



NADP⁺ -Bağımlı Format Dehidrojenaz Enziminin Hesaplamalı ve DeneySEL Yöntemlerle Moleküler Mühendisliği

Program Kodu: 1001

Proje No: 112T538

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Hatice CAN

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Ayhan ÇELİK

Yrd. Doç. Dr. Semran İPEK KÜSKÜ

Danışman:

Doç. Dr. LEVENT SARI

ŞUBAT 2015
GEBZE

Önsöz

Son yıllarda enzimlerin biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak, tıp ,eczacılık, gıda çevre, tarım, deterjan, tekstil ve kağıt gibi birçok alanda kullanımı artmıştır. Enzimler biyokatalizörlerdir ve tıpkı diğer katalizörler gibi kimyasal reaksiyonları hızlandırır ve reaksiyon sonunda temel hallerine geri dönerler.

Enzimlerin önemli bir sınıfını oluşturan oksidoredüktazlar, kiral bileşiklerin ve polimerlerin sentezinde, biyosensör yapımında, çevresel kirliliklerin yıkımında görev almaktadır. Sahip oldukları potansiyele rağmen, oksidoredüktazların pahalı koenzim ihtiyacı, endüstriyel uygulamalarda sınırlayıcı bir faktördür. Bu proje kapsamında, oksidoredüktaz grubu enzimlerinden biri olan format dehidrojenaz (FDH) enzimi üzerine hesaplamalı ve deneysel protein mühendisliği çalışmaları yapılarak; daha aktif, dolayısıyla da endüstriyel kullanıma uygun NADP⁺-bağımlı FDH elde etmeye çalışılmıştır.

Projenin hesaplamalı çalışmalar kısmında moleküler doklamalar ve moleküler dinamik simülasyonlar yardımıyla kofaktör bağlanması en iyi olabilecek mutant enzim belirlenmeye çalışıldı. Elde edilen sonuçların deneysel sonuçlarla örtüştüğü gözlemlendi. Böylece *in silico* ortamda hedeflenen NADP⁺-bağımlı FDH enzimi için planlanan protein mühendisliği çalışmaları istenilen hedefe ulaşmıştır. Deneysel olarak yüksek aktivite elde edilen bazı mutant ve doğal enzim sistemleri için (FDH-kofaktör-format) detaylı olarak hibrit kuantum kimyasal (QM/MM) hesaplamaları yapıldı. Hem QM/MM hem de moleküler dinamik simülasyonlardan elde edilen sonuçlarla format dehidrojenaz enziminin aktif bölgesinde gerçekleşen, formattan kofaktöre hidrür transferinin detayları açıklanmaya çalışıldı.

Doç.Dr. Hatice CAN, Şubat 215

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Önsöz	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1.1 Giriş ve Literatür Bilgisi	1
1.1.1 Giriş	1
1.1.2 Literatür Bilgisi	3
1.1.3 Projenin Amacı	8
2. BÖLÜM-DENEYSEL ÇALIŞMALAR	9
2.2. Materyal ve Metotlar	9
2.2.1. Materyal ve Kimyasallar	9
2.2.2. Doğal tip Bsp383FDH'in DNA ve protein sekansı ve kristal yapısı	9
2.2.3. Mutasyon Çalışmaları	9
2.2.4. Sekanslama Çalışmaları	14
2.2.5. Doğal tip Bsp383FDH ve mutantlarının ekspresyonu ve saflaştırılması	15
2.2.6. <i>Protein Miktarının Ölçümü-Bradford ve BCA Yöntemleri</i>	18
2.2.7. Aktivite ve Kinetik Çalışmalar	18
2.2.8. NADPH Rejenerasyon Reaksiyonları	20
2.2.9. Veri analizi ve grafiklerin oluşturulması	21
2.3.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	22
2.3.1. Bsp383FDH'in kofaktör bağlanma bölgesinde mutasyon çalışmaları	22
2.3.2. Doğal tip Bsp383FDH'in Üretimi, Ekspresyonu ve Saflaştırılması	22
2.3.3. Doğal tip Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	29
2.3.4. Q223G Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	32
2.3.5. Q223G- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	33
2.3.6. Q223A Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	36
2.3.7. Q223A- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	37
2.3.8. Q223V Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	40
2.3.9. Q223V- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	41
2.3.10. Q223S Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	44

2.3.11. Q223S- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	45
2.3.12. Q223T Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	48
2.3.13. Q223T- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	49
2.3.14. Q223C- Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	53
2.3.15. Q223C- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	54
2.3.16. Q223M- Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	58
2.3.17. Q223M- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	59
2.3.18. Q223N- Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	62
2.3.19. Q223N- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	63
2.3.20. Q223R- Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	66
2.3.21. Q223R- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	67
2.3.22. Q223K- Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması	70
2.3.23. Q223K- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları	71
2.4. NADPH Rejenerasyon Reaksiyonları:	74
2.5. Bölümle ilgili Kaynaklar	76
3.1 MATERYAL VE METOD	77
3.1.1 Bilgisayar	77
3.1.2 Enzim Yapısı	77
3.1.3 Hesaplama Metodları	77
3.1.3.1 Moleküler Doklama	77
3.1.3.2 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonlar	78
3.1.3.3 Hibrit Yöntemler (QMM/MM)	80
4. Hesaplama Sonuçları	80
4.1 Moleküler Doklama	80
4.2 Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları	82
4.2.1 Birinci Kısım MD Simülasyonları	82
4.2.2 İkinci Kısım MD Simülasyonları	83
4.3 QM/MM Hesaplama Sonuçları	85
5. Sonuç	86
6. KAYNAKLAR	87

TABLO LİSTESİ

TABLO	SAYFA
Tablolar Dizini	
Tablo 1.1. Çoklu mutasyon için kullanılan ileri ve geri primer dizileri	
Tablo 1.2. Bsp383FDH ve pET14b <i>E.coli</i> BL21(DE3) suşlarının 1-16.saatleri arası proliferasyonu	
Tablo 1.3. Doğal tip Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.4. Q223G Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.5. Q223A Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.6. Q223V Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri	
Tablo 1.7. Q223S Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri	
Tablo 1.8. Q223T Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.9. Q223C Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.10. Q223M Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.11. Q223N Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.12. Q223R Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.	
Tablo 1.13. Q223K Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri	
Tablo 4.1. MD (30 ns) simülasyonu sonrası NADP ⁺ nin doking sonuçları (aktif bölge flexible).	

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 1.1. Farklı imidazol içeren fraksiyonlardaki protein ekspresyonunun SDS-PAGE jelinde görüntüsü.	
Şekil 1.2. Bsp383FDH'in afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında toplanan fraksiyonlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü.	
Şekil 1.3. (A) Bsp383FDH içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) ve kontrol olarak pET14b vektörü içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) suşlarındaki protein ekspresyonunun saatlere göre karşılaştırılmalı SDS-PAGE jel görüntüsü.	
Şekil 1.3.(B) Bsp383FDH içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) ve kontrol olarak pET14b vektörü içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) suşlarındaki protein ekspresyonunun saatlere göre karşılaştırılmalı SDS-PAGE jel görüntüsü.	
Şekil 1.4. Bsp383FDH içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) hücrelerde ilk saatlerdeki protein ekspresyonunun SDS-PAGE jel görüntüsü	
Şekil 1.5. 7 saatlik inkübasyon sonrası Bsp383FDH'in afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında toplanan fraksiyonlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü.	
Şekil 1.6. Doğal tip Bsp383FDH enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.7. Doğal tip Bsp383FDH enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.8. (a) Q223G-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonun piksel analizi.	
Şekil 1.9. Q223G-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.10. Q223G Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.11. (a) Q223A-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (6,7) piksel analizi.	
Şekil 1.12. Q223A-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.13. Q223A-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.14. (a) Q223V-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (8) piksel analizi.	
Şekil 1.15. Q223V-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.16. Q223V-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.17. (a) Q223S-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (8) piksel analizi.	
Şekil 1.18. Q223S-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.19. Q223S-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.20. (a) Q223T-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi.	
Şekil 1.21. Q223T-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	

Şekil 1.22. Q223T-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri	
Şekil 1.23. (a) Q223C-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi.	
Şekil 1.24. Q223C-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.25. Q223C-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.26 (a) Q223M-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.	
Şekil 1.27. Q223M-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.28. Q223M-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.29. (a) Q223N-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel	
Şekil 1.30. Q223N-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.31. Q223N-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.32. (a) Q223R-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi.	
Şekil 1.33. Q223R-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.34. Q223R-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.35. (a) Q223K-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi.	
Şekil 1.36. Q223K-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ve (b) NAD ⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil 1.37. Q223K-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP ⁺ ortamında ve (b) NAD ⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri.	
Şekil.1.38. Ssap-NtrB ve Bsp383FDH enzimlerinin 4NSX-zole 'ün idirgenmesinde kullanımının HPLC ile takibi.	
Şekil 4.1. Bsp383 ve 2NAD enzimlerinin dizi hizalaması (Enzimlerin aktif bölge aminoasitleri renkli gösterilmiştir)	
Şekil 4.2. Koenzimin deneysel ve enzime doklanmış yapıları	
Şekil 4.3. Q223F-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası	
Şekil 4.4. Q223N-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası.	
Şekil 4.5. Q223wt-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası	

ÖZET

Format dehidrojenazlar (FDH, EC 1.2.1.2), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD(P) kofatörünü hidrür (H⁻) transferi yoluyla indirgerken, format (HCOO⁻) iyonunun karbondioksit'e yükseltgenme reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. İnce kimyasalların sentezlendiği proseslerde, koenzim geri dönüşümünde (rejenerasyonunda) görev almaları nedeniyle önemli endüstriyel enzimlerden birisidir. FDH'nin katalitik mekanizmasında hidrür transferi ve kofaktör bağlanmasının hız belirleyen en önemli basamaklar olması ve diğer dehidrojenaz katalizli reaksiyonlarda görülen proton salma basamaklarını içermemesi; formatın dehidrojenaz substratları içerisinde en basit yapıya sahip substrat olması, bu reaksiyonun moleküler mekanizma çalışmalarında model alınmasına sebep teşkil etmektedir. Doğal FDH'ların çoğunun NAD⁺ koenzimine ilgisinin yüksek olması, FDH'nin NADH rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılmasını sağlarken, NADPH rejenerasyonu için kullanımını kısıtlamaktadır. Bu projede, *Burckholderia* sp. den elde edilmiş (Bsp383FDH) ve kristal yapısı aydınlatılmış olan NADP-spesifik format dehidrojenaz kullanılarak ve moleküler mühendislik yoluyla hem deneysel hem de hesapsal yöntemler kullanılarak Bsp383FDH enziminin kofaktör bağlanmasına etki eden aktif bölge amino asitlerinin etkilerinin incelenmesini içermektedir. Bu sayede yapı-fonksiyon ilişkisinin moleküler seviyedeki etkileşimleri incelenmiştir. Bu enzimin NADP⁺ seçiciliği ve etkinliği ve rasyonel mutant dizaynının NADP⁺ bağlanmasına olan etkileri, hesaplama kimya yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bağlanma bölgesinin en önemli amino asiti (Q223) doygun mutasyon yöntemiyle diğer aminoasitlere çevrilerek kinetik parametreler hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, Bsp383FDH bilinen diğer format dehidrojenazların aksine nikotinamid kofaktörlerinden NADP⁺ yi NAD⁺ ye tercih etmektedir. Böyle bir özelliğin olması büyük ölçüde kofaktör bağlanma bölgesinde bulunan glutamin aminoasitinin varlığından kaynaklanmaktadır (Q223). Bu projede, Q223 pozisyonundaki glutamin aminoasiti, teorik çalışmalar eşliğinde mutasyon teknikleri kullanılarak (doygun veya yönlendirilmiş) mümkün olan tüm aminoasitler ile yer değiştirilmiştir. Oluşturulan mutant enzimlerden aktivite gösteren tüm mutantların rekombinant üretimi, saflaştırılması ve kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğal tip enzimle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar, NADP⁺, NAD⁺ ve format (hem NADP⁺ hemde NAD⁺ ortamında) yönünden kinetik parametreleri hesaplanarak (K_M , k_{cat} ve k_{cat}/K_M) incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler; Enzim modelleme, mutasyonel analiz, moleküler doklama, MD simülasyonları, QM/MM hibrit yöntemler, endüstriyel biyodönüşüm, oksidoredüktazlar, format dehidrojenaz

ABSTRACT

Formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) that was first found in pea seeds in 1951 by Davison is one of the widely used enzyme for coenzyme regeneration in the processes of chiral synthesis. The fact that hydride transfer and cofactor binding were the most important rate-limiting steps in the catalytic mechanism of FDH and the absence of proton-release stages that exist in all dehydrogenase catalyzed reactions, considering that formate is structurally the simplest of dehydrogenase substrates, have allowed regarding this reaction as a model to be used in studies of the molecular mechanism. Because of the reason that many native FDH's are highly specific to NAD⁺ coenzyme, FDH is widely used in regeneration of NADH, it could not been used in NADPH regeneration. In this project, a new formate dehydrogenase which is obtained from *Burckholderia* sp. (Bsp383FDH) and has solved crystal structure, has been used. This FDH is NADP⁺-dependent enzyme which is contrast to other FDH enzymes. The NADP⁺ selectivity, efficiency of this new enzyme and the effects of rational mutant design on the binding of NADP⁺ has been investigated computational chemistry methods followed by experimental studies. The best mutation for binding of NADP⁺ to active site of the enzyme has been found to be amino acid of Q223 In accordance with the results of calculations, natural enzyme has been mutated experimentally to all possible amino acids, and the activation of the mutated enzymes with related kinetic parameters (k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M) determined experimentally. Ultimately, FDH enzyme which is NADP⁺- dependent and has high activation in industrial standards has generated. It is thought that the new enzyme will contribute to find out usage in industry for NADPH dependent functional enzymes.

Keywords:

Enzyme modeling, mutational analysis, molecular docking, MD simulations, QM/MM hybrid calculations, industrial biotransformation, oxidoreductases, formate dehydrogenase

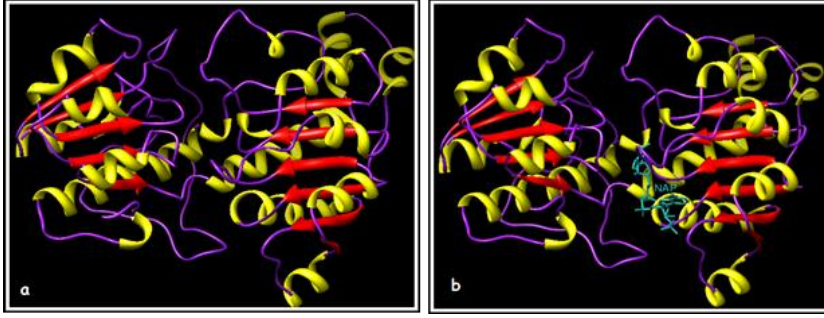
1.1 Giriş ve Literatür Bilgisi

1.1.1 Giriş

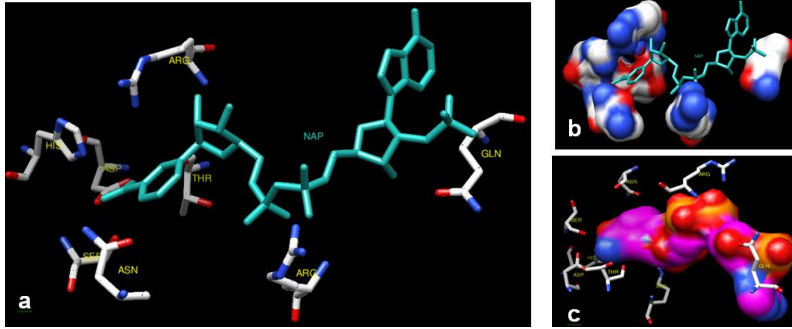
Enzimler, çeşitli kullanım alanlarının yanında; tekstil, gıda, deri, ilaç, kozmetik gibi endüstriyel ölçekli çalışmalarda da yaygın olarak kullanılan biyokatalizörlerdir. Günümüzde hidrolazlar, liyazlar gibi birçok enzim grubu büyük ölçekli sentez proseslerinde kullanılmaktadır. Bazı enzimler de çok önemli reaksiyonları katalizlemesine rağmen, biyoteknolojik açıdan atıl durumda bulunmaktadır. Bu durum, bazı enzimlerin kararlılığının, aktivitesinin, seçiciliğinin düşük olmasından ya da aktivite göstermek için pahalı koenzime gereksinim duymalarından kaynaklanmaktadır. Enzimlerin önemli bir sınıfını oluşturan oksidoredüktazlar, kiral bileşiklerin ve polimerlerin sentezinde, biyosensör yapımında, çevresel kirliliklerin yıkımında görev almaktadır. Sahip oldukları potansiyele rağmen, oksidoredüktazların pahalı koenzim ihtiyacı, endüstriyel uygulamalarda sınırlayıcı bir faktördür.

Bu proje kapsamında, oksidoredüktaz grubu enzimlerinden biri olan format dehidrojenaz (FDH) enzimi üzerine hesaplamalı ve deneysel protein mühendisliği çalışmaları yapılarak; daha aktif, dolayısıyla da endüstriyel kullanıma uygun NADP⁺-bağımlı FDH elde etmeye çalışılmıştır. Bilinen tüm doğal FDH'ler NAD⁺-bağımlı olup, NADP⁺ 'yi koenzim olarak kullanmazlar. Yakın zamanda, içerisinde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Ayhan Çelik'in de bulunduğu Davis ve grubu tarafından yapılan çalışmalar sonucunda NADP⁺'yi kullanan doğal bir FDH keşfedilmiştir. Bu yeni FDH, bilinen FDH genleri ile genom dizilişleri tespit edilen mikroorganizmalar karşılaştırılarak tanımlanmıştır. *Burckholderia* sp. den elde edilen ve Bsp383 FDH olarak isimlendirilen bu enzime ait klonlama ve buna bağlı olarak rekombinant ekspresyon işlemleri tamamlanmıştır. Enzimin yapısını aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalar sonuç vermiş ve yüksek kalitede protein kristalleri elde edilmiştir. Bsp383FDH'in üç boyutlu yapısı, X-ışınları kristalografisi yöntemiyle 1,8 Å çözünürlükte hem koenzimsiz (apo form), hem de koenzimli (holo form) olarak çözülmüştür (Şekil 1).

Yapılan kinetik çalışmalar, bu enzimin hem NAD⁺ hem de NADP⁺ yi koenzim olarak kabul ettiğini; fakat NADP⁺'nin tercih edilen koenzim olduğunu göstermiştir. Bir başka ifadeyle, ilk olarak formatı substrat olarak kullanan, doğal bir NADP⁺-bağımlı FDH keşfedilmiştir. Ayrıca NAD⁺-bağımlı FDH enzimlerinden mutasyon çalışmaları sonucu elde edilen NADP⁺-bağımlı FDH'lara kıyasla bu yeni enzimin daha aktif ve kararlı yapıya sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 1).



Şekil 1. Bsp383FDH enziminin üç boyutlu yapısı: a) apo form b) holo form (NADP⁺ bağlı)



Şekil 2. Bsp383FDH enziminin aktif bölge amino asit rezidüleri ve koenzim (NADP⁺). a)Aktif bölge rezidüleri ve koenzim. b)Aktif bölge rezidüleri (yüzey modelleri), koenzim. c)Aktif bölge rezdüleri ve koenzim (yüzey modeli).

Tablo 1. Bsp383FDH'in koenzim rejerasyonuna uygunluğu yönünden diğer FDH'larla karşılaştırması (wt: wild type (doğal enzim), k_{cat} : dönüşüm sayısı (turnover number), K_M : Michaelis sabiti)

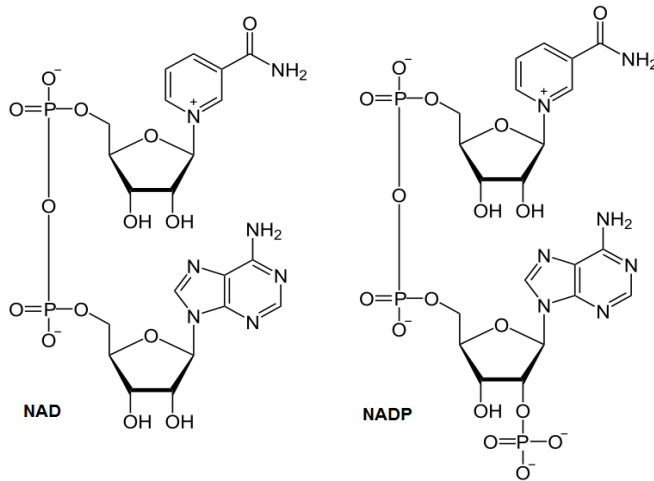
Enzim	Mutantlar	Aktivite (U/mg)		Koenzim seçiciliği $(k_{cat}/K_M)^{NAD^+}/(k_{cat}/K_M)^{NADP^+}$	Referans
		NAD ⁺	NADP ⁺		
Pseudomonas sp. 101	wt, PseFDH	6-8	-	2400	[1]
	T5M8 (patentli)	-	2,9		
	5M9 (patentli)	-	2,5		
	T5M8 (patentli)	-	2,5		
C.bodini	wt, CboFDH	2,2	0,0013		[1]
	D195S	1,5	0,083		
	D195S/Y196H	1,3	0,19		
	D195S/Y196H/K356T	1,3	0,36		
C. Methylica	D195S			8,3	[2]
Bsp383 FDH	wt, Bsp383 FDH	1,09	8,64	0,29	[3]

1] Tishkov, V.I. and V.O. Popov, Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. Biochemistry Moscow, 69(11), 1252-1267, 2004.

- [2] Gul-Karaguler N., Sessions R.B., Clarke A.R., et al. A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP, *Biotechnology Letters*, **23** (4), 283-287, 2001 .
- [3] Davis, B.G., Celik, A., Davies, G.J., and Ruane, K.M., Novel Enzyme. Application No.: PCT/GB2009/051320. Unpublished (filing date: 06.10.2009).

1.1.2 Literatür Bilgisi

Son yıllarda enantiyomerik açıdan saf bileşiklerin üretilmesi özellikle ilaç endüstrisi başta olmak üzere, gıda, ziraat ilaçları ve parfüm üretiminde büyük öneme sahiptir. Enantiyomerik açıdan saf bileşiklerin üretilmesinin başlıca nedeni enantiyomerlerin farklı biyolojik aktiviteler göstermesidir.¹ Oksidoredüktazlar, kiral olmayan substratlardan kiral moleküllerin sentezlenmesinde kullanılır. Bu gruba ait enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar son derece stereo seçici olup, ürün verimi %100'e kadar çıkabilmektedir.² Dehidrojenazları da bünyesinde içeren bu enzim grubu, redoks tepkimelerini katalizleyebilmek için koenzimlere ihtiyaç duyarlar.³ Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP^+) ile bunların indirgenmiş formları (NADH ve NADPH), bütün canlı hücrelerinde bulunan en önemli iki koenzimdir. Bu koenzimler, enerji dönüşümü ve biyosentetik proseslerde elektron taşıyıcı olup, hücresel savunma sistemlerinde ve metabolik dönüşümlerde sinyal iletici olarak hayati önem taşırlar.⁴⁻⁶ NAD^+ ve NADP^+ moleküllerinin yapısı Şekil 1'de verilmiştir



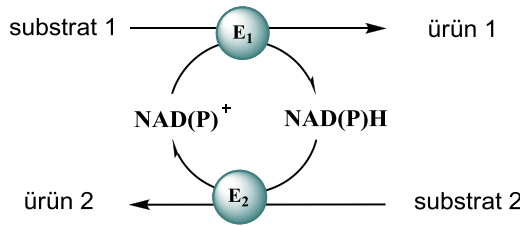
Şekil 3. NAD^+ ve NADP^+ moleküllerinin yapısı.

Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP^+) bütün canlı sistemlerinin biyolojik redoks reaksiyonlarında yer alan koenzimlerdir. Uygun enzim ve substrat varlığında genellikle, stereospesifik bir yolla, bir hidrit iyonu nikotin halkasının 4 konumundaki karbon atomuna ya da karbon atomundan aktarılır. NADP ile NAD'nin büyük yapısal benzerliğine rağmen NAD'dan farklı olarak adenin ucundaki riboz hidroksil grubu

fosfat şeklindedir. Bu durum NAD ve NADP'nin biyokimyasını önemli ölçüde farklı kılar. NAD sadece, ATP'nin olduğu oksidatif degradasyonlarda kullanılmasına ve oksidant olarak davranmasına rağmen, NADP ise bazı indirgeyici biyosentez reaksiyonlarında indirgeyici olarak kullanılır. Aslında bu kadar küçük bir yapısal farklılığın böyle büyük bir biyokimyasal farklara yol açması çok şaşırtıcıdır ve biyolojik kimyadaki moleküler tanınmanın bir ispatıdır. Son yıllarda , birkaç rezidünün mutasyonu ile NAD yada NADP tercihinin değiştirilebileceği üzerine bir kaç başarılı protein mühendisliği çalışmaları vardır.⁷⁻⁹

NAD(P)⁺, yüzlerce oksidoredüktaz enzim reaksiyonunda elektron taşıyıcı olarak çok önemli role sahiptir.¹⁰ Bu koenzimlerin pahalı olması, oksidoredüktazların endüstriyel ölçekte kullanımını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamanın önüne geçmek için yapılan çeşitli protein mühendisliği çalışmalarında, koenzim rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi yoğun ilgi uyandırmıştır.¹¹⁻¹³

Kofaktör bağlı enzimatik sentezinde koenzim rejenerasyonunun genel şeması Şekil 4'de verilmiştir.²



Şekil 4. Enzimatik koenzim rejenerasyon sistemi

Buradaki E₂ temel enzim olup, indirgenmiş koenzim (NAD(P)H) kullanarak kiral bir bileşiğin üretimini katalizler (dehidrojenaz, redüktaz, monooksijenaz gibi). Reaksiyonun sürekliliği için ortamda NAD(P)⁺ ↔ NAD(P)H dönüşümü de gerekmektedir. Bu amaçla yardımcı bir enzim (E₁: format dehidrojenaz gibi) kullanılarak yükseltgenmiş koenzim tekrar indirgenir. Bu ikili enzim sistemi sayesinde koenzim rejenerasyonu gerçekleştirilerek, katma değeri yüksek bileşiklerin üretimi ekonomik hale gelmektedir. Format dehidrojenaz (FDH, EC 1.2.1.2), koenzim rejenerasyon sistemlerinin gelişiminde en ümit verici adaylardan biri olup; günümüzde katma değeri yüksek farmakolojik ürünlerin üretilmesi amacıyla, temiz organik ve kiral sentezlerle uygulama alanına sahiptir.^{2,14-16} Örneğin, Degussa (Almanya) firmasının NADH'nin rejenerasyonu için katalizör olarak NAD bağımlı FDH kullanarak, ter-L-lösin (bir çok kimyasal maddenin ve ilacın sentezlenmesinde kullanılan katma değeri yüksek ürün) üretmek amacıyla endüstriyel ölçekte geliştirdiği proses, farmakolojik kimyadaki en kapsamlı enzimatik proseslerden birisidir.¹

FDH, NADH rejenerasyonunda kullanılmak üzere model enzim olarak seçilmektedir. Çünkü,

1. Normal koşullarda FDH'nin katalizlediği reaksiyon dönüşümsüz olup, %99-100 son ürün verimi ile sonuçlanır.

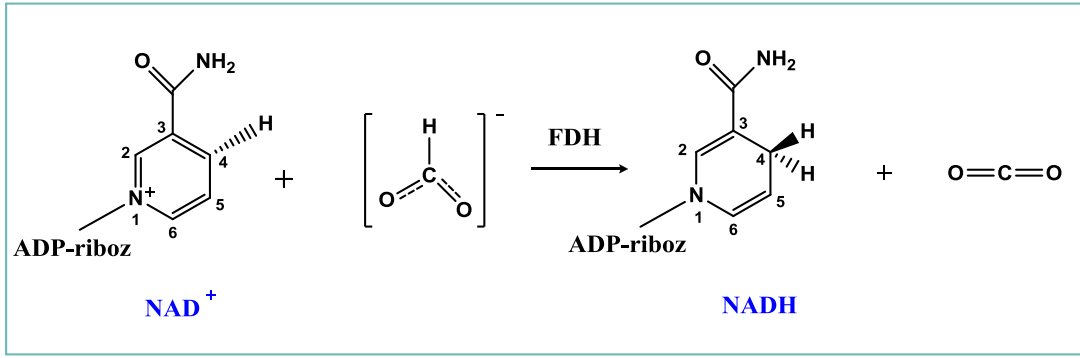
2. Format iyonu (HCOO^-) ucuz bir substrattır.

3. Reaksiyon ürünü olan karbondioksit (CO_2), kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve sonraki ürün saflaştırma basamaklarını basit hale getirerek maliyeti azaltır.

4. FDH, geniş bir pH aralığında (pH 6,0-9,0) katalitik aktivite gösterir.

5. Metanol kullanan bakteri ve mayalar, nispeten düşük üretim maliyeti ile büyük ölçekte enzim üretimi sağlarlar. Ayrıca bakteri ve maya FDH'ları sürekli akış reaktörlerinde kullanılmak için yeterli derecede kararlıdır.²

FDH, fizyolojik sıvılarda ve çözeltilerde formik asit ve okzalik asit tayininde kullanılabilir.¹⁷ Çeşitli organizmalardan elde edilen FDH enzimi üzerine yapılan çalışmalar, özel koşullarda FDH'nin hücre işlevi için önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Örneğin FDH bitkilerde stres proteini olarak görülmektedir. Bitki mitokondrisinde bulunan FDH'nin biyosentezi, uygun olmayan toprak bileşimi ya da çepitli fiziksel ve kimyasal etkiler sonucunda, mitokondrideki toplam proteinin %9'unun üzerinde bir artış göstermektedir.¹⁸ Bu partlar altında sentezlenen FDH'ın esas işlevi, format iyonunu karbondioksit yükseltgectir. FDH izoform oranlarının analizi, hastalıklı ağaçların tayinde kullanılmıştır.¹⁹ FDH, bütün metilotrofik mikroorganizmalarda bulunan bir enzimdir. Bu mikroorganizmaların temel enerji kaynaklarından biri, format iyonunun yükseltgenmesi ile elde edilen karbondioksittir. FDH'ın mikroorganizmalardaki işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, bir hipoteze göre bitkilerdeki fizyolojik etkiye benzer şekilde stres anında ortaya çıkmaktadır.¹ FDH'lar, Şekil 5 ile gösterilmiş olan format anyonunun (HCOO^-) karbondioksit (CO_2) yükseltgendiği tepkimeyi katalizleyen, açığa çıkan elektronları hidrür (H^-) şeklinde başka bir moleküle aktaran (NAD(P)^+) enzimlerdir. Bu tepkimede, substrat molekülündeki (HCOO^-) bir C-H bağı kopmakta ve üründe (NADH) bir C-H bağı oluşmaktadır.²⁰



Şekil 5. FDH enziminin katalizlediği reaksiyon

Bu bi-substrat (HCOO^- ve NAD^+) reaksiyonunda enzime ilk olarak NAD^+ 'nin, ardından formatın bağlandığı yapılan kinetik ölçümlerden bilinmektedir. Ardından bu üçlü komplekste substrattan koenzimin fonksiyonel grubu olan nikotinamidin C4 atomuna (şekil 5), hidrür iyonu doğrudan transfer edilmektedir. Hidrür iyonu transferi, FDH'nin katalitik mekanizmasında hız belirleyen basamak olarak görülmektedir.²¹⁻²² Kataliz, NAD^+ molekülünün pridin halkasında gerçekleşmektedir ve NAD^+ molekülünün karboksiamid grubu trans konformasyondadır (Karboksiamid oksijeni, pridin halkasındaki C4 atomuna doğru yönelmektedir).²⁰ Kataliz reaksiyonunda, nikotinamid halkasının geçiş hal konformasyonunu incelemek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır.²¹⁻²⁴ Yapılan ^{15}N izotop etkisi ölçümleri²² ve gaz fazındaki ab initio hesaplamaları²⁴, reaksiyonun geçiş hali boyunca azot merkezinin planara yakın olduğunu göstermiştir.

Bilinen tüm doğal FDH'lar NAD^+ -bağımlıdır ve NADP^+ 'yi kofaktör olarak kullanmazlar. Bu sebeple literatürde **doğal** bir NADP^+ -bağımlı FDH enzimi üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Aşağıda, enzimlerin ve enzimik reaksiyonların hesaplamalı yöntemlerle incelendiği literatürden seçilmiş bazı çalışmalardan kısaca bahsedilmektedir:

Torres ve gurubu tarafından yapılan çalışmada²⁵, substrat ve NAD^+ koenzimi içeren FDH enziminin aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasındaki mesafeler ve dinamik hareketler, Amber 5.0 paket programı ile yapılan MD simülasyonlarıyla incelenmiştir. 2 ns'lik MD simülasyonları boyunca enzimatik reaksiyonun geçiş hali (E·TS) ve enzim-substrat (E·S) komplekslerinde meydana gelen konformasyonel değişimler rapor edilmiştir. E·S ve E·TS kompleksleri elektrostatik etkileşimler bakımından kıyaslanmış, aralarındaki yük farkından ötürü hidrojen bağlarında farklılıklar görülmüştür. Bulgular, FDH'nin aktif bölgesindeki aminoasitlerin geçiş hal yapısını stabilize etmekten ziyade, substrat ve koenzimi yönlendirdiğini göstermiştir. Hesaplanan kinetik izotop etkileri ile deneysel veriler arasında büyük bir uyum olduğu, dolayısıyla da enzimatik TS ile hesaplanan TS'nin hemen hemen aynı olarak gösterilebileceği tespit edilmiştir.

Castillo ve gurubunun FDH'ın katalize ettiği NAD^+ ile format anyonu arasındaki hidrür transfer reaksiyonunu teorik olarak incelemek amacıyla yürüttükleri çalışmada, DYNAMO programı ile yapılan hibrit QM/MM yöntemler kullanılmıştır. Enzimin hem sulu ortamda, hem de yalnızca aktif bölgesi alınarak hesaplanan serbest enerji değerleri, her iki ortamdaki reaktantlar arasındaki farkları ortaya koymuştur. Sonuçlar enzimin, hidrür transfer reaksiyonu için alıcı ve verici atomların bağlı yönlenmelerini kolaylaştıracak şekilde, substratı ve kofaktörü geçiş haline yakın bir konformasyona getirdiğini göstermiştir ki, bu da aktif bölgedeki aminoasit rezidüleri ile tercih edilen etkileşimlere işaret etmektedir.²⁶

Enzim-koenzim-substrat etkileşimleri sonucunda geometride meydana gelen küçük değişimleri çalışmak için QM metotlar kullanılmaktadır. Bu küçük değişimler, biyokimyasal prosesler için büyük önem arz etmektedir. Polshakov ve gurubu tarafından yapılan bir çalışmada,²⁷ dihidrofolatın (DHF) trihidrofolata (THF) indirgendiği tepkimeyi katalize eden dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine NADPH ve NADP^+ koenzimlerinin bağlanma afiniteleri arasındaki fark, deneysel NMR verileri ile ve B3LYP yoğunluk fonksiyoneli hesaplamalarıyla incelenmiştir. Bu amaçla DHFR, NADPH ve TMP üçlü kompleksi içeren NMR yapısından yola çıkılarak iki model sistem oluşturulmuştur. Birinci model sistemde enzimin üç aktif bölge rezidüsü (Ala 6, Gln 7, Ile 13), NADPH/ NADP^+ ve TMP, ikinci model sistemde ise enzimin iki aktif bölge rezidüsü (Ala 6 ve Gln 7), NADP/ NADP^+ ve TMP alınmıştır. İki model sistemin geometri optimizasyonları, Gaussian 98 paket programı kullanılarak DFT yöntemiyle yapılmıştır. Sonuç olarak, NADP^+ içeren üçlü model sistemlerin toplam etkileşim enerjisi, NADPH içeren üçlü model sistemlerin toplam etkileşim enerjisinden daha düşük çıkmış, bu da enzime NADP^+ koenziminin NADPH koenziminden daha sıkı bağlandığını göstermiştir.

DHFR enziminin katalizörlüğü eşliğinde gerçekleşen, NADPH koenziminden folat (FOL) ve dihidrofolat (DHF) substratlarına hidrür iyonunun transfer edildiği reaksiyonu incelemek amacıyla Cummins ve gurubu tarafından bir dizi hesaplamalı çalışma yürütülmüştür²⁸⁻³¹. Enzimin başlangıç koordinatları protein veri bankasında (PDB) bulunan DHFR-FOL- NADP^+ kompleksinden elde edilmiştir. Bu çalışmaların birinde³¹, DHFR enziminin katalize ettiği hidrür iyonu transfer reaksiyonu üzerine QM bölgesinin değiştirilmesinin etkisi, korunan aktif bölge rezidüsünün (Asp 27) iyonizasyonu, aktivasyon ve reaksiyon serbest enerjileri üzerine polarizasyonun etkisi incelenmiştir. Bu reaksiyona ait serbest enerji değişiminin hesaplamak amacıyla MD simülasyonları yapılmıştır. MD'de kuvvet alanı (FF, force field) olarak, çok sayıda simülasyonu etkili bir şekilde yapabilmek için yarı deneysel PM3-QM/MM yaklaşımı kullanılmıştır. Hidrür iyonu transferi için, minimum serbest enerji yoluna (MFEP) karşılık gelen reaksiyon koordinatı elde edilmiştir. Aktivasyon ve reaksiyon serbest enerji değerleri, deneysel sonuçlarla kıyaslanmıştır. Bu MFEP, QM bölgesinin büyüklüğü ve bileşiminin, Asp27'nin iyonizasyonunun ve polarizasyonun etkisi gibi daha ileri simülasyon uygulamaları

için uygun bir integrasyon yolu sağlamaktadır. Ayrıca MFEP üretimde kullanılan yarı deneysel QM metodundaki yaklaşımlardan ötürü, MFEP boyunca gerçekleşen reaksiyona yardımcı olmak için bazı ileri seviyede ab initio ve DFT QM/MM hesaplamaları da yapılmıştır. QM bölgesine substrat ve kofaktör moleküllerinin tamamını dâhil etmek gerektiğini ve reaktantlara kıyasla geçiş hali (TS, transition state) yapısı ve ürünlerin serbest enerjisini tayin etmede, proteinin tamamının elektrostatik çevresinin önemli olduğunu göstermiştir. Nötral Asp27 için PM3 ile hesaplanan reaksiyon serbest enerjisi (-4 ± 2 kcal/mol) deneysel değeriyle uyumlu iken ($-4,4$ kcal/mol), aktivasyon serbest enerjisi (-21 ± 2 kcal/mol) deneysel değerinden ($-4,4$ kcal/mol) yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, Asp27'nin protonasyonunun aktivasyon mekanizmasında temel faktör olduğunu desteklemiştir.

1.1.3 Projenin Amacı

1. Yapılacak olan mutant dizaynları ile daha aktif enzim mutantları elde edebilmek,
2. Yeni enzimin, literatürde mevcut olan FDH enzimleri gibi NAD^+ değil de, NADP^+ -bağımlı olma nedenlerini araştırmak,
3. Hesapsal olarak öngörülen, doğal enzime göre aktivitesi daha yüksek olan mutant enzimleri, laboratuvarında bölge yönelimli mutasyon yöntemiyle elde edip; hesaplamalı ve deneysel çalışmalar arasındaki korelasyonu ortaya koymak,
4. Mutant NADP^+ -FDH ve oksidoredüktaz (örnek: sitokrom P450 BM3) ikili enzim sistemlerinde başarılı bir NADPH rejenerasyon sistemi geliştirmektir.

Erişilmek istenen sonuç; aktivitesi daha yüksek bir enzim elde etmek ve bu enzimin NADPH rejenerasyonu gerektiren proseslerinde (ilaç ara maddelerin, kiral bileşiklerin sentezi gibi) kullanılabilirliğine imkân sağlamaktır.

2. BÖLÜM-DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.2. Materyal ve Metotlar

2.2.1. Materyal ve Kimyasallar

Araştırmada kullanılan mikro organizmalar ve plazmidler: *E.coli* BL21(DE3), *E.coli* (Top10) ve *E.coli* C1303. İlgili mikro organizmaların kimyasal (CaCl_2) kompetent formları, standart prosedürler kullanılarak yapılmıştır.

2.2.2. Doğal tip Bsp383FDH'in DNA ve protein sekansı ve kristal yapısı

Dogaltip Bsp383FDH ait DNA ve protein sekansı ve kristal yapısı ilgili patentde bulunmaktadır (Davis and Çelik (2008).

2.2.3. Mutasyon Çalışmaları

a.Yönlendirilmiş Mutasyon

İstenen mutantlar doygun mutasyon metodu ile elde edildiği için yönlendirilmiş mutasyona ihtiyaç duyulmamıştır.

b. Doygun Mutasyon

Burkholderia sp. den elde edilen Bsp383FDH enziminin Q223 pozisyonundaki amino asitini değiştirmek amacıyla saturated (doygun-çoklu) mutasyon çalışmaları yapıldı. Buna göre elde edilen mutant genleri içeren kolonilerin, *E.coli* BL21(DE3) hücreleri ile benzer özellik gösteren *E.coli* NEB 10-beta hücrelerine transformasyonu ile Bsp383FDH enziminin, NADP^+ bağlanması ve indirgenmesinde en önemli rolü olan Q223 bölgesinde iyileştirme çalışmaları başlatıldı. Saturated (Doygun-Çoklu) mutasyon için mutasyon yapacak bölgeleri (NNK ve MNN) içeren Bsp383FDH primeri ile T7 primeri iki farklı PCR ürünü elde etmek için kullanıldı. Bu primerlere ait ileri ve geri primer dizileri Çizelge 1.1 'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Çoklu mutasyon için kullanılan ileri ve geri primer dizileri

Kaynak	Yön	Dizi	Tm (°C)
Bsp383FDH	İleri	5'-GCACTACACGNNKCGCCACCGGCTCGATGCATC -3'	87.2
	Geri	5'-GCCGGTGGCGMNNCGTGTAGTGCAGCTGCAGG-3'	86.5

Kaynak	Yön	Dizi	Tm (°C)
T7	Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	52
	Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG G-3'	58

N: herhangi bir baz (A,T,G,C) ve K: G veya T

Birinci PCR ürünü için PCR reaksiyon içeriğinde; saflaştırılmış DNA (plazmit), T7 Promotor ve Bsp383FDH geri primerleri, 5X PrimeSTAR (PS) Tampon, dNTP mix (her birinden 2,5mM) ve

PS Polimeraz yer aldı. İkinci PCR ürünü için ise PCR reaksiyon içeriğinde; saflaştırılmış DNA (plazmit), T7 Terminator ve Bsp383FDH ileri primerleri, 5X PS Tampon, dNTP mix (her birinden 2,5mM) ve PS Polimeraz yer aldı. Çoklu mutasyon için hazırlanan PCR reaksiyonlarının hacmi 25 µl'dir ve her PCR örneği 2'şer tüp olarak hazırlandı. Reaksiyon bileşenlerinin ortamdaki son konsantrasyonları plazmit DNA'sı için 0.5 µL (0.25 ng), T7 ve Bsp383FDH primerleri için 5 µL (0.25 pmol/µL), 5X PS Tampon 1X olacak şekilde (10 µL), dNTP mix 4 µL ve PS Polimeraz 0,5µl olarak eklendi. Birinci PCR işleminde uygulanan program öncelikle reaksiyon karışımının 8 saniye 98 °C'ye ısıtılmasıyla başlayıp sonrasında 95 °C'de 8 sn., 64 °C'de 15 sn. ve 72 °C'de 45 saniyeden oluşan 35 döngü ile çoğaltım ve son olarak 72 °C'de 5 dak. son uzatma işlemi ile gerçekleştirildi. İkinci PCR işleminde ise uygulanan program öncelikle reaksiyon karışımının 8 saniye 98 °C'ye ısıtılmasıyla başlayıp sonrasında 95 °C'de 8 sn., 68 °C'de 15 sn. ve 72 °C'de 45 saniyeden oluşan 35 döngü ile çoğaltım ve son olarak 72 °C'de 5 dak. son uzatma işlemi ile gerçekleştirildi. PCR programı tamamlandıktan sonra 2'şer tüp olan reaksiyon ürünleri tek tüpte birleştirildi ancak her PCR ürününden 10'ar µL alınarak ayrıldı. Geride kalan ~40 µL ürünlerin üzerine 10'ar µL 6X yükleme tamponu ilave edildi ve hafifçe pipetlenerek homojenize hale getirildi. Elde edilen karışım ve marker % 1.2'lik agaroz jelin kuyularına yüklendi ve 80 voltta 50 dakika süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Agaroz jel elektroforezde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları EK-1'de verilmiştir.

