

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***GOSSYPYIUM HIRSUTUM* FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
OKSİDATİF STABİLİTESİNDE YÜZEY METİONİN
KALINTILARININ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Şubat, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***GOSSYPİUM HİRSUTUM* FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
OKSİDATİF STABİLİTESİNDE YÜZEY METİONİN KALINTILARININ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem KURT tarafından hazırlanan tez çalışması 03.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Esra YÜCA YILMAZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ, Üye
Gebze Teknik Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan *Gossypium hirsutum* Format Dehidrogenaz Enziminin Oksidatif Stabilitesinde Yüzey Metionin Kalıntılarının Etkisinin Araştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sinem KURT

İmza

Bu çalışma, kısmen 216Z052 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

TEŞEKKÜR

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca rehberim olduğu, bilim yolunda etik değerlerden ödün vermeden, elinden gelen tüm olanakları bizlere sağladığı için en büyük teşekkürümü değerli hocam, sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emel Ordu'ya ederim.

Sevgili hocam Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi'ye, laboratuvar olanaklarını sağladığı ve manevi desteği için çok teşekkür ederim.

Bölümümüzün değerli hocalarından Prof. Dr. Semiha Erişen ve Dr. Öğr. Üyesi Şenay Vural Korkut'a bana kattığı her şey için çok teşekkür ederim.

Birçok özelliği ile örnek aldığım Dr. Günseli Kurt Gür'e hayatıma dokunduğu için çok teşekkür ederim. Laboratuvar içi ve dışı tüm yardımları için ekibimizin abisi Hasan Demirci'ye ve her türlü sorunlarımızla ilgilenen Dr. Munise Yurtsever'e teşekkürlerimi borç bilirim.

İlk çalışma hayatıma öyle insanlarla başladım ki; nereye gitsem çıta hep aşağılarda olacağını biliyorum. Akın Sunulu, Tuğba Atabey, Şayan Poyraz, Kübra Trabzonlu, Sefanur Erdöl, Gülşah Akbaş, Emrah Bertan, Caner Ertürk, Dilsu Çolpan, Reyhan Akkuzu, İlgül Akmayan, Cansel Kaya, Ceren Kırmızıtaş, Nur Aydın, Kübra Avcı, Ayşegül A. Öztürk'e bir gün yollarımızın tekrar kesişmesini diliyorum.

Her zaman yanımda olan ve güç veren, hayatımın değişmeyen ve en kıymetli parçası Furkan Kasım'a; sadece ev arkadaşı değil ailem olan A. Elif Eren'e; en başından beri birlikte hayal kurduğum ve gerçekleştirdiğim kız kardeşim Hilal Civelek'e; bilim aşkı ile beni her zaman motive eden canım dostum Maide Şeker'e; proteinler, prionlar hakkında keyifli sohbetleri, içten arkadaşlığı için Melike Bahçekapılı'ya ve akademi dünyamızın astrolog prensesi Sema Aydın'a teşekkür ederim.

Canım ailem Cevat Kurt, Hülya Altuntaş, Ayşegül Aldırmaz ve Yasemin Kurt'a ve her zaman arkamda bir çınar gibi duran, hayattaki en büyük şansım, canım annem Sevgi Baripoğlu'na teşekkür ediyorum.

Sinem KURT

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	6
1.3 Hipotez.....	7
2 GENEL BİLGİLER	8
2.1 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenazlar.....	8
2.1.1 Bitkisel NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenazlar.....	10
2.2 Proteinlerin Kararlılığı.....	12
2.2.1 Oksidatif Kararlılık.....	12
2.2.2 Termal Kararlılık.....	14
2.3 Protein Mühendisliği.....	15
2.3.1 Rasyonel Dizayn.....	15
2.4 Homoloji Modelleme.....	18
3 MATERYAL VE METOT	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör.....	22
3.1.2 Mutasyon Primerleri.....	23
3.1.3 Kullanılan Kitler.....	23
3.1.4 Kimyasal ve Malzemeler.....	23
3.1.5 Kullanılan Besiyerleri.....	23
3.1.6 Kullanılan Tampon Çözeltileri.....	24
3.1.7 Kullanılan Enzimler.....	24
3.2 Metot.....	25
3.2.1 Homoloji modelleme.....	25
3.2.2 Bölgeye Yönlendirilmiş Mutagenез.....	25

3.2.3 Transformasyon.....	26
3.2.4 Yabanıl Tip ve Mutant GhFDH'lerin Ekspresyonu.....	27
3.2.5 Enzimlerin Saflaştırılması.....	27
3.2.6 Kararlı Hal Kinetiğinin Belirlenmesi.....	28
3.2.7 Termal Kararlılığının Belirlenmesi.....	29
3.2.8 Oksidatif Kararlılığının Belirlenmesi.....	29
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	31
4.1 Sonuç.....	31
4.1.1 Homoloji Modelleme ve Mutantların Dizayını.....	31
4.1.2 Mutasyon PCR'ı ve Mutasyonların Kontrolü.....	34
4.1.3 Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	35
4.1.4 Kararlı Hal Kinetiği.....	36
4.1.5 Termal Denatürasyon.....	39
4.1.6 GhFDH'nin Hidrojen Peroksite Karşı Kararlılığı.....	41
4.2 Öneriler.....	44
4.2.1 Mutasyonların Dizayını ve Modellerin Analizi.....	44
4.2.2 Mutasyonların Aktiviteye ve Termal Kararlılığa Etkisi.....	46
4.2.3 Mutasyonların Oksidatif Kararlılığa Etkisi.....	47
KAYNAKÇA	50
A DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	59
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	64

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
U	Enzim ünitesi
g	Gram
pH	Hidrojen gücü
kDa	Kilodalton
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
°C	Santigrat
cm	Santimetre

KISALTMA LİSTESİ

AtFDH	<i>Arabidopsis thaliana</i> Format Dehidrogenaz
Bp	Baz Çifti
cbFDH	<i>Candida boidinii</i> Format Dehidrogenaz
cDNA	Komplementer DNA
Cys	Sistein
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDH	Format Dehidrogenaz
GhFDH	<i>Gossypium hirsutum</i> Format Dehidrogenaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
Kb	Kilo baz
LB	Luria-Bertani Broth (Lysogeny Broth)
Leu	Lösin
Met	Metionin
MW	Moleküler Ağırlık
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nicotinamid Adenin Dinucleotit Fosfat
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
UV	Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	NAD ⁺ bağımlı FDH enziminin tersinir reaksiyonu.....	8
Şekil 2.2	FDH tarafından katalizlenen reaksiyon.....	8
Şekil 2.3	NAD(P) rejenerasyonu.....	10
Şekil 2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> 'dan izole edilen NAD-bağımlı format dehidrogenaz enziminin X-ray kristalografi ile elde edilmiş 3 boyutlu yapısı (AtFDH)...	12
Şekil 2.5	PCR Tabanlı Bölgeye Özgü Mutagenез Metodu.....	17
Şekil 2.6	Homoloji Modelleme Basamakları.....	18
Şekil 3.1	pQE-2 vektör haritası.....	22
Şekil 4.1	NAD ⁺ -bağımlı <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFDH, pdb kod: 3NAQ_A, resolution 1.70Å)'ya göre elde edilen GhFDH modeli.....	31
Şekil 4.2	NAD ⁺ -bağımlı <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFDH, pdb kod: 3NAQ_A, resolution 1.70Å)'ya göre elde edilen GhFDH'in 3 boyutlu homoloji modeli üzerinde metionin bakiyelerinin yerleri.....	32
Şekil 4.3	GhFDH'de yüzey metionin amino asitlerinin gösterimi.....	32
Şekil 4.4	Homoloji modellemede kalıp olarak kullanılan ligand bağlanmış NAD ⁺ bağımlı <i>Arabidopsis thaliana</i> format dehidrogenaz (AtFDH, pdb kod: 3N7U, resolution 2.0 Å) ve GhFDH arasındaki amino asit homolojisi ve metionin bakiyelerinin primer yapıdaki konumları.....	33
Şekil 4.5	Seçilen 3 yüzey metionin bakiyesinin NAD ⁺ 'a ve birbirine göre konumları.....	34
Şekil 4.6	M234'e yönelik mutasyon PCR ürününün %0.8 agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	35
Şekil 4.7	Yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin ekspresyon seviyeleri.....	36
Şekil 4.8	Mutant GhFDH'lerin kinetik ölçüm grafikler.....	38
Şekil 4.9	Mutant GhFDH'lerin termal inaktivasyon grafikleri.....	39
Şekil 4.10	50, 55 ve 60 °C'lerde inkübe edilmiş enzimlerin yüzdesel kalan aktivite grafiği.....	41
Şekil 4.11	Yabanıl tip ve mutant GhFDH enzimlerinin 0.15 M H ₂ O ₂ ile inkübasyonundan elde edilen inaktivasyon grafikleri.....	43
Şekil 4.12	GhFDH'in kristalografik yapı bilgisi olan diğer FDH'ler ile çoklu amino asit hizalaması.....	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Popüler Homoloji Modelleme Araç ve Sunucuları.....	20
Tablo 3.1 Hedeflenen Amino Asitlere Özgü Tasarlanan Mutasyon Primerleri.....	23
Tablo 3.2 PCR Reaksiyon Koşulları.....	26
Tablo 4.1 Yabanıl tip ve mutant <i>Gossypium hirsutum</i> FDH'lerin kinetik sabit değerleri.....	37
Tablo 4.2 Termal inaktivasyon sıcaklıklarının ($T_{0.5}$) karşılaştırılması.....	40
Tablo 4.3 Yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin $t_{0.5}$ değerlerinin karşılaştırılması....	42
Tablo 4.4 Yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin H_2O_2 ile inaktivasyonu için etkili birinci dereceden kinetik sabitler.....	44

***Gossypium hirsutum* Format Dehidrogenaz Enziminin Oksidatif Stabilitesinde Yüzey Metionin Kalıntılarının Etkisinin Araştırılması**

Sinem KURT

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Optikçe saf kiral bileşiklerin eldesi hem ürün kalitesi hem de insan sağlığı için önemlidir. Kimyasal yöntemlerle elde edilen kiral bileşikler sonucunda rasemik karışımlar elde edilmektedir. Rasemik karışımlar farmasötik, gıda, tarım gibi optik olarak saf ürün gerektiren sektörlerde problem yaratmaktadır. Kiral moleküllerin sentezinde kimyasal yöntemler yerine enzimlerin kullanılması optikçe saf ürünlerin eldesine imkân sağlamaktadır. Endüstriyel üretimde, optikçe saf kiral ürün eldesinde oksidoredüktaz grubu enzimler kullanılmaktadır. Ancak bu enzimlerin kullanımı için oldukça pahalı bir koenzim olan NAD(P)H gerekmektedir. NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlar, formatı CO₂'e okside ederken; NAD⁺'nin NADH'e indirger ve NADH varlığında ise, CO₂'in indirgenmesini katalizlerler. Bu nedenle pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'in rejenerasyonu ve CO₂'den hidrojen yakıtının stabilize bir formu olan formik asit üretimi araştırmalarında önemlidir.

Bitkilerde çevresel stres koşulları ile mücadelede anahtar rol oynayan FDH enzimi ıslah çalışmaları için de önemlidir. Literatürdeki CbFDH, PsFDH, SoyFDH gibi rekombinant enzimlerinin gerek aktivite gerekse kararlılıkları açısından

geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle yeni FDH'lerin araştırılması ve geliştirilmesi önemlidir. Mikrobiyal kaynaklı FDH'ler hakkında geniş bir literatür bulunmakla beraber, bitkisel FDH'lerin biyoteknolojik potansiyeli yeteri kadar değerlendirilmemiştir.

Protein yüzeyindeki metionin amino asitleri oksidatif strese karşı hassastır ve reaktif oksijen türleri ile metionin sülfokside dönüştürülebilirler. Bu nedenle proteinin konformasyonunun değişmesinde ve aktivitesinin kaybolmasında kritik bölgelerdir. Sülfür grubu nedeniyle oksidasyona meyilli metioninin, oksidasyona dirençli bir lösin amino asidi ile değiştirilmesi oksidatif kararlılığın arttırılmasında önemli bir stratejidir.

Bu yüksek lisans tezinde yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile GhFDH protein yüzeyinde M225L, M234L, M243L, M225/243L ve M225/234/243L mutasyonları yapılarak yüzey metioninlerinin oksidatif kararlılığa olan etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, M234L ($0,72 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) ve M225/234/243L ($0,55 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), yabanıl tipten daha yüksek katalitik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Kimyasal kararlılıkta en dikkat çekici sonuçlar, ikili ve üçlü mutantlarda görülmüştür. M225/243L ve M225/243L/234L, $k_{\text{ef in}}$ faktörünü (sırasıyla $12,3 \times 10^{-5}$ ve $12,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz, *Gossypium hirsutum*, bölgeye yönelik mutagenез, oksidatif kararlılık

Investigation of the Effect of Surface Methionine Residues on the Oxidative Stability of *Gossypium hirsutum* Formate Dehydrogenase Enzyme

Sinem KURT

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Emel ORDU

Optically pure chiral compounds, which are very important for product quality and human health, are obtained by chemical methods and form racemic mixtures. Enzymatic methods can be used instead of chemical in the synthesis of chiral molecules. In industrial production, oxidoreductase enzymes are used to obtain optically pure chiral products. However, these enzymes require NAD(P)H, a rather expensive coenzyme. NAD⁺ dependent FDHs, while oxidizing the formate to CO₂; It reduces NAD⁺ to NADH and in the presence of NADH it reduces CO₂. Therefore, it is important in the regeneration of NAD(P)H, an expensive coenzyme, and the production of formic acid, a stabilized form of hydrogen fuel from CO₂. FDH enzyme, which plays a key role in combating stress in plants, is also important for breeding studies. The activity and stability of existing recombinant enzymes need to be improved. Therefore, it is important to research and develop new FDHs. While there are many studies on microbial FDHs, the biotechnological potential of plant FDHs has not been emphasized.

Methionine on the protein surface are susceptible to oxidative stress and can be converted to methionine sulfoxide with ROS. The conformation of oxidized proteins may change and their activity may be lost. Replacing methionine, which is prone to oxidation due to its sulfur group, with oxidation-resistant leucine is an important strategy in increasing oxidative stability. In this master's thesis, M225L M234 and M243L mutations were made on the GhFDH protein surface with the directed mutagenesis method and their effect on oxidative stability was investigated. The results showed that M234L ($0.72 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) and M225/234/243L ($0.55 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) had higher catalytic activity than wild type. The most remarkable results in chemical stability were seen with double and triple mutants. Double ($12.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) and triple mutant ($12.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) reduced the factor in $k_{\text{ef in}}$.

Keywords: NAD^+ dependent formate dehydrogenase, *Gossypium hirsutum*, site directed mutagenesis, oxidative stability

1.1 Literatür Özeti

Format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2), metilotrofik mikroorganizmalarda ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. FDH enzimi, formatın CO₂'e oksidasyonunu katalizlerken; NAD⁺'nin NADH'ye indirgenmesini sağlamakla beraber uygun şartlarda NAD(P)H varlığında, tersinir olarak CO₂'nin formata indirgenmesini katalizleyebilmektedir [1].

Bu özellikleri ile FDH'ler, kiral bileşiklerin enzimatik sentezi sırasında kullanılması gereken ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'ın yeniden eldesi, ortamdaki formik asit miktarının belirlenmesi, atmosferik CO₂'in tutulması ve CO₂'den hidrojen yakıtının stabilize edilmiş bir formu olan formik asit üretilmesi gibi biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimlerdir [2].

NAD(P)H rejenerasyonunda kullanılan, fosfat dehidrogenaz, glukoz dehidrogenaz gibi başka enzimler de mevcut olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin NADH'a indirgeme aktivitesinin düşük olması ve tersinir olarak çalışırken istenmeyen yan ürünlerin ortaya çıkması gibi dezavantajları mevcuttur. Bu dezavantajlar ve maliyet göz önünde bulundurulduğunda FDH, NAD(P)H rejenerasyonu için en doğru enzim olarak görülmektedir. Ayrıca FDH enzimlerinin %100'e yakın verimle çalışıyor olması, reaksiyon ürünü olan CO₂'nin ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmesi, kullandığı substrat, koenzim ve oluşan ürünün diğer reaksiyonlarda inhibitör etki göstermemesi ve geniş pH aralığında çalışıyor olması gibi avantajları sebebiyle NAD(P)H rejenerasyonunda yaygın kullanım alanları bulmuştur [1, 3-5].

FDH enziminin NAD(P)H rejenerasyonuna ek olarak karbondioksiti fikse ederek formik asit üretim kabiliyeti de mevcuttur. Formik asit, hidrojen yakıtının kararlı hala gelmiş bir formudur ve H₂ gazına göre enerji kapasitesi oldukça yüksektir. Çevre dostu olan bu yakıt, CO₂ gazının sıvı forma (formik asit) geçmesi ile elde

edilmektedir. Kimyasal prosedürlerle formik asit eldesi oldukça enerji gerektiren ve pahalı bir yöntemdir. Bu yüzden herhangi bir pahalı maddeye gereksinim duymayan FDH enzimi gibi biyokatalizörlerin kullanılması bu sorunları ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir [6, 7]. Format üretimini sağlayan güncel kimya mühendisliği metotlarının yerine geçebilecek, etkili enzimlerin arayışı sürmektedir. Bu arayışta CO₂'i formata indirgeyebilen FDH dışında enzimlerin mevcut olduğu bildirilmiştir. Pirüvat dekarboksilaz, karbonik anhidraz gibi enzimlerin de CO₂'i fikse etme yeteneği bilinmektedir. Pirüvat dekarboksilaz, CO₂'i indirgeyebilmek için ekimolar asetaldehite ihtiyaç duymaktadır. Karbonik anhidraz, CO₂'i etkili bir şekilde bikarbonata dönüştürürken indirgenme reaksiyonu değil, hidrasyon reaksiyonu gerçekleştirmektedir. NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz enzimleri ise herhangi başka bir maddeye gereksinim duymadan, yüksek seçicilik ile CO₂'i doğrudan yüksek enerji kapasiteli formata indirgeyebilmektedir. Daha sonra kullanılacak olan alana göre aldehit dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz gibi enzimlerle birlikte çalışarak, formaldehit ve metanole de indirgenebilmektedir. Bundan dolayı NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz enzimleri CO₂ indirgeme reaksiyonlarında sıklıkla tercih edilmektedir [8, 9].

Fungal FDH'lerinden biri olan *Candida boidinii* FDH (CbFDH), ticari olarak kolay bulunan, çift enzimli reaksiyon sistemlerinde kullanılmaya uygun, NAD(P)H rejenerasyonunda ve CO₂ fiksasyonunda kullanılabilen önemli bir enzimdir [9]. Ancak CO₂'yi formata indirgeme kapasitesi düşüktür [2, 6]. Ökaryotik ve prokaryotik farklı organizmalardan izole edilmiş FDH enzimlerinin (*Anciyobacter aquaticus* FDH-AaFDH, *Ceriporiopsis subvermispota* FDH-CsFDH, *Moraxella sp. C-1* FDH-MsFDH, *Paracoccus sp. 12-A* FDH-PsFDH, *Thiobacillus sp. KNK 65MA* FDH-TsFDH) CO₂'i indirgeme aktiviteleri karşılaştırıldığında TsFDH'in CbFDH'den 84 kat fazla katalitik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [9]. Ancak gelişen endüstriyel teknoloji ile bu enzimlerin ticari anlamda geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sebeple bir yandan farklı kaynaklardan izole edilen endüstriyel şartlara dayanıklı yeni FDH'lerin izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları sürerken [9, 10], diğer yandan var olan enzimlerin geliştirilmesi amacıyla protein mühendisliği metotları uygulanmaktadır [11-16].

Literatüre bakıldığında bitki FDH'lerinin aynı zamanda birer stres proteini olduğu bilinmektedir. Kuraklık, sıcaklık değişimi, ağır metal kirliliği, kimyasal ajanlara maruz kalma, hipoksiya, patajenik mikroorganizma saldırısı gibi durumlarla bitkilerde FDH sentezi artmaktadır [17, 18]. Çok farklı stres faktörlerine karşı sentezlenmesi, FDH'in evrensel bir enzim olduğunu ve yüksek bitkilerin stres metabolizmasında anahtar bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

FDH'ler ökaryotik canlılarda genellikle mitokondride bulunurken, *A. thaliana*'dan izole edilen FDH'in karakterizasyon çalışmasında, enzimin N-terminal bölgesinde kloroplasta taşındığına dair sinyal dizisi bulunmuştur. Belirli durumlarda kloroplastta da bulunan AtFDH enziminin tersinir olarak da çalıştığı düşünülmektedir [19]. Bazı bitki FDH'lerin gerekli durumlarda kloroplastta bulunması enerji metabolizması açısından oldukça ilgi çekicidir. Çünkü kloroplastın metabolizması mitokondrininkinden oldukça farklıdır. FDH'in kloroplastta bulunması, mitokondride mümkün olandan daha yüksek enerjili elektron kaynağı sağlayabileceği ve tersinir indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirebileceğini düşündürmüştür [20]. Bu hipotezi doğrular nitelikte, Peacock ve Boulter (1970) tarafından *Phaseolus aerous* bitkisinden izole edilen FDH'in (PaFDH) asidik pH'da (6.8) bazik pH'a (8) göre 19,7 kat fazla CO₂'i indirgeyici aktive gösterdiği bildirilmiştir[21].

NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da 32771 NAD⁺ bağımlı FDH proteini listelenmektedir ve bunlardan yalnızca 183'ü bitki kaynaklıdır. Bitki FDH'lerinin ise çoğu genomik çalışmalar sonucu elde edilen varsayımsal verilerdir. Bitki FDH'leri çalışmalarında ise genellikle AtFDH ve SoyFDH'a odaklanılmıştır [18, 22]. Diğer FDH'ler ile kıyaslandığında aynı zamanda birer stres proteini olan AtFDH ve SoyFDH H₂O₂'ye karşı daha karardır. Bakteriyel FDH'ler arasında mutant PseFDH enzimi benzer bir oksidatif kararlılık göstermektedir. SoyFDH, substrat ve koenzim için düşük Km değeri gösterse de termal kararlılığının ve katalitik etkinliğinin düşük olması nedeniyle endüstriyel uygulamalar için ideal ticari enzim olamamıştır [22, 23].

Protein yapısını oluşturan tüm amino asitler, farklı reaktif oksijen türleri (ROS) ile oksitlenmeye meyillidir. Özellikle metionin ve sistein amino asidinin yan zincirlerindeki sülfür atomundan dolayı proteinlerin başlıca oksidasyon

bölgeleridir [24, 25]. FDH enzimi, endüstriyel işlemlerde yüksek pH, sıcaklık ve farklı çözücü sistemlerine maruz kaldığında, içerdiği aktif sistein bakiyeleri nedeniyle kolaylıkla kararlılığını kaybedebilmektedir. Diğer FDH ile karşılaştırıldığında, stresle indüklenen bitki FDH'lerinin oksidatif kararlılıkları daha yüksek olsa da endüstriyel uygulamalar için geliştirilmesi gerekmektedir [26].

