.62 x 10⁴ S⁻¹; for Phe285ThrFDH the K_M for formate was 0.97 mM and the K_{cat} value was 6.23 x 10⁶³ S⁻¹, the K_M value for

NAD was 2.3 mM and the K_{cat} value was $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Val120ThrFDH the K_M value for formate was 1.3 mM and K_{cat} was $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, K_M value for for the NAD 7.9 mM and K_{cat} of $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; for Gln287GluFDH, the K_M value for formate was 1.65 mM and the K_{cat} was $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 3.3 mM and the K_{cat} value was $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for His311GlnFDH, the K_M value for the format was 1.5 mM and the K_{cat} was $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 1.6 mM, the K_{cat} value was $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Phe285Thr / His311GlnFDH, the K_M value for the formate was 1.4 mM and the K_{cat} was $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 7 mM, and the K_{cat} value was $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$. The effect of 11 different metals in different concentrations on the enzyme activity was found that all metals except CuCl_2 found to enhance the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs by up to 80%; CuCl_2 was found to reduce the activity up to 77% in higher concentrations. The effect of 5 different organic solvents in different concentrations on the enzyme activity was found that acetone, ethanol, metanol and propanol increase the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs in range between 20%-31% but chloroform was found to decrease the activity between 37%- 97% at increasing concentrations in all enzymes.

This study is important in terms of providing data on the production of a wide range of NAD^+ -dependent FDH enzymes, which are absolutely specific to the formate, which is an important indicator of the levels in some pathological conditions, and the production of large-scale NAD^+ -dependent FDH enzyme.

Keywords: *Candida boidinii*, Formate Dehydrogenase, Formate, Protein Engineering, Recombinant DNA Technology, Thermal Stability

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerde önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküller olup, endüstride ve sağlık gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstrideki başlıca kullanım alanları: peynir yapımı sırasında sütteki laktozun uzaklaştırılması, nişasta ve yağları parçalamak amacı ile katkı maddesi olarak deterjan sanayinde, özel yağların sentezlerinde, deri sanayinde, dekstroz fruktoz ve özel şurup üretiminde vb. Bunların dışında pek çok hastalığın rutin tanısında kullanılan ticari kitlerin çalışma prosesi de enzimatik reaksiyonlara dayanmaktadır [1, 2]. Enzimler, bitki veya hayvanlardan izole edilebildikleri gibi rekombinant DNA teknolojisi ile mikroorganizmalar kullanılarak da üretilir. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretim, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi nedenlerle tercih edilen bir yöntemdir [3-5]. NAD⁺-bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimi (FDH) ilk olarak 1950'li yıllarda Mathews tarafından bezelye tohumlarından izole edilmiştir. Buna karşılık enzim popülarlığını 1970'li yılların sonunda, kiral moleküllerin endüstriyel sentezinde kullanılan kofaktörlerin geri dönüştürülmesi ve tekrar tekrar kullanılması amacıyla biyoreaktörlerde kullanılması ile kazanmıştır. 2000'li yılların başında gelişen DNA dizi analizi teknolojisi sayesinde birçok farklı organizmada NAD⁺-bağımlı FDH genleri tanımlanmıştır. Bu organizmalar arasında en çok ilgiyi, içerdikleri FDH enziminin dayanıklılığı ve yüksek kinetik aktivitesinden dolayı *Candida* cinsine ait organizmalar çekmiştir [2,6]. FDH ailesi, 2- hidroksi asit dehidrojenazların süper familyasına ait kuarterner yapıda enzim gruplarıdır. FDH enzimleri kompleksliklerine göre 3 sınıfa ayrılırlar; birinci FDH sınıfı kompleks alt birim yapılı, çalışması için çeşitli kofaktörler ve metallere ihtiyaç duyar ancak NAD⁺-bağımsızdır. İkinci FDH sınıfıysa NAD⁺'yi kofaktör olarak kullanır ve alt birim yapısı ilk sınıf FDH enzimlerinininki gibi kompleksdir. Üçüncü sınıf ise en basit enzimlerden oluşur (EC 1.2.1.2, NAD⁺-bağımlıFDH); koenzim olarak sadece NAD⁺ kullanır ve prostetik grup ya da metal iyonu bulundurmaz aynı zamanda kompleks yapıda değildirler [7,8]. NAD⁺-bağımlı FDH enzimi, format iyonlarını CO₂ 'ye yükseltgeyip

aynı zamanda NAD^+ molekülünü $\text{NADH}+\text{H}^+$ 'a indirgeyen önemli bir oksidoredüktazdır. FDH enziminin katalizlediği reaksiyonun diğer dehidrogenazlara oranla oldukça basit ve tek basamaklı olması sebebiyle, enzimin endüstriyel ve bilimsel kullanımı oldukça yaygındır [9,10]. Endüstriyel prosesler genellikle yüksek sıcaklık, basınç ve ekstrem pH'ları gerektiren koşullara ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte, doğal yollarla oluşan biyokatalizör enzimlerin, bu tür aşırı koşullardaki endüstriyel kullanımları esnasında düşük stabilite ve düşük aktivite gibi bazı sınırlamaları mevcuttur. Bunlara ek olarak, enzimlerin çoğunun sınırlı substrat ve koenzim spesifitesi ile düşük K_{cat} değerleri vardır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve biyokatalizörlerin uygulamalarını artırmak için nanoteknoloji, metabolik mühendislik, hücresel membran mühendisliği ve protein mühendisliği gibi çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Protein mühendisliği yaklaşımları ile, bu problemlerin üstesinden gelmek ve belirli endüstriyel uygulamalar için enzimleri optimize etmek için rasyonel tasarım, yönlendirilmiş mutasyon ve son olarak birleştirme yöntemleri geliştirilmiştir [11]. Çalışmamızın amacı, FDH proteini kodlayan genlerinin *Candida boidii* mikroorganizmasından izole edilerek rekombinant DNA teknolojisi ile *E.coli* (BL21) hücrelerinde ifade edilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Ardından, aktiviteyi ve termal stabiliteyi artırmaya yönelik belirlenen mutasyonların, protein mühendisliği yöntemlerinden birisi olan bölgeye yönelik mutasyon tekniği kullanılarak, üretilen CboFDH enziminde yapılmasıdır. Böylece tıbbi tanı kitlerinde ve endüstrinin pek çok alanında (gıda, boya, çevre teknolojileri vb) kullanılacak aktivitesi ve termal stabilitesi yüksek mutant FDH enzimleri üretilmiş olunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Maya *Candida boidinii*

2.1.1 *Candida boidinii* 'nin genel özellikleri

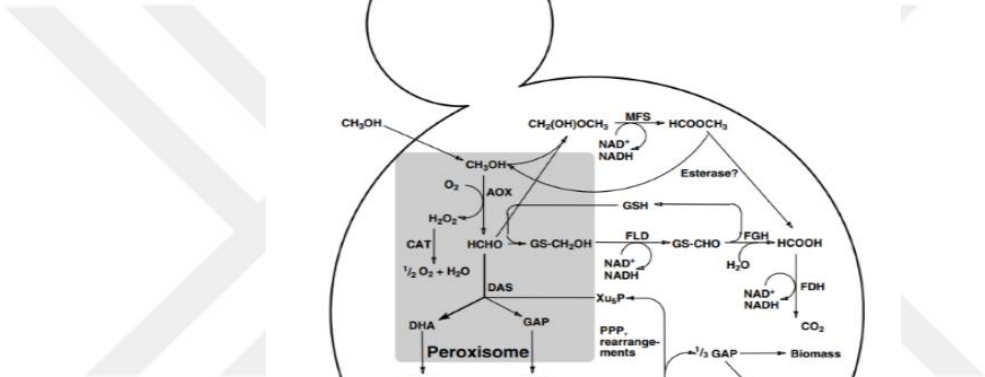
Candida boidinii (*C. Boidinii*) taksonomik olarak mantarlar aleminin, *Ascomycota* şubesinin *Saccharomycetes* sınıfından *Saccharomycetales* takımına aittir ve filogenetik olarak *Ogataea* kladına akrabadır. *Candida* türleri; oda sıcaklığı veya 37 °C 'de herhangi bir özel şarta gereksinim duymadan; normal besiyerlerinde, krem renkli, yumuşak, parlak ve homojen görünümlü koloniler oluşturarak ürerler. İdeal üreyebildikleri pH 4.5-5.0 olup %30-40 neme ihtiyaç duyarlar [12]. Bu maya türleri ilk olarak İspanya'daki ağaç kabuklarında tanımlanmış [13] olup yaygın bir ekolojiye sahiptir. *C. boidinii* türleri çeşitli substratlardan (şarap fermantasyonu, zeytin üretimi vb.) ve doğal ortamlardan (toprak, deniz suyu, pek çok şeker bakımından zengin ağaç türünün özsu akı vb.) izole edilebilirler [14]. *C. boidinii*; ksiloz tüketen, metilotropik mayalardır ve özellikle metanol degradasyonu ile ilgili genlerin çalışması için uygun oldukları kanıtlanmıştır [15-17]. Tüm bunların yanısıra biyoteknolojik potansiyele sahip *C. boidinii* türleri zeytin işleme proseslerindeki lipaz aktivitesi [18], meyve epidermisi üzerinde biyofilm oluşumu [19, 20] ve *Lactobacillus pentosus* gibi laboratuvar türleri ile birlikte agregasyon gibi farklı pek çok işlevsel özellikler sergilemektedir [21, 22]. Tüm bu özellikler *C. boidinii*'nin tür içi biyoçeşitliliğinin yüksek olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir [23].

2.1.2 *Candida boidinii* metabolizması

Metilotropik mayalar içerisinde yer alan *C.boidinii*, rekombinant protein üretimi için ökaryotik bir konakçı olup son 30 yıl içerisinde giderek artan sayıdaki uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda, karbon ve enerji kaynağı olarak metanol kullanım yolundaki (MUT) genlerden türetilmiş metanolle uyarılabilir promotorların varlığından yararlanır [24, 25]. Bu promotorlar, karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında güçlü bir şekilde indüklenirken, yüksek glukoz konsantrasyonlarında ise inhibe olurlar. Rekombinant proteinlerin üretiminde metilotropik mayaların

The diagram illustrates the metabolic pathway for the detoxification of methylglyoxal (CH₃CHO) within a peroxisome. The pathway begins with the entry of CH₃OH and CH₃(OH)OCH₃ into the peroxisome. CH₃OH is converted to CH₃CHO by the enzyme AOX, which uses O₂ and produces H₂O₂. H₂O₂ is then converted to H₂O by the enzyme CAT. CH₃CHO is converted to GS-CH₃OH by the enzyme DAS, which uses 1/2 O₂ and produces H₂O. GS-CH₃OH is then converted to GS-CHO by the enzyme FLD, which uses NAD⁺ and produces NADH. GS-CHO is converted to HCOOCH₃ by the enzyme Esterase, which uses GSH and produces GS. HCOOCH₃ is then converted to HCOOH by the enzyme FGH, which produces H₂O. HCOOH is converted to CO₂ by the enzyme FDH, which uses NAD⁺ and produces NADH. CO₂ is then converted to Biomass. The pathway also shows the conversion of CH₃(OH)OCH₃ to HCOOCH₃ by the enzyme MFS, which uses NAD⁺ and produces NADH. The peroxisome is shown as a shaded area with a dashed border, and the entire process is labeled as 'Methylglyoxal detoxification'.

MUT yolunun bir kısmı peroksizomlarda yer aldığından, bu organeller metanol indüksiyonu ile kitlesel olarak çoğalırlar ve sitoplazmik boşluğun % 80'ini oluşturabilirler [26]. Metanol kullanımının ilk adımında; metanol, alkol oksidazlar (AOX, EC 1.1.3.13) ile formaldehit ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oksitlenir. Toksik H_2O_2 , katalaz etkisi ile oksijene ve suya (H_2O) ayrılır (CAT, EC 1.11.1.6). Her iki enzim de peroksizomlarda tutulmaktadır (Şekil 2.1).



Formaldehit, iki ardışık dehidrojenaz reaksiyonu (disimilasyon yolu) ile oksitlenir veya ksiluloz 5-fosfat (Xu5P) ile kondensasyon yoluyla hücre metabolizmasında asimile edilir. Son peroksizomal kondensasyon reaksiyonu dihidroksiaseton sentaz (DAS, 2.2.1.3) adı verilen özel bir transketolaz ile katalize edilir [27]. DAS, Xu5P ve formaldehiti, sitozolde daha da metabolize edilen C3-bileşik dihidroksiaseton (DHA)

ve gliseraldehid 3-fosfat (GAP)'a dönüştürür. Ayrışma yolağında, formaldehit glutatyon ile kendiliğinden reaksiyona girerek S-hidroksimetil glutatyona dönüşür. Bu bileşik de, her ikisi de sitozolde gerçekleşen iki ardışık reaksiyonla önce glutatyona daha sonra bir NAD^+ bağımlı FDH ile reaksiyona girerek CO_2 'ye dönüşür. Her iki reaksiyonda üretilen NADH, metanolde büyüme için enerji üretiminde kullanılır. Enerji üretimindeki rollerinin yanı sıra, ayrışma yolu enzimleri sırasıyla formaldehit ve formatın detoksifikasyonunda rol oynar [28]. Bu yola dahil olan üçüncü bir enzim (veya enzimatik aktivite), S9-formilglutaze hidrolaz (FGH, EC 3.1.2.12), S-formilglutasyonu format ve glutatyona hidrolize eder [29]. Metalotropik diğer maya türlerinin aksine (*P. pastoris*, *H. polymorpha*, *Kloeckera sp.*) *C. boidinii*'de ayrı bir enzim FDH ile ilişkili bulunmuştur [30].

Etanol ve glukoz, MUT yolunu baskılamak için iki ayrı mekanizma yoluyla hareket eder. İndüklenmiş hücrelerde anahtar enzimler olan alkol oksidaz, dihidroksiaseton sentaz ve format dehidrojenaz, indükte hücrelerde toplam çözünür proteinin % 30'una kadarını (AOX) veya % 20'sini (DAS, FDH) oluşturabilir [31]. Bu durum, enzimleri kodlayan genlerin promotorlarının metanol tarafından kuvvetli bir şekilde aktive edildiğini gösterir ki böyle indüklenebilir promotorlar, metilotrop mayalar aracılı heterolog gen ekspresyon sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Metanol metabolizmasındaki enzimlerin verimli ve stabil bir şekilde izole edildiği, enzimleri kodlayan genlerin metanol tarafından indüklenip glikoz ve etanol tarafından baskılanan promotorların tam olarak tanımlandığı, sentetik tuz temelli ucuz besiyerlerinde yüksek hücre yoğunluğunda büyüyebildiği için *C. boidinii* bu yolağın enzimlerinin eldesinde model organizma olarak kabul edilmektedir [32].

2.2 Metabolizmada Formatın Önemi

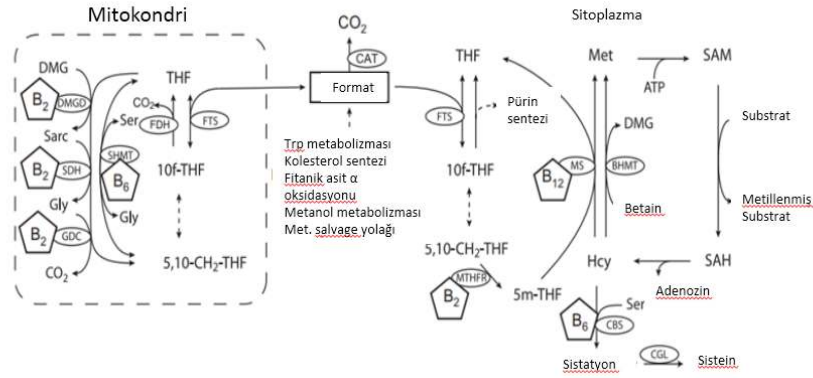
Formik asit ve onun konjuge bazı format, hemen hemen tüm canlı organizmalarda endojen tek karbonlu bileşik metabolizmasının temel bileşenidir. HCOOH kimyasal formülü ile en basit karboksilik asit olan formik asit bazen metanoik asit olarak da adlandırılır [33]. Formik asit 3.77'lik bir pK_a 'ya sahiptir ve vücutta, çoğunlukla format anyonu olarak bulunur.

Formatın metabolizma ara basamaklarındaki önemi yaklaşık 60 yılı aşkın bir süre önce, formatın karbonunu nükleik asitlere ve glikojenik amino asit serine eklediğinin gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır [34-37].

Format karbonunun nükleik asit ve serine eklenmesi, tetrahidrofolat (THF) ile aktivasyonunu gerektirir ve bu nedenle format ve folat metabolizması birbiriyle ilişkilidir [38]. Günümüzdeki hücresel folat metabolizması anlayışımız; glisin, serin ve format gibi tek karbon vericileriyle birbirine bağlanan ve biri mitokondride diğeri sitozolde yer alan iki adet birbirine paralel folat havuzundan oluşur [39]. Metabolik ara basamaklarda formatın önemini bilmemize rağmen, format metabolizması konusundaki bilgimiz sınırlıdır. Annison yaptığı çalışmada; formatın birçok hayvanın kanındaki toplam uçucu yağ asitlerinin % 10 - % 30'unu oluşturduğunu, en önemlisi de bunun keçilerde, sığırlarda, atlarda, köpeklerde, kedilerde ve insanlarda benzer konsantrasyonda olduğunu göstermiştir [40]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise, özellikle metanol toksisitesinde yüksek seviyelerde formik asitin saptanması nedeniyle formatın uzaklaştırılmasına odaklanılmıştır.

2.2.1 Folat bağımlı format üretimi

Formatın ortak tek-karbon vericilerinden folat aracılı üretimi sırasında, donörler mitokondriye girerek 5,10-metilen-tetrahidrofolat oluşturmak üzere stabil olmayan karbonları folat havuzunu oluştururlar ve bu bileşik daha sonra format ve THF üretmek için oksitlenir (Şekil 2.2) [41]. Formatın folat bağımlı üretiminde; serin, kolin, glisin, metiyoninin katkısı büyüktür ve özellikle diyetle alınan serininin katabolizması, iki tane tek karbonlu grup oluşturma potansiyeline sahiptir. Serin ve THF, serin hidroksimetiltransferaz (SHMT) yoluyla 5,10-metilen THF ve glisin haline dönüştürülebilir. Glisinin mitokondriyal katabolizması, ikinci tek-karbon grubunu oluşturma olasılığına sahiptir. Nükleer DNA'da SHMT'nin iki ayrı izoformu kodlanmıştır, bunlardan biri sitoplazmada (SHMT1) diğeri de mitokondride (SHMT2) 'de ifade edilir [42, 43]. Kolin ise tek karbonlu prekürsörlerin arasında benzersiz olup karbon havuzuna dört karbona kadar karbon sağlama kabiliyetine sahiptir. Kolin başlangıçta kolin dehidrojenaz ile betain aldehite katabolize edilir, sonrasında betain aldehid dehidrojenaz ile betaine çevrilir [44].



Şekil 2.2: Format üretiminde folat aracılı tek karbon metabolizması [41].

Bu reaksiyonların ikisi de mitokondride meydana gelir. Betain daha sonra, dışarı sitoplazmaya transfer edilir. Böylece betainin metil grupları, homosistein metiltransferazın (BHMT) etkisiyle homosisteinin metiyonine metillenmesinde kullanılarak dimetilglisin (DMG) oluşturur. Bu metionin, ayrıca, S-adenosilmetiyonin (SAM) üretimi için ve diğer metabolik yollar (protein sentezi gibi) için de kullanılabilir. Spesifik olarak, DMG dehidrojenaz, DMG'yi sarkosine dönüştürür ve bunu glisin oluşumu takip eder [45]. Son olarak; glisin, glisin parçalama sistemi tarafından amonyak ve karbondioksite katabolize edilir. Bu üç reaksiyonun her biri kofaktör olarak THF'ye ihtiyaç duyar [46].

Bu yolla metiyonin, metiyonin adenosiltransferaz ile SAM yapısına katılarak dolaylı olarak sitoplazmik tek karbon havuzuna katkıda bulunur. SAM, bir çok metiltransferazın metiyonindeki metil grubunu nükleofilik substratlara transfer ederek metillenmiş ürünler ve S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) üretme sürecindeki anahtar substrattır [47]. Glisin-N-metiltransferaz (GNMT); hücrenin, metilasyon ve diğer reaksiyonlar için gerekenden daha fazla SAM oluşturması durumunda, metil grubunu, sarkosin oluşturacak şekilde glisin'e transfer edilebilecek bir kontrol mekanizması olarak hizmet eder [48].

2.2.2 Folattan bağımsız format üretimi

Format üretimi her zaman folat gerektirmez. Metanol metabolizması belki de folatın katılımı olmadan format üretiminin en belirgin örneğidir. Format ayrıca triptofan ve fitanik asit metabolizması ve kolesterol sentezi sırasında üretilir. Tüm bunların yanında format üretimine yönelik folat-bağımsız ve folat-bağımlı yolların oransal katkılarına ilişkin herhangi net bilgi bulunmamaktadır [48].

2.2.3 Metanol toksisitesi

Metanol zehirlenmesi, saf methanol eldesi için ucuz bir yöntemin keşfedildiği 1890'dan önce neredeyse bilinmemektedir. Metanol toksisitesi, saatlerce sürebilen bir latent dönem sonrası birden oraya çıkan akut metabolik asidoz ve oküler toksisite ile karakterizedir. Metanol, alkol dehidrogenaz ile formaldehide dönüştürülürken, formaldehit ise aldehit dehidrogenaz ile formik aside dönüştürülür. Tephly yaptığı çalışmada; metanol toksisitesini farklı canlı türlerinde karşılaştırmalı olarak incelemiş, metanol toksisitesinin fare ve sıçan gibi alt hayvanlarda görülmezken, insanlarda ve maymunlarda belirgin gözlemlendiğini bildirmiştir [49]. İnsanlarda ve maymunlarda format birikmesinin sebebi, formatın uzaklaştırılmasında görevli hepatik THF ve 10-formil-THF dehidrogenaz aktivitesinin düşük kapasitelerine bağlanmaktadır. Bunun yanında, bazı pektin içeren meyvelerin [50] ve alkollü içeceklerin tüketimi sonucu insan serumunda düşük yoğunlukta da olsa metanol bulunmaktadır. Fakat bu metanol kaynaklarının format havuzuna indüktif katkısı bilinirken, metabolizmayı biçimlendirmeye olan nispi katkısı bilinmemektedir [51]. Metanol vücutta formik aside dönüştürüldüğü için kandaki metanol seviyesinin belirlenmesi zordur. Kandaki metanol seviyesi alınan metil alkol miktarı ve alınmasının üzerinden geçen zamana göre değişiklik göstermektedir. Zehirlenmede hastalarda semptomların görülmesi çoğunlukla formik asit seviyelerinin yükselmesi sonucunda gerçekleştiği için, kandaki metanol düzeyinin düşüklüğü yanıltıcıdır [52, 53]. Bu yüzden, kanda format düzeyinin ölçülmesi metanol zehirlenmelerinde daha güvenilirdir. Çünkü, insanda serum format düzeyleri normalde 20 μ M ile 450 μ M arasındayken, akut metanol zehirlenmesinde 10 mM -30 mM'a kadar yükselir [54].

2.2.4 Format düzeylerinin klinik önemi

Formik asidin toksisitesi üzerindeki çalışmaların çoğu, çok yüksek konsantrasyonlarda formatın akut birikimini içeren, kompanse olmayan asidoz, koma ve nihayetinde ölüme neden olan metanol zehirlenmesi ile ilgilidir. Bunun yanında, fizyolojik olarak bozulmuş tek karbon metabolizması sırasında oluşabilecek yüksek format konsantrasyonları da patolojik etkiler gösterebilmektedir.

Folat-aracılı tek-karbon metabolizması kofaktör olarak B vitaminlerine bağımlıdır. Lamarre yaptığı çalışmada; B vitamin seviyelerinin azalması durumunda bu metabolik yolların kesintiye uğradığını; bu durumun sonucu olarak, folat eksikliği

olan farelerle yaptığı deneylerde plazma ve idrar format düzeylerinin arttığını göstermiştir [55]. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre format sadece önemli bir ara metabolizma ürünü değil, aynı zamanda B vitamin eksiklikleri için de önemli bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır [56].

Nicholls yaptığı çalışmada, formatın sitokrom c oksidazın bir inhibitörü olduğunu göstermiştir [57, 58]. Kapur ve arkadaşları ise; 1 mM gibi düşük format konsantrasyonunun sıçan hipokampal beyin dilimlerinde nörotoksositeye neden olduğunu bildirmişlerdir [59]. İnsanlarda daha düşük konsantrasyonlardaki formatın daha ciddi sorunlar yaratabileceği düşünülmektedir. Greenwald ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda; şiddetli astım hastalarından alınan ekzale nefes kondensatı örneklerinde s-nitrosotiol (SNO) katabolizması sonucu oluştuğu düşünülen formatın miktarı; hafif-orta seviye astımlı kişilerde, sağlıklı kontrol grubundaki kişilerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bildirilmiştir [60]. Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, bipolar bozukluğu olan erkek ve kadın hasta gruplarında yapılan idrar metabolit incelemelerinde formatın erkek hastalarda diskriminatif olarak sonuç vermiştir [61].

2.3 Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) Koenzimi

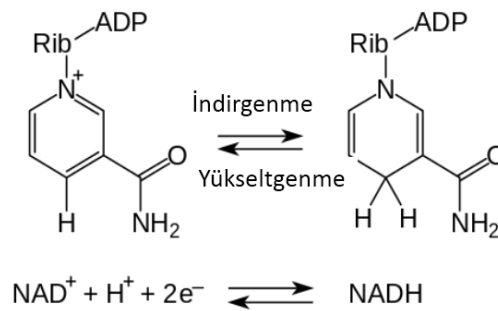
Tüm canlı hücrelerde bulunan Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) koenzimi ilk olarak 1906 yılında İngiliz biyokimyacı Arthur Harden ve William John Young tarafından keşfedilmiştir [62]. NAD koenzimi, fosfat gruplarının katıldığı iki nükleotitten oluşan bileşik bir dinükleotittir. Bir nükleotid, bir adenin nükleobazı ve bir nikotinamid içerir. Metabolizmada NAD, bir reaksiyondan diğerine elektronları taşıyan redoks reaksiyonlarında rol oynar. Hücrelerde NAD^+ formu, oksitleyici bir madde olup diğer moleküllerden elektronları kabul edip indirgenir. Reaksiyon daha sonra elektronları bağışlamak için bir indirgeyici ajan olarak kullanılabilen NADH formunu oluşturur. Bu elektron transfer reaksiyonları NAD'nin ana işlevidir.

NAD^+ ; ADP-ribosilasyon reaksiyonlarında ADP-riboz parçalarının bir donörü olarak ve ikinci haberci molekülü olan siklik ADP-ribozunun bir öncüsü olarak görev almasının yanında ayrıca bakteri DNA ligazları ve asetil gruplarını proteinlerden uzaklaştıran sirtuin olarak adlandırılan bir grup enzim için substrat gibi hareket ederek redoks reaksiyonlarında bir koenzim olarak işlev görür. Özellikle translasyonel modifikasyonlarda proteinlerden kimyasal grupları ekleyen veya çıkaran enzimlerin

substratı şeklinde kullanılırlar. Bu özelliklerinden dolayı ilaç araştırmalarında hedef moleküllerdir. Bu metabolik fonksiyonlara ek olarak NAD^+ , kendiliğinden ve düzenlenmiş mekanizmalarla hücrelerden salınabilen bir adenin nükleotidi olarak ortaya çıkar [63] ve bu nedenle önemli hücre dışı rollere sahip olabilir [64]. Nitekim son yıllarda NAD^+ , hücre-hücre iletişimde rol alan hücre dışı bir sinyallem molekülü olarak da bilinmektedir [65, 66]. NAD^+ 'ın, kan damarlarındaki nöronlardan, [63] idrar kesesinden [63, 67], kalın bağırsaktan [68, 69] nörosekretuar hücrelerden [70] ve beyin sinaptozomlarından [71] salgılandığı bildirilmiştir.

2.3.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Tüm dinükleotidler gibi NAD^+ , bir çift köprüleme fosfat grubuyla birleştirilen iki nükleozidden oluşur. Nükleozidlerin her biri, birincisi birinci karbon atomuna (1' konumu) bağlanmış bir adenin ve diğeri ise bu pozisyonda nikotinamid içeren bir riboz halkası içerir. Nikotinamid kısmı, bu anomerik karbon atomuna iki yönde eklenebilir. Bu iki olası yapı nedeniyle, bileşik iki diastereomer olarak bulunur. Organizmalarda bulunan NAD^+ β -nikotinamid diastereomeridir. Bu nükleotidler, 5 'karbondan iki fosfat grubunun bir köprüsü ile bir araya getirilir [72]. Metabolizmada bileşik, redoks reaksiyonlarında iki hidrojen atomunun tepkime maddesinden (R), bir hidrit iyonu (H_2) ve bir proton (H^+) şeklinde uzaklaştırılmasında rol oynar. Proton, çözelti içinde bırakılırken indirgeyici RH_2 oksitlenir ve NAD^+ , hidritin nikotinamid halkasına aktarılmasıyla NADH 'ye indirgenir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Nikotinamid Adenin Dinükleotidin redoks reaksiyonları [72].

Hidrit elektron çiftinden bir elektron, NAD^+ 'ın nikotinamid halkasının pozitif yüklü azotuna aktarılırken ikinci hidrojen atomu, bu nitrojenin karşısındaki C4 karbon atomuna aktarılır [73]. NADH bir başka molekülü indirgediğinde ve NAD^+ 'a yeniden oksitlendiğinde reaksiyon kolayca geri çevrilebilir. Bu koenzimin tüm formları

higroskopik ve suda çözünebilir olan beyaz amorf tozlardır [74]. NAD^+ çözeltileri, 4 °C' de ve nötral pH'ta yaklaşık bir hafta boyunca renksiz ve stabildirler. Ancak asitler veya alkaliler içinde hızla ayrışır ve bunun sonucunda enzim inhibitörü olan ürünler oluştururlar [75]. Hem NAD^+ hem de NADH , adeninden dolayı ultraviyole ışığı absorbe eder. NAD^+ 'ın absorpsiyon piki 259 nm'de iken NADH 'ın 339 nm'dedir [76]. Yüksek dalga boylarında koenzimlerin okside ve reddükte formları arasındaki absorpsiyon yelpazeleri çok farklıdır. NAD^+ ve NADH ayrıca floresan özellikleri açısından da farklılık gösterir [77]. NADH proteinlere bağlandığında floresan sinyalinin özellikleri değişir, bu nedenle bu değişiklikler enzim kinetiği çalışmalarında yararlı olan ayrılma sabitlerini ölçmek için kullanılır [77, 78]. Ayrıca floresan özelliklerdeki bu değişiklikler, floresan mikroskopu yoluyla yaşayan hücrelerin redoks durumundaki değişiklikleri ölçmek için de kullanılır [79].

2.3.2 NAD^+ biyosentezi

NAD^+ iki metabolik yolla sentezlenir: Birincisi amino asitlerden yeni üretim yoluyla NAD^+ sentezlenmesi, ikincisi ise önceden oluşmuş bileşenlerin kurtarma yollarında geri dönüşümü yoluyla NAD^+ sentezlenmesidir. Buna en basit örnek Nikotinamidin NAD^+ 'a dönüşmesidir.

2.3.2.1 *De novo* yolağı

Çoğu organizma, NAD^+ 'yi basit bileşenlerden sentezler [80]. Bazı reaksiyonlar organizmalar arasında farklılık göstermesine rağmen bir amino asitten gelen kinolinik asidin (QA) üretilmesi ortak bir özelliktir. Bu aminoasit, hayvanlarda ve bazı bakterilerde triptofan (Trp) iken bazı bitkilerde ise aspartik asit (Asp)'dir [81, 82]. Kinolinik asit, bir fosforiboz parçasının transferi ile nikotinik asit mononükleotide (NaMN) dönüştürülür. Bir adenilat parçası daha sonra nikotinik asit adenin dinükleotidi (NaAD) oluşturmak üzere transfer edilir. Son olarak, NaAD içerisindeki nikotinik asit kısmı, nikotinamid adenin dinükleotidi oluşturan bir nikotinamid (Nam) kısmına aittir [80]. Diğer basamaklarda ise NAD^+ , NAD^+ 'ı fosforlayan NAD^+ kinaz ile NADP^+ 'ye dönüştürülür [83]. Çoğu organizmada bu enzim, fosfat grubu kaynağı olarak ATP kullanır.

2.3.2.2 Kurtarma (Salvage) yolağı

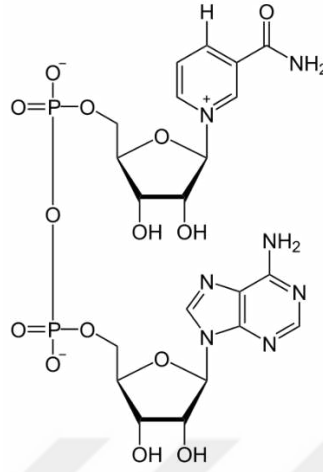
Bu yolda, basit amino asit öncüllerinden yeni NAD^+ üretilmesinin yanı sıra, hücreler pirimidin bazı içeren bileşikler geri dönüştürmek yoluyla da NAD^+ üretilir. Salvage yolağında; nikotinik asit (NA), nikotinamid (Nam) ve nikotinamid ribozid (NR) olarak adlandırılan üç vitamin öncüsü kullanılır [84]. Diyetle alınan ya da hücrel NAD^+ 'nin sindirimi ile üretilen bu bileşikler B3 veya niasin olarak adlandırılırlar. Kurtarma yollarında bulunan enzimlerin bir kısmı hücre çekirdeğinde yoğunlaşmıştır [85]. De novo yolunun varlığına rağmen, kurtarma reaksiyonları insanlarda mutlaka bulunmak zorunda olup niasin yönünden zayıf diyetin sonucunda pellagra olarak bilinen vitamin eksikliği hastalığı oluşur [86]. NAD^+ için bu yüksek gereklilik, koenzimin sürekli transasyon sonrası modifikasyonlar gibi reaksiyonlarda tüketilmesiyle sonuçlanır. NAD^+ 'nin redoks reaksiyonlarındaki oksitlenmiş ve indirgenmiş formları arasındaki döngü ile koenzimin genel seviyesi değişmez [84].

2.3.3 NAD^+ 'in oksidoredüktaz bağlanması

NAD^+ 'in metabolizmadaki ana rolü, dehidrogenazlar yada redüktazlar olarak da bilinen oksidoredüktazlar adı verilen büyük bir enzim grubu tarafından katalize edilen reaksiyonlarda bir molekülden diğerine elektronların aktarılmasıdır. $\text{NAD}^+ / \text{NADH}^+$ ı bağlayan birçok farklı enzim ailesi bulunmakla birlikte bu aileler Rossmann katlanması olarak bilinen yapısal bir ortak motif içerirler [87]. Motif, bu yapının nükleotid bağlayıcı proteinler içinde ne kadar yaygın olduğunu ilk fark eden bilim adamı olan Michael Rossmann'dan adını alır [88].

NAD^+ , bir oksidoredüktazın aktif yerine bağlandığında koenzimin nikotinamid halkası diğer substrattan bir hidriti kabul edebilecek şekilde konumlandırılır. Enzime bağlı olarak hidrit verici, Şekil 2.4'de tanımlandığı gibi düzlemsel C4 karbonunun "üstünde" veya "altında" olacak şekilde konumlandırılır. Enzime göre değişmekle beraber, şekilde görüldüğü üzere, hidrit vericisi düzlemsel C4 karbonunun bulunduğu düzlemin "altında" ya da "üzerinde" yer alır. A sınıfı oksidoredüktazlar atomu yukarıdan aktarırken B sınıfı enzimler aşağıdan aktarır. hidrojeni kabul eden C4 karbonu prokiral olduğundan, enzim mekanizmaları hakkında bilgi vermek için enzim kinetiğinde kullanılabilir. Bu, bir enzimin hidrojenler için süstitüe edilmiş döteryum atomlarına sahip bir substrat ile karıştırılmasıyla yapılır. Böylece enzim hidrojen

yerine döteryumu aktararak NAD^{+} 'ı azaltır. Bu durumda, bir enzim NADH'ın iki stereoizomerinden birini üretebilir [89].



Şekil 2.4: NAD^{+} 'ın oksidoredüktaz bağlanması (Diyagramda, hidrit alıcısı C4 karbonu üstten gösterilmiştir. Nikotinamid halkası, sağdaki karboksi-amid ile sayfanın düzleminde bulunduğu; hidrit verici, sayfanın düzleminin "üstünde" veya "altında" yer alır. Eğer hidrit transferi "yukarıda" ise A sınıfı, "aşağıda" ise B sınıfıdır) [89].

Proteinlerin iki koenzimi de bağlamadaki benzerliğine rağmen hemen her zaman NAD^{+} veya NADP^{+} için yüksek düzeyde bir özgüllük gösterirler [90]. Bu özgüllük, ilgili koenzimlerin farklı metabolik rollerini yansıtır ve iki tip koenzim bağlayıcı cebin farklı amino asit rezidülerinden oluştuğunun göstergesidir. Örneğin, NADP^{+} 'ye bağlı enzimlerin aktif bölgesinde, bir bazik amino asit yan zinciri ve NADP^{+} 'nin asidik fosfat grubu arasında bir iyonik bağ oluşur. Tersine NAD -bağımlı enzimlerde, bu cebin yükü tersine çevrilir ve NADP^{+} 'nin bağlanması engellenir.

2.4 NAD^{+} Bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimleri

60 yıldan fazla bir zaman önce keşfedilen FDH üzerine yapılan çalışmalar 1970'lerde hızlanmış, enzimin genellikle mayalarda, bakterilerde, bitkilerde ve mantarlarda bulunduğu görülmüştür. Metilotrof mikroorganizmaların enerji tedarikinde ve bitkilerde stres cevabında önemli rol oynayan FDH, bitkilerin mitokondrisinde bulunmakta ve stres oluşturan şartların artmasıyla biosentezi artmaktadır. NAD^{+} -bağımlı FDH, format anyonunun karbon dioksit (CO_2) yükseltgenmesini, NAD^{+} 'nin NADH 'a indirgenmesini katalizler. FDH enzimi 2-hidroksi asit dehidrogenaz

süperfamilyasına aittir. Bu süperfamilyadaki enzimler dördüncül yapılarında, prostetik grup bulundurmalarında ve substrat özgüllüklerinde çeşitlilik gösterirler. FDH enzimleri kompleksliklerine göre 3 sınıfa ayrılırlar; ilk iki grup kompleks dördüncül yapıdadır ve molibden, selenyum, demir gibi ağır metallerle çalışır. Aralarındaki tek fark ise birinci FDH sınıfının NAD^+ -bağımsız iken ikinci FDH sınıfının NAD^+ 'yi kofaktör olarak kullanmasıdır. Üçüncü sınıf ise en basit enzimlerden oluşur (EC 1.2.1.3, NAD^+ -bağımlı FDH); koenzim olarak sadece NAD^+ gerektirir ve prostetik grup ya da metal iyonuna gereksinim duymaz [91-94].

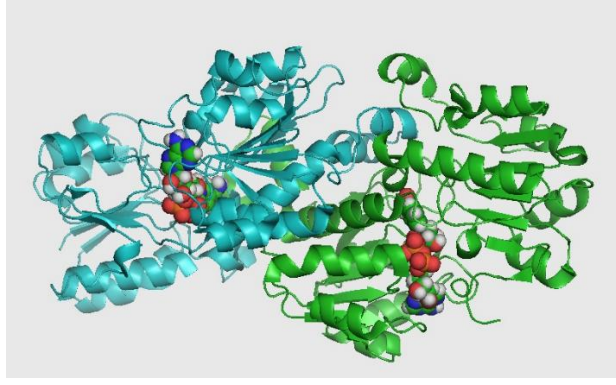
2.4.1 Format Dehidrogenaz enziminin katalitik özellikleri

NAD^+ -bağımlı FDH enzimlerinin çoğunun Michaelis Menten tarzı kinetiği vardır. Aktif bölge merkezleri birbirinden bağımsız çalışır ve genellikle iki-substratlı reaksiyon mekanizmasına sahiptirler ve yapıya önce NAD^+ ardından format bağlanır. Substratlardan birinin bağlanması, diğerine olan afiniteyi (enzimin ilgisini) 3.5 kat artırır. Katalitik mekanizması, hidrid iyonunun substrattan NAD^+ 'nin nikotinamid kısmındaki C4 atomuna doğrudan transferi ile gerçekleşir. Çeşitli organizmalarda yapılan FDH çalışmaları, benzer kinetik özellikler göstermektedir. Tüm enzimlerin format (3 mM -10 mM) ve NAD^+ (35 μM -90 μM) için çok yakın K_M değerleri olmakla birlikte rekombinant FDH enzimleri de bunlardan çok az farklılık göstermektedir. Çoğu NAD^+ -bağımlı FDH enzimlerinin NAD^+ 'ye aşırı özgüllüğü vardır ve NADP^+ 'yi koenzim olarak kullanmazlar. Bu duruma tek istisnai durum, *Pseudomonas* FDH enziminin çift koenzim özgüllüğüdür. FDH enzimleri, geniş pH aralıklarında çalışabilmelerine rağmen yüksek sıcaklıklarda inaktivasyon riski taşırlar. Bu enzimler, pH 6.0- pH 9.0 değerleri arasında reaksiyon katalizleyebilirler ve (birkaç istisna dışında) 50 °C-60 °C aralığında aktivitelerinin yarısını koruyabilirler [93,95].

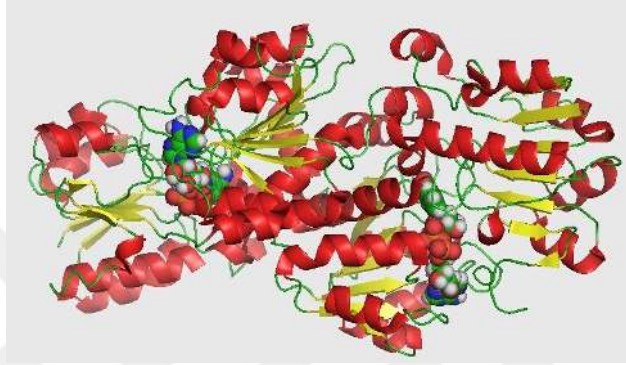
2.4.2. Format Dehidrogenaz enziminin yapısal özellikleri

NAD^+ -bağımlı FDH enzimleri prostetik grup ya da metal iyonu bulundurmaz. Ökaryotik organizmalardaki ve bazı metilotrof bakterilerdeki enzimin moleküler ağırlığı 70 kDa ve 100 kDa arası değişir. NAD^+ -bağımlı FDH enzimleri genelde homodimer hâlinedir, her bir dimer formu hem NAD^+ hem de formata yüksek derecede özgüllük gösterir. NAD^+ bağlanma bölgesi ve katalitik bölge olmak üzere kimyasal olarak özdeş ikişer alt birimden oluşurlar [95] (Şekil 2.5).

FDH enziminin yapısına dair önemli bir özelliği aşırı derecede simetrik olmasıdır. Rossman katlanması temel yapısal birimdir ve her iki alt birimi de bu katlanmayı içerir. D-özüml dehidrogenaz ailesinin başka üyelerinde de benzer yapıların bulunmasıyla, simetrik organizasyonların bu proteinlerin temel bir özelliği olduğu öğrenilmiştir [96]. Tüm FDH enzimleri yapısına göre iki ayrı kategoride incelenebilir; bakteri ve bitkideki FDH enzimleri ilk grubu, maya ve mantardaki enzimler de ikinci grubu oluşturur. FDH enzimleri oldukça korunmuş bir yapıya sahip olup aynı grup içindeki enzimlerde homoloji neredeyse %80-85 iken farklı gruptan iki enzim arasında ise en az %50-55'tir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen FDH sekansları kıyaslandığında, tüm rezidülerin (71 rezidü) neredeyse %20'sinin korunmuş olduğu ve ayrıca katalitik amino asitlerle beraber yapısal kararlılığa katkı sağlayan amino asitlerde yaklaşık %95 sekans homolojisi bulunmuştur [97]. FDH enzimlerinin format özgüllüğü çok yüksektir çünkü aktif bölgenin geometrisi ve özellikle de substrat kanalının yapısı formattan büyük başka bir molekülün aktif bölgeye girmesini engeller. Lineer veya düzlemsel inorganik anyonlar, ancak formata (substrat) ya da CO₂'ye (ürün) benziyorlarsa etkili birer inhibitör olabilirler. Substrat yapısındaki kükürt yerine oksijen yerleştirilmesi gibi küçük bir değişiklik bile enzim aktivitesinin kaybına yol açabilir [96]. *Candida boidinii* FDH (CboFDH) enziminin katalitik önemi olan amino asit rezidüleri Pro97, Phe98, Ile122, Asn146, Ala198 (veya Gly198), Gly200, Gly203, Arg284, Gln313 ve His332 rezidüleridir. NAD bağlanma bölgesi (Asn119 ve Ser313 rezidüleri –CboFDH), dehidrogenaz ailesi üyelerinde yaygınlıkla görülen Rossman katlanma yapısını gösterir. Katalitik bölge de diğer rezidüler tarafından oluşturulur ve flavodoksin benzer topolojisi vardır. Bu bölgeler birbirine iki uzun heliks ile bağlıdır (H6 ve H15) [92]. NAD⁺ bağlanma bölgesindeki konservatif “parmak izi” sekansı GXGXXGX17-18D(E) FDH yapısına özgüdür. Bu sekansın sonundaki negatif yüklü Asp (CboFDH'de D195, *pseudomonas sp.* psFDH'de D221 veya Glu (E)), NAD⁺-bağımlı dehidrogenazlar için NADP⁺ yerine NAD⁺ özgüllüğünü sağlamak adına büyük önem taşır. Hem CboFDH hem de *pseFDH* yapılarında benzer dimer organizasyonu vardır. Sadece *pseFDH* enziminde “parmak izi” sekansının ilk rezidüsü olan Gly yerine Ala gelmiştir ve CboFDH enziminin sekansında, üçlü Gly ve katalitik Asp rezidüleri arasında fazladan bir Lys rezidüsü (K189) bulunmaktadır.



A



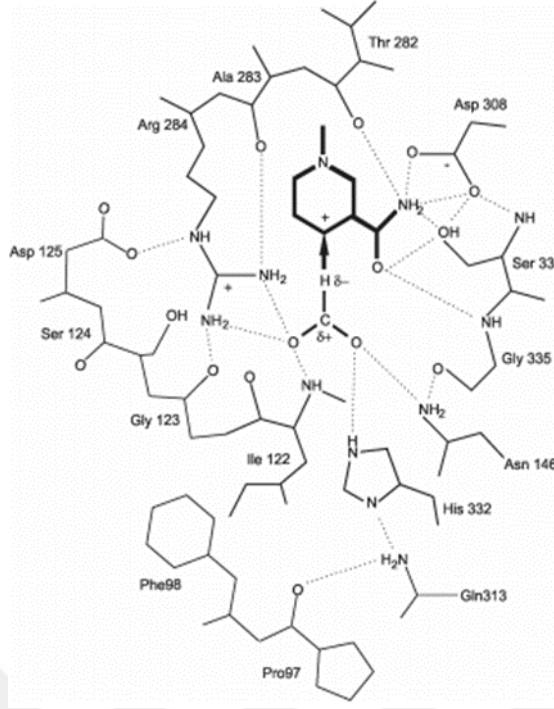
B

Şekil 2.5: CboFDH enziminin NAD bağlanma ve katalitik bölgesi (CboFDH enziminin (5DN9) A’da özdeş iki zincirden oluştuğu gösterilmiştir. B’de ise alfa heliksler ve beta tabakalardan oluşan ikincil yapı gösterilmiştir. Enzim kristalinde NAD molekülü, Azit(mavi) ve Klor bağlı bulunmaktadır (5DN9)).

Kofaktör ile yapılan hidrojen bağlarında rol alan rezidülerin çoğu korunmuştur ve bunlar her iki türün enziminde de benzer konformasyonlarda yer alırlar. Bu “parmak izi” sekansındaki her Gly rezidüsü dönüşün gerginliğinde özel role sahip olup olmanın yanında bu pozisyonadaki protein iskeleti, amino asit rezidüsü ve dinükleotid arasındaki sterik engeli önler. Bir diğer önemli rolü ise zincir ile heliks arası düzgün bir etkileşim kurup heliks H9’un S6 zincirine sıkı yerleşimini sağlar [92]. CboFDH enziminin rezidülerinden Asp282 ve Ser313, nikotinamid halkasıyla temas kurarken; Arg174 rezidüsü de NAD⁺’daki “fosfat linker”a bağlanır. Ayrıca His232 ile Tyr196 rezidülerinin de Adenin halkasıyla etkileşime geçtiği düşünülür. İlave olarak, CboFDH enziminin Asp195 ile Gln197 rezidüleri NAD-ribozomun fosfat gurubu ile etkileşimde bulunur ve Tyr194 ile Tyr196 da hidrofobik küme oluşturur (bu da farklı pozisyon ve çevrede Adenin halkasını stabilize edebilir) [92].

2.4.3 Format Dehidrogenaz enziminin moleküler mekanizması

Pek çok rezidü NAD^+ -bağımlı FDH enziminin katalitik reaksiyonunda önemli rol oynar. Yapısal çalışmalarla bulunan FDH aktif bölgesi Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, FDH moleküler etki mekanizmalarının doğrulanmasına odaklanmış olup bunun için bölgeye yönelik mutasyon yoluyla aktif bölge rezidüleri veya zemin ve geçiş seviyelerinin moleküler dinamiği incelenmektedir [96]. Format iyonu Arg284, Asn146 ve Ile122 rezidüleriyle hidrojen bağı yaparak aktif bölgenin merkezinde tutulur. Thr282, Asp308, Ser334, Gly335 rezidüleri ile yapılan pek çok hidrojen bağı ile trans pozisyonda sabitlenen karboksamid grubunun düzlem dışı hareketi ve “bükülmesi” (twist) ile NAD^+ C4N pozisyonunda uygun şekilde konumlanır ve aktive edilir. His332 substrat bağlanmasında rol alır ve Gln313 ile yaptığı hidrojen bağı sayesinde protonsız hâlde hapsolür. Aynı zamanda Gln313 rezidüsünün konumu iki yanındaki prolinlerle sabitlenmiştir. FDH'in aktif bölge merkezindeki iki hidrofobik duvar, reaksiyon esnasında oluşan konformasyonel değişim sonucunda reaktantların üzerine bastırılır. Bu duvarlardan biri Val150 ve Ile202 rezidülerinden oluşur ve NAD^+ piridin halkasının bir yüzüne hidrofobik çevre sağlar. Diğer duvar ise Pro97 ve Phe98 rezidülerinden oluşur ve substrat bağlanma cebini oluşturur [96]. Aynı zamanda, zemin seviyesinin (ground state) destabilizasyonuna veya geçiş seviyesinin (transition state) stabilizasyona sebep olan etkileşimler, FDH enziminin katalitik mekanizmasının itici gücü olarak düşünülmüştür. Reaktanların zemin seviyesinin hidrofobik duvarlar vesilesiyle pertürbasyonu ve nötr NADH'ın Val150 ile Ile202 aracılığıyla stabilizasyonu buna bir örnektir [96].



Şekil 2.6: FDH aktif bölgesi [96].

2.4.4 NAD⁺ bağımlı Format Dehidrogenaz enziminin pratikte kullanımı

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi reçetelerine göre, ilaçlarda kullanılan tüm kiral bileşiklerin optik saflığı % 99'dan daha yüksek olmalıdır. Enzimatik olmayan reaksiyonların enantiosensivitesi kontrol edilemediğinden, zirai ilaç endüstrisinde enzimatik reaksiyonların kullanılması tercih edilir [98]. Genellikle önemli bileşiklerin sentezinde tüm enzim sınıfları kullanılmakla beraber özellikle dehidrogenazlar asimetrik sentez için idealdirler [99,100]. Fakat Dehidrogenazlar aktivite varlıkları için kofaktör veya koenzim varlığına ihtiyaç duyduklarından sadece dehidrogenazları içeren prosesler asimetrik sentezde ekonomik kâr sağlamaz [101]. Bu nedenle bu enzimler ana reaksiyonu gerçekleştirecek enzimin yanında pahalı kofaktörlerin geri dönüştürülmesini (rejenerasyon) sağlayacak şekilde ikinci enzim olarak sıklıkla tercih edilirler [102,103]. Pek çok dehidrogenazın; Fosfid Dehidrogenaz [99], Glutamat Dehidrogenaz [100] gibi NADH rejeneratörü olarak kullanılabilmesinin yanında özellikle FDH enzimleri çoklu rejenerasyonlarda kullanılırlar. Farmasötik çalışmalarda; *C.boidinii* ve *Pichia pastoris* kaynaklı NAD⁺-Bağımlı FDH enzimlerinin; Tip2 Diyabet tedavisinde [104], depresyon tedavisinde [105], kolestreol

düzenlemede [106] ve Rinovirüs gibi antiviral tedavide [107] kullanılan bazı ilaçların ara ürünlerinin sentezinde NADH kofaktör rejenerasyonunda başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Enzimler reaksiyonları katalizleyen biyomoleküller olduklarından aynı zamanda pek çok hastalığın rutin tanısında da enzim reaksiyonlardan faydalanılır. NAD⁺-Bağımlı FDH enziminin farmasötik alanlarda kullanımının dışında bazı hastalıkların rutin tanısında da kullanılabilirliğine dair çalışmalar mevcuttur. Metanol zehirlenmelerinde, metanolün toksik metaboliti formik asit anyonu olan formatın saptanmasının tanıda hızlı ve kesin sonuç verdiği bildirilmiştir [108]. Metanol karaciğerde alkol dehidrogenaz tarafından formaldehite ardından FDH tarafından hızla formik asite yükseltgenir [109]. Fizyolojik pH'ta formik asit, format ve bir hidrojen iyonuna ayrışır. Format, idrar, plazma, serum gibi biyolojik sıvılarda ölçülebildiğinden FDH enziminin varlığında üretilen NADH miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek zehirlenmenin kolaylıkla tespit edilebildiği gösterilmiştir [110,111]. Yapılan başka bir çalışmada ise Oksalat ürelitiyazisin tanısında FDH enziminin kullanılabildiği bildirilmiştir. İki reaksiyonlu gerçekleşen bu reaksiyonda analizden önce oksalat izolasyonuna gerek duyulmadığı, metodun rutin laboratuvarlarda tercih edilebileceği rapor edilmiştir [112-115]. Yapılan bir başka çalışmada ise; FDH enziminin, dünya genelinde yaygın olarak görülen ve cinsel yolla bulaşan Trikomonas vajiniti (TV)'nin tanısında, hastadan alınan vajinal örnekteki formatın saptanmasında kullanılabileceği bildirilmiştir [116].

2.5 Protein Mühendisliği

Fermante edilmiş gıda üretiminde binlerce yıldır mikroorganizmalar ve enzimler doğal olarak kullanılmaktadır. Ancak doğal olarak oluşan biyokatalizörlerin kullanımı, düşük stabilite veya aktivite ve aşırı endüstriyel koşullarda substrat veya koenzim özgüllüğünün olmaması ile engellenir. Bu yüzden doğal biyokatalizörlerdeki bu tür problemlerin üstesinden gelebilmek için protein mühendisliği araçları, doğal olmayan endüstriyel ortamlar altında enzimlerin performansını arttırmak için kullanılmaktadır. Protein mühendisliğinin iki ayrı stratejisi olan rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş değişim, şu anda stabiliteyi veya aktiviteyi arttırmak, substrat ve koenzim spesifitesini değiştirmek için mevcuttur [117]. Genel olarak rasyonel tasarım, yapısal bilgiye ve enzimin işlev/yapı ilişkisine dayanır. Önceden belirlenmiş rezidülerdeki değişiklikler bölgeye yönelik mutagenез ile gerçekleştirilir. Yönlendirilmiş değişim ise enzimlerin

yapısal bilgisini gerektirmez. Yaklaşım, doğal değişim ve seçilime dayanmaktadır. Enzimin istenen özelliğini elde etme, rastgele mutagenезden ve/veya enzimin gen rekombinasyonundan sonra yüksek-kapsamlı tarama (high-throughput screening) ile sağlanır. Çeşitli yönlendirilmiş değişim araçlarıyla mutant kütüphanelerin oluşturulması ve bir seçim veya tarama metodolojisi geliştirilmesi, yönlendirilmiş değişim yaklaşımının çok kritik noktalarıdır. Her iki stratejinin de endüstriyel uygulamalar için enzim optimizasyonunda büyük bir potansiyeli ve farklı avantajlarının olmasının yanında bazı sınırlamaları da vardır. Rasyonel tasarım, enzimin yapısal ve katalitik mekanizmaları hakkında temel bilgilerimizi geliştirmesine rağmen, enzim yapısı- fonksiyon ilişkisinin karmaşıklığı uygulamayı sınırlandırır. Bunun yanında, rastlantısal mutagenез veya gen rekombinasyonu yoluyla inaktif enzimler oluşturarak ve verimsiz bir tarama yöntemi geliştirerek, yönlendirilmiş değişim uygulamaları engellenir. Ancak hem rasyonel tasarımı hem de yönlendirilmiş değişimi kullanan kombinasyon stratejileri, bu stratejilerin sınırlarını başarılı bir şekilde atlatabilir ve bir enzimin özelliklerini artırabilir [117-119].

2.5.1 Rasyonel tasarım

2.5.1.1 Bölgeye yönelik mutagenез

Bölgeye yönelik mutagenез (Site-directed mutagenез) yoluyla rasyonel tasarım, enzimin yapı-fonksiyon bağlantısına ilişkin bilgiye dayanan en erken ve en yaygın kullanılan protein mühendisliği yaklaşımıdır. Bu strateji; protein yapısı, 3D protein yapısı veya homoloji modelleme verileri aracılığıyla, yeni özellikleri ve hatta yeni proteinleri tasarlamayı amaçlamaktadır. Geçmişten günümüze kadar enzim özgünlüğü ve aktif bölge ikamesi bilgileri ışığında, enzim aktivitesi üzerine birçok başarı elde edilmiştir [119, 120]. Yapısal homolojiye dayanan başka bir yönlendirilmiş yaklaşım ise, enzim mekanizmasını veya substrat/kofaktör özgünlüğünü değiştirmek için kullanılmıştır [121-124]. Bölgeye yönelik yapılan mutagenез, enzimin kinetik ve fonksiyonel özelliklerini arttırabilir. Ancak mutagenезin doğrulanması için, mutant enzimlerin saflaştırılması gerekliliği, mutantların her bir türü için pahalı ve pratik olmayabilir [118, 119].

2.5.1.2 Yönlendirilmiş değişim (rasyonel olmayan tasarım)

Yönlendirilmiş moleküler değişim veya in vitro değişim, laboratuvarında doğal değişimi taklit etmenin genel stratejisini tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir ve protein mutantlarının (varyantların) üretilmesi ve istenen fonksiyonların seçimi için çeşitli tekniklerden oluşur [120, 125, 126]. İlk olarak 1970'lerde keşfedilen yönlendirilmiş değişim, güçlü bir teknoloji olarak ortaya çıkmış ve endüstri, akademi ve tıp alanında geniş bir uygulama alanı bulmuştur. “Yönlendirilmiş değişim” in ilk çalışmalarında, nükleik asitlerin in vitro değişimi gerçekleştirilmiştir [127]. Birkaç yıl sonra ise moleküler düzeyde proteinlerin in vitro mühendisliği için değişim konsepti uygulanmıştır. Yakın zamanda metabolik yollar, virüsler veya bakteriyel genomlar gibi daha karmaşık konular için yönlendirilmiş değişim stratejileri uygulanmıştır. Prosedür bir hedef biyomolekülü, metabolik yolu, organizmayı veya istenen bir fenotipik hedefi belirleyerek başlar. Rastgele mutagenез ve/veya gen rekombinasyonu gibi geleneksel değişim stratejilerini taklit eden yöntemlerle çeşitli mutantlar oluşturulur. Kütüphane içinde istenen özelliklere sahip bireyleri tanımlamak için, yüksek verimli bir tarama veya seçim yöntemi kullanılır. Gerekirse, seçilen mutantlar döngünün ikinci turunda ebeveynler olarak kullanılabilir ve fenotipik hedefe ulaşılan kadar süreç tekrarlanır. Çeşitliliğin binlerce, hatta milyonlarca yıl sonra elde edilebildiği doğal değişimden farklı olarak, yönlendirilmiş değişim kullanarak, birkaç hafta gibi çok daha kısa bir sürede anlamlı bir çeşitlilik oluşturulabilir ve seçilebilir. Ancak, başarılı bir şekilde yönlendirilmiş değişim için aşağıdaki gibi tanımlanan bazı şartlar vardır: i. İstenen fonksiyon fiziksel olarak mümkün olmalıdır. ii. Fonksiyon ayrıca biyolojik veya değişimsel olarak da uygulanabilir olmalıdır. iii. Nadir faydalı mutasyonları içerecek kadar kompleks olan mutant kütüphaneleri oluşturmak mümkün olmalıdır. iv. İstenen işlevi yansıtan hızlı bir gösterim veya seçim gereklidir [128]. Çeşitliliğin başlangıç gen (ler) ine dahil edilmesi için çeşitli stratejiler mevcuttur ve bunlar genel olarak iki sınıfa ayrılabilir; rekombinatif olmayan tasarım ve rekombinant tasarım. Bu tasarımlar, 200'den az varyant ile on binlerce varyant arasında kütüphaneler oluşturmaya kadar uzanabilir. Rekombinant olmayan yöntem, süstitüsyonlar, delesyonlar ve insersiyonları oluşturmak için geliştirilmiş in vitro rastgele mutagenезden oluşur. Rekombinatif yöntem genellikle homolog veya homolog olmayan gen rekombinasyonundan oluşur ki bu, iki veya daha fazla DNA şeridi arasında genetik materyal bloklarının değişimini ifade eder [117, 119, 125].

2.5.1.2.1 Rekombinatif olmayan tasarım

Rekombinant olmayan tasarım, nokta mutasyonları yoluyla moleküler çeşitliliği üretmek için nispeten basit ve popüler yöntemler olan birkaç rastgele mutagenез stratejisinden oluşur. Bunlar sübsitasyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar oluşturmak için geliştirilmiştir. Erken yöntemler DNA zincirine zarar vererek, örneğin kimyasal mutajenler veya ultraviyole ışınlama ile muamele yoluyla bir hedef gende, nokta mutasyonlarını yaratmayı içerir. Bu yöntemler verimsizdir, çünkü in vivo olarak gerçekleştirilirse ciddi hücre hasarına neden olabilirler. Rastgele baz çifti süstitüsyonları da, DNA polimerazın yanılabilirliğinin avantajlarını kullanan, Hata Eğilimli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (error-prone PCR) ile üretilir. Bu metod en basit ve en popüler yönelimli değişim araçlarından biridir. Ancak protein seviyesinde çeşitlilik yaratma yeteneği sınırlıdır çünkü PZR reaksiyonlarında kullanılan DNA polimerazlar çeşitliliği sınırlayan mutasyonel sapmalara (bias) sahiptir. Ayrıca mutasyon oranı düşüktür, genel olarak 1000 baz çifti için sadece 1-3 mutasyon vardır. Bu düşük mutasyon frekansları sınırlı çeşitlilik ve düşük ürün verimi ile sonuçlanabilir [117, 119, 125, 129]. Hata Eğilimli PZR (Error-prone PCR) mutagenезinin sınırlamaları, doymuluk mutagenезi veya sekans doymuluğu (saturation) mutagenезi (SeSaM) yöntemleri ile aşılabılır. Doymuluk mutagenезi; tüm olası amino asitlerin, önceden belirlenmiş bir rezidüde veya ilgili proteindeki korunmuş bir dizi rezidüde rastgele yer değiştirmesini içerir. SeSaM, her bir nükleotid pozisyonunda bir DNA sekansını evrensel bir baz kullanılarak randomize edebilen yakın zamanda ifade edilmiş bir yöntemdir [126, 129].

2.5.1.2.2 Rekombinatif tasarım

Homolog ya da homolog olmayan gen rekombinasyonuna dayanan rekombinant tasarım, iki ya da daha fazla DNA şeridi arasında genetik materyal bloklarının değişimini ifade eder. Esas olarak iki gruba ayrılabilen gen rekombinasyonunda birinci grup rekombinasyon, yüksek dizi özdeşliği olan iki gen arasında meydana geldiği homolog rekombinasyonu kapsar. İkinci grup ise, az sayıda veya hiç sekans özdeşliği olmayan iki DNA sekansı arasında rekombinasyonun meydana geldiği homolog olmayan rekombinasyonu kapsar [130]. Homolog rekombinasyon stratejisi, maternal ve paternal kromozomları germ hücre DNA'sında yeniden düzenleyen genetik materyalin “cinsel” rekombinasyonunu taklit eder. Bu tür rekombinasyon, bir

popülasyondaki genetik varyasyonu arttırır, bu fikir aracılığıyla, çeşitlilik üretimi hedeflenir. Varyant kütüphane üretimi için rekombinant olmayan yöntemlerin avantajlarına rağmen, enzim fonksiyonundaki en önemli değişiklikler rekombinatif yöntemler kullanılarak oluşturulmuştur. DNA karması (DNA shuffling) halen DNA rekombinasyonu için en çok kullanılan yöntemdir. Kısaca DNA karması (DNA shuffling) yöntemi, DNA'nın DNase I kullanılarak rastgele parçalar halinde parçalanmasını, ardından bu fragmanların primersiz bir PZR ile tam uzunlukta bir gene yeniden birleştirilmesini ve yan primerler varlığında, küçük miktardaki tam uzunluktaki gen amplifikasyonu için nihai standart PZR reaksiyonunu içerir. Parçalanma ve yeniden birleştirme süreçleri, nokta mutasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur ve bu mutasyonlar, mutant kütüphanenin çeşitliliğine katkıda bulunur [1, 3]. DNA shuffling yönteminin tanıtılmasından birkaç yıl sonra, bu yöntem çeşitli türlerden ilgili genlerin bir aile rekombinasyonuna adapte edilmiş ve aile karıştırması (family-shuffling) olarak adlandırılmıştır [131].

2.5.2 Yarı-rasyonel tasarım

Pratik deneyimler yönlendirilmiş değişimin ve rasyonel tasarımın, biyokatalizörlerin iyileştirilmesinde kayda değer değişiklikler yaratabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte bu yöntemlerin sınırlamaları vardır [132]. Son zamanlarda yönlendirilmiş değişim yöntemlerin, rasyonel enzim stratejilerinin unsurları ile birleşimi bazı sınırlamaları başarılı bir şekilde ortadan kaldırmaktadır. Yarı rasyonel yaklaşımlarda temel yapısal ya da işlevsel bilgiler aracılığıyla önceden belirlenmiş spesifik rezidüel, özellikle doyumluk mutagenesi kullanılarak randomize edilir. Böylece pozitif sonuç veren “daha akıllı” kütüphaneler oluşturulur [133, 134].

2.5.2.1 Bölge doyumluk mutagenesi

Bölge doyumluk mutagenesi (Site saturation mutagenesis (SSM)) teknolojisi, bir gen dizisinde bir veya daha fazla hedef pozisyonda önceden belirlenmiş tüm olası amino asit değişimlerini içeren mutant kütüphanesi oluşturmayı sağlayan bir yöntemdir.

Tablo 2.1: Protein mühendisliği stratejilerinin karşılaştırılması.

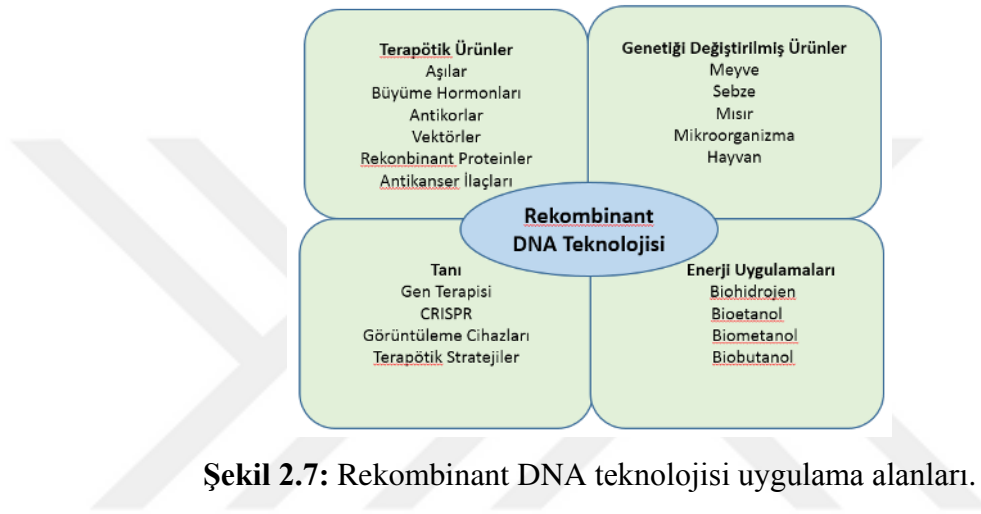
	Rasyonel Tasarım	Yönledirilmiş Değişim	Yarı Rasyonel Tasarım
Yapı Bilgisi	Gerekir	Gerekmez	Gerekir
Mekanizmanın Bilinmesi	Gerekir	Gerekmez	Gerekir
Tarama ve Seçilim Yöntemleri	Gerekmez	Gerekir	Gerekir
Hassas Enzim Deneyleri	Gerekir	Gerekmez	Gerekmez

Yaklaşım, her bir amino asit rezidüsü için 32 veya 64 kodon varyantı içeren dejenere primer setleri ile standart DNA amplifikasyonu kullanılarak genetik düzeyde uygulanır. Sonunda belirlenen yerlerde tüm amino asit olasılıklarını içeren bir kütüphane oluşturulur. Bu teknik ile yapılan çalışmalar sonucunda diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek substrat spesifikliği bulunmuştur [135-139]. Bunların yanısıra bölge doygunluk ve rastgele mutagenез yaklaşımlarının kombinasyonu da, hedef biyokatalizörlerin özelliklerini geliştirmiştir [133].

2.5.3 Rekombinant DNA teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi; yeni aşılar ve farmasötikler, yeni tedavi stratejileri, teşhis kitleri ve izleme cihazları geliştirerek sağlık koşullarının iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı tıbbi genetik ve biyomedikalde, tıbbi olarak yararlı maddeler elde etmek için mikroorganizmaları, hayvanları ve bitkileri modifiye ederek, çok çeşitli terapötik ürünlerin üretilmesini mümkün kılmıştır. Genetiği değiştirilmiş bakteriler [140] tarafından üretilen sentetik insan insülini, eritropoietinin sentezi ve araştırma amaçlı yeni tipte deneysel mutant farelerin üretimi sağlıkta genetik mühendisliğinin önde gelen örneklerinden bir kaçıdır. Benzer şekilde; atıkların biyoyakıtlara ve biyoetanole dönüştürülmesi, petrol sızıntılarının, karbonun ve diğer zehirli atıkların temizlenmesi ve içme suyunda arsenik ve diğer kirletici maddelerin tespiti gibi çevresel sorunların üstesinden gelmek için genetik mühendisliği stratejileri kullanılmaktadır [141-143]. İlk rekombinant DNA (rDNA) molekülleri 1973 yılında, Stanford ve California San Francisco Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından üretildi. 1975 yılında yapılan Asimolar Konferansında rDNA moleküllerinin güvenli kullanımı tartışılmış ancak bu alanda tatminkar sonuçların elde

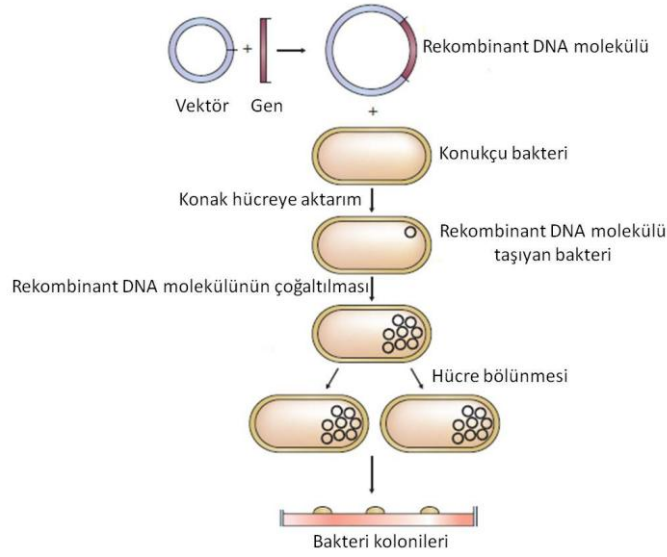
edilmesi uzun zaman almıştır. Özellikle hormonların, aşılardan, terapötik ajanların ve tanı araçlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar 1980'li yılların ortasından itibaren hız kazanmıştır. Daha sonraki yıllarda ise Rekombinant DNA teknolojileri sayesinde, ek glikolizasyon bölgesi içeren sekansların ilavesiyle daha uzun etkili terapötik proteinler geliştirilmiş, gen terapisi ve genetik modifikasyon yaklaşımları için vektörler ve kombine vektörler tasarlanmıştır [144]. Çok çeşitli rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları Şekil 2.7'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7: Rekombinant DNA teknolojisi uygulama alanları.

