

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAMUK BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN NİKOTİNAMİD ADENİN
DİNÜKLEOTİD BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZIN
STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI

Reyhan AKKUZU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Mart, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAMUK BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN NİKOTİNAMİD ADENİN
DİNÜKLEOTİD BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZIN
STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI

Reyhan AKKUZU tarafından hazırlanan tez çalışması çalışması 02.03.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

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

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nevin GÜL KARAGÜLER, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Pamuk Bitkisinden İzole Edilen Nikotinamid Adenin Dinükleotid Bağımlı Format Dehidrogenazın Stabilitesinin Arttırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Reyhan AKKUZU

İmza

Aileme

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca daima yanımda olan ve tez çalışmamda beni yönlendiren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU 'ya verdiği destek ve bilgilerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma süresince laboratuvar çalışmalarımda daima yardımcı olan, bilgi ve desteklerini esirgemeyen okulumuzun araştırma görevlilerinden Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR ve Arş. Gör. Hasan DEMİR' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan ve desteğini esirgemeyen başta Arş. Gör. Sinem KURT olmak üzere Arş.Gör. Şayan POYRAZ, Gülşah AKBAŞ, Sefanur ERDÖL, İlkül AKMAYAN, Arş. Gör. Emrah BERTAN, Kübra TRABZONLU, Tuğba ATABEY, Arş. Gör. Hilal CİVELEK, Maide ŞEKER ve ismini sayamadığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmakta olduğum Özel Genetik Tanı Merkezi' nde meslektaşlarım Erhan AÇAR, Yunis AKDEMİR, Arzu DÜVENCİ ve Zehra DEMİR' e verdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Reyhan AKKUZU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	VII
KISALTMA LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
TABLO LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XIII
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Protein Mühendisliği.....	4
2.1.1 Bölgeye Özel Mutasyon (Site-Directed Mutagenesis)	4
2.2 Homoloji Modelleme.....	5
2.3 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrojenaz	7
2.4 Bitkilerde NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrojenaz	10
2.5 Protein Oksidasyonu	13
3 MATERYAL METOD	15
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör	15
3.1.1 Kullanılan Kitler	16
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	16
3.1.1 Kimyasallar ve Malzemeler.....	16
3.1.1 Kullanılan Besiyerleri	16
3.1.1 Kullanılan Tampon Çözeltileri.....	15
3.2 Metod	18
3.2.1 Homoloji Modelleme	18
3.2.2 Bölgeye Özel Mutasyon Site Directed Mutagenesis	18
3.2.3 Transformasyon	20
3.2.4 Koloni Tarama ve Stoklama	21

3.2.5	Hücre Büyütme ve Protein Ekspresyonu.....	22
3.2.6	6xHis-tag sistemi kullanılarak GhFDH proteininin saflaştırılması	23
3.2.7	Kinetik ve Termodinamik Karakterizasyon Deneyleri	23
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	25
4.1	Sonuç.....	25
4.1.1	Homoloji Modelleme	25
4.1.2	Hedefe Yönelik Mutasyon PCR Sonuçları	30
4.1.3	Transformasyon	31
4.1.4	DNA Dizi Analizi ve Homoloji BLAST	32
4.1.5	Protein Saflaştırma.....	32
4.1.6	Protein Konsantrasyon Ölçümleri.....	33
4.1.7	Enzim Aktivite Ölçümleri	34
4.1.8	Enzim Termal Stabilite Analizi	35
4.1.9	Enzim Oksidatif Stabilite Analizi	36
4.2	Öneriler.....	39
KAYNAKÇA		43
A	DNA DİZİ ANALİZİ VE BLAST	50
A.1	M258L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST	50
A.2	M294L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST	53
A.3	M299L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST	56
B	HOMOLOJİ MODELİ ÜZERİNDE AMİNO ASİT KONUMLARI	59
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR		61

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
U	Enzim ünitesi
g	Gram
pH	Hidrojen gücü
kDa	Kilodalton
L	Litre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
$^{\circ}$ C	Santigrat
cm	Santimetre
cm ³	Santimetreküp

KISALTMA LİSTESİ

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

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	FDH Enzimi NAD(P)H Rejenerasyonu Şeması.....	9
Şekil 3.1	pQE-2 vektör haritası.....	15
Şekil 4.1	Kalıp amino asit dizisi olarak NAD ⁺ -bağımlı <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFDH, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) kullanılarak oluşturulan modelin GhFDH ile gösterdiği amino asit homolojisi.....	25
Şekil 4.2	SWISS - MODEL homoloji modelleme aracı ile yapılmış GhFDH modeli.....	26
Şekil 4.3	Model M258L.....	27
Şekil 4.4	M258 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim.....	27
Şekil 4.5	Model M294L.....	28
Şekil 4.6	M294 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi. (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim.....	28
Şekil 4.7	Model M299L.....	29
Şekil 4.8	M299 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim.....	29
Şekil 4.9	Yapılan Hedefe Yönelik Mutasyon PCR' ları %0,8 lik Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü.....	30
Şekil 4.10	Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Marker Boyut Çizelgesi.....	31
Şekil 4.11	<i>E. coli</i> DH5a Hücrelerine Transformasyonu Yapılan Mutant Vektörlerin Ampisinli Katı LB Plate Üzerinde Koloni Seçimi.....	31
Şekil 4.12	Saflaştırılmış M126L, M214L, M258L, M234L, M243L ve M299L Mutant Proteinlerin SDS PAGE Jel Görüntüsü.....	33
Şekil 4.13	M294L ve M299L Mutant Proteinlerin Saflaştırma Aşamaları SDS PAGE Jel Görüntüsü.....	33
Şekil 4.14	M258L Kinetik Ölçüm Grafiği.....	34
Şekil 4.15	M258L Termal Stabilite Grafiği.....	36
Şekil 4.16	M258L Oksidatif Stabilite Grafikleri	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Hedefe Yönelik Mutasyon için Tasarlanan Primerler.....	19
Tablo 3.2 PCR Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.....	19
Tablo 3.3 PCR Reaksiyon Koşulları.....	20
Tablo 3.4 Dizileme için Kullanılan Primerler.....	21
Tablo 3.5 Dizileme Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.....	22
Tablo 3.6 Dizileme Reaksiyon Koşulları.....	22
Tablo 4.1 <i>Gossypium hirsutum</i> FDH ile Mutant M258L Aktivite Değerleri.....	35
Tablo 4.2 <i>Gossypium hirsutum</i> FDH ile Mutant M258L Termal Stabilite Değerleri.....	36
Tablo 4.3 <i>Gossypium hirsutum</i> FDH ile Mutant M258L Oksidatif Stabilite $t_{0.5}$ ve Termal Stabilite $T_{0.5}$ Değerleri.....	39

Pamuk Bitkisinden İzole Edilen Nikotinamid Adenin Dinükleotid Bağımlı Format Dehidrogenazın Stabilitesinin Arttırılması

Reyhan AKKUZU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi EMEL ORDU

NAD⁺ bağımlı format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2), kiral moleküllerin sentezi için kullanılan ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)H' nin yenilenmesi için özellikle farmasötik endüstrisinde önemli enzimlerdir. Bununla birlikte, FDH enzimleri, stabilite yetersizliği nedeniyle, biyotransformasyon koşulları altında hızlı bir aktivite kaybı göstermektedir. Enzim stabilitesi, endüstriyel biyotransformasyon işlemlerinin gelişimi için sınırlayıcı bir faktördür. Biyotik ve abiyotik stres koşullarında bitki büyümesi üzerindeki etkileriyle ilgili çok sayıda veri bulunmasına rağmen, bitki kaynaklı rekombinant FDH' lerin stabilitesi konusundaki bilgimiz sınırlıdır. Bu durum bitki kaynaklı FDH' lerin biyoteknolojik potansiyelinin değerlendirilmesini de kısıtlamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda *Gossypium hirsutum*' dan izole edilen NAD⁺ bağımlı FDH' nin (GhFDH) stabilitesini geliştirmek amacıyla bölgeye yönelik mutagenез yöntemi kullanılmıştır. GhFDH yapısında bulunan 3 metiyonin amino asidi oksidatif strese dayanıklı lösün amino

asidi ile yer değiştirilerek bu değişimlerin enzimin katalitik özelliklerine ve stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Metiyonin-lösin değişimi için rekombinant GhFDH enziminin M258, M294 ve M299 konumları seçilmiştir. Mutant GhFDH proteinlerin homoloji modellerinin yapılmasının ardından aktivite ve stabilite deneyleri yapılarak bu mutasyonların protein aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. M294L ve M299L mutant enzimlerinin aktivite göstermeme nedeninin bu konumlardaki metiyonin amino asitlerinin katalitik aktivite için önemli olan amino asitler ile kritik etkileşim içinde olduklarını ve bu nedenle enzimin katalitik aktivitesinin kaybına sebebiyet verdiklerini düşündürmektedir. M258L mutantının katalitik aktivitesi (k_{cat} / K_m) yabancı GhFDH' e kıyasla $0.39 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ dan $0.29 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ a düşmüştür. Stabilite deneyleri sonucu M258L mutasyonunun termal stabilitede $6 \text{ }^\circ\text{C}$ ' lik bir düşüğe neden olduğunu göstermektedir. Oksidatif stabilite deneyleri sonucunda ise $50 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ' de yabancı tip GhFDH' e göre önemli bir fark göstermese de, 100 mM ' lık H_2O_2 ' a maruz bırakılan M258L mutantının yabancı GhFDH den 2 kat daha fazla süre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Oksidatif stabilitesinde görülen bu sonuç M258L mutantının geliştirilmek için umut vaad edici olduğunu ortaya koymaktadır. Çoklu mutasyonlar ve CD ölçümleri ile yapısal analizler yapılarak mutasyonların enzimin aktivite ve stabilitesine olan etkisi incelenmelidir.

Anahtar kelimeler: NAD^+ bağımlı format dehidrojenaz, *Gossypium hirsutum*, bölgeye yönelik mutagenез, termal stabilite.

Increasing Stability of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dependent Formate Dehydrogenase Isolated from Cotton Plant

Reyhan AKKUZU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr Emel ORDU

The NAD⁺-dependent formate dehydrogenases (FDH, EC 1.2.1.2) are important enzymes especially in pharmaceutical industry for the regeneration of NAD(P)H which is an expensive coenzyme used for chiral molecules synthesis. However, FDH enzymes show a rapid loss of activity under biotransformation conditions because of the lack of thermostability. Enzyme stability is a limiting factor for the development of industrial biotransformation processes. While there is a wealth of data for the effects on plant growth under biotic and abiotic stress conditions, our knowledge about stability of plant-derived recombinant FDHs is limited. This also restricts the evaluation of the biotechnological potential of plant-sourced FDHs. Therefore, in our study, we used site directed mutagenesis method to improve the stability of NAD⁺-dependent FDH isolated from *Gossypium hirsutum* (GhFDH). The effect of these changes on the catalytic properties and stability of the enzyme was investigated by replacing the 3 methionine amino acid in the GhFDH structure with the oxidative stress-resistant leucine amino acid. M258, M294 and M299

residues of the recombinant GhFDH enzyme were selected for the methionine-leucine exchange. After making homology models of mutant GhFDH proteins, activity and stability experiments were performed and the effects of these mutations on protein activity and stability were evaluated. The reason why M294L and M299L mutant enzymes do not show activity is that methionine amino acids in these locations are in critical interaction with amino acids that are important for catalytic activity and thus cause loss of catalytic activity of the enzyme. The catalytic activity (k_{cat} / K_m) of the M258L mutant decreased from $0.39 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ to $0.29 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ compared to wild GhFDH. The stability experiments show that the M258L mutation causes a 6° C decrease in thermal stability. As a result of the oxidative stability experiments, it was determined that the M258L mutant exposed to $100 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ retains its activity 2 times more than the wild GhFDH, although it does not show a significant difference compared to wild type GhFDH at $50 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. This result, seen in its oxidative stability, reveals that the M258L mutant is promising for development. The effect of mutations on the activity and stability of the enzyme should be examined by performing structural analysis with multiple mutations and CD measurements.

Key words: NAD^+ -dependent formate dehydrogenase, *Gossypium hirsutum*, site directed mutagenesis, thermal stability

1.1 Literatür Özeti

NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar (EC 1.2.1.2, FDH) prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan, format iyonlarını CO₂ 'e yükseltirken NAD⁺ molekülünü NADH' a indirgeyen endüstriyel açıdan önemli enzimlerdir. Uygun şartlarda FDH enzimi bu tepkimeyi ters yönlü olarak da gerçekleştirebilmektedir. Bu çift yönlü reaksiyon sistemi ile FDH' ler son yıllarda, hem CO₂ indirgeme sistemlerinin geliştirilmesinde hem de kiral moleküllerin optikçe saf olarak sentezlenmesi esnasında kullanılan NAD(P)H koenziminin yeniden eldesi çalışmalarında endüstriyel amaçla geliştirilmek üzere özellikle tercih edilmektedir (Tishkov ve Popov , 2004).

Bununla birlikte, doğal FDH' lerin bu endüstriyel alanlarda etkili bir biçimde kullanılabilmesi için bazı yönleri yetersiz kalmaktadır. İlk olarak, operasyonel stabiliteleri, aktif Cys amino asitlerinin varlığı nedeniyle oldukça düşüktür. Bu amino asitlerinin kimyasal modifikasyonu veya oksidasyonu hızlı enzim inaktivasyonu ile sonuçlanır. İkinci olarak, NADP⁺ yi kofaktör olarak kullanan, doğal bir FDH yoktur ve üçüncü olarak, doğal metilotrofik bakteri veya maya suşlarından halihazırda elde edilen FDH' lerin endüstriyel üretim sistemlerinde ihtiyaç duyulan kiral sentez reaksiyonlarında kullanılabilmesi için maliyeti yüksektir. Bu nedenlerle daha düşük üretim maliyeti sağlamak amacıyla kinetik özellikleri geliştirilmiş, kimyasal ve termal stabiliteleri arttırılmış yeni endüstriyel FDH' ler geliştirmek üzere protein mühendisliği yaklaşımlarına başvurulmaktadır.

Protein mühendisliği yaklaşımları ile FDH' lerin; katalitik mekanizmalarının aydınlatılması, kinetik özelliklerinin geliştirilmesi, kimyasal ve termal stabilitelerinin arttırılması, koenzim spesifikliğin geliştirilmesi, 3 boyutlu yapılarının aydınlatılması ve *Escherichia coli*' de FDH gen ekspresyonunun

arttırılması çalışmaları güncelliğini ve önemini sürdürmektedir (Tishkov ve Popov, 2006).

1.2 Tezin Amacı

NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) başta ilaç endüstrisinde kiral molekül sentezi için kullanılan ve oldukça pahalı olan NAD(P) koenziminin rejenerasyonu olmak üzere, ortamdaki formik asit miktarının belirlenmesi, atmosferik CO₂' in tutulması ve CO₂' den hidrojen yakıtının stabilize edilmiş bir formu olan formik asit üretimi gibi endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimlerdir (Kim, Park, Kim, Won, ve Lee, 2013). Bununla birlikte FDH stabilitesinin düşük olması, biyoteknolojik veya endüstriyel biyotransformasyon işlemlerinde sınırlayıcı bir faktördür. Mikrobiyal kaynaklı FDH enzimlerinin endüstriyel sentez sırasında beklenen termal ya da kimyasal stabiliteyi karşılamıyor oluşu ve protein mühendisliği çalışmaları ile elde edilen mutantlarının hala iyileştirme gerektirmesi, bitki kaynaklı rekombinant FDH' leri endüstriyel biyokatalizörler olarak geliştirmeye değer kılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında *Gossypium hirsutum* (pamuk) bitkisinden izole edilerek laboratuvar koşullarında başarı ile rekombinant anlatımı sağlanan NAD⁺-bağımlı format dehidrogenaz enziminin (GhFDH) protein mühendisliği yoluyla stabilitesinin geliştirilmesi ve böylece endüstriyel kullanım potansiyelinin arttırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla GhFDH yapısında bulunan 3 metiyonin amino asidi oksidatif strese dayanıklı lösin amino asidi ile yer değiştirilerek bu değişimlerin enzimin katalitik özelliklerine ve stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Metiyoninin amino asidinin lösin amino asidi ile yer değiştirilmesi için bir protein mühendisliği yaklaşımı olan rasyonel dizayn kullanılmıştır. GhFDH genindeki hedef mutasyonlar bölgeye yönlendirilmiş mutagenез vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Metiyonin lösin değişimi için rekombinant GhFDH enziminin M258, M294, M299 konumları seçilmiştir. Gerçekleştirilen mutant GhFDH proteinlerin homoloji modellerinin yapılmasının ardından aktivite ve stabilite deneyleri yapılarak bu mutasyonların protein aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

1.3 Hipotez

Proteinlerin yapı birimi olan amino asitlerin sahip oldukları yan zincirler amino asitlere yapısal özellikler, elektrik yükü, hidrofilik ya da hidrofobik olma gibi özelliklerini katmaktadır. Protein ve peptidlerde bulunan sistein, metiyonin ve histidin amino asitleri içerdikleri sülfür atomunun yüksek reaktivitesinden dolayı oksidasyona yatkındır. Otoksidasyon sonucu ortaya çıkan peroksidazlar ya da geçiş metallere varlığı bu amino asitleri okside edebilmektedir (Folzer, ve diğerleri, 2015). Metiyonin amino asitinin metiyonin sülfoksite oksidasyonu Fe^{3+} ile katalize edilmekte ve askorbik asit varlığında oksidasyon hızı artmaktadır. Lösin ve metiyonin amino asitlerinin her ikisi de hidrofobik yan zincirlerine sahiptir ve lösin tarafından işgal edilen van der Waals hacmi metiyonine yakındır. Protein yapısına metiyonin yerine lösinin eklenmesi, yakınlardaki bazı amino asitlerde önemli sterik girişimlere ve önemli hareketlere neden olabilmektedir. Metiyonin lösin ile yer değiştirilmesi, değiştirilen amino asitlerin ortamına bağlı olarak dengeleyici bir etki ile sonuçlanabilmektedir ve protein yapısının oksidatif stresten zarar görmesini azalttığı bilinmektedir (Özgün ve diğerleri, 2016). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız *GhFDH* enziminde bulunan oksidasyona eğilimli metiyonin amino asitlerinin oksidasyona dayanıklı lösin amino asidi ile değiştirilmesinin molekülün stabilitesini artıracığı hipotezi üzerine kurulmuştur.