Literatür incelendiğinde; sistein amino asitlerinin, enzim kinetiği ve kararlılığı üzerindeki etkisini incelemek ya da enzim kararlılığını arttırmak için birçok çalışma olduğu görülmektedir. Metionin bakiyelerinin enzim kararlılığı ve aktivitesi üzerindeki etkileri hakkında bilginiz ise sisteinlere göre kısıtlıdır. *Pseudomonas sp. 101* [26, 27] *Mycobacterium vaccae* [28], *Candida boidinii* [29, 30], *Candida methylica*'dan [12, 14], izole edilen NAD⁺ bağımlı FDH enzimleri üzerinde sistein bakiyelerinin oksidasyonunu önlemek ve protein kararlılığını arttırmak için protein mühendisliği uygulamaları yapılmıştır. Sistein bakiyelerinin diğer amino asitler ile değişimi ve FDH enzimleri üzerinde disülfid mühendisliği metodu uygulanarak önemli başarılar elde edilmesine rağmen, bu çalışmalar birçok mutantın aktivitesi veya kararlılığın azalması ile sonuçlanmıştır.

2016 yılında Zheng ve arkadaşları tarafından *Candida boidinii* FDH (CbFDH) üzerinde yapılan disülfid mühendisliği çalışmasında, protein yüzeyinde bulunan A10C ile C23 bakiyeleri arasında kurulan disülfid köprüsü, katalitik verimi ve kararlılığı arttırırken; proteinin içine gömülü olan I239C ile C262 bakiyeleri arasında kurulan disülfid köprüsünün koenzimin bağlanma afinitesini ve enzimin katalitik etkinliğini azalttığı bildirilmiştir [30]. 2000 yılında Slusarczyk ve arkadaşları, oksidatif strese karşı C23S ve C23S/C262A mutantlarının, yabanıl tip CbFDH'e göre kararlılık seviyesini önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir [29]. *Pseudomonas sp. 101* (PseFDH) mutantlarının hidrojen peroksit kaynaklı inaktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar, PseFDH'nin format ve koenzim bağlanma bölgelerinde bulunan C145S ve C255A mutasyonların, enzim kararlılığını arttırdığını gösterirken, protein yüzeyinde bulunan C354 değişimi enzim özelliklerini önemli ölçüde etkilemediği gösterilmiştir [26]. Ayrıca, bir başka çalışmada, C255A mutasyonunun NADP⁺ bağlanmasını arttırdığı gösterilmiştir [27]. *Mycobacterium vaccae* N10 FDH ile yapılan çalışmada, C255V mutasyonunun enzimin katalitik etkinliğini ve NADP bağlanma spesifitesini arttırdığı gösterilmiştir

[28]. Öte yandan, sistein içermeyen *Candida methylica* FDH'e (CmFDH) disülfid köprüsünün eklenmesi, enzim aktivitesi ve kararlılığının azalmasına veya kaybolmasına neden olmuştur [12].

Sistein bakiyelerinin değişimi için birçok çalışma mevcutken, NAD⁺ bağımlı FDH'lerdeki metionin değişimi, yalnızca CmFDH 'in M1C ve M1L değişimleri ile sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalarda, M1C ve D62C bakiyelerinin arasına disülfid bağının eklenmesi CmFDH'in termal kararlılığını azaltırken, 1M'in sisteine değiştirilmesi katalitik etkinliği ve termal kararlılığı arttırmıştır ve tüm mutantlar arasında 60 °C'de inkübasyon sonrasındaki aktivitesini en iyi koruyan M1L mutanti olmuştur [10, 14].

Enzimlerin oksidatif kararlılığı, sistein ve metionin bakiyelerinin kararlılığı ile doğru orantılıdır [25]. Metionin, protein fosforilasyonunu kontrol etmek ve hücredeki reaktif türleri temizlemek için metionin sülfoksite oksitlenerek reaktif oksijen türleri için bir sensör görevi görür [31-33]. Bununla birlikte, metionin oksidasyonu, protein kararlılığını ciddi şekilde etkiler ve endüstriyel işleme veya depolama sırasında biyolojik aktiviteyi azaltır [34]. Metioninin, metionin sülfoksite dönüşmesi, yan zincirin hidrojen bağlama kapasitesini, hacmini ve polaritesini artırarak protein yapısını ve kararlılığını bozduğu düşünülmektedir [35].

Literatürde metioninlerin; glutamin, lösin, izolösin, fenilalanin, valin, alanin veya kodlanmamış amino asitler ile değiştirilmesinin oksidasyona etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır [14, 35-37]. Bu çalışmalar sonucunda, proteinin oksidatif stres hasarını azaltmak için, metionin gibi oksidasyona meyilli amino asitlerin, oksidasyona dayanıklı alanin, lösin gibi amino asitler ile değiştirilmesinin; proteinin oksidatif stres hasarını azalttığı bilinmektedir ve birçok endüstriyel protein üzerinde bu strateji uygulanmıştır [25, 38]. *Alkalimonas amylolytica*'dan izole edilen amilaz enziminin 247. pozisyonundaki metionin amino asidinin lösin amino asidi ile değiştirilmesi oksidatif stabilitatesini 7 kat arttırmakla beraber; termal kararlılık ve katalitik aktivitesini de geliştirmiştir. *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus* sp. TS-23 ve *Alkalimonas amylolytica* amilazlarında metionin amino asidinin oksidasyona dayanıklı alanin ve lösin ile yer değiştirilmesi H₂O₂ varlığında proteinlerin kararlılığını arttırmıştır [39]. Amino hidrolaz ile yapılan bir çalışmada; M221L değişiminin oksidatif kararlılığı, enzimin yarı ömrünü ve aktivitesini arttırdığı

bildirilmiştir [40]. Savin ve Thiskov (2010)'un PsFDH'in kimyasal kararlılığını arttırmak için yaptıkları çalışmada; C255S ve C145S mutantları tek başına kayda değer bir değişikliğe neden olmazken Cys255Ala /Cys145Ser ikili mutantının kümülatif etkisi yabanıl tipe göre kimyasal kararlılığı 1000 kat arttırmıştır [26].

Bu yüksek lisans tezinde, GhFDH enziminin yüzeyinde yer alan M225, M234 ve M243 amino asit bakiyeleri hedef alınmıştır. Hedeflenen ve oksidasyona meyilli yüzey metionin amino asitleri, "site directed mutagenesis" metodu ile oksidasyona dayanıklı lösin amino asidi ile yer değiştirilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Genel olarak enerji metabolizmasındaki görevi ile bilinmekle birlikte, bitkilerde oksidatif stres ile mücadelede de önemli enzimler olan NAD⁺ bağımlı FDH enzimleri özellikle, ilaç endüstrisinde önem arz eden optikçe kiral saf bileşiklerin, enzimatik sentezi sırasında kullanılması gereken ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'ın yeniden eldesi ve CO₂'den hidrojen yakıtının stabilize edilmiş bir formu olan formik asit üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalar için önemlidir[2].

Bu tez çalışmasına konu olan, GhFDH enziminin önceki biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları, GhFDH enziminin çevresel stres koşullarına karşı dayanıklılığının biyoteknolojik olarak önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir [21]. Oksidasyon da en önemli çevresel streslerden biridir ve üretim, işlenme veya depolama gibi endüstriyel aşamalarda enzim inaktivasyonuna sebep olabilmektedir [34]. Bu yüzden oksidatif kararlılık, en önemli kalite parametrelerinden biridir.

Gossypium hirsutum format dehidrogenaz (GhFDH), 9 metionin (M126, M214, M225, M234, M243, M258, M294, M299, M32) ve 5 sistein bakiyesine (C22, C51, C185, C218 ve C265) sahiptir. Sistein bakiyelerinin, farklı kaynaklardan izole edilen FDH enzimlerinin kinetiği ve kararlılığı üzerindeki rolü hakkında çok sayıda veri varken; metionin bakiyelerinin, FDH'lerin kararlılığı ve aktivitesi üzerindeki etkisine ilişkin bilğimiz kısıtlıdır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, NAD⁺ bağımlı GhFDH enziminin oksidatif kararlılığını arttırmak amacıyla protein mühendisliği yaklaşımlarından biri olan bölgeye özgü mutagenез yöntemi uygulanmıştır. GhFDH protein yüzeyinde yer alan ve oksidasyona yatkın olan metionin amino asitleri

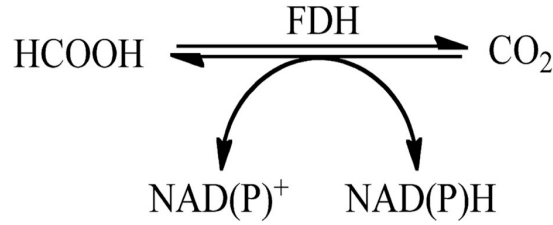
(Met), oksidasyona karşı dayanıklı lösin (Leu) ile yer değiştirilmiştir. Böylece bu Met/Leu değişimlerinin enzimin termal kararlılığına ve aktivitesine olan etkisinin aydınlatılmasının yanı sıra enziminin oksidatif kararlılığının arttırılması amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

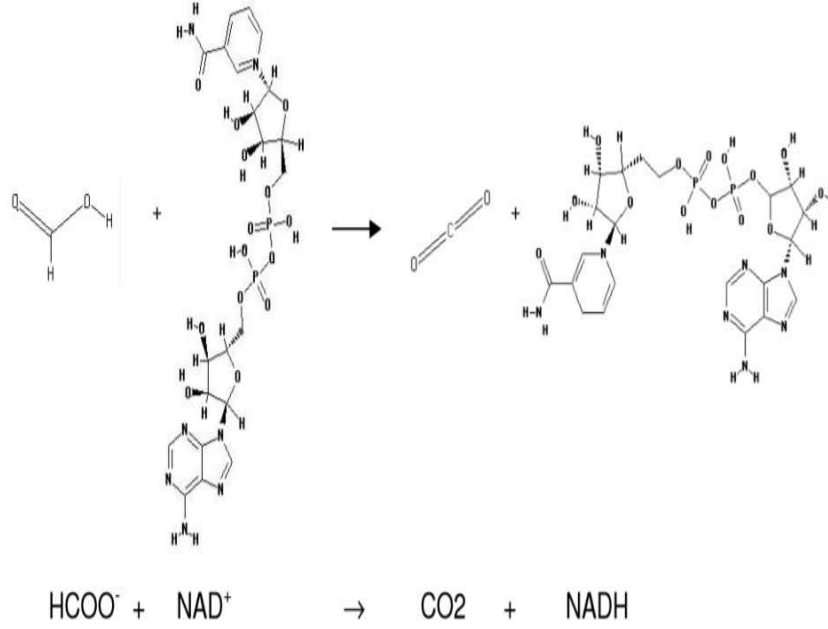
Bu tez çalışmasıyla GhFDH enzimi yüzey metionin amino asit bakiyeleri (M225, M234 ve M243)  zerinde ilk kez protein mühendisliği metotlarından biri olan “site directed mutagenesis” yöntemi uygulanmıştır. Protein yüzeyindeki metionin amino asitleri oksidatif strese karşı hassastır ve reaktif oksijen türevleri tarafından kolaylıkla metionin s lfokside dönüşebilmektedir. Metionin sülfoksit redüktaz, okside olmuş metionini indirgeyerek bir antioksidan savunma mekanizması sağlamaktadır. Eğer okside olmuş metionin indirgenemezse bu bölgenin hidrofobikliği ve dolayısıyla protein konformasyonu değiştiğinden aktivite kaybı ile sonuçlanmaktadır [40]. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız, GhFDH enziminde bulunan oksidasyona eğilimli yüzey metionin amino asitlerinin, oksidasyona dayanıklı lösin amino asidi ile değiştirilerek enzimin oksidatif kararlılığının arttırılacağı hipotezi üzerine kurulmuştur.

2.1 NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenazlar

NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzimler, formatın CO₂'e oksidasyonunu katalizlerken NAD⁺'nin NADH'e indirgenmesini ve NADH varlığında ise, CO₂'in indirgenmesini katalizlemektedirler (Şekil 2.1-2.2).



Şekil 2.1 NAD⁺ bağımlı FDH enziminin tersinir reaksiyonu [6]

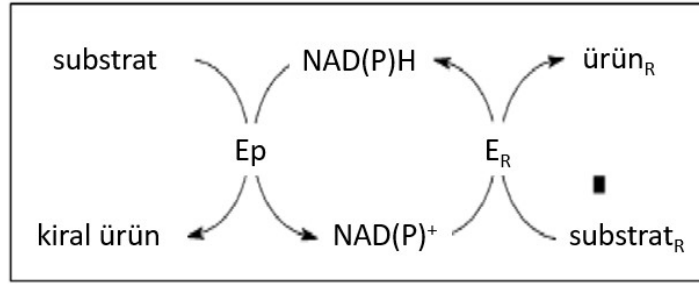


Şekil 2.2 FDH tarafından katalizlenen reaksiyon[41]

FDH, D-spesifik 2-hidroksi asit dehidrogenaz süper familyasına mensup bir enzimdir. Bu süper familyanın üyeleri; kuaterner yapıları, içerdikleri prostetik gruplarının tipi ve substrat spesifisiteleri bakımından çeşitlilik göstermektedir [15],[42]. Format dehidrogenazlar aerobik bakteri, arke, maya, fungi, bitki ve omurgalıların yanı sıra anaerobik türlerde de bulunmaktadır [43]. Format dehidrogenazlar, metal bağımlı format dehidrogenazlar ve metal bağımsız format dehidrogenazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar: İlk gruba dahil olan oksidoredüktazlar, optikçe aktif bileşik üretimde kozmetik, farmasötik gibi endüstriler için önemli biyokatalizörlerdir. İkinci gruba dahil olan format dehidrogenazlar ise, aynı iki alt birimden oluşan homodimerler olarak işlev görmektedir ve NAD(P)^+ 'ye karşı yüksek bir özgünlüğü olduğu bilinmektedir [44].

NAD^+ bağımlı format dehidrogenaz enzimi (FDH, EC 1.2.1.2), metilotropik mayalar, bakteriler [42, 45-47] ve bitkiler [11, 19, 48] de dahil olmak üzere birçok organizmada yaygın olarak bulunmaktadır. Karbon ve enerji kaynağı olarak metanol kullanan metilotropik mikroorganizmalar, metanolün CO_2 'ye oksidasyonundaki terminal basamağı katalizleyen NAD^+ bağımlı format dehidrogenaza sahiptir. Metanol kullanan bakteri ve mayalarda FDH, hücrenin enerjisine katkıda bulunurken, patojenik bakteri ve mantarlarda FDH bir stres proteini olarak görev yapmaktadır [49]. Bitki FDH'leri ise formatın karanlıkta oksidasyonundan sorumlu olduğu gibi demir eksikliği ve farklı anaerobik stres koşullarında da ekspresyonu artmaktadır [50].

NAD^+ bağımlı format dehidrogenazlar; CO_2 'in formata oksidasyonunu katalizlerken, NAD^+ 'i NADH 'e indirgeme sayesinde, NAD(P)H -bağımlı oksidoredüktazların kullandığı ve oldukça pahalı bir koenzim olan NAD(P)H 'in rejenerasyonu için optikçe saf ürün sentezinin önemli olduğu farmasötik, gıda, kozmetik ve tarım endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [15, 20].



Şekil 2.3 NAD(P) rejenerasyonu [15]

Şekil 2.3'te, ana enzim E_p (dehidrogenaz, redüktaz, monoksigenaz, vb.) kofaktörü indirgeyerek kiral bileşiğin üretimini katalizlerken, ikinci enzim E_R (format dehidrogenaz) koenzimin oksidasyonu ile tekrar NAD(P)H'ye indirgemektedir. Uygun şartlarda, aynı enzim her iki reaksiyonu katalizleyebilmektedir [51-53].

Format dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonlar, hidrit iyonunun substrattan asit-baz katalizi aşamaları olmadan, NAD⁺'nin nikotinamid parçasının, C4 atomuna doğrudan aktarılarak; hidrid iyon transferinin genel mekanizmasını araştırmak için uygun bir model olmaktadır [54].

Bu özellikleri ile NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlar, optikçe saf kiral bileşiklerin enzimatik sentezinde gerekli ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'ın yeniden eldesi, atmosferik CO₂'in tutulmasında kullanılırken, tersinir çalışarak CO₂'den hidrojen yakıtının stabilize edilmiş bir formu olan formik asit üretilmesi, ortamdaki formik asit miktarının belirlenmesi gibi biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir enzim olduğu bilinmektedir [20].

2.1.1 Bitkisel NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenazlar

İki özdeş alt birimden oluşan format dehidrogenazlar, proteolitik gruplar ve metal iyonlar içermemektedir. NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlar; bakteriler, mayalar, mantarlar ve bitkiler gibi birçok farklı organizmada (patojenik olanlar dahil) bulunmaktadır. Bakteriyel FDH'ler sitoplazmada bulunurken, bitki FDH'leri mitokondride bulunmaktadır. Bitkide format dehidrogenaz aktivitesi ilk olarak 1921 yılında fasulye (*Phaseolus vulgaris*) 'de keşfedilmesine rağmen bitki kaynaklı FDH'ler ile yapılan çalışmaların mikroorganizma kaynaklı FDH'lere göre oldukça az olduğu görülmektedir [23, 55].

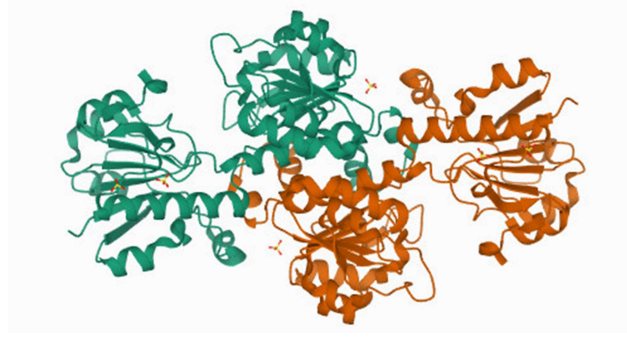
FDH'lerin aktif ve sistematik çalışması 1970'lerin başında başlamış ve bakteriyel çalışmalar odaklı olarak sürdürülmüştür. Metanol kullanan bakteri ve mayalarda FDH, enerji metabolizmasına katkı sağlarken, son çalışmalar, patojenik mikroorganizmalara benzer şekilde, bitkilerde FDH'in stres proteinleri olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde FDH sentezi, kuraklık, ani sıcaklık değişimi, UV ışını, kimyasal ajanlar [50, 56, 57], hipoksi [58] ve patojenik mikroorganizmalar [17] ile artmaktadır.

Mitokondride bulunan bitki FDH'leri, hücre içindeki çözünür proteinlerin küçük bir bölümünü oluşturmaktadır. Bir enzimin doğrudan bitkilerden izole edilmesi, emek isteyen ve zaman alıcı bir işlemdir. Bitki FDH'leri çoğunlukla çok kararlı değildir, bu da izolasyon sırasında enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, ortaya çıkan FDH'lerinin spesifik aktivitesi beklenenden çok daha düşüktür. Bitki FDH'i ilk kez 1951'de bezelye ve fransız fasulyesinden saflaştırılmıştır [59]. 1983 yılında, soya fasulyesinden (*G.max*) büyük miktarda FDH ekstrakte edilmiş ve bitki FDH'in amino asit kompozisyonunun belirlenmesi sağlanmıştır [60].

1993'ten bu yana patates [48], arpa [50], pirinç [61] ve *A. thaliana* [19, 62] olmak üzere sadece birkaç FDH'in cDNA'sı klonlanmıştır [63]. Bitki kaynaklı FDH cDNA'larının *E. coli* konakçı hücresinde ekspresyonu çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır [48]. *E. coli* hücrelerinde mitokondriye taşıma sistemi olmadığından bitki kaynaklı FDH enzimini kodlayan cDNA'dan mitokondriyal sinyal peptidini kodlayan dizinin silinmesi ile ilk kez *E.coli*'de aktif ve çözünür FDH enzimi elde edilebilmiştir. Ancak protein içeriği hücre içindeki tüm proteinlerin yaklaşık %0.01'i olabilmıştır [23, 61].

Kültür koşullarının optimizasyonundan sonra, *A. Thaliana* (Şekil 2.4) ve *G. max*'den izole edilen rekombinant FDH verimi, besiyerinin 500-600 mg/L'sine ulaşabilmiştir [15]. Böylelikle, bitki FDH'lerinin sistematik çalışmaları için gerekli tüm koşullar sağlanmıştır. Adreadeli ve arkadaşları (2009) *L. Japonicas*'dan izole ettikleri FDH genini *E. coli*'de verimle eksprese ettiklerini bildirmiştir [58]. Kurt-Gür ve Ordu (2018)'nin pamuk (*Gossypium hirsutum*) FDH'i ile yaptıkları çalışmada, % 87.3 oranda verimle protein elde edilerek *Gossypium hirsutum* FDH enziminin biyoteknolojik potansiyeli gösterilmiştir [21].

Soya fasulyesi FDH'nin, optikçe aktif bileşiklerin sentezinde kullanılan NAD(P)H rejenerasyonu için oldukça verimli bir biyokatalizör olmayı vaat ettiği öngörülmüştür [23]. Yayınlanan veriler, bitki FDH'leri özellikle çeşitli stres etmenlerine yanıt olarak oluştuğu için son derece önemlidir. FDH'lerin biyosentez düzenlemesi ve fizyolojik rolü karmaşıktır ve şimdiye kadar tam anlamıyla aydınlatılmamıştır. Bu enzimlerin yapı ve işlev çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır. Bu çalışmaların sonuçları, temel bilimler için büyük önem taşımakla birlikte, FDH'nin yüksek aktiviteye sahip mutant formlarının üretilmesi, strese karşı geliştirilmiş dayanıklı bitkiler tasarlamak için de yeni yaklaşımlar getirmektedir.



Şekil 2.4 *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen NAD-bağımlı format dehidrogenaz enziminin X-ray kristalografi ile elde edilmiş 3 boyutlu yapısı (AtFDH) [64]

2.2 Proteinlerin Kararlılığı

Protein kararlılığından peptit omurgasındaki kovalent bağlar, disülfid köprüleri, amino asitlerin birbirleri ile ve su molekülleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimler sorumludur. Kovalent olmayan etkileşimler, van der Waals, hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarının kümülatif etkisidir. Bu kuvvetlerin toplamı, bir proteinin yapısal kararlılığı olarak bilinir. Termodinamik olarak protein doğal yapısından, katlanmamış yani yapısal olmayan polipeptid zincir formuna geçiş için Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG) olarak tanımlanmaktadır [41, 65].