2.5.3.1 Gen klonlama

Gen klonlama, canlı organizmalarda gelişmiş ve arzu edilen özellikleri elde etmek için bir organizmanın dışında genetik materyalin istenilen organizmada kullanılacak şekilde değişimlere tabi tutulması işlemidir. Bu yöntem ile farklı kaynaklardan elde edilen DNA fragmanları uygun vektörler vasıtasıyla istenilen başka bir gen bölgesine aktarılır [145]. Organizmanın genomundaki manipülasyon, bir veya birkaç yeni gen ya da düzenleyici elementin eklenmesiyle veya rekombine edici genler ve elementler yoluyla endojen genlerin ekspresyonunu azaltarak veya bloke ederek gerçekleştirilir [146]. Spesifik DNA dizisi elde etmek için gen, uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılır. Ardından DNA ligaz etkinliği ile istenilen vektörde genin sabitlenmesi için fragmanlar birleştirilir. Daha sonra vektör, DNA fragmanının çoklu kopyalarını üretmek üzere konakçı organizmaya sokulur ve ilgili DNA fragmanını içeren klonlar çeşitli seçim yöntemleri vasıtasıyla toplanır [147]. Gen klonlamadaki basamaklar Şekil 2.8'de gösterilmiştir [148].



Şekil 2.8: Gen klonlama basamakları [148].

2.5.3.1.1 Klonlamada konak hücrelerin seçimi

Teorik olarak mümkün olan pek çok gen manipülasyon örneğine rağmen, endüstrideki uygulamalar için bazı teknik sınırlamalar halen devam etmektedir. Bunlardan en önemlisi genetik haritaların her zaman mevcut olmayışıdır [149]. Hammaddeden antibiyotikler gibi istenen ürüne giden metabolik yolların pek çok durumda netleştirilememiş olması [150] ve dönüşüm için düzenlenecek genlerin sayısının sınırlı tutulacak olması diğer kısıtlayıcı durumlardır. Bu sınırlamalar nedeniyle konakçının özelliklerinden iyi bir şekilde faydalanmak için uygun bir konakçı suş dikkatlice seçilmelidir. Rekombinant proteinlerin üretimi için kullanılan konakçılar, basit prokaryotik ve ökaryotik organizmalar (bakteriler, mayalar) olabileceği gibi transgenik bitkiler ve hayvanlar gibi çok hücreli organizmalar da olabilir. Konak sisteminin seçimi; gen ürününün boyutu, yapısı, stabilitesi ve biyolojik aktivite için post-translasyonel modifikasyonlar gibi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca oluşacak nihai ürünün üretim verimi, maliyeti ve kalite özellikleri de dikkate alınmalıdır [151].

2.5.3.1.2 Klonlama ve ifade vektörleri

Konakçı hücrelerde replikasyon yapabilme özelliklerinden dolayı viral DNA ve plazmid DNA molekülleri klonlama vektörleri olarak kullanılabilirler. Hücre içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunan bakteriyel plazmidler kopyalama sayısına göre düşük ve yüksek kopyalama sayılı olarak genel olarak iki gruba ayrılırlar. Ancak plazmidlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre

daha detaylı bir sınıflandırma da yapmak mümkündür. Plazmid vektör tasarımı için gerekli bazı özellikler aşağıdaki şekildedir:

- Bir plazmid vektörü olabildiğince küçük olmalıdır. Çünkü konakçı hücrelerin transformasyon verimliliği, plazmidin boyutu 15 kb üzerine çıktıkça azalır.
- Plazmid vektörü özerk olarak çoğaltılmalı ve istenen konakta sabit tutulabilmedir.
- Plazmid vektörü, maksimum sayıda endonükleaz kesim bölgesine sahip olmalı ve restriksiyon bölgesini DNA replikasyon bölgesinde bulundurmamalıdır.
- Plazmid vektörünü transforme olmamış hücrelerden ayırt etmek için vektör, seçilebilir bir işarete sahip olmalıdır. Bunun yanında vektörün, yabancı bir DNA fragmanının sokulmasıyla etkisiz hale getirilebilen ek bir genetik belirece sahip olması istenir ki bu durum değiştirilmiş fenotip temelinde rekombinant plazmidlerin taranmasına olanak sağlar.

Klonlama çalışmalarında biyomateryallerin üretiminin geliştirilmesi amacıyla genellikle çoklu kopya plazmidleri gereklidir. Kopya sayısı olarak, tek bir bakteri hücresindeki bir plazmidin molekül sayısı temel alınır. Kopya sayısı, plazmid stabilitesini, yani hücre bölünmesi sırasında ratgele bölünmeler meydana geldiğinde plazmidin akibetini belirler. Eğer vektörün kopya sayısı yapay olarak kontrol edilebilirse bu vektör, endüstride daha da yararlı olur. Bu çeşit bir kontrol sisteminin, belirli bir DNA segmentinin eklenmesi veya çıkarılmasıyla yapılabileceği bildirilmiştir [152]. Bir ifade (ekspresyon) vektörü; ilgilenilen genden ayrı olarak, replikasyon kaynağı, antibiyotik direnci veya seçilebilir bir belirteç, promotor ve transkripsiyon terminatörü veren geni içermelidir. Bu aşamadaki en temel unsurlardan bir tanesi ifade vektörünü barındıran hücrelerdeki plazmid kaybının önlenmesidir. Bu nedenle hem plazmid kaybının önlenmesi hem de transformantın tanımlanması amacıyla antibiyotik direnci genleri kullanılır. İfade vektörlerinde yaygın olarak ampisilin, tetrasiklin veya kanamisin direnci veren genler kullanılmaktadır. Ampisilin direnci çoğunlukla sadece laboratuvar ölçeğinde kullanılır. Çünkü β -laktamaz enzimi, direnci veren ampisilini bozar ve böylece selektif baskı birkaç nesil hücre büyümesinden sonra kaybolur. Plazmid kaybının önlenmesindeki bir başka yaklaşım, esansiyel bir proteini kodlayan gende eksik olan mutasyona uğramış bir *Escherichia coli* (*E. coli*) suşunun kullanılmasıdır. *E. coli*'de yüksek düzeyde ekspresyon için bir takım güçlü promotorlar mevcuttur. Bir promotorun en önemli özelliği, sıkı bir şekilde

düzenlenmiş olarak aşağı regüle edilebilme kabiliyetidir. Bu özellik önemlidir çünkü; heterolog proteinin, bir promotora bağlı olarak aşırı üretimi, hücre büyümesini bozabilir. Bu nedenle yüksek hücre yoğunlukları elde etmek için bir hücre büyüme fazı sırasında promotor baskılanır ve daha sonra yüksek orandaki protein üretimi promoturun indüksiyonu ile başlatılır. Laboratuvar ölçekli üretim için lacI geninin laktoz (lac) represörü tarafından düzenlenen, izopropil b-Dtiyogalaktopiranosid (IPTG) ile indüklenebilir promotorlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar lac promoturu, lac-trp hibrid promoturu, tac ve triptofan (trp) promotorlarıdır. IPTG ile indüklenebilen ve laboratuvar ölçekli kültürlerde en yaygın kullanılan ifade vektör sistemi pET vektör sistemidir. pET vektörü, sadece T7 RNA polimeraz ile kopyalanan ve bir lac promoturunun kontrolü altında olan bir T7 promoturuna sahiptir. IPTG'nin bu promotorların indüksiyonu için kullanımı, IPTG'nin maliyeti nedeniyle insan terapötik proteinlerinin büyük ölçekli üretimi için uygun olmayabilir. Laktozun, bazı uygulamalarda lac promoturunun indüklenmesi için ucuz bir alternatif olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında büyük ölçekli kültürasyonlar için ya trp promoturu ya da ısı kaynaklı promotorlar yaygın olarak kullanılır. Trp promoturu, triptofanın açlığı veya b-indoleakrilik asit ilavesiyle başlatılır. Trp promoturu ile ilgili olası bir sorun ise indüklenmemiş koşullar altında tamamen aşağı regüle edilmesinin zor olmasıdır. Isı ile indüklenen promotora örnek olarak; PL (k), PR (k) ve lacI geninin mutasyonu ile oluşturulan termosensitif lac promoturu (TS) verilebilir. Bu promotorlardaki dezavantaj ise termal indüksiyonun bozunmaya sebep olabilen ısı-şok proteinlerinin üretimini de uyarabilmesidir. Tüm bunların yanı sıra; pH, oksijen seviyeleri, durağan büyüme ve ozmolarite gibi ekim koşulları ile indüklenebilen zayıf ve orta derecede promotorlar da mevcuttur [153]. Ek olarak, rekombinant proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için vektörler üzerinde kolaylıkla uygulanabilecek çok sayıda farklı afinite füzyon sistemi geliştirilmiştir. Bir afinite-füzyon sistemi seçerken, tüm sistemlerin kendi özelliklerine sahip olduğunu ve tüm uygulamalar için tek bir sistemin ideal olmadığını hatırlamak önemlidir. Örneğin, gen ürününün salgılanması istenirse, sekrete edilebilir bir afinite etiketine sahip bir sistemin seçilmesi gereklidir. Eğer gen ürününün denatüre koşullar altında saflaştırılması gerekiyorsa, bu koşullar altında bağlanabilen bir etiketi olan bir sistem seçilmelidir (Ör: polihistidin afinite etiketi). Polihistidin etiketi, inklüzyon cisimcikleri olarak birikmiş gen ürünlerinin saflaştırılması için uygundur. Çünkü füzyon proteini uygun bir denatüre edici ajan ile

çözündürülmesinden sonra bir immobilize-metal-iyon-afinite-kromatografi (IMAC) kolonuna doğrudan uygulanabilir. Polihistidin afinite etiketinde ek bir avantaj ise PZR teknikleriyle bir hedef proteine kolayca genetik olarak birleştirilebilmesidir. Hedef proteinin denatüre edilmediği elüsyon koşulları ile bir afinite füzyon sisteminin seçilmesi de önemlidir. Laboratuvar ölçeğinde afinite füzyon yöntemleri çok güçlüdür ve gen ürünlerinin kolay ve hızlı tek adımlı saflaştırılması için yaygın kullanıma ulaşmıştır.

2.5.3.1.3 Kesim enzimleri

Optimal kesim (restriksiyon) enzimlerini seçmek için birkaç kriter dikkate alınmalıdır. İlk olarak, kesim enzimleri için bağlanma bölgeleri, vektör içindeki bir çoklu klonlama bölgesinde (MCS) ideal olarak mevcut olmalıdır. Alternatif olarak vektör dizininizde promotörün aşağı akışında bulunabilirler. Kesim enzimleri sadece bir DNA dizisi içerisinde bir kesim alanını hedeflemelidir. Çift veya çoklu kesim enzimleri, vektör plazmidinin düzgün çalışması için gerekli olmayan bir DNA dizisi içinde kesme işlemini yapmalıdırlar. Belirtilmelidir ki çift veya çoklu kesim enzimleri, bir DNA dizisi üzerinde iki veya daha fazla kesim bölgesine sahiptir. Vektörün iki veya daha fazla kesiciyle kesilmesi, iki özdeş ucun oluşmasına sebep olur. Böyle bir durumda, insert kaseti her iki ucunda aynı kesim enzim bölgelerini içermelidir. Insert ve vektör fragmanları bir ligasyon deneyinde karıştırıldığında, insert ya doğru yönde (başlangıç kodonundan kodonu durdurmaya) veya tersine (durma kodonundan kodon başlatmaya) vektörle kaynaşabilir. Oluşabilecek bir başka durum ise vektör fragmanının, insertü hiç içermeyen kendi üzerine katlanmasıyla dairesel bir yapı oluşturmasıdır. DNA, kesim enzimleri ile inkübe edildikten sonra bir alkalın fosfataz enzimi kullanılarak vektör plazmidinin 5' ve 3' uçlarının defosforilasyonu kendinden ligasyon riskini büyük ölçüde azaltabilir. Bu nedenle fragman ligasyonundan sonra bu üç ürün için bir klonlama ürününün (sağ yönlendirme, ters yönlendirme, self-ligasyon) taranması önemlidir. Ayrıca daha yüksek klonlama etkinliği olan yapışkan (sticky end) DNA fragmanlarının kullanılması tavsiye edilir.

Kesim enzimleri, yapışkan uç kesim enzimleri (sticky-end-cutter) ve küt uç (blunt-end) kesim enzimleri olarak ayrılırlar. Yapışkan uç kesim enzimleri, tamamlayıcı yapışkan uçlar oluşturan asimetrik DNA'yı ayırır. Tersine, küt uç kesim enzimleri ise simetrik olarak çıkıntı bırakmadan diziyi keser. Küt uç kısımları klonlamak daha

zordur. Yine de daha yüksek bir insert/vektör molar oranı (5 veya daha fazla) ve % 10 polietilen glikol (PEG) kullanımı, küt parçalarının ligasyonunu kolaylaştırabilir. Bazı kesim enzimleri ise metile DNA'yı kesmez. *E. coli* suşlarının çoğu, DNA sekanslarını metilleyen Dam veya Dcm metilazları içerir. Bu onları metilasyona duyarlı kesim enzimlerine karşı dirençli yapar. Bununla birlikte bazen metilasyona duyarlı bir kesim enziminin izoşizomeri metilasyona dirençlidir. Örneğin, Acc65I enzimi duyarlıdır, izoşizomeri kpnI metilasyona dirençlidir. İzoşizomerler, aynı nükleotit sekanslarını tanıyan kesim enzimleridir. Metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri kullanmaktan başka seçenek kalmazsa, vektör DNA'sının kendi - dcm- *E. coli* suşlarında hazırlanması gerekir. Metilasyon ile ilgili bilgiler ve kesim enzimlerinin duyarlılığı genellikle üretici tarafından sağlanır. Ayrıca kesim enzimlerinin tam işlevselliği için gerekli olan tamponların aynı olması klonlamayı kolaylaştırır. Bu durum, zaman tasarrufu sağlamasının yanında saflaştırma sırasında DNA kaybını azaltır [154].

2.5.3.1.4 Ligasyon ve transformasyon

Ligasyon işleminde, kesim enzimleri ile kesilmiş klonlama vektörü ve DNA fragmenti DNA ligaz enzimi ile bir araya getirilir. DNA tamiri ve ikileşmesinde rol oynayan DNA ligaz enzimi, iki DNA molekülünü birleştirebilen özel bir enzim tipidir. DNA ligazlar ya normal *E. coli* bakterilerinden ya da T4 bakteriyofajı ile enfekte edilmiş *E. coli* bakterilerinden izole edilirler. Vektör/insert DNA konsantrasyonları uygun oranlarda olmazsa ligasyonun etkinliği düşer. Vektör/insert DNA tavsiye edilen oranları; 1:1, 1:5, 1:10 şeklindedir. Reaksiyon için gerekli enerji Adenozin Trifosfat (ATP) veya NAD kofaktörlerinin fosfat bağının kesilmesi ile elde edilir. Geride kalan Adenozin Monofosfat (AMP) molekülü, enzimdeki lizin kalıntısı ile bağlanır ve DNA molekülündeki 5' uçtaki fosfat, lizine bağlı AMP'deki 5' uçtaki fosfatla etkileşerek pirofosfat bağı oluşturur. Kopuk DNA zincirinin 3'-OH grubu, 5' uçtaki pirofosfat grubuna saldırarak AMP'nin serbest kalmasına sebep olur ve DNA zincir uçlarını birleştirir. Zincirler arasında fosfodiester bağı oluşur [48].

Transformasyon, ekzogenik DNA'nın başka bir hücrenin kromozomuna girip hücre genetiği ile bütünleşmesi olarak tanımlanır. Bu işlem esnasında plazmid kendiliğinden hücre içerisine giremeyeceğinden transforme olacak olan hücre membranları önceden düzenlenir. Bu düzenlenme, transforme olacak kompetent hücrelerin kalsiyum klorür (CaCl_2) muamelesi ile gerçekleşir. Bunun yanında CaCl_2 muamelesi genel olarak

Gram-negatif bakteriler için daha etkili iken maya formları için diğer metal iyonlarının daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir [153].

2.5.4 Biyoinformatik analiz

Disiplinler arası bir bilim alanı olan biyoinformatik, biyolojik verileri analiz etmek ve yorumlamak için biyoloji, bilgisayar bilimi, bilgi mühendisliği, matematik ve istatistikleri birleştirir. Biyoinformatiğin yaygın kullanımı, genetik ve genomik alanda, genomları ve gözlemlenen mutasyonları sıralamak ve açıklamak şeklindedir. Bunun yanında nükleik asit ve protein dizileri içerisindeki ilkeleri anlamaya çalışır; gen ekspresyonu, protein ekspresyonu ve bunların regülasyon analizinde rol oynar. Deneysel moleküler biyolojide, görüntü ve sinyal işleme gibi biyoinformatik teknikler, büyük miktarlarda ham verilerden faydalı sonuçların çıkarılmasına olanak sağlar. Daha bütüncül bir düzeyde, sistem biyolojisinin önemli bir parçası olan biyolojik yolları ve ağları analiz etmeye ve kataloglamaya yardımcı olurken; yapısal biyolojide, DNA, RNA, proteinlerin yanı sıra biyomoleküler etkileşimlerin simülasyonuna ve modellenmesine yardımcı olur [155].

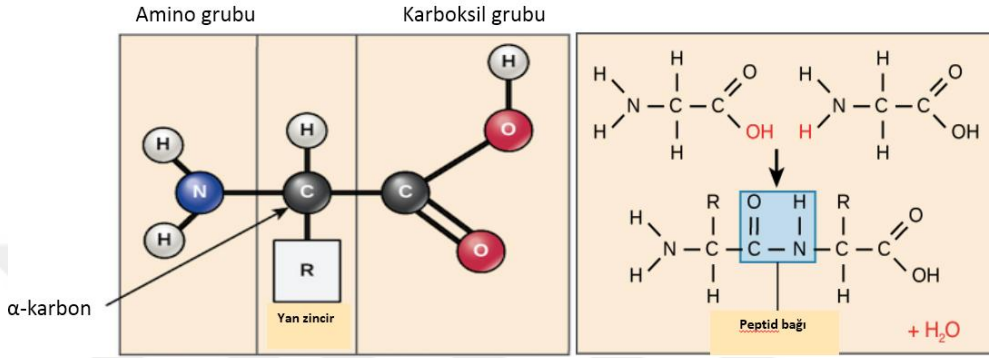
Protein yapı tahmini, biyoinformatiğin önemli bir uygulamasıdır. Bir proteinin, birincil yapı olarak adlandırılan amino asit dizisi, kodlayan gen üzerindeki diziden kolaylıkla belirlenebilir. Pek çok durumda bu birincil yapı, kendi doğal ortamında yapının saptanmasına olanak sağlar. Bu yapının bilgisi, proteinin fonksiyonunun anlaşılmasında hayati öneme sahiptir. Yapısal bilgiler genellikle ikincil, üçüncül ve dördütlü yapılardan biri olarak sınıflandırılır. Biyoinformatikteki temel fikirlerden biri, homoloji kavramıdır. Biyoinformatiğin genomik dalında, bir genin fonksiyonunu tahmin etmek için homoloji kullanılır: eğer işlevi bilinen gen A dizisi, fonksiyonu bilinmeyen gen B dizisine homologsa, bu B'nin A ile benzer işleve sahip olabileceği durumunu ortaya çıkarır. Biyoinformatiğin yapısal dalında, bir proteinin hangi kısımlarının yapı oluşumunda ve hangi kısımlarının diğer proteinlerle etkileşimde olduğunu belirlemek için homoloji kullanılır. Homoloji modellemesi adı verilen bu teknik, protein yapılarını güvenilir bir şekilde tahmin etmenin tek yolu olmaya devam etmektedir.

Biyoinformatik araştırma ve uygulamaları için veritabanları oldukça gereklidir. Çeşitli bilgi türlerini kapsayan birçok veri tabanı vardır: örneğin DNA ve protein dizileri,

moleküler yapılar, fenotipler ve biyoçeşitlilik veritabanları, ampirik verileri (doğrudan deneylerden elde edilmiş), tahmin edilen verileri (analizden elde edilen) veya en yaygın olarak her ikisini de içerebilen veritabanları mevcuttur. Belirli bir organizmaya, yola ya da ilgilenilen moleküle özgü olabilirler. Alternatif olarak, diğer birçok veri tabanından derlenen verileri de içerebilirler. Biyoinformatik analizlerde en fazla kullanılan veri tabaları: Genbank, UniProt (biyolojik sekans analizlerinde); Protein Data Bank (PDB) (yapısal analizlerde); InterPro, Pfam (protein ailelerinin ve motiflerinin analizinde); KEGG, BioCyc (metabolik yolak analizlerinde); GenoCAD (sentetik ve genetik devre tasarımı) şeklindedir. Biyoinformatik için yazılım araçları, basit komut satırı araçlarından, daha karmaşık grafiksel programlara ve çeşitli biyoinformatik şirketlerinden veya kamu kurumlarından temin edilebilen bağımsız web servislerine kadar uzanmaktadır (Bioconductor, Bioperl, Biophyton, BioJava, BioJS, BioRuby, Bioclipse, EMBOSS, NETBio, Orange). SOAP ve REST tabanlı arayüzler, dünyanın bir yerinde bir bilgisayarda çalışan bir uygulamanın dünyanın diğer bölgelerindeki sunuculardaki algoritmalar, veriler ve bilgi işlem kaynaklarını kullanmasına izin veren çok çeşitli biyoinformatik uygulamaları için geliştirilmiştir. Temel avantajları, son kullanıcıların yazılım ve veritabanına ait bakım ve yükleriyle uğraşmadan analizlerini yapabilmelerine olanak sağlar. Temel biyoinformatik hizmetleri, EBI (Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü) tarafından üç kategoriye ayrılır: SSS (Sıralı Arama Hizmetleri), MSA (Çoklu Sıralı Hizalama) ve BSA (Biyolojik Dizi Analizi) [156].

Biyoinformatik analizlerde kullanılan veritabanları ve arayüzler sayesinde elde edilen verilerin görüntülenmesinde 3D (üç boyutlu) yazılım programları kullanılmaktadır. Protein yapılarının görüntülenmesinde en çok kullanılan yazılım programları: PyMol, UCSF Chimera, Swiss-PDB Viewer, YASARA Viewer, ICM-Browser, Visual Molecular Dynamics (VMD) ve Crystal Studio şeklindedir. 3D yazılım programları sayesinde görselleştirilen data ile proteinin birincil yapısında yer alan aminoasitlerin simülasyonları elde edilmiş olur. Özellikle proteinin aktif merkezinde yer alan aminoasitlerin özellikleri o protein hakkında detaylı bilgi edinmemize olanak sağlar. Aminoasitler hücrenin birincil yapı taşlarıdır. Aminoasit, adını iki birincil fonksiyonel grubundan alır. Aminoasitler, alfa karbon olarak adlandırılan bir merkezi kiral karbonu ve buna bağlı olarak bir hidrojen atomu, bir amino (NH₂) grubu, bir karboksilik asit (COOH) grubu ve değişken bir yan zincir olan R grubu taşırlar [157]. Aminoasitlerin

amino ve karboksilik asit grupları arasında kurulan peptit bağları sayesinde polipeptit zincirler oluşur (Şekil-9). Amino asitler, amino grubunun karboksil grubuna göre bulunduğu pozisyona bağlı olarak alfa-, beta- ve gama-amino asit olarak adlandırılırlar. Protein yapısında bulunan standart aminoasitlerin fonksiyonel grupları olan COOH ve NH₂ grupları aynı alfa karbona bağlı olduklarından α-aminoasit olarak adlandırılırlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: α-Aminoasitlerin genel yapısı [157].

Ancak, ikincil yapı, omurga hidrojen bağlama etkileşimlerinden gelir. Alfa heliks ve beta tabakaların ikincil yapısı, karbonil üzerindeki kısmen negatif oksijen ile nitrojen üzerindeki kısmen pozitif hidrojen arasındaki hidrojen bağından gelir. İkincil yapıların sahip olduğu spesifik açılar ise Ramachandran diagramı ile temsil edilebilir. Buna göre proteindeki sterik etkilerin izin verdiği ϕ ve ψ açılarının dönme açıları birbirlerine karşı grafikte yerleştirilerek proteinin konformasyonu hakkında bilgi edinilmiş olunur. Doğada bulunan 300 civarında aminoasitin 22 tanesi standart aminoasit olarak bilinen, DNA tarafından kodlanan ve uygun tRNA antikodonları bulunan aminoasitlerdir. 22 tane aminoasit çeşitli kombinasyonlar oluşturacak şekilde biraraya gelerek enzim, hormon, antikor, kas, örümcek ağı, mantar zehiri vb. yapıları oluştururlar. Aminoasitlerin farklı yan zincirleri, farklı karakterlere sebep olur. Bu özellikler, hidrofilik, hidrofobik, polar, non-polar, pozitif yada negatif yüklü olmak yada aromatik halkaya sahip olmak şeklinde olabilir. Bu özellikler protein yapısı ve protein-protein etkileşimleri için önemlidir. Suda çözünebilir proteinlerde, hidrofilik yan zincirler su ile temas halindeyken, hidrofobik rezidüer (Leu, Ile, Val, Phe ve Trp) ise proteinin ortasına gömülü olma eğilimi gösterir [158]. Pozitif yüklü moleküllere bağlanması gereken proteinler, glutamat ve aspartat gibi negatif yüklü amino asitlerle

zengin yüzeylere sahipken; negatif yüklü moleküllere bağlanan proteinler, lizin ve arginin gibi pozitif yüklü zincirlerle zengin yüzeylere sahiptir. Prolin yan zinciri, etrafında dönen ve ana amino grubuna geri bağlanan 3-karbonlu bir zincirdir. Sadece üç CH₂ grubuna sahip olduğundan, polar olmayan bir hidrofobik yan zincir oluşur. Bu da ana döngüde bir çıkıntı oluşturur ve prolin içeren bir zincirin lineer olmasına izin vermez, bu da onu genellikle protein dönüşlerinde ve bir α -heliksin sonunda bulacağınız anlamına gelir [159]. Sistein incelenecek olursa hafif polar bir S-H yan zincirine sahip olduğundan polaritesi yumuşaktır. Bu yüzden suyla düzgün bir şekilde etkileşime giremez. Proteinlerin doğal korformasyonlarını kararlı halde tutan kuvvetler aminoasitlerin birbirleri ve ortam ile yaptıkları kovalent olmayan etkileşimler ve kovalent bir bağ olan disülfid bağlarıdır. Kovalent olmayan bağlardan hidrojen bağları, her bir peptid bağının C=O ve N-H grupları ve polar yan zincirlerin elektronegatif grupları arasında oluşur. Hidrofobik aminoasitler yan zincirlerinin katlanmasıyla beraber proteinlerin iç kısmına yerleşirler ve burada kovalent olmayan hidrofobik etkileşimler meydana gelir. Bu şekilde serbest enerjiyi düşürerek kararlılığa katkı sağlarlar. Aynı şekilde Van der Waals etkileşimler de hidrofobik etkileşimler arasında yer alarak stabilizeye katkı sağlarlar. Bir diğer kovalent olmayan etkileşimlerden iyonik etkileşimler ise zıt yüklü R gruplarına sahip aminoasitler arasında bağ kurarak stabilizeye katkı sağlarlar. Çoğu yan zincir etkileşimleri arasında polar / yüklü etkileşimler veya polar olmayan Van Der Waals ve Londra dağılımı bulunur. Bununla birlikte, sistein yan zinciri, 2 sülfür atomu arasında yan zincir oksidasyonu ve 2 hidrojen atomunun çıkarılması yoluyla kovalent bağ yapan bir disülfid köprüsü oluşturabilir. Bu kovalent bağ, standart üçüncül ve kuaterner etkileşimlere kıyasla çok daha güçlü ve daha kalıcıdır. Bunun yanı sıra, lizin, arginin ve histidine pozitif yan zincirli amino asitler iken, Aspartat ve Glutamat negatif yan zincirli amino asitlerdir ve bunlarda kendi aralarında kovalent olmayan tuz köprüleri oluşturma kapasitesine sahiptir. Alanine, izölösin, lösin, metiyonin, fenilalanin gibi polar olmayan ve hidrofobik aminoasitler protein içine gömülmeyi tercih ederler. Çoğu protein molekülü, çözücü ile erişilemeyen hidrofobik bir çekirdeğe ve çevre ile temas halinde olan bir polar yüzeye sahiptir. Hidrofobik amino asit rezidüleri çekirdeği oluştururken, polar ve yüklü amino asitler tercihen molekülün yüzeyini kaplar ve hidrojen bağları oluşturma yetenekleri nedeniyle çözücü ile temas halindedir. Oluşacak bir hidrojen bağı için, iki elektronegatif atom (örneğin bir alfa sarmalında

amid N ve karbonil O) durumunda aynı hidrojen ile etkileşime girmelidir. Proteinlerde esasen H-bağları oluşturabilen tüm gruplar (hem ana zincir ve hem de yan zincir, rezidülerin ikincil bir yapı içinde veya başka bir tip yapıda olup olmadığından bağımsız olarak) genellikle birbiriyle veya su moleküllerine H bağlıdır. Elektronik yapıları nedeniyle, su molekülleri 2 hidrojen bağını kabul edebilir ve 2 bağışta bulunur, böylece aynı anda toplam 4 hidrojen bağına girer. Su molekülleri, proteinlerde ana zincir ve yan zincir grupları ile hidrojen bağları yaparak ve hatta farklı protein gruplarını birbirine bağlayarak protein yapısının stabilizasyonunda da rol oynayabilir [160]. Ek olarak, suyun, ligandların proteinlere bağlanmasında, polar veya yüklü yan zincir veya ana zincir atomları ile ligand etkileşimlerine aracılık ettiği sıklıkla bulunur. Bir hidrojen bağının enerjisinin, verici ile alıcı arasındaki mesafeye ve aralarındaki açığa bağlı olarak 2-10 kcal / mol aralığındadır [161].

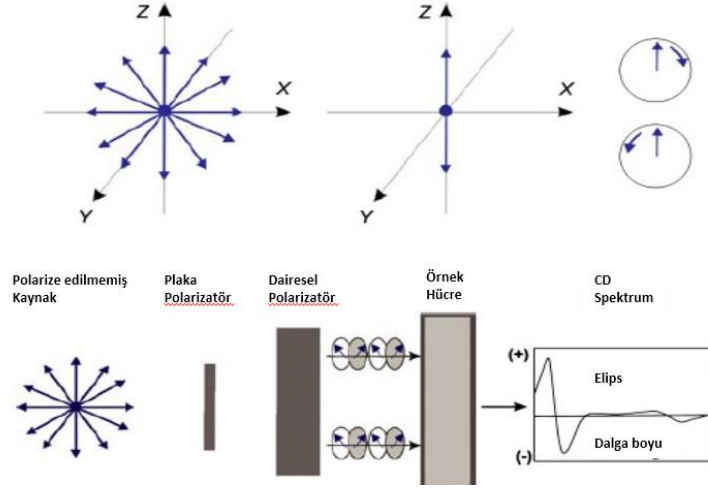
Birçok protein, proteinlerindeki amino asitlere ek kimyasal gruplar eklendiğinde, bir dizi translasyon sonrası modifikasyona uğrar. Bazı değişiklikler hidrofobik lipoproteinler, veya hidrofilik glikoproteinler üretebilir. Bu tip bir modifikasyon, bir proteinin bir membrana geri dönüşümlü olarak hedeflenmesini sağlar. Örneğin, bazı sinyal proteinlerinde yağ asidi palmitik asidin sistein kalıntılarına eklenmesi ve çıkarılması proteinlerin bağlanmasına ve daha sonra hücre zarlarından ayrılmasına neden olur [162].

Bölgeye yönelik mutagenез ile aminoasitlerin değişimi, genellikle polar olmayan aminoasitlerin yerine polar ya da yüklü aminoasitlerin değiştirilmesi ya da yan zincir gruplarının daha uzun ya da daha kısa hale getirilmesi şeklinde yapılır. Böylece enzimin substrat ve koenzim moleküllerine olan afinitesinin artırılması hedeflenir. Örneğin, fenilalanin aminoasidi valin aminoasidine değiştirildiğinde fenilalanine ait halkanın ortadan kaldırılarak koenzime yer açması hedeflenebilir. Ya da valinden treonine yapılan değişim bir CH₃ grubunu OH ile değiştirerek polar olmayan yan zinciri polar hale getirir ve böylece koenzim veya substrat ile affinitesinin artması beklenebilir. Başka bir örnek olarak da var olan bir α -heliksin bozulması istendiğinde seçilen herhangi bir aminoasidin yerine prolin yada glisin eklenmesi sarmal yapının kırılmasını sağlayabilir. Yapılacak olan bu değişiklikler özellikle aktif bölgeye yakın olmalı veya ilgili bölgeye etki edebilecek mesafede bulunmalıdır.

2.6 Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, 1960'lardan beri proteinlerin ve peptidlerin yapılarını incelemek için kullanılan güçlü bir yöntemdir. Özellikle rekombinant teknikler kullanılarak elde edilen veya dokulardan saflaştırılan proteinlerin, ikincil yapısının ve katlanma özelliklerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi için mükemmel bir araçtır. Bu yöntem ile birkaç saat içinde fizyolojik tamponlarda 20 µg veya daha az protein içeren çok sayıda örnek üzerinde ölçüm ve analiz yapılabilir ancak X-ışını kristalografisi veya Nükleer manyetik rezonans (NMR) ile elde edilebilen rezidüye spesifik bilgi elde edilemez. CD spektroskopisinin uygulamaları farklı alanlarda kategorize edilebilir: (i) proteinlerin ve nükleik asitlerin konformasyonel değerlendirmeleri, (ii) biyomoleküllerin katlanması ve açılım termodinamiğinin belirlenmesi, (iii) asimetrik biyomoleküllerin (örneğin; protein-protein etkileşimleri, protein-DNA etkileşimleri, protein-ligand etkileşimleri ve DNA-ligand etkileşimleri) etkileşimli çalışmaları ve (iv) makromoleküllerin katlanması ve katlanma kinetikleri [163].

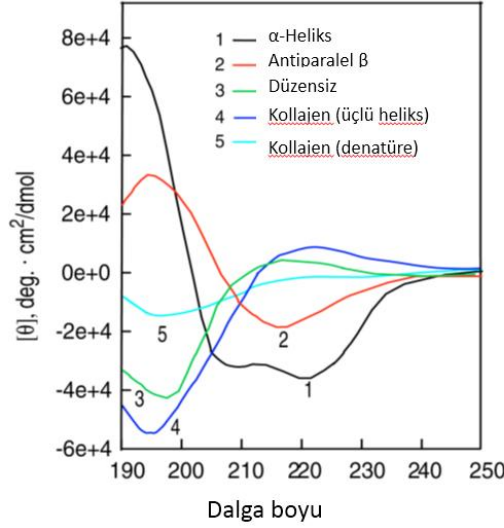
Dairesel dikroizm, sol el ve sağ el dairese polarize ışığın eşit olmayan emilimi olarak tanımlanmaktadır. Bir ışık demeti kendisine ve zamana bağlı elektrik ve manyetik alanlara sahiptir. Işık uygun prizmalardan geçerek polarize edilirse veya elektrik alanını süzerse, E, tek bir düzlemde sinüzoidal olarak salınacaktır. Önden bakıldığında sinüzoidal dalga, eşit uzunluktaki biri saat yönünde (ER) dönen ve diğeri tersine (EL) dönen iki vektörün sonucu olarak görselleştirilebilir (Şekil 2.10). İki dairese polarize dalga fiziksel varlığa sahiptir [164]. Dalgalar birbirleriyle 90° faz farklıdır ve Pockel'in etkisini kullanan çeşitli prizmalar veya elektronik cihazlar kullanılarak ayrılabilirler. Simetrik moleküller ışıkla etkileştiğinde, dairese polarize ışığı sağa ve sola farklı seviyelerde (bu nedenle dairese dikroizm terimi kullanılır) emebilir. Ayrıca iki dalga için farklı kırılma indisleri vardır. Işık dalgasının düzleminin döndürülmesi, ER ve EL vektörlerinin eklenmesi, bir elipsin izini süren ve ışığın eliptik olarak polarize olduğu söylenen bir vektörle sonuçlanır. CD; ΔE biriminde, ER ve EL'nin asimetrik bir molekül tarafından absorpsiyondaki farklılık veya tanjantın, minörün elipsin ana eksenine oranı olan açı olarak tanımlanan dereceli eliptiklik olarak rapor edilir. [θ], molar elips derece·Cm² / dmol = 3298ΔE (157).



Şekil 2.10: Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi [155].

2.6.1 Protein ikincil yapısının belirlenmesi

Protein ikincil yapısı, 'uzak ultraviyole (UV)' spektral bölgesinde (190-250 nm) CD spektroskopisi ile belirlenebilir. Bu dalga boylarında sinyal, düzenli ve katlanmış bir ortamda kromofor peptit bağı olduğunda ortaya çıkar. Peptit kromoforundaki en zayıf enerji geçişi, 210–220 nm'de gözlemlenen ve karbonilin O 'nun bağlanmayan elektronlarını içeren bir $n \rightarrow \pi^*$ geçişidir. Bununla birlikte en güçlü enerji, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi, karbonilin p-elektronlarını içerdiği için, 190 nm merkezli bir absorpsiyon bandıdır. Bu nedenle geçişlerin yoğunluğu ϕ ve ψ burulma açlarına bağlıdır. α -heliks, β -tabaka ve rastgele sarım yapılarının her biri, karakteristik bir şekle ve CD spektrumunun büyüklüğüne yol açar (Şekil 2.11). Teknik olarak, uzak UV CD spektrumları spektrumun bu bölgesinde yüksek bir absorbansa sahip olmayan herhangi bir tamponda 1 mg/ml ile 50 mg/ml protein içeren 20-200 μ l solüsyon gerektirir (yüksek dithiothreitol konsantrasyonları gibi, örneğin histidin veya imidazol, uzak UV bölgesinde kullanılamaz). Proteinlerin polipeptid omurgasına ait amidlerin kromoforları dizilerde hizalandığında, optik transisyonları “exciton” etkileşimleri nedeniyle çoklu geçişlere kaydırılır veya ayrılır. Sonucunda farklı yapısal elemanların karakteristik CD spektrumları ortaya çıkar. Örneğin, α -Heliks proteinler 222 nm ve 208 nm'de negatif bantlara ve 193 nm'de pozitif bir banta sahiptir. İyi tanımlanmış antiparalel β -tabakalı olan proteinler ise 218 nm'de negatif bantlara ve 195 nm'de pozitif bantlara sahipken, düzensiz proteinler 210 nm'nin üzerinde çok düşük eliptikliğe ve 195 nm'ye yakın absorbanslarda negatif bantlara sahiptir.



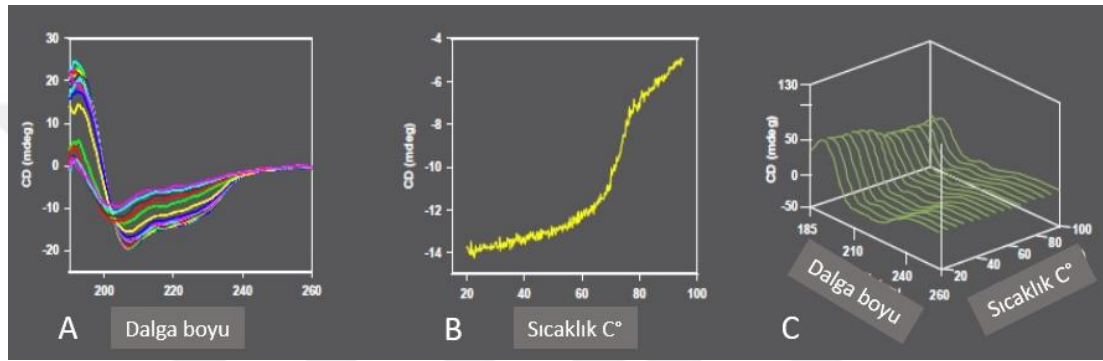
Şekil 2.11: CD spektroskopide protein ikincil yapıları [166].

Proteinlerin spektrumları, yapılarına çok bağlı olduklarından CD, bilinmeyen proteinlerin yapısını tahmin etmek ve sıcaklık, mutasyonlar, ısı, denatürantlar veya bağlanma etkileşimlerine bağlı konformasyonel değişiklikleri izlemek için kullanılabilir [166-170].

Biyolojik moleküllerin uzak UV bölgelerindeki spektrumları, amid gruplarının $n \rightarrow p^*$ ve $p \rightarrow p^*$ geçişleri tarafından domine edildiğinden ve polipeptit omurgalarının geometrilerinden etkilendiğinden, bunların spektrumları farklı tipteki ikincil yapıları yansıtır (ve böylece ϕ , ψ açıları mevcut). Tek bir molekülde bulunan farklı tipteki ikincil yapılardan kaynaklanan çeşitli rezidüleri çözmek için analizler geliştirilmiştir. Genel olarak yöntemler, α -heliks ikincil yapılar için en doğru sonuçları sağlar. Bunun sebebi şudur: (1) α -heliks yapılar çok düzenli olma eğilimindedir, iyi tanımlanmış ϕ , ψ açılara sahiptir ve dolayısıyla çok benzer spektrumlar üretirler. (2) α -heliks bileşenlerin spektrumları (özellikle uzun α -heliks aminoasitler) çok yoğun CD sinyalleri üretir [171]. β -tabaka yapıları daha değişken olmaya eğilimliken, bitişik ipliklerin hem paralel hem de antiparalel yönelimleri ve farklı kıvrımları nedeniyle, ϕ , ψ açıları önemli ölçüde değişmektedir. Ayrıca β -tabaka yapılarının negatif tepe noktaları, α -heliksin negatif tepe noktalarının sadece üçte biri kadar büyüklüğündedir. Bunun bir sonucu olarak, bir protein eğer büyük miktarda α -heliks ve küçük miktarda β -tabaka içerdiği zaman, ikisinin spektral katkısının harmanlanması ve dolayısıyla türetilmiş β -tabaka içeriğinin doğruluğunun oldukça düşüktür [172, 173].

2.6.2 Termal stabilitenin belirlenmesi

Termal stabilite, spektrumdaki sıcaklığın artırılmasıyla birlikte CD kullanılarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, uzak veya yakın UV CD bölgesindeki tüm spektrum çeşitli sıcaklıklarda takip edilebilir. Alternatif olarak, protein yapısının bazı spesifik özelliklerini izleyen tek bir dalga boyu seçilebilir ve bu sıcaklıktaki sinyal daha sonra sıcaklık yükseldikçe sürekli olarak kaydedilir (Şekil 2.12). Çoğunlukla çözelti pH'sı ve şekerler, amino asitler veya tuzlar gibi katkı maddelerinin termal stabiliteyi değiştirdiği dereceyi değerlendirmek için kullanılır [164, 170].



Şekil 2.12: CD spektroskopide termal stabilite (A: Dalga boyunun bir fonksiyonu olarak CD spektrumları, B: 222 nm'de sıcaklığa bağlı CD spektrumları, C:Sıcaklığa bağlı CD spektrumlarının 3D görüntüsü) [164].

Proteinler katlandığında sıklıkla karakteristik CD spektrumları olan α -heliksler ve β -tabakalar gibi yüksek asimetrik ikincil yapısal elemanlara sahiptirler. Proteinler açıldığında, bu yüksek sıralı yapıları kaybederler ve CD bantları değişir. Bazı proteinler tamamen açılma eğilimi gösterir ve açılmamış spektrumları kısa bir polipeptid karışımına benzemektedir. Diğer proteinler ve polipeptidler sadece kısmen açılmakta ve "erimiş globuler durumda" önemli miktarda rezidü α -heliks içeriğe sahip olabilmektedir. Karakteristik dalga boylarında bir sıcaklık fonksiyonu olarak CD'deki değişiklikler, açılımın termodinamiğini (değişme durumunu), yani, açılmanın van't Hoff entalpi (ΔH) ve entropisini (ΔS), açılma geçişinin (TM) orta noktası ve serbest enerjisini (ΔG) belirlemek için kullanılabilir. Açılımın görünen TM'si, protein konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak değiştirilirse veya tuz veya pH'daki değişikliklerle bozulursa, açılmadaki (ΔC_p) ısı kapasitesi değişikliği de CD verisinden tahmin edilebilir [169].

2.7 Protein Modelleme

2.7.1 ONIOM (our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics)

Hibrit yöntemler, iki veya daha fazla hesaplama tekniğini tek bir hesaplamada birleştiren ve çok büyük sistemlerin kimyasını yüksek hassasiyetle analiz etmeyi sağlayan yöntemlerdir [174]. QM/MM yöntemleri olarak adlandırılan hibrit yöntemlerin çoğu, bir kuantum mekaniği (QM) yöntemini bir moleküler mekanik (MM) yöntemiyle birleştirir. ONIOM (kendi n-katmanlı entegre moleküler orbital ve moleküler mekaniği) melez yaklaşım, herhangi bir sayıda moleküler orbital ve moleküler mekaniği metodunu birleştirebilir. Analiz edilecek molekülün bölgesi, bir QM yöntemi ile optimize edilirken, geri kalan kısım bir MM yöntemi ile optimize edilir. Böylece daha az zaman ve maliyetle tam geometri optimize edilebilir [175].

Hibrit metodların, bir araya getirdikleri değişik yöntemler dışında bir farklılığı da QM ve MM arasındaki kovalent etkileşime yapılacak uygulamanın kullanılan yönteme göre değişebilmesidir. QM hesaplamaları sırasında doymuş olması gereken sarkan bağlar oluşur. Bu sorunu çözmek için en basit yaklaşım, bağlantı atomlarını (LA'lar) kullanmaktır. Bağlantı atomları, ikame ettiği sistemin parçasını taklit eden herhangi bir atom olabilir ve genellikle hidrojen atomları olarak kullanılırlar. Bağlantı atomları, büyük bir oranda QM / MM uygulamalarının yanı sıra ONIOM şemasında kullanılır. Çeşitli QM/MM yöntemleri arasındaki ikinci ana fark, iki katman arasındaki elektrostatik etkileşimin yönetilme şeklidir [176]. Elektrostatik etkileşimi değerlendirmek için iki farklı yaklaşım kullanılır. Bu yaklaşımlardan ilki olan klasik veya mekanik gömme yaklaşımında; elektrostatik etkileşim, MM kısmi yüklerinin, QM bölgesindeki atomlara verilen kısmi (nokta) yüklerle etkileşimi olarak değerlendirilir. Elektronik gömme olarak adlandırılan ikinci yaklaşımda ise, MM bölgesinin yük dağılımı QM bölgesinin dalga fonksiyonu ile etkileşir. Sonuç olarak, elektrostatik etkileşimler, MM katmanından gelen kısmi yüklerin, MM katmanının yük dağılımına tepki vermesine izin vererek, QM Hamilton prensibine dahil edildiği için elektronik gömülmeye daha doğru bir şekilde tarif edilmektedir [176]. ONIOM enerji ifadesi, geleneksel QM/MM yöntemlerinin birleştirilmiş Hamilton prensibinin aksine, bir ekstrapolasyon mantığına göre yazılmıştır:

$$E^{\text{ONIOM}} = E^{\text{low}}_{\text{(Real)}} + E^{\text{high}}_{\text{(Model)}} - E^{\text{low}}_{\text{(Model)}}$$

ONIOM'da, gerçek sistem tüm atomları içerir ve sadece MM seviyesinde hesaplanır. Model sistemi, QM ve MM bölgeleri arasındaki kovalent bağların kesilmesinden kaynaklanan bağların sallanması için kullanılan bağlantı atomları ile QM seviyesinde muamele edilen sistemin parçasını içerir. Model sistemi için hem QM hem de MM hesaplamaları yapılmalıdır [177].

2.7.2 MM kuvvet alanları (AMBER)

Kuvvet alanları, sistemdeki tüm bağlar, açılar, dihedraller ve atom tipleri için parametrelerle tanımlanabilir. Moleküler modelleme bağlamında; bir kuvvet alanı, moleküler geometriyi yeniden üretmek ve bir sistemin potansiyel enerjisini tanımlamak için tasarlanmış denklemlerin ve ilgili sabitlerin bir koleksiyonunu ifade eder. Kuvvet alanı fonksiyonları ve parametre setleri, hem deneysel çalışmalardan hem de yüksek düzey kuantum mekaniksel hesaplamalardan elde edilir. Bir güç alanı, bağlı terimler ve bağlı olmayan terimlerden oluşur. Bağ germe, açı eğme ve burulma açısı bağlı terimleri temsil ederken; van der Waals ve Coulomb kuvvetleri bağlanmamış terimleri temsil eder. Bir katkı kuvvet alanında toplam enerji:

$E_{total} = E_{bağlanmış} + E_{bağlanmamış}$ şeklinde yazılabilir.

kovalent ve kovalent olmayan bileşenlerin katkıları aşağıdaki toplamalar ile elde edilir:

$E_{bağlanmış} = E_{bağ} + E_{açı} + E_{dihedral}$ (a)

$E_{bağlanmamış} = E_{van\ der\ Waals} + E_{elektrostatik}$ (b)

$$E_{total} = \sum_{bonds} \left[\frac{1}{2} k_b (r_i - r_0)^2 \right] + \sum_{angles} \left[\frac{1}{2} k_a (\theta_i - \theta_0)^2 \right] + \sum_{dihedrals} \left[k_d [1 + \cos(n_i (\phi_i - \phi_0))] \right] \quad (c)$$

AMBER kuvvet alanının işlevsel formu; denklem (c) olarak gösterilen (a) ve (b) denklemlerinin toplamıdır [177-179]. Kuvvet, bu potansiyelin pozisyona göre türevidir. Sistemde bulunan tüm kimyasal bağlar, açılar ve dihedraller tarafından oluşturulan bağlanmış etkileşimler, sırasıyla, yukarıda gösterilen denklemin ilk üç terimiyle açıklanmaktadır. İlk terim, kovalent olarak bağlanmış atomlar arasındaki enerjiyi temsil eder. Bu harmonik kuvvet, denge bağ uzunluğunun yakınında iyi bir yaklaşım iken atomlar birbirinden uzaklaştıkça zayıflar. İkinci terim, iki ardışık kovalent bağ arasındaki bir açının değişmesinden dolayı enerjiyi temsil eder. Üçüncü terim, bağ sırasına (örneğin çift bağlar) ve komşu bağlara veya tek elektron çiftlerine bağlı bir bağın bükülmesinin enerjiyi temsil eder. Denklemin dördüncü terimi,

sistemdeki her bir atom çifti arasındaki van der Waals etkileşimlerini açıklar. Van der Waals enerjisinin formu, denge mesafesi (r_{0ij}) ve kuyu derinliği (ϵ) kullanılarak hesaplanır. Beşinci terim atom çiftleri arasındaki elektrostatik etkileşimleri temsil eder ve Coulomb yasası kullanılarak değerlendirilir. Parametreler atomların üzerindeki kısmi yüklerdir (q_i ve q_j). Kovalent olarak bağlanmış iki atom arasında veya kovalent olarak bağlanmış bir dizideki birinci ve üçüncü atomlar arasında bağlanmayan etkileşimler hesaplanmaz, çünkü bu etkileşimler önceden, bağ germe ve açılı bükme terimlerinde hesaba katılır [178].

2.7.3 Temel set (Basis)

Bir temel seti, moleküler orbitalleri oluşturmak için kullanılan bir dizi fonksiyondur. Hartree-Fock teorisini kullanan ilk kuantum mekaniksel hesaplamalarda; moleküler orbitaller, atomik orbitallerin lineer kombinasyonu ile hesaplanmıştır. Moleküler orbitallerin, tek-elektron atomik orbitallerin toplamı olarak tahmini bir kolaylık sağlamıştır. Bu atomik orbitaller, tipik olarak, $S_{nlm}(r, \theta, \phi) = N r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_l^m(\theta, \phi)$ ile tanımlanan Slater-tipi orbitallerdir (STO). Burada N , radyal kısımda normalizasyon faktörünü, n orbitalin ana kuantum sayısını, ζ orbital üssü (orbitalin genişliğini kontrol eder) ve Y_{lm} küresel harmoniği ifade eder. Bu orbitaller ayrıca $S_{abc}(x, y, z) = N x^a y^b z^c e^{-\zeta r}$ şeklinde kartezyen koordinatlarıyla da yazılabilir. Bu fonksiyonların, kuantum sayılarına (n, l, m) bağlı olduğunu ve çekirdekten uzaklaştıkça üssel olarak azaldığını görebiliriz. Bu tür orbitallerin entegrasyon sürecinin zorluğu, bazı tahminlere yol açmış ve üstel terimi $\exp(-\zeta r^2)$ olarak yazıldığında fonksiyonun, bir Gauss tipi fonksiyon (GTO) olacağı görülmüştür. $N x^a y^b z^c \exp(-\zeta r^2)$ Buna, bireysel Gauss fonksiyonu denir. Gauss fonksiyonu ile elektron integralleri analitik olarak çözülebilir. Gauss fonksiyonlarının büyük r değerlerde Slater-tipi fonksiyonlardan daha hızlı bozulmalarının dışında, yaklaşım STO'lardan daha iyi olmakla beraber integralleri çözme süreleri uzundur. Bu problemi iyileştirmek için Pople ve arkadaşları minimal temel setini önermişlerdir. Buna göre; çok sayıda atom için sözleşmeli GTO'ları olan STO'ları taklit etmeye yönelik optimal daralma katsayıları ve üsler belirlenmiştir. Bu yaklaşımla, Gauss fonksiyonlarının doğrusal bir kombinasyonu tek bir fonksiyon olarak ele alınır. İlkel Gauss fonksiyonlarının bu doğrusal kombinasyonu, sözleşmeli bir Gauss fonksiyonu olarak adlandırılır. Bu nedenle, bu tür

temel kümeler STO-nG temel kümeleri denir; burada n, 2'den 6'ya değişen tek bir STO'yu taklit eden ilkel Gauss orbitallerinin sayısıdır. Bu ilkel Gauss fonksiyonlarının sayısı ne kadar yüksek olursa, doğruluk da o kadar iyidir [174].

$$S_{abc}(x, y, z) = N \sum c_i x^a y^b z^c \exp(-\zeta r^2)$$

Gauss fonksiyonlarının lineer kombinasyonlarının bu toplamı, hesaplamayı çok daha kolay hale getirmiş ancak minimalitede problem yaratmıştır. Görüldüğü gibi, çekirdek ya da değerlik olan her bir yörünge türü için tanımlanan yalnızca bir sözleşmeli temel fonksiyon vardır. Bir split-valence tabanı, her bir çekirdek atomik orbital için sadece bir sözleşmeli temel fonksiyonu ve değerlik (valence) atomik orbitaller için çoklu temel fonksiyonları kullanır. Bu nedenle, bu tür temel set tiplerine split-valence temel seti denir. En basit split-valence temel seti Pople ve arkadaşları tarafından oluşturulan Pople temel seti olarak adlandırılır ve X-YZG gösterimi kullanılır. Temel setleri, polarizasyon fonksiyonları ve dağınık (diffuse) fonksiyonlar olan iki fonksiyonla değiştirilebilir. Polarizasyon fonksiyonları, sistemdeki herhangi bir ağır atom için daha yüksek açısal momentum orbitallerini ekler ve bu ek, dalga fonksiyonunun polarizasyonuna izin vererek elektronlara esneklik sağlar. Dağınık fonksiyon ise; anyonları, zayıf etkileşimleri, yalnız çiftleri olan sistemler için yararlı bir fonksiyondur ve orbitallerin daha geniş alanları işgal etmesine izin verir. Dağınık fonksiyona sahip temel setler, elektronların çekirdeğe nispeten çok uzak olduğu sistemler için önemlidir. Kuantum kimyasal hesaplamalar için bir temel set seçimi çok önemli olup dağınık ve polarizasyon fonksiyonlarının eklenmesiyle hesaplamalar geliştirilir [177].

2.8 NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enzimi ile İlgili Protein Mühendisliği Çalışmaları

Endüstriyel değeri yüksek FDH enziminin katalitik mekanizmasını araştırmak, termal stabilitesini arttırmak ve koenzim ve substrat spesifitesini değiştirmek için türlerden elde edilen FDH'ler üzerinde protein mühendisliği çalışmaları yapılmıştır. Homodimerik FDH'nin stabilite ve katlanma mekanizmasının analizi, proteinin yapısı ve işleyişi hakkında bilgi elde etmek için oldukça önemlidir. Bilinen en önemli dezavantajı olan termostabilite sorununun çözülmesi için, bilinen en iyi termal stabiliteye sahip FDH'leri olan *C. boidinii* ve *Pseudomonas sp.*'nin rasyonel tasarımı veya yönlendirilmiş değişim çalışmalarına odaklanılmıştır. alkin ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada, *Pseudomonas sp.* FDH (*PseFDH*) 'de Arg284Gln ve Arg284Ala mutasyonları gerçekleştirilmiş, bunlardan Arg284Gln mutasyonunun enzimin format bağlama kapasitesini 20 kat arttırdığı fakat NAD bağlama kapasitesini etkilemediği gösterilmiş olup termal stabiliteyi de önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Arg284Ala mutasyonunda ise aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir [180]. Yine Labrou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; CboFDH' de Arg258Ala bölgesinde bölgeye yönelik mutagenез yapılmış ve enzimin inaktive olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada; His311Gln bölgesinde mutasyon yapılmış Km format değerinin 10 kat arttığı fakat NAD bağlanmasını etkilemediği gösterilmiştir. Asn119His ve Asn119His/ His311Gln kombine mutasyonlarında format Km değerlerinin 70-90 kat, NAD Km değerlerinin ise 100-200 kat arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmanın devamı olarak Ile175Ala ve Phe69Ala mutasyonları CboFDH'de tasarlanmış ve sonucunda mutant Ile175Ala format Km değerinin 2.2, NAD Km değerinin 12 kat arttığı; mutant Phe69Ala format Km değerinin 2.2 arttığı ancak NAD Km değerinin etkilenmediği bildirilmiştir [181]. Tishkov ve ark çalışmalarında; 332. pozisyonundaki histidine odaklanmışlardır. Buna göre; *PseFDH*'de His332Phe ve His332Ala mutasyonları gerçekleştirilmiş ve her iki mutasyonun aktiviteyi ve NAD bağlanmasını etkilemediği bildirilmiştir [183]. Matorin ve Tishkov yaptıkları çalışmada; *PseFDH*'de Asn146Ser, Asn146Cys ve Asn146Ala mutasyonlarını gerçekleştirmişler, Asn146Ser mutasyonunda V_{max} değerinde 2 kattan fazla düşüş görüldüğü, Asn146Cys ve Asn146Ala mutasyonlarında ise enzim aktivitelerinde kayıp olduğunu bildirmişlerdir [184]. Alekseeva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Soya FDH (*SoyFDH*)'nin katalitik özelliklerini geliştirmek ve termal stabilitesini arttırmak amacı ile Phe290Ser, Phe290Asn ve Phe290Asp mutasyonlarını tasarlamışlardır. Daha sonra bu mutantlarının Thr269, Gln292, Gly264, Ala265 ve His298 aminoasitleri ile oluşturdukları hidrojen bağlarını moleküler modelleme çalışmaları ile incelenmişlerdir. Çalışmanın sonunda; Phe290Ser, Phe290Asn ve Phe290Asp mutantlarında Tm değerlerinin 2-8 °C arasında arttığı bildirilmiştir [184]. Alekseeva ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında ise önceden elde ettikleri Phe290Ser, Phe290Asn ve Phe290Asp mutantlarda Ala267Met/Ile272Val mutasyonlarını gerçekleştirip üçlü mutantlar elde etmişlerdir. Çalışmaya göre, en stabil mutantın Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp olduğu bildirilmiştir [185]. Yine Kargov ve arkadaşlarının 290. pozisyonundaki fenilalanin üzerine yaptıkları çalışmalarda; Phe290Ala, Phe290Tyr, Phe290Gln, Phe290Glu ve

Phe290Thr mutasyonları tasarlanmış ve kinetik parametreler analiz edilmiştir. Elde edilen mutantlarda substrat afinitesinde önemli bir değişiklik olamamasına rağmen K_{cat} değerinde meydana gelen artış nedeniyle bölgenin aktivite açısından önemli olabileceği bildirilmiştir [186]. Felber ve arkadaşlarının Error-Prone PZR tekniği kullanarak yaptıkları rastgele mutasyon çalışmalarında CboFDH’de; Cys23Ser ve Phe285Ser mutasyonları yapılmış ve spesifik aktivitenin 1.7 kat arttığı gözlenmiştir [187]. CboFDH’de yapılan bir başka çalışmada ise Jiang ve arkadaşları Val120Ser, Asn187Asp ve Val120Ser/Asn187Asp mutasyonlarını tasarlamışlardır. Gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda en iyi mutant olan Val120Ser mutantının k_{cat} ve k_{cat}/K_M değeri yabanıl tip ile kıyaslandığında sırasıyla 3.48 ve 1.60 kat arttığı bildirilmiştir. NAD^{++} e karşı gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda ise Val120Ser/Asn187Asp kombine mutasyonunda yabanıl tipe kıyasla k_{cat}/K_M değerinin 1.5 kat arttığı gösterilmiştir [188]. Tishkov ve arkadaşları stabilite ve termal stabiliteyi arttırmaya yönelik yaptıkları çalışmalarda sistein rezidülerine odaklanmışlar ve *PseFDH*’de Cys255met, Cys255Ser, Cys255Ala mutasyonlarını tasarlamışlardır. Bunun sonucunda mutasyonların kimyasal stabiliteyi 200 kat arttırdığı fakat termal stabiliteyi düşürdüğü bildirilmiştir. Kinetik çalışmalarda NAD ’a karşı aktivitenin Cys255met ve Cys255Ser mutasyonlarında sırasıyla 7 ve 3 kat arttığı gözlenirken, Cys255Ala mutasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir [189]. Termal stabiliteyi arttırmak için sistein rezidülerine Odintseva ve arkadaşları da odaklanmış ve *PseFDH*’de Cys354Arg, Cys354Ser, Cys354Ala mutasyonlarını tasarlamışlardır. Çalışmaları sonucunda termal stabilitede artış gözlenmiş hatta yapılan Cys255Ala/ Cys354Ala kombine mutasyonu ile de stabilitenin 1000 kat arttığı bildirilmiştir [190]. Slusarczyk ve arkadaşları da CboFDH’de sistein rezidülerine odaklanarak termal stabilite ve kinetik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Buna göre yaptıkları Cys23Ser ve Cys262Val mutasyonları sonucundaki kinetik parametrelerde bir değişiklik gözlenmezken, termal stabilitede düşüş, kimyasal stabilitede ise artış olduğu rapor edilmiştir [191]. Serov ve arkadaşları; prolinin stabilitede koruyucu etkisini araştırmak amacıyla *PseFDH*’de Lys112Pro mutasyonunu yapmışlar ve sonucunda mutant enzimin %60 daha stabil olduğunu bildirmişlerdir [192]. Mitsuhashi ve arkadaşları *PseFDH*’de serin rezidülerine odaklanmışlar ve Ser131Ala, Ser160Ala, Ser168Ala, Ser184Ala, Ser228Ala mutasyonlarını tasarlamışlardır. Yaptıkları mutasyonlar sonucu 168. pozisyon hariç diğer tüm bölgelerdeki serinden

alanine olan değişimin termal stabiliteyi %20 arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında alfa-helikslerin hidrofobizasyonu temel alınmışlardır [193]. Aynı mantıkla Rojkova ve arkadaşları *PseFDH*'de Tyr62Phe ve Tyr165Phe mutasyonlarını tasarlamışlar; Tyr62Phe mutasyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken Tyr165Phe mutasyonunda 17,6 kat termal stabilitede düşüş bildirilmiştir [194].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar listesi.

Cihaz	Marka
Vorteks	DLAB Scientific Co., Çin
pH metre	Milwaukee Instruments Inc., Macaristan
Otoklav	Nuve Steamart, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	Biocote, Stuart CB162, Birleşik Krallık
Otomatik mikropipetler	Thermo Scientific, ABD
Laminar kabin	Biobase, Çin
İnkübatör	Biocote, Stuart S1500, Birleşik Krallık
Orbital karıştırıcı	Biosan, OS20, Litvanya
Santrifüj	Hermle, Z326K, Almanya
Ultrasantrifüj	Becman Coulter, Allegra 64R, ABD
UV-visible spektrofotometre	Thermo Scientific, Biocrom, ABD
Mikroplak okuyucu	Thermo Scientific, Varioscan, ABD
Spektrofotometre	Shimadzu, UV 1800, Japonya
Termal döngü cihazı (PZR)	AB Applied Biosystem, Veriti, ABD
Dairesel dikroizm cihazı (CD)	Jasco Inc., J1500, ABD
Kuvartz küvet	Hellma Analytics, Almanya
Sıcak su banyosu	Memmert, ENB29, Almanya
Sonikatör	Qsonica L.L.C., ABD
Hasas terazi	Daihan, Kore
Istııcı blok	Benchmark Scientific, ABD
Yatay jel elektroforez sistemi	Thermo Scientific, ABD
Dikey jel elektroforez sistemi	Biorad Lab., ABD
Western Blot sistemi	Biorad Lab., ABD
Jel görüntüleme sistemi	Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa
Nanodrop	Maestrogen Inc., Tayvan
Buz makinası	Electrolux, Barline, İtalya
Distile su cihazı	Millipore Co., ABD
Derin dondurucu (-80 °C)	Haier Biomedical, Birleşik Krallık
Derin dondurucu (-20 °C)	Uğur Derin Dondurucu, Türkiye
Buzdolabı (+4 °C)	Beko, Türkiye

3.1.2 Kimyasallar ve kitler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar ve kitler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi.

Malzeme	Marka
D-Sorbitol 500 gr	Sigma, ABD
Sodyum EDTA	Millipore, ABD
β -mercaptoethanol 100 ml	Sigma, ABD
Agaroz 500 gr	Sigma, ABD
CaCl_2	Sigma, ABD
MgCl_2	Sigma, ABD
Gliserol	Thermo Scientific, ABD
1000 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, ABD
Protein Ladder	Sigma, ABD
APS (Amonyum Peroksidisülfat)	Merck, ABD
Tryptone	Merck, ABD
Yeast Extract Granule	Merck, ABD
BSA (Bovine Serum Albumine)	Santa Cruz, ABD
DMSO	Sigma, ABD
SYBR Green	Thermo scientific, ABD
İmidazol	Sigma, ABD
Izopropanol	Merck, ABD
Commasie Brilliant Blue R-250	Sigma, ABD
Commasie Brilliant Blue G-250	Sigma, ABD
K_2HPO_4	Merck, ABD
LB Agar	Merck, ABD
Ampisilin	Sigma, ABD
KCl_2	Merck, ABD
MnCl_2	Merck, ABD
Acrylamid	Sigma, ABD
Bisacrylamid	Sigma, ABD
NaCl_2	Merck, ABD
SDS (Sodium Dodesil Sulfate)	Merck, ABD
TEMED	Sigma, ABD
Trisma Base	Sigma, ABD
Tisma HCl	Sigma, ABD
H_2SO_4	Merck, ABD
HCl	Merck, ABD
TritonX100	Sigma, ABD
Süt Tozu	Sigma, ABD
Tween-20	Sigma, ABD
NaOH	Merck, ABD
Asetik asit	Merck, ABD
X-Gal	Sigma, ABD
DNA Jel Yükleme Boyası	Thermo Scientific, ABD
Absolüt Etanol	Merck, ABD
Sodyum Format	Sigma, ABD
β -Nikotinamid adenin dinükleotit hidrat	Sigma, ABD
IPTG (İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid)	Sigma, ABD
Lizozim	Vivantis, ABD

Tablo 3.2 (Devam): Kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi.

Anti-6xHisTag Antibody	Abcam, ABD
Seconder Antibody	Abcam, ABD
PureLink genomik DNA mini kit	Invitrogen, 182001, ABD
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, F-548S, ABD
His-Pure Affinity Coloum	Thermo His-Pure Ni-NTA Chromotography Cartrige
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, K0502, ABD
GeneJET Gel Extraction	Thermo Fisher Scientific, K0691, ABD
Ultrafiltration Tube	Amicon Ultra-15 santrifugaton tube, Millipore, ABD
Q5 Site-Directed Mutagenesis kiti	New England Biolabs Inc, UK
PD-10 Coloum	GE Healthcare, ABD

3.1.3 Enzimler

Lizozim Enzimi: Ticari olarak temin edilen lizozim enzimi (Vivantis, ABD) saflaştırma basamakları esnasında, sonikasyon işleminden önce bakteri hücre duvarını parçalamak için kullanıldı.

NdeI ve XhoI Enzimleri: Ticari olarak temin edilen *NdeI* ve *XhoI* enzimleri (Thermo Fischer Scientific, ABD) PZR ürününün ve vektörün kesim işlemleri esnasında kullanıldı.

3.1.4 Mikroorganizmalar

Candida boidinii suşu: Ticari olarak temin edilen *C. boidinii* suşu (ATCC,18810, ABD) FDH gen kaynağı olarak kullanıldı.

E. coli BL21 (DE3): Ticari olarak temin edilen One Shot® BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scentific, 600003, ABD) yabanıl tip ve mutant tiplerin ekspresyon vektöründen transformasyonu esnasında kullanıldı. Tranformasyon işlemleri sonrası, *E.coli* BL21 hücreleri FDH gen ekspresyonu için IPTG ile indüklendi.

3.1.5 Primerler

Primerler tasarlandıktan sonra Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul firmasına sentezlettirildi. Klonlama ve mutasyon işlemlerinde kullanılan primerler Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.3: Klonlama bölgesine ait primerler.

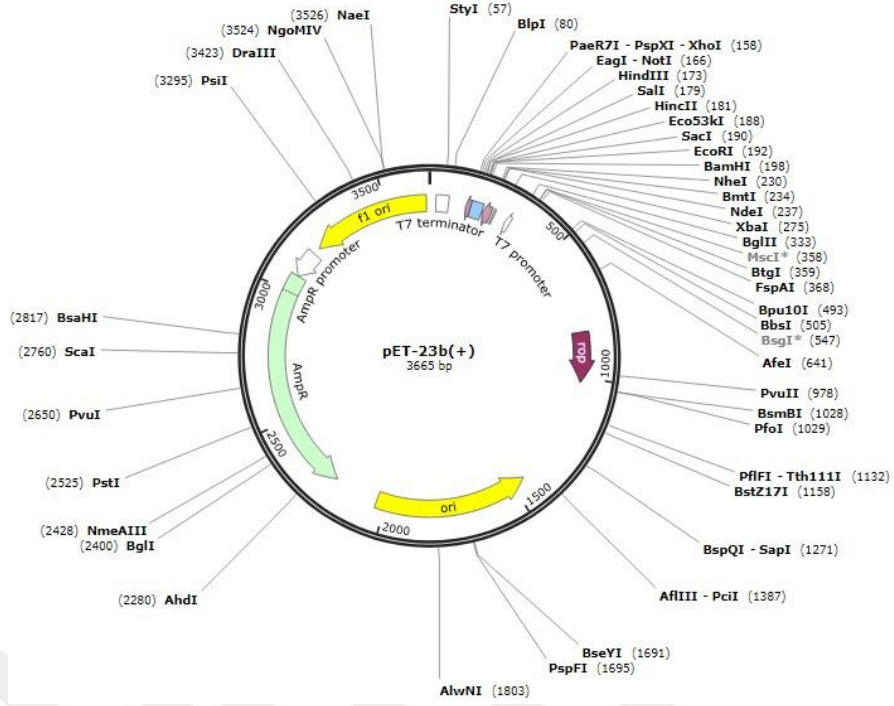
Primer	Sekans Dizisi (5' 3')
Forward	CGG CAT ATG ATG AAG ATC GTT TTA GTC (NdeI)
Revers	GGC CTC GAG TTA TTT CTT ATC GTG CTT (XhoI)

Tablo 3.4: Mutasyon Yapılan Bölgelere Ait Primerler.