2.1 Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, yeni proteinlerin sentezini veya istenen fonksiyonları elde etmek için mevcut protein dizisinde / yapısında değişiklik yapılmasını içerir. Yeni protein tasarım algoritmaları, yapısal biyoinformatikteki gelişmeler, moleküler kuvvet alanları ve 3D protein yapısına ilişkin çok fazla bilginin bulunması, protein mühendisliği için hesaplamalı yaklaşımların kullanılmasını mümkün kılmıştır.

Protein mühendisliği, araştırmacının, kodlama genindeki nükleotitlerin ikame edilmesi, sokulması veya silinmesi yoluyla bir protein dizisini modifiye ettiği, modifiye edilmemiş proteinden daha belirli bir uygulama veya amaç için daha uygun olan bir modifiye edilmiş protein elde etme amacıdır (Engqvist ve Rabe, 2019).

2.1.1 Bölgeye Özel Mutasyon (Site-Directed Mutagenesis)

Hedeflenmiş mutagenез (Targeted mutagenesis) veya bölgeye özel mutagenез (site-directed mutagenesis), bir gen dizisi içindeki spesifik bir bölgenin değiştirildiği bir yöntemdir (Hutchison ve diğerleri, 1978). Bu gibi değişiklikler, protein mühendisliğinde olduğu gibi mühendislik amaçları için veya bir gendeki spesifik mutasyonların etkisini incelemek için yapılabilir. Enzimlerin yapısı, fonksiyonu, katalitik mekanizması ve katalitik kalıntılarına bağlı olarak genleri modifiye etmek ve proteinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini incelemek için paha biçilemez bir araçtır (Yang, Li, Du, ve Liu, 2017). Sahaya yönelik mutagenез, tek ve birleşik mutasyonları içerir. Genellikle biyoinformatik yöntemlerle analiz edilir. Mutagenез metotlarını hızlandırmak ve basitleştirmek için tek bölgeye yönelik mutagenез ve çoklu mutasyonlar kullanılmıştır (Hsieh ve Vaisvila, 2013).

Sahaya yönelik mutagenез yapmak için genin birincil DNA dizisi ve dolayısıyla proteinin anlamlı dizisi gereklidir. Ek olarak, bir ekspresyon vektörüne (tipik olarak *E. coli*'de) uygun bir yapı gereklidir. Tersiyer yapı bilgisi (örneğin, protein modeli veya kristal yapı), mutagenез düzeninin tasarımını yönlendirmek için değerlidir. Protein yapısı-fonksiyonu araştıran deneyler, sadece birincil dizi verilerinin çoklu dizi hizalamalarından korunmuş tortuların tanımlanmasına dayanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir; ancak bu ele alınabilecek soruların mahiyetini sınırlandıracaktır (Cavicchioli, Curmi, Siddiqui, ve Thomas, 2006).

Birçok popüler bölgeye yönelik mutagenез yöntemi, hedef bölgeyi değiştirmek için sentetik oligonükleotitler kullanır. Bu yaklaşımda, "mutajenik" oligonükleotit, mutasyonu oluşturmak için belirli (spesifik) bir uyumsuzluk haricinde, hedef bölgeye mükemmel şekilde tamamlayıcı bir kısım içerir. Oligonükleotitler, hedef moleküle düşük sıklıkla hybridize olur (örn., Hedef genin ekspresyon klonu veya bir PCR ürünü) ve DNA düzeltme özelliği olmayan (non-proofreading) bir DNA polimerazı (örneğin Taq polimeraz veya ekzonükleaz eksi Klenow fragmanı) kullanılarak gerçekleştirilir. Mutasyona uğramış ürün daha sonra PCR kullanılarak büyütülebilir, amplifikasyon ürünü uygun bir vektöre ligasyonu yapılabilir ve mutasyona uğramış gen içeren yeni yapı, bir klonlama veya ekspresyon konakçısına dönüştürülebilir. Bu genel prensibe dayanarak, çeşitli protokol varyasyonları ve lisanslı prosedürler geliştirilmiştir ve bir dizi ticari mutagenез kitleri mevcuttur.

2.2 Homoloji Modelleme

Homoloji modellemesi, güvenilir yapısal modeller oluşturmak için en doğru hesaplama yöntemidir ve birçok biyolojik uygulamada yaygın olarak kullanılır. Homoloji modellemesi, şablon proteinlerin dizi hizalaması yoluyla bir sorgu proteininin 3D yapısını tahmin eder. Genel olarak, homoloji modelleme süreci dört adımdan oluşur: hedef tanımlama, dizi hizalama, model oluşturma ve model iyileştirme (Meier ve Söding, 2015).

Homoloji modelleme için geliştirilmiş birçok program mevcuttur. Bunlar birkaç satırla aşağıda özetlenmiştir.

Modeller 9v16: sağlanan hedef ve şablon dizileri arasında karşılaştırmalı modelleme yoluyla bir protein modeli sağlar; bir model üretmek için hidrojen olmayan atomları hesaplar. Modeller ayrıca döngü modelleme ve protein optimizasyonu için de kullanılır (Fiser ve Šali, 2003).

PRIMO (Protein Etkileşimli Modelleme), protein monomerlerinin homoloji modelleme veri hattıdır. Kullanıcıların protein hedefleriyle kompleks olarak ligandları ve iyonları modellemelerini sağlayan işlevsellik sağlar (Hatherley, Brown, Glenister, ve Tastan Bishop, 2016).

I-TASSER, otomatikleştirilmiş protein yapı tahmini ve yapı temelli fonksiyon açıklaması için hiyerarşik bir protokoldür (Yang ve Zhang, 2015).

SWISS-MODEL, protein yapılarının homoloji modellemesi için bir çalışma alanıdır; protein modelleri SWISS-MODEL çalışma alanı tarafından oluşturulabilir ve doğrulanabilir (Bordoli ve diğerleri, 2009).

DeepView, kullanıcı dostu bir arayüz, proteinlerin yapı görselleştirmesi ve analiz ile diziden yapıya manipüle etme fonksiyonlarını içerecek şekilde tasarlanmıştır (Kopp ve Schwede, 2004).

PROCHECK, bir Ramachandran grafiği oluşturan ve burulma açıları, yüzey alanını, bağ açısını ve atomik mesafeleri değerlendiren modellenmiş proteinin validasyonu için kullanılan bir programdır (Laskowski, MacArthur, Moss, ve Thornton, 1993).

ERRAT, kristalografik model yapısının ve iyileştirmenin incelenmesinde kullanılan bir protein yapısı doğrulama algoritmasıdır (Shen ve Sali, 2006).

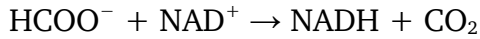
Karşılaştırmalı modelleme olarak da bilinen homoloji modellemesi, iki dizi yüksek benzerlik / özdeşlik paylaştığında, ilgili yapılarının da benzer olduğu biyolojik gerçeğine dayanmaktadır.

Bu yöntemde, bir proteinin 3D yapısı aşağıdaki adımlarla elde edilir:

(i) belirli bir hedef dizi için, BLAST araması kullanılarak uygun şablonu belirleme, (ii) dizi hizalama, (iii) korunmuş veya fonksiyonel olarak önemli kalıntıların hizalanmasını sağlamak için hizalama düzeltmeleri, (iv) omurga oluşturma, (v) döngü modelleme, (vi) rotomer kütüphaneleri kullanılarak yan zincir modelleme, (vii) enerji minimizasyonu kullanarak modeli optimize etme ve (viii) Ramachandran grafiğinin izin verilen bölgelerindeki artıklar ve uygun enerjiler kullanılarak stereokimyasal değerlendirme ile modelin doğrulanması (Gromiha, Nagarajan, ve Selvaraj, 2019).

2.3 NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrojenaz

NAD⁺-bağımlı format dehidrojenaz (EC 1.2.1.2, FDH) enzimi prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan, format iyonlarını CO₂' ye yükseltirken NAD⁺ molekülünü NADH' a indirgeyen endüstriyel açıdan önemli bir enzimdir (Tishkov ve Popov, 2006). Uygun şartlarda FDH enzimi bu tepkimeyi ters yönlü olarakta gerçekleştirebilmektedir.



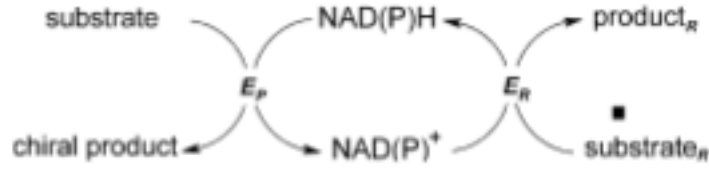
Doğada NAD⁺ -bağımlı format dehidrojenazlar yaygın olarak bulunur. NAD⁺-bağımlı format dehidrojenaz enzimi ilk defa 1950'li yıllarda Mathews tarafından bezelye tohumlarından elde edilmiştir (Mathews ve Vennesland, 1950). DNA dizi analizi teknolojisi sayesinde birçok farklı organizmada NAD⁺-bağımlı format dehidrojenaz genleri tanımlanmıştır.

NAD⁺- bağımlı format dehidrojenaz (FDH), metilotrofik mikroorganizmaların enerji arzında ve bitkilerde strese tepki olarak önemli bir rol oynayan enzimdir. FDH iki özdeş altbirimden oluşur, ne prostetik grupları ne de metal iyonlarını içermez (Alekseeva, Savin, ve Tishkov, 2011). FDH, D-spesifik 2-hidroksi asit dehidrojenazların süper familyasına aittir (Vinals, Depiereux, ve Feytmans, 1993). Bu ailenin tüm enzimleri benzer yapıya ve katalitik olarak aktif merkezdeki hemen hemen aynı esansiyel amino asit kalıntıları kümesine sahiptir (Popov ve Lamzin, 1994) (Lamzin, Dauter, ve Wilson, 1995). Format oksidasyonunun FDH ile katalize edildiği reaksiyon, karbonil bileşiklerinin dehidrojenasyonunun en basit

örneğidir, çünkü katalitik mekanizmada ne proton transferi safhası ne de asit-baz katalizinin diğer safhaları yoktur. FDH'lerin aktivite ve sistematik çalışması 1970'lerin başında başlamış ve öncelikli olarak mikroorganizmaların enzimi üzerinde durulmuştur. Bu ilgi, FDH'nin NAD⁺ bağımlı dehidrojenazlarla kiral sentez enzimatik işlemlerinde NADH rejenerasyonu amacıyla uygulanmasından (Wichmann, Wandrey, Bückmann, ve Kula , 2000) (Hummel ve Kula, 1989) ve dehidrojenaz katalitik mekanizması üzerindeki temel çalışmalardan kaynaklanmıştır (Tishkov ve Popov, 2006).

Mikrobiyal FDH'lerin fizyolojik rolü farklıdır. Metanol kullanan bakteri ve mayada, bu enzim bir hücrede enerji arzında bulunurken, patojenik bakteri ve mantarlarda FDH bir stres proteindir. Yapılan çalışmalar, FDH'nin patojen mikroorganizmalardaki stres proteinlerine benzer şekilde bitkilerdeki stres proteinlerine ait olduğunu ortaya koymuştur. Spesifik koşullar altında, FDH'nin hücre işlevlerinde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. Örneğin, FDH bitkilerde bir stres proteini gibi görünmektedir. Enzim mitokondriye lokalize olur ve biyosentezi stresli koşullar altında keskin şekilde artar (toplam mitokondriyal proteinlerin % 9'una kadar) (Francs-Small, Ambard-Bretteville, Small, ve Remy, 1993). FDH izoformları oranının analizi hastalıklı ağaçları tanımlamak için kullanılmıştır (Weerasinghe, Weerasekera, ve Van Holm , 1999). FDH sentezi kuraklık, sıcaklıkta ani değişimler, sert ultraviyole ışınına tutma, kimyasal ajanlar (Hourton-Cabassa ve diğerleri, 1998; Thompson, Bowsher ve Tobin, 1998). hipoksi (Andreadeli ve diğerleri, 2009). ve patojen mikroorganizmaların etkisi gibi stres koşulları altında önemli ölçüde artmaktadır (David ve diğerleri, 2010).

FDH ile ilgili makale sayısı yıldan yıla artmaktadır ve çalışmaların çoğu, NAD(P) bağımlı oksidoredüktazlarla kiral sentez işlemlerinde kofaktör rejenerasyonu için FDH uygulamasını tarif etmektedir. Optik olarak aktif bileşiklerin kofaktör bağlı enzimatik sentezi için NAD(P)H rejenerasyonunun genel şeması Şekil 2.1' de sunulmuştur:



Şekil 2.1 FDH Enzimi NAD(P)H Rejenerasyonu Şeması (Hummel, Werner ve Kula, 1989)

Şekil 2.1' de gösterildiği gibi ana enzim E_p (dehidrojenaz, redüktaz, monoksijenaz, vb.), indirgenmiş kofaktör kullanarak bir kiral bileşiğin üretimini katalize ederken, ikinci enzim E_R (örneğin, dehidrojenaz formatı) oksidize koenzimi NAD(P)H' ye geri indirgemektedir. Bazı durumlarda, aynı enzim her iki reaksiyonu da katalize edebilir (Hummel, Werner ve Kula, 1989).

Çok sayıda çalışma, FDH' nin indirgenmiş kofaktör rejenerasyonu için en iyi enzimlerden biri olduğunu göstermiştir (Tishkov ve Popov, 2006). FDH tarafından katalizlenen reaksiyon, NAD(P)H rejenerasyonu için tüm kriterlere uyar:

1. Reaksiyon normal koşullar altında geri döndürülemez. Bu, ana reaksiyonun dengesini değiştirmek için termodinamik basınç sağlar ve nihai ürünün% 99-100 verimini verir.
2. Format iyonu ucuz bir substrattır ve reaksiyon ürünü, CO₂, reaksiyon karışımından kolayca çıkarılabilir ve nihai ürünün saflaştırılmasını engellemez.
3. FDH geniş bir pH aralığında optimum katalitik aktivite sergiler (6.0 - 9.0).
4. Metanol kullanan maya ve bakteriler nispeten düşük üretim maliyeti ile yüksek ölçekli bir enzim üretimi sağlar.
5. Bakteriyel ve maya FDH'leri bir süre boyunca akış reaktörlerinde (flow-through reactors) kullanılmak üzere yeterince kararlıdır (Tishkov ve Popov, 2006).

Bununla birlikte, enzim biyotransformasyon koşulları altında oldukça hızlı bir inaktivasyon gösterir (Kragl, Kruse, Hummel, Wandrey, 1996), bu da biyokatalizör için daha yüksek maliyetler sağlar (Slusarczyk, Felber, Kula ve Pohl,

2000). Kofaktör rejenerasyonu için ideal bir katalizör olan FDH' in endüstriyel kullanımı amacıyla sadece su çözeltilerinde değil, aynı zamanda daha agresif ortamlarda da stabil olabilen yeni FDH bazlı katalizörlerin geliştirilmesi önemlidir. Genel olarak NAD⁺ bağımlı Format Dehidrogenaz enziminin istikrarında payı olan üç ana faktör vardır. Birincisi, enzimin termal kararlılığıdır; yani yüksek sıcaklıklarda aktif kalma kabiliyeti. Enzimlerin termal inaktivasyonu genellikle protein denatürasyonu yoluyla gerçekleşir. Farklı kökenlerden oluşan format dehidrogenazların termal stabilitesi geniş ölçüde değişir. Genel enzim stabilitesini belirleyen ikinci faktör kimyasal stabilitesidir; yani enzim aktif bölgesinde bulunan veya üçüncül ve dördüncül yapıların stabilizasyonundan sorumlu olan amino asit kalıntılarını modifiye eden kimyasalların varlığında aktif kalma kabiliyeti. Protein depolanması için özellikle önemli olan üçüncü faktör, proteazların varlığında enzim stabilitesidir. En düşük proteaz safsızlık seviyeleri bile (% 0.001'e kadar) depolama sırasında tam bir enzim aktivitesi kaybına neden olabilir (Savin ve Tishkov, 2010).

Bu enzimin fizyolojik rolünün önemi ve bitkilerdeki FDH'ler konusunda çalışmaların kısıtlı sayıda oluşu, bitki FDH'leri konusunda sistemli çalışmaların ve endüstriyel kullanım potansiyellerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.4 Bitkilerde NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz

Bitki FDH enzimi ilk olarak 1921' de fasulye (*Phaseolus vulgaris*)' de bulunmuştur (Thunberg, 1921). Bitki format dehidrogenazlarının ayrıntılı olarak tanımlanması ve bitki metabolizmasındaki rolünü belirlemek için ilk girişim 1951' de D. Davison (Davison, 1951) tarafından bezelye ve fasulye tohumlarından gelen format dehidrogenaz örnekleri ile yapılmıştır. Bununla birlikte, FDH' in bitkilerdeki rolü oldukça karmaşıktır. Format dehidrogenaz reaksiyonu yoluyla elde edilen NADH oksidasyonunda biriken enerji, elektron taşıma zinciri yoluyla ATP oluşumu için tüketildiğinden, hücrenin enerji talebini tatmin ettiği varsayılmıştır (Oliver,

1981). Format metabolizması ile bitkinin strese cevabı arasındaki ilişki ilk olarak 1978 yılında belirlenmiştir (Hanson ve Nelsen, 1978).

Fazla yağışlı koşullar altında yetişen arpada, formattan etiketli karbon dioksit formasyonundan artan oluşum gözlemlenmiştir. FDH' in fizyolojik rolü hakkındaki çalışmalar toplam mitokondriyal proteinin %9' unu oluşturan fotosentetik olmayan patates dokularında (sap, kökler) bilinmeyen bir protein bulunduğu zaman (1992) başlamıştır. Bu bilinmeyen proteinin geni klonlanmış ve dizilenmiştir. Dizilenen gen ile *Pseudomonas* sp. 101'de ki FDH geninin %55' den fazla homolojiye sahip olduğu bulunmuştur (des Francs-Small ve diğerleri, 1992). Ve bu polipeptit, FDH enzimi gibi formatın oksidasyonunu katalize etmiş ve NAD⁺ nın indirgenmesini sağlamıştır. FDH proteinin N- ucu üzerinde mitokondriye girdikten sonra ayrılan bir sinyal peptidi bulunmuştur. Bu sinyal peptidi FDH in mitokondriye taşınmasını sağlamaktadır ve sinyal peptidinin çıkarılması veya herhangi bir mutasyon olması durumunda FDH' in mitokondriye taşınması tamamen engellenmektedir (Ambard-Bretteville, Small, Grandjean ve des Francs-Small, 2003). Sentezlenen proenzimin N-ucunda sitoplazmadan mitokondriye FDH taşınmasından sorumlu olan bir sinyal peptidi varlığı, bitki FDH' inin karakteristik özelliğidir (des Francs-Small, Ambard-Bretteville, Small, ve Rémy, 1993). Bakteriyel ve maya FDH' leri hiçbir sinyal peptidi içermez. Bir takım patojen funguslardan alınan FDH genleri ayrıca sinyal peptidini kodlayan nükleotid dizisini içermektedir. Bununla birlikte, konakçı hücrenin durumuna bağlı olarak, FDH geninden sentezlenen RNA, alternatif splicing işlemine uğrayarak hem sinyal peptidli hem de sinyal peptidi olmayan proteinleri kodlayan farklı mRNA üretmektedir (Hwang, Hocking-Murray, Bahrami, Andersson, Rine, ve Sil, 2003). Sinyal dizilimi oldukça korunmuştur. Sadece iki N-terminal amino asitin delesyonu, enzimin mitokondriye taşınmasını bloke etmektedir (Ambard-Bretteville, Small, Grandjean ve des Francs-Small, 2003). N-terminal MAM motifinin enzimin mitokondride hızlı bir şekilde taşınmasını sağladığı tespit edilmiştir.

Çoğu bitkide, FDH mitokondride bulunur; Bununla birlikte, *A. thaliana* enziminin sinyal peptidinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi enzimin kloroplastlara taşınabileceğini göstermiştir. Bu enzimin N-terminal fragmanı, patates, arpa ve pirinçten elde edilen FDH'lerin sinyal dizilerinden oldukça farklıdır. Belirli koşullar altında, AthFDH'nin kloroplastlarda lokalize edildiği ve ters reaksiyonu, yani karbondioksiti formata dönüştürmeyi katalizleyebildiğine dair bir hipotez vardır (Olson, Skavdahl, Ramberg, Osterman ve Markwell, 2000).

Dahası, karanlıkta yetiştirilen bitkilerde (bezelye sapları, hindiba yaprakları, havuç kökleri, tatlı patates yumruları, vb.) FDH konsantrasyonu hızla artmıştır (des Francs-Small ve diğerleri, 1992).

FDH'in bir şok proteini olduğu gösterilmiştir ve FDH'ın sentezi kuraklık, hipoksi, düşük sıcaklık vb. gibi çeşitli stresler altında çarpıcı bir şekilde artış göstermektedir (Hourton-Cabassa ve diğerleri, 1998; Thompson, Bowshe ve Tobin, 1998).

Format dehidrogenaz hem ekzojen (negatif çevre etkileri) hem de endojenik (gerekli mikro elementlerin eksikliği, patojenlere maruz kalma) süreçlerin neden olduğu hücre stres tepkisinde yer alan evrensel bir enzim olduğu görülmektedir.

Genetiksel olarak patates çeşitlerinin FDH ekspresyon düzeylerinin azaltılması sonucu formatın birikmesi bu koşullar altında enzimin temel rolünün üretilen formatın oksidasyonu olduğu belirtilmiştir (Ambard-Bretteville, Sorin, Rébeillé, Hourton-Cabassa ve des Francs-Small, 2003).

Dolayısıyla FDH'in yüksek bitkilerin metabolizma süreçlerinde kilit bir rolü olduğu anlaşılmaktadır. Strese yanıt mekanizmasının anlaşılması, soğuğa, kuraklığa vb. streslere dirençli bitkiler oluşturmada umut verici olarak görülmektedir (Hanson, Gage, ve Shachar-Hill, 2000).

Katalitik aktivitesinin artırılması ile üretilen mutant FDH'ın bitki genomuna eklenmesi ile mutant formların üretilmesi strese karşı dirençli bitki tasarımında yeni bir yaklaşım sunmaktadır.

2.5 Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, ROT (OH , H₂O₂ gibi) ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Buyukguzel, 2013). Protein oksidasyonunun birçok mekanizması vardır ve amino asit yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır. Serbest radikal ya da radikal olmayan bir oksidan ile gerçekleşen oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, omurganın fragmentasyonu, yeni reaktif türlerin oluşumu (DOPA, peroksit), fazla miktarda radikal oluşumu ve zincir reaksiyonu şeklinde devam ettirilmesi, protein yada amino asitlerde dimerleşme, çökeltme, proteinin normal katlanmasının bozulması veya konformasyon değişimi, yapısal bozulmaya bağlı işlevsel kayıp, enzim gibi işlevsel proteinlerin çevirim sayısının değişmesi, gen düzenlenmesinin ve ifadesinin değişimi, hücre sinyal yollarında modifikasyon, apoptoz ve nekrozun uyarılması, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, konformasyon ve hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir (Hawkins ve Davies 2001). Proteinlerin amino asit yan zincirleri, metal iyonları katalizörlüğünde serbest radikaller tarafından oksidasyona oldukça hassastır. Sistein, metiyonin gibi sülfür içeren amino asitler de taşıdıkları yan zincirlerinden dolayı oksidantlara karşı oldukça açıktır. Serbest radikallerin bu amino asitlere atağı sonucu sülfenik (Cys-SOH), sülfirik (Cys-SO₂-H), sülfonik (Cys-SO₃-H) türevleri, disülfidler ve metiyonin sülfoksit gibi okside ürünler oluşur. Yan zincirlerinde okside metiyonine sahip proteinler, katalitik aktivitelerinde ve yüzey hidrofobitelerinde değişime uğrarlar (Levine, Berlett, Moskovitz, Mosoni, ve Stadtman, 1999). Proteinlerin yapısındaki taşıdıkları bu amino asitler proteinin oksidatif stabilitesi üzerinde olumsuz etkiye sahiptir.

FDH enziminde oksidatif stabilite tayinleri amacıyla hidrojen peroksidin inaktivasyon madde olarak kullanılmasının 3 ana nedeni aşağıda belirtilmiştir:

-Hidrojen peroksit küçük bir moleküldür ve hem yüzey tiyollerini hem de protein globülünün içinde bulunanları okside edebilir (Tishkov ve diğerleri, 1993).

-Hidrojen peroksit, doğal olarak oluşan bir inaktive edici ve sinyal verici maddedir. Doğal kökenli ve küçük boyutlu hidrojen peroksit, in vivo FDH stabilitesinin değerlendirilmesi için iyi bir kimyasal madde olmasını sağlar (Savin ve Tishkov, 2010).

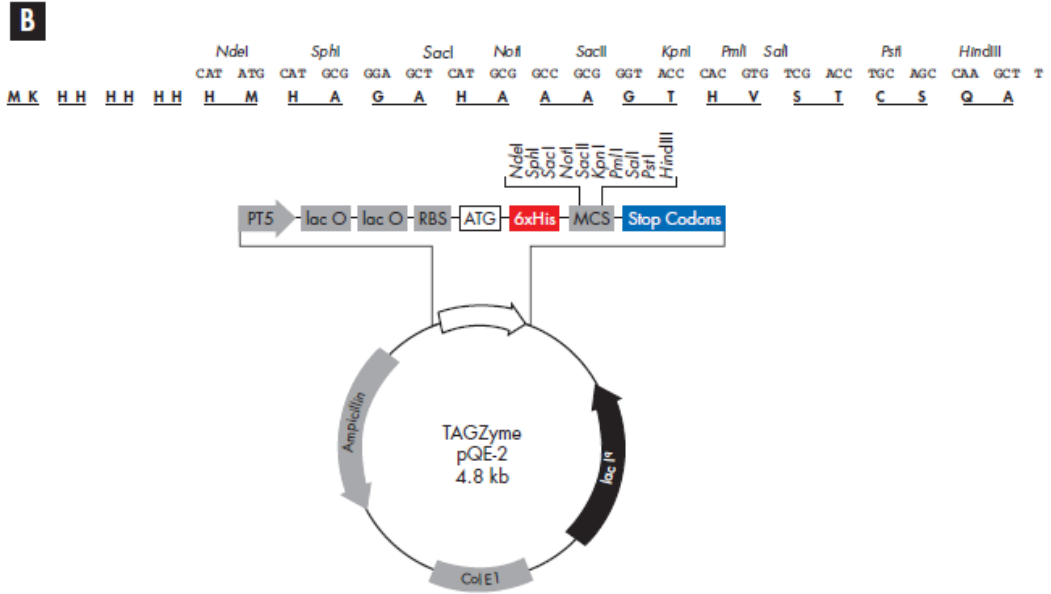
- Stres koşulları altında hücredeki hidrojen peroksit konsantrasyonu artar. Bazen, hücredeki FDH konsantrasyonu stres altında da önemli ölçüde artar. Örneğin, bitkilerde, FDH mitokondride bulunur ve stres altında organeldeki enzim içeriği toplam proteinin %9' una ulaşabilir (des Francs-Small ve diğerleri, 1992).

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör

Bu çalışmada kompatent hücre olarak ticari bakteri suşu kullanılmıştır. DH5a -T1 *E. coli* (F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*) (Invitrogen) ticari kompatent hücre.

GhFDH geni Günseli Kurt-Gür ve Emel Ordu (Yıldız Teknik Üniversitesi) tarafından pQE-2 vektörüne klonlanmış ve stok hücre olarak sağlanmıştır.



Şekil 3.1 pQE-2 vektör haritası

3.1.2 Kullanılan Kitler

PCR Plus Master Mix II (5x) (GeneMark)

EcoSpin Plasmid Isolation Kit (ECO TECH)

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher)

ZipPrime® Sequencing Purification Kit

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Termal Cihazı, Spektrofotometre cihazı (UV-1800), jel elektroforez cihazı(Thermo fisher EC250-90), Applied Biosystems™ 3130 DNA Analizer, mikropipet (Eppendorf), Vortex (Heidolph, Stuart), hassas terazi (Shimadzu ATX224), Santrifüj cihazı(Hettich Universal 32R), güvenlik kabini (Hedlab X-Bio Class-II), -80 °C Dolabı(Thermo fisher)

3.1.4 Kimyasallar ve Malzemeler

Sodyum hidroksit (NaOH, Sigma Aldrich), hidroklorik asit (HCl, Sigma-Aldrich), distile su (H₂O), etanol (EtOH, Sigma Aldrich), etilendiamintetraasetik asit (EDTA Sigma Aldrich), quartz küvet (Sigma Aldrich), Tris (Sigma Aldrich), Agaroz (Sigma Aldrich), falkon tüp (Isolab), NAD (NEB), sodyum format (MERCK), 1 kb DNA Markör (NEB).

3.1.5 Kullanılan Besiyerleri

LB(Luria-Bertani) besiyeri:

1 litre için; 10gr peptan, 5gr NaCl ve 5gr Maya ekstratı içerir. LB Agar besi yeri hazırlamak için litresine 15 gr agar eklenir. pH:7.0' ye ayarlanır.

LB Agar besi yeri hazırlandıktan sonra otoklavda sterilize edilir. Sterilizasyon işlevi 121° C' de 1,5 atm basınçta 20 dakika süre ile yapılır. Otoklavdan sonra bu besi yerleri amfisilinli LB katı besi yeri hazırlamak için elle tutulabilecek ısıya

geldiğinde amfisilin eklenerek sterilize petri kaplarına, petri başına 25 ml besi yeri olacak şekilde dökülür. LB Agar besiyerleri donmaya bırakılır.

SOB (pH 7.0) (Super Optimal Broth):

%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstraktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ içeriği hazırlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanır.

SOC (Super Optimal Broth with added Glycose):

49 ml SOB'ye, 1 ml steril 1 M Glukoz solüsyonu eklenerek elde edilir.

TB (Terrific Broth) besiyeri:

1 litre için; 12 gr Tripton, 24 gr Maya ekstratı ve 4 ml Gliserol 900 ml distile su içerisinde çözündürülür. Otoklavda sterilize edilir. Sterilizasyon işlevi 121° C' de 1,5 atm basınçta 20 dakika süre ile yapılır. Otoklavdan sonra solüsyonun ısısı 60 ° C' ye düşünce 100 ml potasyum fosfat tamponu eklenir.

3.1.6 Kullanılan Tampon Çözeltileri

10X TBE Tamponu: 1 litre TBE Tamponu için; 54,0 g Tris, 27,5 g Borik Asit ve 7,44 g EDTA tartılır ve aynı kapta distile suda çözülür, pH 8,3'e ayarlanır ve 1 litreye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

TE tamponu: 100mM Tris-HCl (pH:8), 0.5mM EDTA. Otoklavda sterilize edildi.

Amfisilin: 100 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

IPTG (Isopropyl-B-D-thiogalopyranoside): 20 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

Protein Saflaştırma Tamponları:

Liziz Tamponu (pH:8, 1 Litre): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol

Yıkama Tamponu (pH:8, 1 Litre): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol

Elüsyon Tamponu (pH:8, 1 Litre): 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol

3.2 Metod

3.2.1 Homoloji Modelleme

BLASTP 2.6.1 ile PDB protein veritabanı araştırmasına göre GhFDH amino asit dizisinin AtFDH ile %88, CbFDH ile %52, PsFDH ile %51 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca SmartBLAST analizine göre GhFDH ile *Glycine max* FDH arasında da % 88'lik bir benzerlik tespit edilmiştir. Diğer bitki FDH'leri ile tutarlı olarak GhFDH ve bakteriyel FDH'ler arasındaki benzerliğin %50 civarında olduğu; bitki FDH'leri ile benzerliğin %80'in üzerinde olduğu görülmüştür [18]. Rekombinant GhFDH'in 3- boyutlu yapı modeli SWISS-MODEL homoloji modelleme aracı ile % 87.6 dizi benzerliği gösteren *Arabidopsis thaliana* format dehidrogenaz apo-form AtFDH (pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70 Å) ve ligand bağlanmış AtFDH (pdb code: 3N7U, resolution 2.0 Å) kalıp olarak kullanılarak yapılmıştır (Arnold, Bordoli, Kopp ve Schwede, 2006).

3.2.2 Bölgeye Özel Mutasyon (Site Directed Mutagenesis)

Hedefe yönelik mutasyon gerçekleştirmek için hedef mutasyonu içeren primerler tasarlandı ve Triogen firmasına hizmet alımı olarak sentezletildi. Hedef mutasyona yönelik tasarlanmış primerler Tablo 3.1' de gösterildi. Amino asit değiştiren 3' lü baz değişimi koyu renk ile belirtildi. Mutasyon PCR' larında kalıp olarak kullanılacak yabancı tip GhFDH geni içeren DH5α -T1 *E. coli* suşu -80 C' den alınıp çoğaltılarak plasmid DNA izolasyonu yapıldı. PCR, Plus Master Mix II (5x) (GeneMark) kit kullanılarak gerçekleştirildi. PCR içeriği Tablo 3.2' de ve termal koşulları Tablo 3.3' de gösterildi. Mutasyonu içermeyen genleri elimine etmek için DpnI endonükleaz kesim enzimi ile yabancı tip GhFDH genleri parçalandı. DpnI kesim reaksiyonu için 7.5 µl ddH₂O, 2 µl 10x Tango Buffer, 10 µl PCR ürünü, 0.5 µl DpnI (Invitrogen) karışımı 4 saat 37 °C' de inkübe edildikten sonra 80 °C' de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı.

Tablo 3.1 Hedefe Yönelik Mutasyon için Tasarlanan Primerler

Mutasyon		Primer
M258L	Forward	5'-GCTCGAGGAGCGATCTTGGATACTCAAGCTG-3'
M258L	Reverse	5'-CAGCTTGAGTATCCAAGATCGCTCCTCGAGC-3'
M294L	Forward	5'-CATCCATGGCGTTACTTGCCAAATCAAGCTATG-3'
M294L	Reverse	5'-CATAGCTTGATTTGGCAAGTAACGCCATGGATG-3'
M299L	Forward	5'-GCCAAATCAAGCTTTGACTCCTCATATTTTC-3'
M299L	Reverse	5'-GAAATATGAGGAGTCAAAGCTTGATTTGGC-3'

Tablo 3.2 PCR Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	Miktar
ddH ₂ O	14,5 µl
DNA Template (20 ng)	2 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
PCR Plus Master Mix II (5x)	5 µl

Tablo 3.3 PCR Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	3.5 dk	1
94 °C	30 sn	30
37-68°C (Primer Tm' sine bağlı)	30 sn	
72°C	5.5 dk	
4°C	∞	1

3.2.3 Transformasyon

DpnI endonükleaz enzimi ile muamele edilmiş PCR ürünü DH5a -T1 *E. coli* kompatent hücrelerine transformasyonu aşağıda verilen adımları takip ederek gerçekleştirildi.

1. -80°C' de saklanan 50 µL *E. coli* DH5a stok hücreleri 5 dakika buz üzerinde çözünene kadar bekletildi, hafifçe karıştırıldı.
2. Buzda erimiş olan kompetan bakterilerin 50 µl' si üzerine 2 µl PCR ürünü eklendi, hafifçe karıştırıldı.
3. Karışım 12 dakika buz üzerinde bekletildi.
4. Bakteriler buzdan alınıp 42°C' de 30 saniye bekletildi. (Hücrelerin yüksek sıcaklıkta bekletilmesi hücre membranlarındaki fosfolipidlerin hareketlerini sağlar. Hücre zarındaki porların açılması ile vektörün içeri girdiği düşünülmektedir.)
5. 42 °C' den alınan bakteriler 2 dakika buz üzerinde bekletilir. (Bu ısı şoku yöntemiyle porlar açılıp kapanarak hücrelerin vektörü içine alması sağlanmıştır.)
6. Hücreler buzdan çıkarılıp üzerine 200 µl SOC eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
8. 37 °C 200 rpm' de bir saat çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi.

9. 125 µl hücre ampisilinli LB katı besiyerine yayma yöntemi ile ekildi. Kolonilerin çoğalması için 37 °C' de gece boyu inkübe edildi.

3.2.4 Koloni Tarama ve Stoklama

Transformasyon sonrası gece boyu inkübe edilen plateden seçilen koloniler ampisilinli sıvı LB' ye ekildi. Seçilen kolonilerin mutasyonu taşıdığını tespit etmek amacıyla EcoSpin Plasmid Isolation Kit (ECO TECH) ile plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra Sanger dizi analizi yöntemi ile dizilendi. Dizileme reaksiyonu, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher) kit kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği Tablo 3.5' de ve termal koşulları Tablo 3.6' de gösterildi. Dizilemede kullanılan primer dizisi Tablo 3.4' da verildi.

Sanger dizileme reaksiyonu sonucu reaksiyon ürünlerin saflaştırılarak kapiler elektroforez sistemine (ABI Genetic Analyzer 3130) yüklemeye hazır hale getirilmesi amacı ile ZipPrime® Sequencing Purification Kit kullanıldı. Saflaştırılan ürünler Applied Biosystems™ 3130 DNA Analizer cihazına yüklendi.

Nükleik asit dizisi belirlenen gen, GhFDH geni ile Homoloji BLAST yapılarak mutasyon ve amino asit değişimi tespit edildi. Hedef mutasyonu taşıdığı belirlenen plasmidleri içeren hücreler bir gece boyu 37°C' de büyütüldükten sonra %20 gliserol içeren -80 °C stokları oluşturuldu.

Tablo 3.4 Dizileme için Kullanılan Primerler

Primer Adı		Primer Dizisi
FDH Seq	Forward	5'- TACTGGGAGCAATGTCGT -3'
pQE-FP	Reverse	5'- CGGATAACAATTTACACACAG -3'
pQE-RP	Reverse	5'- GTTCTGAGGTCATTACTGG -3'

Tablo 3.5 Dizileme Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	Miktar
ddH ₂ O	2 µl
DNA Template (100-150 ng)	2 µl
Forward Primer (3.2 µM)	2 µl
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	2 µl
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	2 µl

Tablo 3.6 Dizileme Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
96 °C	1 dk	1
96 °C	10 sn	25
50 °C	5 sn	
60 °C	4 dk	
4°C	∞	1

3.2.5 Hücre Büyütme ve Protein Ekspresyonu

pQE-2 vektörü içinde yer alan histidin kuyruklu rekombinant GhFDH genini içeren *E. coli* DH5a hücreleri 37 °C' de bir gece LB besi yerinde 250 rpm de çalkalanarak büyütüldü. Bir gece büyütülmüş bu hücre kültüründen 50 ml alınarak Ampisilin (100µg/ml) içeren 1000ml TB besiyerinde 37 °C' de OD₆₀₀ değeri 0.6 ya ulaşana

kadar çalkalanarak büyütüldü. Kültüre son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde 1mM IPTG (isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside) eklenerek GhFDH gen anlatımı indüklendi. IPTG ile indüklendikten sonra 24 °C' de 24 saat çalkalanarak büyütüldü. Kültür 4000 g' de 20 dk santrifüj edilerek pellet -80 °C' de saklandı.

3.2.6 6xHis-tag sistemi kullanılarak GhFDH proteininin saflaştırılması

1000 ml kültürden santrifüj edilmiş hücreler, 20 ml lizis tamponunda süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonuna 1 mg/ml lizozim eklenerek buz üzerinde 30 dk çalkalanarak inkübe edildi. Hücre süspansiyonu 200–300 W' da sonikasyon ile 10'ar saniye aralıklar ile 6 kez sonikasyonda parçalama işlemine maruz bırakıldı. Parçalanmış hücre süspansiyonu 15000 g' de 15 dk 4 °C' de santrifüj ile çöktürüldü. 1 ml % 50Ni-NTA rezinine 15 ml çöktürülmüş hücre süspansiyonunun süpernatantı eklendi. 4°C' de 60 dakika hafifce çalkalandı. Karışım 13000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi. süpernatant ayrıldı. Çökmüş rezin 2 kez 3 ml yıkama tamponu eklenerek 13000 rpm' de 1 dk santrifüj ile yıkandı. His-tagged proteinleri, 1 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilerek 1 ml elüsyon tamponu ile 6 kez elute edildi. Her aşamadan toplanan örnekler ve elüt edilen proteinler, SDS poliakrilamid jel (%12/ h) elektroforezi ile analiz edildi. SDS-PAGE ve Coomassie Brilliant Blue boyaması, proteinin saflaştırmadan sonra > % 95 saf olduğunu gösterdi. Protein konsantrasyonu, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile belirlendi ve 39000 Da monomer kütlesi kullanılarak monomerik protein konsantrasyonu cinsinden ifade edildi.

3.2.7 Kinetik ve Termodinamik Karakterizasyon Deneyleri

3.2.7.1 Kararlı hal kinetiği

Rekombinant doğal ve mutant *cmFDH'* lerin kararlı durum kinetik deneyleri, 20 mM pH 7 Tris Tamponu, 1 mM NAD⁺, 0-40 mM format ve 0.4 μ M enzim (Mr 42000) içeren reaksiyon karışımında 25 °C' de Shimadzu 1800 çift ışınlı (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. NADH

üretimi için 340 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü ve elde edilen veriler Grafit 5 Kinetics Software programına yerleştirilerek analiz edildi.

3.2.7.2 Termal Stabilite

Enzimler, üçlü tekrarlar halinde 20 dakika boyunca 25 ila 75 derece aralığındaki 5 °C aralıklarla inkübe edildi. Aktivite ölçümleri pH 7 20 mM potasyum fosfat tampon, 1 mM NAD⁺, 10 mM format ve 0.4 µM enzim içeren bir reaksiyon karışımında 25 °C' de gerçekleştirildi. Her bir ölçüm 3 kez tekrar edildi. Optimum koşullardaki aktiviteyi %50 azaltmak için gereken sıcaklığı gösteren T0.5 değeri, Grafit 5 kullanılarak sıcaklığa karşı kalan aktivite grafiğinden belirlendi.

3.2.7.3 Oksidatif Stabilite

Oksidatif stabilite tayini için enzimler 50 mM, 100 mM, 150 mM , 200 mM ve 300 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilerek aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir yoğunluk için 15 dakika aralıklarla 340 nm' de ölçülen değer 0.005 altına düşene kadar enzim aktivitesi ölçümlerine devam edildi. Her bir ölçüm 3 kez tekrar edildi. Her bir H₂O₂ konsantrasyonu için, H₂O₂ (Denaturant) içermeyen ve optimum koşullardaki aktiviteyi %50 azaltmak için gereken zamanı gösteren D0.5 değeri, Grafit 5 kullanılarak zamana karşı kalan aktivite grafiğinden belirlendi.

4.1 Sonuç

4.1.1 Homoloji Modelleme

GhFDH geni 348 amino asit içeren 38.65 kDa büyüklüğünde bir enzim sentezlemektedir. Homodimerik bir proteindir. Bu protein M126, M214, M225, M234, M243, M258, M294, M299, M321 nolu residularda olmak üzere her bir alt ünitesi 9 metiyonin amino asidi içermektedir (Şekil 4.1).

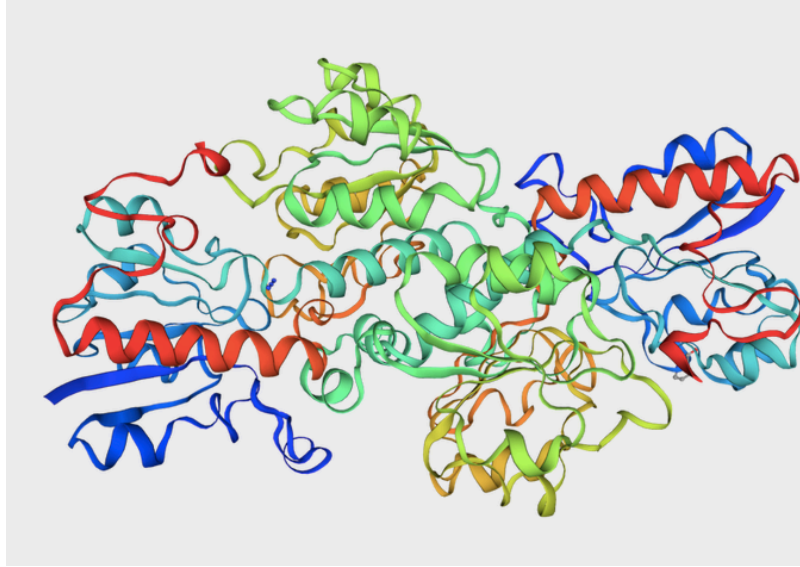
1e1_01:A	MIVGVFYKANEYFTKNPNFVGCVEGALGLRPWLESQGHQYIVTDDKEGPDCELEK	55
1e1_01:B	MIVGVFYKANEYFTKNPNFVGCVEGALGLRPWLESQGHQYIVTDDKEGPDCELEK	55
3naq.1.A	IVGIVFYKANEYATKNPNFVGCVENALGIRDWLESQGHQYIVTDDKEGPDCELEK	64
1e1_01:A	HIPDLHVLISTPPHPAYVTAERIKKAKNLQLLLLTAGIGSDHVDLKAAAEAGLTV	110
1e1_01:B	HIPDLHVLISTPPHPAYVTAERIKKAKNLQLLLLTAGIGSDHVDLKAAAEAGLTV	110
3naq.1.A	HIPDLHVLISTPPHPAYVTAERIKKAKNLKLLLTAGIGSDHVDLQAAAAGLTV	119
1e1_01:A	EVTGSNVVSVAEDELMRILILVRNFVPGYHQVITGDWNVAGIAYRAYDLEGKTVG	165
1e1_01:B	EVTGSNVVSVAEDELMRILILVRNFVPGYHQVITGDWNVAGIAYRAYDLEGKTVG	165
3naq.1.A	EVTGSNVVSVAEDELMRILILMRNFVPGYNQVVBGEWNVAGIAYRAYDLEGKTVG	174
1e1_01:A	TIGAGRIGKLLLQRLKPFNCNLLYHDRVKIDPELEKQTGAKFEEDLDAMLPKCDI	220
1e1_01:B	TIGAGRIGKLLLQRLKPFNCNLLYHDRVKIDPELEKQTGAKFEEDLDAMLPKCDI	220
3naq.1.A	TIGAGRIGKLLLQRLKPFNCNLLYHDRVKIDPELEKQTGAKFEEDLDAMLPKCDI	229
1e1_01:A	IVINMPLTEKTRGMFDKDRIAKMKKGV LIVN NARGAIMDTQAVADACSSGHIAGY	275
1e1_01:B	IVINMPLTEKTRGMFDKDRIAKMKKGV LIVN NARGAIMDTQAVADACSSGHIAGY	275
3naq.1.A	IVINMPLTEKTRGMFDKELIGKLLKGV LIVN NARGAIMDRQAVVDVSSGHIAGY	284
1e1_01:A	SGDVWYQPAPKDHFWRYMPNQAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLERYFKGED	330
1e1_01:B	SGDVWYQPAPKDHFWRYMPNQAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLERYFKGED	330
3naq.1.A	SGDVWYQPAPKDHFWRYMPNQAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLERYFKGED	339
1e1_01:A	FPEQNYIVKAGELAPQYR	348
1e1_01:B	FPEQNYIVKAGELAPQYR	348
3naq.1.A	FPEQNYIVKAGELAPQYR	357

Şekil 4.1 Kalıp amino asit dizisi olarak NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (AtFDH, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) kullanılarak oluşturulan modelin GhFDH ile gösterdiği amino asit homolojisi.

Bu tez çalışmasında GhFDH enziminin stabilitesini arttırmak ve bu metiyonin residularının enzimin aktivite ve stabilitesine olan etkisinin anlaşılması amacıyla

oksidasyona yatkın bölgeler olan metiyonin amino asitlerinin oksidayona dayanıklı bir amino asit ile değiştirilmesi stratejisi uygulanmıştır. Metiyonin amino asidi yerine oksidayona daha dayanıklı aynı zamanda metiyonin gibi hidrofobik bir yan zincire sahip ve işgal ettiği van der Waals hacmi metiyonine yakın bir amino asit olan lösin amino asidi yerleştirilmiştir. Bu değişiklikler sonucu enzimin stabilitesinde ve kinetik özelliklerinde ortaya çıkan değişiklikler incelenmiştir.

Metiyonin-lösin değişimi için rekombinant GhFDH enziminin M258, M294, M299 konumları seçilmiştir. Pozisyonlar SWISS_MODEL homoloji modelleme ile, NAD⁺-bağımlı *Arabidopsis thaliana* (AtFDH, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å, %87,6 dizi benzerliği) FDH'inin amino asit dizisi kalıp olarak kullanılarak oluşturulan homoloji model üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.6, Şekil 4.8). Elde edilen homoloji modellerin, hedef-kalıp eşleşme özelliklerine göre model kalitesini belirleyen “Global Model Quality Estimation” skoru 0.97 ve 0.96 ve “Qualitative Model Energy Analysis”e dayanan QMEAN değeri ise 0.58 ve 0.84'dir.

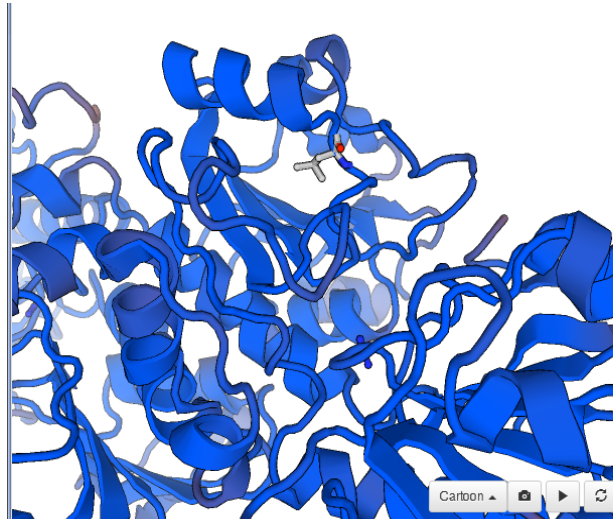


Şekil 4.2 SWISS-MODEL homoloji modelleme aracı ile yapılmış GhFDH modeli

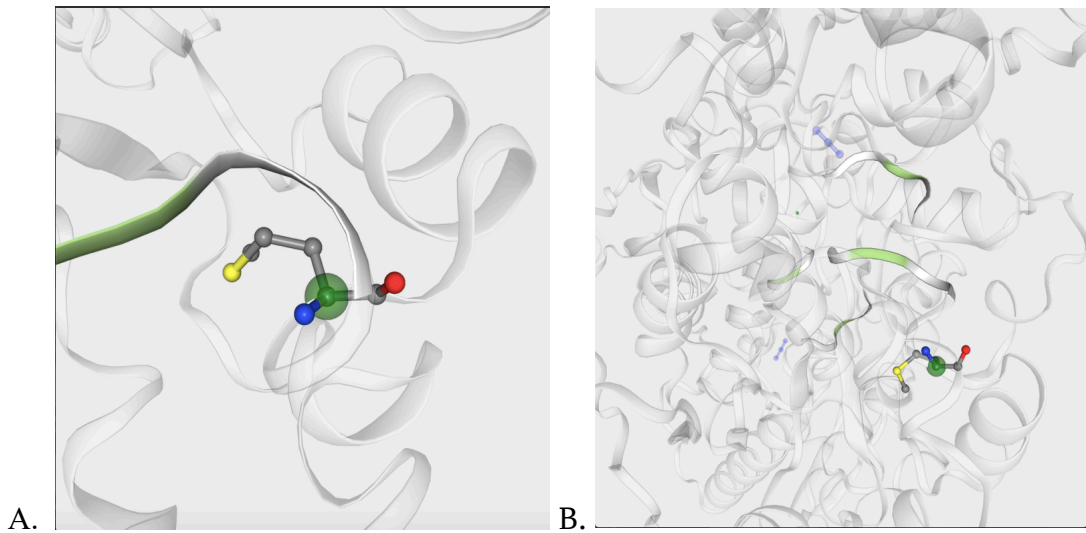
4.1.1.1 *Met258Leu*

GhFDH yapısındaki substrat ve NAD⁺ bağlanma bölgesindeki amino asitler, Ile92, Asn116, Asp191, Asp278 ve katalitik bölgedeki önemli amino asitler olan Arg254 ve His302' in *Lotus japonicus*, *Solanum tuberosum* and *Hordeum vulgare*

FDH'lerinde olduğu gibi korunduğu görülmektedir (Andreadeli ve diğerleri, 2009; Arnold, Bordoli, Kopp ve Schwede, 2006; Labrou ve Rigden, 2001). M258 bir loop yapısı üzerindedir ve katalitik aktivite için önemli olan R254 ile aynı loop yapısında birbirlerine yakın olarak bulunmaktadırlar (Ek B). GhFDH' in 258. bölgesinde bulunan metiyonin amino asidi yerine bazı maya, mantar ve bakteri türlerinde bulunan FDH enzimi için bu bölgede alternatif olarak sistein, valin ve alanin amino asitleri görülmektedir.



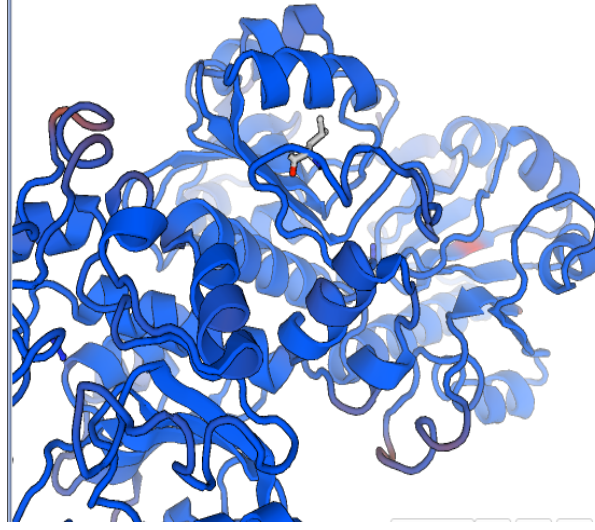
Şekil 4.3 Model M258L



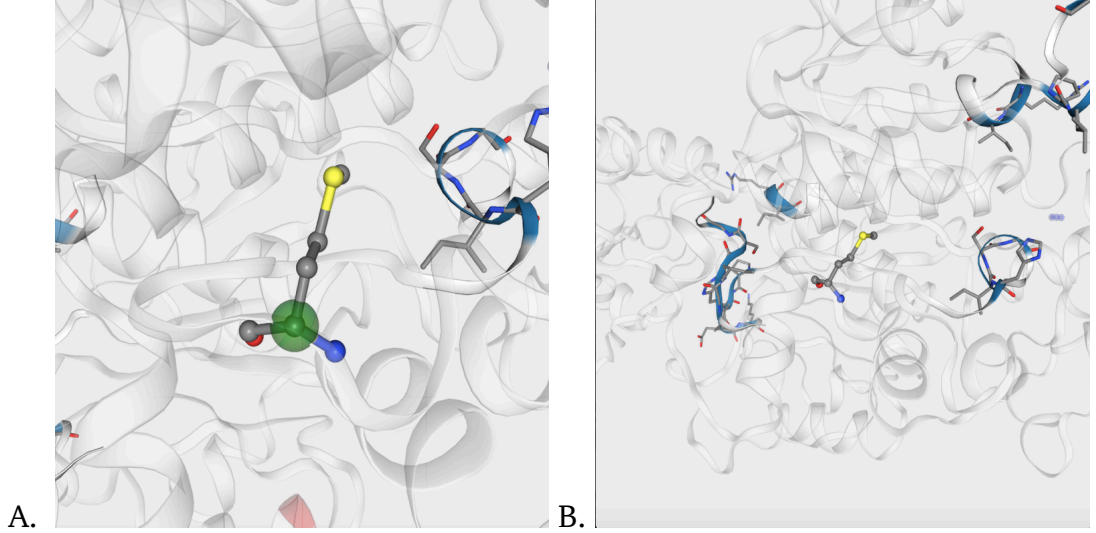
Şekil 4.4 M258 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi. (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim

4.1.1.2 *Met294Leu*

M294 amino asiti proteinin yüzey kısmına yakın bölgededir ve katalitik olarak önemli olan ve korunmuş H302 ile aynı loop yapısı üzerindedir (Ek B). M294 amino asiti diğer türlerdeki FDH enzimindeki konumları ile karşılaştırıldığında yüksek oranda korunduğu görülmektedir.



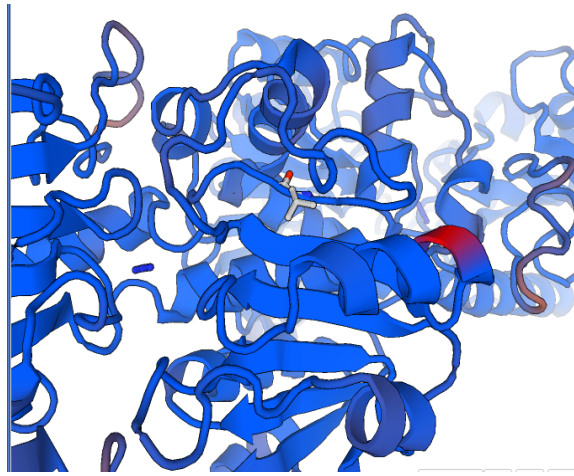
Şekil 4.5 Model M294L



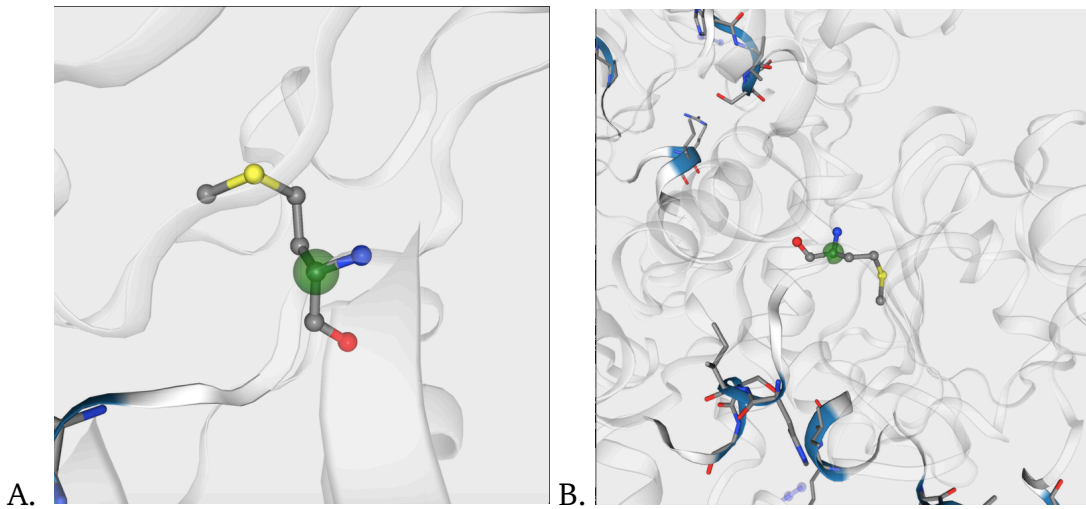
Şekil 4.6 M294 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi. (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim

4.1.1.3 *Met299Leu*

M299 amino asidi katalitik olarak önemli olan ve korunmuş H302 ile aynı loop yapısı üzerinde bulunmaktadırlar (Ek B). Ayrıca proteinin nükleotit bağlanma bölgesine çok yakındadırlar. Nükleotit bağlanma bölgesi proteinde nükleotid fosfatları bağlayan bir bölgeyi tarif etmektedir. Her zaman birden fazla amino asit içerir ve nükleotit bağlanmasına katılan tüm kalıntıları içerir. M299 proteinin iç kısmındadır. GhFDH' in 299. amino asit bölgesinde bulunan metiyonin amino asidi diğer türler ile yapılan homoloji eşleşmesi sonucu bu bölgede diğer türlerde de metiyonin amino asidinin bulunduğu ve korunmuş olduğu tespit edilmiştir.

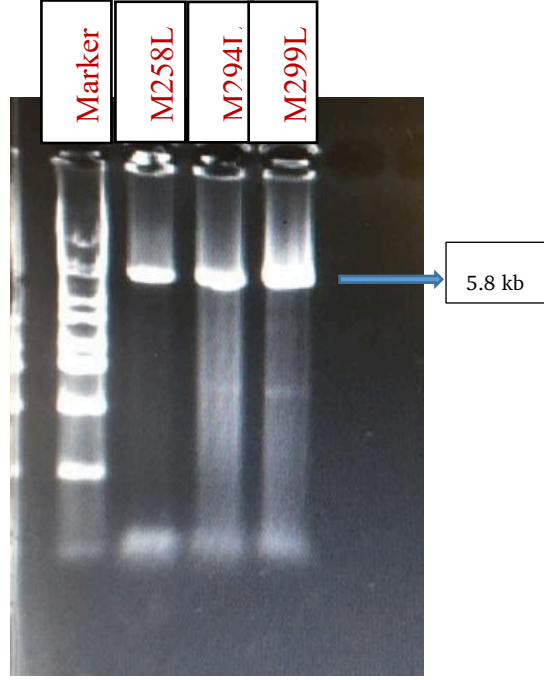


Şekil 4.7 Model M299L



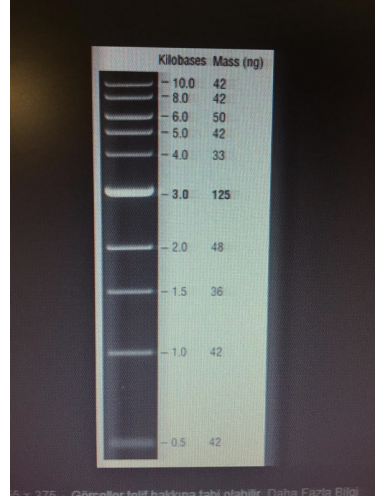
Şekil 4.8 M299 bölgesinin swiss model homoloji modellemesi üzerinde gösterimi. (A) Yakın çekim (B) Uzak çekim

4.1.2 Hedefe Yönelik Mutasyon PCR Sonuçları



Şekil4.9 Yapılan Hedefe Yönelik Mutasyon PCR' ları %0,8 lik Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü

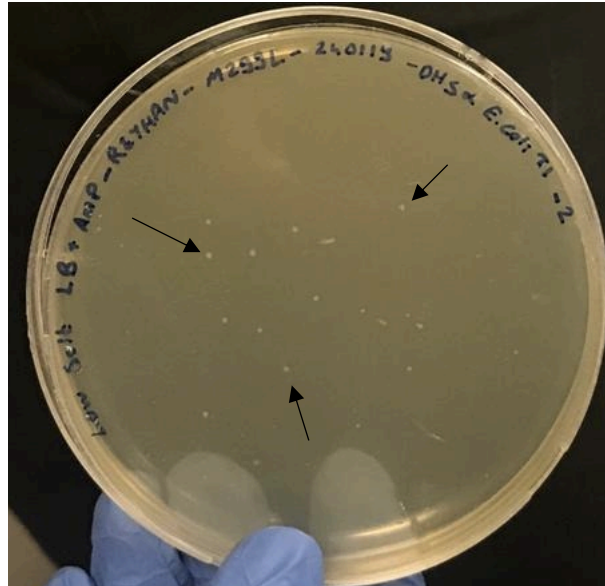
Yapılan mutasyon PCR' ların elektroforez jel görüntüleri Şekil 4.9' da gösterilmiştir. 1 ile numaralandırılmış ilk kuyucuğa 10kb' lik marker yüklenmiştir. Mutasyon PCR ları 2,3,4,5,6,7 ile numaralandırılan kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürünü boyutlarını belirlemek için marker ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 5.8 kb boyutunda olduğu görülmektedir. Bu değer pQE-2 (4.8kb) vektörü ve vektöre bağlanmış 1047 bp büyüklüğündeki GhFDH geni toplam büyüklüğü olan 5.8 kb ile örtüşmektedir.



Şekil 4.10 Agaroz Jel Elektroforezde Kullanılan Marker Boyut Çizelgesi

4.1.3 Transformasyon

Mutant vektörlerin *E. coli* DH5 α hücresine transformasyonundan sonra vektörü içine almış hücreleri seçmek amacıyla Amp içeren katı LB besiyerine ekim yapıldı. Seçilen kolonilerden izole edilen plasmidler M258L, M294L ve M299L mutantlarını doğrulamak amacıyla Sanger dizi analizi yapıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *E. coli* DH5 α Hücresine Transformasyonu Yapılan Mutant Vektörlerin Ampisinli Katı LB Plate Üzerinde Koloni Seçimi

4.1.4 DNA Dizi Analizi ve Homoloji BLAST

Mutant GhFDH vektörlerinin dizi analizi sonucu elde edilen veri yabanıl tip *Gossypium hirsutum* format dehidrogenaz gen dizisi ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmek istenen mutasyonun varlığı tespit edildi. M258L, M294L ve M299L mutantların dizi analizi sonrasında sadece istenilen yerde doğru mutasyonu içerdiği tespit edildi. Elde edilen dizi ve Homoloji BLAST sonuçları ekte (Ek A, sayfa 40-48) verilmiştir.

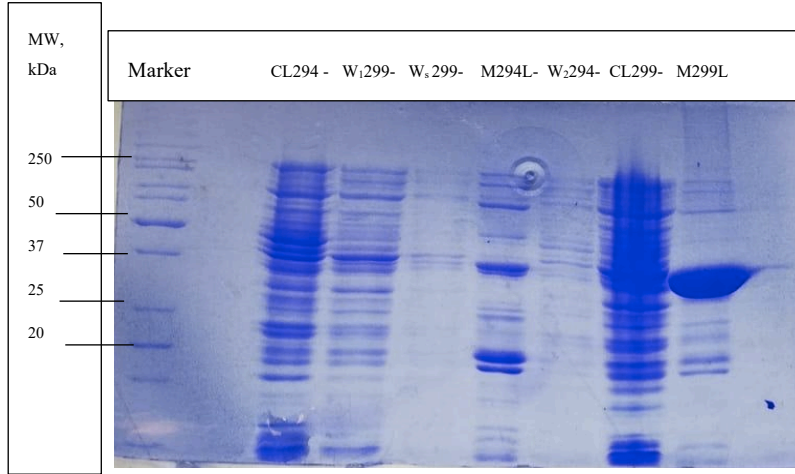
4.1.5 Protein Saflaştırma

Dizi analizi ile doğruluğu tespit edilen mutant GhFDH genini taşıyan hücreler belirlenerek -80 stokları yapılmıştır. Kinetik ve stabilite analizleri için stoktan alınan hücreler 37 °C' de bir gece Amp' li LB besi yerinde 250 rpm de çalkalanarak büyütülmüştür. Bu kültürden alınan 50 ml hücre Amp' li TB besiyerinde IPTG ile indüklendikten sonra 24 °C' de 24 saat çalkalanarak GhFDH protein üretimi yapılmıştır. Elde edilen mutant GhFDH proteinleri 6xHis-tag sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminden sonra mutant GhFDH proteinlerin saflığını görüntülemek amacıyla yapılan SDS-PAGE görüntülemeye aynı koşullarda saflaştırma yapılmasına rağmen bazı mutant proteinlerin uygun saflıkta izole edilemediği tespit edilmiştir. M294L mutantın SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.13' de verildiği gibi uygun saflıkta elde edilemediği görülmektedir. M299L ve M258L mutant GhFDH proteinleri Ni-NTA His-tag saflaştırma yöntemiyle >% 95 olarak saflaştırılabiliştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Safaştırılmış M126L, M214L, M258L, M234L, M243L ve M299L Mutant Proteinlerin SDS PAGE Jel Görüntüsü (Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards)



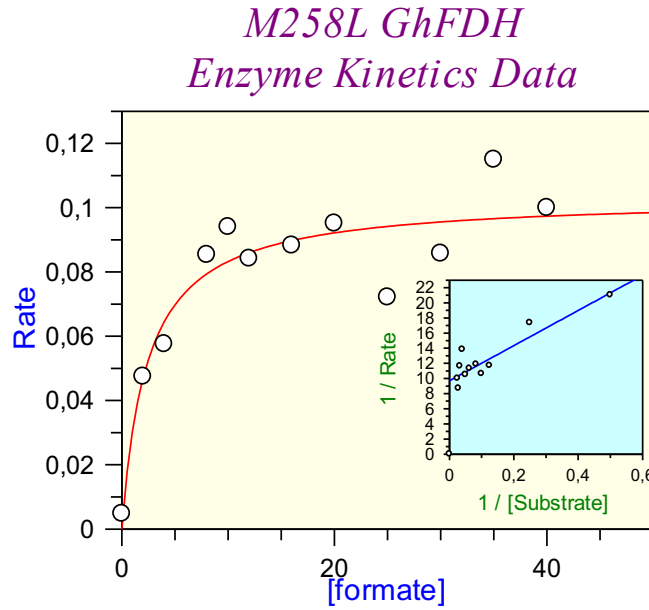
Şekil 4.13 M294L ve M299L Mutant Proteinlerin Safaştırma Aşamaları SDS PAGE Jel Görüntüsü (CL: Hücre Lizatı, W:Yıkama Tamponu, Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards)

4.1.6 Protein Konsantrasyon Ölçümleri

Protein konsantrasyonu Bradford Protein Tahli (Bio-Rad) kullanılarak belirlendi. Safaştırma işleminden ortalama 1.5-2 mg/ml protein elde edildi.

4.1.7 Enzim Aktivite Ölçümleri

GhFDH mutant proteinlerin aktivite ölçümleri 25 ° C'de 20 mM Tris Tamponu (pH7) kullanılarak, 1 mM NAD, 0-40 mM format ve 0.4 uM enzim içeren bir reaksiyon karışımı Shimadzu 1800 çift ışınli (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümünden elde edilen veriler "Grafit5 Kinetics Software" programı kullanılarak analiz edilmiş ve enzimlerin kcat değerleri hesaplanmıştır. Yapılan tekrarlı çalışmalarda M294L ve M299L mutant proteinlerinde 340nm' de ölçülebilir bir aktivite gözlenmemiştir. Bu nedenle M294L ve M299L mutant GhFDH proteinlerin stabilite çalışmalarına devam edilememiştir. M258L mutant proteinin aktivite grafiği Şekil 4.14' de gösterilmektedir.



Şekil 4.14 M258L Kinetik Ölçüm Grafiği

Yabani ve mutant proteinlerin K_m ve k_{cat} değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 *Gossypium hirsutum* FDH ile Mutant M258L Aktivite Değerleri

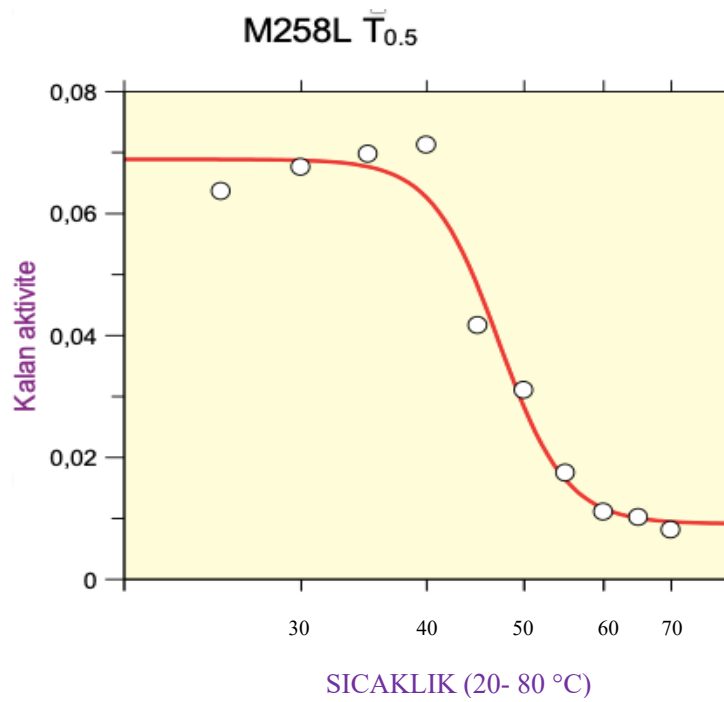
	K_m (mM)	k_{cat} (sn ⁻¹)	k_{cat} / K_m (sn ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>Gossypium hirsutum</i> FDH	0.76 ± 0.07[53]	0.295 ± 0.00[53]	0.39[53]
M258L	2.39±0.8	0.7±0.006	0.29
M294L	-	-	-
M299L	-	-	-

4.1.8 Enzim Termal Stabilite Analizi

Literatürde enzim termostabilitesini karakterize eden yaklaşımlardan biri, sabit bir süre boyunca sabit bir sıcaklıkta inkübasyondan sonra kalan enzim aktivitesini ölçmektir (Tishkov ve Popov, 2006). Bu çalışmada gerekli miktarlarda enzim 5 ile 75 derece arasında 5 °C aralıklarla 20 dakikalık bir süre boyunca inkübe edildikten sonra kalan aktivite Shimadzu 1800 çift ışınlı (10 mm yol uzunluğu) UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 340 nm’ de NADH oluşumundaki azalma takip edilerek enzimin termal stabilitesi analiz edilmiştir. Enzimin başlangıç aktivitesinin %50 azalması için gereken sıcaklık olan $T_{0.5}$ ’ in hesaplanması için elde edilen veriler Grafit5 Kinetics Software kullanılarak değerlendirilmiş (Şekil 4.15) ve M258L mutant GhFDH’ in $T_{0.5}$ değeri 47.2 ± 1.1 °C olarak belirlenmiştir. Yabancıl tip GhFDH ile karşılaştırılması Tablo 4.2’ de gösterilmektedir.

Tablo 4.2 *Gossypium hirsutum* FDH ile Mutant M258L Termal Stabilite Değerleri

	$T_{0.5}$
<i>Gossypium hirsutum</i> FDH	$53,8 \pm 0,12$ [53]
M258L	47.2 ± 1.1

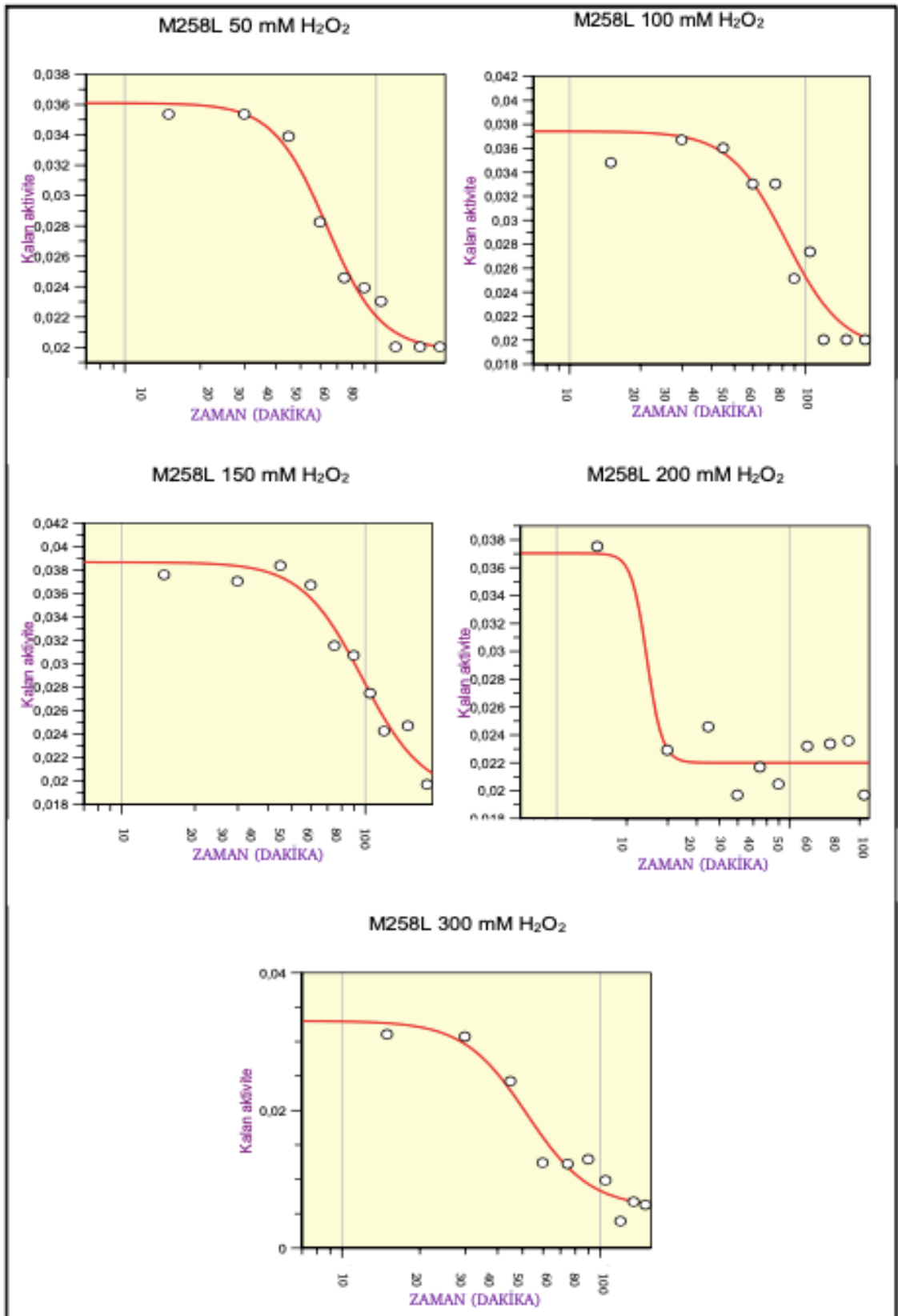


Şekil 4.15 M258L Termal Stabilite Grafiği

4.1.9 Enzim Oksidatif Stabilite Analizi

Çalışmamızda inaktive edici ajanı olarak hem yüzey hem de iç kısımda yer alan tiyol gruplarını okside edebilen H_2O_2 seçilmiştir. H_2O_2 doğal olarak meydana gelen bir kimyasal inaktive edici ajan olması sebebiyle in vivo protein kararlılık çalışmaları için de uygundur. 50mM, 100mM, 150 mM , 200 mM ve 300 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edilen alikotlanmış enzimlerin 15' er dakika aralıklarla kalan aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her bir H_2O_2 konsantrasyonu için, H_2O_2 (denaturant) içermeyen, optimum koşullardaki

aktiviteyi % 50 azaltmak için gereken zamanı gösteren $t_{0.5}$ değeri, Grafit5 Kinetics Software kullanılarak zamana karşı-kalan aktivite grafikleri çizilerek belirlenmiştir (Şekil 4.16). Yabanıl GhFDH enzimi ile karşılaştırması Tablo 4.3' de gösterilmektedir.



Şekil 4.16 M258L Oksidatif Stabilite Grafikleri

Tablo 4.3 *Gossypium hirsutum* FDH ile Mutant M258L Oksidatif Stabilite $t_{0.5}$ ve Termal Stabilite $T_{0.5}$ Değerleri

	$T_{0.5}$ (sıcaklık °C)	$t_{0.5}$	$t_{0.5}$	$t_{0.5}$	$t_{0.5}$	$t_{0.5}$
		50mM H ₂ O ₂ (zaman -dk)	100mM H ₂ O ₂	150mM H ₂ O ₂	200mM H ₂ O ₂	300mM H ₂ O ₂
Rekombinant doğal GhFDH	53,8±0,12	118 ±	45±	82±	64,6±	51,6±
M258L	47.2±1.1	134,74±34.4	82,85±26.0	97,30±12.5	24,40±8.1	51,98±5.6

4.2 Öneriler

Yeni enzimleri tanımlayan her geçen gün genişleyen veri bankalarına rağmen, endüstride istihdam edilebilir enzimler enzimatik sentez için artan talepleri karşılayamamaktadır. Bu boşluğun ilk nedeni, endüstriyel sentezdeki zor koşullarla baş edemeyen mezofilik organizmalardan izole edilen enzimlerin stabiliteinin düşük olmasıdır. İkinci neden, endüstriyel sert koşullara dayanabilen ekstremofilik enzimlerin düşük kullanılabilirliğidir (Özgün ve diğerleri, 2016). Bu nedenle, protein mühendisliği stratejileri, endüstriyel olarak uygulanabilir enzimlerin özelliklerini geliştirmek için önemli bir yöntemdir. FDH'lerin endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirliğini arttırmak için, zorlu endüstriyel reaksiyon koşullarında yüksek stabilite gösterebilmesi önemli bir gerekliliktir. FDH enziminin termostabilitesi ve oksidatif stabilitesine etkisi olan faktörlerin anlaşılması, protein katlanması ve stabilitesi anlayışımıza da ayrıca katkıda bulunacaktır. Aynı zamanda yüksek sıcaklıklarda çalışabilen ve oksidatif strese dayanıklı verimli bir FDH enzimi tasarlamak için de önemlidir.

Genlerin DNA dizilerindeki en büyük çeşitlilik maya ve mantar FDH'leri için gözlenmektedir. Bununla birlikte, FDH aşırı korunmuş bir enzimdir. Tüm

kaynaklardan gelen enzimler arasında 60 amino asit kesinlikle korunmaktadır ve bireysel gruplar içinde homoloji skoru %75' ten yüksektir (Tishkov ve Popov, 2006). Çeşitli makalelerde FDH'deki katalitik bölge üzerinde bulunan ve substrat ve NAD bağlanma bölgesi üzerindeki önemli amino asitler belirtilmiştir. Pro67, Phe68, Ile92, Asn116, Val120 Gly168, Gly170, Ile172, Gly173, Arg254, Asp278, Gln283 ve His302 olarak belirlenen FDH'deki bu korunmuş amino asitler arasına Asp316 da dahil edilmelidir çünkü karboksil grubu NAD⁺ nikotinamid grubunun amid grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır (Andreadeli ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte çeşitli türlerdeki FDH proteini dizisinin homoloji sonucu bazı farklı bölgelerin de yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve korunmuş bölge olarak tespit edildiğini göstermektedir.

Protein ve peptidlerde bulunan sistein, metiyonin ve histidin amino asitleri içerdikleri sülfür atomunun yüksek reaktivitesinden dolayı oksidasyona yatkındır. GhFDH proteini M126, M214, M225, M234, M243, M258, M294, M299, M321 nolu residularda olmak üzere her bir alt ünitesi 9 metiyonin amino asidi içermektedir. Bu bölgelerdeki metiyonin amino asitlerin alternatif amino asitlerle hedefe yönelik mutasyonu ile değiştirilmesi stabilitesinin artırılacağı düşünülmektedir.

Lösin ve metiyonin hidrofobik amino yan zincirlerine sahiptir ve lösin tarafından işgal edilen van der Waals hacmi metiyonine yakındır. Metiyonin lösin ile yer değiştirilmesi, değiştirilen amino asitlerin ortamına bağlı olarak dengeleyici bir etki ile sonuçlanabilmektedir ve protein yapısının oksidatif stresten zarar görmesini azalttığı bilinmektedir (Özgün ve diğerleri, 2016). Lösin eklenmesi, yakınlardaki birçok amino asit ile önemli sterik girişimlere ve önemli hareketlere neden olabilir (Lipscomb, ve diğerleri, 1998). Metiyonin-lösin ikamesi, değiştirilen bölgenin ortamına bağlı olarak stabilize edici veya destabilize edici bir etki verebilir (Pokkuluri, Raffin, Dieckman, Boogaard, Stevens, ve Schiffer, 2002). Aktif bölge etrafındaki tuz köprüleri, yüksek sıcaklıklarda daha fazla atomik hareketlilik nedeniyle değişikliğe karşı aktif bölgesini bir arada tutmaya yardımcı olabilmektedir (Kumar, Ma, Tsai, ve Nussinov, 2000).

Çalışmamızda lösin amino asidi ile değiştirilen M294 ve M299 amino asitleri enzimin katalitik aktivite için önemli olan korunmuş bölgesinde yer alan amino asit H302 ile yakın konumlanmaktadır. Bu etkileşimlerinden dolayı yapılan mutasyon sonucunda ortaya çıkan yapı değişikliğinin protein aktivitesini de etkilemesi beklenmektedir. Bu M299 konumundaki amino asitin diğer türlerde de korunmuş olması gerçekleştirilen mutasyonun protein yapısı ve aktivitesinde önemli olduğunu göstermektedir.

M258 bir loop yapısı üzerindedir ve katalitik aktivite için önemli olan R254 ile aynı loop yapısında yakın olarak bulunmaktadırlar. GhFDH' daki M258 amino asidi yerine bazı maya, mantar ve bakteri türlerinde bu bölgede alternatif olarak sistein, valin ve alanin amino asitleri görülmektedir. Burada gerçekleştirilen M258L mutasyonu enzimin katalitik aktivitesini korumuştur.

Aktivite analizi sonucu M528L mutasyonunun enzimin Km değerini yaklaşık 4 kat yükseltirken (yabanıl tip GhFDH Km: 0.76; M528 GhFDH Km: 2.39), k_{cat} (sn^{-1}) değerini 2 kattan fazla arttırdığı (yabanıl tip GhFDH k_{cat} : 0.3; M528 GhFDH k_{cat} : 0.7) ölçülmüştür. Katalitik aktivite bölgesinde yapılan bu mutasyonun termal stabilite üzerindeki etkisinin yabanıl tip GhFDH' e göre 6 °C' lik bir düşüğe neden olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stabilite deneyleri sonucunda ise 50 mM H_2O_2 'de yabanıl tip GhFDH'e göre önemli bir fark göstermese de, 100 mM' lık H_2O_2 'a maruz bırakılan M258L mutantının yabanıl GhFDH den 2 kat daha fazla süre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Oksidatif stabilitesinde görülen bu sonuç M258L mutantının geliştirilmek için umut vaad edici olduğunu ortaya koymaktadır. Çoklu mutasyonlar ve CD ölçümleri ya da termodinamik deneyler ile yapısal analizler yapılarak mutasyonların enzimin aktivite ve stabilitesine olan etkisini daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir.

GhFDH üzerinde bulunan ve katalitik bölgeye uzak olan diğer metiyonin amino asitleri üzerinde de çalışmalar yapılması metiyonin amino asidinin protein stabilite ve katalitik aktivitesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi konusunda daha ayrıntılı bilgiler sağlayacaktır. Bu çalışmada yapılan 3 mutasyonun elde edilen etkileri göz önünde bulundurularak yeni mutanlar tasarlanabilir, çoklu

mutantlar oluşturulabilir. Sonuç olarak, daha ayrıntılı araştırma gerektirmek ile birlikte 294 ve 299 konumdaki metiyonin amino asidinin enzimin aktivitesi ile doğrudan ilişkili olduğu, M258L değişimi sonucu enzim aktivitesini koruduğu ve metiyonin-lösin değişiminin GhFDH stabilitesini geliştirmek için umut verici bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

- Alekseeva, A. A., Savin, S. S. ve Tishkov, V. I. (2011). NAD + -dependent formate dehydrogenase from plants. *Acta Naturae*, 3, 4-11.
- Ambard-Bretteville, F., Small, I., Grandjean, O. ve des Francs-Small, C. C. (2003). Discrete mutations in the presequence of potato formate dehydrogenase inhibit the in vivo targeting of GFP fusions into mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(4), 966-971.
- Ambard-Bretteville, F., Sorin, C., Rébeillé, F., Hourton-Cabassa, C. ve des Francs Small, C. C. (2003). Repression of formate dehydrogenase in *Solanum tuberosum* increases steady-state levels of formate and accelerates the accumulation of proline in response to osmotic stress. *Plant Molecular Biology*, 52(6), 1153-1168.
- Andreadeli, A., Flemetakis, E., Axarli, I., Dimou, M., Udvardi, M. K., Katinakis, P. ve Labrou, N. E. (2009). Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(6), 976-984.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. ve Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J. ve Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4, 1-13.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buyukguzel, E. (2013). Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(1), 40-51.

- Cavicchioli, R., Curmi, P. M., Siddiqui, K. S. ve Thomas, T. (2006). 17 Proteins from Psychrophiles. In F. A. Rainey, *Methods in Microbiology* (pp. 395-436). LA USA: Academic Press.
- David, P., des Francs-Small, C. C., Sévignac, M., Thareau, V., Macadré, C., Langin, T. ve Geffroy, V. (2010). Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(1), 87-103.
- Davison, D. C. (1951). Studies on plant formic dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 49(4), 520.
- des Francs-Small, C. C., Ambard-Bretteville, F., Darpas, A., Sallantin, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C. ve Rémy, R. (1992). Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues. *Plant physiology*, 98(1), 273-278.
- des Francs-Small, C. C., Ambard-Bretteville, F., Small, I. D. ve Rémy, R. (1993). Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. *Plant Physiology*, 102(4), 1171-1177.
- Engqvist, M. K. ve Rabe, K. S. (2019). Applications of Protein Engineering and Directed Evolution in Plant Research. *Plant physiology*, 907-917.
- Fiser, A. ve Šali, A. (2003). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. In C. W. Carter, & R. M. Sweet, *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Fiser, A. ve Šali, A. (n.d.). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models.
- Folzer, E., Diepold, K., Bomans, K., Finkler, C., Schmidt, R., Bulau, P., . . . Koulov, A. V. (2015). Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule. *Pharmaceutical Sciences*.
- Francs-Small, C., Ambard-Bretteville, F., Small, I. D. ve Remy, R. (1993). Identification of a Major Soluble Protein in Mitochondria from

- Nonphotosynthetic Tissues as NAD-Dependent Formate Dehydrogenase. *Plant Physiology*, 102.4, 1171-1177.
- Gromiha, M. M., Nagarajan, R. ve Selvaraj, S. (2019). Protein Structural Bioinformatics: An Overview. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2, 445-459.
- Hanson, A. D., Gage, D. A. ve Shachar-Hill, Y. (2000). Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in plant science*, 5(5), 206-213.
- Hanson, A. D. ve Nelsen, C. E. (1978). Betaine accumulation and [14C] formate metabolism in water-stressed barley leaves. *Plant physiology*, 62(2), 305-312.
- Hatherley, R., Brown, D. K., Glenister, M. ve Tastan Bishop, Ö. (2016). PRIMO: An Interactive Homology Modeling Pipeline. *PLoS ONE*, 11(11): e0166698.
- Hawkins, C. L. ve Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504(2-3), 196-219.
- Hourton-Cabassa, C., Ambard-Bretteville, F., Moreau, F., de Virville, J. D., Rémy, R. ve des Francs-Small, C. C. (1998). Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiology*, 116(2), 627-635.
- Hsieh, P.-C. ve Vaisvila, R. (2013). Protein Engineering: Single or Multiple Site-Directed Mutagenesis. In J. C. Samuelson, *Enzyme Engineering* (pp. 173-186). USA: Humana Press.
- Hummel, W. ve Kula, M. R. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *EJB Reviews*, 184, 85-97.
- Hutchison, C. A., Phillips, S., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P., Smith, M. ve III, +. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 6551-6560.
- Hwang, L., Hocking-Murray, D., Bahrami, A. K., Andersson, M., Rine, J. ve Sil, A. (2003). Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Molecular biology of the cell*, 14(6), 2314-2326.

- Kim, M. H., Park, S., Kim, Y. H., Won, K. ve Lee, S. H. (2013). Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 209-214.
- Kopp, J. ve Schwede, T. (2004). The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Research*, 32, D230–D234.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W. ve Wandrey, C. (1996). Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biotechnology and bioengineering*, 52(2), 309-319
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C. J. ve Nussinov, R. (2000). Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 38(4), 368-383.
- Kurt-Gür, G. ve Ordu, E. (2018). Characterization of a novel thermotolerant NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *3 Biotech*, 8(3), 175.
- LABROU, N. E. ve Rigden, D. J. (2001). Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 354(2), 455-463.
- Lamzin, V. S., Dauter, Z. ve Wilson, S. K. (1995). How nature deals with stereoisomers. *Current Opinion in Structural Biology*, 5.6, 830-836.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. ve Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26, 283-291.
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L. ve Stadtman, E. R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development*, 107(3), 323-332.
- Lipscomb, L., Gassner, N., Snow, S., Eldridge, A., Baase, W., Drew, D. ve Matthews, B. (1998). Context-dependent protein stabilization by methionine-to-leucine substitution shown in T4 lysozyme. *Protein Science*, vol. 7, no. 3, pp. 765–773,.

- Mathews, M. B. ve Vennesland, B. (1950). Enzymic oxidation of formic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 186(2), 667-682.
- Meier, A. ve Söding, J. (2015). Automatic Prediction of Protein 3D Structures by Probabilistic Multi-template Homology Modeling. *PLOS Computational Biology*, e1004343.
- Oliver, D. J. (1981). Formate oxidation and oxygen reduction by leaf mitochondria. *Plant physiology*, 68(3), 703-705.
- Olson, B. J., Skavdahl, M., Ramberg, H., Osterman, J. C. ve Markwell, J. (2000). Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast. *Plant Science*, 159(2), 205-212.
- Özgün, G. P., Ordu, E. B., Tütüncü, H. E., Yelboğa, E., Sessions, R. B. ve Karagüler, N. G. (2016). Site Saturation Mutagenesis Applications on *Candida methylica* Formate Dehydrogenase. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*, 7.
- Pokkuluri, P. R., Raffin, R., Dieckman, L., Boogaard, C., Stevens, F. J. ve Schiffer, M. (2002). Increasing protein stability by polar surface residues: domain-wide consequences of interactions within a loop. *Biophysical journal*, 82(1), 391-398.
- Popov, V. O. ve Lamzin, V. S. (1994). NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biochem Journal*, 301, 625–643.
- Savin, S. S. ve Tishkov, V. I. (2010). Assessment of formate dehydrogenase stress stability in vivo using inactivation by hydrogen peroxide. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 2(1 (4)).
- Shen, M.-y. ve Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science*, 15.11, 2507-2524.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R. ve Pohl, M. (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *European journal of biochemistry*, 267(5), 1280-1289.
- Thunberg, T. (1921) *Arch. Physiol. Biochem.* V. 18. P. 601–606.

- Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Marchenko, G. N., Egorova, O. A., Sheluho, D. V., Kulakova, L. B., ... Egorov, A. M. (1993). Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp. 101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements. *Biochemical and biophysical research communications*, 192(2), 976-981.
- Tishkov, V. I. ve Popov , V. O. (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Moscow)* , 1252.
- Tishkov, V. ve Popov, V. O. (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering* , 89-110.
- Thompson, P., Bowsher, C. G. ve Tobin, A. K. (1998). Heterogeneity of mitochondrial protein biogenesis during primary leaf development in barley. *Plant Physiology*, 118(3), 1089-1099.
- Uotila, L. ve Koivusalo, M. (1979). Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, 196(1), 33-45.
- Vinals, C., Depiereux, E. ve Feytmans, E. (1993). Prediction of structurally conserved regions of D-specific hydroxy acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 192(1), 182-8.
- Weerasinghe, P. A., Weerasekera, M. ve Van Holm , L. (1999). Use of Isoenzymes to Differentiate Growth Categories of *Pericopsis Mooniana* Trees. *Biologia Plantarum*, 42, 541–547.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A. F. ve Kula , M.-R. (2000). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD (H) regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, 67.6, 91-804.
- Yang, H., Li, J., Du, G. ve Liu, L. (2017). Microbial Production and Molecular Engineering of Industrial Enzymes: Challenges and Strategies. In G. Brahmachari, *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 151-165). *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press.

Yang, J. ve Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics*, 52.1, 5-8.

A.1 M258L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST

CGCAGCTAACCTTATGAAAGAATTGCCCATCTTGTTGCTCGTGAGGGAGCTGGGT
GCGCCCATGGCTGATCACAGGGGCATCAGTATATTGTTACGACGACAAAGAAGG
ACCCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACC
CCATTTCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTG
CAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAGCTG
CAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGC
TGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCCGAATTTTCGTACCTGGTTAT
CATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATG
ATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCT
TACTCCAGCGATTGAAACCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAA
GATAGATCCAGAATTGGAGAAACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGA
TGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAG
ACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTG
ATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCTTGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTT
GTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGC
TCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGACTCCTCATATT
TCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATATGC
TTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACATTGTCAAAGC
AGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGATTTTCGTGGTTTCTTCGTCCATGAAAGA
GAGTCCAAATGTGTTTCGGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTGA
TGTTTAGTATGTTGCAAATAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACTTGATGTAA
GCTTAATTAGCTRAGCCTTWAYMMWRG

BLAST:

Query: None Query ID: lc1|Query_56725 Length: 1179

>PREDICTED: *Gossypium hirsutum* formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC107958572), mRNA
Sequence ID: XM_016894382.1 Length: 1639
Range 1: 380 to 1493

Score:1986 bits(1075), Expect:0.0,
Identities:1104/1116(99%), Gaps:10/1116(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 43   GAGGGAG-C-T-GGG-TGCGCCATGGCTG--ATCACAGGGGCATCAGTATATTGTTA-C 95
          ||||| | | ||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
Sbjct 380   GAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATATTGTTACC 439

Query 96   GACGACAAAGAAGGACCCGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT-CCTGATCTCCATGTGCT 154
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 440   GACGACAAAGAAGGA-CCGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCATGTGCT 498

Query 155  CATATCGACCCCAATTTCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAAAA 214
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 499  CATATCGACCCCA-TTCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAAAA 557

Query 215  ACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAGCTG 274
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 558  ACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAGCTG 617

Query 275  CAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCTGAGG 334
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 618  CAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCTGAGG 677

Query 335  ACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCCGAAATTCGTACCTGGTTATCATCAAGTTA 394
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 678  ACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCCGAAATTCGTACCTGGTTATCATCAAGTTA 737

Query 395  TTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGGGAAGA 454
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 738  TTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGGGAAGA 797

Query 455  CAGTTGGAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAAACCAT 514
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 798  CAGTTGGAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAAACCAT 857

Query 515  TCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAAACAGA 574
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 858  TCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAAACAGA 917

Query 575  CCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTATTGTCA 634
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 918  CCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTATTGTCA 977
```

```

Query 635 TAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGCGAAGA 694
          |||
Sbjct 978 TAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGCGAAGA 1037

Query 695 TGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCTTGGATACTCAAGCTG 754
          |||
Sbjct 1038 TGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATACTCAAGCTG 1097

Query 755 TTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGTACCCGC 814
          |||
Sbjct 1098 TTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGTACCCGC 1157

Query 815 AACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGACTCCTCATA 874
          |||
Sbjct 1158 AACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGACTCCTCATA 1217

Query 875 TTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATATGCTTG 934
          |||
Sbjct 1218 TTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATATGCTTG 1277

Query 935 AGAGGTACTIONCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACATTGTCAAAGCAGGTGAGC 994
          |||
Sbjct 1278 AGAGGTACTIONCAAAGGTGAAGACTTTCCTGAACAGAACTACATTGTCAAAGCAGGTGAGC 1337

Query 995 TCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGAAAGAGAGTCCAAATGTG 1054
          |||
Sbjct 1338 TCGCTCCTCAATACCGATGATTCGTGGTTTCTTCGTCCATGAAAGAGAGTCCAAATGTG 1397

Query 1055 TTCGGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTGATGTTTAGTATGTTGCAAA 1114
          |||
Sbjct 1398 TTCGGTTGGTAGTTAAACGTAGCTACTATTGAAATAATGTGATGTTTAGTATGTTGCAAA 1457

Query 1115 TAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACTTGATGT 1150
          |||
Sbjct 1458 TAATGTGCCATCTATATTGTGCTTTGAACTTGATGT 1493

```

A.2 M294L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST

CATGGRCRRYATTARCTATGAACRTCASCATCWSCATCACCATATGCAAATGATT
GTTGGGGTGTTTTACRAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGKTG
GTTGKGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATC
AGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATAT
CCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATCCACCCGGCTTACGTTACGGCT
GAGAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCT
CCGATCATGTTGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGT
TACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATT
CTTGTTGGAATTTTCGTACCTGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATTGGAATG
TTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGGGAAGACAGTTGGAACTAT
AGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAAACCATTCAACTGT
AATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAAACAGACCG
GAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTATTGT
CATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATC
GCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATG
GATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTG
GAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACT**TTGCC**
AAATCAAGCTATGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGA
TACGCTGCCGGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTC
CTGAACAGAACTACATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGAT

BLAST:

Query: None Query ID: lcl|Query_6161 Length: 1097

>PREDICTED: *Gossypium hirsutum* formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC107958572), mRNA
 Sequence ID: XM_016894382.1 Length: 1639
 Range 1: 309 to 1358

Score:1912 bits(1035), Expect:0.0,
 Identities:1044/1050(99%), Gaps:0/1050(0%), Strand: Plus/Plus

Query	48	AAATGATTGTTGGGGTGT	TTTACRAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG	107
<u>Sbjct</u>	309	AAAAGATTGTTGGGGTGT	TTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTG	368
Query	108	KTGGTTGKGTGGAGGGAGC	CTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	167
<u>Sbjct</u>	369	TTGGTTGTGTGGAGGGAGC	CTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGT	428
Query	168	ATATTGTTACCGACGACA	AAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATC	227
<u>Sbjct</u>	429	ATATTGTTACCGACGACA	AAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATC	488
Query	228	TCCATGTGCTCATATCG	ACCCCATCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	287
<u>Sbjct</u>	489	TCCATGTGCTCATATCG	ACCCCATCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGA	548
Query	288	AAGCCAAAACTTGCAACT	GCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	347
<u>Sbjct</u>	549	AAGCCAAAACTTGCAACT	GCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTA	608
Query	348	AGGCAGCTGCAGAAGCT	GGTTTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	407
<u>Sbjct</u>	609	AGGCAGCTGCAGAAGCT	GGTTTGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGG	668
Query	408	TTGCTGAGGACGAGCTA	ATGAGGATCCTATTCTTGTTGCGAATTCGTACCTGGTTATC	467
<u>Sbjct</u>	669	TTGCTGAGGACGAGCTA	ATGAGGATCCTATTCTTGTTGCGAATTCGTACCTGGTTATC	728
Query	468	ATCAAGTTATTACTGG	GAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	527
<u>Sbjct</u>	729	ATCAAGTTATTACTGG	GAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCG	788
Query	528	AAGGGAAGACAGTTG	GAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	587
<u>Sbjct</u>	789	AAGGGAAGACAGTTG	GAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGAT	848
Query	588	TGAAACCATTCAACTG	TAACTCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	647
<u>Sbjct</u>	849	TGAAACCATTCAACTG	TAACTCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGG	908
Query	648	AGAAACAGACCGGAG	CTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	707
<u>Sbjct</u>	909	AGAAACAGACCGGAG	CTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA	968
Query	708	TTATTGTCATAAATAT	GCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGA	767
<u>Sbjct</u>	969	TTATTGTCATAAATAT	GCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGA	1028
Query	768	TCGCGAAGATGAAGA	AGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	827
<u>Sbjct</u>	1029	TCGCGAAGATGAAGA	AGGGAGTCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATA	1088

```

Query 828 CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT 887
          |||
Sbjct 1089 CTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTT 1148

Query 888 GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACTTGCCAAATCAAGCTATGA 947
          |||
Sbjct 1149 GGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACTTGCCAAATCAAGCTATGA 1208

Query 948 CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG 1007
          |||
Sbjct 1209 CTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGG 1268

Query 1008 ATATGCTTGAGAGGTA CTTCAAAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCAAAG 1067
          |||
Sbjct 1269 ATATGCTTGAGAGGTA CTTCAAAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCAAAG 1328

Query 1068 CAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGAT 1097
          |||
Sbjct 1329 CAGGTGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGAT 1358

```

A.3 M299L Mutantı DNA Dizi Analizi ve BLAST

ATGATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACT
TTGTTGGTTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGG
GGCATCAGTATATTGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAA
GCATATCCCTGATCTCCATGTGCTCATATCGACCCCATTCCACCCGGCTTACGTTA
CGGCTGAGAGGATCAAGAAAGCCAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGA
TTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGCAGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGC
TGAAGTTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGCTGAGGACGAGCTAATGAGGAT
TCTTATTCTTGTTCGGAATTTTCGTACCTGGTTATCATCAAGTTATTACTGGAGATT
GGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGGGAAGACAGTTG
GAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAAACCATT
CAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAAA
CAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACA
TTATTGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGA
TCGGATCGCGAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGC
GATCATGGATACTCAAGCTGTTGCTGATGCTTGTTC AAGTGGACACATTGCAGGT
TACAGTGGAGATGTTTGGTACCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTT
ACATGCCAAATCAAGCTTTGACTCCTCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCA
GTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATATGCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGA
AGACTTTCCTGAACAGA ACTACATTGTCAAAGCAGGTGAGCTCGCTCCTCAATAC
CGATGA

BLAST:

```
Query: None Query ID: lcl|Query_40797 Length: 1046
>PREDICTED: Gossypium hirsutum formate dehydrogenase, mitochondrial (LOC107958572), mRNA
Sequence ID: XM_016894382.1 Length: 1639
Range 1: 313 to 1357

Score:1912 bits(1035), Expect:0.0,
Identities:1042/1045(99%), Gaps:1/1045(0%), Strand: Plus/Plus

Query 3      GATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGG 62
             |||
Sbjct 313    GATTGTTGGGGTGTTTTACAAGGCCAACGAGTACTTTACGAAGAATCCCAACTTTGTTGG 372

Query 63     TTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATAT 122
             |||
Sbjct 373     TTGTGTGGAGGGAGCCTTGGGGTTGCGCCCATGGCTGGAATCACAGGGGCATCAGTATAT 432

Query 123    TGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCA 182
             |||
Sbjct 433    TGTTACCGACGACAAAGAAGGACCGGACTGCGAACTTGAAAAGCATATCCCTGATCTCCA 492

Query 183    TGTGCTCATATCGACCCCATCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGC 242
             |||
Sbjct 493    TGTGCTCATATCGACCCCATCCACCCGGCTTACGTTACGGCTGAGAGGATCAAGAAAGC 552

Query 243    CAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGC 302
             |||
Sbjct 553    CAAAACTTGCAACTGCTTCTCACAGCAGGGATTGGCTCCGATCATGTTGATCTTAAGGC 612

Query 303    AGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGC 362
             |||
Sbjct 613    AGCTGCAGAAGCTGGTTTGACTGTTGCTGAAGTACTGGGAGCAATGTCGTCTCGGTTGC 672

Query 363    TGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTCGTACCTGGTTATCATCA 422
             |||
Sbjct 673    TGAGGACGAGCTAATGAGGATTCTTATTCTTGTTCGGAATTCGTACCTGGTTATCATCA 732

Query 423    AGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGG 482
             |||
Sbjct 733    AGTTATTACTGGAGATTGGAATGTTGCAGGCATTGCTTATAGAGCTTATGATCTCGAAGG 792

Query 483    GAAGACAGTTGGAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAA 542
             |||
Sbjct 793    GAAGACAGTTGGAACTATAGGTGCTGGCCGTATCGGCAAGCTCTTACTCCAGCGATTGAA 852

Query 543    ACCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAA 602
             |||
Sbjct 853    GCCATTCAACTGTAATCTCCTATATCATGATCGAGTCAAGATAGATCCAGAATTGGAGAA 912

Query 603    ACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTAT 662
             |||
Sbjct 913    ACAGACCGGAGCTAAATTCGAGGAGGATCTTGATGCAATGCTTCCAAAATGTGACATTAT 972

Query 663    TGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGC 722
             |||
Sbjct 973    TGTCATAAATATGCCTCTAACTGAGAAGACAAGAGGGATGTTTGACAAAGATCGGATCGC 1032

Query 723    GAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATACTCA 782
             |||
Sbjct 1033   GAAGATGAAGAAGGGAGTCCTGATTGTTAACAATGCTCGAGGAGCGATCATGGATACTCA 1092
```

```

Query 783 AGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGA 842
          |||
Sbjct 1093 AGCTGTTGCTGATGCTTGTTCAAGTGGACACATTGCAGGTTACAGTGGAGATGTTTGGA 1152

Query 843 CCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTTTGACTCC 902
          |||
Sbjct 1153 CCCGCAACCTGCTCCGAAGGACCATCCATGGCGTTACATGCCAAATCAAGCTATGACTCC 1212

Query 903 TCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATAT 962
          |||
Sbjct 1213 TCATATTTCTGGTACCACCATTGATGCGCAGTTGCGATACGCTGCCGGAGTCAAGGATAT 1272

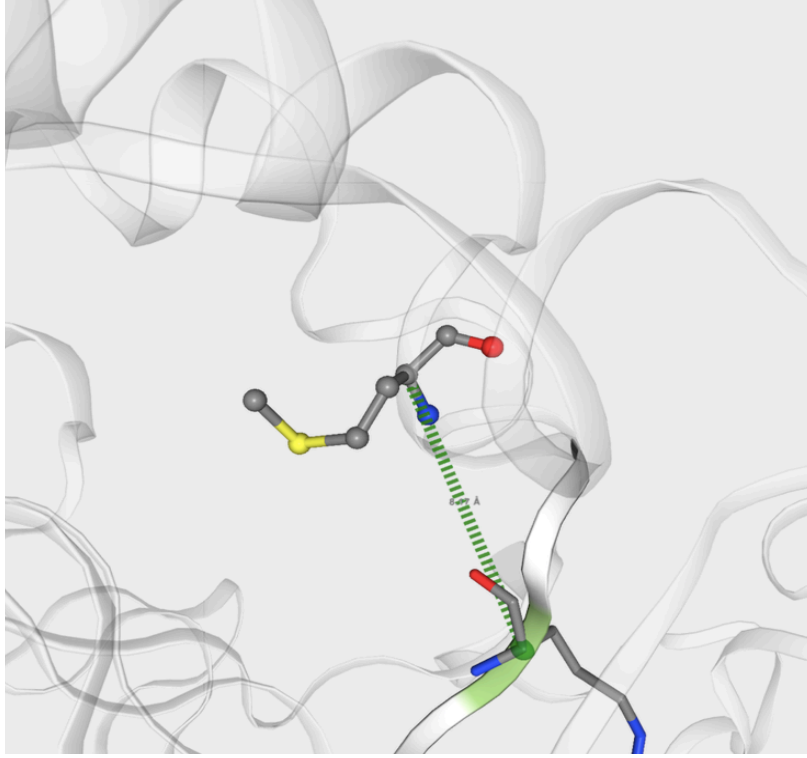
Query 963 GCTTGAGAGGTACTTC-AAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCAAAGCAGG 1021
          |||
Sbjct 1273 GCTTGAGAGGTACTTCAAAGGTGAAGACTTTCTGAACAGAACTACATTGTCAAAGCAGG 1332

Query 1022 TGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGA 1046
          |||
Sbjct 1333 TGAGCTCGCTCCTCAATACCGATGA 1357

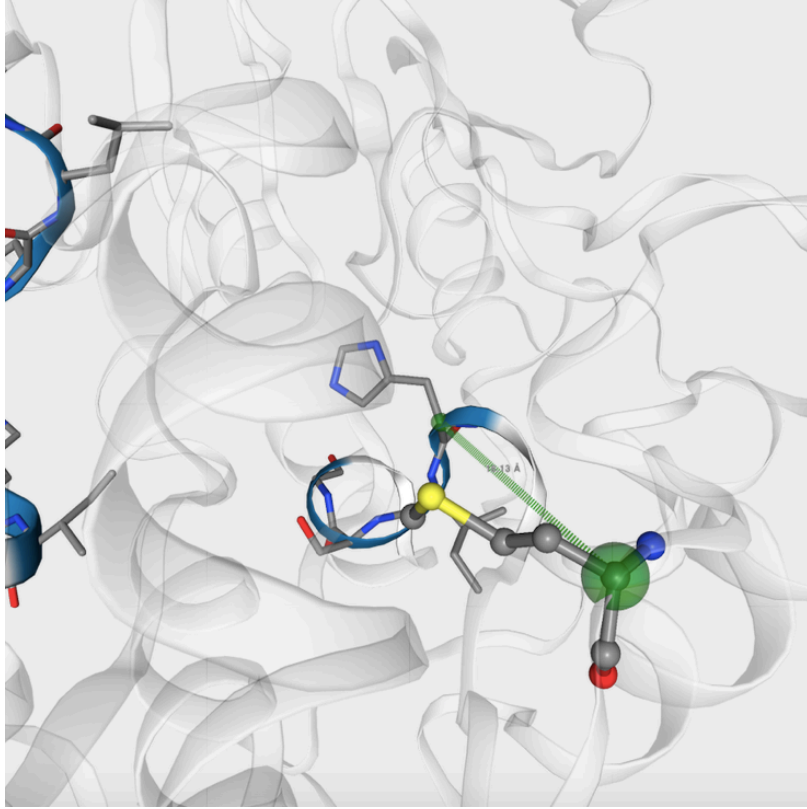
```

B

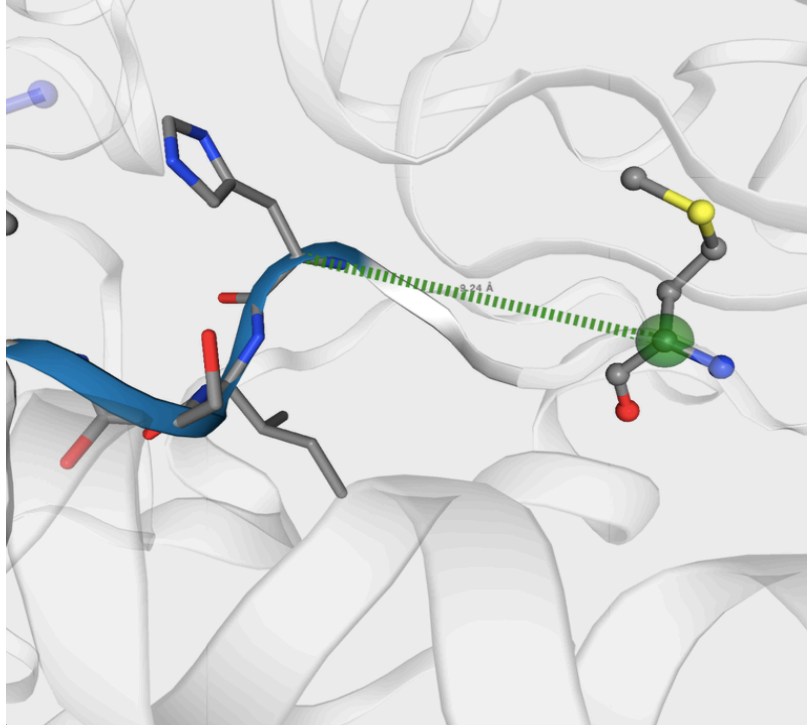
HOMOLOJİ MODELİ ÜZERİNDE AMİNO ASİT KONUMLARI



Şekil B.1 M258- R254 uzaklık



Şekil B.2 M294- H302 uzaklık



Şekil B.3 M299- H302 uzaklık

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: akkuzu.reyhan@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Akkuzu R. ve Ordu E. (2019). Site directed mutagenesis of NAD⁺ dependent formate dehydrogenase isolated from cotton (*Gossypium hirsutum*). Turkish Journal of Biology, 43.5, 73.