2.2.1 Oksidatif Kararlılık

Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ile doğrudan veya oksidatif stresin yan ürünleri ile dolaylı reaksiyonlarla indüklenen, proteinin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. ROS, serbest radikaller ($\bullet OH$, $O_2\bullet-$, $RS\bullet$ ve $ROO\bullet$), radikal olmayan türler (H_2O_2 ve $ROOH$) ve reaktif aldehytler ve ketonları

içermektedir [66]. ROS, hem amino asit yan zincirlerinde hem de protein iskeletinde oksidasyona neden olarak protein parçalanmasına veya protein-protein çapraz bağlarına neden olabilmektedir. Proteinlerin oksidasyonu; konformasyon, yapı, çözünürlük, proteolize duyarlılık ve enzim aktiviteleri dahil olmak üzere fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir. Oksidatif stres, oksidant seviyesinin, organizmadaki antioksidant sisteminin ROS'u uzaklaştırma kapasitesini aştığında ortaya çıkmaktadır [67, 68]. ROS ve bir dizi başka reaktif bileşik, aerobik metabolizmanın bir sonucudur. Bu reaktif bileşikler, proteinler, lipitler ve DNA ile reaksiyona girerek, bunları değiştirebilir [69-71]. Bu tür değişiklikler, insanlarda dejeneratif hastalıklara ve yaşlanmaya neden olabilir [72].

Bitkilerde biyotik veya abiyotik stres koşullarında ile ROS bileşiklerindeki artış, antioksidant sistemi aştığında oksidatif stres oluşabilmektedir. Stres altında elektronlar, asıl hedefleri yerine oksijene taşınmaktadır. Bu şekilde başlayan zincirleme reaksiyonlar ile dokularda ROS bileşikleri birikmektedir. Bu sebeple, stres koşullarında yan bir stres olarak ortaya çıkan oksidatif stres, tarımsal verimliliği tehdit eden en önemli unsur olarak kabul edilmektedir ve bitkilerde önemli ölçüde verim kaybına sebep olabilmektedir. Bitkilerde oksidatif stresin kaynağının çoğu zaman H_2O_2 'in olduğu varsayılmaktadır. Hidrojen peroksidin oksitleme gücünün zayıf olmasına rağmen doğrudan sülfidril grupları ile etkileşime girerek fruktoz bifosfataz vb. enzimleri inaktif ettiği bildirilmiştir [73].

Tüm amino asitler, ROS tarafından oksitlenebilmektedir. Fakat sistein ve metionin aminoasitleri, içerdikleri sülfür grubundan dolayı oksidasyon seviyesi yüksek olduğu bilinmektedir. Sisteinin, radikal oksidan ile tek elektronlu oksidasyonu sonucu tiyil radikalleri oluşabilmektedir [74, 75]. Sistein ve oksidanlar arasındaki iki elektronlu oksidasyonu sonucu, sülfenik asit (CysSOH), sülfonik asit (CysSO₂H) ve sülfonik asit (CysSO₃H) oluşabilmektedir [76]. Bu türler kararsız olmakla birlikte hidroliz reaksiyonları ile oksiasitler veya başka bir tiyol grubu ile reaksiyona girerek disülfid bağları verebilmektedir [77]. Benzer şekilde, metionin bakiyeleri, çeşitli oksidan türleri tarafından kolayca oksitlenebilmektedir. Metionin oksidasyonu sonucu oluşan ürün, sülfona oksitlenebilen sülfoksittir [78, 79]. Metionin sülfoksit, metionin sülfoksit redüktaz enzimi, merkaptoetanol ve ditiyotreitil gibi indirgeyici reaktifler ile metionine geri çevrilebilir [80, 81].

2.2.2 Termal Kararlılık

Termofilik organizmalar, 120 °C'ye kadar sıcak ortamlarda yaşayabilmek için evrimleşmiş organizmalardır. Bu moleküller, ekstrem koşullar altında kararlılıklarını ve fonksiyonlarını korumak için farklı stratejilerle evrimleşmiştir. Protein mühendisliği uygulamaları doğayı taklit ederek, mezofilik proteinlere, ekstremofilik proteinlerin özellikleri kazandırılarak kararlılıkları geliştirilebilmektedir [65, 82].

Endüstriyel üretim süreçlerin başlıca sorunlardan biri katalitik aktivitesi yüksek enzimlerin yüksek sıcaklıklarda denatüre olarak aktivitesinin azalması ve zamanla aktivitesini kaybetmesidir. Bu yüzden termofilik canlılardan (*Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* vb.) izole edilen enzimler yüksek sıcaklıklarda muamele edilmesi gereken uygulamalar için ideal enzim adaylarıdır. Örnek olarak moleküler biyoloji sektöründe sıklıkla kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu katalizleyen DNA polimeraz enzimi bir termofilik bir proteindir. Fakat termofilik canlılarla çalışmak zordur. Bu yüzden çalışılması nispeten daha kolay mezofilik canlılardan izole edilen proteinler, termofilik özellikler kazandırarak proteinlerin termal kararlılık seviyelerinin arttırılması hedeflenmektedir. Bu özellikler çalışılan proteine göre değişse de literatürdeki çalışmalar; termofilik proteinlerde van der Waals etkileşimlerinin, hidrojen bağlarının, tuz köprülerinin, dipol-dipol etkileşimlerinin fazla olduğu ve disülfid köprülerinin, hidrofobik etkileşimlerinin ve yüzeyde kısa loop yapılarının olduğunu göstermektedir [41, 83-85].

2.3 Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, istenen işlevleri elde etmek için yeni proteinlerin sentezini veya mevcut protein dizisinde / yapısında değişiklik yapılmasını içermektedir. Yeni protein tasarım algoritmaları, yapısal biyoinformatiğin ilerleyişı, moleküler kuvvet alanları ve 3D protein yapısı ile ilgili bilgilerin artması, protein mühendisliği uygulamaları için hesaplamalı yaklaşımların kullanılmasını mümkün kılmıştır [86].

Proteinlerin özelliklerinin geliştirilmesi ya da değiştirilmesi için genel olarak iki ana protein mühendisliği yaklaşımı olan rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrim kullanılmaktadır. İlk yaklaşım olan rasyonel tasarımda, protein yapısı bilgisi kullanılmaktadır ve protein yapı iskeletlerini (örneğin biyokatalizörün aktif bölgesi) modifiye etmek için bölgeye yönlendirilmiş mutagenез kullanılmaktadır. Bu yaklaşım için, hedef proteinin amino asit dizi bilgisi ve protein yapı bilgisi gerekmektedir. İkinci yaklaşım, yönlendirilmiş evrim olarak adlandırılmaktadır. Yönlendirilmiş evrim, çok sayıda rastgele mutagenез veya rekombinasyon ardından mutant kütüphanesinin taranmasını içermektedir [87]. Yönlendirilmiş evrimde, protein yapısının bilgisi gerekli değildir. Yönlendirilmiş evrimin problemi, fonksiyonel dizi bilgisinin sınırlı olmasından dolayı örneklemelerin veriminin az olmasıdır. Bununla birlikte, kısmi yapısal bilgi mevcut ise üçüncü bir protein mühendisliği yaklaşımı olarak tanımlanan yarı rasyonel dizayn (bölge doyurulmuş mutagenез) uygulanabilmektedir. Bölge doyurulmuş mutagenезin avantajı rastgele mutasyonları bir bölgede sınırlayarak taranması daha kolay akıllı kütüphanelerin oluşturulabilmesidir [14].

2.3.1 Rasyonel Dizayn

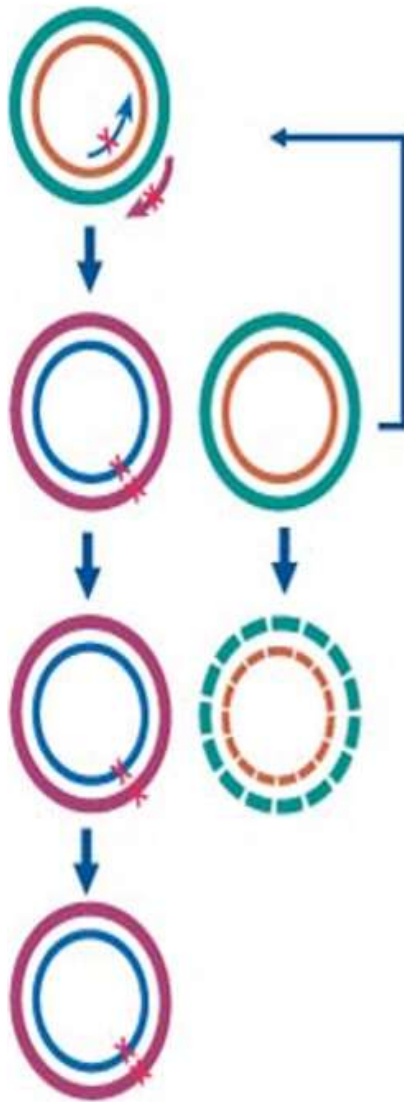
Rasyonel dizayn yaklaşımında, bilgisayar tabanlı modelleme ve biyoinformatik bilgisi ile proteinin yapısal ve işlevsel özelliklerini belirlenebilmekte ve hedeflenen bölgelerde mutasyon gerçekleştirilebilmektedir. Bu hesaplamalı yöntem yaklaşımında hedeflenen proteinin amino asit dizi bilgisi, yapısı ve fonksiyon bilgisi gerekmektedir. Rasyonel dizayn ile yapılan değişiklik, insersiyon, delesyon ya da inversiyon olabileceği gibi nokta mutasyonu ya da kaset mutasyonu da olabilmektedir. Rasyonel dizayn yapılırken istenilen değişiklikler, proteine PCR tabanlı bir yöntem olan bölgeye yönelik mutagenез yöntemi ile sokulmaktadır [88, 89].

2.3.1.1 Bölgeye Yönelik Mutagenез

Bölgeye yönelik mutagenез, bir genin DNA dizisinde ve herhangi bir gen ürününde spesifik değışiklikler yapmak için kullanılan PCR işlemine dayalı bir moleküler biyoloji yöntemidir. Bölgeye özgü mutagenез DNA, RNA ve protein moleküllerinin yapısını ve biyolojik aktivitesini araştırmak için de kullanılmaktadır [90].

Bölgeye özgü mutagenез için temel prosedür şöyledir: istenen mutasyonu içeren kısa sentetik oligonükleotit, kalıp DNA'nın tamamlayıcısıdır, böylece ilgilenilen gendeki DNA ile hibridize olabilmektedir. Mutasyon, tek bir baz değışikliği (bir nokta mutasyonu), çoklu baz değışiklikleri, delesyon veya insersiyon içerebilmektedir. Tek iplikli primer daha sonra genin geri kalanını kopyalayan bir DNA polimeraz kullanılarak uzatılır. Bu şekilde çoğaltılan gen, mutasyona uğramış bölgeyi içerir ve daha sonra bir vektör yardımıyla hücreye sokulur ve klonlanır. Son olarak, istenen mutasyonu içerip içermediklerini kontrol etmek için DNA dizi analizi ile gen dizisi kontrol edilir [91].

Kunkel's metot [92], kaset mutagenез [93], PCR tabanlı bölgeye yönelik mutagenез [94], "Whole Plasmid" mutagenез [95] olmak üzere çeşitleri mevcuttur. Bu yüksek lisans tezinde de kullanılan PCR tabanlı bölgeye yönelik mutagenез (Şekil 2.5) yönteminin protokolü kısaca şöyledir: İstenilen mutasyon(lar), kalıp plazmiti çoğaltan bir PCR protokolü ile primerler (istenen mutasyona sahip) kullanılarak plazmitlere sokulmaktadır. Kalıp DNA, metilasyona bağımlı bir endonükleaz (DpnI) kullanılarak kesilerek bakteriye, nükleaza dirençli plazmit (PCR ürünü) aktarılmaktadır. Plazmitler, elde edilen kolonilerden izole edildikten sonra istenilen mutasyon için taranmaktadır. Son olarak pozitif kolonilerde, hedeflenen mutasyonun varlığını ve ek mutasyonların olup olmadığını kontrol etmek için DNA dizi analizi yapılmaktadır [96].



1. Mutant Zincir Sentezi

- Kalıp DNA denatüre edilir.
- İstenilen mutasyona sahip mutajenik primerler kalıp DNA'ya bağlanır.
- 'High Fidelity' enzim ile primerler uzar ve reaksiyon sonlanır.

2. Kalıp DNA'nın *DpnI* Enzimi ile Kesimi

- DpnI* enzimi ile metillenmiş parental DNA kesilir.

3. Transformasyon

- Mutasyon içeren plazmitler, kompetent hücrelere aktarılır.

Şekil 2.5 PCR tabanlı bölgeye özgü mutagenез metodu [97]

2.4 Homoloji Modelleme

Homoloji modellemesi, birden çok adımdan oluşan bir yapı tahmin yöntemidir ve küçük farklılıklar içeren ortak prosedürlere sahiptir. Homoloji modelleme, 3 boyutlu yapısı belirlenmemiş proteinlerin yapısını tahmin etmek için en doğru ve güvenilir hesaplama yöntemidir. Homoloji modellemesi, sorgulanan proteininin üç boyutlu yapısını, kalıp proteinler ile dizi hizalaması yoluyla tahmin etmektedir. Genel olarak, homoloji modelleme yöntemi: hedef tanımlama, dizi hizalama, model oluşturma ve model geliştirme olmak üzere 4 adımdan oluşmaktadır [98]. Homoloji modelleme basamakları Şekil 2.6'da özetlenmiştir.



Şekil 2.6 Homoloji modelleme basamakları [99]

Homoloji modellemesi için bu yüksek lisans tezinde SWISS MODEL sunucusu kullanılmıştır. SWISS-MODEL’de homoloji modelleme için gerçekleştirilmesi gereken ana basamakların sırası şöyle olmaktadır: Sorgulanan hedef proteinin dizisi FASTA, Clustal veya düz metin formatında girilmektedir. Hedeflenen proteinin dizisi, veri tabanında sorgulanarak, homolog proteinler yüzdesel olarak en yüksek eşleşmeye sahip olandan düşük olana doğru sıralanmaktadır. Planlanan çalışmaya göre, yüzdesel olarak yüksek homoloji gösteren protein(ler) kalıp olarak seçilmektedir ve seçilen her kalıp için korunmuş amino asitlerin koordinatları aktarılarak, 3 boyutlu protein modeli sunucu tarafından otomatik olarak oluşturulmaktadır. Oluşturulan modellerin, model kalite tahmin skoruna bakarak oluşturulan modelin doğruluğuna ilişkin yorum yapılabilir[100].

Tablo 2.1’de verilen modelleme araçlarının avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bu araçları karşılaştırmak için; aynı veri kümesine karşı, aynı süre zarfında, tamamen aynı parametre kümesini kullanarak test edilmektedir. CASP (Protein Yapısı Tahmininin Kritik Değerlendirmesi), 1994’ten bu yana iki yılda bir gerçekleşen protein yapısı tahmini için dünya çapında bir deneydir [101]. CASP, yapı tahmin yöntemlerini objektif olarak test etme ve protein yapı modellemesindeki son teknolojiyi bağımsız bir şekilde değerlendirme fırsatı sunmaktadır. CASP’nin birincil amacı, amino asit dizisinden proteinin üç boyutlu yapısını belirleme yöntemlerini geliştirmeye yardımcı olmak olsa da CASP sayesinde, mevcut araçlarda büyük iyileştirmeler yapılmıştır. Ayrıca, CAMEO topluluk projesi [102] LiveBench [103] ve EVA [104, 105] otomatikleştirilmiş yapı tahmin sunucularının sürekli olarak değerlendirmesini sağlayan diğer kaynaklardır [106].

Tablo 2.1 Popüler homoloji modelleme araç ve sunucuları[99]

Homoloji Modelleme Sunucuları ve Araçları	Açıklama
MODELLER	Uzamsal kısıtlama yöntemi ile proteinlerin 3 boyutlu yapısını oluşturan bir homoloji modelleme aracıdır. Ücretsiz erişilebilir, güçlü özelliklere sahiptir ve güvenilir sonuçlar verir.
I-TASSER	Protein yapı tahmini için internet bazlı hizmet sağlayan bir sunucudur. CASP deneyinin sunucular bölümünde en iyi yöntemlerden biri olduğu görülmüştür.
SWISS-MODEL	Proteinin, amino asit diziliminden 3D yapısını veren bir sunucudur. Web arayüzü kullanışlıdır. Bu sunucu, en uygun şablonu seçmek için model kalite tahminini kullanır ve tahmini oluşturulan modellerin doğruluğunu verir.
MOE	Segment eşleştirme ve ekleme veya silme bölgeleri yaklaşımlarının modellemesinin bir kombinasyonudur. 3D yapı tahminine ek olarak, gelişmiş loop modelleme, gelişmiş hizalama yöntemleri ve güçlü hizalama görselleştiricisi ve düzenleyicisine sahiptir.
PHYRE2	Bu modelleme, 3D yapılar oluşturmak için çeşitli tespit araçları kullanır. Protein amino asit dizileri arasında ligand bağlanma tahmini ve varyant analizi gibi özel özelliklere sahiptir.
HHPRED	Bu araç, profil gizli Markov modellerinin (HMMs) tekli veya çoklu sorgu dizisinden, ikili karşılaştırma yaparak 3D yapılar oluşturur.
ROBETTA	ROSETTA parça ekleme yöntemine dayanarak, protein bölgesinin hem başlangıç hem de homoloji modellerini verir.
PMP	PMP, model oluşturma ve kalite değerlendirmesi için etkileşimli arayüz sağlar.
ICM	Doğruluğu yüksek 3 boyutlu yapı veren homoloji modelleme araçlarından biridir. Özellikleri arasında hızlı model oluşturma, loop tahmini, model doğrulama ve iyileştirme bulunur.

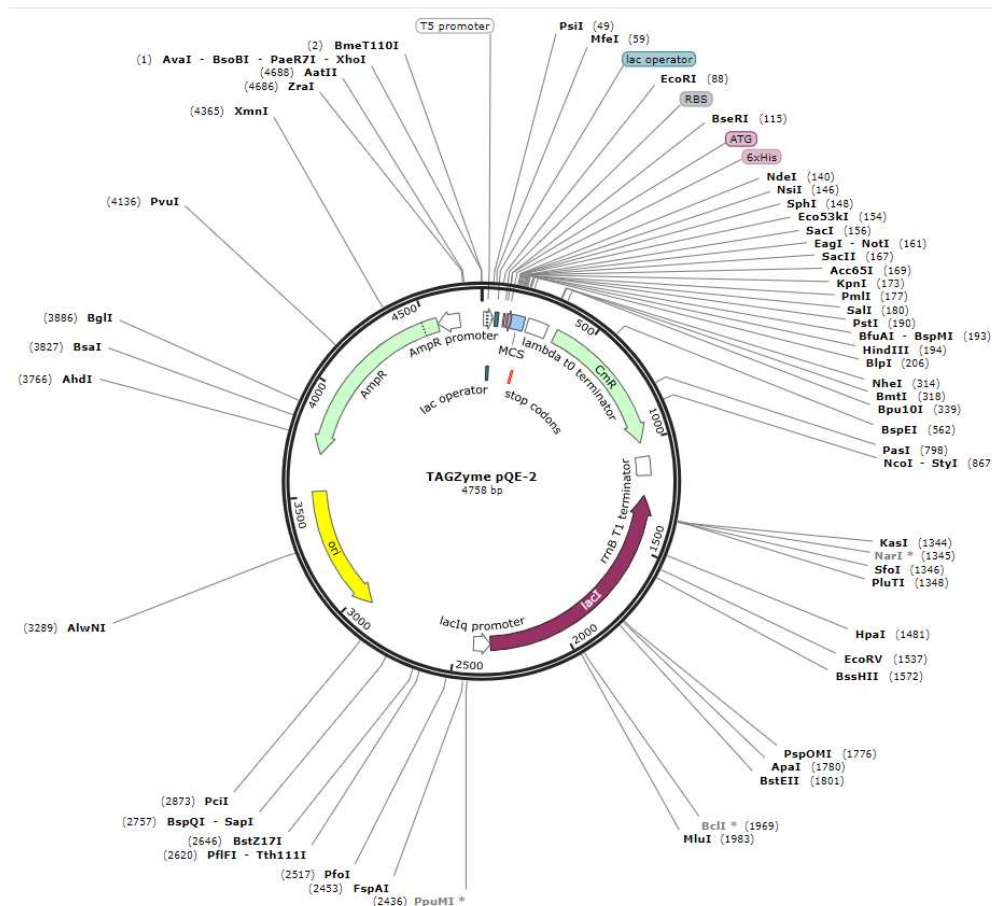
Tablo 2.1 Popüler homoloji modelleme araç ve sunucuları (devamı) [99]

PRIME	Doğru protein yapısı tahmini için güçlü bir pakettir. Yüksek doğrulukta yapı oluşturmalarının yanı sıra gelişmiş simülasyon sağlar. Homoloji modellemesini ve katlanmayı doğrulamasını bir paket halinde birleştirir. Kullanımı kolay bir arayüze sahiptir.
SCWRL4	İyi doğrulukta hızlı ve kullanımı kolay bir araçtır.
INTFOLD	Yapı içi bozuklukları, domainleri ve protein-ligand bağlanma alanlarını tahmin eden bağımsız bir sunucudur.

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör

Bu çalışmada kompatent hücre olarak ticari bakteri suşu kullanılmıştır [DH5 α -T1 *E. coli* (F ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk -, mk +) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA) (Invitrogen) ticari kompatent hücre]. GhFDH geni, pQE-2 vektörüne (Şekil 3.1) klonlanmış ve stok hücre olarak sağlanmıştır.



Şekil 3.1 pQE-2 vektör haritası [107]

3.1.2 Mutasyon Primerleri

Tablo 3.1 Hedeflenen amino asitlere özgü tasarlanan mutasyon primerleri

M225	FP: 5'-ATTATTGTCATAAATCTACCTCTAACTGAGAAG-3'
	RP: 3'-TAATAACAGTATTTAGATGGAGATTGACTCTTC-5'
M234	FP: 5'-GAGAAGACAAGAGGGCTATTTGACAAAGATCGG-3'
	RP: 3'-CTCTTCTGTTCTCCCGATAAACTGTTTCTAGCC-5'
M243	FP: 5'-GATCGGATCGCGAAGCTAAAGAAGGGAGTCCTG-3'
	RP: 3'-CTAGCCTAGCGCTTCGATTTCTTCCCTCAGGAC-5'

3.1.3 Kullanılan Kitler

- Plazmit izolasyon kiti Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD (732-2780)
- Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad)

3.1.4 Kimyasal ve Malzemeler

Sodyum hidroksit (NaOH, Sigma Aldrich), hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich), etanol (EtOH, Sigma Aldrich), etilendiamintetraasetik asit (EDTA Sigma Aldrich), quartz küvet (Sigma Aldrich), Tris (Sigma Aldrich), Agaroz (Sigma Aldrich), Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NEB), sodyum format (MERCK), 1 kb DNA Markör (NEB).

3.1.5 Kullanılan Besiyerleri

- Luria Broth (LB): 10 g Tripton, 5g Yeast Extract, 10 g NaCl üzerine saf su ilave edilerek 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. pH 7'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Katı LB için sıvı 1L LB'ye 15 g Agar ilave edildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.
- SOC (Super Optimal Broth with added Glycose): 49 ml SOB'ye, 1 ml steril 1 M glikoz solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır.
- TB (Terrific Broth) besiyeri: 1 litre için; 12 g tripton, 24 g maya ekstratı ve 4 ml gliserol 900 ml distile su içerisinde çözündürülüp ve 121 °C'de 1,5 atm

basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan sonra besiyerinin sıcaklığı 60 °C' ye düştüğünde 100 ml steril potasyum fosfat tamponu (100 ml için; 2,31 g KH₂PO₄ ve 12,54 g K₂HPO₄.) ilave edilmiştir.

3.1.6 Kullanılan Tampon Çözeltileri

- 10X TBE Tamponu: 54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.3), 1 L saf su ile tamamlanmıştır.
- DNA yükleme boyası: 250 mM Tris-HCl pH 7.5, %0,2 bromfenol mavisi, %0,2 ksilen siyanol ve % 40 gliserol karıştırarak elde edilmiştir.
- Etidyum bromür stok solüsyonu (EtBr): 5 mg/ml EtBr'e steril saf su ilave edilmiştir.
- Ampisilin: 100 mg/ml stok solüsyon hazırlandı ve 0.22 µm membran filtre ile sterilize edilmiştir.
- IPTG (Isopropyl-B-D-thiogaltpyranoside): 1M stok solüsyon hazırlanarak ve 0.22 µm membran filtre ile sterilize edilmiştir.
- Potasyum fosfat tamponu (pH 7; 1M; 1L): 20,1 g K₂HPO₄ ve 11,51 g KH₂PO₄ tartılıp, distile suda çözündürülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
- Protein saflaştırma tamponları:
 - Bağlanma tamponu (pH 8): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol içermektedir.
 - Yıkama tamponu (pH 8): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol içermektedir.
 - Elüsyon tamponu (pH 8): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol içermektedir.

3.1.7 Kullanılan Enzimler

- DpnI endonükleaz (Thermo Fisher Scientific 500 U)
- Platinum® Taq High Fidelity DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific 11304011)

3.2 Metot

3.2.1 Homoloji modelleme

Rekombinant GhFDH geni, 348 amino asit içeren 38.65 kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır. Homodimerik yapıdaki GhFDH enzimi M126, M214, M225, M234, M243, M258, M294, M299, M321 olmak üzere 9 metionin amino asidi içermektedir. Şekil 4.2’de homoloji modellemede kalıp amino asit dizisi olarak kullanılan ligand bağlanmış NAD⁺ bağımlı *Arabidopsis thaliana* format dehidrogenaz (AtFDH, PDB ID: 3N7U, resolution 2.0 Å) enzimi ile GhFDH’in amino asit homolojisi ve metionin bakiyeleri gösterilmektedir.

Rekombinant GhFDH’in 3- boyutlu yapı modeli, SWISS-MODEL aracılığı ile %87,6 dizi benzerliği gösteren *Arabidopsis thaliana* format dehidrogenaz apo-form AtFDH (pdb kod: 3NAQ_A, çözünürlük 1.70 Å) ve ligand bağlanmış AtFDH (pdb kod: 3N7U, çözünürlük 2.0 Å) kalıp olarak kullanılarak elde edilmiştir.

SWISS-MODEL’da oluşturulan homoloji modeli kalıp olarak kullanılarak PyMOL 2.4’te yüzey metionin bakiyelerinin birbirlerine ve NAD⁺’a ve olan uzaklıkları belirlenmiştir (Şekil 4.5).

Çalışmamızda 9 metionin (Met) amino asit bakiyesi arasından protein yüzeyinde bulunduğu tespit edilen M225, M234 ve M243 pozisyonları hedef alınmıştır. Bu pozisyonlardaki metionin amino asitleri bölgeye yönlendirilmiş mutagenез yöntemi kullanılarak oksidasyona karşı dayanıklı amino asitlerden biri olan lösin (Leu) ile yer değiştirilmiştir. Yabanıl tip ve mutant GhFDH’lerin kinetik özellikleri, termal ve oksidatif kararlılıkları analiz edilerek metionin oksidasyonunun GhFDH enzimin inaktivasyonundaki etkisi incelenmiştir.

3.2.2 Bölgeye Yönlendirilmiş Mutagenез

Hedeflenen mutasyonlar için tasarlanmış sentetik oligonükleotidler (Tablo 3.1) kullanılarak, PCR aracılığıyla GhFDH’nin yüzeyinde 225, 234 ve 243 pozisyonlarında bulunan Met/Leu değişimi gerçekleştirilmiştir. Mutasyon PCR’ları için kalıp olarak pQE-2 TAGZyme ekspresyon vektörüne klonlanmış his-kuyruklu yabanıl tip GhFDH geni kullanılmıştır. GhFDH’nin lineer plazmidini elde etmek için PCR reaksiyonu tablo 3.2’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Mutasyon PCR’ı için 50 ng kalıp DNA, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM ileri ve geri mutasyon primerleri ve 1 ünite Platinum®

Taq High Fidelity DNA polimeraz kullanılmıştır. PCR ürünleri, %0,8 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, 37°C'de 4 saat boyunca 10 ünite *DpnI* endonükleaz (Thermo Fisher Scientific 500 U) ile inkübe edilerek, yabanıl tip GhFDH genlerini elimine etmek için kesilmiştir. *DpnI* endonükleaz inaktivasyonu için 80 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir.

Tablo 3.2 PCR reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	2 dakika	1
94 °C	15 saniye	30
57 °C	30 saniye	
68 °C	5,5 dakika	

3.2.3 Transformasyon

Mutasyona uğramış GhFDH genlerini içeren 5 µl *DpnI* kesim reaksiyon ürününün, kompetent hücrelere transformasyonu, aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

Transformasyon koşulları:

- 5 µl *DpnI* kesim reaksiyonu, buzda erimiş 50 µl kompetent hücreye eklenmiş ve 30 dk inkübe edilmiştir.
- Bakteriler buzdan alınıp 42°C' de 30 saniye inkübe edilmiştir.
- 42°C' den alınan bakteriler, buzda 2 dk inkübe edildikten sonra ve üzerine 1 ml SOC eklenmiştir.
- 37°C'de 1,5 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır
- İnkübasyon süresi bittikten sonra 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatanttan 100 µl kalacak şekilde üst sıvı atılmış, kalan süpernatantla pellet çözdürülmüştür. Ampisilinli LB Agara ekilmiştir. 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

Transformantlar için, 100 µg ml⁻¹ ampicilin içeren Luria – Bertani agarda seçim yapılmıştır.

- Mutasyona uğratılmış konumlar, DNA dizileme analizi ile doğrulanmıştır.

3.2.4 Yabancı Tip ve Mutant GhFDH'lerin Ekspresyonu

pQE-2 ekspresyon vektörü içinde yer alan histidin kuyruklu rekombinant yabancı tip ve mutant GhFDH genleri aşağıdaki koşullarda ekspresyonu sağlanmıştır:

- İlgili vektörü içeren *E. coli DH5α* hücreleri 37 °C' de gece boyu (16 saat) LB besiyerinde 250 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür.
- Gece boyu büyümüş hücre kültüründen 40 ml, ampicilin (100 µg/ml) içeren 800 ml TB besiyerine eklenerek ve 37 °C' de OD₆₀₀ değeri 0.6 ya ulaşana kadar çalkalanarak büyütülmüştür.
- Kültüre son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde, 1M IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) eklenerek GhFDH gen ekspresyonu indüklenmiştir.
- IPTG ile indüklendikten sonra 24 °C'de 24 saat çalkalanarak büyütülmüştür.
- Kültür 4000 g'de 20 dk santrifüj edilerek pellet -80 °C' de saklanmıştır.

3.2.5 Enzimlerin Saflaştırılması

pQE-2 ekspresyon vektörü içerisinde bulunan 6xHis-kuyruğu içeren GhFDH geninin ekspresyonu ve enzimin izolasyonu Ni-NTA rezin kullanılarak Ordu ve ark. (2013)'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir[13]:

- 800 ml'lik kültürden santrifüj edilen hücreler, 12 ml bağlama tamponu içerisinde süspanse edildikten sonra 1 mg/ml oranında lizozim eklenip ve 30 dk buzda çalkalamalı inkübasyona tabi tutulmuştur.
- O sırada 500 ml Ni-NTA rezine 2,5 ml bağlama tampon eklenip ve buzda çalkalamalı inkübasyona tabii tutulmuştur.
- Lizozime maruz bırakılmış kültür, inkübasyon sonrası 200-300 W'de 1 dakika (10 sn vuruş-10 sn duruş) sonikasyon yapılmıştır.
- Total protein ekspresyonunun belirlenmesi için 50 µl numune ayrılarak SDS-PAGE'de kontrol edilmiştir.
- Kalan hücre süspansiyonu 15000 g'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir.

- Bağlanma tampon içindeki rezin, 1000 xg'de 1 dk santrifüj yapılarak üst faz atılmıştır.
- Rezinin üzerine 12 ml temizlenmiş lizat ilave edilerek 45 dakika boyunca 4 °C'de çalkalanarak rezin ile proteinin reaksiyona girmesi sağlanmıştır (yatay bir çalkalayıcıda 50 devir / dakika).
- Karışım 1000 g'de 1 dakika süreyle santrifüje tabi tutulup resin çöktürülmüştür.
- Pellet haline getirilmiş rezin, 1 dakika süreyle 1000 g'de santrifüj ile 3 ml yıkama tamponu ile iki kez yıkanmıştır.
- His-kuyruklu proteinler 1000 g'de 1 dakika süreyle 6 kere santrifüje edilerek 1 ml'lik elüsyon tamponlarına alınmıştır.
- Elde edilen protein +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Elüe edilen proteinler, SDS poliakrilamid jel (%12 w/v) elektroforezi ile analiz edilmiştir.

3.2.5.1 Ultrafiltrasyon

Enzim saflaştırılması ile elde edilen elüsyon tamponu içinde bulunan 6 enzim fraksiyonu ultrafiltrason tüpüne aktarılmıştır ve üzerine tüpün haznesini dolduracak şekilde 50 mM, pH 7 potasyum fosfat tamponu eklenmiştir. 3000 g'de 30 dk santrifüj edildikten sonra üzerine 2 kez daha potasyum fosfat tamponu eklenerek, santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. En son tüp haznesinde 1 ml kalacak şekilde santrifüje devam edilmiş, kalan 1 ml yeni tüpe alınmıştır. Elde edilen enzimlerin muhafazası +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2 Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonu, Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) kiti kullanılarak Bradford (1976) [108] yöntemi ile belirlenip ve 39 kDa monomer kütlesi kullanılarak monomerik protein konsantrasyonu cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.6 Kararlı Hal Kinetiğinin Belirlenmesi

Kararlı hal kinetik deneyleri, 20 mM pH 7 potasyum fosfat, 1 mM NAD⁺, 0–40 mM format, 0,4 µM enzim içeren bir reaksiyon karışımında Shimadzu 1800 çift ışınlı (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan NADH üretimi, 340 nm'deki

absorpsiyon artışı ile izlenmiştir [14]. 3 tekrarlı ölçümlerden elde edilen veriler, “Grafit 5 Kinetics” yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.7 Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Protein örneklerinin termal kararlılığı, üç tekrarlı olarak 25 °C ile 70 °C arası sıcaklıklarda (5 °C aralıklarla), 20 dakika inkübe edildikten sonra 340 nm'de NADH üretimi ölçülerek belirlenmiştir. Aktivite ölçümleri; 10 mM format, 1 mM NAD⁺ ve 0.4 µM enzim 20 mM pH 7 potasyum fosfat içeren reaksiyonda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Optimum koşullardaki aktiviteyi %50 azaltmak için gereken sıcaklığı gösteren T_{0.5} değeri, “Grafit 5 Kinetics” yazılımı kullanılarak sıcaklığa karşı kalan aktivite grafiğinden belirlenmiştir.

3.2.8 Oksidatif Kararlılığının Belirlenmesi

Oksidatif kararlılığın belirlenmesi deneyinde inaktivasyon madde olarak hidrojen peroksitin kullanılmıştır. Hidrojen peroksit kullanılmasının 3 ana nedeni: Hidrojen peroksit küçük bir moleküldür ve hem yüzey tiyollerini hem de protein globülünün içinde bulunanları okside edebilmektedir [109]. Hidrojen peroksit, doğal olarak oluşan bir inaktive edici ve sinyal verici bir ajandır. Doğal kökenli ve küçük boyutlu oluşu ile, in vivo FDH kararlılık deneyleri için ideal bir kimyasal maddedir [55]. Stres koşulları altındaki hücrelerde hidrojen peroksit konsantrasyonu artar. Bazı durumlarda, hücredeki FDH konsantrasyonun stres altında önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin; bitkilerde, FDH stres altında mitokondrideki enzim içeriği toplam proteinin %9'a kadar ulaşabildiği bildirilmiştir [110]. Bu da hidrojen peroksit ve FDH enziminin belirli stres koşullarda pozitif korelasyon ilişkisi olduğunu göstermektedir.

Yabanıl tip ve mutant GhFDH enzimleri bir dizi farklı konsantrasyonda (50, 100, 150, 200 ve 300 mM) hidrojen peroksit ile (H₂O₂) muamele edilmiştir. Muamele sonrası enzimler; reaksiyonun içinde 0.4 µM olacak şekilde; 10 mM format, 1 mM NAD⁺, 20 mM pH 7 potasyum fosfat tampon çözeltisine eklenmiştir ve 340 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir. Enzimlerin hidrojen peroksit ile muamelesi, çalkalamalı ısıtıcı blok üzerinde 100 rpm hız ile sürekli olarak çalkalanarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Farklı H₂O₂ konsantrasyonları ile

muamele edilen enzimler, herhangi bir aktivite gözlemlenmeyene kadar 15 dakika aralıklarla ölçülmüştür. Ölçümlerde BioTek Mikroplaka Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Elde edilen veriler ile “Grafit 5 Kinetics” yazılımı kullanılarak, zamana karşı rezidüel aktivite grafiği çizilmiştir. Grafikten, başlangıç aktivitesini %50 azaltmak için gereken süre ($t_{0.5}$) ve k_{in}^{ef} (etkin kinetik inaktivasyon sabiti) değeri belirlenmiştir.

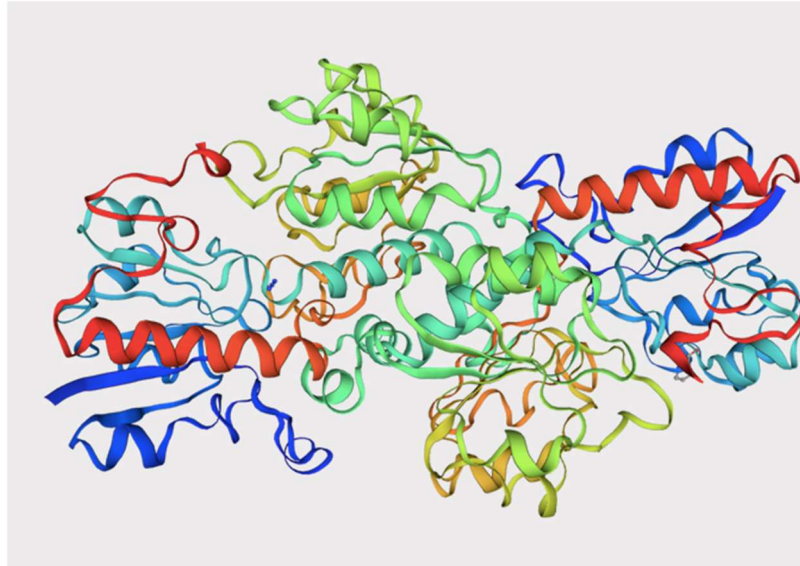
4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuç

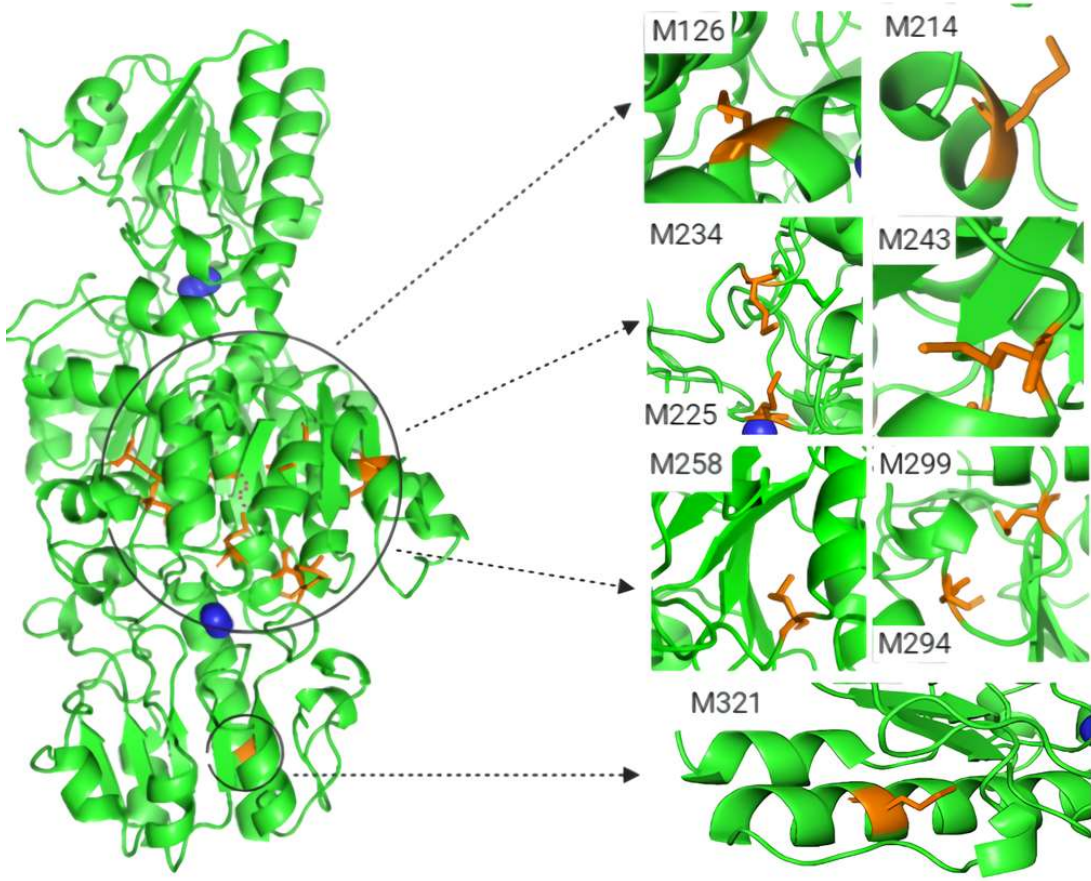
4.1.1 Homoloji Modelleme ve Mutantların Dizaynı

Rekombinant GhFDH'nin homoloji modellemesi, *Arabidopsis thaliana*'dan NAD⁺ bağımlı FDH'in güncel kristal yapısı (Şekil 4.1) kalıp olarak kullanılarak SWISS-MODEL aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Homoloji modelinin, hedef-kalıp eşleşmesine göre “Global Model Kalite Tahmini” skoru 0,97; QMEAN (Niteliksel Model Enerji Analizi) değeri ise 0,58 olarak belirlenmiştir.

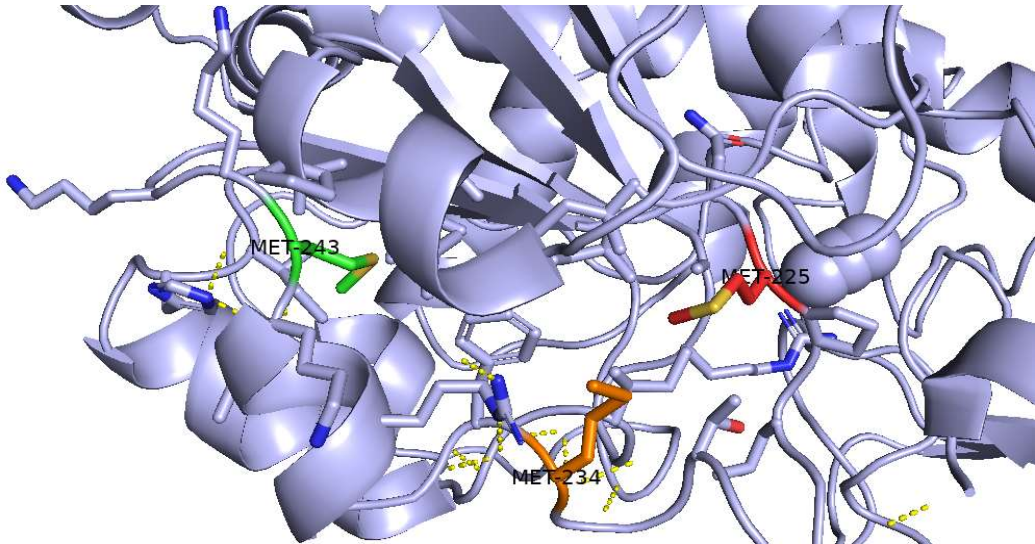


Şekil 4.1 NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (AtFDH, pdb kod: 3NAQ_A, çözünürlük 1.70Å)'ya göre elde edilen GhFDH modeli

348 amino asit içeren rekombinant NAD⁺ bağımlı GhFDH geni, 38.65 kD büyüklüğünde bir protein sentezlemektedir. Homodimer GhFDH enzimi, metal iyonları içermez. Dimer, iki NAD⁺ bağlanma alanı ve katalitik alanda N-terminaldeki küçük bir dimerizasyon sarmalı tarafından tutulmaktadır [111].



Şekil 4.2 NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (AtFDH, pdb kod: 3NAQ_A, resolution 1.70Å)'ya göre elde edilen GhFDH'in 3 boyutlu homoloji modeli üzerinde metionin bakiyelerinin yerleri



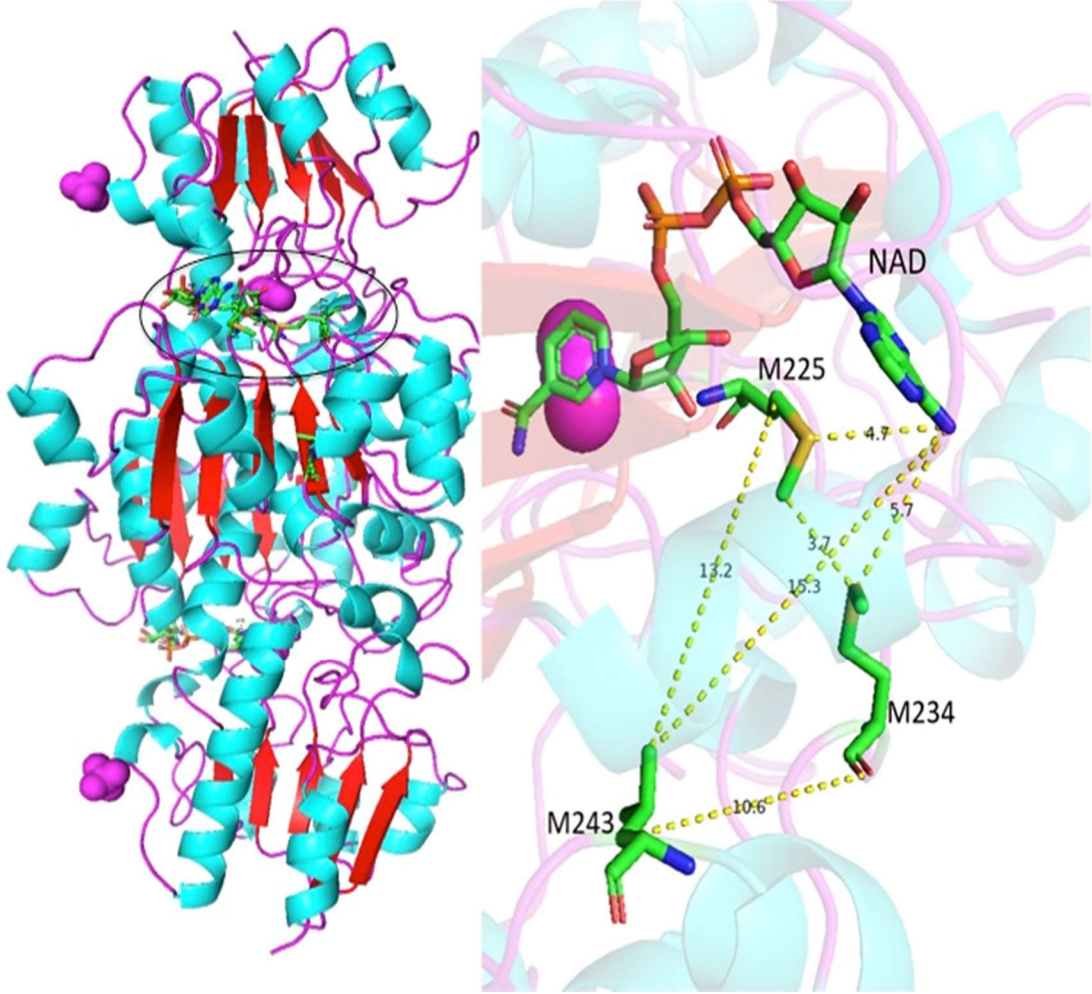
Şekil 4.3 GhFDH'de yüzey metionin amino asitlerinin gösterimi

GhFDH enzimi, her bir alt ünite için M126, M214, M225, M234, M243, M258, M294, M299, M321 pozisyonlarında 9 metionin içermektedir (Şekil 4.2-4.4). Enzimin homoloji modeline göre, protein yüzeyinde bulunan M225, M234 ve M243 pozisyonlarındaki 3 amino asit bakiyesi, lösin ile değiştirilmek üzere seçilmiştir (Şekil 4.3). Mutasyonların kümülatif etkisini anlayabilmek için ikili ve üçlü mutant (M225/243L ve M225/234/243L) tasarlanmıştır.



Şekil 4.4 Homoloji modellemeye kalıp olarak kullanılan ligand bağlanmış NAD⁺ bağımlı *Arabidopsis thaliana* format dehidrogenaz (AtFDH, pdb kod: 3N7U, çözünürlük 2.0 Å) ve GhFDH arasındaki amino asit homolojisi ve metionin bakiyelerinin primer yapıdaki konumları

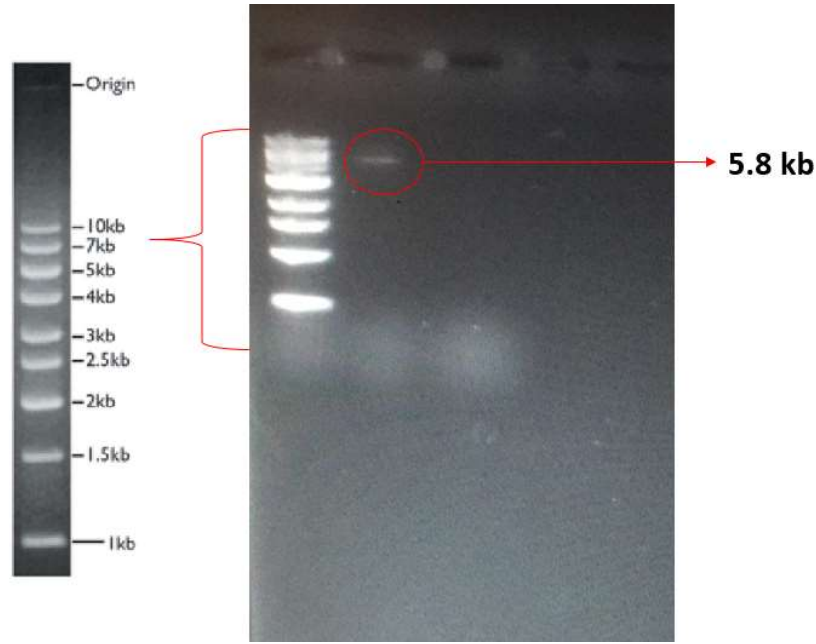
Lösin ile değiştirilmek için seçilen metionin amino asit bakiyeleri (M225, M234 ve M243) NAD⁺ bağlanma alanında bulunmaktadır ve dimerizasyon arayüzünden uzaktır. 3 metioninin NAD⁺'a ve birbirine göre uzaklıkları Şekil 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5 Seçilen 3 yüzey metionin bakiyesinin NAD⁺ 'e ve birbirine göre konumları

4.1.2 Mutasyon PCR'ı ve Mutasyonların Kontrolü

GhFDH geninde hedeflenen mutasyonlar, bölgeye yönlendirilmiş mutagenез işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Mutagenез gerçekleştirildikten sonra elde edilen PCR ürünleri %0,8 agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. M234L'nin agaroz jel görüntüsü şekil 4.6'da gösterilmiştir. Agaroz jel analizinde, 1047 bp büyüklüğündeki GhFDH genini ve bağlı olduğu 4.8 kb büyüklüğündeki pQE-2 vektörünü gösteren toplamda 5.8 kilobazlık beklenen bir bant büyüklüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



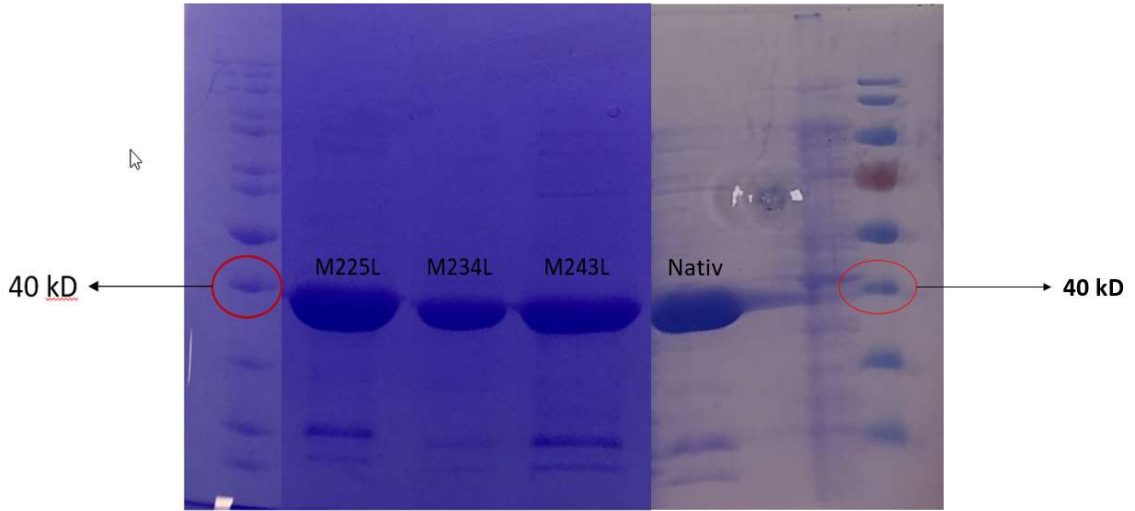
Şekil 4.6 M234'e yönelik mutasyon PCR ürününün, %0,8 agaroz jel elektroforez görüntüsü [Sağ baştan 1. kuyucuk: Marker (BioMarker™ 10kb), 2. kuyucuk: M234L PCR ürünü]

Mutasyon PCR ürünleri, DpnI endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, kesim ürünü, *E.coli* kompetent hücrelerine transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Transformasyon sonrası, ampicilin antibiyotik seçilimi ile büyütülen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerde, mutasyon varlığını kontrol etmek için Triogen Biyoteknoloji firmasına DNA dizi analizi hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. DNA dizi analizi sonrası hedeflenen mutasyonlara dair değişimler gözlemlenen kolonilerden gliserol stok hazırlanarak, enzim karakterizasyon deneyleri için -80 °C'de muhafaza edilmiştir. DNA dizi analizi sonuçlarının analizi Ek A'da verilmiştir.

4.1.3 Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Hedeflenen mutasyon noktaları DNA dizi analizi ile doğrulanmış hücreler, IPTG ile indüklenerek ekspresyonu sağlanmıştır. Ekspresyon gerçekleştiğini doğrulamak için indüklenmiş hücrelerden ayrılan örneğin, SDS-PAGE ile analizi yapılmıştır. Yaklaşık 40 kD büyüklüğünde, beklenen boyutta overeksprese olmuş bant gözlemlenmiştir. Ekspresyon gerçekleştiği doğrulandıktan sonra protein saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma için N-terminalde bulunan histidin kuyruğundan faydalanan afinite saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılmış enzimlerin 6 fraksiyonunu birleştirerek konsantre etmek ve enzim karakterizasyon

deneyleri için enzimi istenilen potasyum fosfat tampon çözeltisi içine alabilmek için ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon sonrası konsantre edilmiş enzim örneklerinin yoğunluğu, Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Saflaştırılan enzimlerin saflığının kontrol edilmesi için SDS PAGE ile analizi yapılmıştır (Şekil 4.7). >%95 saflıkla elde edilen yabancı tip ve mutant GhFDH proteinlerinin ölçülen protein konsantrasyonları, tüm mutantlar için Met/Leu değişimlerinin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde etkilemediği gösterilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Yabancı tip ve mutant GhFDH'lerin ekspresyon seviyeleri

4.1.4 Kararlı Hal Kinetiği

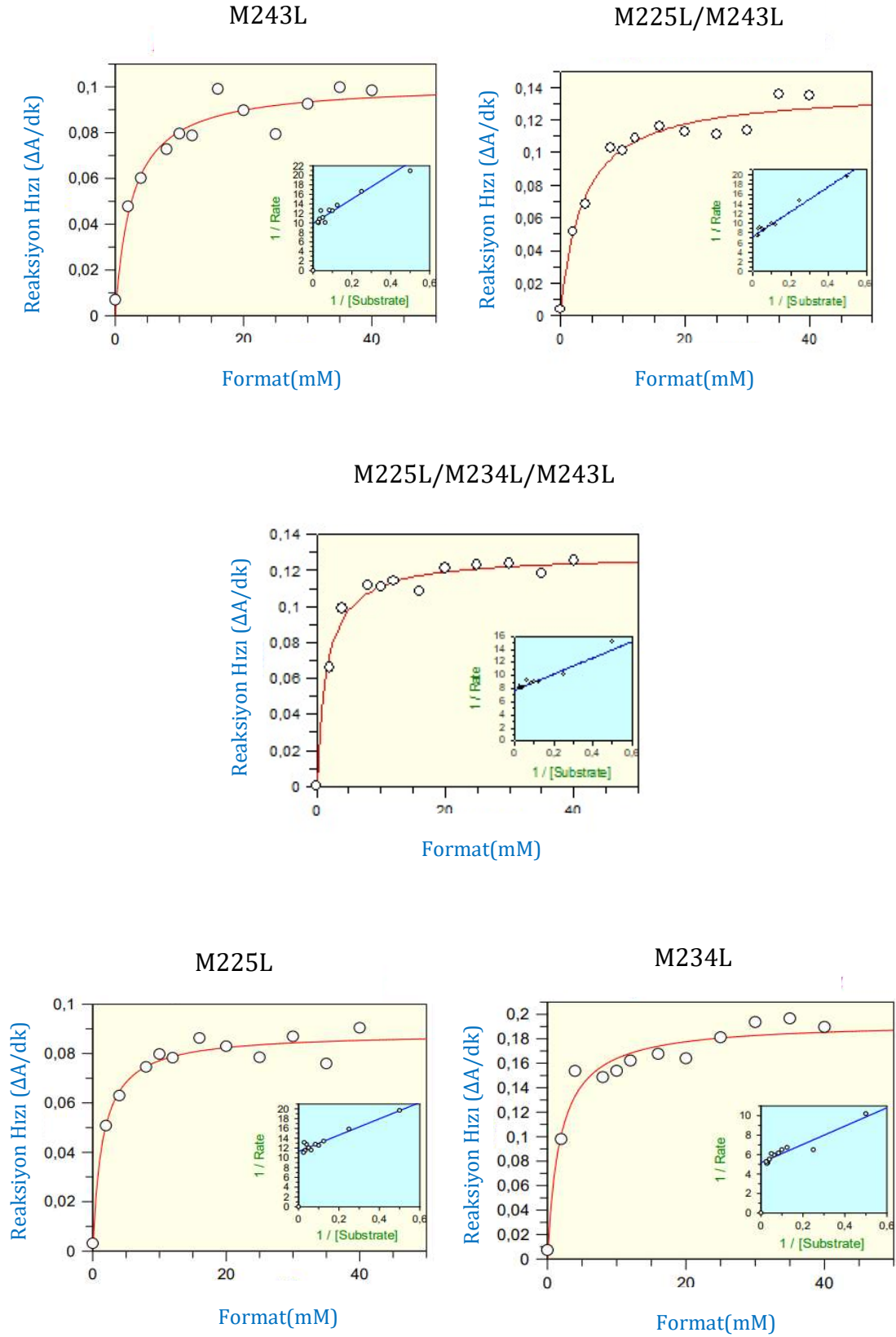
3.2.6'da verilen şartlarda gerçekleştirilen, rekombinant yabancı tip ve mutant GhFDH'lerin kararlı hal kinetik deneylerinden elde edilen veriler "Grafit 5 Kinetics Software" kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.8).

Tablo 4.1'de verilen sonuçlara göre, M225L'nin ($0.41 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) katalitik verimliliğinin neredeyse yabancı tip GhFDH'ye ($0.39 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) eşit olduğu gösterilmiştir. M234L ($0.72 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) ve M225L / M234L / M243L ($0.55 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), yabancı tip enzimden daha yüksek bir katalitik verime sahiptir. Diğer mutant enzimler (M243L ve M225L / M243L) daha düşük katalitik aktivite göstermiştir ve bu mutantların katalitik aktiviteleri ($0.26 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) birbirine eşittir. Yabancı tip enzime göre yaklaşık 2 kat daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olan M234L mutantı aynı zamanda en yüksek k_{cat} değerine sahiptir.

Spesifik aktivite, enzimin konsantrasyonuna bağı olarak değişmektedir. Enzimin, miligram başına düşen ünite miktarıdır. Enzimin saflık derecesi hakkında bilgi edinmemizi sağlamaktadır [112]. Bu nedenle Tablo 4.1’de verilen U/mg cinsinden verilen değerler kıyaslandığı zaman yabancı tip ve mutant enzimlerin saflık derecelerinin birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Saflık derecesi açısından sıralaması şu şekildedir: M234L>M225/243L>M225/234/243L>Yabancı tip>M243L<M225L.

Tablo 1.1 Yabancı tip ve mutant *Gossypium hirsutum* FDH’lerin kinetik sabit değerleri

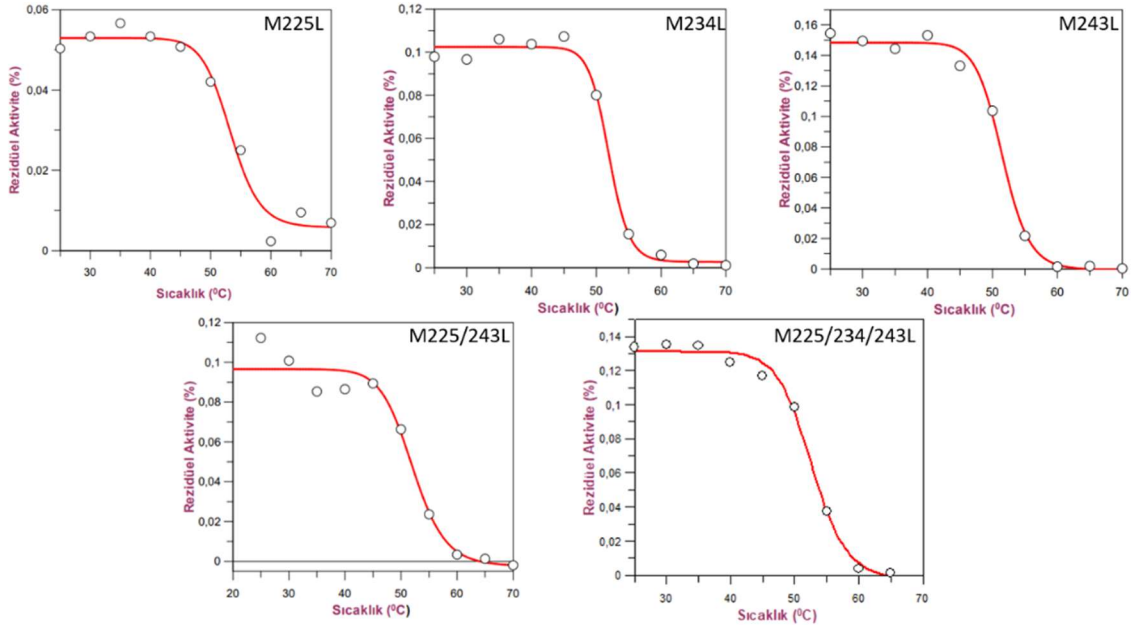
	Yabancı tip	M225L	M234L	M243L	M225L/ M243L	M225L/ M243L/ M234L
K_m (mM)	0.76±0.07	1.47±0.03	1.82±0.03	2.6±0.05	3.55±0.02	1.58±0.2
k_{cat} (s⁻¹)	0.29±0.00	0.6±0.00	1.3±0.00	0.68±0.00	0.93±0.00	0.86±0.00
k_{cat}/K_m	0.39	0.41	0.72	0.26	0.26	0.55
Spesifik Aktivite (U/mg)	1.2±0.02	0.9±0.05	2±0.08	1.03±0.03	1.4±0.05	1.3±0.04



Şekil 4.8 Mutant GhFDH'lerin kinetik ölçüm grafikler

4.1.5 Termal Denatürasyon

Termal kararlılık için, farklı sıcaklıklarda inkübe edilen yabanıl tip ve mutant enzimlerin kalan aktivitesi değerlendirilmiştir. Enzimin başlangıç aktivitesinin %50 azalması için gereken sıcaklık olan $T_{0.5}$ 'in hesaplanması için elde edilen veriler “Grafit5 Kinetics Software” yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Mutant GhFDH'lerin termal inaktivasyon grafikleri

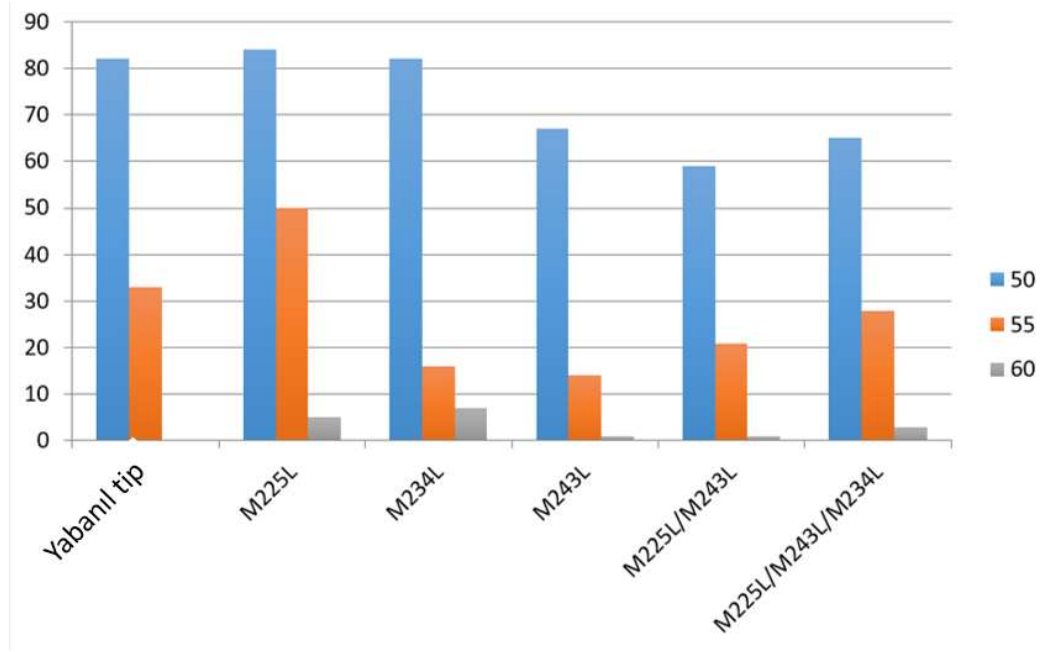
Tüm mutant enzimlerin $T_{0.5}$ değerleri kıyaslandığında, aralarında çok büyük bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Tablo 4.2'de, enzimlerin termal denatürasyon grafiklerinden elde edilen $T_{0.5}$ değerleri gösterilmiştir. Yabanıl tip GhFDH'nin $T_{0.5}$ değerine (53.8 ± 0.12) göre M225L (53.3 ± 0.9) mutasyonunun GhFDH kararlılığı üzerinde en az etkiye sahip olduğu ve M225L / M243L / M234L üçlü mutasyonunun $T_{0.5}$ değerinin, yabanıl tip enziminki (53.7 ± 0.44) ile hemen hemen aynı olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Termal inaktivasyon sıcaklıklarının ($T_{0.5}$) karşılaştırılması

Sıcaklık (°C)	Yabanıl tip	M225L	M234L	M243L	M225L/ M243L	M225/ 243/234L
$T_{0.5}$	53.8±0.12 [21]	53.3±0.9	52±0.3	51.5±0.3	52.5±1.1	53.7±0.44
$\Delta T_{0.5}$	0	-0.5	-1.8	-2.3	-1.3	-0.1
T_{opt}	25	35	45	25	25	30

T_{opt} (optimal aktivite sıcaklığı), maksimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeridir. T_{opt} değerlerinin küçükten büyüğe sıralaması şu şekildedir: Yabanıl tip=M243L=M225/243L<M225/234/243L<M225L<M234L (Tablo 4.2). Elde edilen verilerden yola çıkarak; 243. pozisyondaki Met/Leu değişiminin, yabanıl tip ile kıyaslandığında T_{opt} değerine etki etmediği, 225. pozisyondaki değişiminin ise optimal aktivite sıcaklığını 10 derece arttırdığı gözlemlenmiştir. M225/243L mutasyonlarının kümülatif etkisine bakıldığında M225 değişiminin artırıcı etkisinin baskılandığı ve yabanıl tip ile eşlenik T_{opt} sıcaklığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. M234 değişimi ise yabanıl tipe göre T_{opt} değerinde 20 derece artış sağlayarak, 45 °C'ye ulaşmıştır. Mutasyonların üçlü etkisine (M225/234/243L) bakıldığında ise T_{opt} değerinin (30 °C) yabanıl tipin sahip olduğu $T_{0.5}$ değerinin 5 °C üzerinde olduğu görülmüştür.

Sonuçlar, M225L ve M234L mutantlarının 50 °C'de inkübasyondan sonra aktivitelerinin sırasıyla %84 ve %82'sini koruyabildiğini göstermiştir. M225L mutanti, 55 °C'de inkübasyondan sonra aktivitesinin yarısını korumuştur. 60 °C'de inkübasyondan sonra, yabanıl tip enzim ölçülebilir herhangi bir aktivite göstermezken, M225L ve M234L mutantlarında aktivitelerinin %5'ini koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 50, 55 ve 60 °C'lerde inkübe edilmiş enzimlerin yüzdesel kalan aktivite grafiği

4.1.6 GhFDH'nin Hidrojen Peroksite Karşı Kararlılığı

Farklı H_2O_2 konsantrasyonları ile muamele sonrası kalan enzim aktivitesi ölçülerek Met/Leu değişiminin enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Aktivite ölçümlerine, ölçülebilir bir enzim aktivitesi görülmeyene dek devam edilmiştir.

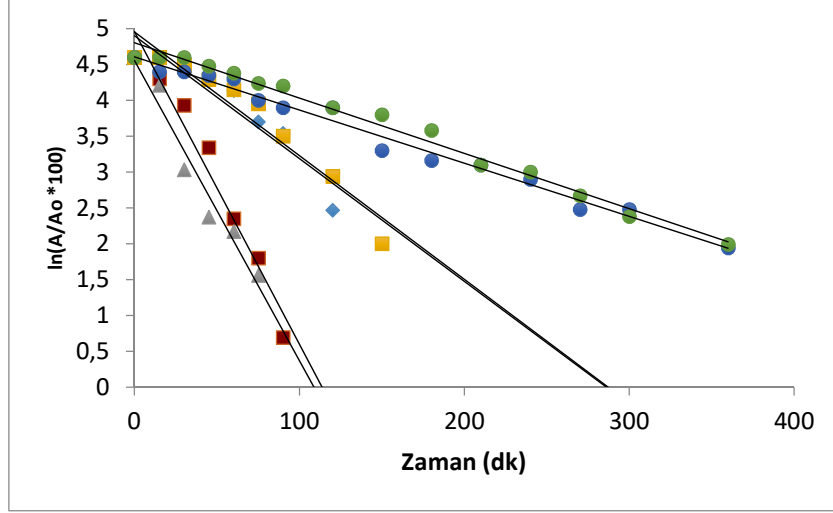
Her bir H_2O_2 konsantrasyonu için, optimum koşullardaki aktiviteyi %50 azaltmak için gereken zamanı gösteren $t_{0.5}$ değeri, "Grafit5 Kinetics Software" kullanılarak zamana karşı kalan aktivite grafiği çizilerek belirlenmiştir. Yabanıl tip GhFDH enzimi ile mutantların karşılaştırması Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Sonuçlar, tüm GhFDH'lerin enzim aktivitesinin, artan H_2O_2 konsantrasyonu (50-300 mM) ile aşamalı olarak azaldığını göstermiştir. 50 ve 100 mM H_2O_2 muamelesinde, ikili mutant (M225L /M243L) aktivitesini, yabanıl tip GhFDH'den sırasıyla 7.8 ve 10 kat daha uzun süre sürdürebilmiştir. Üçlü mutantın (M225L/M234L /M243L) enzim aktivitesi, aynı H_2O_2 konsantrasyonlarında (50 ve 100 mM) yabanıl tipe göre sırasıyla 10 ve 35 kat daha uzun süre devam ettiği ölçülmüştür. M225L, 50 ve 100 mM ve M243L; 50, 100 ve 200 mM H_2O_2 muamelesinde yabanıl tip GhFDH enziminden daha uzun süre aktif kalabildiği belirlenmiştir. Diğer mutant M234L ise

farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer tüm mutant GhFDH'lerden daha düşük kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin t_{0.5} değerlerinin karşılaştırılması

	t_{0.5} (dk)				
H₂O₂ (mM)	50	100	150	200	300
Yabanıl tip GhFDH	354 ±8.5	82±9.4	63±9.2	64,6±4.2	51,6±6.2
M225L	404±79	309±65	36±3	36±9	21±0.9
M234L	63.8±6	24.2±1.7	24.6±2.7	19±0.7	19.3±0.4
M243L	158±13	106±6.2	83±4.5	76±8.4	48±9
M225/243L	2773±131	841±125	123±27	86±2.5	55±2.3
M225/234/243L	3540±429	2838±50	149±26	148±13	61±3.7

Tüm H₂O₂ konsantrasyonları için zamana karşı aktivitenin logaritmasına dayalı çizilen grafiklerin eğimlerinden etkin kinetik inaktivasyon sabiti ($k_{\text{ef, in}}$) hesaplanmıştır. FDH enziminin inaktivasyonu, bimoleküler bir reaksiyondur ve enzim, hiçbir ara ürün oluşturmamaktadır. Reaksiyon sırasında H₂O₂ konsantrasyonundaki azalma ihmal edilebilir derecede küçüktür ve reaksiyon enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Bu nedenle hidrojen peroksit fazlalığında, enzim inaktivasyon kinetiği birinci derecedir. Savin ve Thiskov (2010)'nun önerdiği gibi sabit bir H₂O₂ konsantrasyonunda mutant GhFDH'lerin kararlılığını karşılaştırmak için etkili birinci derece inaktivasyon sabitleri kullanılmıştır [26]. Yabanıl tip GhFDH'nin inaktivasyon deneylerine de dayanarak, ortalama inaktivasyon konsantrasyonu olan 150 mM sabit olarak seçilerek mutantların inaktivasyon grafikleri yabanıl tip GhFDH ile karşılaştırılmıştır. Enzimlerin inaktivasyon grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 Yabanıl tip ve mutant GhFDH enzimlerinin 0.15 M H₂O₂ ile inkübasyonundan elde edilen inaktivasyon grafiği (M225/234L/243L yeşil daire, M225/243L lacivert daire, M243L sarı kare, yabanıl tip GhFDH açık mavi kare, M225L kırmızı kare ve M234L gri üçgen olarak gösterilmiştir.)

Hesaplanan $k_{\text{ef}_{\text{in}}}$ değerleri Tablo 4.4'te gösterilmektedir. Yabanıl tip ve mutant GhFDH'ler için etkili inaktivasyon kinetik sabitlerinin ($k_{\text{ef}_{\text{in}}}$) karşılaştırılması, seçilen mutasyon noktalarının, enzim kararlılığına katkısı için bir tahmin sağlamaktadır. $k_{\text{ef}_{\text{in}}}$ değeri kullanılarak, uygulanan amino asit değişimlerinin enzimin kimyasal kararlılığına etkisi değerlendirilebilmektedir. $k_{\text{ef}_{\text{in}}}$ sabitleri kıyaslandığında aynı loop üzerinde bulunan M225 ve M234, hidrojen peroksit'e karşı benzer reaktivite göstermiştir ve inaktivasyon sabitini yabanıl tipe göre yaklaşık 2.5 kat arttırmıştır. 4 amino asitlik komşu loop bölgesinde bulunan M243L değişimi yabanıl tip GhFDH ile kıyaslandığında ise kayda değer bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. İkili ve üçlü mutantlarda mutasyon noktalarının kümülatif etkisi ile en düşük inaktivasyon sabitlerine sahip olduğu (yabanıl tipten yaklaşık 2,3 kat daha az) ve hemen hemen birbirlerine eşit olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.4 Yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin H₂O₂ ile inaktivasyonu için etkili birinci dereceden kinetik sabitler

Enzim	Yabanıl tip	M225L	M234L	M243L	M225/ 243L	M225/234/243L
k_{in}^{ef} *10 ⁻⁵ (s ⁻¹)	28.5±0.002	72.7±0.001	69.8±0.002	28.8±0.003	12.3±0.001	12.8±0.002

4.2 Öneriler

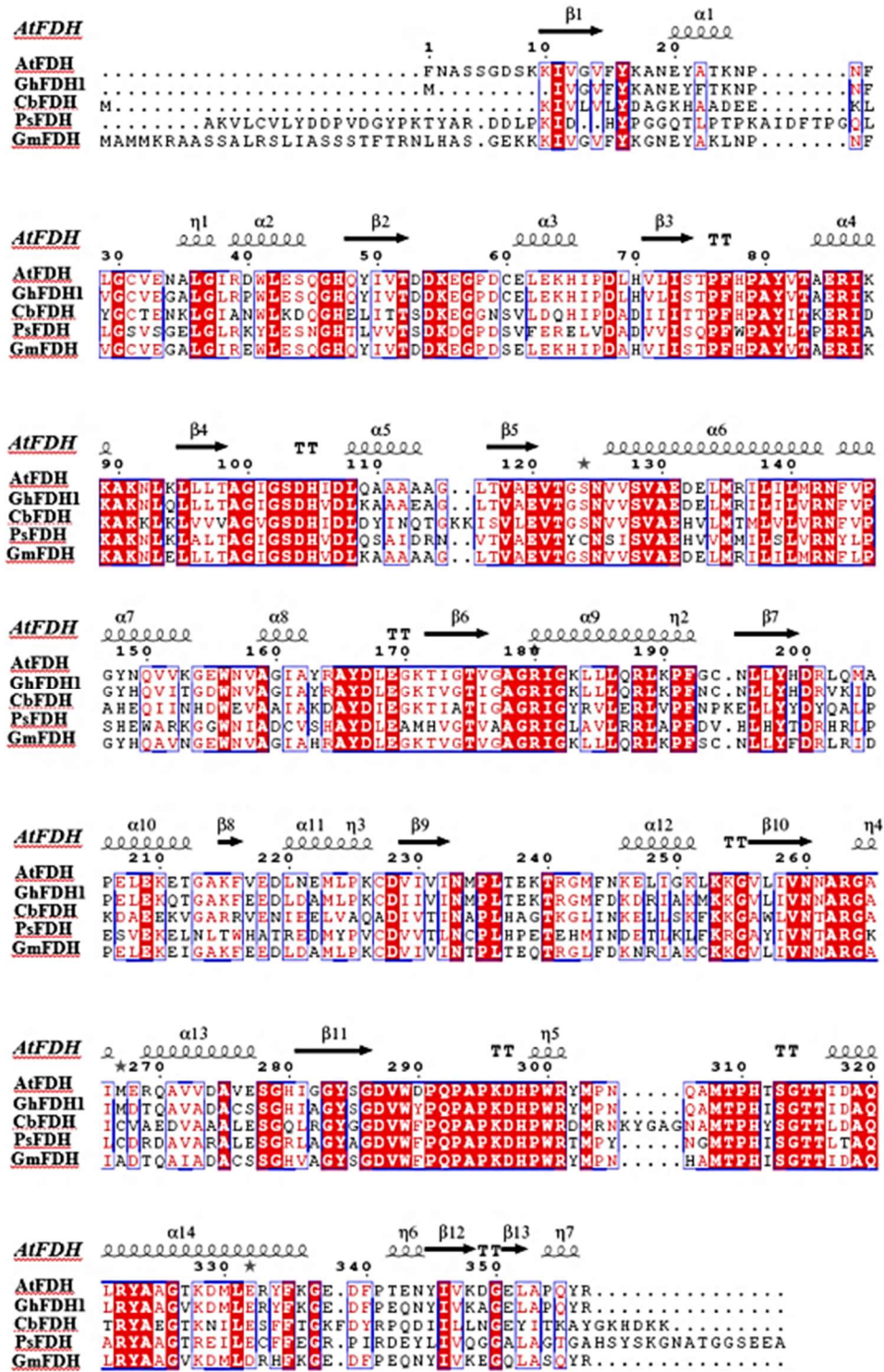
4.2.1 Mutasyonların Dizaynı ve Modellerin Analizi

SWISS-MODEL kullanılarak yapılan modelleme çalışmaları için ve farklı FDH'lerin amino asit dizilerinin karşılaştırmaları sonucunda 9 metionin arasından protein yüzeyinde bulunan M225, M234 ve M243 pozisyonları lösin ile değiştirilmek üzere seçilmiştir. Bu mutasyonların sonuçlarına göre, tek mutantların kümülatif etkisini incelemek üzere ikili ve üçlü mutant tasarlanmıştır.

En çok çalışılan bakteriyel (PsFDH), fungal (CbFDH) ve bitki kaynaklı (AtFDH ve GmFDH) FDH'lerin amino asit dizilerinin çoklu hizalamaları (Şekil 4.12) sonucu M126, M294 ve M299'un korunmuş amino asitler olduğu gösterilmektedir [21]. Karşılaştırılan FDH'ler arasında farklı olarak sadece CbFDH'in 214. pozisyonunda lösin bulunması, M214'ün de korunmuş bir bakiye olduğu düşünülmektedir. Bu metioninlerin korunmuş olması GhFDH enziminin yapısı ve işlevindeki önemini göstermektedir.

Fosforilasyon motiflerinde bulunan metioninler, in vivo oksidasyona eğilimli olduğu bilinmektedir [33]. Bykova ve arkadaşları 2003'te patates FDH'inde fosforillenmiş amino asit bakiyelerinin yakınında bulunan M327 ve M332'nin oksitlendiğini göstermiştir [113]. Patates FDH'inde okside oldukları belirlenen bu bakiyelerin GhFDH yapısındaki homologları M294 ve M299'dur. Bu iki bakiyenin de oksidatif stresle mücadelede etkin bir rolü olduğunu göstermektedir.

GhFDH'de lösin ile değiştirmek üzere seçtiğimiz M234'ün homologu PsFDH ve AtFDH'de metionin, CbFDH ve GmFDH'de lösindir. M225 amino asit bakiyesinin diğer FDH'lerde homologu metionin, alanin, sistein ve tirozin iken M243'ün lösin, fenilalanin ve sisteindir.



Şekil 4.12 GhFDH'in kristalografik yapı bilgisi olan diğer FDH'ler ile çoklu amino asit hizalaması [21] (AtFDH: *Arabidopsis thaliana* FDH, PsFDH: *Pseudomonas 101 sp.* FDH, CbFDH: *Candida biodinii* FDH ve GmFDH: *Glycine max*'ı temsil etmektedir.)

GhFDH proteinin, NAD⁺ bağlama alanının yüzeyinde bulunan M225, M234 ve M243 amino asit bakiyeleri, gömülü olanlara göre oksidasyona daha duyarlıdır. İkincil yapı değerlendirildiğinde, seçilen M225 ve M234 amino asit bakiyeleri aynı loop

yapısında iken, M243 sadece 4 amino asit içeren komşu loopta yer almaktadır. Metionin oksidasyonunun global analizi çalışmasında loop yapılarında bulunan metioninler büyük ölçüde oksitlenmeye meyilli iken, β -tabaka ve α -sarmallarındaki metioninlerin oksitlenmeye karşı korunduğu bildirilmiştir [114].

4.2.2 Mutasyonların Aktiviteye ve Termal Kararlılığa Etkisi

Bu tez çalışmasında hedeflediğimiz ve NAD^+ 'a göre uzaklıkları Şekil 4.5'te gösterilen metionin bakiyelerinin etkisini anlamak için, GhFDH'nin kinetik ve kararlılık parametreleri karşılaştırılmıştır. NAD^+ a 4.7 Å uzaklıktaki M225L ve NAD^+ a 15.3 Å uzaklıktaki M243L mutasyonları spesifik aktivitede önemli bir değişikliğe neden olmazken, NAD^+ dan 5,7 Å uzaklıkta bulunan M234L, spesifik ve katalitik aktiviteyi yaklaşık 2 kat arttırmıştır.

Substrata olan afinite (K_m) karşılaştırıldığında; tasarlanan tüm mutantların, yabanıl tipe göre formata karşı daha düşük afiniteli olduğu belirlenmiştir. İkili ve üçlü mutantların k_{cat} değerleri hemen hemen aynı olmasına rağmen, bu mutantların K_m değerleri arasındaki fark, M234L mutasyonunun formata karşı afiniteyi arttırdığını göstermiştir. Üçlü mutantın K_m değeri M225L ve M234L'e yakın ve ikili mutantın K_m değerinin M243L'den yüksek olduğu gösterilmiştir. Uygulanan tekli ve çoklu mutasyonlar sonucunda, substrata afiniteler kıyaslandığında M234'ün M225 ve M243'e göre en etkili amino asit bakiyesi olduğu ve diğer mutasyonlarla kümülatif etkisine bakıldığında da substrat afinitesini arttırdığı belirlenmiştir.

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, yabanıl tip ve mutant GhFDH'lerin $T_{0.5}$ 'i hemen hemen aynıdır. Ancak 50 °C'de enzimlerin aktiviteleri çok farklıdır (%59-%84). Bu farklılık, 50 °C'nin üzerinde enzimlerin aktivitelerindeki bozulma oranları ile açıklanabilir. 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, M243L, M225/243L ve M225/243/234L mutantlarının aktivitesi hızlı azalırken, yabanıl tip, M225L ve M234L enzimlerinin aktivite kaybı daha yavaş olmuştur (Şekil. 4.10). 50 °C'de; M225L ve M234L mutantlarının kararlılık seviyesi (%82), yabanıl tip ile aynı olduğu görülmüştür. Yalnızca M225L mutanı, 55 °C'de inkübasyondan sonra aktivitesinin yarısını koruyabilmiştir [yabanıl tipten (%33) daha yüksek]. 60 °C'de inkübasyondan sonra, yabanıl tip GhFDH aktivitesini kaybetmiş, M225L ve M234L ise aktivitelerini %5 koruduğu gözlemlenmiştir. Termal inaktivasyon deneylerine göre kalan aktivitelerinin karşılaştırılması, 50, 55 ve 60 °C'de inkübasyondan sonra M225L

mutantının, yabanıl tip GhFDH'den daha uzun süre aktif kaldığını göstermektedir.

Özgün ve arkadaşları (2016) tarafından, *Candida methylica* NAD⁺ bağımlı FDH üzerinde bölge doyumluk mutagenesi ile elde edilen tüm mutantlar arasından M1L, 60 °C'de aktivitesinin %17'sini koruması ile en iyi aktiviteye sahip olduğunu bildirilmiştir [37]. Bu bildirinin dışında, literatürde Met/Leu değişiminin NAD⁺ bağımlı FDH üzerindeki etkisini araştıran başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, Met/Leu değişiminin NAD⁺ bağımlı FDH üzerindeki etkilerinin ilk karakterizasyonudur.

4.2.3 Mutasyonların Oksidatif Kararlılığa Etkisi

Format dehidrogenazların kimyasal kararlılık çalışmalarında, *Pseudomonas sp. 101*, *Mycobacterium vaccae* ve *Candida boidinii*'den izole edilen FDH enzimleri ile Hg²⁺, Cu²⁺, DTNB ve p-kloro mercuribenzoat gibi kimyasal ajanlar kullanılmıştır [26]. Stres koşullarında H₂O₂ seviyesinin artmasıyla, hücrede FDH ekspresyon seviyesinin arttığı bilinmektedir. *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan bir çalışmada mikroorganizma H₂O₂'ye maruz bırakıldığında format konsantrasyonunun kontrol grubuna göre 2 ile 8 kat arası arttığı bildirilmiştir [115]. Oksidatif stresle mücadelede format indirgeyici bir kuvvet olarak kullanılıp stres altındaki hücrelerde aktivitesi artan NAD⁺ bağımlı FDH tarafından düzenlenebilir. Bu nedenle, GhFDH'nin kararlılığını gözlemlemek için çalışmamızda kimyasal inaktivasyon ajanı olarak H₂O₂ seçilmiştir.

Oksidasyona meyilli amino asit sistenin ikili ve üçlü mutasyonlarının H₂O₂ stresine karşı etkisi, Savin ve Tishkov (2010) tarafından araştırılmıştır. C255S ve C145S mutantları önemli bir değişikliğe neden olmazken, C255A/C145S ikili mutantının kimyasal kararlılığı, yabanıl tip PsFDH'e göre 1000 kat arttığı bildirilmiştir [26]. Bu çalışmada da oksidasyona meyilli metionin amino asitlerinin ikili/üçlü mutasyonları incelenmiştir. Enzimlerin kimyasal kararlılıkları karşılaştırıldığında, en dikkat çekici sonuçlar 50 ve 100 mM H₂O₂ ile muamele edilmiş ikili ve üçlü mutantta görülmüştür. Yabanıl tip GhFDH enziminin t_{0.5} değeri 50 mM H₂O₂'de 354 dk iken, M225L / M243L 2772 dk ve üçlü mutantınki ise 3540 dakikadır.

Tek amino asit değişimleri arasından, yabanıl tip GhFDH'den daha uzun süre aktif kalabilen M225L ve M243L'nin H₂O₂ stresine karşı daha toleranslı olduğu gösterilmiştir. M234L ise farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer tüm mutant

GhFDH'lerden daha düşük kararlılığa sahiptir (Tablo 4.3). Metionin ve aromatik amino asitler arasındaki hidrofobik etkileşimin, proteinlerin kararlılığına katkısı bilinmektedir [114, 116]. Çalışmamızda en düşük kararlılığa sahip olan M234L, fenilalanine komşudur. Buna göre, M234L'nin düşük kararlılığı, Met-Leu değişimi sonucu bu etkileşimde bir değişiklik ile açıklanabilir.

Huang ve arkadaşları (2017), mitokondriyal proteinlerin, (özellikle ROS'a maruz kalanların) oksidatif strese karşı korunmak için, korunmuş metioninler açısından zengin olduğunu öne sürmüşlerdir [117]. Bitki kaynaklı NAD⁺ bağımlı FDH'ler mitokondriyal bir proteinlerdir. *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max*'dan izole edilen NAD⁺ bağımlı FDH'lerinin kimyasal kararlılık deneylerinin, H₂O₂ kullanılan bir çalışmada, stresle indüklenen FDH'lerin, stres olmayan koşullarda eksprese edilen FDH'lerden daha stabil olduğu gösterilmiştir [26]. Bu verilere dayanarak, M225L ve M234L'nin kararlılığının düşük olması, 225. ve 234. pozisyondaki metioninlerin, oksidasyon savunma mekanizmaları için kritik bir pozisyonda olabileceğini düşündürmektedir.

Yabanıl tip ve mutant GhFDH enzimlerinin spesifik aktiviteleri, ticari olarak yaygın olarak kullanılan PseFDH, CbFDH, CmFDH enzimlerinden düşük olsa da tüm GhFDH enzimlerinin, sektörde kullanılan FDH'lere kıyasla daha yüksek katalitik etkinliğe sahip olduğu görülmektedir [16].

H₂O₂ ile gerçekleştirilen inaktivasyon deneylerinde elde edilen sonuçlar, seçilen her metionin bakiyesinin GhFDH kararlılığına katkısını açıklamaya yardımcı olmaktadır. Seçilen metionin bakiyeleri NAD⁺'a ne kadar yakınsa, gözlemlenen kararlılık seviyesi o kadar düşük olmuştur. M243'ün lösin ile değiştirilmesi, inaktivasyon sabitini değiştirmemiş, yabanıl tip ile neredeyse aynı k_{in}^{ef} değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Kimyasal kararlılık açısından en dikkat çekici sonuçlar, kümülatif olarak ikili ve üçlü mutantlarda görülmüştür. Metioninin lösinine, ikili ve üçlü değişimi (M225L / M243L ve M225L / M243L / M234L) k_{in}^{ef} faktörünü (sırasıyla $12,3 \times 10^{-5}$ ve $12,8 \times 10^{-5} s^{-1}$) azaltmıştır. Bu mutantların yaklaşık aynı olan inaktivasyon sabitleri, M225L/M243L mutantına M234L eklenmesinin, H₂O₂'ye karşı enzim kararlılığında önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir [115]. PseFDH ticari olarak yaygın olarak kullanılan bir bakteri kaynaklı enzimdir. Literatüre bakıldığında, PseFDH enzimidaki sistein amino asidi değişimlerinin

etkilerini araştıran çalışmanın sonuçlarına göre [26]; yabanıl tip ve M243L, M225/243L, M225/234/243L mutant GhFDH enzimlerinin k_{ef}^{in} faktörünün mutant PseFDH enziminkinden daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. C245S/C255A PseFDH mutantı en düşük k_{ef}^{in} faktörüne sahip olsa da M225/243L ve M225/234/243L GhFDH mutantlarının da düşük etkin kinetik inaktivasyon değeri ile endüstriyel alanda kullanılabilir aday biyokatalizörler olduğu düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda, bu aday mutant enzimlere, farklı mutasyonlar eklenerek geliştirilebileceği öngörülmektedir.

Özetle bu yüksek lisans tez çalışması ile, Met/Leu değişiminin NAD^+ bağımlı FDH zerindeki etkileri literatürde ilk kez detaylı olarak araştırılmıştır. Metionin mutasyonlarının enzimlerin kararlılığı üzerindeki kümülatif etkisi dikkat çekmektedir. Sonuçlar, özellikle 3 mutant GhFDH'nin (M243L, M225L/M243L ve M225L/M234L/M243L) endüstriyel uygulamalar için güçlü aday biyokatalizörler olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, GhFDH'nin kararlılığının anlaşılmasının yanı sıra, kiral sentezin önemli olduğu ilaç, gıda ve tarım gibi biyoteknoloji üretim sektörlerine de önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

- [1] V. T. Popov, Vladimir "NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. From a model enzyme to a versatile biocatalyst," in *Protein structures (Kaleidoscope of structural properties and functions 2003)*, V. N. Uversky Ed., 2003, pp. 441-473.
- [2] M. H. Kim, S. Park, Y. H. Kim, K. Won, and S. H. Lee, "Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 97, pp. 209-214, 2013.
- [3] B. Kaup, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm, "D: -Mannitol formation from D: -glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 69, no. 4, pp. 397-403, 2005.
- [4] G. Mayer, K. D. Kulbe, and B. Nidetzky, "Utilization of xylitol dehydrogenase in a combined microbial/enzymatic process for production of xylitol from D-glucose," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 98-100, pp. 577-89, 2002.
- [5] W. A. van der Donk and H. Zhao, "Recent developments in pyridine nucleotide regeneration," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 14, no. 4, pp. 421-6, 2003.
- [6] A. Alissandratos, H. K. Kim, H. Matthews, J. E. Hennessy, A. Philbrook, and C. J. Easton, "Clostridium carboxidivorans strain P7T recombinant formate dehydrogenase catalyzes reduction of CO(2) to formate," *Appl Environ Microbiol*, vol. 79, no. 2, pp. 741-4, 2013.
- [7] I. Tsujisho, M. Toyoda, and Y. Amao, "Photochemical and enzymatic synthesis of formic acid from CO₂ with chlorophyll and dehydrogenase system," *Catalysis Communications*, vol. 7, no. 3, pp. 173-176, 2006.
- [8] A. Bassegoda, C. Madden, D. W. Wakerley, E. Reisner, and J. Hirst, "Reversible interconversion of CO₂ and formate by a molybdenum-containing formate dehydrogenase," *J Am Chem Soc*, vol. 136, no. 44, pp. 15473-6, 2014.
- [9] H. Choe *et al.*, "Efficient CO₂-reducing activity of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for formate production from CO₂ gas," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e103111, 2014.
- [10] G. Özgün, N. G. Karagüler, O. Turunen, N. J. Turner, and B. Binay, "Characterization of a new acidic NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 122, pp. 212-217, 2015.
- [11] A. Andreadeli, D. Platis, V. Tishkov, V. Popov, and N. E. Labrou, "Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺," *Febs j*, vol. 275, no. 15, pp. 3859-69, 2008.
- [12] N. G. Karagüler, R. B. Sessions, B. Binay, E. B. Ordu, and A. R. Clarke, "Protein engineering applications of industrially exploitable enzymes: *Geobacillus stearothermophilus* LDH and *Candida methylica* FDH," *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, no. 6, pp. 1610-1615, 2007.

- [13] E. B. Ordu, R. B. Sessions, A. R. Clarke, and N. G. Karagüler, "Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylica*," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 95, pp. 23-28, 2013.
- [14] E. B. Ordu, E. Yelboğa, F. Secundo, R. B. Sessions, and N. G. Karagüler, "The effect of methionine to cysteine substitution on the stability of formate dehydrogenase from *Candida methylica*," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 82, pp. 109-114, 2012.
- [15] V. I. Tishkov and V. O. Popov, "Protein engineering of formate dehydrogenase," *Biomol Eng*, vol. 23, no. 2-3, pp. 89-110, 2006.
- [16] W. Wu, D. Zhu, and L. Hua, "Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida bodinii* creating effective NADP+-dependent FDH enzymes," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 61, no. 3, pp. 157-161, 2009.
- [17] P. David *et al.*, "Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*," *Theor Appl Genet*, vol. 121, no. 1, pp. 87-103, 2010.
- [18] H. Q. Lou *et al.*, "A Formate Dehydrogenase Confers Tolerance to Aluminum and Low pH," *Plant Physiol*, vol. 171, no. 1, pp. 294-305, 2016.
- [19] B. J. Olson, M. Skavdahl, H. Ramberg, J. C. Osterman, and J. Markwell, "Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast," *Plant Sci*, vol. 159, no. 2, pp. 205-212, 2000.
- [20] V. I. Tishkov and V. O. Popov, "Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 69, no. 11, pp. 1252-1267, 2004.
- [21] G. Kurt-Gür and E. Ordu, "Characterization of a novel thermotolerant NAD+-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.)," *3 Biotech*, vol. 8, no. 3, p. 175, 2018.
- [22] I. S. Kargov, S. Y. Kleimenov, S. S. Savin, V. I. Tishkov, and A. A. Alekseeva, "Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design," *Protein Eng Des Sel*, vol. 28, no. 6, pp. 171-8, 2015.
- [23] A. A. Alekseeva, S. S. Savin, and V. I. Tishkov, "NAD (+) -dependent Formate Dehydrogenase from Plants," *Acta naturae*, vol. 3, no. 4, pp. 38-54, 2011.
- [24] P. Bin, R. Huang, and X. Zhou, "Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine," *Biomed Res Int*, vol. 2017, p. 9584932, 2017.
- [25] D. L. Atroshenko, I. V. Golubev, S. S. Savin, and V. I. Tishkov, "Influence of Met/Leu amino acid changes on catalytic properties and oxidative and thermal stability of yeast D-amino acid oxidase," *Moscow University Chemistry Bulletin*, vol. 71, no. 4, pp. 243-252, 2016.
- [26] S. S. Savin and V. I. Tishkov, "Assessment of Formate Dehydrogenase Stress Stability In vivo using Inactivation by Hydrogen Peroxide," *Acta naturae*, vol. 2, no. 1, pp. 97-102, 2010.

- [27] L. Calzadiaz-Ramirez *et al.*, "In Vivo Selection for Formate Dehydrogenases with High Efficiency and Specificity toward NADP⁺," *ACS Catalysis*, vol. 10, no. 14, pp. 7512-7525, 2020.
- [28] K. Hoelsch, I. Sührer, M. Heusel, and D. Weuster-Botz, "Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, no. 6, pp. 2473-81, 2013.
- [29] H. Slusarczyk, S. Felber, M. R. Kula, and M. Pohl, "Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues," *Eur J Biochem*, vol. 267, no. 5, pp. 1280-9, 2000.
- [30] J. Zheng, T. Yang, J. Zhou, M. Xu, X. Zhang, and Z. Rao, "Elimination of a Free Cysteine by Creation of a Disulfide Bond Increases the Activity and Stability of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase," *Appl Environ Microbiol*, vol. 83, no. 2, 2017.
- [31] A. Drazic *et al.*, "Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 23, pp. 9493-8, 2013.
- [32] S. Luo and R. L. Levine, "Methionine in proteins defends against oxidative stress," *Faseb j*, vol. 23, no. 2, pp. 464-72, Feb 2009.
- [33] F. J. Veredas, F. R. Cantón, and J. C. Aledo, "Methionine residues around phosphorylation sites are preferentially oxidized in vivo under stress conditions," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 40403, 2017.
- [34] E. Folzer *et al.*, "Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule," *J Pharm Sci*, vol. 104, no. 9, pp. 2824-31, Sep 2015.
- [35] Y. H. Kim, A. H. Berry, D. S. Spencer, and W. E. Stites, "Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins," *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 14, no. 5, pp. 343-347, 2001.
- [36] V. Sáez-Jiménez, S. Acebes, V. Guallar, A. T. Martínez, and F. J. Ruiz-Dueñas, "Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0124750, 2015.
- [37] G. P. Özgün, E. B. Ordu, H. E. Tütüncü, E. Yelboğa, R. B. Sessions, and N. Gül Karagüler, "Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylica* Formate Dehydrogenase," *Scientifica*, vol. 2016, p. 4902450, 2016/10/25 2016.
- [38] D. Bordo and P. Argos, "Suggestions for "safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis," *J Mol Biol*, vol. 217, no. 4, pp. 721-9, 1991.
- [39] H. Yang *et al.*, "Structure-based engineering of methionine residues in the catalytic cores of alkaline amylase from *Alkalimonas amylolytica* for improved oxidative stability," *Appl Environ Microbiol*, vol. 78, no. 21, pp. 7519-7526, 2012.

- [40] I. C. Peng, K.-Y. Lo, C.-H. Hsu, and C.-Y. Lee, "Increasing the storage and oxidation stabilities of N-acyl-d-amino acid amidohydrolase by site-directed mutagenesis of critical methionine residues," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 1785-1790, 2012.
- [41] E. Ordu, "Protein Mühendisliği ile *Candida methylica* Format Dehidrogenaz Enzimin Katlanma Mekanizmasının Aydınlatılması ve Termostabilitesinin Arttırılması," Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2010.
- [42] S. J. Allen and J. J. Holbrook, "Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylica*," *Gene*, vol. 162, no. 1, pp. 99-104, 1995.
- [43] X. Yu, D. Nicks, A. Mulchandani, and R. Hille, "Efficient reduction of CO(2) by the molybdenum-containing formate dehydrogenase from *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)," *The Journal of biological chemistry*, vol. 292, no. 41, pp. 16872-16879, 2017.
- [44] I. G. Shabalin, K. M. Polyakov, V. I. Tishkov, and V. O. Popov, "Atomic Resolution Crystal Structure of NAD(+)-Dependent Formate Dehydrogenase from Bacterium *Moraxella* sp. C-1," *Acta Naturae*, vol. 1, no. 3, pp. 89-93, 2009.
- [45] L. Chistoserdova, G. J. Crowther, J. A. Vorholt, E. Skovran, J.-C. Portais, and M. E. Lidstrom, "Identification of a Fourth Formate Dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Confirmation of the Essential Role of Formate Oxidation in Methylotrophy," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 24, pp. 9076-9081, 2007.
- [46] V. O. Popov and V. S. Lamzin, "NAD(+)-dependent formate dehydrogenase," *The Biochemical journal*, vol. 301 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 625-643, 1994.
- [47] T. Watanabe, T. Hattori, S. Tengku, and M. Shimada, "Purification and characterization of NAD-dependent formate dehydrogenase from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermisporea* and a possible role of the enzyme in oxalate metabolism," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 37, no. 1, pp. 68-75, 2005.
- [48] C. C. des Francs-Small, F. Ambard-Bretteville, I. D. Small, and R. Remy, "Identification of a Major Soluble Protein in Mitochondria from Nonphotosynthetic Tissues as NAD-Dependent Formate Dehydrogenase," *Plant Physiology*, vol. 102, no. 4, pp. 1171-1177, 1993.
- [49] V. S. Lamzin, Z. Dauter, V. O. Popov, E. H. Harutyunyan, and K. S. Wilson, "High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase," *Journal of Molecular Biology*, vol. 236, no. 3, pp. 759-785, 1994.
- [50] K. Suzuki, R. Itai, H. Nakanishi, N. Nishizawa, E. Yoshimura, and S. Mori, "Formate Dehydrogenase, an Enzyme of Anaerobic Metabolism, Is Induced by Iron Deficiency in Barley Roots," *Plant physiology*, vol. 116, pp. 725-32, 1998.

- [51] M. R. Kula and C. Wandrey, "Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration," *Methods Enzymol*, vol. 136, pp. 9-21, 1987.
- [52] D. T. Yücesoy, "Multifunctional Formate Dehydrogenase Fusion Protein Binds To Gold Surface With Improved Reaction Kinetics," Master, Department of Advanced Technologies, Istanbul Technical University, 2011.
- [53] A. Liese and M. Villela Filho, "Production of fine chemicals using biocatalysis," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, no. 6, pp. 595-603, 1999.
- [54] A. E. Serov, A. S. Popova, and V. I. Tishkov, "The kinetic mechanism of formate dehydrogenase from bakery yeast," *Doklady. Biochemistry and biophysics*, Article vol. 382, pp. 26-30, 2002.
- [55] U. Kragl, W. Kruse, W. Hummel, and C. Wandrey, "Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example," *Biotechnol Bioeng*, vol. 52, no. 2, pp. 309-19, 1996.
- [56] C. Hourton-Cabassa, F. Ambard-Bretteville, F. Moreau, J. D. de Virville, R. Rémy, and C. Colas des Francs-Small, "Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves," *Plant Physiology*, vol. 116, no. 2, pp. 627-635, 1998.
- [57] P. Thompson, C. G. Bowsher, and A. K. Tobin, "Heterogeneity of mitochondrial protein biogenesis during primary leaf development in barley," *Plant physiology*, vol. 118, no. 3, pp. 1089-1099, 1998, doi: 10.1104/pp.118.3.1089.
- [58] A. Andreadeli *et al.*, "Cloning and characterization of Lotus japonicus formate dehydrogenase: A possible correlation with hypoxia," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1794, no. 6, pp. 976-984, 2009.
- [59] D. C. Davison, "Studies on plant formic dehydrogenase," *Biochemical Journal*, vol. 49, no. 4, pp. 520-526, 1951.
- [60] M. P. Farinelli, D. W. Fry, and K. E. Richardson, "Isolation, purification, and partial characterization of formate dehydrogenase from soybean seed," *Plant physiology*, vol. 73, no. 3, pp. 858-859, 1983.
- [61] T. Shiraishi, E.-I. Fukusaki, and A. Kobayashi, "Formate dehydrogenase in rice plant: Growth stimulation effect of formate in rice plant," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 89, no. 3, pp. 241-246, 2000.
- [62] E.-I. Fukusaki, T. Ikeda, T. Shiraishi, T. Nishikawa, and A. Kobayashi, "Formate dehydrogenase gene of Arabidopsis thaliana is induced by formaldehyde and not by formic acid," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 90, no. 6, pp. 691-693, 2000.
- [63] P. L. Herman, H. Ramberg, R. D. Baack, J. Markwell, and J. C. Osterman, "Formate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana: overexpression and subcellular localization in leaves," *Plant Science*, vol. 163, no. 6, pp. 1137-1145, 2002.
- [64] I. G. Shabalin *et al.*, "Structures of the apo and holo forms of formate dehydrogenase from the bacterium Moraxella sp. C-1: towards

- understanding the mechanism of the closure of the interdomain cleft," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 65, no. Pt 12, pp. 1315-25, 2009.
- [65] A. Razvi and J. M. Scholtz, "Lessons in stability from thermophilic proteins," *Protein Sci*, vol. 15, no. 7, pp. 1569-78, 2006.
 - [66] D. A. Butterfield and E. R. Stadtman, "Protein Oxidation Processes in Aging Brain," in *Advances in Cell Aging and Gerontology*, vol. 2, P. S. Timiras and E. E. Bittar Eds.: Elsevier, 1997, pp. 161-191.
 - [67] I. M. Møller and B. K. Kristensen, "Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 40, no. 3, pp. 430-435, 2006.
 - [68] W. Zhang, S. Xiao, and D. U. Ahn, "Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 53, no. 11, pp. 1191-1201, 2013.
 - [69] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 1999.
 - [70] E. Shacter, "Quantification And Significance Of Protein Oxidation In Biological Samples," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 32, no. 3-4, pp. 307-326, 2000.
 - [71] P. Ghezzi and V. Bonetto, "Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins," *Proteomics*, vol. 3, no. 7, pp. 1145-53, 2003.
 - [72] W. Dröge, "Free radicals in the physiological control of cell function," *Physiol Rev*, vol. 82, no. 1, pp. 47-95, 2002.
 - [73] A. Dogru, "Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres," 26/05/2020.
 - [74] C. Schöneich, "Mechanisms of Protein Damage Induced by Cysteine Thiyl Radical Formation," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 21, no. 6, pp. 1175-1179, 2008.
 - [75] P. Wardman and C. von Sonntag, "Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells," in *Methods in Enzymology*, vol. 251: Academic Press, 1995, pp. 31-45.
 - [76] L. B. Poole, P. A. Karplus, and A. Claiborne, "Protein sulfenic acids in redox signaling," *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 44, pp. 325-47, 2004.
 - [77] L. Turell *et al.*, "Reactivity of Sulfenic Acid in Human Serum Albumin," *Biochemistry*, vol. 47, no. 1, pp. 358-367, 2008.
 - [78] S. Barelli *et al.*, "Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics," *Proteomics Clin Appl*, vol. 2, no. 2, pp. 142-57, 2008.
 - [79] W. Vogt, "Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal," *Free Radic Biol Med*, vol. 18, no. 1, pp. 93-105, 1995.
 - [80] R. T. Dean, S. Fu, R. Stocker, and M. J. Davies, "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation," *Biochem J*, vol. 324 (Pt 1), no. Pt 1, pp. 1-18, 1997.
 - [81] R. A. Houghten and C. H. Li, "Reduction of sulfoxides in peptides and proteins," *Methods Enzymol*, vol. 91, pp. 549-59, 1983.

- [82] F. Rigoldi, S. Donini, A. Redaelli, E. Parisini, and A. Gautieri, "Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications," *APL Bioeng*, vol. 2, no. 1, p. 011501, 2018.
- [83] A. Karshikoff and R. Ladenstein, "Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing," *Protein Eng*, vol. 11, no. 10, pp. 867-72, 1998.
- [84] S. Kumar, B. Ma, C. J. Tsai, and R. Nussinov, "Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers," *Proteins*, vol. 38, no. 4, pp. 368-83, 2000.
- [85] M. Robinson-Rechavi, A. Alibés, and A. Godzik, "Contribution of Electrostatic Interactions, Compactness and Quaternary Structure to Protein Thermostability: Lessons from Structural Genomics of *Thermotoga maritima*," *Journal of Molecular Biology*, vol. 356, no. 2, pp. 547-557, 2006.
- [86] J. K. Dhanjal, V. Malik, N. Radhakrishnan, M. Sigar, A. Kumari, and D. Sundar, "Computational Protein Engineering Approaches for Effective Design of New Molecules," in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, and C. Schönbach Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 631-643.
- [87] C. A. Tracewell and F. H. Arnold, "Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 13, no. 1, pp. 3-9, Feb 2009.
- [88] S. A. Marshall, G. A. Lazar, A. J. Chirino, and J. R. Desjarlais, "Rational design and engineering of therapeutic proteins," *Drug Discov Today*, vol. 8, no. 5, pp. 212-21, Mar 1 2003.
- [89] Z. N. Candan, "Candida methylica Kaynaklı NAD+- Bağımlı Format Dehidrojenaz enziminin koenzim özelliğinin rasyonel dizayn ile değiştirilme denemeleri," Yüksek Lisans Tezi, İleri Teknolojiler, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2008.
- [90] P. D. Hsu, E. S. Lander, and F. Zhang, "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering," *Cell*, vol. 157, no. 6, pp. 1262-1278, Jun 5 2014.
- [91] M. P. Weiner, K. A. Felts, T. G. Simcox, and J. C. Braman, "A method for the site-directed mono- and multi-mutagenesis of double-stranded DNA," *Gene*, vol. 126, no. 1, pp. 35-41, Apr 15 1993.
- [92] T. A. Kunkel, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, no. 2, pp. 488-92, Jan 1985.
- [93] J. A. Wells and D. A. Estell, "Subtilisin--an enzyme designed to be engineered," *Trends Biochem Sci*, vol. 13, no. 8, pp. 291-7, Aug 1988.
- [94] M. F. Carey, C. L. Peterson, and S. T. Smale, "PCR-mediated site-directed mutagenesis," *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2013, no. 8, pp. 738-42, Aug 1 2013.
- [95] C. Papworth, J. Bauer, and J. Braman, "Site-Directed Mutagenesis in One day with >80% Efficiency," *Strategies*, vol. 9, pp. 3-4, 01/01 1996.

- [96] F. Castorena, K. Peñuelas-Urquides, and M. Bermúdez de León, "Site-Directed Mutagenesis by Polymerase Chain Reaction," 2016.
- [97] Agilent. "QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits - Details & Specifications." <https://www.agilent.com/en/quikchange-ii-site-directed-mutagenesis-kits-details>, 23.11.2020.
- [98] S. Skariyachan and S. Garka, "Chapter 1 - Exploring the binding potential of carbon nanotubes and fullerene towards major drug targets of multidrug resistant bacterial pathogens and their utility as novel therapeutic agents," in *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*, A. M. Grumezescu Ed.: William Andrew Publishing, 2018, pp. 1-29.
- [99] M. T. Muhammed and E. Aki-Yalcin, "Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives," *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 93, no. 1, pp. 12-20, 2019.
- [100] A. Waterhouse *et al.*, "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. W1, pp. W296-w303, Jul 2 2018.
- [101] J. Moult, J. T. Pedersen, R. Judson, and K. Fidelis, "A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods," *Proteins*, vol. 23, no. 3, pp. ii-v, Nov 1995.
- [102] J. Haas *et al.*, "The Protein Model Portal--a comprehensive resource for protein structure and model information," *Database (Oxford)*, vol. 2013, pp. bat031-bat031, 2013.
- [103] J. M. Bujnicki, A. Elofsson, D. Fischer, and L. Rychlewski, "LiveBench-2: large-scale automated evaluation of protein structure prediction servers," *Proteins*, vol. Suppl 5, pp. 184-91, 2001.
- [104] V. A. Eyrich *et al.*, "EVA: continuous automatic evaluation of protein structure prediction servers," *Bioinformatics*, vol. 17, no. 12, pp. 1242-3, Dec 2001.
- [105] I. Y. Y. Koh *et al.*, "EVA: evaluation of protein structure prediction servers," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 13, pp. 3311-3315, 2003.
- [106] H. Jalily Hasani and K. Barakat, "Homology Modeling: an Overview of Fundamentals and Tools," *International Review on Modelling and Simulations (IREMOS)*, vol. 10, p. 129, 04/30 2017.
- [107] Qiagen. "TAGZyme pQE-2 Plasmid." Snapgene. [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=qiagen_vectors&plasmid=TAGZyme pQE-2](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=qiagen_vectors&plasmid=TAGZyme_pQE-2), 04.01.2021.
- [108] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, pp. 248-54, May 7 1976.
- [109] V. I. Tishkov *et al.*, "Catalytic Properties and Stability of a *Pseudomonas* sp.101 Formate Dehydrogenase Mutants Containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met Replacements," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 192, no. 2, pp. 976-981, 1993.

- [110] C. C. des Francs-Small *et al.*, "Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues," *Plant physiology*, vol. 98, no. 1, pp. 273-278, 1992.
- [111] K. Schirwitz, A. Schmidt, and V. S. Lamzin, "High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*," *Protein Sci*, vol. 16, no. 6, pp. 1146-56, Jun 2007.
- [112] B. Földesi. "Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design." <https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design>, 28.01.2021.
- [113] N. V. Bykova, A. Stensballe, H. Egsgaard, O. N. Jensen, and I. M. Møller, "Phosphorylation of formate dehydrogenase in potato tuber mitochondria," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 28, pp. 26021-30, Jul 11 2003.
- [114] E. J. Walker, J. Q. Bettinger, K. A. Welle, J. R. Hryhorenko, and S. Ghaemmaghani, "Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 13, pp. 6081-6090, 2019.
- [115] S. C. Thomas, A. Alhasawi, C. Auger, A. Omri, and V. D. Appanna, "The role of formate in combatting oxidative stress," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 109, no. 2, pp. 263-271, 2016/02/01 2016.
- [116] K. Xu, V. N. Uversky, and B. Xue, "Local flexibility facilitates oxidization of buried methionine residues," *Protein Pept Lett*, vol. 19, no. 6, pp. 688-97, Jun 1 2012.
- [117] J. Huang *et al.*, "Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in *Arabidopsis*," *Journal of Experimental Botany*, vol. 69, no. 14, pp. 3491-3505, 2017.

DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

PREDICTED: Gossypium hirsutum formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC1028990049) XM_016894382.1 Length: 1639 Number of Matches: 1

Range 1: 309 to 1418				GenBank	Graphics	Next Match	
Score	Expect	Identities	Gaps			Strand	
1840 bits(2040)	0.0	1083/1112(97%)	12/1112(1%)			Plus/Pl	
Query 46	AAATGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG				105	
Sbjct 309	AAAAAGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG				368	
Query 106	TTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGT	TGCGCCATG	GCTGGAATCACAGGGGCATCAGT			165	
Sbjct 369	TTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGT	TGCGCCATG	GCTGGAATCACAGGGGCATCAGT			428	
Query 166	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAGAAGCATATCCCTGATC					225	
Sbjct 429	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAGAAGCATATCCCTGATC					488	
Query 226	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA					285	
Sbjct 489	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA					548	
Query 286	AAGCCAAAAACTTGCAACTGCTTCTCAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA					345	
Sbjct 549	AAGCCAAAAACTTGCAACTGCTTCTCAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA					608	
Query 346	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCCTCG					405	
Sbjct 609	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCCTCG					668	
Query 406	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTCGTACCTGGTTATC					465	
Sbjct 669	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTCGTACCTGGTTATC					728	
Query 466	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTGCAAGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG					525	
Sbjct 729	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTGCAAGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG					788	
Query 526	AAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT					585	
Sbjct 789	AAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT					848	
Query 586	TGAACCAATTCAACTGTAATCTCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG					645	
Sbjct 849	TGAACCAATTCAACTGTAATCTCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG					908	
Query 646	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGAGACA					705	
Sbjct 909	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGAGACA					968	
Query 706	TTATTGTCATAAACTAATCTTAAGTGAAGACAAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGA					765	
Sbjct 969	TTATTGTCATAAACTAATCTTAAGTGAAGACAAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGA					1028	
Query 766	TCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA					825	
Sbjct 1029	TCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA					1088	
Query 826	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTACAGTGGAGATGTTT					885	
Sbjct 1089	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTACAGTGGAGATGTTT					1148	
Query 886	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGA					945	
Sbjct 1149	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGA					1208	
Query 946	CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG					1005	
Sbjct 1209	CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG					1268	
Query 1006	ATATGCTTGAGAGGTAAGTCAAAAGGTGAAGACTTTCTG-ACAG-ACTACA-TGTC-AAG					1061	
Sbjct 1269	ATATGCTTGAGAGGTAAGTCAAAAGGTGAAGACTTTCTG-ACAG-ACTACA-TGTC-AAG					1328	
Query 1062	CAGGTGGAGCYTCGCTCCTCATTACCGATGA-TTCG-KGTATC-TCGTCAATGAAGARAA					1118	
Sbjct 1329	CAGGT-GAGC-TCGCTCCTCAATACCGATGA-TTCG-KGTATC-TCGTCAATGAAGARAA					1386	
Query 1119	GTC--GATGTGATCCGTTGATAGCT-AACGTA		1147				
Sbjct 1387	GTCCAAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTA		1418				

Şekil A.1 M225L'nin BLASTn ile DNA Hizalama Görüntüsü (Mutasyon noktası kırmızı çember ile gösterilmiştir.)

PREDICTED: Gossypium hirsutum formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC1028990049|XM_016894382.1 Length: 1639 Number of Matches: 1

Range 1: 309 to 1410		GenBank	Graphics			Next Match	Pr
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
1851 bits(2052)	0.0	1082/1108(98%)	13/1108(1%)	Plus/Plus			
Query 47	AAATG	TTTGTGGGGTGT	TTTACAAAGGCCAACGAGTACTTTACGA	AAATCCCAACTTTG	106		
Sbjct 309	AAAAGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAAGGCCAACGAGTACTTTACGA	AGATCCCAACTTTG	368			
Query 107	TTGGTTGKGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCC	ATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	166				
Sbjct 369	TTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCC	ATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	428				
Query 167	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATC	226					
Sbjct 429	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATC	488					
Query 227	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	286					
Sbjct 489	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	548					
Query 287	AAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	346					
Sbjct 549	AAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	608					
Query 347	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	406					
Sbjct 609	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	668					
Query 407	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTCGTACCTGGTTATC	466					
Sbjct 669	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTCGTACCTGGTTATC	728					
Query 467	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	526					
Sbjct 729	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	788					
Query 527	AAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	586					
Sbjct 789	AAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	848					
Query 587	TGAAACCAATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	646					
Sbjct 849	TGAAACCAATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	908					
Query 647	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	706					
Sbjct 909	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	968					
Query 707	TTATTGTCATAAATATGCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGCTAATTGACAAAGATCGGA	766					
Sbjct 969	TTATTGTCATAAATATGCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGCTAATTGACAAAGATCGGA	1028					
Query 767	TCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	826					
Sbjct 1029	TCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	1088					
Query 827	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT	886					
Sbjct 1089	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT	1148					
Query 887	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGA	946					
Sbjct 1149	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGA	1208					
Query 947	CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG	1006					
Sbjct 1209	CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG	1268					
Query 1007	ATATGCTTGAGAGGTAATTC-AAGGTGAAGACTTTCCTG-ACAG-CTACATTGTC-AAG	1062					
Sbjct 1269	ATATGCTTGAGAGGTAATTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACATTGTCAAAG	1328					
Query 1063	CAGGTGAGCTYCGCTCCTC-ATACCGATGATTTTCGKG--TTCCTCGTTTCATKGAAAGAGA	1119					
Sbjct 1329	CAGGTGAGCT-CGCTCCTCAATACCGATGATTTTCGTTTCTTCGTCCAT-GAAAGAGA	1386					
Query 1120	AGCTCCGAATGTGATCCGGTTGGATAGT	1147					
Sbjct 1387	--GTCCAAATGTG-TTCGGTTGG-TAGT	1410					

Şekil A.2 M234L'nin BLASTn ile DNA Hizalama Görüntüsü (Mutasyon noktası kırmızı çember ile gösterilmiştir.)

PREDICTED: Gossypium hirsutum formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC1079
Sequence ID: [gij1028990049|XM_016894382.1](#) Length: 1639 Number of Matches: 1

Range 1: 359 to 1493 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previ	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
1903 bits(2110)	0.0	1109/1136(98%)	8/1136(0%)	Plus/Plus		
Query 5	CCCAACCTTTGTAGATAGTTGGATG	CAGCCT - GAGCTGGCGCCCATG	GCTG - ATT	CACA	62	
Sbjct 359	CCCAAC - TTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATG	GCTGGAAT	CACA	417		
Query 63	GGG - CATCAGTATATTGTA - -CGACGACAAGAAGGGACCGGACTGCGA - CTTGAAAAGCA	118				
Sbjct 418	GGGGCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAAGTTGAAAAGCA	477				
Query 119	TATCC - TGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGA	177				
Sbjct 478	TATCCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGA	537				
Query 178	GAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCA	237				
Sbjct 538	GAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCA	597				
Query 238	TGTTGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAA	297				
Sbjct 598	TGTTGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAA	657				
Query 298	TGTCGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTTCTG	357				
Sbjct 658	TGTCGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTTCTG	717				
Query 358	ACCTGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGC	417				
Sbjct 718	ACCTGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGC	777				
Query 418	TTATGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTT	477				
Sbjct 778	TTATGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTT	837				
Query 478	ACTCCAGCGATTGAAACCATTCAACTGTAATCTCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGA	537				
Sbjct 838	ACTCCAGCGATTGAAACCATTCAACTGTAATCTCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGA	897				
Query 538	TCCAGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCC	597				
Sbjct 898	TCCAGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCC	957				
Query 598	AAAATGTGACATTATTGTCAATAATATGCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGA	657				
Sbjct 958	AAAATGTGACATTATTGTCAATAATATGCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGA	1017				
Query 658	CAAAGATCGGATCGCGAACTAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGC	717				
Sbjct 1018	CAAAGATCGGATCGCGAACTAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGC	1077				
Query 718	GATCATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAG	777				
Sbjct 1078	GATCATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAG	1137				
Query 778	TGGAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAA	837				
Sbjct 1138	TGGAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAA	1197				
Query 838	TCAAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGC	897				
Sbjct 1198	TCAAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGC	1257				
Query 898	CGGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTAATTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTA	957				
Sbjct 1258	CGGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTAATTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTA	1317				
Query 958	CATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTCTGTTGTTCTTCGTCCA	1017				
Sbjct 1318	CATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTCTGTTGTTCTTCGTCCA	1377				
Query 1018	TGAAAGAGAGTCCAAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGATACTATTGAAATAATGT	1077				
Sbjct 1378	TGAAAGAGAGTCCAAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGATACTATTGAAATAATGT	1437				
Query 1078	GATGTTTAGTATGTTGCAAAATAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACCTGATGT	1133				
Sbjct 1438	GATGTTTAGTATGTTGCAAAATAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACCTGATGT	1493				

Şekil A.3 M243L'nin BLASTn ile DNA Hizalama Görüntüsü (Mutasyon noktası kırmızı çember ile gösterilmiştir.)

PREDICTED: *Gossypium hirsutum* formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC10
Sequence ID: [gij1028990049|XM_016894382.1](#) Length: 1639 Number of Matches: 1

Range 1: 309 to 1372 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Pn

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1803 bits(1999)	0.0	1043/1069(98%)	5/1069(0%)	Plus/Plus
Query 45	AAATGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG	104	
Sbjct 309	AAAAGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG	368	
Query 105	TTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTCGCCCATG	GCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	164	
Sbjct 369	TTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTCGCCCATG	GCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	428	
Query 165	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAGCATATCCCTGATC	224		
Sbjct 429	ATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAGCATATCCCTGATC	488		
Query 225	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	284		
Sbjct 489	TCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	548		
Query 285	AAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	344		
Sbjct 549	AAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	608		
Query 345	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	404		
Sbjct 609	AGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	668		
Query 405	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCCTATTCTTGTTCGGAATTTTCGTACCTGGTTATC	464		
Sbjct 669	TTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCCTATTCTTGTTCGGAATTTTCGTACCTGGTTATC	728		
Query 465	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	524		
Sbjct 729	ATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	788		
Query 525	AAGGGAAGACAGTTGGAATATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	584		
Sbjct 789	AAGGGAAGACAGTTGGAATATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	848		
Query 585	TGAACCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	644		
Sbjct 849	TGAACCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	908		
Query 645	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	704		
Sbjct 909	AGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	968		
Query 705	TTATTGTCATAAATCTAAGCTCTAAGTGAAGACAAAGAGGGATGTTTGACAAAAGATCGGA	764		
Sbjct 969	TTATTGTCATAAATCTAAGCTCTAAGTGAAGACAAAGAGGGATGTTTGACAAAAGATCGGA	1028		
Query 765	TCGCGAAGCTAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	824		
Sbjct 1029	TCGCGAAGCTAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	1088		
Query 825	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT	884		
Sbjct 1089	CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT	1148		
Query 885	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAANGGACCATCCATGCGCTTACATGCCAGATCAAGCTATG	944		
Sbjct 1149	GGTACCCGCAACCTGCTCCGAA-GGACCATCCATGCGCTTACATGCCAAATCAAGCTATG	1207		
Query 945	ACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAANNCA	1004		
Sbjct 1208	ACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG-AGTCAA	1266		
Query 1005	GGANNNGCTTGANNAGGNACCTCAAAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCA	1064		
Sbjct 1267	GGATATGCTTGA-GAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCA	1325		
Query 1065	AAGCGGGTGAGNNNGCTCCTCAATACCGAAGAAATTCNGGGNTTCTTC	1113		
Sbjct 1326	AAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATG-ATTTC-GTGGTTTCTTC	1372		

Şekil A.4 M225L/M243L'nin BLASTn ile DNA Hizalama Görüntüsü (Mutasyon noktaları kırmızı çember ile gösterilmiştir.)

Range 1: 309 to 1499 GenBank Graphics						▼ Next Match ▲ Prev	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand		
2090 bits(2317)	0.0	1178/1191(99%)		0/1191(0%)	Plus/Plus		
Query 48	AAATGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGT	ACTTTACGAAGAATCCCA	ACTTTG	107		
Sbjct 309	AAAAGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGT	ACTTTACGAAGAATCCCA	ACTTTG	368		
Query 108	TTGGTTGTGTGGAGGGAG	CCTTGGGGTTCGCCCA	ATGGCTGGAATCACAGGG	GATCAGT	167		
Sbjct 369	TTGGTTGTGTGGAGGGAG	CCTTGGGGTTCGCCCA	ATGGCTGGAATCACAGGG	GATCAGT	428		
Query 168	ATATTGTTACCGACGACA	AAGAAGGACCGGACTGC	GAACTTGAAAAGCATAT	CCCTGATC	227		
Sbjct 429	ATATTGTTACCGACGACA	AAGAAGGACCGGACTGC	GAACTTGAAAAGCATAT	CCCTGATC	488		
Query 228	TCCATGTGCTCATATCG	ACCCATTCCACCCGGCT	TACGTTACGGCTGAGAG	GATCAAGA	287		
Sbjct 489	TCCATGTGCTCATATCG	ACCCATTCCACCCGGCT	TACGTTACGGCTGAGAG	GATCAAGA	548		
Query 288	AAGCCAAAACTTGCAACT	GCTTCTCACAGCAGGG	ATTGGCTCCGATCATG	TTGATCTTA	347		
Sbjct 549	AAGCCAAAACTTGCAACT	GCTTCTCACAGCAGGG	ATTGGCTCCGATCATG	TTGATCTTA	608		
Query 348	AGGCAGCTGCAGAAGCT	TGTTGACTGTTGCTGA	AGTTACTGGGAGCAATG	TCGTCTCGG	407		
Sbjct 609	AGGCAGCTGCAGAAGCT	TGTTGACTGTTGCTGA	AGTTACTGGGAGCAATG	TCGTCTCGG	668		
Query 408	TTGCTGAGGACGAGCTA	ATGAGGATCTTATTCT	TGTTTCGGAATTCGT	ACCTGGTTATC	467		
Sbjct 669	TTGCTGAGGACGAGCTA	ATGAGGATCTTATTCT	TGTTTCGGAATTCGT	ACCTGGTTATC	728		
Query 468	ATCAAGTTATTACTGG	GAGTTGGAATGTTGC	AGGCATTGCTTATAG	AGCTTATGATCTCG	527		
Sbjct 729	ATCAAGTTATTACTGG	GAGTTGGAATGTTGC	AGGCATTGCTTATAG	AGCTTATGATCTCG	788		
Query 528	AAGGGAAGACAGTTG	GAACTATAGGTGCTG	GCCGATCGGCAAGCT	CTTACTCCAGCGAT	587		
Sbjct 789	AAGGGAAGACAGTTG	GAACTATAGGTGCTG	GCCGATCGGCAAGCT	CTTACTCCAGCGAT	848		
Query 588	TGAAACCATTCAACTG	TAACTCTCTATATCAT	GATCGAGTCAAGATAG	ATCCAGAATTGG	647		
Sbjct 849	TGAAACCATTCAACTG	TAACTCTCTATATCAT	GATCGAGTCAAGATAG	ATCCAGAATTGG	908		
Query 648	AGAAACAGACCCGAG	CTAAATTCGAGGAGG	ATCTTGATGCAATGCT	TCCAAAATGTGACA	707		
Sbjct 909	AGAAACAGACCCGAG	CTAAATTCGAGGAGG	ATCTTGATGCAATGCT	TCCAAAATGTGACA	968		
Query 708	TTATTGTCATAAATCT	AACTCTAACTGAGAAG	ACAAGAGGCTATTG	ACAAAGATCGGA	767		
Sbjct 969	TTATTGTCATAAATCT	AACTCTAACTGAGAAG	ACAAGAGGCTATTG	ACAAAGATCGGA	1028		
Query 768	TCGCGAAGCTAAGAA	GGGAGTCTGATTGTT	AACAATGCTCGAGG	AGCGATATGATA	827		
Sbjct 1029	TCGCGAAGCTAAGAA	GGGAGTCTGATTGTT	AACAATGCTCGAGG	AGCGATATGATA	1088		
Query 828	CTCAAGCTGTTGCTG	ATGCTTGTTCAGTGG	ACACATTGCAGGTT	ACAGTGGAGATGTTT	887		
Sbjct 1089	CTCAAGCTGTTGCTG	ATGCTTGTTCAGTGG	ACACATTGCAGGTT	ACAGTGGAGATGTTT	1148		
Query 888	GGTACCCGCAACCTG	CTCCGAAGGACCATC	CATGGCGTTACATG	CCAAATCAAGCTATGA	947		
Sbjct 1149	GGTACCCGCAACCTG	CTCCGAAGGACCATC	CATGGCGTTACATG	CCAAATCAAGCTATGA	1208		
Query 948	CTCCTCATATTTCT	GGTACCACTTATG	CGCAGTTGCGATAC	GCTGCCGGAGTCAAGG	1007		
Sbjct 1209	CTCCTCATATTTCT	GGTACCACTTATG	CGCAGTTGCGATAC	GCTGCCGGAGTCAAGG	1268		
Query 1008	ATATGCTTGAGAGGT	ACTTCAAGGTGAAG	ACTTTCTGAAACAG	AACTACATTGTCAAAG	1067		
Sbjct 1269	ATATGCTTGAGAGGT	ACTTCAAGGTGAAG	ACTTTCTGAAACAG	AACTACATTGTCAAAG	1328		
Query 1068	CAGGTGAGCTCGCT	CCTCAATACCGATG	ATTTTCGTGGTTTCT	TCGTCCATGAAAGAGAGT	1127		
Sbjct 1329	CAGGTGAGCTCGCT	CCTCAATACCGATG	ATTTTCGTGGTTTCT	TCGTCCATGAAAGAGAGT	1388		
Query 1128	CCAAATGTGTTTCG	GTTGGTAGTTAAAC	GTAAGCTACTATTG	AAATAATGTGATGTTT	1187		
Sbjct 1389	CCAAATGTGTTTCG	GTTGGTAGTTAAAC	GTAAGCTACTATTG	AAATAATGTGATGTTT	1448		
Query 1188	TGTTGCAAATAATG	TGCCATCTAAATG	GGGCTTTGAAC	TGATGTAACCTT	1238		
Sbjct 1449	TGTTGCAAATAATG	TGCCATCTATATTG	TGCTTTGAAC	TGATGTACGTT	1499		

Şekil A.5 M225L/M234L/M243L'nin BLASTn ile DNA Hizalama Görüntüsü
(Mutasyon noktaları kırmızı çember ile gösterilmiştir.)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: kurt.sinem@outlook.com

Projeler

1. E. Ordu, G. Kurt-Gür, S. Kurt, A. Sunulu, "Pamuk Bitkisinden (*Gossypium hirsutum*) İzole Edilen NAD⁺- Bağımlı Format Dehidrogenaz'ın Rekombinant Üretimi ve Biyoteknolojik Kullanımının Araştırılması," 216Z052 numaralı TÜBİTAK Projesi, 2019.

: