

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Gossypium hirsutum* FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ
ÜZERİNE BÖLGE DOYGUNLUK MUTASYONU UYGULAMALARI**

Kübra ATİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Emel Ordu

Aralık, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Gossypium hirsutum* FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ ÜZERİNE
BÖLGE DOYGUNLUK MUTASYONU UYGULAMALARI**

Kübra ATİK tarafından hazırlanan tez çalışması 02.12.2020 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

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Hatice GÜLEN, Üye

Bilgi Üniversitesi

Danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Emel ORDU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan *Gossypium hirsutum* Format Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bölge Doygunluk Mutasyonu Uygulamaları 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.

Kübra ATİK

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-3787 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

Sevgili Fulya Aytaç Türkan'a

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince engin bilgilerini benden esirgemeyen, beni her zaman hoşgörü ile karşılayan ve yol gösteren değerli hocam, tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışma süresince laboratuvarını kullandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ve tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca benimle değerli bilgilerini paylaşan sevgili Arş.Gör. Dr. Günseli KURT GÜR hocama teşekkürlerimi sunarım. Değerli laboratuvar arkadaşlarım Özge BAŞSARAÇ, Şebnem GÖK, Furkan ÇALIŞ, İrem ENGÜLEÇ, Ayşenur TOKER, Ceyda Nur ALTINIŞIK, Sabina NEZİRİ ve Eda ARSLAN'a laboratuvarda değerli ve verimli zamanlar geçirmemde yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Hayatımda desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve benim için her daim en iyisini isteyen değerli annem ve babama; benden kilometrelerce uzakta olan ama sonsuz rehberliği ile her zaman yanımda hissettiğim sevgili abim Musa ATİK'e; tez çalışmam boyunca moral ve motivasyon kaynağım olan sevgili kardeşim Betül ATİK'e; varlığını, desteğini ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam Öğr.Gör. Fulya AYTAÇ TÜRKAN'a ve şans meleğim Oğuz TÜRKAN'a sonsuz sevgi ve saygılarımı borç bilirim.

Kübra ATİK

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	16
1 GİRİŞ	19
1.1 Literatür Özeti.....	19
1.2 Tezin Amacı.....	20
1.3 Hipotez.....	21
2 GENEL BİLGİLER	22
2.1 Pamuk (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	22
2.2 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz.....	22
2.3 Protein Mühendisliği.....	26
2.3.1 Bölge Doygunluk Mutasyonu (SSM)	27
2.3.2 Dejenere Primer	28
2.4 Homoloji Modelleme.....	29
3 MATERYAL VE METOD	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Cihazlar	31
3.1.2 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler	32
3.1.3 Besiyerleri	33
3.1.4 Çözeltiler	33
3.1.5 Kullanılan Hücreler ve Vektör	37
3.2 Metod.....	38
3.2.1 Homoloji Modelleme	38
3.2.2 Plazmit DNA İzolasyonu	39

3.2.3	Bölge Doygunluk Mutasyonu	39
3.2.4	CaCl ₂ Kompetant Hücre Hazırlanması	41
3.2.5	Transformasyon	42
3.2.6	Kolorimetrik Aktivite Tayini	42
3.2.7	DNA Dizi Analizi.....	43
3.2.8	Protein Ekspresyonu.....	43
3.2.9	6xHis-Tag Sistemi Kullanılarak <i>Gh</i> FDH Enziminin Saflaştırılması	44
3.2.10	SDS-PAGE.....	44
3.2.11	Mutant Proteinlerin Karakterizasyonu	45
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	46
4.1	Sonuçlar.....	46
4.1.1	Homoloji Modelleme	46
4.1.2	Bölge Doygunluk Mutasyonu PZR Sonuçları	49
4.1.3	Transformasyon	49
4.1.4	Kolorimetrik Aktivite Sonuçları.....	50
4.1.5	DNA Dizi Analizi ve Mutasyonların Saptanması	51
4.1.6	Protein Saflaştırma.....	51
4.1.7	Kinetik Ölçümler	52
4.1.8	Termal Kararlılık.....	56
4.1.9	Mutant <i>Gh</i> FDH'lerin Homoloji Modellemesi.....	58
4.2	Öneriler.....	64
A	DNA DİZİ ANALİZİ VE CLUSTAL OMEGA	68
A.1	N184N Nükleotid Değişimi Dizi Analizi.....	68
A.2	N184R Nükleotid Değişimi Dizi Analizi.....	70
A.3	N184H Nükleotid Değişimi Dizi Analizi.....	72
A.4	D123A Nükleotid Değişimi Dizi Analizi.....	74
A.5	E198G Nükleotid Değişimi Dizi Analizi.....	76
B	HOMOLOJİ MODELİNDE AMİNO ASİT KONUMLARININ BİRBİRİNE	
	UZAKLIKLARI	79
B.1	N116-D123 Amino Asitlerinin Birbirine Olan Uzaklığı.....	79

KAYNAKÇA	80
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	85

SİMGE LİSTESİ

rpm (xg)	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
pH	Hidrojen gücü
L	Litre
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
OD	Optik yoğunluk
$^{\circ}$ C	Santigrat

KISALTMA LİSTESİ

3D	Üç boyutlu yapı
AtFDH	<i>Arabidopsis thaliana</i> Format Dehidrogenaz
Asn	Asparajin
Bp	Baz Çifti
CmFDH	<i>Candida methylica</i> Format Dehidrogenaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
PMS	Fenazin metosülfat
FDH	Format Dehidrogenaz
Pamuk	<i>Gossypium hirsutum</i> L.
GhFDH	<i>Gossypium hirsutum</i> L. Format Dehidrogenaz
CO ₂	Karbondioksit
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Format dehidrogenazın reaksiyon şemaları.....	24
Şekil 2.2	Dejenere primerlerin gösterimi.....	28
Şekil 3.1	pQE-2 vektörü şeması.....	38
Şekil 4.1	<i>GhFDH</i> 'in SWISS homoloji modeli.....	46
Şekil 4.2	<i>GhFDH</i> ile <i>CmFDH</i> dizi karşılaştırması.....	47
Şekil 4.3	<i>GhFDH</i> enziminde mutasyon noktası olan Asn184 ile NAD ⁺ koenzim bağlanma bölgesi (A; uzak görüntü, B; yakın görüntü).....	48
Şekil 4.4	Jel elektroforezi görüntüsü.....	49
Şekil 4.5	DH5 α -T1 transforme hücreleri ve BL21-DE3 transforme hücreleri.....	50
Şekil 4.6	Kolorimetrik aktivite tarama örneği.....	51
Şekil 4.7	SDS-PAGE sonucu.....	52
Şekil 4.8	N184R aktivite grafiği.....	53
Şekil 4.9	N184H aktivite grafiği.....	53
Şekil 4.10	N184R aktivite grafiği (NADP ⁺).....	54
Şekil 4.11	N184H aktivite grafiği (NADP ⁺).....	55
Şekil 4.12	N184R termal kararlılık grafiği.....	57
Şekil 4.13	N184H termal kararlılık grafiği.....	57
Şekil 4.14	N184R mutasyonunu temsil eden modelleme.....	59
Şekil 4.15	N184H mutasyonunu temsil eden modelleme.....	60
Şekil 4.16	D123 bölgesini gösteren modelleme.....	61
Şekil 4.17	<i>GhFDH</i> E198. residunun farklı kaynaklardaki dizi karşılaştırması.....	63
Şekil 4.18	E198 bölgesini gösteren modelleme.....	63
Şekil A.1	N184N nükleotid değişimi.....	69
Şekil A.2	N184R nükleotid değişimi.....	71
Şekil A.3	N184H nükleotid değişimi.....	73
Şekil A.4	D123A nükleotid değişimi.....	75
Şekil A.5	E198G nükleotid değişimi.....	77
Şekil B.1	N116- D123 amino asitlerinin birbirine olan uzaklığı.....	79

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka/modelleri.....	31
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal, enzim ve kitler.....	32
Tablo 3.3 10X TBE tampon içeriği.....	34
Tablo 3.4 SDS Jel Elektoroforezi için gerekli kimyasalların oranı.....	34
Tablo 3.5 Kolorimetrik aktivite liziz tampon kimyasal içeriği.....	36
Tablo 3.6 <i>GhFDH</i> aktivitesi için kolorimetrik analizi solüsyon içeriği.....	36
Tablo 3.7 Liziz tamponu, yıkama tamponu ve elüsyon tampon içerikleri.....	37
Tablo 3.8 PZR için tasarlanan dejenere primerler.....	39
Tablo 3.9 PZR’de kullanılan içerik miktarı.....	40
Tablo 3.10 PZR’de kullanılan termal koşullar.....	40
Tablo 3.11 DpnI endonükleaz kesimi reaksiyon içeriği.....	41
Tablo 4.1 Yabanıl tip rekombinant <i>GhFDH</i> ve mutant <i>GhFDH</i> ’lerin aktivite değerleri (NAD ⁺ koenzim olduğunda).....	54
Tablo 4.2 Yabanıl tip rekombinant <i>GhFDH</i> ve mutant <i>GhFDH</i> ’lerin aktivite değerleri (NADP ⁺ koenzim olduğunda).....	55
Tablo 4.3 Yabanıl tip rekombinant <i>GhFDH</i> ve pozitif mutant <i>GhFDH</i> ’lerin T _{0.5} değerleri.....	58

***Gossypium hirsutum* Format Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bölge Doygunluk Mutasyonu Uygulamaları**

Kübra ATİK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Emel ORDU

NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalar ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir. FDH enzimi NAD(P)⁺ varlığında formatın CO₂'e oksidasyonunu katalizlerken NAD⁺'ın NADH'a indirgenmesini ve uygun şartlarda NADH varlığında ise ters yönde, CO₂'in indirgenmesini katalizleyebilmektedir. Dolayısıyla hem CO₂ indirgeme reaksiyonlarının geliştirilmesinde hem de kiral moleküllerin optikçe saf olarak sentezlenmesi sırasında kullanılan NAD(P)H koenziminin yeniden elde edilmesinde önemli enzimlerdir. Literatür incelendiğinde, NAD⁺-bağımlı FDH enzimleri ile ilgili çalışmaların mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaştığı, bitki FDH'leri ile ilgili protein mühendisliği çalışmalarının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu nedenle pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisinden izole edilerek *E.coli* konakçı hücresinde rekombinant olarak üretilen *Gossypium hirsutum* NAD⁺-bağımlı FDH (*GhFDH*) enziminin NAD(P)H rejenerasyonunda kullanılma potansiyelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. FDH enzimleri genellikle NAD⁺ koenzimine karşı kesin bir spesifite göstermekle birlikte *GhFDH*'in NADP⁺'ye

karşı da bir afinite gösterdiği tespit edilmiştir. Belirlenen bu NADP⁺ afinitesi *GhFDH* enziminin NAD(P)H rejenerasyonu için geliştirilmeye değer olduğunu göstermektedir. NADP⁺ afinitesi gösteren bir FDH enziminin elde edilmesi endüstriyel olarak en az NADH kadar sıklıkla kullanılan NAD(P)H koenziminin rejenerasyonu için önemlidir. Bugüne kadar FDH enziminin koenzim spesifitesinin değiştirilmesine yönelik çalışmalar sonucunda NADP⁺ molekülüne kısmi aktivite gösteren birkaç mutant enzim elde edilmiştir.

Bu çalışmada Bölge Doygunluk Mutasyonu yöntemi kullanılarak *GhFDH* enziminin koenzim spesifitesinin genişletilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen mutasyonların koenzim spesifitesinin yanı sıra, substrat spesifitesi, enzim aktivitesi ve termal kararlılığı üzerine olan etkileri de incelenmiştir. *GhFDH*'de koenzim spesifitesi açısından önemli bir bölge olduğu bilinen N184 amino asidine uygulanan Bölge Doygunluk Mutasyonu ile hedef bölgede mutasyonlar içeren bir akıllı kütüphane elde edilerek mutant *GhFDH*'ler karakterize edilmiştir. Kütüphanenin aktiviteye bağlı olarak taranması sonucunda hedef bölgedeki N184R ve N184H hedef mutasyonlarına ek olarak farklı iki mutant (D123A ve E198G) daha tespit edilmiştir. Taramalar sonucu seçilen bir başka mutantta ise sadece nükleotid değişimi gerçekleştiği, amino asidin aynı kaldığı görülmüştür (N184N, AAC → AAT).

N184R mutantının katalitik aktivitesi (k_{cat}/K_m) koenzim olarak NAD⁺ kullanıldığında yabanıl tip *GhFDH*'e göre $0.39 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 'dan $0.0048 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 'a düşmüştür. NADP⁺ koenzimi kullanılarak yapılan aktivite ölçümlerinde N184R'nin katalitik aktivitesi yabanıl tip *GhFDH*'e göre $0.0042 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 'dan 0.00049 'a düşüş göstermiştir. Yabanıl tip *GhFDH*'in termal kararlılığı ($T_{0.5}$) 53.8°C iken, N184R için 50.37°C olarak hesaplanmıştır. N184H mutantının katalitik aktivitesi NAD⁺ kullanıldığında $0.017 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak ölçülürken, NADP⁺ kullanıldığında katalitik aktivite $0.00049 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Termal kararlılık ise N184H için yabanıl tip *GhFDH*'e göre yaklaşık 1°C düşüş göstermiştir. Bununla birlikte hedef dışı rastlanan iki mutasyon noktası olan D123A ve E198G'de herhangi bir aktivite elde edilmemiştir. İleriki çalışmalarda ikinci tur bölge doymuluk mutasyonu ve koenzim spesifitesi için önemli olduğu bilinen farklı residulara bölge doymuluk mutasyonu uygulanarak, NADP⁺ spesifitesi için önemli bir potansiyele sahip olan *GhFDH* enziminin koenzim tanıma aralığının genişletilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Gossypium hirsutum*, NAD⁺-bağımlı format dehidrogenaz, bölge doygunluk mutasyonu (SSM), koenzim spesifitesi.

Site Saturation Mutagenesis Applications On *Gossypium hirsutum* Formate Dehydrogenase Enzyme

Kübra ATİK

Department of Molecular Biology and Genetics

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Asts.Prof.Dr Emel ORDU

NAD⁺-dependent formate dehydrogenases (FDH, EC 1.2.1.2) are enzymes commonly found in methylotrophic microorganisms and higher plants. While the FDH enzyme catalyzes the oxidation of formate to CO₂ in the presence of NAD(P)⁺, it can catalyze the reduction of NAD⁺ to NADH and if it is reverse in the presence of NADH under appropriate conditions, the reductive catalyzes of CO₂. Therefore, they are important enzymes in the development of CO₂ reduction reactions as well as in the recovery of the NAD(P)H coenzyme used during the optically pure synthesis of chiral molecules. When the literature is examined, it is seen that studies on NAD⁺-dependent FDH enzymes focus on microorganisms, and protein engineering studies on plant FDHs are very few. Therefore, the potential of using *Gossypium hirsutum* NAD⁺-dependent FDH (*Gh*FDH) enzyme, which can be isolated from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and produced recombinantly in *E.coli* host cell, in NAD(P)H regeneration has been predicted.

Although FDH enzymes generally show a definite specification for NAD⁺ coenzyme, it has been determined that *Gh*FDH also shows an affinity for NADP⁺. This determined NADP⁺ affinity makes it worth developing for the NAD(P)H

regeneration of the *GhFDH* enzyme. It is important for the regeneration of the coenzyme NAD(P)H, which is used at least as much as NADH, as an FDH enzyme with NADP⁺ affinity needs to be obtained. Until today, several mutant enzymes that show activity to the NADP⁺ molecule have been obtained in studies aimed at changing the coenzyme specific activity of the FDH enzyme. This site is aimed at the coenzyme-specific expansion of the *GhFDH* enzyme under the Site Saturation Mutagenesis. In addition to the coenzyme specification, the effects of the obtained mutations on substrate specificity, enzyme activity and thermal application were also investigated. A smart library containing targeted mutations with the Site Saturation Mutagenesis of N184 amino acid, which is known to be an important region of coenzyme specificity in *GhFDH*, was obtained and mutant *GhFDH*s were noted.

Depending on the activity of the library, in addition to the N184R and N184H target mutations in the target region, two different mutants (D123A and E198G) were detected. The screening path was observed to occur only in the nucleotide in another mutant, and the amino acid remained the same (N184N, AAC→AAT). The catalytic activity (k_{cat}/K_m) of the N184R mutant decreased from 0.39 s⁻¹mM⁻¹ to 0.0048 s⁻¹mM⁻¹ compared to wild-type *GhFDH* when NAD⁺ was used as coenzyme. In the activity measurements using NADP⁺ coenzyme, the catalytic activity of N184R decreased from 0.0042 s⁻¹mM⁻¹ to 0.00049 compared to wild type *GhFDH*. While the thermal stability ($T_{0.5}$) of wild type *GhFDH* was 53.8°C, it was calculated as 50.37°C for N184R. The catalytic activity of the N184H mutant was measured as 0.017 s⁻¹mM⁻¹ when NAD⁺ was used, while the catalytic activity was determined as 0.00049 s⁻¹mM⁻¹ when NADP⁺ was used. Thermal stability decreased by about 1°C for N184H compared to wild type *GhFDH*.

However, no activity was obtained in D123A and E198G, two non-target mutation points. In future studies, it is thought that the coenzyme recognition range of the *GhFDH* enzyme, which has an important potential for NADP⁺ specificity, can be expanded by applying site saturation mutagenesis to different residues known to be important for second round site saturation mutagenesis and coenzyme specificity.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, site saturation mutagenesis (SSM), coenzyme specificity.

1.1 Literatür Özeti

Format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalar ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan oksidoredüktaz grubu enzimlerdir. FDH enzimi NAD(P)⁺ varlığında formatın CO₂'e oksidasyonunu katalizlerken NAD⁺'ın NADH'a indirgenmesini ve uygun şartlarda NADH varlığında ise ters yönde, CO₂'in indirgenmesini katalizleyebilmektedir [1]. Bu özelliğinden dolayı FDH'ler, hem CO₂ indirgeme reaksiyonlarının geliştirilmesinde hem de kiral moleküllerin optikçe saf olarak sentezlenmesi sırasında kullanılan NAD(P)H koenziminin yeniden eldirmesinde kullanılan önemli enzimlerdir.

Farmasötik, gıda, tarım, kozmetik ve koku gibi endüstri alanlarında optikçe saf moleküllerin sentezlenmesinin önemli olması sebebiyle kiral moleküllerin enzimatik sentezi sırasında kullanılan laktat dehidrogenaz, hidroksi isocaproate dehidrogenaz, ksilitol dehidrogenaz, mannitol dehidrogenaz ve limon monooksijenaz gibi oksidoredüktaz grubu enzimler oldukça pahalı bir koenzim olan NAD(P)H koenzimine ihtiyaç duymaktadır [2,3,4].

Pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'ın kullanıldıktan sonra ortamdan yeniden elde edilebilmesi ve yeniden kullanılabilmesi endüstriyel açıdan önemlidir [5,6]. NAD(P)H koenzimi hem ürün kalitesi hem de insan sağlığı için optik olarak saf kiral bileşiklerin elde edilmesinde gereklidir. Kiral merkezli moleküllerin sentezi kimyasal yöntemlerle gerçekleştirildiğinde rasemik karışımlar elde edilmektedir. Aktif kiral bileşiğin her iki enantiyomerini de içeren rasemik karışımlar farmasötik, gıda, tarım, kozmetik ve koku gibi optik olarak saf ürün gerektiren endüstri alanlarında problem yaratmaktadır. Kiral maddelerin elde edilmesi ile ilgili olan birçok çalışmada FDH enziminin koenzim rejenerasyonunu gerçekleştirebilen en uygun enzim olduğu belirtilmiştir [7].

GhFDH enziminin karakterizasyon sonuçları enziminin literatürde bildirilen diğer rekombinant bitki FDH enzimlerine göre formata daha yüksek afinitesi (0.76 mM) olduğunu, NAD⁺ için K_m değerinin 0.06 ± 0.01 mM ve NADP⁺ için K_m değerinin 1.98 ± 0.4 mM olduğunu göstermektedir [8]. FDH enzimleri genellikle NAD⁺ koenzimine karşı kesin bir spesifite göstermekle birlikte *GhFDH*'in NADP⁺'ye karşı da bir afinite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu NADP⁺ spesifitesi *GhFDH* enziminin biyoteknolojik kullanıma yönelik olarak geliştirilmeye değer olduğunu göstermektedir [8]. Bölge doygunluk mutasyonu yöntemi ile *Candida boidinii* FDH'i üzerinde yapılan bir çalışmada koenzim özgünlüğü ile ilgili olduğu belirlenen Asp195 ve Tyr196 amino asitleri bölgesine uygulanan iki tur bölge doygunluk mutasyonunun ardından yapılan tarama sonuçları Asp195Gln/Tyr196His çift mutantının NADP⁺'ye olan ilgisinin 900 kattan fazla arttırılabildiği bildirilmiştir [9]. *Candida methylica* FDH enzimi üzerinde bölge doygunluk mutasyonunun Asp195, Tyr196 ve Gln197 residularına uygulanması ile NAD⁺ koenzim spesifitesi NADP⁺'ye dönüştürülmüştür [10].

1.2 Tezin Amacı

NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar, format ve NAD⁺'ın karbondioksit ve NADH'ye dönüşümünü katalizlemektedir. Dolayısıyla kiral olarak saf alkollerin oluşturulması için aldehitlerin ve ketonların enzimatik indirgenmesinde kullanılması gereken ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H'nin rejenerasyonunda oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. NAD⁺-bağımlı FDH'lerin reaksiyonu tek basamakta gerçekleştirmesi ve substrat olarak kullanılan formatın ucuz ve küçük bir molekül olması, yan ürün CO₂'nin reaksiyon ortamında kolayca uzaklaştırılabilmesi FDH'leri NAD(P)H rejenerasyonunda oldukça önemli bir yere koymaktadır. Literatür incelendiğinde, NAD⁺-bağımlı FDH enzimleri ile ilgili çalışmaların mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaştığı, bitki FDH'leri ile ilgili protein mühendisliği çalışmalarının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında pamuk bitkisinden izole edilerek *E.coli* konakçı hücresinde rekombinant olarak ekspresyonu yapılmış olan *Gossypium hirsutum* NAD⁺-bağımlı FDH (*GhFDH*) enziminin NAD(P)H rejenerasyonunda kullanılma potansiyelinin

geliştirilmesi amaçlanmıştır. *GhFDH* enziminin karakterizasyon sonuçları enziminin literatürde bildirilen diğer rekombinant bitki FDH'lerine göre formata daha yüksek afinitesi (0.76 mM) olduğunu, NAD⁺ için K_m değerinin 0.06 ± 0.01 mM iken, NADP⁺ için K_m değerinin 1.98 ± 0.4 mM olduğunu göstermektedir. FDH enzimleri genellikle NAD⁺ koenzimine karşı kesin bir spesifite göstermekle birlikte *GhFDH*'in NADP⁺'ye karşı da bir afinite gösterdiği tespit edilmiştir. Belirlenen bu NADP⁺ afinitesi *GhFDH* enziminin biyoteknolojik kullanıma yönelik olarak geliştirilmeye değer olduğunu göstermektedir. Bu literatür bilgisi ve verilerinden yola çıkılarak tez çalışmamızda, NAD⁺-bağımlı *GhFDH* enziminin koenzim bağlanma spesifitesinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* FDH enziminin 3 boyutlu yapısına dayalı olarak oluşturulan homoloji model ve *Candida methylica* NAD⁺-bağımlı FDH enzimi ile daha önce yapılmış protein mühendisliği çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre enzimin koenzim spesifitesinde önemli residulardan biri olduğu belirlenen Asn184 pozisyonuna bölge doygunluk mutasyonu uygulanmıştır.

1.3 Hipotez

Proteinler üzerinde istenilen değişiklikleri yapabilmek için çeşitli protein mühendisliği yaklaşımları bulunmaktadır. Enzimlerin koenzim-substrat spesifitesini değiştirmek için en etkin yöntemin, substratın veya koenzimin bağlandığı bölgede gerçekleşen değişimlerle sağlandığı çeşitli çalışmalardan anlaşılmıştır [11,12]. Bu tez çalışması, daha önce *Candida methylica* FDH enziminde koenzim spesifitesi için önemli bir residu olduğu belirlenen Asn187 amino asidi referans alınarak *GhFDH* enzimindeki homolog residu (Asn184) üzerinde mutasyonlar yapılmasının enzimin koenzim spesifitesini değiştireceği hipotezine dayanmaktadır. *GhFDH*'in Asn184 residu üzerine Bölge Doygunluk Mutasyonu yöntemi uygulanarak "akıllı kütüphane" oluşturmuş ve seçilen mutasyonların koenzim spesifitesindeki değişikliklerin yanı sıra aktivite ve kararlılık üzerinde de etkileri olacağı düşünülerek karakterize edilmiştir.

2.1 Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.)

Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), dünyanın en önemli doğal lifidir ve önemli bir küresel tarımsal ürünü temsil etmektedir [11]. Pamuk bitkisinin verimi biyotik ve abiyotik streslere göre değişmekte olup dünya üzerinde özellikle ılıman ve sıcak iklimlerde yetiştirilmektedir. Sıcak iklim bölgelerinde yetişen bitkilerden izole edilen enzimlerin ısıya karşı dayanıklılıklarının daha yüksek olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [12,13].

Bu tez çalışmasında koenzim spesifitesi hedef alınan format dehidrogenaz enzimi bu sebeple pamuk bitkisinden izole edilerek rekombinant olarak eksprese ettirilmiştir. Böylece enzimin kullanım bulduğu ilaç, gıda, enerji sektörlerinde gerçekleştirilmekte olan biyoteknolojik sentezler sırasında ekonomik avantajlar getirebileceği öngörülmektedir [14].

2.2 NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz

Endüstriyel olarak en önemli bileşiklerin sentezini sağlayan metabolik yollar, indirgeme-yükseltgenme (redoks) reaksiyonlarını içermektedir. Endüstriyel sentez reaksiyolarında rasemik karışımlarla sonuçlanan geleneksel kimyasal sentez yöntemlerinin yerine stereospesifite özelliği sayesinde optikçe saf ürünler sağlayan dehidrogenazlar önemlidir. Nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺), 300'den fazla redoks reaksiyonunda bir koenzim olarak işlev görmektedir ve bu özelliğinden dolayı hücrel metabolizmada merkezi bir rol oynar. Buna ek olarak, literatürdeki çalışmalar NAD(P)H/NAD(P)⁺ koenzim çiftinin bazı genlerin ekspresyonunda ve bazı enzimlerin aktivitesi üzerinde düzenleyici bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

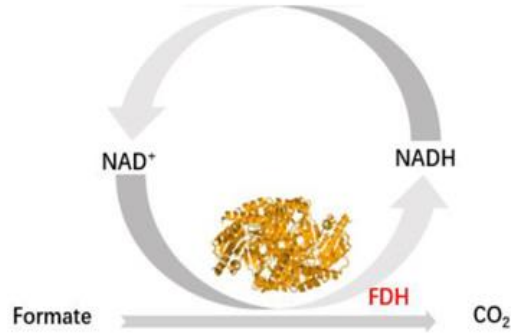
Hücre bir redoks dengesi elde etmek için NADH'dan NAD⁺'ı yeniden üretmektedir. Buna ek olarak kullanılmış koezimlerin etkili rejenerasyonu, NAD⁺ benzeri

koenzimlerin yüksek maliyeti nedeniyle endüstriyel alandaki koenzim bağımlı sentez sistemlerinde kritik bir öneme sahiptir. Koenzim rejenerasyonu yapılarak, optik olarak aktif amino asitler, kiral hidroksi asitler, esterler, alkoller ve farklı dehidrogenazlar tarafından sentezlenen diğer saf kimyasalların sentezi için in vitro olarak başarılı uygulamalar yapılmıştır [15].

T.Turnberg tarafından 1900-1922 yılları arasında keşfedilen dehidrogenazlar, indirgeme reaksiyonlarında oksijen yerine hidrojen atomlarını gideren biyolojik katalizörlerdir [16]. Buradaki esas görevi hidrojen atomunu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ye transfer ederek bir substratı oksitlemektir [17]. Dehidrogenaz enzim grubu mikroorganizmalar ve bitkiler başta olmak üzere birçok insan dokusunda da bulunmaktadır [16]. Format, ökaryotik organizmalar, öbakteri ve arkeobakteriler tarafından katalize edilen birçok reaksiyonun substratı veya ürünüdür. Bu organizmaların tümünde formatın geri dönüşümlü iki elektronlu oksidasyonunu katalize eden enzim olan format dehidrogenaz bulunmaktadır. Formatın bu özelliğinin yanı sıra daha karmaşık substratların kullanımı için yardımcı bir indirgeyici ve reaksiyonda enerji tasarrufu sağlamak için ara madde olarak işlev gördüğü bilinmektedir [18]. Genellikle formik asit formundaki format, uygulamada gıda ve hayvan yemlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır ve ayrıca diğer uygulamalarda pH regülatörü olarak da yer almaktadır. CO_2 bir substrat ya da biyolojide çok sayıda farklı enzimatik yollarla katalize edilmiş reaksiyonların bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır.

Birçok farklı reaksiyonda, CO_2 'nin formata (HCOO^-) dönüştürülmesi ile birlikte ortam sıcaklığında kinetik olarak kararlı sıvı bir kimyasal olan ürün sentezlemektedir. Karboksilasyon yoluyla CO_2 'nin reaksiyona dahil edilmesinin alternatif potansiyelinin aksine format, elektronlar ve serbest protonlar biçimindeki enerjiden başka (koenzim) reaktifler olmadan da üretilmektedir [19]. Format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalarda ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan oksidoredüktaz enzimleridir. FDH enzimi NAD(P)^+ varlığında formatın CO_2 'ye oksidasyonunu katalize ederken NAD^+ 'ın NADH 'a indirgenmesini ve uygun şartlar altında NADH varlığında ise

reaksiyonu ters yönde, CO₂'nin indirgenmesini katalizleyebilmektedir [1]. Format dehidrogenazın reaksiyon şeması Şekil 2.1'de belirtilen şekiller gibidir.



Şekil 2.1 Format dehidrogenazın reaksiyon şemaları [19,20]

Hidrit transfer reaksiyonunda substrattaki tek bir karbon-hidrojen bağı kırılmasıyla birlikte NADH ürünüde yeni bir karbon-hidrojen bağı oluşur. Substratın basit yapısı ve reaksiyon sırasında proton transfer basamaklarının olmaması, FDH'in hidrit transferini içeren genel kataliz mekanizmasının araştırılması için uygun bir model yapmaktadır. FDH enzimi aynı zamanda ilaç etken maddeleri, tarım ürünleri ve kiral ara ürünlerin sentezindeki verimlilik ve zirai kimyasal endüstrilerinden de yüksek talep görmektedir. Koenzim geri dönüşümü için FDH enzimini kullanmanın en büyük avantajı, normal koşullar altında % 100'e yakın ürün verimi sağlarken aynı zamanda geri dönüşümü olmayan katalitik bir tepkimedir. Ek olarak, format ve CO₂ reaksiyonda sentezlenen NADH'ı kullanan ortak enzimlerin aktivitelerini nadir olarak etkilemektedir [21]. Formatın düşük maliyetli olması ve geniş pH (pH 6-9) aralığında aktivite verebilmesi FDH enzimini biyokatalitik uygulamalarda kullanışlı hale getirmektedir [22]. FDH enziminin bir diğer avantajı ise NAD(P)H rejenerasyonunda reaksiyon ürünü CO₂'nin reaksiyon karışımından kolayca çıkarılabilir olması ve CO₂'nin toksik etkisinin olmamasıdır. Ayrıca CO₂'nin reaksiyon esnasında

ortamdaki enzimleri inaktive etmemesi de NAD(P)H rejenerasyonunda oldukça önemlidir. Böylece nihai ürünün saflaştırılması kolay hale gelmektedir. Bununla birlikte, metanol kullanan maya ve bakterilerden nispeten düşük üretim maliyeti ile yüksek ölçekli bir FDH enziminin üretimi sağlanmaktadır [23,24,25]. Enzimlerin yapısındaki farklılıkları inceleyerek iki ana FDH enzim grubunu ayırt etmek mümkündür. Birinci grup anaerobik mikroorganizmalar ve arkealardan oluşmaktadır. Bu gruptaki FDH'ler, kompleks bir dördüncül yapıya ve yüksek moleküler ağırlığına sahip olan heterooligomer FDH'lerdir. Genellikle enzimin aktif bölgesinde demir-sülfür kümeleri, molibden ve tungsten iyonları gibi çeşitli prostetik grupları bulunur ve oksijene karşı olan yüksek hassasiyetleri vardır. İkinci grup, her ikisi de iki aktif bölgeye sahip olan ve protein globülünde metal ve prostetik grupların bulunmadığı iki özdeş alt birimden oluşan NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlardan oluşur. Bu gruba ait FDH'ler tarafından katalizlenen format oksidasyonu reaksiyonu, karbonil bileşiklerinin dehidrogenasyonunun en basit örneğidir. Bunun sebebi ise katalitik mekanizmada proton transferinin ve asit-baz katalizinin diğer aşamalarının olmamasıdır. FDH'lerin aktif ve sistematik çalışması 1970'lerin başında başlamıştır ve öncelikle mikroorganizmaların FDH enzimlerine yönelim artmıştır. Mikrobiyal FDH'lerin fizyolojik rolü farklıdır. Örneğin; metanol kullanan bakteri ve mayada, bu enzim bir hücreye enerji sağlarken patojenik bakteriler ve mantarlarda FDH bir stres proteini olarak görülmektedir [26]. FDH'leri kodlayan genlerin en önemli karakteristik özelliklerinden biri, enzimin N-terminalinde sinyal peptidini kodlayan özel nükleotid dizisinin bulunmasıdır. Bitki genomlarındaki FDH genlerinin sayısı bir ile altı arasında değişiklik göstermektedir. Bakteri, maya ve mantarlardan elde edilen FDH'ler sitoplazmada bulunurken bitki FDH'leri mitokondride bulunmaktadır ve homodimerik bir dördüncül yapıya sahiptir. FDH, bitkilerdeki etkili bir stres enzimidir ve bitki stres koşulları altındayken mitokondrideki FDH miktarı önemli bir miktarda artış gösterir. Farklı izoenzimlerin ekspresyon seviyesi strese maruz kalma tipine bağlı olarak değişmektedir. Stres durumları kuraklık, termal değişiklikler, ultraviyole, hipoksi ve patojen enfeksiyonu gibi maruziyetler olarak sıralanabilir. Bitki hücrelerindeki düşük FDH içeriğinden dolayı, doğal enzimlerin saflaştırılması,

düşük verimle sonuçlanmaktadır ve zaman alıcı bir laboratuvar prosedürüdür. Bu nedenle, doğal bitki FDH'lerinin sistematik çalışmaları sınırlıdır [27,28,29].

2.3 Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, protein yapı-aktivite ilişkisini daha iyi anlamak ya da bir proteinin fonksiyonunu kontrol ederek aktivitesinde istenilen bir değişikliği elde etmek amacıyla mutasyonlar yaparak geliştirilmiş yeni protein molekülleri elde edilmesini amaçlamaktadır. Protein mühendisliği, genetik mühendisliğinden sonra ikinci bir yenilik dalgası olarak kabul edilmektedir. Temel araştırma ve uygulama çalışmaları, yapı-işlev ilişkileri ve endüstriyel çalışmalar için kullanışlı bir alandır [30.] Proteinler yaşamın başlangıcıdır ve amino asit dizilerini değiştirme olasılığı, temel bilimden uygulamalı bilime, gıda, endüstriyel enzimler, temizlik ürünleri gibi çeşitli alanlarda daha verimli ve daha güvenli üretimler için fırsatlar yaratmıştır [31]. Protein mühendisliği yöntemleri üç ana stratejiden oluşmaktadır; rasyonel tasarım, yönlendirilmiş evrim ve her iki yöntemin bir kombinasyonu olan yarı rasyonel tasarım (Bölge Doygunluk Mutasyonu).

1. Rasyonel Dizayn: Rasyonel dizayn, bir başka deyişle proteinlerin hesaplamalı tasarımı çalışılırken, ilgilenilen proteinin amino asit dizisine, 3D yapısına ve fonksiyon bilgisine sahip olmak gerekmektedir. Bu yöntem, kontrol edilebilir amino asit dizisi değişikliklerini (ekleme, silme veya yer değiştirme) sağlar. Kontrollü değişiklikler, özgün residu değişikliklerinin protein yapısı, katlanması, kararlılığı veya fonksiyonu üzerindeki etkisini belirlenmesi için önemlidir.
2. Yönlendirilmiş Evrim: Yönlendirilmiş evrim (in vitro evrim veya rastgele mutasyon) proteinlerin dizisi, yapısı veya fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi gerektirmemektedir. Yönlendirilmiş evrim, evrimin zaman alıcı yönünü milyonlarca yıldan aylara veya haftalara düşürerek in vitro doğal evrimi taklit etmektedir. Bu yöntem 1980'lerden bu yana çeşitli enzimlerin fonksiyonlarını arttırmak veya değiştirmek için kullanılmaktadır.
3. Yarı Rasyonel Tasarım (Bölge Doygunluk Mutasyonu): Rasyonel tasarım ya da yönlendirilmiş evrim etkili sonuçlar verse de, yönlendirilmiş evrimin zaman

alıcı tarama ve seçim sürecine ve rasyonel tasarım da amino asit dizi ve 3D bilgilerine ihtiyaç duymaktadır. Bu dezavantajları aşmak için yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır [32].

2.3.1 Bölge Doygunluk Mutasyonu (SSM)

Yarı-rasyonel tasarım ya da bölge doymunluk mutasyonu -site saturation mutagenesis- (SSM) yöntemi, rasyonel dizayn ve rastgele mutasyon yaklaşımının beraber kullanıldığı bir yöntem olarak protein mühendisliği çalışmalarında uygulanmaktadır. Bu teknikte, rasyonel dizayn yönteminde olduğu gibi 3D yapısı bilinen bir proteini kodlayan DNA dizisinde önceden belirlenmiş bir amino asit bölgesinde mutasyon çalışması yapılmaktadır. Fakat aynı zamanda dejenere primerler ile rastgele amino asit değişimi yapılarak hedeflenen bölgede farklı özellikte mutant kütüphaneler oluşturulabilir. Böylece yöntem, rastgele mutasyon uygulaması yöntemi ile paralellik gösterir. Rasyonel dizayn ve rastgele mutasyon yöntemlerinin avantajlarını kullanan Bölge Doygunluk Mutasyonu uygulamasıyla belirlenmiş hedef bölgede rastgele mutasyonlar ile çalışılan proteinde istenilen özelliğin elde edilmesi ihtimali arttırılmaktadır. Oluşturulan mutant kütüphane, önceden belirlenen hedef bölgede 22 farklı amino asit değişikliğinin tüm olasılıklarını içermesini beklendiğinden “akıllı kütüphane” olarak da tanımlanmaktadır. Böylelikle elde edilen daraltılmış kütüphanenin taranması daha hızlı ve kolay yapılmaktadır. Enzimlerin koenzim-substrat spesifitesini arttırmak için uygulanan en etkili yöntem, substratın veya koenzimin bağlandığı bölgede gerçekleşen değişimlerle sağlanmıştır ve bu uygulamalar çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir [33,34].

DNA karışımı, Error-prone PZR (epPCR) gibi diğer rastgele mutasyon teknikleri tüm gen üzerinde değişikliklere neden olmaktadır. Böylece taranması zor olan geniş gen kütüphanelerinin oluşmasına neden olmaktadır [35,36,37]. Bu nedenle, sadece koenzim bağlanmasıyla ilişkili olan bölgedeki amino asitlerin değiştirilmesine yönelik SSM yöntemi daha çok tercih edilmektedir. SSM yöntemi kullanılarak oluşturulan kütüphane, homoloji modelleme ile edinilmiş bilginin

kullanılmasına imkan verdiğinden ve enzim-substrat ya da enzim-koenzim kompleksinden uzak olan amino asitlerin değişimi yerine, koenzime en yakın amino asitlerin değişimini içerdiğinden protein mühendisliği metodları içerisinde hedefe en iyi ulaşılabilen yöntem olarak kabul görmektedir [38]. Bu yöntemle farklı özellikleri geliştirilmiş FDH enzimleri ve farklı enzimler bulunmaktadır [1,2,3,39,40]. SSM, protein yapısındaki aktivite ya da substrat bağlanması gibi fonksiyonlar için kritik olan amino asitler üzerinde kombinasyonel doygunluk mutasyonunun gerçekleştirilmesine ve yeni veya geliştirilmiş enzimatik özellikler için bağlama bölgesinin optimizasyonuna izin verebilmektedir [41].

