

**Aktif Bölge Mimarisinin Anlaşılması Temelinde, NAD<sup>+</sup>  
Bağımlı Mutant *Candida methylica* Format Dehidrogenaz  
Enziminin Spesifik Aktivitesinin Arttırılması**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 114Z798**

Proje Yürütücüsü:  
**Yrd. Doç. Dr. Barış BİNAY**

Bursiyer:  
Soner TORUN

OCAK 2016  
İSTANBUL

## ÖNSÖZ

Projede literatürde ısıl kararlılığı olan *Candida methylica* (*Cm*) FDH için hesapsal yöntemler ve literatür bilgisi ile belirlenen fonksiyonel amino asit pozisyonları, ISM/CAST için mutant kütüphanesi oluşturulmuş ve substrat olarak NAD<sup>+</sup> ve formik asite karşı yüksek spesifik aktiviteye sahip mutant FDH'ı seçmek için taranmıştır. Seçilen substratlara karşı doğal tip *Cm* FDH ile karşılaştırıldığında spesifik aktivitesi yüksek olan mutant FDH'lar seçilerek dizi analizi yapıldıktan sonra, TAGZyme sistemi ile saflaştırılan mutant enzimlerin seçilen substratlara karşı *KM*, *k<sub>cat</sub>* kinetik değerleri belirlenmiştir.

Son olarak seçilen mutant FDH enzimleri için mutasyon geçiren amino asit pozisyonlarının substrat ile olan etkileşimlerinin moleküler dinamik simülasyonları yapılarak incelenmiştir. Projenin sonucunda karakterize edilmiş, yüksek spesifik aktiviteli NAD<sup>+</sup> bağımlı ısıya dayanıklı bir (1) adet mutant FDH enzimleri tanımlanmıştır.

Bu projeden sağlanan destekle İstanbul Enzim Tanıma Merkezi (IERC) Araştırma Laboratuvarı'nın teknik imkânları iyileştirilmiş olup; proje çalışmaları adı geçen laboratuvarda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu projeden alınan destekle, 1 yüksek lisans öğrencisine burs imkânı sağlanmıştır. Bunun yanında proje kapsamında yapılan çalışmalar ile İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programında yüksek lisans öğrencisi Soner Torun için bir yüksek lisans tezi oluşturulmaya başlanmıştır. Projede gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar, 11. Uluslararası Protein Stabilizasyon kongresine poster bildirisi olarak gönderilmiş ve kabul alınmıştır.

Ayrıca proje kapsamında yapılan çalışmalar Scientific Citation Index (SCI) ve SCI-Expanded (SCI-E) indeksli "Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology" isimli uluslararası nitelikte hakemli dergide yayınlanması için gönderilmiştir.

114Z798 nolu projemizi destekleyerek sunduğu maddi olanaklardan dolayı TÜBİTAK'a ve çalışmalarımızı gerçekleştirmemiz için sunduğu fiziki imkânlardan dolayı İstanbul AREL Üniversitesi'ne sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Format Dehidrogenaz Enzimi .....	1
2. Literatür Özeti .....	2
2.1. Format Dehidrogenaz Enziminin Önemi .....	2
2.2. Format Dehidrogenaz Enzimleri için Enzim Mühendisliği Çalışmaları .....	4
2.3. Kombine aktif bölge doyurulmuş test tekniği: Alternatif Enzim Mühendisliği Tekniği .....	5
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	7
3.1. Cihazlar .....	7
3.2. Enzimler .....	8
3.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	8
3.4. Primerler.....	9
3.5. Kullanılan Suşlar.....	10
3.6. Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	10
3.7. Çözeltiler ve Tamponlar.....	11
3.7.1. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	11
3.7.2. Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler .....	12
3.7.3. Kompetent Hücre Hazırlanılmasında Kullanılan Çözeltiler .....	12
3.7.4. Diğer Çözeltiler .....	12
4.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	12
4.1. Mutasyon Çalışmaları.....	12
4.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi .....	12
4.1.2. Kompetent Hücre Hazırlanması .....	13
4.1.1.1. Plazmid DNA İzolasyonu .....	12
4.1.3. Transformasyon.....	14
4.2. Kalıp Plazmidin Dizi Analizi .....	14
4.3. <i>Candida methylca</i> (Cm) mutant format dehidrogenaz'ın yeniden modellenmesi ve CAST için aday amino asit pozisyonlarının belirlenmesi .....	15
4.3.1. Aday amino asit pozisyonları için dejeneratif kodon seçimi ve primer tasarımı .....	15
4.3.2. Tasarlanan dejeneratif kodonlu primerler ile PCR.....	15

4.4. Elde edilen mutant <i>Cm fdh</i> gen(ler)'in çok fazla proteine dönüştürülmesi için; His-tag'lı rekombinant taşıyıcının kompetent hücreye taşınarak mutant kütüphanesinin oluşturulması	16
4.5. Mutant kolonilerin tarama tekniği için hazırlanması ve elde edilen mutant kolonilere çok kuyucuklu mikro plakalarda tarama tekniğinin uygulanması	16
4.6. Elde edilen mutant kolon(ler)in stoktan büyütülmesi ve mutant <i>Cm</i> FDH(lar)'ı taşıyan rekombinant taşıyıcının dizilenmesi	17
4.7. Seçilen <i>Cm</i> FDH(lar)'ın saflaştırılması	18
4.9. Protein Tayini	18
4.10. Elde edilen mutant <i>Cm</i> FDH için kısmi karakterizasyon	19
4.11. Elde edilen saflaştırılmış mutant <i>Cm</i> FDH(lar) ile seçilen substratlara karşı spesifik aktivite ve kinetik çalışmaları	19
3.18. Elde edilen en iyi mutant <i>Cm</i> FDH'in moleküler dinamik ile yüksek başarılı bilgisayarlarda modellenmesi	20
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b>	
5.1. Rekombinant plazmitin saflaştırılması ve kalıp <i>fdh</i> geninin dizilenmesi	20
5.2. Kütüphanenin oluşturulması ve taranması	20
5.3. Elde edilen saflaştırılmış mutant <i>Cm</i> FDH(lar) ile seçilen substratlara karşı spesifik aktivite ve kinetik çalışmaları	22
5.4. Elde edilen mutant <i>Cm</i> FDH için kısmi karakterizasyon	23
5.5. Elde edilen en iyi mutant <i>Cm</i> FDH'in moleküler dinamik ile yüksek başarılı bilgisayarlarda modellenmesi	24
<b>6. REFERANSLAR</b>	27

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Mevcut karakterize edilmiş NAD <sup>+</sup> bağımlı FDH enzimlerinin spesifik aktiviteleri	4
Tablo 2. Kullanılan cihazlar	7
Tablo 3. Kullanılan enzimler	8
Tablo 4. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	8
Tablo 5. Hedef aminoasit pozisyonları için tasarlanan primerler	9
Tablo 6. Dizilemede kullanılan primerler	10
Tablo 7. Kullanılan suşlar	10
Tablo 8. NRT dejeneratif kodonunun kodladığı amino asitler	15
Tablo 9. PCR bileşenleri	16
Tablo 10. PCR koşulları	16
Tablo 11. Dizileme sonucu tespit edilen baz ve amino asit değişimleri	22
Tablo 12. Yabani ve spesifik aktivitesi yüksek çıkan örnek için kinetik değerler	24

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Endüstriyel uygulamalarda, biyokatalitik yol için, koenzim olarak kullanılan NADH'nin sürekli yenilenmesi .....	3
Şekil 2. CAST tekniğinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 3. Transforme olmuş hücrelerin Petri platede büyümüş hallerine örnekler .....	22
Şekil 4. FDH'ların saflaştırılması aşamasında elde edilen örnekler ve gliserol stoğun jelde görünümü .....	23
Şekil 5. Farklı pH değerlerinde mutant enzimin bağıl aktivite değeri .....	23
Şekil 6. FDH enzimleri için elde edilen Michaelis-Menten grafikleri.....	24
Şekil 7. <i>Cm</i> FDH'ın moleküler dinamik ile yüksek başarımlı bilgisayarlarda modellenmesi sonucu elde edilen yapı.....	25

## ÖZET

Format dehidrogenaz enzimi (FDH), endüstriyel biyokatalizörler arasında son yıllarda en çok dikkat çeken enzimlerden biridir. Özellikle NAD(P)<sup>+</sup> bağımlı FDH, gerçekleştirdiği reaksiyonun düşük redoks potansiyeli nedeniyle biyoenerji üretimi ve saf kiral bileşiklerin sentezi sırasında ihtiyaç duyulan sürekli NAD(P)H yenilenmesinin sağlanması için en çok başvurulan enzimlerdendir. Endüstriyel biyoteknoloji için, NAD(P)<sup>+</sup> bağımlı FDH'ın en büyük dezavantajı mevcut FDH'ların (FDHs) düşük aktiviteye sahip olmasıdır. Bu nedenle özellikle endüstriyel ölçekte biyokatalitik yöntemlerle değerli farmasötik saf kiral ara bileşiklerin sentezi için gerekli olan sürekli NAD(P)H'nin yenilenmesinde FDH enziminin kullanılması oldukça yüksek maliyetlidir.

Proje başvurusu öncesinde ön çalışma olarak literatürde rapor edilen ısı kararlılığı artırılmış *Candida methylica* (*Cm*) mutant FDH'ın yapısı analiz edilmiştir. Bunun için, öncelikle *Cm* FDH'ın homoloji yöntemi ile yapısı tahmin edilmiş ve elde edilen yapı moleküler dinamik ile optimize edilmiştir. Sonra diğer kaynaklardan elde edilen FDH enzimlerin dizileri ve yapıları ile karşılaştırılarak; *Cm* FDH için katalitik bölgeyi oluşturan, formik asit-NAD<sup>+</sup> bağlanma bölgesini oluşturan amino asit pozisyonları tahmin edilmiştir. Enzimin aktif bölgesini oluşturduğu yada katalitik aktivitesinde etkili olabileceği tahmin edilen Thr67, Phe69, Gly92, Val93, Gly94, Asp96, Arg258, Gln287, His311 dokuz (9) amino asit, ISM yönteminin CAST tekniği için aday amino asit pozisyonları olarak belirlenmiştir.

Projenin kabulü sonrası ilk iş olarak, hesapsal yöntemler ve literatür bilgisi ile belirlenen fonksiyonel amino asit pozisyonları için ISM/CAST ile mutant kütüphanesi oluşturulmuştur. Petri plakelerde oluşturulan her mutant kütüphanesi için 20-50 arasında koloni elde edilmiştir. Oluşturulan mutant kütüphaneleri, substrat olarak NAD<sup>+</sup> ve formik asite karşı yüksek spesifik aktiviteye sahip mutant FDH'ı seçmek için taranmıştır. Tarama sonucu 13 tane mutant koloninin aktif olduğu gözlemlenmiştir. Seçilen substratlara karşı doğal tip *Cm* FDH ile karşılaştırıldığında spesifik aktivitesi yüksek olan mutant FDH'lar seçilerek, dizi analizi için dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme sonucu aktif olan 13 mutanttan sadece 3 tanesinde baz değişimi olduğu görülmüştür. Bunlardan 2 tanesinde sessiz mutasyon, diğerinde ise N119R değişimi tespit edilmiştir. TAGZyme sistemi ile saflaştırılmış ve yabanıl tip ve mutant enzimin kinetik değerleri sırasıyla format ve NAD<sup>+</sup>'ye karşı *KM* 11,20 ve 0,95 mM, *kcat* 22,21 ve 54,56 s<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Büyük yan zincirden kaynaklı substratlara ev sahipliği yapan 119. pozisyon için yerinin daha az su ile dolması ve substratlar ile daha çok etkileşmesi seçilen substratlar için *KM* değerinde iyileşmeye neden olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, Arg119'a ait geniş hacimli yan zinciriyle His311'e hidrit transferinin kolaylaşması *kcat*'in artmasına yol açtığı düşünülmektedir.

Son olarak elde edilen mutant FDH enziminin substrat ile olan etkileşimleri, moleküler dinamik simülasyonu ile elde edilen yapıda incelenmiştir. Modelleme çalışmaları sonuçları göstermektedir ki; Arg119 mutasyonu iki monomerin birleşme noktasında olan Phe69 üzerinden yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu mutasyonun, NAD<sup>+</sup> ile bağlanmayı güçlendiren etkilere sahip olduğu iyileşen kinetik değerlerden dolayı da tahmin edilmektedir. Elde edilen yapı göstermektedir ki; arjinin sahip olduğu uzun yan zincir ile substratların doğru yönde yönlendirilmesini, hidrit iyonunun formik asitten His311'e daha hızlı transfer olmasını sağlamakta ve iyileşen *K<sub>M</sub>* ve *k<sub>cat</sub>* değerleri bu varsayımları desteklemektedir.

Proje sonunda; NAD<sup>+</sup> ve formata karşı yaklaşık %10 katalitik aktivitesi artırılmış, karakterize edilmiş, ısıya dayanıklı mutant FDH enzimi tanımlanmıştır. 119. pozisyonundaki Asn, Arg ile yer değiştirmesi, substratların katalitik bölgeye daha iyi yönelmesini sağlamıştır. Arg, Asn gibi karboksilat grubu üzerinden substratları koordine etmiştir. Yüksek katma değerli endüstriyel biyokatalizör olarak aktivitesi yüksek olan mutant FDH enziminin patentlenmesi planmaktadır.

## **ABSTRACT**

Formate dehydrogenase enzyme (FDH) is one of the most intriguing industrial biocatalysts that have been researched these last few years. Especially the NAD(P)<sup>+</sup> dependent FDH, due to its low redox reaction potential, it produces bioenergy and facilitates the synthesis of pure chiral compounds that requires the continuous NAD(P)H regeneration. Considering its use in the Biotechnology Industry, NAD(P)<sup>+</sup> dependent FDH's greatest disadvantage is its low activity in its current state. Using the FDH for continuous regeneration of NAD(P)H via the required bio-catalytic methods to achieve an industrial scale for the synthesis of valuable pharmaceutical pure chiral-intermediates is very expensive.