Primer	Sekans Dizisi (5' 3')
Val120Thr-F	CGGTTCTAATACCGTCTCTGTTGC
Val120Thr-R	GTACTTCCAAAACGGAG
Phe285Thr-F	TGATGTTTGGACCCCAACCTG
Phe285Thr-R	CCACCGTAACCTCTTAATTG
Gln287Glu-F	TTGGTTCCCAGAGCCTGCTCCAA
Gln287Glu-R	ACATCACCACCGTAACCTC
His311Gln-F	CATGACTCCTCAATACTCTGGTAC
His311Gln-R	GCGTTACCAGCACCATAT

3.1.6 Vektör sistemi

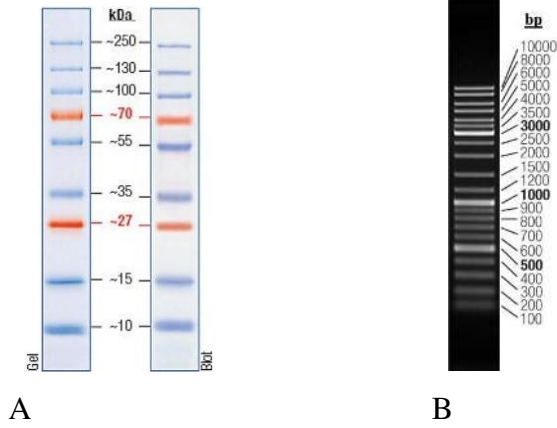
pET vektör sistemi, *E. coli*'de rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilmiş en güçlü sistemdir. Hedef genler, güçlü bakteriyofaj T7 transkripsiyonu ile translasyon sinyallerinin kontrolü altında pET plazmidlerinde klonlanır. Ekspresyon, konakçı hücrede bir T7 RNA polimeraz kaynağı sağlanarak indüklenebilir. T7 RNA polimeraz tamamen indüklendiğinde, hücrenin hemen hemen tüm kaynakları hedef gen ifadesini eksprese etmek için kullanılır. İstenen ürün, indüksiyondan birkaç saat sonra toplam hücre proteininin % 50'sinden fazlasını içerebilir. İkinci durumda, ekspresyon IPTG veya laktozun bakteriyel kültüre eklenmesiyle veya bir otoindüksiyon ortamı kullanılarak başlatılır. pET-23b(+) vektörlerinde N-terminali T7 dizisi ve C-terminali isteğe bağlı olarak histidin dizisi taşır. Bu plazmidler, T7 promotorunun hemen aşağısında bir lac operatör dizisi içerir. Aynı zamanda T7 lac ve lacI promotorlarının ayrışması için lac represörüne (lacI) ait doğal promotor ve kodlama dizisini de taşırlar.



Şekil 3.1: pET-23b(+) vektörü haritası.

3.1.7 Protein ve DNA belirteçleri

Tez çalışmasında, ticari olarak temin edilen protein belirteci (Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, ABD) Western Blot ve SDS-PAGE çalışmalarında kullanılırken, yine ticari olarak temin edilen DNA belirteci (Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix, ABD) ise tüm klonlama ve mutasyon işlemleri sırasında yapılan PZR temelli deneylerdeki elektroforez jel yürütme aşamalarında kullanıldı.



Şekil 3.2: Belirteçler (A: Protein belirteç, B: DNA belirteç).

3.1.8 Tampon ve çözeltiler

3.1.8.1 Besiyeri çözeltileri

Kültür ve transformasyon için kullanılan mediyaların hazırlanması: Luria-Bertani (LB) broth media ve Luria-Bertani (LB) agar media *E.coli* hücrelerini büyütmek için, Yeast Mold (YM) agar media ve Yeast Mold (YM) broth media *C.boidinii* hücrelerini büyütmek için Süper Optimal Broth (S.O.C) media ise transformasyon işlemleri sırasında *E.coli* hücrelerini çoğaltmak için kullanıldı. Antibiyotik olarak Ampisilin kullanıldı ve ortamdaki konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Luria-Bertani (LB) media hazırlanması: 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya özütü tartıldı ve son hacim, distile su (dH₂O) ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Agar İçeren Luria-Bertani (LB) media: 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya özütü tartıldı ve 900 ml dH₂O ile çözdürüldükten sonra 15 g agar ortam karışımına ilave edildi. Son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Süper Optimal Broth (S.O.C) media hazırlanması: 20 g tripton, 5 g maya özütü, 0.58 g NaCl (10mM), 0.186 g KCl (2.5 mM) tartıldı ve yaklaşık 950 ml dH₂O ile çözdürüldükten sonra son hacim yine dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Yeast Mold (YM) Agar ve Broth media hazırlanması: *C. boidinii* mikroorganizmasının büyütilmesinde kullanılan YM agar ve broth media kullanıma hazır şekilde ticari olarak (BD, Difco, ABD) elde edilmiştir. Buna göre; YM agardan 41 g tartılarak dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanırken, YM broth mediadan 21 g tartıldıktan sonra dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan tüm besiyerleri 121 C°'de, 15 dakika süreyle 1 atm basınç altında otoklavlandı.

3.1.8.2 TAE (Tris Asetik Asit EDTA) çözeltisi (50x)

Agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere 50x TAE tamponu hazırlandı. 50x TAE tamponu daha sonra 1x TAE'ye dH₂O ile seyreltilti. 50x TAE'nin hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5: 50x TAE çözeltisi hazırlanışı.

İçerik	Miktar
Tris Baz	242 g
Glasiyal asetik asit	57.1 ml
EDTA	14.6 g
dH ₂ O	1 Litre (L)

3.1.8.3 SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel) çözeltileri

6x Örnek tamponu

Protein örneklerini denatüre etmek için 6x örnek tamponu kullanıldı. Bu tampon, protein örneğimizle karıştırıldı ve protein örnekleri SDS-poliakrilamid jele yüklendi. 6x örnek tamponun hazırlanması Tablo 3.6'da verilmiştir

Tablo 3.6: 6x Örnek tamponu hazırlanışı.

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Tris-HCl pH 6.8	0.3 M	1.25 ml
SDS	%6	6 ml
Gliserol	% 20	2 ml
Bromofenol mavisi	%0.05	5 mg
DTT	0.15 M	231 mg
dH ₂ O		10 ml'ye tamamlanır

Tris-Trisin yürütme çözeltisi (10x)

Tris-Trisin SDS Buffer (10x), SDS-PAGE işlemlerinde elektroforez aşamasında tampon olarak kullanıldı. Tris-Trisin tamponunun hazırlanması Tablo 3.7'de verilmiştir.

Akrilamid çözeltisi: 29 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 100 ml dH₂O'da çözülerek hazırlandı.

APS (Amonyum peroksidisulfat) çözeltisi: Her seferinde taze hazırlanması gerektiğinden az miktarda hazırlanır. %10'luk hazırlandı. 1 g APS tartılarak 10 ml dH₂O'da çözüldü.

Tablo 3.7: Tris-Trisin yürütme çözeltisi hazırlanışı.

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Tris baz	1 M	60.55 g
Trisin	1 M	89.60 g
SDS	% 1	5 g
dH ₂ O		500 ml'ye tamamlanır

SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi: 10 g SDS tozunun 100 ml dH₂O'da çözdürülmesi ile hazırlandı.

Coomassie Brilliant Blue (CBB) boya çözeltisi

SDS poliakrilamid jeli üzerinde ayrılan protein bantlarını görünür kılmak için CBB boya çözeltisi kullanıldı. CBB boya çözeltisinin hazırlanması sırasında kullanılan bileşenler Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: CBB boya çözeltisi hazırlanışı.

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
CBB R-250	% 0.1	0.5 g
Metanol	% 45	450 ml
Asetik asit	% 10	100 ml
dH ₂ O		450 ml

Boya giderici çözelti

SDS poliakrilamid jeli CBB boyası ile boyadığımızda, bantlar harici arka plandaki boyayı uzaklaştırmak için kullanılır. Bu sayede protein bantları çok daha görünür hale gelir. CBB destaining çözeltisinin hazırlanması Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9: Boya giderici çözeltisinin hazırlanışı.

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Metanol	% 10	100 ml
Asetik asit	% 10	100 ml
dH ₂ O		800 ml

3.1.8.4 Western Blot çözeltileri

Transfer tamponunun hazırlanışı: 10x olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 288 g glisin ve 60.4 g Tris bazı tartılarak 2 L dH₂O’da çözdürüldü.

TBST (Tris tamponlu salin Tween 20) tamponunun hazırlanışı: 10x olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 24 g Tris bazı ve 88 g NaCl 900 ml dH₂O’da çözdürüldü. Ardından tamponun pH’sı 7.6’ya ayarlandıktan sonra total hacim 1 litreye dH₂O ile tamamlandı. Çözeltiden, kullanılacağı zaman 100 ml alınıp üzerine 1 ml %0.1 Tween 20 konulduktan sonra total hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Bovin Serum Albümin (BSA) stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 100 mg BSA tartılarak 1 ml dH₂O’da çözdürüldü.

Süt tozunun hazırlanışı: % 10’luk olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 1 g süt tozu 10 ml TBST içerisinde çözdürüldü.

3.1.8.5 Protein saflaştırma çözeltileri

Protein saflaştırma tamponları, His-Trap saflaştırma yöntemi ile bakteriyel peletten proteinlerin saflaştırılması için kullanıldı.

Tampon A: 3.12 g NaH₂PO₄·2H₂O (20mM), 29.22 g NaCl (500 mM) ve 2.04 g imidazol (30 mM) tartıldı ve 950 ml dH₂O içinde çözdürüldü. Son hacim dH₂O ile 1000 ml’ye tamamlandı. Son olarak NaOH kullanılarak pH 7.4’e ayarlandı.

Tampon B: 3.12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20mM), 29.22 gr NaCl (500 mM) ve 34.04 g imidazol (500 mM) tartıldı ve 950 ml dH_2O içinde çözdürüldü. Son hacim dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Son olarak NaOH kullanılarak pH 7.4'e ayarlandı.

50 mL Tampon A + 100 mM imidazol: 42.55 ml Tampon A ve 7.45 ml Tampon B karıştırıldı.

50 mL Tampon A + 200 mM imidazol: 31.9 ml Tampon A ve 18.1 ml Tampon B karıştırıldı.

50 mL Tampon A + 400 mM imidazol: 10.6 ml Tampon A ve 39.4 ml Tampon B karıştırılmıştır.

3.1.8.6 Enzim aktivite testi çözeltileri

0,2 M Asetat tamponu: 0,2 M Sodyum asetat ve 0,2 M Asetik asit hesaplanarak 100'er ml dH_2O içinde çözdürüldü. pH 5 ve 5.5 olacak şekilde farklı aralıklara ayarlanarak hazırlanan tamponlar pH ölçümlerinde kullanıldı.

0,2 M Sodyum fosfat tamponu: 0,2 M Na_2HPO_4 ve 0,2 M NaH_2PO_4 hesaplanarak 100'er ml dH_2O içinde çözdürüldü. pH 6, 6.5 ve 7 olacak şekilde farklı aralıklara ayarlanarak hazırlanan tamponlar aktivite ve pH ölçümlerinde kullanıldı.

0,1 M Tris tamponu: 0,1 M TrisHCl ve 0,1 M Trizma baz hesaplanarak 100'er ml dH_2O içinde çözdürüldü. pH 7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8, 8.5 ve 9 olacak şekilde farklı aralıklara ayarlanarak hazırlanan tamponlar aktivite ve pH ölçümlerinde kullanıldı.

0,1 M Glisin-NaOH tamponu: 0,1 M Glisin ve 0,1 M NaOH hesaplanarak 100'er ml dH_2O içinde çözdürüldü. pH 9, 9.5, 10, 10.5 ve 11 olacak şekilde farklı aralıklara ayarlanarak hazırlanan tamponlar pH ölçümlerinde kullanıldı.

0,2 M KCl-NaOH tamponu: 0,2 M KCl ve 0,2 M NaOH hesaplanarak 100'er ml dH_2O içinde çözdürüldü. pH 11.5 ve 12 olacak şekilde farklı aralıklara ayarlanarak hazırlanan tamponlar pH ölçümlerinde kullanıldı.

Sodyum format çözeltisi: Kinetik ölçümler esnasında kullanılmak üzere 100 mM sodyum format hesaplanarak 100 ml dH_2O içerisinde hazırlandı. Hazırlanan çözelti ana stok olarak kullanıldı.

NAD^+ çözeltisi: Kinetik ölçümler esnasında kullanılmak üzere 20 mM NAD^+ hesaplanarak 100 ml dH_2O içerisinde hazırlandı. Hazırlanan çözelti ana stok olarak kullanıldı.

Metal bileşiklere ait çözeltiler: Farklı metal konsantrasyonlarının enzim aktivitelerine etkisi analiz etmek için aktivite tayinleri esnasında kullanıldı. Hazırlanan metal bileşiklerin ana stok bilgileri Tablo 3.10’da verilmiştir.

Tablo 3.10: Metal bileşiklere ait çözeltiler.

Metal Adı	Konsantrasyon	Çözücü
Çinko Klorür (ZnCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Bakır Klorür (CuCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Potasyum Klorür (KCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Lityum Klorür (LiCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Tungsten (W)	1 M	dH ₂ O
Demir Klorür (FeCl ₃)	1 M	dH ₂ O
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Mangan (Mn)	1 M	dH ₂ O
Potasyum Klorür (KCl ₂)	1 M	dH ₂ O
Molibdat (Mo)	1 M	dH ₂ O

3.2 Yöntem

3.2.1 Gen kaynağı *C. boidinii* mikroorganizmasının büyütülmesi

Ticari olarak ampul halde elde edilen *C. boidinii* suşu (ATCC,18810, ABD) 25-30 °C su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra içerikten 100 µl alınarak YM agar plaklara ekildi. Hemen sonrasında % 70 etanol ile ampul sterilize edilip, kalan içerik derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Ekim yapılan plaklar, 26 °C’de 4 gün inkübe edildikten sonra üreyen kolonilerden örnek alınarak 10 ml YM broth besiyerlerine ekildi. Örnekler, 26 °C, 200 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde 3 gün inkübasyonun ardından 1:1 oranında gliserol (%50) stok hazırlanarak derin dondurucuya (-80 °C) saklandı.

3.2.2 *C. boidinii* genomik DNA izolasyonu

C. boidinii genomik DNA’sının izolasyonunda ticari olarak elde edilen PureLink genomik DNA mini kit (Invitrogen, 182001, ABD) kullanıldı. Kitin tavsiyesi üzerine Zimolaz tamponu (1 M sorbitol, 10 mM sodium EDTA, 14 mM β-mercaptoethanol) deneye başlamadan hemen önce hazırlandı. YM sıvı kültür ortamında çoğaltılan hücreler, 10000 x g’ de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra

süpernatant kısmı atıldı. Kalan pelet üzerine 500 µl taze hazırladığımız Zimolaz tamponu ve 10 µl Zimolaz enzimi (15 units) pipetledikten sonra 1 saat 37 °C ısıtıcı blokta inkübasyona bırakıldı. Tüpler, 3000 x g 'de 10 dakika oda ısısında santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Tüplerdeki peletlerin üzerine 180 µl genomik parçalama tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra 5 saniye kadar vorteks yapılıp ardından 55 °C ısıtıcı blokta 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Lizatlara 20 µl RNaz A eklenip yavaşça tüpler karıştırıldıktan sonra 2 dakika oda ısısında inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası tüplere, 200 µl genomik lizis/bağlanma tamponu eklendi ve yavaşça vorteks ile karıştırıldı. Her bir örneğe %100'lük etanol ilave edildikten sonra lizatlar spin kolonlara (~640 µL) yüklendi. Kolonlar 10000 x g' de 1 dakika oda ısısında santrifüj yapıldı ve yeni toplama tüplerine alındı. Kolonların üzerine 500 µl yıkama solüsyonu-1 konuldu ve 10000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından kolonlara 500 µl yıkama solüsyonu-2 konuldu ve 12000 x g' de 3 dakika santrifüj edildi. Kolonlar, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve üzerlerine 100 µl elüsyon tamponu yüklendi. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildikten sonra tüpler 12000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi. DNA miktarı 260-280 nm dalga boyunda UV-vis spektrofotometrede ölçüldü ve daha sonraki kullanımlar için örnekler derin dondurucuya (-20 °C) kaldırıldı.

3.2.3 PZR ile Format Dehidrogenaz gen bölgesinin çoğaltılması

C. boidinii mikroorganizmasının FDH-1 proteinine ait gen dizilimi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.uniprot.org/> sitelerinden tespit edildi. *C. boidinii* FDH enzimini kodlayan gen bölgesinin çoğaltılması için ilk olarak Primer3 programı kullanılarak Forward ve Revers primerler tasarlandı. Primerlerin 5' uçlarına *NdeI* ve *XhoI* endonükleazlarına uygun olan bölgeler yerleştirildi. Primerler, oligoEvaluator programı ile ikincil yapıları açısından kontrol edildikten sonra Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul firmasına sentezlettirildi.

C. boidinii FDH geninin kopya sayısını arttırmak için ticari olarak temin edilen Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanıldı. Kitin çalışılması esnasında PZR yapılmış olup, reaksiyon ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.11 ve Tablo 3.12'de belirtilmiştir. PZR bileşenleri buz üzerinde ve laminar kabin içerisinde herhangi bir kontaminasyon olmayacak şekilde PZR tüpüne

konulduktan sonra, tüpün dibinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde iyice karıştırılıp PZR cihazına (Applied Biosystem, ABD) konuldu.

***Candida boidinii* NAD⁺ Bağımlı FDH1 geni (1095 bp)**

ATGAAGATCGTTTTAGTCTTATACGATGCTGGTAAACACGCCGCCGATGAAGAAAAATTATACGGTTGTA
CTGAAAACAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGCCATGAATTAATCACCACCTTCTGATAA
AGAAGGCGGAAACAGTGTGTTGGATCAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATTACAACCTCTTCCATC
CTGCTTATATCACCAAGGAAAGAATCGACAAAGCTAAAAAATTGAAATTAGTTGTCGTCGCTGGTGTCTGG
TTCTGATCATATTGATTGGATTACATCAACCAAAACCGGTAAGAAAATCTCCGTTTTGGAAGTTACCGGTT
CTAATGTTGTCTCTGTTGCAGAACACGTTCTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTTGTCCAGCTC
ACGAACAAATCATTAAACCACGATTGGGAAGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAA
AACTATCGCCACCATTGGTGCCGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAGATTAGTCCCATTAAATCCAA
AAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAAGATGCCGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGGGT
TGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCCCAAGCTGATATAGTTACAATTAATGCTCCATTACACGCTGGTACAA
AAGGTTTAATTAACAAGGAATTATTGTCTAAATTCAAGAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACTGCAAGAGGT
GCCATTGTGTTGCCGAAGATGTTGCTGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTT
TGGTTCACACAACCTGCTCCAAAAGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAACAAATATGGTGCTGGTAACGC
CATGACTCCTCATTACTCTGGTACTACTTTAGATGCTCAAAGTAGATACGCTGAAGGTACTAAAAATATTTT
AGAGTCATTCTTTACCGGTAAGTTTGACTACAGACCACAAGATATCATCTTATTAAATGGTGAATACATTAC
CAAAGCTTATGGTAAGCACGATAAGAAATAA

Primerler

FDH-Forward: CGG **CAT ATG** ATG AAG ATC GTT TTA GTC

FDH-Revers: GGC **CTC GAG** TTA TTT CTT ATC GTG CTT

Tablo 3.11: *C. boidinii* genomik DNA PZR reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master Mix	25 µl
FDH-Forward primer	2.5 µl (0.5 µM)
FDH-Revers primer	2.5 µl (0.5 µM)
Genomik DNA	2 µl (25 ng/ml)
dH ₂ O	18 µl
Toplam	50 µl

Tablo 3.12: *C. boidinii* genomik DNA PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 °C	30 sn	
Denatürasyon	98 °C	10 sn	35 döngü
Bağlanma	60 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	7 dk	

PZR reaksiyonundan sonra *C. boidinii* FDH gen bölgesinin amplifikasyonunu gözlemleyebilmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için %1'lik hazırlanan agaroz jele sırasıyla 3 µl DNA belirteç ve 2 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 5 µl PZR ürünü yüklendi. Daha sonra jel 120 mA, 110 V'de 1 saat yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi.

3.2.3.1 Agaroz jelden DNA saflaştırma

Beklenen DNA bantı görüldükten sonra ticari olarak temin edilen GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, K0691, ABD) kiti ile jelden pürifikasyon işlemi yapıldı. Agaroz jelden UV-312 nm ışığı altında kesilen bantlar, steril ependorf tüpler içerisine alınarak tartıldı. Ardından 1 hacim jele: 3 hacim bağlanma tamponu eklenip 55 °C 'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Bu süre içerisinde tüpler, jellerin homojenize olması için alt-üst edildi. Tüplerin içerisindeki jel solüsyonu kitin içerisinden çıkan kolonlara 800 µl olarak yüklendi ve 1 dk 10000 x g'de santrifüj edildi. Kolona 700 µl yıkama tamponu yüklendikten sonra yine 1 dk 10000 x g'de santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra saflaştırma kolonları steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve üzerlerine 50 µl elüsyon tamponu konuldu. Son olarak 1 dk 10000 x g'de santrifüj edildikten sonra kolon uzaklaştırılarak DNA içeren süpernatant %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve DNA'nın varlığı kontrol edildi. DNA, derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

3.2.4 Klonlama işlemleri

Klonlama, tüm genleri içeren DNA fragmanlarını çoğaltmak için kullanılabildiği gibi istenilen bir gen bölgesi, promotorlar, kodlayıcı olmayan sekanslar ve rastgele parçalanmış DNA gibi herhangi bir DNA sekansını amplifiye etmek için de

kullanılabilir. Klonlama yöntemi parmak izinden (DNA finger-printing) büyük ölçekli protein üretimine kadar pek çok biyolojik deney ve pratik uygulamada kullanılır. Canlı bir organizmada herhangi bir DNA dizisini amplifiye etmek için, bu dizinin, kendisinin ve herhangi bir bağlantılı dizinin replikasyonunu yönetebilen bir replikasyon orijinine bağlanması gerekir. Bunun yanı sıra protein üretimi, afinite etiketleme (tagging) gibi özellikler için klonlama vektörlerine ihtiyaç duyulur. Herhangi bir DNA parçasının klonlanması esas olarak dört adımı içerir: 1. Restriksiyon (DNA dizisinin kesilmesi), 2. Ligasyon (DNA parçalarını istenen bir sırayla birleştirmek), 3. Transfeksiyon-transformasyon (yeni oluşturulmuş DNA parçalarını hücrelere yerleştirmek), 4. tarama / seçim (yeni DNA ile başarıyla transfekte edilen hücrelerin seçilmesi) İlk olarak istenilen gen bölgesine sahip canlının DNA'sı izole edilir. İzole edilen DNA, istenilen gen bölgesini PZR koşullarında çoğaltacak olan uygun primerler varlığında amplifiye edilir ve böylece DNA fragmanı ortaya çıkar. Daha sonra transfekte edilecek canlıya ve amaca uygun vektör (çoğunlukla dairesel olan), kesim enzimleri kullanılarak doğrusallaştırılır ve uygun koşullar altında DNA ligaz adı verilen bir enzim ile ilgilenilen DNA fragmanı ile inkübe edilir. Bu işleme ligasyon prosedürü adı verilir. Ligasyonu takiben ilgili insert ile birleşen vektör, hücrelere transforme edilir. Son olarak transfekte edilmiş hücreler kültürlenir. Modern klonlama vektörleri, sadece vektörün transfekte edildiği hücrelere izin veren seçilebilir antibiyotik direnç belirteçleri içerir. Buna ek olarak, klonlama vektörleri X-gal ortamı üzerinde mavi / beyaz tarama (alfa-faktör tamamlama) sağlayan renk seçim belirteçleri içerebilir. Ancak, bu seçim adımları, DNA fragmanının elde edilen hücrelerde bulunduğunu kesin bir şekilde garanti etmez. Sonuçların PZR reaksiyonları, sekans analizleri gibi yöntemlerle ayrıca doğrulanması gerekir.

3.2.4.1 CboFDH geninin pET-23b(+) vektörüne aktarılması

Klonlama ve ekspresyon vektörü pET-23b(+), PZR ürünü ile uyumlu yapışkan uçlara sahip olabilmesi için *NdeI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesildi. Reaksiyon 5 µl pET-23b(+), 5 µl hızlı parçalama tamponu, 2,5 µl *NdeI* enzimi (5 u/ µl), 2,5 µl *XhoI* enzimi (5 u/ µl), 35 µl steril distile su, total hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra vektörün kendi üzerine kapanmaması için

37 °C'de 10 dk 5 µl Alkalın fosfataz enzimi ile inkübe edilerek defosforilasyon işlemi yapıldı.

3.2.4.2 CboFDH geninin pET-23b(+) vektörüyle ligasyonu

PZR ürünü ile pET-23b(+) vektörünün birbirine bağlanması için ligasyon işlemi 1:3 oranında olacak şekilde Tablo 3.13'de belirtilen ölçülerde hazırlandı.

Tablo 3.13: CboFDH geninin pET23b+ vektörüyle ligasyonu bileşenleri.

Bileşen	Vektör+Insert	Sadece Insert / Kontrol
	Miktar	Miktar
pET-23b(+) vektörü	5 µl	-
PZR ürünü	10 µl	10 µl
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl
Ligasyon tamponu	4 µl	4 µl
dH ₂ O	-	5 µl
Toplam	20 µl	20 µl

Ligasyon karışımları 1 saat oda ısısında inkübe edildikten hemen sonra 4 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Süpernatant, %1'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'nın varlığı kontrol edildi.

3.2.4.3 pET-23b(+)/FDH 'nin *E.coli* DH5-α hücrelerine transformasyonu ve koloni PZR

İnkübasyon tamamlandıktan sonra ligasyon karışımı *E.coli* DH5-α hücrelere transforme edildi. *E.coli* DH5-α kompetent hücrelere transformasyon için ön hazırlık olarak; daha önceden hazırlanan 50 µg/ml ampisilinli LB katı petrilerin üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmesi, S.O.C besiyerinin oda ısısına getirilmesi, *E.coli* DH5-α kompetent hücrelerin buz üzerinde eritilmesi işlemleri yapıldı. Ligasyon sonunda elde edilen ürün, kompetent hücrelerin üzerine yavaşça eklenerek buzda 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler, porların açılıp plazmidlerin içeri girmesi için, 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 sn inkübe edildikten hemen sonra buz içerisine alınarak 10 dk bekletildiler. Sürenin bitiminde her bir örneğin üzerine 950 µl S.O.C besiyeri eklendi.

Örnekler 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 10000 x g'de 25 sn santrifüj edildikten sonra 800 µl besiyeri uzaklaştırılıp kalan süpernatant içerisinde pellet çözülüp LB agar petrilere yayıldı. 16 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılan petrilere plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmamasından faydalanılarak klonlar seçildi. Seçilen 10 adet koloni, 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerlerine ekildi. Besiyerleri 37 °C , 200 x rpm'de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildikten sonra ticari olarak elde edilen 'Genejet Plasmid Miniprep Kit' (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. Buna göre; hücreler 14000 x rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst süpernatantları uzaklaştırıldı. Pelet kısımlarının üzerine 250 µl resüspansiyon tamponu ilave edildikten sonra iyice vorteks ile karıştırılıp 250 µl 'Lysis lizis solüsyonu' konuldu. Tüpler hafifçe alt üst edilerek çevrildikten sonra üzerlerine 350 µl nötralizasyon tamponu eklenip tekrar hafifçe alt üst edildi. Bakteri lizatları bulutumsu bir form aldıktan sonra 14000 x rpm'de 5 dk santrifüj edildiler. Santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatantlar 'GeneJET spin kolonlara' transfer edildi. Kolonlar 14000 x rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra üzerlerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenip tekrar 14000 x rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi 2 defa yapıldı ve her santrifüj işlemi sonrası oluşan sızıntılar uzaklaştırıldı. Kolonlar, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındıktan sonra 70 °C'de ısıtılmış 50 µl elüsyon tamponu üzerlerine eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. Ardından 14000 x rpm'de 2 dk santrifüj sonucu elde edilen plazmidlerin miktarı UV-vis spektrofotometre yardımı ile ölçüldü. Büyüyen kolonilerde CboFDH gen bölgesinin pET-23b(+) vektörüne yerleşip yerleşmediğini kontrol etmek için ticari olarak elde edilen Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, F-548S, ABD) kiti ile Tablo 3.14 ve Tablo 3.15'de belirtilen miktar ve koşullarda gen bölgesine ait primerler varlığında koloni PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR ürünleri, %1'lik hazırlanan agaroz jele yüklendikten sonra 120 mA, 110 V'de 1.5 saat yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi.

3.2.4.4 Plazmidin endonükleazlar ile kesimi

Koloni PZR reaksiyonunun yanlış sonuç verme ihtimaline karşılık kontrol amaçlı olarak plazmidler restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi için reaksiyon: 6 µl pET-23b(+)/FDH, 2 µl Fast Digest Buffer, 1 µl *NdeI* enzimi (5 u/ µl), 1 µl *XhoI* enzimi

(5 u/ µl), 10 µl steril dH₂O, total hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra örnekler %1 agaroz jelde yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi.

Tablo 3.14: Koloni PZR reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master Mix	12.5 µl
FDH-Forward primer	1.25 µl (10 µM)
FDH-Revers primer	1.25 µl (10 µM)
DNA	1 µl (25ng/ml)
dH ₂ O	9 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.15: Koloni PZR reaksiyonu döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 °C	30 sn	
Denatürasyon	98 °C	10 sn	
Bağlanma	60°C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	2 dk	

3.2.4.5 Dizi analizi

PZR ürünü rekombinant pET-23b(+)/FDH vektörü Sentromer DNA Teknolojileri İstanbul firmasına dizi analizine gönderilerek; PZR ürününün vektöre doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği, N-terminal bölgesinde His-Tag füzyon proteininin bulunup bulunmadığı kontrol edildi. Bunun için plazmide özgü T7 promotor primerleri iki yönlü olacak şekilde kullanıldı. Yöntem olarak Sanger Coulson’un zincir sonlama yöntemi, ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı kullanarak Sentromer DNA Teknolojileri firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans sonucu <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> programları kullanılarak CboFDH-1 protein dizisi ile alignmant adı verilen yöntem

vasıtasıyla karşılaştırıldı. Analiz sonucundan sonra, protein ekspresyon bakterisi olan *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücreleri kullanılarak transformasyon işlemi yapıldı.

3.2.4.6 pET-23b(+)/FDH'nin *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu

Sekans analizi sonucu ile istenilen gen bölgesinin vektöre düzgün yerleştiği doğrulandıktan sonra pET-23b(+)/FDH vektörü *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edildi. Bunun için ilk olarak *E. coli* BL21(DE3) One Shot® hücreleri buz üzerinde eritildikten sonra, üzerine 5 µl hacimde 10 ng plasmid DNA' sı eklenip hafifçe karıştırıldı. Buzda 30 dk inkübasyona bırakılan hücreler, 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 sn inkübe edildikten hemen sonra buz içerisine alınarak 10 dk bekletildiler. Sürenin bitiminde örneğin üzerine 950 µl S.O.C besiyeri eklendi ve 200 x rpm de orbital çalkalayıcı üzerinde 37 °C 'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 10000 x g'de 25 sn santrifüj edildikten sonra 800 µl besiyeri uzaklaştırılıp kalan süpernatant içerisinde pellet çözülüp 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere ekildi ve 37 °C 'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında en iyi gelişen üç koloni seçildi ve koloniler 50 µg/ml ampisilin içeren sıvı besiyerine ekildikten sonra 37 °C 'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, ticari olarak temin edilen 'Genejet Plasmid Miniprep Kit' (Thermo Fisher Scientific, K0502, ABD) kullanılarak plasmid izolasyonu daha önce bölüm 3.2.4.3'de belirtildiği şekilde yapıldı. Plazmidler daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20 °C) saklandı. Ayrıca hücrelerden 1:1 oranında gliserol stok yapılarak derin dondurucuda (-80 °C) saklandı.

3.2.5 FDH gen ifadesinin IPTG ile indüklenmesi

Daha önce hazırlanan gliserol stok kullanılarak 50 µg/ml ampisilinli 20 mL LB sıvı besiyerinde hazırlanan ön kültür, 37 °C 'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde 16 saat inkübe edilerek hazırlandı. Daha sonra bu ön kültür 500 ml LB sıvı besiyeri içeren 1 litrelik erlene inoküle edildi ve 37 C°'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu 0.5'e ulaşınca kadar inkübe edildi. Yaklaşık 4 saatlik inkübasyon sonrası indüklenmemiş örnek 0. saat olarak kabul edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 1'er ml olacak şekilde 3 farklı ependorfa numune alındı. Alınan numuneler 14000 x rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pelet kısımları -20 °C'de saklandı. Diğer kalan hücrelerin gen

ekspresyonunun indüksiyonu için 1 mM IPTG ortama eklendi ve 37 °C’de 200 rpm orbital çalkalayıcı üzerinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 1., 2., 3., 4., 5., 6., 12. ve 24. saatlerde ependorflara 1 ml örnek alınıp 14000 x rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pelet kısımları -20 °C’ye saklandı. Bu süreçte alınan örnekler kaba özüt olarak kabul edildi. Örneklerle SDS-PAGE yapılarak hangi saat aralığının protein ekspresyonu için optimum olduğuna karar verildi.

3.2.6 Protein saflaştırma işlemleri

Optimum ekspresyon süresinin 4 saat olduğuna karar verildikten sonra, daha önceden gliserol stok yaptığımız *E.coli* BL21 hücrelerinden 50 µg/ml ampicilin içeren 20 ml LB sıvı besiyerine ön kültür hazırlanarak 37 °C’de 200 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde 16 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, 50 µg/ml ampicilin içeren 500 ml LB sıvı besiyerine, ön kültür inoküle edildi ve 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu 0.5 olana kadar 37 °C’de 200 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. OD=0.5 olduğunda ortama 1 mM IPTG eklendi ve 4 saat 37 °C’de 200 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde 1 litrelik erlende bulunan hücreler, 50 ml’lik steril falkonlara alınarak +4 °C’de 4000 x rpm’de 20 dk santrifüj edildi ve üst süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işleme erlendeki besiyeri bitene kadar devam edildi. Santrifüj işlemleri sonunda elde edilen pelet, pH 7.4 20 mM sodyum fosfat tamponu ile pipetaj yapılarak iyice homojenize edildi. FDH enzimi intraselüler bir enzim olduğundan, hücrelerdeki proteinin dışarı çıkarılabilmesi için homojenat lizozim ve sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun için pelet ağırlığı ile orantılı olacak şekilde (1g/1ml) kullanılan sodyum fosfat tamponu miktarına göre lizozim tartıldı. 1 mililitreye 1 mg olacak şekilde tartılan lizozim, homojenatın içerisine eklendi ve +4 °C’de orbital çalkalayıcı üzerinde 30 dk-1saat aralığında inkübasyona bırakıldı. Homojenata, buz içerisinde 10 saniye aralıklarla 10 sn x 10 kez olacak şekilde sonikasyon (Qsonica, ABD) yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra homojenat 10000 x rpm’de 1 saat +4 °C’de santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant kolondan geçirilmeden önce 0,45µm’lik filtreden geçirildikten sonra temiz bir falkon tüpe alındı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Üretilen rekombinant protein N-terminal kısmında His-Tag bölümüne sahip olduğundan, histidine afinite gösteren ticari olarak temin edilmiş 1 ml Ni-NTA agaroz kolon (Thermo scientific, Pierce HisPure Ni-NTA Spin Columns, ABD) ile saflaştırıldı.

Proteinin kolondan geçirilmesi işlemi sırasında ilk olarak 10 ml deiyonize H₂O His-trap kolondan saniyede 1 damla olacak şekilde geçirildi. Ardından kolonun dengeye gelmesi için 5 ml Tampon A geçirildi. Yeni bir falkona aldığımız protein lizatını toplamda 2 defa His-trap kolondan saniyede 1 damla olacak şekilde geçirildikten sonra 5 ml Tampon A kolondan geçirilerek toplandı. Önceden hazırladığımız 100 mM, 200mM ve 400 mM'lık imidazollü Tampon A solüsyonlarımızı sırasıyla kolondan geçirip, çıktılarını 100 mM için 1ml'lik 3 ependorf tüpe, 200 mM için 1 ml'lik 5 ependorf tüpe ve 400 mM için 1ml'lik 3 ependorf tüpe topladık. Yine daha önce hazırladığımız Tampon B solüsyonunu kolondan ilk 5 ml'sini 1 ml'lik 5 ayrı ependorfa toplayacak şekilde ve son 5 ml'sini tek bir falkonda toplayacak şekilde geçirdik. Kolon ile işimiz bittikten sonra kolondan 10 ml deiyonize H₂O geçirdikten sonra 10 ml %20 lik etanol geçirip + 4 °C' de sakladık. Elimizde toplamda ilk geçirilen protein örneği, Tampon A, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve Tampon B örnekleri olmak üzere 19 protein örneğimiz oldu. Örnekleri aralıklı olarak SDS-PAGE jele yükledikten sonra hangi numunelerimizde doğru protein ekspresyonunun olduğuna karar verildi.

3.2.7 SDS-PAGE analizi

Saflaştırma işlemi sonrasında FDH proteininin ekspresyonunu görmek için SDS-PAGE deneyi yapıldı. Örnekler jele yüklenmeden önce proteinler denatürasyon işlemine tabi tutuldu. Önceden hazırlanmış yükleme boyası ve örnekler 1:1 oranında ependorflar içerisinde karıştırıldıktan sonra, önceden 97 °C'ye getirilmiş ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve 10 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası ependorf tüpler 10 dk buzda inkübe edildi ve ardından 3000 x rpm 'de 5 sn sanrifüj yapıldı.

SDS-PAGE jeli için ; %12'lik ayırma (separating) jeli ve %8'lik yığma (stacking) jeli Tablo 3.6'da verilen ölçülere göre hazırlandı. Hazırlanan jele 3 µl protein belirteç ve 20'şer µl daha önceden elde edilen protein örnekleri yüklendi. Jel için camlar iyice temizlendikten sonra yeşil kenarlı aparata camlar yerleştirildi. %12'lik hazırlanan ayırma jeli, jel aparatındaki yeşil çizgiye kadar döküldü. Üzerine tüm yüzeye kadar izopropanol konulduktan sonra donmaya bırakıldı. Alt jel donduktan sonra % 8'lik hazırlanan yığma jel, izopropanol ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra diğer jelin üzerine döküldü. Burada geriye kalan fazla izopropanol kalıntıları, bir kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldı. Üst jeli döktükten sonra taraklar yerleştirilerek donmaya

bırakıldı. SDS-PAGE analizi için, önceden 0.,1.,2.,3.,4.,5.,6.,12. ve 24. saatlerde aldığımız IPTG ile indüklediğimiz hücre örnekleri ve saflaştırma için Ni-NTA agaroz kolondan geçirdiğimiz protein örnekleri (ilk geçirilen protein örneği, Tampon A, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve Tampon B örnekleri) aralıklı olarak jellere yüklendikten sonra 120 mA, 100 V’de 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Örneklerin elektroforez işlemi bittikten sonra jeller, kasetlerden çıkarılarak temiz kaplara aktarıldı. Önceden hazırlanmış Coomassie Brilliant Blue boyası (CBB) üzerlerini örtecek kadar konulduktan sonra, 100 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde 15 dk oda ısısında bekletildi. Jellerin üzerindeki boya uzaklaştırıldıktan sonra iyice boyadan arınması maksadıyla jeller 16 saat boya giderici solusyonda (destaining) 100 x rpm’de orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi.

Tablo 3.16: SDS-PAGE için jellerin bileşenleri.

İçerik	% 12 Ayırma Jeli	% 8 Yığma Jeli
% 30 Akrilamid	4 ml	1.7 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-
0,5 M Tris (pH 6.8)	-	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl	100 µl
% 10 APS	50 µl	50 µl
TEMED	5-6 µl	5-6 µl
dH ₂ O	3.4 ml	5.7 ml

3.2.8 Ultrafiltrasyon işlemi

SDS-PAGE görüntüsü ile protein ekspresyonlarının doğru ve saf olduğu belirlenen örneklerin hepsi yeni bir falkon tüp içerisinde karıştırılarak üzeri 50 ml’ye kadar sodyum fosfat tamponu ile tamamlandı. Daha sonra bu protein karışım 30000 MW ‘lik ultrafiltrasyon tüpünde (Amicon Ultra-15 santrifugaton tube Millipore, ABD) 3000 x rpm’de 10 dk olacak şekilde +4 °C’de santrifüj edildi. Buradaki amaç saflaştırma esnasında kullanılan imidazolü yapıdan uzaklaştırmaktır. Santrifüj işlemine, 50 ml’lik protein karışımı 2.5 ml olana kadar devam edildi. Bu şekilde hem imidazol yapıdan uzaklaştırıldı hem de proteinin konsantrasyonu arttırıldı.

3.2.9 PD-10 kolon uygulaması

Ultrafiltrasyon tüplerinden geçirilip son hacmi 2.5 ml olan yabanıl tip CboFDH'deki saflaştırma basamaklarından sonra geriye kalan imidazol ve tuzları iyice uzaklaştırmak için protein çözeltisi PD-10 (GE Healthcare, ABD) kolondan geçirildi. Bunun için PD-10 kolonun üst kısmında bulunan etanol, kolonun ağız kısmı açılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra kolondan sırasıyla 4 defa dH₂O ve 4 defa sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) geçirildi. Ardından 2.5 ml protein, kolondan 2 defa geçirildi. Son olarak protein çözelti 3.5 ml tampon çözelti (sodyum fosfat pH 7.4) ile toplandı. Bu işlemden sonra elimizdeki protein çözeltinin konsantrasyonunu arttırmak için örnek daha önce 3.2.8'de belirtildiği şekilde tekrar ultrafiltrasyon tüpünde santrifüj edildi.

3.2.10 Protein miktar tayini

Örneklerdeki protein miktarları, Bradford yöntemi ve 1 mg/ml Bovine serum albüminin (BSA) farklı konsantrasyonlarda standart olarak kullanılmasıyla ölçüldü. Bu ölçüm için öncelikle spektrofotometre cihazı Bradford boyası ile sıfırlandıktan sonra 1 ml'lik plastik tek kullanımlık küvetlere 20 µl örnek üzerine 980 µl Bradford ayırıcı pipetlenip vorteks ile karıştırıldı. Bu işlemin ardından 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakılan örnekler 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV 1800, Japonya) ölçüldü.

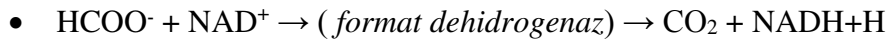
3.2.11 Western Blot analizi

Rekombinant üretilen FDH proteininin varlığı ayrıca Western Blot (western blot system, Biorad, ABD) analizi ile doğrulandı. Bunun için protein belirteç (3 µl) ve protein örneğinin (40 µg/ml) bölüm 3.2.7'de belirtildiği şekilde yüklendiği jel, 120 mA, 100 V'de 1.5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jeldeki proteinler nitroselülez membrana transfer edildi. Bu işlem için PVDF membran sırasıyla 30 sn metanol, 3 dk dsu ve 5 dk transfer solusyonunda bekletildi. Daha sonra sırasıyla üstüste olacak şekilde transfer sünger, membran, jel ve transfer sünger konularak transfer cihazına (Transblot system, Biorad, ABD) yerleştirildi. 10 dk 90 mV'da transfer işlemi yapıldıktan sonra jeldeki proteinlerin transfer membranına geçip geçmediği kontrol edildi. Membran daha sonra TBST içerisinde %5 'lik hazırlanmış bloklama solusyonu ile 1 saat 100 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran TBST ile 5 dk boyunda 3 defa yıkandı. Membran,

1/1000 oranında %2.5 'luk süt tozu içerisinde hazırlanan 'Anti-Histag primer antikor' (Abcam, ABD) ile +4 °C'de 100 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran TBST ile 5 dk 5 defa oda ısısında yıkandı. Membran, 1/2000 oranında %2.5 'luk süt tozu içerisinde hazırlanan 'Seconder antikor' (Abcam, ABD) ile oda ısısında 100 x rpm de orbital çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran TBST ile 5 dk boyunca 5 defa yıkandı. Tüm bu işlemlerin sonunda membrandaki bantlar ticari olarak temin edilen 'Western Blotting Luminaol Reagent'(Santa cruz, ABD) görüntüleme kiti ile analiz edildi. Bunun için kitin içerisinde bulunan solusyon A ve solusyon B 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, ışık görmeyecek şekilde membran yüzeyi bu solusyon ile muamele edildi. Bantlar, görüntüleme cihazında (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi ve değerlendirildi.

3.2.12 Yabanıl tip CboFDH enziminin aktivite çalışmaları

Format dehidrojenaz enziminin çalışması, spesifik olarak format üzerinde dehidrojenaz aktivitesi göstermesi ve koenzim olarak NAD molekülünü kullanması prensibine dayanmaktadır. FDH ile yapılan çalışmalarda asetat, malat ve pirüvat gibi maddeler substrat olarak denenmiş ve sadece formatın, dehidrojenaz aktiviteyi desteklediği, enzimin substrat olarak formata mutlak spesifisitesi olduğu görülmüştür. Enzim aynı zamanda koenzim olarak NAD⁺'a bağımlı faaliyet göstermektedir (Schütee vd., 1975). NAD⁺-bağımlı FDH, formatın karbondioksit dönüşmesini NAD'ın NADH'a redüksiyonu ile eşlenik olarak katalizler. NADH+H spektrofotometrik ölçümlerde 340 nm'de absorbanans piki veren bir moleküldür.



Üretilen yabanıl tip CboFDH enzimi için değişen pH, substrat, kofaktör ve sıcaklıklarda aktivite ölçümleri alınarak yabanıl tip CboFDH için optimum koşullara karar verilmiş ve kinetik hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.12.1 Farklı pH ve sıcaklığın aktiviteye etkisi

Enzimler pH değişikliklerden etkilenmekle birlikte enzimin en aktif olduğu noktadaki en uygun pH değeri optimum pH olarak bilinir. pH, enzimlerin stabilitesinde ve aktivitesinde önemli bir faktördür. Aşırı yüksek veya düşük pH değerleri genellikle çoğu enzim için tam aktivite kaybına yol açabilir. Enzimlerin aktivite ve stabilitesini

etkileyen bir diğerk önemli faktör ise sıcaklıktır. Yine çalışılan enzim için optimum olmayan sıcaklıklarda enzimin protein yapısında bozulmalar meydana geleceğinden aktivite ve stabilite kayıpları gözlenebilir. Bu yüzden enzimatik bir reaksiyonun doğru ve tekrarlanabilir olması için, bu fiziksel ve kimyasal parametrelerin her biri göz önünde bulundurulmalı ve optimize edilmelidir. Yabanıl tip CboFDH aktivitesi için optimum pH şartlarını belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (pH 5-12) hazırlanan tamponlar kullanıldı. Reaksiyon, 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml yabanıl tip CboFDH varlığında gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri, 25 °C sıcaklıkta ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı.

Yabanıl tip CboFDH aktivitesi için optimum sıcaklık şartlarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (20°C -70°C) aktivite ölçümleri 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon, 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml yabanıl tip CboFDH varlığında gerçekleştirildi.

3.2.12.2 Enzim kinetiğı hesaplamaları

Bir enzimin aktivitesi, substratın tüketimini veya ürünün üretimini gözlemleyerek ölçülebilir. Ürün artışının izlenmesi, ürün artışıındaki küçük değışikliklerin, substrat azalmasına göre daha kolay tespit edilebildiğinden daha doğru sonuçlar verir. Enzim kinetiğı sayesinde bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı belirlenebilir. Bunu belirlemek için enzim katalizli reaksiyonların hızları farklı substrat konsantrasyonlarında ölçülür. Enzim kinetiğindeki önemli kavramlar: K_M , Turnover sayısı (K_{cat}), K_{cat}/K_M oranı, enzim aktivite ünitesi ve enzim inhibisyonu şeklindedir.

K_M : Bir enzimin substrata olan afinitesi hakkında bilgi verir. Enzime ait K_M değeri düşük ise substrat olan afinite yüksektir. Çünkü düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşmış yani doymuştur. Metabolizmada düşük K_M 'e sahip enzimler büyük önem taşır (10^{-6} - 10^{-8}).

K_{cat} : Bir saniyede bir enzim molekülünün substrattan oluşturduğu ürün sayısıdır. Enzim substrata bağlandıktan sonraki dönemdeki enzim aktivitesi gösterir.

K_{cat}/K_M oranı: Enzim molekülünün total aktivitesini gösterir. Enzimin substrata bağlanmadan önceki dönemi de içerir.

Enzim aktivitesi: Birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat mol sayısına eşittir.

Reaksiyon hızı ile reaksiyon hacminin çarpımına eşittir. Bir birim enzim birimi = (Unite) = $1 \mu\text{mol min}^{-1}$. 1 U şeklinde ifade edilir.

Spesifik Aktivite: Bir enzimin, 1 miligram toplam proteindeki aktivitesi olup $\mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak ifade edilir. Toplam proteinin miligramı başına, belli bir süre zarfında ve belli şartlarda bir enzim tarafından meydana getirilen ürün miktarıdır. Enzim aktivitesinin toplam protein kütlesine bölümüne eşittir.

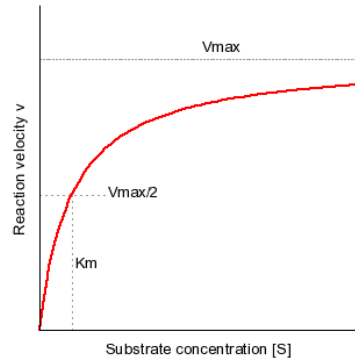
Enzim inhibisyonu: Enzimlerin katalitik etkilerinin bazı kimyasal bileşiklerle azaltılması ya da durdurulmasıdır. Yarışmalı, yarışmasız ve bağımlı inhibisyon şeklinde türleri vardır.

Enzim kinetiğini açıklamak için en yaygın kullanılan modellerden biri Michaelis-Menten modelidir. Bu model, V_{max} , substrat konsantrasyonu ve K_M ile ilgili bir denkleme sahiptir ve bu denkleme göre, reaksiyonun hızı hesaplanabilir. Michaelis-Menten denklemi ($[S]$: substrat konsantrasyonu) aşağıdaki şekildedir:

$$V = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_M + [S]}$$

Bu denklemde, V_{max} reaksiyonun elde ettiği maksimum hızı gösterirken, K_M Michaelis sabitini ve reaksiyon hızı V_{max} 'ın yarısını elde ettiğinde substrat konsantrasyonunu temsil eder.

Reaksiyonun velocity (hız) -substrat konsantrasyonunun grafiği Şekil 3.4'de gösterildiği gibi çizilebilir.

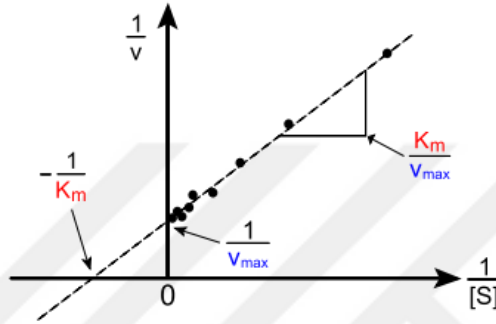


Şekil 3.3: Michaelis Menten Eğrisi.

Michaelis-Menten denklemi rasyonel bir denklem olduğu için parabolik bir grafik verir ve bu çizim ile çalışmak zordur. Bu nedenle Michaelis-Menten denkleminde elde edilen lineer bir denklem olan Lineweaver-Burk denklemi kullanılır.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

V_{max} ve $-1 / K_M$ değerleri, Lineweaver-Burk denklemi ile oluşturulan doğrusal grafikten elde edilebilir. Grafiğin y-kesişi $1 / V_{max}$ 'ı temsil ettiğinden, x-kesişi $-1/K_M$ 'e eşittir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Lineweaver-Burk Eğrisi.

Spektrofotometrik ölçümler kullanarak, bir çözeltinin konsantrasyonu Beer-Lambert Yasasına göre " $A = \epsilon dc$ " formülü ile hesaplanabilir. " A " absorbansı gösterir ve birim içermez. " ϵ " birimi $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ olan molar emiciliği temsil eder. Her bileşik için spesifik ve sabittir. NADH'nin molar emiciliği $6.22 \times 10^3 M^{-1}.cm^{-1}$ 'dir. " d ", numuneyi içeren küvetin yol uzunluğu olan numunenin yol uzunluğudur ve santimetre cinsinden ifade edilir. " c " numunenin konsantrasyonu anlamına gelir; birimi $mol.L^{-1}$ olarak ifade edilir. NAD^+ -Bağımlı FDH aktivitesi ölçülürken, NAD 'ın $NADH$ 'a redüksiyonu izlenir. $NADH$ oranı, $NADH$ 'nin 340 nm'de bir absorbans piki vermesinden dolayı kolaylıkla belirlenebilir.

Çalışmada, kinetik ölçümler için numuneler hazırlanırken, reaksiyonun substratı olan format son bileşen olarak ortama eklendi. Absorbanslar 10 dk boyunca 10 sn aralıklarla olacak şekilde 340 nm'de ölçüldü. Daha sonra, $\Delta Absorbans / dakikanın$ mutlak değerleri kullanılarak her bir çözüm için değerler;

V_0 , hız (U/L): $(\Delta A / dk \times T.V.(ml) \times 10^6) / (\epsilon \times d \times N.V(ml))$ denklemleri Beer Kanunu ile hesaplandı. Buradaki ' ϵ ' molar absorptivite anlamına gelir. Deneylerde, enzim aktivitesini belirlemek için oluşan $NADH$ miktarı baz alındı, hesaplamalarda $NADH$ 'nin molar absorptivitesi $6.22 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ olarak kullanıldı. ' d ' ışık yolunun

uzunluğunu temsil eder ve 1 cm'dir. 'T.V.' çözeltinin toplam hacmine göre 'N.V.' ise reaksiyon esnasında kullanılan enzimin hacmi dikkate alınarak formüle uygulandı.

Michaelis -Menten grafiğinde,

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

formülü kullanılarak maksimum hız ($V_{\max}$) hakkında bir tahmin yapmak mümkündür. Ancak bu grafik, lineer bir çizgi yaratmadığından $V_{\max}$ ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiği kullanıldı. Bu yüzden $V_{\max}$ ve K_M değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Buna göre y eksenini $1 / V_{\max}$ 'ı temsil ederken x eksenini $-1 / K_M$ 'i temsil eder. $V_{\max}$ ve K_M değerleri her değişken için hesaplandıktan sonra enzimin K_{cat} değeri, $V_{\max} / [E]$ formülü ile hesaplandı. Daha sonra bulunan bu değerler kullanılarak enzimin K_{cat}/K_M oranı ve spesifik aktivite (enzim aktivitesi/toplam protein miktarı) değerleri hesaplandı.

Yapılan çalışmalar sonucu optimum pH ve sıcaklık yabancı tip CboFDH için pH 7.4 ve 40 °C olarak belirlendi. Bu nedenle kinetik ölçümler esnasında sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) kullanıldı. K_M , $V_{\max}$ ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi için ilk olarak farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite tayinleri alınarak daha sonra Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ancak hesaplamalar Lineweaver-Burk eğrisinden elde edilen formül yardımıyla yapıldı. Kinetik hesaplamalar için kullanılan reaksiyon ortamları Tablo 3.17, Tablo 3.18 ve Tablo 3.19'da verilmiştir.

Tablo 3.17: Değişen substrat konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.

Seçilmiş Sodyum Format Konsantrasyonları (mM)	NAD ⁺	Enzim	pH	Sıcaklık °C
0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	4 mM	0.5 mg/ml	7.4	25

Tablo 3.18: Değişen koenzim konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.

Seçilmiş NAD ⁺ Konsantrasyonları (mM)	Format	Enzim	pH	Sıcaklık °C
1, 2, 3, 4, 5, 6	2 mM	0.5 mg/ml	7.4	25

Tablo 3.19: Değişen enzim konsantrasyonlarının reaksiyon ortamları.

Seçilmiş Enzim Konsantrasyonları (mg/ml)	Format	NAD ⁺	pH	Sıcaklık °C
0.0306, 0.0612, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75	2 mM	1.5 mM	7.4	25

3.2.12.3 Farklı metal iyonlarının aktiviyete etkisi

Metal iyonları birçok enzimin biyolojik işlevinde önemli rol oynar. Metal-protein etkileşimleri içerisinde metal-ligand ve enzim-köprü kompleksleri sayılabilir. Metaller elektron vericileri veya alıcıları, Lewis asitleri veya yapısal düzenleyiciler olarak görev yapabilirler. Metaller, enzim proteinleri ve substratlar (ya da inhibitör) arasında meydana gelebilecek etkileşimlerin türleri tanımlanmıştır. Bu etkileşimlerden ilki, gerçek bir substrat kompleksi oluşturmaya yönelik substrat ve metal iyonu arasındaki etkileşimdir. Bu tip davranış tipik olarak metalle aktive olan enzimlerde gözlenir (Ör: Metal Bağımlı FDH'ler). İkinci bir etkileşim şeklinde ise, metal ilk önce enzim proteinine bağlanır ve daha sonra substrat ile bir etkileşim alanı oluşturur. Bu durumda metal ya enzimin katalitik kısmının bir bileşeni olarak ya da bağlanma bölgesi olarak işlev görebilir. Üçüncü bir etkileşim metal iyonunun enzimin aktif bölgesinin dışında bir yere bağlanma durumudur. Bu gibi durumlarda, metal ya protein yapısını muhafaza ederek ya da proteinin aktif uyumlarını stabilize ederek aktiviteyi dolaylı yoldan düzenleyebilir.

Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine olan etkilerini incelemek için 11 farklı metal iyonunun 5 farklı konsantrasyonu reaksiyon ortamında denendi. Reaksiyonda farklı konsantrasyonda hazırlanan metal iyonları, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından

reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon ortamındaki metal iyonları ve konsantrasyonları Tablo 3.20’de verilmiştir.

Tablo 3.20: Değişen konsantrasyonlardaki farklı metallerin reaksiyon ortamları.

Metaller	Seçilmiş Konsantrasyonlar (µM)	Enzim	NAD ⁺	Format	pH	Sıcaklık °C	Dalga Boyu (nm)
ZnCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
MgCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
CuCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
LiCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
W	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
FeCl ₃	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
CaCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
Mn	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
KCl ₂	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
NaCl	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340
Mo	1, 3, 5, 7, 10	0.25 mg/ml	1.5 mM	2 mM	7.4	25	340

3.2.12.4 Farklı organik çözücülerin aktiviteye etkisi

Organik çözücülerin enzimolojiye dahil edilmesi, geniş bir reaksiyon ortamı varyasyonu elde etmeyi mümkün kılmıştır. Reaksiyon ortamının seçimi hem substratı hem de enzimi etkilediğinden, enzim katalizli reaksiyonların ürünleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Çözücüler, enzim konformasyon değişikliklerini indüklemek, enzim dinamiklerini etkilemek, enzim inhibitörü olarak görev yapmak ve substrat özelliklerini değiştirmek şeklinde etki gösterebilirler.

Farklı konsantrasyonda hazırlanan organik çözücülerdeki enzim aktivitesi ölçümleri 25 °C’de 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyonda farklı konsantrasyonda hazırlanan organik çözücüler, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından reaksiyon başlatıldı. Enzim reaksiyon ortamları Tablo 3.21’de verilmiştir.

Tablo 3.21: Değişen konsantrasyonlardaki farklı organik çözücülerin reaksiyon ortamları.

Organik Çözücüler	Seçilmiş Konsantrasyonlar (%)	Format	NAD ⁺	Enzim	Tampon (Sodyum fosfat)
Etanol	5, 10, 25, 50	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4
Metanol	5, 10, 25, 50	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4
Kloroform	5, 10, 25, 50	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4
Aseton	5, 10, 25, 50	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4
Propanol	5, 10, 25, 50	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4
Sodyum Fosfat (pH 7.4)	100	2 mM	1.5 mM	0.25 mg/ml	pH 7.4

3.2.13 Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi

Proteinlerin yapısal analizinde floresan ve CD spektroskopisi tamamlayıcı tekniklerdir. Floresan spektroskopisi, proteinin aromatik kalıntıları hakkında bilgi sağlarken CD spektroskopisi, protein omurgası boyunca meydana gelen konformasyonel değişiklikleri açıklayabilir. Ek olarak, bir proteinin değişken bir sıcaklık taraması boyunca termodinamik özellikleri ve proteinin termal stabilitesi hakkında önemli bilgiler sağlar. CD spektrometrede yer alan sıcaklık / dalga boyu tarama programları ile sıcaklığa bağlı CD spektrumları kolaylıkla elde edilebilir. Biyolojik numunelerde, denatürasyon sıcaklığı (T_m), entalpi değişimleri (ΔH) ve entropi değişimleri (ΔS) gibi sıcaklığa bağlı verileri hesaplamak için kullanılabilir. Programdan elde edilen veriler, verileri 3 boyutlu bir grafik gösterimi olarak gösterebilen Spektrum Analizi ve Aralık Analiz programları kullanılarak işlenir. İkincil yapı analizi ve proteinin termodinamik parametrelerinin hesaplanması ise, opsiyonel Termal Denatürasyon Analizi ve Protein İkincil Yapısı Tahmin (SSE) programları kullanılarak yapılabilir.

3.2.13.1 Proteinin ikincil yapısının belirlenmesi

Saflaştırma işlemlerinden sonra protein konsantrasyonu ölçülen yabancı tip CboFDH enziminin konsantrasyonu kendi tamponu kullanılarak (sodyum fosfat, pH 7.4) 0.25 mg/ml'ye dilüe edildi. Ardından ikincil yapının analizi için 25 °C'de 190-260 nm dalga boyları arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) absorbans ölçümleri alındı. Ölçümler esnasında bant genişliği (bandwidth) 1.00 nm, veri aralığı

0.2 nm, tarama hızı 50 nm/min, data aralığı 0.2 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD ve fotometrik mod da CD, HT, UV, Abs olarak alındı.

3.2.13.2 Termal stabilite tayini

Protein konsantrasyonunu 0.25 mg/ml'ye ayarladığımız enzimin termal denatürasyon eğrisinin 3D yapısını elde etmek için numunemiz, 190-250 nm arasındaki spektrumda 25 °C ile 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) tarandı. Tarama sırasındaki ölçüm parametleri, bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD, data ve veri aralığı 0.1 nm'ye, tarama hızı 50 nm/min ve fotometrik modlar CD, HT olarak ayarlandı. Ayrıca termal denatürasyon eğrisi için numunemiz yine 25 °C ile 95 °C arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) α -heliks yapısına spesifik 222 nm absorbansında ölçüldü. Ölçüm parametleri ise bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD olarak alınmıştır. Fotometrik modlar ise CD, HT ve UV olarak ayarlandı.

3.2.14 Yabani tip CboFDH'in biyoinformatik analizi ve mutasyonlar için bölgelerin seçimi

CboFDH'nin kristal yapıları (PDB: 5ND9), substrat ve NAD⁺ ile etkileşime giren amino asit rezidülerinin seçimini yönlendirmek için kullanılarak, aktivite ve termal stabiliteyi arttırmayı hedefleyen aminoasit değişikliklerine karar verildi. CboFDH enziminde katalitik önemi olan amino asit rezidüleri Pro97, Phe98, Ile122, Asn146, Ala198 (veya Gly198), Gly200, Gly203, Arg284, Gln313 ve His332 iken NAD bağlanma bölgesi rezidüleri ise Asn119 ve Ser313 şeklindedir. Bu nedenle çalışmamızda substrat afinitesi arttırmaya yönelik mutasyon yapılacak bölgeler seçilirken, özellikle enzimin aktif bölgesinde substrat ile etkileşim alanı içerisinde kalan aminoasit rezidülerine odaklanıldı. Bu doğrultuda 120. pozisyondaki valinin treonine, 285. pozisyondaki fenilalaninin treonine değişimine karar verildi. Bu değişimlerdeki temel mantık, 120. pozisyonunda bulunan nonpolar valini, polar olan treonine; 285. pozisyondaki yapıca büyük ve non-polar olan fenilalanini daha küçük yapıda ve polar olan treonine değiştirmek şeklinde oldu. Termal stabiliteyi arttırmaya yönelik bölgeler belirlenirken daha önce başka mikroorganizma kaynaklı FDH enzimlerine ait yayınlar araştırıldı ve kendi proteinimizin aktif bölgesine denk gelen bölgeler içerisinde 287.

ve 311. pozisyonlar seçildi. Bu pozisyonlar seçilirken aynı zamanda substrat ya da koenzim afinitesinin de etkilenebileceği düşünüldü.

Kombine mutasyona, termal stabilite ve aktiviteyi arttırmaya yönelik mutasyonların kinetik parametreleri hesaplandıktan sonra karar verildi. Yapılan deneyler ve hesaplamalar sonucunda substrat afinitesini daha fazla arttırdığını bulduğumuz 285. pozisyondaki aminoasit değişimi ile termal stabiliteyi daha fazla arttırdığını bulduğumuz 311. pozisyondaki aminoasit değişiminin aynı anda gerçekleştirilmesine karar verildi.

Böylece, Phe285Thr, Val120Thr, Gln287Glu ve His311Glu mutasyonlarına ve Phe285Thr/ His311Glu kombine mutasyonuna karar verildi. Primerler, bu mutasyonları oluşturmak için tasarlandı. Karşılaştırmalı yapı modellemesi Pymol ve SwissModel sunucularında yapıldı.

3.2.15 Primerlerin tasarımı

Forward ve revers primerler 120. pozisyondaki valini treonine, 285. pozisyondaki fenilalanini treonine, 287. pozisyondaki glutamini glutamata ve 311. pozisyondaki histidini glutamine dönüştürmek üzere NEBasechanger ve OligoEvaluator programları kullanılarak tasarlandı. Değiştirilecek aminoasitlerin tüm organizmalardaki üçlü kodlanma kodonları Tablo 3.22 ve gen bölgesi üzerindeki yerleri Şekil 3.6'da gösterilmiş olup; aminoasit değişimleri için tasarlanan primerler ise Tablo 3.23'de verilmiştir.

Tablo 3.22: Değiştirilecek aminoasitlerin tüm organizmalardaki üçlü kodlanma kodonları

Pozisyon	Aminoasit	SLC	DNA kodon
120	Treonin	T	ACT, ACC, ACA, ACG
285	Treonin	T	ACT, ACC, ACA, ACG
287	Glutamat	E	GAA, GAG
311	Glutamin	Q	CAA, CAG

inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, K0502, ABD) kullanılarak daha önce bölüm 3.2.4.3’de belirtilen şekilde plazmid izolasyonu yapıldı. Belirlenen 4 aminoasit değişimi için uygun Tm sıcaklığını bulmaya yönelik gradient PZR reaksiyonları yapıldı. Gradient PZR reaksiyonlarına ait miktar ve döngü koşulları Tablo 3.24 ve Tablo 3.25’de belirtilmiştir. Reaksiyonlar sonrasında; %1’lik agaroz jel hazırlanıp, jele sırasıyla 3 µl DNA belirteç ve 2 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 5 µl PZR ürünleri yüklenmiş ve sonra 120 mA, 110 V’de 1 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel, görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülenmiştir.

Tablo 3.24: Gradient PZR reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master Mix	12.5 µl
FDH-Forward primer	1.25 µl (10 µM)
FDH-Revers primer	1.25 µl (10 µM)
DNA	1 µl (25ng/ml)
dH ₂ O	9 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.25: Gradient PZR reaksiyonu döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94 °C	30 sn	
Denatürasyon	94 °C	10 sn	
Bağlanma	54-64 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	2 dk	

Tm sıcaklıklarına gradient PZR sonuçları ile karar verildikten sonra 120. pozisyonndaki valini treonine, 285. pozisyonndaki fenilalanini treonine, 287. pozisyonndaki glutamini glutamata, 311. pozisyonndaki histidini glutamine ve kombine mutasyon olarak düşünülen Phe285Thr /His311Gln dönüşümlerini gerçekleştirmek için ticari olarak temin edilen Q5 Site-Directed Mutagenesis kiti (New England Biolabs Inc, UK) ile PZR reaksiyonları yapıldı. Phe285Thr /His311Gln kombine mutasyonu, ilk 4

mutasyon değişimleri gözlemlendikten ve aktivite tayinleri alındıktan sonra en iyi enzim aktivitesi ve termal stabiliteyi gösteren iki mutasyon kombine mutasyon için seçildi. Buna göre 285. pozisyonundaki fenilalaninin treonine dönüşümü en iyi substrat afinitesi gösterdiğinden ve 311. pozisyonundaki histidinin glutamine dönüşümü en iyi termal stabiliteyi gösterdiğinden, bu iki bölge mutasyonu tek bir mutasyon olarak tasalandı. Bunun için F285TFDH'e ait plazmid üzerinde 311. pozisyonunda histidinin glutamine değişimi gerçekleştirildi. PZR reaksiyonlarına ait miktar ve döngü koşulları Tablo 3.26, Tablo 3.27, Tablo 3.28, Tablo 3.29, Tablo 3.30 ve Tablo 3.31'de verilmiştir.

Tablo 3.26: Mutasyonlar için PZR reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Q5 Hot start Hight Fidelity Master Mix	12.5 µl
FDH-Forward primer	1.25 µl (0,5 µM)
FDH-Revers primer	1.25 µl (0,5 µM)
Plazmid	1 µl (25ng/ml)
Nükleazdan yoksun H ₂ O	9 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.27: Val120Thr değişimi için PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 °C	30 sn	
Denatürasyon	98 °C	10 sn	
Bağlanma	62 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	2 dk	

Tablo 3.28: Phe285Thr değişimi için PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 °C	30 sn	
Denatürasyon	98 °C	10 sn	
Bağlanma	57 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	2 dk	
Son Uzama	72 °C	2 dk	

Tablo 3.29: Gln287Glu değişimi için PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 C	30 sn	
Denatürasyon	98 C	10 sn	
Bağlanma	64 C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 C	2 dk	
Son Uzama	72 C	2 dk	

Tablo 3.30: His311Gln değişimi için PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 C	30 sn	
Denatürasyon	98 C	10 sn	
Bağlanma	58 C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 C	2 dk	
Son Uzama	72 C	2 dk	

Tablo 3.31: Phe285Thr /His311Gln değişimi için PZR döngü koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98 C	30 sn	
Denatürasyon	98 C	10 sn	
Bağlanma	58 C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 C	2 dk	
Son Uzama	72 C	2 dk	

3.2.17 Mutant genlerin KLD reaksiyonu ve transformasyon

KLD reaksiyonu, kinaz, ligaz ve DpnI enzimlerini içeren bir tampon ile gerçekleştirilir. Bu enzim karışımı, PZR reaksiyonu sonrası ortamda karışık halde bulunan mutant ve yabanıl şablonların içerisinden, yabanıl tipleri uzaklaştırarak sadece mutant şablonun kalmasına olanak sağlar. DpnI, tanıma dizisi GATC'yi sadece A metillendiğinde keser ve *E. coli* suşları bu bölgeyi metiller. PZR rnleri DpnI ile kesildiğinde, tüm GATC elemanlarındaki parenteral türler yok edilir. Bu yöntem mutasyona uğramamış şablondan kurtulmak istediğiniz bölgeye yönelik mutageniz

işlemlerinde kullanılır. KLD reaksiyonu ticari olarak temin edilen Q5 Site-Directed Mutagenesis kiti (New England Biolabs Inc, UK) kullanılarak yapıldı. KLD reaksiyonuna ait miktarlar Tablo 3.32’de verilmiştir.

Tablo 3.32: KLD reaksiyonuna ait bileşenler.

Bileşen	Miktar
PZR ürünü	1 µl
KLD reaksiyon tamponu	5 µl
KLD enzim karışımı	1 µl
Nükleazdan yoksun H ₂ O	3 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan KLD reaksiyon karışımı 5 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra transformasyon işlemi yapıldı. Bunun için karışımdan 5 µl alınıp, -80 °C ’de saklanmış ve 15 dakika buz üzerinde erimeye bırakılan 50 µl *E. coli* BL12 (D3) hücrelerinin üzerine yavaşça bırakıldı. Karışım, 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından karışım, 42 °C’ye önceden ayarlanmış su banyosunda 30 sn bekletildikten hemen sonra 5 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitiminde karışım üzerine 950 µl S.O.C besiyeri eklendi. Örnekler 200 rpm çalkalayıcı üzerinde 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 10000 x g’de 25 sn santrifüj edildikten sonra 800 µl besiyeri uzaklaştırılıp kalan süpernatant içerisinde pellet çözülüp 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere yayıldı. 16 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılan petrilere koloni formlarının oluşumu gözlemlendi.

3.2.18 Mutasyonların dizi analizi

Bir önceki gün ekim yapılan petrilere oluşan mutant koloniler, 50 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB broth besiyerine 37 °C’de 200 rpm orbital çalkalayıcı üzerinde 16 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen ön kültür ile ticari olarak temin edilen Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, K0502, ABD) kullanılarak daha önce bölüm 3.2.5.3’de belirtildiği şekilde plazmid izolasyonu yapıldı. Phe285Thr, Val120Thr, Gln287Glu , His311Glu ve Phe285Thr/ His311Glu pozisyonlarına ait plazmidlerde mutasyonların doğruluğunu teyit etmek için plazmidler sekans analizine gönderildi. Dizi analizinde plazmidlere özgü T7 promotor primerleri iki yönlü olacak

şekilde kullanıldı. Yöntem olarak Sanger Coulson'un zincir sonlama yöntemi, ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı kullanarak Sentromer DNA Teknolojileri, İstanbul firması tarafından gerçekleştirildi.

Elde edilen sekans sonuçları Bioedit ve Snapgene programları kullanılarak daha önce elde ettiğimiz yabancı tip CboFDH sekansları ile aligment yapılarak karşılaştırıldı. 120., 285., 287. 311. ve hem 285. hemde 311. pozisyonlarda istenilen aminoasit değişikliklerinin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

3.2.19 Mutant genlerin *E.coli* BL21 (D3) hücrelerinde protein ifadesi

Laktoz, bazı prokaryotlar ve ökaryotlar tarafından metabolize edilen doğal olarak oluşan bir şekerdir. IPTG, bir substrat olarak kullanılabilen ancak metabolize edilemeyen, sentetik ve yapısal bir allolaktoz analogudur. IPTG'nin olumlu bir yanı, organizma tarafından metabolize edilememesi nedeniyle konsantrasyonunun, tüm deney süresince sabit kalmasıdır. IPTG'nin 100 μ M-1.5 mM aralığındaki konsantrasyonları lac operonunun indüksiyonunda kullanılır. İndüksiyon için kullanılan laktoz veya IPTG miktarı, IPTG'nin ve laktozun lac represörüne bağlanma ve ayrışma sabitine bağlıdır ve bu ikisinin de kesin olarak farklı bağlanma sabitleri vardır. Laktozun olumlu yönü ise IPTG'ye göre maliyetinin düşük olmasıdır. IPTG indüksiyonu fazla maliyetli olduğundan eğer sentez büyük ölçeklerde gerçekleştirilecekse laktoz ile indüksiyon yöntemi kullanılır. Laktoz indüksiyonu için hazırlanan Studier oto-indüksiyon media içeriği Tablo 3.33'de verilmiştir. Studier oto-indüksiyon media hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlandı.

Tablo 3.33: Studier oto-indüksiyon media bileşenleri.

İçerik	Miktar
Maya ekstrat özütü	5 g
Pepton from casein	20 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	5 g
% 10 glukoz	5 ml
% 8 laktoz	25 ml
% 60 gliserol	10 ml
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanır

Ön kültür hazırlamak için önceden hazırladığımız gliserol stoklardan 20 ml 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerin ekim yapılarak 37 °C’de 200 x rpm’de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edilen hücreler, hazırlanan 50 µg/ml ampisilin içeren 500 ml Studier oto-indüksiyon media içerisine inoküle edildi. İnokülasyon sonrası hücreler 30 °C’de 200 x rpm’de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildi. Ertesi gün hücrelerin saflaştırma işlemlerine geçildi.

3.2.20 Mutant proteinlerin saflaştırma işlemleri

Studier oto-indüksiyon media ile inkübasyon bitiminde 1 litrelik erlenlerde bulunan hücreler, 50 ml’lik steril falkonlara alınarak +4 °C’de 4000 x rpm’ de 20 dk santrifüj edildi ve üst süpernatantlar uzaklaştırıldı. Bu işleme erlenlerdeki besiyerleri bitene kadar devam edildi. Elde edilen peletler, pH 7.4, 20 mM sodyum fosfat tamponu ile pipetaj yapılarak iyice homojenize edildi. FDH enzimi intraselüler bir enzim olduğundan ve hücrelerdeki proteinin dışarı çıkarılabilmesi için homojenat, lizozim ve sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun için peletlerin ağırlıkları ile orantılı olacak şekilde (g/ml) kullanılan sodyum fosfat tamponu miktarına göre lizozim (µg/ml) tartıldı. Tartılan lizozimler daha sonra homojenatların içerisine eklendi ve +4 °C’de orbital çalkalayıcı üzerinde 30 dk-1saat aralığında inkübasyona bırakıldı. Homojenatlara, buz içerisinde 10 saniye aralıklarla 10 sn x 10 kez olacak şekilde sonikasyon (Qsonica, ABD) yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra homojenat 10000 x rpm’de 1 saat +4 °C’de santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatantlar kolondan geçirilmeden önce 0,45µm’lik filtrelerden geçirildikten sonra temiz falkon tüplere alındı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Üretilen her mutant proteinin N-terminal kısmında His-Tag bölümü olduğundan, histidine afinite gösteren ticari olarak temin edilen 1 ml Ni-NTA agaroza kolonlar (Thermo scientific, Pierce HisPure Ni-NTA Spin Columns, ABD) saflaştırma için kullanıldı. Mutant proteinlere ait saflaştırma işlemleri bölüm 3.2.6’da daha önceden belirtildiği şekilde yapıldı.

3.2.21 Mutant proteinlerin SDS-PAGE analizi

Mutant proteinlerin saflaştırılma işlemlerinden sonra, hangi örneklerde doğru ve daha fazla protein ekspresyonu olduğunu gözlemlemek için SDS-PAGE analizi yapıldı. Tüm örnekler SDS-PAGE jele yüklenmeden önce denatürasyon işlemine tabi tutuldu.

Denatürasyon işlemi ve sonrasında gerçekleştirilen SDS-PAGE aşaması bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.22 Mutant proteinlerin ultrafiltrasyon işlemleri

SDS-PAGE görüntüsü ile protein ekspresyonunun fazla ve doğru yerde olduğu belirlenen Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH proteinlerine ait örneklerin hepsi yeni birer falkon tüp içerisinde karıştırılarak üzerleri 50 ml’ye kadar sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile tamamlandı. Daha sonra her bir mutanta ait bu protein karışımları 30000 MW ‘lik ultrafiltrasyon tüplerinde (Amicon Ultra-15 santrifugaton tube Millipore, ABD) 3000 x rpm 10 dk olacak şekilde +4 °C’de santrifüj edildi. Buradaki amaç saflaştırma esnasında kullanılan imidazolü ve tuzları yapıdan uzaklaştırmaktır. Santrifüj işlemine, 50 ml’lik protein karışımları 2.5 ml olana kadar devam edildi. Bu şekilde hem imidazol ve tuzlar yapıdan uzaklaştırıldı hem de mutant proteinlerin konsantrasyonu artırıldı.

3.2.23 PD-10 kolon uygulaması

Ultrafiltrasyon tüplerinden geçirilip son hacimleri 2.5 ml olan Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH protein çözeltilerdeki geriye kalan tüm imidazol ve tuzları iyice uzaklaştırmak için mutant proteinler PD-10 (GE Healthcare, ABD) kolondan geçirildi. Bunun için PD-10 kolonun üst kısmında bulunan etanol, kolonun ağız kısmı açılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra kolondan sırasıyla 4 defa dH₂O ve 4 defa sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) geçirildi. Ardından 2.5 ml protein kolondan 2 defa geçirildi. Son olarak her bir mutant protein çözelti 3.5 ml tampon çözelti (sodyum fosfat, pH 7.4) ile toplandı. Bu işlemde sonra elimizdeki protein çözeltinin konsantrasyonunu arttırmak için tekrar ultrafiltrasyon tüpünü daha önce belirtildiği şekilde kullandık.

3.2.24 Mutant proteinlerin miktar tayini

Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH proteinlerindeki, protein miktarları Bradford yöntemi ve 1 mg/ml BSA’nın farklı konsantrasyonlarda standart olarak kullanılmasıyla ölçüldü. Bu ölçüm için öncelikle spektrofotometre cihazı Bradford ayırıcı ile sıfırlandıktan sonra 1 ml’lik plastik tek kullanımlık küvetlere 20 µl örnek üzerine 980 µl Bradford

ayıracı pipetlenip vortekslendi. Bu işlemin ardından 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakılan örnekler 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV 1800, Japonya) ölçüldü.

3.2.25 Mutant proteinlerin Western Blot analizi

Mutant FDH proteinlerinin varlığı ayrıca Western Blot analizi ile doğrulandı. Saflaştırma sonrası elde edilen tüm mutant protein örneklerine Western Blot analizi (western blot system, Biorad, ABD) yapıldı. Bunun için Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH proteinlerine ait örnekler bölüm 3.2.11’de belirtildiği şekilde protein belirteçleri ile birlikte jellere yüklendi ve yürütüldü. Sonrasında nitroselüloz membranlara aktarılan proteinler His-tag antikolar ile muamele edildi ve oluşan bantlar görüntüleme cihazında (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, ABD) görüntülenip değerlendirildi.

3.2.26 Mutant enzimlerin aktivite çalışmaları

Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH proteinlerine ait enzim aktivite çalışmalarında ilk olarak her mutant enzim için optimum olan pH ve sıcaklığın belirlenmesine yönelik deneyler yapıldı. Optimum pH ve sıcaklık belirlendikten sonra kinetik ölçümler alındı.

3.2.26.1 Mutant enzimlerde farklı pH ve sıcaklığın aktiviteye etkisi

Mutant enzimler için optimum pH şartlarını belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (pH 5-12) hazırlanan tamponlar kullanıldı. Reaksiyon, 5 farklı mutant enzim için ayrı ayrı: 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml mutant enzim varlığında gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri, 25 °C sıcaklıkta ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı.

Optimum sıcaklık şartlarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (20°C-90°C) aktivite ölçümleri, 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon, Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH enzimleri için pH 7 ve Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için pH 8 tampon ortamında ayrı ayrı: 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml mutant enzim varlığında gerçekleştirildi.

3.2.26.2 Mutant enzimlerin kinetik hesaplamaları

Yapılan çalışmalar sonucunda optimum pH ve sıcaklık Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH için belirlendi. Kinetik ölçümler ile her bir mutant enzim için K_M , V_{max} ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi adına farklı substrat, koenzim ve enzim konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri çizildikten sonra Lineweaver-Burk eğrisinde elde edilen formül yardımıyla kinetik hesaplamalar yapıldı. Kinetik hesaplamalar için kullanılan reaksiyon ortamları Tablo 3.34, Tablo 3.35 ve Tablo 3.36'da verilmiştir. Reaksiyonlara ait ölçümler, 25 °C'de ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı.

Tablo 3.34: Mutant enzimlerin değişen substrat konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.

Mutantlar	Seçilmiş Format Konsantrasyonları (mM)	Enzim	NAD ⁺	pH
Phe285ThrFDH	0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	0.5 mg/ml	4 mM	7
Val120ThrFDH	0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	0.5 mg/ml	4 mM	7
Gln287GluFDH	0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	0.5 mg/ml	4 mM	7
His311GlnFDH	0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	0.5 mg/ml	4 mM	7
Phe285Thr/His311GlnFDH	0.612, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40	0.5 mg/ml	4 mM	8

Tablo 3.35: Mutant enzimlerin değişen koenzim konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.

Mutantlar	Seçilmiş NAD ⁺ Konsantrasyonları (mM)	Enzim	Format	pH
Phe285ThrFDH	1, 2, 3, 4, 5, 6	0.5 mg/ml	1 mM	7
Val120ThrFDH	1, 2, 3, 4, 5, 6	0.5 mg/ml	1.3 mM	7
Gln287GluFDH	1, 2, 3, 4, 5, 6	0.5 mg/ml	2 mM	7
His311GlnFDH	1, 2, 3, 4, 5, 6	0.5 mg/ml	1.5 mM	7
Phe285Thr/His311GlnFDH	1, 2, 3, 4, 5, 6	0.5 mg/ml	1.4 mM	8

Tablo 3.36: Mutant enzimlerin değişen enzim konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.

Mutantlar	Seçilmiş Enzim Konsantrasyonları (mg/ml)	NAD ⁺	Format	pH
Phe285ThrFDH	0.0306, 0.0612, 0.125 0.25, 0.5, 0.75	2.5 mM	1 mM	7
Val120ThrFDH	0.0306, 0.0612, 0.125 0.25, 0.5, 0.75	4 mM	1.3 mM	7
Gln287GluFDH	0.0306, 0.0612, 0.125 0.25, 0.5, 0.75	4 mM	2 mM	7
His311GlnFDH	0.0306, 0.0612, 0.125 0.25, 0.5, 0.75	2.5 mM	1.5 mM	7
Phe285Thr/His311GlnFDH	0.0306, 0.0612, 0.125 0.25, 0.5, 0.75	4 mM	1.5 mM	8

3.2.26.3 Mutant enzimlerde farklı metal iyonlarının aktiviteye etkisi

Farklı metal iyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine olan etkilerini incelemek için, 11 farklı metal iyonunun (ZnCl₂, MgCl₂, CuCl₂, LiCl₂, W, FeCl₃, CaCl₂, Mn, KCl₂, Mo, NaCl) 5 farklı konsantrasyonu (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 7 μ M, 10 μ M) reaksiyon ortamlarında denendi ve her bir mutant enzim için ayrı ayrı reaksiyon oluşturuldu. Reaksiyon ortamları, Phe285ThrFDH için; 1 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim; Val120ThrFDH için 1.3 mM format, 4 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim; Gln287GluFDH için 2 mM format, 4 mM NAD, 0.25 mg/ml enzim; His311GlnFDH için 1.5 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 1.5 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim olacak şekilde hazırlandı. Ölçümler, Phe285Thr/His311GlnFDH için pH 8 ve diğer mutant enzimler için pH 7 tampon kullanılarak, 25 °C sıcaklık ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonları, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından reaksiyon başlatıldı.

3.2.26.4 Mutant enzimlerde farklı organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi

Farklı çözücülerin mutant enzimlerin aktivitesine olan etkilerini incelemek için, 5 farklı organik çözücünün (etanol, metanol, kloroform, aseton, propanol) 4 farklı konsantrasyonu (%5, %10, %25, %50) reaksiyon ortamlarında denendi. Reaksiyon ortamları, Phe285ThrFDH için; 1 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim; Val120ThrFDH için 1.3 mM format, 4 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim; Gln287GluFDH için 2 mM format, 4 mM NAD, 0.25 mg/ml enzim; His311GlnFDH için 1.5 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 1.5 mM format, 2.5 mM NAD, 0.125 mg/ml enzim olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyonda farklı konsantrasyonda hazırlanan organik çözücüler, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından reaksiyon başlatıldı. Ölçümler, Phe285Thr/His311GlnFDH için pH 8 ve diğer mutant enzimler için pH 7 tampon kullanılarak, 25 °C sıcaklık ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı.

3.2.27 Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi

Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH enzimlerinin ikincil yapılarının ve termal stabilitelerinin belirlenmesi için CD spektroskopisi yöntemi kullanıldı.

3.2.27.1 Mutant proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesi

Saflaştırma işlemlerinden sonra protein konsantrasyonları ölçülen mutant FDH enzimlerinin konsantrasyonları her mutant için uygun pH'daki tampon kullanılarak 0.25 mg/ml'ye dilüe edildi. Ardından ikincil yapının analizi için 25 °C'de 190-260 nm dalga boyları arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) absorbans ölçümleri alındı. Ölçümler esnasında bant genişliği 1.00 nm, veri aralığı 0.2 nm, tarama hızı 50 nm/min, data aralığı 0.2 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD ve fotometrik mod da CD, HT, UV, Abs olarak alındı.

3.2.27.2 Mutant proteinlerin termal stabilitesinin belirlenmesi

Protein konsantrasyonunu 0.25 mg/ml'ye ayarladığımız enzimin termal denatürasyon eğrisinin 3D yapısını elde etmek için numunemiz, 190-250 nm arasındaki spektrumda 25 °C ile 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) tarandı. Tarama sırasındaki ölçüm parametleri, bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD, data ve veri aralığı 0.1 nm, tarama hızı 50 nm/min ve fotometrik modlar CD, HT olarak ayarlandı. Ayrıca termal denatürasyon eğrisi için numunemiz yine 25 °C ile 95 °C arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) α -heliks yapısına spesifik 222 nm absorbansında ölçüldü. Ölçüm parametleri ise bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD olarak alınmıştır. Fotometrik modlar ise CD, HT ve UV olarak ayarlandı.

3.2.28 Modelleme çalışmaları

Molekül geometrilerini optimize etmek için Kuantum Mekaniği / Moleküler Mekanik hibrit yöntemleri kullanıldı. Gaussian09 yazılımı, ONIOM hibrid yaklaşımı, molekülün farklı bölümlerinde farklı yöntemlerin kullanılmasını sağlayan geometri optimizasyonunu gerçekleştirdi. MM optimizasyonu AMBER kuvvet alanı tarafından gerçekleştirilirken, mutasyona uğramış amino asitlerden ve bunların komşu rezidülerinden oluşan QM bölgesindeki optimizasyon için M062X hibrit fonksiyonel yöntem kullanıldı. QM optimizasyonları, oksijen atomu için 6-31 + G * ve diğer atomlar için 6-31G ** baz alınarak gerçekleştirildi. Molekülün ilk geometrisi deneysel verilerden elde edildi. Geometrik modifikasyonlar (mutasyonlar) ilk önce Pymol yazılımı kullanılarak molekül üzerinde yapıldı. Ayrıca, Pymol, optimizasyonun tamamlanması sırasında ve sonrasında molekül geometrisinin görselleştirilmesinde kullanıldı. ONIOM algoritması ilk olarak QM bölgesi için analitik birinci türevlerin ve sayısal ikinci türevlerin hesaplamalarını yaparak bir QM basamağı oluşturur. Ardından, MM bölgesini optimize eder. Bu sürece mikrotrasyon denir. Optimizasyon işlemi, kuvvet ve yer değiştirme değerleri tamamen birleşene kadar devam eder. Çalışmada, mikrotrasyon kullanan bazı optimizasyonların bir araya gelemediği durumlarda ise birleşik ikinci dereceli makro algoritma kullanıldı ve mikrotrasyonlar devre dışı bırakıldı. Birleştirilmiş ikinci dereceden makro algoritma, model sistemindeki atomlar ile yalnızca MM katmanındaki atomlar arasındaki eşleşmeyi dikkate alır. QM ve MM bölgeleri arasındaki elektrostatik etkileşimi dikkate almak

için elektronik yerleştirme kullanıldı. Elektronik yerleştirme, MM bölgesinin elektriksel yüklerini, QM bölgesinin dalga fonksiyonuna (Hamiltonian) yerleştirdiğinden; bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşim kuantum seviyesinde hesaplandı.



4. BULGULAR

4.1 *C. boidinii* Genomik DNA İzolasyonu Bulgusu

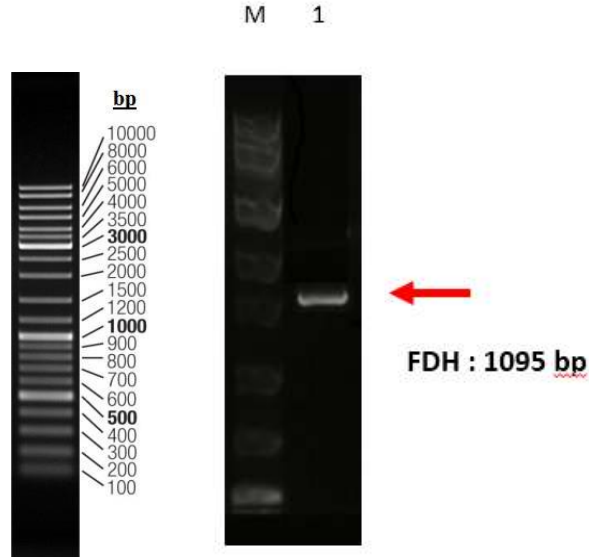
C. boidinii genomik DNA'sının izolasyonunda, ticari olarak temin edilen PureLink genomik DNA mini kit (Invitrogen, 182001, ABD) kullanıldı. *C. boidinii* genomik DNA'sının miktarı 260 nm'deki absorbans değeri ile ölçülerek 93 ng/ µl olarak bulundu. Saflığı 260 nm/280 nm oranı ile 1.7 bulundu. DNA, sonraki PZR çalışmalarında kalıp olarak kullanıldı.

4.2 PZR ile Çoğaltılan FDH Gen Bölgesi Bulgusu

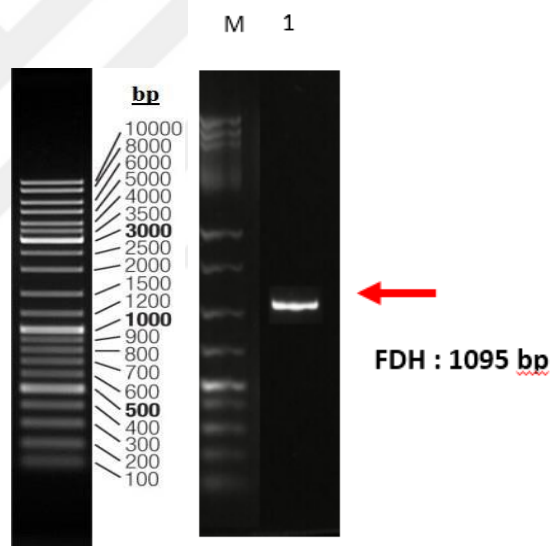
C. boidinii FDH geninin kopya sayını arttırmak için ticari olarak temin edilen Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanıldı. PZR reaksiyonundan sonra *C. boidinii* FDH gen bölgesinin amplifikasyonunu gözlemleyebilmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için %1'lik hazırlanan agaroz jele sırasıyla 3 µl DNA belirteç ve 2 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılmış 5 µl PZR ürünü yüklendikten sonra 120 mA, 110 V'de 45 dk yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi (Şekil 4.1).

4.3 Agaroz Jelden DNA Saflaştırmasına Ait Bulgu

1095 bp'de görülmesi beklenen DNA bantı görüldükten sonra ticari olarak temin edilen GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, K0691, ABD) kiti ile jelden pürifikasyon işlemi yapıldı. DNA içeren süpernatant %1'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'nın varlığı kontrol edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: PZR ile çoğaltılan FDH gen bölgesi ürününün UV görüntüsü (M: DNA belirteç, 1: PZR ürünü).

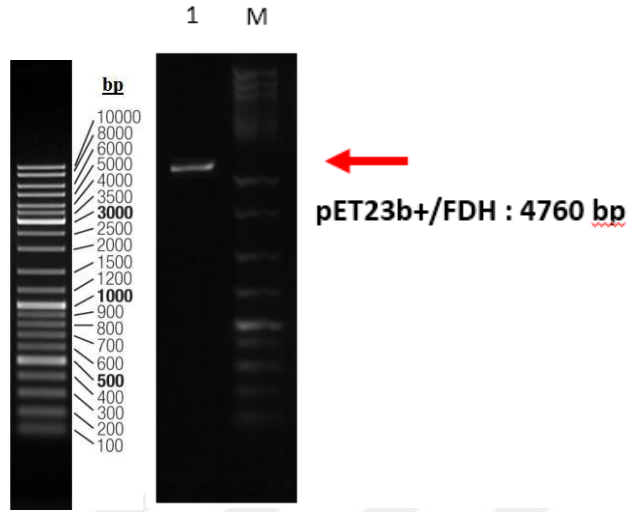


Şekil 4.2: Agaroz jelden saflaştırılan DNA ürününün UV görüntüsü (M: DNA belirteç, 1: PZR ürünü).

4.4 CboFDH Geninin pET23b+ Vektörüne Aktarılması Bulgusu

Klonlama ve ekspresyon vektörü pET23b+ 'in PZR ürünü ile uyumlu yapışkan uçlara sahip olabilmesi için *NdeI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesildi. Vektörün endonükleazlar ile kesim işleminin ardından PZR ürünü ile pET23b+ vektörünün birbirine bağlanması için ligasyon işlemi yapıldı. Ligasyon İşleminin de ardından ligasyon ürünü %1'lik agaroz jelde 120 mA, 110 V'da 1 saat yürütülmüş ve sonrasında

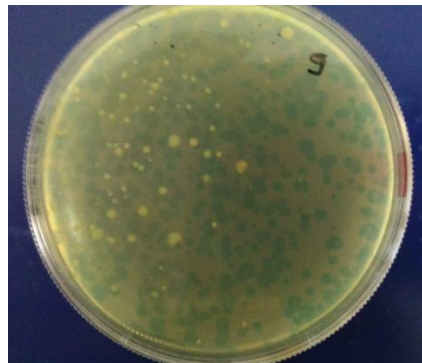
jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: pET23b+ vektörüne aktarılan FDH gen ürününün UV görüntüsü (M: DNA blirteç, 1: Ligasyon ürünü).

4.5 pET-23b+/FDH ‘in *E.coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu Bulgusu

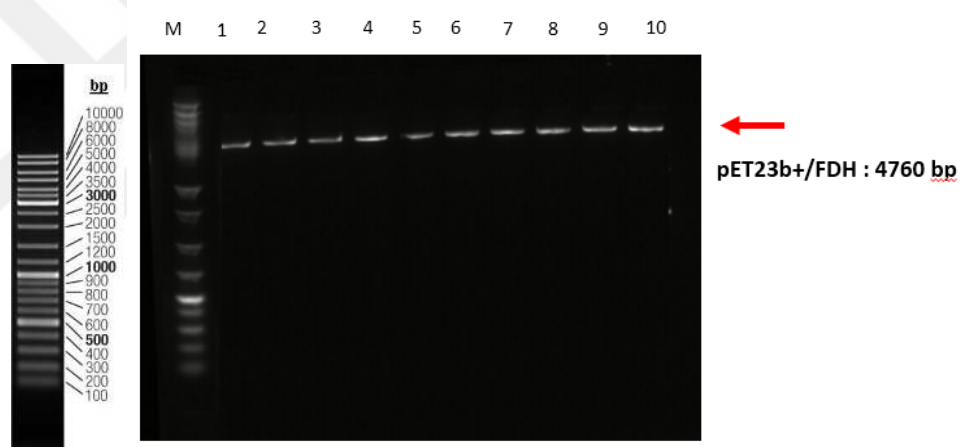
Vektöre aktarılan FDH geni daha sonra *E.coli* DH5α hücrelere transforme edildi. Transformasyon işlemi; ürünün *E.coli* DH5α kompetent hücrelerinin üzerine yavaşça bırakılması ve buzda inkübasyonu ile gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası hücreler, 50 µg/ml ampicilinli LB katı petrilere (üzerlerinde 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş olan) ekilerek 16 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Petrilerden, plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından faydalanılarak 10 adet klon seçildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: pET-23b+/FDH‘in *E.coli* DH5α hücrelerine transformasyonu.

4.6 pET23b+/FDH Vektörünü Alan Hücrelerin Koloni PZR Bulgusu

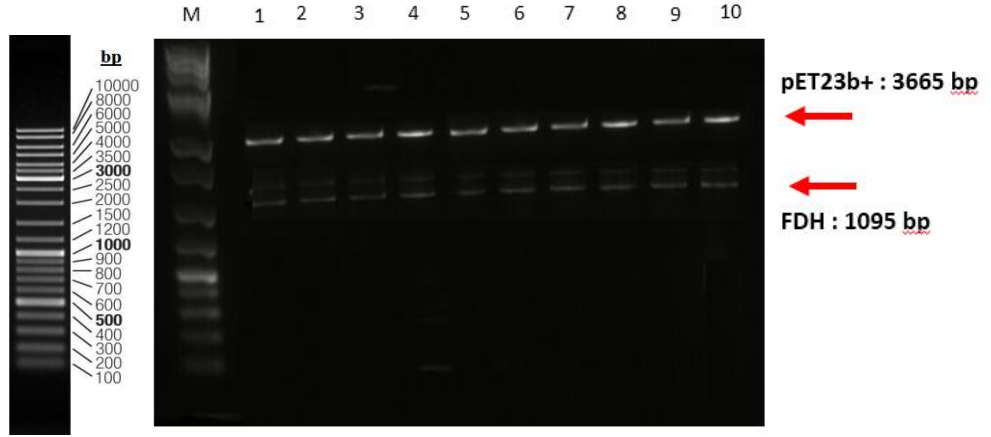
Seçilen 10 adet koloni, 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerlerine ekildi ve 37 C°'de, 200 x rpm'de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildi. Ticari olarak elde edilen Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmidlerin miktarı UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific, Biocrom, ABD) 260 nm'de ölçüldü. Konsantrasyonlar 91.10 ng/µl, 98.16 ng/µl, 95.29 ng/µl, 102.15 ng/µl, 129.11 ng/µl, 113.12 ng/µl, 90.10 ng/µl, 97.39 ng/µl, 96.18 ng/µl ve 108.11 ng/µl bulundu. Saflikları ise 1.62- 1.77 aralığında hesaplandı. Plazmid izolasyonunun ardından Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, F-548S, ABD) kiti ile koloni PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 120 mA, 110 V'da 1 saat yürütüldü ardından jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntü alındı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: pET23b+/FDH vektörünü alan hücrelerin koloni PZR UV görüntüsü (M: DNA belirteç, 1-10: Koloni PZR sonrası elde edilen ürünler).

4.7 Plazmidlerin Endonükleazlar ile Kesimleri Bulgusu

Koloni PZR reaksiyonunun yanlış sonuç verme ihtimaline karşılık kontrol amaçlı olarak plazmidler, *NdeI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim işlemi sonrasında ürünler %1'lik agaroz jelde 120 mA, 110 V'da 1 saat yürütüldü ardından jel görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntülendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Plazmidlerin endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrası UV görüntüsü (M: DNA belirteç).

4.8 Dizi Analizi Bulgusu

Koloni PZR ve kesim enzimleri ile vektöre uygun şekilde yerleştiği doğrulanan rastgele seçilmiş 3 koloninin, dizi analizine gönderilmek üzere plazmid izolasyonları yapıldı. Plazmidler (rekombinant pET-23b+/FDH vektörü) Sentromer DNA Teknolojileri Firmasına gönderilerek; PZR ürünlerinin vektöre doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği, N-terminal bölgesinde 6 adet histidinin bulunup bulunmadığı yapılan sekans analizleri ile kontrol edildi. Elde edilen sekans sonuçları <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> programları kullanılarak veri tabanındaki CboFDH-1 protein dizisi ile aligment yapılarak karşılaştırıldı. Rekombinant FDH proteinimize ait gen dizisi ve protein dizisi Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’da verilmiştir.

4.9 pET-23b+/FDH ‘in *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

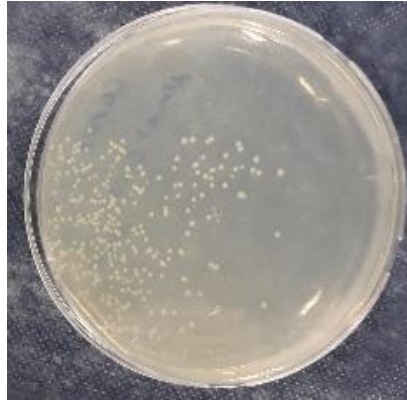
Sekans analizi sonucu ile istenilen gen bölgesinin vektöre düzgün yerleştiği doğrulandıktan sonra pET-23b+/FDH vektörü *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonrası hücreler, 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere ekildi ve 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kolonilerin varlığı kontrol edildi (Şekil 4.9). İnkübasyon sonrasında en iyi gelişen üç koloni seçildi ve koloniler 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekildi. Daha sonra sıvı besiyerindeki hücrelerden 1:1 oranında gliserol stok yapılarak derin dondurucuda (-80 °C) saklandı.

ATGAAGATCGTTTTAGTCTTATACGATGCTGGTAAACACGCCGCCGATGAAGAAAAATTATACGGTTGTACTGAA
AACAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTAAAAGATCAAGGCCATGAATTAATCACCACCTTCTGATAAAGAAGGCGG
AAACAGTGTGTTGGATCAACATATCCCAGATGCTGATATTATCATTACAACCTCTTCCATCCTGCTTATATCACC
AAGGAAAGAATCGACAAAGCTAAAAAATTGAAATTAGTTGTCGTCGCTGGTGTGCGTTCTGATCATATTGATTTG
GATTACATCAACCAAACCGGTAAGAAAATCTCCGTTTTGGAAGTTACCGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCAGAA
CACGTTCTCATGACCATGCTTGTCTTGGTTAGAAAATTTGTTCCAGCTCACGAACAAATCATTAAACCAGATTGGG
AAGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACTATCGCCACCATTGGTGCCGGTAGAATTG
GTTACAGAGTCTTGGAAAGATTAGTCCCATTTAATCCAAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAA
AAGATGCCGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGGGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCCCAAGCTGATATAGTT
ACAATTAATGCTCCATTACACGCTGGTACAAAAGGTTTAATTAACAAGGAATTATTGTCTAAATTCAAGAAAGGT
GCTTGGTTAGTCAATACTGCAAGAGGTGCCATTTGTGTTGCCGAAGATGTTGCTGCAGCTTTAGAATCTGGTCAA
TTAAGAGGTTACGGTGGTGATGTTTGGTTCCACAACCTGCTCCAAAAGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAAC
AAATATGGTGCTGGTAACGCCATGACTCCTCATTACTCTGGTACTACTTTAATGCTCAAACCTAGATACGCTGAAG
GTACTAAAAATATTTTAGAGTCATTCTTTACCGGTAAGTTTGACTACAGACCACAAGATATCATCTTATTAAATGG
TGAATACATTACCAAAGCTTATGGTAAGCACGATAAGAAATAA

Şekil 4.7: pET-23b+/FDH vektörünün dizileme sonucu.

MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDEGETSELDKHIPD
ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGVSDHIDLIDYINQTKKISVLEVTGSNV
VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDEVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL
ERLLPFNPKELLYYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN
KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRDMR
NKYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK
HDKK

Şekil 4.8: Dizileme sonucu elde edilen rekombinant FDH protein dizisi.

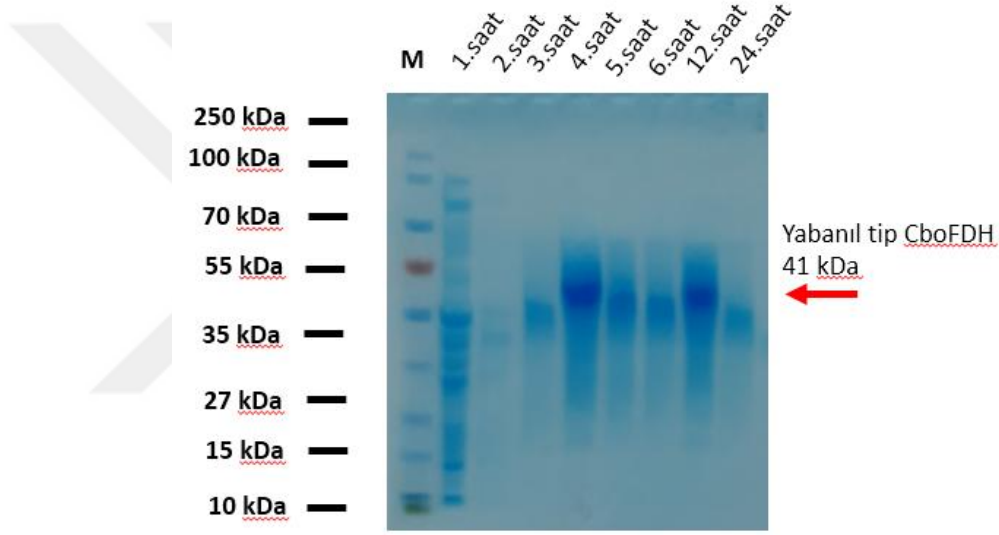


Şekil 4.9: pET-23b+/FDH 'in *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu.

4.10 FDH Gen İfadesinin IPTG ile İndüklenmesi ve Protein Saflaştırma

Bulgusu

FDH gen ekspresyonunun IPTG ile indüklenmesi 500 ml LB sıvı besiyerinde büyütülen kolonilerin OD=600 nm'deki absorbansı 0.5 olduğunda ortama 1 mM IPTG eklenmesi ile yapıldı. Yaklaşık 4 saat sonra hücrelerden numune alınarak bu numune 0. saat olarak kabul edildi. Örnek alma işlemine 24 saat boyunca; 1., 2., 3., 4., 5., 6., 12. ve 24. saatlerde de devam edildi. Alınan numuneler 14000 x rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra pelet kısımlarından SDS-PAGE analizi yapılarak hangi saatteki IPTG uygulamasının optimum olduğuna karar verildi (Şekil 4.10).



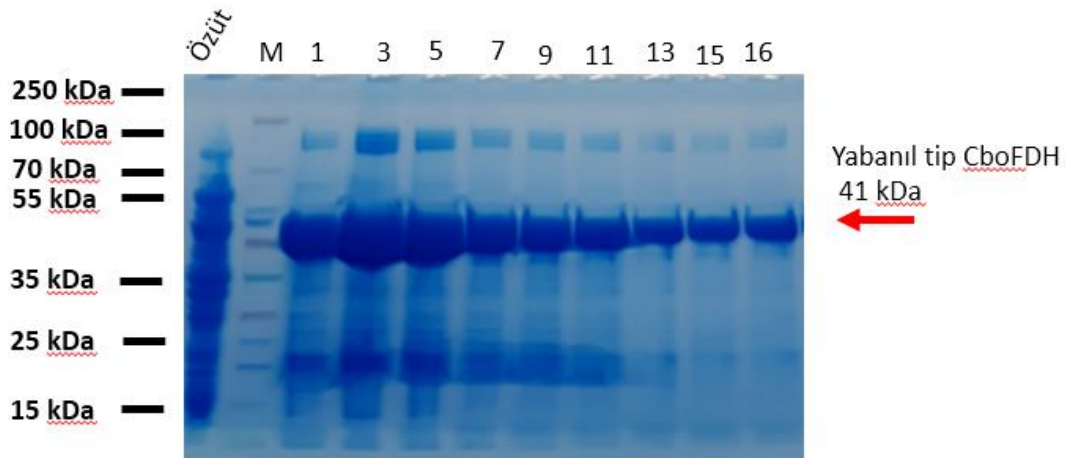
Şekil 4.10: FDH gen ifadesinin IPTG ile indüklenmesi bulgusu (M: Protein belirteç).

Yapılan IPTG çalışması ile optimum inkübasyon süresinin 4 saat olduğuna karar verildikten sonra stok yaptığımız transformant *E.coli* BL21 hücrelerinden, 50 µg/ml ampicilin içeren 15 ml LB sıvı besiyerine ön kültür hazırlandı. Ön kültür, 16 saat 37 °C'de 200 x rpm orbital çalkalayıcıda inkübasyonun ardından 500 ml 50 µg/ml ampicilin içeren LB sıvı besiyerine inoküle edildi. 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu 0.5 olana kadar 37 °C'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. OD=0.5 olduğunda ortama 1 mM IPTG eklendi ve 4 saat 37 °C'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj işlemlerine tabi tutularak pelet elde edildi. Daha sonra pelet pH 7.4 sodyum fosfat tamponu ile homojenize edildi. İntraselüler bir enzim olan FDH'in hücrelerden dışarı çıkarılabilmesi için homojenat, lizozim ile muamele edildikten sonra sonikasyon

işlemine tabi tutuldu. Sonikasyon işleminden sonra homojenat 10000 x rpm'de 1 saat +4 °C'de santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant 0.45µm'lik filtreden geçirilip temiz bir falkon tüpe alındı. Üretilen rekombinant protein N-terminal kısmında His-Tag bölümüne sahip olduğundan, histidine afinite gösteren ticari olarak temin edilmiş 1 ml Ni-NTA agaroz kolon (Thermo scientific, Pierce HisPure Ni-NTA Spin Columns, ABD) ile saflaştırıldı. Örneğimizi farklı imizadol konsantrasyonlardaki tampolar ile kolondan geçirdikten sonra; ilk geçirilen protein örneği, Buffer A, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve Buffer B olmak üzere 19 protein örneğimiz oldu.

4.11 Yabanıl Tip CboFDH SDS-PAGE Analizi Bulgusu

Saflaştırma işlemi sonrasında elde ettiğimiz; ilk geçirilen protein örneği, Buffer A, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12., 14., 16. örnekler ve protein belirteç jele yüklendikten sonra 120 mA, 100 V'de 1.5 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi sonrası jel, Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi görüntüsü (Özüt: Kolondan geçirilmemiş protein lizati, M: Protein belirteç, 1-16: Kolondan farklı imidazol konsantrasyonları içeren tamponlar ile geçirilmiş protein elüsyonları).

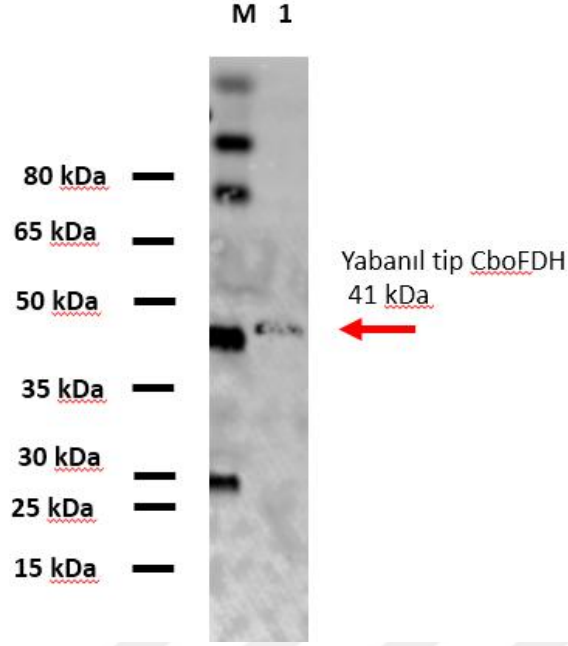
4.12 Protein Miktar Tayini Bulgusu

Protein miktar tayini yapılmadan önce SDS-PAGE analizi sonucu ekspresyonu fazla olan ilk 8 örnek tek bir yerde toplanarak üzeri sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile 50 ml'ye tamamlandıktan sonra ultrafiltrasyon (Amicon Ultra-15 santrifugaton tube

Millipore, ABD) işlemine tabi tutuldu. Buradaki amaç protein çözeltide bulunan imidazol ve tuzları uzaklaştırabilmektir. Aynı amaç ile örnek bir de PD-10 (GE Healthcare, ABD) kolondan geçirildi ve tekrar ultrafiltrasyon işlemine tabi tutuldu. Tüm bu işlemlerin ardından örneğimizdeki protein miktarı, Bradford yöntemi ile 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) ölçüldü. Protein miktarımız 8.5 mg/ml olarak bulundu.

4.13 Yabanıl Tip CboFDH Western Blot Analizi Bulgusu

Rekombinant üretilen CboFDH proteininin varlığı Western Blot (western blot system, Biorad, ABD) analizi ile doğrulandı. Protein miktarı belirlenen yabanıl tip CboFDH enzimine Western Blot analizi için jele yüklenmeden önce protein denatürasyon işlemi yapıldı. Ardından protein belirteç ile birlikte jele yüklenen yabanıl tip CboFDH; 120 mA, 100 V'de 1.5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, nitroselülez membrana transfer edildi (Transblot system, Biorad, ABD). Yıkama basamaklarının ardından membran Anti-Histag primer antikor (Abcam, ABD) ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası İkincil antikor (Abcam, ABD) ile yeniden inkübe edilen membrandaki bantlar yıkama basamaklarının ardından ticari olarak temin edilen görüntüleme kiti (Santa cruz, ABD) ile görüntüleme cihazında (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, France) görüntülendi (Şekil 4.12). 41 kDa boyutunda beklenen proteinimiz, beklenen bant aralığında elde edildi.



Şekil 4.12: Yabancı tip CboFDH'in Western Blot analizi görüntüsü (M: Protein belirteç, 1: Yabancı tip CboFDH protein örneği).

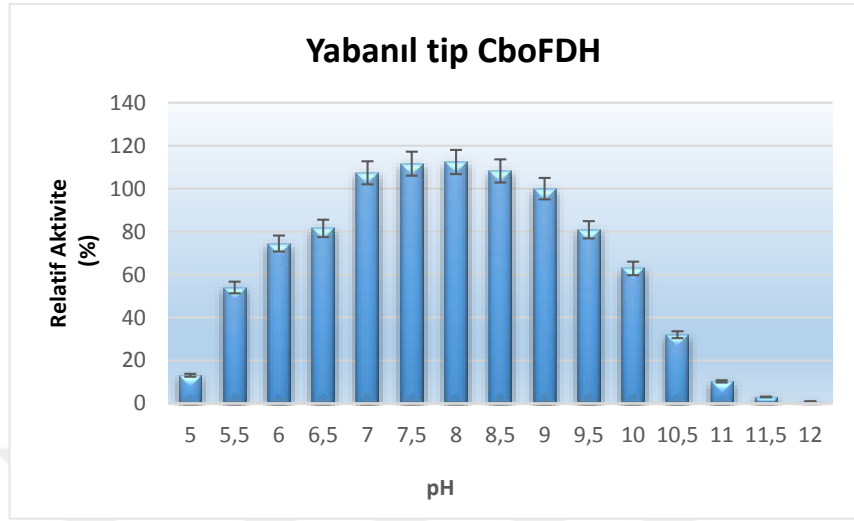
4.14 Yabancı Tip CboFDH Enziminin Aktivite Çalışması Bulguları

Saflaştırılan ve Western Blot analizi ile beklendiği şekilde ~41 kDa'da bant verdiği tespit edilen rekombinant FDH enzimine ait aktivite çalışmalarında ilk olarak enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Ardından K_M , V_{max} ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi için değişen konsantrasyonlarda enzimin substratına, koenzimine ve kendisine karşı aktivite ölçümleri alındı.

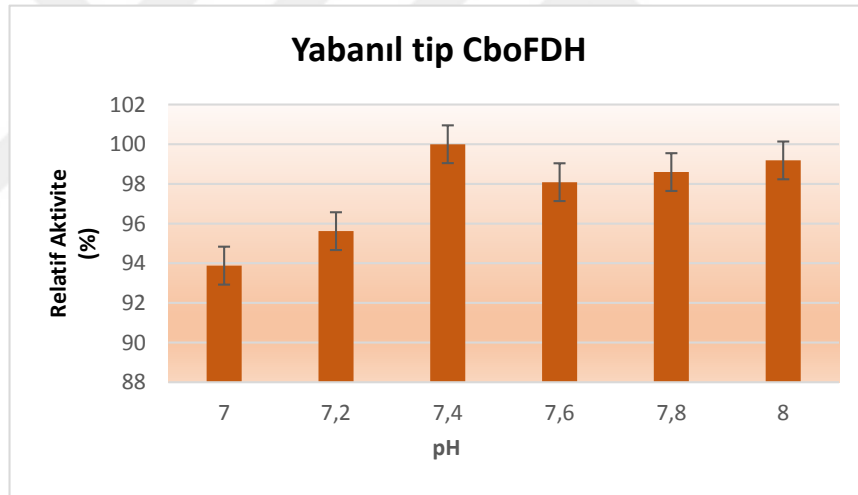
4.14.1 Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

Yabancı tip CboFDH aktivitesi için optimum pH şartlarını belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (pH 5-12) hazırlanan tamponlar kullanıldı. Tamponlar, pH 5-5.5 için asetat tamponu (0.2 M), pH 6-8 için fosfat tamponu (0.2 M), pH 8-9 için tris tamponu (0.1 M), pH 9-11 için glisin-NaOH tamponu (0.1 M), pH 11-12 için KCl-NaOH tamponu (0.1 M) olarak hazırlandı. Reaksiyon, 20 mM sodyum format, 4 mM NAD^+ ve 0.5 mg/ml yabancı tip CboFDH varlığında gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri, 25°C sıcaklıkta ve 340 nm absorbandsda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Buna göre pH 7 ve pH 8 değeri birbirine yakın çıktığından, iki pH değeri arasındaki değerler 0.2 arttırılarak yeniden ölçüm yapıldı. Bütün

analizler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Çalışma sonucunda yabancı tip CboFDH için optimum pH 7.4 bulundu (Şekil 4.13).



A



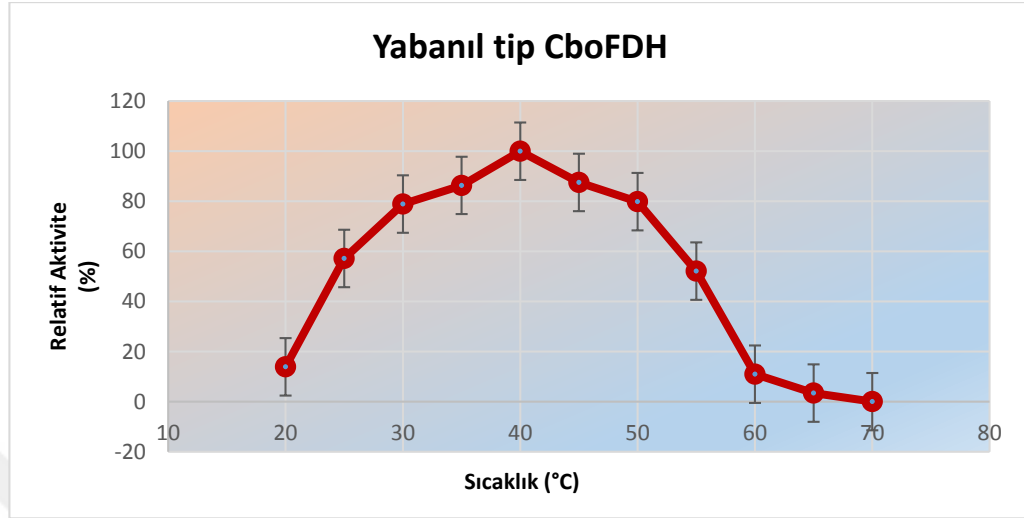
B

Şekil 4.13: Farklı pH değerlerinin yabancı tip CboFDH aktivitesine etkisi (A: Yabancı tip CboFDH aktivitesinin pH 5-12 arasındaki tamponlar ile ölçümü, B: Yabancı tip CboFDH aktivitesinin pH 7-8 arasındaki tamponlar ile ölçümü).

4.14.2 Farklı sıcaklık değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

Yabancı tip CboFDH aktivitesi için optimum sıcaklık şartlarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (20°C-70°C) aktivite ölçümleri 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon; 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml yabancı tip CboFDH varlığında her bir

sıcaklık derecesi için üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda yabancı tip CboFDH için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Farklı sıcaklık değerlerinin yabancı tip CboFDH aktivitesine etkisi.

4.14.3 Enzim kinetiği hesaplamalarına ait bulgular

Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızını belirleyebilmek için yabancı tip CboFDH enzimine ait kinetik hesaplamalar yapıldı. K_M , V_{max} ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi için ilk olarak farklı substrat, koenzim ve enzim konsantrasyonlarında aktivite tayinleri alınarak, Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk denklemlerinin de yardımıyla hesaplamalar yapıldı.

Çalışmaya başlamadan önce format (100mM) ve NAD (20 mM) stokları dH₂O ile hazırlandı. Reaksiyonların her birinin toplam hacmi 200 µl olarak belirlendi. Reaksiyon ortamında belirlenen konsantrasyonlarda bulunması gereken bileşenlerin, ana stoklardan ortama ne kadar konulacağı hesaplandı. Reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda konulan bileşenlerden reaksiyonun substratı olan format, ortama en son konuldu. Ortama substratın ilavesi ile başlayan reaksiyonlara ait absorbanslar 10 dk boyunca 10 sn aralıklarla olacak şekilde 340 nm'de ölçüldü. Daha sonra, Δ Absorbans / dakikanın mutlak değerleri kullanılarak her bir çözüm için değerler;

V_0 , hız (U/L): $(\Delta A / dk \times T.V.(ml) \times 10^6) / (\epsilon \times d \times N.V(ml))$ denklemli Beer Kanunu ile hesaplandı. Buradaki 'ε' molar absorptivite anlamına gelir. Deneylerde, enzim aktivitesini belirlemek için oluşan NADH miktarı baz alındı, hesaplamalarda

NADH'nin molar absorptivitesi $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak kullanıldı. 'd' ışık yolunun uzunluğunu temsil eder ve 1 cm'dir. 'T.V.' çözeltinin toplam hacmine göre 'N.V.' ise reaksiyon esnasında kullanılan enzimin hacmi dikkate alınarak formüle uygulandı.

Elde edilen değerler ile ilk olarak Michaelis-Menten eğrisi çizildi. Daha sonra $V_{\max}$ ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Bu eğrinin çizimi esnasında $1/V_0$ ve $1/S$ değerleri kullanıldı. Buna göre y eksenini $1/V_{\max}$ 'ı temsil ederken x eksenini $-1/K_M$ 'i temsil eder. $V_{\max}$ ve K_M değerleri her değişken için hesaplandıktan sonra enzimin K_{cat} değeri, $V_{\max} / [E]$ formülü ile hesaplandı. Daha sonra bulunan bu değerler kullanılarak enzimin K_{cat}/K_M oranı ve spesifik aktivite (enzim aktivitesi/toplam protein miktarı) ve buna bağlı olarak relatif aktivite değerleri hesaplandı.

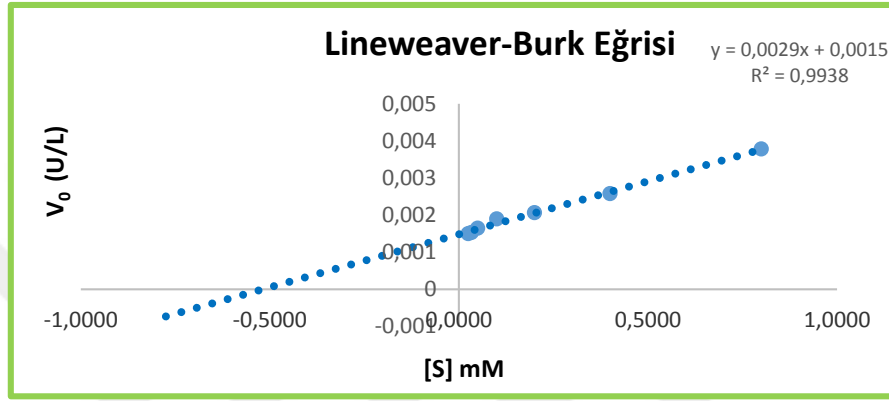
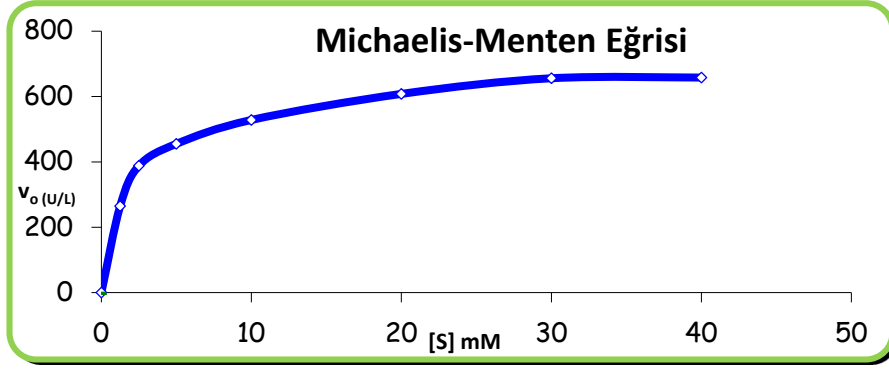
4.14.3.1 Değişen substrat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

FDH enzimi substrat olarak formata mutlak spesifite gösterir. Bu yüzden farklı konsantrasyonlardaki substrat ortamlarında aktivite ölçümleri yapılarak yabancı tip CboFDH enziminin K_M , K_{cat} ve $V_{\max}$ değerleri hesaplandı. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonu Tablo 4.1'de verilmiştir. Aktivite ölçümleri her konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde 340 nm absorbandsda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı.

Tablo 4.1: Yabancı tip CboFDH için değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

Seçilmiş Format	NAD ⁺	Enzim	pH	Sıcaklık °C
Konsantrasyonları				
0,612 mM-40 mM	4 mM	0.5 mg/ml	7.4	25

Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.15'de verilmiştir. Ancak Michaelis Menten eğrisi lineer bir çizgi yaratmadığından $V_{\max}$ ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiği kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. $V_{\max}$, K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki y eksenini $1/V_{\max}$ 'ı temsil ederken, x eksenini $-1/K_M$ değerini temsil etmektedir.



Şekil 4.15: Değişen substrat konsantrasyonlarında yabancı tip CboFDH enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.

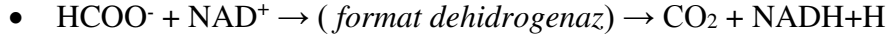
Çalışma sonucunda yabancı tip CboFDH enziminin substratı olan formata ait kinetik ölçümleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: Yabancı tip CboFDH enziminin format kinetik ölçüm değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Yabancı Tip CboFDH	2	0.6	9.48×10^2	4.74×10^2

4.14.3.2 Değişen koenzim konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

NAD⁺-bağımlı FDH, formatın karbondioksite dönüşmesini NAD'ın NADH'a redüksiyonu ile katalizler. Oluşan NADH+H spektrofotometrik ölçümlerde 340 nm'de absorbanans piki veren bir moleküldür.

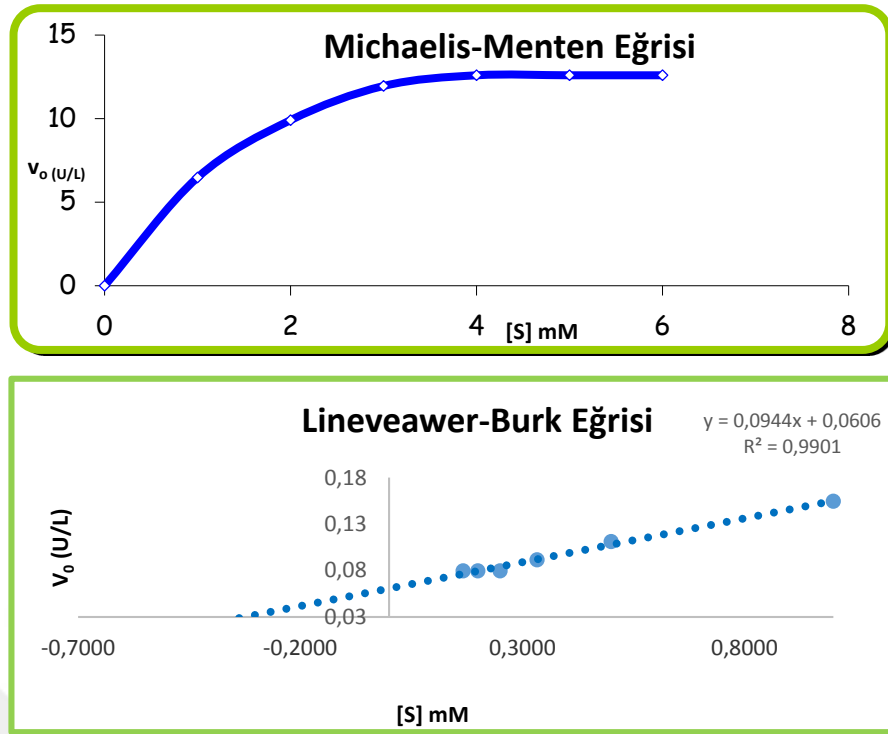


Çalışmada farklı koenzim konsantrasyonlarına karşı alınan enzim aktivite ölçümleri kullanılarak NAD için $V_{\max}$, K_M ve K_{cat} değerleri hesaplandı. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonu Tablo 4.3'de verilmiştir. Aktivite ölçümleri her konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde 340 nm absorbansta mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alınmıştır.

Tablo 4.3: Yabanıl tip CboFDH için değişen koenzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

Seçilmiş NAD ⁺ Konsantrasyonları	Format	Enzim	pH	Sıcaklık °C
1 mM-6 mM	2 mM	0.5 mg/ml	7.4	25

Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.16'da verilmiş olup $V_{\max}$ ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılmıştır. $V_{\max}$, K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki y eksenini $1 / V_{\max}$ 'ı temsil ederken, x eksenini $-1 / K_M$ değerini temsil etmektedir.



Şekil 4.16: Değişen koenzim konsantrasyonlarında yabancı tip CboFDH enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.

Çalışma sonucunda yabancı tip CboFDH enziminin koenzimi olan NAD'a ait kinetik ölçüm değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4: Yabancı tip CboFDH enziminin NAD kinetik ölçüm değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Yabancı Tip CboFDH	1.5	0.016	2.62×10^4	1.74×10^4

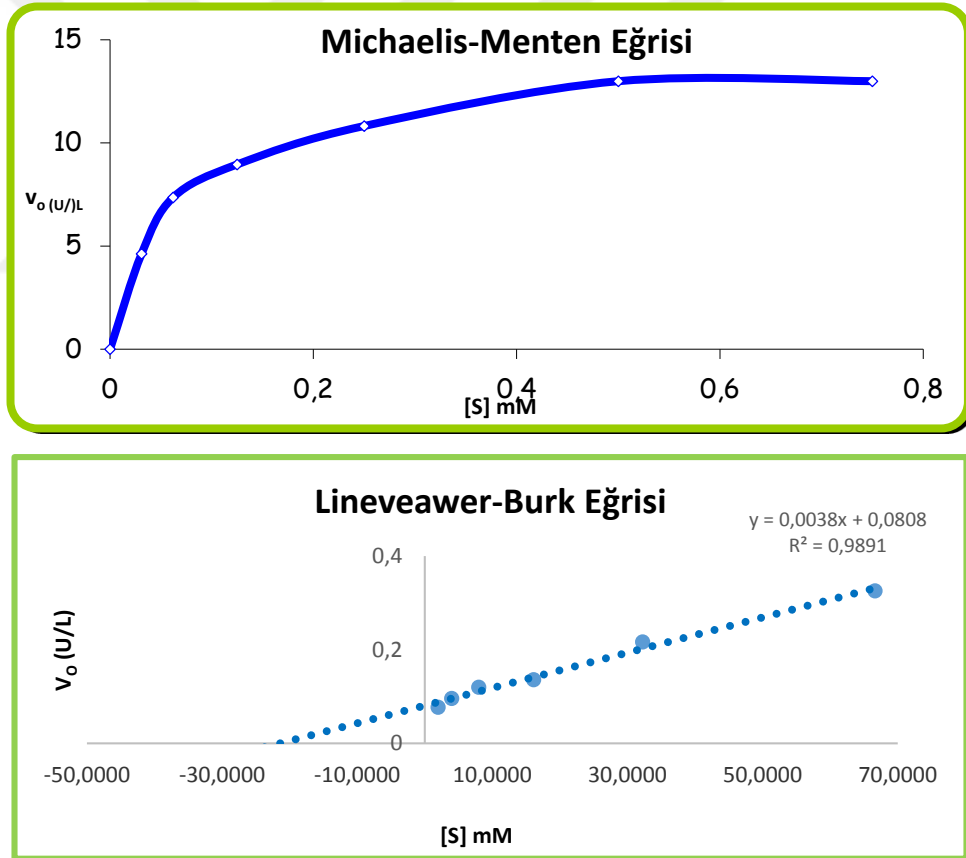
4.14.3.3 Değişen enzim konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

değişen enzim konsantrasyonların aktiviteye olan etkisini incelemek ve kinetik parametreleri hesaplamak için kullanılan reaksiyon ortamı tablo 4.5'de verilmiştir. aktivite ölçümleri 340 nm absorbandsa mikropalak okuyucuda (varioscan, thermo fisher scientific, ABD) alınmıştır.

Tablo 4.5: Yabanıl tip CboFDH için değişen enzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

Seçilmiş Enzim Konsantrasyonları	Format	NAD ⁺	pH	Sıcaklık °C
0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	2 mM	1.5 mM	7.4	25

Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.17’de verilmiş olup V_{max} ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılmıştır. V_{max} , K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki y eksenini $1 / V_{max}$ ’ı temsil ederken, x eksenini $-1 / K_M$ değerini temsil etmektedir.



Şekil 4.17: Değişen enzim konsantrasyonlarında yabanıl tip CboFDH enzimi için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri.

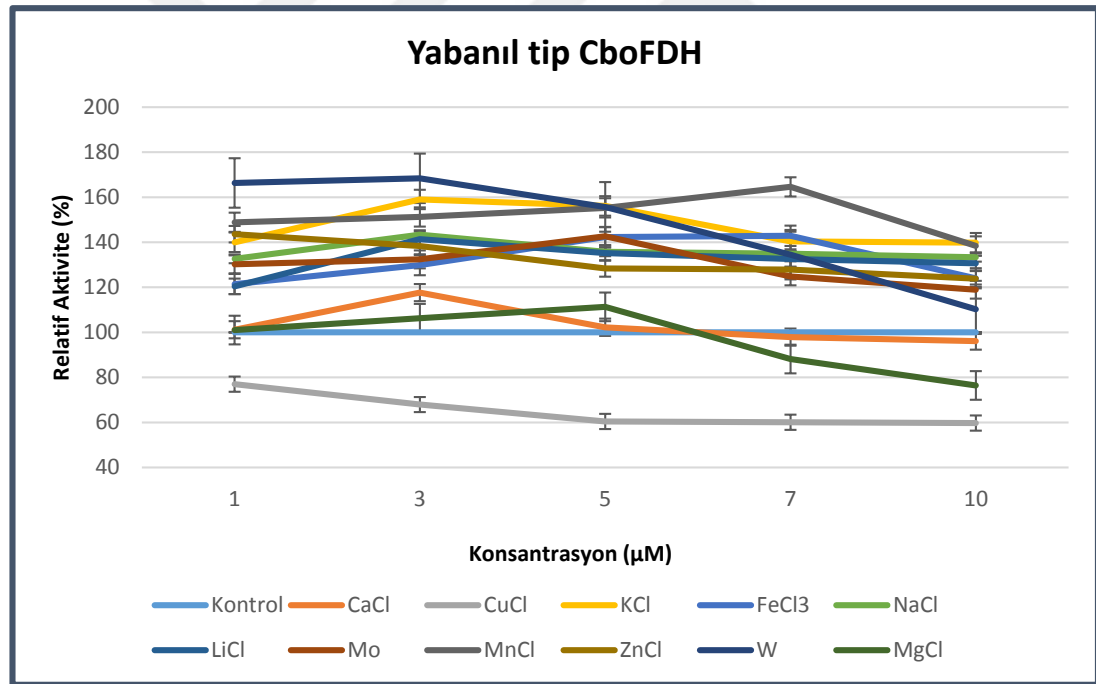
Çalışma sonucunda yabanıl tip CboFDH enzimine ait kinetik ölçüm değerleri Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6: Yabanıl tip CboFDH enzimine ait kinetik ölçüm değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
Yabanıl Tip CboFDH	0.047	0.016	1.96×10^3	4.18×10^4

4.14.3.4 Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine olan etkilerini incelemek için, 11 farklı metal iyonunun 5 farklı konsantrasyonu ($1\mu M$, $3\mu M$, $5\mu M$, $7\mu M$, $10\mu M$) reaksiyon ortamında denendi. Reaksiyon ortamı, her bir farklı metal konsantrasyonu için 0.25 mg/ml enzim, 1.5 mM NAD^+ , 2 mM format ve pH 7.4 sodyum fosfat tamponu olacak şekilde oluşturuldu. Ölçümler her bir durum için üç tekrarlı olacak şekilde, $25^\circ C$ 'de ve 340 nm absorbanda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı (Şekil 4.18).



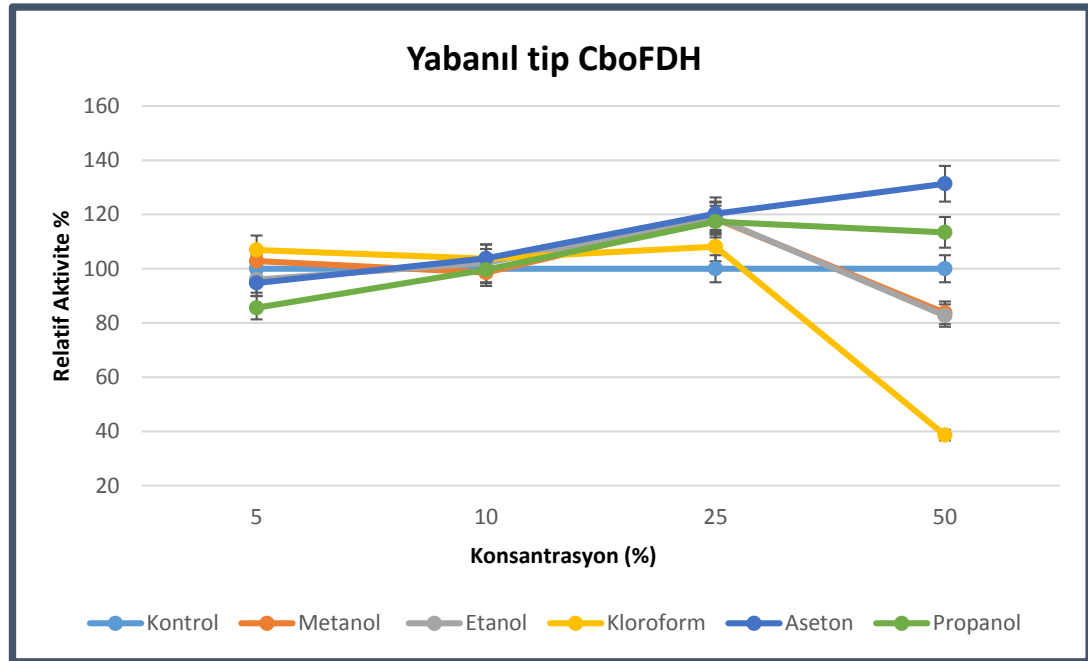
Şekil 4.18: Farklı metal iyonlarının yabanıl tip CboFDH enziminin aktivitesine etkisi grafiği.

Çalışma sonucunda $CuCl_2$ 'ün enzim aktivitesini %41 oranında düşürdüğü diğer tüm metallerin ise artan konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur. Buna göre, $CaCl_2$ 'ün aktiviteyi en fazla $3\mu M$ konsantrasyonda %17, KCl_2 'ün aktiviteyi en fazla $5\mu M$ konsantrasyonda %56, $FeCl_3$ 'ün aktiviteyi en fazla $7\mu M$ konsantrasyonda %42,

NaCl'ün aktiviteyi en fazla 3 μ M konsantrasyonda %43, LiCl'ün aktiviteyi en fazla 3 μ M konsantrasyonda %41, Mo'n aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %42, MnCl'ün aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %64, ZnCl'ün aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %28, Tungsten'in aktiviteyi en fazla 3 μ M konsantrasyonda %68 oranında arttırdığı bulunmuştur. Enzim aktivitesini attıran metallere sadece MgCl₂'ün aktiviteyi yüksek konsantrasyonlarda %24 oranında düşürdüğü bulunmuş bunun yanında 5 μ M konsantrasyonda en yüksek olacak şekilde enzim aktivitesini %11 oranında arttırdığı görülmüştür.

4.14.3.5 Farklı organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerin yabancı tip CboFDH enzim aktivitesi ölçümleri, her bir durum için üç tekrarlı olacak şekilde, 25 °C'de ve 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) yapıldı. Etanol, metanol, kloroform, aseton ve propanol çözümleri reaksiyon ortamlarına, %5, %10, %25 ve %50 oranında bulunacak şekilde konuldu. Reaksiyon ortamındaki diğer bileşenler ise 0.25 mg/ml enzim, 2 mM NAD⁺, 2 mM format ve sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) olarak eklendi. Reaksiyondaki organik çözümler, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından format ilave edilerek reaksiyon başlatıldı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Farklı organik çözücülerin yabancı tip CboFDH enziminin aktivitesine etkisi grafiği.

Çalışma sonucunda, metanol, etanol ve propanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi % 20'ye kadar arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda yaklaşık % 20 oranında düşürdüğü bulundu. Her üç organik çözücü için % 25 konsantrasyonda aktivite artışı en yüksek gözlemlendi. Kloroformda ise aktivite artışı en fazla %25 konsantrasyonda % 8 oranında iken, %50 konsantrasyonda %52 oranında aktivite kaybı gözlemlendi. Asetonda diğer organik çözücülerin aksine artan konsantrasyonlarda aktiviteyi % 30 civarında arttırdığı bulundu.

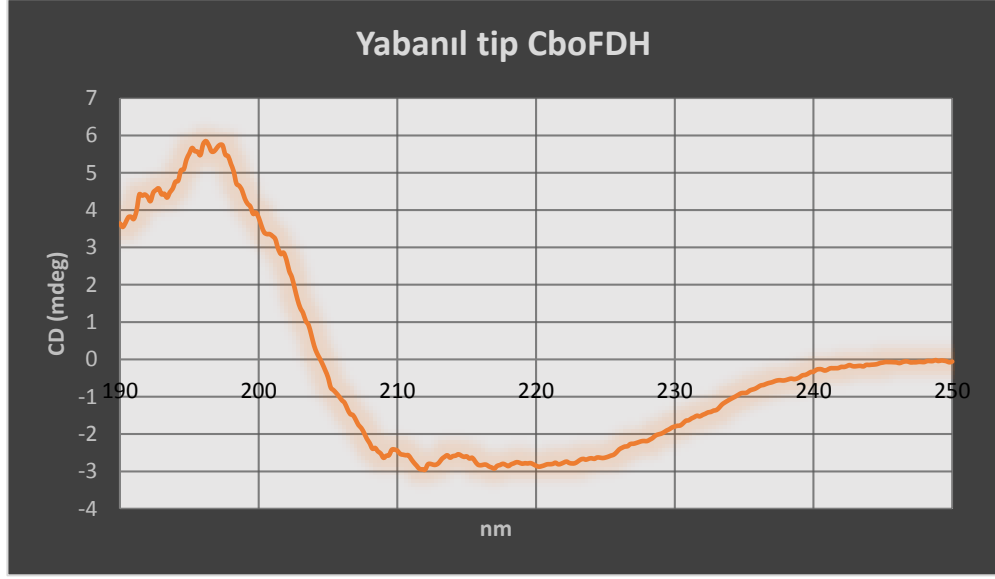
4.15 Dairesel Dikroizm Spektroskopisi (CD) Bulguları

CD spektroskopisi ile proteine ait ikincil yapı analizi yapıldı. Ayrıca sıcaklık / dalga boyu tarama programları kullanılarak yabancı tip CboFDH enziminin sıcaklığa bağlı CD spektrumları ve denatürasyon sıcaklığı (T_m) sıcaklığı tespit edildi.

4.15.1 Yabancı tip CboFDH'in ikincil yapısının belirlenmesi

Saflaştırma işlemlerinden sonra protein konsantrasyonu 8.5 mg/ml olan yabancı tip CboFDH enziminin konsantrasyonu kendi tamponu kullanılarak (sodyum fosfat, pH 7.4) 0.25 mg/ml'ye dilüe edildi. Ardından ikincil yapının analizi için 25 °C'de 190-260 nm dalga boyları arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) absorbans ölçümleri alındı. Ölçümler esnasında bant genişliği 1.00 nm, veri aralığı 0.2 nm, tarama hızı 50 nm/min, data aralığı 0.2 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD ve fotometrik mod da CD, HT, UV, Abs olarak alındı.

Çalışma sonucunda, *C. boidinii* FDH ikincil yapısında ağırlıklı olarak bulunan α -heliks yapısı, klonlanan yabancı tip CboFDH proteininde de gözlemlendi (Şekil 4.20).

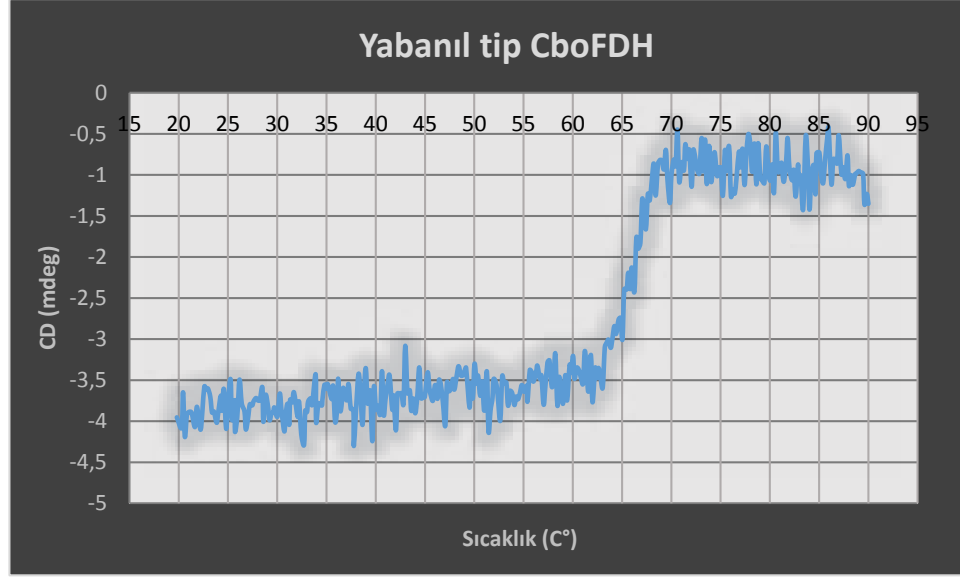


Şekil 4.20: Yabancı tip CboFDH' e ait α -heliks yapısı.

4.15.2 Yabancı tip CboFDH'in termal stabilite tayini

Protein konsantrasyonunu 0.25 mg/ml'ye ayarladığımız enzimin termal denatürasyon eğrisinin 3D yapısını elde etmek için numunemiz, 190-250 nm arasındaki spektrumda 25 °C ile 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) tarandı. Tarama sırasındaki ölçüm parametreleri, bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD, data ve veri aralığı 0.1 nm'ye, tarama hızı 50 nm/min ve fotometrik modlar CD, HT olarak ayarlandı. Ayrıca termal denatürasyon eğrisi için numunemiz yine 25 °C ile 95 °C arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) α -heliks yapısına spesifik 222 nm absorbansında ölçüldü. Ölçüm parametreleri ise bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD olarak alınmıştır. Fotometrik modlar ise CD, HT ve UV olarak ayarlandı.

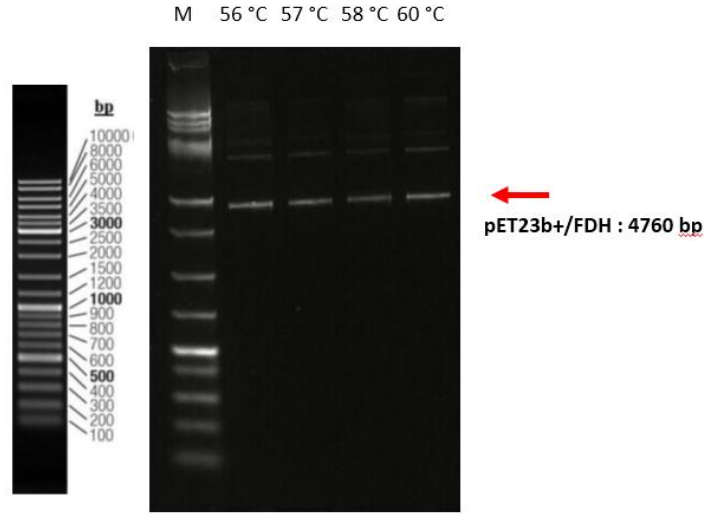
Çalışma sonucunda yabancı tip CboFDH için denatürasyon sıcaklığı 64 °C olarak bulundu. (Şekil 4.21).



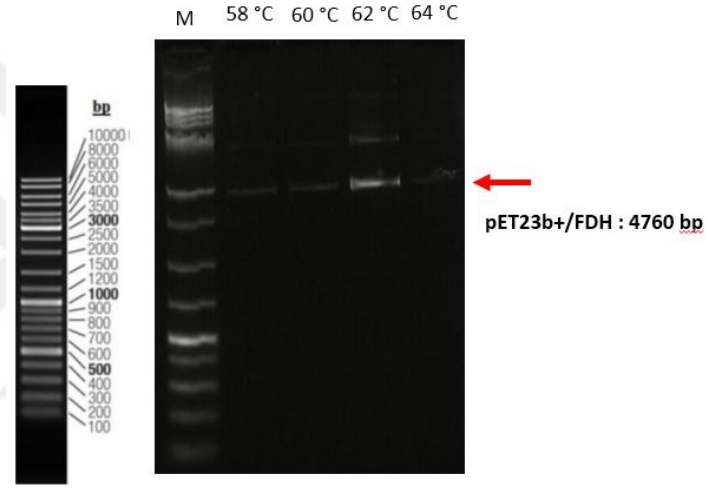
Şekil 4.21: Yabanıl tip CboFDH'e ait termal denatürasyon eğrisi.

4.16 Gradient PZR Bulguları

Biyoinformatik analiz için, kaynak olarak *CboFDH*'in kristal yapıları (PDB: 5ND9) kullanıldı. Özellikle aktif bölgede yer alan amino asit rezidüleri taranarak, 120., 285., 287. ve 311. pozisyonlarda, aktivite ve termal stabiliteyi arttırmayı hedefleyen aminoasit değişikliklerine karar verildi. Bu amaçla, Phe285Thr, Val120Thr, Gln287Glu ve His311Glu mutasyonlarına ve Phe285Thr/ His311Glu ve kombine mutasyonu tasarlandı. Primerler, bu mutasyonları oluşturmak üzere NEBasechanger ve OligoEvaluator programları kullanılarak dizayn edildi. Mutasyonları oluşturmadan önce her bir bölge için, tasarlanan primerlerin Tm sıcaklıklarını bulmak adına gradient PZR yapıldı (Şekil 4.22). Buna göre, Phe285Thr aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 57 °C, Val120Thr aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 62 °C, Gln287Glu aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 64 °C ve His311Glu aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 58 °C olarak bulundu.

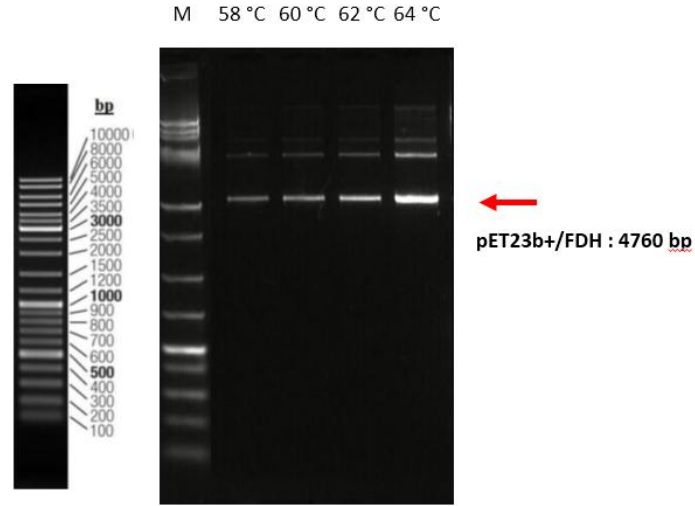


A

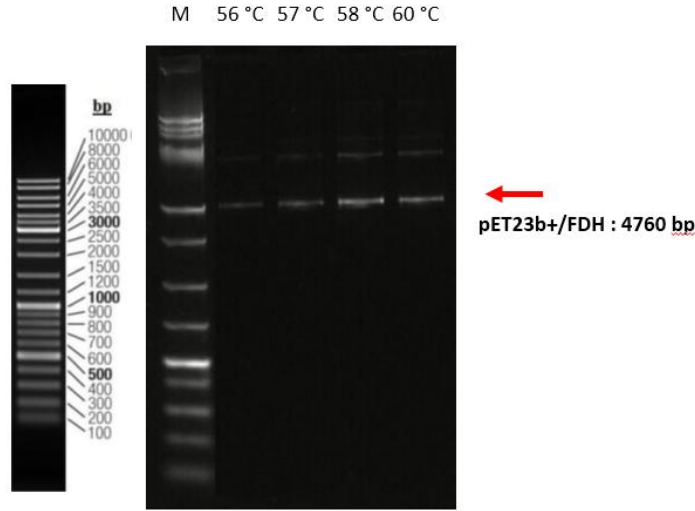


B

Şekil 4.22: Gradient PZR UV görüntüleri (M: DNA belirteç, A: Phe285ThrFDH için Tm: 57 °C, B: Val120ThrFDH için Tm: 62 °C, C: Gln287GluFDH, için Tm: 64 °C, D: His311GlnFDH için Tm: 58 °C).



C



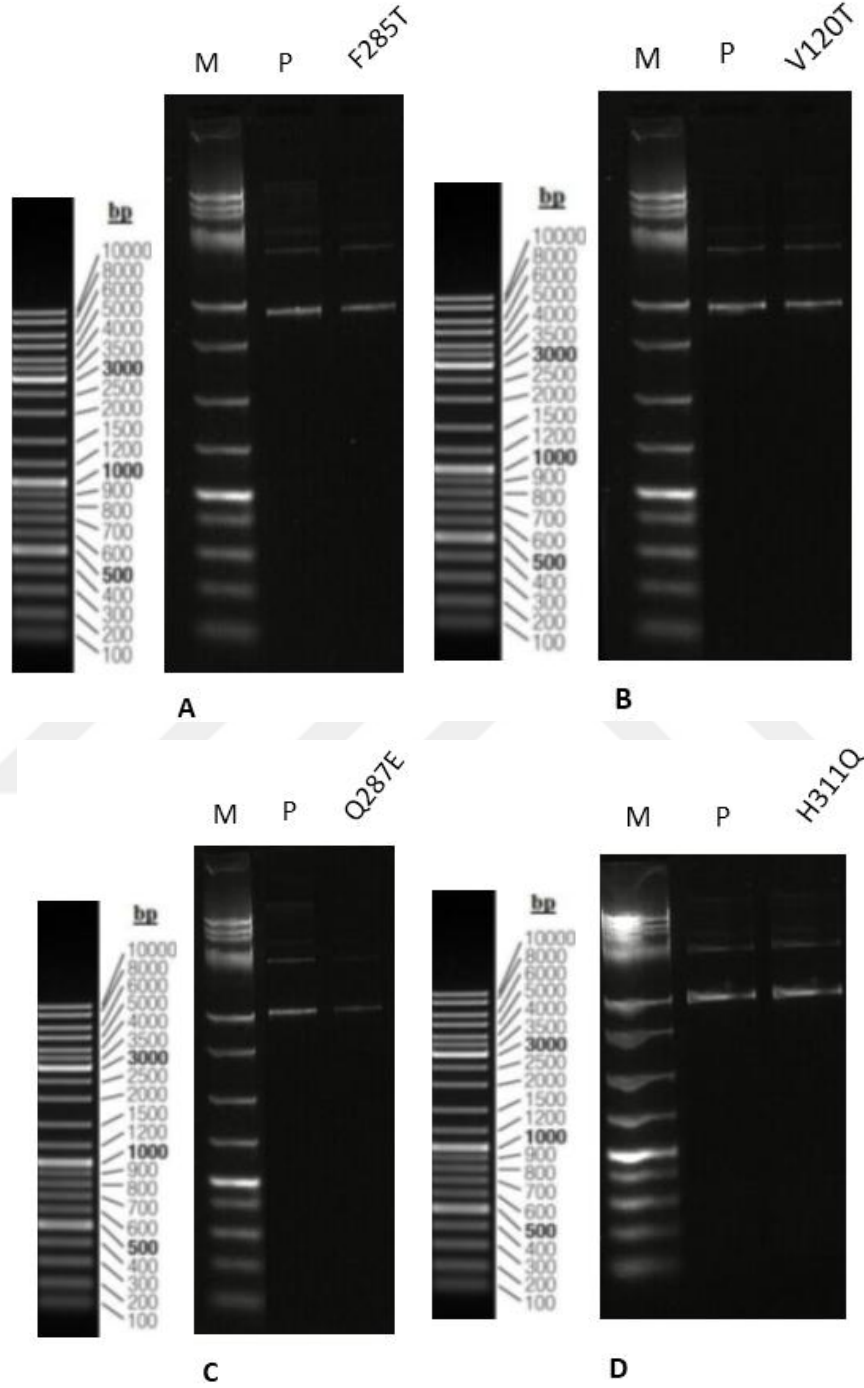
D

Şekil 4.22 (devam): Gradient PZR UV görüntüleri (M: DNA belirteç, A: Phe285ThrFDH için Tm: 57 °C, B: Val120ThrFDH için Tm: 62 °C, C: Gln287GluFDH, için Tm: 64 °C, D: His311GlnFDH için Tm: 58 °C).

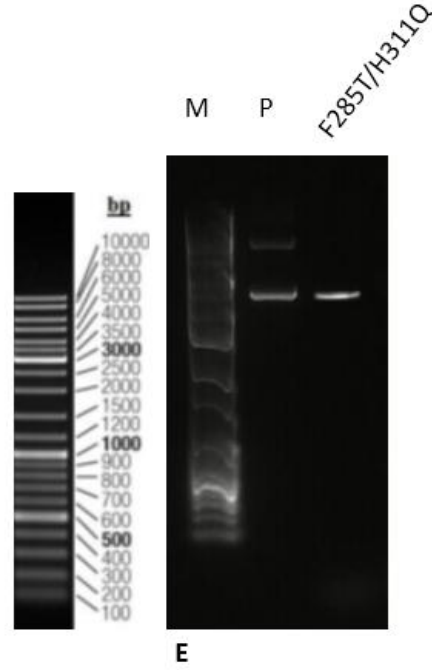
4.17 Bölgeye Yönelik Mutasyonların PZR Bulguları

Tm sıcaklıklarına gradient PZR sonuçları ile karar verildikten sonra 120. pozisyondaki valini treonine, 285. pozisyonadaki fenilalanini treonine, 287. pozisyonadaki glutamini glutamata, 311. pozisyonadaki histidini glutamine dönüştürmek ve hem 285. pozisyonda hem de 311. pozisyonda aynı anda 2 yerde mutasyon yapmak üzere ticari olarak temin edilen Q5 Site-Directed Mutagenesis kiti (New England Biolabs Inc, UK) ile PZR reaksiyonları yapıldı. Reaksiyonlar sonrasında, %1'lik agaroz jel hazırlanıp, jele sırasıyla 3 µl DNA belirteç ve 2 µl DNA yükleme boyası ile

karıştırılmış 5 µl PZR ürünleri yüklendi. Daha sonra 120 mA, 110 V'de 1 saat yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Bölgeye yönelik mutasyoların PZR UV görüntüleri (M: DNA belirteç, P: Plazmid (yababil tip CboFDH), A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH).

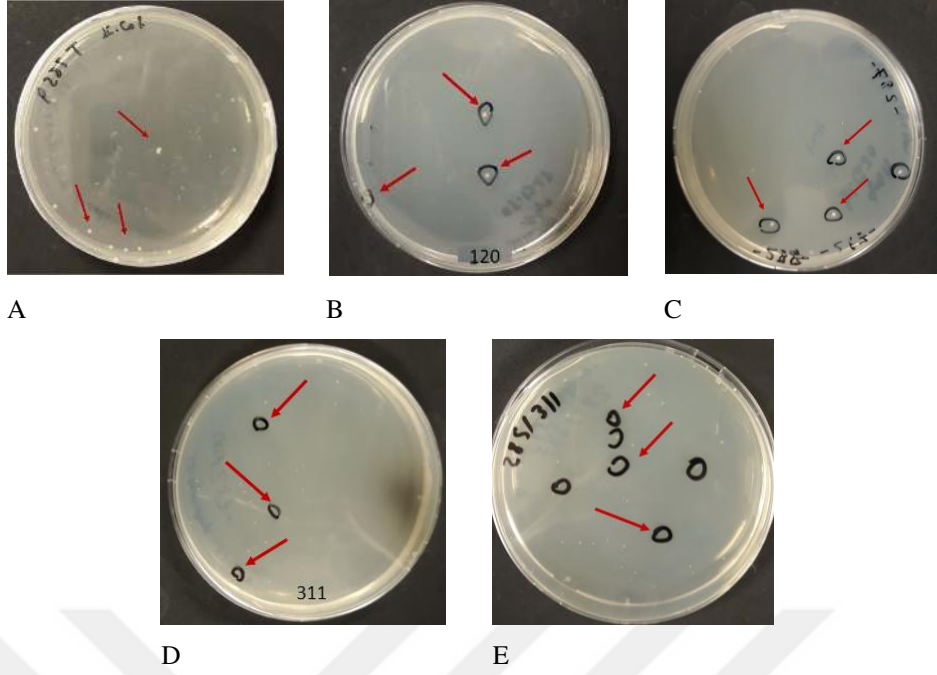


Şekil 4.23 (devam): Bölgeye yönelik mutasyoların PZR UV görüntüleri (M: DNA belirteç, P: Plazmid (yababil tip CboFDH) A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH).

PZR reaksiyonu sonrası ortamda karışık halde bulunan mutant ve yabanıl şablonların içerisinde, yabanıl tipleri uzaklaştırmak ve sadece mutant şablonun kalması sağlamak amacıyla KDL reaksiyonu yapıldı. KLD reaksiyonu, kinaz, ligaz ve DpnI enzimlerini içeren bir tampon ile gerçekleştirilir. Buradaki DpnI, PZR ürünlerindeki tüm GATC elemanlarındaki parenteral türleri yok eder. KLD reaksiyonu ticari olarak temin edilen Q5 Site-Directed Mutagenesis kiti (New England Biolabs Inc, UK) kullanılarak yapıldı.

4.18 Mutant FDH'lerin *E.coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

KLD reaksiyonu sonrasında her bir karışım *E. coli* BL12 (D3) kompetent hücrelerine transfer edildi. Transfer işleminden sonra hücreler, 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere yayıldı. 16 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılan petrilere koloni formlarının oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.24).

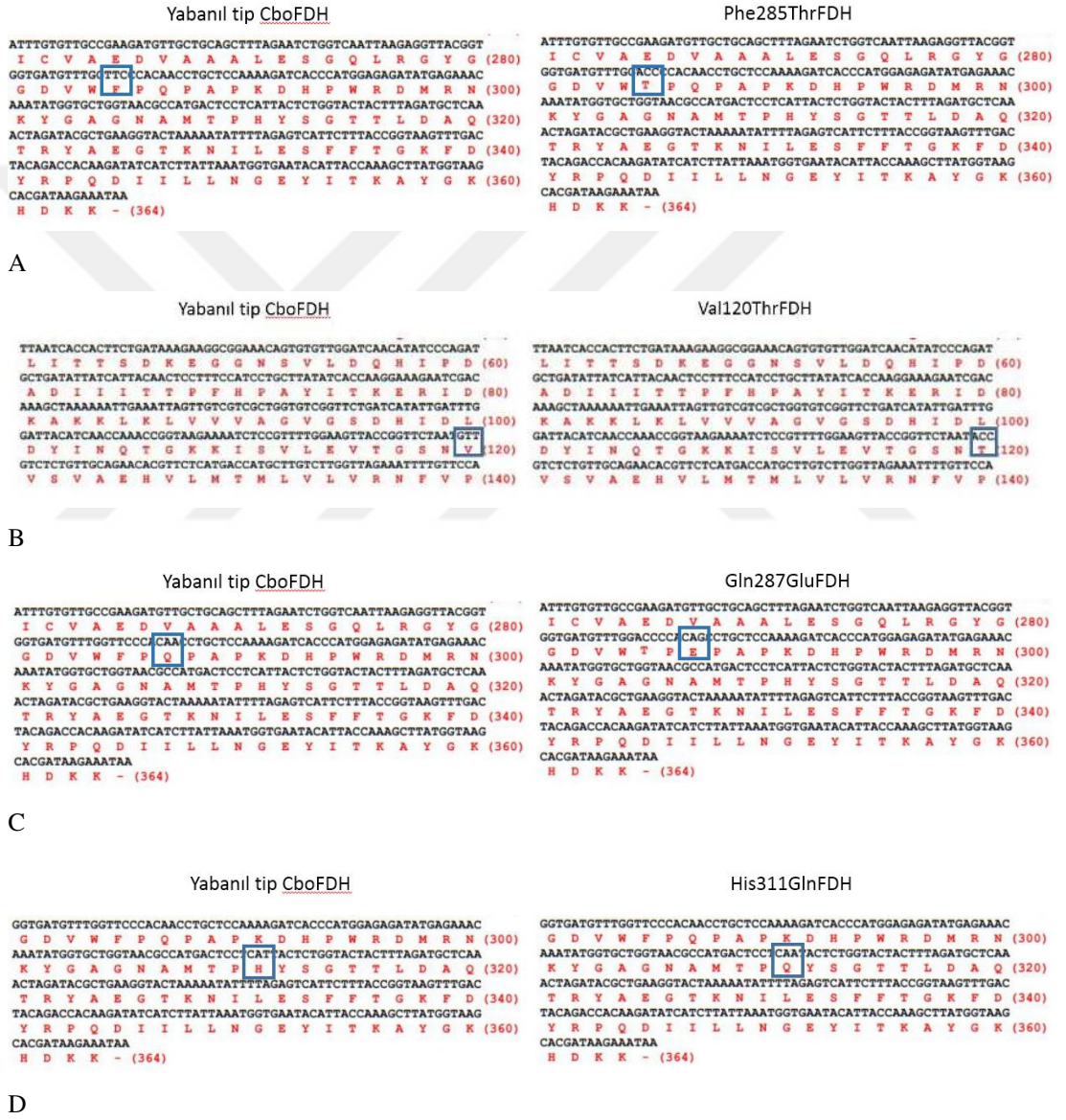


Şekil 4.24: Mutant FDH'lerin *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E:Phe285Thr/His311GlnFDH).

4.19 Mutasyonların Dizi Analizi Bulguları

LB agar petrilerde oluşan mutant koloniler, 50 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB broth besiyerine alınarak 37 °C'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcı üzerinde 16 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen ön kültür ile ticari olarak temin edilen Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, K0502, ABD) kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmidlerin DNA konsantrasyonları nanodrop cihazında (Maestrogen Inc, Taiwan) ölçüldü. Mutant proteinlerin DNA konsantrasyonları Phe285ThrFDH için 98 ng/µl, Val120ThrFDH için 103 ng/ µl, Gln287GluFDH için 112 ng/ µl, His311GlnFDH için 108 ng/ µl ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 106 ng/ µl olarak bulundu. Plazmidler daha sonra mutasyonların doğruluğunu teyit etmek için sekans analizine gönderildi. Dizi analizi, Sanger Coulson'un zincir sonlama yöntemi, ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı kullanarak Sentromer DNA Teknolojileri firması tarafından gerçekleştirildi. Elde edilen sekans sonuçları Bioedit ve Snapgene programları kullanılarak daha önce elde ettiğimiz yabancı tip CboFDH sekansları ile alignent yapılarak karşılaştırıldı. Buna göre, 120., 285., 287., 311. ve hem 285 hem 311. pozisyonlarda istenen aminoasit değişikliklerinin gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 4.25). Dizi analizi sonuçlarına göre 285. pozisyonundaki aminoasit

değişimi 853-854-855. bazlara denk geldiğinden değişim TTC853ACC şeklinde; 120. pozisyondaki aminoasit değişimi 358-359-360. bazlara denk geldiğinden değişim GTT358ACC şeklinde; 287. pozisyondaki aminoasit değişimi 859-860-861. bazlara denk geldiğinden değişim CAA859CAG şeklinde; 311. pozisyondaki aminoasit değişimi 931-932-933. bazlara denk geldiğinden değişim CAT931CAA şeklinde olmuştur. F285T/H311QFDH kombine mutasyonunda ise 285. pozisyonda fenilalaninin treonine değişimi gerçekleştirildikten sonra 311. pozisyondaki mutasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.25: Mutasyonların dizileme sonuçları (A: Phe285Thr değişimi, B: Val120Thr değişim, C: Gln287Glu değişimi, D: His311Gln değişimi, E: Phe285Thr değişimi üzerinde His311Gln değişimi).

Phe285ThrFDH	Phe285Thr/His311GlnFDH
ATTGTGTTGCCGAAGATGTTGCTGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGT I C V A E D V A A A L E S G Q L R G Y G (280) GGTGATGTTTGACCCACCAACCTGCTCCAAAAGATCACCATGGAGAGATATGAGAAAC G D V W T P Q P A P K D H P W R D M R N (300) AAATATGGTGTGTTAAGCCATGACTCCCATCTACTGTTACTACTTTAGATGCTCAA K Y G A G N A M T P H Y S G T T L D A Q (320) ACTAGATACGCTGAAGTACTAAAAATATTTAGAGTCATTCTTTACCGGTAAGTTGAC T R Y A E G T K N I L E S F F T G K F D (340) TACAGACCACAAGATATCATCTTTAAATGGTGAATACATTACCAAGCTTATGGTAAG Y R P Q D I I L L N G E Y I T K A Y G K (360) CACGATAAGAAATAA H D K K - (364)	ATTGTGTTGCCGAAGATGTTGCTGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGT I C V A E D V A A A L E S G Q L R G Y G (280) GGTGATGTTTGACCCACCAACCTGCTCCAAAAGATCACCATGGAGAGATATGAGAAAC G D V W T P Q P A P K D H P W R D M R N (300) AAATATGGTGTGTTAAGCCATGACTCCCATCTACTGTTACTACTTTAGATGCTCAA K Y G A G N A M T P Q Y S G T T L D A Q (320) ACTAGATACGCTGAAGTACTAAAAATATTTAGAGTCATTCTTTACCGGTAAGTTGAC T R Y A E G T K N I L E S F F T G K F D (340) TACAGACCACAAGATATCATCTTTAAATGGTGAATACATTACCAAGCTTATGGTAAG Y R P Q D I I L L N G E Y I T K A Y G K (360) CACGATAAGAAATAA H D K K - (364)

E

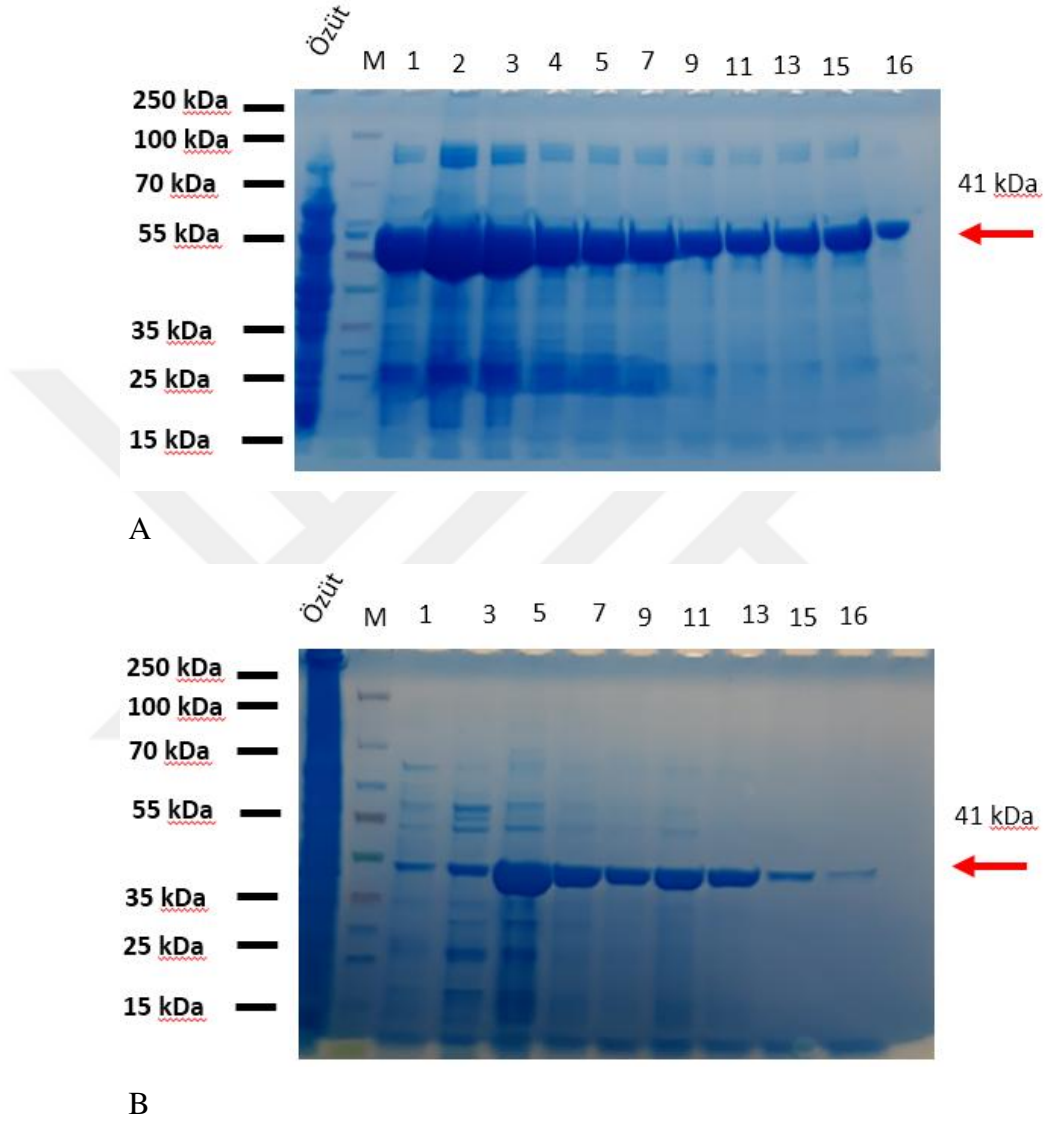
Şekil 4.25 (devam): Mutasyonların dizileme sonuçları (A: Phe285Thr değişimi, B: Val120Thr değişim, C: Gln287Glu değişimi, D: His311Gln değişimi, E: Phe285Thr değişimi üzerinde His311Gln değişimi).

4.20 Mutant FDH'lerin Protein İfadelerinin Bulguları

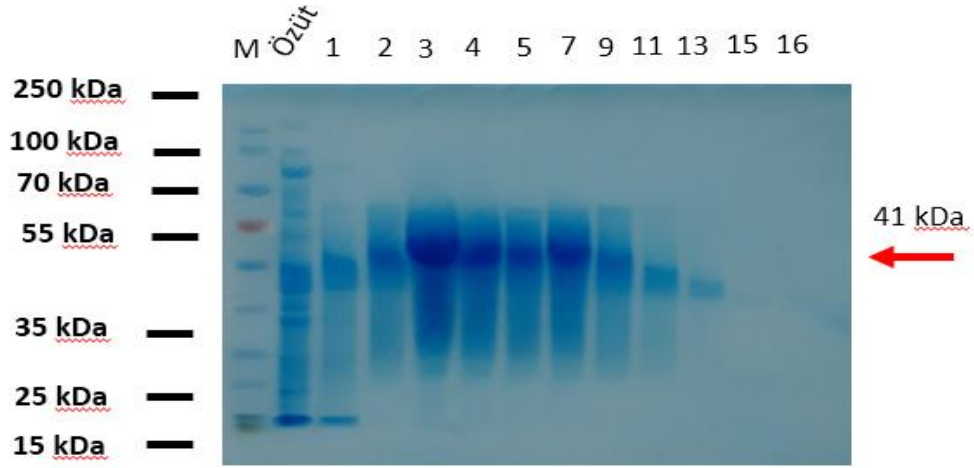
E. coli BL 21 hücrelerine transfer edilen mutant FDH'lerin protein ekspresyonlarında lac operonunun indüksiyonu için maliyeti yüksek olan IPTG yerine laktoz içeren Studier oto indüksiyon media kullanıldı. Ön kültürü 20 ml 50 µg/ml ampicilin içeren LB sıvı besiyerinde hazırlanan hücreler 50 µg/ml ampicilin içeren Studier oto indüksiyon media içerisine inoküle edildi. İnokülasyon sonrası hücreler 30 °C'de 200 x rpm'de orbital çalkalayıcıda 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj işlemlerine tabi tutularak tüm mutantlara ait peletler elde edildi. Daha sonra peletler pH 7.4 sodyum fosfat tamponu ile homojenize edildi. İntraselüler bir enzim olan FDH'in hücrelerden dışarı çıkarılabilmesi için homojenatlar lizozim ile muamele edildikten sonra sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Sonikasyon işleminden sonra homojenatlar 10000 x rpm'de 1 saat +4 °C'de santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatantlar 0.45µm'lik filtreden geçirilip temiz falkon tüplere alındı. Mutant proteinler N-terminal kısmında His-Tag bölümüne sahip olduğundan, histidine afinite gösteren ticari olarak temin edilmiş 1 ml Ni-NTA agaroz kolon (Thermo scientific, Pierce HisPure Ni-NTA Spin Columns, ABD) ile saflaştırma işlemleri yapıldı. Mutant proteinleri farklı imizadol konsantrasyonlardaki tamponlar ile kolondan geçirdikten sonra, ilk geçirilen protein örneği, Buffer A, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve Buffer B olmak üzere her bir mutant proteine ait 19'ar protein örneğimiz oldu.

4.20.1 Mutant FDH'lerin SDS-PAGE analizi bulguları

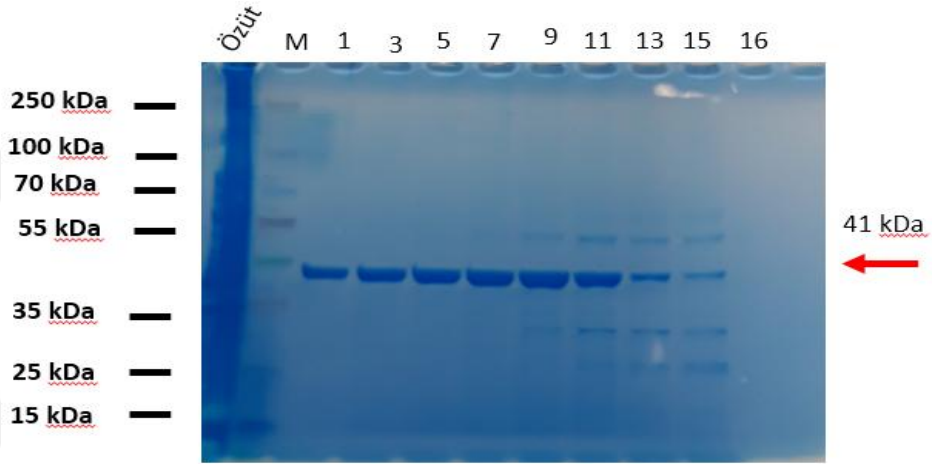
Her bir mutanta ait protein örnekler ve protein belirteç, jellere yüklendikten sonra 120 mA, 100 V'de 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi sonrası jeller, Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyandı (Şekil 4.26).



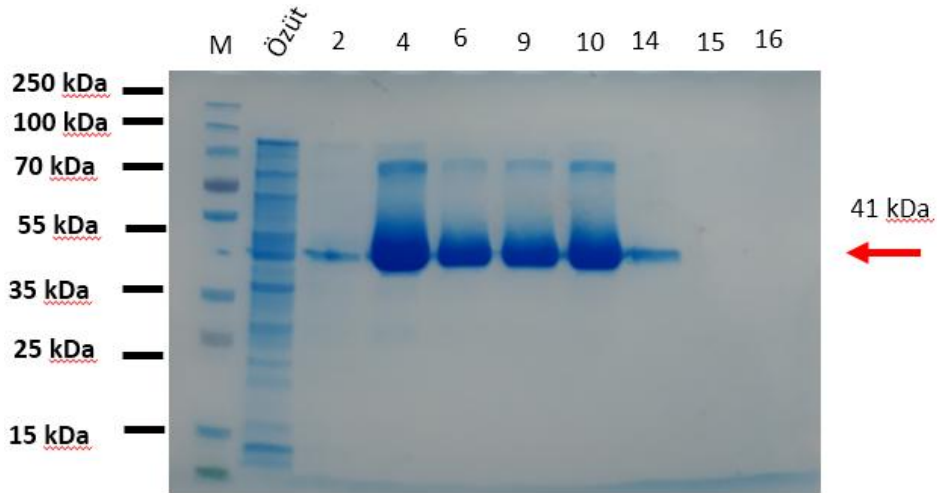
Şekil 4.26: Mutant FDH'lerin SDS-PAGE analizi görüntüleri (A: Phe285ThrFDH, B: Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E:Phe285Thr/His311Gln FDH, Özüt: Saflaştırma sonrası kolondan geçirilmemiş örnek, 1-16: Farklı imidazol konsantrasyonlu tamponlardan geçirilmiş protein elüsyonları).



C



D



E

Şekil 4.26 (devam) : Mutant FDH'lerin SDS-PAGE analizi görüntüleri (A: Phe285ThrFDH, B: Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E:Phe285Thr/His311Gln FDH, Özü: Saflaştırma sonrası kolondan geçirilmemiş örnek, 1-16: Farklı imidazol konsantrasyonlu tamponlardan geçirilmiş protein elüsyonları).

4.20.2 Mutant FDH'lerin protein miktar tayini bulguları

SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre her mutant enzim için ekspresyonu fazla olan protein numunelerinden tek bir havuz oluşturularak üzerleri sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile 50 ml'ye tamamlandı. 5 farklı mutant enzim çözeltisi yapıdaki imizadolü uzaklaştırmak için ultrafiltrasyon (Amicon Ultra-15 santrifugaton tube Millipore, ABD) işlemine tabi tutuldu. Ardından yine aynı amaç için mutant enzimler bir de PD-10 (GE Healthcare, ABD) kolondan geçirildi. Tüm bu işlemlerin ardından mutant enzimlerimizdeki protein miktarı, Bradford yöntemi ile 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) ölçüldü. Protein konsantrasyonları, Phe285ThrFDH için 8.5 mg/ml, Val120ThrFDH için 8.2 mg/ml, Gln287GluFDH için 5.5 mg/ml, His311GlnFDH için 6.4 mg/ml ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 7.3 mg/ml olarak bulundu.

4.20.3 Mutant FDH'lerin Western Blot analizi bulguları

Mutant enzimlerdeki FDH proteini varlığı Western Blot (western blot system, Biorad, ABD) analizi ile doğrulandı. Protein miktarları belirlenen mutFDH enzimlerine Western Blot analizi için jele yüklenmeden önce protein denatürasyon işlemi yapıldı. Ardından protein belirteç ile birlikte jele yüklenen mutFDH'ler; 120 mA, 100 V'de 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, nitroselülez membrana transfer edildi (Transblot system, Biorad, ABD). Yıkama basamaklarının ardından membran Anti-Histag primer antikor (Abcam, ABD) ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Seconder antikor (Abcam, ABD) ile yeniden inkübe edilen membrandaki bantlar yıkama basamaklarının ardından ticari olarak temin edilen görüntüleme kiti (Santa cruz, ABD) ile görüntüleme cihazında (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, France) görüntülendi (Şekil 4.27). 41 kDa beklenen protein bantlarımız beklenen bölgede saptandı.



Şekil 4.27: Mutant FDH'lerin Western Blot analizi görüntüleri (1:Phe285ThrFDH, 2:Val120ThrFDH, 3:Gln287GluFDH, 4: His311GlnFDH, 5:Phe285Thr/His311Gln FDH).

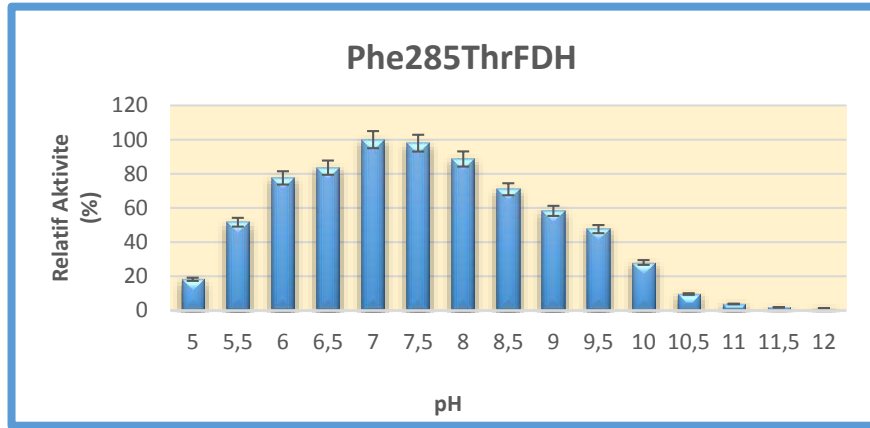
4.21 Mutant FDH Enzimlerin Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular

Saflaştırılan ve Western Blot analizi ile beklendiği şekilde 41 kDa'da bant verdiği tespit edilen Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDHFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH enzimlerine ait aktivite çalışmalarında ilk olarak enzimlerin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Ardından K_M ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi için değişen konsantrasyonlarda substrat, koenzim ve enzime karşı aktivite ölçümleri alındı.

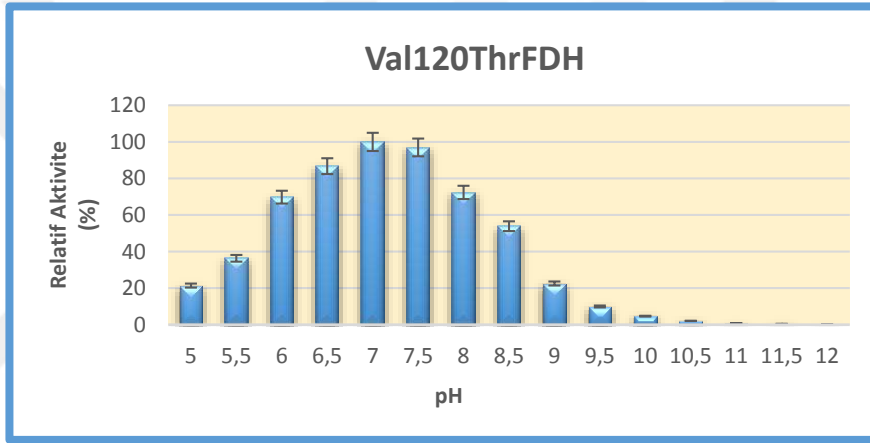
4.21.1 Farklı pH değerlerinin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

Optimum pH şartlarını belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (pH 5-12) hazırlanan tamponlar kullanıldı. pH 5-5.5 aralığı için asetat tamponu (0.2 M), pH 6-7 aralığı için sodyum fosfat tamponu (0.2 M), pH 7-9 aralığı için tris tamponu (0.1 M), pH 9-11 aralığı için Glisin-NaOH (0.1 M) tamponu, pH 11.5-12 için ise KCl-NaOH (0.1 M) tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar, 20 mM sodyum format, 4 mM NAD^+ ve 0.5 mg/ml mutFDH (Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDHFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH) varlığında gerçekleştirildi. Aktivite ölçümleri her bir pH aralığı için üç tekrarlı olacak şekilde, 25 °C sıcaklıkta ve 340 nm absorbandsda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Çalışma sonucunda Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDHFDH enzimleri için optimum pH 7 olarak belirlenirken; kombine

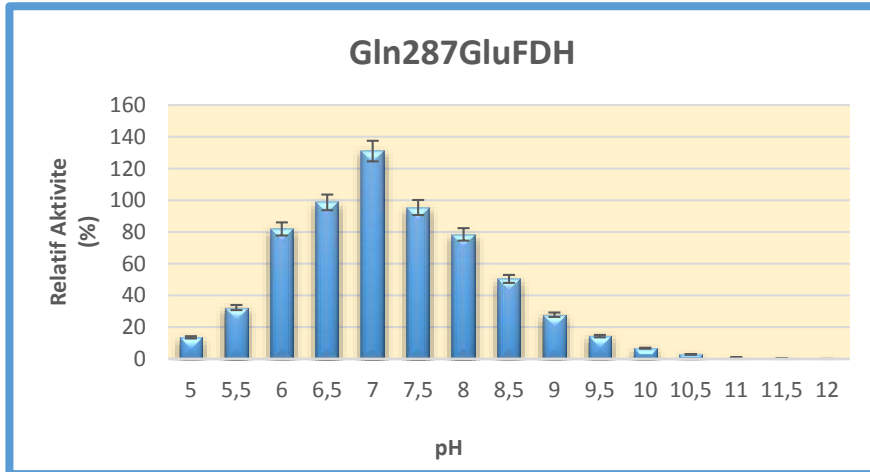
mutasyon yapılan Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için optimum pH 8 olarak belirlendi (Şekil 4.28).



A

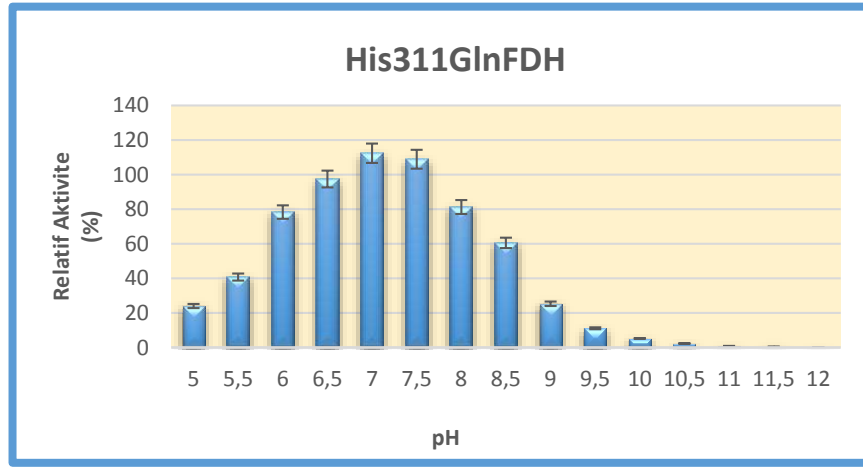


B

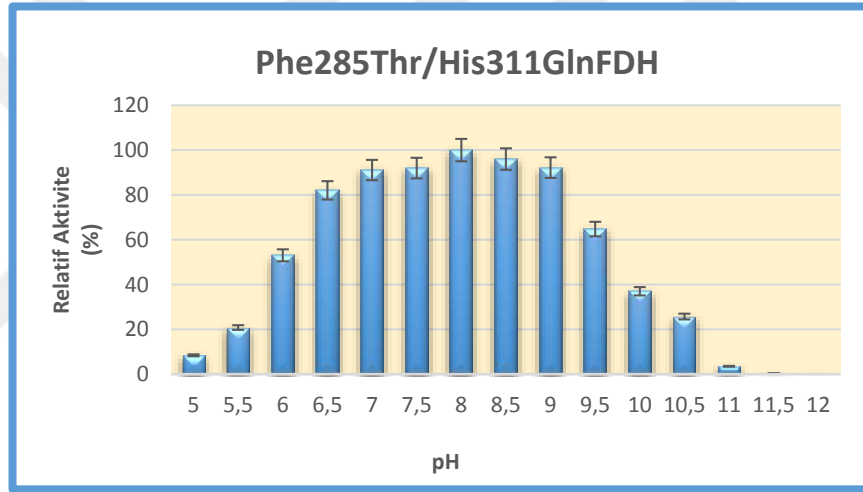


C

Şekil 4.28: Mutant enzimlerde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı pH değerlerinin aktiviteye etkisi.



D



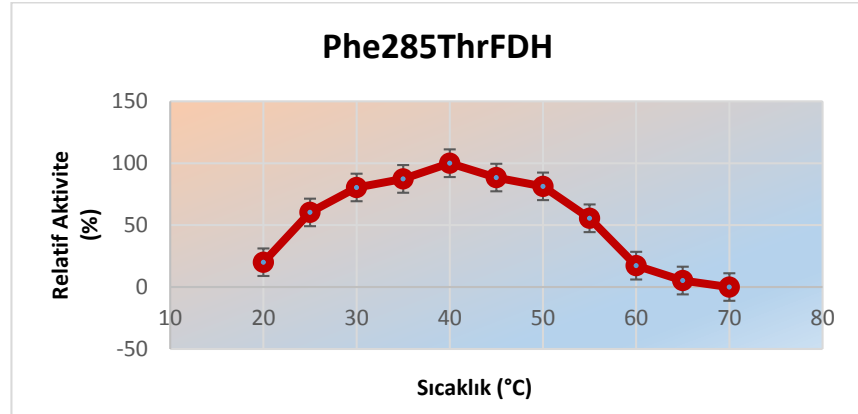
E

Şekil 4.28 (devam): Mutant enzimlerde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı pH değerlerinin aktiviteye etkisi.

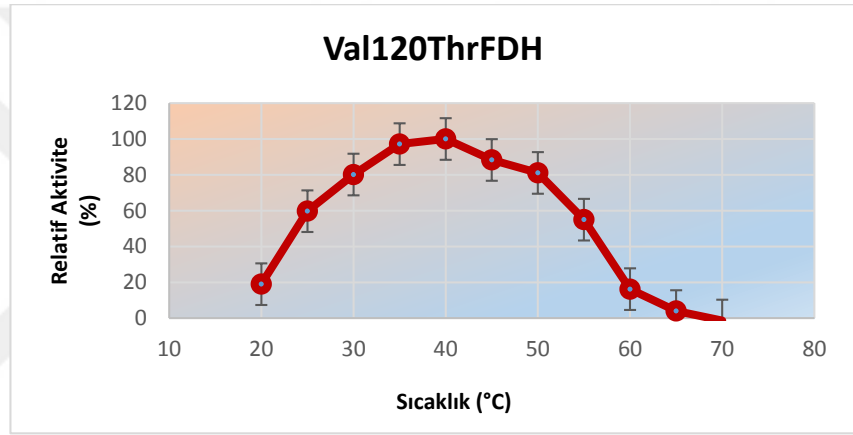
4.21.2 Farklı sıcaklık değerlerinin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

Optimum sıcaklık şartlarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (20°C-90°C) aktivite ölçümleri, 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon, Phe285ThrFDH, Val120ThrFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH enzimeri için pH 7 ve Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için pH 8 tampon ortamında ayrı ayrı: 20 mM sodyum format, 4 mM NAD⁺ ve 0.5 mg/ml mutant enzim varlığında gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda optimum sıcaklık değerleri Phe285ThrFDH için 40 °C, Val120ThrFDH için 40 °C,

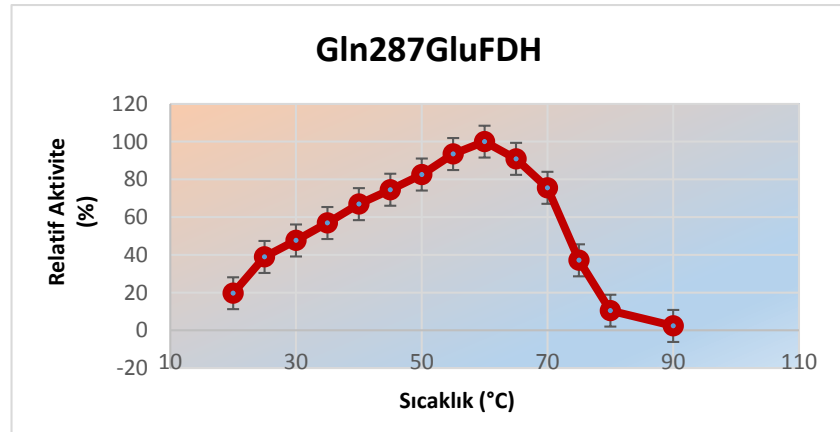
Gln287GluFDH için 60 °C, His311GlnFDH için 65 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH 65 °C olarak bulundu (Şekil 4.29).



A

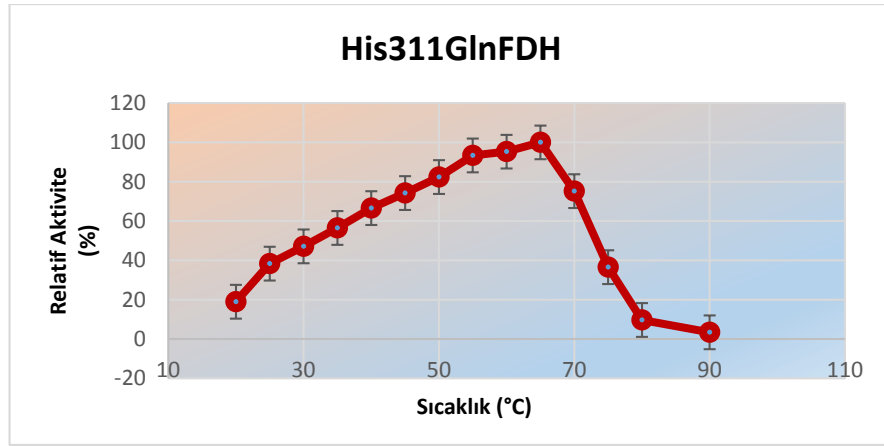


B

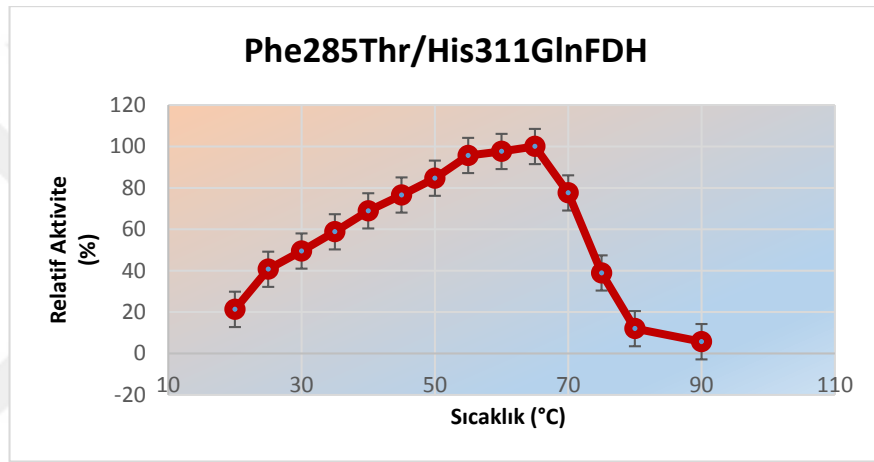


C

Şekil 4.29: Mutant enzimlerde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı sıcaklık değerlerinin aktiviteye etkisi.



D



E

Şekil 4.29 (devam): Mutant enzimlerde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı sıcaklık değerlerinin aktiviteye etkisi.

4.21.3 Mutant enzimlerin kinetik hesaplamalarına ait bulgular

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını belirleyebilmek için mutFDH enzimlerine ait kinetik hesaplamalar yapıldı. K_M , V_{max} ve K_{cat} değerlerinin hesaplanabilmesi için ilk olarak farklı konsantrasyonlardaki substrat, koenzim ve enzime karşı aktivite tayinleri alınarak, Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk denklemlerinin de yardımıyla hesaplamalar yapıldı.

Çalışmaya başlamadan önce format (100mM) ve NAD (20 mM) stokları dH_2O ile hazırlandı. Mutant enzimlerin kinetik çalışmalarında oluşturulacak reaksiyon ortamlarının her birinin toplam hacmi 200 μl olarak belirlendi. Reaksiyon ortamlarında

belirlenen konsantrasyonlarda bulunması gereken bileşenlerin, ana stoklardan ortama ne kadar konulacağı hesaplandı. Reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda konulan bileşenlerden reaksiyonun substratı olan format, ortama en son konuldu. Ortama substratın ilavesi ile başlayan reaksiyonlara ait absorpsiyonlar 10 dk boyunca 10 sn aralıklarla olacak şekilde 340 nm'de ölçüldü. Daha sonra, Δ Absorbans / dakikanın mutlak değerleri kullanılarak her bir çözüm için değerler;

V_0 , hız (U/L): $(\Delta A / dk \times T.V.(ml) \times 10^6) / (\epsilon \times d \times N.V(ml))$ denklemli Beer Kanunu ile hesaplandı. Buradaki 'ε' molar absorptivite anlamına gelir. Deneylerde, enzim aktivitesini belirlemek için oluşan NADH miktarı baz alındı, hesaplamalarda NADH'nin molar absorptivitesi $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak kullanıldı. 'd' ışık yolunun uzunluğunu temsil eder ve 1 cm'dir. 'T.V.' çözeltinin toplam hacmine göre 'N.V.' ise reaksiyon esnasında kullanılan enzimin hacmi dikkate alınarak formüle uygulandı.

Elde edilen değerler ile ilk olarak Michaelis-Menten eğrisi çizildi. Daha sonra V_{max} ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Bu eğrinin çizimi esnasında $1/V_0$ ve $1/S$ değerleri kullanıldı. Buna göre y eksenini $1/V_{max}$ 'ı temsil ederken x eksenini $-1/K_M$ 'i temsil eder. V_{max} ve K_M değerleri her değişken için hesaplandıktan sonra enzimin K_{cat} değeri, $V_{max} / [E]$ formülü ile hesaplandı. Daha sonra bulunan bu değerler kullanılarak enzimin K_{cat}/K_M oranı ve spesifik aktivite (enzim aktivitesi/toplam protein miktarı) ve buna bağlı olarak relatif aktivite değerleri hesaplandı.

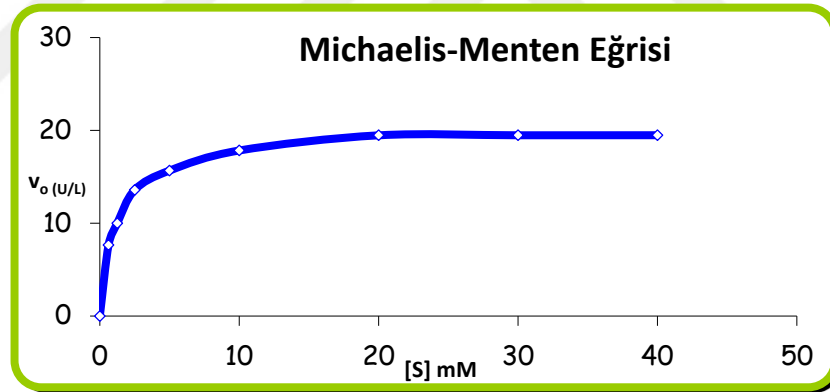
4.21.3.1 Değişen substrat konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

FDH enzimi substrat olarak formata mutlak spesifite gösterir. Bu yüzden farklı konsantrasyonlardaki substrat ortamlarında aktivite ölçümleri yapılarak mutFDH enzimlerinin K_M , K_{cat} ve V_{max} değerleri hesaplandı. Reaksiyonların ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonu Tablo 4.7'de verilmiştir. Aktivite ölçümleri her bir konsantrasyon için üç tekrarlı olacak şekilde, 340 nm absorpsiyon mikropiplak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.30'da verilmiş olup V_{max} ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılmıştır. V_{max} , K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen

denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki y eksenini $1/V_{max}$ 'i temsil ederken, x eksenini $-1/K_m$ değerini temsil etmektedir.

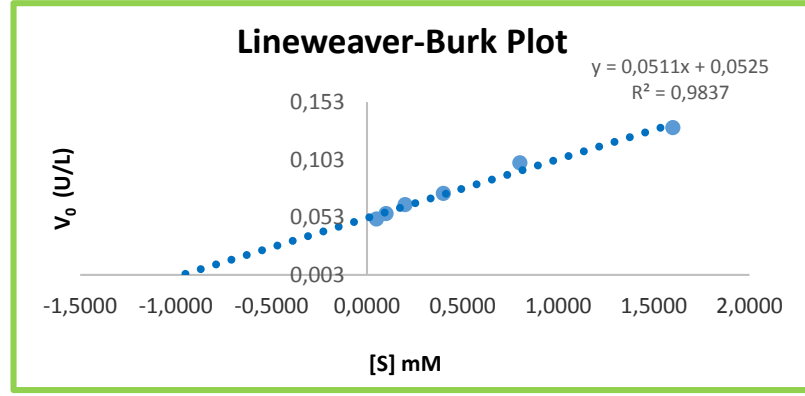
Tablo 4.7: mutFDH'ler için değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

Mutant FDH Enzimi	Seçilmiş Format	Enzim	NAD ⁺	pH	Sıcaklık °C
	Konsantrasyonları				
Phe285ThrFDH	0.625 mM-40 mM	0.5 mg/ml	4 mM	7	25
Val120ThrFDH	0.625 mM-40 mM	0.5 mg/ml	4 mM	7	25
Gln287GluFDH	0.625 mM-40 mM	0.5 mg/ml	4 mM	7	25
His311GlnFDH	0.625 mM-40 mM	0.5 mg/ml	4 mM	7	25
Phe285Thr/His311GlnFDH	0.625 mM-40 mM	0.5 mg/ml	4 mM	8	25

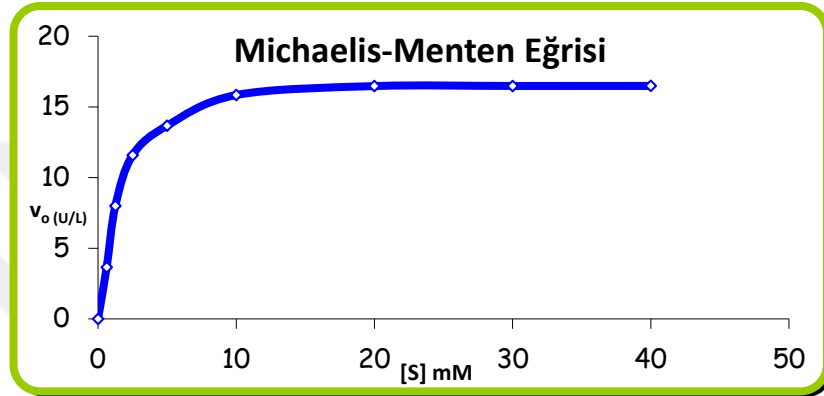


A1

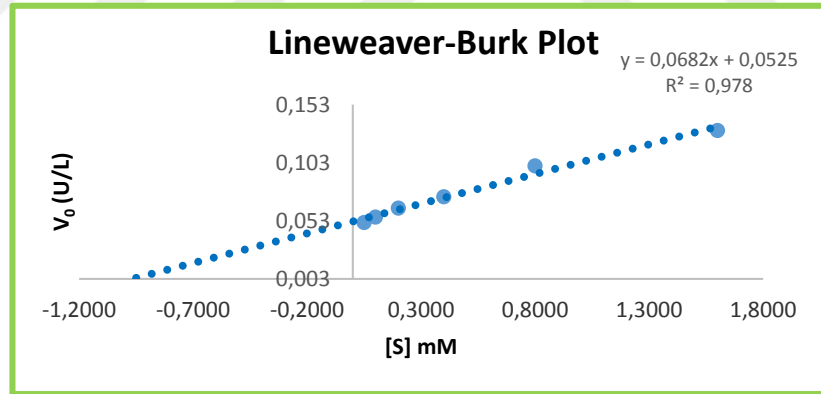
Şekil 4.30: Değişen substrat konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2:Gln287GluFDH; D1,D2:His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



A2

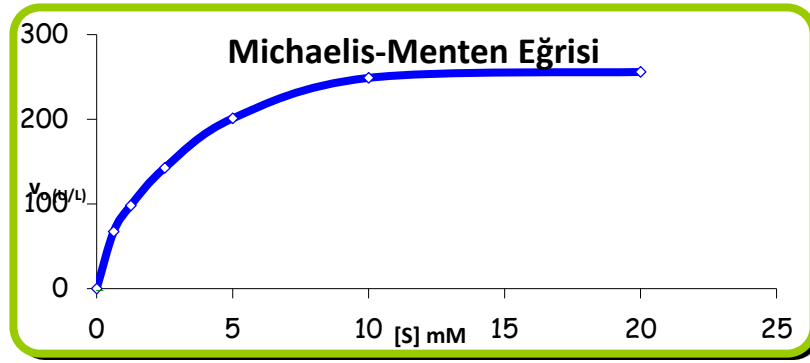


B1

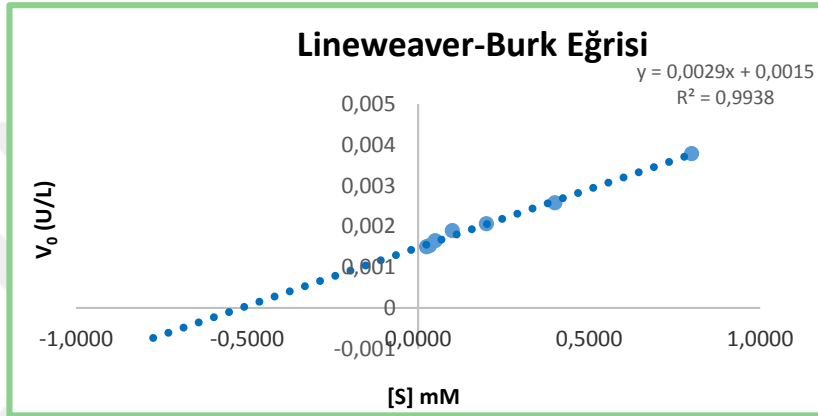


B2

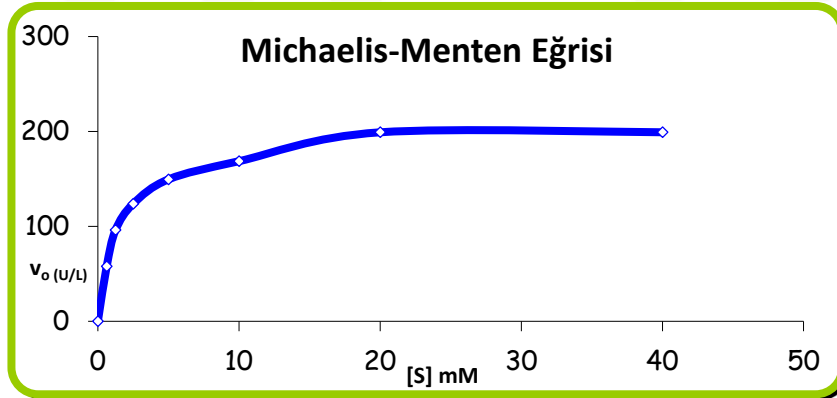
Şekil 4.30 (devam): Değişen substrat konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2:Gln287GluFDH; D1,D2:His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



C1

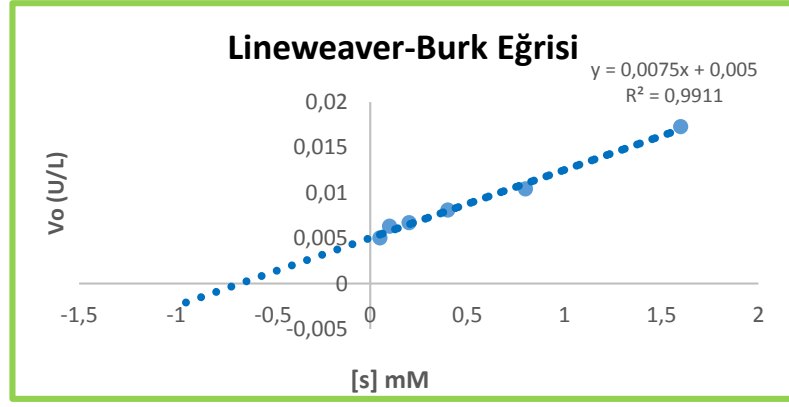


C2

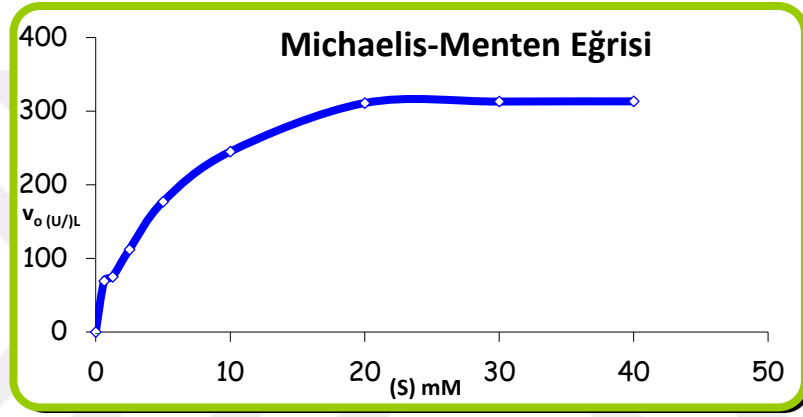


D1

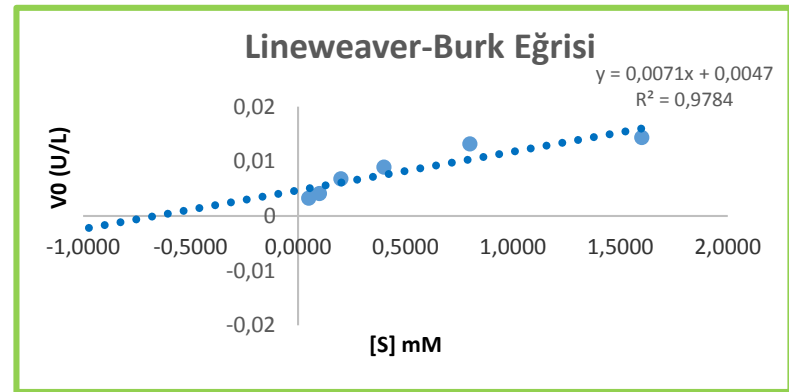
Şekil 4.30 (devam): Değişen substrat konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2:Gln287GluFDH; D1,D2:His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



D2



E1



E2

Şekil 4.30 (devam): Değişen substrat konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2:Gln287GluFDH; D1,D2:His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).