2.3.2 Dejenere Primer

Bölge doygunluk mutasyonu deneylerinin temeli, kodon dejenerasyonu veya kodonun rastlantısallığına dayanmaktadır. Dejenere primerler tamamen rastlantısal bir kodon (NNN, burada N = A, C, G veya T), 22 amino asidin ve 3 durdurma kodonunun tümünü kodlayan 64 farklı diziden oluşan bir kütüphane boyutu ile sonuçlanır. Bir deney için tasarlanan dejenere primer ile birden fazla kodonu hedeflediğinde, kütüphane boyutu önemli ölçüde yüksek olabilir [42].



Şekil 2.2 Dejenere primerlerin gösterimi [43]

Mutasyona uğratılacak protein içindeki her pozisyon için iki dejenere primer tasarlanır ve kullanılır. Tasarlanan her iki primer de hedeflenen mutasyonu içerir ve DNA kalıbının karşılıklı yönlerinde aynı diziye bağlanır. Mutasyon bölgesi genellikle dizayn edilen primerin ortasında bulunmaktadır. Şekil 2.2'de de

gösterildiği gibi kodlanan iplik primeri mutasyona uğratılacak pozisyonda NNK, kodlamayan iplik ise MNN içerir. N, dört nükleotidin tamamını içerirken; K eşit bir G ve T karışımıdır; ve M, A ve C'nin eşit bir karışımıdır. Bu primer tasarımıyla mutasyon, 22 amino asidin tamamı ve bir durdurma kodonu için kodlayan 32 farklı dizinin bir karışımını vermektedir [43].

2.4 Homoloji Modelleme

Protein fonksiyon mekanizmasını anlayabilmek için genellikle protein dizisi tarafından belirlenen proteinin üç boyutlu yapısı hakkında bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. X-ışını kristalografisi veya NMR spektroskopisi gibi deneysel yöntemler kullanılarak protein yapısı belirlenmesi zaman alıcı uygulamalar arasında yer almaktadır. Bu nedenle homoloji modelleme ile üç boyutlu yapı elde edilmesi alternatif bir yoldur [44].

Bir proteinin dizisi belli ise homoloji modellemesi yapmak için dört adıma ihtiyaç duyulmaktadır [44]:

Protein Veri Bankası'ndan bilinen yapının homologunu tanımlama; araştırılan dizinin kalıp yapısına hizalama; hizalamaya göre model oluşturma; modeli belirleme ve geliştirme [44].

Homoloji modelleme programları arasında önemli bir yere sahip olan SWISS-MODEL, ilk tam otomatik protein homoloji modelleme sunucusudur ve son 25 yılda sürekli olarak geliştirilmiştir [44].

Modelleme işlevselliği, etkileşen ortak amino asit dizileri göz önüne alındığında homomerik ve heteromerik kompleks protein yapılarının modellemesini de içermektedir. 2014 yılında günde yaklaşık 1500 modelleme yapılırken bu sayı yıllar içinde günde yaklaşık 3000 modellemeye yükselmiştir [45].

PyMOL bir moleküler görselleştirme sistemidir. Yaygın olarak modelleme sistemi olarak kullanılmaktadır ve noktalar, yüzeyler, küreler, çubuklar ve çizgiler dahil olmak üzere farklı şekillerde makromoleküllerin yüksek kaliteli filmlerini ve görüntülerini tasarlayabilmektedir.

PyMOL'deki görselleştirme ve gelişmiş analiz fonksiyonlarının yanı sıra, aynı zamanda protein-ligand modelleme, moleküler simülasyonlar (MS) ve sanal tarama (VS) birimleri de bulunmaktadır [46].

3.1 Materyal

3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/modelleri aşağıdaki Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Ekipman	Marka/Model
Çalkalayıcı inkübatör	JSR
Güvenlik kabini	Hedlab X-Bio Class-II
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Jel elektroforez cihazı	Thermo fisher EC250-90
Manyetik balık	Thermo fischer
Manyetik karıştırıcı	Thermo fischer
Mikropipet	Eppendorf
Mikroplaka spektrofotometre	Biotek Instruments MQX200R2
Nanodrop	Thermo Scientific One/OneC
Otoklav	Hirayama HVE-50
pH metre	Hanna Instruments
Santrifüj	Hettich Universal 32R
SDS-PAGE Ekipmanları	BIORAD
Sonikatör	Bandelin-Sonoplus
Termal cihazı	PeQStar
UV Spektrometre	Shimadzu UV-1800
Vorteks	Heidolph, Stuart
-80°C derin dondurucu	Thermo fischer

3.1.2 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, enzimler ve kitler ile firmaları aşağıda Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal, enzim ve kitler

Kimyasallar	Firma
Agaroz	Sigma Aldrich
Akrilamid	BIORAD
Amonyum persülfat (APS)	BIORAD
Ampisilin	BioShop
Coomassie brilliant blue	Sigma-Aldrich
Dipotasyum Fosfat	IsoLab
DL-Dithiothreitol (DTT)	GoldBio
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fenazin metosülfat (PMS)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Gliserol	Multicell
İmidazol	Sigma-Aldrich
Lizozim	Sigma-Aldrich
Monopotasyum Fosfat	IsoLab
NAD ⁺	Biomatik
NADH	Biomatik
NADP ⁺	Biomatik
Nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA Agaroz)	QIAGEN
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Thermo fisher
Sodyum klorid (NaCl)	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck
Sodyum format	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tripton	Sigma-Aldrich
TRIS	Sigma-Aldrich
Maya ekstraktı	Sigma-Aldrich

Tablo 3.2 (devamı) Çalışmada kullanılan kimyasal, enzim ve kitler

Enzim	Firma
DpnI	İnvitrogen
Taq DNA Polimeraz	İnvitrogen
Kitler	Firma
EcoSpin Plasmid İzolasyon Kiti	EcoTech

3.1.3 Besiyerleri

LB (Luria-Bertani) Besiyeri: 1 litre LB sıvı besiyeri için; 10 g tripton, 5 g NaCl ve 5 g maya ekstraktı distile suda çözülür ve pH'ı 7.0'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

1 litre LB katı besiyeri için; LB sıvı malzemelerine ek olarak 15 g agar eklenir ve pH'ı 7.0'a ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sıcaklığı katılaşmayacak kadar düştüğünde ampisilin antibiyotiği eklenir ve petri kaplarına 25 ml olacak şekilde pay edilir. Besiyeri katılaştıktan sonra +4°C'de saklanır.

Terrific Broth (TB) Besiyeri: 1 litre TB besiyeri için; 12 g Tripton, 24 g maya ekstraktı ve 4 ml gliserol 900 ml distile su ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır. 2.31 g KH_2PO_4 ve 12.54 g K_2HPO_4 100 ml distile su içinde çözülür. Potasyum fosfat tamponu ve TB besiyeri ayrı ayrı 121°C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika sterilize edilir. Besiyerinin sıcaklığı 60°C'ye düştüğünde içerisine potasyum fosfat tamponu eklenir.

SOB (pH 7.0) (Super Optimal Broth): %2 Tripton, %0.5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 içeriği hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

SOC (Super Optimal Broth with added Glycose): 49 ml soğumuş SOB'ye, 1 ml filtreden geçirilerek sterilize edilmiş 1 M glikoz solüsyonu eklenerek elde edilir.

3.1.4 Çözeltiler

Ampisilin: 100 mg/ml'lik stok solüsyonlar hazırlanarak filtre ile sterilize edilir. -20°C'de saklanır.

IPTG(Isopropyl-B-D-thiogaltopyranoside): 1 M hazırlanan stok çözelti filtre ile sterilize edildikten sonra -20°C'de saklanır.

Agaroz Jel Elektroforezi: %1'lik agaroz jel elde etmek için 0.4 g agaroz 40 ml Tris-Borat-EDTA (TBE, pH 8.3) tamponunun içinde çözülür. TBE tamponu 10X'lik stok çözelti olarak hazırlanır ve tampon agaroz jel yapımı için 1X'e seyreltilir. Oda sıcaklığında saklanabilir. TBE tampon için gerekli kimyasalların miktarları Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Kimyasallar 800 ml dH₂O içinde karıştırıldıktan sonra pH 8.3'e ayarlanır ve ardından tamponun hacmi 1 L'ye tamamlanır.

Tablo 3.3 10X TBE tampon içeriği

Kimyasallar	Miktar
Tris-baz	54.0 g
Borik Asit	27.50 g
EDTA	7.440 g
dH ₂ O	1 L

SDS Jel Elektroforezi: SDS jel elektroforezi yürütme jeli ve toplama jeli olmak üzere toplamda iki jelden oluşur. Bir jel için gerekli olan kimsalların oranı aşağıda verilen Tablo 3.4'de belirtilmiştir.

Tablo 3.4 SDS Jel Elektoroforezi için gerekli kimyasalların oranı

Kimyasallar	Yürütme jeli (%12)	Toplama jeli (%5)
dH ₂ O	1600 µL	1800 µL
Tris (1.5 M)	1300 µL	-
Tris (0.5 M)	-	312.5 µL
SDS Solüsyonu (%10)	50 µL	25 µL
Akrilamid (%30)	2000 µL	335 µL
APS (%10)	50 µL	25 µL
TEMED	5 µL	2.5 µL

SDS jellerini hazırlamak için kullanılan %10'luk SDS solüsyonu hazırlamak için 10.0 g SDS 100 ml dH₂O'da, %10'luk APS hazırlamak için 0.1 g APS 1 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. %12'lik yürütme jeli için gerekli olan 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) solüsyonu hazırlamak için 18.15 g Tris-baz 100 ml dH₂O'da ve %5'lik toplama jeli için gerekli olan 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) solüsyonu hazırlamak için 6.0 g Tris-baz 100 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. SDS jel elektroforezinde proteinlerin jelde elektrik akımı ile yürümesini sağlayan 10X SDS yürütme tamponunu hazırlamak için 3.30 g Tris-baz, 144.0 g glisin ve 10.0 g SDS 1 L dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. Ardından kurulacak deneylerde kullanılmak üzere 10X yürütme tamponu 1X'e seyreltilmiştir. Ayrılan proteinlerin oluşturduğu bantları SDS jeli üzerinde boyamak ve tespit edebilmek üzere Coomassie Brilliant Blue (CBB) solüsyonu kullanılmıştır. 1.0 g CBB; 500 ml metanol, 100 ml glacial asetik asit ve 400 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. SDS jeli üzerinde bant oluşturan proteinlerin Coomassie Brilliant solüsyonu ile boyanması sonucu arka planda oluşan boyaların jelden uzaklaştırılması için destaining solüsyonu kullanılmıştır. Destaining solüsyonu 200 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml dH₂O'un karışımı sonucu hazırlanmıştır. DTT solüsyonu, SDS jel üzerindeki proteinlerin disülfid bağlarını zayıflatarak proteinin jelde yürümesini kolaylaştırması için yükleme boyası ile karıştırılarak kullanılmıştır. 50 mM DTT solüsyonu, 0.77 g DTT 100 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. Kompetent hücrelerin porlarını genişletmek için kullanılan CaCl₂ solüsyonu 1.47 g CaCl₂*2H₂O 100 ml dH₂O'da çözülmüş ve filtre ya da otoklav ile sterilize edilmiştir.

Kolorimetrik Aktivite Liziz Tamponu:

Proteinin kolorimetrik aktivite tayini için gerekli olan liziz tamponun 500 ml hacmi için kimyasal bileşenleri Tablo 3.5'te verilmiştir. Kimyasalların üzerine 480 ml dH₂O eklendikten sonra pH 8.0'e ayarlanarak tamponun hacmi dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Tablo 3.5 Kolorimetrik aktivite liziz tampon kimyasal içeriği

Kimyasallar	Miktar
Tris-HCl (1M, pH 8)	5 ml
EDTA (0.5M)	1 ml
SDS (%10)	5 ml
dH ₂ O	500 ml

1 M TRIS HCl (pH 8.0), 60.870 g Tris-baz 500 ml dH₂O'da çözülerek ve 0.5 M EDTA solüsyonu 73.06 g EDTA'nın 500 ml dH₂O'da çözünmesi ile hazırlanmıştır.

GhFDH Aktivitesi Kolorimetrik Analizi:

Mutant ve yabancı tip GhFDH enziminin kolorimetrik aktivite tayini, 20 µl 10 mM NAD⁺, 20 µl 200 mM format, 20 µl GhFDH enzimi ve 140 µl reaksiyon solüsyonu (Tablo 3.6) varlığında ölçülmüştür. 10 mM NAD⁺ 0.0730 g NAD⁺'ın 10 ml dH₂O'da; 10 mM NADP⁺ 0.06580 g NADP⁺'nin 10 ml dH₂O'da; 200 mM format 0.90 g formatın 10 ml dH₂O'da çözünmesi ile hazırlanmıştır [10].

Tablo 3.6 GhFDH aktivitesi için kolorimetrik analizi solüsyon içeriği

Kimyasallar	Miktar
Tris-HCl (50mM, pH 8.0)	0.60 g
NBT (300 µM)	0.0240 g
PMS (30 µM)	0.00092 g
dH ₂ O	100 ml

Protein Saflaştırma:

Protein saflaştırması liziz tamponu, yıkama tamponu ve elüsyon tamponu olan üç farklı tampon ile gerçekleştirilmiştir. Kimyasal bileşenler ve miktarları Tablo

3.7'de gösterilmiştir. Ultrafiltrasyonda kullanılan 50 mM potasyum fosfat (pH 7.0), 1.577 g KH_2PO_4 ve 2.336 g K_2HPO_4 500 ml dH_2O 'da çözülerek hazırlanmıştır.

Tablo 3.7 Liziz tamponu, yıkama tamponu ve elüsyon tampon içerikleri

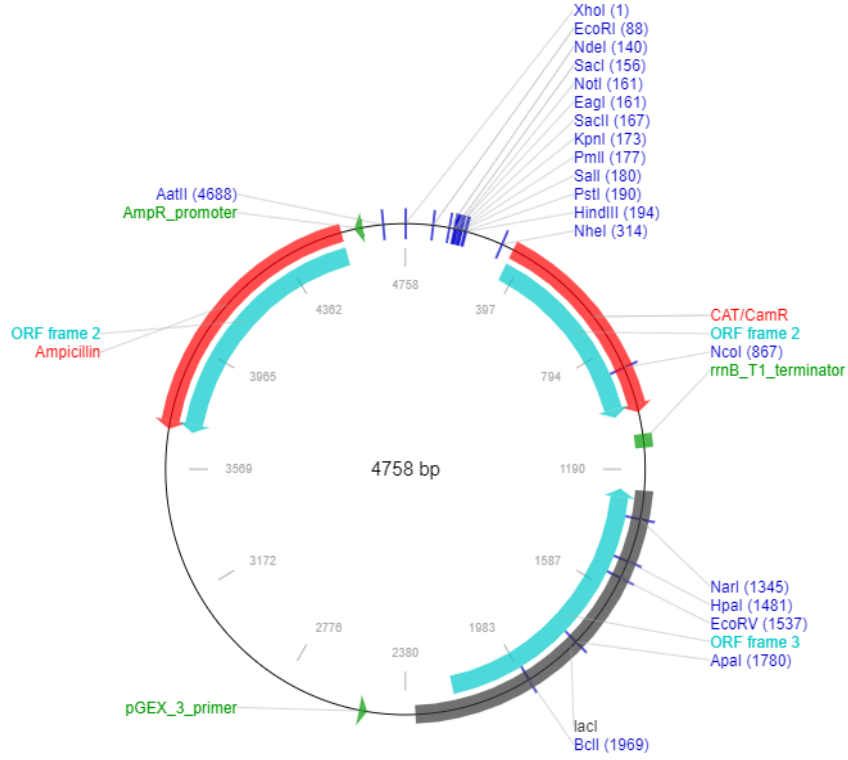
Kimyasallar	Miktar	Miktar	Miktar
	Liziz Tamponu	Yıkama Tamponu	Elüsyon Tamponu
NaH_2PO_4	6.90 g	6.90 g	6.90 g
NaCl	17.54 g	17.54 g	17.54 g
Imidazol	0.68 g (10 mM)	1.36 g (20 mM)	17.00 g (250 mM)
dH_2O	1 L	1 L	1 L

Mutant *GhFDH* Kararlı Hal Kinetiği:

Mutant *GhFDH* kararlı hal kinetiği ölçümü için 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılmıştır. 0.631 g KH_2PO_4 ve 0.934 g K_2HPO_4 500 ml dH_2O 'da çözülerek hazırlanmıştır. Kararlı hal kinetiği için tampona ek olarak; 200 mM format ve 10 mM NAD^+ , 10 mM NADP^+ ya da 0.5 mM NADH hazırlanmıştır.

3.1.5 Kullanılan Hücreler ve Vektör

Bu tez çalışmasında kullanılan *GhFDH* geni, Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda *Gossypium hirsutum* L. (pamuk) bitkisinden izole edilerek pQE-2 plazmidi içerisinde *E.coli* BL21 suşunda heterolog olarak ekprese edilmiştir [8]. Kompetent hücre olarak ticari bakteri suşlarından olan *E.coli* BL21-DE3 ve DH5 α -T1 stok hücreler kullanılmıştır. Vektör pQE-2'nin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 pQE-2 vektörü şeması [47]

3.2 Metod

3.2.1 Homoloji Modelleme

BLASTP araştırmasına göre *GhFDH* enziminin amino asit dizisinin *Arabidopsis thaliana* FDH enzimi ile ~% 88, *Candida methylica* NAD⁺-bağımlı FDH enzimi ile ~%52 benzerliği bulunmaktadır. Bitki FDH'lerinde çalışılmış olan *Glycine max* FDH ile *GhFDH* arasında da ~%82 oranında bir benzerlik vardır. *E.coli* NAD⁺-bağımlı FDH enzimi ile ise ~%50 benzerlik bulunmaktadır. Rekombinant *GhFDH*'in 3-boyutlu yapısı SWISS_MODEL homoloji modelleme ile, NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (*AtFDH*, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) FDH'inin amino asit dizisi kalıp olarak kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.2 Plazmit DNA İzolasyonu

Laboratuvarında -80°C’de stok olarak bulunan yabancı tip *GhFDH*’den alınan 2 µl hücre, 3 ml LB besiyeri ve 3 µl ampicilin içeren falkon tüpler içerisinde 37°C’de gece boyu çalkalamalı inkübatör ile 200 rpm’de büyütülmüştür. Ertesi gün toplanan *E.coli* hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu yapılarak mutasyon PZR reaksiyonu için kalıp olarak kullanılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu için “EcoSpin Plasmid Isolation Kit (ECO TECH)” kullanılmıştır. İzole edilen plazmit DNA sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.2.3 Bölge Doygunluk Mutasyonu

İzolasyonu yapılan plazmit DNA’lara bölge doygunluk mutasyonu uygulanabilmesi için hedef bölge olan Asn184 amino asidine yönelik dejenere primerler tasarlanmıştır ve tasarlanan primerler Triogen firmasına hizmet alımı olarak sentez ettirilmiştir. Tasarlanan dejenere primerler Tablo 3.8’de gösterilmektedir. Değiştirilmesi hedeflenen bölge koyu renk ile ifade edilmektedir. PZR reaksiyonu içeriği ve termal koşullar Tablo 3.9 ve Tablo 3.10’da gösterildiği gibi, “Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen)” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8 PZR için tasarlanan dejenere primerler

Mutasyon Bölgesi		Dejenere primerler
Asn184	Forward	5'-CGATTGAAACCATTC NN KTGTAATCTCCTATATC-3'
	Reverse	5'-GATATAGGAGATTAC MN NGAATGGTTTCAATCG-3'

Tablo 3.9 PZR’de kullanılan içerik miktarı

Bileşen	Miktar
PZR suyu	38.5 µl
10x PZR tamponu	5.0 µl
10 µM dNTP karışımı	1 µl
10 µM forward primer	1 µl
10 µM reverse primer	1 µl
Template DNA (60 ng/µl)	6 µl
50 µM MgSO ₄	2 µl
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2 µl

Tablo 3.10 PZR’de kullanılan termal koşullar

Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre	Evre
1	94°C	3.5 dakika	Başlangıç denatürasyon
30	94°C	30 saniye	Denatürasyon
	59 °C	30 saniye	Bağlanma
	72 °C	5.5 dakika	Uzama
1	72 °C	10 dakika	Son uzama
1	4 °C	∞	Bekletme

PZR’nin kontrolü için %1’lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel, 0.4 g agarozu 40 ml 1x TBE’nin eklenmesi ve ardından mikrodalga fırında 3 dakika kaynatılması ile çözünmesi sağlandı. Elle tutulabilir sıcaklığa düşen jel karışımına 2 µl etidyum bromür eklendi. Elektroforez kuyusuna uygun tarak yerleştirildikten sonra jel dökülerek donmaya bırakıldı. Donma işleminden sonra 1x TBE içeren tankın içine bırakılan jelle 3 µl Lambda eco14 digest marker yüklendi. 1 µl 6x loading boya (Takara) ile karıştırılan 5 µl DNA jeldeki diğer kuyucuğa yüklenir ve DNA 100 voltta 30 dakika boyunca yürütüldü.

PZR sonrası elde edilen ürünlerdeki mutasyona uğramayan genleri elimine etmek için DpnI endonükleaz kesim enzimi ile yabancı tip *GhFDH* genleri parçalanmıştır. DpnI

kesimi için kurulan reaksiyonun bileşenleri ve miktarları Tablo 3.11’de gösterilmektedir. Enzim kesim reaksiyonu 4 saat boyunca 37 °C’de gerçekleştirilmesinin ardından enzim inaktivasyonu için -20 °C’de bekletilmiştir.

Tablo 3.11 DpnI endonükleaz kesimi reaksiyon içeriği

Bileşenler	Miktar
10x Tango Tamponu	2 µl
PZR ürünü	17.5 µl
DpnI	0.5 µl

3.2.4 CaCl₂ Kompetant Hücre Hazırlanması

PZR sonucu oluşan ürünlerin transformasyonu için gerekli kompetant hücrelerin hazırlanmasında *E.coli* BL21-DE3 ve DH5α-T1 hücreleri kullanılmıştır. Hücre stokları -80°C’den öze ile alınarak antibiyotik içermeyen katı besiyerlerine azaltılarak ekimleri yapılmış ve gece boyu 37 °C’de büyütülmüştür. İnkübasyon sonucu her iki suş için de tek koloni seçilerek antibiyotik içermeyen 5 ml LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Daha sonra 37°C’de 220 rpm ile gece boyu inkübe edilen hücrelerden 500 µl alınarak 250 ml’lik erlenmayerde 50 ml antibiyotik içermeyen LB sıvı besiyerine aktarılmıştır. 37°C ve 220 rpm’de inkübe edilen hücrelerin OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6 aralığına geldiğinde 50 ml’lik başlangıç kültürleri önceden soğutulmuş 50’lik iki falkona pay edilmiştir. Falkonlar buzun içerisinde 10 dakika bekletilmesinin ardından 4000 rpm ile 4°C’de 10 dakika santfirüj edilmiştir. Süpernant atılmış ve önceden soğutulmuş ve sterilize edilmiş 100 mM (pH 7.0) konsantrasyonundaki CaCl₂ solüsyonundan 10 ml alınarak pelletlerin üzerine eklenmiş ve pelletler yavaşça pipetaj yapılarak çözülmüştür. 4000 rpm 4°C’de 10 dakika santfirüj edilmiştir. CaCl₂ işlemi ile santrifüj işlemi 3 kez tekrar edilerek hücre porlarının daha geçirgen olması sağlanmıştır. Süpernantlar 2 kez atıldıktan sonra üçüncü süpernant ile pellet iyice çözülerek üzerine steril %100 gliserolden 200 µl eklenmiştir. Hazırlanan kompetant hücreler önceden soğutulmuş ependorflara etiketlenerek pay edilerek -80°C’de stoklanmıştır.

3.2.5 Transformasyon

DpnI endonükleaz enzimi ile yabancı tip *GhFDH* genlerinin kesilmesinin ardından PZR ürünü içinde mutasyona uğramış olan *GhFDH* genleri BL21-DE3 ve DH5 α -T1 kompetant hücrelerine transforme edilmiştir. -80°C'de saklanan 100 μ l kompetant hücre 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra hafifçe pipetaj yapılarak karışması sağlanmış ve üzerine 10 μ l DpnI enzim kesim ürünü eklenmiştir. Yarım saat buzda bekletilen kompetant hücre-DpnI ürünü daha sonra 1 dakika boyunca 42°C'de bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır. Ardından 2 dakika buzda üzerinde bekletilmiştir. Transformasyon işleminden önce +4 °C'den oda sıcaklığına alınan SOC besiyerinden 700 μ l olmak üzere her reaksiyona eklenmiştir. Hücrelerin 37°C'de 1.5-2 saat kadar 200 rpm'lik çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra 5000 rpm'de 3 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 700 μ l'si pipet ile çekilerek ortamdaki uzaklaştırılmış ve geriye kalan süpernant ile pelletin karışması için pipetaj yapılmıştır. Çözünen hücreler ampisilinli LB katı besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen hücre kolonileri %20 gliserol stoğuna alınmıştır. Koloniler numaralandırıldıktan sonra 400 μ l ampisilinli LB sıvı besiyerinin içinde çözündürülmüş ve 37°C 200 rpm'de 16 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerine sterilize edilmiş %100 gliserolden 100 μ l eklenerek %20'lik -80°C'de stokları hazırlanmıştır.

3.2.6 Kolorimetrik Aktivite Tayini

Yabancı tip *GhFDH*'e göre daha iyi aktivite gösteren stokta bulunan mutant *GhFDH*'leri taşıyan hücrelerin seçilmesi için NAD(P)H üretimi 96 kuyucuklu mikrotipler üzerinde kolorimetrik aktivite tayin ile dolaylı olarak gözlenmiştir [10]. Kolorimetrik aktivite tayin için ilk olarak transforme edildikten sonra stoklanmış olan her koloni eksprese edilmiştir. 2 ml'lik ependorflara 1.5 ml TB besiyeri ve 100 mg/ml ampisilin eklenmiştir. Her bir koloniden ve karşılaştırma analizi için yabancı tip *GhFDH*'den 3 μ l hücre besiyerine eklenmiştir. Hücreler

24°C'de 22 saat boyunca 200 rpm'lik çalkalamalı inkübatörde eksprese edilmiştir. 22 saat sonunda hücreler 20 dakika süresince oda sıcaklığında ve 4000xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak pelletlerin üzerine 50 µl kolorimetrik tayin için hazırlanmış olan liziz tamponundan eklenmiştir. Pelletler hücrelerin parçalanması ve enzimin elde edilmesi için 24°C'de 20 dakika boyunca 200 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelerin çöktellerini (hücre duvarı, hücre zarı gibi) ortamdan uzaklaştırmak için hücreler 4000 xg'de oda sıcaklığında 20 dakika santrifüj edilmiştir. Eksprese edilmiş olan total protein (lizat) süpernatanttan alınarak kolorimetrik tayinde kullanılmıştır. Kolorimetrik tayinde 20 µl lizat, 20 µl NAD⁺ ya da NADP⁺ (10 mM), 20 µl format (200 mM) ve 140 µl reaksiyon solüsyonu (50 mM Tris-HCl içeren, pH 8.0; 300 µM NBT, 30 µM PMS) 96 kuyucuklu mikropalakalara eklenmiştir. Her lizat üç kez tekrar edilerek ölçüm alınmadan hemen önce her reaksiyona en son lizat eklenmiştir. BioTek PowerWave XS2 cihazında yapılan ölçümlerde inkübasyon kapatılarak 580 nm'de 1 saniye çalkalama ile kinetik ölçümü yapılmıştır. Tayin için hazırlanmış solüsyonlar ve lizatlar her deneyden önce mutlaka buzda bekletilmiştir. Yabanıl tip *GhFDH*'in ölçüm sonuçlarından daha iyi sonuçlar veren kolonilerin dizi analizi yapıldıktan sonra hedeflenen bölgede mutasyon taşıyan koloniler geniş hacimde eksprese edilmiştir.

3.2.7 DNA Dizi Analizi

Kolorimetrik tayin sonucu seçilen kolonilerde mutasyon varlığını saptamak için Sanger dizi analizine gönderildi. Kolonilerin plazmit izolasyonundan sonra dizileme analizi Triogen firması (İstanbul, Türkiye) tarafından yapıldı.

3.2.8 Protein Ekspresyonu

Sanger DNA dizi analizi sonucu hedef bölgede mutasyon olduğu tespit edilen hücreler 37°C'de 16 saat boyunca 200 rpm'de inkübe edildikten sonra taze TB besiyerine % 5 lik inokülasyon yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 0.6 olan hücrelerin 1 M

IPTG ile indüklenmesinin ardından 24°C'de 22 saat 200 rpm'de overekspresyonu sağlanmıştır.

3.2.9 6xHis-Tag Sistemi Kullanılarak *GhFDH* Enziminin Saflaştırılması

1000 ml'den santrifüj edilerek elde edilen hücrelerin üzerine 20 ml lizis tamponu eklenerek süspansiyon hale getirilmiş ve ardından 1 mg/ml lizozim eklenmiştir. Vorktekslenerek lizozim karışması sağlandıktan sonra hücreler 30 dakika boyunca buz üzerinde bırakılmıştır. Hücre süspansiyonu 200–300 W'ta 10'ar saniye aralıklar ile 6 kez 10'ar saniye sonikatörde parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 10000xg'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. pQE-2 ekspresyon vektörü histidin kuyruğu ile Ni-NTA afinitesi sayesinde protein saflaştırma kolaylığı sağladığı için eksprese edilen His-kuyruklu mutant *GhFDH* proteini nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) metal-afinite kromatografisi kullanılarak izole edilmiştir. 1000 ml hücre lizatına 500 µl Ni-NTA rezin eklenerek buz üzerinde 45 dakika çalkalanarak karışması sağlanmıştır. Çalkalama işleminin ardından 1 dakika boyunca 1000 xg ve 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerine yıkama tamponu eklenmiştir. Rezinin üzerine 3 kez 3 ml yıkama tamponu eklenerek 1000xg'de 1 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır. Ni-NTA rezine bağlanan *GhFDH* proteinleri 6 kez 1 ml elüsyon tamponu ile 1000xg'de 1 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Toplanan protein bir gece +4°C'de bekletilerek rezininin çökmesi sağlanmıştır. Ertesi gün proteine 50 mM potasyum fosfat tamponu ile ultrafiltrasyon işlemi uygulanarak konsantre edilmiş ve imidazol uzaklaştırılmıştır. Konsantre edilen protein +4°C'de muhafaza edilmiştir. Protein miktarının ölçülmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır.

3.2.10 SDS-PAGE

Proteinin saflaştırılması sonra enzimin elde edilip edilmediğini kanıtlayabilmek için SDS jel elektroforezi yapılmıştır. %12'lik oranla hazırlanan yürütme jeli ile %5'lik olarak hazırlanan toplama jeli kullanılmıştır. Reaksiyon 1x SDS yürütme tamponu ilave edilen ortamda gerçekleşmiştir. Jele yüklenen örnekler 4x Laemmli

Sample Buffer (BIO-RAD) boya ile muamele edilmiştir. Jele marker olarak Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD) yüklenmiştir. 30 dakika boyunca 100 V'ta yürütülen örnekler toplama jelini geçince volt yükseltilerek 160 V'a ayarlanmıştır ve örnekler yaklaşık 1 saat daha yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel Comassie Brilliant Blue solüsyonunun içerisinde gece boyunca 37°C'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra destaining solüsyonunda 1 saat boyunca 37°C'de çalkalanmıştır.

3.2.11 Mutant Proteinlerin Karakterizasyonu

3.2.11.1 Kararlı Hal Kinetiği

Mutant *GhFDH* kolonilerinin kararlı durum kinetik deneyleri oda sıcaklığında Shimadzu 1800 çift ışınli (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 340 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. NAD(P)H üretimini belirlemek için 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 8.0, 1 mM NAD⁺, 0-40 mM format ve 0.4 µM enzim ya da 200 mM format, 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 8.0, 0-40 mM NADP⁺ ve 4 ile 10 µM arası değişen enzim içeren reaksiyon ile belirtilen koşullarda kinetik ölçümü yapılmıştır. CO₂ redüksiyonu ise 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 8.0, 0-50 mM sodyum bikarbonat, 0.5 mM NADH ve 4 µM enzim içeren reaksiyon karışımı ile NADH tüketiminin absorbands değeri ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen veriler Grafit 7 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.11.2 Termal Kararlılık

Mutant *GhFDH*'ler, farklı sıcaklıklarda (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C) 20 dakika boyunca inkübe edilmesinin ardından kalan aktivite ölçümü yapılmıştır. Aktivite ölçümü 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 8.0, 1 mM NAD⁺, 200 mM format ve 0.4 µM enzim içeren reaksiyon karışımı ile 340 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Grafit 7 programında analiz edilmiştir.

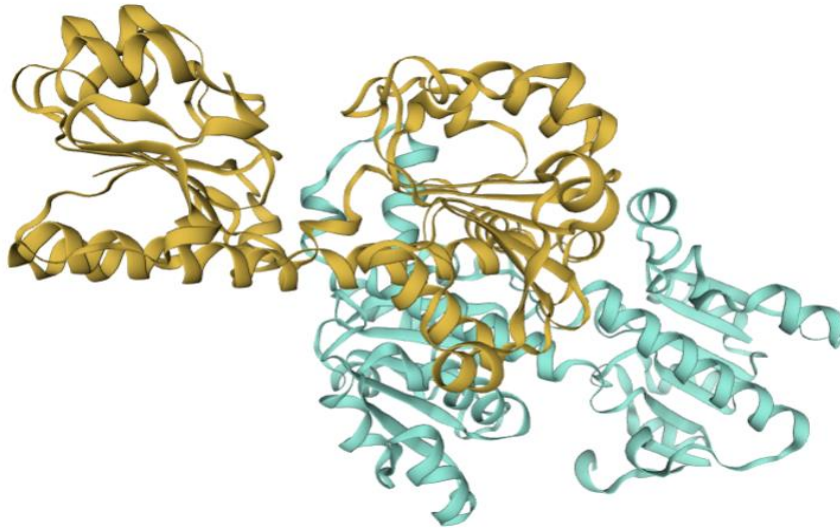
4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Homoloji Modelleme

348 amino asitten oluşan *GhFDH* geni 38.65 kDa büyüklüğünde ve homo-dimerik bir protein kodlamaktadır ve 3-boyutlu kristal yapısı bilinmemektedir. Bu nedenle rekombinant *GhFDH*'in 3-boyutlu yapısı SWISS_MODEL homoloji modelleme aracılığı ile, 3 boyutlu yapı bilinen NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (*AtFDH*, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) FDH'inin amino asit dizisi kalıp olarak kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.1). *AtFDH* ile *GhFDH* arasındaki ~%88'lik dizi benzerliğini yanı sıra elde edilen homoloji modelinin, hedef-kalıp eşleşme özelliklerine göre model kalitesini belirleyen “Global Model Quality Estimation” skoru 0.95 ve “Qualitative Model Energy Analysis”e dayanan QMEAN değeri ise 0.84'tür.



Şekil 4.1 *GhFDH*'in SWISS homoloji modeli: Şablon olarak *AtFDH* (pdb kodu: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) kullanılarak oluşturulan ve özdeş iki alt ünitenin gösterildiği *GhFDH1*'in Apo formu.

Hedef mutasyon bölgesi elde edilen *GhFDH* homoloji modeli ve *CmFDH* ile daha önce yapılmış protein mühendisliği çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre seçilmiştir. Asn187 residusu, NAD⁺ bağlanma residuları olan Asp195, Tyr196 ve Gln197'yi içeren α -heliks ve β -zincir arasındaki döngü üzerindedir. NAD⁺ bağlanma residuları olarak belirlenen bu sarmal, yapısal olarak *psFDH* ve *cbFDH*'te benzerdir. Bu nedenle, döngünün NAD⁺ adenin ribozun hidroksil grupları ile temas eden NAD⁺ bağlanma residularının konumunu sağladığı düşünülmektedir [48]. *Candida methylica* NAD⁺-bağımlı format dehidrogenaz ile *GhFDH*'in dizi homolojisi ve yapısı karşılaştırıldığında *CmFDH* enziminin 187. pozisyonunda bulunan ve koenzim spesifitesinden sorumlu olan asparajin amino asidi ile *GhFDH* enziminin 184. pozisyonunda bulunan asparajin amino asidinin homolog olduğu anlaşılmıştır. *GhFDH* ve *CmFDH*'in amino asit dizi homolojisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CmFDH      MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTSDEKETSELDKHIPD      60
GhFDH      -MIVGVFVKANEYFTKNPNFVGCVGALGLRFWLESQGHQYIVTDDKEGPDCELEKHIPD      59
          ** *:.*.*.: : : : **.*. **:  ***:***: *.*.*.*. :*:*****

CmFDH      ADIIITTFPHPAYITKERLDKAKNLKSVVAVGSDHIDLQYINQTKKISVLEVTGSNV      120
GhFDH      LHVLI STPFHPAYVTAERIKKAKNLQLLLTAGIGSDHVDLKAEEAG--LTVAEVTGSNV      117
          .:.*:*****:* **.:*****: :.:**.:*****:*. :.* ::* *****

CmFDH      VSAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHDEVAIAKDAYDIEGKT IATIGAGRIGYRVL      180
GhFDH      VSAEDELMLRILILVRNFVPGYHQVITGDWNVAGIAYRAYDLEGKTVGTIGAGRIGKLLL      177
          ***** :* :*:*****.:*:*: **.*.*. ***:*****:***** :*

CmFDH      ERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN      240
GhFDH      QRLKPFNCN-LLYHDRVKIDPELEKQTGAKFEEDLDAMLPKCDIIVINMPLTEKTRGMFD      236
          :** *** : **:* : * *.:***: *:: : :.*.:* ** *:*:::

CmFDH      KELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFQPAKPDHPWRDMRN      300
GhFDH      KDRIAKMKKGLIVNARGAIDTQAVADACSSGHIAGYSGDVWYFQPAKPDHPWRYPN      296
          *: :.*:***. :*.*.*.*. : : * * .*: : *.*.*:***** * *

CmFDH      KYGAGNAMPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGK      360
GhFDH      -----QAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLERYFKGE-DFPEQNYIVKAGELAPQY-R-      348
          :***** ***:*** ** *.*.:** :*:* :* :* :* :* :* :* :*

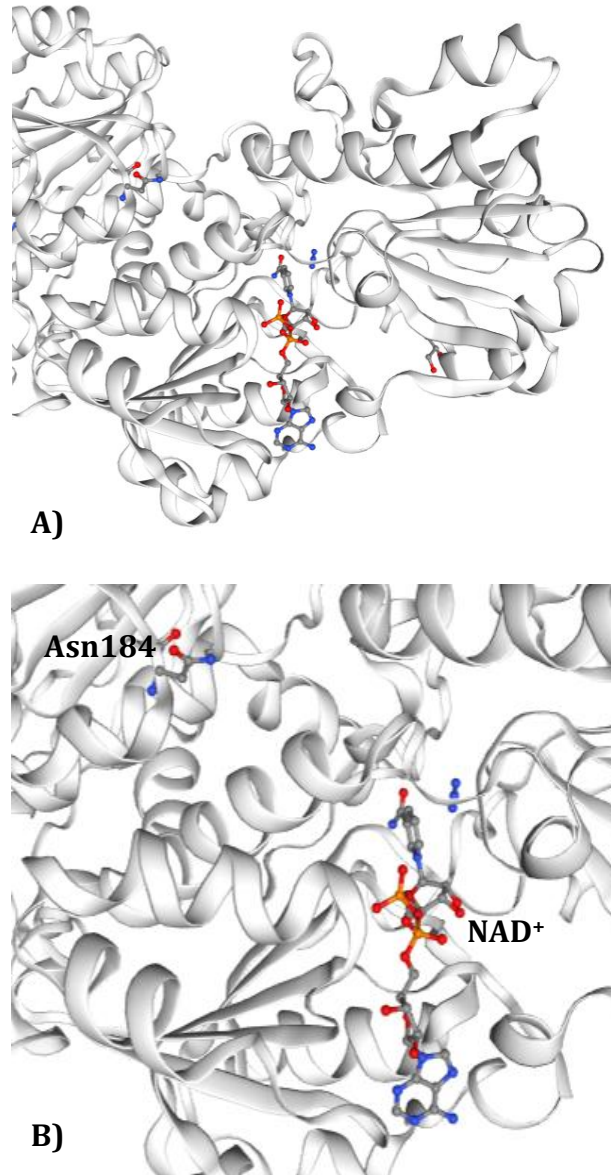
CmFDH      HDKK      364
GhFDH      -----      348

```

Şekil 4.2 *GhFDH* ile *CmFDH* dizi karşılaştırması

Belirlenen Asn184 pozisyonuna bölge doygunluk mutasyonu uygulanarak asparajinin diğer amino asitler ile yer değiştirdiğinde koenzim spesifitesinde meydana gelecek değişiklikler incelenmiştir.

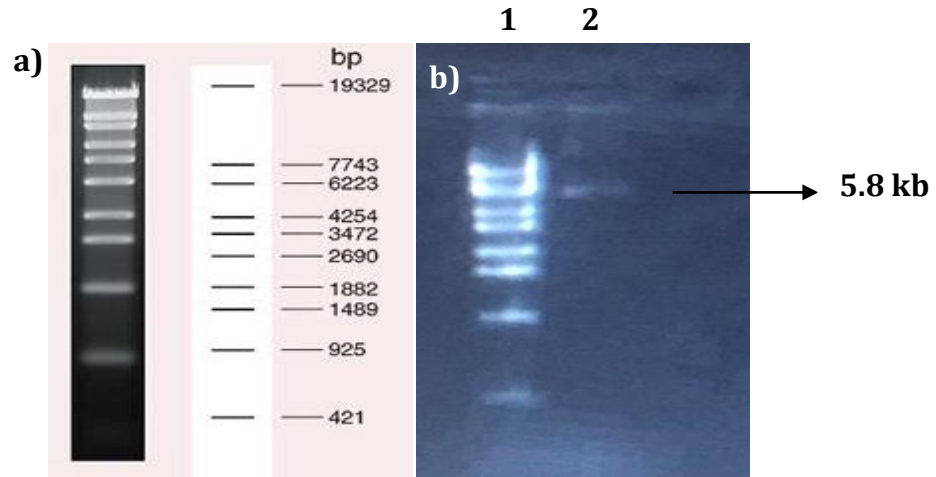
GhFDH homoloji modeli üzerinde mutasyon noktası olarak seçilen Asn184 amino asiti Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Hedef bölge olan Asn184 amino asidi loop yapısı üzerinde bulunmaktadır.



Şekil 4.3 *GhFDH* enziminde mutasyon noktası olan Asn184 ile NAD⁺ koenzim bağlanma bölgesi (A; uzak görüntü, B; yakın görüntü)

4.1.2 Bölge Doygunluk Mutasyonu PZR Sonuçları

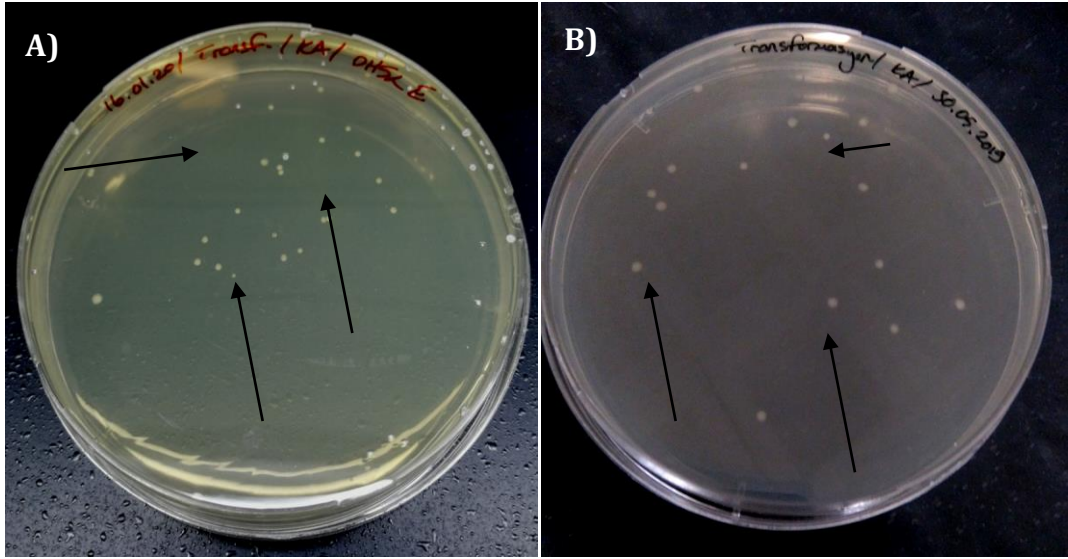
Bölge doygunluk mutasyonu için yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonucu %1'lik agaroz jel elektoroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.4). İlk kuyucuğa yüklenmiş olan marker boyutu ile *GhFDH* geninin büyüklüğü birbiri ile örtüşmektedir. Vektöre bağlı olan *GhFDH* geni 1047 bp iken pQE-2 vektör büyüklüğü 4.8 kb değerindedir. Toplam değer, jel görüntüsündeki değer olan 5.8 kb'ye karşılık gelmektedir.



Şekil 4.4 Jel elektroforezi görüntüsü a) Lambda *eco*14 digest/Takara marker ve b) SSM PZR agaroz jel elektroforezi: 1. Marker, 2. PZR sonucu elde edilen olası mutant *GhFDH* genlerini taşıyan pQE-2 vektörü

4.1.3 Transformasyon

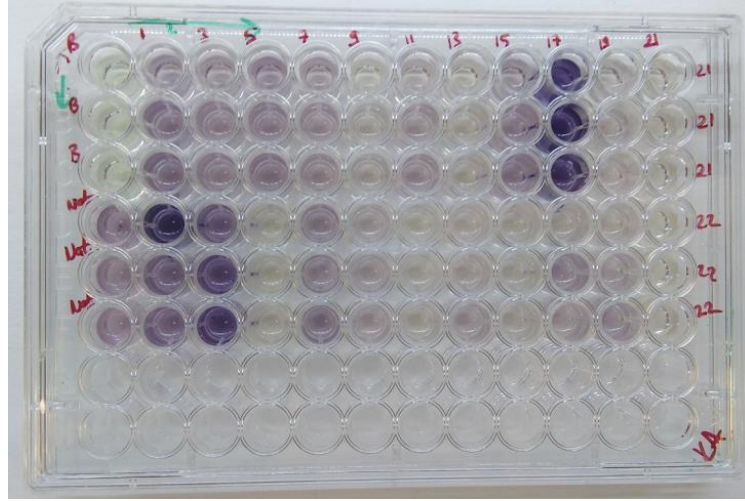
Agaroz jel üzerinde kontrol edilen PZR ürünü, mutant *GhFDH* genlerini taşıyan pQE-2 vektörü, BL21-DE3 ve DH5 α -T1 kompetant hücrelerine transforme edilmiştir (Şekil 4.5). Amp'li LB katı besiyerine ekilen transformant hücrelerden üreyen koloniler numaralandırılarak sıvı LB besiyerine ekilmiş ve 96 kuyucuklu "plate"lerde kolotimetrik aktivite taraması gerçekleştirilmiştir. Toplamda 127 hücrenin aktivite taraması yapılmıştır.



Şekil 4.5 DH5α-T1 transforme hücreleri (A'da gösterilen oklar) ve BL21-DE3 transforme hücreleri (B'de gösterilen oklar)

4.1.4 Kolorimetrik Aktivite Sonuçları

Elde edilen olası mutant *GhFDH*'lerin NADP^+ ve NAD^+ varlığında aktivitesini saptayabilmek için 96 kuyucuklu mikropłaka üzerinde kolorimetrik bir tarama gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik metod, dehidrogenaz tarafından üretilen NAD(P)H 'nin fenazin metosülfat (PMS) varlığında nitroblue tetrazolium'un (NBT) mavi-mor formazan çökeleği oluşturmaya dayanmaktadır. Reaksiyon solüsyonu NBT ve PMS içerirken, NADP^+ veya NAD^+ ile format da kolorimetrik tayinde yer almaktadır. Kontrol (blank) ve yabancı tip *GhFDH* ile birlikte mutant *GhFDH* kolonilerinin üçer tekrarlı olmak üzere 580 nm dalga boyunda ölçümü gerçekleştirildikten sonra renk değişimine ek olarak mutant olmayan *GhFDH*'in ölçüm sonuçlarından daha iyi sonuçlar veren koloniler seçilmiştir. Kolorimetrik aktivite sonucu platelerde oluşan renk değişimleri Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Seçilen kolonilerin -80°C gliserol stokları yapılmış ve büyük hacimde büyütülerek protein izolasyonu yapılmıştır. Aynı zamanda seçilen bu kolonilerdeki mutasyonu tayin etmek üzere koloniler Sanger dizi analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.6 Kolorimetrik aktivite tarama örneği

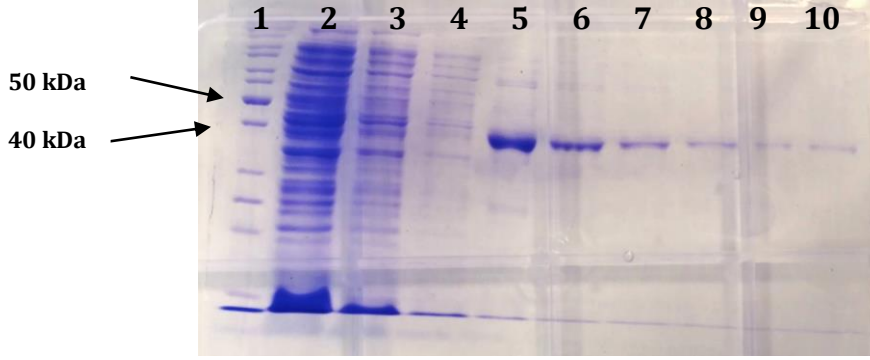
4.1.5 DNA Dizi Analizi ve Mutasyonların Saptanması

Elde edilen olası mutant *GhFDH* enzimlerini kodlayan genlerin Sanger dizi analizi sonucu mutasyonun istenen bölgede gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Dizi analizine gönderilen hücrelerden birinde sadece nükleotid değişimi olduğu ancak amino asidin aynı kaldığı tespit edilirken, 184. amino asitte gerçekleşen diğer mutasyonlar N184R ve N184H olarak tespit edilmiştir. Diğer iki kolonide tespit edilen mutasyonların hedef bölge dışında D123A ve E198G olduğu belirlenmiştir ve tüm 4 mutantın analizleri yapılmıştır. Sanger dizi analizi sonuçları ve CLUSTAL OMEGA ile dizi karşılaştırmaları ekte (Ek A) verilmiştir.

4.1.6 Protein Saflaştırma

Kolorimetrik aktivite tayini ile seçilen mutant *GhFDH* enzimleri için büyük hacimde protein ekspresyonu hazırlanmıştır. Ekspresyon sonucu protein saflaştırması, pQE-2 ekspresyon vektörünün sağladığı histidin kuyruğu sayesinde Ni-NTA afinitesi kullanılarak yapılmıştır. Saflaştırma adımları ve en son elde edilen proteinin saflığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. SDS-PAGE sonucu Şekil 4.7’de gösterildiği gibidir ve mutant *GhFDH* proteini büyüklüğü olan 38.65 kDa’luk banta karşılık geldiği görülmektedir.

SDS-PAGE analizi saflaştırmadan sonra >%95 saflıkta protein elde edildiğini göstermiştir. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile analiz edilmiştir. Saflaştırılan protein konsantrasyonları 2-5 mg/ml arasında değişiklik göstermiştir.

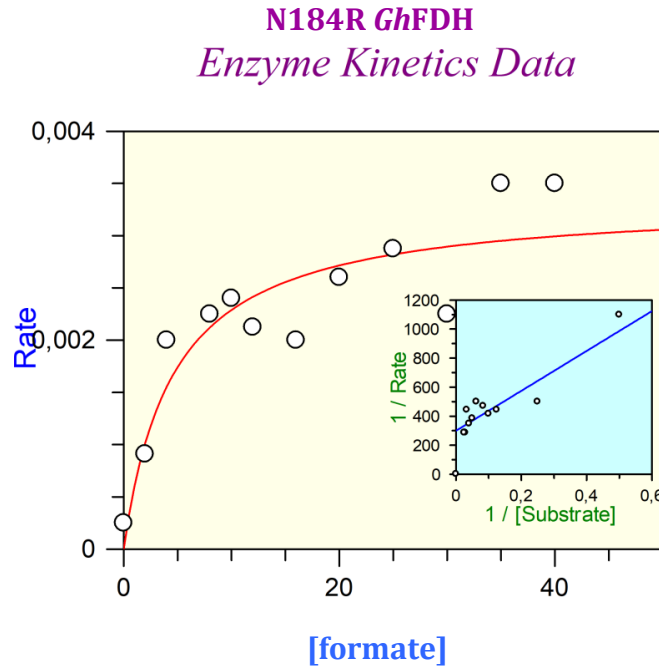


Şekil 4.7 SDS-PAGE sonucu (1. Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD) marker, 2. flowthrough, 3. yıkama 1, 4. yıkama 2, 5. elüsyon 1, 6. elüsyon 2, 7. elüsyon 3, 8. elüsyon 4, 9. elüsyon 5 ve 10. elüsyon 6)

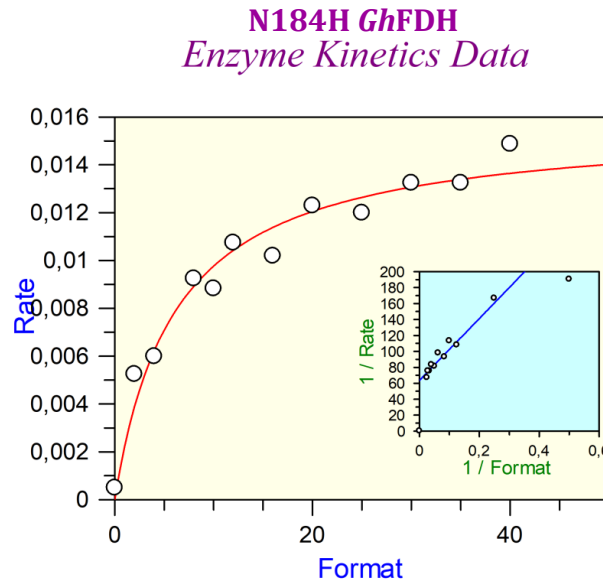
4.1.7 Kinetik Ölçümler

Mutant *GhFDH*'lerin aktivite ölçümleri 25°C'de ve Shimadzu 1800 çift ışınlı (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Kararlı hal ölçümleri, pH 7.0'de 20 mM potasyum fosfat tamponu, 1 mM NAD⁺, 0-40 mM format ve 0.4 µM enzim veya 200 mM format, 0-40 mM NAD(P)⁺ ve 4-10 µM arası enzim içeren (N184R 10 µM, N184H 4 µM, E198G 4 µM) bir reaksiyon karışımında yapılmıştır. Ölçümlerde NAD(P)⁺ sabit tutulurken değişken olarak format kullanılmıştır. Koenzim olarak NAD⁺ veya NAD(P)⁺ kullanıldığında enzimin formata olan afinitesi ve enzim aktivitesi değişimi karşılaştırılmıştır. NAD(P)H üretimi, 340 nm'de absorpsiyondaki artışı takip ederek izlenmiş ve elde edilen veriler "GraFit 7 Kinetics Software" kullanılarak analiz edilmiştir. Ardından mutant *GhFDH*'lerin k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. D123A ve E198G mutasyonlarının NAD⁺ ya da NADP⁺ kullanılarak yapılan tekrarlı aktivite ölçümleri sonucu ilk kolorimetrik taramalardan farklı olarak ölçülebilir bir aktivite gözlenmemiştir. Aktivite gözlenen N184R ve N184H mutant proteinlerinin NAD⁺ kullanılarak

yapılan aktivite grafikleri ve kinetik analiz değerleri Şekil 4.8, Şekil 4.9'da ve Tablo 4.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.8 N184R aktivite grafiği



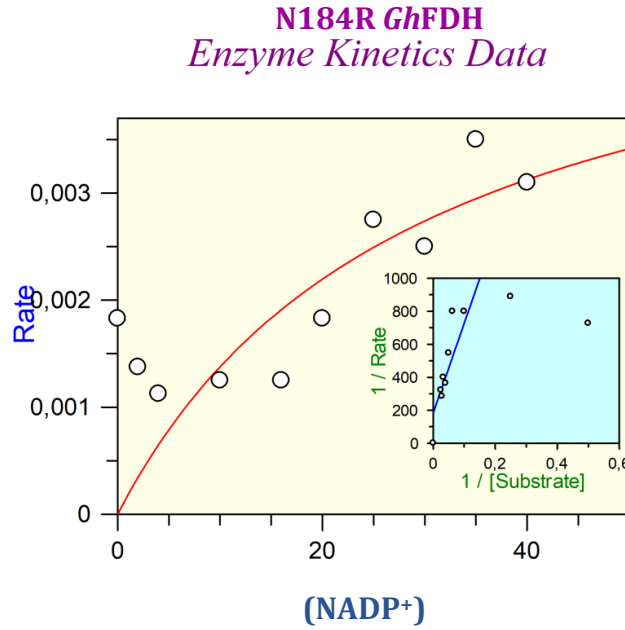
Şekil 4.9 N184H aktivite grafiği

184. bölgede oluşan her iki mutasyonun aktivite değerleri yabancı tip *Gh*FDH enzimine göre daha düşük değerler ile sonuçlanmıştır.

Tablo 4.1 Yabancı tip rekombinant *Gh*FDH ve mutant *Gh*FDH'lerin aktivite değerleri (NAD⁺ koenzim olduğunda)

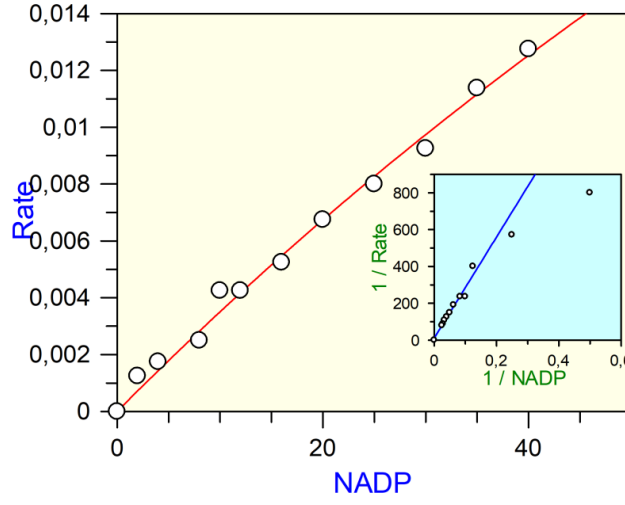
Mutasyonlar	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>Gh</i> FDH	0.76 ± 0.07 _[8]	0.295 _[8]	0.39 _[8]
N184R	4.5870 ± 2.0227	0.022	0.0048
N184H	6.1084 ± 1.0893	0.105	0.017
D123A	-	-	-
E198G	-	-	-

NADP⁺ kullanılarak yapılan aktivite grafikleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de ve Tablo 4.2'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.10 N184R aktivite grafiği (NADP⁺)

N184H GhFDH
Enzyme Kinetics Data



Şekil 4.11 N184H aktivite grafiği (NADP⁺)

Arginin ve histidin amino asit mutasyonları 184. bölgedeki NADP⁺ koenzim spesifitesinde azalmaya neden olmuştur. Elde edilen grafik eğrileri ile aktivite değerleri mutasyonların enzimin aktivitesini azaltmıştır.

Tablo 4.2 Yabancıl tip rekombinant GhFDH ve mutant GhFDH'lerin aktivite değerleri (NADP⁺ koenzim olduğunda)

Mutasyonlar	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
GhFDH	1.98 ± 0.40 _[8]	0.0083 _[8]	0.0042 _[8]
N184R	29.4209 ± 28.3935	0.001446	0.000049
N184H	242.8583 ± 111.6578	0.5935	0.00244
D123A	-	-	-
E198G	-	-	-

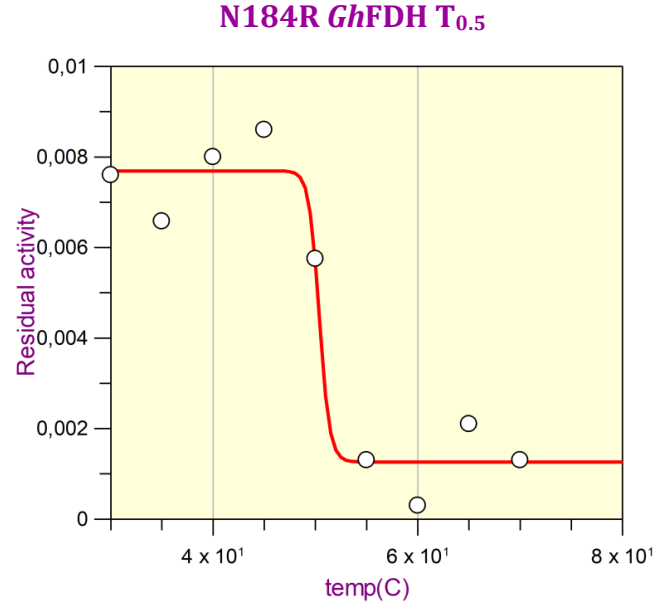
FDH enziminin ileri yönde reaksiyonu için değişen kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla NAD^+ ve NADP^+ kullanılarak yapılan deneylerin ardından, mutant enzimlerin NADH koenzimine olan spesifitesini görmek, dolayısıyla ters yönde CO_2 redüksiyonu kapasitelerini ölçmek için koenzim olarak NADH kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler pH 7.0'de 20 mM potasyum fosfat tamponu, 0-50 mM sodyum karbonat, 0.5 mM NADH ve 4 μM enzim içeren bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. NADH tüketimi, 340 nm'de absorpsiyon azalması takip ederek izlenmiştir. Ölçümler sonucu mutant enzimlerin NADH koenzim aktivitesine rastlanmamıştır.

4.1.8 Termal Kararlılık

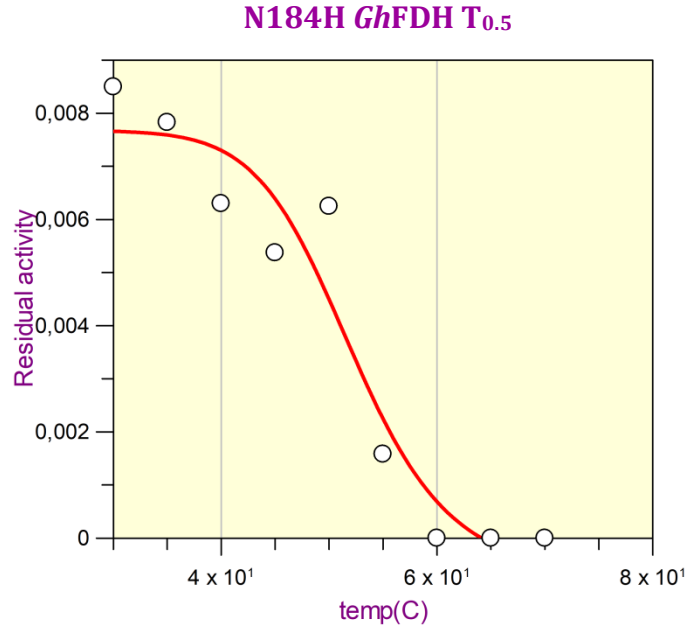
Bölge doyumluk mutasyonu yöntemi ile *GhFDH*'in 184. pozisyonunda elde edilen aktif mutantlar olan, N184R ve N184H'in termal kararlılık ölçümleri Shimadzu 1800 çift ışınli (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. 340 nm'de 20 dakika 30-70°C arası 5'er derecelik artışlarla gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucu enzimin NADH ürününü oluşturtmasındaki azalma takip edilerek termal kararlılık hesaplanmıştır.

Literatüre dayanan bu çalışmaya göre [23], sabit bir zaman diliminde sabit sıcaklık ile inkübasyon sonucu enzimin kalan aktivitesi ölçülmektedir. Enzimin başlangıç aktivitesinin %50 azalması için gerekli sıcaklık olan $T_{0.5}$ 'in hesaplanması için elde edilen veriler "Grafit 7 Kinetics Software" kullanılarak değerlendirilmiştir. Termal kararlılık için elde edilen verilerin grafiği Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmektedir. *GhFDH* ile karşılaştırılmalı $T_{0.5}$ hesaplamaları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

184. bölgede gerçekleşen mutasyonlar sonucu *GhFDH* enziminin termal kararlılığında düşüş gözlenmiştir. Elde edilen grafik ve $T_{0.5}$ değerlerine göre histidin mutasyonunun arginin mutasyonuna göre daha iyi termal kararlılığa sahip olduğu analiz edilmiştir.



Şekil 4.12 N184R termal kararlılık grafiği



Şekil 4.13 N184H termal kararlılık grafiği

Tablo 4.3 Yabanıl tip rekombinant *GhFDH* ve mutant *GhFDH*'lerin $T_{0.5}$ değerleri

Mutasyonlar	$T_{0.5}$
<i>GhFDH</i>	53.8 ± 0.12
N184R	50.3765 ± 2.5266
N184H	52.1798 ± 2.9401
D123A	-
E198G	-

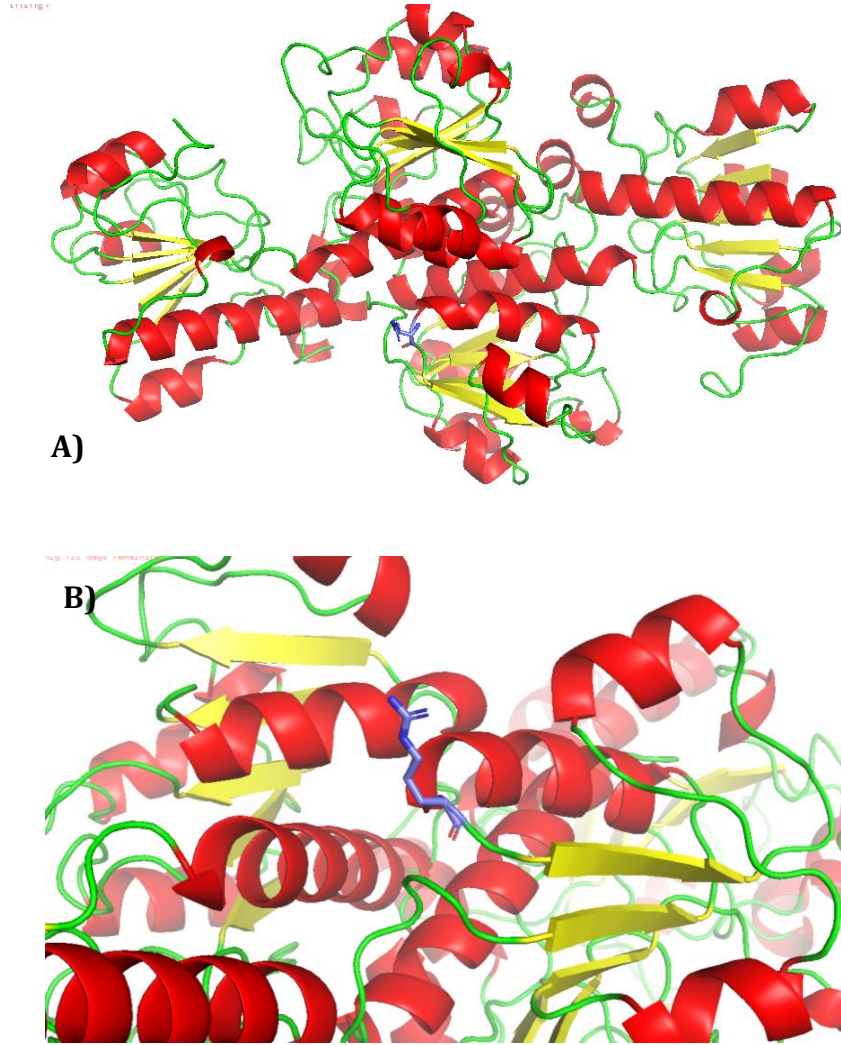
4.1.9 Mutant *GhFDH*'lerin Homoloji Modellemesi

GhFDH enziminin 3D yapısının analizi, enzimin substrat bağlanma bölgelerindeki kritik residuların Ile92 ve Asn116 amino asitlerinin olduğunu, NAD^+ bağlanma bölgelerinin ise Asp191, Asn252 ve Asp278 amino asitleri olduğunu ortaya çıkarmıştır [8]. Daha önceki çalışmalarda ise, Arg254 ve His302 enzimin katalitik aktivitesi için önemli residular olduğu belirlenmiştir. Bu amino asitler ayrıca *Lotus japonicus*, *Solanum tuberosum* ve *Hordeum vulgare* gibi farklı bitki FDH'leri arasında da korunmaktadır [49,50,51]. N184 koenzim bağlanma bölgesi bir loop yapısı üzerinde ve α -heliks yapısının bitiminde bulunmaktadır. *GhFDH* N184 bölgesi diğer türler ile olan dizi karşılaştırmasında glisin ve aspartik asit gibi amino asitlere karşılık gelmektedir. Bölge doyumluk mutasyonu uygulaması sonucu elde ettiğimiz mutasyonların homoloji modelleri aşağıdaki gibidir.

4.1.9.1 N184R

Asparajin, polar yüksüz bir amino asittir. SSM sonucu elde edilen asparajinin arjinin amino asidine değişimi (Şekil 4.14), 184. bölgenin pozitif yüklü olmasını sağlamıştır. NAD^+ 'ın yapısında bulunan 2'-OH ve 3'-OH grupları ile negatif yüklü amino asitler hidrojen bağı oluşturmaktadır [51]. 184. bölgenin mutasyon ile pozitif yüklü olması $NADP^+$ bağlanmasını ya olumsuz etkileşimler yoluyla ya da $NADP^+$ 2'-fosfat grubu bağlanmasını sterik olarak engelleyerek önlediği düşünülmektedir [9]. Asparajin yerine pozitif yüklü hidrofobik özelliği olmayan bir amino asidin

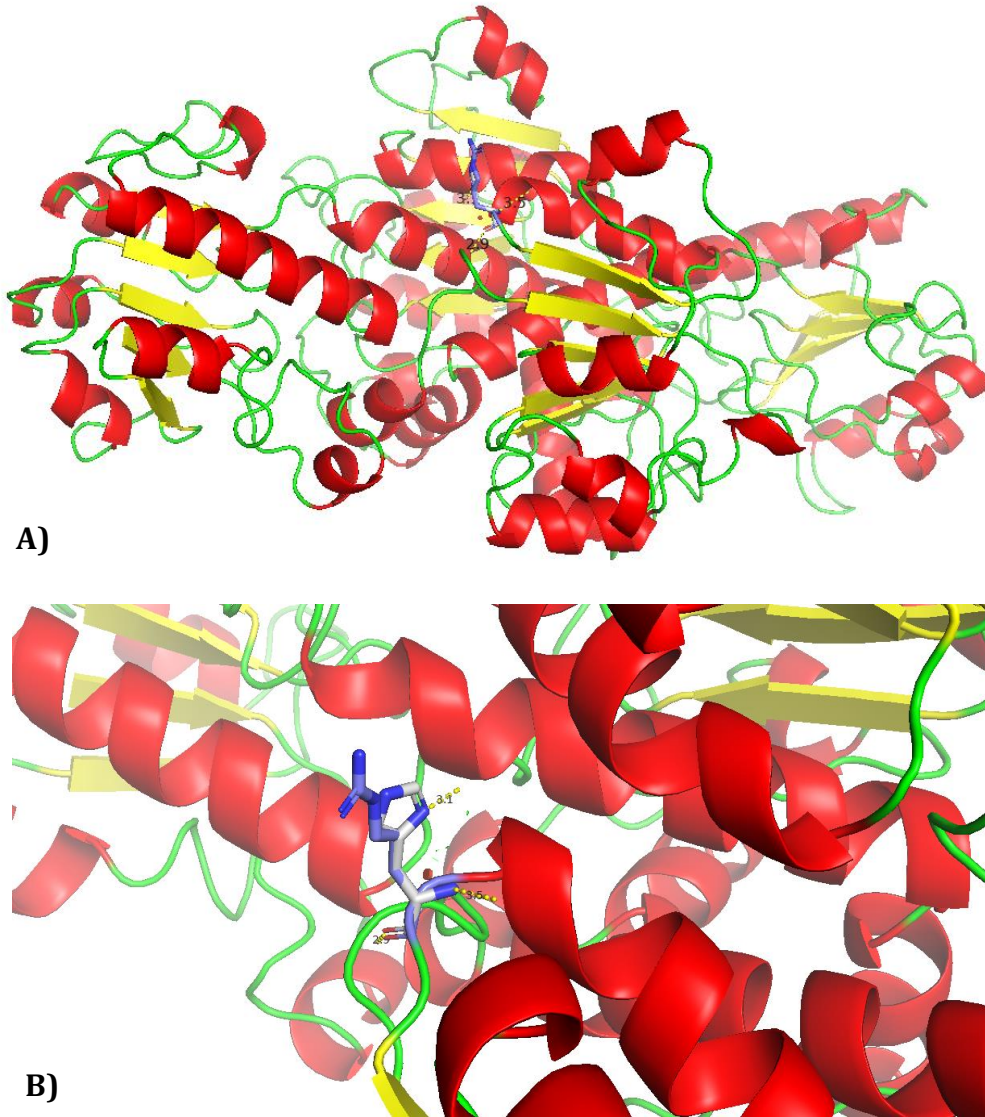
gelmesi enzimin NADP⁺'ye karşı olan koenzim spesifitesinin düşmesine neden olmuştur [53]. NADH rejenerasyonunda, NADH konsantrasyonunun *GhFDH* enzimi için inhibitör etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmalarda NADH rejenerasyonuna rastlanmamıştır. Arginin amino asidinin negatif yüklü amino asitler ile oluşturduğu tuz köprüleri protein kararlılığına etki etmektedir [54].



Şekil 4.14 N184R mutasyonunu temsil eden modelleme (A; uzak görüntü, B; yakın görüntü)

4.1.9.2 N184H

Histidin amino asidi de tıpkı arginin gibi pozitif yüklü bir amino asittir. 184. bölgedeki pozitif yük değişimi (Şekil 4.15), enzimin NAD^+ ile arasında olan hidrojen bağlarını azalttığı düşünülmektedir. Bu nedenle N184H mutasyonunun NAD^+ koenzim spesifitesinde düşüş gözlenmiştir [52]. Histidin residusunun yan zinciri olan imidazol halkası az da olsa NADP^+ koenzim bağlanmasında sterik bir engel oluşturmaktadır. Bu durumun NADP^+ koenzim spesifitesinde bir düşüğe neden olduğunu düşünülmektedir [9].

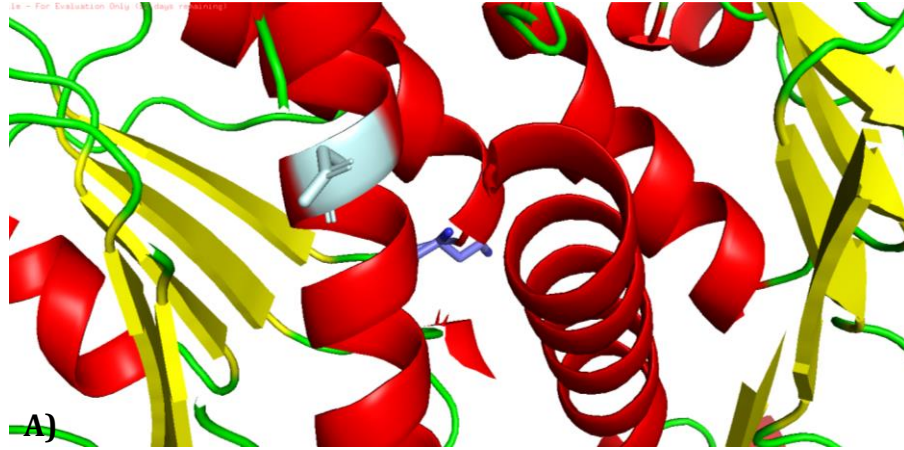


Şekil 4.15 N184H mutasyonunu temsil eden modelleme (A; uzak görüntü, B; yakın görüntü)

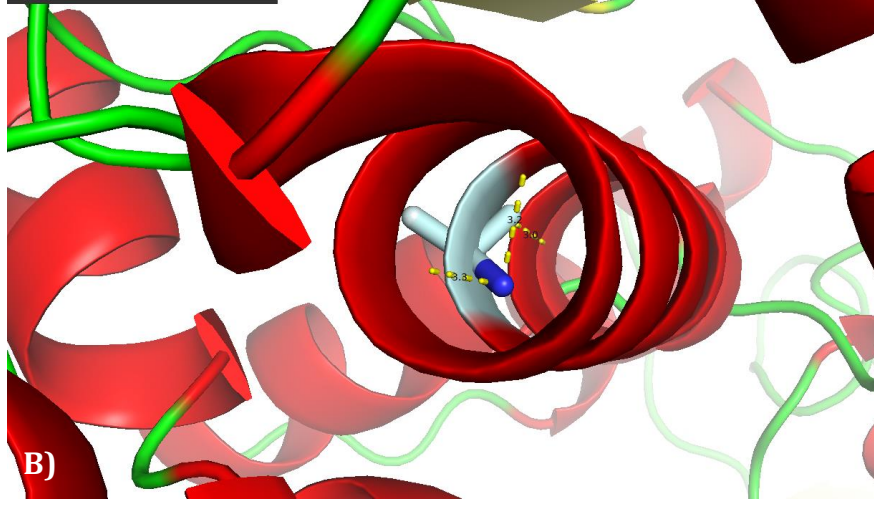
4.1.9.3 D123A

D123 bölgesi bir α -heliks yapısının üzerinde bulunmaktadır. Belirtilen α -heliks bölgesinde Asn116 residusu bulunmaktadır ve bu residu kanıtlanmış substrat bağlanma bölgesidir (Şekil B.1). D123 bölgesine uygulanan dizi karşılaştırması sonucu *Arabidopsis thaliana* FDH enziminde aspartik asit amino asidi bulunurken; bazı maya ve bakteri türlerinde histidin amino asidinin yer aldığı belirlenmiştir.

Negatif yüklü aspartik asit NAD⁺'ın 2'-OH ve 3'-OH bölgeleri ile kurduğu hidrojen bağı sayesinde NAD⁺'a karşı koenzim spesifitesi bulunmaktadır [52]. Alanin amino asidinin yan zincirinin düşük hidrofobik özelliği ile NAD⁺'a karşı spesifitesinin bulunmadığı ve NADP⁺'nin 2'-fosfat gurubu ile hidrojen bağının zayıflaması ile NADP⁺'ye karşı koenzim spesifitesi olmadığı düşünülmektedir. Bu özelliği ile aynı zamanda proteinin yapısında bir boşluk oluşmasına neden olmaktadır [55]. Mutasyon bölgesinin, önemli substrat bağlanma bölgesi ile aynı α -heliks yapısında bulunması enzimin aktivitesini etkilemektedir.



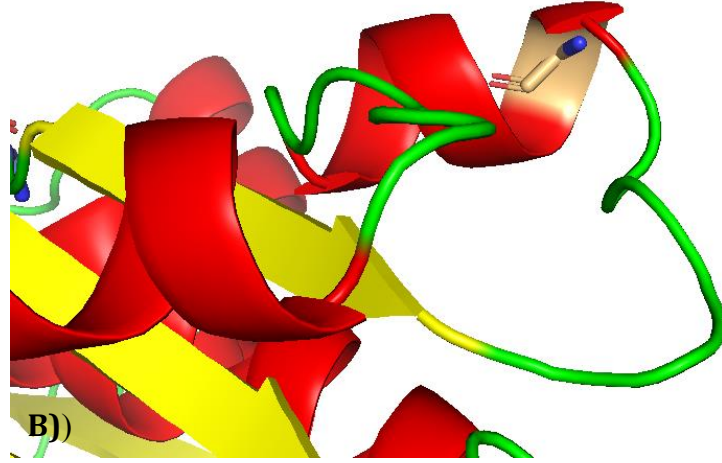
Şekil 4.16 D123 bölgesini gösteren modelleme (A; D123A mutasyonundan önce, B; D123A mutasyonundan sonra)



Şekil 4.16 (devamı) D123 bölgesini gösteren modelleme (A; D123A mutasyonundan önce, B; D123A mutasyonundan sonra)

4.1.9.4 E198G

Farklı organizmalardan izole edilmiş FDH gen dizileri karşılaştırıldığında 198. bölgede bulunan glutamik asitin birçok FDH’te korunmuş olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). E198 kısa bir α -heliks yapısının üzerinde ve loop yapısına bağlanma bölgesinde yer almaktadır (Şekil 4.18). Polar negatif yüklü bir amino asit olduğu için NAD^+ ile güçlü hidrojen bağları kurabilmektedir. Ancak glisin polar olmayan bir amino asittir ve bu özelliğinin hem NAD^+ ile olan hidrojen bağlarını kaybetmesine yol açtığı hem de bir α -heliks yapı üzerinde bulunduğunda proteinin kararlılığını azalttığı düşünülmektedir [56]. Buna ek olarak glisin residusunun hidrofilik yapıda olması NADP^+ ’nin 2’-fosfat grubu ile etkileşimde bulunmasını engellediği düşünülmektedir [9]. Bu sonuç ile birlikte çalışmalarda mutant *GhFDH* enziminin aktivitesine rastlanmamıştır.



Şekil 4.18 (devamı) E198 bölgesini gösteren modelleme (A; E198G mutasyonundan önce uzak görüntü, B; E198G mutasyonundan sonra)

4.2 Öneriler

Çeşitli endüstriyel alanlarda kiral olarak saf ürünlerin sentezi için kullanılan oksidoredüktaz enzimleri, elektron taşıyıcısı olarak pahalı koenzimler olan NAD(P)H'a ihtiyaç duymaktadır. FDH'ler, ucuz bir substrat kullanarak NAD(P)⁺'yi NAD(P)H'a indirgeyebilmektedir [57]. Bununla birlikte moleküler biyoloji ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerden yararlanılarak protein mühendisliği teknikleri ile proteinlerin yapı ve fonksiyonlarından sorumlu olan amino asit dizilerinde kontrollü değişiklikler yapılabilmektedir [58]. Spesifik endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere birçok enzimin bu tekniklerle başarılı bir şekilde geliştirilmesi sağlanmıştır [39,40,59]. NAD(P)H rejenerasyonu, atmosferik CO₂'in indirgenmesi ve hidrojen yakıtının bir stabilize bir formu olan format üretimi gibi amaçlarla son yıllarda endüstriyel üretim koşullarının zorlu koşullarına dayanabilecek yeni NAD⁺-bağımlı FDH'lerin araştırılması ve bunların protein mühendisliği yaklaşımları ile geliştirilmesi önemli konular arasındadır. Şu anda 52 tam (17 bakteriden, 15 bitkiden, 10 mayadan ve 10 mantardan) ve 15'ten fazla kısmi FDH DNA dizisi bilinmekte ve çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA dizi analizi karşılaştırmalarına göre en büyük farklılık maya ve mantar FDH'lerinde görülmekle birlikte farklı kaynaklardan gelen tüm FDH'ler arasında 60 residu mutlak biçimde korunmaktadır. Gruplar içinde homoloji skoru %75'in üzerindedir [23]. FDH enzimin korunmuş residuları Pro105, Phe106, Ile130, Asn154,

Val158, Gly206, Gly208, Ile210, Gly211, Arg292, Asp229, Gln321 ve His340 olarak belirlenmiştir. FDH'deki korunmuş residular arasına Asp316 da dahil edilmelidir çünkü karboksil grubu NAD⁺'ın nikotinamid kısmının amid grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır [8].

Literatürde FDH enziminin koenzim spesifitesinin geliştirilmesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. *PseFDH* enziminde yapılan çoklu mutasyonlarda, NAD⁺'ın adenozin riboz bölgesi ile önemli hidrojen bağları kurabilen D221 amino asidinde yapılan mutasyon uygulaması ile D221Q değişimi gerçekleştirilmiştir. Bu residu bölgesinde aspartik asidin oluşturduğu elektrostatik etki azaltılarak NADP⁺'ye karşı olan koenzim spesifitesinde yabanıl tip *PseFDH* enzimine göre artış olduğu gözlenmiştir [24]. *BstFDH* enziminde NADP⁺ bağlanma bölgesi olarak bilinen Y260, S262 ve T263 amino asitlerine uygulanan NNK dejenere primerleri ile oluşturulan mutasyonlar sonucu herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır. Buna ek olarak alanin amino asidinin esnekliği ve koenzim bölgesinde geniş alan oluşturmaması sebebiyle üç bölgede de yapılan alanin yer değiştirmesi sonucunda yalnızca S262A değişimi ile gelişmiş NADP⁺ afinitesine rastlanmıştır. Ancak bu mutasyon enzimin formata karşı olan afinitesini yaklaşık 2 kat azaltmıştır [25]. NADP⁺-bağımlı *Burkholderia stabilis* FDH üzerinde yapılan bir mutasyon çalışmasında Q223E değişiminde 223. bölgede negatif yüklü glutamik asit amino asidi NADP⁺'nin negatif yüklü fosfat grubu ile birbirini itmektedir. Bu nedenle enzimin NADP⁺ koenzim spesifitesinde düşüş gözlenmiştir. Buna ek olarak negatif yük kazancı enzimin NAD⁺ koenzim spesifitesini yaklaşık 24 kat arttırmıştır [60]. CO₂ redüksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda çoğu FDH enziminin ölçülen bir aktivitesi bulunmamasına rağmen, NAD⁺-bağımlı *Candida boidinii* ve *Thiobacillus sp.* FDH enzimlerinin CO₂ redüksiyonu ölçülmüştür. Bununla birlikte asidik pH'lar nötr ve bazik pH'lara göre; N-terminal ve C-terminal uçlarda halka yapısına sahip olan bakteriyel FDH'lerin de ökaryotik FDH'lere göre daha iyi CO₂ redüksiyon aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir [61]. *CmFDH* enzimi üzerinde daha önce yapılan çalışmada 187. pozisyonda bulunan asparajin amino asidinin yüzey elektrostatik etkileşiminde ve NAD⁺ bağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir [62]. Bu bilgilerden yola çıkarak bölgeye yönelik mutasyon uygulaması sonucu *GhFDH* enziminde 184. pozisyondaki asparajin değiştirilerek enzimin koenzim spesifitesinin geliştirilmesi

hedeflenmiştir. Yüksüz polar bir amino asit olan asparajin diğer polar veya yüklü amino asitler ile etkileşimde bulunabilmektedir [63]. Bölgeye özel mutasyon uygulaması sonucunda oluşturduğumuz kütüphaneden seçilen N184R mutantında arginin, pozitif yüklü polar bir amino asittir ve protein kararlılığına katkıda bulunmak için negatif yüklü amino asitler ile hidrojen bağları kurarak tuz köprüleri oluşturabilir [54]. NAD⁺'ın yapısında bulunan 2'OH ve 3'OH grupları ile negatif yüklü amino asitler hidrojen bağı oluşturabilmektedir [52]. Arginin residu değişimi ile 184. bölgede oluşan pozitif yük NAD⁺ ile kurulan hidrojen bağlarını etkileyerek koenzim spesifitesinde düşüşe neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, NADP⁺ koenzim spesifitesinin ya koenzim-enzim bağlanmasının ya da NADP⁺ 2'-fosfat grubu bağlanmasının sterik olarak engellenmesiyle düşüş gösterdiği düşünülmektedir. Asparajinin arginine dönüşümü ile hidrofobik olmayan bir amino asidin 184. bölgede bulunması NADP⁺'ye karşı koenzim spesifitesinin düşüşüne neden olmuştur [53]. N184R değişimi ile format için K_m değeri 4.58 mM olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip *GhFDH* K_m değeri ile karşılaştırıldığında yüksek bir değere sahip olduğu ve arginin amino asidinin 184. bölgede koenzim spesifitesini azalttığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte yabanıl tip *GhFDH* k_{cat} değeri 0.295 sn⁻¹ iken N184R mutant *GhFDH* k_{cat} değeri 0.022 sn⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre mutant *GhFDH* k_{cat} değeri yaklaşık 13 kat azalmıştır. Termal kararlılıkta mutant *GhFDH* yabanıl tipe göre yaklaşık 3°C daha düşük bir sonuç vermiştir (yabanıl tip *GhFDH* $T_{0.5}$ değeri 53.8°C iken mutant *GhFDH* $T_{0.5}$ değeri 50.37 °C). N184H değişimindeki histidin amino asidi, imidazol yan zincirine sahip olması nedeniyle amino asitler arasında özel bir yeri vardır [64]. Histidin de arginin amino asidi gibi pozitif yüklü bir amino asittir. 184. bölgenin pozitif yüklü olması ile NAD⁺ ile kurduğu hidrojen bağlarının azaldığı düşünülmektedir [52]. Bu durum NAD⁺ koenzim spesifitesinde bir düşüşe neden olmuştur. Histidin amino asidinin imidazol halkası az da olsa NADP⁺ bağlanmasında bir sterik engel oluşturmaktadır [9]. Böylece NADP⁺ koenzim spesifitesinde de bir düşüş olduğu düşünülmektedir. 184. bölgedeki asparajin-histidin değişimi yabanıl tip *GhFDH* ile karşılaştırıldığında format için K_m değerinin yaklaşık 8 kat arttığı gözlenmiştir (yabanıl tip *GhFDH* K_m 0.76 mM ve mutant *GhFDH* K_m 6.10 mM). Ayrıca asparajin-histidin değişiminde mutant *GhFDH*'in k_{cat}

değeri yaklaşık 3 kat azalmıştır (yabanıl tip *GhFDH* k_{cat} 0.295 sn^{-1} ve mutant *GhFDH* k_{cat} 0.105 sn^{-1}). Bu mutasyon sonucuna göre FDH enziminin NAD^+ koenzimine karşı koenzim spesifitesinin azaldığı anlaşılmıştır. Mutant *GhFDH*'in termal kararlılık sonuçlarına göre $T_{0.5}$ değeri yaklaşık olarak 2°C azalmıştır (yabanıl tip *GhFDH* $T_{0.5}$ değeri 53.8 °C iken mutant *GhFDH* $T_{0.5}$ değeri 52.17 °C). Bölge doygunluk mutasyon PZR'si sonucu seçtiğimiz iki mutantın 184. pozisyondan farklı bölgede mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar D123A ve E198G olarak belirlenmiş ve aktivite ölçümleri yapılmıştır. 123. bölgede bulunan aspartik asitin alanine dönüşümü sonucu mutant proteinin ekspresyonu sonucu elde edilen enzimin aktivite göstermediği belirlenmiştir. Kanıtlanmış substrat bölgesi ile aynı α -heliks yapısı üzerinde bulunan aspartik asit, negatif yükü ile NAD^+ 'ın 2'-OH ve 3'-OH bölgeleri ile hidrojen bağı kurarak koenzim spesifitesinde etkili olmaktadır [52]. Mutasyon sonucu 123. bölgede bulunan alanin residusu, düşük hidrofobik özelliğinden dolayı NAD^+ ile hidrojen bağı kuramadığı ve $NADP^+$ 'nin 2'-fosfat grubu ile de hidrojen bağı kurmasının güç olduğu düşünülmektedir. Alanin sahip olduğu esnek yapı ve H atomu sayesinde α -heliks yapısının düzensiz olmasına neden olur. Bu özelliği sayesinde "heliks kırıcı" olarak adlandırılmaktadır [65,66]. Hedef bölge dışında görülen diğer bir mutasyon noktası olan E198G değişiminde glutamik asit glisin amino asidine dönüşmüştür. Bu değişim ile birlikte mutant *GhFDH* enziminde aktivite gözlenmemiştir. Mutasyon sonucu kısa α -heliks yapısında bulunan glutamik asidin glisine dönüşümü, NAD^+ ile kurulan hidrojen bağlarının yok olmasına neden olmuştur. Glisin amino asidinin hidrofilik yapıda olması ile $NADP^+$ 'nin 2'-fosfat grubu ile etkileşimde bulunmasını engellediği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler N184R ve N184H mutasyonlarının enzim aktivitesini ve kararlılığını etkileyerek azalttığı; hedef dışı mutasyonlar olan D123A ve E198G değişimlerinin ise enzim aktivitesini ve kararlılığını direkt etkileyerek aktivite görülmesini engellediği görülmüştür. İleriki çalışmalarda daha fazla mutant taranması, ikinci tur bölge doygunluk mutasyonu uygulaması ve koenzim spesifitesi için önemli olduğu bilinen farklı residulara bölge doygunluk mutasyonu uygulanarak, $NADP^+$ spesifitesi için önemli bir potansiyele sahip olan *GhFDH* enziminin koenzim tanıma aralığı genişletilebilir.

DNA DİZİ ANALİZİ VE CLUSTAL OMEGA

A.1 N184N Nükleotid Değişimi Dizi Analizi:

ATTAAGGAAATTAACCTATGAAACATCACCATCACCATCACCATATGCAAATGATTGTT
 GGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGGTTGTGT
 GGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATATTGTTA
 CCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCATGTG
 CTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAA
 AAACCTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAG
 CTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCT
 GAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTTTCGTACCTGGTTATCATCA
 AGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAA
 GGGAAGACAGTTGGAACCTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATT
 GAAACCATTCAATTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTG
 GAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTG
 ACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGA
 TCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATC
 ATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG
 AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCGAATC
 AAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCACAATAGCGATACACTGCC
 GGAATCAGGATAGGCTTGAAAGGTACTTCATAGGTGCAGAATTCCTG

N184N Nükleotid Değişimi:

XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CAAAGCAATTGCCAATTCTGGGTCTCTCTCTTACCAGACAACTCCATGCTTCTCC -----ATTAAGGAAATTAACATGAAACATCACCATCACCATCA * * * * *	300 39
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGGGAGCAAAAAGATTGTTGGGGTGTGTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC CCATATGCAAATGATTGTTGGGGTGTGTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC * * * *	360 99
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG *****	420 159
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT *****	480 219
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG *****	540 279
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT *****	600 339
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT *****	660 399
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTCGTACC CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTCGTACC *****	720 459
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA *****	780 519
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAAGTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAAGTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT *****	840 579
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CCAGCGATTGAAGCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC CCAGCGATTGAAACATTCAATTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC *****	900 639

Şekil A.1 N184N nükleotid değişimi

XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA *****	960 699
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA *****	1020 759
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT *****	1080 819
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG *****	1140 879
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA ***** ****	1200 939
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCACAATAGCGATACACTGCCGG ***** ** * *****	1260 999
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT AATCAGGA-TAGGCTTGAAAGGTACTTCATAGGTGCAGAATTCCTG----- * * * * * ** ***** ***** ** *	1320 1045
XM_016894382.1 GhFDH4-pQE-FP	TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA -----	1380 1045

Şekil A.1 (devamı) N184N nükleotid değişimi

A.2 N184R Nükleotid Değişimi Dizi Analizi:

CATAAAGGAAATTAACCTATGAAACATCACCATCACCATCACCATATGCAAATGATTGT
TGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGGTTGTG
TGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATATTGTT
ACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCATGT
GCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCA
AAAACCTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCA
GCTGCAGAAGCTGGTTTGAAGTGTGCTGAAGTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGTTGC
TGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTCGTACCTGGTTATCATC
AAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGA
AGGGAAGACAGTTGGAACCTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT
TGAAACCATTCAGGTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATT
GGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGT

GACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAG
 ATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT
 CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGGTGGACACATTGCAGGTTACAGTG
 GAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAAT
 CAAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGC
 CGGAATCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAAACCTTTCCTGAACAGAAC
 TACATTGTCATAGCAGGTGAGCTCGCTTCTCAATACCGATGATTTCTTGTTTTCTTCA
 TCCAA

N184R Nükleotid Değişimi:

XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	CAAAGCAATTGCCAATCTGGGTCACTCTCTTCTTACCAGACAACCTCATGCTTCTCC -----CATAAAGGAAATTAACATGAAACATCACCATCACCATCA * * * * *	300 40
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	AGGGAGCAAAAAGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC CCATATGCAAAATGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC * * * * *	360 100
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG *****	420 160
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAAC TTGAAAAGCATAT GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAAC TTGAAAAGCATAT *****	480 220
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG *****	540 280
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	GATCAAGAAAGCCAAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT GATCAAGAAAGCCAAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT *****	600 340
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT *****	660 400
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTTCTGACC CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTTCTGACC *****	720 460
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA *****	780 520
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT *****	840 580
XM_016894382.1 GhFDH2-36-pQE-FP	CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC CCAGCGATTGAAGCCATTCAAGGTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC *****	900 640

Şekil A.2 N184R nükleotid değişimi

XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA *****	960 700
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA *****	1020 760
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAAACAATGCTCGAGGAGCGAT AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAAACAATGCTCGAGGAGCGAT *****	1080 820
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG *****	1140 880
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA *****	1200 940
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AGCTATGACTCCTCATATTCTGTTACCAACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG AGCTATGACTCCTCATATTCTGTTACCAACCATGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG *****	1260 1000
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT AATCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAACTTTCCTGAACAGAACTACAT * ***** *	1320 1060
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA TGTCATAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTCGTGGTTTCTTCATCCAA- **** * * *	1380 1119
XM_016894382.1 GhFDH2 - 36 - pQE - FP	AAGAGAGTCCAAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTGAT -----	1440 1119

Şekil A.2 (devamı) N184R nükleotid değişimi

A.3 N184H Nükleotid Değişimi Dizi Analizi:

CCCGGGGTTTTTTTATTGGGGCTTAAGGAAATTAAGTATGAAACATCACCATCACCATCA
CCATATGCAAATGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAAT
CCCAACTTTGTTGTTGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACA
GGGGCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAG
CATATCCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCT
GAGAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGA
TCATGTTGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGA
GCAATGTGCTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAAT
TTCGTACCTGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTA
TAGAGCTTATGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAAGTATAGGTGCTGGCCGTATCGGC
AAGCTCTTACTCCAGCGATTGAAACCATTCCCATTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGT

CAAGATAGATCCAGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGAT
GCAATGCTTCCAAAATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAA
GAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAA
CAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGAC
ACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCA
TGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGGACCACAATTGAAGC
GCAGATGCCATACGCTGCCGGAATCCAGGAAATGCTTGAGAGGGACTT

N184H Nükleotid Değişimi:

XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CAAAGCAATTGCCAATTCTGGGTCATCCTCTCTTACCAGACAACCTCATGCTTCTCC -CCCGGGTTTTTTATTGGGGCTTAAGGAAATTAACATGAAACATCACCATCACCATCA * ** *** ** *	300 59
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	AGGGAGCAAAAAGATTGTTGGGGTGTTCACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC CCATATGCAAAATGATTGTTGGGGTGTTCACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC * *** *****	360 119
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CAACTTTGTTGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG CAACTTTGTTGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG *****	420 179
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAATTTGAAAAGCATAT GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAATTTGAAAAGCATAT *****	480 239
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG *****	540 299
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT *****	600 359
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT *****	660 419
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCCGGAATTTCTGACC CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCCGGAATTTCTGACC *****	720 479
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA *****	780 539
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT *****	840 599
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC *****	900 659

Şekil A.3 N184H nükleotid değişimi

XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA *****	1020 779
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT *****	1080 839
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG *****	1140 899
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA *****	1200 959
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGGACCACAATTGAAGCGCAGATGCCATACGCTGCCGG *****	1260 1019
XM_016894382.1 GhFDH2-60-pQE-FP	AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT AATCCAGGAAATGCTTGAGAGGGACTT----- * * * * *	1320 1046

Şekil A.3 (devamı) N184H nükleotid değişimi

A.4 D123A Nükleotid Değişimi Dizi Analizi:

ACTAAAGGAAATTAAGTATGAAACATCACCATCACCATCACCATATGCAAATGATTGT
TGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGGTTGTG
TGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATATTGTT
ACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCATGT
GCTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCA
AAAACCTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCA
GCTGCAGAAGCTGGTTTACTGTTGCTGAAGTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGC
TGAGGCCGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTTCGGAATTCGTACCTGGTTATCATC
AAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGA
AGGGAAGACAGTTGGAATATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT
TGAAACCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTG
GAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTG
ACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGA
TCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATC
ATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG

AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATC
AAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCC
GGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACT
ACATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTTCGTGGTTTCTTCGTC
CATGAAAGAAAATCCAAATGGGTTTCGGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAAAT
AATGGTGATGTTTAGTATGTTGCAAATAAAGGGGCCATCTAAATTGGGGCTTTGAACT
TGATGTAAGCTTAATTTAGCTGAACC

D123A Nükleotid Değişimi:

XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CAAAGCAATTGCCAATTCTGGGTATCCTCTCTTACCAGACAATCCATGCTTCTCC -----ACTAAAGGAAATTAACATGAAACATCACCATCACCATCA * * * * *	300 40
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGGGAGCAAAAAGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC CCATATGCAAATGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC * * * *	360 100
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG *****	420 160
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT *****	480 220
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCACCCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG *****	540 280
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT *****	600 340
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT *****	660 400
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTGGAATTTCTGATCC CGTCTCGGTTGCTGAGGCCGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTGGAATTTCTGATCC *****	720 460
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA TGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA *****	780 520
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACT *****	840 580
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC *****	900 640

Şekil A.4 D123A nükleotid değişimi

XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA *****	960 700
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA *****	1020 760
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGAT *****	1080 820
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG *****	1140 880
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA *****	1200 940
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG AGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG *****	1260 1000
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT *****	1320 1060
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA *****	1380 1120
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	AAGAGAGTCCAAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTG-- AAGAAATCCAAATGGGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGGTG *** * ***** *	1438 1180
XM_016894382.1 GhFDH46-pQE-FP	ATGTTTAGTATGTTGCAAATAATGTGCCA-TCTATATT-GTGCTTTGAACTTGATGTTAC ATGTTTAGTATGTTGCAAATAAAGGGGCCATCTAAATTGGGGCTTGAACCTTGATGTAAG ***** *	1496 1240

Şekil A.4 (devamı) D123A nükleotid değişimi

A.5 E198G Nükleotid Değişimi Dizi Analizi:

CTTAAAGGAAATTA ACTATGAAACATCACCATCACCATCACCATATGCAAATGATTGTT
GGGGTGT TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGGTTGTGT
GGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATATTGTTA
CCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCATGTG
CTCATATCGACCCCATTCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAA
AACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAG
CTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCT
GAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTTGCTACCTGGTTATCATCA
AGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAA
GGGAAGACAGTTGGA ACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATT

GAAACCATTCAATTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTG
GAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTG
ACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGGGAAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGA
TCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATC
ATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG
AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATC
AAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCC
GGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTA CTTC AAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACT
ACATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCATTACCGATGATTTTCGTGGTTTTCTTCGTC
CATGAAAGAGAGTCCAAATGGGTTCGGTTGGTAGTTAAACGTA ACTACTATTGAAATA
ATGGGATGTTGAAGAAGTTGCAAATAATGGGCCATCTAATTTGGGCTTTGAACTTGAA
GTAAACTTAATTACCTGAACTTGGACTCCGGTTGAAAAATCCCATAATGACCTCAAAAT
CCAACTGGATTTTTTTCCAAACCTCGGGTTGCCCCCGGGGGTGTTTTATGTGGGGAAACC
CCA

E198G Nükleotid Değişimi:

XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CAAAGCAATTGCCAATTCTGGGTCATCTCTCTTCTTACCAGACAACCTCCATGCTTCTCC -----CTTAAAGGAAATTAACATGAAACATCACCATCACCATCA * * * * *	300 40
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGGGAGCAAAAAGATTGTTGGGGTGTGTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC CCATATGCAAATGATTGTTGGGGTGTGTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCC * * * *	360 100
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG CAACTTTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGG *****	420 160
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT GCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT *****	480 220
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CCCTGATCTCCATGTGTCATATCGACCCATTCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG CCCTGATCTCCATGTGTCATATCGACCCATTCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAG *****	540 280
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT GATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGT *****	600 340

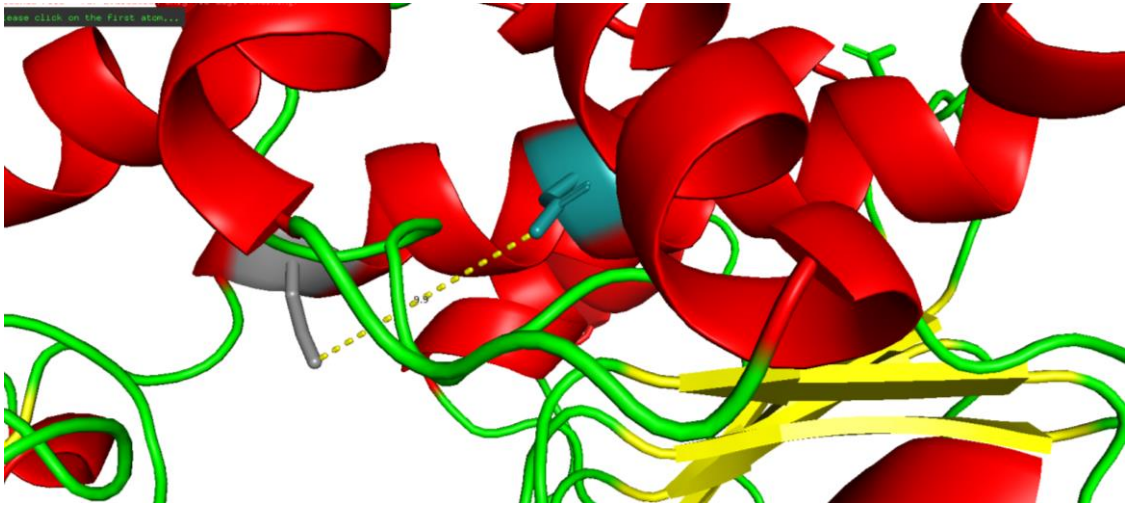
Şekil A.5 E198G nükleotid değişimi

XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT TGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGT *****	660 400
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCATTCTTGTTCGGAATTCGTACC CGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCATTCTTGTTCGGAATTCGTACC *****	720 460
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	TGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA TGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTA *****	780 520
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTTACT TGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACATAGGTGCTGGCCGATCGGCAAGCTCTTACT *****	840 580
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CCAGCGATTGAAGCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC CCAGCGATTGAAGCCATTCAATTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCC *****	900 640
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA AGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAA *****	960 700
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA ATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGGGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAA *****	1020 760
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAAACATGCTCGAGGAGCGAT AGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCTGATTGTTAAACATGCTCGAGGAGCGAT *****	1080 820
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG CATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGG *****	1140 880
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA AGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCA *****	1200 940
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGCTATGACTCCTCATATTTCGTTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG AGCTATGACTCCTCATATTTCGTTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGG *****	1260 1000
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT AGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACAT *****	1320 1060
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA TGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGA *****	1380 1120
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	AAGAGAGTCCAATGTGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTGAT AAGAGAGTCCAATGGGTTGCGTTGGTAGTTAAACGTAACTACTATTGAAATAATGGGAT *****	1440 1180
XM_016894382.1 GhFDH2-44-pQE-FP	GTTTAGATGTTGCAAATAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACTTGATGTTACGTTG GTTGAGAAGAGTTGCAAATAATGGGCCATCTAATTTGGGCTTTGAACTTGAAAGTAACTTA *****	1500 1240

B

HOMOLOJİ MODELİNDE AMİNO ASİT KONUMLARININ BİRBİRİNE UZAKLIKLARI

B.1 N116- D123 Amino Asitlerinin Birbirine Olan Uzaklığı



Şekil B.1 N116- D123 amino asitlerinin birbirine olan uzaklığı

- [1] Popov, V.O., Thiskov, V.I., (2003). "NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. From a model enzyme to a versatile biocatalyst", Protein Structures: Kaleidoscope of Structural Properties and Functions, pp. 441-443.
- [2] Van der Donk, W. A. & Zhao, H., (2003). "Recent developments in pyridine nucleotide regeneration", Current Opinion in Biotechnology, 14, pp. 421-426.
- [3] Kaup, B., Meyer, S. B. & Sahm, H., (2005). "D-mannitol formation from D-glucose in a whole cell biotransformation with recombinant E.coli", Applied Microbiology and Biotechnology, 69, pp. 397-403.
- [4] Mayer, G., Kulbe, K.D. & Nidetzky, B., (2002). "Utilization of xylitol dehydrogenase in a combined microbial/enzymatic process for production of xylitol from D-glucose", Applied Biochemistry, 99, 3, pp.577-590.
- [5] Patel, R. N., (2004). "Biocatalytic Synthesis of Chiral Intermediates", Food Technology and Biotechnology, 42, 4, pp. 305-325.
- [6] Vrtis, J. M., White, A. K., Metcalf, W. W. & Van der Donk, W.A., (2002). "Phosphite dehydrogenase: versatile cofactor-regeneration enzyme", Angewandte Chemie International Edition, 41, pp. 3257-3259.
- [7] Hölsch K., Weuster-Botz D., (2010). "Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins", Biotechnology and Applied Biochemistry, Volume 56, Issue 4, Pages 131-140.
- [8] Kurt-Gür G., Ordu E., (2018). "Characterization of a novel thermotolerant NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", Springer Nature.
- [9] Andreadeli, A., Platis, D., Tishkov, V., Popov, V., Labrou, NE., (2008). "Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺", The FEBS Journal.
- [10] Özgün, G.P., et al., (2016). "Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylica* Formate Dehydrogenase", Hindawi, Volume 2016.
- [11] Zahid, K.R., et al., (2016). "Response and Tolerance Mechanism of Cotton *Gossypium hirsutum* L. to Elevated Temperature Stress: A Review", Frontiers in Plant Science, 7: 937.
- [12] Salvucci, M.E., Crafts-Brandner, S.J., (2004). "Relationship between the Heat Tolerance of Photosynthesis and the Thermal Stability of Rubisco Activase in Plants from Contrasting Thermal Environments", Plant Physiology, Vol. 134, pp. 1460-1470.
- [13] Nachimuthu, G., A. Webb, A., (2017). "Closing the Biotic and Abiotic Stress-Mediated Yield Gap in Cotton by Improving Soil Management and Agronomic Practices", Plant Tolerance to Individual and Concurrent Stresses, pp 17-31.

- [14] Rigoldi, F., et al., (2018). "Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications", *APL Bioengineering*, 2(1): 011501.
- [15] Berrios-Rivera, S.J., et al., (2002). "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* : Increase of NADH Availability by Overexpressing an NADp-Dependent Formate Dehydrogenase", *Elsevier Science*, 217–229.
- [16] Nwazue, N.R., (2012). "Functions of Dehydrogenases in Health and Disease", *IntechOpen*.
- [17] Biology Online, Dehydrogenase, <https://www.biologyonline.com/dictionary/dehydrogenase>, 6 Mayis 2020.
- [18] Ferry, J.G., (1990). "Formate dehydrogenase", *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 7, Issue 3-4, Pages 377–382.
- [19] Nielsen, C.F., et al., (2019). "Classification and enzyme kinetics of formate dehydrogenases for biomanufacturing via CO₂ utilization", *Elsevier*, Volume 37, Issue 7, 107408.
- [20] Li, R., et al., (2020). "Peptide Bond Formation Between the Hetrosubunits of ω -Transaminase, Alanine Dehydrogenase, and Formate Dehydrogenase Through Subunit Splicing Promoted by Heterodimerization of Leucine Zipper Motifs", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 8, Article 686.
- [21] Schirwitz, K., et al., (2007). "High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Vol. 16(6), pages 1146–1156.
- [22] Fogal, S., et al., (2015). "Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8", *Springer*, 99(22):9541-54.
- [23] Popov, V.O., Thiskov, V.I., (2006). "Protein engineering of formate dehydrogenase", *Biomolecular Engineering*, Volume 23, Issues 2–3, Pages 89-110.
- [24] Ramirez, L.C., et al., (2020). "In Vivo Selection for Formate Dehydrogenases with High Efficiency and Specificity toward NADP⁺", *ACS Catalysis*, 10, 7512–7525.
- [25] Jiang, H.W., et al., (2020). "Rational Engineering of Formate Dehydrogenase Substrate/Cofactor Affinity for Better Performance in NADPH Regeneration", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192, pages530–543.
- [26] Alekseeva, A.A., et al., (2011). "NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase from Plants", *Acta Naturae*, 3(4): 38–54.
- [27] Alekseeva, A.A., et al., (2012). "Stabilization of plant formate dehydrogenase by rational design", *Springer*, 77, pages1199–1209.
- [28] Alekseeva, A.A., et al., (2012). "Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations", *Oxford Academic*, Volume 25, Issue 11, Pages 781–788.

- [29] Olson, B.J.S.C., et al., (2000). "Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast", *Plant Science*, Volume 159, Issue 2, Pages 205-212.
- [30] Khan, I., Akhtar, M.W., (2011). "Different Approaches For Protein Engineering in Industrial Biotechnology", *Nature*.
- [31] Schwarte, A., et al., (2017). "NewProt - a protein engineering portal", *Oxford Academic*, 30(6):441-447.
- [32] Ordu E., Karagüler N.G., (2012). "Protein Engineering Applications on Industrially Important Enzymes: *Candida methylica* FDH as a Case Study", *InTech*.
- [33] El Hawrani, A.S., et al., (1994). "Engineering surface loops of proteins a preferred strategy for obtaining new enzyme function", *Trends Biotechnology*, Volume 12, Issue 5, Pages 207-211.
- [34] Morley, K.L., Kazlauskas, R.J., (2005). "Improving enzyme properties: when are closer mutations better?", *Trends in Biotechnology*, Volume 23, Issue 5, Pages 231-237.
- [35] Stemmer, W. P., (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 25, 91, 22, pp. 10747-51.
- [36] Leung, D., Chen, E., Goeddel, D., 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
- [37] Wong, T. S.; Tee, K. L.; Hauer, B. & Schwaneberg, U. (2004). "Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution", *Nucleic Acids Research*, 32, 3, pp.26.
- [38] Parikh, M.R., Matsumura, I., (2005). "Site-saturation Mutagenesis is more Efficient than DNA Shuffling for the Directed Evolution of β -Fucosidase from β -Galactosidase", *Journal of Molecular Biology*, Volume 352, Issue 3, Pages 621-628.
- [39] Takita, T., Nakatani, K., Katano, Y., et al., (2019). "Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using site saturation mutagenesis", *Enzyme And Microbial Technology*, Volume: 130.
- [40] Lee, K.B., Dunn, Z., Ge, X., (2019). "- Reducing proteolytic liability of a MMP-14 inhibitory antibody by site-saturation mutagenesis", *Protein Science*, Volume: 28, Issue: 3, Pages: 643-653.
- [41] Georgescu R., Bandara G., Sun L., (2003). "Saturation Mutagenesis", *Directed Evolution Library Creation*, pp 75-83.
- [42] Siloto, R.M.P., Weselake, R. J., (2012). "Site Saturation Mutagenesis: Methods and Applications in Protein Engineering", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 181-189.

- [43] Kretz, K.A., Richardson, T.H., Gray, K.A., Robertson, D.E., Tan, X., Short, J.M., (2004). "Gene Site Saturation Mutagenesis: A Comprehensive Mutagenesis Approach", *Methods in Enzymology*, Volume 388, Pages 3-11.
- [44] Xiang, Z., (2006). "Advances in Homology Protein Structure Modeling", *Current Protein & Peptide Science*, 7(3): 217-227.
- [45] Waterhouse, A., et al., (2018). "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes", *Nucleic Acids Research*, 46(Web Server issue): W296-W303.
- [46] Yuan. S., et at., (2017). "Using PyMOL as a platform for computational drug design", *WIREs Computational Molecular Science*, e1298.
- [47] Addgene, Plasmid: TAGZyme pQE-2, <https://www.addgene.org/vector-database/4813/>, 3 Augustos 2020.
- [48] Ordu, Emel. Protein Engineering Applications on *Candida* Methylica Formate Dehydrogenase To Elucidate Folding Mechanisms and To Increase The Thermostability. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2010.
- [49] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T., (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling", *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- [50] Labrou, N. E., & Rigden, D. J., (2001). "Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase", *Biochemical Journal*, 354(2), 455-463.
- [51] Andreadeli, A., et al., (2009). "Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: A possible correlation with hypoxia", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794, 976-984.
- [52] M. Chánique, A., P. Parra, L., (2018). "Protein Engineering for Nicotinamide Coenzyme Specificity in Oxidoreductases: Attempts and Challenges", *Frontiers Microbiology*, 9:194.
- [53] Barin, R., et al., (2018). "Enzymatic CO₂ reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical regeneration of NADH", *Journal of CO₂ Utilization*, Volume 28, Pages 117-125.
- [54] Ruselllab, Arginine, <http://www.ruselllab.org/aas/Arg.html>, 2 Augustos 2020.
- [55] Kim, Y.H., et al., (2001). "Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins", *Protein Engineering, Design and Selection*, Volume 14, Issue 5, Pages 343-347.
- [56] Pace, C.N., et al., (1998). "A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins", *Biophysical Journal*, Volume 75, 422-427.
- [57] M K., Ordu E., K Y., Ng K., C T., (2012). "Improved *Candida methylica* Formate Dehydrogenase Fermentation Through Statistical Optimization Of Low-Cost Culture Media", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol.42, Pp.507-519.

- [58] Walsh, G., (2002). "Proteins: Biotechnology and biochemistry", Biochemistry and Molecular Biology Education, Volume 30, Issue 4, Pages 271-272.
- [59] Hu, B.C., Li, C., Wang, R., et al., (2018). "Improvement in the activity and enantioconvergency of PvEH3, an epoxide hydrolase from *Phaseolus vulgaris*, for p-chlorostyrene oxide by site-saturation mutagenesis", Catalysis Communications, Volume: 117, Pages: 9-13.
- [60] Hatrongjit, R., Packdibamrung, K., (2010). "A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: screening, purification and characterization", Enzyme Microb. Technol., 46, 557– 561.
- [61] Choe, H., et al., (2014). "Efficient CO₂-reducing activity of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for formate production from CO₂ gas", Plos One, 9(7): e103111.
- [62] Ordu E.B., et al., (2013). "Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylica*", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Volume 95, Pages 23-28.
- [63] Russelllab, Asparagine, <http://www.russelllab.org/aas/Asn.html>, 2 Austos 2020.
- [64] Kessler., A.T., Raja., A.,(2020). "Biochemistry, Histidine", StatPearls.
- [65] Llano, J.L., et al., (2006). "α-helix stabilization by alanine relative to glycine: Roles of polar and apolar solvent exposures and of backbone entropy", Proteins, Volume64, Issue3, Pages 769-778.
- [66] Imai, K., Mitaku, S., (2005). "Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins", The Biophysical Society of Japan, 1: 55–65.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: kubraatik11@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Kübra ATİK, Emel ORDU, *Gossypium hirsutum* Format Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bölge Doygunluk Mutasyonu Uygulamaları, 3. Ulusal Proteomik Kongresi, 2020, s24.