Prior to the application of this project, as a preliminary work, the mutant FDH with an enhanced thermal stability (reported in an earlier research paper) derived from the *Candida methylca* (*Cm*) has been further modified to have a higher specific activity. For this purpose, with the use of homology method, the structure of *Cm* FDH has been estimated, and the obtained structure was optimized with the use of molecular dynamics. After the optimization the resulting structure was compared against the sequences and structures of the FDH enzymes from other sources via the use of molecular dynamics. With the obtained information from the literature and our analysis, the amino acid positions forming the catalytic and binding region for the formic acid-NAD<sup>+</sup> and their structures for *Cm* FDH were determined and dissected. The functional amino acid positions were selected with the use of computational methods and literature knowledge was also used to form a mutant library for the ISM and CAST techniques.

After the initiation of the project, our primary objective was to determine the functional amino acid positions using computational methods and literature. We have selected these positions in order to generate the mutant library for the ISM/CAST as candidate amino acid positions. Creating for mutant library, we were selected 20-50 colonies. Generated mutant library was screened for selecting higher specific activity of the mutant FDH against NAD(P)H and formic acid as substrates. It was observed that 13 mutant colonies were active the result of scan. When compared to the wild-type *Cm* FDH, mutant FDHs that showed increased specific activity against selected substrates was selected. The selected mutant FDH enzymes were sent for analysis to get sequenced. Result of sequencing, we observed that only sequen of 3 mutant colonies were changed inside 13 active mutant colonies. Two of them were contained silent mutation and the other one was detected N119R base composition changing. Kinetic values of the purified wild type and mutant enzyme with TAGZyme system against formate and NAD<sup>+</sup> as *KM* 11,20 and 0,95 mM, *kcat* 22,21 and 54,56 s<sup>-1</sup> were determined respectively. , It is estimated that originating the large side chain that leads to stuffed with less water and more interaction with substrate for 119<sup>th</sup> position leads to the recovery value *KM* for the selected substrate. In addition, it is assumed that facililating of the hydride transfer to His311 via the large volume side chain of Arg119 that leads to increase the *kcat*.

Lastly, to identify and understand the catalytic interactions with the substrates, the amino acid positions, which were modified to form the mutant FDHs, were run through a molecular dynamics simulation. It shows the results of modeling studies; Arg119 mutation leads to structural changes over the Phe69 at the junction of the two monomers. Also due to improved the kinetic values, it is estimated that this mutation has the effect of strengthening the binding of NAD<sup>+</sup>. The obtained structure shows that Arg with its long side chain ensures being directed right orientation of substrates, faster transfer hydride ion from formic acid to His311 and these case is made understand the improved *KM* and *kcat* values.

In the end of the proeject, NAD<sup>+</sup> dependent, thermo-stabilized mutant FDH enzymes with about 10% high specific activity were characterized and identified with the project. Exchanging Asn at position 119 with Arg has provided a better orientation of the substrates to the catalytic region. Arg coordinates substrates over its carboxyl group like Asn. We plan to patent the high active mutant FDH, which has been created as a value added industrial biocatalyst.

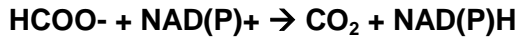


# 1.GİRİŞ

## 1.1. Format Dehidrogenaz Enzimi

NAD(P)H'i sürekli üretebilen dehidrogenaz enzimlerden NAD(P)+ bağımlı format dehidrogenazlar (FDHs) [EC 1.2.1.2], format iyonunu (HCOO-) karbondioksit (CO<sub>2</sub>) iyonuna yükseltgenmesini, NAD(P)+ iyonunu da NAD(P)H'e indirgenmesini katalizlerler (Ferry, 1990; Mathews vd., 1990; Vinals vd. 1993).

FDH'in katalizlediği reaksiyon:



FDHs, rekombinant deoksiribonukleik asit (DNA) teknolojisi ile mayalardan ve bakterilerden düşük maliyetlerle yüksek miktarlarda üretilmektedir (Berezin vd., 1989; Weusterbotz vd.1995). Bitkilerden izole edilen NAD(P)+ bağımlı FDH enzimlerin ait bitki genomunda fdh genlerinin sayısı değişmektedir (David vd., 2010; Alekseeva vd. 2011). FDH, bakterilerde ve mayalarda sitoplâzmadayken, bitkilerde mitokondride bulunmaktadır (Herman vd., 2002; Alekseeva vd. 2011).

NAD(P)+ bağımlı format dehidrogenaz enzimi, NAD(P)H'in yenilenmesini en az maliyetle, yüksek verimle ve çevreye zarar veren yan ürünler üretmeden gerçekleştirir (Şekil 2). Formatın karbondioksite yükseltgenme reaksiyonun tersinmez oluşu ve ana reaksiyon ile istenilen ürün için %100'e varan kazanç sağlamasıdır. FDH'in pH 5,5-11 ve 6-9,5 aralıklarında sırasıyla aktivitesinin ve Michaelis değerlerinin değişmemesi, NAD(P)+ bağımlı farklı biyokatalizörlerle beraber kullanılma imkânını sağlar Mesentsev vd. (1997). Bu beraber kullanımda, format tuzu çok ucuza mal edilmekte ve bilinen bütün enzimler için inhibe edici etkisi yoktur. Diğer yandan FDH'in yan ürün olarak ürettiği karbondioksit, inhibe edici etkisi yoktur; istenilen ürünün saflaştırılmasını zorlaştırmaz ve rahatlıkla ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Bu nedenle; endüstriyel öneme sahip birçok biyokatalizörün tıbbi, gıda, kozmetik, ilaç endüstrisi için optik olarak saf ürünü sentezlemesi için koenzim olarak ihtiyaç duyduğu NAD(P)H'nin, endüstriyel koşullarda FDH tarafından sürekli yenilenebilir olması, NAD(P)+ bağımlı FDHs'ı çok değerli yapmaktadır (Yamamoto vd., 2005; Moore vd., 2007; Wichmann vd., 1981; Hummel ve Kula 1989; Bommarius vd. 1995).

## 2. Literatür Özeti

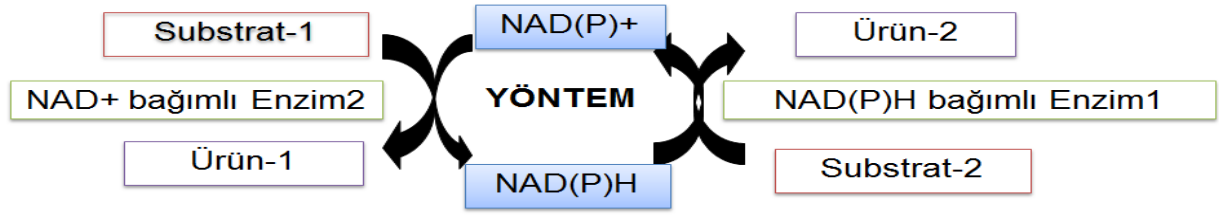
### 2.1. Format Dehidrogenaz Enziminin Önemi

Birçok çalışmada, NAD(P)+ bağımlı FDHs'ın, diğer enzimlerin gerçekleştirdikleri organik sentez için koenzim olarak ihtiyaç duydukları NAD(P)H'in yenilenmesi için kullanıldığı rapor edilmiştir (Shaked ve Whitesides 1980; Wichmann ve Vasic-Racki 2005, Wang vd. 2013). Bu nedenle farklı kaynaklardan elde edilip, karakterizasyonu gerçekleştirilen NAD(P)+ bağımlı FDH enzimleri için, NAD(P)H'nin yenilenmesinde kullanılmak üzere çok sayıda kayıtlı patent bulunmaktadır (Formate dehydrogenase, 2014).

NAD(P)+ bağımlı FDH enziminin NADH yenilenmesi için en dikkat çekici ticari uygulama; insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) bulaşma tedavisinde kullanılan ve antiretroviral bir ilaç olan atazanavirin sentezlenmesinde kullanımıdır. Atazanavirin üretilmesi için gerekli ara ürün sentezinde, tert-lösinin üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Keto asitin amino asite indirgenmesini lösin dehidrogenaz (LeDH) enzimi gerçekleştirmektedir. LeDH reaksiyonu gerçekleştirmek için amonyaya ve koenzim olarak NADH'e ihtiyaç duyar Patel vd. (1997). Reaksiyon için ihtiyaç duyulan NADH, FDH tarafından sürekli üretilmektedir Bommarius vd. (1995) Ceramopril allizin etilen asetal, HIV proteaz inhibitör ve antibiyotik tigemonam için kiral sentonların sentezinde gerekli olan NADH'in yenilenmesinde *P. pastoris* FDH enzimi kullanılmaktadır Goldberg vd. (2006).

Ancak bütün bu avantajlarına rağmen; NADP(+) bağımlı FDH enzimini farklı biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmasını sınırlayan en büyük faktörlerden biri ortalama  $6 \text{ U mg}^{-1}$  olan düşük spesifik aktivitesidir (Sluarczyk vd., 2000; Alekseeva vd. 2011).

Endüstriyel biyokatalizörlerin kullanımı ile çok farklı alanlarda pahalı farmasötik ara bileşikleri ve kimyasalları üretmeye giderek artan bir ilgi söz konusudur (Schmid vd., 2001; Nakamura vd., 2003; Moore vd. 2007). Enantiyoselektif, güvenli ve çevreyle dost reaksiyonlara olan ihtiyacın genomik ve genetik mühendisliği alanında ortaya çıkan gelişmeler ile karşılanabilir olması; bu ilgiyi en fazla büyüten unsurdur. Çünkü endüstriyel öneme sahip biyokatalizörler, çok sayıda rejio, kemo ve stereospesifik reaksiyonu değişik fonksiyonel gruplar üzerinden çevreci ve düşük maliyetlerle gerçekleştirmektedirler. Bu biyokatalizörler, karbon hidrojen yada karbon karbon bağına oksijen atomunun eklenmesi, hidrit taşıma, indirgeyici aminasyon, optik olarak aktif değerli kiral farmasötik ara bileşiklerin ve kimyasalların sentezlenme ve biyotransformasyon reaksiyonlarını büyük ölçekli katalizlerken, çok pahalı olan NAD(P)H'inde koenzim olarak sürekli yenilenmesine ihtiyaç duyarlar (Şekil 1). (Shaked vd. 1980; Whichmann vd., 1981; Vasic-Racki vd., 1989; Bommarius vd., 1992; Krix vd., 1997; Carugo ve Argos 1997; Bommarius vd.,1998; Slatner vd., 1998; Kula ve Kragl 1999; Zhu vd., 2006; 2006a; Zhang vd. 2009)



**Şekil 1.** Endüstriyel uygulamalarda, biyokatalitik yol için, koenzim olarak kullanılan NADH'nin sürekli yenilenmesi

Şekil 1'deki Enzim1 ile katalizlenen reaksiyon tiplerini ekonomik açıdan mümkün olması, kesintisiz koenzim yenilenmesini sağlayacak bir yöntemle mümkündür. Koenzim yenilenmesi için temel olarak yöntem, istenilen reaksiyonu gerçekleştirmek için ana enzim (Enzim1) tarafından kullanılan NAD(P)H koenziminin yükseltgenmiş formunu sürekli yenileyebilen bir enzimin (Enzim2) kullanılarak oluşturulmasıdır (Chenault vd. 1988). Koenzimin bu şekilde yenilenmesi için; Enzim2 olarak glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (Weckbecker ve Hummel, 2005), alkol dehidrogenaz, (Wong ve Whitesides, 1982; Bradshaw vd. 1992) ve fosfit dehidrogenaz Johannes vd. (2006) ve format dehidrogenaz enzimleri (Wong ve Whitesides 1994; Bommarius vd., 1995; Moore vd., 2007; Patel, 2013) kullanılmıştır. Ancak NAD(P)+ bağımlı glikoz-6-dehidrogenaz enziminin substrat olarak kullandığı glikozun ucuz olmasına karşın; eşdeğer indirgeme kapasitesinin amonyum formata göre düşüktür (Tishkov ve Popov 2006). Ayrıca, glikoz-6-dehidrogenaz çok pahalı bir enzim ve NAD(P)H'in yenilenmesi sırasında ürettiği glukonat çevre için zararlı olup; yan ürün olarak üretilen optik olarak aktif alkol ile etkileşmesi nedeniyle endüstriyel uygulamalar için tercih edilmemiştir Yamamoto vd. (2005).

Alkol dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan ürünlere bakıldığında, yüksek inhibe edici etkileri ve reaksiyon ortamından uzaklaştırılma maliyetlerinin yüksek olduğu görülmektedir Bradshaw vd. (1992). NAD(P)+ bağımlı format dehidrogenaz enzimi ile karşılaştırıldığında; fosfit dehidrogenaz enzimi sadece ksiloz redüktaz enzimi ile beraber kullanıldığında iyi sonuçlar vermektedir Neuhausser vd. (1998).

Literatürde tanımlanmış mevcut NAD+ bağımlı FDH enzimlerin doğal substratlarına karşı sahip oldukları spesifik aktiviteleri endüstriyel biyokataliz olarak kullanılmaları için son derece düşüktür (Tablo 1).