Tablo 4.8: mutFDH enzimlerinin format kinetik değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Phe285ThrFDH	0.97	0.019	6.23×10^3	6.4×10^3
Val120ThrFDH	1.3	0.019	6.23×10^3	4.79×10^3
Gln287GluFDH	1.65	0.27	4.42×10^3	2.67×10^3
His311GlnFDH	1.5	0.2	3.28×10^3	2.18×10^3
Phe285Thr/His311GlnFDH	1.4	0.212	6.95×10^3	4.96×10^3

4.21.3.2 Değişen koenzim konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

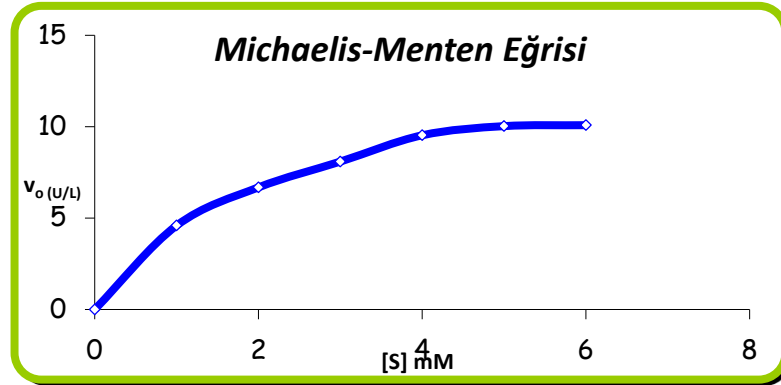
NAD⁺-bağımlı FDH, formatın karbondioksite dnüşmesini NAD'ın NADH'a redüksiyonu ile katalizler. Farklı koenzim konsantrasyonlarına karşı alınan enzim aktivite ölçümleri ile mutFDH'lere ait NAD için K_m , K_{cat} ve V_{max} değerleri hesaplandı. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonu Tablo 4.9'da verilmiştir. Aktivite ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde, 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alınmıştır.

Tablo 4.9: Değişen koenzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

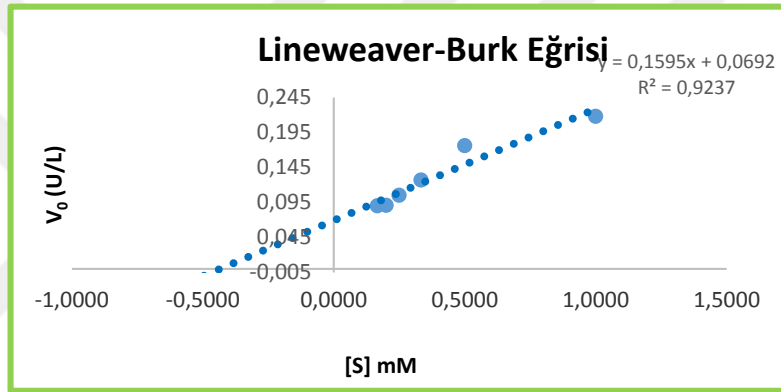
Mutant FDH Enzimi	Seçilmiş Konsantrasyonları	NAD ⁺ Enzim	Format	pH	Sıcaklık °C
Phe285ThrFDH	1 mM-6 mM	0.5 mg/ml	1 mM	7	25
Val120ThrFDH	1 mM-6 mM	0.5 mg/ml	1.3 mM	7	25
Gln287GluFDH	1 mM-6 mM	0.5 mg/ml	2 mM	7	25
His311GlnFDH	1 mM-6 mM	0.5 mg/ml	1.5 mM	7	25
Phe285Thr/His311GlnFDH	1 mM-6 mM	0.5 mg/ml	1.4 mM	8	25

Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri şekil 4.31'de verilmiş olup V_{max} ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılmıştır. V_{max} , K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden

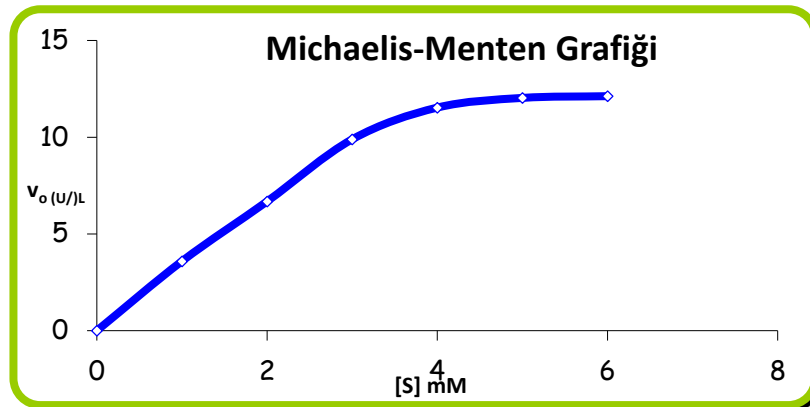
elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki y eksenini $1 / V_{max}$ 'ı temsil ederken, x eksenini $-1 / K_m$ değerini temsil etmektedir. Çalışma sonucunda mutFDH enzimlerinin koenzimi olan NAD^{+} 'a ait kinetik değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir.



A1

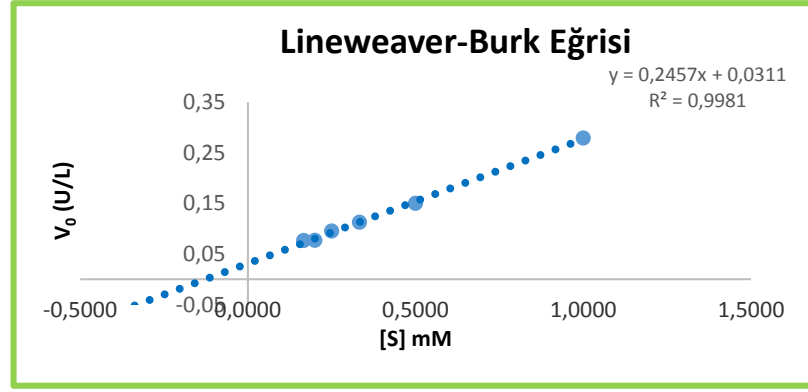


A2

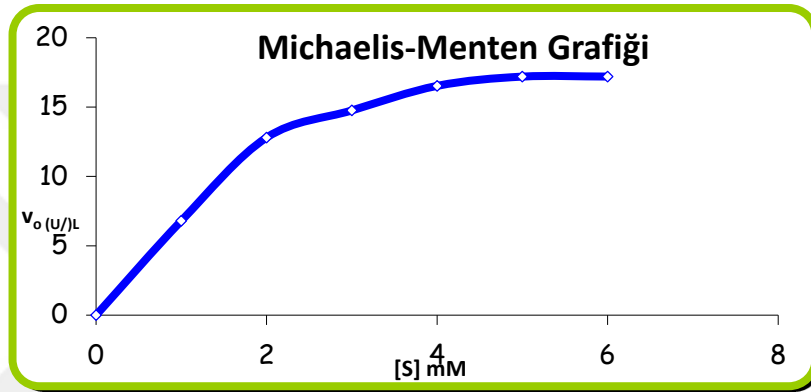


B1

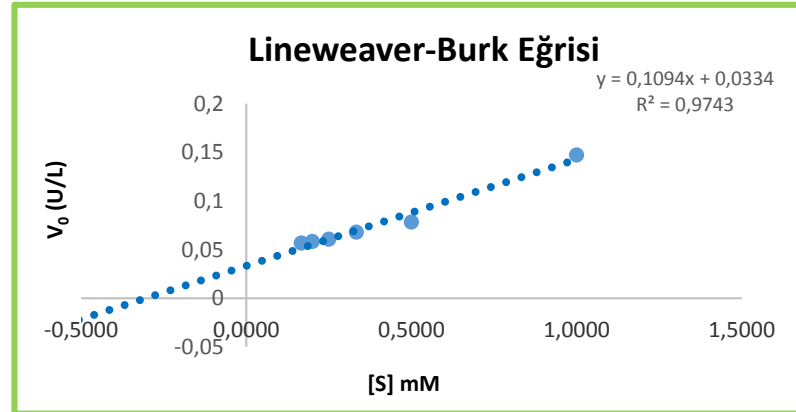
Şekil 4.31: Değişen koenzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2: Gln287GluFDH; D1,D2 His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



B2

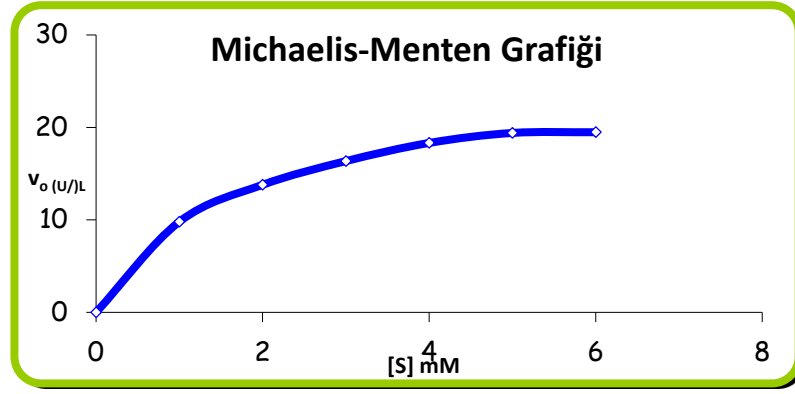


C1

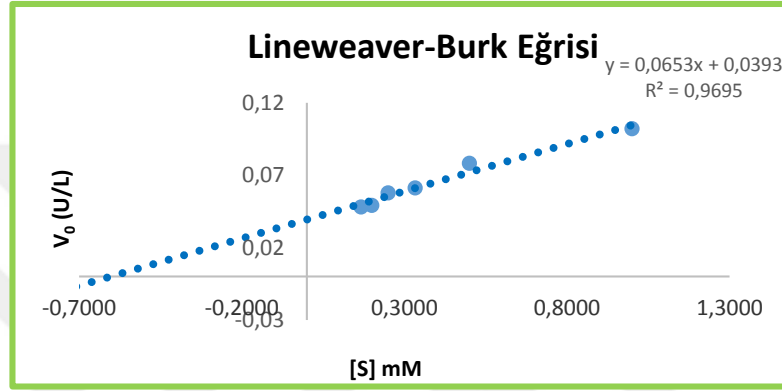


C2

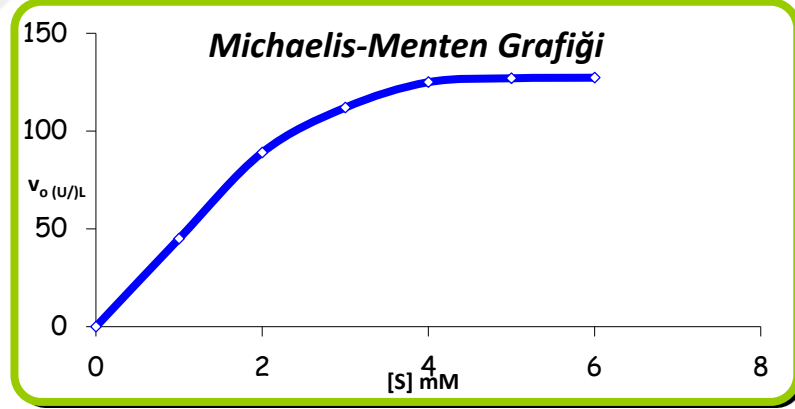
Şekil 4.31 (devam): Değişen koenzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2: Gln287GluFDH; D1,D2 His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



D1

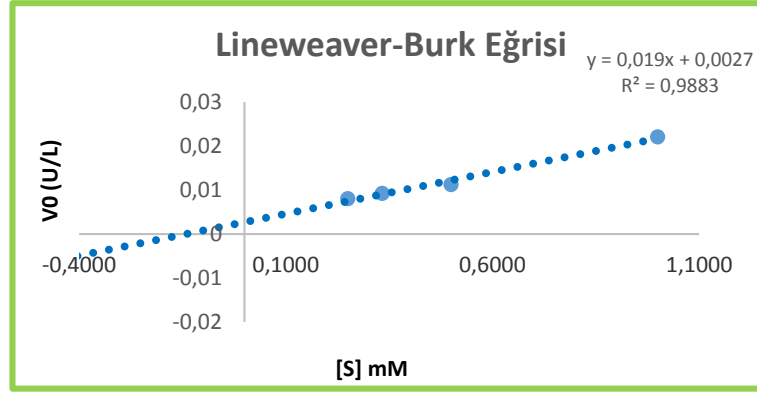


D2



E1

Şekil 4.31 (devam): Değişen koenzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2: Gln287GluFDH; D1,D2 His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



E2

Şekil 4.31 (devam): Değişen koenzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2: Gln287GluFDH; D1,D2 His311GlnFDH; E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).

Tablo 4.10: mutFDH enzimlerinin NAD^+ kinetik değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Phe285ThrFDH	2.3	0.014	4.59×10^3	1.99×10^3
Val120ThrFDH	7.9	0.032	1.04×10^4	1.32×10^3
Gln287GluFDH	3.3	0.029	9.51×10^3	2.9×10^3
His311GlnFDH	1.6	0.025	8.2×10^3	4.93×10^3
Phe285Thr/His311GlnFDH	7	0.37	1.21×10^4	1.7×10^3

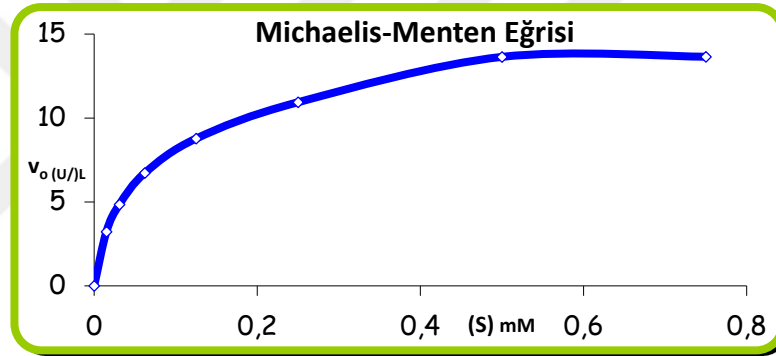
4.21.3.3 Değişen enzim konsantrasyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

Farklı enzim konsantrasyonlarına karşı alınan aktivite ölçümleri ile mutFDH'lere ait K_M , K_{cat} ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonları Tablo 4.11'de verilmiştir. Reaksiyonlara ait Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.32'de verilmiş olup V_{max} ve K_M değerlerini daha doğru tahmin etmek için Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılmıştır. V_{max} , K_M ve K_{cat} değerleri, Lineweaver -Burk çiziminden elde edilen denklem kullanılarak hesaplandı. Grafikteki

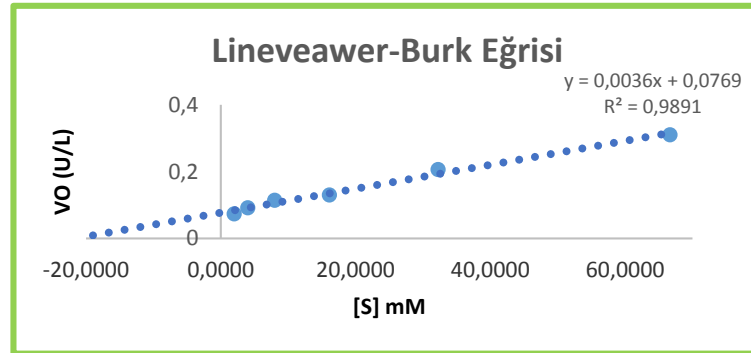
y eksenini $1/V_{max}$ 'ı temsil ederken, x eksenini $-1/K_m$ değerini temsil etmektedir. Çalışma sonucunda mutFDH enzimlerine ait kinetik değerler Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.11: mutFDH'ler için değişen enzim konsantrasyonlarında reaksiyon ortamı içeriği.

Mutant Enzim	Seçilmiş Enzim Konsantrasyonları	NAD ⁺	Format	pH	Sıcaklık C°
Phe285ThrFDH	0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	2.5 mM	1 mM	7	25
Val120ThrFDH	0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	4 mM	1.3 mM	7	25
Gln287GluFDH	0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	4 mM	2 mM	7	25
His311GlnFDH	0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	2.5 mM	1.5 mM	7	25
Phe285Thr/His311Gln FDH	0.75 mg/ml-0.0031 mg/ml	4 mM	1.5 mM	8	25

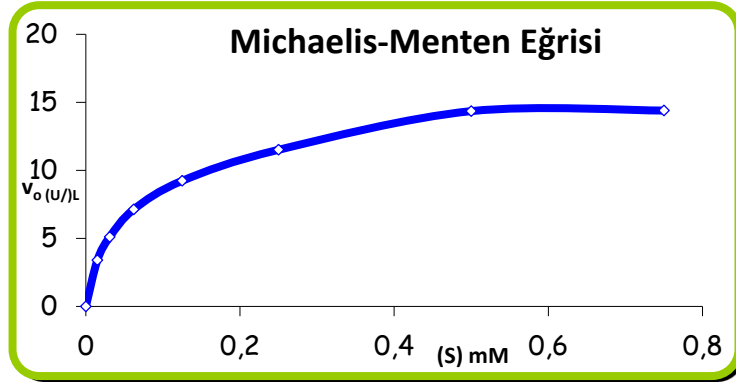


A1

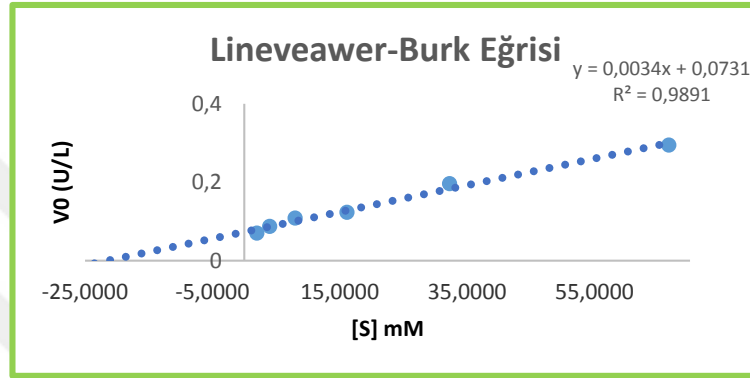


A2

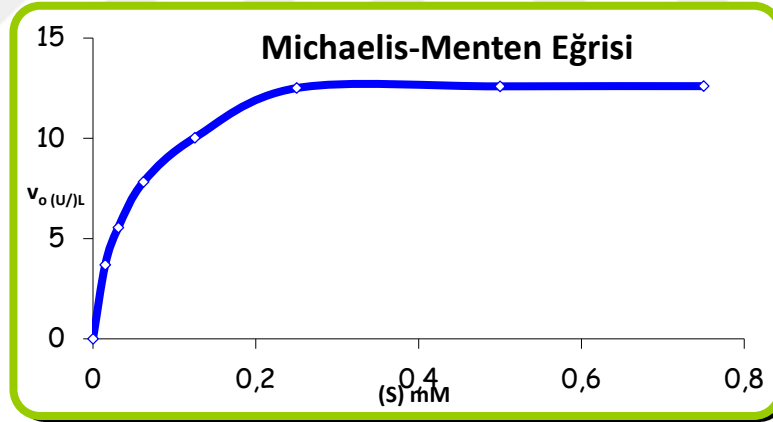
Şekil 4.32: Değişen enzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2: Gln287GluFDH; D1,D2: His311GlnFDH, E1,E2: Phe285Thr/His311GlnFDH).



B1

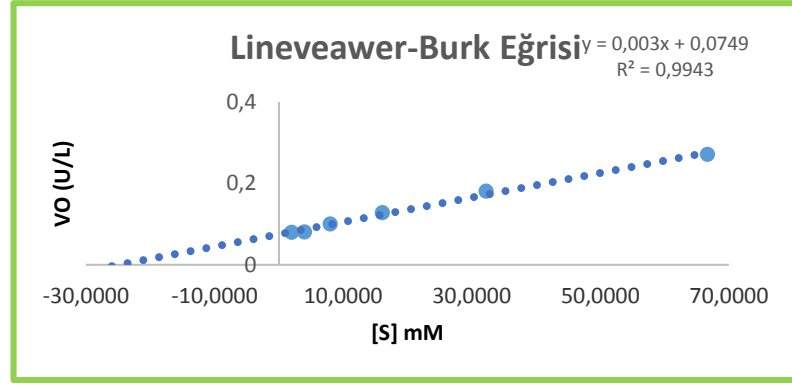


B2

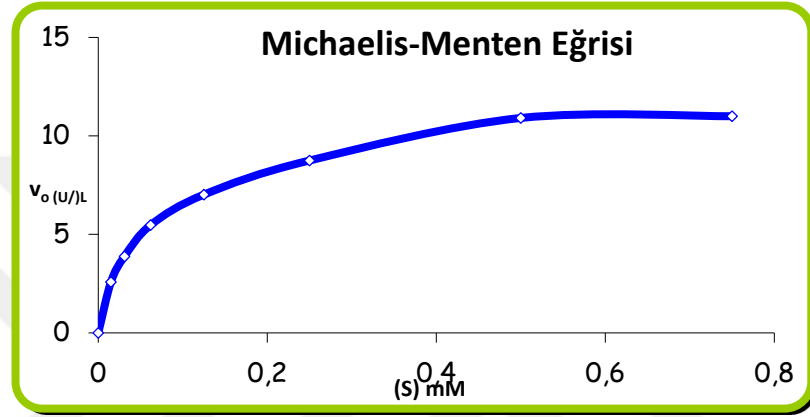


C1

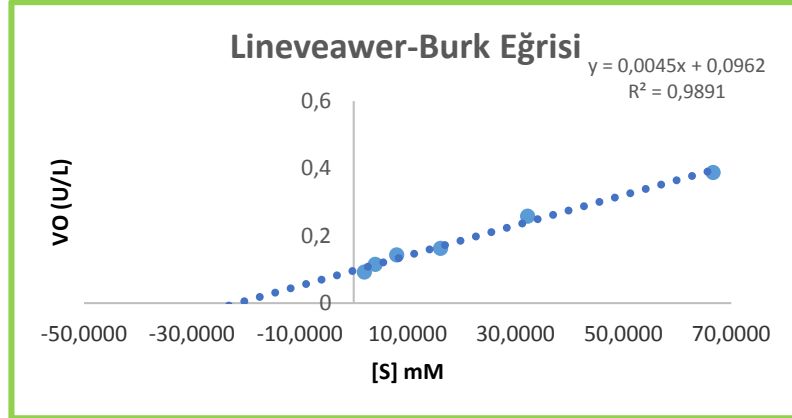
Şekil 4.32 (devam): Değişen enzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2 Gln287GluFDH; D1,D2: His311GlnFDH, E1,E2 Phe285Thr/His311GlnFDH).



C2

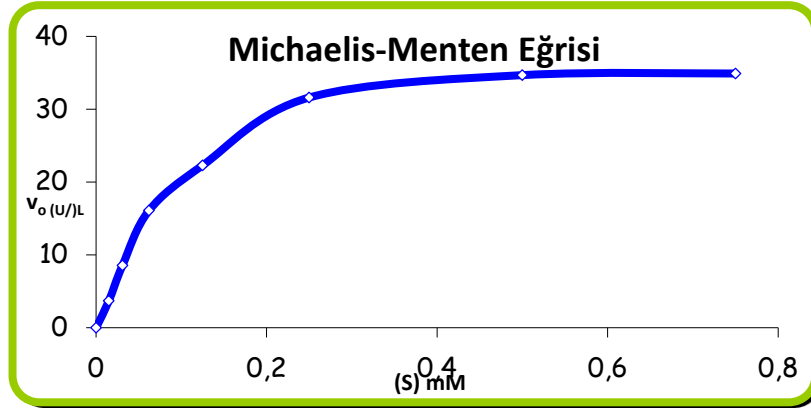


D1

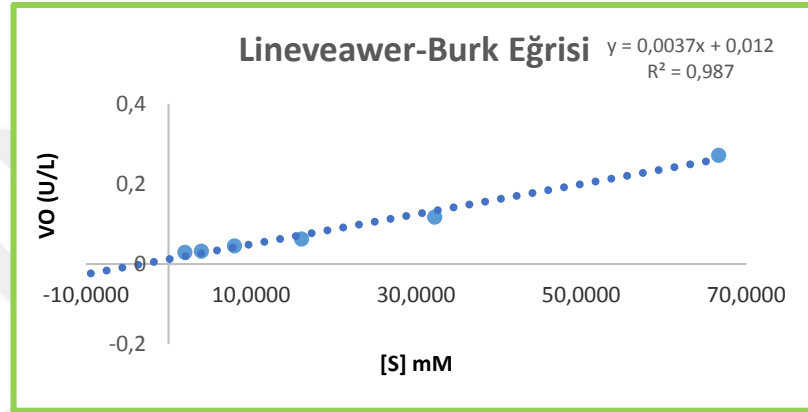


D2

Şekil 4.32 (devam): Değişen enzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2 Gln287GluFDH; D1,D2: His311GlnFDH, E1,E2 Phe285Thr/His311GlnFDH).



E1



E2

Şekil 4.32 (devam): Değişen enzim konsantrasyonlarında mutFDH enzimleri için Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri (A1,A2: Phe285ThrFDH; B1,B2: Val120ThrFDH; C1,C2 Gln287GluFDH; D1,D2: His311GlnFDH, E1,E2 Phe285Thr/His311GlnFDH).

Tablo 4.12: mutFDH enzimlerinin kinetik değerleri.

	K_M (mM)	V_{max} (U/ml)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Phe285ThrFDH	0.047	0.013	2.13×10^3	4.55×10^4
Val120ThrFDH	0.046	0.013	2.23×10^3	4.79×10^4
Gln287GluFDH	0.04	0.013	2.18×10^3	5.44×10^4
His311GlnFDH	0.047	0.01	1.64×10^3	3.5×10^4
Phe285Thr/His311GlnFDH	0.308	0.083	1.36×10^4	4.43×10^5

4.21.4 Farklı metal iyonlarının mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesine olan etkilerini incelemek için, 11 farklı metal iyonunun 5 farklı konsantrasyonu (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 7 μ M, 10 μ M) reaksiyon ortamında denendi. Reaksiyon ortamlarına ait bileşenlerin konsantrasyonları Tablo 4.13’de verilmiştir. Ölçümler her bir durum için üç tekrarlı olacak şekilde, 25 °C’de ve 340 nm absorbandsda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı (Şekil 4.33).

Tablo 4.13: Mutant FDH enzimlerinin farklı metal konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.

Mutant Enzim	Seçilmiş Metal	Enzim	NAD ⁺	Format	pH
Konsantrasyonları					
Phe285ThrFDH	1 μ M-10 μ M	0.125 mg/ml	2.5 mM	1 mM	7
Val120ThrFDH	1 μ M-10 μ M	0.125 mg/ml	4 mM	1.3 mM	7
Gln287GluFDH	1 μ M-10 μ M	0.125 mg/ml	4 mM	2 mM	7
His311GlnFDH	1 μ M-10 μ M	0.125 mg/ml	2.5 mM	1.5 mM	7
Phe285Thr/His311GlnFDH	1 μ M-10 μ M	0.125 mg/ml	4 mM	1.5 mM	8

Çalışma sonucunda Phe285ThrFDH enziminde, CaCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μ M konsantrasyonda %77, KCl₂ aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %37, FeCl₃ aktiviteyi en fazla 10 μ M konsantrasyonda %50, NaCl aktiviteyi en fazla 1 μ M konsantrasyonda %58, LiCl aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %39, Mo aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %46, MnCl aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %74, ZnCl aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %74 oranında arttırmıştır. Bunların haricinde ise W aktiviteyi 1 μ M konsantrasyonda %17 arttırırken ortamda bulunduğu diğer konsantrasyonlarda %24’ e kadar düşürmüştür. Yine MgCl₂ için 5 μ M konsantrasyonlarına kadar aktiviteyi %21 oranında arttırmış ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ortamda bulunduğu aktiviteyi %24’e kadar düşürmüştür. CuCl₂ ‘ün ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %77 oranında azalttığı bulunmuştur.

Çalışma sonucunda Val120ThrFDH enziminde, CaCl₂ aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %53, KCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μ M konsantrasyonda %49, FeCl₃

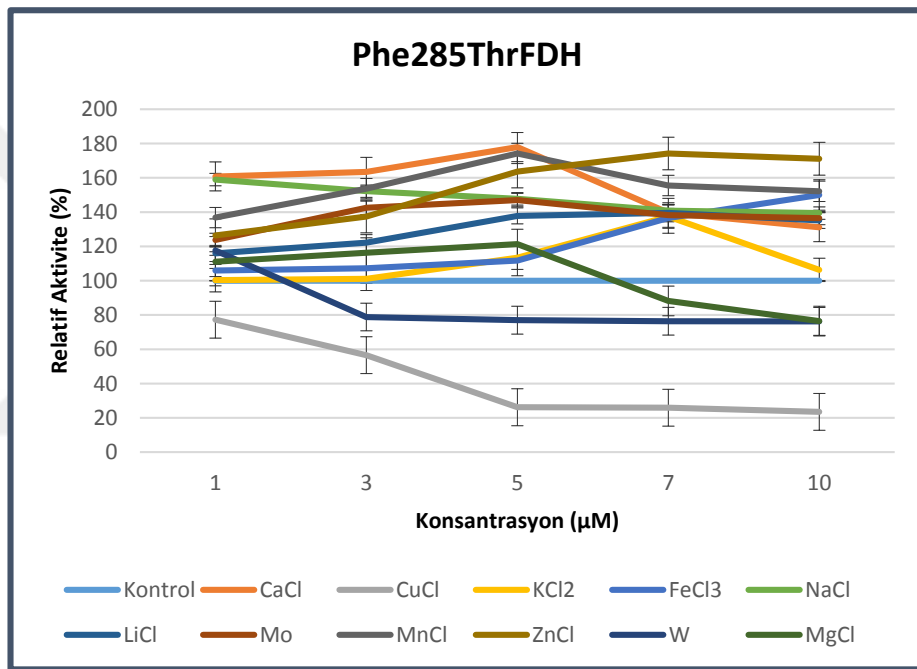
aktiviteyi en fazla 7 μM konsantrasyonda %48, NaCl aktiviteyi en fazla 5 μM konsantrasyonda %42, LiCl aktiviteyi en fazla 10 μM konsantrasyonda %49, Mo aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %36, MnCl aktiviteyi en fazla 10 μM konsantrasyonda %51, W'nun aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %32, MgCl₂ aktiviteyi en fazla 10 μM konsantrasyonda %2 arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca ZnCl₂'ün aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %10 arttırdığı bulunurken artan konsantrasyonlarında %5'e kadar düşürdüğü ve CuCl₂'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %26'ya kadar düşürdüğü bulunmuştur.

Çalışma sonucunda Gln287GluFDH enziminde; CaCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %8, KCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %49, FeCl₃ aktiviteyi en fazla 5 μM konsantrasyonda %32, NaCl aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %30, LiCl aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %29, Mo aktiviteyi en fazla 5 μM konsantrasyonda %31, MnCl aktiviteyi en fazla 7 μM konsantrasyonda %55, ZnCl aktiviteyi en fazla 1 μM konsantrasyonda %34, W'nun aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %49 oranında arttırdığı bulunmuştur. Enzim aktivitesini attıran metallerden sadece MgCl₂ aktiviteyi 1 μM , 3 μM ve 5 μM konsantrasyonlarda en fazla 5 μM 'da olacak şekilde %9 oranında arttırırken, yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %33 oranında düşürmüştür. Ayrıca CuCl₂'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %39'a kadar düşürdüğü bulunmuştur.

Çalışma sonucunda His311GlnFDH enziminde; CaCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %14, KCl₂ aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %55, FeCl₃ aktiviteyi en fazla 7 μM konsantrasyonda %39, NaCl aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %39, LiCl aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %37, Mo aktiviteyi en fazla 5 μM konsantrasyonda %39, MnCl aktiviteyi en fazla 7 μM konsantrasyonda %61, ZnCl aktiviteyi en fazla 1 μM konsantrasyonda %40, W'nun aktiviteyi en fazla 3 μM konsantrasyonda %64 oranında arttırdığı bulunmuştur. Enzim aktivitesini attıran metallerden sadece MgCl₂ aktiviteyi 1 μM , 3 μM ve 5 μM konsantrasyonlarda en fazla 5 μM 'da olacak şekilde %7 oranında arttırırken, yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %28 oranında düşürmüştür. Ayrıca CuCl₂'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %26'ya kadar düşürdüğü bulunmuştur.

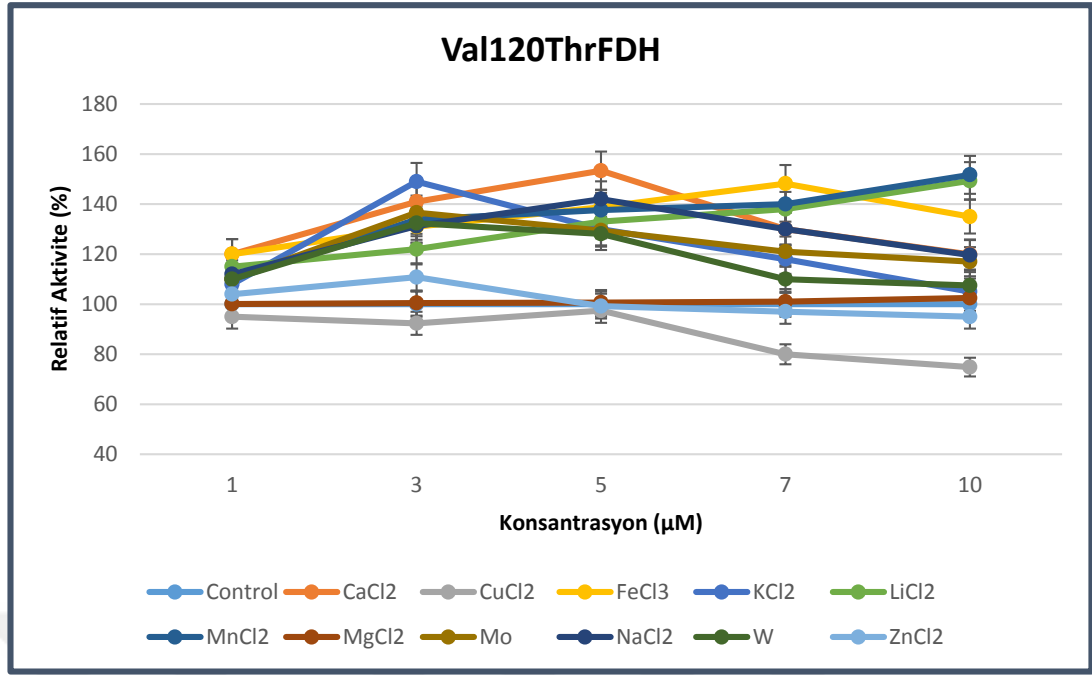
Çalışma sonucunda Phe285Thr/His311GlnFDH enziminde; CaCl₂ aktiviteyi en fazla 5 μM konsantrasyonda %62, KCl₂ aktiviteyi en fazla 7 μM konsantrasyonda %41, FeCl₃ aktiviteyi en fazla 10 μM konsantrasyonda %46, NaCl aktiviteyi en fazla 3 μM

konsantrasyonda %38, LiCl aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %30, Mo aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %38, MnCl aktiviteyi en fazla 5 μ M konsantrasyonda %51, ZnCl aktiviteyi en fazla 7 μ M konsantrasyonda %57 oranında arttırmıştır. Bunların haricinde ise W'nun aktiviteyi 1 μ M konsantrasyonda %15 arttırırken ortamda bulunduğu diğer konsantrasyonlarda %27' ye kadar düşürmüştür. Yine MgCl₂ için 5 μ M konsantrasyonlarına kadar aktiviteyi %16 oranında arttırmış ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ortamda bulunduğu aktiviteyi %28'e kadar düşürmüştür. CuCl₂ 'ün ise tüm konsantrasyonlarda aktiviteyi düşürdüğü, 10 μ M konsantrasyonda ise %45 oranında azalttığı bulunmuştur.

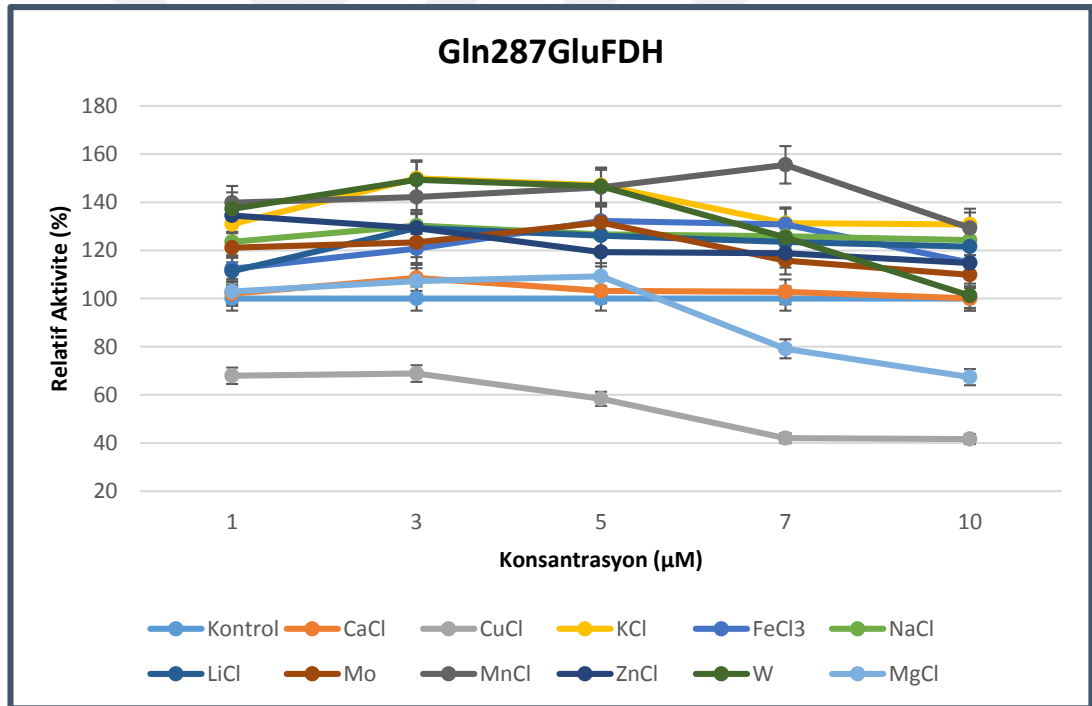


A

Şekil 4.33: mutFDH enzimlerinde (A: Phe285ThrFDH, B: Val120ThrFDH, C: Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı metal iyonlarının aktiviteye etkisi.

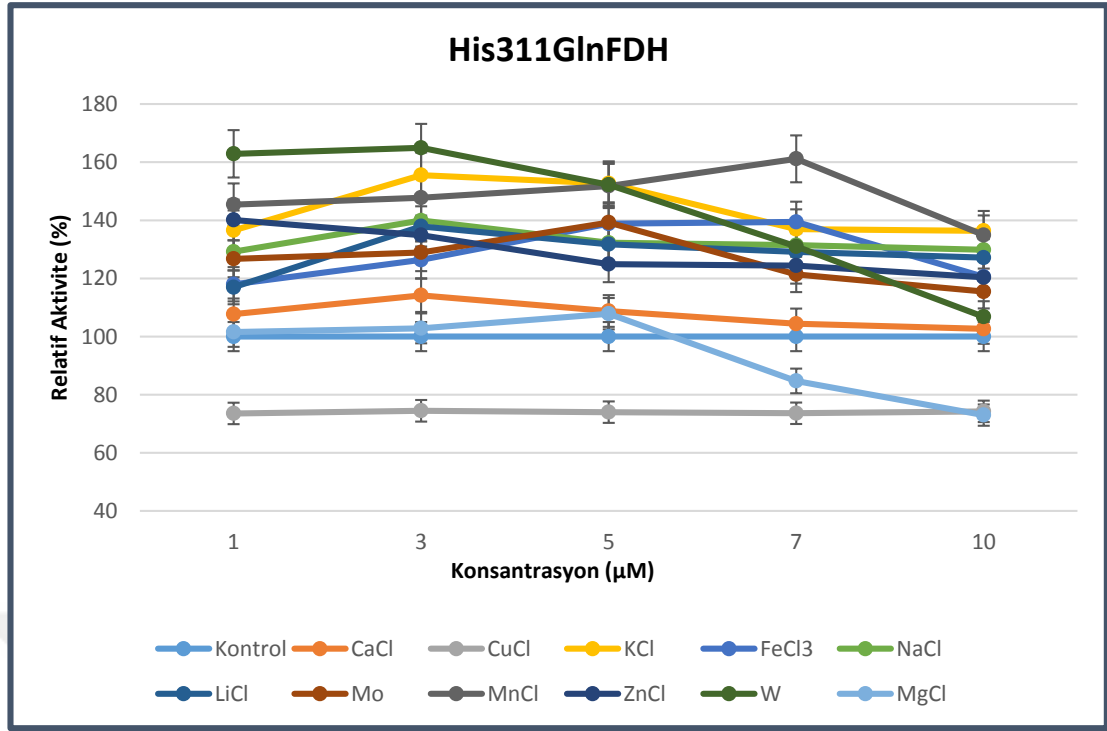


B

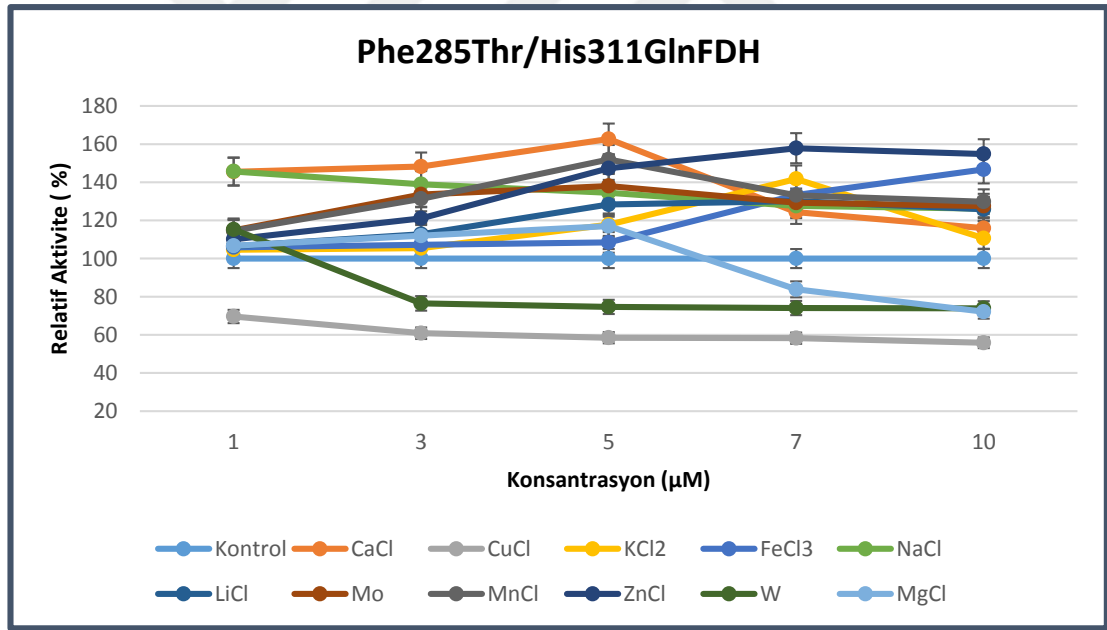


C

Şekil 4.33 (devam): mutFDH enzimlerinde (A: Phe285ThrFDH, B: Val120ThrFDH, C: Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı metal iyonlarının aktiviteye etkisi.



D



E

Şekil 4.33 (devam): mutFDH enzimlerinde (A: Phe285ThrFDH, B: Val120ThrFDH, C: Gln287GluFDH, D: His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı metal iyonlarının aktiviteye etkisi.

4.21.5 Farklı organik çözücülerin mutant enzimlerin aktivitesine etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerin, mutFDH enzimleri aktivitesi üzerine etkilerinin ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde, 25 °C’de 340 nm absorbansda mikropalak okuyucuda (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, ABD) alındı. Etanol, metanol, kloroform, aseton ve propanol çözücülerini reaksiyon ortamlarına; %5, %10, %25 ve %50 oranında bulunacak şekilde konuldu. Reaksiyon ortamındaki diğer bileşenler Tablo 4.14’de verilmiştir. Reaksiyondaki organik çözücüler, reaksiyonu başlatıcı substrat (format) ortama ilave edilmeden önce konuldu ve 3 dk inkübasyonun ardından format ilave edilerek reaksiyon başlatıldı (Şekil 4.34).

Tablo 4.14: Mutant FDH enzimlerinin farklı organik çözücü konsantrasyonlarındaki reaksiyon ortamları.

Mutant Enzim	Seçilmiş Çözücücü Konsantrasyonları	Enzim	NAD ⁺	Format	pH
Phe285ThrFDH	%5-%50	0.125 mg/ml	2.5 mM	1 mM	7
Val120ThrFDH	%5-%50	0.125 mg/ml	4 mM	1.3 mM	7
Gln287GluFDH	%5-%50	0.125 mg/ml	4 mM	2 mM	7
His311GlnFDH	%5-%50	0.125 mg/ml	2.5 mM	1.5 mM	7
Phe285Thr/His311GlnFDH	%5-%50	0.125 mg/ml	4 mM	1.5 mM	8

Deney sonucunda Phe285ThrFDH enzimi için, metanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %5 arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda aktiviteyi %70 azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında en fazla aktivite artışı % 25 konsantrasyonda gözlenmiştir. Etanol de tıpkı metanol gibi artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %11 oranında arttırmış ancak %50 konsantrasyonda %33 aktivite kaybına sebep olmuştur. Kloroformun artan konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteyi %40 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Aseton ve propanolün ise tıpkı metanol ve etanoldeki gibi artan konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olduğu ve en fazla aktivite artışına %25 konsantrasyonda %21 şeklinde etki ettiği görülmüştür. Ancak % 50 konsantrasyonlarda aktivite her iki çözücüde de düşmüş bunun yanında propanolde %13’lük aktivite kaybına sebep olmuştur.

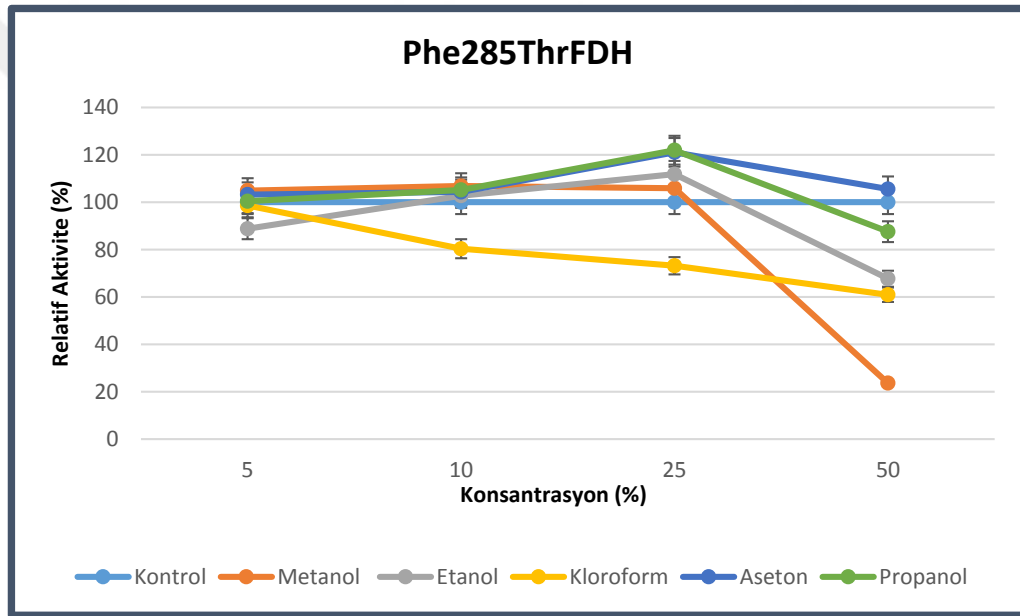
Deney sonucunda Val120ThrFDH enzimi için, metanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %10 arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda aktiviteyi %64 azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında en fazla aktivite artışı % 10 konsantrasyonda gözlenmiştir. Etanolün, en yüksek aktivite artışına %25 konsantrasyonda % 13'lük artış ile gözlenmiş ancak %50 konsantrasyonda %32 aktivite kaybına sebep olmuştur. Kloroformun artan konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteyi %37 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Aseton ve propanolün ise tıpkı metanol ve etanoldeki gibi artan konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olduğu ve en fazla aktivite artışına %25 konsantrasyonda %22 ve %24 şeklinde etki ettiği görülmüştür. Ancak % 50 konsantrasyonda her iki çözücüde de aktivitede kayıp görülmüş propanolde %11 oranında bir kayıp gözlenmiştir.

Deney sonucunda Gln287GluFDH enzimi için, metanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %12 arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda aktiviteyi %25 azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında en fazla aktivite artışı % 25 konsantrasyonda gözlenmiştir. Etanolün, en yüksek aktivite artışına %25 konsantrasyonda % 7'lik artış şeklinde bulunmuş ve %50 konsantrasyonda %28 aktivite kaybı görülmüştür. Kloroformun artan konsantrasyona bağlı olarak aktiviteyi %42 oranında düşürdüğü bulunmuş; aseton ve propanolün ise artan konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olduğu ve en fazla aktivite artışına %25 konsantrasyonda %16 ve %31 şeklinde etki ettiği görülmüştür. Ancak % 50 konsantrasyonda aktivite her iki çözücüde de düşmüş bunun yanında propanolde aktivite kaybı %5 olarak bulunmuştur.

Deney sonucunda His311GlnFDH enzimi için, metanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %12 arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda aktiviteyi %33 azalttığı bulunmuştur. En fazla aktivite artışı % 25 konsantrasyonda gözlenmiştir. Etanolün, en yüksek aktivite artışı %25 konsantrasyonda % 6'lık artış olarak bulunmuş fakat %50 konsantrasyonda %32 aktivite kaybına sebep olduğu gözlenmiştir. Kloroformun artan konsantrasyona bağlı olarak aktiviteyi %49 oranında düşürdüğü bulunmuştur. Aseton ve propanolün artan konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olduğu ve en fazla aktivite artışına %25 konsantrasyonda %19 ve %15 şeklinde etki ettiği görülmüştür. Ancak % 50 konsantrasyonda aktivite her iki çözücüde de düşmüş ve propanolde %6'lık aktivite kaybına sebep olmuştur.

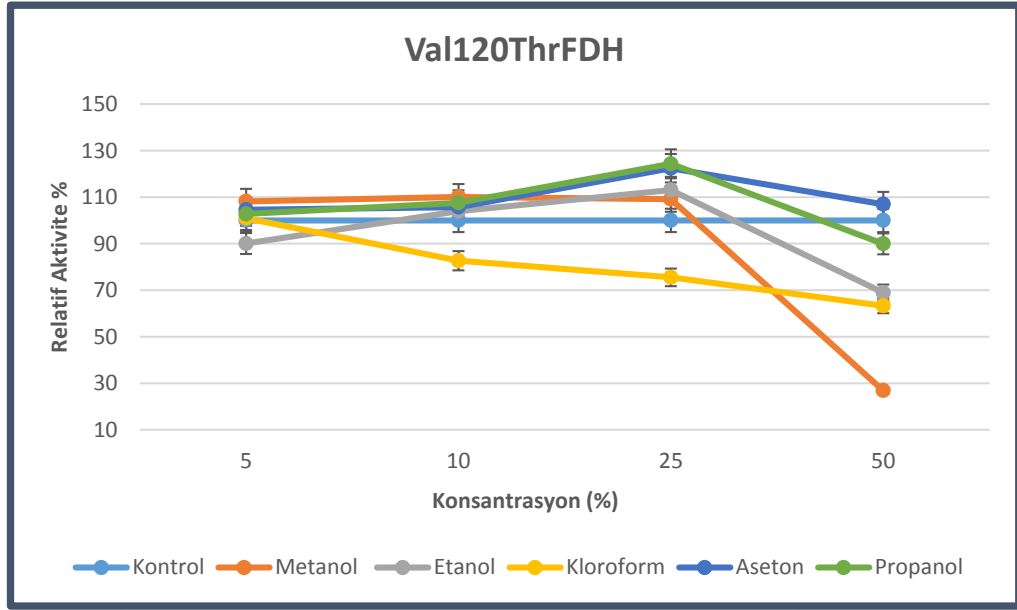
Deney sonucunda Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için, metanolün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %24 arttırdığı ancak % 50 konsantrasyonda aktiviteyi

%67 azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında en fazla aktivite artışı % 25 konsantrasyonda gözlenmiştir. Etanolün, en yüksek aktivite artışı %25 konsantrasyonda görülmüş ve % 9 oranında aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur ancak %50 konsantrasyonda %64 aktivite kaybı gözlenmiştir. Kloroformun artan konsantrasyona bağlı olarak aktiviteyi %97 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Aseton ve propanolün artan konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olduğu ve en fazla aktivite artışına %25 konsantrasyonda %25 ve %29 şeklinde etki ettiği görülmüştür. Her iki çözücü için % 50 konsantrasyonlarda aktivite düşmüş bunun yanında propanolde %9'luk aktivite kaybına sebep olmuştur.

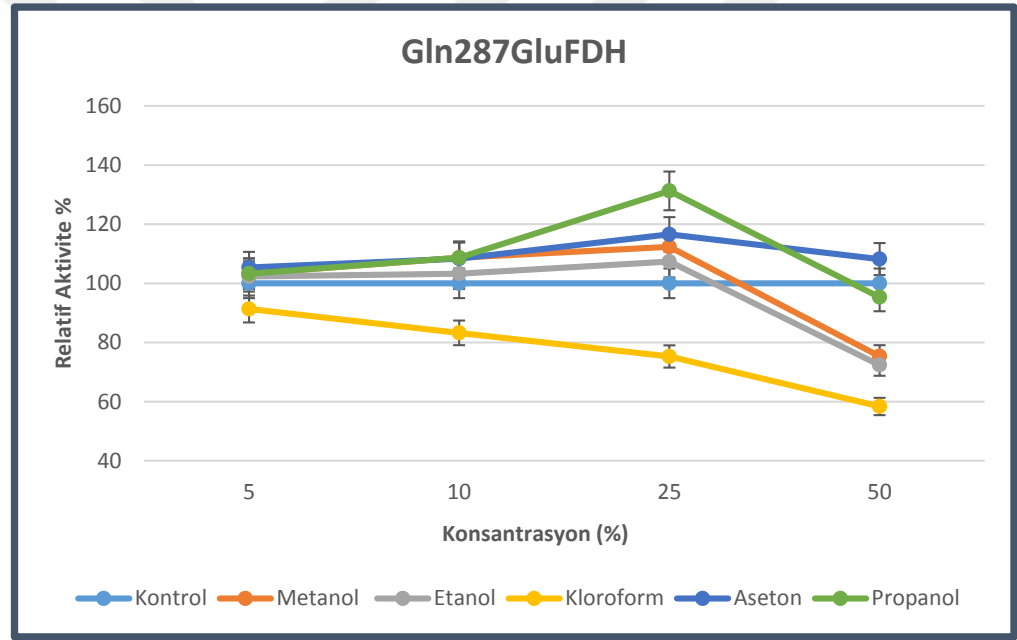


A

Şekil 4.34: mutFDH enzimlerinde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı organik çözücülerin aktiviteye etkisi.

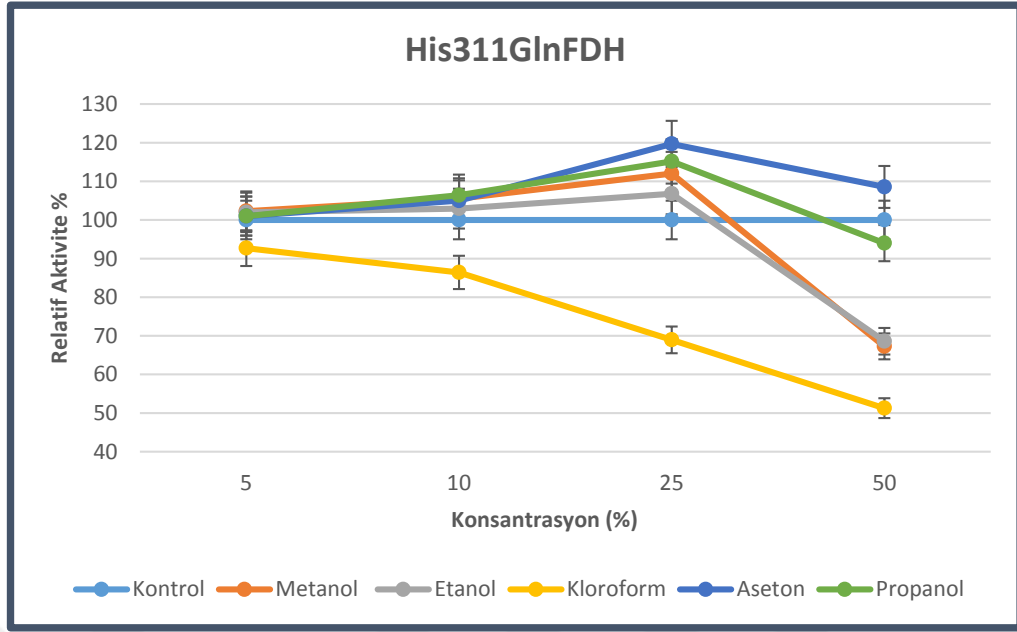


B

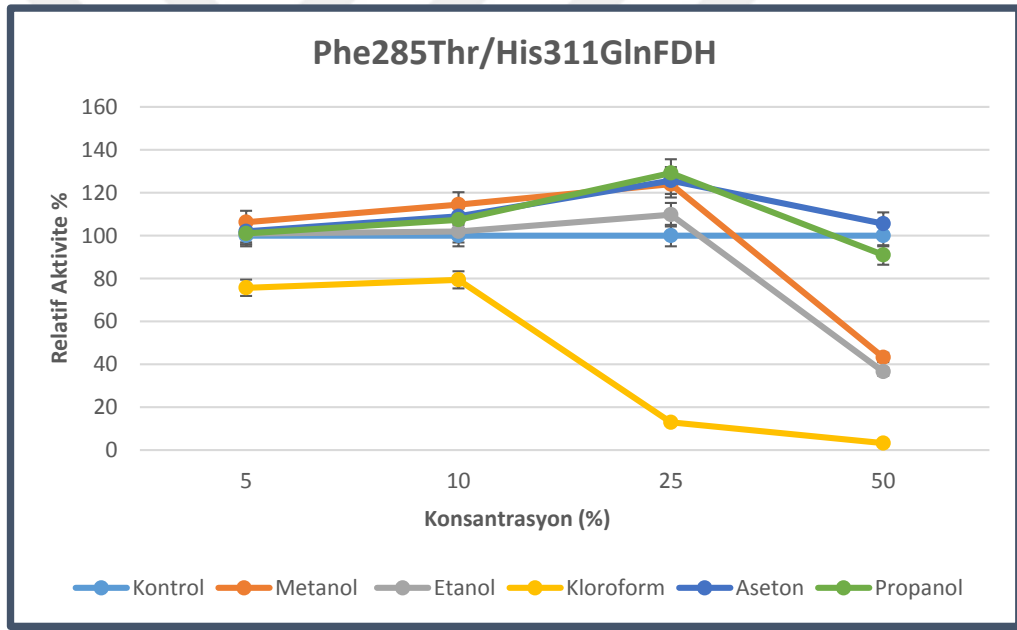


C

Şekil 4.34 (devam): mutFDH enzimlerinde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı organik çözücülerin aktiviteye etkisi.



D



E

Şekil 4.34 (devam): mutFDH enzimlerinde (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) farklı organik çözücülerin aktiviteye etkisi.

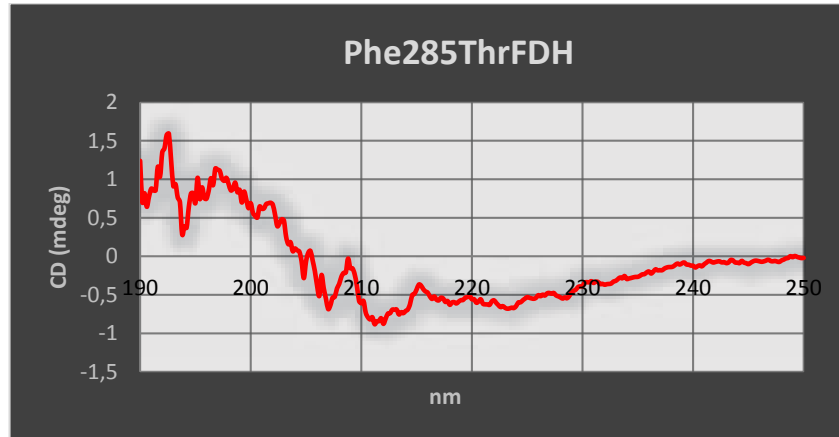
4.22 Mutant FDH Proteinlerinin Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi Bulguları

CD spektroskopisi ile proteine ait ikincil yapı analizi yapıldı. Ayrıca sıcaklık / dalga boyu tarama programları kullanılarak mutFDH enzimlerinin sıcaklığa bağlı CD spektrumları ve denatürasyon sıcaklığı (T_m) sıcaklığı tespit edildi.

4.22.1 Mutant FDH proteinlerinin ikincil yapısının belirlenmesi

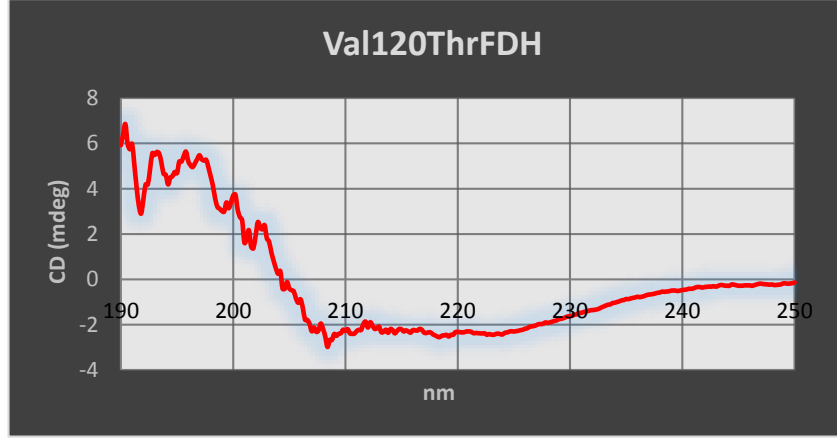
Saflaştırma işlemlerinden sonra Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları Phe285ThrFDH için 8.5 mg/ml, Val120ThrFDH için 8.2 mg/ml, Gln287GluFDH için 5.5 mg/ml, His311GlnFDH için 6.4 mg/ml ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 7.3 mg/ml ölçülen enzimlerin son konsantrasyonları kendi tamponları kullanılarak (sodyum fosfat, pH 7 ve tris tamponu, pH 8) 0.25 mg/ml'ye dilüe edildi. Ardından ikincil yapının analizi için 25 °C'de 190-260 nm dalga boyları arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) absorbans ölçümleri alındı. Ölçümler esnasında bant genişliği 1.00 nm, veri aralığı 0.2 nm, tarama hızı 50 nm/min, data aralığı 0.2 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD ve fotometrik mod da CD, HT, UV, Abs olarak alındı.

Çalışma sonucunda, *C. boidinii* FDH ikincil yapısında ağırlıklı olarak bulunan α -heliks yapısı mutFDH proteinlerimizde de gözlemlendi (Şekil 4.35).

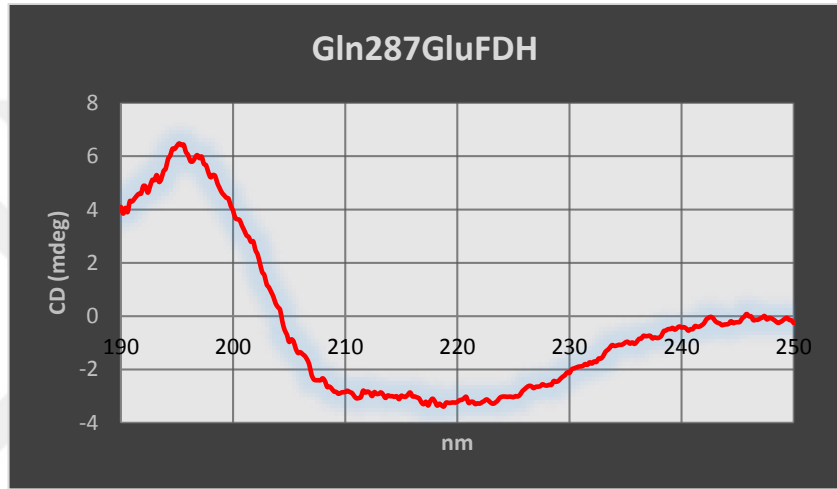


A

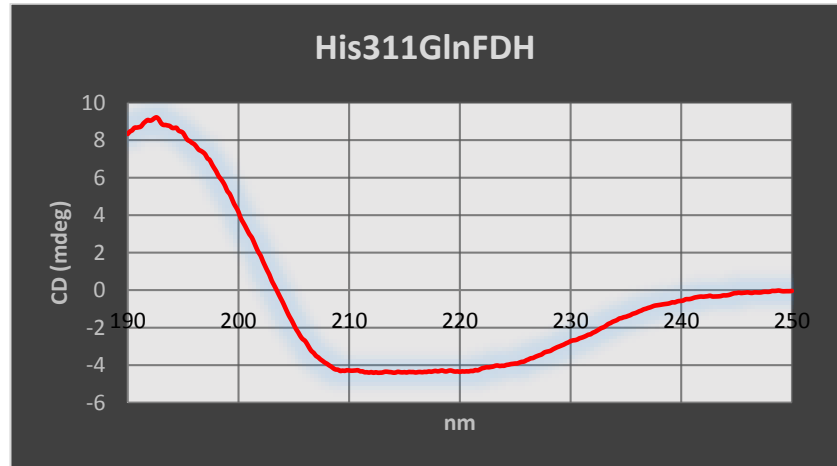
Şekil 4.35: mutFDH'lere (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) ait α -heliks yapıları.



B

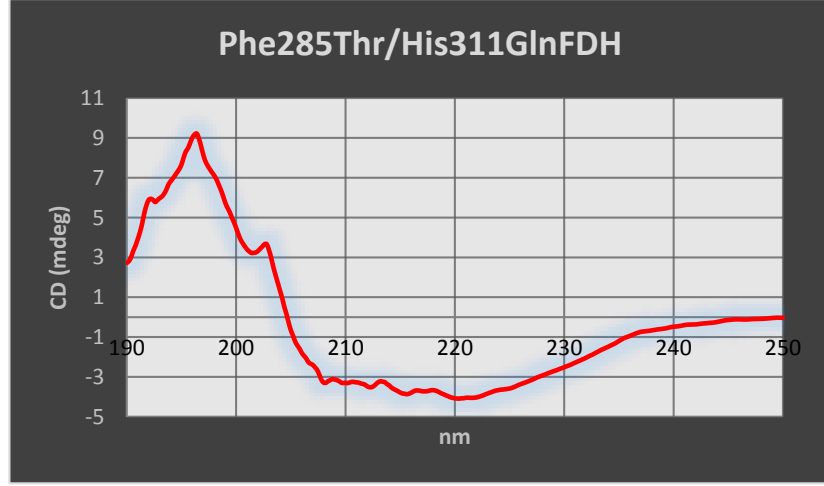


C



D

Şekil 4.35 (devam): mutFDH'lere (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) ait α -heliks yapıları.

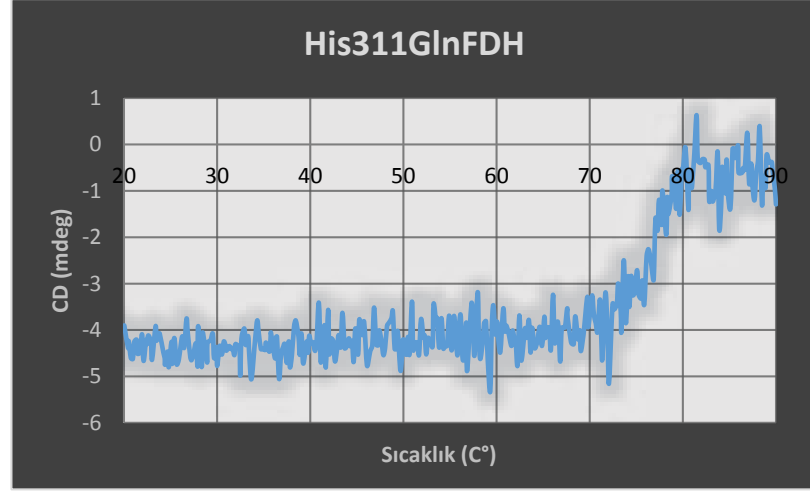


E

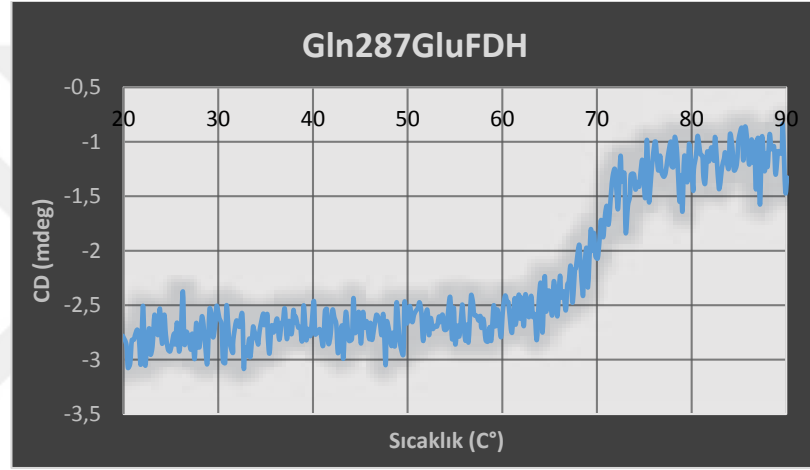
Şekil 4.35 (devam): mutFDH'lere (A:Phe285ThrFDH, B:Val120ThrFDH, C:Gln287GluFDH, D:His311GlnFDH, E: Phe285Thr/His311GlnFDH) ait α -heliks yapıları.

4.22.2 Mutant FDH proteinlerinin termal stabilite tayini

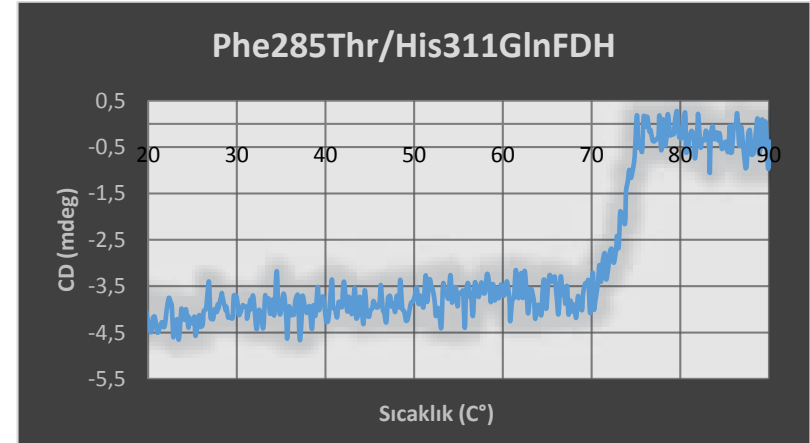
İkincil yapının belirlenmesi esnasında kullanılan mutant örneklerimizin, termal denatürasyon eğrilerinin 3D yapısını elde etmek için 190-250 nm arasındaki spektrumda 25 °C ile 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) tarandı. Tarama sırasındaki ölçüm parametleri, bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD, data ve veri aralığı 0.1 nm, tarama hızı 50 nm/min ve fotometrik modlar CD, HT olarak ayarlandı. Ayrıca termal denatürasyon eğrisi için numunemiz yine 25 °C ile 95 °C arasında CD spektrofotometrede (Jasco J-1500, ABD) α -heliks yapısına spesifik 222 nm absorbansında ölçüldü. Ölçüm parametleri ise bant genişliği 1.00 nm, CD ve FL ölçekleri 200 mdeg/1.0 dOD olarak alınmıştır. Fotometrik modlar ise CD, HT ve UV olarak ayarlandı. Çalışma sonucunda denatürasyon sıcaklıkları, Gln287GluFDH için 70 °C, His311GlnFDH için 77 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 73 °C olarak bulundu (Şekil 4.36).



A



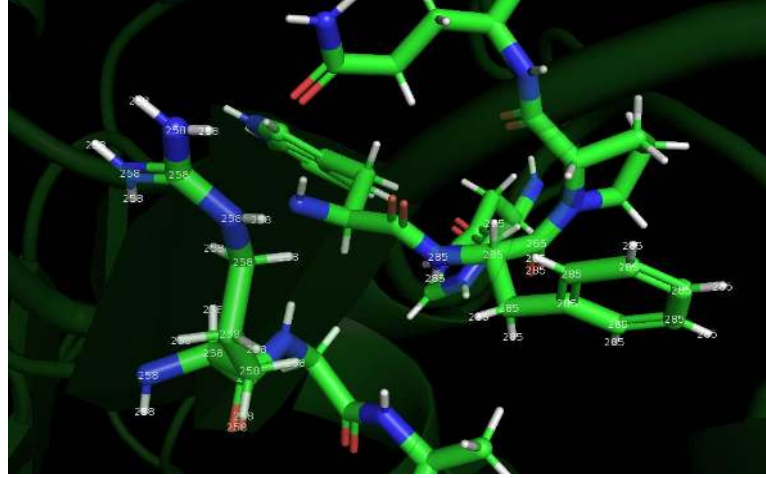
B



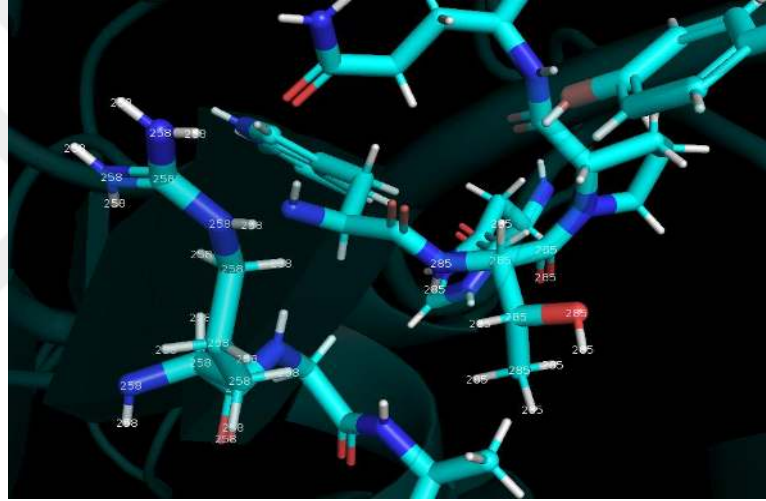
C

Şekil 4.36: mutFDH'lere (A:His311GlnFDH, B:Gln287GluFDH, C: Phe285Thr/His311GlnFDH) ait termal denatürasyon eğrileri.

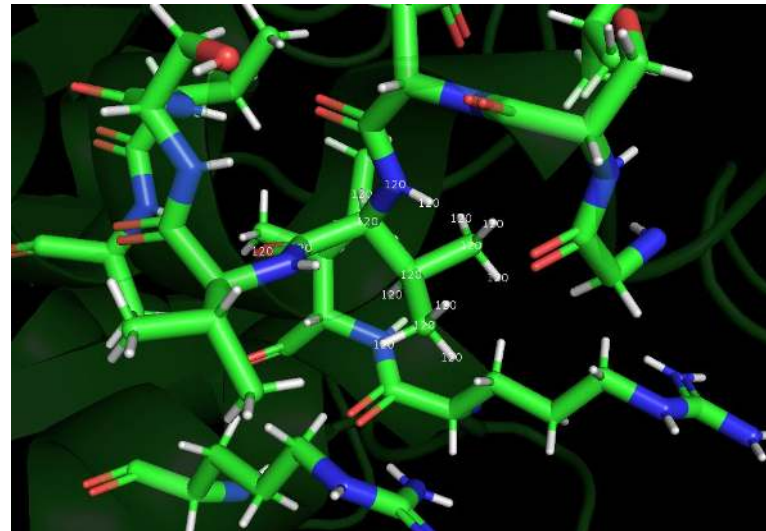
4.23 Protein Modelleme Bulguları



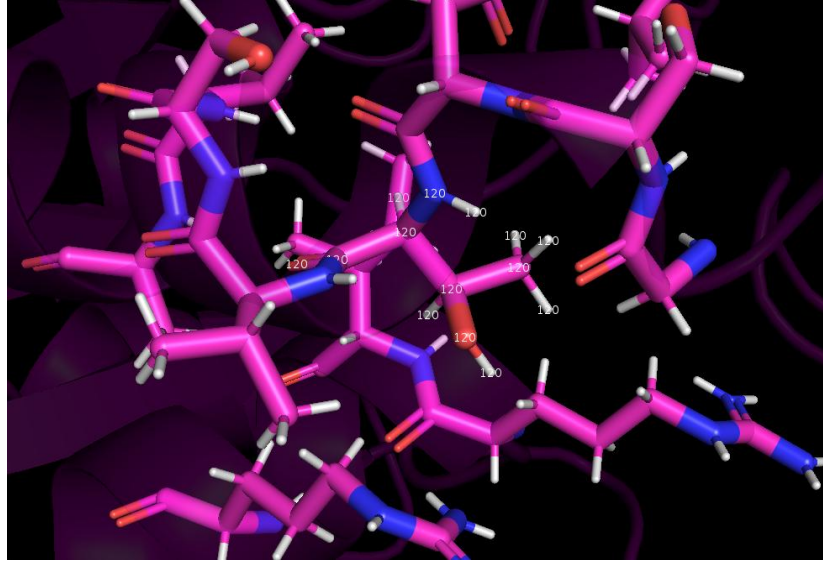
Şekil 4.37: 285. pozisyondaki fenilalanin



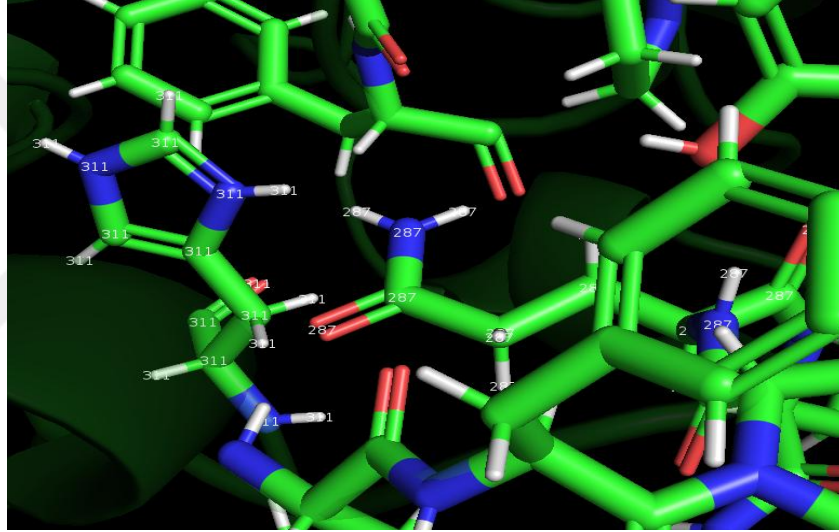
Şekil 4.38: Phe285 (TTC853) -> Thr285 (ACC853) mutasyonu



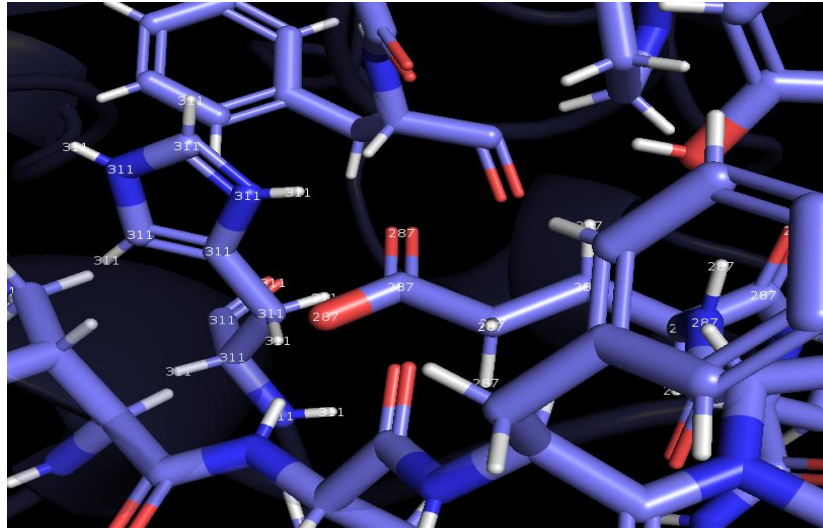
Şekil 4.39: 120. pozisyondaki valin



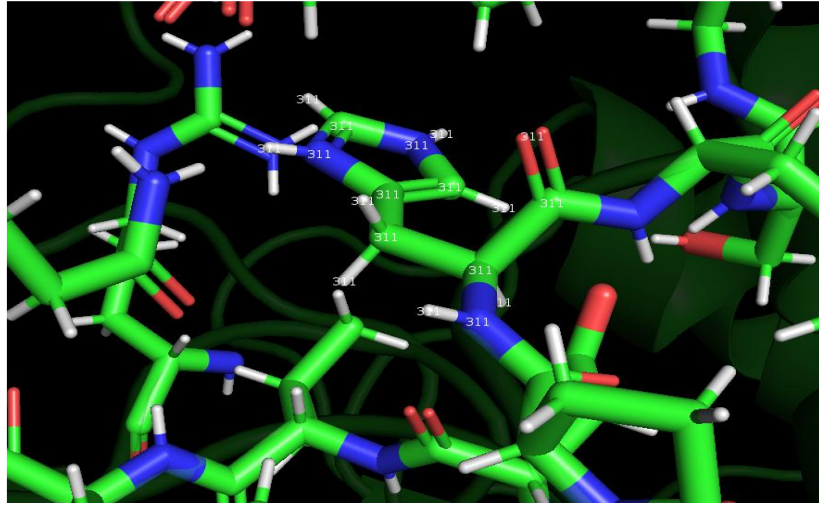
Şekil 4.40: Val120 (GTT358) -> Thr120 (ACC358) mutasyonu



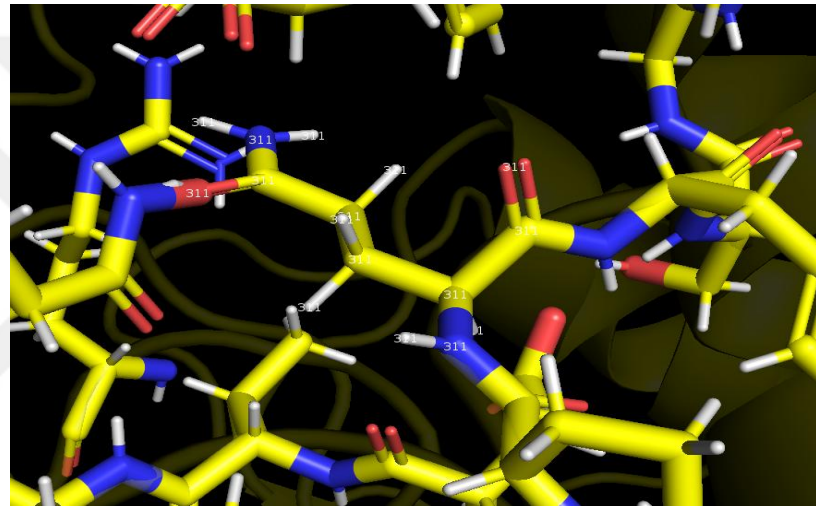
Şekil 4.41: 287. pozisyondaki glutamin



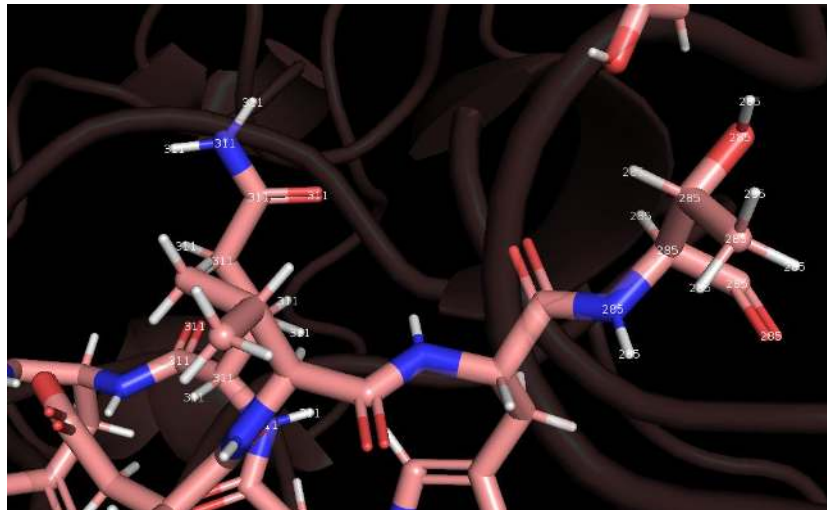
Şekil 4.42: Gln287 (CAA861) -> Glu287 (CAG861) mutasyonu



Şekil 4.43: 311. pozisyondaki histidin



Şekil 4.44: His311 (CAT933) -> Gln311 (CAA933) mutasyonu



Şekil 4.45: Phe285Thr/His311Gln kombine mutasyonu

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, bazı patolojik durumlardaki seviyeleri önemli olan format için mutlak spesifik, ayrıca endüstriyel kullanım alanı geniş NAD-bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin rekombinant DNA teknoloji ile üretilmesi ve protein mühendisliği ile aktivite ve termal stabilitesinin artırılması amacıyla yapılmıştır.

NAD⁺-bağımlı FDH enzimi, format iyonlarını CO₂ 'ye yükseltgeyip aynı zamanda NAD⁺ molekülünü NADH+H'a indirgeyen önemli bir oksidoredüktazdır. FDH enziminin katalizlediği reaksiyonun diğer dehidrogenazlara oranla oldukça basit olması ve tek basamaklı olması sebebiyle, enzimin endüstriyel ve bilimsel kullanımı oldukça yaygındır [9,10]. 60 yıldan fazla bir zamandır FDH üzerine yapılan çalışmalarda, enzimin genellikle mayalarda, bakterilerde, bitkilerde ve mantarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Metilotrof mikroorganizmaların enerji tedarikinde ve bitkilerde stres cevabında önemli rol oynayan FDH, methanol yolağının son enzimidir. Metilotropik mayalar içerisinde yer alan *C.boidinii*, rekombinant protein üretimi için ökaryotik bir konakçı olup, son 30 yıl içerisinde giderek artan sayıdaki uygulamalarda kullanılmaktadır.

Metanol metabolizmasındaki enzimlerin verimli ve stabil bir şekilde izole edilebildiği, enzimleri kodlayan genlerin metanol tarafından indüklenip glukoz ve etanol tarafından baskılanan promotorların tam olarak tanımlandığı, sentetik tuz temelli ucuz besiyerlerinde yüksek hücre yoğunluğunda büyüyebildiği için *C. boidinii* metanol yolağı enzimlerinin eldesinde model organizma olarak kabul edilmektedir [32].

FDH enzimleri ilaç endüstrisinde ekonomik ve çevresel faktörlerden dolayı çoklu rejenerasyonlarda kullanılırlar. Farmasötik çalışmalarda, *C.boidinii* ve *Pichia pastoris* kaynaklı NAD⁺-Bağımlı FDH enzimlerinin, TipII Diyabet tedavisinde [104], depresyon tedavisinde [105], kolestreol düzenlemede [106], antiviral tedavide [107] kullanılan bazı ilaçların ara ürünlerinin sentezinde ve NADH kofaktör ejenerasyonlarında başarılı olduğu bilinmektedir. NAD⁺-Bağımlı FDH enzimi, farmasötik alanlarda kullanımının dışında bazı hastalıkların rutin tanısında da önemli role sahiptir. Bunlardan en önemlisi metanol zehirlenmelerinde, metanolün toksik metaboliti formik asit anyonu olan formatın hızlı ve kesin bir şekilde saptanmasında

kullanılabilmesidir. Buna göre, idrar, serum, tam kan veya biyolojik örneklerdeki metanol metabolizasyon ürünü olan formatın, FDH enzimiyle yükseltgenmesi sonucu oluşan NADH'ın saptanmasıyla ölçülür [108]. Bunun yanında Oksalat üretiltiyazisin ve Trichomona vajinitinin tanısında, numune örneklerindeki format miktarının tespit edilmesinde FDH enzimlerinin pratik uygulama alanları bulunmaktadır [112,116].

Son yıllarda moleküler bilgi birikimi düzeyindeki artış ve organizmalar üzerindeki genetik değişiklikler sayesinde endüstriyel enzim üretimindeki verim 200-500 kat artmıştır. Enzimler etkili katalitik özellikleri sayesinde endüstriyel uygulamalara girmişlerdir ancak büyük ölçekteki üretimleri beraberinde yüksek verim ve düşük maliyet talebini de gündeme getirmiştir. Bunun yanında endüstriyel işlemler genellikle yüksek sıcaklık, basınç ve ekstrem pH gerektiren koşullara ihtiyaç duyarlar. Fakat doğal yollarla oluşan biyokatalizör enzimlerin, bu tür farklı koşullardaki endüstriyel kullanımları esnasında düşük stabilite ve düşük aktivite gibi bazı sınırlamaları mevcuttur. Bunlara ek olarak, enzimlerin çoğunun sınırlı substrat ve koenzim spesifitesi ile düşük K_{cat} değerleri vardır. Tüm bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve biyokatalizörlerin uygulamalarını arttırmak için nanoteknoloji, metabolik mühendislik, hücresel membran mühendisliği ve protein mühendisliği gibi çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Protein mühendisliği yaklaşımları ile, bu problemlerin üstesinden gelmek ve belirli endüstriyel uygulamalar için enzimleri optimize etmek için rasyonel tasarım, yönlendirilmiş değişim ve son olarak da birleştirme yöntemleri geliştirilmiştir [11].

Günümüzde endüstriyel enzimlerin neredeyse tamamı rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmektedir. Bu işlemler sırasındaki ilk adım ise, istenilen proteini kodlayan geni taşıyabilecek uygun bir mikroorganizma seçmektir [48]. Bu çalışmada FDH 1 proteinini kodlayan gen bölgesini taşıyan *C. boidinii* ATCC 18810 mikroorganizması gen kaynağı olarak seçildi. FDH üretiminde model organizma olmasının yanında intron içermediğinden klonlama çalışmalarına direk DNA izolasyonu ile başlanabilmesi *C. boidinii*'nin diğer bir avantajıdır. Çalışmada, FDH-1 proteinini klonlamak ve uygun vektör aracılığıyla ekspresyonunu sağlamak için gen kütüphanesi taranarak ilgili proteini kodlayan gen dizisi bulundu ve kesim enzim haritası da çıkarılarak FDH-1 gen dizisinin 1095 bp uzunluğunda olduğu belirlendi. Dizisi belirlenen 1095 bp uzunluğundaki FDH-1 geni, uygun primerler vasıtasıyla PZR ürünü olarak elde edildi (Şekil 4.1). Çalışmada, *E. coli*'de rekombinant

proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilmiş en güçlü sistemlerden biri olan pET vektör sistemi kullanıldı. Elde edilen PZR ürünü, klonlama ve ekspresyon vektörü olan pET23b+ 'ye kesim ve ligasyon işlemleri ile aktarıldı. Bunun sonucunda, pET23b+/FDH ligasyon ürünü 4760 bp bandında jel elektroforezinde gözlemlendi (Şekil 4.3). pET23b+/FDH ürünü daha sonra *E.coli* DH5 α hücrelere transforme edildi ve X-Gal ve IPTG içeren petrilere ekildi. İşlemler sonucunda, beyaz koloni oluşturma özelliğinden faydalanılarak insert içeren vektörler seçilmiş oldu (Şekil 4.4). DH5 α suşları, sahip oldukları *lacZ* Delta M15 Delta (*lacZYA-argF*), U169 *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rK-mK +) *supE44* ti-1, *gyrA96* *relA* mutasyonları sayesinde klonlama prosedürlerinde tercih edildi. *LacZ* Delta M15 mutasyonu: Rekombinant hücreler için mavi-beyaz taramaya izin verir. *endA1* mutasyonu: Daha yüksek plazmid transfer hızları sağlarken daha düşük endonükleaz bozulmalarına izin verir. *recA1* mutasyonu ise daha kararlı bir insert için homolog rekombinasyonu azaltır. Koloni oluşumları gözlemlendikten sonra 10 adet klon için koloni PZR yapıldı (Şekil 4.5). Koloni PZR reaksiyonundan elde edilen sonucu teyit etmek amacıyla *NdeI* ve *XhoI* endonükleaz enzimleri ile plazmidler kesildi ve jel elektroforezinde ayrı ayrı FDH gen ürünü (1095 bp) ve pET23b+ vektörüne (3665 bp) ait bantlar gözlemlendi (Şekil 4.6). Hem koloni PZR hem de kesim enzimleri ile doğrulamanın ardından ratgele seçilen 3 koloniden izole edilen plazmidler dizilemeye gönderildi. Gelen sekans sonuçları <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> programları kullanılarak veri tabanındaki CboFDH-1 protein dizisi ile alignment yapılarak karşılaştırıldı. Klonlanan gen dizisinin veri tabanındaki CboFDH dizisi ile %99 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Sekans analizi sonucu ile istenilen gen bölgesinin vektöre düzgün yerleştiği doğrulandıktan sonra pET-23b+/FDH vektörü, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transfer edildi (Şekil 4.9). *E.coli* BL21 hücreleri, Lon ve OmpT proteazları içermeyecek şekilde modifiye edildikleri için proteinler degrade olmaz bu yüzden protein ekspresyon çalışmalarında sıklıkla kullanılırlar [195, 196]. Transformasyon sonrası FDH geninin ekspresyonu IPTG ile indüklendi. Yapılan literatür araştırmaları ile 1 mM IPTG kullanılmasına karar verildikten sonra, 24 saat boyunca 1., 2., 3., 4., 5., 6., 12. ve 24. saatlerde örnek toplandı ve daha sonra bu örnekler SDS-PAGE jelde yürütülerek uygun saatin 4 saat inkübasyon olduğuna karar verildi (Şekil 4.10). Çalışmada, rekombinant protein üretimlerinde sıklıkla gözlenen bir problem olan inklüzyon cisimciği oluşumu meydana gelmedi. Üretilen

rekombinant proteinin N-terminal kısmında 6 adet histidin rezidüsü olduğundan, histidine afinite gösteren Ni-NTA agaroz kolon ile saflaştırma işlemleri yapıldı. Saflaştırma sonrası elde edilen protein örnekler SDS-PAGE jelde yürütüldü ve 41 kDa civarında protein bantlar elde edildi (Şekil 4.11). Net bir şekilde 41 kDa civarında bant görülen saf protein örnekleri tek bir yerde birleştirildikten sonra yapıdaki imidazol ve tuzları uzaklaştırmak için ultrafiltrasyon işlemi ve PD-10 kolondan geçirme işlemi yapıldı. Bu işlemler sonrası yabancı tip CboFDH enziminin protein konsantrasyonu 8.5 mg/ml olarak ölçüldü. Ayrıca FDH-1 proteininin varlığı Western Blot analizi ile de 41 kDa civarında gösterildi (Şekil 4.12). Klonlanma, saflaştırma ve protein varlığının doğrulanma işlemlerinden sonra yabancı tip CboFDH için CD spektroskopisi ve karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

Bölgeye yönelik mutagenез ile aminoasitlerin değişimi, genellikle polar olmayan aminoasitlerin yerine polar ya da yüklü aminoasitlerin değiştirilmesi ya da yan zincir gruplarının daha uzun ya da daha kısa hale getirilmesi şeklinde yapılır. Böylece enzimin substrat ve koenzim moleküllerine olan afinitesinin artırılması hedeflenir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer konu ise yapılacak olan değişikliklerin özellikle enzimin aktif bölgesine yakın olması veya bu bölgeye etki edebilecek mesafede bulunmasıdır.

NAD⁺-bağımlı FDH enzimleri genelde homodimer hâlinde, her bir dimer formu hem NAD⁺ hem de formata yüksek derecede özgülük gösterir. NAD⁺ bağlanma bölgesi ve katalitik bölge olmak üzere kimyasal olarak özdeş ikişer alt birimden oluşurlar [95]. CboFDH enziminin katalitik önemi olan amino asit rezidüleri Pro97, Phe98, Ile122, Asn146, Ala198 (veya Gly198), Gly200, Gly203, Arg284, Gln313 ve His332 şeklindedir. Format iyonu Arg284, Asn146 ve Ile122 rezidüleriyle hidrojen bağı yaparak aktif bölgenin merkezinde tutulur. His332 substrat bağlanmasında rol alır ve Gln313 ile yaptığı hidrojen bağı sayesinde protonsız hâlde hapsolür. Aynı zamanda Gln313 rezidüsünün konumu iki yanındaki prolinlerle sabitlenmiştir. NAD bağlanma bölgesinde ise Asn119 ve Ser313 rezidüleri oldukça önemlidir. CboFDH enziminin rezidülerinden Asp282 ve Ser313, nikotinamid halkasıyla temas kurarken; Arg174 rezidüsü de NAD⁺'daki "fosfat linker"a bağlanır. Ayrıca His232 ile Tyr196 rezidülerinin de Adenin halkasıyla etkileşime geçtiği düşünülür. İlave olarak, CboFDH enziminin Asp195 ile Gln197 rezidüleri NAD-ribozomun fosfat gurubu ile etkileşimde bulunur ve Tyr194 ile Tyr196 da hidrofobik küme oluşturur (bu da farklı pozisyon ve

çevrede Adenin halkasını stabilize edebilir) [92]. FDH'in aktif bölge merkezindeki iki hidrofobik duvar, reaksiyon esnasında oluşan konformasyonel değişim sonucunda reaktantların üzerine bastırılır. Bu duvarlardan biri Val150 ve Ile202 rezidülerinden oluşur ve NAD⁺ piridin halkasının bir yüzüne hidrofobik çevre sağlar. Diğer duvar ise Pro97 ve Phe98 rezidülerinden oluşur ve substrat bağlanma cebini oluşturur [96]. Proteinlerin doğal konformasyonlarını kararlı halde tutan kuvvetler aminoasitlerin birbirleri ve ortam ile yaptıkları kovalent olmayan etkileşimler ve kovalent bir bağ olan disülfid bağlarıdır. Hidrofobik aminoasitlerin yan zincirleri, proteinlerin iç kısmında kovalent olmayan hidrofobik etkileşimler meydana getirerek serbest enerji düşürürler ve kararlı bir yapı oluşmasına katkı sağlarlar. Hidrofobik etkileşimler arasında yer alan Van der Waals etkileşimleri de yine stabilizeye katkı sağlar. Ayrıca iyonik etkileşimler de zıt yüklü R gruplarına sahip aminoasitler arasında bağ kurarak stabilizeyi destekler. Çoğu yan zincir etkileşimleri arasında polar / yüklü etkileşimler veya polar olmayan Van Der Waals ve Londra dağılımı bulunur. Bununla birlikte iki sülfür atomu arasında oluşan disülfid köprüsü ile meydana gelen kovalent bağ standart üçüncül ve kuaterner etkileşimlere kıyasla çok daha güçlü ve daha kalıcı bir yapı ortaya çıkarır. Ayrıca pozitif ve negatif yan zincirli aminoasitlerin kendi aralarında kovalent olmayan tuz köprüleri oluşturma kapasiteleri de stabilizeye katkı sağlar. Proteinlerdeki tüm gruplar genellikle birbiriyle veya su moleküllerine hidrojen bağları ile bağlıdır. Su molekülleri, proteinlerde ana zincir ve yan zincir grupları ile hidrojen bağları yaparak ve hatta farklı protein gruplarını birbirine bağlayarak protein yapısının stabilizasyonunda da rol oynayabilir [160]. Ek olarak, suyun, ligandların proteinlere bağlanmasında, polar veya yüklü yan zincir veya ana zincir atomları ile ligand etkileşimlerine aracılık ettiği bilinmektedir [161].

Çalışmada CboFDH'nin kristal yapıları (PDB: 5ND9) Pymol programı kullanılarak analiz edildi. Özellikle substrat afinitesini arttırmaya yönelik değişiklik yapılması planlandığından enzimin katalitik bölgesinde substrat ile etkileşim alanı içerisinde kalan aminoasit rezidülerine odaklanıldı. Bu doğrultuda 120. pozisyon ile 332. pozisyon aralığında kalan tüm aminoasitlerin etkileşimleri incelendi. Literatür araştırması ile de teyit edildikten sonra henüz incelenmemiş bölgeler olan 285. ve 120. pozisyonlarda yer alan fenilalanin ve valin aminoasitlerine odaklanıldı. Buna göre, 120. pozisyonundaki valinin treonine, 285. pozisyonundaki fenilalaninin treonine değişimine karar verildi. Bu değişimlerdeki temel mantık, 120. pozisyonunda bulunan nonpolar valini, polar olan

treonine; 285. pozisyondaki yapıca büyük ve non-polar olan fenilalanini daha küçük yapıda ve polar olan treonine değiştirmek şeklinde oldu. Aktif bölgenin geometrisi ve özellikle de substrat kanalının yapısı formattan büyük başka bir molekülün aktif bölgeye girmesini engellediğinden FDH enzimlerinin format özgüllüğü çok yüksektir. Çalışmada, termal stabiliteyi arttırmaya yönelik rezidüler belirlenirken daha önce başka mikroorganizma kaynaklı FDH enzimlerinde bu amaçla çalışılmış aminoasit rezidüleri araştırıldı. Bu rezidülerden 287. ve 311. pozisyonlardakilerin *C. boidinii* FDH için termal stabilitede artışa sebep olduğu bilgisi literatürde yer alan 2 derlemede sadece Dr. Labrou'nun kişisel verilerinden elde edilen bilgiler şeklinde belirtilmiştir [4, 96]. Literatürde bu bölgelerin termal stabiliteye etkisine dair detaylı çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmada enzim termal stabilitesini artırmak için 287. pozisyondaki glutaminin, glutamate dönüşümünü ve 311. pozisyondaki histidinin glutamine dönüşümü şeklindeki mutasyonlara karar verildi. Buna göre, 287. pozisyonda bulunan, yapısında -NH₂ içeren glutaminin, mutasyon ile yapısında -OH içeren glutamata dönüşümünün, H bağı oluşturma potansiyelini artırabileceği bunun da yapıyı elektrostatik açıdan daha kararlı hale getirebileceği öngörülmüştür. 311. pozisyondaki benzen halkalı histidinin yapısı daha küçük ve nötral glutamine dönüştürüldüğünde, yapının elektrostatik olarak daha kararlı hale geleceği öngörülmüştür.

Termal stabiliteyi arttırmaya yönelik daha önce çalışılmış rezidüler seçilirken aynı zamanda substrat afinitesini de arttırabileceği düşünülen pozisyonların seçilmesine dikkat edildi. Seçilen bu iki bölgeden 287. rezidü için düşünülebilecek bir diğer mantık yük röle sistemlerinin düzenlenmesi şeklindedir. Bu sistemde, asit, baz ve nükleofilden oluşan katalitik bölgede yer alan üçlü, nükleofilik bir rezidü oluşturur. Böylece ortamdaki asit baza etki ederek, nükleofilik olan rezidüden H koparır ve substrata atak etkisi yaratır. Bu durum, ortamdaki hem elektrostatik durumunu değiştirirken hem de substrat afinitesini etkileyebilir. Nükleofil en yaygın olarak bir serin veya sistein amino asididir, ancak bazen treonin veya hatta selenosistein olabilir. Format dehidrogenazlardaki önemli bir özellik katalitik bölgenin, diğer tüm NAD + bağımlı dehidrogenazlarda korunan His ± Glu yük röle sisteminin yerine, FDH'lerde (*C. boidinii* enziminde His-311 ve Gln-287) değişmeyen bir His ± Gln çifti bulunmasıdır. Çalışma için seçilen bölgelerden 287. pozisyondaki glutamin yerine asidik bir aminoasit olan glutamik asidin değiştirilmesi özellikle 313. pozisyonda yer alan

nükleofilik bir rezidü olan serin aminoasidinden bir H kopmasına sebep olacağı ve substrata bir atak etkisi yaparak afiniteyi arttırabileceği öngörülmüştür.

Çalışmadaki kombine mutasyona (Phe285Thr/His311Gln), termal stabilite ve aktiviteyi arttırmaya yönelik mutasyonlar yapıldıktan ve mutantların kinetik parametreleri hesaplandıktan sonra karar verildi. Yapılan deneyler ve hesaplamalar sonucunda substrat afinitesini daha fazla artırdığını bulduğumuz 285. pozisyondaki aminoasit değişimi ile termal stabiliteyi daha fazla artırdığını bulduğumuz 311. pozisyondaki aminoasit değişiminin aynı anda gerçekleştirilmesine karar verildi. Bunun için 285. pozisyondaki mutasyonun varlığı doğrulandıktan sonra aynı plazmid, kalıp olarak kullanılarak 311. pozisyonda mutasyon gerçekleştirildi. Çalışma için Phe285Thr, Val120Thr, Gln287Glu ve His311Glu mutasyonları ve Phe285Thr/His311Glu kombine mutasyonu bölgeye yönelik mutagenез yöntemi ile gerçekleştirildi. Primerler, bu mutasyonları oluşturmak üzere NEBasechanger ve OligoEvaluator programları kullanılarak tasarlandı. Her mutasyon için tasarlanan primerlerin Tm sıcaklıklarını bulmak için gradient PZR yapıldı (Şekil 4.22). Buna göre, Phe285Thr aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 57 °C, Val120Thr aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 62 °C , Gln287Glu aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 64 °C ve His311Glu aminoasit değişimine ait primerler için Tm: 58 °C olarak bulundu. Tm sıcaklıklarına karar verildikten sonra belirlenen bölgelerde istenen aminoasit değişikliklerini gerçekleştirmek için PZR reaksiyonları yapıldı (Şekil 4.23). Mutasyon yapılan tüm ürünlerin PZR görüntülerinde, yabancı tip CboFDH ile aynı hizada bant elde edildi (~4761bp). PZR reaksiyonu sonrası ortamda karışık halde bulunan mutant ve yabancı şablonların içerisinde, yabancı tipleri uzaklaştırmak ve sadece mutant şablonun kalmasını sağlamak amacıyla KLD reaksiyonları yapıldı. KLD reaksiyonları sonrasında her bir karışım, modifiye edilmiş degrede olmayan ve bu yüzden protein ekspresyon çalışmalarında kullanılan [196, 197] *E. coli* BL12 (D3) kompetent hücrelerine transfer edildi (Şekil 4.24). Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden LB sıvı ön kültür hazırlanıp plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra DNA konsantrasyonları Phe285ThrFDH için 98 ng/µl, Val120ThrFDH için 103 ng/ µl, Gln287GluFDH için 112 ng/ µl, His311GlnFDH için 108 ng/ µl ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 106 ng/ µl olarak ölçüldü. Daha sonra plazmidler, mutasyonların doğruluğunu teyit etmek için sekans analizine gönderildi. Elde edilen sekans sonuçları Bioedit ve Snapgene programları kullanılarak daha önce

elde edilen yabancı tip CboFDH sekansı ile alignmant yapılarak karşılaştırıldı. Buna göre, 120., 285., 287., 311. ve hem 285 hem 311. pozisyonlarda istenen aminoasit değişikliklerinin gerçekleştirildiği teyit edildi (Şekil 4.25).

Mutant FDH'lerin protein ekspresyonlarında lak operonunun induksiyonu için IPTG yerine T7 bazlı *E. coli* ekspresyon sistemlerinde herhangi bir amino asit ve vitamin takviyesi içermeyen, glikoz, gliserol, tek bir azot kaynağı olarak NH_4 + karışımı ve laktoz kullanılarak basit ve düşük maliyetli bir oto induksiyon media kullanıldı [198]. Otoindüksiyon kullanarak lak operon düzenleyici elemanların kontrolü altında protein üretimi, daha çok tercih edilen karbon substratların tüketiminden sonra *E. coli*'nin laktoz üzerinde iki fazlı büyümesine dayanır. İki fazlı büyüme, bir kültür büyüme ortamında bulunan biri hedef bakteri tarafından metabolize edilmesi kolay olan iki şekerin varlığına bağlıdır. Buna göre *E. coli* ortamda bulunan glukozu ilk olarak tüketir ve bu durum, hızla büyümeye yol açar. Ardından bir lag fazı oluşur. Lag fazı sırasında ikinci şeker olan laktozu metabolize etmek için kullanılan hücresel süreç devreye girer ve ikinci şeker metabolize olur [199].

Ön kültürü yapılmış Studier otoindüksiyon mediaya inoküle edilmiş mutant hücreler 200 x rpm'de orbital çalkalayıcıda 30 °C' de 16 saat inkübe edildi. Mutant proteinlerin N-terminal kısmında 6 adet histidin rezidüsü olduğundan, histidine afinite gösteren Ni-NTA agaroz kolon ile saflaştırma işlemleri yapıldı. Saflaştırma sonrası elde edilen protein örnekler SDS-PAGE jelde yürütüldü ve 41 kDa civarında protein bantları elde edildi (Şekil 4.26). Her bir mutant proteine ait, net bir şekilde 41 kDa civarında bant görülen saf protein örnekleri tek bir yerde birleştirildikten sonra yapıdaki imidazol ve tuzları uzaklaştırmak için ultrafiltrasyon işlemi ve PD-10 kolondan geçirme işlemleri yapıldı. Bu işlemler sonrası protein konsantrasyonları, Phe285ThrFDH için 8.5 mg/ml, Val120ThrFDH için 8.2 mg/ml, Gln287GluFDH için 5.5 mg/ml, His311GlnFDH için 6.4 mg/ml ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 7.3 mg/ml olarak ölçüldü. Ayrıca mutant örneklerde FDH-1 proteininin varlığı Western Blot analizi ile de 41 kDa civarında gösterildi (Şekil 4.27). Saflaştırma ve protein varlığının doğrulanma işlemlerinden sonra mutant FDH'ler için CD spektroskopisi ve karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

Proteinlerin ve nükleik asitlerin konformasyonel değerlendirmeleri, biyomoleküllerin katlanması ve açılım termodinamiğinin belirlenmesi, asimetrik biyomoleküllerin etkileşimli çalışmaları, makro moleküllerin katlanması ve katlanma kinetiklerinin

aydınlatılması konularında CD spektroskopisinden faydalanılır [163]. Dairesel dikroizm, sol el ve sağ el dairese polarize ışığın eşit olmayan emilimi olarak tanımlamaktadır. Bir ışık demeti kendisine ve zamana bağlı elektrik ve manyetik alanlara sahiptir. Işık uygun prizmalardan geçirildiğinde tek bir düzlemde sinüzoidal olarak salınır. Önden bakıldığında sinüzoidal dalga, eşit uzunluktaki biri saat yönünde (ER) dönen ve diğeri tersine (EL) dönen iki vektörün sonucu olarak görülebilir. Dalgalar birbirleriyle 90° faz farklıdır ve çeşitli prizmalar veya elektronik cihazlar kullanılarak ayrılabilirler. Simetrik moleküller ışıkla etkileştiğinde, dairese polarize ışığı sağa ve sola farklı seviyelerde (bu nedenle dairese dikroizm terimi kullanılır) emebilir. Protein ikincil yapısı, 'uzak ultraviole (UV)' spektral bölgesinde (190-250 nm) CD spektroskopisi ile belirlenebilir. Bu dalga boylarında sinyal, düzenli ve katlanmış bir ortamda kromofor peptit bağı olduğunda ortaya çıkar. α -heliks proteinler 222 nm ve 208 nm'de negatif bantlara ve 193 nm'de pozitif bir banta sahiptir.

Çalışmada saflaştırma işlemleri biten yabancı tip ve mutant FDH'lerin ikincil yapıları CD spektroskopi yöntemi ile belirlendi. FDH enzimi homodimer bir yapıda olup her bir dimer bir koenzim bağlanma alanı ve Rossmann kıvrımlarına dayanan bir substrat bağlanma alanı içerir. İki alan, iki uzun α -heliks olan, α A ve α 8 yoluyla bağlanır. Her bir dimer yapısı ağırlıklı olarak α -heliks yapısı içerir. Bu nedenle çalışmada CD spektroskopi deneyleri esnasında protein örneklerin ikincil yapıları belirlenirken, yabancı tip ve mutant FDH'lerin protein konsantrasyonları kendi tamponlarıyla 0.25 mg/ml'ye dilüe edildi. Protein örnekler, 25 °C'de 190-260 nm dalga boyu aralığında CD spektroskopi cihazında tarandı. Çalışma sonucunda α -heliks yapıları özgü pikler 190-260 nm bandında gözlemlenerek hem yabancı hem de mutant proteinler için elde edildi. (Şekil 4.20, Şekil 4.35).

Çalışmada saflaştırma işlemleri biten yabancı tip CboFDH, Gln287GluFDH, His311GlnFDH ve Phe285Thr/His311GlnFDH enzimlerinin termal stabilite deneyleri CD spektroskopisi yöntemiyle yapıldı. Bunun için kendi tamponları ile 0.25 mg/ml'ye dilüe edilmiş protein konsantrasyonuna sahip yabancı tip CboFDH ve mutant proteinlerin termal denatürasyon eğrileri, 25 °C ile 95 °C sıcaklık aralığında dakikada bir derece artış sağlanarak α -heliks yapıya özgü 222 nm'de ölçüldü. Buna göre yabancı tip CboFDH'in termal denatürasyon sıcaklığı 64 °C olarak bulundu (Şekil 4.21). Mutant proteinlerden His311GlnFDH için termal denatürasyon sıcaklığı 77 °C, Glu287GlnFDH için denatürasyon sıcaklığı 70 °C ve Phe285Tre/His311Gln FDH için

denatürasyon sıcaklığı 73 °C olarak bulundu (Şekil 4.36). Yapılan çalışmalar ile farklı mikroorganizma ve *C. bovidinii* kaynaklı FDH 'lern termal denatürasyon sıcaklığı 54.7 °C ile 64.5 °C aralığında bildirilmiştir [96]. Çalışmadaki yabancı tip CboFDH'in termal denatürasyon sıcaklığı diğer yabancı tip FDH'ler ile benzer çıkmış olup, termal stabiliteyi arttırmaya yönelik yapılan mutasyonlar ile denatürasyon sıcaklığı 6 °C ile 13 °C arasında artırılmıştır.

Literatürde, Glu287Gln ve His311Gln değişimleri için termal stabilite çalışmalarının varlığı sadece Popov ve arkadaşlarına ait derlemede Dr. Labrou'nun kişisel verilerine dayanarak Glu287Gln mutasyonunun termal stabiliteyi etkilemediği, His311Gln mutasyonunun ise stabiliteyi 1.6 kat artırdığı şeklinde bildirilmiştir [96]. Bunun yanında bu rezidülerdeki mutasyonların enzimin termal stabilitesine etkisine dair literatürde herhangi bir başka kayıt bulunmamaktadır. Labrou'nun kişisel verilerinde yer alan 287. pozisyondaki değişimin enzimin termal stabilitesine etki etmediği bilgisine karşılık çalışmada enzim termal stabilitesinde yabancı tipe göre 6 °C'lık bir artış gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak 287. pozisyondaki glutaminin, yapısında OH içeren glutamik aside dönüştürülmesiyle, H bağlarına katkı sağlayarak stabiliteyi artırabileceği düşünülebilir.

Ayrıca 311. pozisyonda yapılan mutasyon ile yapıcı halkalı olan histidinin daha polar ve nötral glutamine çevrilmesiyle katalitik bölgenin daha stabil hale gelebileceği çalışma öncesi biyoinformatik analizler ile öngörülmüştür. Bunun dışında 311. pozisyona dair diğer bir olasılık da, hidrofobik aminoasitlerin bulunduğu bir bölgede kalan hidrofilik yapıdaki histidinin, stabilizasyonu bozmakta olduğudur. Bu yüzden histidinin yapıcı daha az hidrofilik bir aminoasit olan glutamine çevrilmesiyle ortamın daha stabil hale gelebileceği, yine çalışma öncesi yapılan biyoinformatik analizler ile öngörülmüştür. Bu bölgedeki değişim sonucunda enzim termal stabilitesinde yabancı tipe göre 13 °C'lık artış gözlenmiştir. Çalışmada Phe285Thr/His311Gln kombine mutasyonunda ise yabancı tipe göre enzimin termal stabilitesinde 9 °C'lık artış bulunmuştur. Kombine mutasyonda, His311Gln tekli mutasyonuna göre 4 °C daha az bir termal stabilite elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak 311. rezidüde histidin yerine değiştirilen polar yapıdaki glutaminin, 285. rezidüdeki polar olmayan fenilalanin ile elektrostatik olarak denge halinde olması ve buradaki fenilalanin polar yapıdaki treonine dönüşümü ile bu dengenin olumsuz yönde etkilenmesi düşünülebilir. Çalışmada Phe285Thr mutasyonu substrat afinitesini arttırmaya yönelik tasarlanmıştır.

Endüstriyel uygulama alanı olarak farmasötik çalışmalarda önemli bileşiklerin sentezinde ve maliyeti yüksek kofaktör rejenerasyonunda kullanılan FDH'lerin termal stabilitesini artırmaya yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan *C. boidinii* kaynaklı FDH'in termal stabilitesini artırmak için Slusarczyk ve arkadaşları sistein rezidülerine odaklanmışlardır. Buna göre yaptıkları Cys23Ser ve Cys262Val mutasyonları sonucundaki termal stabilitede düşüş rapor edilmiştir [191]. FDH'lerin katalitik bölgesinde yer alan ve enzim stabilizasyonunda içerdiği disülfid bağlarından dolayı önemli görevi olan sistein rezidülerinin değiştirilmesi yapının stabilizasyonunu bozduğu kuvvetle muhtemeldir. *C. boidinii* kaynaklı FDH ile yine Slusarczyk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yönlendirilmiş değişim yöntemi kullanılarak CboFDH'lerde termal stabilizasyonu daha yüksek yeni mutantlar elde edilmiştir. Buna göre Arg178Ser, Arg178Gly, Asp149Glu, Glu151Asp, Lys356Glu, Lys306Arg, Thr315Asn, Arg187Ser ve Phe285Tyr mutantlarında 2-47 kat enzim termal stabilitesinde artış gözlenmiştir [210]. Bu çalışmada elde edilen mutant enzimler rasyonel olmayan protein mühendisliği tekniklerinden yönlendirilmiş değişim ile elde edilmiştir. Yani spontan gerçekleştirilen mutasyonlar sonucu oluşturulan mutant kütüphanelerin ürünleridir ve herhangi bir biyoinformatik analize ihtiyaç duyulmamaktadır. FDH termal stabilitesini arttırmaya yönelik literatürde *C. boidinii* haricinde diğer mikroorganizma kaynaklı FDH'lere ait çalışmalar mevcut olup Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Çalışmada saflaştırma işlemleri sonrasında yabanıl tip ve mutant enzimler için kinetik aktivite tayinleri yapıldı. Kinetik aktivite tayinlerinden önce, enzimlerin stabilitesinde ve aktivitesinde önemli bir faktör olan aşırı yüksek veya düşük olmaları genellikle çoğu enzim için tam aktivite kaybına yol açabilen pH ve sıcaklık analizleri yapıldı. Buna göre optimum pH şartlarını belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (pH 5-12) hazırlanan tamponlar kullanılarak her bir enzim için aktivitenin en yüksek bulunduğu pH değeri belirlendi. Yabanıl tip CboFDH için optimum pH 7.4 (Şekil 4.13), Phe285Tyr/His311Gln FDH için pH 8 ve Glu287Gln, His311Gln, Val120Thr ve Phe285Thr FDH'ler için optimum pH 7 olarak bulundu (Şekil 4.28). Yapılan çalışmalara göre FDH aktivitesinin NAD⁺ ve format için Michaelis sabitleri pH 6.0-9.5 aralığında benzer olduğu bildirilmiştir. Bu geniş pH aralığı FDH'yi herhangi bir dehidrojenaz bazlı sentez için uygulanabilir kılar. Diğer tüm dehidrojenazlar, katalitik aktivite için dar bir optimum pH sergilerler ve NAD (P) H rejenerasyonu için evrensel

bir katalizör olarak kullanılamazlar [4]. Çalışmada hem yabanıl tip hem de mutant proteinlerin optimum pH'ları literature uygun bulunmuştur. Çalışmada her bir FDH için optimum sıcaklık şartlarını belirlemek amacıyla da farklı sıcaklıklarda (20°C-90°C) aktivite ölçümleri alındı. Çalışma sonucunda optimum sıcaklık değerleri yabanıl CboFDH için 40 °C (Şekil 4.14), Phe285Thr için 40 °C, Val120Thr için 40 °C, Gln287Glu için 60 °C, His311Gln için 65 °C ve Phe285Thr/His311Gln FDH için 65 °C olarak bulundu (Şekil 4.29).

Çalışmada enzim kinetiği analizleri ile yabanıl tip ve mutant FDH'lerin K_M , V_{max} ve K_{cat} değerleri Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk denklemlerinin yardımıyla hesaplandı. Absorbanslar 10 dk boyunca 10 sn aralıklarla olacak şekilde 340 nm'de ölçüldü. Daha sonra, Δ Absorbans / dakikanın mutlak değerleri kullanılarak her bir çözüm için değerler; V_0 , hız (U/L): $(\Delta A / dk \times T.V.(ml) \times 10^6) / (\epsilon \times d \times N.V(ml))$ denklemleri Beer Kanunu ile hesaplandı. $1/S$ değerlerine karşılık $1/V_0$ değerleri ile Lineweaver –Burk grafiği çizilerek yabanıl tip ve mutant enzimlerin farklı substrat, koenzim ve enzim konsantrasyonlarında denklemleri elde edildi. Elde edilen her bir denklemde x'e sıfır verildiğinde elde edilen değer $1/V_{max}$ iken y'ye sıfır verildiğinde elde edilen değer $1/K_M$ 'i ifade etti. Bu değişkenler hesaplandıktan sonra K_{cat} değerleri $V_{max}/[E]$ formülü ile hesaplandı. Burada $[E]$: enzim konsantrasyonu/reaksiyon hacmi/protein Mw (Da) şeklinde hesaplandı. Daha sonra bu değerler kullanılarak K_{cat}/K_M oranı ve spesifik aktivite (enzim aktivitesi/toplam protein miktarı) değerleri hesaplandı. Spesifik aktivite değerleri kullanılarak relatif aktivite değerleri de yabanıl ve mutant enzimler için hesaplandı.

Enzim kinetiği çalışmaları ile yabanıl tip CboFDH için format K_M değeri 2 mM ve K_{cat} değeri $9.2 \times 10^2 S^{-1}$ olarak hesaplandı. NAD için K_M değeri 1.5 mM ve K_{cat} değeri $2.62 \times 10^4 S^{-1}$ olarak hesaplandı. K_M değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir ve ne kadar düşük ise enzimin substrata olan afinitesi o kadar yüksek olduğu anlamına gelir. Çalışma sonucunda format için bulunan 2 mM K_M değeri literatürde yer alan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. Bu da klonlanan enzimin substratı olan formata iyi bir afinite gösterdiğinin kanıtıdır. Literatürdeki diğer CboFDH klonlama çalışmalarında format K_M değeri Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 7.3 mM [201], Labrou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2.4 mM [200], Bommarius ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5 mM [202], Ansorge-Schumacher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5.9 mM [203], Schirwitz ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada 20 mM [204], Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3.63 mM [188], Slusarczyk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5.6 mM olarak bildirilmiştir.

Bir enzimin K_{cat} değeri, enzim molekülünün bir saniyede substrattan oluşturduğu ürün sayısıdır ve bu değer ne kadar yüksek ise enzimin o kadar aktif olduğu anlamına gelir. Çalışmada klonlanan enzimin format için K_{cat} değeri $9.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak bulunması enzimin literatürde yer alan diğer CboFDH'ler ile kıyaslandığında yüksek bir K_{cat} değerine sahip olduğunu gösterir. Buna göre literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile format K_{cat} değeri Labrou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4.7 S^{-1} [200], Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3.3 S^{-1} [201], Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 92.05 dk^{-1} [188] olarak bildirilmiştir.

Çalışmada NAD için K_M değeri 1.5 mM olarak bulundu. FDH enzimlerinde enzimin substratı ve koenzimine ilgisinin benzer olduğu yani yakın K_M değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir [4]. Çalışmada 1.5 mM olarak bulunan NAD K_M değeri, 2 mM olarak bulunan format K_M değeri ile oldukça yakındır. Literatürde yer alan diğer CboFDH NAD K_M değerleri Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5.36 mM [202], Andreadeli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 0.015 mM [91], Ansorge-Schumacher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 50 μM [203], Schirwitz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 50 mM [204], Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3.4 mM [189], Carter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 75 μM [205] ve Slusarczyk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 45 mM [191] olarak bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda NAD için K_M değerlerinin oldukça değişken bulunduğu bunun sebebinin ise klonlama işlemleri esnasında kullanılan tekniklerden (vektör seçimi, primer tasarımı vb.) kaynaklı olduğu düşünülebilir.

Çalışmada NAD K_{cat} yani klonlanan enzimin NAD için saniyedeki ürün sayısı $2.62 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu bulgunun literatürdeki diğer NAD K_{cat} değerleri ile kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda NAD K_{cat} değeri Andreadeli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3.7 S^{-1} [91], Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1338.08 dk^{-1} [188] ve Carter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 12.8 dk^{-1} [205] olarak bildirilmiştir.

Çalışmada, 4 adet tekli mutasyon yabancı tip CboFDH plazmidi şablon olarak kullanılarak, 1 adet kombine mutasyon ise Phe285ThrFDH plazmidi şablon olarak kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan 5 mutant enzim için kinetik parametreler hesapladı. Yapılan mutasyonlardan Phe285Thr ve Val120Thr değişimleri enzimin

formata karşı afinitesi artırmaya yönelik tasarlanmış olup kinetik hesaplamalar sonucunda iki mutant enzim için de format afinitesinin arttığı bulunmuştur. Buna göre Phe285Thr FDH için format K_M değeri 0.97 mM, K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak; NAD için K_M değeri 2.3 mM ve K_{cat} değeri $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Yabanıl tip CboFDH enzimi için 2 mM bulunan format K_M değeri Phe285ThrFDH enziminde 0.97 mM olarak bulunmuştur. Yani enzimin formata olan afinitesi 2.06 kat artmıştır. CboFDH kristal yapısı (5DN9) Pymol programı ile incelendiğinde değiştirilen 285. pozisyondaki fenialaninin substrat bağlama kanalının giriş kısmında bulunduğu görülür. Afinitede meydana gelen bu artışın sebebi olarak, yapının polar özellikteki ve daha küçük treonine değişiminin substrat bağlama kanalını genişlettiği ve polar etkileşimler ile formatın kanala daha kolay girmesine olanak sağladığı düşünülebilir. Çalışmada, Phe285ThrFDH için format K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Daha önce format K_{cat} değeri $9.2 \times 10^2 \text{ S}^{-1}$ olarak bulunmuş yabanıl tip CboFDH kıyaslandığında bu değer 1.47 kat arttığı gözlenmiştir.

Ancak yapılan bu mutasyon ile NAD afinitesi 1.5 kat düşmüştür. Çalışmada yabanıl tipte 1.5 mM olan NAD K_M değeri 2.3 mM olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde yabanıl tipte $2.62 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olan K_{cat} değeri $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve 5.7 kat azalış göstermiştir. Bunun sebebi ise aktif bölgedeki substrat bağlama ve NAD^+ bağlama bölgelerinin yakın olması sebebiyle substrat bağlama bölgesinde meydana gelen değişikliğin NAD^+ bağlama bölgesini olumsuz yönde etkilemiş olabileceğidir. Diğer yandan 285. pozisyonda yapılan değişikliğin, NAD^+ bağlama bölgesinde önemli rol oynayan ve 285. pozisyona çok yakın olan 258. pozisyondaki argininin suyla yaptığı H bağlarına etki etmiş olabileceği ve bunun da NAD^+ bağlama afinitesinde düşüşe yol açacağı öngörülmektedir.

Format afinitesini artırmaya yönelik yapılan bir diğer mutasyon olan Val120Thr FDH için format K_M değeri 1.3 mM ve K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak; NAD için K_M değeri 7.9 mM ve K_{cat} değeri $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. 120. pozisyonda gerçekleştirilen bu mutasyon ile yabanıl tip CboFDH'e göre format afinitesi 1.53 kat artmıştır. Aynı şekilde format K_{cat} değeri de yabanıl tipe göre 13.7 kat artmıştır. Çalışmada valin yapı olarak kendisine çok benzeyen ve ayrıca polar özellikteki treonine dönüştürülmüştür. Böylece substrat kanalında meydana gelen bir genişleme ile substratın bu bağlanma bölgesine kolayca alınabildiği düşünülmektedir. Ancak çalışmada NAD^+ afinitesinde, yabanıl tipe kıyasla 5 kat azalma olduğu hesaplanmıştır.

Yine NAD^+ K_{cat} değerinde 1.6 kat azalma gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak 120. pozisyonun sadece substrat bağlama kanalına değil aynı zamanda NAD^+ bağlama bölgesine de çok yakın olması sebebiyle, bu civardaki NAD^+ bağlanmasında görevli polar aminoasitlerin etkileşimlerine olumsuz etki edebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada biyoinformatik analizler sırasında termal stabiliteyi artıracak mutasyonlar için rezidüler seçilirken, bu rezidülerin aynı zamanda özellikle format afinitesini de artırabilecek olması hedeflendi. Çalışmada termal stabiliteyi arttırmak için Gln287Glu ve His311Gln değişimlerine karar verilmiş olup termal stabilite açısından sonuçlar yukarıda tartışılmıştır.

Çalışmada, kinetik analizler sonucunda Gln287Glu FDH için format K_M değeri 1.65 mM ve K_{cat} değeri $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak; NAD için K_M değeri 3.3 mM ve K_{cat} değeri $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Bu bölgede gerçekleştirilen mutasyon sonucunda format K_M değeri yabanıl tip CboFDH'e göre 1.2 kat arttığı bulunmuştur. Format K_{cat} değeri ise afiniteadaki artışa benzer şekilde artış göstermiş ve bu oran 9.3 kat olarak hesaplanmıştır. Bunun sebebi olarak bu bölgede yer alan yük röle sisteminin düzenlenmesi olarak düşünülebilir. Bu sistemde, asit, baz ve nükleofilden oluşan katalitik bölgede yer alan üçlü, nükleofilik bir rezidü oluşturur. Böylece ortamdaki asit baza etki ederek, nükleofilik olan rezidüden H koparır ve substrata atak etkisi yaratır. Bu durum, ortamdaki hem elektrostatik durumunu değiştirirken hem de substrat afinitesini etkileyebilir. Çalışma için seçilen bölgelerden 287. pozisyonndaki glutamin yerine asidik bir aminoasit olan glutamik asidin değiştirilmesi özellikle 313. pozisyonnda yer alan nükleofilik bir rezidü olan serin aminoasidinden bir H kopmasına sebep olacağı ve substrata bir atak etkisi yaparak afiniteyi arttırabileceği öngörülmüştür. Labrou ve arkadaşlarının CboFDH için aynı bölgede yaptıkları mutasyonda ise yabanıl tipte 2.42 mM olan format K_M değeri mutasyon ile birlikte afinite kaybederek 2.91 mM olarak bildirilmiştir. Labrou ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada bu durumun sebebiyle ilgili herhangi bir bilgi verilmemiştir [181]. Gln287Glu mutasyonu için NAD^+ afinitesinde yabanıl tipe kıyasla 2.2 kat azalma hesaplanmıştır. Buna göre yabanıl tipte 1.5 mM hesaplanan NAD^+ K_M değeri, 3.3 mM olarak bulunmuştur. Aynı şekilde NAD^+ K_{cat} değeri de afinite ile korele olarak azalma göstermiş bu oran yabanıl tipe göre 1.8 kat olarak bulunmuştur. NAD^+ bağlanma bölgesinde Asn119, Ser313, Asp282, Arg174, His232, Tyr196, Asp195, Gln197, Tyr194 rezidüleri oldukça önemlidir [92] ve 287. pozisyonndaki değişimin özellikle bu

bölgelere yakın bulunmasından dolayı buradaki etkileşimleri olumsuz yönde etkileyerek NAD^+ afinitesini azaltabileceği düşünülebilir. Benzer şekilde Labrou ve arkadaşlarının aynı bölgede yaptıkları mutasyonda yabancı tipte 0.04 mM olan NAD K_M değeri mutasyon ile birlikte afinite kaybederek 0.15 mM olarak bildirilmiştir. Yani 3.75 kat NAD^+ afinitesinde azalma olduğu bildirilmiştir. Labrou ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada bu durumun sebebiyle ilgili herhangi bir bilgi verilmemiştir [181].

Çalışmada kinetik analizler sonucunda His311Gln FDH için format K_M değeri 1.5 mM ve K_{cat} değeri $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak; NAD için K_M değeri 1.6 mM ve K_{cat} değeri $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Buna göre daha önce yabancı tip için 2 mM bulunan format K_M değeri bu mutasyon ile 1.5 mM, afinite artışı ise 1.3 kat olarak hesaplandı. Aynı şekilde format K_{cat} değerinde de yabancı tipe göre 3.4 kat artış bulundu. Ancak aynı bölgede Labrou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yabancı tipe göre format K_M değeri 2.42 mM'dan 24.92 mM'a artmış olduğu ve afinitenin de 10 kat azaldığı bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak bu bölgede yer alan yük röle sisteminin olumsuz yönde etkilendiği savunulmuştur [182].

Fakat kristal yapı incelendiğinde (5DN9) 311. pozisyonda yer alan histidinin substrat bağlama kanalının başında olduğu görülebilir. Bu yüzden histidin gibi halkalı bir yapıya sahip aminoasidin, glutamin gibi daha küçük bir aminoasite dönüşümünün enzim substrat bağlanmasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Aynı zamanda burada yer alabilecek olan yük röle sisteminin oluşturacağı elektrostatik dengeden dolayı afiniteyi artırabileceği savunulabilir. His311Gln mutasyonu için yabancı tipte 1.5 mM olan NAD K_M değeri 1.6 mM olarak çok küçük bir afinite kaybı ile hesaplanmıştır. NAD K_{cat} değeri ise yabancı tipe göre 3.1 kat azalma göstermiştir. Benzer şekilde aynı bölgede mutasyon yapan Labrou ve arkadaşlarının çalışmasında da NAD^+ K_M değeri benzer kalırken K_{cat} değerinde düşme bildirilmiştir [182]. Bunun sebebi olarak format ve NAD^+ bağlama bölgelerinin yanyana olması, histidinin de bu iki bölgenin giriş kısmında bulunmasından dolayı burada yapılan bir mutasyonun NAD^+ bağlanmasını olumsuz etkileyebileceği düşünülebilir.

Yapılan kinetik çalışmalar ile format afinitesini en fazla artırdığı hesaplanan 285. bölge mutasyonu ile, CD spektroskopisi çalışmalarıyla termal stabiliteyi en fazla artırdığı bulunan 311. bölge mutasyonu kombine mutasyon olarak yapıldı. Phe285Thr/His311Gln kombine mutasyon sonucunda termal stabilitenin yabancı tip

CboFDH'e göre 9 °C artığı yukarıda tartışılmıştır. Kombine mutasyon ile elde edilen mutant enzim için yapılan kinetik analizler sonucunda format K_M değeri 1.4 mM ve K_{cat} değeri $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ olarak; NAD için K_M değeri 7 mM ve K_{cat} değeri $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Buna göre format afinitesi yabancı tipe kıyasla 1.42 kat, format K_{cat} değerinin ise 7.3 kat arttığı hesaplanmıştır. Bu değer diğer tekli mutasyonlar ile kıyaslandığında özellikler Phe285Thr mutasyonuna göre format afinitesini daha az artırdığı görülmektedir. Bunun sebebi olarak aynı anda hem 285. hem de 311. pozisyonlarda yapılan mutasyonun, her iki mutasyon bölgesinin substrat bağlama kanalının girişinde yer almasından dolayı hem konformasyonu hem de elektrostatik etkileşimleri olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülebilir. Çalışmada kombine mutasyon yapılan mutant enzimin NAD afinitesinde yabancı tipe göre 4.6 kat, K_{cat} değerinde ise 1.4 kat azalma hesaplandı. Kombine olarak mutasyonu yapılan gerek 285. pozisyon gerekse 311. pozisyona ait tekli mutasyonlarda da NAD afinitesinde ve K_{cat} değerinde benzer sonuçlar hesaplanmıştır.

Literatürde yer alan farklı mikroorganizma kaynaklı (ParFDH, SoyFDH, PseFDH, MycFDH, CmeFDH, SceFDH) FDH'lerin aktivitelerini değiştirmeye yönelik farklı yöntemleri temel alan protein mühendisliği çalışmaları mevcut olup Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Literatürde, CboFDH'deki substrat afinitesine etkisini değerlendirmek için protein mühendisliği yöntemlerinden bölgeye yönelik mutagenез tekniği kullanılarak yapılmış mutasyon çalışmaları mevcuttur. Labrou ve arkadaşları CboFDH'de aktif bölgenin karakterizasyonuna yönelik belirledikleri bölgelere (Phe69Ala, Asn-119His, Ile175Ala, Gln197Leu, Arg258Ala, Gln287Glu ve His311Gln) mutasyon yapmışlardır [182]. Çalışmada, elde ettikleri mutant enzimlerde format ve NAD^+ için kinetik ölçümler yapılmış, buna göre, Phe69Ala mutasyonu sonucu NAD^+ afinitesi değişmezken, format afinitesi 2.16 azaldığı bildirilmiştir. Bu bölgenin aslında stabilizasyonda görevli olduğu ve aktif bölgedeki hidrofobik duvar yapısına destek sağladığı öngörülmüştür. Bu nedenle burada meydana gelen bir değişimin enzimin substrat bağlama kapasitesini olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür. Ile175Ala mutasyonunda ise NAD^+ afinitesinde 10 kat, format afinitesinde 2 kat azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Yine bu bölgedeki değişimin özellikle hidrofobik duvar yapısında ve burdaki stabilizasyona olumsuz etki edebileceği öngörülmüştür. Asn119His ve Gln197Leu mutasyonları, NAD^+ afinitesini çok fazla etkilemezken,

format afinitesinde 4 kata kadar azalmaya sebep olmuştur. Bu durumun sebebiyle ilgili literatürde detaylı bir bilgi verilmemiştir. Ancak 119. ve 197. rezidüler substrat bağlama kanalına yakın bulunduğundan 119. rezidüdeki asidik aminoasidin bazik bir aminoaside dönüştürülmesi substrat ile enzim arasındaki etkileşimi bozabileceği, 197. rezidüde bulunan polar yapıdaki glutaminin polar olmayan lösine dönüştürülmesi aynı şekilde enzim ve substrat arasındaki bağlanmaları zayıflatmış olabileceği düşünülebilir. Çalışmada Arg258Ala mutasyonun enzimi inaktif hale getirdiği bildirilmiştir. Sebep olarak, 258. pozisyonda yer alan arjininin, hidrit üzerindeki negatif yükün satabilizasyonunda kilit görev oynadığı ve burada meydana gelebilecek bir değişimin yük dengesini bozabileceğinden enzim aktivitesini azaltacağı bildirilmiştir.

Yine bu çalışmada Gln287Glu ve His311Gln mutasyonları yapıp afinite üzerine etkisi yapılan kinetik ölçümler ile araştırılmıştır. Buna göre Gln287Glu mutasyonunda NAD afinitesi 3.75 kat, format afinitesinin ise 1.2 kat azalma gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum 287. pozisyonun enzim stabilizasyonunda ve substrat afinitesinde önemli olan yük röle sistemi ile ilişkilendirilmiştir [182]. Yaptığımız çalışmada ise NAD⁺ afinitesinde 2.2 kat azalma görülürken, format afinitesinde 1.2 kat artış bulunmuştur. Bu durum bu mutasyon bölgesi için yukarıda tartışılmıştır.

Aynı çalışmada His311Gln mutasyonu sonucu yapılan kinetik ölçümler sonucunda NAD⁺ afinitesinde bir değişiklik görülmezken, format afinitesinde 10 kat azalma olduğu bildirilmiştir. Bu durum yine bu bölgenin içinde yer aldığı tahmin edilen yük röle sisteminin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir [182]. Aynı bölge için yaptığımız mutasyonda ise format afinitesinde 1.3 kat artış gözlenmiştir. NAD⁺ afinitesinde ise yapılan çalışmaya benzer olarak yok denecek kadar az bir afinite kaybı gözlenmiş ve bu durum bu bölge mutasyonu için yukarıda tartışılmıştır.

CboFDH'de yapılan bir başka çalışmada ise Jiang ve arkadaşları NAD⁺ afinitesine artırmaya yönelik Val120Ser, Asn187Asp ve Val120Ser/Asn187Asp mutasyonlarını tasarlamışlardır. Gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda en iyi mutant olan Val120Ser mutantının substrat K_{cat} değerinin yabanıl tip ile kıyaslandığında sırasıyla 3.48 kat arttığı bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak, 120. pozisyonadaki polar olmayan valinin polar hale dönüştürülmesinin, substrat bağlama kanalına çok yakın olan bu bölgenin substrat ve enzim arasındaki etkileşimi artırdığı düşünülmüştür. Asn187Asp mutasyonu için substrat K_{cat} değerinin 1.2 kat arttığı ancak K_M değerinin 2 kat azaldığı

bildirilmiştir. Burada ise polar yüklü bir yapıya sahip asparajinin, negatif yüklü aspartik aside dönüştürülmesi ortamdaki yük dengelerini ve elektrostatik etkileşimleri etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. NAD⁺ e karşı gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda yapılan tekli mutasyonların NAD⁺ kcat değerini artırırken, afinitesinde azalmaya yani K_M değerinde artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Ancak Val120Ser/Asn187Asp kombine mutasyonunda ise yabancı tipe kıyasla K_{cat}/K_M değerinin 1.5 kat bunun yanında afinitenin de 1.45 kat arttığı gösterilmiştir [188].

Slusarczyk ve arkadaşları da cboFDH’de sistein rezidülerine odaklanarak kinetik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bölgeye yönelik Cys23Ser ve Cys262Val mutasyonları sonucunda, kinetik parametrelerde Cys23Ser için bir değişiklik gözlenmezken; Cys262Val mutasyonunda 1.3 katlık bir format afinite artışı bildirilmiştir. Bunun yanında her iki pozisyon için kimyasal stabilitede artış olduğu rapor edilmiştir [191]. Bu durum enzimin stabilitesinde içerdiği disülfid bağları sayesinde önemli rol oynayan sistein rezidüleri ile ilişkilendirilmiştir. Kinetik parametrelerin çok az etkilenmesine ait literatürde bir veri bulunmamasına rağmen özellikle 23. pozisyonun nispeten substrat ve koenzim bağlama kanalına biraz uzak olmasıyla bölgede meydana gelen değişimin bağlanmayı çok etkilemeyeceği düşünülebilir.

Tablo 5.1: FDH’lerde Yapılmış Mutasyonlar

Amaç	Mutasyon Bölgesi/ Kaynak	Sonuç	Referans
Moleküler mekanizmanın araştırılması Spesifik aktivitenin artırılması	C23S/F285S (CboFDH)	Spesifik aktivitenin 1.7 kat artması	Felber S. [187]
	Arg284Gln,	Km format 20 kat artış, Km NAD değişme yok	Galkin ve ark. [181]
	Arg284Ala PseFDH	Aktivite kaybı, Km NAD değişme yok	
	His332Phe, His332Ala (PseFDH)	Enzim aktivitesi ve NAD bağlanmada değişme yok	Tishkov ve ark. [182]
	Asn146Ser, Asn146Cys, Asn146Ala.	Vmax 2 kat azalma Enzim aktivitesinde kayıp Enzim aktivitesinde kayıp	Matorin ve Tishkov. [183]

	(PseFDH) Phe290Ala, Phe290Tyr, Phe290Gln, Phe290Glu ve Phe290Thr (SoyFDH)	Km format değerlerinde değişme yok ancak Kcat değerinde artış	Kargov ev ark. [186]
Substrat spesifitesinde α-heliks ve beta tabakalardaki döngülerin rolü	Glu141Gln, Glu141Asn, ParFDH	Km format değerlerinde 4.3 kat artış, Kcat'ta 110- 590 kat azalma. Glioksiksilat redüksiyon reaksiyonu katalitik verimide 9.5 ve 85 kat artma	Shinoda ve ark. [206]
Operasyonel stabilitenin arttırılması PseFDH'yi kontrol eden “temel” Cys'in değiştirilmesi	Cys255Met, Cys255Ser, Cys255Ala, PseFDH	En az bir ay stabil (kimyasal stabilitede 200 kat artış) Azalan termostabilite. Km NAD, Met için yedi kat, Ser için üç kat azalma ve Ala için WT ile aynı. Ala ve Ser için format bağlayıcılığı değişmez iken ve Met için üç kat azalma	Tishkov ve ark. [189] Odintseva ve ark. [190]

Yüzey Cys354 değişimi	Cys354Arg, Cys354Ser, Cys354Ala, PseFDH Cys255Ala/Cys354 Ala, PseFDH	En iyi termal stabilite 1000 kat arttırılmış operasyonel stabilite	Odintseva ve ark. [190]
----------------------------------	--	--	-------------------------------

Katalitik olarak önemli Asn146 yakınında Cys145'in değişimi	Cys145Ser Cys145Ala, PseFDH Cys255Ala/Cys145Ser, Cys255Ala/Cys145Ala, PseFDH	Kinetik parametrelerde değişim yok, termal stabilitede %10 azalma Kinetik parametrelerde değişim yok, kimyasal stabilitede artma	Tishkov ve ark. [4]
MycFDH'deki temel Cys'in değişimi	Cys6Ser, Cys145/Ser, Cys255Ala/Ser/Val, C146S/C256V, C6A/C146S/C256V, MycFDH	Kimyasal stabilitede artış	Yamamoto ve ark. [100]
CboFDH'de mevcut tüm sisteinlerin değişimi	Cys23(52)Ser, Cys262(288)Val, Cys23Ser/Cys(262)Ala, CboFDH	Kinetik parametrelerde değişim yok, kimyasal stabilitede artma	Slusarczyk ve ark. [191] Felber S. [187]

Isıl kararlılığın artırılması

Elektrostatik etkileşimlerin optimizasyonu	Glu61Gln, Glu61Pro Glu61Lys, MycFDH Lys61Arg, PseFDH	4-6 kat daha az ısı kararlılık Sıcaklığa bağlı termal inaktivasyon hız sabitinin değişimi	Galkin ve ark. [207] Fedorchuk ve ark. [208]
Heliks yapıların hidrofobizasyonu	Ser131Ala, Ser160Ala Ser168Ala Ser184Ala Ser228Ala Ser(131,160)Ala Ser(184,228)Ala	1.20 kat ısı kararlılık artışı 1.24 kat ısı kararlılık artışı 1.4 kat ısı kararlılık artışı 1.13 kat ısı kararlılık artışı 1.2 kat ısı kararlılık artışı	Rojkova ve ark. [194]

	Ser(131,160,184,228))Ala PseFDH Tyr62Phe, Tyr165Phe, PseFDH	1.4 kat ısı kararlılık artışı 1.28 kat ısı kararlılık artışı 1.60 kat ısı kararlılık artışı Isıl kararlılıkta değişim yok 17.6 kat ısı kararlılıkta azalma	Serov ve Tishkov. [192]
--	---	--	-------------------------------

Poliipeptid zincirlerdeki yapısal gerilimi en aza indirme	His263Gly Ala191Gly Asn234Gly Asn136Gly Tyr144Gly Tyr144Gly + T4, PseFDH	1.3 kat ısı kararlılıkta azalma Stabiliteye etki yok Stabiliteye etki yok 1.2 kat ısı kararlılıkta artma 1.4 kat ısı kararlılıkta artma 2.3 kat ısı kararlılıkta artma	Serov ve ark. [209]
--	--	---	---------------------------

Yönlendirilmiş değişim ile ısı kararlılığın iyileştirilmesi	Cys23Ser Arg178Ser Arg178Gly Asp149Glu, Arg178Ser Glu151Asp, Arg178Ser	6.7 kat ısı kararlılıkta azalma 3.1 kat ısı kararlılıkta artma 2.2 kat ısı kararlılıkta artma 6.7 kat ısı kararlılıkta artma	
--	--	---	--

	Glu151Asp, Arg178Ser, Lys356Glu, Glu151Asp, Arg178Ser, Lys306Arg, Lys356Glu Glu151Asp, Arg178Ser, Lys306Arg, Thr315Asn Cys23Ser, Cys262A Lys306Arg, Thr315Asn, Lys356Glu, Glu18Asp, Lys35Arg, Arg187Ser Glu18Asp, Lys35Arg, Glu151Asp, Arg187Ser, Phe285Tyr CboFDH	27.6 kat ısı kararlılıkta artma 18 kat ısı kararlılıkta artma 36 kat ısı kararlılıkta artma 35 kat ısı kararlılıkta azalma 3.8 kat ısı kararlılıkta artma 47 kat ısı kararlılıkta artma	Slusarczyk ve ark. [191, 210]
Isıl kararlılıkta prolinlerin rolünün araştırılması	Pro288(312)Thr CboFDH	Isıl inaktivasyon hızında 18 kat artma	Labrou ve Rigden. [181]
C.metilica FDH'nin kararlılığında	Thr169Val Thr226Val		Karaguler ve ark. [211]

Thr169 Thr226'nın rolünün test edilmesi	Thr169Val/Thr226Val CmeFDH		
--	-------------------------------	--	--

Koenzim özgüllüğünün değişimi

NAD,NADP özgüllüğünün değişimi	Asp195(221)Ser CmeFDH	NAD tercihinde azalma	Gul Karaguler ve ark. [212]
	Asp195Ser Asp195Ser/Tyr196His Asp195Ser/Tyr196His/ Lys356(379)Thr CboFDH sp196(221)Ala/ SceFDH	NAD ⁺ ve NADP ⁺ aktivitesinde artma 276 kat NADP ⁺ aktivite artışı NAD ⁺ için koenzim tercihinde > 3 X 10 ⁹ 'dan 0.43-0.67 kayma	Rozzell ve ark. [213] Serov ve ark. [214]

Birçok enzimin biyolojik fonksiyonunda önemli rolleri olan metal iyonlarının özellikle organizmadaki enzimatik reaksiyonlarda katalitik görevleri bulunabilmektedir. Günümüzde 75.000 enzimin insan vücudunda varolduğu düşünülmekte ve bunların en az üçte birinin metal iyonları gerektirdiği veya içerdiği tahmin edilmektedir [214]. Çok çeşitli enzim metal etkileşim modelleri olmakla birlikte, bunlardan ilki, substrat ve metal iyonu arasındaki etkileşimdir. Substrat-metal kompleksi, enzim-substrat kompleksinin oluşumundan önce veya sonra meydana gelebilir. Bu model, tipik olarak metalle aktifleştirilen enzimlerde gözlenir. İkinci model, metalin önce proteine bağlandığı daha sonra substrat ile etkileşime geçtiği durumdur. Bu modelde, metal, enzimin katalitik bölgesinin bir bileşeni olarak veya bir bağlama bölgesi olarak veya her ikisi olarak da işlev gösterebilir. Peptidler, metal

içermeyen apoenzimlere, metalloenzimlere bağlandıkları şekilde bağlanırlar. Böylece peptid substratlar için metaller katalitik bölge gibi hizmet edebilir. Substrat ve metal arasındaki etkileşim modundaki değişkenlikler sayısız kinetik farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Üçüncü bir model ise, metalin aktif bölgeden uzak enzim üzerindeki başka bir bölgeye etki ettiği modeldir. Bu gibi durumlarda, metal ya protein yapısını korumaya hizmet edebilir ya da katalitik aktiviteyi dolaylı olarak etkiler yani protein aktif yapılarını stabilize ederek aktiviteyi düzenler. Metalle aktive olan proteinlerde, metal protein etkileşiminin metal konsantrasyonu ile manipüle edildiği bir diğer durum daha doğru olarak kabul edilir [215].

FDH'ler oksidoredüktaz enzim sınıfına ait olmakla birlikte kendi içlerinde 3 sınıfa ayrılırlar. Bunlardan ilk sınıf, molibden, demir ve tungsten gibi ağır metallere ihtiyaç duyar ancak NAD gibi bir koenzime ihtiyaç duymaz. Diğer sınıf ise metallerin haricinde bir de NAD'ye ihtiyaç duyar. Çalışmada klonlanıp mutant formları elde edilen NAD bağımlı FDH ise son sınıfa dahildir ve çalışması için sadece NAD'ye gereksinim gösterir. Bunun yanında FDH'ler farklı sınıflara ayrılırsalar da yapılan homoloji çalışmalarında, birbirlerine benzerlik oranının çok yüksek olduğu bildirilmiştir [4]. Bu nedenle çalışmada yabanıl tip ve tüm mutant enzimlerin aktiviteleri üzerine farklı metal iyonlarının etkisi araştırıldı. Şimdiye kadar farklı metallerin etkisine yönelik detay bir çalışmanın yapılmamış olması bundan sonra yapılacak olan mekanizmayı aydınlatmaya yönelik çalışmalar için kaynak teşkil edecektir. Çalışmada, 11 farklı metal iyonunun 5 farklı konsantrasyonu yabanıl tip ve mutant enzimlerin aktivitesine etkisi için araştırıldı.

Yabanıl tip CboFDH için CuCl_2 harici tüm metallerin aktiviteyi arttırdığı gözlenirken CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda %30'a kadar aktiviteyi düşürdüğü; ayrıca KCl_2 , MnCl_2 ve Tungsten'in aktiviteyi %50'nin üzerinde arttırdığı bulundu (Şekil 4.18). Mutant enzimlerden Phe285ThrFDH enzimi için CaCl_2 , NaCl , MnCl 'nin artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %50'nin üzerinde arttırdığı, CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %77'ye kadar azalttığı; Val120ThrFDH enzimi için CaCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %50'nin üzerinde arttırdığı CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %26'ya kadar azalttığı; Gln287GluFDH enzimi için MnCl 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %50'nin üzerinde arttırdığı CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %39'a kadar azalttığı; His311GlnFDH enzimi için KCl_2 , MnCl ve Tungsten'in artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %50'nin üzerinde

arttırdığı CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %26'a kadar azalttığı; Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için CaCl_2 , MnCl ve ZnCl 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %50'nin üzerinde arttırdığı CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %45'e kadar azalttığı bulundu (Şekil 4.33).

Çalışmada genel olarak metal iyonlarının belirli bir konsantrasyona kadar aktiviteyi arttırdığı, özellikle 10 μM düzeylerinde neredeyse tüm reaksiyon ortamlarında aktivitede azalmaya sebep olduğu bulunmuştur. Çalışmada periyodik cetvelde 1A grubu elementlerinden K, Na ve Li; 2A grubu elementlerinden Ca ve Mg; ağır metallerde dahil edilen geçiş metallerinden ise Zn, Cu^{+2} , W, Fe^{+3} , Mn ve Mo kullanıldı. Geçiş metallerinden W, Fe^{+3} ve Mo anaerobik mikroorganizma ve arkealardaki FDH'lerin yapısında bulunur ve dahil oldukları sınıf gereği aktiviteleri için bu metaller gereksinim duyarlar. Ancak çalışmada kullanılan NAD bağımlı FDH bu metaller zorunlu bir gereksinim göstermemektedir. Her üç geçiş metalinin varlığı, artan konsantrasyona bağlı olarak yabanıl tip ve mutant enzimlerde farklı etkilere sebep olmuştur. Mo ve Fe^{+3} hem yabanıl tip hem de mutant enzimlerin tamamında enzim aktivitesinde benzer oranlarda bir artışa sebep olurken, W yabanıl tip ve mutant enzimlerin aktivitesinde oldukça değişken etki göstermiştir. Buna göre, yabanıl tipte %68 oranında aktivite artışına sebep olurken mutant enzimlerden Phe285Thr ve Phe285Thr/His311Gln'de artan konsantrasyonlarda %27'ye kadar aktivite kaybına sebep olmuştur. Bunun dışında Val120Thr, Gln287Glu ve His311Gln enzimlerinde %68'lere kadar aktivitede artışa sebep olmuştur. Tüm bu veriler doğrultusunda çalışmada kullanılan NAD bağımlı FDH'in, metal bağımlı enzimlere benzerlik gösterdiği söylenebilir. Diğer yandan 1A ve 2A grubu metallerin etkisi yabanıl tip ve mutant enzimler arasında benzer artışa sebep olurken bu gruplarda özellikle 1A grubundan en az etkiyi Li göstermiştir. Ayrıca 2A grubunda yer alan Mg'un Val120ThrFDH hariç diğer tüm enzimlerde artan konsantrasyona bağlı olarak aktiviteyi %33'e kadar düşürdüğü bulundu.

Reaksiyon ortamına eklenen metal iyonlarının NAD bağımlı FDH'lerdeki enzim aktivitesine tam olarak nasıl etki ettiğine dair net bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Ancak reaksiyon ortamına eklenen metallerin doğrudan enzimin aktif bölgesi ile etkileşip ya da ortamda bulunan NAD molekülleri ile bağlanıp, enzim substrat arasındaki bağlanmayı kolaylaştırdığı yada NAD'ın etkinliğini arttırmak suretiyle katalitik aktiviteyi olumlu yönde etkileyebileceği düşünülebilir. Bunun dışında

özellikle metalloenzimlerdeki metal iyonlarının, substrat spesifitesini sağlamak için uygun bir bağlama yeri oluşturduğu, substratın bağlanacağı katalitik rezidüleri sıralı bir hale getirdiği ve dengelenmiş bir hidrofobik- hidrofilik bir ortam sağladığı bilinmektedir [216]. Bu yüzden NAD bağlı FDH enzimlerinin, FDH'lerin sınıflandırılmalarındaki birinci sınıf enzim grubuna homoloji gösterebileceği düşünülürse özellikle ortama eklenen metal iyonunun aktif bölge ile etkileşip substrat ile bağlanmayı kolaylaştırabileceği öngörülebilir.

Çalışmada hem yabanıl tip hem de mutant FDH'lerin tamamında CuCl_2 'ün konsantrasyona bağlı olarak enzim aktivitesini azalttığı bulundu. Divalent bakır iyonu, sülfhidril gruplarının oksidasyonunu destekleyen bir geçiş metal iyonu olarak kabul edilir. CboFDH enzimi için özellikle sülfidril grupları içeren sistein rezidüleri katalitik bölgede yer alarak aktivitede önem rol oynarlar [191]. Çalışmada artan konsantrasyonlara bağlı olarak bakırın meydana getirdiği inaktivasyon, yapıdaki histidin rezidülerinin disülfid bağlarını olumsuz yönde etkilemesiyle ilişkilendirilebilir. Schütten ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Cu^{2+} 'nin, CboFDH'nin güçlü inhibitörü olduğu gösterilmiş ve aktivite için veya enzimin uygun yapısını korumak için bir sistein kalıntısının gerekli olduğu öne sürülmüştür [2]. Kelly ve Zydney'in yaptığı çalışmada da yine Cu^{2+} iyonlarının varlığında yabanıl tip enzimin aktivitesinin %15-30 oranında azalma bildirilmiş ve sülfidril gruplarının oksidasyonundan kaynaklı hipotez desteklenmiştir. Tüm bunların yanında CboFDH yada başka mikroorganizma kaynaklı FDH enzimlerinin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisine ait neredeyse hiç çalışma bulunmamakla birlikte, farklı metal iyonlarıyla yapılan çalışmalar özellikle büyüme ortamına ilave edilen metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi şeklindedir.

Organik çözücülerin enzimolojiye dahil edilmesi, çok çeşitli reaksiyon ortamları elde etmeyi mümkün kılmıştır. Reaksiyon ortamının seçimi hem substratı hem de enzimi etkileyeceğinden, enzim katalizli reaksiyonların sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Çözücünün, enzim konformasyonel değişikliklerini indüklediği, enzim dinamiklerini etkilediği, enzimin inhibitörü görevi gördüğü yada substrat özelliklerini değiştirdiği düşünülmektedir. Farklı etki mekanizmalarıyla reaksiyonun sonucunu değiştiren çözücülerin davranışları: substrat çözünürlüğünü artırma, rekabetçi yada rekabetçi olmadan bir inhibitor görevi görme, geçiş durumlarında stabilizasyonu sağlama ve fiziksel parametreler ile korelasyon oluşturma şeklinde gruplanabilir.

Çalışmada farklı konsantrasyonlardaki 5 farklı organik çözücünün, yabancı tip CboFDH ve mutant FDH'lerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Buna göre, yabancı tip CboFDH için aseton hariç etanol, metanol, propanol ve kloroformun ortamki konsantrasyonları %50 olduğunda, aktivitede %52 oranında kayıp gözlenirken; etanol, metanol, propanolün artan konsantrasyonlarında en fazla %20, kloroformda ise %8 aktivite artışı gözlemlendi (Şekil 4.19).

Mutant enzimlerden Phe285ThrFDH enzimi için etanol, metanol, propanol ve aseton organik çözücülerini artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %5-%21 aralığında arttırdığı ancak %50 konsantrasyonlarda %70'e kadar aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Kloroformun ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %40 oranına kadar düşürdüğü bulundu. Val120ThrFDH enzimi için etanol, metanol, propanol ve aseton organik çözücülerini artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %10-%24 aralığında arttırdığı ancak %50 konsantrasyonlarda %64 oranına kadar aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Kloroformun ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %37 oranına kadar düşürdüğü bulundu. Gln287GluFDH enzimi için etanol, metanol, propanol ve aseton organik çözücülerini artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %7-%31 aralığında arttırdığı ancak %50 konsantrasyonlarda %25 oranına kadar aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Kloroformun ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %42 oranına kadar düşürdüğü bulundu. His311GlnFDH enzimi için etanol, metanol, propanol ve aseton organik çözücülerini artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %6-%19 aralığında arttırdığı ancak %50 konsantrasyonlarda %33 oranına kadar aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Kloroformun ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %49 oranına kadar düşürdüğü bulundu. Phe285Thr/His311GlnFDH enzimi için etanol, metanol, propanol ve aseton organik çözücülerini artan konsantrasyonlarda aktiviteyi %9-%29 aralığında arttırdığı ancak %50 konsantrasyonlarda %67 oranına kadar aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Kloroformun ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktiviteyi %97 oranına kadar düşürdüğü bulundu (Şekil 4.34).

Enzimatik reaksiyonlar sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden reaksiyonun akıbeti kuvvetli bir şekilde ortam pH'sına bağlıdır. Çalışmada reaksiyon ortamı içerisinde değişen yüzde konsantrasyonlarda farklı organik çözücüler kullanılmış olup hem yabancı tip hem de mutant enzimlerde aktivitenin etkilendiği görülmüştür. Çalışmada alkol sınıfına ait metanol (CH_3OH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), propanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$); keton sınıfına ait aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ve yağları çözen bir organik çözücü olan kloroform

(CHCl₃) kullanılmıştır. pH, sudaki nispi hidrojen ve hidroksil iyonlarının bir ölçüsü olduğundan organik çözücülerde pH kavramından bahsetmek doğru değildir. Bir çözeltinin asitliği, pH [H⁺] seviyesini ifade etmek için proton (hidrojen iyonu) konsantrasyonu ([H⁺]) belirlenir. pH değeri ne kadar küçükse, asitlik o kadar kuvvetli (yüksek proton konsantrasyonu) olur ve $pH = -\log_{10}[H^+]$ formülü ile ifade edilir. pH ile ilgili önemli bir nokta ise, pH değerinde sadece 1 olan bir değişimin, proton konsantrasyonundaki 10 kat bir değişime eşdeğer olmasıdır. Organik çözücülerde ise pH yerine pK_a teriminden bahsedilmesi daha doğrudur.

Asitler, suda tamamen ayrıışan güçlü asitleri ve sadece kısmen ayrıışan zayıf asitleri içerir. Bir asit ayrıldığında, çözeltiyi asidik hale getirmek için bir proton salgılar, ancak zayıf asitler, ayrışma denge denkleminde göre bir arada bulunan hem ayrıışmış bir duruma (A⁻) hem de ayrıışmamış bir duruma (AH) sahiptir ($AH \rightleftharpoons A^- + H^+$).

Her iki tarafın konsantrasyon oranı belirli analitik şartlar altında sabittir ve asit ayrışma sabiti (K_a) olarak adlandırılır. $K_a = [A^-][H^+]/[AH]$ formülü kullanılır. Formülde ilgili bileşenlerin konsantrasyonu köşeli parantez ile gösterilmiş olup K_a, bu denklemden yola çıkarak, asitin bir proton salgıladığını (başka bir deyişle asit olarak kuvvetini) ifade eder. Ek olarak, denklem, zayıf asitlerin ayrışma durumunun çözeltideki [H⁺] seviyesine göre nasıl değiştiğini göstermektedir. Ancak asetik asit ve laktik asit gibi karboksilik asitler (-COOH içeren) normalde yaklaşık 10⁻³ ila 10⁻⁶ arasında bir K_a sabitine sahiptir. Sonuç olarak, asitliği tek başına K_a sabiti cinsinden ifade etmek çok uygun bir ifade şekli değildir. Bu nedenle, pK_a zayıf asitlerin asitliğini ifade etmek için $pK_a = -\log_{10} K_a$ olarak tanımlanır.

Çalışmadaki hem yabancı tip hem de mutant enzimlerimizin optimum pH aralığı 7-8 aralığında bulunmuştur. Çalışmada özellikle asetonun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak tüm enzimlerin aktivitesini en fazla oranda artırdığı bulunmuştur. Asetonun pK_a'sının 19.2 [216] ve suyun pK_a'sının 15.7 olduğu düşünüldüğünde, asetonun suya göre daha az asidik yani daha bazik bir organik çözücü olduğunu söyleyebiliriz. Bunun yanında asetonun iyi bir çözücü olmasından dolayı özellikle enzimin konformasyonel esnekliğini artırarak moleküler bir kayganlaştırıcı görevi gördüğü söylenebilir. Çalışmada hem yabancı hem de mutant enzimlerin aktivitesinde artışa sebep olmuş olan alkol grubundan metanolün pK_a'sı 15.5, propanolün 16 ve etanolün 15.9'dur [216]. Bu nedenle bu organik çözücülerin benzer asidite değerlerine sahip ve reaksiyon ortamı için gerekli pH değerine yakın oldukları söylenebilir. Bunun yanında

yine alkol gruplarının iyi bir çözücü olma özelliğinden dolayı enzim-substrat kompleksinin oluşumu için substrat için iyi bir afiniteye sebep oldukları böylece enzim aktivitesini artırabilecekleri düşünülebilir. Tüm bunların yanında deneyler esnasında ortama konulan organik çözücülerin artan konsantrasyona bağlı olarak ortam pH'sını değiştirdiği gözlenmiştir. Ortam pH'sını değiştirme yenenekleri çözücülerin sahip olduğu pKa değerleri ile ilişkilendirilebileceğinden ve elde ettiğimiz enzimlerin optimum pH'sına en yakın değişikliğe aseton sebep olduğundan dolayı asetonun enzim aktivitesinde en yüksek etkiye sahip olduğu söylenebilir. Bunun yanında kloroformun reaksiyon ortamında homojen bir şekilde çözülmediği, aksine ayrı bir faz oluşturduğu deneyler esnasında görülmüştür. Bu sebeple enzim ile substratın bağlanma bölgelerinde negatif etkiye sebep olarak enzim aktivitesini düşürdüğü söylenebilir.

Aseton, etanol, metanol ve propanolün yabancı tip ve mutant enzimlerin aktivitesine olumlu etki göstermelerinin diğer bir sebebi de FDH enziminin katalitik mekanizmasında yer alan özellikle hidrofobik duvarların bulunduğu substrat ve NAD⁺ bağlanma bölgelerinde, olumlu konformasyonel değişimlere sebep olabileceğidir. Literatürde mekanizmayı açıklayan detaylı bir veri olmaması ile birlikte mekanizmayı aydınlatmaya yönelik protein mühendisliği çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çalışmada pKa'sı ise 25 [216] olan kloroformun hem yabancı hem de mutant tüm enzimlerde uygun pH ortamını değiştirmesinden dolayı, özellikle enzimin katalitik bölgesinde yer alan H bağları ve disülfid bağlarının yapısını bozmuş olabileceği ve enzim aktivitesini artan konsantrasyonlara bağlı olarak olumsuz etkileyebileceği düşünülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada metanol toksisitesi, B vitamini eksikliği, nörotoksisite, şiddetli astım, bipolar bozukluklar, ürolitiazis (üriner sistem taş hastalığı), Trikomonas vajiniti gibi patolojik durumlarda serumda, idrarda ve biyolojik sıvılarda artan format düzeylerini tespit edebilmek için kullanılabilecek rekombinant kaynaklı FDH enzimi üretilmiştir. İthal olarak maliyetli bir şekilde alımı gerçekleştirilen bu enzimin laboratuvar ölçeğinde ucuz ve yüksek etkinlikle üretilmesinin yanında protein mühendisliği tekniklerinden bölgeye yönelik mutagenез tekniği kullanılarak enzimin 5 farklı mutant formu elde edilmiş ve böylece substratı olan formata afinitesi arttırılmıştır. Çalışmada klonlanan FDH enzimin sadece tanıda değil aynı zamanda endüstriyel uygulamalarda da kullanılıyor olması enzimi değerli hale getirmektedir. Enzim, NAD bağımlı olmasından dolayı farmasötik alanda pahalı koenzimlerin geri dönüşümünde (NADH rejenerasyonu) kullanılmakta ve bu aşamalarda termal stabiliteye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle klonlanan enzimde termal stabiliteyi artırmak için bölgeye yönelik mutagenез tekniği ile mutasyonlar yapılarak termal stabilitesi yüksek mutant enzimler elde edildi. Ayrıca enzimin etkinliğini güçlendirmek amacıyla afinitede ve termal stabilitede en iyi sonucu veren bölge mutasyonları kombine olarak yapıldı. Çalışmada yabancıl tip ve mutant enzimlerin tamamına ait karakterizasyon çalışmaları yapılmış olup farklı metal iyonlarının ve organik çözümlerin enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın sonraki aşamalarında uygun görülen mutant enzim için patent başvurusu yapılabilir. Üretilen formata afinitesi yüksek mutant enzim kullanılarak, klinik açıdan önemli patolojik durumlara bağlı olarak insan serum ve biyolojik sıvılarında 10 mM-30mM düzeylerine kadar çıkan format düzeylerini tespit edebilecek ticari bir kit üretilir. Endüstriyel ölçekte üretime geçilebilmesi için enzim, fermentörde üretim yapılabilecek şekilde optimize edilebilir. Bunların haricinde farklı metal iyonları ve organik çözümlerin varlığında enzimin aktif merkezinde meydana gelen değişimlerin protein mühendisliği yöntemleri (protein modelleme) ile incelenerek mekanizmaların aydınlatılması; protein kristalizasyon tekniği vasıtasıyla her bir mutant için farklı

ligandlar kullanılarak, yapının nasıl değiştiğinin incelenmesi ile bilimsel anlamda literature önemli katkılar sağlanabilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Wichmann, R.** (1981). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(12), 2789-2802.
- [2] **Schütte H, Flossdorf J, Sahm H and Kula MR .** (1976). Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida Boidinii* *Eur J Biochem*, 62(1), 151-60.
- [3] **Lamarre S.G.** (2013). Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more? , *Clin Chem Lab Med*, 51(3), 571-578.
- [4] **Tishkov, V.I., and Popov V.O.** (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomolecular Engineering*, 23(2-3), 89-110.
- [5] **Allen, S.J., and Holbrook, J.J.** (1995). Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylica*, *Gene*, 162(1), 99-104.
- [6] **Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick Lilia S, Quinlivan Eoin P and Coats Bonnie S.** (2004). Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, 272–279.
- [7] **Slow S, Garrow TA.** (2006). Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats, *J Nutr*, 136, 2279–83.
- [8] **Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y and Fujiwara K.** (2012). Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans, *Hum Mol Genet*, 21, 1496–503.
- [9] **Lamarre SG, Molloy AM, Reinke SN, Sykes BD, Brosnan ME and Brosnan JT.** (2012). Formate can differentiate between hyperhomocysteinemia due to impaired remethylation and impaired transsulfuration, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, 61–7.
- [10] **Paasma R., Hovda K.E. and Tikkerberi D.** (2007). Methanol mass poisoning in Estonia: outbreak in 154 patients, *Clin. Toxicol*, 45, 152–157.
- [11] **Solar G., Giraldo R., Echevarria m., Espinosa M., and Orejas R.** (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June, 434–464
- [12] **Yarar, M.** (2014). Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarında SAP Genlerinin Araştırılması. (Tıpta Uzmanlık). Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- [13] **Ramírez C.** (1953). Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos. *Microbiol Española*, 6, 249–53.
- [14] **Kurtzman C, Fell JW and Boekhout T.** (2011). The yeasts. Amsterdam: Elsevier
- [15] **Vongsuvanlert V and Tani Y.** (1988). Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in

- sorbitol production from glucose. *Agric Biol Chem. Japan Society for Bioscience*, 52, 1817–24.
- [16] **Grembecka M.** (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Res Technol. Springer Berlin Heidelberg*, 241, 1–14.
- [17] **Oda S., Yurimoto H., Nitta N., Sasano Y. and Sakai Y.** (2015). Molecular characterization of hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot Cell. American Society for Microbiology*, 14, 278–85.
- [18] **Rodríguez-Gómez F, Arroyo-López FN, López-López A, Bautista-Gallego J and Garrido-Fernández A.** (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiol.*, 27, 604–12.
- [19] **Domínguez-Manzano J, León-Romero Á, Olmo-Ruiz C, Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN and Garrido-Fernández A.** (2012). Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *Int J Food Microbiol.*, 157, 230–8.
- [20] **Arroyo-López FN, Bautista-Gallego J, Domínguez-Manzano J, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F and García-García P.** (2012). Formation of lactic acid bacteria– yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiol.*, 32, 295–301.
- [21] **Zanoni P, Farrow JAE, Phillips BA and Collins MD.** (1987). *Lactobacillus pentosus*. *Int J Syst Bacteriol.*, 37, 339–41.
- [22] **León-Romero Á., Domínguez-Manzano J., Garrido-Fernández A., Arroyo-López FN and Jiménez-Díaz R.** (2015). Formation of in vitro mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *American Society for Microbiology*, 82, 689–95.
- [23] **Lee J-D. and Komagata K.** (1983). Further taxonomic study of methanol-assimilating yeasts with special references to electrophoretic comparison of enzymes. *Applied Microbiology, Molecular and Cellular Biosciences Research Foundation*, 29, 395–416.
- [24] **Lin YH., Lee FL. and Hsu WH.** (1996). Molecular and chemical taxonomic differentiation of *Candida Boidinii* Ramirez strains. *Int J Syst Bacteriol. Microbiology Society*, 46, 352–5.
- [25] **Hartner F.S. and Glieder, A.** (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts, *Microb Cell Fact*, 5: 39.
- [26] **Gleeson MA. and Sudbery PE.** (1988). The methylotrophic yeasts. *Yeast*, 4, 1–15.
- [27] **Gellissen G.** (2002). *Hansenula polymorpha* - Biology and Applications. 1st edition. Weinheim, Wiley-VCH, 352.
- [28] **Sakai Y., Murdanoto AP., Konishi T., Iwamatsu A. and Kato N.** (1997). Regulation of the formate dehydrogenase gene, *FDH1*, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an *FDH1*-disrupted strain on methanol, methylamine and choline. *J Bacteriol*, 179, 4480–4485.

- [29] **Lee B., Yurimoto H., Sakai Y. and Kato N.** (2002). Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology*, 148, 2697-2704.
- [30] **Van Dijken JP., Oostra-Demkes GJ., Otto R. and Harder W.** (1976) S-formylglutathione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. *Arch Microbiol.* , 111, 77-83.
- [31] **Houard S., Heinderyckx M. and Bollen A.** (2002). Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. *Biochimie.* , 84, 1089-1093.
- [32] **Yurimoto, H. and Sakai, Y.** (2009). Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*, *Biotechnol Appl Biochem*, 53(2), 85-92.
- [33] **Wray J.** (1670). Concerning some un-common observations and experiments made with an acid juice to be found in ants. *Philos Trans R Soc Lond* ., 5, 2063- 6.
- [34] **Sakami W.** (1948). The conversion of formate and glycine to serine and glycogen in the intact rat. *J Biol Chem.*, 176, 995.
- [35] **Plaut GW, Bethel JJ and Lardy HA.** (1950). The relationship of folic acid to formate metabolism in the rat. *J Biol Chem.*, 184, 795-805.
- [36] **Drysdale GR, Plaut GW and Lardy HA.** (1951). The relationship of folic acid to formate metabolism in the rat – formate incorporation into purines. *J Biol Chem.*, 193, 533-8.
- [37] **Hartman SC and Buchanan JM.** (1959). Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis). *Ann Rev Biochem.*, 28, 365-410.
- [38] **Huennekens FM., Whiteley HR. and Osborn MJ.** (1959). Mechanisms of formylation and hydroxymethylation reactions. *J Cell Comp Physiol.*, 54, 109- 25.
- [39] **Tibbetts AS and Appling DR.** (2010). Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Ann Rev Nutr.*, 30, 57-81.
- [40] **Annison EF.** (1954). Studies on the volatile fatty acids of sheep blood with special reference to formic acid. *Biochem J.*, 58, 670-80.
- [41] **Lamarre S. G., Morrow G., Macmillan L., Brosnan M. E. and Brosnan J. T.** (2013). Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more? *Clin Chem Lab Med.*, 51(3), 571–578.
- [42] **Anderson DD, Eom JY and Stover PJ.** (2012). Competition between sumoylation and ubiquitination of serinehydroxymethyltransferase 1 determines its nuclear localization and its accumulation in the nucleus. *J Biol Chem.*, 287, 4790- 9.
- [43] **Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K and Shane B.** (1997). Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. *J Biol Chem.*, 272, 1842- 8.
- [44] **Slow S and Garrow TA.** (2006). Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *J Nutr.*, 136, 2279-83.

- [45] **Porter DH, Cook RJ and Wagner C.** (1985). Enzymatic properties of dimethylglycine dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase from rat-liver. *Arch Biochem Biophys.*, 243:396 -407.
- [46] **Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y and Fujiwara K.** (2012). Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.*, 21, 1496-503.
- [47] **Brosnan JT and Brosnan ME.** (2006). The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr.*, 136, 1636S- 40S.
- [48] **Cook RJ and Wagner C.** (1984). Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol. *Proc Natl Acad.*, 81, 3631- 4.
- [49] **Tephly TR.** (1991). The toxicity of methanol. *Life Sci.*, 48, 1031-41.
- [50] **Lindinger W, Taucher J, Jordan A, Hansel A and Vogel W.** (1997). Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol Clin Exp Res.*, 21, 939 -43.
- [51] **Sprung R, Bonte W and Lesch OM.** (1988). Methanol – an up-to-now neglected constituent of all alcoholic beverages. A new biochemical approach to the problem of chronic alcoholism. *Wien Klin Wochenschr.*, 100, 282-8
- [52] **Hovda K.E., Andersson K.S., Urdal P., and Jacobsen D.** (2005). Methanol and Formate Kinetics During Treatment with Fomepizole. *Clin. Toxicol.*, 43, 221–227.
- [53] **Hovda K.E., Hunderi O.H., Tafjord A.B., Dunlop O., Rudberg N. and Jacobsen D.** (2005). Methanol outbreak in Norway 2002-2004: epidemiology, clinical features and prognostic signs. *J. Int. Med.*, 258, 181–190.
- [54] **Hovda K.E., Urdal P. and Jacobsen D.** (2005). Increased Serum Formate in the Diagnosis of Methanol poisoning, *J. Anal. Toxicol.*, 29, 586–588.
- [55] **Marumo M and Wakabayashi I.** (2017). Effects of methanol and formic acid on human platelet aggregation. *Environ Health Prev Med.*, 16, 22(1), 81
- [56] **Lamarre SG., Molloy AM., Reinke SN., Sykes BD., Brosnan ME., Brosnan JT.** (2012). Formate can differentiate between hyperhomocysteinemia due to impaired remethylation and impaired transsulfuration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 302, 61–7.
- [57] **Nicholls P.** (1975). Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. *Biochem Bioph Res Co.*, 67, 610 – 6.
- [58] **Nicholls P.** (1976). The effect of formate on cytochrome 3aa and on electron transport in the intact respiratory chain. *Biochim Biophys Acta.*, 430, 13– 29.
- [59] **Kapur BM., Vandenbroucke AC., Adamchik Y., Lehotay DC. and Carlen PL.** (2007). Formic acid, a novel metabolite of chronic ethanol abuse, causes neurotoxicity, which is prevented by folic acid. *Alcohol Clin Exp Res.*, 31, 2114- 20.
- [60] **Greenwald R., Fitzpatrick AM., Gaston B., Marozkina NV. and Erzurum S.** (2010). Breath Formate Is a Marker of Airway S-Nitrosothiol Depletion in Severe Asthma. *PLoS ONE.*, 5(7), 119.

- [61] **Chen J.j, Huang H., Zhao Lb., Zhou D., Yang Yt. and Zheng P.** (2014). Sex-Specific Urinary Biomarkers for Diagnosing Bipolar Disorder. *PLoS ONE*, 9(12), 5221.
- [62] **Harden A. and Young WC.** (1906) The alcoholic ferment of Yeast juice Part II. *Proceedings of the royal Society of London. Series B.*, 78 (526), 369-375.
- [63] **Smyth LM., Bobalova J., Mendoza MG., Lew C. and Mutafova-Yambolieva VN.** (2004). Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder. *J Biol Chem.*, 19, 279(47), 48893-903.
- [64] **Billington RA., Bruzzone S., De Flora A., Genazzani AA., Koch-Nolte F., Ziegler M. and Zocchi E.** (2006). Emerging functions of extracellular pyridine nucleotides. *Mol Med.*, 12(11-12), 324-7.
- [65] **Ziegler M. and Niere M.** (2004). NAD⁺ surfaces again. *Biochem J.*, 15, 382, e5-6.
- [66] **Koch-Nolte F., Fischer S., Haag F. and Ziegler M.** (2011). Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett.*, 6, 585(11), 1651-6.
- [67] **Breen LT., Smyth LM., Yamboliev IA. and Mutafova-Yambolieva VN.** (2006). Beta-NAD is a novel nucleotide released on stimulation of nerve terminals in human urinary bladder detrusor muscle. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 290(2), F486-95.
- [68] **Mutafova-Yambolieva VN., Hwang SJ., Hao X., Chen H., Zhu MX., Wood JD., Ward SM. and Sanders KM.** (2007). Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 9, 104(41), 16359-64.
- [69] **Hwang SJ., Durnin L., Dwyer L., Rhee PL., Ward SM., Koh SD., Sanders KM. and Mutafova-Yambolieva VN.** (2011). β -nicotinamide adenine dinucleotide is an enteric inhibitory neurotransmitter in human and nonhuman primate colons. *Gastroenterology*, 140(2), 608-617.
- [70] **Yamboliev IA., Smyth LM., Durnin L., Dai Y. and Mutafova-Yambolieva VN.** (2009). Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Eur J Neurosci.*, 30(5), 756-68.
- [71] **Durnin L., Dai Y., Aiba I., Shuttleworth CW., Yamboliev IA. and Mutafova-Yambolieva VN.** (2012). Release, neuronal effects and removal of extracellular β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) in the rat brain. *Eur J Neurosci.*, 35(3), 423-35.
- [72] **Pollak N, Dölle C. and Ziegler M.** (2007). The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem J.*, 1, 402(2), 205-18.
- [73] **Unden G. and Bongaerts J.** (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.*, 1320(3), 217-34.
- [74] **Windholz M.** (1983). The Merck Index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. *Rahway NJ US*, 909.
- [75] **Biellmann JF., Lapinte C., Haid E. and Weimann G.** (1979) Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme. *Biochemistry.*, 3, 18(7), 1212-7.

- [76] **Dawson R.B.** (1985). Data for biochemical research Oxford. *Clarendon press.*, 122.
- [77] **Lakowicz JR., Szmecinski H., Nowaczyk K. and Johnson ML.** (1992). Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89(4), 1271-5.
- [78] **Jameson DM., Thomas V. and Zhou DM.** (1989). Time-resolved fluorescence studies on NADH bound to mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.*, 994(2), 187-90.
- [79] **Kasimova MR., Grigienė J., Krab K., Hagedorn PH., Flyvbjerg H., Andersen PE. and Møller IM.** (2006). The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. *Plant Cell.*, 18(3), 688-98.
- [80] **Belenky P., Bogan KL. and Brenner C.** (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.*, 32(1), 12-9.
- [81] **Katoh A., Uenohara K., Akita M. and Hashimoto T.** (2006) Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiol.*, 141(3), 851-7.
- [82] **Foster JW. and Moat AG.** (1980). Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev.* 44(1), 83-105.
- [83] **Magni G., Orsomando G. and Raffaelli N.** (2006). Structural and functional properties of NAD kinase, a key enzyme in NADP biosynthesis. *Mini Rev Med Chem.*, 6(7), 739-46.
- [84] **Lin SJ. and Guarente L.** (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol.*, 15(2), 241-6.
- [85] **Anderson RM., Bitterman KJ., Wood JG., Medvedik O., Cohen H., Lin SS., Manchester JK., Gordon JL. and Sinclair DA.** (2002). Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. *J Biol Chem.*, 277(21), 18881-90.
- [86] **Henderson LM.** (1983). Niacin. *Annu Rev Nutr.*, 3, 289-307.
- [87] **Hanukoglu I.** (2015). Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochem Mol Biol Educ.*, 43(3), 206-9.
- [88] **Rao ST. and Rossmann MG.** (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol.* 15, 76(2), 241-56.
- [89] **Bellamacina CR1.** (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.*, 10(11), 1257-69.
- [90] **Carugo O. and Argos P.** (1997). NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins.*, 28(1), 10-28.
- [91] **Andreaddeli A., Platis D., Tishkov V. I., Popov V. O. and Labrou N. E.** (2008). Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *FEBS Journal*, 275(15), 3859-69.
- [92] **Schirwitz K., Schmidt A. and Lamzin V.S.** (2007). High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Sci.*, 16, 1146-1156.
- [93] **Tishkov V. I. and Popov V. O.** (2004). Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase. *Biochemistry*, 69, 1252-1267.

- [94] Tishkov V. I. and Popov V. O. (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomolecular Engineering*, 23, 89–110.
- [95] Popov V. O. and Lamzin V. S. (1994). NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, *Biochem. J.*, 301, 625-643.
- [96] Popov V.O. and Tishkov V. I. (2003). NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. From a model enzyme to a versatile biocatalyst. *Research Signpost Protein Structures: Kaleidoscope of Structural Properties and Functions*, 441-443.
- [97] Robinson WE., Bassegoda A., Reisner E. and Hirst J. (2017). Oxidation-State-Dependent Binding Properties of the Active Site in a Mo-Containing Formate Dehydrogenase. *J Am Chem Soc.*, 139(29), 9927-9936.
- [98] Klibanov A.M. and Cambou, B. (1987). Enzymatic production of optically active compounds in biphasic aqueous-organic systems. *Methods Enzymol*, 136: 117-137.
- [99] Vrtis J.M., White A.K., Metcalf W.W. and Donk W.A. (2002). Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme. *Angewandte Chemie, International Edition*. 41(17), 3257 - 3259.
- [100] Yamamoto H., Mitsuhashi K., Kimoto N., Kobayashi Y. and Esaki N. (2004). Robust NADH-regenerator: improved a-haloketone-resistant formate dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 33-39.
- [101] Dixon M. and Zerfas L.G. (1940). The role of coenzymes in dehydrogenase systems. *Biochem J.*, 34(3), 371-391.
- [102] Liu A., Feng R. and Liang B. (2016). Microbial surface displaying formate dehydrogenase and its application in optical detection of formate. *Enzyme Microb Technol.*, 91, 59-65.
- [103] Uppada V. (2014). Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis, *Current science*, 106 (7).
- [104] Ronald L., Hanson S.L.G., Brzozowski D. B., Tully T. P., Cazzulino D., Parker W. L., Lyngberg O. K., Vu T. C., Wong M. K. and Patel R. N. (2007). Preparation of an Amino Acid Intermediate for the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor, Saxagliptin, using a Modified Phenylalanine. Dehydrogenase, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1369–1378.
- [105] Goldberg S. L., Nanduri V. B., Chu L., Johnston R. M. and Patel R. N. (2006). Enantioselective microbial reduction of 6-oxo-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione: Cloning and expression of reductases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1441-1450.
- [106] Davis S.C., Grate J.H., Gray D.R., Gruber J.M., Huisman G.W., Ma S.K., Newman L.M., Sheldon R. and Wang L.A. (2010). *U.S. Patent No. 7807423 (B2)*.
- [107] Tao J. and McGee K. (2002). Development of a Continuous Enzymatic Process for the Preparation of (R)-3-(4-Fluorophenyl)-2-hydroxy Propionic Acid. *Organic Process Research & Development*, 6(4), 520-524.
- [108] Hovda K.E., Urdal P. and Jacobsen D. (2005). Increased serum formate in the diagnosis of methanol poisoning. *J Anal Toxicol.*, 29(6), 586-588.

- [109] **Barceloux D.G., Bond G. R., Krenzelok E. P., Cooper H. and Vale J. A.** (2002). American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol.*, 40(4), 415-446.
- [110] **Hantson P., Haufroid V. and Wallemacq P.** (2005). Formate kinetics in methanol poisoning. *Hum Exp Toxicol.*, 24(2), 55-9.
- [111] **Onyekwere N., Nwadiuto I., Maleghemi S., Maduka O., Numbere TW., Akpuh N., Kanu E., Katchy I. and Okefor I.** (2018). Methanol poisoning in South- South Nigeria: Reflections on the outbreak response. *J Public Health Afr.*, 6, 9(1), 748.
- [112] **Barbas C., Garcia A., Saavedra L. and Muros M.** (2002). Urinary analysis of nephrolithiasis markers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 781(1-2), 433-455.
- [113] **Perinpam M., Enders FT., Mara KC., Vaughan LE., Mehta RA., Voskoboev N., Milliner DS. and Lieske JC.** (2017). Plasma oxalate in relation to eGFR in patients with primary hyperoxaluria, enteric hyperoxaluria and urinary stone disease. *Clin Biochem.*, 50(18), 1014-1019.
- [114] **Urdal P.** (1984). Enzymic assay for oxalate in unprocessed urine, as adapted for a centrifugal analyzer. *Clin Chem.*, 30(6), 911-913.
- [115] **Brzica H., Breljak D., Burckhardt BC., Burckhardt G. and Sabolić I.** (2013). Oxalate: from the environment to kidney stones. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 64(4), 609-30.
- [116] **Coleman J.S., Gaydos C. A. and Witter F.** (2013). *Trichomonas vaginalis* vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies. *Obstet Gynecol Surv.*, 68(1), 43-50.
- [117] **Pitela S. B., Chob C. M., Chen W. and Zhao H.** (2007). Chapter 3. Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 49-72.
- [118] **Chen, R.** (2001). Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends in Biotechnology*, 19, 13-14.
- [119] **Williams G. J., Nelson A. S. and Berry, A.** (2004). Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 3034–3046.
- [120] **Cedrone F., Ménez A. and Quéméneur E.** (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 405–410.
- [121] **Quéméneur E., Moutiez M., Charbonnier J. B. and Ménez A.** (1998). Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature*, 391, 301–304.
- [122] **Getzoff E. D., Cabelli D. E., Fisher C. L., Parge H. E., Viezzoli M. S., Banci L. and Hallewell R. A.** (1992). Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature*, 358, 347–351.
- [123] **Chen R., Greer A. and Dean A. M.** (1996). Redesigning secondary structure to invert coenzyme specificity in isopropylmalate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 12171–12176.
- [124] **Chen R.** (1999). A general strategy for enzyme engineering. *Trends Biotechnol.*, 17, 344–345.

- [125] **Yuan L., Kurek I., English J. and Keenan R.** (2005). Laboratory-Directed Protein Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 373–392.
- [126] **Zhao H. and Zha W.** (2003). Evolutionary Methods for Protein Engineering.” In *Enzyme Functionality: Design, Engineering and Screening*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 353-373.
- [127] **Mills D. R., Peterson R. L. and Spiegelman, S.** (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 217-224
- [128] **Farinas ET., Bulter T. and Arnold FH.** (2001). Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (6), 545-551.
- [129] **Wong T. S., Tee K. L., Hauer, B. and Schwaneberg, U.** (2004). Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res*, 56.
- [130] **Stemmer W. P.** (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10747-1075.
- [131] **Cramer A., Raillard S. A., Bermudez E. and Stemmer W. P.** (1998). DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 391, 288-291.
- [132] **Leisola M. and Turunen O.** (2007). Protein engineering: opportunities and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 75(6), 1225-32.
- [133] **Chica R. A., Doucet N. and Pelletier J. N.** (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 378–384.
- [134] **Yoshikuni Y., Ferrin T. E. and Keasling J. D.** (2006). Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 440, 1078–1082.
- [135] **McLachlan M. J., Johannes T. W. and Zhao H.** (2008). Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 99, 268-274.
- [136] **Miyazaki K. and Arnold F. H.** (1999). Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.*, 49, 716-720 55.
- [137] **Parikh M. R. and Matsumura I.** (2005). Site-saturation mutagenesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of β -Fucosidase from β -Galactosidase. *J. Mol. Biol.*, 352, 621-628.
- [138] **DeSantis G., Wong K., Farwell B., Chatman K., Zhu Z., Tomlinson G., Huang H., Tan X., Bibbs L. and Chen P.** (2003). Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 11476-11477.
- [139] **Spadiut O., Pisanelli I., Maischberger T., Peterbauer C., Gorton L., Chaiyen P. and Haltrich D.** (2008). Engineering of pyranose 2-oxidase: Improvement for biofuel cell and food applications through semi-rational protein design. *Journal of Biotechnology*, 139, 250–257.
- [140] **Lomedico PT.** (1982). Use of recombinant DNA technology to program eukaryotic cells to synthesize rat proinsulin: a rapid expression assay for cloned genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 79(19), 5798-802.

- [141] Stryjewska A., Kiepusa K., Librowski T. and Lochyński S. (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Rep.*, 65(5), 1075-85.
- [142] Galambos L. and Sturchio J. L.. (1998). Pharmaceutical firms and the transition to biotechnology: a study in strategic innovation. *Business History Review*, 72 (2), 250–278.
- [143] Steinberg F. M. and Raso J.. (1998). Biotech pharmaceuticals and biotherapy:an overview. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 1(2), 48–59.
- [144] Bazan-Peregrino M., Sainson R. C. A. and R. C. Carlisl. (2013). Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. *Cancer GeneTherapy*, 20(8), 461–468.
- [145] Metzger L. E. and Raetz C. R. H. (2009). Purification and characterization of the lipid A disaccharide synthase (LpxB) from *Escherichia coli*, a peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 48(48), 11559–11571.
- [146] Berk A. and Zipursky S. L. (2000). *Molecular Cell Biology*. WH Freeman, New York, NY, USA, 4th.
- [147] Venter M. (2007). Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in Plant Science*, 12(3), 118–124.
- [148] Brown T. A. (1990). Gene cloning. *Second Edition*, London, Chapman & Hall, 3-11.
- [149] Imanaka T. (2005). Application of recombinant DNA technology to the production of useful biomaterials. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1–27.
- [150] Johnson I. (1983). Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, 219(4585), 632–637.
- [151] Hoseini S. S. and Sauer M. G. (2015). Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *Journal of biological engineering*, 9(2), 2-9.
- [152] Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P.-Å. and Ståhl S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(2), 91.
- [153] Balbás P. (2001). Understanding the Art of Producing Protein and Nonprotein Molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 19(3), 251–268.
- [154] Demain A. L. and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
- [155] Kmiecik S., Gront D., Kolinski M., Wieteska L., Dawid AE. and Coarse A. (2016). Grained Protein Models and Their Applications. *Chem Rev.*, 116(14), 7898-936.
- [156] Nisbet R., Elder J. and Miner G. (2014). Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications. *Academic Press*. 9, 328.
- [157] Bischoff R. and Schlüter H. (2012). Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *Journal of Proteomics*, 75(8), 2275–2296.
- [158] Guy H. R. (1985). Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins. *Biophysical journal*, 47(1), 61-70.

- [159] **Sneddon S. F., Morgan R. S. and Brooks C. L.** (1988). A new classification of the amino acid side chains based on doublet acceptor energy levels. *Biophysical journal*, 53(1), 83-9.
- [160] **Zhu C., Gao Y., Li H., Meng S., Li L., Francisco J. S. and Zeng X. C.** (2016). Characterizing hydrophobicity of amino acid side chains in a protein environment via measuring contact angle of a water nanodroplet on planar peptide network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 12946–12951.
- [161] **Ng P. C. and Henikoff S.** (2006). Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 61–80.
- [162] **Magee T. and Seabra MC.** (2005). Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Curr Opin Cell Biol.*, 17(2), 190-6.
- [163] **Whitmore L. and Wallace B. A.** (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392–400.
- [164] **Manavalan P. and Johnson WC Jr.** (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem.*, 167(1), 76-85.
- [165] **Andrade M. A., Chaco'n P., Merelo J. J. and Mora'n F.** (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, 6, 383–390.
- [166] **Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. and Woody, R. W.** (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 243–251.
- [167] **Greenfield N. J.** (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890.
- [168] **Greenfield N. and Fasman GD.** (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8, 4108–4116.
- [168] **Holzwarth G. and Doty P.** (1965). The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 218–228.
- [169] **Hong A., Choi CM., Eun HJ., Jeong C., Heo J. and Kim NJ.** (2014). Conformation-specific circular dichroism spectroscopy of cold, isolated chiral molecules. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 53(30), 7805-8.
- [170] **Beychok S.** (1966). Circular dichroism of biological macromolecules. *Science*, 154, 1288–1299.
- [171] **Ranjbar B. and Gill P.** (2009). Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chemical Biology & Drug Design*, 74(2), 101–120.
- [172] **Berova N., Bari L. and Pescitelli G.** (2007). Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chemical Society Reviews*, 6.
- [173] **Berova N., Nakanishi K. and Woody R.W.** (2000) Circular Dichroism: Principles and Applications, 2nd edn. New York, USA.

- [174] **Fiori A., Volpi E., Zarlenga A. and Bohling G.C.** (2015). Gaussian or non-Gaussian logconductivity distribution at the MADE site: What is its impact on the breakthrough curve? *J Contam Hydrol.*, 179, 25-34.
- [175] **Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Zhang W., Merz K.M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossváry I., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D.H., Seetin M.G., Sagui C. and Babin V.** (2008). AMBER 10, D.A. Case TAD, T.E. Cheatham, III. *University of California, San Francisco*. [176] Mats S., Humbel S., Froese R.D.J., Matsubara T., Sieber S., Morokuma K. (1996). ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels–Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)₃)₂+ H₂Oxidative Addition. *The Journal of Physical Chemistry*. 100 (50), 57-193.
- [176] **Ernest D. and Feller D.** (1986). Basis set selection for molecular calculations. *Chem. Rev.*, 86 (4), 681–696.
- [177] **Cornell W., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W. and Kollman P.A.** (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins. *Nucleic Acids, and Organic Molecules, J. Am. Chem. Soc.*, 117(19), 5179–5197.
- [178] **DuanY., Wu S. Chowdhury M.C., Lee G., Xiong W., Zhang R., Yang P., Cieplak R., Luo T., Lee J., Caldwell J. and Wang P.** (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.*, 24(16), 1999–2012.
- [179] **Foster JP. and Weinhold F.** (1980). Natural hybrid orbitals. *Journal of the American Chemical Society*, 102, no.24, 7211-7218.
- [180] **Galkin A.G., Kutsenko A.S., Bajulina N.P., Esipova N.G., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Shelukho D.V., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B. and Popov V.O.** (2002). *Biochim.Biophys.Acta*, 1594, 136.
- [181] **Labrou N.E. and Rigden D.J.** (2001). Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biochem.J.* 354, 455-463.
- [182] **Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V., Savitsky A.P., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mezentzev A.V. and Popov V.O.** (1996). Site directed mutagenesis of the formate dehydrogenase active centre : role of the His332-Gln313 pair in enzyme catalysis. *FEBS Letters*, 390, 104.
- [183] **Matorin A. D. and Tishkov V.I.** (1998). The role of Asn146 residue in enzyme catalysis of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biocatalysis-98. Fundamentals and Applications*
- [184] **Alekseeva A. A., Serenko A. A., Kargov I. S., Savin S. S., Kleymenov S. Y. and Tishkov V. I.** (2012). Engineering Catalytic Properties and Thermal Stability of Plant Formate Dehydrogenase by Single-Point Mutations. *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(11), 781–788.

- [185] **Alekseeva A. A., Kargov I. S., Kleimenov S. Y., Savin S. S. and Tishkov V. I.** (2015). Additivity of the Stabilization Effect of Single Amino Acid Substitutions in Triple Mutants of Recombinant Formate Dehydrogenase from The Soybean Glycine max. *Acta Naturae*, 7(26), 55-64.
- [186] **Kargov I.S., Kleimenov S. Y., Savin S.S., Tishkov V. I. and Alekseeva A.A.** (2015). Improvement of The Soy Formate Dehydrogenase Properties by Rational Design. *Protein Engineering, Design and Selection*, 28(6), 171-178.
- [187] **Felber S.** (2001). Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse, Doktora Tezi, Düsseldorf Üniversitesi.
- [188] **Jiang W., Lin P., Yang R. and Fang B.** (2016). Identification of catalysis, substrate, and coenzyme binding sites and improvement catalytic efficiency of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 8425-37.
- [189] **Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.M., Egorova O.A., Sheluho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A. and Egorov A.M.** (1993). Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp.101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 192, 976.
- [190] **Odintseva E.R., Popova A.S., Rojkova A.M. and Tishkov V.I.** (2002) Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin of Moscow University, Ser. 2 Chemistry*, 43, 356.
- [191] **Slusarczyk H., Felber S., Kula, M. R. and Pohl M.** (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur. J. Biochem.*, 267(5), 1280.
- [192] **Serov A.E. and Tishkov V.I.** (2002). Baker's yeast formate dehydrogenase: unusual mechanism of inactivation and stabilization by ionic strength and cofactor. *Bulletin of Moscow University Ser. 2 Chemistry*, 43,345.
- [193] **Mitsuhashi K., Yamamoto H. and Kimoto N.** (2002). European Patent Application EP1211316A1.
- [194] **Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V. and Tishkov V.I.** (1999). Bacterial formate dehydrogenase.Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha helices. *FEBS Lett.*, 445, 183.
- [195] **Mesentsev A.V., Lamzin V.S., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B. and Popov V.O.** (1997). *Biochem. J.*, 321, 475.
- [196] **Rosano G.L. and Ceccarelli E.A.** (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5, 172.
- [197] **Strandberg L. and Enfors S.O.** (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 57(6), 1669-1674.
- [198] **Li Z., Kessler W., Heuvel J. and Rinas U.** (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1203.

- [199] **Loomis WF. and Magasanik B.** (1967). Glucose-Lactose Diauxie in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 93(4), 1397–1401.
- [200] **Labrou N.E., Rigden D.J. and Clonis Y.D.** (2000). Characterization of the NAD⁺ binding site of *Candida boidinii* formate dehydrogenase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 267, 6657– 6664.
- [201] **Zheng J., Yang T., Zhou J., Xu M., Zhang X. and Rao Z.** (2017). Elimination of a Free Cysteine by Creation of a Disulfide Bond Increases the Activity and Stability of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase *Appl Environ Microbiol.* 15, 83(2).
- [202] **Bommarius AS. and Karau A.** (2005). Deactivation of formate dehydrogenase (FDH) in solution and at gas-liquid interfaces. *Biotechnol Prog.*, 21(6), 1663-72.
- [203] **Ansorge-Schumacher MB., Slusarczyk H., Schümers J. and Hirtz D.** (2006). Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide. *FEBS J.*, 273(17), 3938-45.
- [204] **Schirwitz K., Schmidt A. and Lamzin VS.** (2007). High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Sci.* 16(6), 1146-56.
- [205] **Carter JL., Bekhouche M., Noiriél A., Blum LJ. and Doumèche B.** (2014). Directed evolution of a formate dehydrogenase for increased tolerance to ionic liquids reveals a new site for increasing the stability. *Chembiochem.*, 15(18):2710-8.
- [206] **Shinoda T., Arai K., Shigematsu-Iida M., Ishikura Y., Tanaka S., Yamada T., Kimber M.S., Pai E.F., Fushinobu S. and Taguchi H.** (2005). Distinct conformation-mediated functions of an active site loop in the catalytic reactions of NAD-dependent D-lactate dehydrogenase and formate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 280, 17068–17075.
- [207] **Galkin A., Kulakova L., Tishkov V., Esaki N. and Soda K.** (1995). Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 479–483.
- [208] **Fedorchuk V.V., Galkin A.G., Yasny I.E., Kulakova L.B., Rojkova A.M., Filippova, A.A. and Tishkov V.I.** (2002). Influence of interactions between amino acid residues 43 and 61 on thermal stability of bacterial formate dehydrogenases. *Biochemistry (Mosc.)*, 67, 1145–1151.
- [209] **Serov A.E., Odintzeva E.R., Uporov I.V. and Tishkov V.I.** (2005). Use of Ramachandran plot for increasing thermal stability of bacterial formate dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 804–808.
- [210] **Slusarczyk H., Felber S., Kula M.-R. and Pohl M.** (2003). Novel mutants of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *US Patent Application Publication US2003/0157664*, 21.09.2003.
- [211] **Karaguler N.G., Sessions R.B., Moreton K.M., Clarke A.R. and Holbrook J.J.** (2004). Estimating the energetic contribution of hydrogen bonding to the stability of *Candida methylica* formate dehydrogenase by using double mutant cycle. *Biotechnol. Lett.* 26, 1137–1140.

- [212] **Gul-Karaguler, N., Sessions R.B., Clarke A.R. and Holbrook J.** (2001). A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylica* allows the enzyme to use NADP. *Biotechnol. Lett.* 23, 283–287.
- [213] **Rozzell J.D., Hua L., Mayhew M. and Novick S.** (2004). Mutants of enzymes and methods for their use. US Patent Application Publication US2004/0115691, 17.06.2004.
- [214] **Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V. and Tishkov V.I.** (2002). Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 367, 841–847.
- [215] **Yvonne Chiang A., Kresge J., Tang Y.S. and Jakob Wirz.** (1984). The pKa and keto-enol equilibrium constant of acetone in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (2), 460–462.
- [216] **Ballinger P. and Long F.A.** (1960). Acid Ionization Constants of Alcohols. II. Acidities of Some Substituted Methanols and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (4), 795–798

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Huri BULUT
İletişim Bilgileri : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Adres : Biyokimya Anabilim Dalı Adnan Menderes Bulvarı
Vatan Cad. Fatih/İstanbul Türkiye
Mail : huridedeakay@gmail.com, hbulut@bezmialem.edu.tr
Unvanı : Uzm. Biyolog
Akademik Unvan : Araştırma Görevlisi
Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Üniversite
Lisans	Biyoloji	Uludağ Üniversitesi
Yüksek Lisans	Klinik Mikrobiyoloji	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doktora	Tıbbi Biyokimya	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Meydan S., Esrefoğlu M., Selek S., Tosunoglu Akbas E., Ozturk O., Kurbetli N., Bayındır N., Bulut H., Meral I. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester and thymoquinone on toluene induced liver toxicity. *Biotechnics and Histochemistry*, doi: 10.1080/10520295.2018.1554825
2. Saygin B., Esrefoglu M., Bayindir N., Tok OE., Selek S., Bulut H., Ozer OF., Ozturk A., Yilmaz O., Meydan S. Protection with thymoquinone against formaldehyde-induced neurotoxicity in the rats. *Bratisl Med J* 2018; 119 (11).
3. Mesut Seker, Hayati C. Isen, Nidal Çevirme, Sinem Aydın, Ahmet Bilici, Huri Bulut, Ayşe I. Yasin, Ezgi Coban, Tarık Demir, Altay Aliyev, Abdurrahim Kocyigit, Hacı M. Turk. Role of Urotensin-2 in 5-Fluorouracil-Related Arterial Vasoconstriction in Cancer Patients. *Oncol Res Treat.* 2018 DOI: 10.1159/000490120
4. Abdurrahim Kocyigit, Eray Metin Guler, Ersin Karatas, Hifa Caglar, Huri Bulut. Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. *Mutat Res Gen Tox En* 2018 829–830 (2018) 50–60
5. Sinem Yıldırım, Meltem Bakka, Huri Bulut, Sahabettin Selek. Quantitative evaluation of dental anxiety indicators in the serum and saliva samples of children treated under general anesthesia. *Clinical Oral Investigations* 2018 /doi.org/10.1007/s00784-018-2340-2

6. Gökhan Karaca, Faruk Pehlivanli, Oktay Aydın, Canan Altunkaya, Hafize Uzun, Mehmet Niyaz, Hüseyin Özden, Huri Bulut. The effect of mesenchymal stem cell use on intraabdominal adhesions in a rat model. *Annals of Surgical Treatment and Research* 2018, doi.org/10.4174/astr.2018.94.2.57

7. Bastu E, Zeybek U, Gurel Gurevin E, Yüksel Ozgor B, Celik F, Okumus N, Demiral I, Dural O, Celik C, Bulut H, Ilkay Armutak E, Baysal B, Buyru F, Yeh J. Effects of Irisin and Exercise on Metabolic Parameters and Reproductive Hormone Levels in High-Fat Diet-Induced Obese Female Mice. *Reprod Sci.* (2017)

8. Nehir Aytan A, Bastu E, Demiral I, Bulut H, Dogan M, Buyru F Relationship between hyperandrogenism, obesity, inflammation and polycystic ovary syndrome *Gynecol Endocrinol.* 2016 Mar 7:1-5.

9. Kaptan Z, Akgün-Dar K, Kapucu A, Dedeakayoğulları H, Batu Ş, Üzümlü G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain Res.* 2015 Aug 27;1618:194-204

Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.

1.Huri Bulut, Büşra Yüksel, Mehmet Gül, Meryem Eren, Michail Isupov,Berin Yelmazer, Barış Binay, Jennifer Littlechild, Abdurrahim Koçyiğit. NAD⁺ Dependent Formate Dehydrogenase Production and Enhancement Of Activity via Protein Engineering. TBS International Biochemistry Congress, 26-30 October 2018, Bodrum, Turkey **(Sözlü bildiri)**

2.Huri Bulut, Ezgi Bakan, Betül Yenigün, Abdurrahim Kocyigit. Investigation of In-vitro Anticancer Activity of Plant Parasite *Cuscuta campestris*. 1. Uluslararası Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi. 19-22 Nisan 2018, İstanbul, Turkey **(Sözlü bildiri)**

3.Fatih Aktas, Huri Bulut, Jennifer Littlechild, Berin Yelmazer, Baris Binay. Thermostable L- Amino acid Dehydrogenase; Purification, Characterization and Kinetic Mechanism. 1. EBAT Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress. 27-30 October 2018. Antalya, Turkey **(Sözlü bildiri)**

4.Adnan Kirit, Abdurrahim Kocyigit, Kasım Takım, Vidan Betül Yenigün, Huri Bulut, Eray Metin Guler, Ezgi Balkan. The Investigation Of Anti-Cancer Effectiveness Of Rheum Ribes L. Root Extract On Malignant Melanoma Cell Line. 1. Uluslararası GAP Matematik-Mühendislik-Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi. 4-7 Ekim 2018, Sanliurfa, Türkiye **(Sözlü bildiri)**

5.Yelda Deligoz Bildacı, Huri Bulut, Meltem Gursu, Omer Elcioğlu. Effect of Ketoanalogues Inflammation in Diabetic Nephropathic Rats. 55. ERA-EDTA congressNephrology Dialysis Transplantation. 24-27 May 2018, Copenhagen, Denmark **(Sözlü bildiri)**

- 6.Huri Bulut, Berin Yelmazer, Simone De Rose, Michail Isupov, Jennifer Littlechild, Fatih Aktas, Baris Binay. Thermostable L- Amino acid Dehydrogenase Purification, Characterization and Kinetic Mechanism 12. Conference on Protein Stabilization. 16-18 May 2018, Vilnius, Lithuania
- 7.Huri BULUT, Ahmet TULEK, Sahabettin SELEK, Baris BINAY An Investigation On Effects Of Metals On Formate Dehydrogenase Activity. 13. International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. 9-13 July 2017, Budapest, Hungary
8. B. Yuksel, D. Sahin, H. Bulut, A. Kocyigit. A new Approach to Recurrent Pregnancy Losses: Anti-cardiolipin- specific Peptide Screening with Phage Display Technique . FEBS Congress 2017, Jarusselam, Israel
- 9.Huri BULUT, Umut BUYUK, Berk BULUT, Aytac JAFERZADE, Busra YUKSEL, Sahabettin SELEK. MicroRNA Expression are altered in Endometrial Tissues of PCOS Women. 42.FEBS Congress from molecules to cells and back. 10-14 September 2017, Jerusalem, Israel.
- 10.Ersin KARATAŞ, Huri BULUT, Şahbettin SELEK, Abdurrahim KOÇYİĞİT,Barış BINAY. Characterization and Production via Recombinant DNA Technology of Oxalate Decarboxylase Enzyme. 13.International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. 9-13 July 2017, Budapest, Hungary
- 11.Dr.Cem Gökhan, Prof. Süha Yalçın, Dr. Hakkı Kumuşoğlu, Martin James, Dr. Enrico Appiani, Huri Dedeakayoğulları Msc. Introducing Healthier Table Sugar: G-SUGAR 2. FOOD-OMICS CONGRESS 2011, Aula Magna, Cesena Italy
12. H. Dedeakayoğulları, H.Kumuşoğlu, G. Biçim, A.S.Yalçın. Antioxidant Capacity of G-Sugar: A Healthy Table Sugar. SFRR-Europe 2011 Meeting, September 7-10 2011, İstanbul
- 13.Huri Dedeakayogullari, Ahmet Kilinc, Gokhan Bicim, Eray Metin Guler, Ziba Mochberi Oskouei A.Suha Yalcin. Comparative Analysis of Different Parts of Vicia faba for Production of a Protein Isolate with High Antioxidant Activity, L-Dopa and Phenolic Content 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia
- 14.Eray Metin Guler, Mustafa Kesmen, Huri Dedeakayogullari, Ziba Mochberi Oskou Production of Hen Egg IgY Liposomes Against Different Salmonella Species. 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia
- 15.Eray Metin Guler, Ulker Anadol Kelleci, Hayriye Gul Polat, Huri Dedeakayogullari, Gokhan Bicim Ahmet Kilinc, A. Destina Yalcin, A.Suha Yalcin The Role of Oxidative/Antioxidative Balance , Vascular Pathophysiology and Inflammation in Migraine 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia

16.Savas Ustunova, Sevan Gurun, Ebru Gurel, Huri Dedeakayogullari, Cihan Demirci Tansel

Staphylococcus aureus-Induced Sepsis and Coenzyme Q10 Therapy: an Isolated Rat Heart Study, 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia

17. Sinem Ozdemir, Asli Kandil, Tugba Kaskavalci, Huri Dedeakayogullari, Cihan Demirci Tansel. The Effects of Tempol on Liver in LPS-Induced Acute Endotoxemia in the Rat. 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia

18. Deniz Erol,Savas Ustunova, Ebru Gurel, Huri Dedeakayogullari, Cihan Demirci Tansel. Role of Ischemic Preconditioning and Tempol in Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart 38. FEBS CONGRES, July 6-11 2013, Saint Petersburg, Russia

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Huri Dedeakayoğulları, Ayşe Emel Önal Çevre-İnsan Sağlığı İlişkisi Açısından Su ve Su Analizinin Önemi İstanbul Tıp Fak. Dergisi 2009;72: 65-70

2. Huri Dedeakayoğulları, Osman Şadi Yenen, Emel Önal İstanbul'da Hepatit E Virüsü (HEV) İnfeksiyonunun Seroprevelansı Üzerine Bir Çalışma İstanbul Tıp Fak. Dergisi 2010;127: 68-72

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Savaş Üstünova, Ebru Gürel-Gürevin, Huri Dedeakayoğulları, Cihan Demirci-Tansel. İzole sıçan kalbinde Hidroje Sülfid'in iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolü. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014, Kayseri

2. Huri Dedeakayoğulları, Eray Metin Güler, Makbule Deniz Borucu, A. Destina Yalçın, A. Suha Yalçın. Diyabetik Nöropatili Hastalarda Oksidatif Hasarın İncelenmesi 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir

3. Ziba Mochberi Oskouei, Huri Dedeakayoğulları, Eray Metin Güler, A. Suha Yalçın Vicia faba'dan L-DOPA ve Antioksidan İçeriği Yüksek Ekstrakt Eldesi 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir

4. E.M. Güler, H. Dedeakayoğulları, A.Kılınç, A.S. Yalçın Oksidatif Stresin Belirlenmesinde Yeni Bir Yaklaşım 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011