1. ve 2. PCR ürünlerinin birleştirilmesi

Jelden saflaştırılmış ürünler ile jele yüklenmeden ayrılmış olan (10'ar µL) ürünler ayrı ayrı PCR işlemi ile birleştirildi. Buna göre kullanılan PCR içerikleri ve PCR programı aşağıda verilmiştir.

Jelden saflaştırılmış ürünlerin birleştirilmesi (1)

PCR içeriği

• 5X PS Tampon	10 µL
• dNTP mix (her birinden 2,5mM)	4 µL
• Saf Kalıp 1	2 µL
• Saf Kalıp 2	2 µL
• PS Polimeraz	0.5 µL
• dH ₂ O	21.5 µL

Saf olmayan (10 µL ayrılan) ürünlerin birleştirilmesi (2)

PCR içeriği

• 5X PS Tampon	10 µL
• dNTP mix (her birinden 2,5mM)	4 µL
• Saf olmayan Kalıp 1	2 µL
• Saf olmayan Kalıp 2	2 µL
• PS Polimeraz	0,5 µL
• dH ₂ O	21,5 µL

Her iki PCR içeriğinin toplam hacmi 40 µL'dir.

Birleştirme için PCR Programı

Önce

98 °C'de 5 sn.	}	7 döngü ~12 dak.
55 °C'de 10 sn.		
72 °C'de 45 sn.		

Sonra

T7 promotor ve T7 terminator primerler 5'er µL olarak eklendikten sonra aşağıdaki program uygulandı.

98 °C'de 8 sn.	}	35 döngü ~1saat 30 dak.
55 °C'de 15 sn.		
72 °C'de 1 dak.15 sn.		

Ürünler çok olduğundan 2 kuyuya ayrıldı. PCR sonrası ürünler ve marker % 1.2'lik agaroz jelde 95 voltta 40 dakika yürütüldü.

Restriksiyon enzimleri ile kesim

Elde edilen ve mutasyon içeren saf ürünü (insert) ve vektör olan pET23b içerisine yerleştirmek (ligasyon) için öncelikle hem insert hem de plazmitin restriksiyon enzimleri ile (XhoI ve NdeI) kesildi. Bu işlem için gerekli reaksiyon aşağıdaki gibi kurulmuştur.

Vektör için reaksiyon içeriği

• XhoI	10 µL	}	100 µL olan toplam içerik 20'şer tüplere ayrıldı.
• NdeI	10 µL		
• 10X Buffer H	10 µL		
µL'lik			
• Bsp383 Plazmit (91 ng/µL)	50 µL		
• dH ₂ O	20 µL		

Insert için reaksiyon içeriği

• XhoI	10µL	}	100 µL olan toplam içerik 20'şer µL'lik tüplere ayrıldı.
• NdeI	10µL		
• 10X Buffer H	10µL		
• Insert ürünü (187.6 ng/µl)	25µL		
• dH ₂ O	45µL		

Toplam 10 tüp 37°C'de bir gece boyunca inkube edildi. Inkubasyon sonrası ürünler ve marker % 1.2'lik agaroz jelde 80 voltta 50 dakika yürütüldü.

Ligasyon ve transformasyon

Elde edilen mutant ürünün Bsp383FDH içeren plazmit içerisine ligasyonu ve mutasyonun belirlenmesi için de *E.coli* kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle ligasyon hesabı ve ligasyon, sonrasında ise transformasyon yapıldı.

Ligasyon hesabı:

$$\frac{\text{ng vektör} \times \text{insert kb}}{\text{vektör kb}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vektör}} = \text{ng insert}$$

$$\text{Bsp383} + \text{pET23b} = 4748 \text{ bç} \quad \text{Insert} = 1,2 \text{ kb}$$

pET23b = 3665 bç = 3,66 kb ve vektörün genellikle 50ng olması istenir.

$$\frac{50 \text{ ng} \times 1,2 \text{ kb}}{3,66 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 49,1 \text{ ng insert}$$

1µl'de 70,9 ng insert olduğundan 50ng için 0,7 µl insert gerekmektedir. 1µl'de 6,8 ng vektör olduğundan 49,1ng için 7,3 µl insert gerekmektedir.

Ligasyon

Bu hesaba göre ligasyon içeriği aşağıdaki gibi yapılmıştır.

• 10X Ligasyon tamponu	2 µL	} toplam 20 µL olan içerik 2 tüpe ayrıldı.
• Vektör	7,3 µL	
• İntert	0,7 µL	
• T4 DNA Ligaz	1 µL	
• dH ₂ O	9 µL	

1. tüp 25°C'de 2 saat inkube edilirken 2. tüp gece boyu 16 °C'de inkube edildi.

Transformasyon

Ligasyon sonrası hem ligasyon ürünlerinin hem de sadece FDH plazmitinin *E. coli* C3013 ve NEB10-beta kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Kompetent hücrelerin miktarı 200 µL olup tüm hücre içeriği LB-agar petrilere ekildi. Bu nedenle kullanılacak olan plazmit 1/10 oranında seyreltildi ve bu seyreltmeden 1'er µL kompetent hücrelere eklendi. Ligasyon ürünlerinden ise 5'er µL kompetent hücrelere eklendi. Transformasyonda şu yol takip edildi: Karışım 30 dakika buzda inkube edildi. Sonrasında 42 °C'de 2 dakika bekletildi.

Bu işlemden sonra tekrar 3 dakika buzda inkube edildi. Karışım üzerine 500 µL bakteri suşlarının büyütülmesi için ampisilin içermeyen sıvı LB besiyeri (EK-1) eklendi ve 1 saat, 37 °C'de, 230 rpm'de çalkalamalı etüvde inkube edildi. 1 saat sonunda 8.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Dipte kısımda kalan ~200µl lik pellet iyice süspanse edildi ve inokülasyon ürünlerinin tamamı ampisilin antibiyotiği içeren toplam 4 adet LB agar petriye yayıldı (EK2). 1 gece 37 °C'de inkübasyon sonrasında tüm petrilere koloni oluşumu takip edildi.

Yapılan transformasyonların negatif kontrolü amacıyla insert ve vektörün ligazsız ligasyonu da yapıldı. Bunun için aşağıdaki işlem uygulandı.

10X Ligasyon tamponu	1 µL
Vektör	3,75 µL
İnsert	0,35 µL
dH ₂ O	4,9 µL

Toplam 10 µL olarak hazırlanan fiziksel karışım içeriği 5'er µL olarak hem NEB 10-beta hem de C3013 hücrelerine transforme edildi.

Mutant kolonilerin stoklanması- Mutant içeren ve ekspresyon hücresi olan *E.coli* C3013 hücrelerine transforme edilen 2 saatlik ligasyon sonucu üreyen kolonilerden 155 adet koloni tek tek steril kürdan yardımı ile farklı petrilere aktarıldı ve petri üzerinde numaralandırılma yapıldı. 1 gece 37 °C'de inkübasyon ile stok (master) petrilere oluşturuldu.

Koloni PCR- Bsp383FDH plazmiti içerip içermediğinin kontrolü amacıyla öncelikle stoğu yapılan ilk 10 koloniden koloni PCR yapıldı. Sonrasında ise koloni PCR deneyinin optimizasyonu ile diğer 40 koloni ile toplamda 50 mutant koloninin koloni PCR ile taraması gerçekleştirildi.

Koloni PCR için kalıp DNA eldesi- İlk 10 koloni ayrı ayrı olarak, içerisinde 25 µL dH₂O bulunan 10 tüpe alındı ve kaynayan suda 5 dakika bekletildi. Süre sonunda tüpler buza alındı ve soğutuldu. Sonra 13.500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 20'şer µl alınıp yeni tüplere ayrılarak koloni PCR için kalıp DNA'lar hazırlandı.

I. Koloni PCR içerikleri

	Tek Tüp için	Karışım (mix) için
	Hacim: <u>10 µL</u>	<u>12X=96 µL</u>
10X Taq tamponu	1 µL	12 µL
25mM MgCl ₂	1 µL	12 µL
dNTP mix	0,8 µL	9,6 µL

Kalıp DNA	2 µL	- Her tüpe ayrı ayrı sonradan eklenir.
Taq polimeraz	0,12 µL	1,44 µL
T ₇ Promotor	1 µL	12 µL
T ₇ Terminator	1 µL	12 µL
dH ₂ O	3,08 µL	36,96 µL

Önce 10 tüpe 8'er µL karışımdan konulup sonra da DNA kalıpları eklendi. Ayrıca pozitif kontrolde DNA kalıbı olarak doğrudan plazmit kullanılarak, negatif kontrolde ise hiç vektör içermeyen kompetent C3013 hücrelerinden DNA kalıbı hazırlanarak bu bunlardan koloni PCR yapıldı. PCR işleminde uygulanan program öncelikle reaksiyon karışımının 2,5 dakika 95 °C'ye ısıtılmasıyla başlayıp sonrasında 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 1 dakikadan oluşan 35 döngü ile çoğaltım ve son olarak 72 °C'de 5 dakika son uzatma işlemi ile gerçekleştirildi.

II. Koloni PCR içerikleri

	Tek Tüp için	Karışım (mix) için
	Hacim: <u>10 µL</u>	<u>10X=80 µL</u>
Green Dream Taq Master Mix (2X)	5 µL	50 µL
Kalıp DNA	2 µL	-Her tüpe ayrı ayrı sonra eklenir.
T ₇ Promotor	1 µL	10 µL
T ₇ Terminator	1 µL	10 µL
dH ₂ O	3,08 µL	10 µL

Önce 10 tüpe 8'er µL karışımdan konuldu sonra da DNA kalıpları eklendi. Ayrıca pozitif kontrol olarak doğrudan plazmit ve ayrıca sadece plazmit içeren C3013 hücresi ile negatif kontrol olarak ise hiç vektör içermeyen kompetent C3013 hücrelerinden DNA kalıpları hazırlanarak bunlardan da koloni PCR yapıldı.

PCR işleminde uygulanan program, öncelikle reaksiyon karışımının 1 dakika boyunca 95 °C'ye ısıtılmasıyla başlayıp sonrasında 95 °C'de 30 sn., 58 °C'de 30 sn. ve 72 °C'de 2 dakikadan oluşan 30 döngü ile çoğaltım ve son olarak 72 °C'de 7 dakika son uzatma işlemi ile gerçekleştirildi. Koloni PCR işlemi sonucunda örnekler %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Koloni PCR'ın çalışması ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda ilk 50 mutant koloniye koloni PCR uygulandı ve bant veren koloni örneklerinden 50 mL'lik büyük kültür yapılarak toplam proteine göre (cell free) enzim aktivitelerine bakıldı.

2.2.4. Sekanslama Çalışmaları

Hazırlanan potansiyel mutant kolonileri 4 ayrı gruba ayrılarak sekanslama çalışmaları yapıldı. Hücre pelletlerinden plazmit izolasyonu, GET™ plasmid Miniprep plasmid isolation kiti (Biosciences) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı. Özetle, -20 °C'den alınan

hücre pelleti üzerine 250µL RNAz ilave edilmiş hücre süspansiyon tamponu eklenerek pipetleme yapıldı. Üzerine 250 µL lizis tamponu ilavesi ile karışım 3-6 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-5 dakika inkubasyon sonrasında karışım üzerine 350 µL soğutulmuş nötralizasyon tamponu eklendi ve lizatın beyaz kalın bir çökelti oluşturması sağlandı. Sonra 15 dakika 15.000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant, filtreli tüpe alınıp, 1 dakika maksimum hızda santrifügasyonu sonrası, 2 kez 500 µL yıkama tamponu ile aynı şekilde santrifügasyon ile yıkama yapıldı. Son aşamada filtrede kalan plazmit, 70 µL steril deiyonize su (pH 8.5) kullanılarak santrifüj edilip alındı. Elde edilen plazmit elüsyonlarının yarısı -20°C'de saklandı. Diğer yarısının ise dizi analizi Refgen (Ankara), MedSanTek (İstanbul) firmalarına hizmet alımı adı altında yaptırıldı. Tüm sekanslama sonuçları Ek1. 'de verilmiştir.

2.2.5. Doğal tip Bsp383FDH ve mutantlarının ekspresyonu ve saflaştırılması

Plazmit İzolasyonu-NADP-Bsp383FDH genini taşıyan plazmitin izolasyonu High pure plasmid isolation kiti (Roche) ile yapıldı. Özetle, -20 °C'den alınan hücre pelleti üzerine 250µL RNAz ilave edilmiş süspansiyon tamponu eklenerek pipetleme yapıldı. Üzerine 250 µL lizis tamponu ilavesi ile karışım 3-6 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkubasyon sonrasında karışım üzerine 350 µL bağlama (binding) tamponu eklendi ve 5 dakika buzda inkübe edildikten sonra 10 dakika 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant, filtreli tüpe alınıp, 1 dakika 13.500 rpm'de santrifügasyon sonrası, sırası ile 500 µL ve 700 µL'lik yıkama tamponları ile aynı şekilde santrifüjleme yoluyla yıkama yapıldı. Son aşamada filtrede kalan plazmit steril deiyonize su ile santrifüj edilip alındı ve elüsyon kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

Plazmitin E.coli ekspresyon hücrelerine aktarımı-Hazırlanan plazmitten (pBsp383FDH) 5 µL alınarak 50 µL hacimli E.coli BL21(DE3) suşuna transforme edildi. Transformasyonda şu yol takip edildi: Karışım 30 dakika buzda bekletildi. Sonrasında 42 °C'de 50sn bekletildi. Bu işlemten sonra tekrar 5 dakika buzda bekletildi. Bakteri suşlarının büyütülmesi için karışım üzerine 250 µL sıvı LB besiyeri eklendi ve 1 saat boyunca 37 °C, 230 rpm' e ayarlanmış çalkalamalı etüvde inkube edildi. 1 saatin sonunda inokülasyon ürünü 10µL ve 15µL olarak ampicilin (100µg/ml) antibiyotigi içeren 2 adet LB agar petriye yayıldı. 1 gece 37 °C'de inkübasyon sonrası koloni oluşumu görüldü. Plazmit ampicilin direnç geni de içerdiğinden koloni oluşumu ile plazmit transformasyonunun başarılı olduğu anlaşıldı.

Doğal tip-Bsp383FDH enziminin üretimi- Ekspresyon plazmitlerini içeren *E.coli* BL21(DE3) suşundan tek koloni alınarak, 100 µg/mL ampisilin içeren 5 mL LB besiyerine ekildi ve 1 gece 37 °C'de, 180 rpm'de çalkalamalı etüvde inkube edildi. Gecelik 5 mL'lik küçük kültür, 500 mL'lik flastaki 100 µg/mL ampisilin içeren Studier besiyerine aktarıldı. 30 °C'de 180 rpm çalkalama hızında, 16-17 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flastdaki bakteri kültürü 50 mL'lik falkon tüplerde 4 °C'de 5800 rpm'de santrifüj edildi.

Mutant-Bsp383FDH Enzimlerinin Üretimi- Ekspresyon plazmitlerini içeren *E.coli* BL21(DE3) suşundan tek koloni alınarak, 100 µg/mL ampisilin içeren 5 mL LB besiyerine ekildi ve 1 gece 37 °C'de, 180 rpm'de çalkalamalı etüvde inkube edildi. Gecelik 5 mL'lik küçük kültür, 500 mL'lik flastaki 100 µg/mL ampisilin içeren Studier besiyerine aktarıldı. 30 °C'de 180 rpm çalkalama hızında, 16-17 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda flastdaki bakteri kültürü 50 mL'lik falkon tüplere konularak 4 °C'de 5800 rpm'de santrifüj edildi.

Optimum ekspresyon zamanının belirlenmesi amacıyla Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) ve kontrol olarak laboratuvarımızda bulunan pET14b vektörü içeren *E.coli* BL21(DE3) hücreleri transformasyon sonucu agardan tek koloni seçimi yapılarak önce küçük LB besiyerine ve sonra büyük ölçekte Studier besiyerine ekildi. 37 °C' ye ayarlanmış inkübatörde büyümeye bırakılan hücrelerden 1-16 saatleri arasında her saat başı örnekleme yapıldı ve örneklerdeki bakterilerin yoğunluğu spektrofotometrik yöntemle 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Saat başı alınan örneklerin protein ekspresyonu SDS-PAGE analizi ile yapıldı.

Afinite Kromatografisi ile saflaştırma işlemleri-Elde edilen bakteri pelleti; gram pellet başına ~4 mL tampon A (20 mM tris-HCl pH 7.8, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol) çözeltisi ile çözdürüldükten sonra 100 mM fenilmetansülfonilfloritten (PMSF) 8 µL/g pellet, 10 mg/mL lizozimden 80 µL/g pellet eklenerek buz içerisinde karıştırılarak 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yine buz içerisinde 15 saniye süre ile 6 kez 45 saniye ara verilerek sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Parçalama sonucu açığa çıkan hücresel atıklar 5800 rpm'de 4°C'de 50 dakika santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Süpernatant kolona yüklenmeden önce, resin kolon rejenere edildi. Rejenerasyon işleminde nikelin uzaklaştırılması için sırasıyla 10 kolon hacmi tampon B (50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 20 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.4), 10 kolon hacmi 1.5 M NaCl çözeltisi, 10 kolon hacmi 1 M NaOH çözeltisi, 10 kolon hacmi % 30 izopropanol ve her bir basamağın arasında kolondan 10 kolon hacmi kadar distile su geçirildi. Son aşamada ise 5 kolon hacmi 0.5 M NiSO₄ çözeltisi geçirilip ardından 5 kolon hacmi distile su ile kolon yıkandı. Son olarak kolonu dengelemek için kolondan 10 kolon

hacmi dengeleyici tampon (20 mM tris-HCl, 0.5 M NaCl pH 7.8) geçirildi. Sonikasyon sonrası yapılan santrifüjden elde edilen süpernatant kolona yüklenerek akan süzüntü toplandı (kolon çıkış) ve 4 °C'de saklandı. Sonrasında kolondan sırasıyla 5 kolon hacmi kadar 30 mM, 100 mM, 200 mM, ve 2 kez 400 mM imidazol içeren tris tamponu (20 mM tris/HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.8) geçirilip ayrı ayrı fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlardan SDS-PAGE ile saf enzim içeriği belirlenen farklı (100, 200 ve 400mM) imidazol içeriği olan fraksiyonlardaki imidazol içerikleri, PD-10 kolon ile uzaklaştırıldıktan sonra konsantre edilip 1:1 oranında % 100 gliserol ilave edilerek -20 °C'de saklandı.

SDS-PAGE Analizleri-Elektroforez işleminde proteinlerin ayrılmasını sağlayacak jeli oluşturmak için kullanılacak olan 2 adet cam tabaka %70'lik etanol ve saf su ile yıkandı. Kurutulduktan sonra jel hazırlama tankına yerleştirilen camlar, jel döküldükten sonra sızıntı olmaması için iyice sıkıştırıldı, içine distile su akıtılarak kontrol edildi ve sızıntı olmadığı anlaşıncaya kurutuldu. SDS-PAGE elektroforezde kullanılan çözeltilerin hazırlanma protokolleri EK2'de verilmiştir. 15mL'lik falkon tüp içine önce 3.30 mL distile su eklendi üzerine % 30'luk akrilamid çözeltisinden 4mL, 1.5M hazırlanmış Tris tamponundan (pH8.8) 2.5 mL, %10'luk SDS'den 0,1 mL ve %10'luk amonyum persulfat çözeltisinden 0,1mL ilave edildi. Polimerleşmeyi sağladığı için 4 µl tetrametiletildiamin (TEMED) karışıma en son ilave edildi. Hazırlanan ayırma jeli pastör pipeti yardımıyla çekilerek camların kısa olanının arkasından iki camın arasına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde dolduruldu. Dökülen jelin üzerine jelin donmasını beklemeden hemen etil alkol eklenerek jelin üst kısmının düzgün olması sağlandı. Yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında ayırma jelinin polimerleşmesi için beklendi. Etil alkol ayırma jeli polimerleşince, kurutma kâğıdı yardımıyla uzaklaştırıldı. Yükleme jeli için 15 mL'lik falkon tüp içine sırasıyla 2.10 mL distile su, 0.50 mL %30'luk akrilamid, 0.38 mL 1M Tris (pH 6.80), 0.03 mL %10 SDS ve 0.03 mL %10 amonyum persulfat eklendi. 3 µL TEMED yükleme yapılmadan hemen önce ilave edildi ve karışım pipet yardımıyla ayırma jelinin üzerine akıtıldı. Üzerine iki cam arasına girecek şekilde yüklemenin yapılacağı kuyuları oluşturmak için tarak yerleştirildi. Konsantrasyonu ayırma jeline göre daha düşük olan yükleme jelinin tamamen polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Protein içeriğine bakılacak örneklerden 30 µL alınıp üzerine 6X örnek yükleme tamponundan 10µL eklendi. Eğer örnek pellet şeklindeyse pellet 30 µL yürütme tamponunda çözündürüldü. Boya içeren örnek 15 dakika 100 °C'de inkübe edildi ve sonra 10 dakika 13.500 rpm'de santrifüj edildi.

Jelin polimerizasyonun tamamlanmasının ardından jel hazırlama tankından camları ile birlikte dikkatlice alınıp yürütme tankına yerleştirildi. Yürütme tankı yürütme solüsyonu ile dolduruldu. Hamilton şırınga yardımıyla protein örneklerinden 10' ar µL çekilerek kuyulara yüklendi. Tank,

güç kaynağına bağlanarak örnekler, kuyulardan çıkana kadar 80 volt sonra ise 120 volt ile yaklaşık 2 saat elektroforez ile yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra tank içindeki tampon uzaklaştırıldı ve jel camları ile birlikte dikkatlice tanktan çıkarıldı. Camlar dikkatli bir şekilde ayrıldı ve jel temiz bir petri kabı içine alındı. Jelin üzerine, jeli kaplayacak şekilde protein boyama çözeltisi eklendi ve 5-10 dakika mikrodalga fırında ısıtıldı ve sonrasında 20-30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi. Proteinlere bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması için jel geniş bir kap içine dikkatlice alındı ve üzerine boya uzaklaştırıcı solüsyon eklendi. Mikrodalga fırında ısıtma sonrasında 20-30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletilerek boya uzaklaştırıldı.

2.2.6. Protein Miktarının Ölçümü-Bradford ve BCA Yöntemleri

Bradford Yöntemi-Protein miktar tayini Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford 1976). Bu yöntem, brilliant blue boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin, 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Yöntemde reaktif boya distile su ile 5 kat seyreltilerek kullanıldı. Standart eğri oluşturmak için BSA (bovine serum albumin) stok çözeltiden (10mg/mL) derişimi 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mg/mL olacak şekilde protein standartları hazırlanıp 96 kuyucuklu mikrolakanın kuyularına her standart ve her örnekten 10 µL ve boya solüsyonundan 200 µL eklendi. Mikrolaka karıştırıcıda dikkatlice karıştırıldı. En az 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip örnek yüklü plaka 595 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Protein konsantrasyonları, standartlar kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplandı.

BCA (Bikinkoninik Asit) Yöntemi-

Reaktif olarak bikinkoninik asit (BCA)’ in kullanıldığı bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin,biüret reaktifi (CuSO_4 , $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ve NaOH ’in karışımı) ile Cu^{+2} ’yi Cu^{+1} ’ e indirgemesi ve daha sonra Cu^{+1} ’in BCA (bikinkoninik asit) ile verdiği mor renkli kompleksin 562 nm’deki absorbansının spektrofotometrik metodla ölçümüne dayanır. Renk değişimi, BCA kiti reaktif çözeltisinin rengi olan yeşilden koyu mora doğru gerçekleşir.

2.2.7. Aktivite ve Kinetik Çalışmalar

Cell free aktivite ölçümü-50 mL’lik kültürlerden elde edilen bakteri pelletleri yaklaşık 1 gram olarak alındı. Buna göre her mutant hücre ekstratı 2 mL tampon A (20 mM tris-HCl pH 7.8, 0.5 M NaCl) çözeltisi ile çözündürüldükten sonra 100 mM fenilmetansülfonilfloritten (PMSF) 10 µL/g pellet, 10 mg/mL lizozimden 100 µL/g pellet eklenerek buz içerisinde karıştırılarak 15-20 dakika inkübasyona bırakıldı. Yine buz içerisinde 15 saniye süre ile 4 kez 45 saniye ara

verilerek sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Parçalama sonucu açığa çıkan hücresel atıklar 13.200 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Toplam proteini içeren süpernatanttaki (cell free) enzim aktivitesi, 200 mM amonyum format ve 1 mM NADP^+ içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) NADPH konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, spektrofotometrik yolla 340 nm'de ölçüldü (NADPH için $\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Gulevskaya, 2009). Reaksiyon NADP^+ ilavesiyle başlatıldı. Toplam reaksiyon hacmi 800 μL ve spesifik aktivite (U/mg); 1 dakikada, 1 mg enzimin oluşturduğu ürünün μmol cinsinden miktarı olarak tanımlandı.

Rutin Aktivite ölçümü- Enzim aktivitesi, 200 mM sodyum veya amonyum format ve 1 mM NADP^+ içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) NADPH konsantrasyonunun artışına bağlı, spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçüldü (NADPH için $\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Gulevskaya, 2009). Reaksiyon NADP^+ ilavesiyle başlatıldı. Toplam reaksiyon hacmi 800 μL ve spesifik aktivite (U/mg); 1 dakikada, 1 mg enzimin oluşturduğu ürünün μmol cinsinden miktarı olarak tanımlandı.

Kararlı-Hal Kinetiği Çalışmaları

Format oksidasyonu için kararlı-hal kinetiklerinin incelenmesi: BspFDH'ın formatı karbondioksitde yükseltgemesi, UV/vis spektrofotometri kullanılarak 96 kuyucuklu plaka formatında izlenmiştir. 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak hazırlanmış 0,5 M'lık sodyum format stok çözeltisinden dilüsyon yoluyla 8 farklı konsantrasyonda çözelti (0 - 200 mM) hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına 170'şer μL konulup, FDH stok çözeltilerinden (Bsp383 FDH) kuyucuklara 10'ar μL ilave edilip 30°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, reaksiyon 8 kanallı pipet kullanılarak taze hazırlanmış 20 μL NAD^+ veya NADP^+ solusyonunun (en az $3.5 \times K_M$ konsantrasyonu oluşturacak şekilde) eklenmesiyle başlatılmıştır. Plaka, bu işlemin ardından hemen mikropilaya okuyucuya yerleştirilip, 3 saniye karıştırılır ve zaman bazlı ölçümler yapılmıştır. Format oksidasyonu, absorpsiyon katsayısı $3,38 \text{ mM}^{-1}$ (200 μL için; NADH standartları kullanılarak hazırlanmış) alınarak hesaplanmıştır.

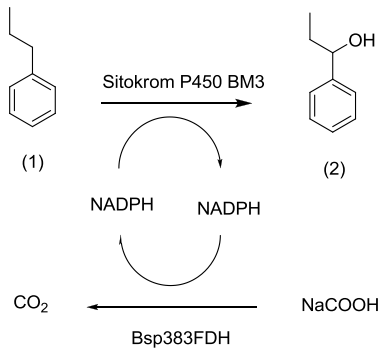
NAD^+ ve NADP^+ için kararlı-hal kinetiklerinin incelenmesi:

NAD^+ ve NADP^+ için Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesinde yukarıdaki yöntemler benzer şekilde yapılacaktır. Farklı olarak, 0-100 mM arasında değişen konsantrasyonlarda kofaktör stok çözeltilerinden, dilüsyon yoluyla sekiz çözelti hazırlanmıştır ve diğer işlemler benzer şekilde tekrarlanmıştır.

2.2.8. NADPH Rejenerasyon Reaksiyonları

NADPH rejenerasyon reaksiyonları için, sitokrom P450 BM3 ve nitroredüktaz enzimleri kullanılarak format/format dehidrojenaz sistemiyle çeşitli substrat molekülleri varlığındaki reaksiyonları incelenmiştir. Metabolitlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu kromatografik ve spektroskopik teknikler (HPLC, GC, kütle spektroskopisi) kullanılarak yapılmıştır.

Örnek 1- Propil benzenin (1) hidroksilasyonu için Bsp383FDH-Sitokrom P450 BM3 sistemi



NADPH gerikazanımı propilbenzenin hidroksilasyonu reaksiyonunda gösterilmiştir. Bu bağlamda, 0.5 mL potasyum fosfat tamponuna (100 mM, pH 7.0), sırasıyla 50 µL propilbenzen (1M, DMSO'da), 100 µL sodyum format (3M dH₂O'da), 50 µL BSA (100 mg/mL dH₂O'da) ve 15 µL NADP⁺ (10 mM) eklenmiştir. Karışım, öncelikle oda sıcaklığında birkaç dakika karıştırılmıştır ve 25 µL doğal tip (veya mutant) Bsp383FDH (17.05 mg/ml) ilave edilmiştir. 10 dakika sonra, 45 µL sitokrom P450-BM3 (2.4 mg/ml) ilave edilerek reaksiyon 1200 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı, 2 saat oda sıcaklığında sürdürülmüştür ve sonrasında 2 M HCl ilavesiyle (pH < 2-3 olacak şekilde) sonlandırılmıştır. Etil asetat ile ekstraksiyonu takiben, ürün analizi GC-MS yardımıyla yapılmıştır. Substrat ve ürüne ait piklerin alıkonma zamanı sırasıyla, 1.46 and 3.4 dakika şeklindedir.

GC-MS (CI⁺): m/z hesaplanan C₉H₁₂O [M]⁺=136.0888, C₉H₁₃O [M+H]⁺=137.0966; bulunan: 136.0726 (M)⁺, 137.0762 (M+H)⁺. GC Rt: 3.4 dk

¹H-NMR (400 MHz, kloroform-*d*): δ ppm 0.90 (t, J=7.45 Hz, 3H), 1.66-1.87 (m, 2H), 4.53 (t, J=6.57, 2.78 Hz, 1H) 7.30-7.37 (m, 4H). ¹³C-NMR (400 MHz, Kloroform-*d*): δ ppm 10.03 (C10), 31.72 (C9), 75.79 (C7), 125.90(C2,C6), 127.28 (C4), 128.22 (C3,C5), 144.51(C1).

Örnek 2.

4NSX-zole/SspNtrB reaksiyonu, kofaktör rejenerasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile reaksiyon ortamına kofaktör rejenerasyonunu sağlayacak format dehidrogenaz (Bsp383FDH) enzimi eklenmekte, böylece ortamdaki kofaktör sınırlaması kaldırılmakta, reaksiyon son basamağına kadar ilerleyebilmektedir.

Reaksiyonun ilk aşamasında, 200 mM sodyum format, 0.2 mg/ml BSA, 50 µM substrat, 25 mM pH:8,5 tris/Cl tamponunda ortamda %5 DMSO olacak şekilde, 25°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon ortamına 0,03 U/ml CmFDH enzimi, substrat miktarının onda biri kadar (5 µM) NAD⁺ ve 0,5 µM NADH eklenerek 5 dakika daha 25°C'de inkübe edilmiştir. Ssp-NtrB enziminden ortamda 0,027 mg/ml olacak şekilde eklenerek reaksiyon başlatılmış, 25oC'de 60 dk inkübe edilmiştir. 30. ve 60. dakikada alınan örnekler üzerine 1:1 oranında asetonitril eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kontrol olarak enzim haricinde bütün bileşenler eklenmiş, asetonitril eklenip reaksiyon durdurulduktan sonra enzim eklenmiştir.

2.2.9. Veri analizi ve grafiklerin oluşturulması

K_m ve V_{max} değerleri, $V=V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$ şeklindeki Michaelis-Menten denkleminde, lineer olmayan regresyonla, Origin v.7.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır ve grafikler oluşturulmuştur.

2.3.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

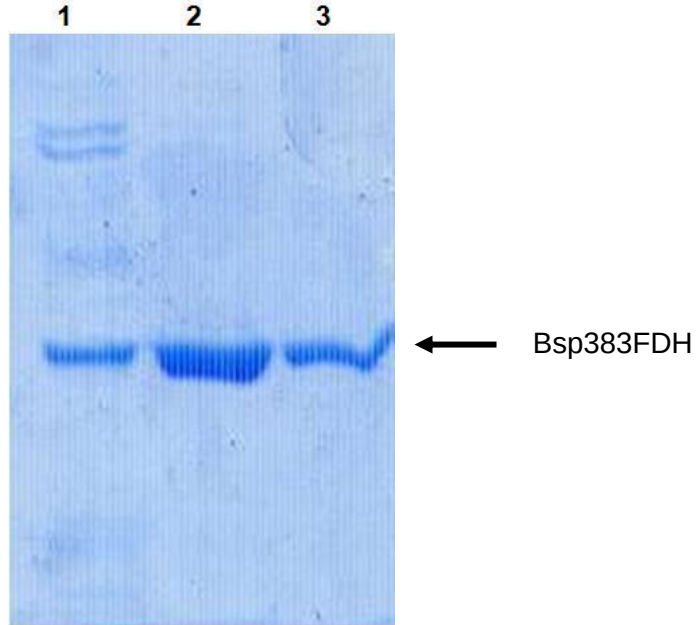
2.3.1. Bsp383FDH'in kofaktör bağlanma bölgesinde mutasyon çalışmaları

Daha önceki çalışmalarda rapor edildiği üzere (Davis ve Çelik, 2010) ve giriş kısmında da açıklandığı gibi, Bsp383FDH bilinen diğer format dehidrogenazların aksine nikotinamid kofaktörlerinden NADP^+ yi NAD^+ ye tercih etmektedir. Böyle bir özelliğin olması büyük ölçüde kofaktör bağlanma bölgesinde bulunan glutamin aminoasitinin varlığından kaynaklanmaktadır (Q223). Bu yönüyle enzim endüstriyel yönden önemlidir. Buna karşılık diğer NAD^+ -spesifik enzimler ile yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, kofaktör bağlanma bölgesinde bulunan ve büyük ölçüde korunmuş olan aspartat aminoasitinin alanin, serin veya glutamine çevrilmesinin, NAD^+ ye spesifite gösteren diğer FDH enzimlerinin kofaktör olarak NADP^+ yi kabulüne katkı sağladığı rapor edilmişti. Ancak bu katkı sınırlı kalmış ve endüstriyel anlamda kullanılabilecek NADP^+ -spesifik enzime olan ihtiyacı ortadan kaldıramamıştır. Bu çalışmanın en önemli yanlarından biri NADP^+ -spesifik bir enzimden başlanarak, kofaktör bağlanma bölgesindeki en önemli aminoasit olan glutaminin mutasyon çalışmaları yoluyla rolünün ve iyileştirilme limitlerinin belirlenmesi ve bu sayede yapı-fonksiyon ilişkisinin detaylı şekilde ortaya koyulmasıdır. Bu sayede mevcut ilişkinin niteliği anlaşılmış olup enzimin katalitik performansı için isabetli değerlendirmeler yapılabilecektir.

Bu projede Q223 pozisyonundaki glutamin aminoasiti, teorik çalışmalar eşliğinde mutasyon teknikleri kullanılarak (doygun veya yönlendirilmiş) mümkün olan tüm aminoasitler ile yer değiştirilmiştir. Oluşturulan mutant enzimlerden aktivite gösteren tüm mutantların rekombinant üretimi, saflaştırılması ve kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğal tip enzimle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar, NADP^+ , NAD^+ ve format (hem NADP^+ hemde NAD^+ ortamında) yönünden kinetik parametreleri hesaplanarak (K_M , k_{cat} ve k_{cat}/K_M) incelenmiştir. Doğal tip ve herbir mutasyona ait çalışmalar aşağıda ayrı ayrı detaylıca verilmiştir.

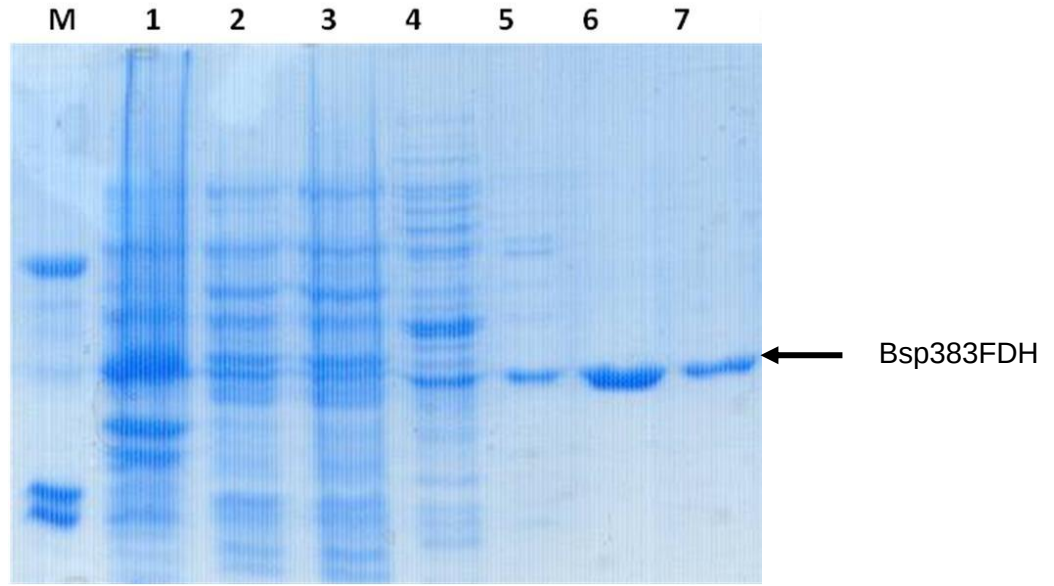
2.3.2. Doğal tip Bsp383FDH'in Üretimi, Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Bsp383FDH üretiminde proje önerisinde belirtilen IPTG ilavesi ile indüklemeye yerine, son zamanlarda özellikle rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon için ideal olarak tanımlanan Studier besiyeri kullanıldı (Studier, 1990, Studier, 2005). Studier besiyeri, yüksek yoğunluklarda hücre büyümesi için karbon kaynağı olarak belirli konsantrasyonlarda glikoz ve laktoz içermektedir. Çünkü glikoz tükendikten sonra, *lacUV5* promotor kontrolündeki indüksiyona yol açan T7 RNA polimerazı, laktoz aktive edebilmektedir (Studier, 1990, Studier, 2005). LB besiyerinde *Bsp383FDH* plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 37°C'de büyütülüp sonrasında pellet olarak toplanan hücre pastasının kolondan 100 mM, 200 mM ve 400 mM imidazol fraksiyonlarına bakıldı. Buna göre 100mM imidazol içeren fraksiyonda safsızlıklar, diğerleri ise yeterli saflıkta (>%90) olduğu görüldü (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Farklı imidazol içeren fraksiyonlardaki protein ekspresyonunun SDS-PAGE jelinde görüntüsü. **(1)** 100 mM imidazol ile gelen elusyon, **(2)** 200 mM imidazol ile gelen elusyon, **(3)** 400 mM imidazol ile gelen elusyon.

Protein ekspresyonu görünen 200 mM ve 400 mM imidazol fraksiyonları konsantre edildi ve PD-10 jel filtrasyon kolonundan geçirilip 1:1 oranında % 100 gliserol ilave edilerek, kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Özetle, tüm ekspresyon ve saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.2).



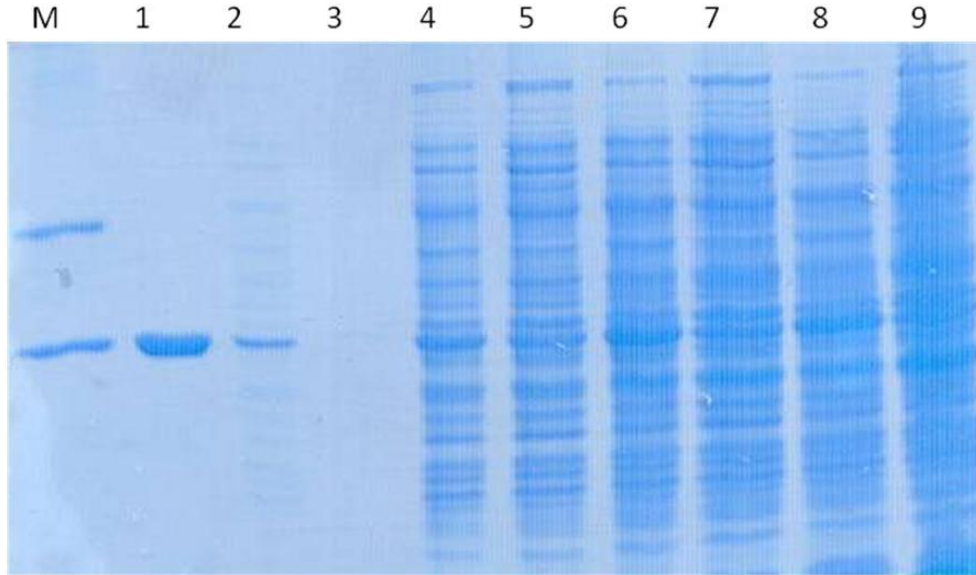
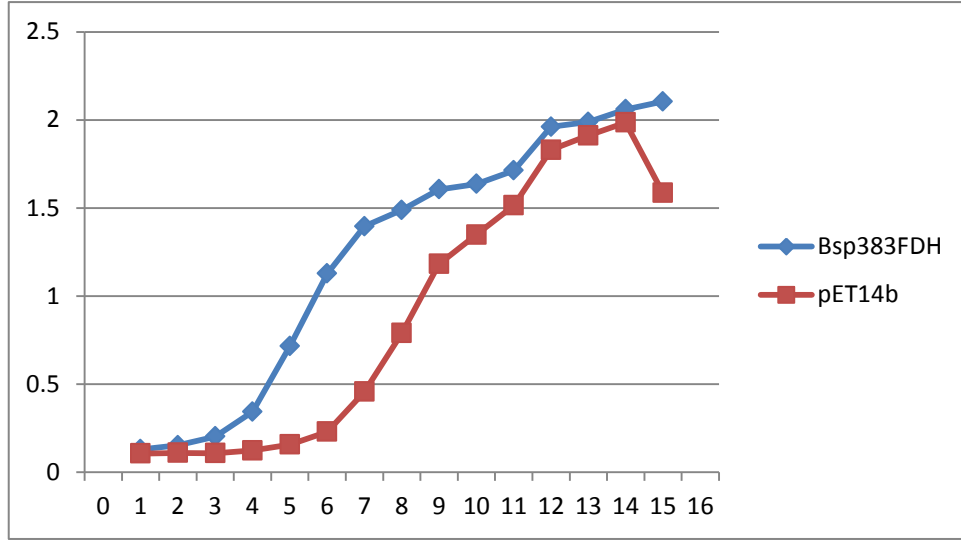
Şekil 1.2. Bsp383FDH'in afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında toplanan fraksiyonlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü. **(M)** Marker, **(1)** sonikasyon sonrası pellet, **(2)** sonikasyon sonrası süpernatant, **(3)** kolon çıkış, **(4)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(5)** 100 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon.

Protein Miktar Tayini-Protein miktar tayini Bölüm 1.2.6.'da anlatıldığı gibi yapıldı ve buna göre doğal tip enzimlerinin konsantrasyonu sırası ile 0.43-0.72 mg/mL olarak ölçüldü.

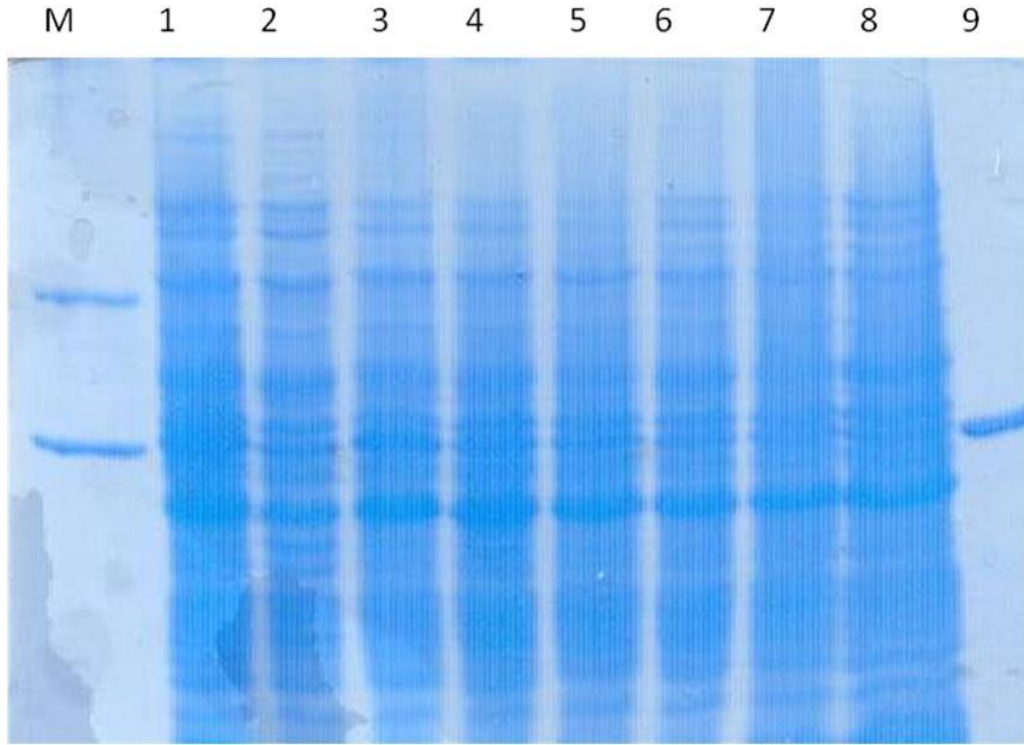
Enzimin Aktivite Tayini-Elde edilen doğal tip enzimlerin NAD ve NADP kofaktörüne göre spesifik aktivite değerleri: (U/mg) şeklinde ölçülmüştür. -

Ekspresyon için Optimum Proliferasyon Saatinin Tespiti- 1-16. saatler arasında her saat Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) ve kontrol olarak pET14b vektörü içeren *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinin büyümesi UV-vis spektrofotometre ile 600 nm optik yoğunluk ölçümü yapılarak takip edildi. SDS-PAGE analizi ile pelletlerden protein ekspresyonu takip edildi (Şekil 1.3 (A) ve (B)).

Tablo 1.2. Bsp383FDH ve pET14b *E.coli* BL21(DE3) suşlarının 1-16. saatleri arası proliferasyonu

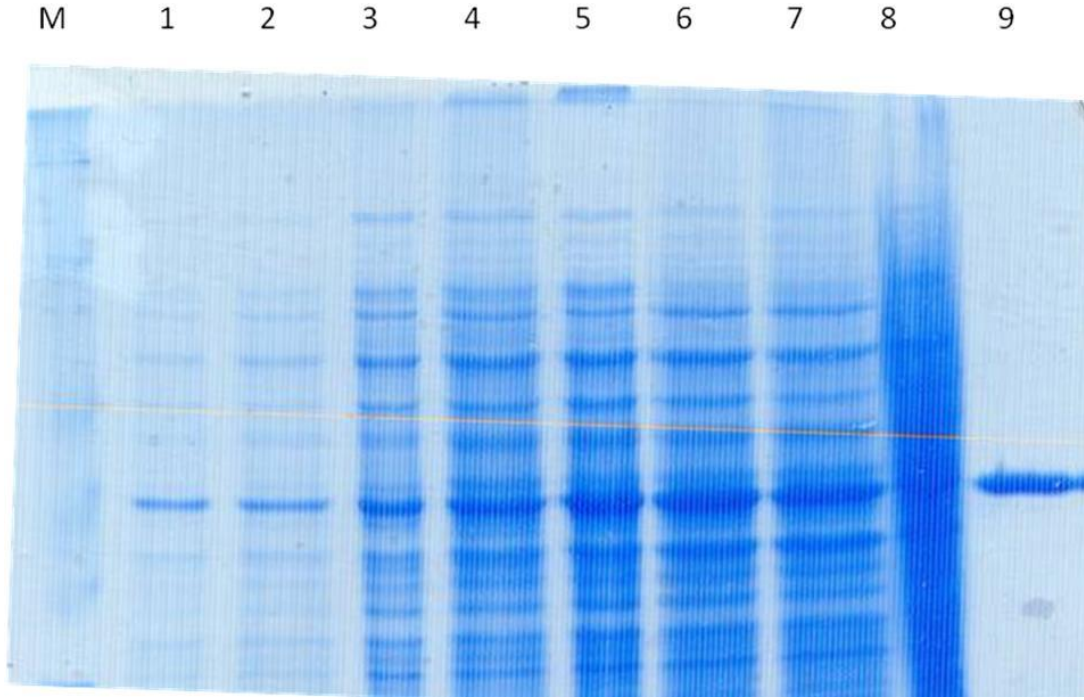


Şekil 1.3. (A) Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) ve kontrol olarak pET14b vektörü içeren *E.coli* BL21(DE3) suşlarındaki protein ekspresyonun saatlere göre karşılaştırılmalı SDS-PAGE jel görüntüsü. **(M)** Marker, **(1)** Kontrol enzim - (FDH2), **(2)** Bsp383FDH, 3. saat, **(3)** pET14b, 3. saat, **(4)** Bsp383FDH, 5. saat, **(5)** pET14b, 8. saat, **(6)** Bsp383FDH, 7. saat, **(7)** pET14b, 10. saat, **(8)** Bsp383FDH, 9. saat; **(9)** pET14b, 12. saat.



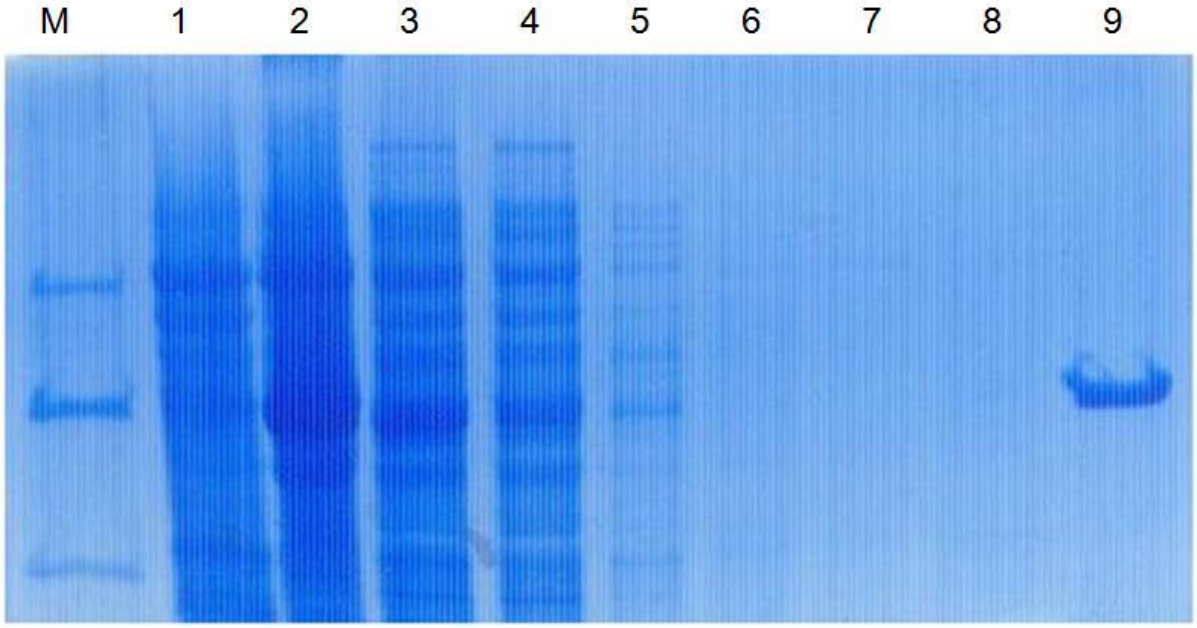
Şekil 1.3.(B) Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) ve kontrol olarak pET14b vektörü içeren *E.coli* BL21(DE3) suşlarındaki protein ekspresyonun saatlere göre karşılaştırılmalı SDS-PAGE jel görüntüsü. **(M)** Marker, **(1)** Bsp383FDH, 13. saat **(2)** pET14b, 13. saat, **(3)** Bsp383FDH, 14. saat, **(4)** pET14b, 14. saat, **(5)** Bsp383FDH, 15. saat, **(6)** pET14b, 15. saat, **(7)** Bsp383FDH, 16. saat, **(8)** pET14b, 16. saat, **(9)** Kontrol enzim - (FDH2)

Saatlere göre hücrelerin protein ekspresyonuna bakıldığında ilk saatler ile son saatler arasında hücre proliferasyonunda önemli bir fark görülmedi. Bu nedenle Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinin ilk saatlerinin protein ekspresyonunun görülmesi için bu hücrelerin ilk saatlerinin SDS-PAGE analizi yapıldı (Şekil 1.4)



Şekil 1.4. Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) hücrelerde ilk saatlerdeki protein ekspresyonunun SDS-PAGE jel görüntüsü. **(M)** Marker, **(1)** Bsp383FDH, 3. saat, **(2)** Bsp383FDH, 4. saat, **(3)** Bsp383FDH, 5. saat, **(4)** Bsp383FDH, 6. saat, **(5)** Bsp383FDH, 7. saat, **(6)** Bsp383FDH, 8. saat, **(7)** Bsp383FDH, 10. saat, **(8)** Bsp383FDH, 13. saat, **(9)** Kontrol enzim - (FDH2)

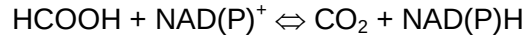
Bsp383FDH içeren *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinin 7. saatinde protein ekspresyonunun görülmesi nedeniyle bölüm 1.2' deki işlemler bu sefer hücreler 7 saat inkübe edilerek tekrarlandı ve yine 4.4 g yaş ağırlığında pellet elde edildi. Elde edilen pellet bölüm 1.2'de anlatıldığı gibi hücre pastası haline getirildi ve kolondan geçirildi ancak bu sefer tris tamponunun imidazol içerikleri 5 kolon hacmi kadar 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, ve 2 kez 400 mM olarak ayarlandı ve fraksiyonlar ayrı ayrı toplandı. Toplanan fraksiyonlardan her iki 400mM imidazol içeren fraksiyonlardaki imidazol içerikleri, PD-10 kolon ile uzaklaştırıldıktan sonra konsantre edildi (**FDH4 ve FDH5**) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. 7 saatlik inkübasyon sonrası Bsp383FDH'ın afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında toplanan fraksiyonlara ait SDS-PAGE jel görüntüsü. **(M)** Marker, **(1)** pellet, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** , sonikasyon sonrası süpernatant, **(4)** kolon çıkış, **(5)** 10 mM imidazol ile gelen elusyon, **(6)** 15 mM imidazol ile gelen elusyon, **(7)** 20 mM imidazol ile gelen elusyon, **(8)** 25mM imidazol ile gelen elusyon, **(9)** Kontrol enzim - (FDH2)

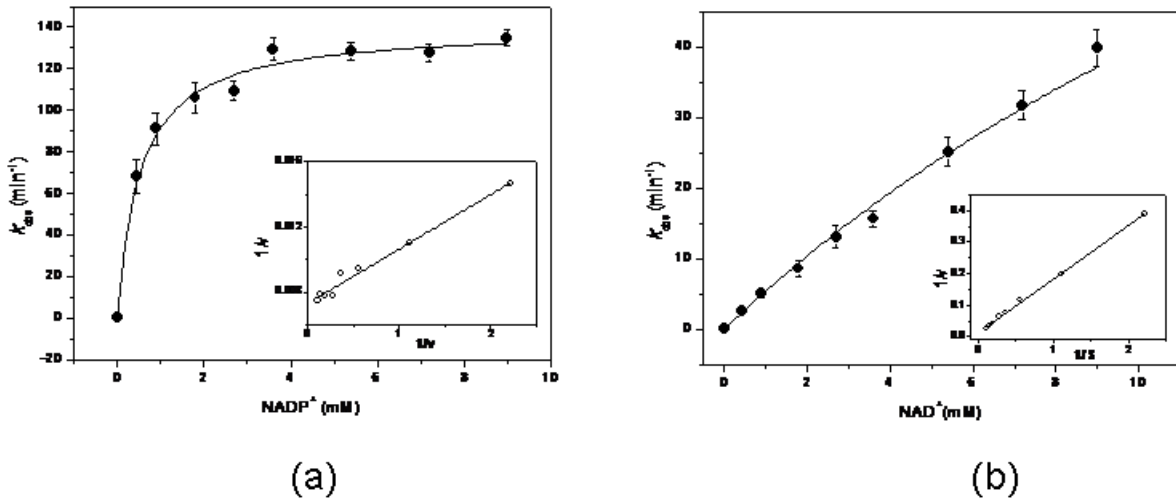
2.3.3. Doğal tip Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

Giriş bölümünde bahsedildiği üzere, format dehidrogenaz enzimleri, format'ın karbondioksit oksidasyonunu katalizlerken ilişkili olduğu nikotinamid kofaktörünü, indirgemektedirler. Bu reaksiyonun denklemi aşağıda verilmiştir.



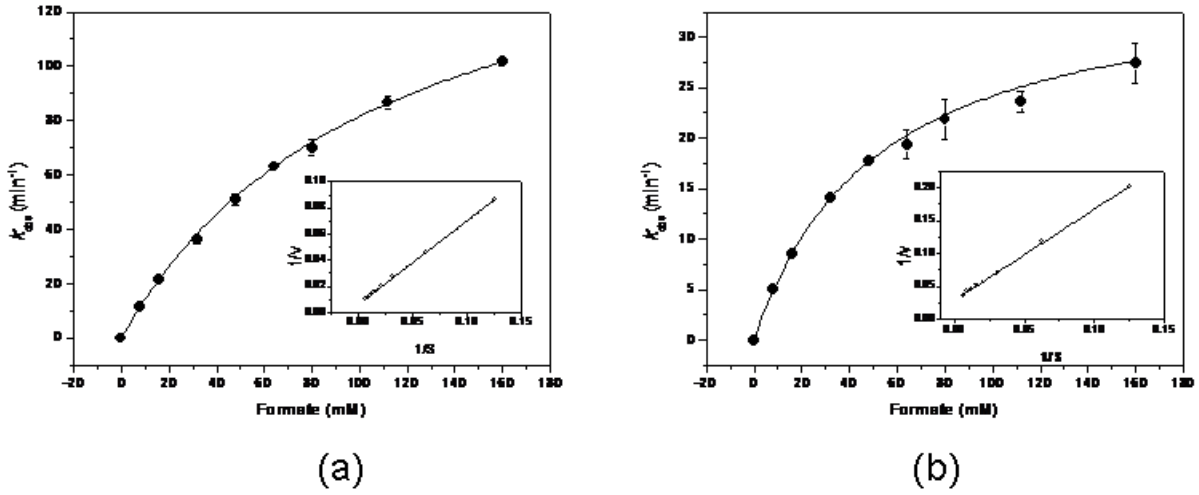
Doğal tip Bsp383FDH enzimi kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonlarının eğrileri tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denklemine uygun davranış sergilemiştir.

NAD⁺ ve NADP⁺'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD⁺ için hem de NADP⁺ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.1. de özetlenmiştir.



Şekil 1.6. Doğal tip Bsp383FDH enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ve (b) NAD⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

Benzer şekilde, NAD⁺ ve/veya NADP⁺'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.7 (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.7. Doğal tip Bsp383FDH enzimin katalizlediği **(a)** NADP⁺ ortamında ve **(b)** NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺'nin konsantrasyonları sırasıyla 6.0 ve 6.0 mM dır.

Michaelis-Menten kinetik sabitleri (K_M ve k_{cat}) aynı şekilde hesaplanmış ve Tablo 1.3. de özetlenmiştir.

Tablo 1.3. Doğal tip Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrate	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	139.85±2.54	0.49 ± 0.06	285.40
NAD ⁺	81.88 ±12.13	13.32 ± 2.89	6.14
Formate ¹	177.90 ±4.58	119.66 ± 5.46	1.48
Formate ²	35.00 ±0.95	48.99 ± 3.34	0.71

1 with NADP⁺ (6 mM)

2 with NAD⁺ (6 mM)

Buna göre, doğal tip Bsp383FDH enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Gln(Q) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyleki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (27:1) şeklinde olup, bu değer açıkça doğal tip Bsp383FDH enziminin kofaktör tercihinin NADP⁺ yönünde olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki

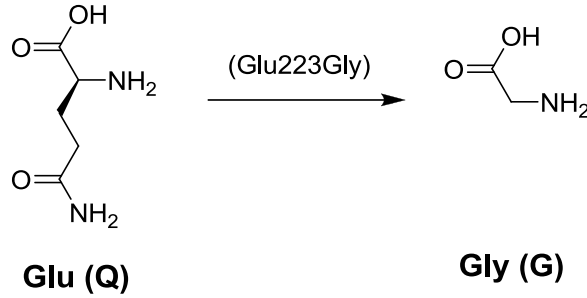
değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP^+} / (k_{cat}/K_M)^{NAD}$ karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ açısından katalitik etkisinin 46.5 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz, format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyonda bulunan Gln(Q) amino asitinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. $NADP^+$ 'nin doygun konsantrasyonda (yaklaşık $3.5 \times K_M$) kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 119.6 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 48.9 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Doğal tip enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

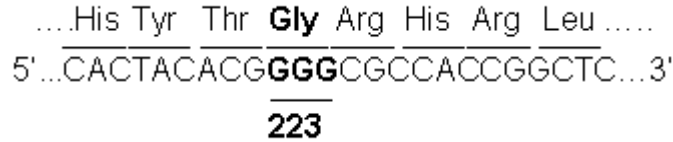
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format} / (k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD^+ ve $NADP^+$ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ 'li ortamda katalitik etkisinin 2.1 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.4. Q223G Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

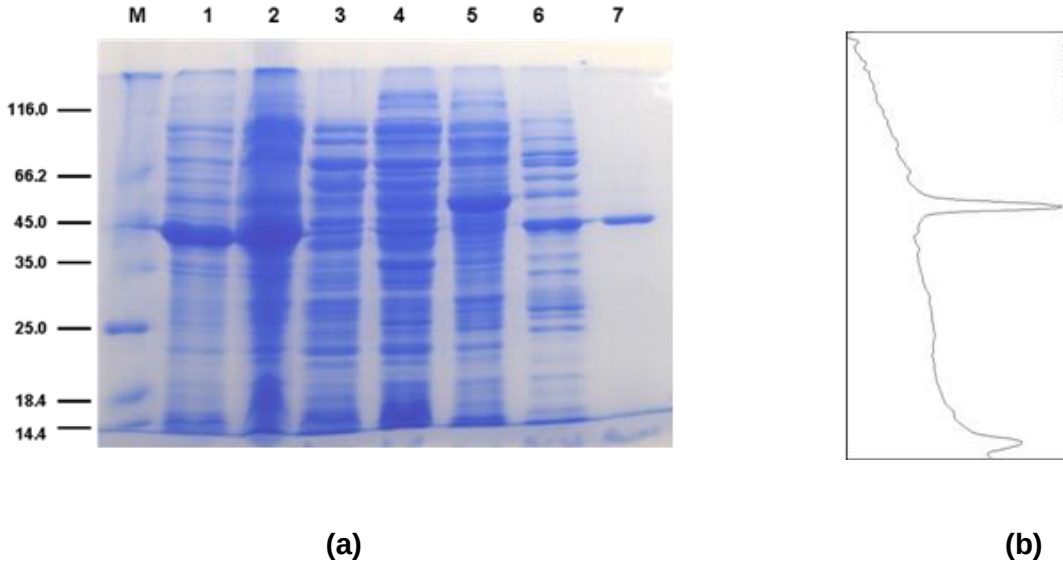
Bu çalışmada doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti glisin amino asiti ile değiştirilmiştir. Glisin amino asitlerin en küçüğü olup, ilgili bölgede büyük bir boşluk oluşturacağı düşünülmektedir.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **GGG (Gly)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti polar olmayan ve hidrojen bağı yapamayan **Gly** amino asidine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223G Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223G* genini kodlayan plazmiti taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapıldı. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.8). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile yeterli saflıkta **Q223G Bsp383FDH** (>%90) elde edilmiştir. Bu sayede kinetik çalışmalar için uygun saflıkta enzim eldesi mümkün olmuştur.

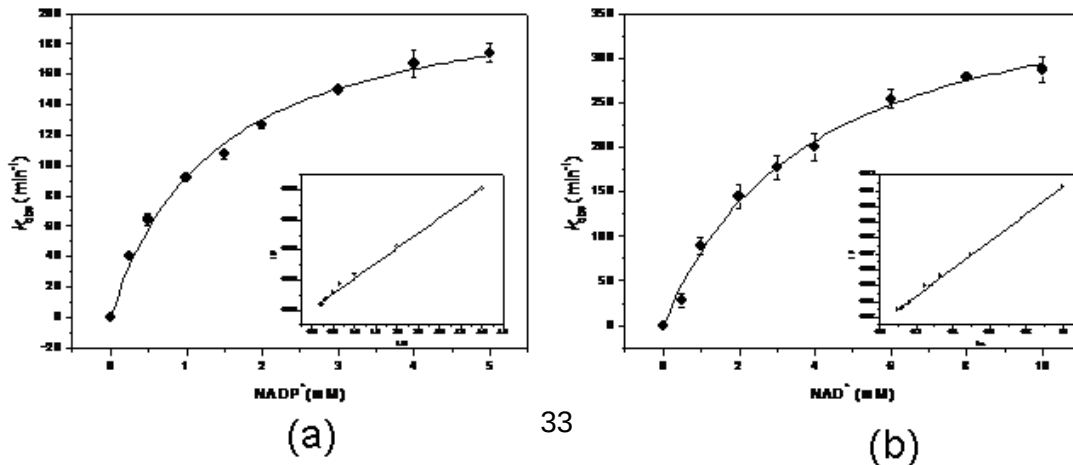


Şekil 1.8. (a) Q223G-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(M)** Marker, **(1)** sonikasyon sonrası pellet, **(2)** sonikasyon sonrası süpernatant, **(3)** kolon çıkış, **(4)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(5)** 100 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonun piksel analizi.

2.3.5. Q223G- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

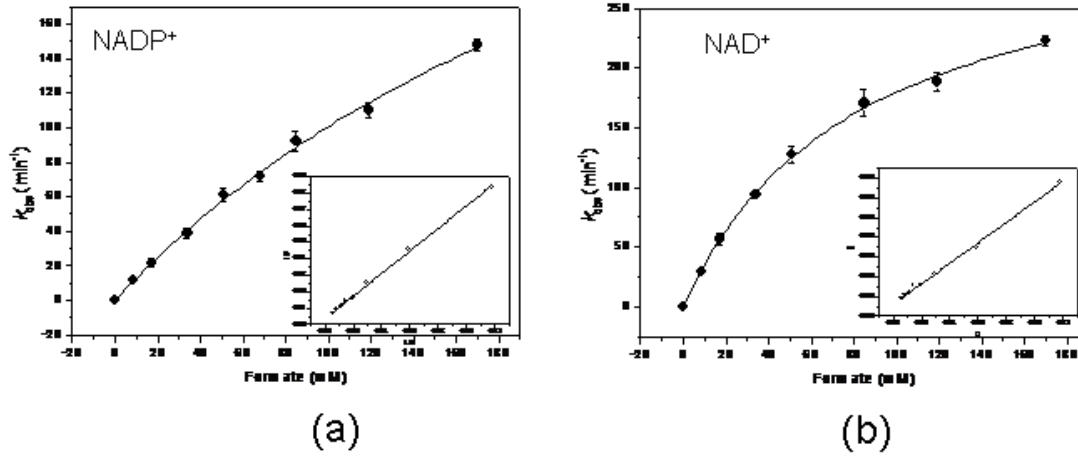
Q223G-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.

NAD⁺ ve NADP⁺'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD⁺ için hem de NADP⁺ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.2. de özetlenmiştir.



Şekil 1.9. Q223G-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) kullanılmıştır.

Benzer şekilde, Q223G-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.10. (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.10. Q223G Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ortamında ve (b) NAD^+ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP^+ ve NAD^+ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 4.0 ve 6.0 mM dır.

Tablo 1.4. Q223G Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrat	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
NADP^+	219.82 ± 7.97	1.38 ± 0.14	159.29
NAD^+	408.75 ± 21.93	3.90 ± 0.49	104.81
Formate ¹	421.17 ± 45.45	319.30 ± 46.72	1.32
Formate ²	327.24 ± 10.26	82.11 ± 5.47	3.99

$^1\text{NADP}^+$ ve $^2\text{NAD}^+$ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 4.0 ve 6.0 mM dır.

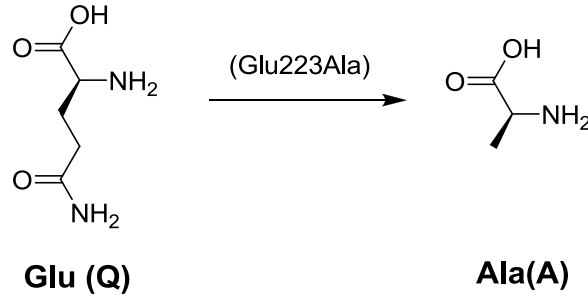
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223G-Bsp383FDH mutant enzimin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Gly(G) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslanma yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{\text{NAD}^+}/K_M^{\text{NADP}^+}$ yaklaşık olarak (3:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q223G-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin bir miktar NADP^+ yönünde olduğu, ancak NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirmenin olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NADP}^+} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NAD}^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP^+ açısından katalitik etkisinin sadece 1.5 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyonundaki Gln(Q)→Gly (G) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP^+ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 319.30 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 82.11 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223G-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}}$ NAD^+ ve NADP^+ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

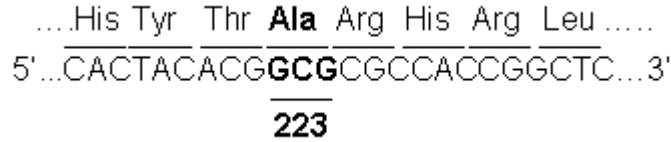
2.3.6. Q223A Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması

Bu çalışmada doğal tip Bsp383FDH enziminin 223. pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti alanin amino asitine dönüştürülmüştür. Alanin, aminoasitlerin glisinden sonraki en küçüğü olup, ilgili bölgede boşluk oluşturacağı düşünülmektedir.

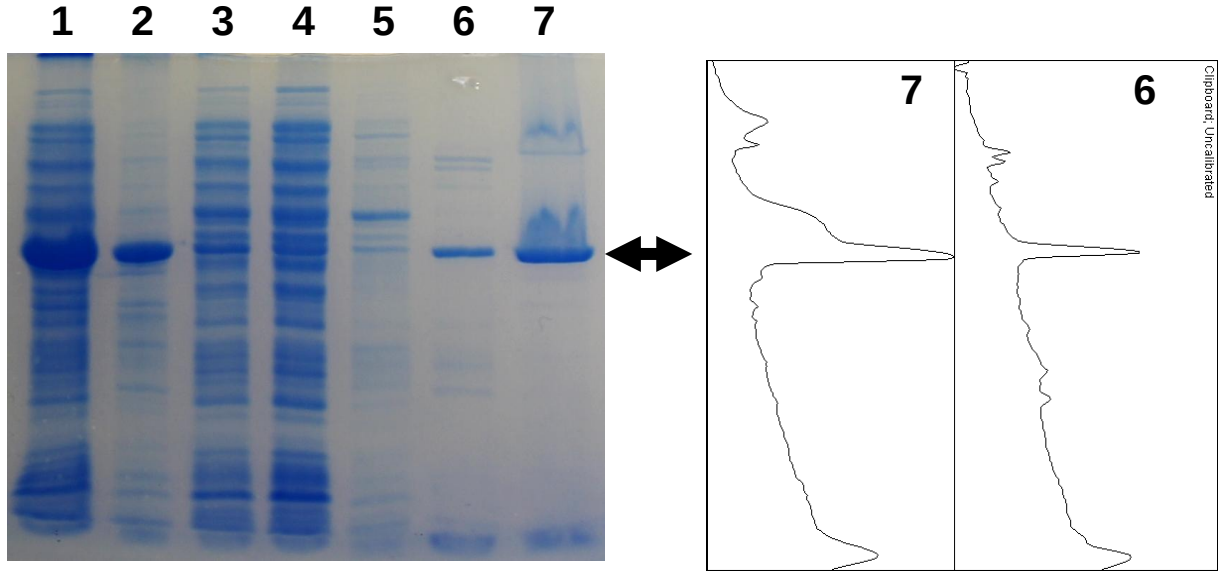


Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **GCG (Ala)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** aminoasiti küçük alifatik yan zinciri olan ve hidrofobik olan **Ala** amino asitine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.

Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223A Bsp383FDH**'in ekspresyonu rekombinant *E.coli*



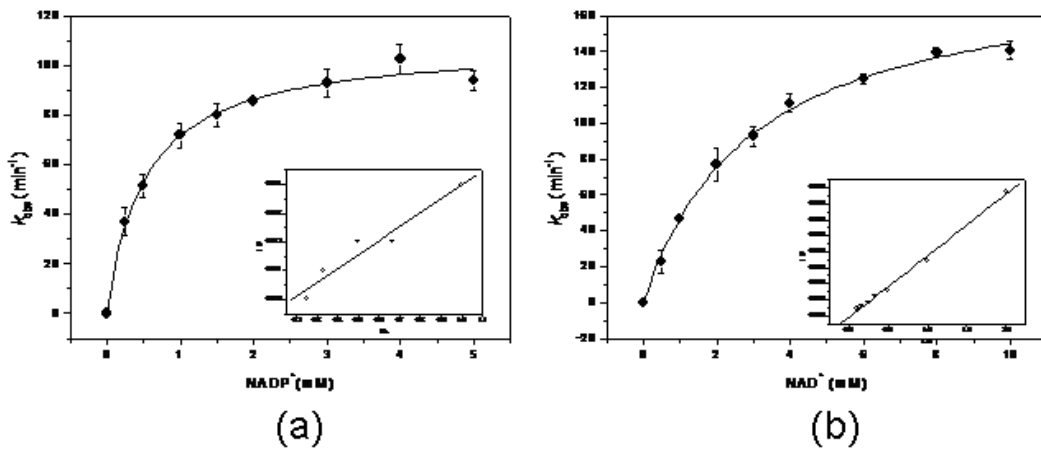
suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223A* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.11). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile yeterli saflıkta **Q223A Bsp383FDH** (>%90) elde edilmiştir. Bu sayede kinetik çalışmalar için uygun saflıkta enzim eldesi mümkün olmuştur.



Şekil 1.11. (a) Q223A-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant **(4)** kolon çıkış, **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (6,7) piksel analizi.

2.3.7. Q223A- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

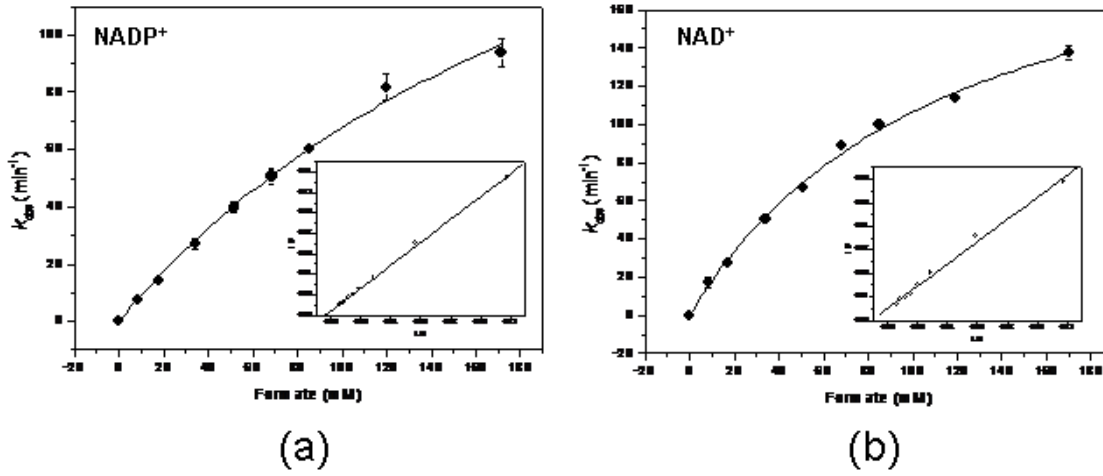
Q223A-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.12. Q223A-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği **(a)** NADP^+ ve **(b)** NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.3 ile özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223A-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.13. (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.13. Q223A-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği **(a)** NADP^+ ortamında ve **(b)** NAD^+ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP^+ ve NAD^+ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 5.0 ve 10.0 mM dır.

Tablo 1.5. Q223A Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrate	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
NADP ⁺	108.82±3.00	0.52±0.06	209.25
NAD ⁺	187.16±5.60	2.96±0.23	63.23
Formate ¹	241.13±27.21	256.64±41.52	0.94
Formate ²	233.79±13.07	119.74±12.10	1.95

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 5.0 ve 10.0 mM dır.

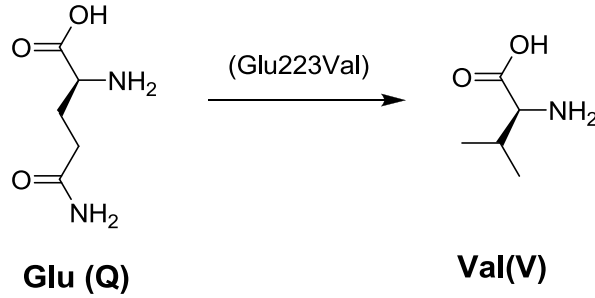
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223A-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Ala(A) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslanma yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{\text{NAD}^+}/K_M^{\text{NADP}^+}$ yaklaşık olarak (6:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q223A-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin NADP⁺ yönünde olduğu, ancak NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirmenin (yaklaşık 5 kat) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{\text{NADP}^+} / (k_{cat}/K_M)^{\text{NAD}^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP⁺ açısından katalitik etkisinin yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223. pozisyondaki Gln(Q)→Ala (A) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP⁺ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 256.64 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD⁺ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 119.74 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223A-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD⁺ yönünde olduğu ve NAD⁺ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

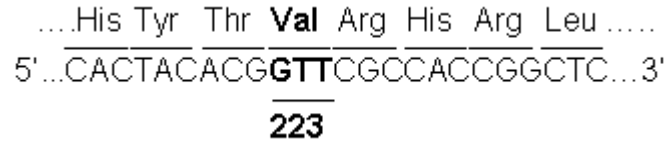
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{\text{format}} / (k_{cat}/K_M)^{\text{format}}$ NAD⁺ ve NADP⁺ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD⁺ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.8. Q223V Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

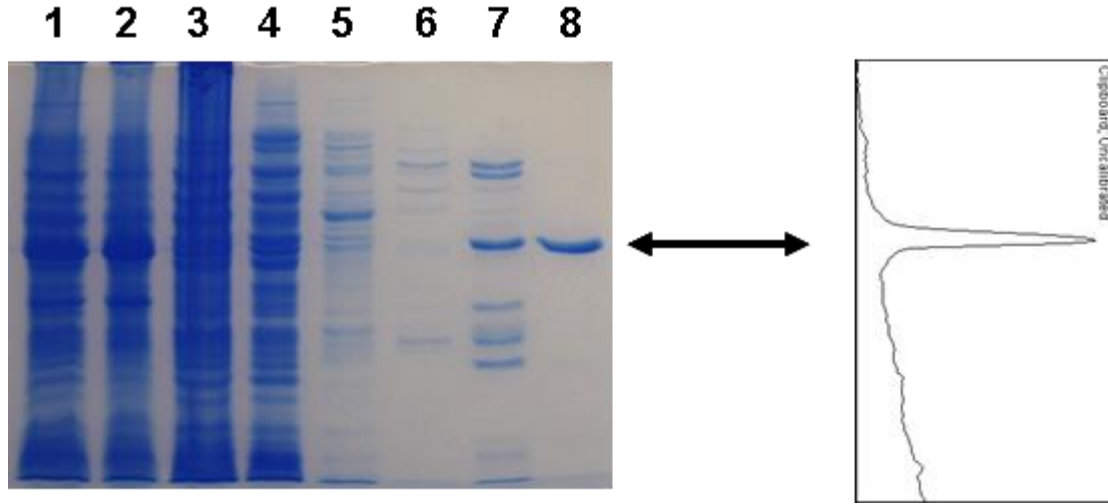
Bu çalışmada doğal tip Bsp383FDH enziminin 223. pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti valin amino asitine dönüştürülmüştür.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **GTT (Val)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri olan ve hidrofobik olan **Val** amino asitine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



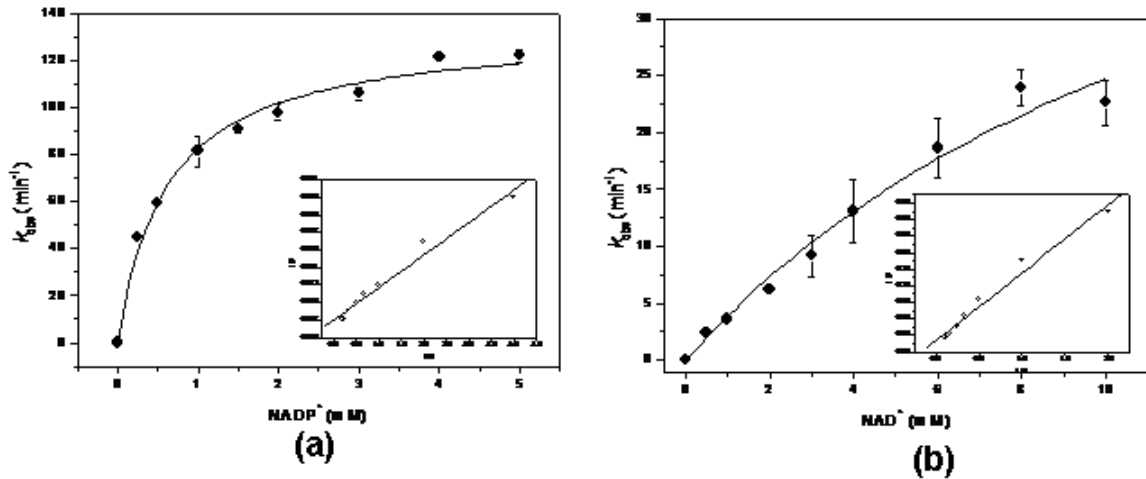
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223V Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223V* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.14). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile yeterli saflıkta **Q223V-Bsp383FDH** (>%90) elde edilmiştir. Bu sayede kinetik çalışmalar için uygun saflıkta enzim eldesi mümkün olmuştur.



Şekil 1.14. (a) Q223V-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant **(4)** kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 100 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(8)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon. (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (8) piksel analizi.

2.3.9. Q223V- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

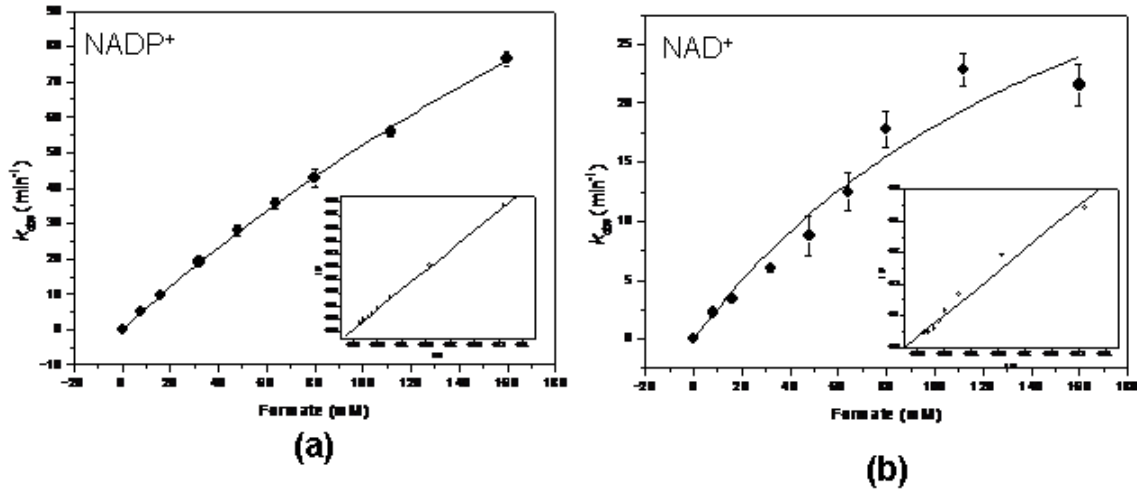
Q223V-Bsp383FDH mutant enzimi kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.15. Q223V-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.4. özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223V-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanımı ile yapılan çalışmalara ait eğriler Şekil 1.16. (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.16. Q223V-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ortamında ve (b) NAD^+ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP^+ ve NAD^+ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 5.0 ve 10.0 mM'dir.

Tablo 1.6. Q223V Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri

Substrat	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
NADP^+	133.08 ± 4.39	0.62 ± 0.08	214.64
NAD^+	61.42 ± 16.62	14.85 ± 5.89	4.13
Formate ¹	312.66 ± 27.79	499.57 ± 54.42	0.62
Formate ²	52.70 ± 19.36	191.73 ± 107.32	0.27

$^1\text{NADP}^+$ ve $^2\text{NAD}^+$ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 5.0 ve 10.0 mM dir.

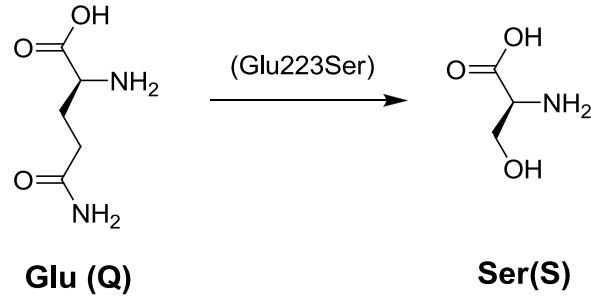
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223V-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223. pozisyonda bulunan Val(V) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{\text{NAD}^+}/K_M^{\text{NADP}^+}$ yaklaşık olarak (24:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q223V-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin NADP^+ yönünde olduğu, ancak NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirmenin (yaklaşık 20 kat) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NADP}^+} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NAD}^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP^+ açısından katalitik etkisinin yaklaşık 52 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223. pozisyondaki Gln(Q)→Val (V) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP^+ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 500 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 191 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223V-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

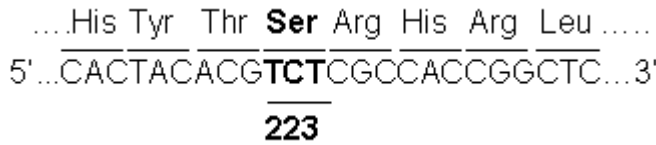
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}}$ NAD^+ ve NADP^+ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NADP^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.10. Q223S Bsp383FDH'in üretimi ve saflaştırılması

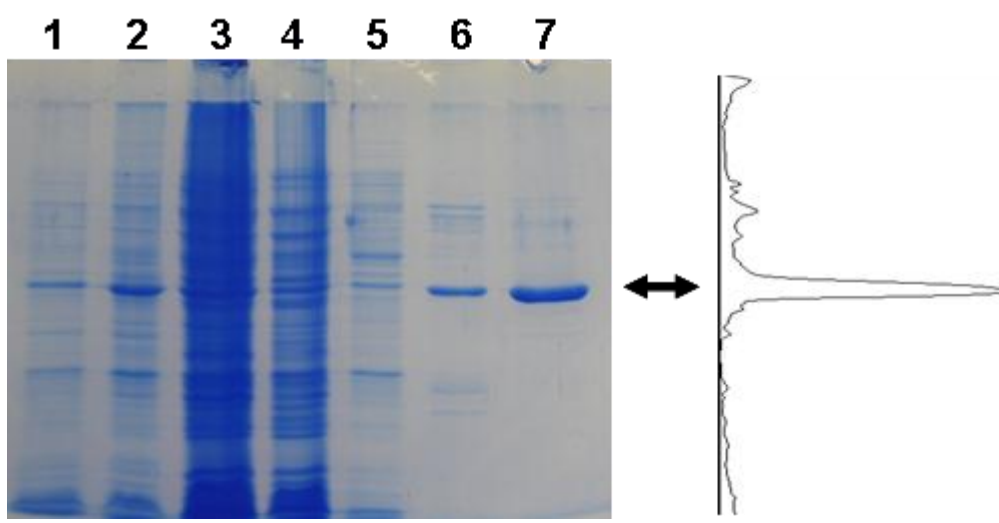
Bu çalışmada doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti serin amino asitine dönüştürülmüştür. Serin amino asiti hidrofilik yan grubuna sahiptir ve genellikle enzimlerin aktif bölgesinde sıklıkla bulunur.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **TCT (Val)**' ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve hidrofilik karekterdeki **Ser** amino asitine doygun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



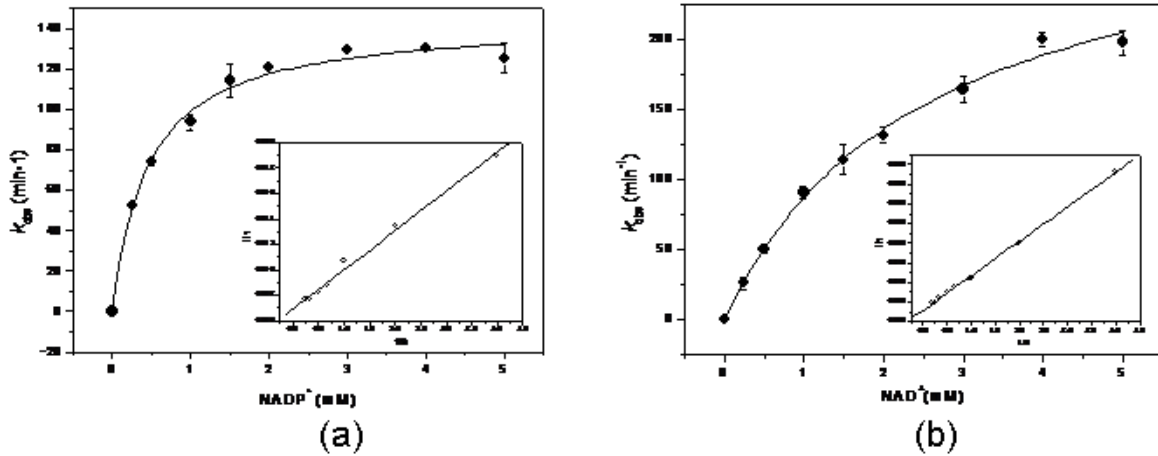
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223S Bsp383FDH'in** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223S* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütölüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.17). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile yeterli saflıkta **Q223S-Bsp383FDH** (>%90) elde edilmiştir. Bu sayede kinetik çalışmalar için uygun saflıkta enzim eldesi mümkün olmuştur.



Şekil 1.17. (a) Q223S-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant **(4)** kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların (8) piksel analizi.

2.3.11. Q223S- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

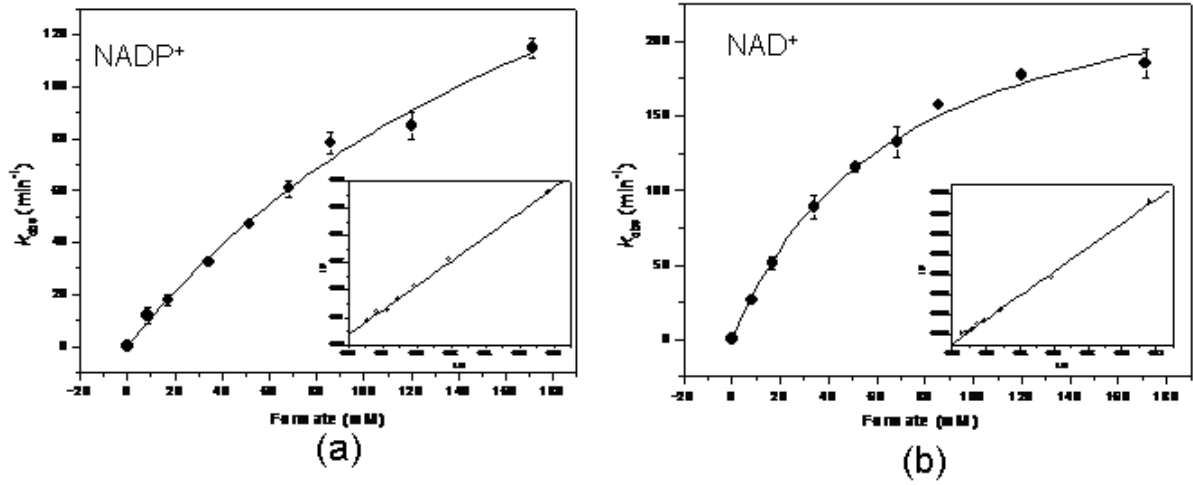
Q223S-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denklemine uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.18. Q223S-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği **(a)** NADP⁺ ve **(b)** NAD⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD⁺ ve NADP⁺'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD⁺ için hem de NADP⁺ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.5. özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223S-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD⁺ ve/veya NADP⁺'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.19. (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.19. Q223S-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ortamında ve (b) NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 3.0 ve 4.0 mM dir.

Tablo 1.7. Q223S Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri

Substrat	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	144.17±3.86	0.45±0.05	320.37
NAD ⁺	309.07±17.66	2.54±0.31	121.68
Formate ¹	256.54±36.42	231.39±46.78	1.10
Formate ²	256.98±12.89	68.55±7.70	3.74

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 3.0 ve 4.0 mM dir.

Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223S-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223. pozisyonda

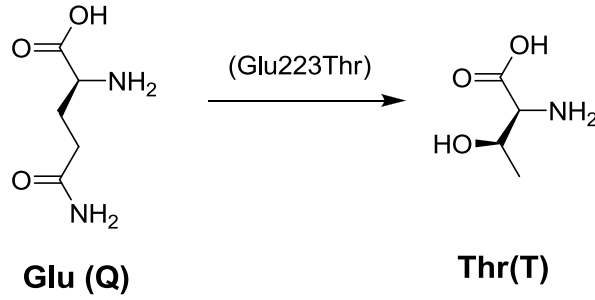
bulunan Ser(S) aminoasitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (6:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q233S-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin $NADP^+$ yönünde olduğu, ancak NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirmenin (yaklaşık 5 kat) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP} / (k_{cat}/K_M)^{NAD}$ karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ açısından katalitik etkisinin sadece 2.6 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyondaki Gln(Q)→Ser (S) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. $NADP^+$ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 231.39 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 68.55 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223S-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

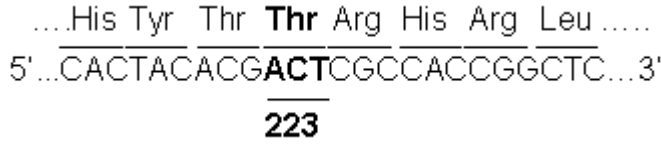
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format} / (k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD^+ ve $NADP^+$ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 3.4 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.12. Q223T Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

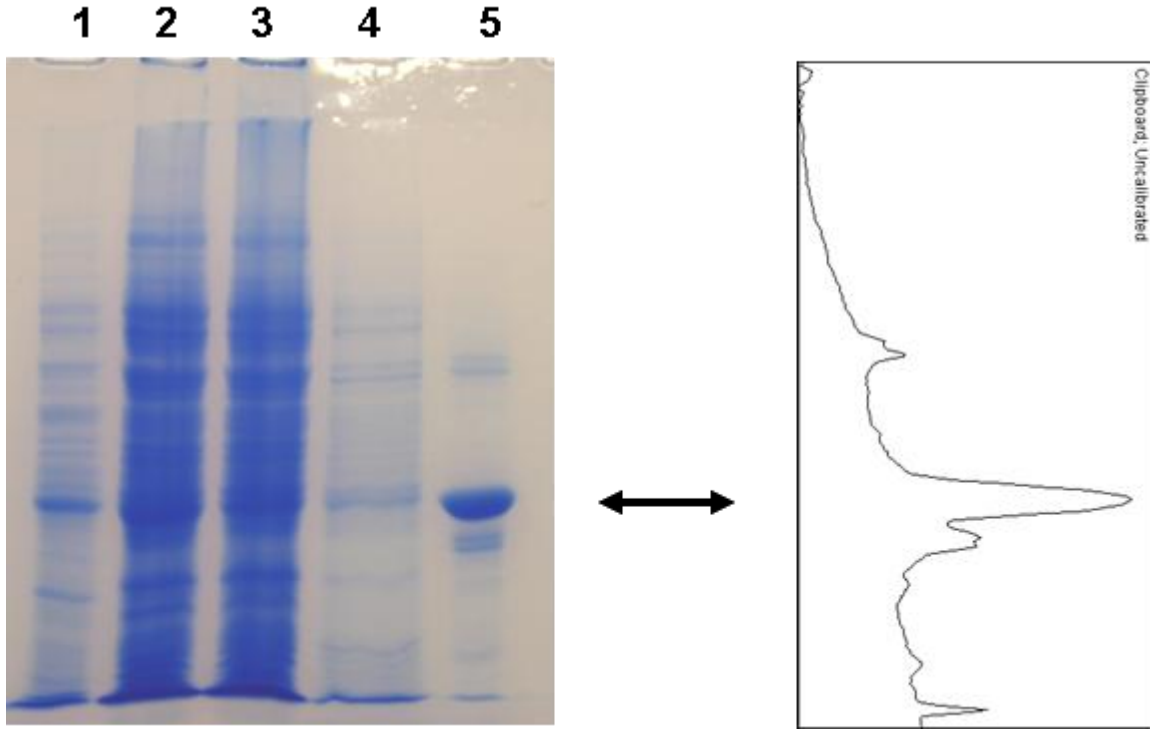
Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223. pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti treonin aminoasitine dönüştürülmüştür. Treonin amino asiti hidrofilik yan grubuna sahiptir ve az da olsa polar özelliktedir.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **ACT (Thr)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve bir miktar polar karakterdeki **Thr** amino asitine doygun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



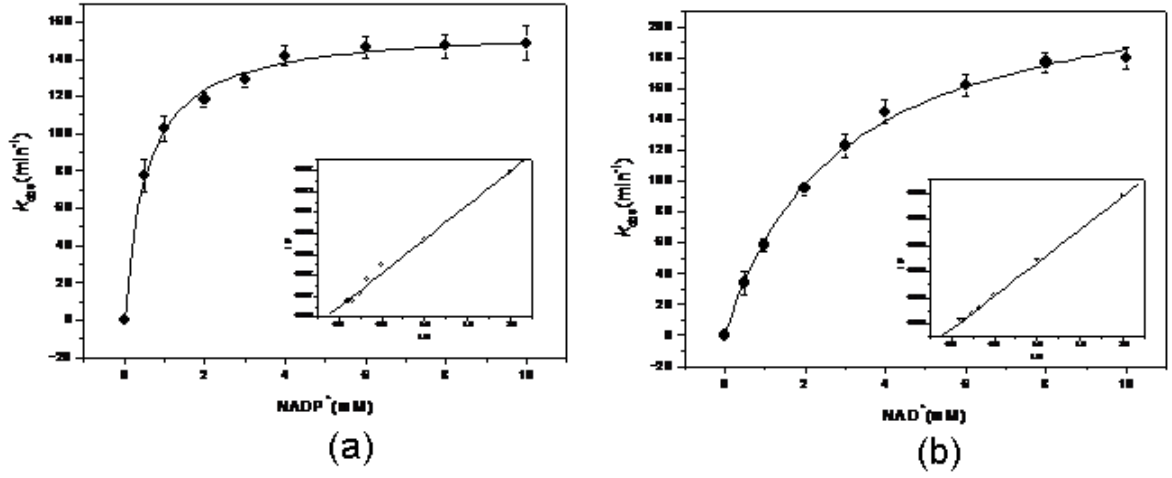
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223T-Bsp383FDH**'ın ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223T* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.20). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için uygun saflıkta **Q223T-Bsp383FDH** (>%85) elde edilmiştir.



Şekil 1.20. (a) Q223T-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant **(4)** kolon çıkışı **(5)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.13. Q223T- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

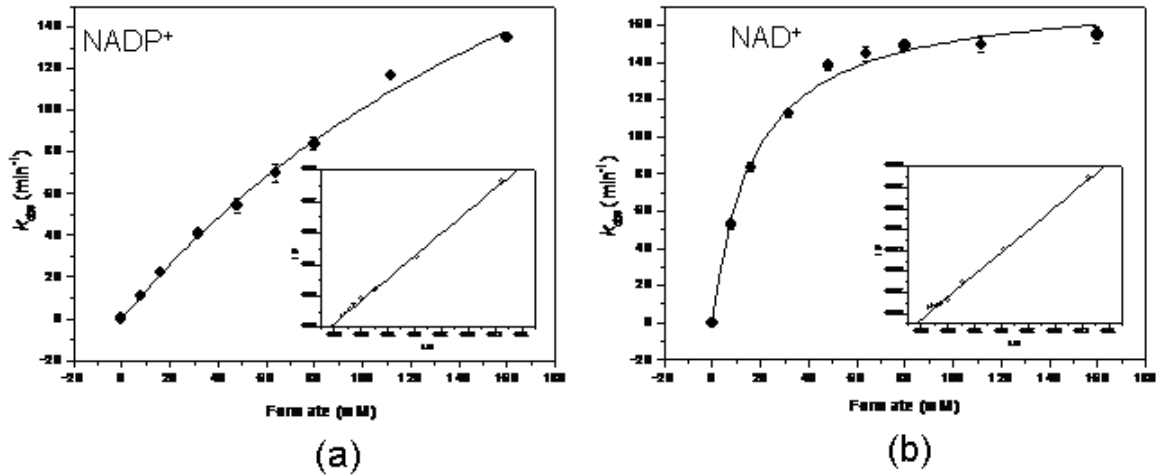
Q223T-Bsp383FDH mutant enzimi kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.21. Q223T-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ve (b) NAD⁺ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD⁺ ve NADP⁺'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD⁺ için hem de NADP⁺ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.6. da özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223T-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD⁺ ve/veya NADP⁺'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil1.22 (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.22. Q223T-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ortamında ve (b) NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 6.0 ve 6.0 mM dır.

Tablo 1.8. Q223T Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrate	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	156.76 ± 2.16	0.54 ± 0.04	290.30
NAD ⁺	237.88 ± 6.34	2.85 ± 0.20	83.47
Formate ¹	358.98 ± 47.54	256.18 ± 47.81	1.40
Formate ²	177.08 ± 4.63	17.20 ± 1.77	10.30

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 6.0 ve 6.0 mM dır.

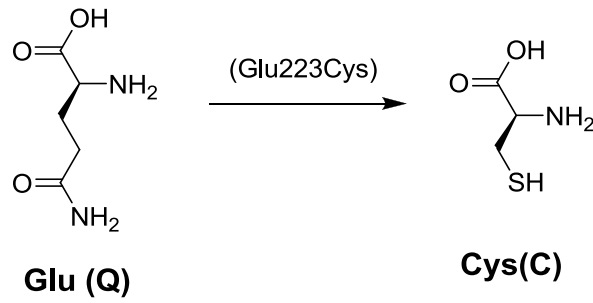
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223T-Bsp383FDH mutant enzimin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Thr(T) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (5:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q223T-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin NADP⁺ yönünde olduğu, ancak NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirmenin (yaklaşık 4.7 kat) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP^+} / (k_{cat}/K_M)^{NAD^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP⁺ açısından katalitik etkisinin sadece 3.5 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyondaki Gln(Q)→Thr (T) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP⁺ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 358.98 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD⁺ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 177.08 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223T-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD⁺ yönünde olduğu ve NAD⁺ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format}$ / $(k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD^+ ve $NADP^+$ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 7.35 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

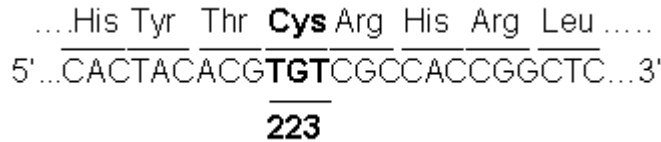
2.3.14. Q223C- Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti sistein aminoasitine dönüştürülmüştür. Sistein amino asiti kükürt içeren yan grubuna sahiptir ve kolayca oksitlenebilen özelliğindedir.

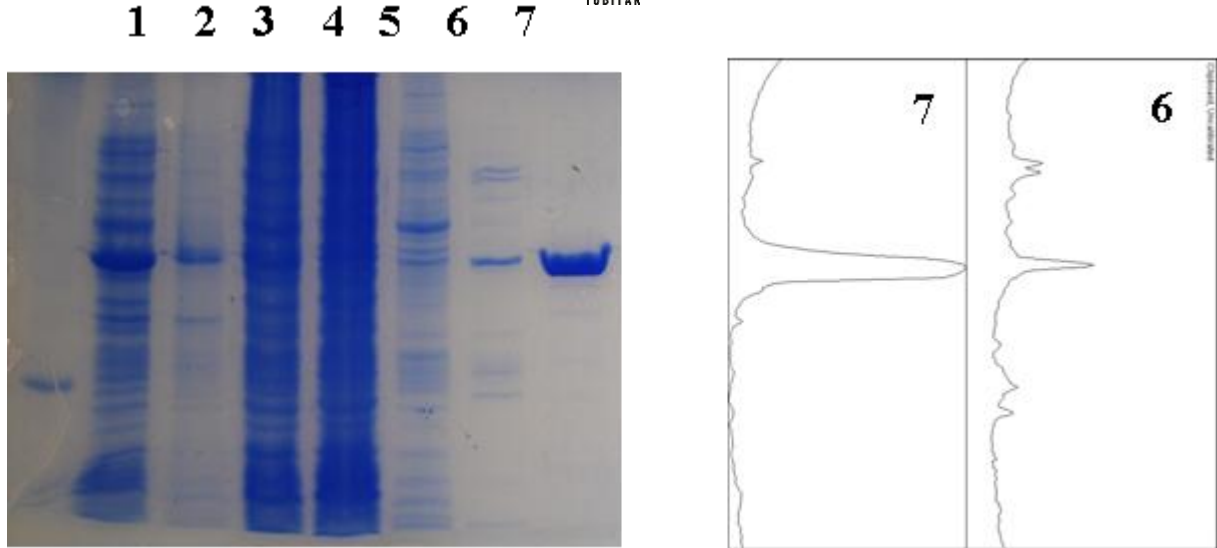


Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **TGT (Cys)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve kükürt taşıyan (-SH) **Cys** amino asitine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.

Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223C-Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant



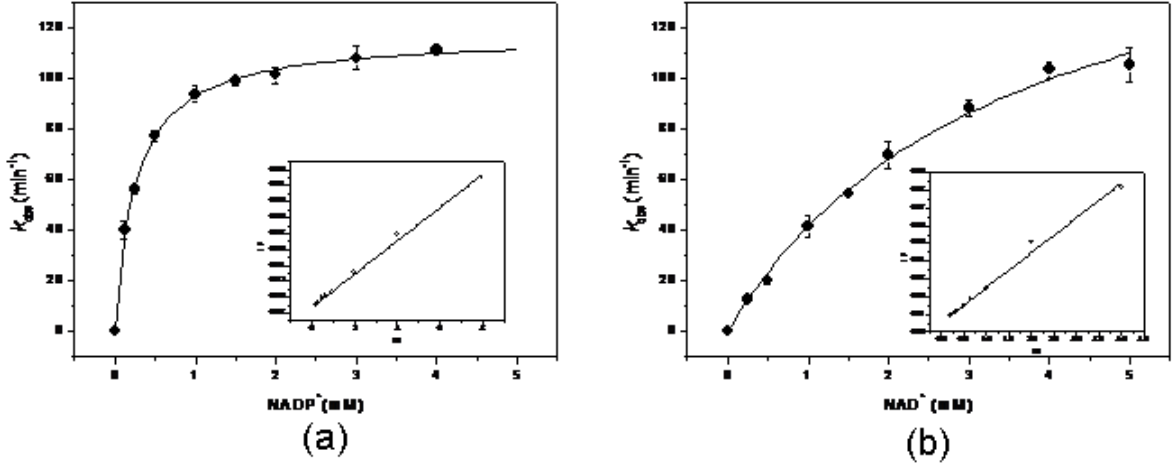
E.coli suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223C* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.23). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için uygun saflıkta **Q223C-Bsp383FDH** (>%85) elde edilmiştir.



Şekil 1.23.. (a) Q223C-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant (4) kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.15. Q223C- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

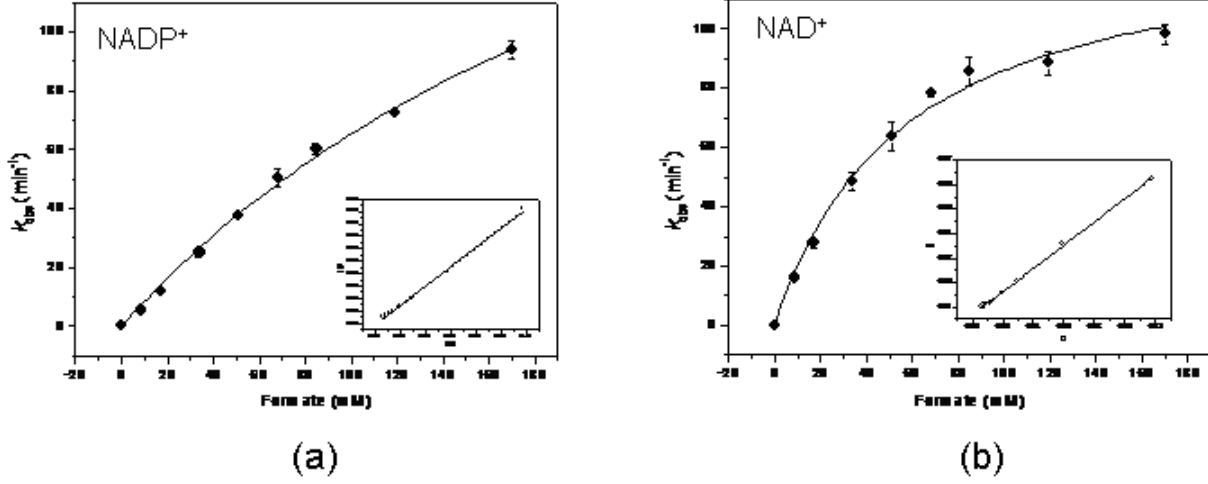
Q223C-Bsp383FDH mutant enzimi kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doyumluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.24. Q223C-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.7. de özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223C-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalara ait eğriler Şekil 1.25. (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.25. Q223C-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ortamında ve (b) NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺'nin konsantrasyonları sırasıyla 4.0 ve 5.0 mM dır.

Tablo 1.9. Q223C Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrate	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	116.66±0.84	0.26±0.01	488.69
NAD ⁺	186.78±12.23	3.52±0.43	53.05
Formate ¹	256.24±28.63	292.84±45.29	0.88
Formate ²	134.04±7.11	56.02±7.20	2.39

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺'nin konsantrasyonları sırasıyla 4.0 ve 5.0 mM dır.

Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223C-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Cys(C) aminoasitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (14:1) şeklinde olup, bu değer açıkça Q223C-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin NADP⁺ yönünde olduğu, ancak NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre bir miktar geliştirmenin (yaklaşık 3.7 kat) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, aynı veriler

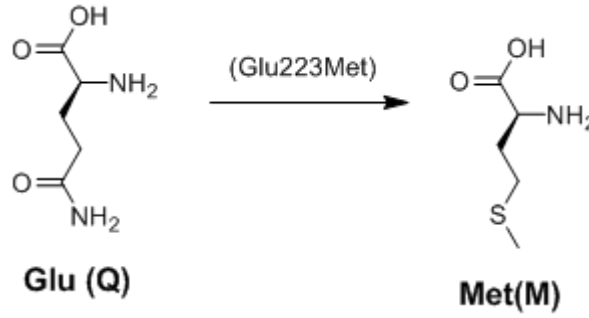
kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP^+} / (k_{cat}/K_M)^{NAD}$ karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ açısından katalitik etkisinin 9.2 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyondaki Gln(Q)→Cys (C) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. $NADP^+$ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 292 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 56 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223C-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

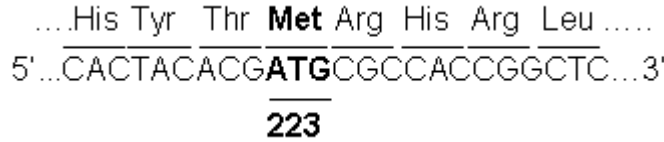
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format} / (k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD^+ ve $NADP^+$ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 2.7 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.16. Q223M- Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

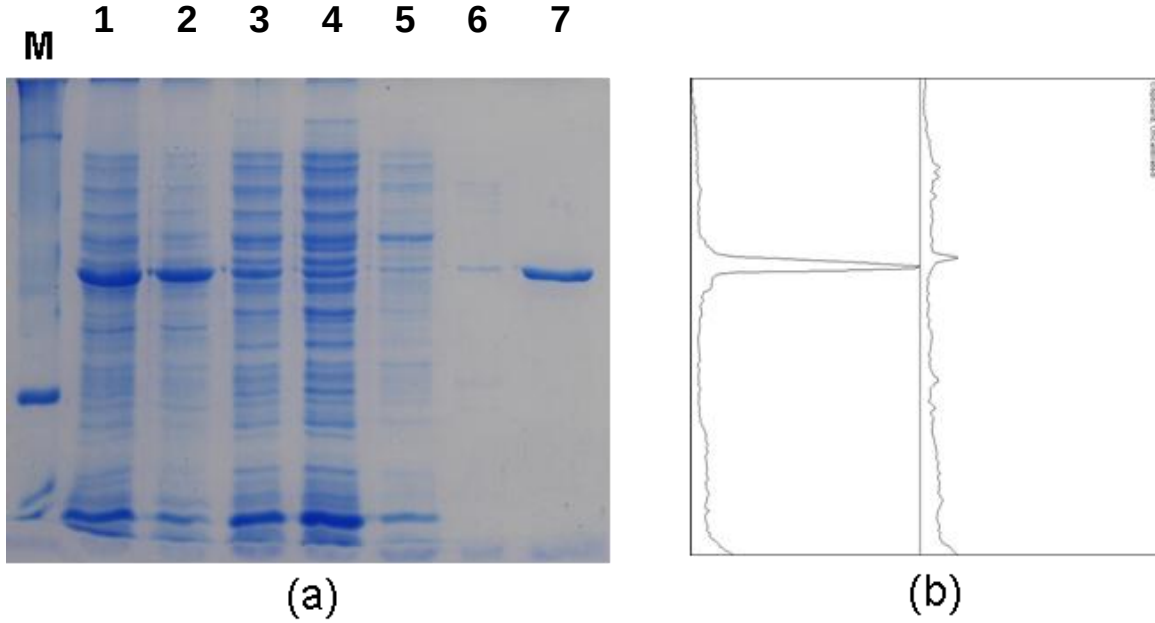
Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti metiyonin (Met, M) asitine dönüştürülmüştür. Metiyonin amino asiti kükürt içeren yan gruba sahiptir ve apolar bir aminoasittir.



Sekanslama sonuçlarına göre 223 aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **ATG (Met)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve metillenmiş kükürt taşıyan (-SCH₃) **Met** amino asitine doymuş mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



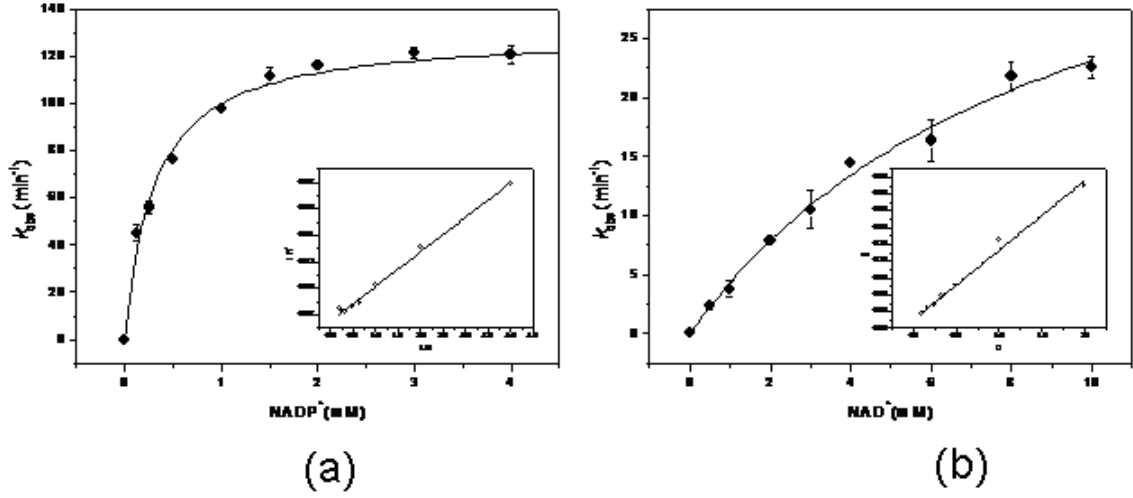
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223M-Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223M* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.26). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için yüksek saflıkta **Q223M-Bsp383FDH** (>%95) elde edilmiştir.



Şekil 1.26 (a) Q223M-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (M) Markır, **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant (4) kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.17. Q223M- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

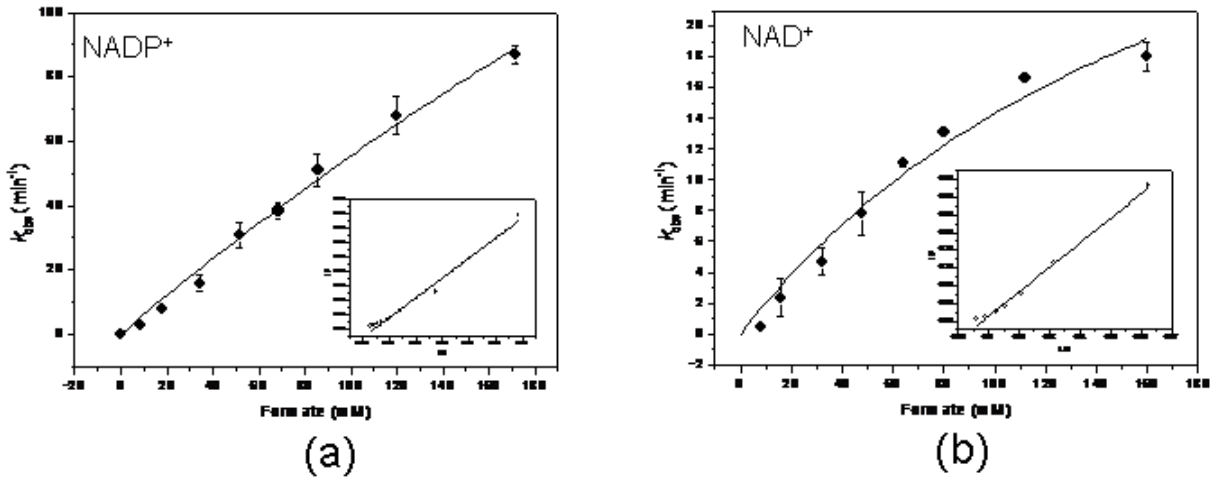
Q223M-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/CO₂ oksidasyon ve NAD(P)⁺ / NAD(P)H redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.27. Q223M-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.8. de özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223M-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.28 (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.28. Q223M-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ortamında ve (b) NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 3.0 ve 10.0 mM'dır.

Tablo 1.10. Q223M Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrat	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	129.73±2.78	0.30±0.03	432.43
NAD ⁺	44.59±5.30	9.31±1.87	4.79
Formate ¹	584.65±301.66	955.64±557.56	0.61
Formate ²	43.86±10.29	206.71±72.36	0.21

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 3.0 ve 10.0 mM dir.

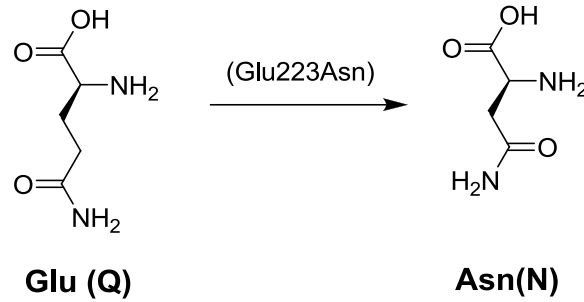
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223M-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Met(M) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (31:1) şeklindedir. Q223M-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin büyük ölçüde NADP⁺ yönündedir. NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre bir miktar gelişme göstermiştir (yaklaşık 1.4 kat). Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP^+} / (k_{cat}/K_M)^{NAD^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP⁺ açısından katalitik etkisinin 90 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz, format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyondaki Gln(Q)→Met (M) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP⁺ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 955 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD⁺ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 206 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223M-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD⁺ yönünde olduğu ve NAD⁺ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format} / (k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD⁺ ve NADP⁺ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NADP⁺ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

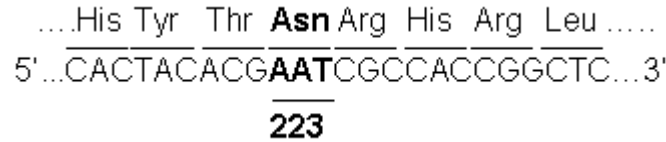
2.3.18. Q223N- Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti asparajin (Asn, N) asitine dönüştürülmüştür. Asparajin aminoasiti hidrofilik nitelikte niteliktedir.

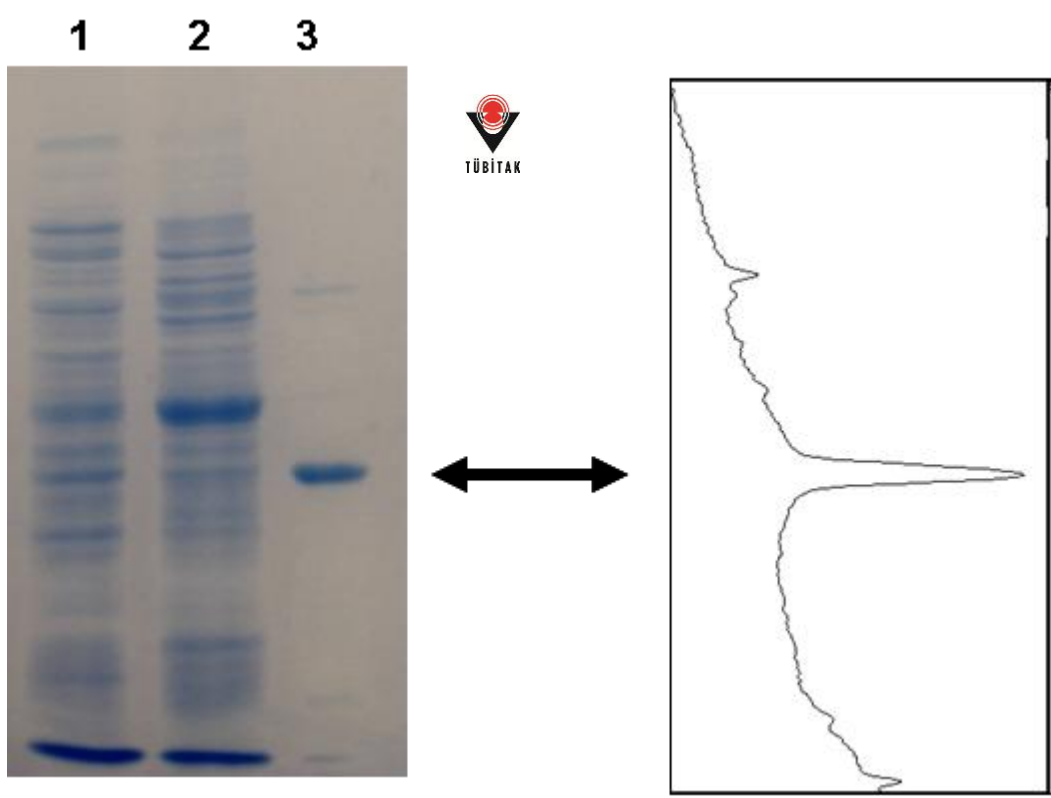


Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **ATT (Asn)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve amid grubu taşıyan **Asn** amino asitine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.

Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223N-Bsp383FDH**'ın ekspresyonu rekombinant



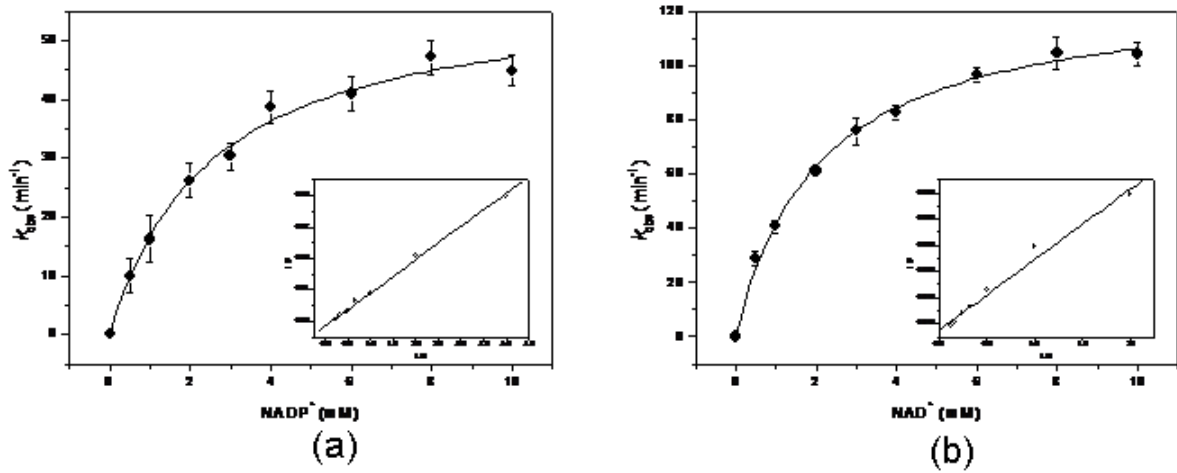
E.coli suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223N* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.29). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için yüksek saflıkta **Q223N-Bsp383FDH** (>%90) elde edilmiştir.



Şekil 1.29. (a) Q223N-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (M) Markır, (1) tüm hücre, (2) sonikasyon sonrası pellet (3) sonikasyon sonrası süpernatant (4) kolon çıkışı (5) 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, (6) 200 mM imidazol ile gelen elüsyon (7) 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.19. Q223N- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

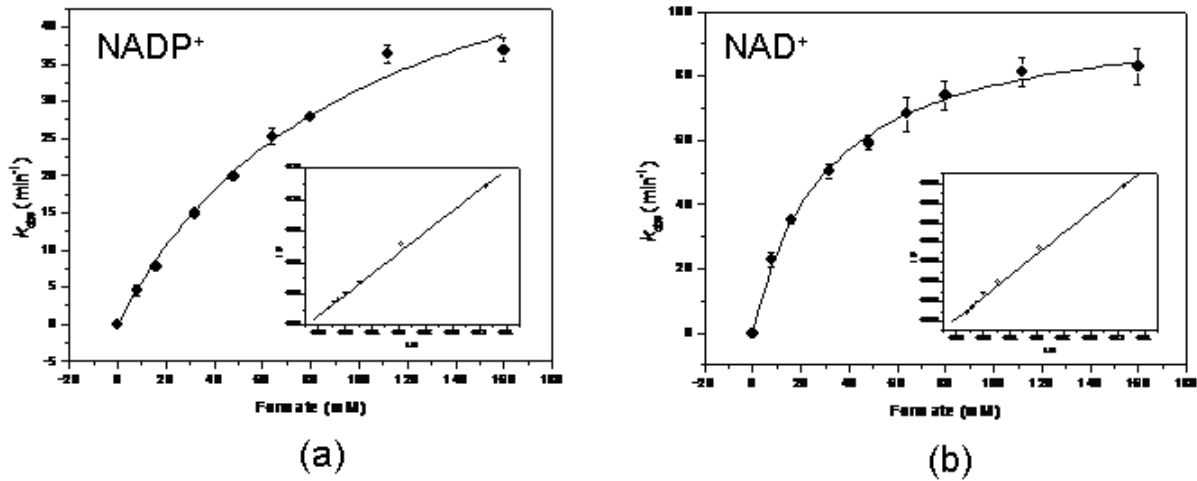
Q223N-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/ CO_2 oksidasyon ve $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.30. Q223N-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.9' da özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223M-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.31 (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.31. Q223N-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ortamında ve (b) NAD^+ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP^+ ve NAD^+ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 6.0 ve 6.0 mM 'dir.

Tablo 1.11. Q223N Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrat	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
NADP^+	58.82 ± 2.69	2.50 ± 0.32	23.53
NAD^+	128.11 ± 3.34	2.07 ± 0.16	61.83
Formate ¹	63.18 ± 6.08	99.90 ± 18.13	0.63
Formate ²	100.49 ± 2.52	30.49 ± 2.34	3.29

$^1\text{NADP}^+$ ve $^2\text{NAD}^+$ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 6.0 ve 6.0 mM dır.

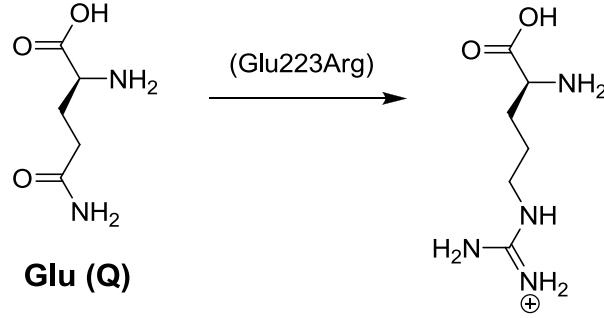
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223N-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Asn(N) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{\text{NAD}^+}/K_M^{\text{NADP}^+}$ yaklaşık olarak (1:1) şeklindedir. Q233N-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihinin her iki cofaktör için de aynıdır denebilir. NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre gelişme göstermiştir (yaklaşık 6.5 kat). Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NADP}^+} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NAD}^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ açısından katalitik etkisinin 2.6 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyonadaki Gln(Q)→Asn (N) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP^+ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 99.90 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 30.49 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223N-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

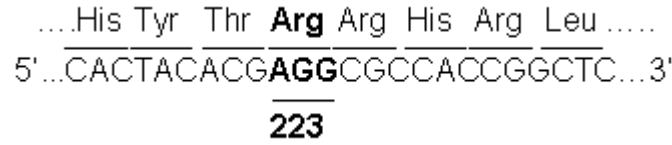
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}}$ NAD^+ ve NADP^+ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

2.3.20. Q223R- Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

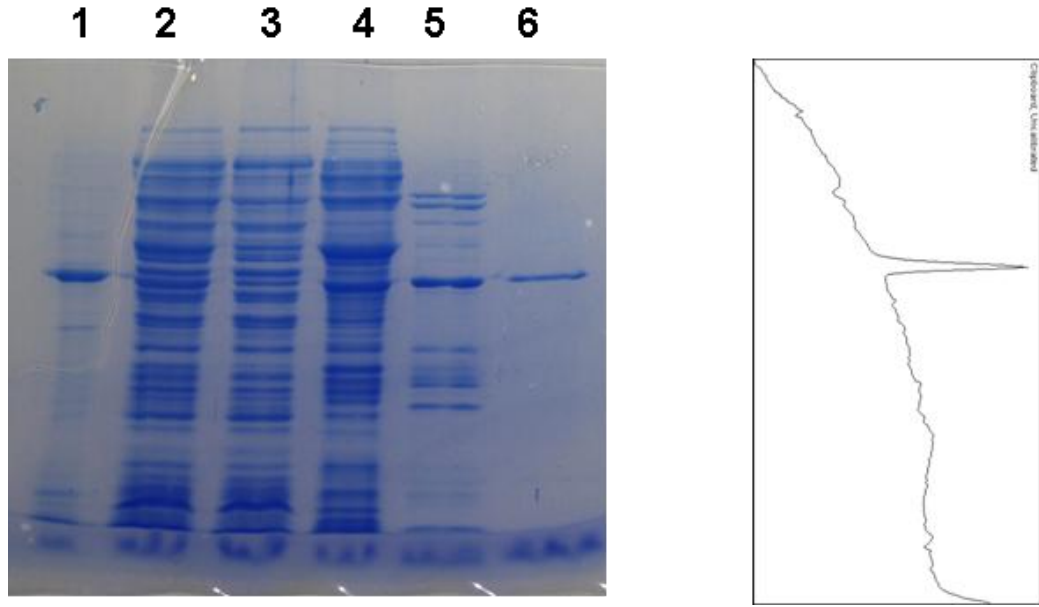
Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223. pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti arjinin (Arg, R) aminoasitine dönüştürülmüştür. Arjinin aminoasiti bazik niteliktedir.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **AGG (Arg)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve amid grubu taşıyan bazik **Arg** amino asitine doymun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



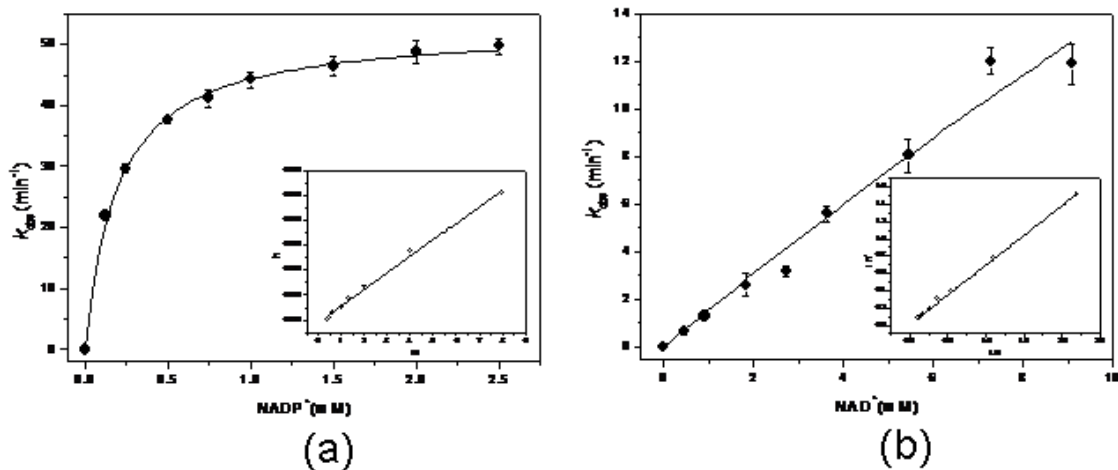
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223R-Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223R* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.32). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için yüksek saflıkta **Q223R-Bsp383FDH** (>%95) elde edilmiştir.



Şekil 1.32. (a) Q223R-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (M) Markır, **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant **(4)** kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.21. Q223R- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

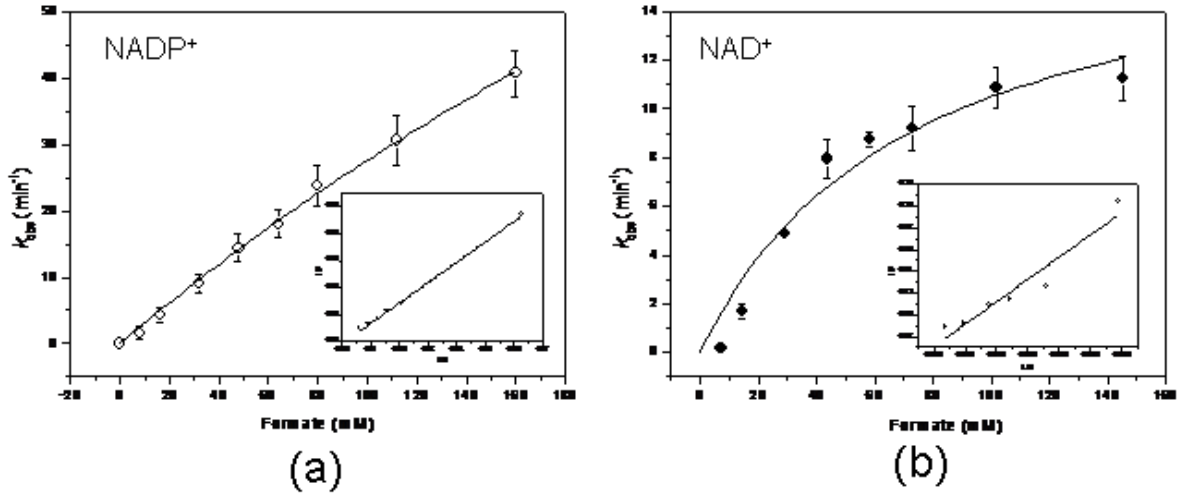
Q223R-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/ CO_2 oksidasyon ve $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminde uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.33. Q223R-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ve (b) NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) kullanılmıştır.

NAD^+ ve NADP^+ 'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde ($\sim 200 \text{ mM}$) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD^+ için hem de NADP^+ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.10 özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223R-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD^+ ve/veya NADP^+ 'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalar ait eğriler Şekil 1.34 (a) ve 1.34 (b) verilmiştir.



Şekil 1.34. Q223R-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP^+ ortamında ve (b) NAD^+ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP^+ ve NAD^+ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 1.0 ve 10 mM 'dir.

Tablo 1.12. Q223R Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrat	$k_{cat} (\text{min}^{-1})$	$K_M (\text{mM})$	$k_{cat}/K_M (\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
NADP^+	52.76 ± 0.56	0.19 ± 0.01	277.68
NAD^+	121.42 ± 18.03	77.04 ± 12.4	1.58
Formate ¹	216.12 ± 50.88	683.26 ± 187.96	0.32
Formate ²	18.12 ± 3.31	72.76 ± 27.23	0.25

$^1\text{NADP}^+$ ve $^2\text{NAD}^+$ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 2.0 ve 10.0 mM dır.

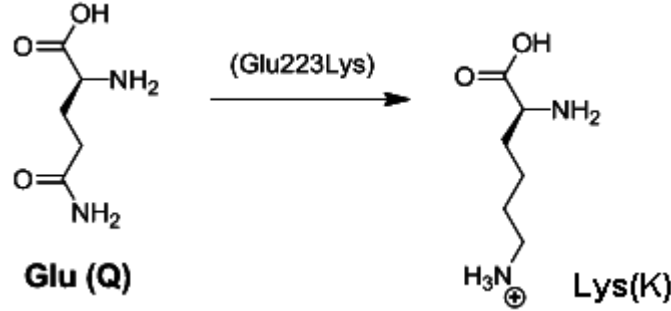
Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223R-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Arg(R) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{\text{NAD}^+}/K_M^{\text{NADP}^+}$ yaklaşık olarak (405:1) şeklindedir. Q223R-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi çok büyük ölçüde NADP^+ yönündedir. NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre çok daha zayıf tır. Yaklaşık 8 kat bir azalma sözkonusudur. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NADP}^+} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{NAD}^+}$ karşılaştırıldığında, enzimin NADP^+ açısından katalitik etkisinin 175 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu değer doğal tip enzimde 46 kat olduğu düşünüldüğünde çok ciddi bir ilerleme sözkonusudur.

Benzer başka bir analiz, format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyondaki Gln(Q)→Arg (R) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. NADP^+ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 683.26 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 72.76 mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223R-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

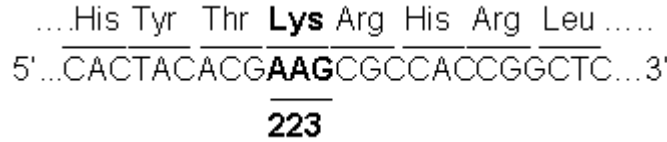
Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}} / (k_{\text{cat}}/K_M)^{\text{format}}$ NAD^+ ve NADP^+ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin birbiriyle kıyaslanabilecek düzeyde olduğu söylenebilir.

2.3.22. Q223K- Bsp383FDH'ın üretimi ve saflaştırılması

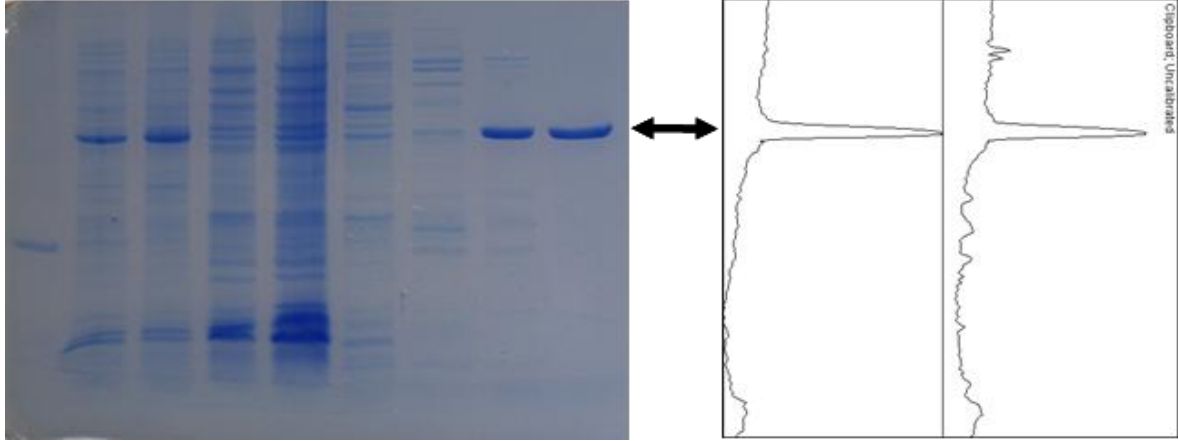
Bu çalışmada, doğal tip Bsp383FDH enziminin 223'cü pozisyonundaki glutamin (Q) aminoasiti lizin (Lys, R) aminoasidine dönüştürülmüştür. Lizin aminoasiti bazik niteliktedir.



Sekanslama sonuçlarına göre 223. aminoasiti kodlayan kodon olan **CAG (Gln)**, **AAG (Lys)**'ye çevrilmiştir ve sekans sonuçları ile bu mutasyon doğrulanmıştır. Bu sayede, göreceli olarak polar olan ve hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip olan **Gln** amino asiti alifatik yan zinciri ve amid grubu taşıyan bazik **Lys** aminoasidine doygun mutasyon yöntemiyle çevrilmiştir.



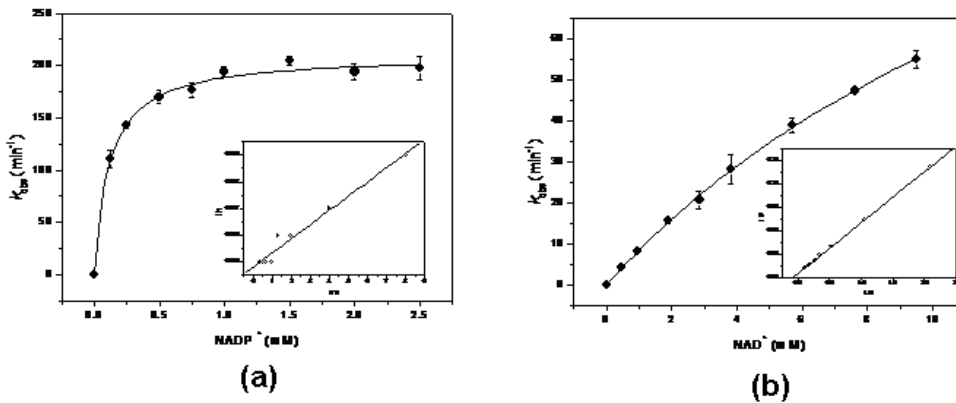
Doğal tip Bsp383FDH benzer şekilde **Q223K-Bsp383FDH'ın** ekspresyonu rekombinant *E.coli* suşlarında oto-indüksiyon yoluyla, yani Studier besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Studier besiyerinde *Bsp383FDH-Q223K* genini kodlayan plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri 30°C'de büyütülüp sonrasında pellet eldesini takiben saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma basamaklarını gösteren SDS-PAGE analizi ve saflık derecesi için piksel analizi aşağıda verilmiştir (Şekil 1.35). Buna göre 400mM imidazol içeren fraksiyon ile bir miktar safsızlık olmakla birlikte, kinetik çalışmalar için yüksek saflıkta **Q223K-Bsp383FDH** (>%95) elde edilmiştir.



Şekil 1.35. (a) Q223K-Bsp383FDH'in ekspresyon ve saflaştırma basamaklarına ait SDS-PAGE analizi. (M) Markır, **(1)** tüm hücre, **(2)** sonikasyon sonrası pellet **(3)** sonikasyon sonrası süpernatant (4) kolon çıkışı **(5)** 30 mM imidazol ile gelen elüsyon, **(6)** 200 mM imidazol ile gelen elüsyon **(7)** 400 mM imidazol ile gelen elüsyon, (b) Saflaştırılan enzimin saflık derecesini gösteren kolonların piksel analizi.

2.3.23. Q223K- Bsp383FDH'in Kinetik Çalışmaları

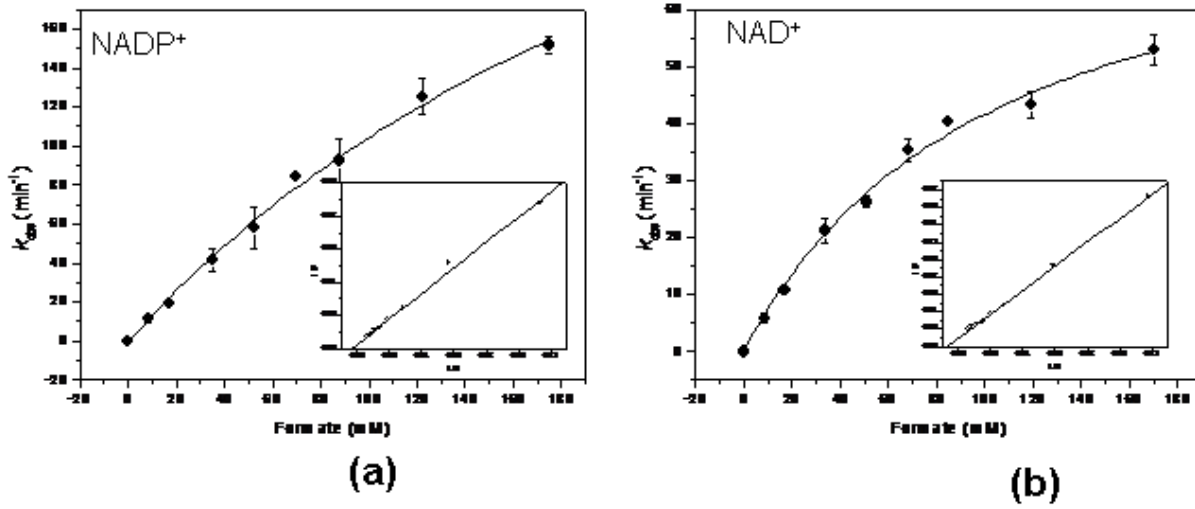
Q223K-Bsp383FDH mutant enziminin kullanılarak yapılan kararlı hal kinetik çalışmalarında, format/ CO_2 oksidasyon ve $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ redüksiyon reaksiyonun eğrisi tipik doygunluk niteliğinde olup Michaelis-Menten denkleminin uygun davranış sergilemiştir.



Şekil 1.36. Q223K-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği **(a)** NADP^+ ve **(b)** NAD^+ redüksiyon reaksiyonları için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. Format doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) kullanılmıştır.

NAD⁺ ve NADP⁺'nin değişen konsantrasyonlarda kullanıldığı ve format'ın doygunluk seviyesinde (~ 200 mM) olduğu reaksiyona ait Michaelis-Menten eğrileri aşağıda verilmiştir. Bu grafiklerden hem NAD⁺ için hem de NADP⁺ için K_M ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Tüm kinetik parametreler Tablo 1.11' de özetlenmiştir.

Benzer şekilde, Q223K-Bsp383FDH mutant enzimi için NAD⁺ ve/veya NADP⁺'nin doygunluk seviyesinde kullanıldığı, buna karşılık format'ın değişik konsantrasyonlarda kullanılarak yapılan çalışmalara ait eğriler Şekil 1.37 (a) ve (b) verilmiştir.



Şekil 1.37. Q223K-Bsp383FDH mutant enzimin katalizlediği (a) NADP⁺ ortamında ve (b) NAD⁺ ortamında format'ın oksidasyonu için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (küçük resim) eğrileri. NADP⁺ ve NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 2.0 ve 10 mM'dır.

Tablo 1.13. Q223K Bsp383FDH enzimi için Michaelis-Menten kinetik parametreleri.

Substrate	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
NADP ⁺	210.18±3.41	0.12±0.01	1751
NAD ⁺	160.29±8.37	18.22±1.31	8.79
Formate ¹	431.55±54.95	314.56±54.87	1.37
Formate ²	84.96±6.10	104.38±14.23	0.81

¹NADP⁺ ve ²NAD⁺ 'nin konsantrasyonları sırasıyla 2.0 ve 10.0 mM dır.

Buna göre, doğal tip enzim için yapılan analizin benzeri bu mutant enzim için de yapılabilir. Q223K-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi, bir başka ifadeyle 223'üncü pozisyonda bulunan Lys(K) amino asitinin kofaktör bağlanmasına olan etkisi her iki kofaktör için elde edilen K_M değerleri kıyaslama yapılarak bulunabilir. Şöyle ki, $K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$ yaklaşık olarak (151:1) şeklindedir. Q233K-Bsp383FDH mutant enziminin kofaktör tercihi çok büyük ölçüde $NADP^+$ yönündedir. NAD^+ 'nin afinite değerinde doğal tipe göre az da olsa daha zayıftır. Yaklaşık 1.32 kat bir azalma sözkonusudur. Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{NADP} / (k_{cat}/K_M)^{NAD}$ karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ açısından katalitik etkisinin 200 kat daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu değer doğal tip enzimde 46 kat olduğu düşünüldüğünde çok ciddi bir ilerleme sözkonusudur.

Benzer başka bir analiz format bağlanması açısından da yapılabilir. Bu sayede 223'üncü pozisyonundaki Gln(Q)→Lys (K) değişikliğinin format bağlanmasına olan etkisi hakkında bilgi edinilebilir. $NADP^+$ 'nin doyguna yakın konsantrasyonda kullanıldığı durumda format bağlanmasının K_M değeri 314.56 mM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NAD^+ 'nin kullanıldığı durumda, format bağlanmasının K_M değeri ise 104.38mM şeklindedir. Buna göre, kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Q223K-Bsp383FDH mutant enzim için bu etkinin NAD^+ yönünde olduğu ve NAD^+ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir.

Benzer şekilde, aynı veriler kullanılarak katalitik etki değerleri $(k_{cat}/K_M)^{format} / (k_{cat}/K_M)^{format}$ NAD^+ ve $NADP^+$ 'li ortamda karşılaştırıldığında, enzimin NAD^+ 'li ortamda katalitik etkisinin birbiriyle kıyaslanabilecek düzeyde olduğu söylenebilir.

2.4. NADPH Rejenerasyon Reaksiyonları

Elde edilen doğal tip ve mutant Bsp383FDH enzimleri, hem NADPH hem de NADH rejenerasyon reaksiyonları için laboratuvarımızda rutin olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda özellikle sitokrom P450 BM3 ve nitroredüktaz enzimleri ile birlikte ikili enzim sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar.

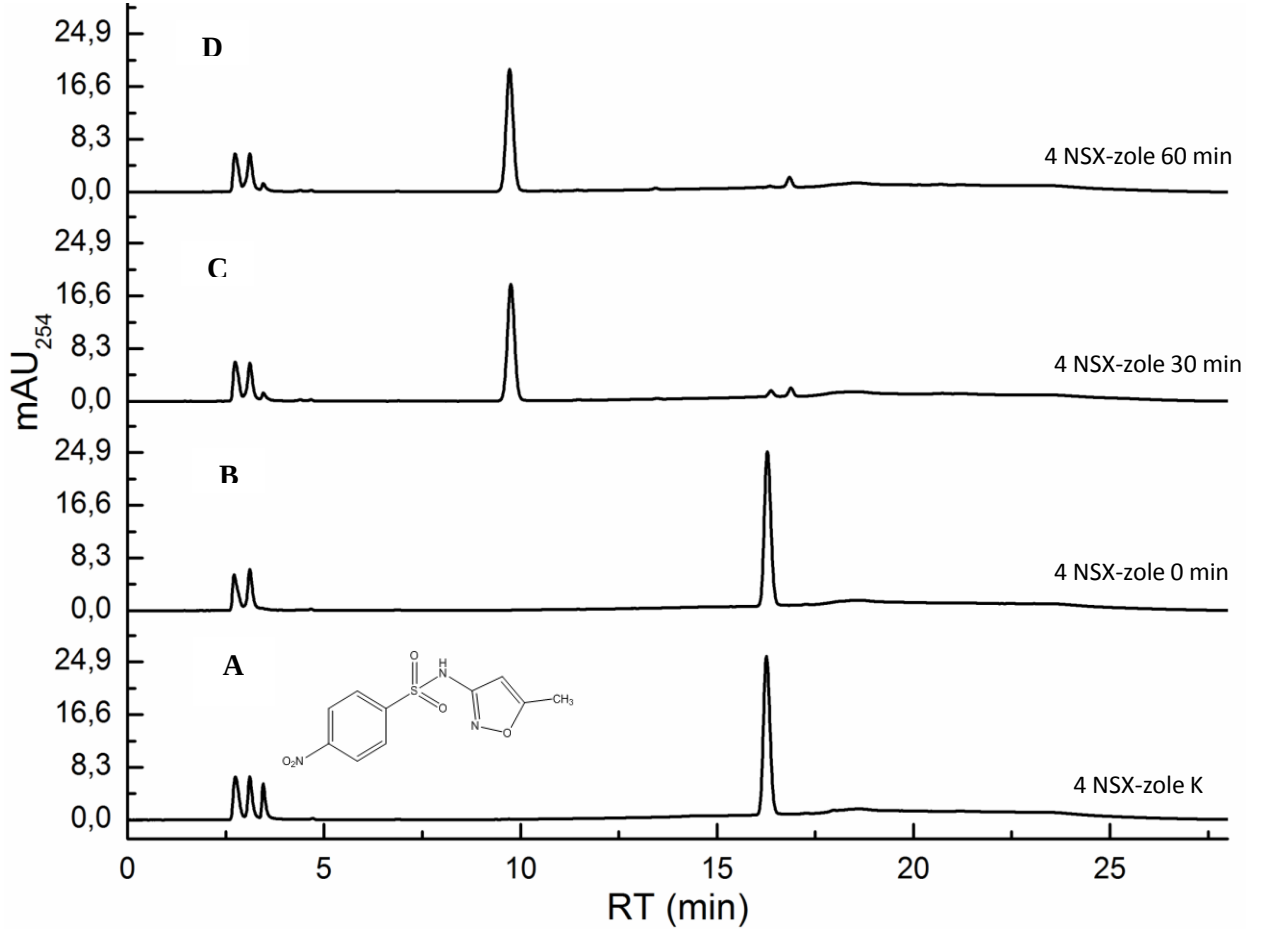
Örnek 1- Propil benzenin hidroksilasyonu için Bsp383FDH-Sitokrom P450 BM3 sistemi

Sitokrom P450 enzimleri monooksijenaz ailesine ait olup bitkilerde, hayvanlarda ve prokaryotlarda bulunmaktadır. İnsan genomu 50 kadar bu enzim ailesinin üyesine sahiptir ve bunların 15'ine yakını doğrudan ilaç metabolizmasında görev almaktadırlar. *Arabidopsis* bitkisi ise 250 den fazla üyeye sahiptir. Bu enzim ailesi moleküler oksijeni kullanarak hidroksilasyon reaksiyonunda arasında bulunduğu pek çok reaksiyonu katalizlerler. Elde edilen ürünler geniş yelpazede uygulama alanına sahiptir. Özellikle polimer yapı birimi, incekimyasalların sentezindeki arabileşiklerin sentezi ve parfüm edüstrisinde kullanım alanları mevcuttur. Bu aşışamada Bsp383FDH'in sitokrom P450 BM3 ile birlikte model bir reaksiyon olan propil benzenin hidroksilasyonu çalışılmıştır. Reaksiyon başarılı şekilde çalışmıştır. 2 saatlik süre sonunda %99 oranında substrat ürüne çevrilmiştir . Kontrol reaksiyonunda FDH kullanılmadığı durumda başlangıç maddesi aynen kalmıştır.

Örnek 2- 4NSX-zole bileşığının indirgenmesi için NTR-FDH enzim sistemi

4NSX-zole bileşığının alıkonma süresi 16,27 dakikadır. Bu substratın Ssp-NtrB enzimi ile büyük oranda reaksiyona girdiğı ve biri baskın olmak üzere iki adet metabolit oluşturduğı gözlenmiştir. Bu metabolitlerin alıkonma zamanları 9,73 dk (ana ürün) ve 16,85 dakikadır. Kofaktör sınırlaması olmadan gerçekleştirilen 30 dakikalık reaksiyon sonucu 4NSX-zole substratının neredeyse tamamının tükendiğı, 60 dakikalık reaksiyon sonucu substratın tamamen tükendiğı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, kofaktör sınırlamasını ortadan kaldıran ikili enzim sistemi ile yapılan reaksiyonun başarılı bir şekilde çalıştığı gözlenmiş; ortamda yeterince kofaktör bulununca 4NSX-zole substratının SspNtrB ile enzimatik reaksiyonunda son basamağı kadar indirgenmesi ve ürüne dönüştürülmesi sağlanmıştır



Şekil 1.38. (A) Ssap-NtrB'nin 4NSX-zole ile reaksiyonun kontrolüne (tampon, substrat, kofaktör, FDH enzimi, inaktif SsapNtrB enzimi) ve (B) 0. dakikasına ait HPLC kromatogramı (tampon, substrat, kofaktör, FDH enzimi), (C) Ssap-NtrB'nin 4NSX-zole ile 30 dakikalık ve (D) 60 dakikalık reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı (25 °C'de, %5 DMSO içeren 25 mM pH 7,5 tris/Cl içersinde 50 µM 4NSX-zole, 27 µg/ml Ssap-NtrB, 0.03 U/ml CmFDH, 200 mM sodyum format, 0.2 mg/ml BSA, 5 µM NAD⁺ ve 0,5 µM NADH).Reaksiyon sonunda 1:1 hacim asetonitril ilave edilmiştir.

2.5. Bölümle ilgili Kaynaklar

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Gulevskaya, A.V., Verbeeck, S., Burov, O.N., Meyers, C., Korbukova, I.N., Herrebout, W., and Maes, B.U. (2009). Synthesis of (alkylamino) nitroarenes by oxidative alkylamination of nitroarenes. *European Journal of Organic Chemistry* 2009, 564-574.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.

Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-234.

Davis, B.G., Celik, A., Davies, G.J., and Ruane, K.M. Novel Enzyme. Application No.: PCT/GB2009/051320 *Unpublished (filing date: 06.10.2009)*

3.1 MATERYAL VE METOD

3.1.1 Bilgisayar: Proje kapsamında, moleküler dinamik simülasyonları ve QM/MM hesaplamaları için kullanılmak üzere 2 adet HP Z820 iş istasyonu alınmış ve bu iş istasyonlarına Linux işletim sistemi (Fedora 17) kurulmuştur.

3.1.2 Enzim Yapısı: Proje kapsamında üzerinde araştırma yapılan NADP⁺ -bağımlı FDH enzimine (Bsp383) ait kristal yapı Doç.Dr. Ayhan Çelik tarafından sağlanmıştır.³²

3.1.3 Hesaplama Metodları: FDH enzimi üzerine hesaplamalı ve deneysel protein mühendisliği çalışmaları yapılarak daha aktif, dolayısıyla da endüstriyel kullanıma uygun NADP⁺-bağımlı FDH elde etmek amacıyla planlanan bu projenin **Hesaplamalı Bölüm 3** basamaktan oluşmuştur. Bunlar moleküler doklama, moleküler dinamik simülasyonlar ve hibrit kuantum mekanik-moleküler mekanik (QM/MM) hesaplama basamaklarıdır.

3.1.3.1 Moleküler Doklama

AutoDock Vina³³ programı moleküler doklama işlemlerinde kullanılmıştır. Ayrıca enzimi, yapısında bulunan su ve ligand molekülerinden ayırmak için UCSF Chimera³⁴, AD Vina'yı çalıştırmak için gerekli olan enzim ve ligand moleküllerine ait girdi (input) dosyalarını hazırlamak için AutoDockTools³⁵, enzim yapısında mutasyon gerçekleştirmek ve doking sonuçlarını görüntülemek için PyMOL³⁶ görüntüleme ve modelleme programları kullanılmıştır. AD Vina'nın algoritması birçok yerel ve global optimizasyon yaklaşımının bir kombinasyonudur. AD Vina skorlama fonksiyonu olarak "united atom", konformasyonel tarama metodu olarak da "ötelenmiş lokal tarama global optimizasyonu" isimli bir algoritma kullanır. AD Vina ile doking hesaplaması yapabilmek için bir konfigürasyon dosyası hazırlanmalıdır. Bu konfigürasyon dosyası, ligand ve hedef molekül bilgileri ile birlikte, doking yapılacak alanı, merkezin kartezyen koordinatları ve doking bölgesinin genişliği şeklinde tanımlayan parametreler içerir. AD Vina'nın validasyonu, koenzim ve substratın enzime doklanması ile elde edilen konformasyonların, X-ray yapısından sapması (Root Mean Square Deviation, RMSD) incelenerek gerçekleştirilmiştir.

Doking işleminde hedef molekül olan Bsp383 enziminin girdi dosyalarını hazırlamak için ilk olarak Chimera programı ile enzimin kristal yapısında bulunan etilen glikol, sülfat ve su molekülleri silinmiştir. Enzimin mutasyonu, PyMOL programı ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, AutoDockTools ile enzime polar hidrojen atomları eklenmiş ve enzimin dosya formatı *.pdb'den *.pdbqt'ye dönüştürülmüştür.

Ko-faktörün (NAD^+ , NADP^+) ve formatın enzimin aktif bölgesine doklama işlemleri yapılarak, moleküler dinamik simülasyon öncesi üçlü kompleks (ko-faktör-enzim-format) yapısı elde edilmiştir. Herbir mutant enzim için elde edilen olan en karalı üçlü kompleks yapılarına, mutant enzimlerin bağlanma afiniteleri ve RMSD (root-mean-square deviation; standart sapmanın kare kökü) değerlerine bakılarak karar verilmiştir.

3.1.3.2 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonlar

Moleküler doklama sonucunda elde edilen enzim-koenzim-substrat üçlü yapıyı enerjetik ve geometrik açıdan daha kararlı hale getirmek amacıyla MD simülasyonları yapılmıştır. Bu amaçla daha önceden yapılan literatür araştırmaları neticesinde seçilen Gromacs (GROningen MACHine for Chemical Simulations) programı kullanılmıştır.³⁷

MD simülasyonları iki farklı simülasyon zamanı, kuvvet alanları (force fields) ve simülasyon kutusu boyutu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu farklılıkların sebebi ise şöyle açıklanabilir: Öncelikle, birinci kısım MD simülasyonlarında, enzime koenzim (NADP^+) bağlanmasında ve aktivitesinde etkili olabileceği düşünülen Q223 aminoasidinin diğer 19 aminoasid ile değiştirilip elde edilen yeni mutantların koenzim (NADP^+) bağlanmasındaki davranışı optimum MD simülasyon şartları sağlanarak araştırılmaya çalışılmıştır. Bunun sonucunda koenzim bağlanmasında hangi mutantların etkili olabileceği konusunda ön bilgi edinilmiştir. İkinci kısım MD simülasyonlarında ise, elde edilen deneysel sonuçlardan aktivitesi yüksek çıkan mutantlar üzerinde daha detaylı bilgi edinebilmek amacıyla bazı MD simülasyon parametreleri değiştirilmiş ve tekrar bu mutantlar için yeniden MD simülasyonları yapılmıştır. Aşağıda bu değişiklikler özetlenmiştir.

A) Birinci Kısım MD Simülasyonları: Toplam MD süresi 30 ns, kuvvet alanı olarak³⁸ Gromos 53A6, simülasyon kutusu oluşturulurken enzim ile kutu arasındaki mesafe, **1 nm** olarak alınmıştır. Gromacs'ın 4.5.5 versiyonu kullanılmıştır.

B) İkinci Kısım MD Simülasyonları: Toplam MD süresi 15 (veya 10) ns, kuvvet alanı olarak³⁹ Gromos54a7, simülasyon kutusu oluşturulurken enzim ile kutu arasındaki mesafe **5 nm** olarak alınmıştır ve toplam su moleküllerinin sayısı arttırılmıştır. Bu durumda 30 ns yerine (daha fazla hesapsal zaman alacağından dolayı) 15 ns simülasyon süresi alınmıştır. Gromacs'ın 4.6.5 versiyonu kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan Gromos54a7 kuvvet alanı birinci kısımda kullanılabildiği göre proteinlerin alfa sarmalını daha iyi stabilize etmektedir, dipol-dipol etkileşimlerini ve intra-molekül düzeyde oluşan birçok hidrojen bağı popülasyonunu daha hassas hesaplamaktadır.⁴⁰

Yukarıda açıklanan birinci ve ikinci kısım MD simülasyonlarında kullanılan ortak parametreler ise şu şekildedir:

Format iyonu parametreleri ise mevcut kuvvet alanları içerisinde tanımlı olmadığından, Automated Topology Builder (ATB) programı ile bu iyon için bir topoloji oluşturulmuştur. Atomların ESP (electrostatic potential) yükleri, GAUSSIAN 09 programı⁴¹ ile 6-31G (d) seviyesinde yapılan MP2 enerji hesaplaması ile elde edilmiştir.

Simülasyonlarda çözücü olarak spc (simple point charge) tipi su molekülleri kullanılmıştır. Simülasyon kutusu oluşturulduktan sonra su moleküllerinin enzim, koenzim, substrat üçlü kompleksi içerisinde ve simülasyon kutusunun diğer kısımlarında dağıtabilmek amacıyla enerji minimizasyonu yapılmıştır. Bu sırada enzim, koenzim ve substrat yapılarının atomları arasına büyük bir yay sabiti ($k = 1000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$) konularak bu atomların hareket etmesi engellenmiştir (Bu yapıların uzaysal konfigürasyonu bağıl olarak sabit tutulmuştur). Bununla birlikte, su moleküllerinin atomları üzerine düşen kuvvet 1 kJ mol^{-1} den daha küçük olana kadar enerji minimizasyonuna devam edilerek, su moleküllerinin simülasyon kutusu içerisindeki enzim-koenzim ve substrat yapıları üzerindeki en iyi uzaysal konfigürasyonu bulunmuştur. Enerji minimizasyonu için steepest descent algoritması kullanılmıştır.

Enerji minimizasyonu sonrasında termodinamik dengeleme işlemi yapılmıştır. Bunun için, simülasyon kutusu içerisindeki sistemi aynı termal banyoda ve basınçta tutmak amacıyla öncelikle makrokanonik toplulukta, sistemin sıcaklığı 300 K 'e çıkarılarak leap-frog algoritması kullanılarak enerji minimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sistemin sıcaklığını 300 K 'de tutabilmek amacıyla Berendsen-termostat algoritması, basıncı bu sıcaklık altında referans basıncı olan 1 bar civarında tutabilmek amacıyla Parrinello-Rahman yaklaşımı kullanılmıştır. Berendsen-termostat algoritmasında sıcaklığı küçük zaman aralıklarında dahi sistemin atomlarının kinetik enerjilerine göre yeniden ölçeklendirmek amacıyla zaman sabiti $0,1 \text{ ps}$ olarak alınmıştır. Bu sırada, molekül içi bağ açıları ve uzunluklarının değişmemesi için LINCS kısıtlama algoritması kullanılmıştır. Hesaplamalar sırasında, elektrostatik ve polar etkileşmelerin periyodik sınır koşulları (PBC) altında hesaplanması için Particle-mesh Ewald (PME) metodu kullanılmış; bu metot ile uzun-mesafe etkileşmelerinin ters enerji uzayında nümerik olarak çözülmesi sağlanmıştır.

Bir önceki adımda istenilen sıcaklık ve basınçta dengeye getirilen sistem için MD hesaplamalarına başlanmıştır. MD sırasında üçlü kompleksi üzerindeki konum kısıtlamaları kaldırılmış ve Newton hareket denklemlerinden atomların hızlarını, her bir zaman adımında hesaplamak ve atomlar üzerindeki kuvvete göre atomları hareket ettirebilmek amacıyla leap-frog algoritması kullanılmıştır. MD sırasında, molekül içi bağ açıları ve uzunluklarının değişmemesi için LINCS kısıtlama algoritması; elektrostatik ve polar etkileşmelerin periyodik sınır koşulları (PBC) altında hesaplanması için ise Particle-mesh Ewald (PME) metodu

kullanılmıştır. MD simülasyonları sırasında atomların yeni konumları 2 fs zaman aralıklarıyla hesaplanmıştır.

3.1.3.3 Hibrit Yöntemler (QMM/MM)

Reaksiyon mekanizmasının inceleneceği son aşamada, MD yöntemi ile elde edilen yapılardan yola çıkılarak doğal ve bazı mutant enzimler üzerine QM/MM yöntemler uygulanmıştır. Bu işlemler, Gaussian 09 paket programı içerisinde bulunan ONIOM yöntemi ile yapılacaktır. ONIOM yöntemi enzimin, koenzim ve substrat bağlanma bölgelerine uygulanacak; MD simülasyonları ile belirlenmiş olan, reaksiyon için kritik önem teşkil eden etkileşimler dikkate alınarak, sistem iki bölgeye ayrılmıştır. Bu iki bölgeye içten dışa doğru sırasıyla QM, ve MM yöntemler uygulanacaktır. En içteki bölge reaksiyonun gerçekleştiği bölge olup, bu bölgede QM yöntemler kullanılarak reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. QM/MM yöntemiyle, hidrür transfer reaksiyonuna ait bariyer enerjileri hesaplanmış olacaktır.

4. Hesaplama Sonuçları

4.1 Moleküler Doklama

Doklama işlemleri enzime koenzimin ve formatın doklanması şeklinde Autodock Vina programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doklama işlemlerinin amacı: birincisi, MD simülasyonları öncesi, enzim-koenzim-format üçlü yapıya ait uygun bir konformasyon elde etmek. İkincisi ise MD sonrasında elde edilen minimum enerjili stabil üçlü yapıdaki koenzimin enzime bağlanma afinitesini belirlemek.

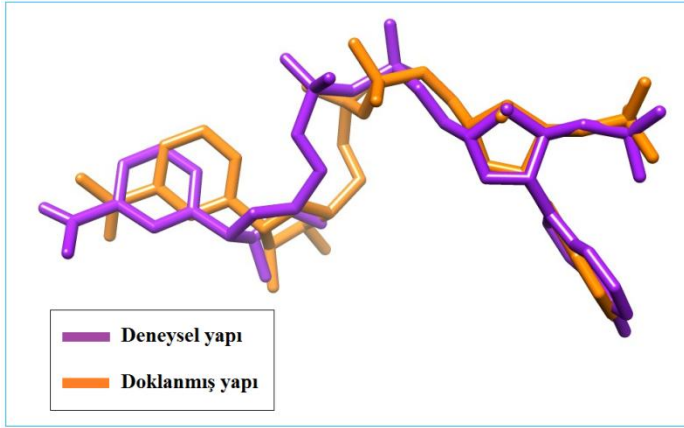
Bsp383 enziminin kristal yapısından yola çıkılarak, doğal tip (wild type) ve mutant enzimlere koenzimin bağlanma afinitelerini ve konformasyonlarını incelemek amacıyla moleküler doking hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Mutasyon, koenzim bağlanmasında etkili olan 223 nolu glutaminin, diğer 19 aminoasitle değiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan 8 aminoasitten (Asn148, Arg203, Gln223, Arg286, Thr284, Asp310, His334, Ser336) glutaminin mutasyona uğratılmasının nedeni, bu çalışmada kullanılan NADP⁺-bağımlı Bsp383 format dehidrojenaz³² ile literatürde bulunan NAD⁺-bağımlı Pseudomonas sp.101 format dehidrojenaz⁴² enzimlerinin aktif bölgelerindeki tek farklılığın bu aminoasit olmasıdır. NAD⁺-bağımlı Pseudomonas sp.101 FDH enziminde (protein veri bankasındaki kodu: 2NAD) glutamin yerine aspartik asit bulunmaktadır. Bsp383 ve 2NAD enzimlerinin dizi hizalaması Şekil 6' da verilmiştir.

2NA Bsp38	AKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTLPTPK-AIDFTPGQL 49 ATVLCVLYPDPVDGYPPRYVRDAIPVITHYADGQTAPTAPAGPPGFRPGEL 50
2NAD Bsp383	LGSVSGELGLRKYLESNHGTLLVVTSDKDGPDSEFERELVDADVVISQPFW 99 VGCVSGALGLRGYMEAHGHTLIVTSDKDSPEFERRLPEADVVISQPFW 100
2NAD Bsp383	PAYLTPERIAKAKNLKLALTAGIGSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTCNSIS 149 PAYLTAERIAAPKLKLALTAGIGSDHVDLDAARAATVAEVTGSNSIS 150
2NAD Bsp383	VAEHVVMMLSLVRNYLPSHEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVGTVAA 199 VAEHVVMTTALVRNYLPSHAIAQQGGWNIADCVSRSDVEGMHFGTVGA 200
2NAD Bsp383	GRIGLAVLRRRLAPFDVHLHYTD R HRRLPESVEKELNLTWHATREDMYPVCD 249 GRIGLAVLRRRLKPFGLQLHYTD R HRRLDASIEQELGLTYHADAASLASAVD 250
2NAD Bsp3	VVTLNCPLHPETEHMINDETCLKFKRGAYIVNTARGKLCDRDAVARALES 299 IVNLQIPLYPSTEHLFDAAMIARMKRGAYLINTARAKLVDRDAVVNALTS 300
2NAD Bsp383	GRLAGYAGDVWFPPAPKDHPWRTMPYNGMTPHISGTTTLTAQARYAAGTR 349 GHLAGYGGDVWFPPAPADHPWRTMPFNGMTPHISGTSLSAQARYAAGTL 350
2NAD Bsp383	EILECFEGRPIRDEYLIVQ 369 EILQCWFDGKPIRNEYLIVD 370

Şekil 4.1. Bsp383 ve 2NAD enzimlerinin dizi hizalaması (Enzimlerin aktif bölge aminoasitleri renkli gösterilmiştir).

Doklama işlemleri öncesinde AD Vina doklama programının validasyonu için koenzim (NADP^+) doğal tip enzime yeniden doklanmıştır ve elde edilen 20 pozdan afinite değeri yüksek olan ilk poza ait koenzim (NADP^+) konformasyonu, deneysel yapıdaki koenzim (NADP^+) konformasyonu ile örtüşmüştür (Şekil 7).

Q223 aminoasidi, diğer 19 aminoasit ile değiştirilerek her defasında koenzim (NADP^+) ve format iyonu enzime doklanmış ve elde edilen enzim-koenzim-format üçlü yapısı MD simülasyonları için hazırlanmıştır. 2.2.3.2 bölümünde açıklanan MD simülasyon metodunun uygulandığı her iki kısımda (birinci ve ikinci kısım MD simülasyonları) belirtilen doklama işlemleri ayrı ayrı tekrarlanmıştır.



Şekil 4.2. Koenzimin deneysel ve enzime doklanmış yapıları.

MD simülasyonları sonrası koenzimin enzime doklanması sonucunda elde edilen değerleri bir sonraki bölümde belirtilecektir.

4.2 Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları

4.2.1 Birinci Kısım MD Simülasyonları

Bu bölümde, MD süresi 30 ns, kuvvet alanı olarak Gromos 53A6 kullanılarak yapılan sonuçlar sunulacaktır. Simülasyon kutusu oluşturulurken enzim ile kutu arasındaki mesafe, **1 nm** olarak alınmıştır. Gromacs'ın 4.5.5 versiyonu kullanılmıştır. Bu bölümde yapılan MD simülasyonlarının amacı, Q223 nolu aminoasidin diğer 19 aminoasit ile değiştirilmesi sonucunda elde edilen mutant enzimlere koenzim bağlanma afinitesinin belirlenmesi üzerinedir. MD simülasyonları sonrasında koenzim (NADP^+) tekrardan enzime doklanmıştır ve bağlanma afiniteleri hesaplanmıştır.

Bu bölümde MD simülasyonlarından elde edilen bütün sonuçlar dosya büyüklüğü sınırı olmasından dolayı sunulmayacaktır. Sadece bu bölümün amacı doğrultusunda sonuçlar rapor edilecektir. Bu sebeple bu bölümde MD simülasyonları sonrasında koenzimin (NADP^+) enzime bağlanma afinitelerini gösteren sonuçlara yer verilecektir. Bu bölümde yapılan MD simülasyonları ile hangi mutant enzimin koenzim bağlanmasında daha aktif olabileceği tahmin edilmiştir. Tablo 2.'de enzimin aktif bölge rezidülerinin esnek bırakılarak yapılan koenzim doklama sonuçları sunulmuştur.

Tablo 4.1. MD (30 ns) simülasyonu sonrası NADP⁺ nin doking sonuçları (aktif bölge flexible).

Enzim	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
Q223N	-13.0
Doğal tip	-12.3
Q223R	-12.3
Q223F	-12.0
Q223G	-11.9
Q223E	-11.6
Q223W	-11.5
Q223K	-11.4
Q223A	-10.9
Q223L	-10.9
Q223C	-10.8
Q223S	-10.7
Q223T	-10.7
Q223D	-10.4
Q223P	-10.4
Q223V	-9.9
Q223I	-9.8
Q223H	-9.7
Q223M	-8.8

4.2.2 İkinci Kısım MD Simülasyonları

Bu kısımda MD süresi 15 (veya 10) ns, kuvvet alanı olarak Gromos54a7, simülasyon kutusu oluşturulurken enzim ile kutu arasındaki mesafe 5 nm olarak alınmıştır ve toplam su moleküllerinin sayısı artırılmıştır. Ayrıca Gromacs'ın 4.6.5 versiyonu kullanılmıştır. Bu kısımda sadece deneysel olarak aktivitesi yüksek olan bazı mutasyonlar için hesaplamalar yapılmıştır.

MD simülasyonlarının bazı sonuçları **EK 2'de** verilmiştir. Bu sonuçlar, RMSD (Root Mean Square Deviation), RMSF ((Root Mean Square Fluctuation), hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi hakkında bilgi vermektedir.

MD simülasyonu boyunca enzim, enzimin omurgası (backbone), NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerlerine bakıldığında, NADP⁺ ve format yapılarında çok büyük bir değişim olduğu gözlenmemektedir. Enzim ve backbonedeki nispeten büyük RMSD değişimi, enzim ve backbone üzerinde bulunan yüklü amino asit yan zincirlerinin su molekülleriyle etkileşmesi ve bu nedenle denge konformasyonuna daha yavaş ulaşmasından kaynaklanmaktadır.

MD simülasyonu boyunca enzimdeki amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri sunulmuştur. Şekillerden de görüleceği üzere başlangıç yapılarından daha fazla sapan birimler aktif bölgenin dışında kalan aminoasitlerdir. Bu da enzimin 3 boyutlu yapısının genel olarak korunduğu anlamına gelir. Bu sonuçlar hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi resimleriyle de uyumludurlar.

MD simülasyonlarından elde edilen sonuçlar özellikle koenzimin ve formatın enzimle yapmış olduğu hidrojen bağları açısından değerlendirildiğinde oldukça ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar **EK 3** 'de tablolar halinde ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Genel olarak tablolarda belirtilen hidrojen bağları ile deneysel sonuçlar birleştirildiğinde şu yorumlar yapılabilir:

Enzimin NADP^+ açısından katalitik etkisinin doğal tipte yani Q223 (wild type) , Q223R, Q223K, Q223V ve Q223M mutantlarında diğer mutantlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Q223N ise yaklaşık olarak hem NADP^+ hem de NAD^+ açısından eşit katalitik etki göstermiştir. Bu durum formatın enzimle yapmış olduğu hidrojen bağları irdelenerek açıklanabilir. Q223 (wild type) , Q223R ve Q223N enzimlerinde, formatın enzimle yapmış olduğu en önemli hidrojen bağları Asn146 ve Ser334 aminoasitleri ile olanlarıdır. Formatın, enzimin Asn146'i ile yaptığı hidrojen bağı enzimin NADP^+ açısından katalitik etkinliğini arttırmaktadır. Q223N ve Q223R'de, formatın Arg284 ve His332 ile yaptığı hidrojen bağları hem NADP^+ ve NAD^+ açısından hem de format açısından eşit katalitik etkiye sebep olduğu düşünülmektedir. Q223 (wild type) , Q223R ve Q223N enzimlerinin ortak özelliği ise Q, R ve N aminoasitlerinin bazik ve amid özelliğine sahip olmalarıdır. Pozitif yüklü bu aminoasitler formatın yapmış olduğu hidrojen bağları formatın negatif yükünü stabilize etmektedir.

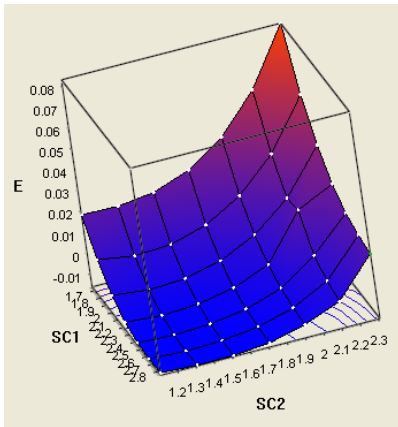
Q223K, Q223V mutan enzimlerinde, format Ser149 ile birden fazla hidrojen bağı yapmaktadır. Her iki enzimde NADP^+ olması durumunda Ser149 ile daha fazla hidrojen bağı yapmaktadırlar ve NADP^+ açısından katalitik etki daha yüksek olmaktadır. Hidrofobik olan valin (V) daha çok küçük ve nükleofilik özellikteki serin ve glisinle hidrojen bağı yaparak NADP^+ açısından katalitik etki artmaktadır.

Q223G ve Q223C mutantlarında ise Ser149 ile NAD^+ varlığında hidrojen bağı yapılmaktadır ve katalitik etki bu durumda format ve NAD^+ açısından katalitik etki daha yüksek olmaktadır. Q223T mutantında ise (NADP^+ varlığında) formatın Arg343 ile yaptığı iki adet hidrojen bağı formatın negatif yükünü stabilize ederek NADP^+ açısından katalitik etkinin artmasına yol açmaktadır.

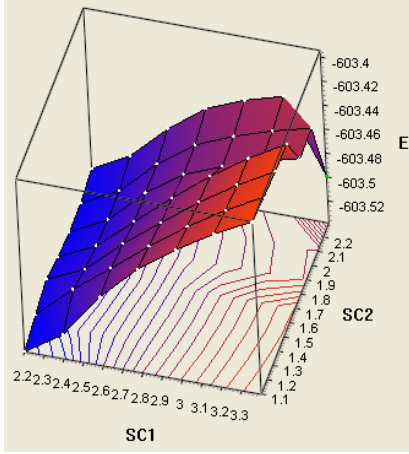
4.3 QM/MM Hesaplama Sonuçları

QM/MM hesaplamaları ile, format iyonundan hidrojenin, NADP+'nin C4 atomuna transferi potansiyel enerji haritaları çıkartılarak araştırılmıştır. Bu haritalar çıkartılırken öncelikle enzimin aktif bölgesini tamamı, format iyonu ve NADP+'nin tamamı hesaplamalara dahil edilmiştir. Ancak NADP+'nin çok büyük olması dolayısıyla nikotinamid tarafından riboz halkasından sonraki metil grubundan kesilerek hidrojenle kesilen kısım kapatılmıştır. Reaksiyonun gerçekleştiği format ve NADP+'nin hesaplamaya dahil edilen kısmı quantum mekaniksel B3LYP/6-21G* veya 3-21G* ile, aktif bölge aminoasitleri ise moleküler mekanik kuvvet alanı olan UFF ile hesaplanmıştır. Potansiyel enerji haritaları çıkartılırken reaksiyon koordinatları olarak formatın C-H bağı 0.2 Å azaltılırken formatın hidrojeni ile NADP+'nin C4 atomu yani hidrojenin transfer olacağı atom arasındaki uzaklık ise 0.2 Å artırılmıştır.

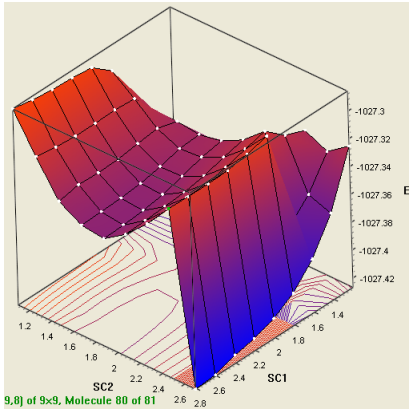
Çeşitli sebeplerden dolayı projenin son aylarında gerçekleştirilen QM/MM çalışmaları sırasında çok sayıda denemeler yapılmıştır. Yapıların çok büyük olması dolayısıyla çok büyük zorluklarla elde edilen potansiyel enerji haritaları sadece doğal tip enzim (Q223wt), Q223N ve Q223F mutant enzimleri üzerinde üretilebilmiştir. Bu haritalar yardımıyla tahmin edilen geçiş hali yapılarından yola çıkılarak elde edilen reaksiyon bariyer enerjileri bize adı geçen mutant enzimlerinin katalitik aktivitesi hakkında bilgi vermiştir. Buna göre, Q223wt, Q223N ve Q223F mutant enzimlerinin reaksiyon bariyer enerjileri sırasıyla, 56.48, 90.36 ve 445 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu enerjiler enzimde kofaktör olarak NADP+ varken hesaplanmıştır. Dolayısıyla deneysel yolla elde edilen değerle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Q223F-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası.



Şekil 4.4. Q223N-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası.



Şekil 4.5. Q223wt-NADP-format yapısına ait potansiyel enerji haritası.

5.SONUÇ

Bsp383FDH bilinen diğer format dehidrogenazların aksine nikotinamid kofaktörlerinden NADP⁺ yi NAD⁺ ye tercih etmektedir. Böyle bir özelliğin oluşu büyük ölçüde kofaktör bağlanma bölgesinde bulunan glutamin aminoasitinin varlığından kaynaklanmaktadır (Q223). *Burckholderia sp.* den elde edilen ve Bsp383 FDH olarak isimlendirilen enzime ait aktivite ve kinetik işlemleri. Doç. Dr. Ayhan Çelik'in de içinde bulunduğu bu çalışma grubundan tarafından tamamlanmıştır.

Deneyisel çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre Q223 doğal tip ve aktivite gözlenen G, A, V, S, T, C, M, N, R, ve K mutant enzimlerinde genel olarak kofaktör tercihi NADP⁺ yönündedir. Q223G ve N mutantları hem NAD⁺'i hem de NADP⁺'i eşit tercih etse de NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre önemli bir geliştirme gözlemlendi. Sadece Q223R'de NAD⁺'nin afinite değerinde doğal tipe göre azalma gözlemlendi.

Kullanılan nikotinamid kofaktörünün çeşidinin format bağlanmasına etkisi olduğu söylenebilir. Çoğu mutant enzimler için, NAD⁺ kullanıldığı durumlarda formatın aktif bölgeye daha kuvvetli bağlandığı söylenebilir

6.KAYNAKLAR

1. Tishkov, V.I. and V.O. Popov, Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry-Moscow*, 69(11), 1252-1267, 2004.
2. Tishkov, V.I. and V.O. Popov, Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering*, 23(2-3), 89-110, 2006.
3. Hummel, W., Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends in Biotechnology*, 17(12), 487-492, 1999.
4. Belenky, P., K.L. Bogan, and C. Brenner, NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 12-19, 2007.
5. Pollak, N., C. Dölle, and M. Ziegler, The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem J*, 402(2), 205-218, 2007.
6. Unden, G. and J. Bongaerts, Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(3), 217-234, 1997.
7. Scrutton, N.S., Berry, A., Perham, R.N. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343:38–43, 1990.
8. Fan, F., Lorenzen, J.A., Plapp, P.V. An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry* 30:6397–6401, 1991.
9. Feeney, R., Clarke, A.R., Holbrook, J.J. A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 166:667–672, 1990.
10. Vuorilehto, K., S. Lütz, and C. Wandrey, Indirect electrochemical reduction of nicotinamide coenzymes. *Bioelectrochemistry*, 65(1), 1-7, 2004.
11. Labrou, N.E., D.J. Rigden, and Y.D. Clonis, Characterization of the NAD⁺ binding site of *Candida boidinii* formate dehydrogenase by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry*, 267(22), 6657-6664, 2000.
12. Klyushnichenko, V., V. Tishkov, and M.R. Kula, Rapid SDS-GEL capillary electrophoresis for the analysis of recombinant NADP⁺-dependent formate

- dehydrogenase during expression in *Escherichia coli* cells and its purification. *Journal of Biotechnology*, 58(3), 187-195, 1997.
13. Wu, W.H., D.M. Zhu, and L. Hua, Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida bodinii* creating effective NADP(+)-dependent FDH enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 61(3-4), 157-161, 2009.
 14. Krix, G., Bommarius, A. S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm M. and Kula M. R., Enzymatic reduction of [alpha]-keto acids leading to l-amino acids, d- or l-hydroxy acids. *Journal of Biotechnology*, 53(1), 29-39, 1997.
 15. Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann A. F. and Kula M. R., Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration (Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, vol 23, pg 2789-2802, 1981). *Biotechnology and Bioengineering*, 67(6), 791-804, 2000.
 16. Shaked, Z. and G.M. Whitesides, Enzyme-Catalyzed Organic-Synthesis - NADH Regeneration By Using Formate Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 102(23), 7104-7105, 1980.
 17. Popov, V.O. and V.S. Lamzin, NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase (Vol 301, Pg 625, 1994). *Biochemical Journal*, 302, 967-967, 1994.
 18. Labrou, N.E., Improved purification of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Bioseparation*, 9(2), 99–104, 2000.
 19. Colas des Francs-Small, C., F. Ambard-Bretteville, and I.D. Small, Re'my, R., Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. *Plant Physiol.*, 102(4), 1171–1177, 1993.
 20. Weerasinghe, P.A., M. Weerasekera, and L.H.J. Van Holm, Use of isoenzymes to differentiate growth categories of *Pericopsis mooniana* trees. *Biologia Plantarum*, 42(4), 541-547, 1999.
 21. Popov, V.O. and V.S. Lamzin, NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 301, 625-643, 1994.
 22. Hermes, J.D., Morrical, S.W., O'Leary, M.H., Cleland, W.W., Vaiation Of Transition-State Structure As A Function Of The Nucleotide In Reactions Catalyzed By Dehydrogenases .2. Formate Dehydrogenase. *Biochemistry*, 23(23), 5479-5488, 1984.
 23. Rotberg, N.S. and Cleland W. W., Secondary N-15 Isotope Effects On The Reactions Catalyzed By Alcohol And Formate Dehydrogenases. *Biochemistry*, 30(16), 4068-4071, 1991.
 24. Tapia, O., J. Andrés, and R. Cardenas, Transition structure for the hydride transfer reaction from formate anion to cyclopropenyl cation: a simple theoretical model for

- the reaction catalyzed by formate dehydrogenase. Chemical Physics Letters, 189(4-5), 395-400, 1992.
25. Schiott, B., Y.J. Zheng, and T.C. Bruice, Theoretical investigation of the hydride transfer from formate to NAD^+ and the implications for the catalytic mechanism of formate dehydrogenase. Journal of the American Chemical Society, 120(29), 7192-7200, 1998.
 26. Torres, R.A., B. Schiott, and T.C. Bruice, Molecular dynamics simulations of ground and transition states for the hydride transfer from formate to NAD^+ in the active site of formate dehydrogenase. Journal of the American Chemical Society, 121(36), 8164-8173, 1999.
 27. Castillo, R., Oliva, M., Marti S. and Moliner V., A theoretical study of the catalytic mechanism of formate dehydrogenase. Journal of Physical Chemistry B, 112(32), 10012-10022, 2008.
 28. Polshakov, V.I., Biekofsky, R. R., Birdsall, B. and Feeney J., Towards understanding the origins of the different specificities of binding the reduced (NADPH) and oxidised (NADP^+) forms of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate coenzyme to dihydrofolate reductase. Journal of Molecular Structure, 602-603(0), 257-267, 2002.
 29. Cummins, P.L. and J.E. Gready, Computational methods for the study of enzymic reaction mechanisms. II. An overlapping mechanically embedded method for hybrid semi-empirical-QM/MM calculations. Journal of Molecular Structure-Theochem, 632, 247-257, 2003.
 30. Cummins, P.L. and J.E. Gready, Computational methods for the study of enzymic reaction mechanisms III: A perturbation plus QM/MM approach for calculating relative free energies of protonation. Journal of Computational Chemistry, 26(6), 561-568, 2005.
 31. Cummins, P.L., Greatbanks, S. P., Rendell A. P. and Gready J. E., Computational methods for the study of enzymic reaction mechanisms. 1. Application to the hydride transfer step in the catalysis of dihydrofolate reductase. Journal of Physical Chemistry B, 106(38), 9934-9944, 2002.
 32. Davis, B.G., Celik, A., Davies, G.J., and Ruane, K.M. Novel Enzyme. Application No.: PCT/GB2009/051320 *Unpublished (filing date: 06.10.2009)*.
 33. Trott, O., and Olson, A.J. (2010). Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. Journal of Computational Chemistry 31, 455-461.)
 34. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry 25, 1605-1612.

35. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30, 2785-2791.
36. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.
37. Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D., and van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91, 43-56.
38. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A.E., and Van Gunsteren, W.F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1656-1676.
39. Schmid N., Eichenberger A.P., Choutko A., Riniker S., Winger M., Mark A.E., van Gunsteren W.F., "Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7", *Eur Biophys J.* (2011) 40 p:843-56.
40. Huang W., Z. , and van Gunsteren W.F., "Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to β -Peptide Folding", *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, 7 (5), pp 1237–1243.
41. Gaussian 09, R.A., M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
42. Lamzin, V.S., Dauter, Z., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H., And Wilson, K.S. (1994). High Resolution Structures Of Holo And Apo Formate Dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* 236, 759-785.

Alignment: D:\BELGELERIM\PROJELER\112T538\Bsp383FDH-Mut T7R-RC for all active mutants-aligned.fas

[illegible]

R-PRIMER-R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M12 T7R-RC	CG-CG-ACTC	GTCC-GCTGC	GTGTCC--GC	GCGC-TCGGC	T-GCGCGG--	CTACATGGAG	-GCGCACGA-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M20 T7R-RC	CG-CG-ACTC	GTCC-GCTGC	GTGTC---GC	GCGC-TCG-C	T-GCGCG---	CTACATGA--	-GCGCACGA-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AAAGGA
M33 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M35 T7R-RC	CG-CG-ACTC	GTC--GCTGC	GTGTCCG-GC	GCGC-TCGGC	TTGCGCGG--	CTACATGA--	-GCGCACGG-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M36 T7R-RC	CG-CG-ACTC	GTC--GCTGC	GTGTCC--GC	GCGC-TCGGC	T-GCGCG---	CTACATGA--	-GCGCACGG-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M40 T7R-RC	CG-CGAACTC	GTC--GCTGC	GTGTCCCGGC	GCGC-TCGGC	T-GCGCGG--	CTACATGGAG	-GCGCACGA-	--C-ACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M43 T7R-RC	CA-CGA-CT-	GTCG--CTGC	GGGTTTCG--C	GCGC-TCG--	CTGCGCGG--	CTACATGA--	-GCGCACG--	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-G-A
M47-A T7R-	CG-GCGACTC	GTC--GCTGC	GTGTCC--GC	GCGC-TCGGC	TTGCGCGG--	CTACATGGAG	-GCGCACGG-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AAAGGA
M47-B T7R-	-----	-----	--GCTT---C	GGGC-TTGGC	GGGGGGGCTA-	ACATGGGAGG	GGCGCAACGG	CCACCACGCT	--GATCG--T	CAC-GAGGCG	AACAAAGGAA
M49 T7R-RC	CG-CGAACTC	GTC--GCTGC	GTGTCC--GC	GCGC-TCGGC	T-GCGCGG--	CTACATGA--	-GCGCACGG-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M53 T7R-RC	AGGATCCGGG	CGAACTCGTT	CTGACT---G	CGGT-TCCGG	TCGCGCTCG-	CCTGCGCGCT	ACCATTTGGAG	GCGCACATCA	CACGCTTGAT	CCGTCACGAG	CGACAAGGAC
M54 T7R-RC	GTTACGGCCT	AGCGTGTGTT	CAGACG---C	-CTC-CAGAC	TGGCGCCGA-	CTACATGAGA	GGCGCC-ACG	GCACCACCGC	-TTGATCGTT	CAACGGAGCG	AC--AAGGAC
M57 T7R-RC	GGTCCGGACT	GGCG-GTGTG	AGGCCG---C	GCCT-TCGGC	TTGCGGCGC-	CTAACATGGA	GGCGCCCACC	GGCCAACCAC	GCTGATCGT-	CAACGAGGCG	AC--AAGGAC
M61 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M63 T7R-RC	TCCCGCGAAC	TCGGTTTCGGC	TAGCGT---G	TCCA-GCGCG	CCTCGGCCT-	GCGCGCTACC	ATTGGAAGGC	GCAACGCACC	ACCGCTGATT	CGTTCACGAG	CGACAAGGAC
M65 T7R-RC	TCCGGACTION	CGTGT-CAGC	GCGCCT---C	GGCC-TTTGC	GCGC--CTA-	CCATGA-AGG	CGC-CACA--	TCACCACGCT	-GAATCCGTT	CAC--GAGCG	AC--AAGGAC
M67 T7R-RC	AGTT-CGGCT	AGCGGTTGCA	G----C---G	GCGC-TCG-C	CTGCG-CGA-	C-TACAT--G	GAGGCGCAC-	GGCCA--CAC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGG-A
M68 T7R-RC	GTT-----CG	ACTGCGTGTC	-AGTCG---C	GCTC---GAC	CTGCGCGAC-	TTACCATGAA	GTCGCC-ACG	GTCCCACACC	GCTGATTCTG	TCACG-AGCG	AC--AGGGAC
M70 T7R-RC	GG-CGAACTC	GTC--GCTGC	GTGTCCAGTC	GCGC-TCAGC	CTGCGCGG--	CTACATGAAG	-GCGCACGG-	--T-ACA--C	GCTGATCCG-	TTACGAGCG	AC--AA-GGA
M72 T7R-RC	GG-CGAACTC	GTC--GCTGC	GTGTCCG-GC	GCGC-TCGGC	TTGCGCGG--	CTACATGGAG	-GCGCACGG-	--CCACCA-C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M73 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M79 T7R-RC	CGGCGA-CTC	GTCA--CTGC	GGGTTTCGGCC	GCGCCTCG--	CTGCGCGGG-	CTACATGGAG	GGCGCACGG-	--CCACCACC	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-G-A
M89 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M90 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M93 T7R-RC	TC---GCCTG	CGTGTACGGC	GCGCTC---G	GCCT-TTAGC	ACGCG-CTA-	CCATGG-AAG	GGCGCACCGC	CCACCACGCT	TGGATTCTGTT	CACCGAGGCG	ACCAAGGGAC
M102 T7R-R	CGCCGA-CTC	GTCCGCCTGC	GTGTCCGG-C	GCGC-TCGGC	TTGCGCGG--	CTACATGGAG	-GCGCACGG-	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M105 T7R-R	CGTT-CGCTG	CG-TGTCCCG	G-----C	GCGC-TCGGC	TTGCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGG-CGCAC-	GGCCAC--AC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGGGA
M107 T7R-R	CGTCCGGCTG	CG-TGTCCCG	G-----C	GCGC-TCGGC	T-GCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGGGCGCAC-	GGCCACCACC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGG-A
M109 T7R-R	CGTC-GGCTG	CG-TGTCCCG	-----C	GCGC-TCGGC	T-GCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGG-CGCAC-	GGCCAC--AC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGG-A
M110 T7R-R	CGTC-CGCTG	CG-TGTCCCG	-----C	GCGC-TCGGC	T-GCG-CG--	C-TACAT-GG	AGG-CGCAC-	GACCAC--AC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGGGA
M131 T7R-R	CGTC-GCCTG	CG-TGTCCCG	-----C	GCGC-TCG-C	TTGCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGGGCGCAC-	GGCCA--CAC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGG-G
M136 T7R-R	CGATCTGCCG	CGCGGTTTACG	CCGAACTGTC	GACTION-CGGT	CAGCGCCTCG	CTTGCGCGGC	TACATGGAGC	CAACGCCACC	GCTGATCGT-	--CACGAGCG	AA--CAAGGA
M137 T7R-R	CG-CG-ACTC	GTC--GCTGC	GTGTC---GC	GCGC-TCGGC	TTGCGCG--	CTACATGGAG	-GCGCACG--	--CCACA--C	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M138 T7R-R	CGTC-GCCTG	CG-TGTCC--	G-----C	GCGC-TCGGC	TTGCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGG-CGCAC-	GGTCCACCAC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAAG-G
M142 T7R-R	AGTC-GGCTG	CGGTGTTCCC	GGCCGC---C	GCCT-TCGGC	TTGCGGCGG-	CCTACATTGG	AAGGCGCACC	GGCCAA-CAC	GCTGATCGTC	AA--CGAGCG	AC--AAGG-A
M143 T7R-R	CGCCGAACTC	GTCGGGCTGC	GTGTCCGG-C	GCGCTCGGGC	TTGCGCGGG-	CTACATGGAG	GGCGCACGG-	--CC-CACAC	GCTGATCG--	-TCACGAGCG	AC--AA-GGA
M144 T7R-R	CGTC-GGCTG	CG-TGTCC--	G-----C	GCGC-TCGGC	TTGCG-CGG-	C-TACAT-GG	AGG-CGCAC-	GGCCAC--AC	GCTGATCGTC	A---CGAGCG	AC--AAGG-A

											
	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
F-PRIMER	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-PRIMER-R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M12 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTG	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCCGAGCGC
M20 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTG	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCCGAGCGC
M33 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GCG	TACCTTGACG	GCC-GGAG-C
M35 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTG	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCCGAGCGC
M36 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTG	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCCGAGCGC

M40 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M43 T7R-RC	CAGCCC-GAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCAGCGC
M47-A T7R-	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M47-B T7R-	CAGC-CCCCG	ACT--CCGAG	TT-CGAGCGC	-CCGGCTGCC	C-GGAAGCCG	GAACGGTGGT	GATCTCGCAG	G--CCATT--	CTGGCCCGCG	TAC-TGGACG	GGC-CGAG-C
M49 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M53 T7R-RC	AGCCCCGACT	CCC-----	GAGTTCGAGC	GCCGGCTGCC	C---GAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	-TGGCCCGCG	TACC-TGACG	GCC-CGAG-C
M54 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----GA	AGTTCGAGGC	GCCGGCTGGC	C--GAAGGCC	GACGT--GGT	GATCTCGGCA	G--CCATTC-	TGGGCCCGCG	TACC-TGACG	GAC-CCGAGC
M57 T7R-RC	-AGCCCCGAC	TC-----GG	AGTTCGAAGC	GCCGGCCTGC	CCCGAAGCCC	GACGGTGGGT	GATCTCGCCA	G--CCATTCC	TGGGCCCGCG	TACC-TGACG	G-C-CGAGCC
M61 T7R-RC	-----	-----	-----CAC	GCCGACTCCA	GTACAGGGCC	GTTGTCGGAA	ACCGACGTGA	G-TTCGCAGC	AATTGCCTGG	TACT--GAAC	GCCGAGGGCC
M63 T7R-RC	AGCCCCGACT	CCC-----G	AGTTTCGAGC	GCCGGCTGCC	C---GAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	-TGGCCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M65 T7R-RC	AG---CCCCG	ACT-CCCGAG	TT-CGAGCGC	-CCGGCTGCC	C-GAAAGCCC	GACG--TGGT	GATCTCGCAG	---CCATT-C	TGGGCCCGCG	TACC-TGACG	GGC-CGAG-C
M67 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--GAAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M68 T7R-RC	--AGCCTGAC	TC-----G	AGTTCCGAGC	GCCGGCTGCC	----GAAGCC	GACGT-GGGT	GATCTCG-CA	G--CCATTC-	-TGGCCCGCG	TACC-CTGAA	CGG-CCGAGC
M70 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTTTCGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAAAGCC	GACGT-GGGT	GATCTCGCAG	---CCCATT	TGGGCCCGCG	TACC-TGACG	GCCCAGCGC
M72 T7R-RC	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M73 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M79 T7R-RC	CAGCCC-GAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCG-CTGCC	---GAA-GCC	GACGT-G--T	GATCTCGCAG	---CC-AT-C	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M89 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M90 T7R-RC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M93 T7R-RC	AAGCCCCCG	ACTTCCCGAG	TTTCGGACGC	GCCGGCTGCC	CCGAAAGCCC	GACCGTTGGT	GATCTCGCCA	GGCCCATTT	TGGGCCCGCG	TACCCTGACG	GCC-CGAGGC
M102 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M105 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M107 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGGGCCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M109 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M110 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGGCTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M131 T7R-R	ACAGCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGGCTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATTC-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M136 T7R-R	CAGC-CGGAC	TC-----G	AGTC--GAGC	-CCGGCTGCC	G---GAAGCC	GACGT--GGT	GATTCTGCAG	----CTATT	TG--CCCGCG	TACT--GACG	GCG--AGCGC
M137 T7R-R	CAGCCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCCCAGCGC
M138 T7R-R	ACAGCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATT-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M142 T7R-R	CAGCCCGAC	TCC-----G	AGTTTCGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGTA-GGT	GATCTCGCAG	---CCATT-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M143 T7R-R	CAGCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGGCTGCC	C--GAA-GCC	GACGT-GG-T	GATCTCGCAG	---CC-ATTC	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC
M144 T7R-R	CAGCCCGAC	TCC-----G	AGTT-CGAGC	GCCGG-CTGC	C--CGAAGCC	GACGT--GGT	GATCTCGCAG	---CCATT-	TGG-CCCGCG	TACC-TGACG	GCC-GAGCGC

											
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
F-PRIMER	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-PRIMER-R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M12 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M20 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M33 T7R-RC	GCA--TCGCC	CGGCGCGCCG	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGG-CCCG	CCATCAGCTC	CGGATCACGT	-CGATCTCGA	TGCCGCCCGC	CCGGGCCCCG	CATTACC-GT
M35 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M36 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M40 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M43 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCCCCG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M47-A T7R-	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M47-B T7R-	GCA--TCGCC	CG-CGCGCCG	AAGCTGAAAG	CTCG--CGCT	GACGG-CCGG	C-ATCGGCTC	CGGATCACGT	-CGATCTCGA	TGCCGCCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M49 T7R-RC	ATC-----GC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGGCC-GG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT
M53 T7R-RC	GCA---TCGC	CCGCGCGCC-	GAAGCTGAAG	CTCG--CGCT	GACGG-CCGG	C-ATCGGCTC	C-GATCACGT	-CGATCTCGA	TGCC-GCCGC	CCGGGCCC-G	CATTACC-GT

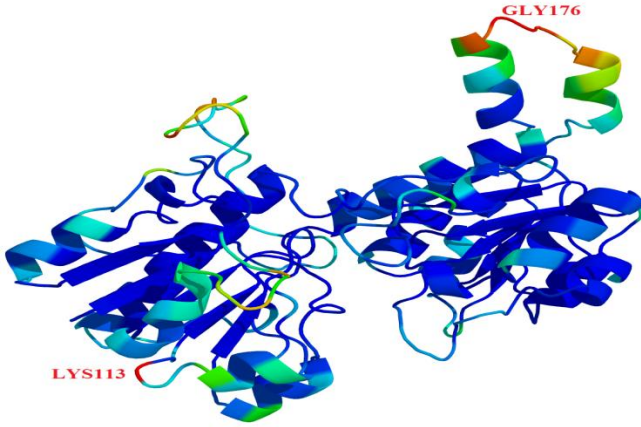
[illegible]

F-PRIMER												
R-PRIMER-R												
M12	T7R-RC	ATGCTGGTTC	GACGGCAAGC	CGATCCGCAA	CGAATACCTG	ATCGTCGACG	GCGGCACGCT	CGCGGGGAACG	GGCGCGCAGT	CGTACCGGCT	GACGCTCGAG	CACCACCACC
M20	T7R-RC	ATGCTGGTTC	GACGGCAAGC	CGATCCGCAA	CGAATACCTG	ATCGTCGACG	GCGGCACGCT	CGCGGGGAACG	GGCGCGCAGT	CGTACCGGCT	GACGCTCGAG	CACCACCACC

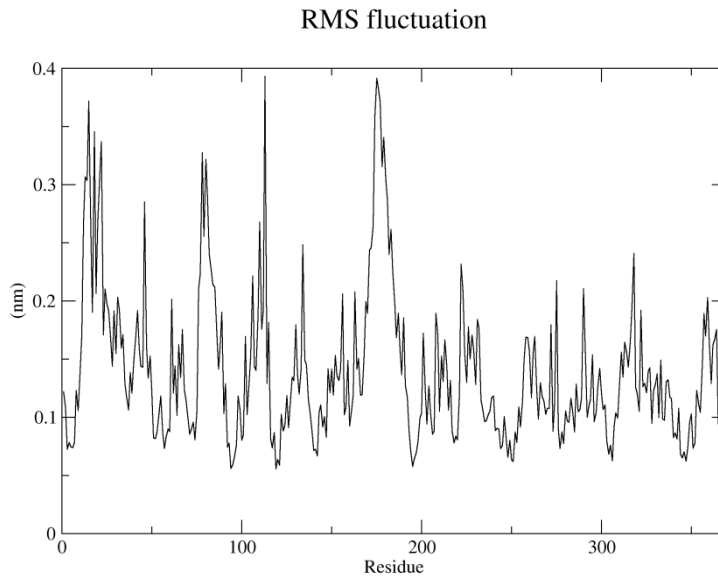
		1220		1230		1240		1250		1260		1270	
F-PRIMER		-----											
R-PRIMER-R		-----											
M12	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	AA-GCAGT--							
M20	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	A--GCATTT-							
M33	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T--CTAACAA	AG--CCCGAA	AAGGGA---							
M35	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	AT-GCATT--							
M36	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	A--GCATT--							
M40	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAA---									
M43	T7R-RC	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	AGCTATT---							
M47-A	T7R-	ACCACC- ACT	GAGATCCG GC	T-GCTAACAA	AGCCCGAA AG	AA-GTTGATT	TT--						

M47-B T7R-	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AAGCCCCGAA	AAAGGAAGGC	AGGGGC-----	----
M49 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AG-TTGTTT-	-----	----
M53 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAA	GAATGTTT--	-----	----
M54 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAA	GAAGGCCAT-	-----	----
M57 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAA	GAATGGTT--	-----	----
M61 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AAGGTCT---	-----	----
M63 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCCGAA	AGGAAAGGTT	GT-----	----
M65 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG-CCCGAAA	GACGGT----	-----	----
M67 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCC--GAA	ATGGAGGGT-	-----	----
M68 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCC-GAAA	GAAGTCT---	-----	----
M70 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AG-GTAT---	-----	----
M72 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	GACGT-----	-----	----
M73 T7R-RC	ACCACGGA	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	GAAAGCTGAG	TGGGTCCCCA	CA-
M79 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAAC--	-----	-----	-----	----
M89 T7R-RC	ACCACCGAAT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	GAAAGCTGAT	TGGGTCCCCG	AAA
M90 T7R-RC	ACCGGG-AAT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCGAAAGG	AAACTGAATT	GTTCCCCC-	----
M93 T7R-RC	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	TTGCTAACAA	AG-CCCCGGA	AAGGAAAGGT	T-----	----
M102 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AGGCAGT---	-----	----
M105 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG--CCCGAA	AGAA-GTAGT	T-----	----
M107 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG--CCCGAA	AGAC-GCATT	-----	----
M109 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG-CCCCGAA	AGAC-GCAT-	-----	----
M110 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG--CCCGAA	AGGATGTAGT	T-----	----
M131 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCC--GAA	AGGAAGCCAT	-----	----
M136 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	-GCCAGAAAG	GATGTGAGTG	-----	----
M137 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AATGCTGGT-	-----	----
M138 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG-CCCCGAA	AGAA-GGCCG	T-----	----
M142 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCCGAA	AAGGAAGGGC	AGTTC-----	----
M143 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AGCCCCGAAAG	AGCAGT----	-----	----
M144 T7R-R	ACCACC-ACT	GAGATCCGGC	T-GCTAACAA	AG--CCCGAA	AGAA-GCAGT	T-----	----

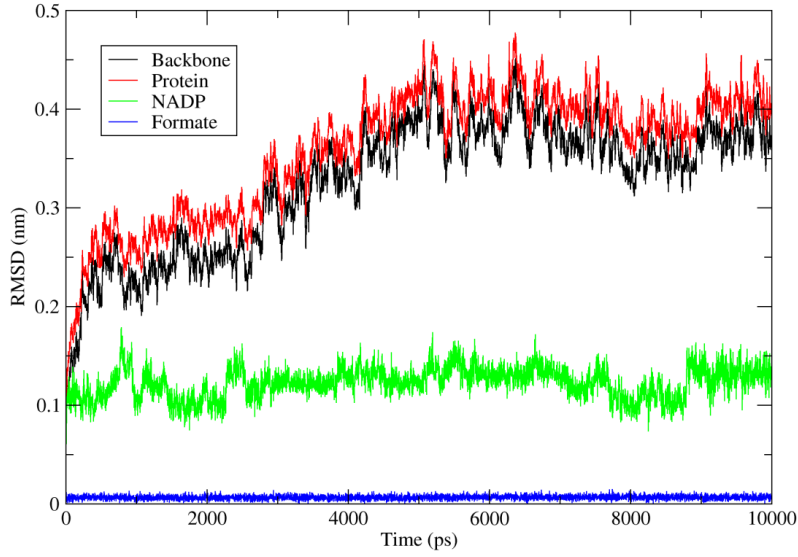
EK2.



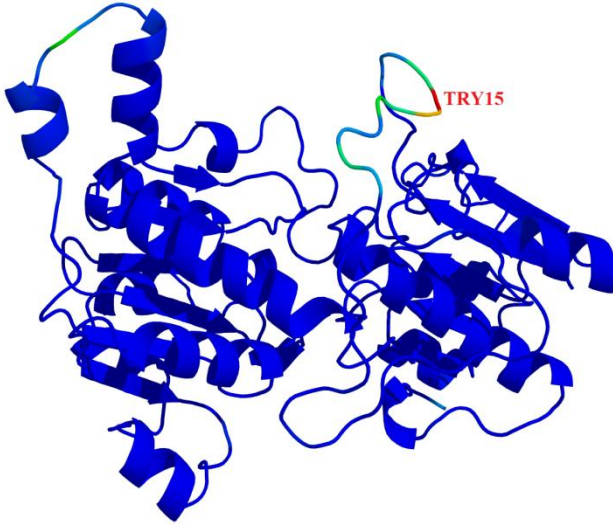
Şekil 3.1. Q223wt-NADP⁺ mutanđı için 10 ns MD simülasyonu sırasında mutanđ enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değeriğine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



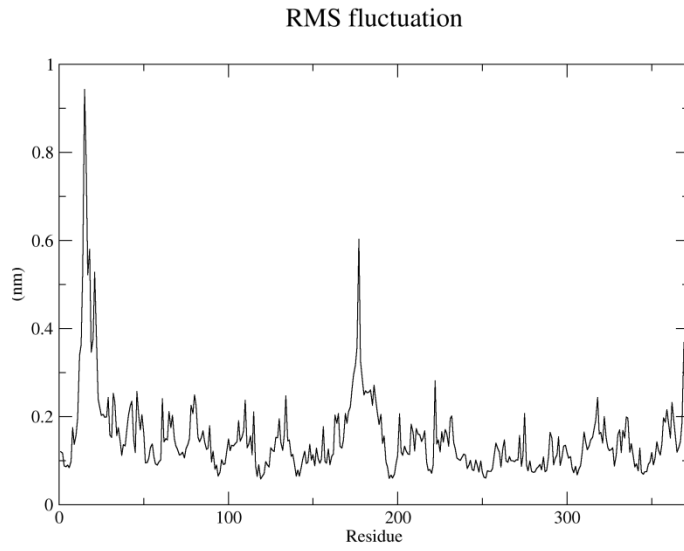
Şekil 3.2. Q223wt-NADP⁺ mutanđı için 10 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değışimini gösteren RMSF değeriği.



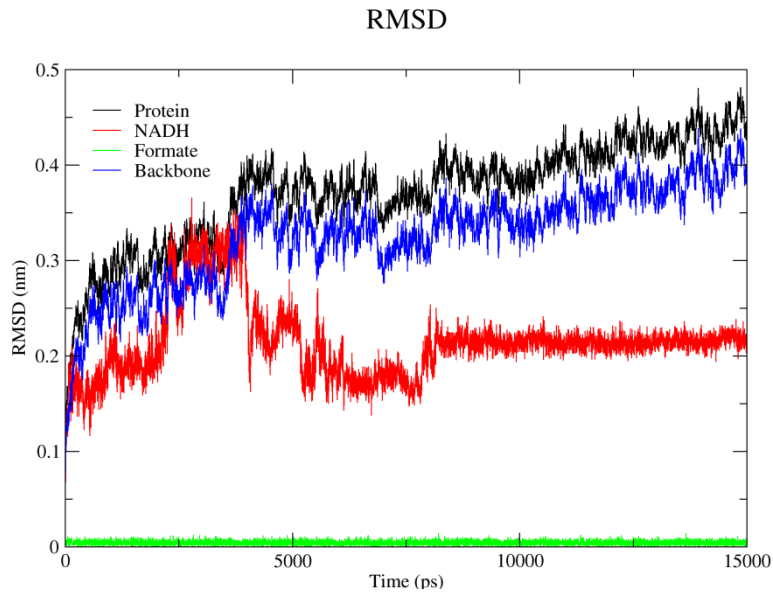
Şekil 3.3. Q223wtNADP⁺ mutan ı için 10ns MD sim lasyonu boyunca Q223, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



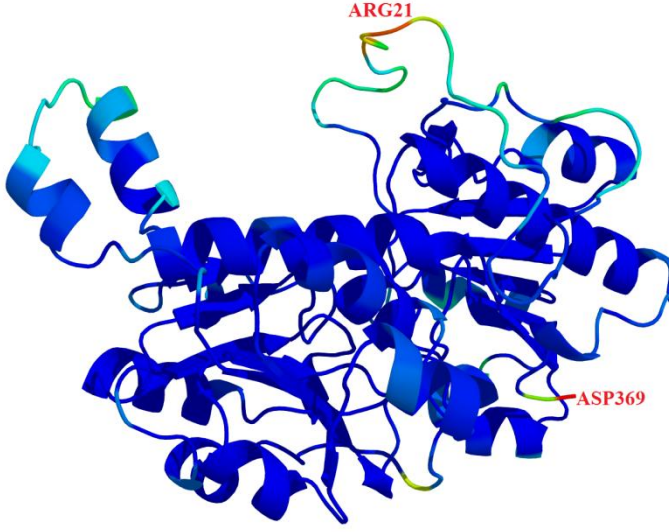
Şekil 3.4. Q223wt-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



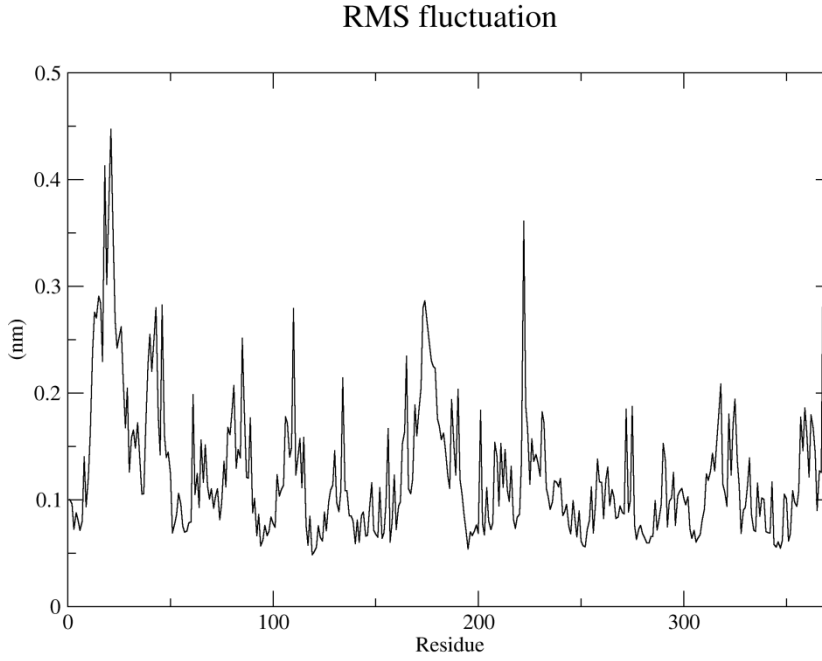
Şekil 3.5. Q223wt-NAD⁺ mutan⁺ için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



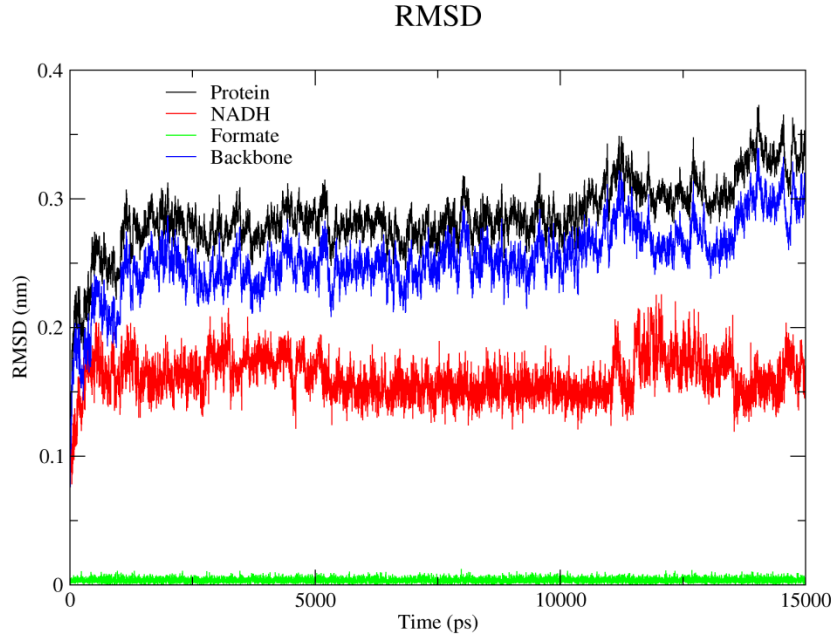
Şekil 3.6. Q223wtNAD⁺ mutan⁺ için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



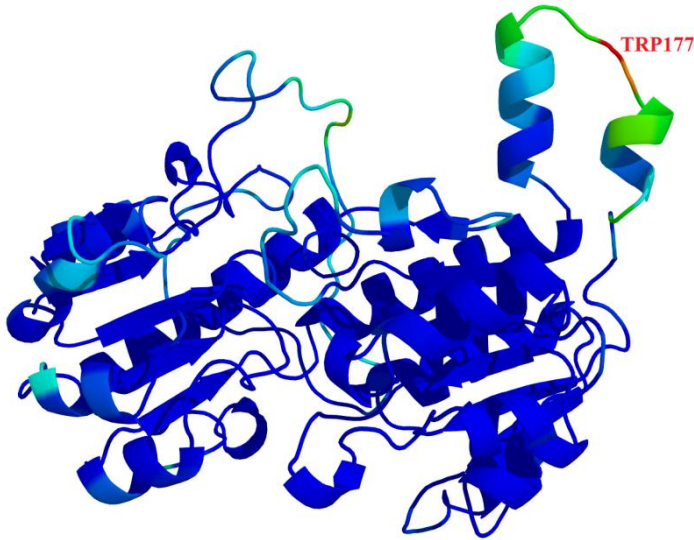
Şekil 3.7. Q223G-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



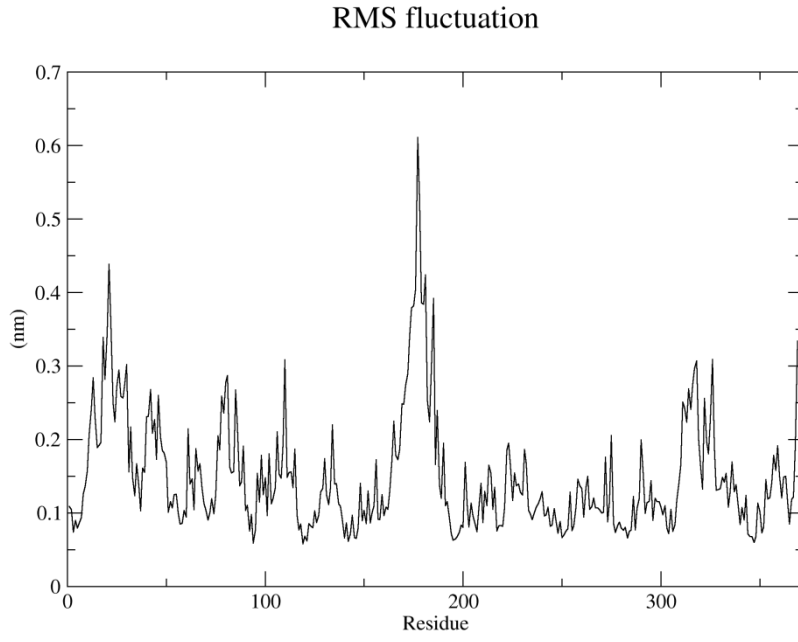
Şekil 3.8. Q223G-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



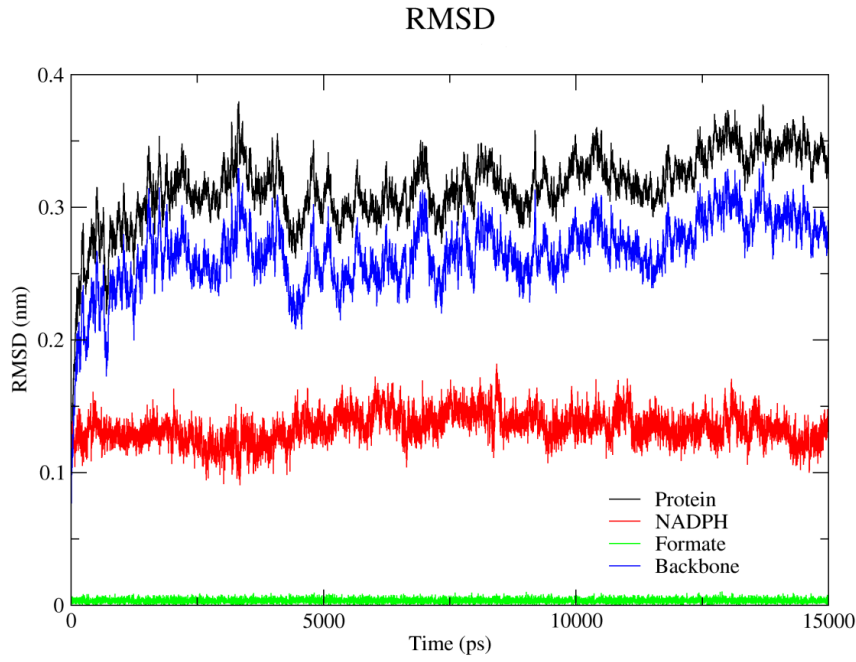
Şekil 3.9. Q223G-NAD⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223G, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



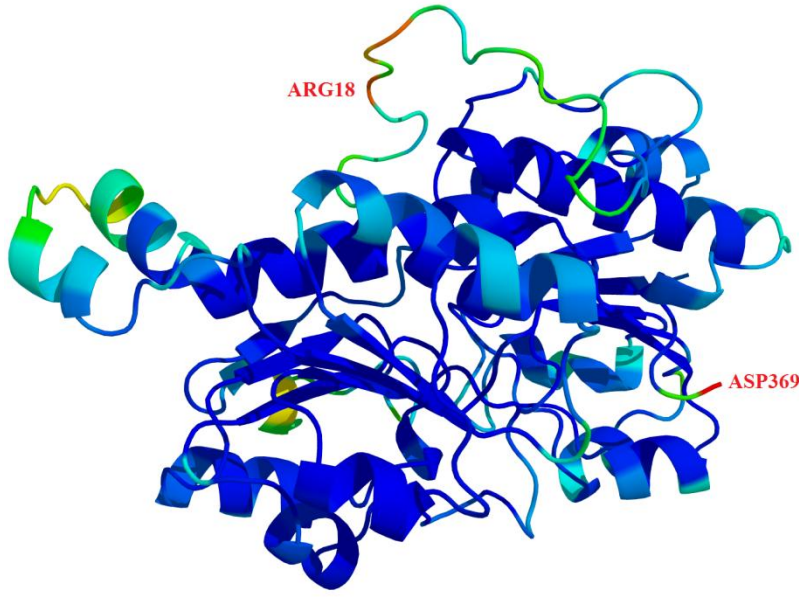
Şekil 3.10. Q223G-NADP⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



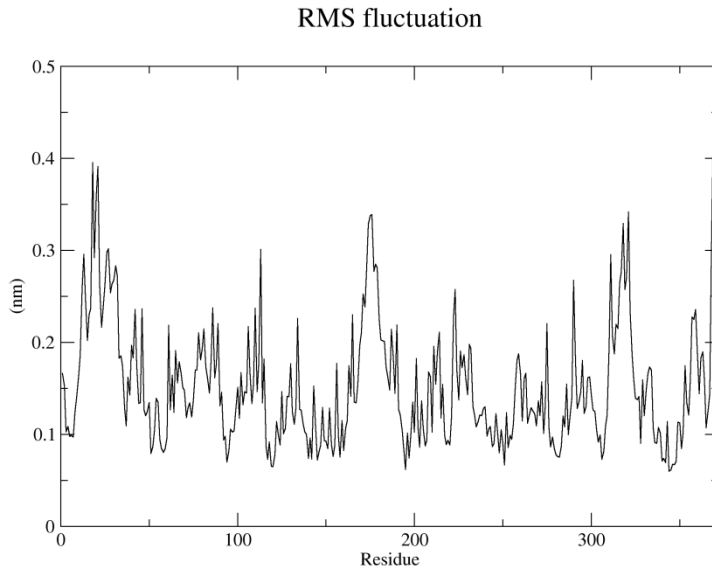
Şekil 3.11. Q223G-NADP⁺ mutan^tı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



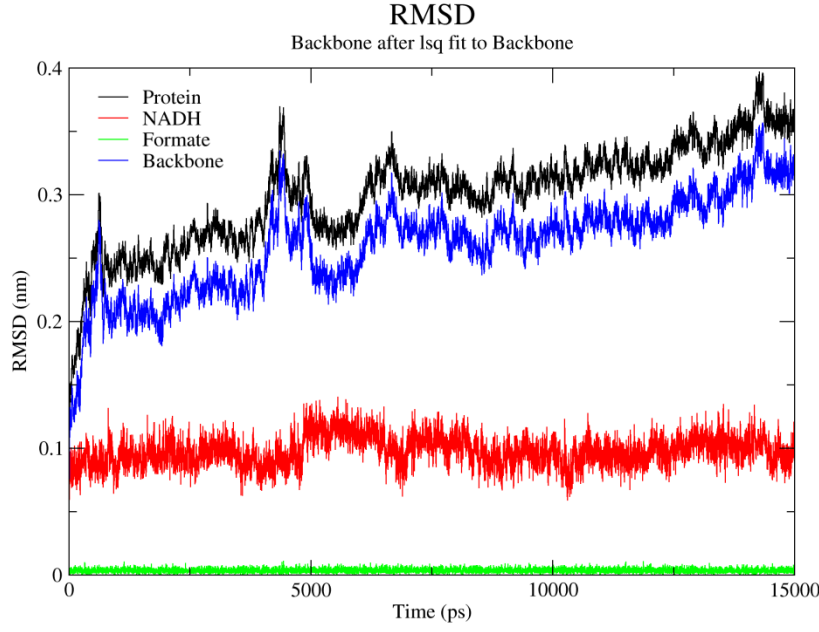
Şekil 3.12. Q223G-NADP⁺ mutan^tı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223G, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



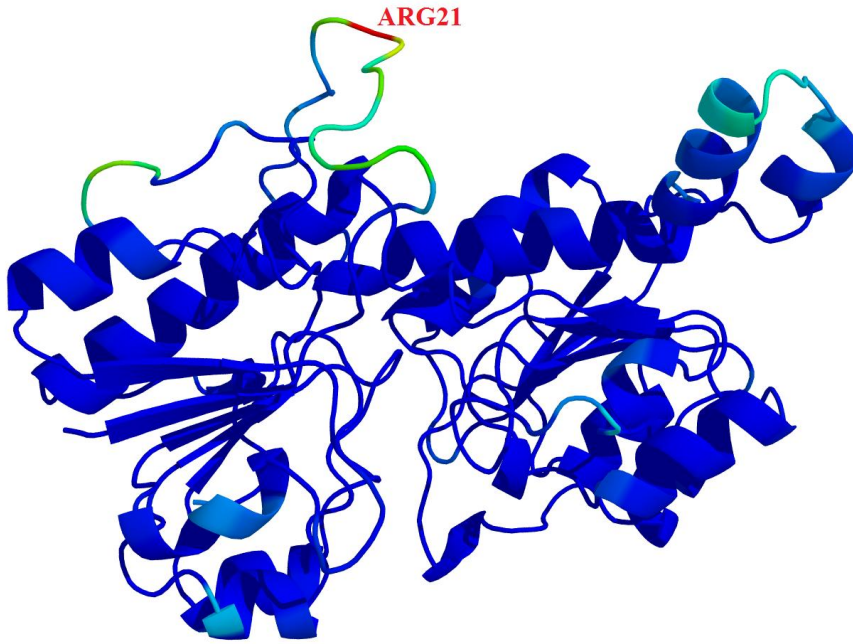
Şekil 3.13. Q223K-NAD⁺ mutanıtı için 15 ns MD simülasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



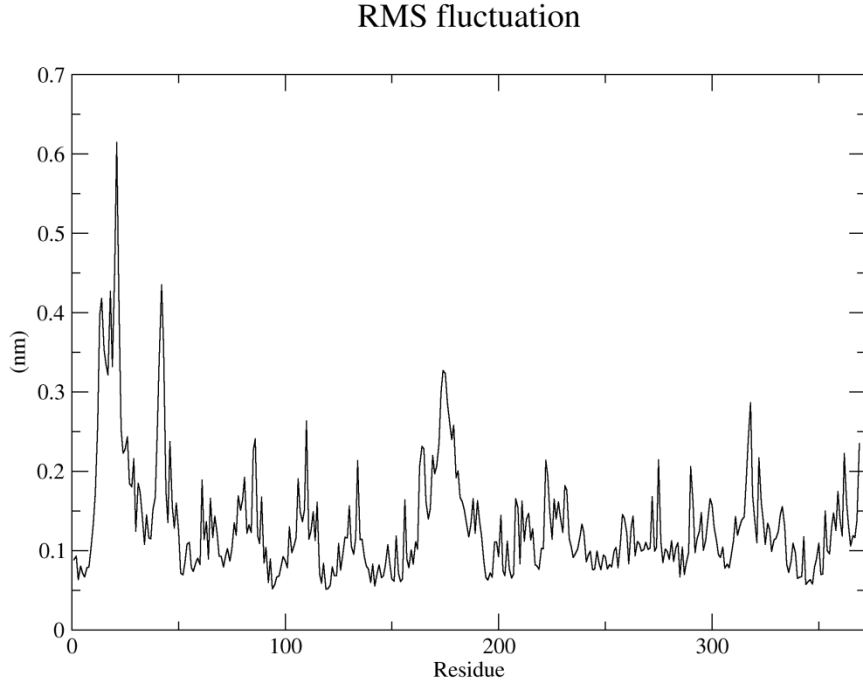
Şekil 3.14. Q223K-NAD⁺ mutanıtı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



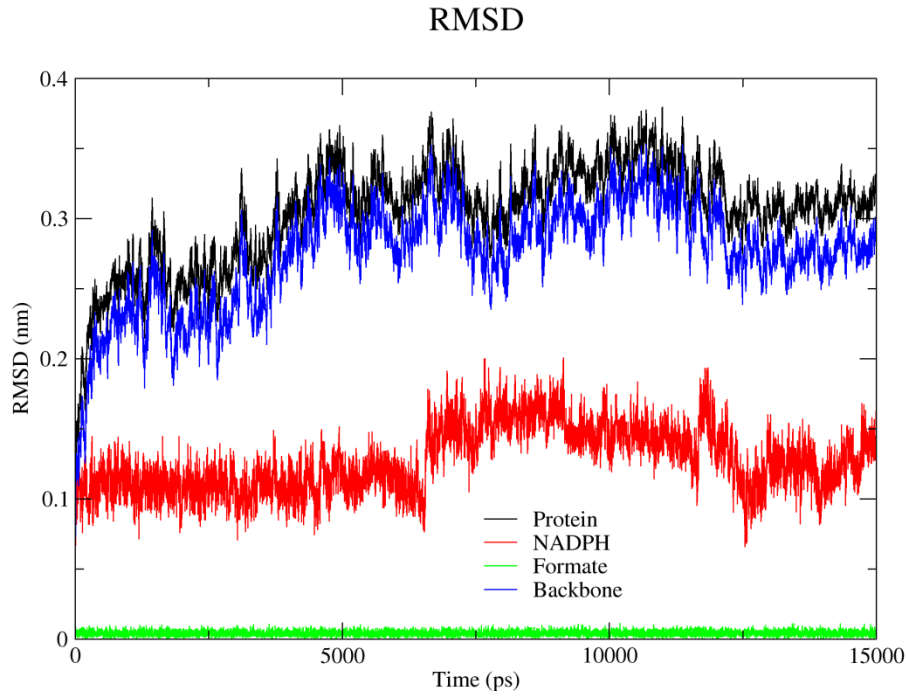
Şekil 3.15. Q223K-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca Q223K, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



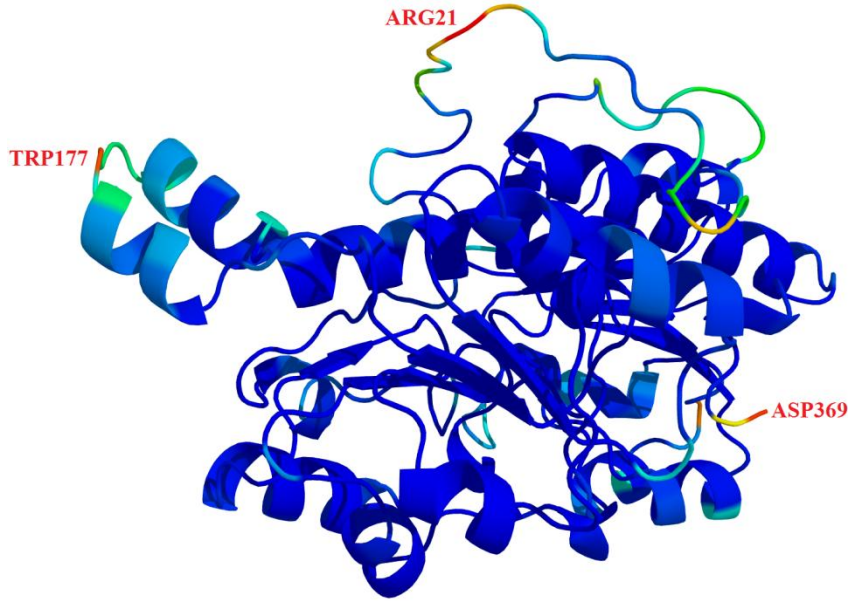
Şekil 3.16. Q223K-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



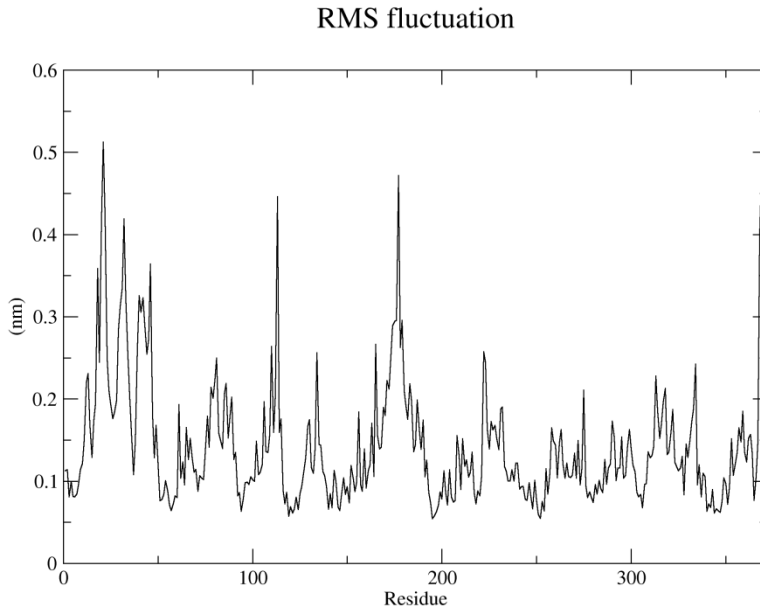
Şekil 3.17. Q223K-NADP⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



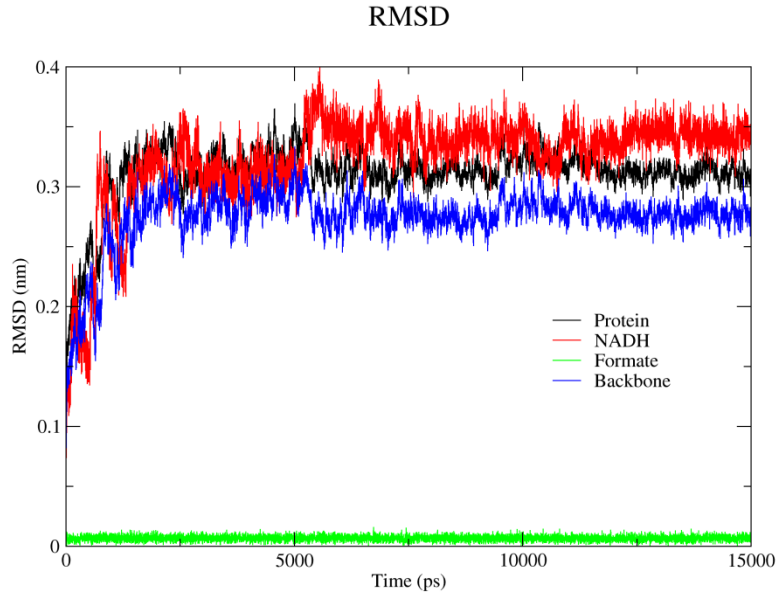
Şekil 3.18. Q223K-NADP⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223K, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



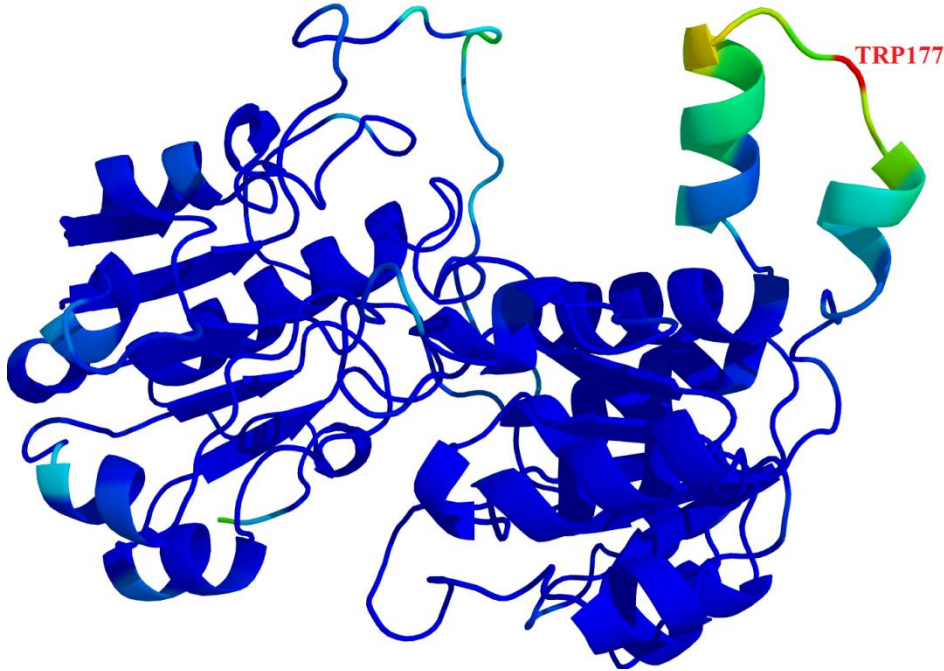
Şekil 3.19. Q223T-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



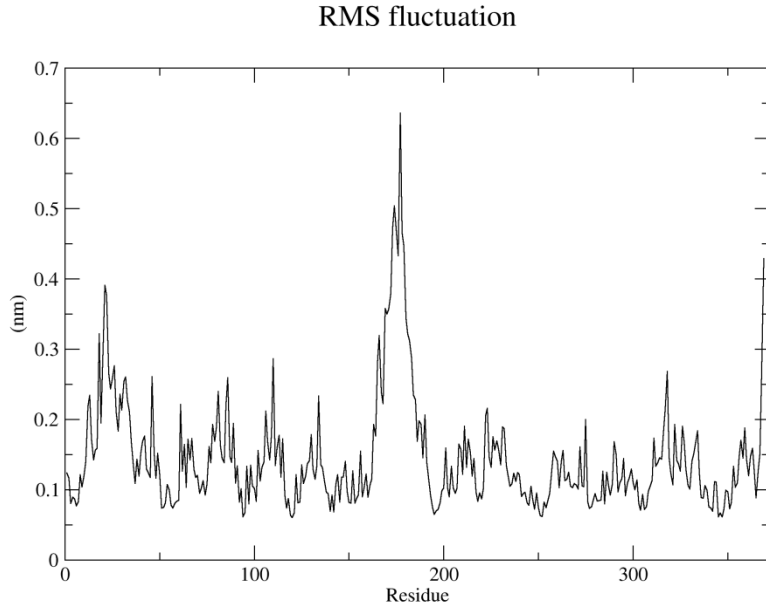
Şekil 3.20. Q223T-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



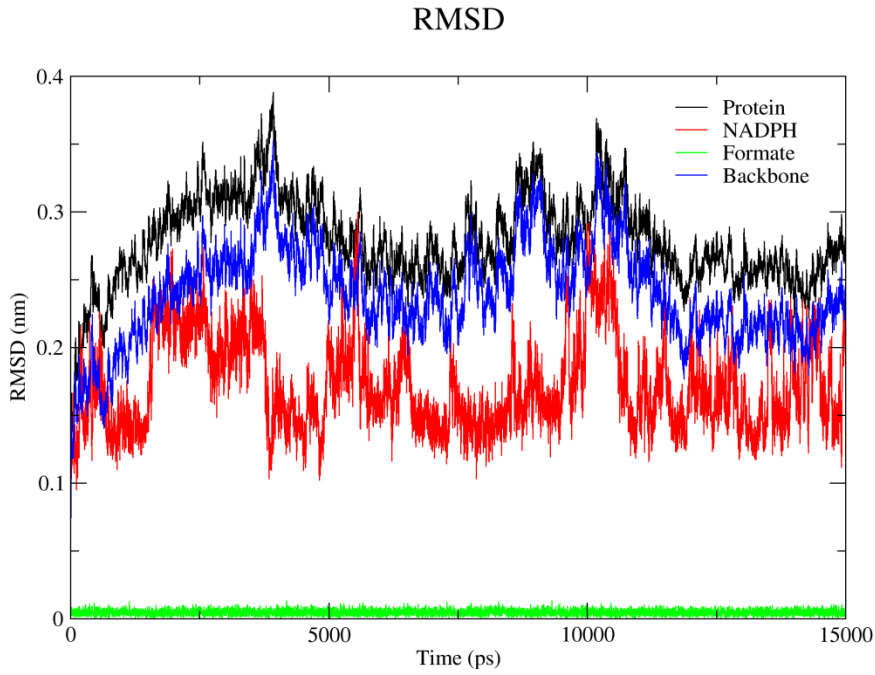
Şekil 3.21. Q223T-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca Q223T, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



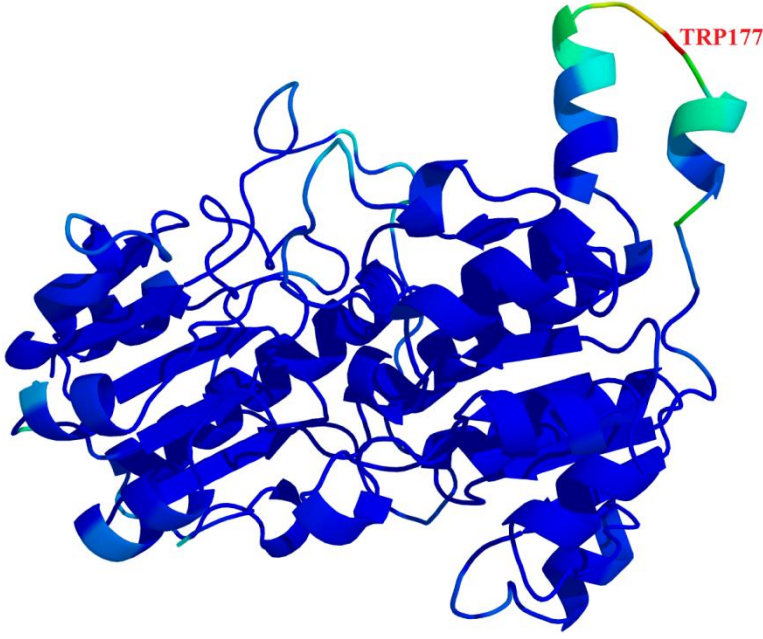
Şekil 3.22. Q223T-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



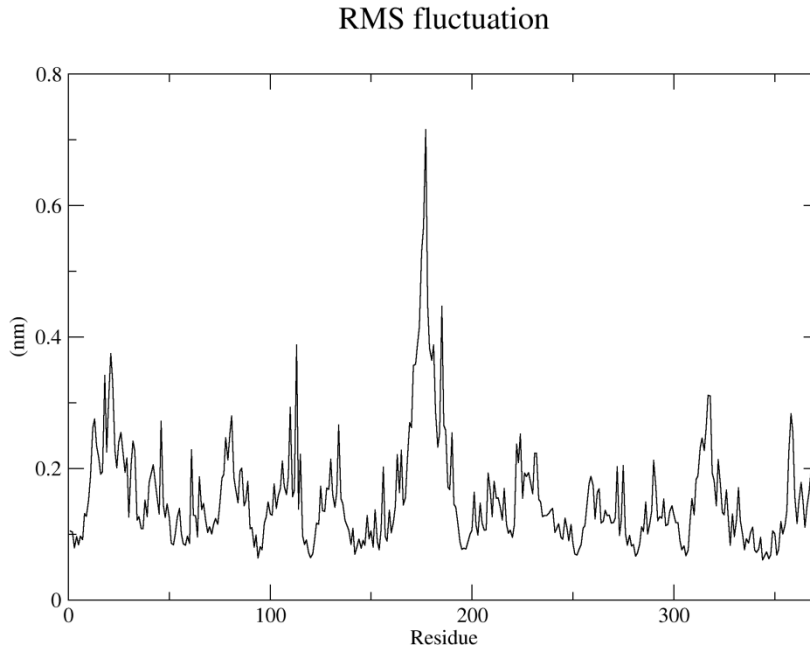
Şekil 3.23. Q223T-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



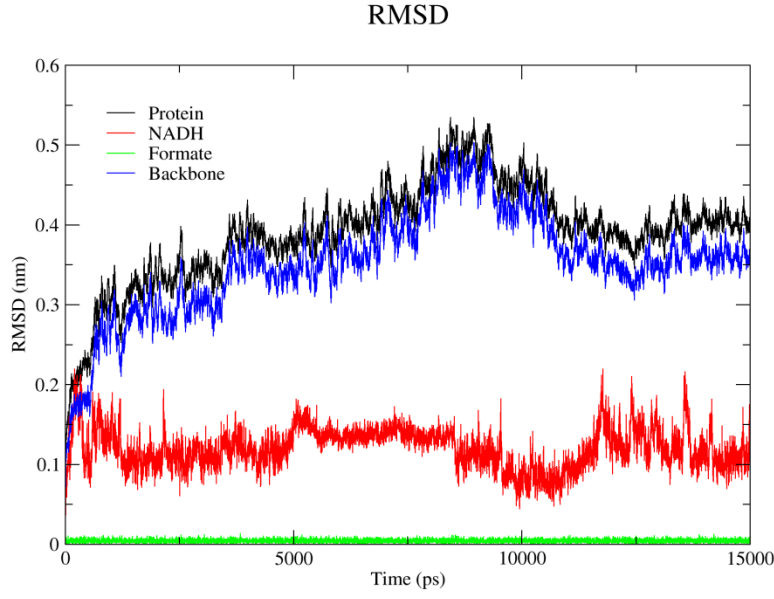
Şekil 3.24. Q223T-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223T, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



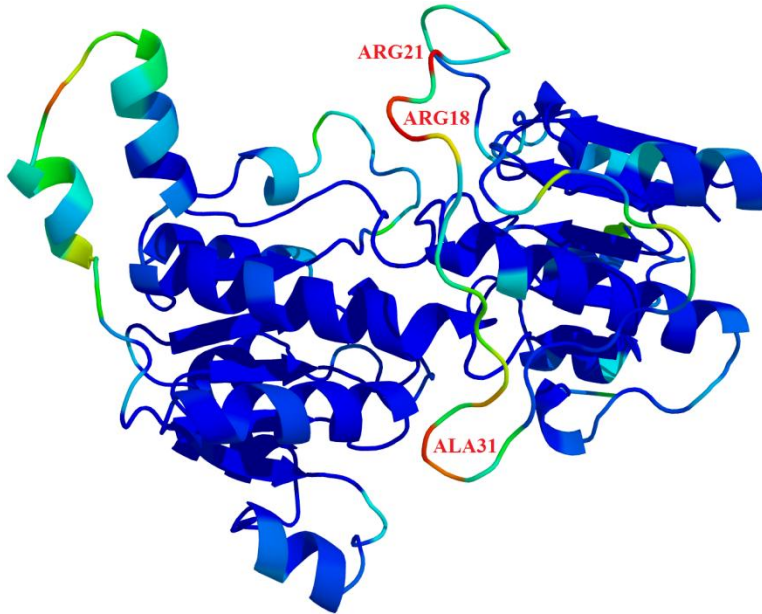
Şekil 3.25. Q223V-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değlerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



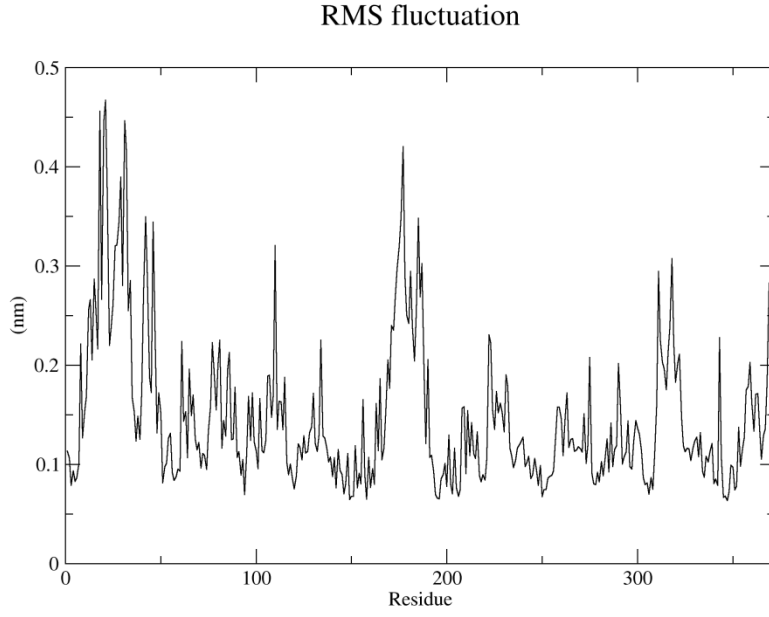
Şekil 3.26. Q223V-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değışimini gösteren RMSF değlerleri.



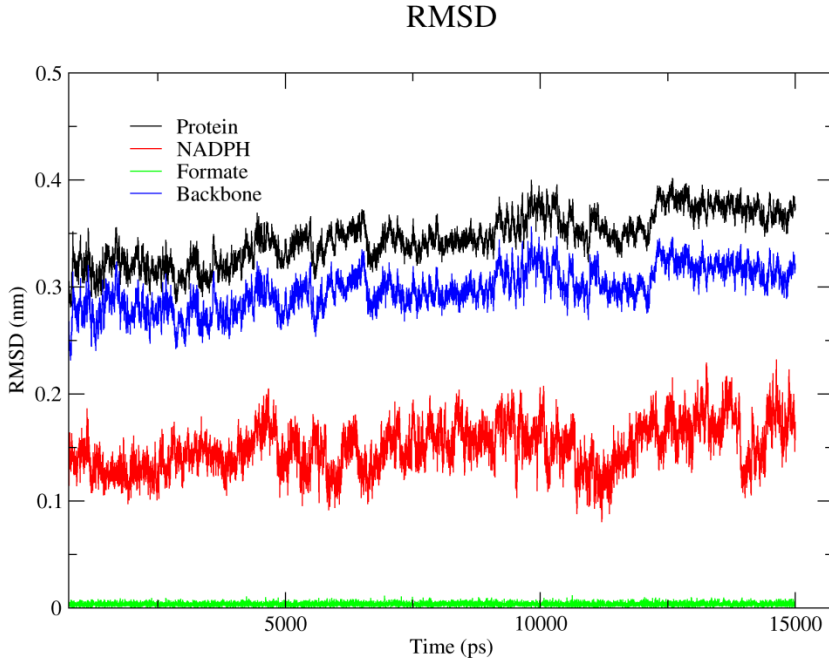
Şekil 3.27. Q223V-NAD⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223V, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



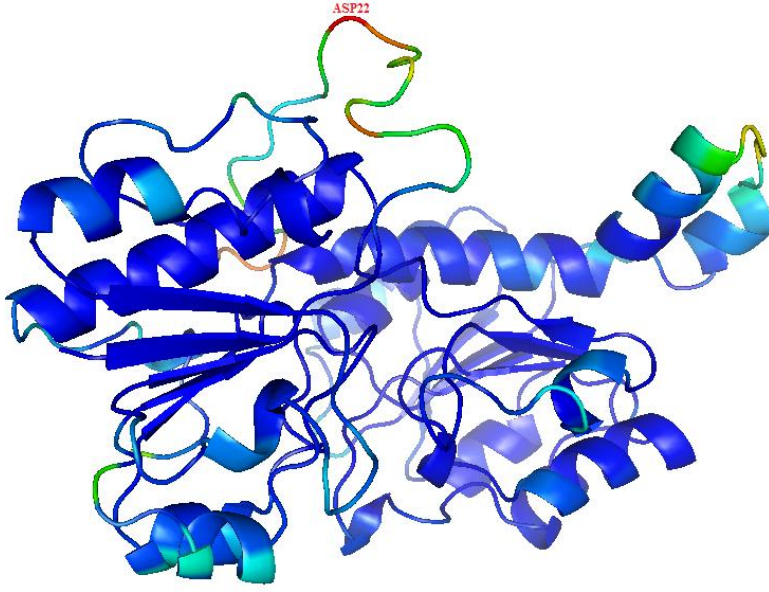
Şekil 3.28. Q223V-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



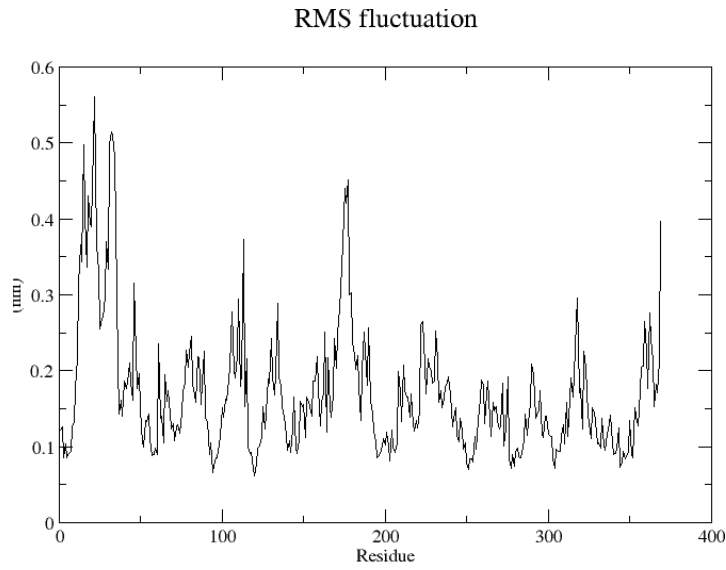
Şekil 3.29. Q223V-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



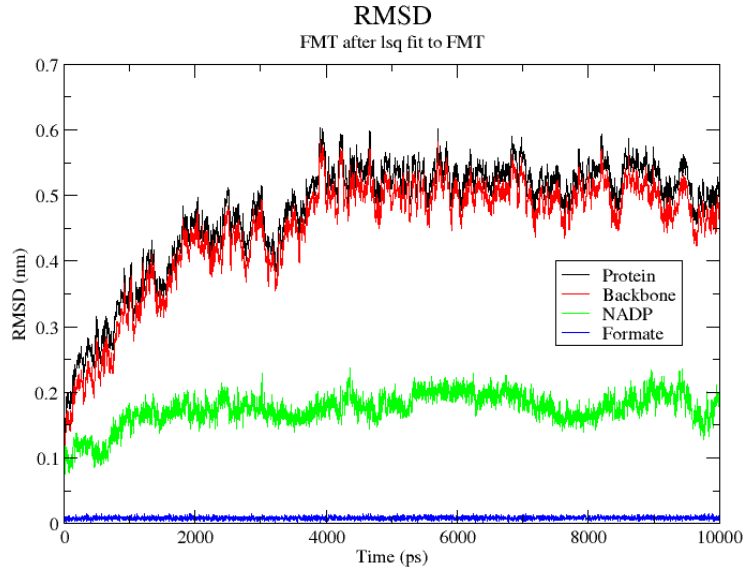
Şekil 3.30. Q223V-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223V, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



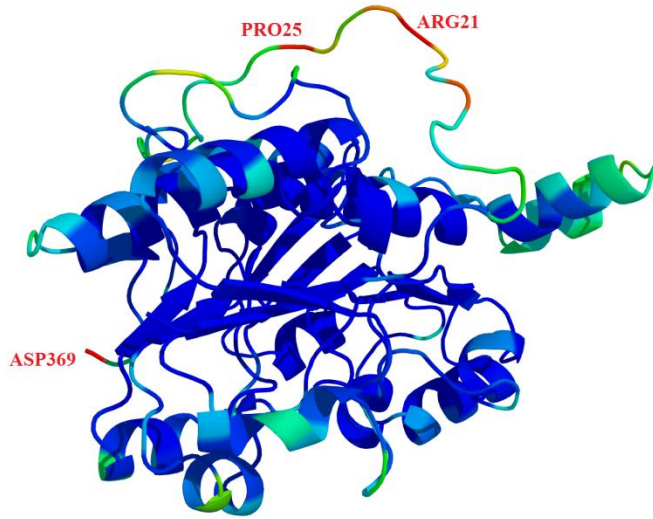
Şekil 3.31. Q223N-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



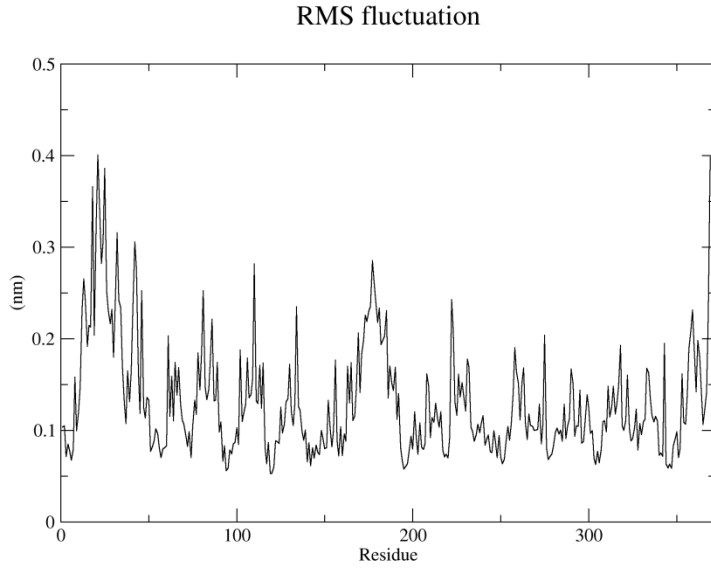
Şekil 3.32. Q223N-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



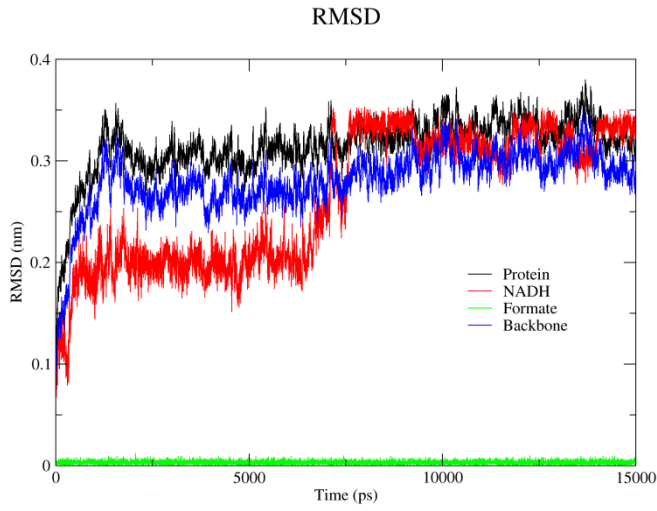
Şekil 3.33. Q223N-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca Q223N, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



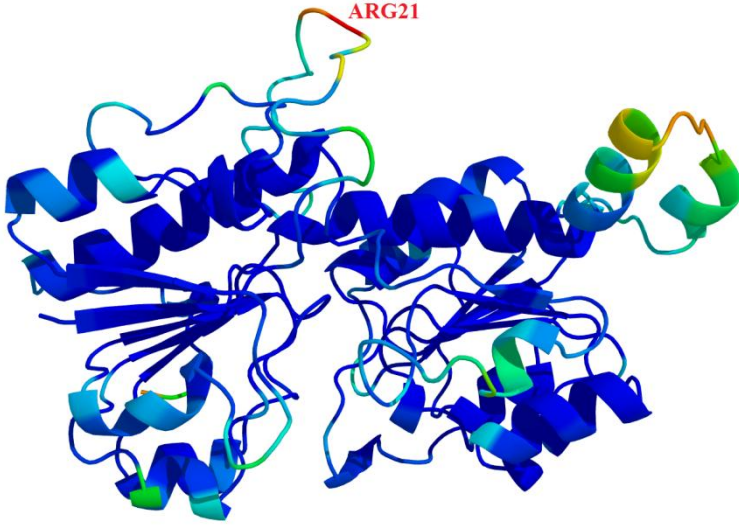
Şekil 3.34. Q223N-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



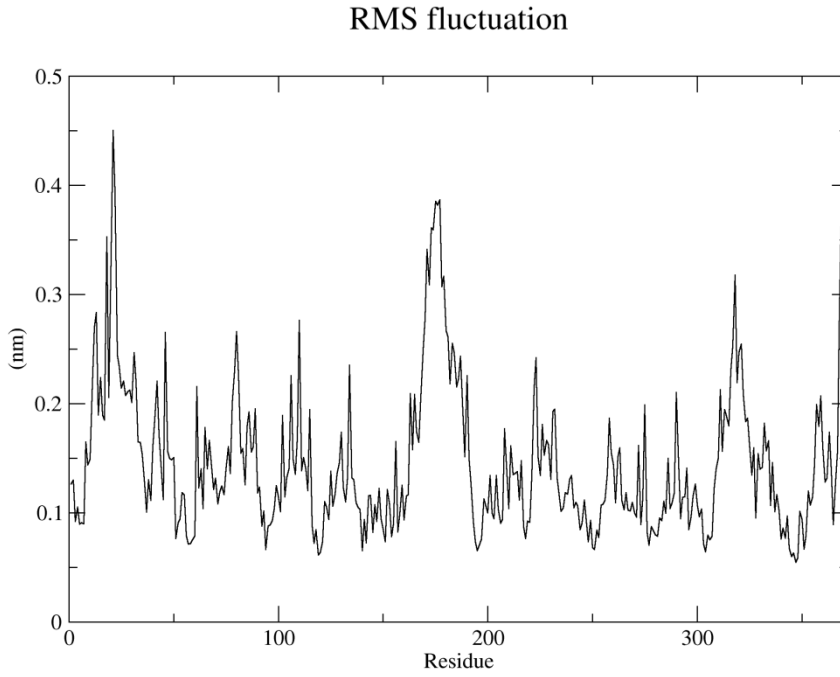
Şekil 3.35 Q223N-NAD⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



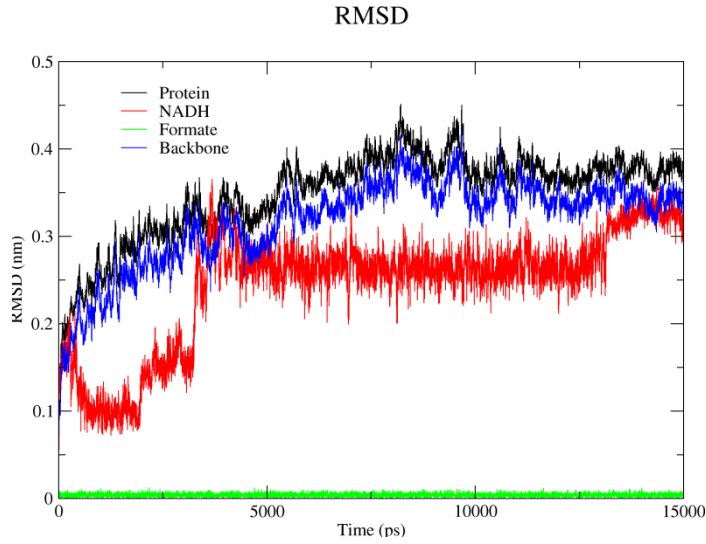
Şekil 3.36. Q223N-NAD⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223N, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



Şekil 3.37. Q223C-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu sırasında mutanđ enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değeriğine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



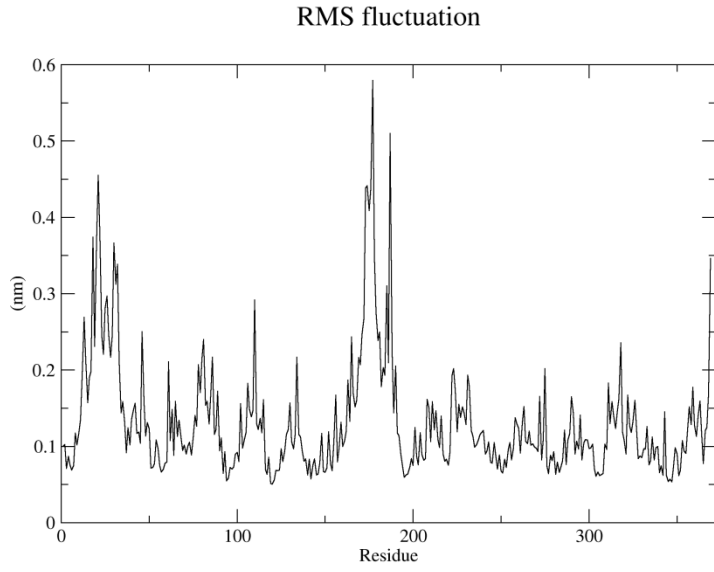
Şekil 3.38. Q223C-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değışimini gösteren RMSF değeri.



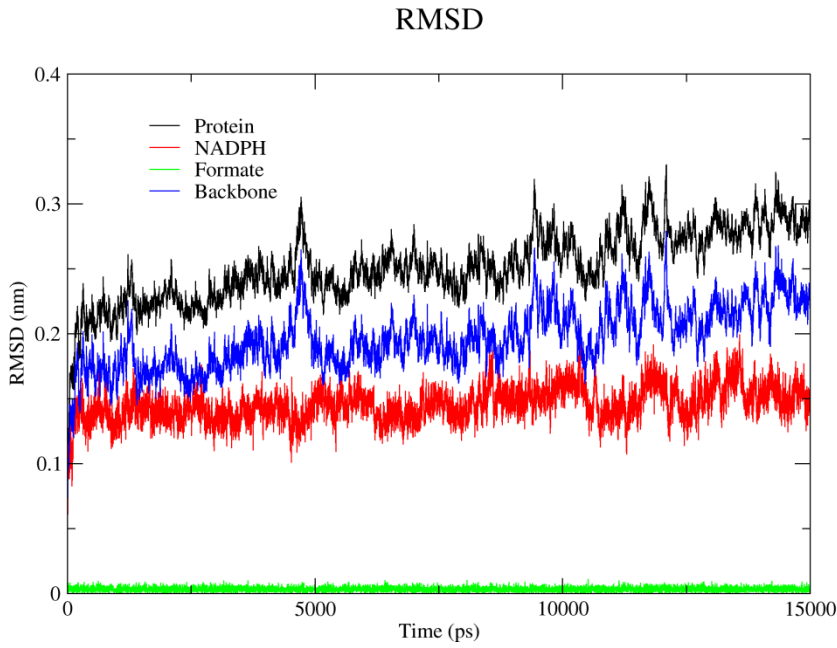
Şekil 3.39. Q223C-NAD⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223C, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



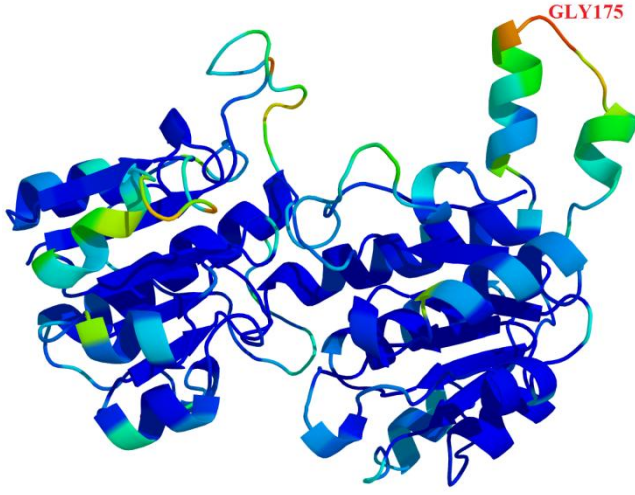
Şekil 3.340. Q223C-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



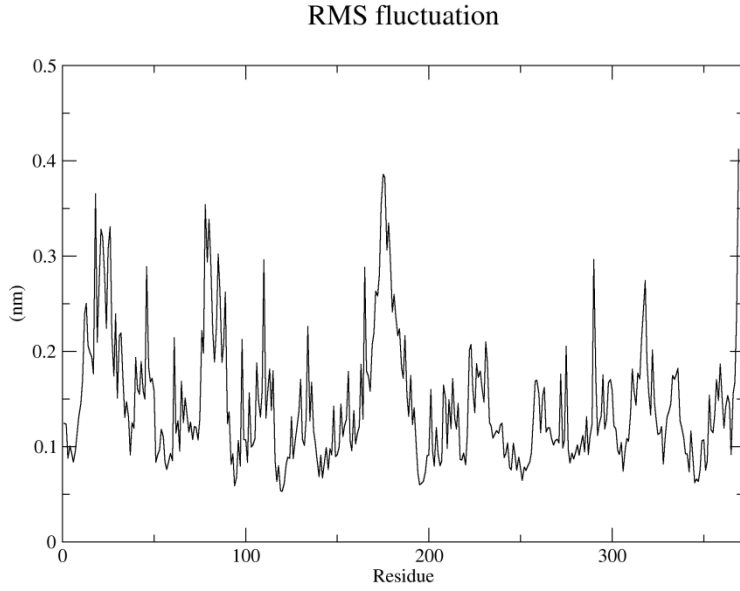
Şekil 3.41. Q223C-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



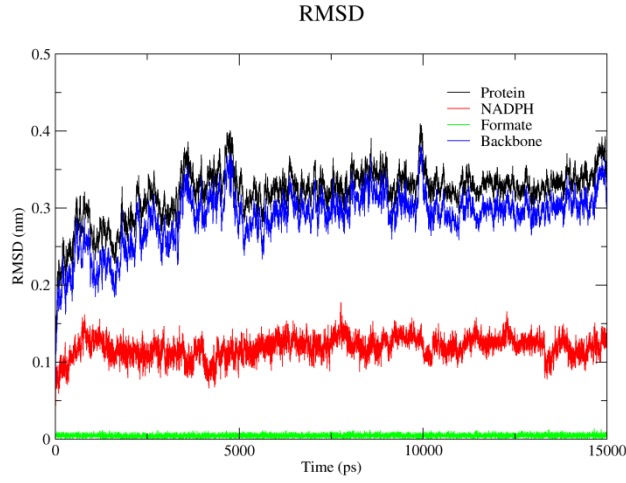
Şekil 3.42. Q223C-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223C, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



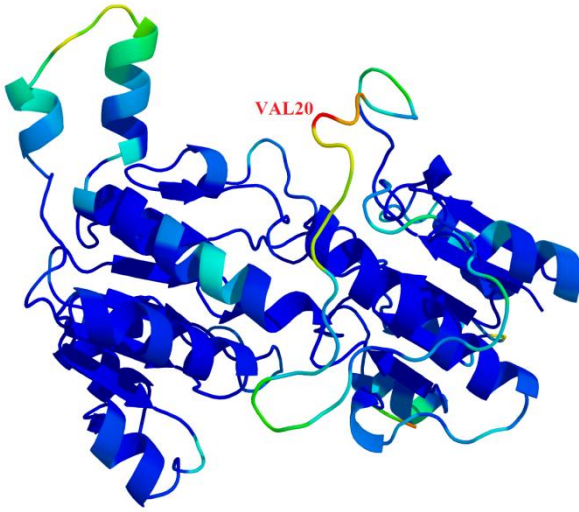
Şekil 3.43. Q223M-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutan  enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



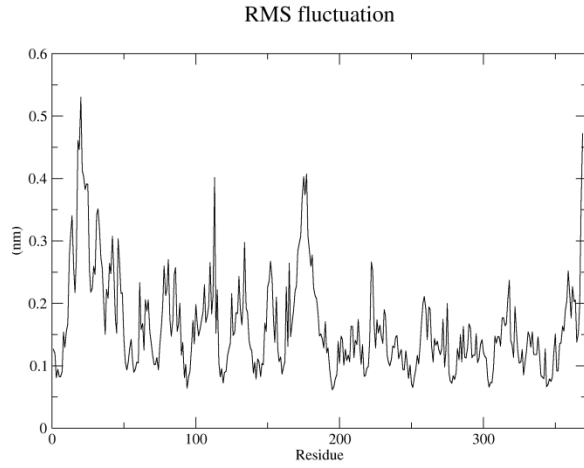
Şekil 3.44. Q223M-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



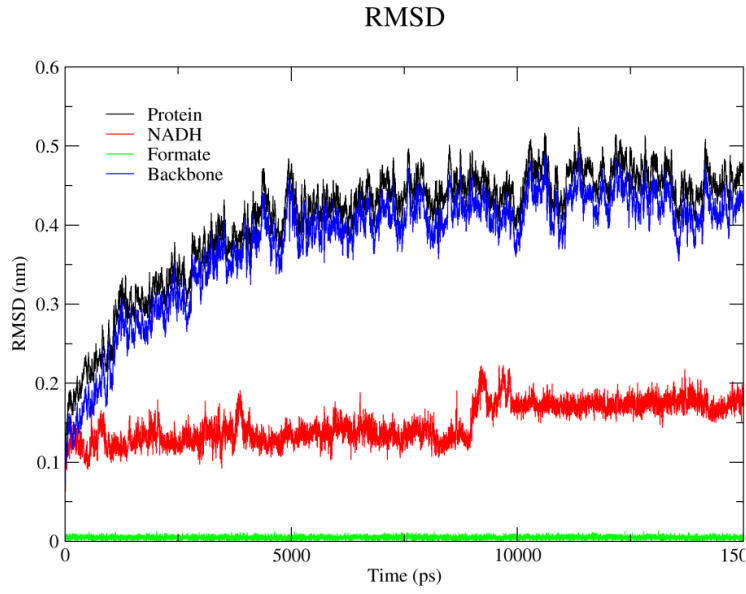
Şekil 3.45. Q223M-NADP⁺ mutan⁺tı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223M, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



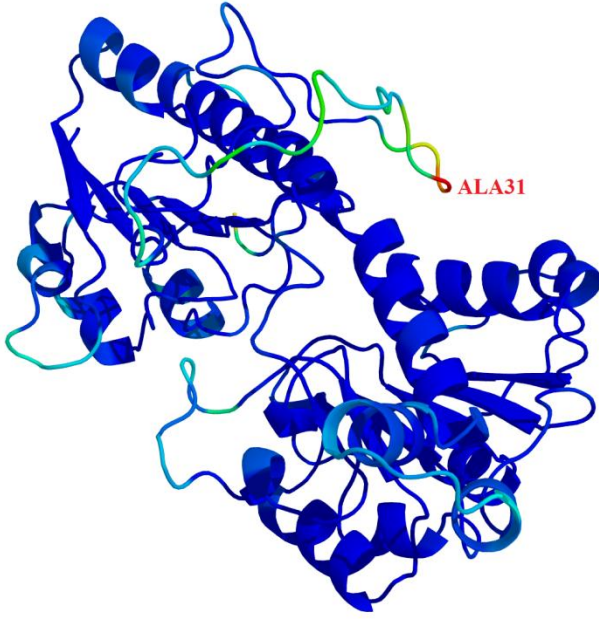
Şekil 3.46. Q223M-NADP⁺ mutan⁺tı için 15 ns MD simülasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



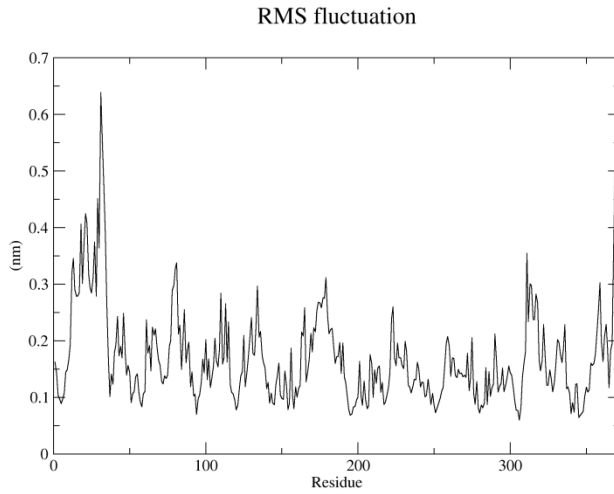
Şekil 3.47. Q223M-NAD⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



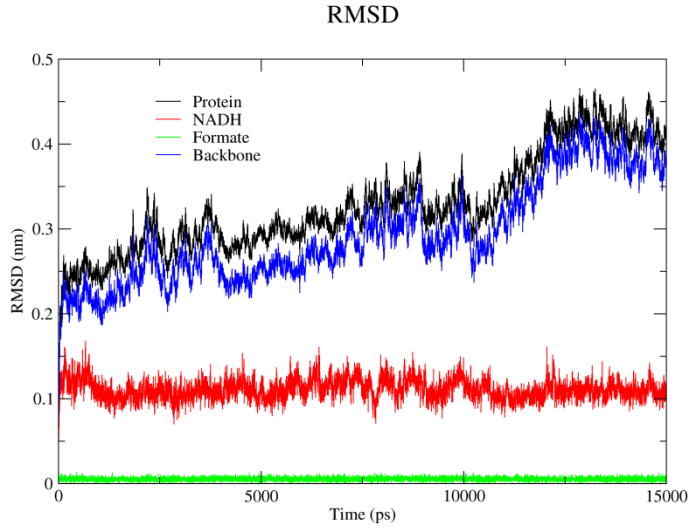
Şekil 3.48. Q223M-NAD⁺ mutantı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223M, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



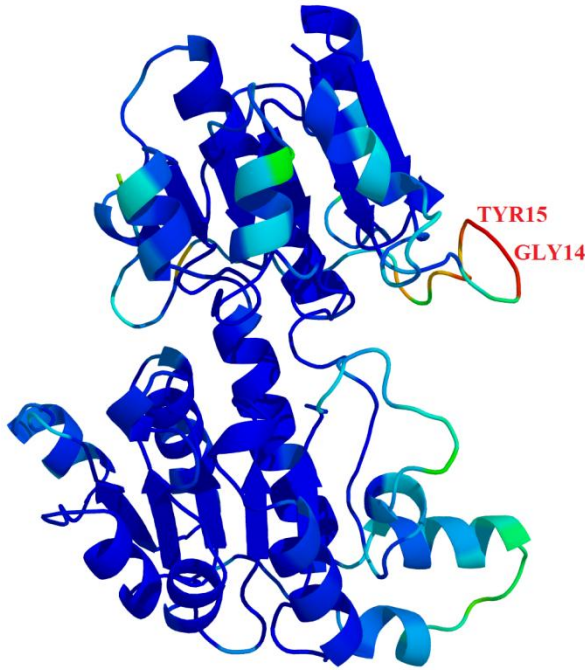
Şekil 3.49. Q223R-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu sırasında mutanđ enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değlerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).



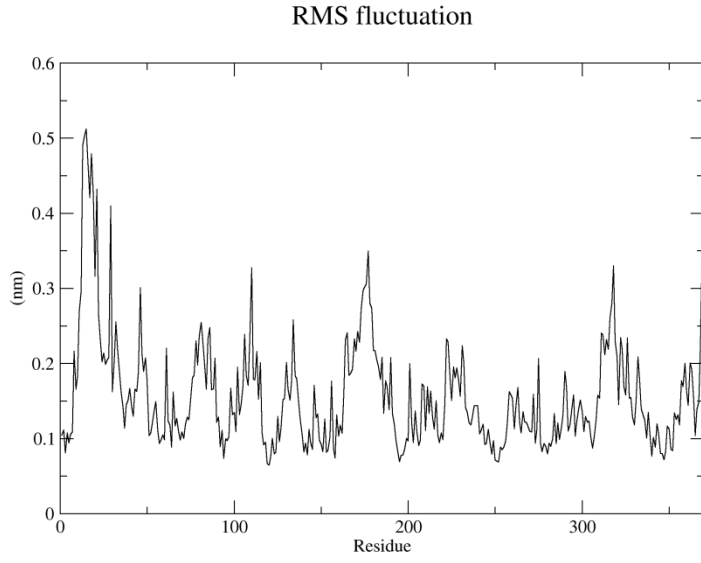
Şekil 3.50. Q223R-NAD⁺ mutanđı için 15 ns MD simölasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değlerleri.



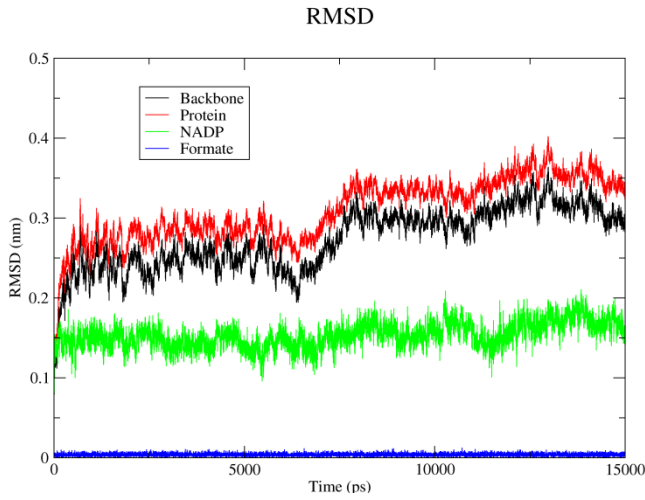
Şekil 3.51. Q223R-NAD⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu boyunca Q223R, backbone, NAD⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.



Şekil 3.52. Q223R-NADP⁺ mutan ı için 15 ns MD sim lasyonu sırasında mutant enzimin hesaplanan sıcaklık faktörü değerlerine göre hareketli ve rijit bölgelerinin gösterimi (kırmızı ve turuncu bölgeler en hareketli, mavi bölgeler ise en rijit bölgelerdir).

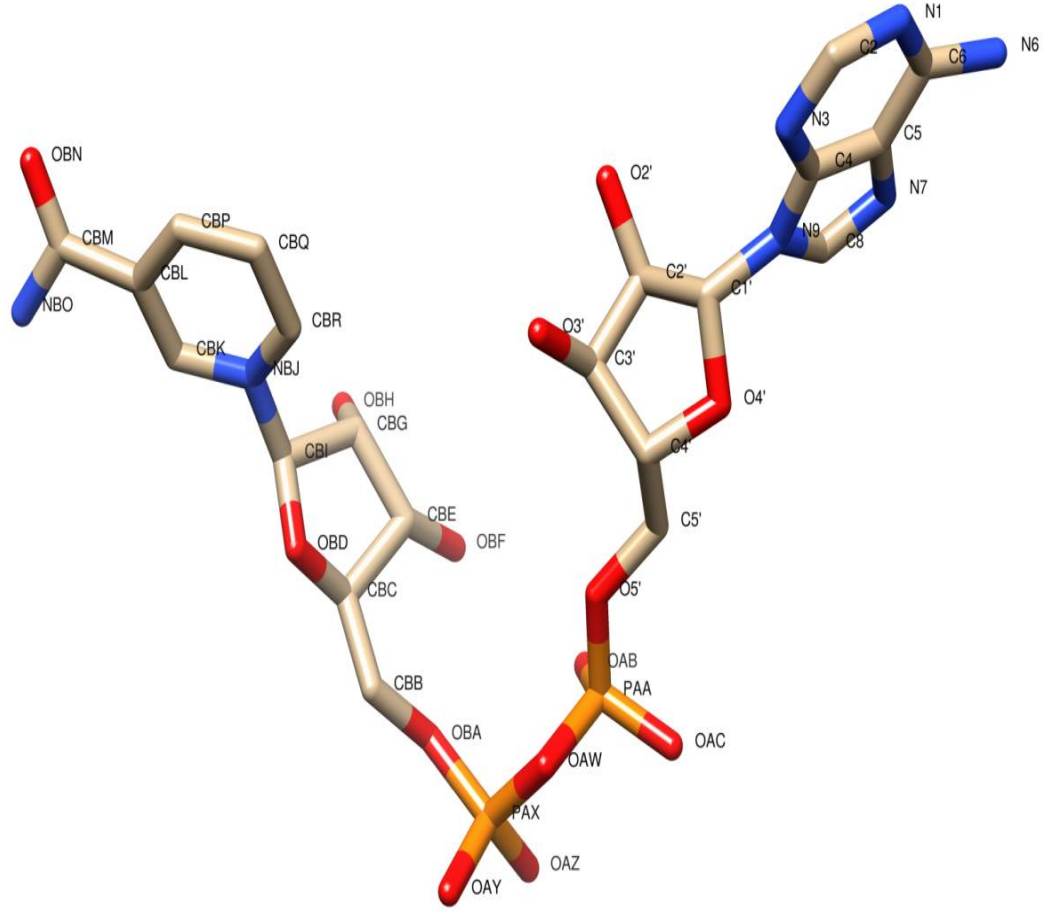


Şekil 3.53. Q223R-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca amino asit rezidülerinin başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSF değerleri.



Şekil 3.54. Q223R-NADP⁺ mutan^ı için 15 ns MD simülasyonu boyunca Q223R, backbone, NADP⁺ ve format yapılarının başlangıç yapılarına göre değişimini gösteren RMSD değerleri.

EK:3



Şekil 1: NAD(P)'a ait atom tipleri.

Tablo 2.2. Q223 (wild type) -NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri	Kofaktör	Komşu Rezidüler	Kofaktör
Q223 (wild type) NAD	Gln221	Riboz oksijeni (O3*)	Ser260	Pürin azotu (N6)
	Gln221	Riboz oksijeni (O2*)	Gln254	Riboz ile köprü fosfat arasındaki oksijen(OBA)
	Arg284	Riboz oksijeni (OBH)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)
	Asn146	Pirimidin oksijeni (OBN)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gln254	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)
	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Gln254	Riboz oksijeni (OBD)
			Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur	

Tablo 2.3. Q223T-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223T NADP	Gln254	Pürin azotu hidrojeni (NH3’)	Ala199	Riboz fosfat oksijeni (OP2)	Ser147	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Thr221	Riboz fosfat oksijeni (OP2)	Ile148	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)	Val150	O1
	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Gly200	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Arg343	O2
			Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Arg343	O2
			Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
			Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP1)		
			Tyr258	Pürin Riboz Oksijeni (O3*)		
			Thr282	2NH7		
			Toplam 9adet hidrojen bağı oluşmuştur			

Tablo 2.4. Q223T-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223T NAD	Leu257	Pürin Azotu (N6)	Gln254	Riboz oksijeni (OBF)	Tyr8	O1
	Glu141	Pürin Riboz Oksijeni (O2*)	Thr282	Pirimidin Azotu (NBO)	Thr336	O2
	Glu141	Pürin Riboz Oksijeni (O3*)	Asp308	Pirimidin Azotu (NBO)	Gln341	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)		
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (O5)	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur			
	Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.5. Q223G-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format		
Q223G NAD	Arg284	Pirimidin oksijeni (OBN)	Tyr258	AH3’	Arg21	O1	
	Gln254	Riboz oksijeni (OBD)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser149	O1	
	Gln254	Riboz ile köprü fosfat arasındaki oksijen(OBA)	Toplam 2 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Thr336	O2	
					Ser337	O2	
					Ser337	O2	
					Ser337	O1	
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)			Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur		
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)					
	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)					
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)					
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (2NH7)					
	Thr282	Pürin azotu hidrojeni (2NH7)					
Toplam 9 adet hidrojen bağı oluşmuştur							

Tablo 2.6. Q223G-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223G NADP	Arg284	Pirimidin oksijeni (OBN)	Gln254	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser337	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser337	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Toplam 2adet hidrojen bağı oluşmuştur		Tyr344	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)			Gln341	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)			Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.7. Q223K-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Aktif Bölge Rezidüleri Format	
Q223K NAD	Gly200	Köprü fosfat oksijeni (OAW)	Gln254	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser339	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser339	O2
	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Toplam 2 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Ala340	O2
	Arg284	Pirimidin oksijeni (OBN)			Leu338	O1
	Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur				Ser337	O2
					Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur	

Tablo 2.8. Q223K-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Aktif Bölge Rezidüleri Format	
Q223K NADP	Lys221	Riboz fosfat oksijeni (OP2)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser149	O1
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser149	O1
			Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP3)	Ser339	O2
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)	Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP3)	Arg343	O2
			Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP1)	Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Thr282	Pürin azotu hidrojeni (2NH7)	Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP1)		
			His223	Riboz fosfat oksijeni (OP2)		
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gln254	Pürin azotu hidrojeni (NH3')????		
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gln254	Riboz ile köprü fosfat arasındaki oksijen(OBA)		
	Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 9 adet hidrojen bağı oluşmuştur			

Tablo 2.9. Q223V-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223V NAD	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Gln254	Riboz oksijeni (OBD)	Ser149	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser149	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Gly335	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Thr336	O2
	Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Ser337	O2
					Ser337	O2
					Ser337	O1
					Toplam 7 adet hidrojen bağı oluşmuştur	

Tablo 2.10. Q223V-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Aktif Bölge Rezidüleri Format	
Q223V NADP	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	His332	Pirimidin oksijeni (OBN)	Ser149	O1
					Ser149	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Gly335	O2
	His332	Pirimidin oksijeni (OBN)	Gly200	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser149	O1
					Ser149	O2
	Gln254	Riboz ile köprü fosfat arasındaki oksijen(OBA)	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Gln254	Pürin azotu hidrojeni (NH2')				
	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.11. Q223M-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223M NADP	Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP3)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Tyr344	O2
			Gln254	NH3'	Gln96	O2
			Thr282	2NH7		
	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 2 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)				
	Asp308	Pürin azotu hidrojeni (1NH7)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)				
	Gly200	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)				
	His223	Riboz fosfat oksijeni (OP1)				
	Toplam 9 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.12. Q223M-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223M NAD	Arg222	O2’	Gln254	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ser149	O1
			Gln254	NH3’		
			Thr282	NH2’		
	Gln34	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Ser337	O2
	Ala199	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Toplam 4adet hidrojen bağı oluşmuştur		Gln335	O1
	Gly200	Köprü fosfat oksijeni (OAB)			Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)				
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAY)				
	Toplam8 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.13. Q223C-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223C NAD	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gln254	Riboz oksijeni (OBD)	Ser149	O2
			Gln254	NH2'	Ser149	O1
			Thr282	NH7	Ser147	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Val150	O2
	Asp308	1NH7	Toplam 4adet hidrojen bağı oluşmuştur	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur	Ile148	O1
	Ala199	O3'				
	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)				
	Toplam5 adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.14. Q223C-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler	Kofaktör	Komşu Rezidüler	Format		
Q223C NADP	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Thr282	NH7	Gln96	O2		
			His223	Riboz fosfat oksijeni (OP1)	Tyr344	O2		
			Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP3)	Toplam 2 adet hidrojen bağı oluşmuştur			
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)				
			Gln254	NH3'				
	Asp308	1NH7	Toplam 5adet hidrojen bağı oluşmuştur					
	Asp308	1NH7						
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)						
	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)						
	Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur							

Tablo 2.15. Q223N-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Komşu Rezidüler Format	
Q223N NAD	Arg284	Riboz oksijeni (OBH)	Asp125	Riboz oksijeni (OBH)	Gln313	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Asp125	Riboz oksijeni (OBF)	Tyr102	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Lsy77	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Gln254	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)		
	Toplam 5 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Gln254	Riboz ile köprü fosfat arasındaki oksijen(OBA)		
			Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur			

Tablo 2.16. Q223N-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

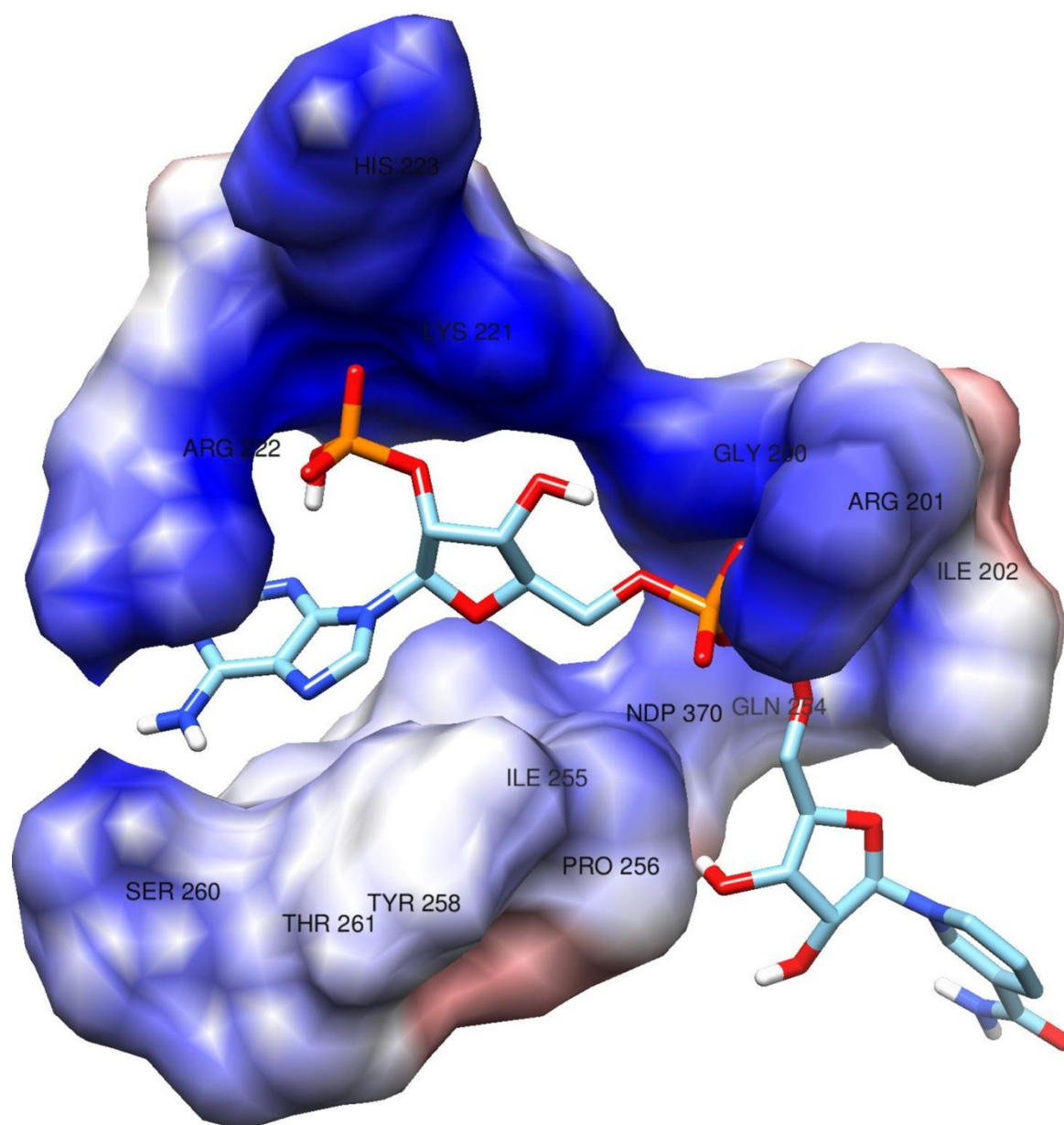
Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge		Komşu		Aktif Bölge	
	Rezidüleri	Kofaktör	Rezidüleri	Kofaktör	Rezidüleri	Format
Q223N NADP	Thr282	Pirimidin Azotu (NBO)	Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP1)	Asn146	O1
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Arg284	O2
	Asn221	Riboz fosfat oksijeni (OP3)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Arg284	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	His223	Riboz fosfat oksijeni (OP2)	His332	O2
	Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Ser334	O1
					Ser334	O2
					Toplam 6 adet hidrojen bağı oluşmuştur	

Tablo 2.17. Q223R-NADP-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Aktif Bölge Rezidüleri Format		Komşu Rezidüler Format	
Q223R NADP	Arg221	Riboz fosfat oksijeni (OP1)	Gln254	Riboz oksijeni (OBF)	Asn146	O1	Thr336	O1
							Thr336	O2
	Arg221	Riboz fosfat oksijeni (OP1)	Arg222	Riboz fosfat oksijeni (OP2)			Tyr344	O2
							Tyr15	O2
	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAB)	Gly203	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Toplam 1 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur		His223	Riboz fosfat oksijeni (OP1)				
			Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAY)				
			Toplam 5adet hidrojen bağı oluşmuştur					

Tablo 2.18. Q223R-NAD-Format sistemindeki bazı önemli hidrojen bağları.

Mutasyon ve Kofaktör	Aktif Bölge Rezidüleri Kofaktör		Komşu Rezidüler Kofaktör		Aktif Bölge Rezidüleri Format	
Q223R NAD	Arg201	Köprü fosfat oksijeni (OAZ)	Tyr258	Pirimidin Azotu (NBO)	His332	O2
	Asp308	Pürin azotu (N6)	Ile202	Köprü fosfat oksijeni (OAC)	Arg284	O1
	Asp308	Pürin azotu (N6)	Glu141	Riboz oksijeni (OBH)	Arg284	O2
	Arg284	Pürin azotu (N3)	Glu141	Riboz oksijeni (OBH)	Toplam 3 adet hidrojen bağı oluşmuştur	
	Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur		Toplam 4 adet hidrojen bağı oluşmuştur			



TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HATİCE CAN
Proje No:	112T538
Proje Başlığı:	Nadp+ Bağımlı Format Dehidrojenaz Enziminin Hesaplamalı Ve Deneysel Yöntemlerle Moleküler Mühendisliği
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	AYHAN ÇELİK, SEMRAN İPEK KÜSKÜ
Danışmanlar:	LEVENT SARI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2012 - 01/02/2015
Onaylanan Bütçe:	237802.0
Harcanan Bütçe:	183398.11
Öz:	NADP bağımlı FDH enzimi üzerine protein mühendisliği deneysel ve teorik metodlarla yapılmıştır.
Anahtar Kelimeler:	mutasyonel analiz, teorik hesaplamalı, format dehidrojenaz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Mutational Analysis of Format Dehydrogenase by Molecular Dynamic Simulations Providing Insight into Dual Coenzyme Specificity (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- In Silico Prediction of Coenzyme Binding Modes and Affinities to the Wild Type and Mutated NADP+-Dependent Formate Dehydrogenase (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 3- In Silico Prediction of Mutation Effect of NADP+ Dependent Formate Dehydrogenase on Catalytic Versatility with Coenzyme and Substrate (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 4- Engineering of NADP+-dependent Formate Dehydrogenase Using Computational Tools (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- Mutational Effects on Conformational Energy Landscape of Relatively New NADP+-Dependent FDH: A Molecular Dynamics Study (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 6- Mutational Analysis of Format Dehydrogenase by Molecular Dynamic Simulations Providing Insight into Dual Coenzyme Specificity (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 7- ?In Silico Prediction of Mutation Effect of NADP+ Dependent Formate Dehydrogenase on Catalytic Versatility with Coenzyme and Substrate (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 8- In Silico Prediction of Coenzyme Binding Modes and Affinities to the Wild Type and Mutated NADP+-Dependent Formate Dehydrogenase (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 9- Protein Engineering of FDHs for Cofactor (NAD(P)H) Recycling in Reactions Catalysed by Oxidoreductases (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 10- Computational Engineering of Formate Dehydrogenase: From Catalytic Versatility to Coenzyme Specificity (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),