**Tablo 1.** Mevcut karakterize edilmiş NAD<sup>+</sup> bağımlı FDH enzimlerinin spesifik aktiviteleri.

FDH Kaynağı	Spesifik Aktivite U/mg	<i>k<sub>cat</sub></i> s <sup>-1</sup>	KM(NAD <sup>+</sup> ) μM	KM(format) mM	Referans
<i>Pisum sativum</i> sp.	4,1	Bilinmiyor	23	2,1	Alekseeva vd. (2011)
<i>A. thaliana</i> , rekombinant transgenetik tütünden	1,3	0,87	78	11	Alekseeva vd. (2011)
<i>Clostridium acidurici</i>	1,3	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Alekseeva vd. (2011)
<i>C. methylica</i> , doğal tip	2,1	1,4	100	13	Alekseeva vd. (2011)
<i>C. methylica</i> , mutant	Bilinmiyor	0,85	Bilinmiyor	4,4	Ordu vd. (2013)
<i>Soybean</i> , <i>G. max</i> , rekombinant	4	2,83	13,2	1,5	Alekseeva vd. (2011)
<i>C. boidinii</i> , doğal tip	6,3	3,7	37	5,9	Alekseeva vd. (2011)
<i>A. thaliana</i> , rekombinant <i>E.coli</i> 'den	6,5	3,8	20	2,8	Alekseeva vd. (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , rekombinant	10	6,5	36	5,5	Alekseeva vd. (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	10	7,3	60	7	Wang vd. (2013)

Bu nedenle, NAD(P)<sup>+</sup> bağımlı FDHs'ın sürekli koenzim yenilenmesinde biyokatalizör olarak kullanılması çok maliyetlidir.

## 2.2. Format Dehidrogenaz Enzimleri için Enzim Mühendisliği Çalışmaları

FDHs'ın aktivitesini arttırmak amacıyla *Candida boidinii* den (*Cb*) elde edilmiş FDH enzimi için rapor edilen çalışmalar bulunmaktadır Slusarczyk vd. (2000). Bütün çalışmalarda elde edilen mutantlar, doğal tipteki FDHs ile karşılaştırılmıştır. Spesifik aktiviteyi arttırmak amacıyla, Cys23Ser ve Phe285Ser mutasyonları gerçekleştirilmiştir. Seçilen pozisyonlar için daha küçük yan zincir ve eşdeğer olabilecek amino asit (Ser) seçilmiştir. Formata karşı spesifik

aktivitede 1.7-kat artış gözlemlenmiştir. Ancak, NAD<sup>+</sup> ve format için FDH'in *KM* değerinde artma bildirilmiştir. *Cb* FDH için bir diğer çalışmada, Asp195, Tyr196 ve Lys356-379 pozisyonları hedef alınmıştır Rozzell (2004). NADP<sup>+</sup>'ye karşı daha aktif olan mutantlar elde edilmiş ancak format ve koenzim için *KM* değerleri hakkında herhangi bir bilgi rapor edilmemiştir. *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) FDH için aynı *Cb*'deki aynı pozisyonlar farklı amino asitler ile değiştirildiğinde koenzim seçiciliği NAD<sup>+</sup>'den NADP<sup>+</sup>'ye değişmiştir Serov (2002). Koenzim seçiciliğinde NAD<sup>+</sup>'den NADP<sup>+</sup>'ye değişiklik için *Pseudomonas sp.*101 (*Pse*) FDH içinde mutasyonlar gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar patentlenmiştir. *Paracoccus sp.*12-A organizmasından elde edilen FDH için, benzer amaçla Glu141Gln, Glu141Asn mutasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir mutasyon, enzimin formata karşı *kcat*'inde ortalama 5-kat bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir Shinoda (2005). *Pse*'dan elde edilen FDH'da aktivite artırmak için Cys145Ser(Ala) tek ve Cys255Ala(Ser) ile beraber mutasyonlar oluşturulmuş, ancak kinetik değerlerde bir değişiklik rapor edilmemiştir Tishkov (2006). *Pse* FDH enzimi için, 184, 228, 131, 160, 184, 228, pozisyonlarındaki amino asitler Ala ile değiştirilmiş ancak doğal tipteki *Pse* FDH enzimi ile aynı kinetik değerler elde edilmiştir Tishkov ve Popov (2006).

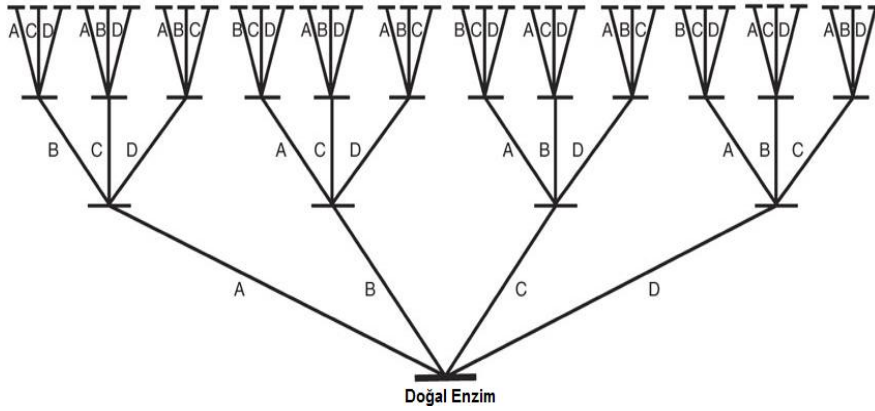
*Candida methylca* (*Cm*) FDH'dan elde edilen FDH için Asp195 ve Asp221 Ser ile değiştirildiklerinde NAD<sup>+</sup> için aktivitesinde çok ciddi azalma, Thr169Val mutasyonu için formata karşı *kcat*'de 4-kat azalma, bu mutasyon Thr226Val mutasyonu ile beraber olduğunda ise kinetik değerlerde hiçbir değişiklik oluşmadığı bildirilmiştir (Karagüler vd. 2001; 2004). Aynı organizma için 13., 105., 147., 160., 187., 302. pozisyonlar için mutasyonlar daha fazla elektrostatik etkileşim için dizayn edilmiş ancak mutasyonlar tek başına yada ikili birkaç kombinasyonda formata karşı istenilen aktivite artırılamamıştır Ordu vd. (2013).

### **2.3. Kombine Aktif Bölge Doyurulmuş Test Tekniği: Alternatif Enzim Mühendisliği Tekniği**

NAD<sup>+</sup> bağımlı FDH enzimin aktivitesini artırmak amacıyla yapılan tüm bu mutasyonlar, rasyonel tasarım stratejisi ile bölge yönlendirilmiş mutagenesiz tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde, 2002 yılına kadar, NAD<sup>+</sup> bağımlı FDH enzimin aktivitesini arttırmak için yönlendirilmiş evrim yada yarı-rasyonel tasarım stratejisi ile elde edilmiş mutant NAD<sup>+</sup> bağımlı FDH enzimler bildirilmemiştir. Yönlendirilmiş evrim yada yarı-rasyonel tasarım stratejilerinin enzimlere uygulanmasında, ilgili enzim için oluşturulacak mutant kütüphanesini tarayacak etkin ve verimli bir tarama tekniğinin geliştirilmiş olması son derece önemlidir Dalby, 2007; Reetz, 2013). 2002 yılında F. H. Arnold, NAD(P)<sup>+</sup> bağımlı dehidrogenazlar için geliştirilmiş mutant kütüphanesinden aktif mutantları renk değişimi ile belirleyen bir tarama tekniği geliştirdiğini rapor etmiştir Mayer ve Arnold (2002). Ancak bu bildirimle rağmen,

şimdiye kadar NAD<sup>+</sup> bağımlı FDH enzimlerin aktivitesini arttırmak amacıyla uygulanmış yönlendirilmiş evrim ya da yarı-rasyonel tasarım stratejisi bildirimlerine literatürde rastlanılmamıştır.

Özellikle yarı-rasyonel tasarım stratejilerinden Tekrarlayan Doyurulmuş Mutagenезler (ISM) metodu, ilgili enzim için etkili ve verimli bir tarama tekniğinin varlığında hedef enzimi geliştirmek için çok kullanışlıdır (Şekil 2). Reetz ve Carballeira (2007). ISM, ilgili enzimin sadece fonksiyonel olduğu belirlenmiş yada tahmin edilen amino asit(ler)in pozisyon(lar)ına odaklanır. Yönlendirilmiş evrim, diğer teknikler ile karşılaştırıldığında; sayıca daha az amino aside yoğunlaşması nedeniyle; ISM'le elde edilen mutant kütüphanesi daha küçük ve fonksiyonel mutantlar açısından daha kalitelidir. ISM, enzime ait yapısal bilgileri kullanmasıyla rasyonel tasarım, mutant kütüphane oluşturmasıyla yönlendirilmiş evrim olup; toplamındaysa daha az iş ve daha kaliteli mutantlara götüren tekniği ile her iki temel yöntemin başarılı bir birleşimidir. Bunun için, kombine aktif bölge doyurulmuş test (CAST) tekniğini kullanır. İlgilenilen pozisyon ya da bölge, enzimde oluşturulmaya çalışılan hedef özelliğe katkı sunduğu düşünülerek seçilir. Doğru pozisyonu ya da bölgeyi seçmek amacıyla; hesapsal modelleme ile elde edilecek bilgi ve ilgili enzimle ilgili gerçekleştirilen literatür çalışmaları referans alınır Reetz vd. (2005).



**Şekil 2.** CAST tekniğinin şematik gösterimi Reetz ve Carballeira (2007).

Aday A, B, C ve D isimli bölgelerin an az 2 amino asit içerdikleri düşünülerek; PCR'ın her döngüsünde yeni mutantlar elde edilirken aktivite artar. Hedef enzim elde edilinceye kadar PCR döngüsü sürdürülür.

Son yıllarda, ISM'in enzimlere uygulanmasıyla, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı çok sayıda farklı enzim elde edilmiştir (Reetz vd. 2005; 2010; Ba vd., 2013; Martinez vd., 2013; Parra vd., 2013; Valetti ve Gilardi 2013).

2002 yılında, NAD(P)<sup>+</sup> bağımlı dehidrogenaz enzimleri için oluşturulmuş mutant kütüphanesinden hedef enzimi seçmek için kolorimetrik tarama tekniğinin geliştirildiği rapor

edilmiştir Mayer ve Arnold (2002). Etkili ve verimli bir tarama tekniği, yönlendirilmiş evrim stratejileri için vazgeçilmezdir. Bu tarama tekniğine rağmen, NAD+ bağımlı FDH için spesifik aktiviteyi arttırmak amacıyla yapılmış yönlendirilmiş evrim çalışmalarına literatürde rastlanılmamıştır. FDH için aday amino asit pozisyonlarını hedef alan ve hedef amino asit değişiminin dejeneratif kodonla sınırlandırılmasıyla, daha az mutant koloni ile hedef FDH'ın elde edilmesi mümkündür.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Cihazlar

Projede kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Firma	Model
PCR	Techne	Prime
Otoklav	Nüve	NB-1045
Su banyosu	Thermo Scientific	Microprocessor Controlled 280
Pipetler	CAPP	KF10751-10752
Mikrosantrifüj	Sigma	1-16 K
Soğutmalı santrifüj	Hettich	Rotina 380 R
Hassas terazi	AND	HR-250 AZ
Kaba terazi	RADWAG	WTB 2000
Sonikatör	BANDELIN	HD 2070
Plate okuyucu	BioTek	ELx808
Çalkalamalı inkübatör	N-BIOTEK	NB-205 L
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-pharma Spec 1700
pH metre	HANNA	H1221
-80 °C buzdolabı	New Bruswick Scientific	U40 Premium
-20 °C buzdolabı	SANYO	MDF-U333
4 °C buzdolabı	VESTEL	ECOFLEX

### 3.2. Enzimler

Proje kapsamında kullanılan enzimler Tablo 3’de verilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan enzimler

<b>Enzim</b>	<b>Firma</b>	<b>Konsantrasyonu</b>
<i>Dpnl</i>	NEB	20,000 units/ml
Phusion <i>Taq</i> polimeraz	NEB	2,000 units/ml
Lizozim	Serva	100,000 units/ml

### 3.3. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Proje kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.

<b>Kimyasal Maddeler/Malzemeler</b>	<b>Firma</b>
Tripton	Lab M
Maya ekstratı	Lab M
NaCl	Merck
Agar	Merck
Agaroz	Serva
CaCl <sub>2</sub>	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Merck
Glükoz	Lab M
NAD+	Sigma-Aldrich
Sodyum format	Sigma-Aldrich
Tris-base	Formedium
HCl	Sigma-Aldrich
İmidazol	Serva
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck



### 3.4. Primerler

Proje kapsamında kullanılan *Cm* FDH enzimini kodlayan gen üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerleri Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 5.** Hedef aminoasit pozisyonları için tasarlanan primerler.

Primer Adı	Baz Sırası
N119F	5'-GGAAGTTACAGGTTCTNRTGTTGTCTCTGTTGC-3'
N119R	5'-GCAACAGAGACAACAYNAGAACCTGTAACCTCC-3'
R258F	5'-GGTTAGTCAATACCGCANRTGGTGCTATTTGTGTTGC-3'
R258R	5'-GCAACACAAATAGCACCAYNTGCGGTATTGACTAACC-3'
H311F	5'-GGTAATGCCATGACTCCTNRTTACTCTGGTACTACTTTAGACGC-3'
H311R	5'-GCGTCTAAAGTAGTACCAGAGTAAYNAGGAGTCATGGCATTACC-3'
P68F	5'-CTGATATTATCATCACCCTNRTTTCCATCCTGCTTATATCAC-3'
P68R	5'-GTGATATAAGCAGGATGGAAAYNAGTGGTGATGATAATATCAG-3'
F69F	5'-CTGATATTATCATCACCCTNRTCATCCTGCTTATATCAC-3'
F69R	5'-GTGATATAAGCAGGATGGAAAGGAYNAGTGGTGATGATAATATCAG-3'
V93F	5'-CGTTGTCGCTGGTNRTGGTTCTGATCACATTG-3'
V93R	5'-CAATGTGATCAGAACCAYNACCAGCGACAACG-3'
G94F	5'-CGTTGTCGCTGGTGTTNRTTCTGATCACATTG-3'
G94R	5'-CAATGTGATCAGAAYNAACACCAGCGACAACG-3'
V123F	5'-GGTTCTAATGTTGTCTCTNRTGCTGAACACGTTGTC-3'
V123R	5'-GACAACGTGTTTCAGCAYNAGAGACAACATTAGAACC-3'
I175F	5'-GGTGCTGGTAGANRTGGTTACAGAGTCTTGG-3'
I175R	5'-CCAAGACTCTGTAACCAYNTCTACCAGCACC-3'

**Tablo 6.**Dizilemede kullanılan primerler.

Primer Adı	Baz Sırası
pOE-2F	5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3'
pOE-2R	5'- GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'

### 3.5. Kullanılan Suşlar

Proje kapsamında ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* suşları Tablo 8'da verilmiştir.

**Tablo 7.** Kullanılan suşlar.

Tür	Suş	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)Star	Expresyon hücresi

### 3.6. Sıvı ve Katı Besiyerleri

**Luria-Bertani (LB) Besiyeri:** 10.0 g bakto-tripton, 5.0 g maya ekstrağı ve 10 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda (dH<sub>2</sub>O) çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilir.

**Luria-Bertani Agar (LB-Agar) Besiyeri :** 10.0 g bakto-tripton, 5.0 g maya ekstrağı ve 10 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda (dH<sub>2</sub>O) çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp üzerine 15 g agar eklenip 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilir.

**SOC besiyeri :** 20.0 g bakto-triptofan, 5 g maya ekstratı, 0.58 g NaCl (son konsantrasyonu 10 mM), 0.186 g KCl (son konsantrasyonu 2.5 mM) yaklaşık 990 mL saf suda (dH<sub>2</sub>O) çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilir. Daha sonra üzerine filtreden geçirilerek steril edilmiş 10 mL MgSO<sub>4</sub> çözeltisi (son konsantrasyon 10 mM) ve filtreden geçirilerek steril edilmiş 10 mL glukoz çözeltisi (son konsantrasyon 20 mM) eklenir.

### 3.7. Çözeltiler ve Tamponlar

#### 3.7.1. Substrat, Tarama ve Enzim Aktivitesi Tayini için Kullanılan Çözeltiler

**Reaksiyon çözeltisi (4mM)** : 27.42 mg  $\text{NAD}^+$  tartılarak 10 mL 50mM Tris-HCl (pH 8.0) da iyice çözündürülür.

**Substrat çözeltisi (40 mM)** : 54.4 mg sodyum format tartılarak 20 mL 50mM Tris-HCl (pH 8.0) da iyice çözündürülür.

**Tris-HCl çözeltisi (50 mM)** : 3.03 g Tris-base tartılarak yaklaşık 470 mL otoklavlanmış suda çözündürülür. Üzerine hedef pH'lar olan pH 7.0-7.5-8.0-9.0 görülene kadar konsantre HCl eklenir ve çözeltinin son hacimi 500 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

**Sodyum Asetat çözeltisi (50mM)**: 2.05 g Sodyum asetat 470 mL otoklavlanmış suda çözündürülür. Üzerine hedef pH'lar olan pH 4.0-5.0-5.5-6.0 olana kadar asetik asit eklenir ve çözeltinin son hacimi 500 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

**Glisin çözeltisi (50mM)**: 2.43 gr glisin 470 mL otoklavlanmış suda çözündürülür. Üzerine hedef pH'lar olan pH 9.5-10.5-11.5 olana kadar NaOH ilave edilir ve çözeltinin son hacimi 500 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

#### 3.7.2. Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

**Liziz tamponu (Lysis Buffer)** : 2.76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3.508 g NaCl, 0.136 g imidazol tartılarak yaklaşık 170 mL otoklavlı suda çözündürülür NaOH ile pH'ı 8.0 a ayarlanır ve daha sonra çözeltinin son hacmi 200 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

**Yıkama tamponu (Wash Buffer)** : 2.76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3.508 g NaCl, 0.272 g imidazol tartılarak yaklaşık 170 mL otoklavlı suda çözündürülür NaOH pH'ı 8.0 a ayarlanır ve daha sonra çözeltinin son hacmi 200 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

**Elüsyon tamponu (Elution Buffer)** : 2.76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3.508 g NaCl, 3.4 g imidazol tartılarak yaklaşık 170 mL otoklavlı suda çözündürülür NaOH pH'ı 8.0'a ayarlanır ve daha sonra çözeltinin son hacmi 200 mL olacak şekilde otoklavlı suyla tamamlanır.

#### 3.7.3. Kompetent Hücre Hazırlanılmasında Kullanılan Çözeltiler

**Solüsyon A (0.02 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,08 M  $\text{MgCl}_2$ )** : 0.176 g  $\text{CaCl}_2$  ve 0.975 g  $\text{MgCl}_2$  tartılarak yaklaşık 50 mL otoklavlı suda çözündürülür. Daha sonra çözeltinin son hacmi 60 mL olana kadar otoklavlı su eklenir.

**Solüsyon B (0.1 M CaCl<sub>2</sub>)** : 0.882 g CaCl<sub>2</sub> tartılarak yaklaşık 50 mL otoklavlı suda çözündürülür. Daha sonra çözeltinin son hacmi 60 mL olana kadar otoklavlı su eklenir.

#### 3.7.4. Diğer Çözeltiler

**Ampisilin Çözeltisi (100 mg/mL)** :1 g ampisilin yaklaşık 9 mL otoklavlı suda çözündürülürve son hacim 10 mL olacak şekilde otoklavlı su eklenir, 0.22 mikron filtreden geçirilir.

**IPTG çözeltisi (1M)** : 2.38 g IPTG yaklaşık 8 mL otoklavlı suda çözündürülür ve son hacim 10 mL olacak şekilde otoklavlı su ile tamamlanır, 0.22 mikron filtreden geçirilir.

### 4.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 4.1. Mutasyon Çalışmaları

##### 4.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi

pQE-2 vektörüne klonlanmış mutant (Gln105Arg) *Cm* FDH genini içeren His-Tag'lı taşıyıcının gliserol stok kültüründen, 20 µg/mL ampisilin LB agar besiyeri içeren Petri plate öze yardımıyla ekim yapıldı. 37 °C'de sıcaklıkta gece boyunca büyütüldü. Büyütülen hücrelerden pipet ucu ile tek koloni alınıp ampisilinli LB sıvı besiyerine (5 µg/mL) ekim yapılarak 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde gece kültürü hazırlandı.

##### 4.1.1.1. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu, plazmid DNA izolasyon kiti (Agilent) kullanılarak yapıldı.

- 5 mL gece kültürü, 13000 x rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Eppendorf tüp ters çevrilip, kağıt havlu üzerine bastırılarak tüpte kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
- Bakteri pelletinin üzerine 100 µL solüsyon 1 eklenip pipetaj yapılarak hücreler tamamen çözündürülür.
- Çözündürülen örneklerin üzerine 100 µL solüsyon 2 eklendikten sonra tüpler 4-6 kez alt-üst edildi.
- 125 µL solüsyon 3 eklendikten sonra tüpler yine 4-6 kez alt-üst edildi.
- Elde edilen bakteriyal lizat 13000 x rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant, 2 mL'lik eppendorf tüpün üzerine konulmuş olan minikolon tüpü içine boşaltılarak 13000 x rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. 2 mL'lik eppendorf tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Mini kolon tüpünün üzerine 750 µL "nuclease removal" çözeltisi eklenerek 13000 x rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. 2 mL'lik eppendorf tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolon tüpünün üzerine 750 µL 1x wash buffer eklenerek 13000 x rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. 2 mL'lik eppendorf tüpüne geçen sıvı uzaklaştırılır.
- Mini kolon tüpünü boş şekilde 13000 x rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. 2 mL'lik eppendorf tüpünde arta kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolon tüpü steril 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne yerleştirilir ve mini kolon tüpüne 50 µL "elution buffer" (EB) eklenerek 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra 13000 x rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek plazmid DNA çözeltisi elde edildi.

#### 4.1.2. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna göre yapıldı (Maniatis vd. 1989). Klonlama işlemleri için BL21(DE3) Star suşundan agarlı LB besiyeri plateye ekim yapılarak 37 °C'de 16 saat boyunca bekledi.

- Platede büyütülen hücrelerden tek koloni alınarak 3-5 mL LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 16 saat boyunca büyütüldü.
- Büyütülen kültürden 2 mL alınarak 100 mL LB besiyeri içeren erlen içerisine eklendi ve 37 °C çalkalamalı inkübatörde 600 nm'deki optik yoğunluğu 0.4-0.6 olana kadar bekletildi.
- Optik yoğunluğu istenilen değere ulaşan hücre kültürü 50 mL'lik steril falkon tüplere konularak 10 dakika buzda bekletildi.
- Daha sonra bekletilen tüpler 4 °C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı tüplerden uzaklaştırıldı.
- Tüp içerisinde kalan hücre peleti üzerine 30 mL soğuk A solüsyonu eklendi ve hücre peleti iyice pipetaj yapılarak süspansiyon haline getirildi.
- Süspanse edilen tüpler 4 °C'de 4000x rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı tüplerden uzaklaştırıldı.
- Tüp içerisinde kalan hücre peleti üzerine 2 mL B solüsyonu eklendi ve %15'lik gliserol eklenerek hücre peleti iyice pipetaj yapılarak süspansiyon haline getirildi.

- Süspansiyon haline getirilmiş hücreler 50-100 µL hacminde steril eppendorf tüplere konularak -80 °C'de saklandı.

#### 4.1.3. Transformasyon

- Eppendorf içinde bulunan BL-21 kompetent hücrelerine 1 µL *DpnI* ile kesilen PCR ürününden 5 µL eklenip, 30 dakika buzda bekletildi.
- Daha sonra plazmidin hücre içine girmesi için tüpler 30 saniye 42 °C'de su banyosu içerisinde bekletildi.
- Su banyosunda bekletilen tüpler hemen buza alınarak 2-3 dakika beklendi ve daha sonra bu tüplerin içerisine 250 µL SOC besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 1 saat beklendi.
- Bekletilen örneklerden 100 µL alınarak ampisilinli LB agar plate (20µg/ml) yayma ekim yapıldı ve 37 °C'de 16 saat beklenerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

#### 4.2. Kalıp Plazmidin Dizi Analizi

Ampisilin içeren LB agar besiyerine ekilip büyütülen koloniler seçildi ve 15 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de büyütülüp gece kültürü yapıldı. Hazırlanan gece kültürlerinden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmidler, dizi analizi yapılmak üzere gönderildi.

DNA dizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) sayfasında kayıtlı olan yabancı tip *Cm* FDH ile (NCBI No: X81129) karşılaştırılmıştır (NCBI, 2015).

#### 4.3. *Candida methylica* (*Cm*) mutant format dehidrogenaz'ın yeniden modellenmesi ve CAST için aday amino asit pozisyonlarının belirlenmesi

NAD<sup>+</sup> bağımlı *Candida methylica* (*Cm*)'dan izole edilmiş ve ısıl kararlılığı arttırılmış mutant (Gln105Arg) format dehidrogenaz (FDH)'in (Ordu vd. 2013) yapısının belirlenmesi için homoloji modellemesi kullanıldı. Homoloji modellemesinde, üç boyutlu yapısı (3D) bilinen ve *Cm* FDH ile yüksek sekans benzerliği nedeniyle Protein Data Bank (PDB)'da (PDB erişim numarası: 2FSS) olan *Candida boidinii* FDH (*Cb* FDH) kalıp olarak kullanılmıştır (Chenna vd. 2003; Protein Data Bank, 2014). Homoloji ile tahmin edilen *Cm* mutant FDH'ye ait yapının belirlenmesi için, AMBER moleküler dinamik programı uygulandı Case vd. (2008).

Protein Data Bank'ta kayıtlı NAD<sup>+</sup> bağımlı FDHs'in yapıları incelendi (Protein Data Bank 2014), literatür çalışmalarından ve farklı kaynaklardan FDH'a ait dizilerin karşılaştırma sonuçları analizi edilerek *Cm* FDH enziminin katalitik bölgesini oluşturan amino asit pozisyonları belirlendi. Enzimin aktif bölgesini oluşturduğu yada katalitik aktivitesinde etkili olabileceği tahmin edilen Thr67, Phe69, Gly92, Val93, Gly94, Asp96, Arg258, Gln287, His311 dokuz (9) amino asit, ISM yönteminin CAST tekniği için aday amino asitler olarak seçildi.

#### 4.3.1. Aday amino asit pozisyonları için dejeneratif kodon seçimi ve primer tasarımı

Elde edilen Thr67, Phe69, Gly92, Val93, Gly94, Asp96, Arg258, Gln287, His311 dokuz (9) aday amino asit pozisyonu için mutant kütüphanesi oluşturmak amacıyla dejeneratif kodon olarak NRT seçildi. NRT dejeneratif kodonu ile Arg, Asn, Asp, Cys, Gly, His, Ser, Tyr amino asitlerinden birini gelişigüzel seçerek aday amino asit pozisyonları için kodlamaktadır. NRT dejeneratif kodonun stop kodonu içermemesi ve bütün NRT dejeneratif mutant kombinasyon ihtimallerinin oluşması için daha az sayıda koloni gerektirmesi nedeniyle tercih edilmiştir (Reetz ve Carballeira 2007; Binay, 2010).

**Tablo 8.** NRT dejeneratif kodonunun kodladığı amino asitler

<b>Arjinin</b>	<b>Glisin</b>
<b>Asparajin</b>	<b>Histidin</b>
<b>Aspartik Asit</b>	<b>Serin</b>
<b>Sistein</b>	<b>Tirozin</b>

#### 4.3.2. Tasarlanan dejeneratif kodonlu primerler ile PCR

pQE-2 vektörüne klonlanmış ısıl kararlılığı olan mutant (Gln105Arg) ile kazandırılmış *Cm*FDH genini içeren plazmid ve seçilen pozisyonlarda mutasyon yapacak primerler kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. PCR karışımı Tablo 9'da, PCR koşulları ise Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 9.** PCR bileşenleri.

Bileşen	Kullanılan miktar
5X HF buffer	5 µL
Primer karışımı (10 ng/µL)	1 µL
dNTP karışımı	1 µL
dH <sub>2</sub> O	42.25 µL
Plazmid DNA (50 ng/µL)	0.25 µL
Phusion Taq polimeraz enzimi	0.5 µL

**Tablo 10.** PCR koşulları.

Sıcaklık	Zaman	
98 °C	30 saniye	
98 °C	30 saniye	] 18 döngü
55 °C	1 dakika	
72 °C	6 dakika	
72 °C	5 dakika	
4 °C	+∞	

#### 4.4. Elde edilen mutant *CmFDH* gen(ler)'in çok fazla proteine dönüştürülmesi için; His-tag'li taşıyıcının kompetent hücreye taşınarak mutant kütüphanesinin oluşturulması

Elde edilen mutant *CmFDH* (ler)'i içeren His-tag'li ekspresyon taşıyıcısı, mutant *CmFDH*'ların proteine dönüştürülmesi için laboratuvarında hazırlanmış kompetent BL21(DE3)Star *E.coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi (Sambrook ve Russel 2001; Binay vd. 2009).



#### **4.5. Mutant kolonilerin tarama tekniği için hazırlanması ve elde edilen mutant kolonilere çok kuyucuklu mikro plakalarda tarama tekniğinin uygulanması**

Elde edilen mutant koloniler plateden daha önceden otoklavlanarak steril edilen kürdanlar yardımıyla 96 derin kuyucuklu mikro plakalara aktarıldı (Russel vd. 2001) ve üzerlerine ampilisin (20 µg/mL) içeren 400 µL LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C’de büyütüldü. Daha sonra büyütülen kültürden gliserol stok oluşturmak üzere her kuyucuğa 70 µL %85’lik gliserol (son hacim %20-25 arası olacak şekilde) eklendi ve bu plaka “ana plaka” olarak etiketlendi. 96 derin kuyucuklu mikro plaka, -80 °C’de muhafaza edildi (Binay, 2010).

Tarama tekniği uygulanmak üzere ana plaka üzerinden kopya plakalar aynı şekilde ampilisin içeren 400 µL LB sıvı besiyerinde, 37 °C’de büyütüldü. IPTG eklenerek protein indüksiyonu sağlandı. Daha sonra kültür santrifüjde 4000 rpm de 20 dakika çöktürülerek, üstte toplanan sıvı atılıp, içinde pellet olan plakalar -20 °C’de muhafaza edildi.

Tarama yöntemi 96 kuyucuklu mikro plakada üç set şeklinde uygulandı. Daha önceden -20 °C’de muhafaza edilen plakalardaki her kuyucuğun üzerine 400 µL Tris pH 8.0 tamponunda hazırlanan lizozim eklenerek pelletler çözüldü. Plakalar, oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra santrifüjde 4000x rpm’de 20 dakika çöktürüldü. Elde edilen parçalanmış hücreler ve kontrol olarak taşıyıcıyı içermeyen kompetent hücrelerden 50 µL alınarak yeni çok kuyucuklu mikro plakaya eklendi. Bu aşamada, Mayer ve Arnold (2002)’in geliştirdiği teknik mikro plakalara uygulanmıştır.

Alternatif tarama yöntemi olarak, FDH’in spesifik aktivitesi ölçme temelinde bir tarama tekniği uygulanmıştır. Aynı şekilde elde edilen parçalanmış hücreler ve kontrol olarak taşıyıcıyı içermeyen kompetent hücrelerden 50 µL alınarak; yeni çok kuyucuklu mikro plakaya eklenmiştir. Bu yöntemde mikro plakaya sırasıyla 50 µL NAD<sup>+</sup> çözeltisi (son konsantrasyon 1 mM NAD<sup>+</sup>) ve 100 µL substrat çözeltisi (son konsantrasyon 20 mM sodyum format) eklenerek 340 nm dalga boyunda 25 °C’de 10 dakika okuma yapıldı. Kontrolde (Q105R) mutasyonunu içeren kalıp FDH enzimi kullanılmıştır.

Renk değişimi gözlemlmek için; elde edilen çöktürme sonrası üst kısımda kalan süpernatant kısmından 50 µL alınıp üzerine Nitro Blue Tetrazolium (NBT) çözeltisi eklenerek (1 mg/mL NBT, 0.5 mg/mL fenazin metosülfat, 15 mM NAD<sup>+</sup>, and 40 mM fosfit) mikro plaka okuyucuda 580 nm’de 5 dakika boyunca okuma yapıldı.

#### 4.6. Elde edilen mutant kolon(ler)in stoktan büyütülmesi ve mutant *Cm* FDH(lar)'ı taşıyan rekombinant taşıyıcının dizilenmesi

Aktivite gösteren ve göstermeyen mutant koloni(ler), stoktan seçilerek ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde gece boyunca büyütüldü. Büyütülen gece kültürü santrifüjle çöktürüldü. Çöktürülen hücrelere plazmid ekstraksiyon kit protokolü uygulandı (Plazmid izolasyon kiti, Agilent). Elde edilen plazmid DNA örnekleri, mutant *Cm* FDH geni dizi analizi için gönderildi.

#### 4.7. Seçilen *Cm* FDH(lar)'ın saflaştırılması

- Kontrole göre yüksek aktivite gösteren mutant koloni(ler), -80 °C'de bulunan gliserol stoktan seçilerek ampisilinli LB sıvı besiyerinde 16 saat süresince büyütüldükten sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü.
- Çöktürülen hücrelerin üzerine 10 mL liziz tamponu eklenerek hücreler çözündürüldü.
- Daha sonra çözündürülmüş hücrelerin üzerine süspansiyonun yüzeyini kaplayacak kadar lizozim eklenerek 4 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
- Daha sonra bekletilen süspansiyon ultrasonikasyon yardımıyla 5 dakika parçalanmıştır. (20 sn açık/20 sn kapalı).
- Parçalanmış hücreler 11000x rpm'de 15 dakika çöktürülerek süpernatant kısmı steril bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant kısmın üzerine 1 mL Ni-NTA eklenip 30 dakika 4 °C'de bekletildi (Binay vd. 2013).
- Rotatordan alınan örnekler 1000 g de 1 dakika santrifüj edilerek üst kısmı steril eppendorfa alındı.
- Alt kısımda kalan Ni-NTA kısmın üzerine 1 mL yıkama tamponu (wash buffer) eklendi ve 1000 g de 1 dakika santrifüj edilerek üst kısmı yine steril bir eppendorf tüpe alınır. Bu işlem 3 kere tekrar edildi.
- Altta kalan kısım üzerine 1 mL elüsyon tamponu (elution buffer) eklenerek örnek yavaş bir şekilde birkaç kez alt-üst edildi.
- Daha sonra örnek 1000 g'de santrifüj edilerek üst kısımda kalan enzim steril bir tüpe alınarak enzim örneklerinin saflıkları sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile kontrol edildi (Schägger ve von Jagow 1987) (Şekil.6).

#### 4.8. Protein Tayini

Protein tayini yöntemi BCA protein kiti kullanılarak tayin edildi (SERVA)

#### 4.9. Elde edilen mutant *Cm* FDH için kısmi karakterizasyon

Yüksek aktiviteli mutant *Cm* FDH enziminin katalizlediği reaksiyon için en iyi pH belirlendi. Spesifik aktivite için çeşitli tampon çözeltilerde hazırlanan NAD<sup>+</sup> ve sodyum formata karşı üç set şeklinde 96 kuyucuklu mikro plakalarda, 340 nm dalga boyunda 10 dakika boyunca ölçüm alındı. Ölçüm 1 mM NAD<sup>+</sup>, 20 mM sodyum format ve yüksek saflıkta enzim ile NADH oluşumu gözlemlenerek gerçekleştirildi. Tampon çözeltiler olarak asetat tamponu (pH 4.0 - 5.0 - 5.5 - 6.0), tris tamponu (pH 7.0 - 8.0 - 9.0) ve glisin tamponu (pH 9.5 - 10.5 - 11.5) kullanıldı.

#### 4.10. Elde edilen saflaştırılmış mutant *Cm* FDH(lar) ile seçilen substratlara karşı kinetik çalışmaları

Saflaştırılmış olan yabanıl tip ve mutant *Cm* FDH enzimi için kinetik ölçümler NAD<sup>+</sup> ve sodyum formata karşı üç set şeklinde 96 kuyucuklu mikro plakalarda, 340 nm dalga boyunda yapıldı. NAD<sup>+</sup>'a karşı yapılan ölçümler için kuyucuklara değişik konsantrasyonlarda (0-20 mM) NAD<sup>+</sup>, 20 mM sodyum format ve yüksek saflıkta enzim eklenerek 340 nm'de NADH oluşumu gözlemlenerek yapıldı. Sodyum formata/NAD<sup>+</sup>'a karşı yapılan ölçümler için kuyucuklara değişik konsantrasyonlarda sodyum format 40 mM'a kadar/1mM NAD<sup>+</sup> varlığında, 8 mM'a kadar farklı konsantrasyonlarda NAD<sup>+</sup>/10mM sodyum format varlığında ve yüksek saflıkta enzimle 340 nm'de gerçekleştirildi. Tampon çözelti olarak, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği tampon çözelti ve pH seçildi. Elde edilen değerler, substrat konsantrasyonlarına karşı grafik oluşturularak, Grafit programıyla *k<sub>cat</sub>* ve *K<sub>M</sub>* hesaplandı (Grafit, 2001; Binay vd. 2009; 2013).

#### 4.11. Elde edilen en iyi mutant *Cm* FDH'in moleküler dinamik ile yüksek başarılı bilgisayarlar da modellenmesi

Kinetik ölçümleri yapılmış en iyi mutant *Cm* FDH için yer değiştiren amino asit pozisyonu ve rotamer tercihleri için moleküler grafik ve modelleme programı AMBER kullanıldı (Case vd. 2008). *Cm* FDH'in yapısının üç boyutlu modellenmesi için SWISS-MODEL programı kullanıldı (<http://swissmodel.expasy.org/>). Modellenmiş *Cm* FDH'in aktif bölgesi içindeki format molekülü (formatı analoğu azit kullanılmıştır) Swiss-Pdb Viewer ile Amber ff99SB kuvvet alanı kullanılarak oda sıcaklığı ve 1 bar basınç koşulları altında moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi Case ve ark. (2001). Burda kullanılan en iyi

mutant *Cm* FDH, *Cb* FDH'in kalıp olarak kullanılmasıyla homoloji modellemesinin uygulanmasıyla elde edilen yapıdır. Ancak en iyi mutant *Cm* FDH'in substrat yanaşması ve "docking" aşamasında, format ile beraber koordinant verilerinin derlenmiş olması nedeniyle *Pseudomonas sp.101 (Pse)* FDH (PDB erişim kodu: 2GUG) yapısı substrat yerleştirmede ve "docking" kısmında tercih edilmiştir. *Cm* FDH ve *Pseudomonas*'in dizisinin hizalanması ClustalW (Larkin vd. 2007) programı ile yapıldı. Çoklu model yapısı ve sıkı protein yapısı kalite değerlendirilmesi PROSA II (Sippl vd. 1993), PROFILER\_3D (Bowie vd. 1991) ve PROCHECK (Laskowski vd. 1996) programları kullanılarak yapıldı. Mutasyona uğramış pozisyondaki yan-zincir konformasyonlarının tahmini yan zincir rotamer kütüphaneleri içeren program kullanılarak yapıldı.

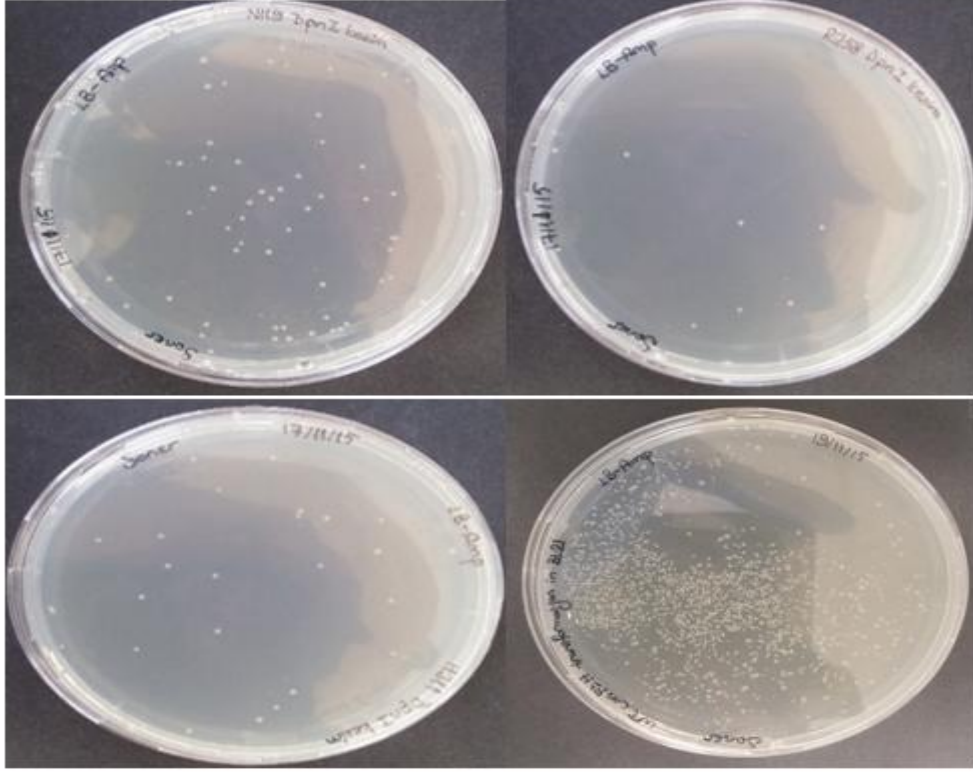
## 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

### 5.1. Rekombinant plazmitin saflaştırılması ve kalıp *fdh* geninin dizilenmesi

Bekleme sonrası Petri platelerde çok sayıda koloni gözlemlendi. Bu kolonilerden büyütülerek elde edilen hücre kültüründen, plazmid başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Kalıp olarak kullanılacak *fdh* genini içeren plazmidler için elde edilen dizi sonuçları karşılaştırıldığında, protein ifadesine ısı kararlılık veren mutasyonu (Q105R) içerdiği ve başka mutasyon içermediği gözlemlenmiştir.

### 5.2. Kütüphanenin oluşturulması ve taranması

Mutasyon için kurulan PCR'lardan elde edilen ürünler taşıyıcı hücrelere aktarıldıktan yaklaşık 16 saat sonra 37 derecedeki Petri platelerde koloniler gözlemlendi. (Şekil 3). Ancak her plate de ortalama 20-50 koloni olması nedeniyle, elde edilen koloni kütüphanesinin sayıca çok zengin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle NRT dejeneratif kodonun kodlama ihtimali olan sekiz (8) amino asit kombinasyonunun tümünün elde edilmesi zor görünmektedir.



**Şekil 3.** Transforme olmuş hücrelerin petri platede büyümüş hallerine örnekler.

Elde edilen kolonilere, kontrol olarak kullanılan yabancı tip/doğal tip ve önceden tasarlanmış ısıl kararlılığı olan FDH'ı taşıyan hücrelere Arnold ve May (2002) tarafından rapor edilen protokol uygulanmış ancak çalıştırılmamıştır. Buna neden olarak yeterli protein konsantrasyonu ve ışıklı ortam nedeniyle boyaların çok çabuk redoks reaksiyonuna uğramaları düşünülmüştür.

Alternatif yöntem olarak; çok kuyucuklu mikropalakada, her örnek için NADH oluşumu gözlemlenerek benzer kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Bu yöntemin uygulanması sonucunda, kontrole göre daha aktif 3 örnek görülmüştür. Bu örneklerle ait hücre kültürlerinden dizilenmek üzere plazmitler saflaştırılmıştır.

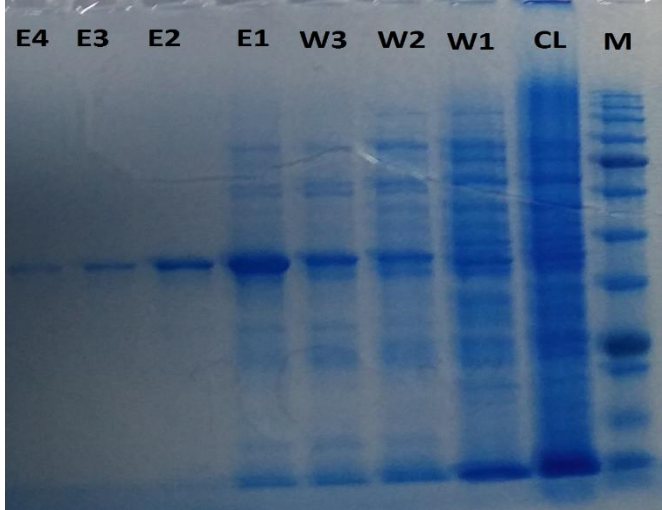
Dizileme sonucu sadece 119. pozisyonda bir mutant, 258 ve 311. pozisyonlarda ise sessiz mutasyonlar gözlemlenmiştir (Tablo.11). Diğer aday amino asit pozisyonlarından herhangi bir mutasyon yada aktif koloniye rastlanılmamıştır.

**Tablo 11.** Dizileme sonucu tespit edilen baz ve amino asit değişimleri.

FDH tipi	DNA Pozisyon	Amino asit pozisyon	DNA Dizi	Amino asit	Mutasyon
Yabani Tip	355-356-357	119	AAT	Asparajin	-
mutant(B11)	355-356-357	119	CGT	Arjinin	<b>N--R</b>
Yabani Tip	772-773-774	258	AGA	Arjinin	-
mutant(D1)	772-773-774	258	CGT	Arjinin	<b>N--N</b>
Yabani Tip	931-932-933	311	CAC	Histidin	-
mutant(H4)	931-932-933	311	GTG	Histidin	<b>H--H</b>

119. pozisyonda asparajin yerine daha büyük ve bazik yüklü arjinin gelmiştir. Arjinin büyük yan zinciri ile aktif bölgedeki boşlukların çözelti ile dolması (bağ kurmasını) engellediği için, bu bölgeyi oluşturan katalitik amino asitler, substratlar ile daha çok bağ kurma ve daha hızlı hidrit (H<sup>+</sup>) transferini sağlamış olabilir. Sessiz mutasyonların daha fazla aktivite göstermesinin de, kodon tercihinde iyileşmeye yol açması nedeniyle, daha fazla protein ifadesi gerçekleşmiştir. Bu nedenle enzimin aktivitesinde iyileşme görülmüştür.

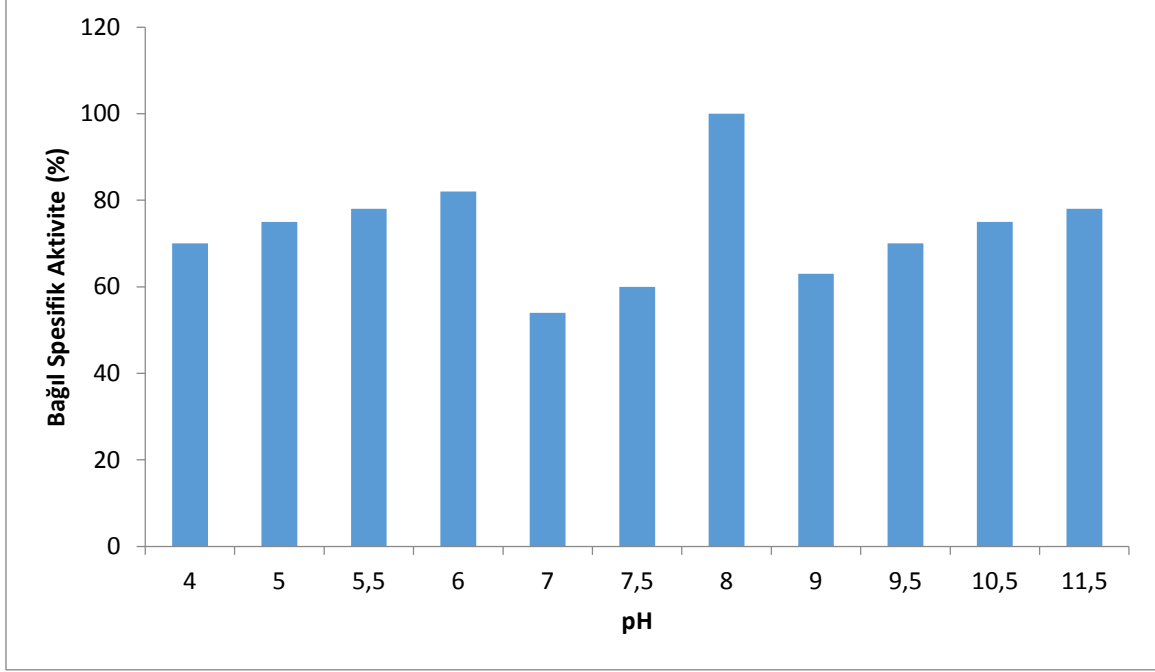
Ayrıca, FDH proteinleri de bu kültürlerden saflaştırılarak SDS-PAGE'de saflaştırılan örneklere ait SDS-PAGE resmi eklenmiştir (Şekil 4).



**Şekil 4.** Mutant FDH'in saflaştırılması aşamasında elde edilen örnekler ve gliserol stoğun jelde görünümü (Marker (240,165,125,93,72,57,42,31,24,18,15,8 kDa), CL: Ham lizat, W1-2-3: yıkama bufferi, E1-2-3-4: elüsyon fraksiyonları).

### 5.3. Elde edilen mutant *Cm* FDH için kısmi karakterizasyon

Mutant enzimi için aktivitesinin en yüksek olduğu Tris tamponu pH 8.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 5).

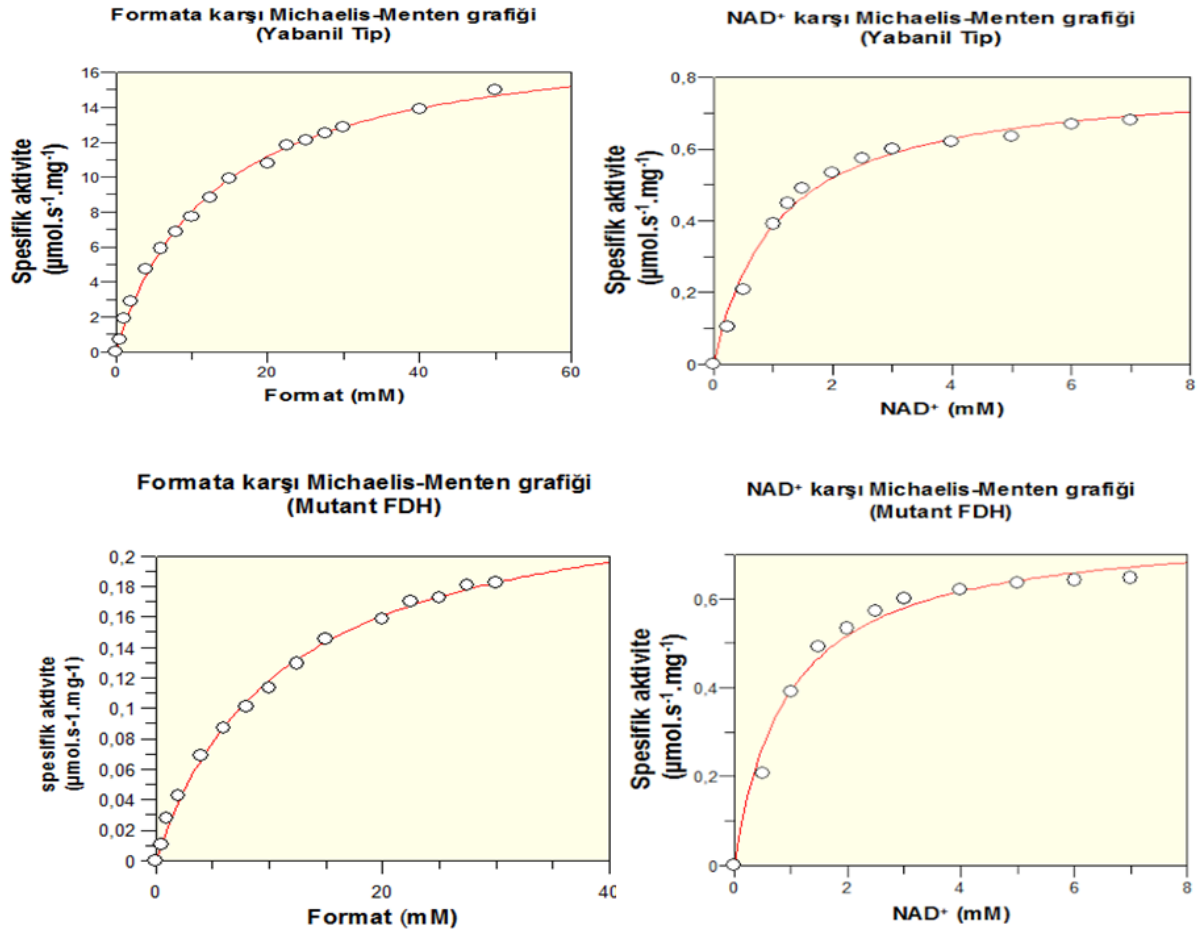


**Şekil 5.** Farklı pH değerlerinde mutant enzimin bağıl spesifik aktivitesi (pH 4.0-6.0; asetat, pH 6.0-9.0; Tris-HCl çözeltisi, pH 9.5-11.5; glisin çözeltisi).

Yabanıl tip ile kıyaslandığında mutant enzim için en iyi pH değerinin değişmediği görülmüştür. Katalitik bölgeyi oluşturan (H258, R311 gibi) amino asit pozisyonlarının aktivite için en iyi yönelmeyi ve pozisyonu yine bu pH'da sağlamış oldukları bilinmektedir. Polar N119'un yerine gelen yüklü arjinin amino asidi de fonksiyonel olabilmek (doğru pozisyonda ve yönelimde substrat ile etkileşim için) için yabanıl tip FDH'in ihtiyaç duyduğu en iyi pH değerine ihtiyaç duymuştur. Çünkü asparajin amino asidi, arjinine göre daha polar ve yan zinciri daha kısadır.

### 5.4. Elde edilen saflaştırılmış mutant *Cm* FDH ile seçilen substratlara karşı spesifik aktivite ve kinetik çalışmaları

Gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda yabanıl tip ve mutant enzim için ölçülen değerler, Michaelis-Menten grafiğinde aşağıdaki gibi gösterilmiştir.



Şekil 6. FDH enzimleri için elde edilen Michaelis-Menten grafikleri.

Gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Tablo.13 'de gösterilmiştir.

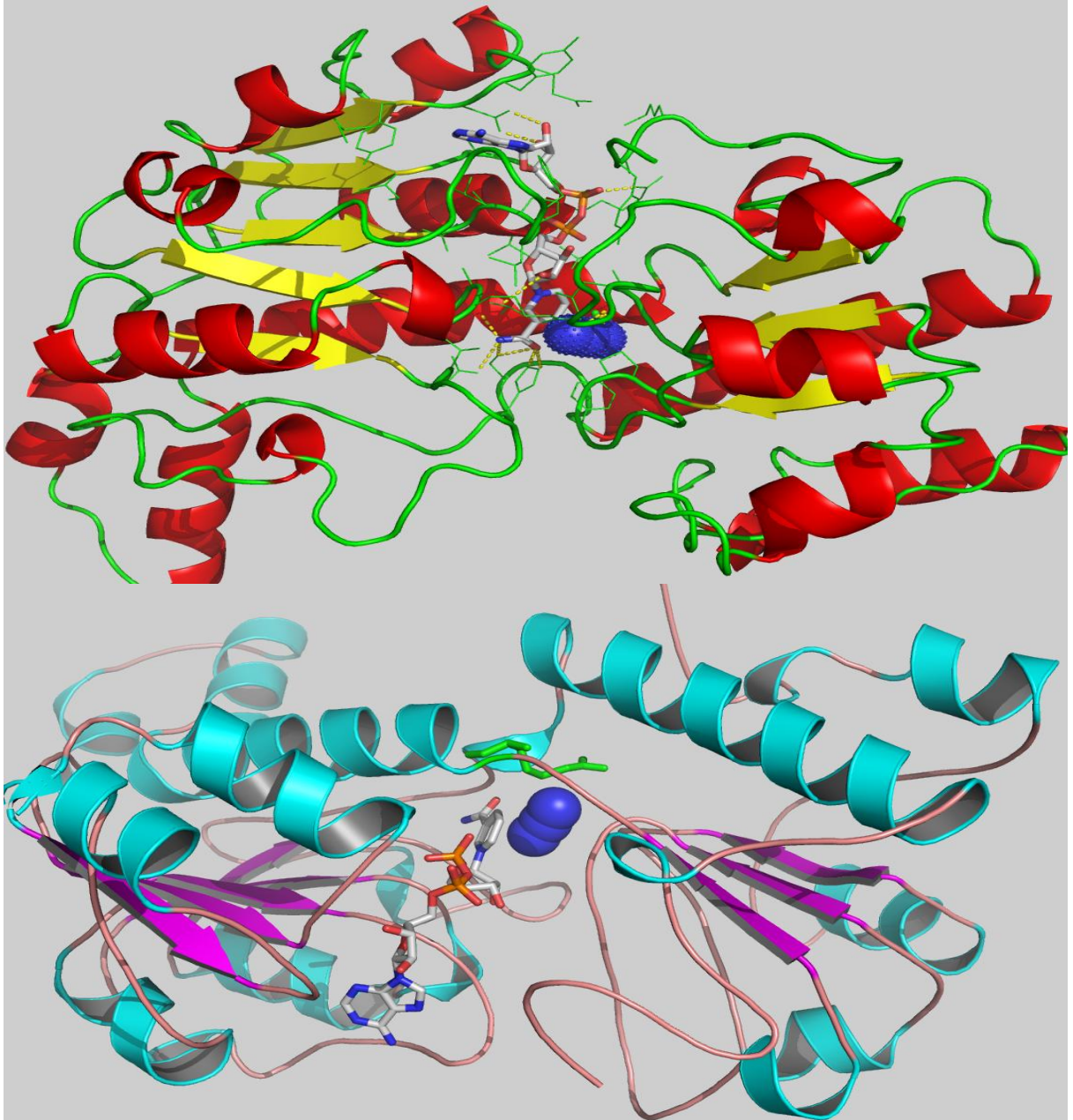
Tablo 12. Yabanil spesifik aktivitesi yüksek çıkan örnekler için kinetik değerler.

FDHs(Substrat)	<i>K<sub>M</sub></i> (mM)	<i>k<sub>cat</sub></i> (sn <sup>-1</sup> )	<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub></i> (sn <sup>-1</sup> /mM)
Yabanil tip (sodyum format)	13	17,96	1,38
Yabanil tip (NAD <sup>+</sup> )	1,082	50,67	46,83
Mutant (sodyum format)	11,20	24,21	2,20
Mutant (NAD <sup>+</sup> )	0,95	54,56	57,43



N119R mutant enzimi pozisyonu katalitik verim açısından yabancı tip FDH enziminden daha iyi olduğu görülmektedir. Spesifik aktivitede olduğu gibi, 119. pozisyonda asparajin yerine daha büyük ve bazik arjinin gelmiştir. Arjinin büyük yan zinciri ile aktif bölgedeki boşlukların çözelti ile dolması (bağ kurmasını) engellediği için, bu bölgeyi oluşturan katalitik amino asitler, substratlar ile daha çok bağ kurma ve daha hızlı hidrit (H<sup>+</sup>) transferini sağladığı tahmin edilmektedir.

##### 5.5. Yabancı tip FDH ve elde edilen en iyi mutant *Cm* FDH'ın moleküler dinamik ile yüksek başarılı bilgisayarlarda modellenmesi



**Şekil 7.** Yabancı tip (üstte) ve mutant (altta) *Cm* FDH'ın moleküler dinamik ile yüksek başarılı bilgisayarlarda modellenmesi sonucu elde edilen yapılar (Asn119: yeşil çubuk, NAD<sup>+</sup>: çok renkli çubuk, format analogu azit: mavi renkli küre).

Mutant enzimin başlangıç yapısını homoloji modellenmesi ile tahmin etmek için yüksek dizi benzerliği nedeniyle *Cb* FDH tercih edilmiştir. Ancak, homoloji modellenmesi ile optimize edilmiş mutant FDH enziminin katalitik bölgesine format yerleştirme(docking) için format ile beraber kristallendirilmiş olması nedeniyle *Pse* FDH kullanılmıştır. Yerleştirme sonucu elde edilen yapı tekrardan moleküler dinamik programı Amber ve *ff99SB* kuvvet alanı kullanılarak modellenmiştir.

Yabanıl tip FDH'in özellikle katalitik bölgesini oluşturan His311, Asn119 ve Arg238 pozisyonlarının substrat tanıma, yönlendirmede ve ürüne dönüşecek ara kompleksin oluşturulmasında fonksiyonel oldukları bilinmektedir (Labrou ve Rigden, 2001). Daha önceden rapor edilen bu bilgiyi, yabanıl tip *Cm* FDH'a göre kısmen daha aktif N119R mutanıtı doğrulamaktadır. 119. Pozisyondaki amino asit formik asit ve NAD<sup>+</sup> ile anahtar etkileşimler için fonksiyonel olduğu Asn119Arg için hesaplanan *k<sub>cat</sub>* ve *K<sub>M</sub>* değerlerinden anlaşılmaktadır. Bu etkileşimin Asn ve Arg amino asitlerine ait karboksilat molekül grubu üzerinden gerçekleştiği görülmektedir. Büyük yan zinciri nedeniyle, substratlara ev sahipliği yapan bölge daha az su ile dolması ve substratlar ile daha çok etkileşim nedeniyle, *K<sub>M</sub>* değerinde hem NAD<sup>+</sup> hemde format için iyileşmeye neden olduğu tahmin edilmektedir.

*k<sub>cat</sub>*'in daha yüksek çıkması, Arg119'a ait geniş hacimli yan zinciri nedeniyle His311'e hidrit transferini kolaylaştırdığı tahmin edilmektedir. Hidrit iyonun kısa sürede transferi, ürüne dönüşecek kompleksin oluşumu ve sonrasında ürüne dönüşme süresini kısaltması *k<sub>cat</sub>*'in artmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Modelleme çalışmalarının sonuçları göstermektedir ki; Arg119 mutasyonu iki monomerin birleşme noktasında olan Phe69 üzerinden yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Asn119 ile sadece hidrojen bağı oluşturduğu görülmektedir. Azit ile hiç bağı kurmamasına rağmen, NAD<sup>+</sup> ile bağlanmayı dahada güçlendiren etkilere sahip olduğu kinetik değerlerden de tahmin edilmektedir.

Ayrıca elde edilen yapıda da görüldüğü gibi, arjinin sahip olduğu uzun yan zincir ile aktif bölgenin substrat ile etkileşimde kullandığı bölge dolmuştur. Bu nedenle bu bölgede yer alan ilgili amino asitler çözelti/su ile daha az etkileştiği, daha fazla etkileşimi arjininin yan zincirinin oturtulması ve substratların doğru yönde yönlendirilmesiyle katalitik aktivitenin arttığı görülmektedir. Bu nedenle hidrit iyonunun formik asitten His311'e daha hızlı transfer olduğu ve enzimin daha çok substrat bağladığı iyileşen *K<sub>M</sub>* ve *k<sub>cat</sub>* değerlerinden anlaşılmaktadır.

Elde edilen sonuçlarda yeterli mutant koloni sayısı elde edilemediğinden dolayı hedeflenen mutasyon çeşitliliği yakalanamamıştır. Bu nedenle yüksek farklı-ticari taşıyıcı hücrelerin seçilmesi gibi farklı yöntemler denenerek transformasyon veriminin artırılması gerekmektedir. Çok sayıda koloni, hedeflenen mutasyon çeşitliliğini de sağlayacağı için daha

yüksek aktiviteli format dehidrogenaz enzimlerinin elde edilmesini mümkün kılacaktır. Bu nedenle sentezlenen primerler ile bu çerçevede deneylerin yeniden kurulması önerilmektedir.

## 6. Referanslar

1. Alekseeva, A.A., Savin, S.S., Tishkov, V.I. 2011. "NAD<sup>+</sup>-dependent Formate dehydrogenase from plants", *Acta Naturae*, 3, 38-54.
2. Ba, L., Li, P., Zhang, H., Duan, Y., Lin, Z. 2013. "Semi-rational engineering of cytochrome P450sca-2 in a hybrid system for enhanced catalytic activity: Insights into the important role of electron transfer", *Biotechnol Bioeng*, 110, 2815-25.
3. Berezin, I.V., Tishkov, V.I., Karzanov, V.V., Avilova, T.V., Egorav, A.M., Petkyavichene, R.I., Vaitkyavihus, R.K., Glemza, A.A. 1989. "Novel formate dehydrogenase", USSR Patent No:1479513.
4. Binay B., 2010. "Development of Novel Ammonia Lyase Biocatalysts for the Production of Unnatural Amino Acids for Industry, TÜBİTAK-2214 Yurtdışı Doktora Araştırma Bursu Kapanış Raporu, Danışman: N. James Turner, Manchester Üniversitesi, Birleşik Krallık.
5. Binay, B., Sessions, R.B., Karagüler, N.G. 2013. "A double mutant of highly purified *Geobacillus stearothermophilus* LDH recognizes mandelic acid as a substrate", *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 393-399.
6. Binay, B., Shoemark, D.K., Sessions, R.B., Clarke, A.R., Karaguler, N.G. 2009. "Increasing the substrate specificity of the lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* by DNA shuffling", *Biochemical Engineering Journal*, 48, 118-123.
7. Bommarius, A.S., Deauz, K., Groeger, U., Wandrey, C. 1992. Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure alpha-amino acids. In *Chirality in Industry*. Editor: Collins, A. N., Crosby, J New York: John Wiley&Sons Ltd.
8. Bommarius, A.S., Schwarm, M., Drauz, K. 1998. "*Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives*", *J Molecular Catal B Enzymatic*, 5, 1-11.
9. Bommarius, A.S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., ve Drauz, K. 1995. "Synthesis and Use of Enantiomerically Pure tert.-Leucine", *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 2851-88.
10. Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D., 1991, "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 12, 253,164-70.
11. Bradshaw, C.W., Hummel, W., Wong, C.H. 1992. "Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis", *J Org Chem*, 57, 532–1536.
12. Carugo, O., Argos, P. 1997. "NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding", *Proteins Struct Funct Genet*, 28, 10-28.

13. Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Crowley, M., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Wu, X., Brozell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D.H., Seetin, M.G., Sagui, C., Babin, V., Kollman, P.A. 2008. "AMBER 10", University of California, San Francisco.
14. Chenault, H.K., Simon, E.S., Whitesides, G.M. 1988. "Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis", *Biotechnol and Genet Eng Rev*, 6, 221-70.
15. Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. 2003. "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs", *Nucleic Acids Res*, 31, 3497-3500.
16. Dalby, P.A. 2007, "Engineering Enzymes for Biocatalysis" *Recent Patents on Biotechnology*, 1, 1-9.
17. El Hawrani, A.S., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Holbrook, J.J. 1996. "Guided evolution of enzymes with new substrate specificities", *J Mol Biol*, 264, 97-110.
18. Ferry, J.G., 1990. "Formate dehydrogenase" *FEMS Microbiol Rev*, 7(3-4), 377-82.
19. Leatherbarrow R.J. GraFit Version 5. Staines, UK: Eryacus Software Ltd.; 2001.
20. Goldberg, S.L., Cino, P.M., Patel, R.N., Nanduri, V.B., Johnston, R.M. 2006. "Pichia pastoris formate dehydrogenase and uses therefor", US Patent, US 7087418 B2.
21. Hummel, W., Kula, M.R. 1989. "Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds", *Eur J Biochem*, 184, 1-13.
22. Johannes, T.W., Woodyer, R.D., Zhao, H. 2007. "Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase", *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 18-26.
23. Karagüler, N.G., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Clarke, A.R., Holbrook, J.J. 2001, "A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP", *Biotechnology Letters*, 23, 283-287.
24. Karagüler, N.G., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Clarke, A.R., Holbrook, J.J. 2004, "Estimating the energetic contribution of hydrogen bonding to the stability of *Candida methylca* formate dehydrogenase by using double mutant cycle.", *Biotechnol Lett*, 26, 1137-40.
25. Krix, G., Bommarius, A.S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm, M., Kula, M.R. 1997. "Enzymatic reduction of *ot*-keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids", *Biotechnol*, 53, 29-39.
26. Kula, M.R., Kragl, U. 1999. Dehydrogenases in sytnythesis of chiral compounds. In stereoselective Biocatalysis. Editor: Patel, R. New York: Marcel Dekker.

27. Labrou, N.E., Rigden, D.J. 2001. "Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase", *Biochem J*, 354, 455-63.
28. Larkin, M. A, Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. 2007, *Bioinformatics* 23, 2947-8.
29. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein. R., Thornton, J. M. 1996. "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR". *J Biomol NMR*, 8, 477-86.
30. Martinez, R., Jakob, F., Tu, R., Siegert, P., Maurer, K.H., Schwaneberg, U. 2013. "Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) by directed evolution", *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 711-20.
31. Mathews, M.B., Vennesland, B. 1990. "Enzymic oxidation of formic acid", *J Mol Biol*, 186, 667-82
32. Mayer, K.M, Arnold, F.H. 2002. "A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates", *J Biomol Screen*, 7, 135-40.
33. Mesentsev, A.V., Lamzin, V.S, Tishkov, V.I, Ustinnikova, T., Popov, V.O. 1997. "Effect of pH on kinetic parameters of NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase", *Biochem J*, 321, 475-80.
34. Moore, J.C., Pollard, D.J., Kosjek, B., Devine, P.N. 2007. "Advances in the enzymatic reduction of ketones", *Acc Chem Res*, 40(12),1412-9.
35. Nakamura, K., Yamanaka, Matsuda, R. T., Harada, T. 2003. "Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts", *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 2659-81.
36. Neuhauser, W., Steininger, M., Haltrich, D., Kulbe, K.D., Nidetzky, B. 1998. "A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependent enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration", *Biotechnol Bioeng*, 60, 277-82.
37. Nilov, D.K., Shabalin, I.G., Popov, V.O., Svedasa, V.K. 2012. "Molecular modeling of formate dehydrogenase: the formation of the Michaelis complex", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 30, 170-179.
38. Ordu, E., Sessions, R. B., Clarke, A. R., & Karagüler, N. G. 2013. "Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylca*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 23-28.
39. Ordu, E.B., Sessions, R.B., Clarke, A.R. Karagüler, N.G. 2013. "Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylca*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 23-28.
40. Parra, L.P., Agudo, R., Reetz, M.T. 2013, "Directed evolution by using iterative

- saturation mutagenesis based on multiresidue sites”, *Chembiochem*, . 14, 2301-9.
41. Patel, R. N. 2013. “Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals”, *Biomolecules*, 3, 741-777.
  42. Patel, R.N., Banerjee, A., McNamee C.G., Brzozowski D.B., Szarka, L.J. 1997. ”Preparation of chiral synthon for HIV protease inhibitor: stereoselective microbial reduction of N-protected  $\alpha$ -aminochloroketone”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 2547-2552.
  43. Popov, V.O., Lamzin, V.S. 1994. “NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase”, *Biochem. J.*, 301, 625-43.
  44. Reetz, M.T., Bocola, M., Carballeira, J.D., Zha, D., Vogel, A. 2005. “Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test”, *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 4192-6.
  45. Reetz, M.T., Carballeira, J.D. 2007. “Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes”, *Nat Protoc* 2 891-903.
  46. Reetz, M.T., Prasad, S., Carballeira, J.D., Gumulya, Y., Bocola, M. 2010. “Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: rigorous comparison with traditional methods”, *J Am Chem Soc*, 132, 9144-9152.
  47. Reetz, MT, 2013. “Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future”, *Journal Of The American Chemical Society*, 135,12480-12496.
  48. Rozzell, J.D., Hua, L., Mayhew, M., Novick, S., 2004. Mutants of enzymes and methods for their use”, *US Patent Application Publication US2004/0115691*.
  49. Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E. 1990. “Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro”, *Nucl Acids Res*, 18, 6409-6412.
  50. Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  51. Schägger, H., von Jagow, G. 1987. “Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa”, *Anal Biochem*, 166, 368-379.
  52. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. 2001. “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature*, 409, 258-68.
  53. Serov, A.E., Popova, A.S., Fedorchuk, V.V., Tishkov, V.I., 2002. “Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biochem J*, 367, 841-7.
  54. Shaked, Z., Whitesides, G.M. 1980. “Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase”, *J Am Chem Soc*, 102, 104-5.
  55. Shinoda, T., Arai, K., Shigematsu-lida, M., Ishikura, Y., Tanaka, S., Yamada, T., Kimber, M.S., Pai, E.F., Fushinobu, S., 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, 17068-75.
56. Sippl, M.J., 1993, “Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins”, Proteins, 17, 355-62.
  57. Slatner, M., Nagl, G., Haltrich, D., Kulbe, K.D., Nidetzky, B. 1998. “Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity”, Biocatal. Biotrans, 16(5), 351-63.
  58. Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.R., Pohl, M. 2000.” Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues”, Eur J Biochem, 267,1280-9.
  59. Tishkov, V.I., Popov, V.O. 2006. “Protein engineering of formate dehydrogenase”, Biomolecular Engineering, 23, 89-110.
  60. Valetti, F., Gilardi, G. 2013. “Improvement of Biocatalysts for Industrial and Environmental Purposes by Saturation Mutagenesis”, Biomolecules, 3, 778-811.
  61. VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. 2008. “Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis”, Biotechniques, 44, 619-626.
  62. Vasic-Racki, D., Jonas M., Wandrey, C., Hummel, W. and Kula, M.R. 1989.” *Continuous(R)-mandelic acid* production in an enzyme membrane reactor”, Appl Microbiol Biotechnol, 31, 215-22.
  63. Vinals, C., Depiereux, E., Feytmans, E. 1993. “Prediction of structurally conserved regions of D-specific hydroxyl acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase”, Biochem Biophys Res Commun, 192, 182–8.
  64. Wang, S.N., Huang, H.Y., Kahnt, J., Thauer, R.K. 2013. “Clostridium acidurici Electron-Bifurcating Formate Dehydrogenase”, Applied And Environmental Microbiology, 79, 6176-6179.
  65. Wang, Y., Li, L., Ma, C., Gao, C. Tao, F., Xu, P. 2013. “Engineering of cofactor regeneration enhances (2S,3S)-2,3-butanediol production from diacetyl”, Scientific Reports, 3, 2643.
  66. Weckbecker, A., Hummel, W. 2005. “Microbial Enzymes and Biotransformations”, Methods in Biotechnology, 7, 225-38
  67. Weuster-Botz, D, Wandrey, C. 1995. “Medium Optimization by Genetic Algorithm for Continuous Production of Formate Dehydrogenase”, Proc Biochemistry, 30, 563-71.
  68. Wichmann, R., Vasic-Racki, D. 2005. “Cofactor regeneration at the lab scale”, Adv Biochem Eng Biotechnology, 92, 225-60.
  69. Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A.F., Kula, M.R. 1981. “Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration”, Biotechnol Bioeng, 23,2789-802.

70. Wong, C.H., Whitesides, G.M. 1982. "Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration using ethanol/alcohol dehydrogenase/aldehyde dehydrogenase and methanol/alcohol dehydrogenase/aldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase", J Org Chem, 47, 2816-2818.
71. Yamamoto, H., Mitsuhashi, K., Kimoto, N., Kobayashi, Y., Esaki, N. 2005. "Robust NADH-regenerator: improved alpha-haloketone-resistant formate dehydrogenase", Appl Microbiol Biotechnol, 67, 33-9.
72. Zhang, Y., Huang, Z., Du, C., Li, Y., Cao, Z. 2009. "Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol", Metabolic Engineering, 11, 101-106.
73. Zhu, D., Hua, J. 2006. "Enantioselective enzymatic reductions of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase", J Org Chem, 71(25), 4202-5.
74. Zhu, D., Yang, Y., Buynak, J.D., Hua, L. 2006a. "Enantioselective enzymatic reductions of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase", Org. Biomol. Chem, 4, 2690-5.
75. Formate dehydrogenase, 2014.  
Google Patent Arama: "Formate dehydrogenase"  
[https://www.google.com/?tbs=pts&gws\\_rd=ssl#q=formate+dehydrogenase&tbs=pts](https://www.google.com/?tbs=pts&gws_rd=ssl#q=formate+dehydrogenase&tbs=pts)  
Avrupa Patent Ofisi: "Formate dehydrogenase"  
<http://www.epo.org/searching.html>  
Son erişim tarihi: 22 Haziran 2014.
76. National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
Son erişim tarihi: 04 Mart 2015.
77. Plasmid maxi kit, Qiagen.  
<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiagen-plasmid-maxi-kit>  
Son erişim tarihi: 27 Temmuz 2014.
78. Protein Data Bank, 2014.  
Protein Data Bank: "NAD+ dependent formate dehydrogenase"  
<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?outformat=&qrid=19851900&tabto=show=Current>  
Son erişim tarihi: 22 Haziran 2014.
79. QuikChange® Site-Directed Mutagenesis, Stratagene.  
<http://www.genomics.agilent.com/en/Site-Directed-Mutagenesis/QuikChange-II/?cid=AG-PT-175&tabId=AG-PR-1161>



Son erişim tarihi: 24 Temmuz 2014.

**80.** SERVA, 2015

[http://www.serva.de/www\\_root/documents/39228\\_e.pdf](http://www.serva.de/www_root/documents/39228_e.pdf)

Son erişim tarihi: 04 Temmuz 2015.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. BARIŞ BİNAY
Proje No:	114Z798
Proje Başlığı:	Aktif Bölge Mimarısının Anlaşılması Temelinde, Nad+ Bağımlı Mutant Candida methylica Format Dehidrogenaz Enziminin Spesifik Aktivitesinin Arttırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL AREL Ü. FEN EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/01/2015 - 15/01/2016
Onaylanan Bütçe:	29595.0
Harcanan Bütçe:	29594.01
Öz:	<p>Format dehidrogenaz enzimi (FDH) endüstriyel biyokatalizörler arasında son yıllarda en çok dikkatçeken enzimlerden biridir. Özellikle NAD(P)+ bağımlı FDH, gerçekleştirdiği reaksiyonun düşük redoks potansiyeli nedeniyle biyoenerji üretimi ve saf kiral bileşiklerin sentezi sırasında ihtiyaç duyulan sürekli NAD(P)H yenilenmesinin sağlanması için en çok başvurulan enzimlerdendir. Endüstriyel biyoteknoloji için, NAD(P)+ bağımlı FDH?ın en büyük dezavantajı mevcut FDH?ların (FDHs) düşük aktiviteye sahip olmasıdır. Bu nedenle özellikle endüstriyel ölçekte biyokatalitik yöntemlerle değerli farmasötik saf kiral ara bileşiklerin sentezi için gerekli olan sürekli NAD(P)H yenilenmesinde FDH enziminin kullanılması oldukça yüksek maliyetlidir. Proje başvurusu öncesinde ön çalışma olarak literatürde rapor edilen ısı kararlılığı arttırılmış Candida methylica (Cm) mutant FDH için spesifik aktivitesi arttırılmıştır. Bunun için, öncelikle Cm FDH?ın homoloji yöntemi ile yapısı tahmin edilmiş ve elde edilen yapı moleküler dinamik ile optimize edilmiştir. Sonra diğer kaynaklardan elde edilen FDH enzimlerin dizileri ve yapıları ile karşılaştırılarak; Cm FDH için katalitik bölgeyi oluşturan, formik asit-NAD+ bağlanma bölgesini oluşturan amino asit pozisyonları tahmin edilmiştir. Enzimin aktif bölgesini oluşturduğu yada katalitik aktivitesinde etkili olabileceği tahmin edilen Thr67, Phe69, Gly92, Val93, Gly94, Asp96, Arg258, Gln287, His311 dokuz (9) amino asit, ISM yönteminin CAST tekniği için de aday amino asitler olarak seçilmiştir.</p> <p>Projenin kabulü sonrası ilk iş olarak hesapsal yöntemler ve literatür bilgisi ile belirlenen fonksiyonel amino asit pozisyonları ISM/CAST için mutant kütüphanesi oluşturulmuştur. Petri plakelerde oluşturulan her mutant kütüphanesi için 20-50 arasında koloni elde edilmiştir. Oluşturulan mutant kütüphaneleri, substrat olarak NAD+ ve formik asite karşı yüksek spesifik aktiviteye sahip mutant FDH?ı seçmek için taranmıştır. Tarama sonucu 13 tane mutant koloninin aktif olduğu gözlemlenmiştir. Seçilen substratlara karşı doğal tip Cm FDH ile karşılaştırıldığında spesifik aktivitesi yüksek olan mutant FDH?lar seçilerek dizi analizi için dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme sonucu aktif olan 13 mutanttan sadece 3 tanesinde baz değişimi olduğu görülmüştür. Bunlardan 2 tanesinde sessiz mutasyon, diğerinde ise N119R değişimi tespit edilmiştir. Mutant enzim (N119R) TAGZyme sistemi ile saflaştırılmış ve seçilen substratlara karşı Km, Kcat kinetik değerleri belirlenmiştir. Son olarak mutant FDH enzimi için substrat ile olan etkileşimleri moleküler dinamik simülasyonlarıyla elde edilen yapıda incelenmiştir.</p> <p>Proje ile karakterize edilmiş yüksek spesifik aktiviteli NAD+ bağımlı ısıya dayanıklı mutant FDH enzimi tanımlanmıştır. Yüksek katma değerli endüstriyel biyokatalizör olarak aktivitesi yüksek olan mutant FDH enziminin patentlenmesi hedeflenmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	NAD+ bağımlı Format Dehidrogenaz(FDH), Spesifik Aktivite, Tekrarlayan Doyurulmuş Mutagenezler(ISM)
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır