

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOFİLİK BİR CANDIDA TÜRÜNDEN NAD⁺- BAĞIMLI
FORMAT DEHİDROGENAZ GENİNİN KLONLANMASI VE
HETEROLOG EKSPRESYONU**

Özge BAŞSARAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Eş Danışman

Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR

Temmuz, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOFİLİK BİR CANDIDA TÜRÜNDEN NAD⁺- BAĞIMLI FORMAT
DEHİDROGENAZ GENİNİN KLONLANMASI VE HETEROLOG
EKSPRESYONU**

Özge BAŞSARAÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 06.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Arş. Gör. Dr. Günseli KURT-GÜR

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üye Emel ORDU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nehir Özdemir ÖZGENTÜRK, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Üye

Gebze Teknik Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU ve eş danışman Arş. Gör. Dr. Günseli KURT-GÜR sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Halofilik Bir Candida Türünden NAD⁺-Bağımlı Format Dehidrogenaz Geninin Klonlanması ve Heterolog Ekspresyonu 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.

Özge BAŞSARAÇ

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün FBA-2021-4244 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Sevgili Aileme ve
Dr.Mehdi elikyay'a*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğretim süreci boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bilgisi, hoşgörüsü ve çalışkanlığıyla bana bu yolda rehber olan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU ve Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren çok değerli arkadaşlarım Mustafa Utku ALMAZ, Sena BİBERCİ, Akif Can KILIÇ, Ayca GÜNER, Sinem KADIOĞLU, Sinem GÜNERİ, Harbiye HACIBEKTAŐOĞLU, Kübra ATİK'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen, bana bu zorlu yolda rehber olan sevgili hocam Dr. Mehdi ÇELİKİYAY ve sevgili AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özge BAŞSARAÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Halofilik Mikroorganizmalar ve Halofilik Enzimler.....	4
2.2 NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz.....	5
2.2.1 FDH Enzimi ile NAD(P)H Rejenerasyonu.....	6
2.2.2 NAD(P) ⁺ -Bağımlı FDH Enzimleri ile Atmosferik CO ₂ 'in Biyolojik fiksasyonu ve Hidrojen Yakıt Üretimi.....	7
3 MATERYAL VE METOD	10
3.1 Materyal.....	10
3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör.....	10
3.1.2 Kullanılan Kitler ve Enzimler.....	11
3.1.3 Kullanılan Cihazlar.....	11
3.1.4 Kimyasallar ve Malzemeler.....	12
3.1.5 Kullanılan Besiyerleri.....	12
3.1.6 Kullanılan Tampon Çözeltileri.....	13
3.2 Metod.....	14
3.2.1 <i>Candida sp.</i> Büyütülmesi.....	14
3.2.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	15
3.2.3 Primer Dizaynı ve PZR.....	15
3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi.....	17
3.2.5 Ligasyon.....	17
3.2.6 CaCl ₂ Kompetent Hücre Hazırlanması.....	18
3.2.7 Transformasyon.....	19

3.2.8 Transformasyon Analizi.....	20
3.2.9 Transformasyon Analizi İçin Restriksiyon Endonukleazlarla Kesim İşlemi..	20
3.2.10 <i>CdFDH</i> Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması.....	21
3.2.11 pQE-2 Ekspresyon Vektörüne Klonlama.....	22
3.2.12 <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinin Transformasyonu ve Transformantların Analizi	23
3.2.13 Hücre Büyütme ve Protein Ekspresyonu.....	24
3.2.14 6xHis-Tag Sistemi Kullanılarak <i>CdFDH</i> Enziminin Saflaştırılması.....	24
3.2.15 Ultrafiltrasyon.....	25
3.2.16 SDS-PAGE Analizi.....	26
3.2.17 Kararlı Hal Kinetiği.....	27
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	28
4.1 Genomik DNA İzolasyonu ve <i>CdFDH</i> Geninin Amplifikasyonu.....	28
4.2 <i>CdFDH</i> Geninin pGEMT Vektörüne Klonlanması ve Transformasyon.....	29
4.3 Koloni Taraması.....	30
4.4 DNA Dizi Analizi ve Homoloji BLAST.....	31
4.5 Clustal Sonuçları.....	32
4.6 3-B Homoloji Modelleme.....	35
4.7 <i>CdFDH</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	35
4.8 Protein Ekspresyonu.....	37
4.9 Rekombinant <i>CdFDH</i> Proteinin Saflaştırılması.....	38
4.10 SDS-PAGE Analizi Bulguları.....	38
4.11 Enzim Aktivite Ölçümleri.....	40
4.12 Öneriler.....	42
KAYNAKÇA	45
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	50

SİMGE LİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

Bp	Baz Çifti
<i>Cb</i> FDH	<i>Candida boidinii</i> Format Dehidrogenaz
<i>Cm</i> FDH	<i>Candida methylica</i> Format Dehidrogenaz
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDH	Format Dehidrogenaz
GDH	Glukoz dehidrogenaz
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PTDH	Fosfit dehidrogenaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
<i>Ts</i> FDH	<i>Thiobacillus</i> sp. Format Dehidrogenaz
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	FDH enzimi ile NAD(P) Rejenerasyonu.....	6
Şekil 2.2	Kofaktör NAD(P)H kullanılarak enzimatik reaksiyonun şematik gösterimi ve NAD(P)H rejenerasyonundan elde edilen olası ürünler.....	7
Şekil 3.1	pGEM-T vektör haritası.....	10
Şekil 3.2	pQE-2 vektör haritası.....	11
Şekil 4.1	PZR sonucu %1 lik Agaroz Jel Elektroforez görüntüsü.....	29
Şekil 4.2	<i>CdFDH</i> içeren DH5 α kolonileri.....	30
Şekil 4.3	SacI ve PstI restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen ürünlerin UV Görüntüsü.....	31
Şekil 4.4	<i>CdFDH</i> 'in nükleotid ve amino asit dizisi.....	34
Şekil 4.5	<i>CdFDH</i> , <i>Candida boidinii</i> ve <i>Candida methylica</i> 'nın gösterdiği aminoasit Homolojisi.....	35
Şekil 4.6	<i>CdFDH</i> dizisi ile kristal yapısı bilinen <i>CmFDH</i> ve <i>CbFDH</i> ile sekonder yapı Karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.7	<i>CdFDH</i> 'in SWISS homoloji modeli: Şablon olarak <i>CmFDH</i> (pdb kodu: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) kullanılarak oluşturulan ve özdeş iki alt ünitenin gösterildiği <i>CdFDH</i> 'in formu.....	35
Şekil 4.8	Restriksiyon enzim kesim sonrası jel elektroforezi UV görüntüsü.....	38
Şekil 4.9	pQE-2/ <i>CdFDH</i> vektörünü alan hücrelerin tespiti için yapılan restriksiyon Enzim kesim sonrası jel elektroforezi.....	39
Şekil 4.10	100 ml kültür ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu.....	41
Şekil 4.11	500 ml hücre kültürü ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu sonucu SDS PAGE Jel Görüntüsü	41
Şekil 4.12	500 ml hücre kültürü ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu sonucu SDS PAGE Jel Görüntüsü	42
Şekil 4.13	FDH proteini saflaştırma sonrası SDS PAGE Jel Görüntüsü.....	42
Şekil 4.14	Rekombinant <i>CdFDH</i> proteinin potasyum fosfat pH 6 ve pH 7 aktivite sonuçları.....	43
Şekil 4.15	Rekombinant <i>CdFDH</i> proteinin Tris pH 8 ve 9 aktivite sonuçları.....	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Farklı kaynaklardan izole edilmiş FDH enziminin termal stabilitelerinin ve optimum pH değerlerinin karşılaştırılması.....	9
Tablo 3.1 SDS-PAGE jelinin hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları.....	13
Tablo 3.2 PZR için tasarlanan primerler.....	17
Tablo 3.3 <i>CdFDH</i> geninin amplifikasyonu için kurulan PZR'nin bileşenleri.....	16
Tablo 3.4 PZR Termal Koşulları.....	19
Tablo 3.5 Ligasyon reaksiyonunun bileşenleri.....	18
Tablo 3.6 <i>CdFdh+</i> pGEM-T plazmidinin <i>SacI</i> ve <i>PstI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.....	22
Tablo 3.7 pQE-2 plazmidinin <i>SacI</i> ve <i>PstI</i> restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.....	24
Tablo 3.8 Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	25
Tablo 3.9 <i>CdFdh+</i> pQE-2 plazmidinin <i>PstI</i> restriksiyon enzimi ile kesim işlemi.....	24
Tablo 4.1 PZR sonucu konsantrasyon değerleri.....	29
Tablo 4.2 Konsantrasyon sonuçları.....	36
Tablo 4.3 Rekombinant <i>CdFDH</i> 'in pH (6-9) aralığındaki aktivite değerleri.....	42

Halofilik Bir *Candida* Türünden NAD⁺-Bağımlı Format Dehidrogenaz Geninin Klonlanması ve Heterolog Ekspresyonu

Özge BAŞSARAÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Eş-Danışman: Arş. Gör. Dr. Günseli KURT-GÜR

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 ve CO₂ indirgenmesi reaksiyonları için endüstriyel önemi olan enzimlerdir. Bu enzimler daha ayrıntılı yapıların sentezinde yapı taşları olarak değerli olan saf alkollerin oluşturulması için aldehitlerin ve ketonların enzimatik indirgenmesinde NADH'nin yeniden üretilmesinde kullanılabilir. Enzim stabilitesi, endüstriyel biyotransformasyon işlemlerinin gelişimi için sınırlayıcı bir faktördür. Mikroorganizmalarda bulunan FDH'ler daha yüksek enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu durumdan dolayı daha çok mikroorganizma kaynaklı FDH'ler üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışma kapsamında FDH, halofilik bir mikroorganizmadan izole edilerek *Escherichia coli*'de rekombinant olarak eksprese edilmiştir. Rekombinant CdFDH proteininin homoloji

modelinin yapılmasının ardından aktivite deneyleri yapılarak elde edilen CdFDH enziminin farklı pH koşulları altında enzimatik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: NAD⁺ Bağımlı format dehidrogenaz, *Candida* sp., aktivite, termal stabilite.

Cloning and Heterologous Expression of the NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase Gene from a Halophilic Candida Species

Özge BAŞSARAÇ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Dr. Emel ORDU

Co-supervisor: Dr. Günseli KURT-GÜR

NAD⁺ dependent formate dehydrogenases (FDH, EC 1.2.1.2) are enzymes of industrial importance for the regeneration of NAD(P)H and CO₂ reduction reactions, an expensive coenzyme used for the synthesis of chiral molecules. These enzymes can be used to regenerate NADH in the enzymatic reduction of aldehydes and ketones to form pure alcohols that are valuable as building blocks in the synthesis of more detailed structures. Enzyme stability is a limiting factor for the development of industrial biotransformation processes. FDHs found in microorganisms have higher enzymatic activity. Due to this situation, studies on FDH originating from microorganisms are carried out. Within the scope of this study, FDH was isolated from a halophilic microorganism and expressed recombinantly in *Escherichia coli*. After the homology model of the recombinant

CdFDH protein was made, it was shown that the *CdFDH* enzyme obtained by performing activity experiments has enzymatic activity under different pH conditions.

Keywords: NAD⁺ dependent formate dehydrogenase, *Candida* sp., activity, thermal stability.

1.1 Literatür Özeti

Format dehidrogenazlar (FDH, EC 1.2.1.2) metilotrofik mikroorganizmalar ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir. FDH enzimi NAD(P)^+ varlığında formatın CO_2 'e oksidasyonunu katalizlerken NAD^+ 'nin NADH 'e indirgenmesini ve uygun şartlarda NADH varlığında ise ters yönde, CO_2 'in indirgenmesini katalizleyebilmektedir.[1] Düşük redoks potansiyeli nedeniyle, NAD^+ bağımlı FDH'ler endüstriyel alanda daha çok kullanılmaktadır. [2] FDH'lerin başlıca kullanım alanları; kiral bileşiklerin sentezi için gereken koenzimler olan NAD(P)H rejenerasyonu, CO_2 azaltılması, stabilize edilmiş hidrojen yakıtı elde etmektir. [3]

NAD(P)^+ -bağımlı ve NAD(P)^+ -bağımsız olmak üzere başlıca iki FDH enzim grubu bulunmaktadır. NAD(P)^+ -bağımsız FDH'ler yüksek CO_2 indirgeyici aktiviteye sahiptir fakat tungsten ya da molibden gibi metal iyonları, demir-sülfür grupları, selenosistein gibi yüksek derecede oksijenlenebilen katalitik komponentler içermelerinden dolayı endüstriyel uygulamalar için uygun değildir. Bu nedenle son dönemde CO_2 indirgeme sistemlerinde, hem atmosferik CO_2 seviyesinin düşürülmesi, hem de hidrojen enerjisi depolama sistemleri araştırmalarında, NAD(P)^+ -bağımlı FDH'ler tercih edilmektedir. [3,4,5,6]

Format dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonlarda substrat olarak kullanılan sodyum format bileşiğinin çok ucuz maliyetinin olması ve kolayca elde edilebilir olması, katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan karbon dioksitin (CO_2) reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmesi, format dehidrogenaz enziminin çok geniş bir pH aralığında etkinlik gösterebilme kapasitesi ve reaksiyon sonucu oluşan ürün veriminin fazla olması, format dehidrogenazın endüstriyel alanda daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır.

Candida boidinii FDH'i ticari olarak en kolay bulunan NAD^+ -bağımlı enzimdir ve çift enzimli reaksiyon sistemleri ile NADH rejenerasyonunda kullanıldığı kadar CO_2 indirgeyici biyokatalizör olarak da tercih edilmektedir.[5] Ancak *CbFDH*'in CO_2

indirgeyici aktivitesi uygulamada kullanılabilmek için çok düşük olduğundan daha etkili ticari değeri olabilecek yeni yeni format dehidrogenaz enzimlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılması önemlidir. Ökaryotik ve prokaryotik farklı organizmalardan izole edilmiş FDH enzimlerinin (*Ancylobacter aquaticus* FDH-AaFDH, *Ceriporiopsis subvermispora* FDH-CsFDH, *Moraxella* sp. C-1 FDH-MsFDH, *Paracoccus* sp. 12-A FDH-PsFDH, *Thiobacillus* sp. KNK 65MA FDH-TsFDH) CO₂ indirgeyici etkilerine bakıldığında *Thiobacillus* sp. KNK 65MA'dan izole edilen TsFDH'in (0.034) CbFDH'den (0.0004) 84 kez yüksek katalitik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak ticari anlamda halen enzimin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı çalışmada optimum pH'ı asidik olan FDH'lerin CO₂ indirgenmesinde nötral ya da alkali pH'a sahip FDH'lerden daha etkili olduğu gösterilmiştir. CbFDH asidik pH'da (pH 5.5 da 1.6 mU/mg enzim) nötral pH'a (pH 7.0 de 0.5 mU/mg enzim), göre daha yüksek CO₂ indiregeyici aktivite gösterirken, nötral pH'da (pH 7.0 de 6.1 U/mg enzim) asidik pH'ya (pH 5.5 da 3.8 U/mg enzim) göre daha iyi format oksidasyon aktivitesi göstermiştir. AaFDH, CbFDH, CsFDH, MsFDH, PsFDH ve TsFDH'lerin hepsi asidik pH'da daha iyi CO₂ indirgeyici aktivite göstermiştir. [5]

FDH enziminin en önemli dezavantajı endüstriyel işlemlerde kullanılan sıradışı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında ve farklı çözen sistemlerinde enzimin içermiş olduğu aktif sistein amino asitleri nedeni ile kolaylıkla stabilitesini kaybedebilmesidir. Bu nedenle bir yandan protein mühendisliği yaklaşımları ile varolan enzimlerin geliştirilmesi çalışmaları devam ederken diğer yandan endüstriyel şartlara dayanıklı olabilecek yeni FDH enzimlerinin izolasyonu ve rekombinant olarak eksprese ettirilmesi çalışmaları önemle devam etmektedir.[7,2]

Endüstriyel, ticari ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım için önemli potansiyele sahip olan halofilik mikroorganizmaların kullanım alanları : *Halomonas* sp., *Halomonas venusta* ve haloalkalifil *Halomonas* sp. Fenol'ün parçalanması[8,9] *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium distributum* ve diğer biyosümfaktan üreten halofil ve halotolerant mikroorganizmalar *Haloferax mediterranei* Petrol ile kirlenmiş olan tuzlu ortamların remediasyonudur.[10]

1.2 Tezin Amacı

NAD⁺-bağımlı format dehidrogenazlar endüstride sıklıkla kullanılan ve pahalı bir koenzim olan NAD(P)⁺ rejenerasyonunda olduğu kadar hem atmosferik CO₂

seviyesinin düşürülmesi, hem de hidrojen enerjisi depolama sistemleri araştırmalarında, önemli enzimlerdir. FDH enziminin en önemli dezavantajı endüstriyel işlemlerde kullanılan sıradışı pH ve yüksek sıcaklık koşullarında ve farklı çözen sistemlerinde kolaylıkla stabilitesini kaybedebilmesidir. Bu nedenle endüstrinin zorlu sentez koşullarında etkili olabilecek yeni FDH'lerin araştırılması önemlidir.

Asidofiller, pH'sı 4.0'dan düşük olan asidik ortamlarda gelişen ekolojik ve ekonomik açıdan önemli, hücre içindeki pH'yi düzenlemek için hücresel adaptasyonlara sahiptirler. Asidofillerden gelen enzimlerin sitoplazmik pH'dan çok daha düşük pH'da işlevsel olduğu bilinmektedir. Amilazlar, proteazlar, ligazlar, selülozlar, ksilanazlar, α -glukozidazlar, endoglukanazlar ve düşük pH'da stabil esterazlar gibi enzimlerin çeşitli asidofilik mikroorganizmalar tarafından üretildiği bilinmektedir.^[11] Bu tez çalışmasında asidofilik mikroorganizmaların yaşamasına zemin sağlayan tuzla doyurulmuş halofilik bir ortam olan sofralık zeytin fermentasyon (%8-12 NaCl, pH 3.2) ortamından izole edilerek 16S rDNA metodu ile bir *Candida* türü olarak tanımlanan MLP1'den halofik ve asidik ortamda aktif kalabilme potansiyeli taşıyan yeni bir NAD⁺-bağımlı FDH enzimi kodlayan genin izole edilmesi ve uygun bir ekspresyon vektörüne klonlanması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Halofilik mikroorganizmaların yaşamasına zemin sağlayan tuzla doyurulmuş sofralık zeytin salamura ortamı (%8-12 NaCl konsantrasyonu) halofilik mikroorganizmaların ve dolayısıyla susuz ya da az-sulu çözen ortamında ve sıradışı pH koşullarında aktif kalabilecek halofilik enzimlerin araştırılması için uygun bir metagenomik kaynaktır. Enzimlerin izole edildikleri organizmaların adapte oldukları ortama paralel özellik gösterebildiği bilinmektedir. Bu tez çalışması pH 3-4 arası ve halofilik bir ortam olan zeytin salamurasından izole edilen *Candida sp*'den izole edilecek olan NAD⁺-bağımlı FDH enziminin de asidik pH ve az sulu/susuz çözen sistemlerinde aktif kalabileceği hipotezine dayanmaktadır.

2.1 Halofilik Mikroorganizmalar ve Halofilik Enzimler

Mikrobiyal komünitenin asidik, yüksek tuz ve alkali pH, yüksek basınç gibi ortamlarda da bulunabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır. Böyle ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılmaktadır. Halofiller, ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleridirler.^[12]

Yüksek tuz konsantrasyonlarına adapte olmuş mikroorganizmalar (halofillerin) işlevselliklerini sürdürebilmek için çeşitli enzimlere sahip olması, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda önemini arttırmaktadır.

Ekstremofillerden elde edilen enzimler, organik çözücüler, yüksek sıcaklıklar varlığında ve yüksek tuz konsantrasyonlarında işlevsel olma avantajına sahiptir.^[13] *Haloferax volcanii*, kökeniyle son derece halofilik bir arkeondur. *Haloferax volcanii*, alkol dehidrogenaz gibi yüksek oranda tuz ve organik çözücüye toleranslı enzimleri kodlayan bir model halofilik arkeondur. (HvADH2), NADPH/NADH kofaktörü varlığında aldehytlerin ve ketonun indirgenmesini katalize eder.^[14] Kolayca kültüre alınabilir ve laboratuvar koşullarında büyütülebilmektedir (aerobik ve 45°C). Saflaştırılmış HvADH2, alışılmadık derecede geniş bir substrat kapsamına sahiptir ve NADPH / NADH kofaktörü varlığında endüstriyel olarak değerli kiral alkollerin üretimini katalize eder.^[15]

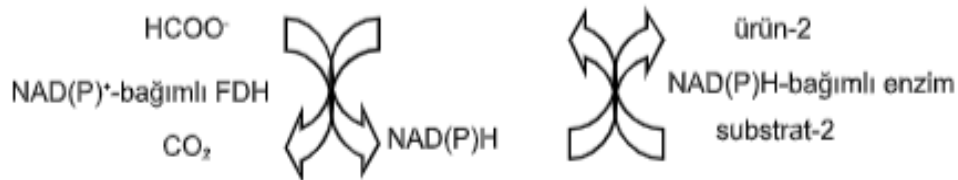
Halofilik mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarla bu organizmaların ricari ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. *Halomonas* sp., *Halomonas venusta* ve haloalkalifil *Halomonas* sp. Fenol'ün parçalanması^[8,9], *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium distributum* ve diğer biosümfaktan üreten halofil ve halotolerant mikroorganizmalar *Haloferax mediterranei* Petrol ile kirlenmiş olan tuzlu ortamların remediasyonunda ^[10,16,17,18,19,8] kullanılabildiği bildirilmektedir.

2.2 NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz

FDH kullanışlılığı, daha ayrıntılı yapıların sentezinde yapı taşları olarak değerli olan saf alkollerin oluşturulması için aldehitlerin ve ketonların enzimatik indirgenmesinde NADH'yi yeniden üretebilmesinde yatmaktadır.^[20] Farmasötik, gıda, kozmetik ve tarım endüstrilerinde optik olarak saf ürünlerin sentezi için biyokatalizörler olarak kullanılan oksidoredüktazlar, elektron taşıyıcıları olarak pahalı koenzimler olan NADH veya NADPH gerektirir. Bu koenzimlerin üretimini geliştirmek için farklı pek çok yöntem önerilmiştir ancak bunlar arasında format kullanılarak enzimatik rejenerasyon en umut verici olan yöntemdir.

NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz enzimi ilk olarak 1950'de bezelye tohumlarından izole edilmiştir, ancak enzimin katalitik özellikleri ve potansiyel uygulamaları hakkında araştırmacıların ilgisini çekmesi ve çalışmaların başlaması 1970'lerin sonlarını bulmuş ve çalışmalar özellikle kiral sentezin enzimatik süreçlerinde NADH rejenerasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır.^[21,22] Literatürde format dehidrogenaz enzimleri ile ilgili önemli sayıda çalışma metilotrofik bakteriler ve maya kökenlidir.

FDH enzimi NAD(P)⁺ varlığında formatın CO₂ 'e oksidasyonunu katalizlerken NAD⁺'nin NADH'e indirgenmesini ve uygun şartlarda NADH varlığında ise ters yönde, CO₂'in indirgenmesini katalizleyebilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 FDH enzimi ile NAD(P) rejenerasyonu^[1]

Gerçekleşen reaksiyon hücreye daha sonra ATP sentezi için kullanılan NADH sağlayan temel reaksiyonlardan biridir. Organizmalarda bulunan tüm format dehidrogenazlar homodimerler olarak mevcuttur. Küresel bir proteindir ve her alt birim iki Rossmann katlanmasına sahiptir: Bir koenzim bağlama alanı ve bir katalitik alan vardır.^[23] Koenzim bağlayıcı alan, NAD⁺ 'yı spesifik olarak tanır ve bağlar. İlginç bir şekilde, iki katalitik alan, FDH enzim kompleksinin zıt uçlarında yer alır. Alanlar, sırasıyla αA ve $\alpha 8$ olarak adlandırılan tek α -sarmalları aracılığıyla birbirine bağlanır.^[23] İn vivo olarak, iki alt birim, koenzim bağlama alanları yoluyla birbirine sıkıca bağlanır ve kolayca

ayrılmaz. Bununla birlikte deneysel veriler, tek FDH alt birimlerinin katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.[1] Sonuç olarak, bir alt birimdeki konformasyon değişiklikleri diğerini etkilemez ve bu nedenle alt birimler iş birliği yapmadan çalışır.

Format dehidrogenazlar doğada çok yaygındır. Metilotrofik ve simbiyotik nitrojen bağlayıcı bakteriler gibi çeşitli bakterilerde bulunurlar. Buna ek olarak, FDH genler bakteriler de dahil olmak üzere, pek çok patojenik mikroorganizmalarda da bulunmaktadır (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium subsp. Paratüberküloz str. K10*, çeşitli suşları *Bordetella* ve *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis subsp. Tularensis* SCHU S4) ve mikrofungus (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans var. Neoformans* JEC21, vb.).[24]

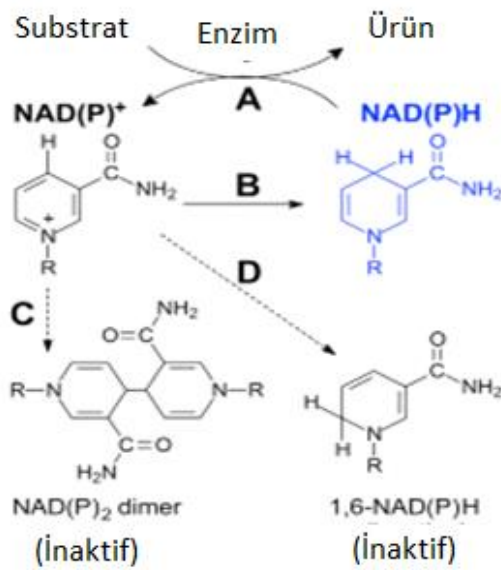
Literatür incelendiğinde çok farklı organizmalardan klonlanmış rekombinant NAD⁺-bağımlı FDH enzimlerinin karakterize edildiği görülmektedir: *Pseudomonas* sp. 101,[25] *Mycobacterium vaccae* N10,[26] *Moraxella C-2*, *meast Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*,[27] *Candida methylica*,[28] *Candida boidinii*,[29] *Aspergillus nidulans*,[30] *Neurospora crassa*,[31] patates mitokondri,[32] ve arpa,[33] *Gossypium hirsutum* FDH da bulunmaktadır.[34] Genel olarak literatürde incelenen FDH enzimlerinin birbirlerine kinetik özellikleri açısından benzerlik gösterdiği görülmektedir. Fakat bakteriyel FDH'ler stabilite açısından farklıdır. Çeşitli kaynaklardan FDH'lerin amino asit dizileri karşılaştırıldığında bakterilerde bulunan FDH'lerin amino uçlarının daha uzun olduğu ve stabilitelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.[26]

Sonuç olarak, endüstriyel ölçekli FDH üretimi koenzimlerin ekonomik rejenerasyonunda önemli bir adımdır.[24]

2.2.1 FDH Enzimi ile NAD(P)H Rejenerasyonu

NAD(P)H ve NAD(P)⁺ yapıları arasındaki önemli fark bir hidrit iyonudur. NAD(P)H'nin rejenerasyonu, bir proton ve iki elektronun (hidrit donörlerinden) NAD(P)⁺ 'ya (yani, NAD(P)⁺ indirgenmesi) katalitik veya katalitik olmayan transferini gerektirir. Yaygın hidrit donörleri arasında yer alan format, glukoz, fosfit, trietanolamin (TEOA), merkaptolanol, propanol ve moleküler H₂ gazı değerli kimyasallar olmakla birlikte rejenerasyonda tüketilirken bazıları daha fazla atık yan ürün üretir. Kofaktör rejenerasyonunun aktivitesi devir frekansı ile ölçülebilir (TOF; birim zaman başına aktif bölgenin molü başına oluşan NAD(P)H'nin mol sayısı), aslında rejenerasyon sisteminin

verimliliği, devir sayısı (TN; birim zamanda kofaktör molü başına oluşan ürünün mol sayısı) ve toplam yapılan iş sayısı (TTN; tam bir reaksiyon sırasında bir mol kofaktör başına oluşan ürün mol sayısı) ile ölçülebilir.[35] Seçicilik, NAD(P)H'nin rejenerasyonu için başka bir zorluk sunar çünkü inaktif yan ürünler olan 1,6-NAD(P)H izomeri ve NAD(P)₂ dimeri enzimatik olarak geri dönüşümsüz bir şekilde oluşur ve kalıcı olarak bir değerli kofaktör kaybına yol açabilir. Nihayetinde, NAD(P)H rejenerasyonunun geliştirilmesi, aktivite, seçicilik, proses sürdürülebilirliği (atık ve yan ürün üretimi) ve daha önemlisi pratik uygulamaları, yani üretim enzimleriyle uyumluluğu dikkate alınmalıdır.[36,37]



Şekil 2. 2 Kofaktör NAD(P)H kullanılarak enzimatik reaksiyonun şematik gösterimi ve NAD(P)H rejenerasyonundan elde edilen olası ürünler: (A) Biyotransformasyonda NAD(P)H tüketimi, (B) NAD(P)H rejenerasyonu için hedef yol, (C) Enzimatik olarak inaktif NAD(P)₂ dimer oluşumu, (D) Enzimatik olarak inaktif 1,6-NAD(P)H oluşumu, R adenosin difosforibozu gösterir.[38]

2.2.2 NAD(P)⁺-Bağımlı FDH Enzimleri ile Atmosferik CO₂'in Biyolojik Fiksasyonu ve Hidrojen Yakıt Üretimi

Güvenli ve yenilenebilir enerji alternatiflerine olan için lityum iyon pilleri, jeotermal güç ve nükleer enerji gibi enerji kaynaklarının yanında çevreyle dost bir enerji sağlayan hidrojen enerjisi en fazla umut vaat eden alternatif olarak görülmektedir. Ancak bu alanda yapılan geniş çaplı çalışmalara rağmen hidrojenin depo edilmesi ve taşınması halen hidrojenin yakıt olarak kullanılmasını sınırlayan temel nedenlerdir. Hidrojen

depolanması ve taşınması konusunda geliştirilen yöntemler temelde fiziksel ve kimyasal depolama yöntemleri olarak 2 sınıfa ayrılabilir. Fiziksel yöntemler yüksek basınç altında hidrojenin sıkıştırılması, düşük sıcaklıklarda hidrojenin sıvılaştırılması ve metal-organik ya da zeolit gibi yüzeylere adsorbsiyon olarak sıralanabilir. Ancak bu yöntemlerin maliyeti yüksek ve enerji etkinliği düşük olmakla birlikte güvenlik eksiklikleri de mevcuttur. Kimyasal depolama yöntemlerinde ise hidrojen, moleküler formu yerine kimyasal olarak bağlı formda (sodyum borohidrit, formik asit, metal hidritleri vb) depo edilmektedir.[39]

Bu bağlı formlar arasında basit bir karboksilik asit olan formik asit (HCOO) başta eczacılık olmak üzere birçok endüstride kullanılan değerli bir kimyasal olmanın yanı sıra son zamanlarda yakıt endüstrisi için hidrojen depolama materyali olarak önem kazanmaktadır. Normal sıcaklık ve basınç altında %4.4 (wt.) hidrojen içeren formik asit bugün araştırmacılar tarafından hidrojen depolamasında en umut vaat eden materyal olarak tanımlanmaktadır.[40] Hidrojen içeriği düşük gibi görülse bile volümetrik kapasitesi bugün kullanılabilen diğer hidrojen depolama materyallerine göre formik aside avantaj sağlamaktadır. Ayrıca toksik değildir, çabuk tutuşmaz, oda sıcaklığında sıvı halde bulunur, taşınması ve depo edilmesi kolaydır.[41] Formik asit kimyasal olarak çeşitli yollarla elde edilebilir. Kimyasal katalizörler zor reaksiyon koşulları ve pahalı metaller gerektirmektedir. Kimyasal CO₂ indirgenmesinin aksine, CO₂ enzimler kullanılarak ılımlı koşullarda indirgenebilmektedir. Enzimatik kataliz ile CO₂ indirgenmesi sonucu formik asit üretilmesi ucuz ve aynı zamanda çevreyle dost bir teknoloji sunmaktadır.[43,42]

FDH üzerinde yapılan bir çalışmada asetojen bir bakteri olan *Clostridium carboxidivorans*'nın CO₂ redüksiyonu yapabildiği gösterilmiştir.[43] *Candida boidinii*'den elde edilen FDH formatı okside edebilmektedir. *Candida boidinii* ile asetojen bakteri olan *Clostridium carboxidivorans* FDH'i karşılaştırıldığında asetojen FDH'in CO₂'i katalizleme özelliğinin formata olan düşük bağlanma afinitesinden geldiği düşünülmektedir.[4] FDH enziminin en önemli dezavantajı farklı çözen sistemlerinde enzimin içermiş olduğu aktif sistein amino asitlerinden ve yüksek pH ve yüksek sıcaklarında kolaylıkla stabilitesini kaybedebilmesidir. FDH enzimlerini endüstriyel şartlara dayanıklı hala getirmek için yeni FDH enzimlerinin izolasyonu ve rekombinant olarak eksprese ettirilmesi üzerine günümüzde birçok araştırma devam etmektedir.[7,44] Literatürdeki son çalışmalarda[7] termofilik bir fungus olan *Chaetomium*

thermophilium üzerine çalışmışlardır. Bu fungustan klonlanıp, tanımlanan FDH enziminin Tm değeri beklenildiğinden farklı olarak 58°C olarak ölçülmüştür. Karşılaştırılan sonuçlara göre bu değer mezofilik bir enzimle aynı Tm değerine sahip olduğu görülmektedir. Mezofilik enzimler olan *Candida methylica* (CmFDH) enziminin Tm değeri 63°C,[45] *Pseudomonas sp* (PsFDH) enziminin Tm değeri 68°C'dir.[48] İzole edilmiş FDH'lerin endüstriyel alanda kullanılmasının zorluğundan dolayı birçok protein mühendisliği yöntemi de uygulanmaktadır.[45,46,47,24]. Thiskov ve ark. 1993 yılında Cys255Ser ve Cys145Ser mutantları üzerine yapılan psFDH çalışmalarında gerçekleştirilen mutantların tek başına kimyasal stabilitede bir değişikliğe sahip olmadığı görülürken, Cys255Ala /Cys145Ser çift mutantının yabani tipe göre kimyasal kararlılığı 1000 kat arttırılabilmektedir.[25]

FDH enzimleri izole edildiği kaynağa göre değişmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1 Farklı kaynaklardan izole edilmiş FDH enziminin termal stabilite ve optimum pH değerlerinin karşılaştırılması

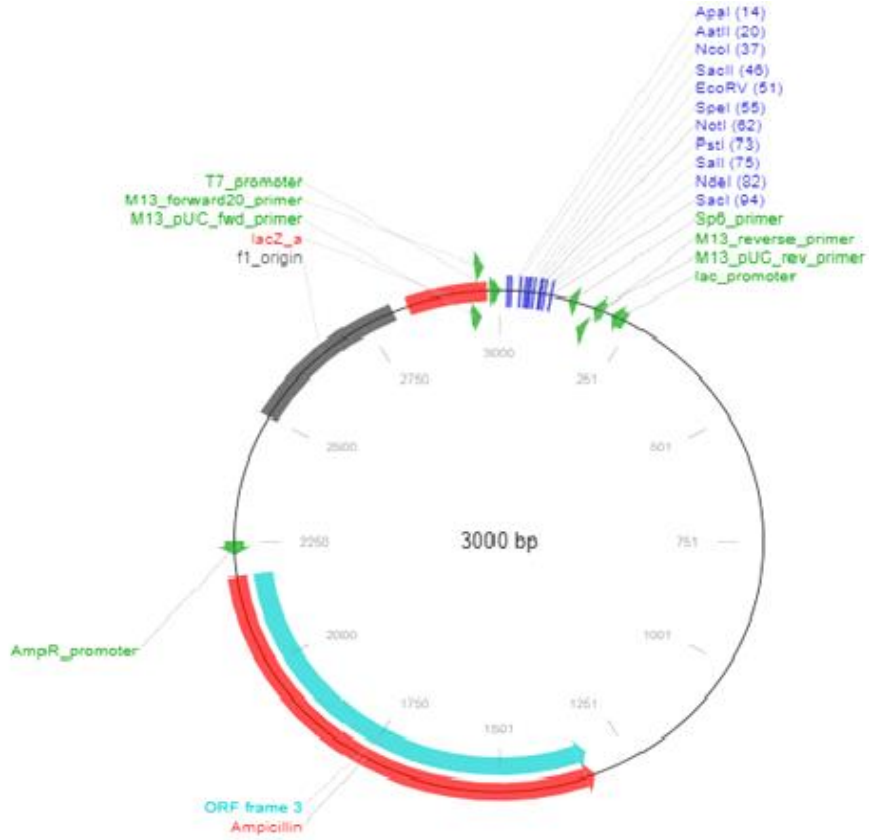
FDH Kaynakları	pH	Tm	Referans
<i>Gossypium hirsutum</i> FDH	7.0	53	(Ordu ve Kurt-Gür, 2018)
<i>Glycine max</i> FDH	7.0	57.1	(Alekseeva, 2011; Kargov ve ark., 2015)
<i>Arabidopsis thaliana</i> FDH	7.0	64.9	(Alekseeva, 2011)
<i>Granulicella mallensis</i> FDH	7.0	53	(Fogal ve ark., 2015)
<i>Pseudomonas sp. 101</i> FDH	7.0	67.6	(Alekseeva ve ark., 2015)
<i>Candida boidinii</i> FDH	7.0	64.5	(Sadykhov ve ark., 2006; Choe ark., 2014)
<i>Candida methylica</i> FDH	8.0	58±0.81	(Ordu ve ark., 2013; Özgün ve ark., 2015)

3.1 Materyal

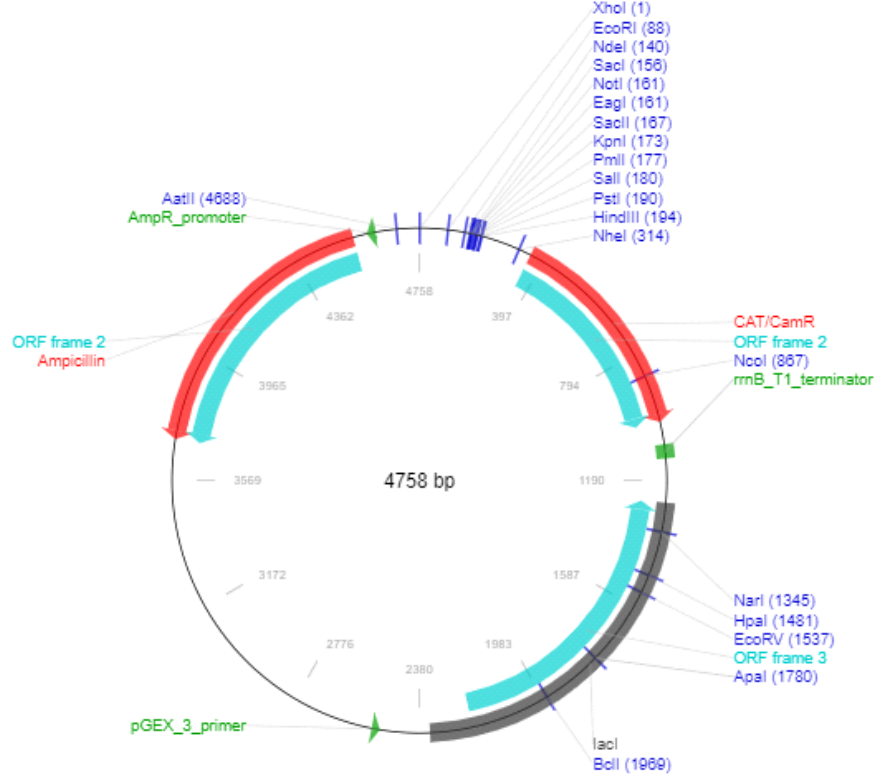
3.1.1 Kullanılan Hücreler ve Vektör

Bu çalışmada kompetent hücre olarak ticari *Escherichia coli* DH5 α -T1 ve *Escherichia coli* BL21(DE3) kompetent hücreleri kullanılmıştır.

CdFDH geni pGMET -T klonlama vektörü ve pQE-2 ekspresyon vektörüne klonlanmış ve rekombinant DNA taşıyan bakteri gliserol içerisinde -80°C 'de saklanmıştır. Vektör pGEM-T 'nin şematik gösterimi Şekil 3.1'de, pQE-2 vektörünün şematik gösterimi Şekil 3.2'de verilmiştir



Şekil 3. 1 pGEM-T vektör haritası



Şekil 3. 2 pQE-2 vektör haritası

3.1.2 Kullanılan Kitler ve Enzimler

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

EcoSpin Plasmid Isolation Kit (ECO TECH)

EcoSpin gel Isolation Kit (ECO TECH)

Gel isolation kit (BIOMATİK)

PstI (Biolabs)

SacI (Biolabs)

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800), jel elektroforez cihazı (Thermo fisher EC250-90), 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

Agaroz (Sigma Aldrich), Akrilamid/bisakrilamid 29:1 (BIORAD), Amonyum persülfat (BIORAD), Ampisilin (BioShop), Coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich), Dipotasyum Fosfat (IsoLab), DL-Dithiothreitol (DTT) (GoldBio), Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich), Hidroklorik asit (HCl) (Merck), Gliserol (Multicell), İmidazol (Sigma-Aldrich), Lizozim (Sigma-Aldrich), Monopotasyum Fosfat (IsoLab), NAD⁺ (Biomatik), Nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA Agaroz) (QIAGEN), Sodyum klorür (NaCl) (Merck), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄) (Merck), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck), Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck), Tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich), Tripton (Sigma-Aldrich), TRIS (Sigma-Aldrich), Maya özütü (Sigma-Aldrich).

3.1.5 Kullanılan Besiyerleri

YPD (Yeast Extract peptone dextrose) Broth besiyeri: 1 litre için; 10 g Maya özütü, 20 g pepton, 20 g glukoz içerir.

LB (Luria-Bertani) besiyeri: 1 litre için; 10 g pepton, 5 g NaCl ve 5g Maya özütü içerir. Katı LB besiyeri hazırlamak için 1 lt sıvı besiyerine 15 g agar eklenerek pH:7.0' ye ayarlanır. LB Agar besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121° C' de 1,5 atm basınçta 20 dk sterilize edilir. Ampisilin içeren katı besiyeri hazırlamak için otoklavlanan LB katı besiyeri elle tutulabilecek ısıya geldiğinde 100 µg/ml ampisilin eklenerek sterilize olan petri kaplarına, petri başına yaklaşık 25 ml besiyeri olacak şekilde dökülür. LB Agar besiyerleri yaklaşık 15 dk donmaya bırakılır.

SOB (Super Optimal Broth): %2 Tripton, %0,5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ içeriği hazırlandıktan sonra pH 7.0'ye ayarlanır ve 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilir.

SOC (Super Optimal Broth with added Glucose): 49 ml soğumuş SOB'ye, 1 ml filtreden geçirilerek sterilize edilmiş 1 M glukoz solüsyonu eklenerek hazırlanır.

TB (Terrific Broth) besiyeri: 1 litre için; 12 g Tripton, 24 g Maya ekstratı ve 4 ml Gliserol 900 ml distile su içerisinde çözündürülür. Otoklavda 121° C' de 1,5 atm basınçta 20 dk boyunca sterilize edilir. Otoklavdan çıkan besiyerinin sıcaklığı yaklaşık 60 °C iken 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 ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanır.

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

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

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

Protein Saflaştırma Tamponları:

Lizis 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

SDS-poliakrilamid Jel Elektrofrezisi: SDS-poliakrilamid jel, yürütme jeli ve toplama jeli olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bir jel için gerekli olan kimyasalların miktarları aşağıda verilen Tablo 3.1'de belirtilmiştir

Tablo 3. 1 SDS-PAGE jelinin hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları

Kimyasallar	Yürütme jeli (%12)	Toplama jeli (%5)
dH ₂ O	1,6 mL	1,8 mL
Tris (1.5 M, pH 8.8)	1,3 mL	-
Tris (0.5 M, pH 6.8)	-	0.313 mL
SDS Solüsyonu (%10)	0,05 mL	0,025 µL
Akrilamid/Bisakrilamid 29:1 (%30)	2 mL	0,335 µL
APS (%10)	0,05 mL	0,025 mL
TEMED	0,005 mL	0,0025 mL

SDS-PAGE jellerini hazırlamak için:

%10'luk SDS solüsyonu, 10.0 g SDS'in 100 ml dH₂O'da çözülmesi ile hazırlanmıştır.

%10'luk APS 0.1 g APS'nin 1 ml dH₂O'da çözülmesi ile hazırlanmıştır.

%12'lik ayırma jeli için gerekli olan 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) solüsyonu, 18.15 g Tris-bazın 100 ml dH₂O'da çözülmesi ile hazırlanmıştır.

%5'lik toplama jeli için gerekli olan 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) solüsyonu, 6.0 g Tris-bazın 100 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır.

10x SDS yürütme tamponunu hazırlamak için 3.30 g Tris-baz, 144.0 g glisin ve 10.0 g SDS 1 L dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır (Elektroforez öncesinde 10x yürütme tamponu 1x'e seyreltilmiştir).

Coomassie Brilliant Blue (CBB) solüsyonu, 1.0 g CBB, 500 ml metanol, 100 ml glasiyal asetik asit ve 400 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır.

Destaining solüsyonu, 200 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml dH₂O'un karışımı sonucu hazırlanmıştır.

50 mM DTT solüsyonu, 0.77 g DTT 100 ml dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır.

Kompetent hücrelerin hazırlanmasında kullanılan CaCl₂ solüsyonu, 1.47 g CaCl₂*2H₂O'nun 100 ml dH₂O'da çözülmesinin ardından 121° C' de 1,5 atm basınçta 20 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmesiyle hazırlanmıştır.

Enzim Aktivite Testi Çözeltileri: 1 M Tris HCl (pH 8.0) hazırlamak için 60.870 g Tris-baz 500 ml dH₂O'da çözülerek ve 0.5 M EDTA solüsyonu 73.06 g EDTA'nın 500 ml dH₂O'da çözülmesi ile hazırlanmıştır.

3.2 Metod

3.2.1. *Candida sp.* Büyütülmesi

Gliserol stoğundan alınan *Candida sp.* hücreleri 5 ml YPD broth içine ekilerek çalkalamalı inkübatörde 30°C, 160 rpm koşullarında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında çöktürülen kültür genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.2 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Harju solüsyonu hazırlanmıştır.[51] 48 saat boyunca büyütülen *Candida sp.* hücreleri 1,5 ml'lik örnek tüpüne aktarılmıştır ve 20,000 x g 'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp pellet üzerine 200 µl Harju solüsyonu eklendikten sonra 2 dk boyunca kuru buz içinde bekletilmiştir. Ardından örnek tüpü 95°C'de 1 dk boyunca sıcak blokta bekletilmiş ve son iki basamağın tekrarlanmasını takiben örnek 30 sn boyunca vorteksle karıştırılmıştır. Üzerine 200 µl kloroform eklendikten sonra 2 dk boyunca tekrar vorteksle karıştırılmış ve 3 dk boyunca 20,000 x g 'de santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz farklı bir 1,5 ml'lik örnek tüpüne aktararak üzerine 400 µl %100 etanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 20,000 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra oluşan supernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pellet 0.5 ml %70'lik etanol ile yıkanarak oda sıcaklığında 20,000 x g'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasının ardından örnek tüpünün kapağı açık tutularak pelletten etanolun uzaklaştırılması sağlanmıştır. 25 µl suda pelletin çözüldürülmesinin ardından DNA miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. İzole edilen DNA örneği daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

3.2.3 Primer Dizaynı ve PZR

Primerler *Candida boidini* NAD⁺-bağımlı FDH gen dizi bilgisi kullanılarak spesifik olarak tasarlanmıştır (Tablo 3.2). Primer tasarlarken, primerlerin 5' ucuna restriksiyon enzimleri olarak kullanılacak SacI ve PstI endonükleazlarına uygun tanıma bölgeleri yerleştirilmiştir. Ticari olarak satın alınan primerler kullanım talimatına göre sulandırılmıştır. PZR reaksiyonlarında bu şekilde kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

Tablo 3. 2 PZR için tasarlanan primerler

Forward primer	5-CGC GTG AGC TCA AAT GAA GAT CGT TTT AGT-3
Reverse primer	5-ACC GCT GCA GTT ATT TCT TAT CGT GTT TAC-3

İntronsuz genler prokaryotların karakteristik bir özelliğidir, ancak ökaryotlarda hala birkaç intronsuz gen vardır.[52] Mayalardaki NAD⁺-bağımlı FDH genleri de intronsuz

genlerdir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında genomik DNA izolasyonu sonrası miktarı ve kalitesi belirlenen DNA molekülleri kalıp olarak kullanılmıştır ve PZR ile hedef gen olan *CdFDH* geninin çok sayıda kopyası elde edilmiştir. Bu işlem için “PCR Plus Master Mix II (5x) (GeneMark)” ve gene özgü primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR Tablo 3.3’ de belirtilen miktarlarda hazırlandıktan sonra Tablo 3.4’ de verilen PZR reaksiyon termal koşulları optimize edilmiştir.

Tablo 3. 3 *CdFDH* geninin amplifikasyonu için kurulan PZR’nin bileşenleri

İçerik	Miktar
Genomik DNA (75 ng/μl)	2 μl
İleri Primer (100 μM)	2 μl
Geri Primer (100 μM)	1 μl
Master mix high proof (5X)	5 μl
dH ₂ O	11 μl
Toplam hacim	20 μl

Tablo 3. 4 PZR termal koşulları

PZR Reaksiyon Koşulları	
<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
94 °C	2 dk
94 °C	1dk
55 °C	5 dk
72 °C	60 sn
72 °C	5 dk
4 °C	∞

} 35 Döngü

3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

CdFDH enzimini kodlayan gen bölgesini içeren PZR ürünleri %1' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel hazırlamak için 0.4 g agaroz 40 mL 1 X TBE tamponunda mikrodalga fırında çözülmüştür. Homojen hale getirilen jel yaklaşık 55-60°C' ye kadar soğutularak 3 µL etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Yükleme tamponu eklenerek kuyucuklara 3 µl marker ve 2 µl 6x yükleme boyası (Takara) ile karıştırılan 10µl DNA jeldeki diğer kuyucuğa yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 100 V'da 30 dk yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. İlgili ampikon büyüklüğü görüldükten sonra jele yüklenmeyen PZR ürünü "PZR Purification kit (Qiagen)" ile purifiye edilmiştir. Purifikasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. PZR ürünü hacminin iki katı kadar "Binding Buffer", ilaveden sonraki toplam hacim kadar da izopropanol eklenerek karıştırılmıştır.
2. Karışım kolona aktarılmıştır ve 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir ve toplama tüpünde biriken sıvı ortamdan uzaklaştırılmıştır.
3. Kolonun üzerine 500 µl "Wash Buffer" eklenmiş, 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş, Yıkama basamağı iki defa tekrarlanmıştır.
4. Kolonda "Wash Buffer" kalmış olması ihtimaline karşı 14000 rpm'de 3 dk boş santrifüj yapılmış ve toplama tüpünde biriken biriken sıvı ortamdan uzaklaştırılmıştır.
5. Kolonun üzerine 55°C'de ısıtılmış 21 µl ddH₂O" eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
6. 14000 rpm'de 2 dk santrifüj sonucu süzüntüde bulunan PZR ürünlerinin miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle belirlenmiştir.
7. Örnek, daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

3.2.5 Ligasyon

NAD⁺-bağımlı *CdFDH* genini taşıyan PZR ürünü pGEM-T vektörüne klonlamak için 18 saat +4°C'de bekletilmiştir. Ligasyon için kullanılan kimyasallar ve miktarları tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5 Ligasyon reaksiyonunun bileşenleri

İçerik	Miktarı
PZR ürünü (13,1 ng / µl)	3,5µl
5x Ligasyon Buffer	5 µl
pGEM-T vektör(1082 ug/ml)	1 µl
T4 DNA ligaz (5U/ µl)	0,5 µl
Toplam hacim	10 µl

3.2.6 CaCl₂ Kompetent Hücre Hazırlanması

Transformasyon için gerekli kompetent hücrelerin hazırlanması aşağıdaki işlem sıralarına göre gerçekleştirilmiştir.

1. Transformasyon işlemi için *E.coli* BL21-DE3 ve DH5α-T1 hücreleri kullanılmıştır.
2. -80°C'de bulunan hücre stokları öze ile alınarak antibiyotik içermeyen katı besiyerlerine azaltılarak ekimleri yapılmış ve 16 saat 37 °C'de büyütülmüştür.
3. İnkübasyon sonunda her iki suş için de tek koloni seçilerek antibiyotik içermeyen 5 ml LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Daha sonra 37°C'de 220 rpm ile gece boyu inkübe edilen hücrelerden 500 µl alınarak 250 ml'lik erlende 50 ml antibiyotik içermeyen LB sıvı besiyerine ekilmiştir.
4. 37°C ve 220 rpm'de inkübe edilen hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunluk değeri UV-Vis spektrometre kullanılarak belirlenmiş ve 0.5-0.6 aralığına geldiğinde 50 ml'lik başlangıç kültürleri 50 ml'lik iki örnek tüpüne eşit olarak dağıtılmıştır.
5. 50 ml'lik örnek tüplerinin buzun içerisinde 10 dk bekletilmesinin ardından örnekler 4000 rpm ile 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek çöktürülmüş ve oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
6. Önceden sterilize edilmiş 100 mM (pH 7.0) konsantrasyonundaki CaCl₂ solüsyonundan 10 ml alınarak pelletlerin üzerine eklenmiş ve pelletler yavaşça pipetaj yapılarak çözülmüştür.

7. Pelletlerin çözülmesinin ardından 4000 rpm + 4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. CaCl₂ işlemi ile santrifüj işlemi 3 kez tekrar edilmiş ve CaCl₂’nin kullanılması ile hücre porlarının daha geçirgen olması sağlanmıştır.
9. Süpernatantlar 2 kez ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra pellet 40 µl üst sıvı ile iyice çözülerek üzerine steril %100 gliserolden 200 µl eklenmiştir.
10. Hazırlanan kompetent hücreler 1,5 ml’lik örnek tüplerine istenilen miktarda dağıtılmasının ardından daha sonra kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.7 Transformasyon

pGEM-T vektörüne klonlanan PZR ürününün DH5α -T1 *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyonu aşağıda verilen adımları takip ederek gerçekleştirilmiştir.

1. -80°C’ de saklanan 50 µL *E. coli* DH5α kompetent bakterileri 5 dk buz üzerinde çözünene kadar bekletilmiştir.
2. Çözünmeye başlayan bakterilerin 50 µl’ si üzerine 5 µl *CdFDH* PZR ürünü eklenmiştir.
3. Kompetent hücreler 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
4. Kompetent hücreler buzdan alınıp 42°C’ de 1 dk bekletilmiştir.
5. 42°C’ den alınan bakteriler 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
6. Hücreler buzdan çıkarıldıktan sonra üzerine 900 µl SOC eklenmesinin ardından hafifçe karıştırılmıştır.
7. Çalkalayıcılı inkübatörde 37 °C’de 200 rpm’ de yaklaşık bir saat inkübe edilmiştir.
8. İnkübe edilen hücreler 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant kısımdan 850 µl ortamdan uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan 100 µl ile pellet çözüldürülmüştür.
10. 100 µl hücre, X-Gal-Amp-IPTG içeren katı LB besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Kolonilerin çoğalması için 37 °C’ de gece boyunca inkübe edilmiştir.
11. 37°C’den alınan petriyeler + 4 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.8 Transformasyon Analizi

Transformasyon sonrası petride görülen kolonilerden NAD⁺-bağımlı *CdFDH* genini taşıyan pGEM-T plazmidini hücre içerisine alan bakterilerin seçilimi 20 mg/mL X-gal, 1 mM IPTG ve 100 µg/ml Amp içeren katı LB besiyerinde gerçekleştirilmiş ve beyaz renkli koloniler pozitif, mavi renkliler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.9 Transformasyon Analizi için Restriksiyon Endonukleazlarla Kesim İşlemi

Beyaz renkli kolonilerdeki “insert” varlığı izole edilen plazmidlerin restriksiyon endonukleazlarıyla kesimine dayalı olarak doğrulanmıştır. Bu amaçla ampisilinli LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C’de gece boyu inkübe edilen hücrelerden EcoSpin Plazmid İzolasyon Kiti (ECO TECH) ile plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra *SacI* ve *PstI* enzimleri ile 3,5 saat 37°C’de kesim yapılmıştır (Tablo 3.6). Enzim ile kesimi gerçekleştirilen örneklerden 45 µl, yükleme boyasından ise 5 µl jele yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 100 V’da 30 dk yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. İlgili bant jelden geri saflaştırılarak pQE-2 vektörüne klonlanması için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır. FDH geni içerdiği düşünülen koloni Ampisilinli LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda EcoSpin Plazmid İzolasyon kiti (ECO TECH) ile plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra koloniler Sanger dizi analizi yöntemi ile dizilenmiştir. Dizi analizi sonucuna göre ilgili geni taşıdığı belirlenen koloni sıvı LB besiyeri içinde 37°C’de 16 saat inkübe edilmiş ve hücreler %20 oranında gliserol eklendikten sonra derin dondurucuya (-80°C) kaldırılmıştır.

Tablo 3. 6 *CdFdh+* pGEM-T plazmidinin *SacI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

<i>CdFdh+</i> pGEM-T (601 ng/ µl)	21 µl
10x NEB Buffer	5 µl

Tablo 3. 7 *CdFdh+* pGEM-T plazmidinin *SacI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi (devamı)

<i>SacI</i> (20 U/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	22 μ l
<i>PstI</i> (20 U/ μ l)	1 μ l
Toplam	50 μ l

3.2.10 *CdFDH* Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Restriksiyon enzimi ile kesim sonrası agaroz jel üzerinde yürütülerek kontrol edilen *CdFDH* geni, pQE-2 ekspresyon vektörüne klonlama işlemi için aşağıda belirtilen şekilde jelden geri kazanılmıştır.

1. *CdFDH* geni içeren jel parçaları 1.5 ml'lik örnek tüplerine alınmıştır.
2. 100 mg agaroz jel parçalarına 300 ml'' Binding'' solüsyonu eklenmiştir.
3. Jel parçaları 50-60°C'de 7-10 dk boyunca 2 dk aralıklarla vorteks ile karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır.
4. Agaroz jel tamamen çözüldükten sonra her 100 mg jel parçası için üzerine 150 μ l izopropanol eklenmiştir.
5. Çözünmüş jel parçaları Spin kolonlarına aktarılmıştır.
6. Kolonlar 12,000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edilerek kolonun altında kalan sıvı ortamdan uzaklaştırılmıştır.
7. Kolonlara 700 μ l yıkama solüsyonu eklenerek 1 dk 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8. Kolonlar boş olarak 3 dk 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
9. Toplama kolonu yeni 1.5 ml'lik yeni bir örnek tüpüne yerleştirilmiştir. 55°C'de ısıtılmış sudan 30 μ l kolona eklenmiştir.
10. 2 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilen kolon 1 dk 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

11. Elüe edilen örnek daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

3.2.11 pQE-2 Ekspresyon Vektörüne Klonlama

Jelden geri saflaştırdığımız CdFDH genini pQE-2 ekspresyon vektörüne yerleştirmek için pQE-2 vektörü LB sıvı içinde 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda hücrelerden EcoSpin Plazmid izolasyon kiti (ECO TECH) ile plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra SacI ve PstI enzimleri ile 3,5 saat 37°C’de kesim yapılmıştır. pQE-2 vektörü restriksiyon endüonukleaz ile kesim koşulları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3. 7 pQE-2 plazmidinin SacI ve PstI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi

pQE-2 Vektör (257 ng/ µl)	10 µl
10x NEB Buffer	5 µl
SacI (20 U/ µl)	1 µl
PstI(20 U/ µl)	1 µl
dH ₂ O	33 µl
Toplam	50 µl

Jelden elüe edilen ve derin dondurucuya (-20°C) kaldırılan NAD⁺-bağımlı CdFDH geninin protein ekspresyonunu sağlamak amacıyla hedef genin histidin kuyruklu bir ekspresyon vektörü olan pQE-2 vektörüne klonlanması için Tablo 3.8’de belirtilen bileşenler bir araya getirilerek +4°C’de 18 saat boyunca ligasyon gerçekleştirilmiştir

Tablo 3. 8 Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Ligasyon için kullanılan içerikler	Miktar
İnsert (22,01 ng/ul)	8 µl
5x Ligasyon Buffer	2 µl
Vektör (pQE-2) (1814 µg/ml)	2 µl
dH ₂ O	7 µl
T4 DNA ligaz (5U/ µl)	1 µl
Toplam	20 µl

3.2.12 *E. coli* BL21 Hücrelerinin Transformasyonu ve Transformantların Analizi

CdFDH genini taşıyan pQE-2 vektörü *E.coli* BL21 hücrelerine 3.2.7. Transformasyon başlığı altında belirtilen işlemler uygulanarak aktarılmıştır. Ampisilin içeren katı LB besiyerine ekilen transformasyon karışımının 37°C de 16 saat inkübasyonunun ardından oluşan koloniler hem çizgi ekim yöntemiyle Ampisilinli LB katı besiyerine ekilmiş, hem de steril koşullarda ampisilinli LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 37°C de 16 saat boyunca inkübe edilen kolonilerin rekombinant vektörleri içerip içermediğinin belirlenmesi için ilk önce kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. *CdFDH* geninin ekspresyon vektörüne genin açık okuma çerçevesine uygun yönde klonlandığını doğrulamak için izole edilen plazmidler PstI restriksiyon enzimi ile Tablo 3.9’da verilen koşullarda 37°C’de 3,5 saat boyunca kesilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmidlerin bant büyüklüklerini görmek için agaroz jel elektroforezi yapılmış ve jel görüntüleme ile beklenen hedef bantları vererek *CdFDH*’in vektöre düz bir şekilde girdiği tayin edilen koloniler tekrar ekim yapılarak gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plazmit izolasyonu yapılarak Sanger dizi analizine yollanmıştır. Doğruluğu kanıtlanan koloniler ile çalışmalara devam edilmiştir.

Tablo 3. 8 *CdFdh+* pQE-2 plazmidinin PstI restriksiyon enzimi ile kesim işlemi

<i>CdFDH</i> +pQE-2 (352 ng/ μ l)	2 μ l
10x NEB Buffer	1 μ l
PstI (20 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	6.5 μ l
Toplam	10 μ l

3.2.13 Hücre Büyütme ve Protein Ekspresyonu

1. *CdFDH* genini taşıyan pQE-2 vektörünü içeren *E. coli* BL21 hücreleri 25 ml'lik ampisilinli sıvı LB besiyerine ekilmiş ve inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2. Gece boyunca inkübe edilmiş alt kültürü yapılan hücrelerin tamamı 500 ml ampisilinli (100 μ g/ml) TB besiyerine inoküle edilerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 2 saat inkübe edilmesinin ardından OD₆₀₀ değeri 0.6 ya ulaştığında 1mM IPTG (isopropyl- β -D- thio galactopyranoside) eklenerek *CdFDH* gen anlatımı indüklenmiştir.

3. IPTG ile indüklendikten sonra 24 °C' de 22 saat inkübe edilmiştir. Ardından 1ml hücre 1,5 ml'lik örnek tüplerine alınmıştır.

4. İnkübasyon sonunda geriye kalan hücreler 15,000x g' de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve pellet -80 °C' de saklanmıştır.

3.2.14 6xHis-Tag Sistemi Kullanılarak *CdFDH* Enziminin Saflaştırılması

1. -80°C'de saklanan pellet üzerine 12 ml lizis tampon eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir.

2. Hücre süspansiyonuna 12 mg/ml lizozim eklenerek buz üzerinde 30 dk çalkalanarak inkübe edilmiştir.

3. Hücre süspansiyonu 200–300 W’ da sonikasyon ile 10’ar saniye aralıklar ile 6 kez sonikasyonda parçalama işlemine maruz bırakılmıştır.
4. Sonikasyon sonrası parçalanmış hücre süspansiyonundan 1 ml farklı bir 1,5 ml’lik örnek tüplerine alınmıştır.
5. Geriye kalan parçalanmış hücre süspansiyonu 15000xg’ de 15 dk +4°C’ de santrifüj ile çöktürülmüştür.
6. *CdFDH* proteini nikel–nitriлотriasetik asit (Ni–NTA) metal-afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. 15 ml çöktürülmüş hücre süspansiyonu süpernatantının 1 ml Ni–NTA rezin eklenerek buz üzerinde 45 dk çalkalanarak karışması sağlanmıştır.
7. Karışım 1000xg’de 1 dk santrifüj edildikten sonra rezine bağlanmayan proteinleri içeren süpernatant “flow-through” olarak etiketlenmiş ve +4°C’ye kaldırılmıştır.
8. Çöktürülen rezin 2 kez 3 ml yıkama tamponu eklenerek 1000xg’de 1 dk santrifüj ile yıkanmış ve her bir yıkamada elde edilen süpernatantlar daha sonra analiz edilmek üzere +4°C’ye kaldırılmıştır.
9. Ni-NTA rezine bağlanan *CdFDH* proteinleri, 1 dk boyunca 1000xg’de santrifüj edilerek 1 ml elüsyon tamponu ile 6 kez elüe edilmiştir.
10. Bir araya getirilen elüsyon fraksiyonları bir gece boyunca +4°C’de bekletilerek rezininin çökmesi sağlanmıştır. Bekletilen protein rezinden ayrıldıktan sonra ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilip aktivite analizlerinde kullanılmıştır.
11. -80°C’den alınan hücre pelleti, sonikasyon öncesi, sonikasyon sonrası, yıkama sonrası ve elüsyon sonucu edilen proteinler SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.

3.2.15 Ultrafiltrasyon

1. Merck (MWCO 30,000 kDa) ultrafiltrasyon tüpünün üst çizgisine kadar ddH₂O eklenerek 3.000xg’de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Ardından ultrafiltrasyon tüpünün alt kısmı ve membran içeren hazne içindeki sıvı ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
2. Haznenin üst kısmına kadar 50 mM pH 7 potasyum fosfat tamponu eklenerek 3.000xg’de 10 dk santrifüj yapılmasının ardından tüpün alt kısmı ve haznesi içindeki sıvı ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

3. Saflaştırma sonucu elde edilen protein hazneye boşaltılmıştır. En üst çizgiye kadar 50 mM pH 7 fosfat potasyum tamponu eklendikten sonra 3.000xg'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Alt sıvı atıldıktan sonra tekrar tampon çözelti eklenmiş ve 3.000xg'de 4 dk santrifüj yapılmıştır. En son gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra örnek tüpü haznesinde yaklaşık 1 ml protein kalmıştır.

4. 200 µl'lik pipet ile ultrafiltrasyon tüpü haznesinin duvarları da yıkanarak içindeki protein toplanmıştır.

3.2.16 SDS-PAGE Analizi

CdFDH proteininin varlığını doğrulamak için SDS-PAGE yapılmıştır. İlk olarak, %12'lik ayırma (separating) jeli ve %5'lik toplama (stacking) jeli hazırlanmıştır. Elektroforez camları toz kalmayacak şekilde silinmiştir. Camlar doğru bir şekilde kasete yerleştirildikten sonra ilk olarak %12'lik ayırma jeli dökülmüştür. İçerikler hazırlanırken polimerizasyonu başlatıcı APS ve TEMED bileşenleri en son eklenmiştir. Ayırma jeli tamamen polimerize olduktan sonra üzerine %5'lik toplama jeli dökülmüş ve tarak yerleştirilerek yaklaşık 20 dk toplama jelinin donması beklenmiştir. Toplama jeli hazırlanırken de APS ve TEMED bileşenleri en son eklenmiştir. Toplama jelinin donmasıyla tarak jelden çıkarılmış, kuyucuklar 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile yıkanmış ve cam kaset elektroforez sistemine yerleştirilmiştir. IPTG ile indüklenen hücre pellet ve süpernatantlarda *CdFDH* proteinini eksprese edilip edilmediğini görmek için örnekler 4 µl 4x Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) boya ile muamele edilmiştir. Örnekler boya ile 95°C'de 5 dk denatüre edilerek jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Marker olarak 3 µl Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD) yüklenmiştir. Örnekler 10 µl olarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendikten sonra elektroforez tankı 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile doldurulmuştur. 30 dk boyunca 100 V'ta yürütülen örnekler toplama jelinden ayrıldıktan sonra 160 V'da 1 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra jel boyama solüsyonunun içerisinde gece boyunca 25°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ardından boyama çözeltisi dökülerek jelin üzerine yüzeyini kaplayacak miktarda boya çıkarma solüsyonunda 1 saat boyunca 37°C'de çalkalanmış ve protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3.2.17 Kararlı Hal Kinetiği

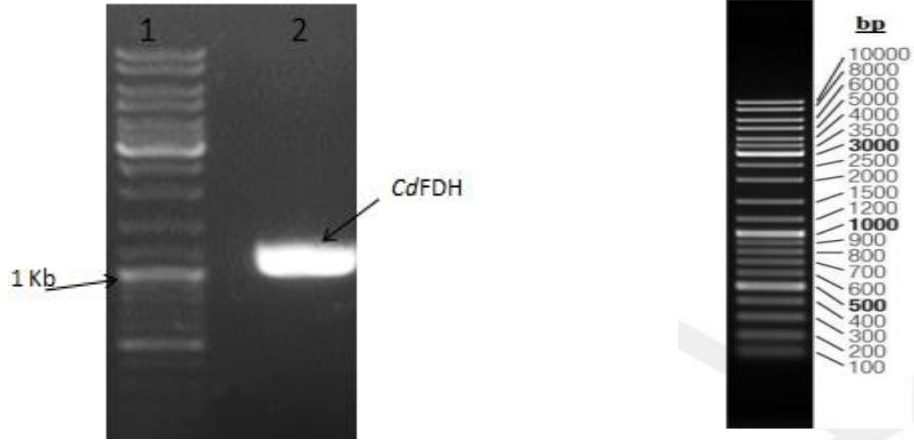
CdFDH enziminin aktivitesi, koenzimi olan NAD^+ 'ı NADH 'a indirgediğinde 340 nm'de oluşturduğu absorbans ile belirlenmiştir. Rekombinant *CdFDH*'lerin kararlı durum kinetik deneyleri, 20 mM pH 6 Potasyum fosfat, pH 7 Potasyum fosfat, pH 8 Tris Tamponu, pH 9 Tris Tamponu, 1 mM NAD^+ , 12 mM ve 40 mM format ve 100 μM enzim içeren reaksiyon karışımının 340nm'deki absorbansının 25°C'de ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Grafit 7 Kinetics Software programına yerleştirilerek analiz edilmiştir.

4.1 Genomik DNA İzolasyonu ve *Cd*FDH Geninin Amplifikasyonu

NAD⁺- bağımlı format dehidrogenaz enzimi mayalarda intron içermediği bilindiğinden^[53] MLP1 kodlu hücreden doğrudan genomik DNA izolasyonu ile klonlama çalışmalarına başlanabilmektedir. Çalışmamızda FDH enzimi gen kaynağı olarak kullanılan MLP1 kodlu hücre, pH 3-4 arası ve halofilik bir ortam olan zeytin salamurasından izole edilmiş ve 16S rRNA tanımlamasına göre %99 oranında *Candida diddensiae* ile benzerlik gösterdiğinden *Candida diddensiae* olarak tanımlanmıştır.^[54]

Genomic DNA Prep (Bust 'n' Grab Protocol) DNA izolasyonu ile elde edilen genomik DNA'nın miktarı 260 nm'deki absorbans değeri ile, saflığı (kalite) ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı ($A_{260/280}$) ile belirlenmiştir. Konsantrasyonu 75 ng/μl, saflığı 1.88 çıkan genomik DNA PZR ile çoğaltılacak hedef gen bölgesi için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

Hedef FDH geninin çoğaltılması için *Candida boidinii* ve *Candida methylica* FDH genleri temel alınarak tasarlanan primerler ve gerekli bileşenlerle polimeraz zincir reaksiyonuna sokulmuş ve sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Rekombinant *Cd*FDH'in PZR sonucu elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.1' de gösterilmiştir. 1 numaralı kuyucukta 1015 baz çiftine sahip *Cd*FDH gen dizisinin PZR ürünü beklenildiği gibi agaroz jelde ~1015 bp büyüklüğünde bant vermiştir. PZR örneği PZR saflaştırma kiti (Qiagen) ile temizlendikten sonraki konsantrasyon değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 PZR ürününün %1 lik Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü 1) Marker, 2) PZR ürünü

Tablo 4. 1 PZR sonucu amplifiye edilen gen konsantrasyon değerleri

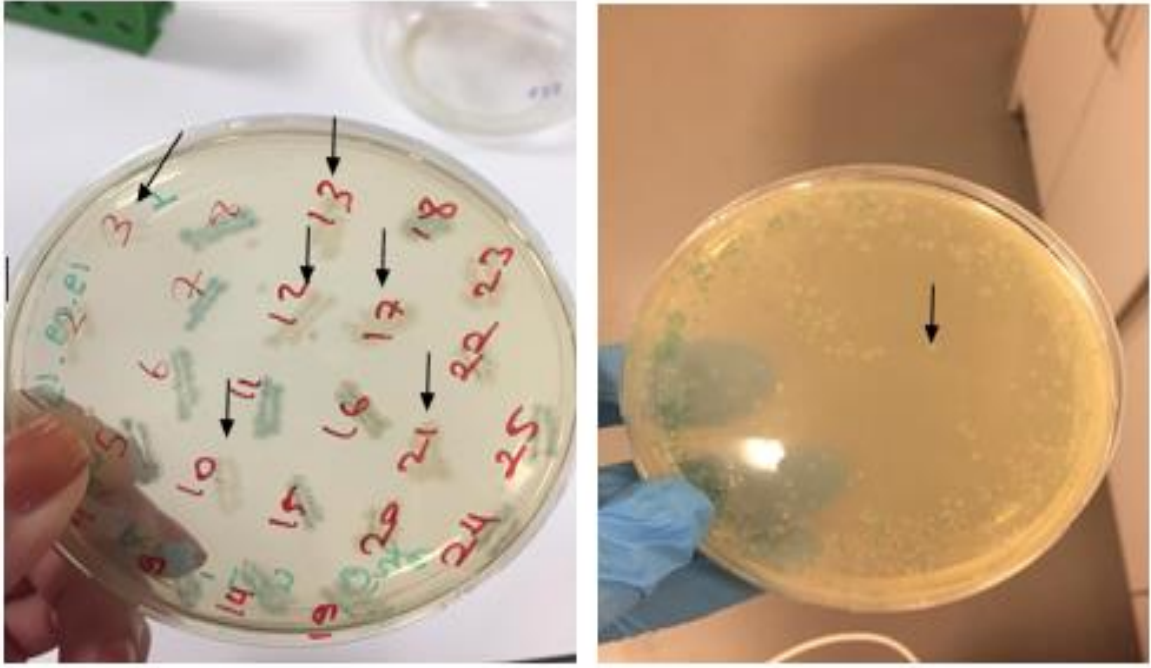
Konsantrasyon	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
13,1 ng / μ l	1,90	1,62

4.2 *CdFDH* Geninin pGEMT Vektörüne Klonlanması ve Transformasyon

PZR örneği PZR saflaştırma kiti (Qiagen) ile temizlendikten sonra elde edilen *CdFDH* geninin pGEM-T vektörüne ligasyonu sağlanmıştır. Elde edilen rekombinant *CdFDH/pGEM-T* vektörü *E. coli* DH5 α hücresine transformasyonundan sonra rekombinant DNA'yı içine almış kolonileri seçmek amacıyla X-Gal-Amp-IPTG içeren katı LB besiyerine ekim yapılmıştır.

X-Gal/IPTG içeren katı besiyerinde yapılan taramada, plazmidin içerdiği marker gen beta galaktozidaz restriksiyon enzimi ile kesilerek buraya hedef gen yerleşmişse ve beta galaktozidaz geninin bütünlüğü bozulmuşsa bu genin aktivitesi ortadan kalkar. Eğer, böyle bir konjugat (kimerik plazmid) taşıyan *E. coli*, Xgal (5-bromo -4chloro -3-indolyl -beta- D-galactopyronoside) içeren ortama aktarılırsa, *E.coli*'ler ürer ancak, enzim sentezlenemediği için Xgal'ı ayrıştıramaz ve kolonilerin etrafı renksiz olarak görülür. Eğer beta galaktozidaz geninin bütünlüğü bozulmamışsa sentezlenen enzim, Xgal'ı

ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir. İstenilen gen ile diğer yabancı gen veya DNA sekanslarını taşıyan plazmidli *E. coli* 'leri birbirinden ayırmak için ise seçilen kolonilerin sıvı LB besiyeri içinde üretilip genin ekspresyonu kontrol edilmelidir. Çalışmamızda 3,10,12,13,17 ve 21 numaralı beyaz koloniler çizgi ekimi ile seçilerek bu kolonilerden elde edilen plazmidler restriksiyon enzimi ile kesilerek doğru boyutta geni taşıyıp taşımadıkları kontrol edilmiştir (Şekil 4.2).

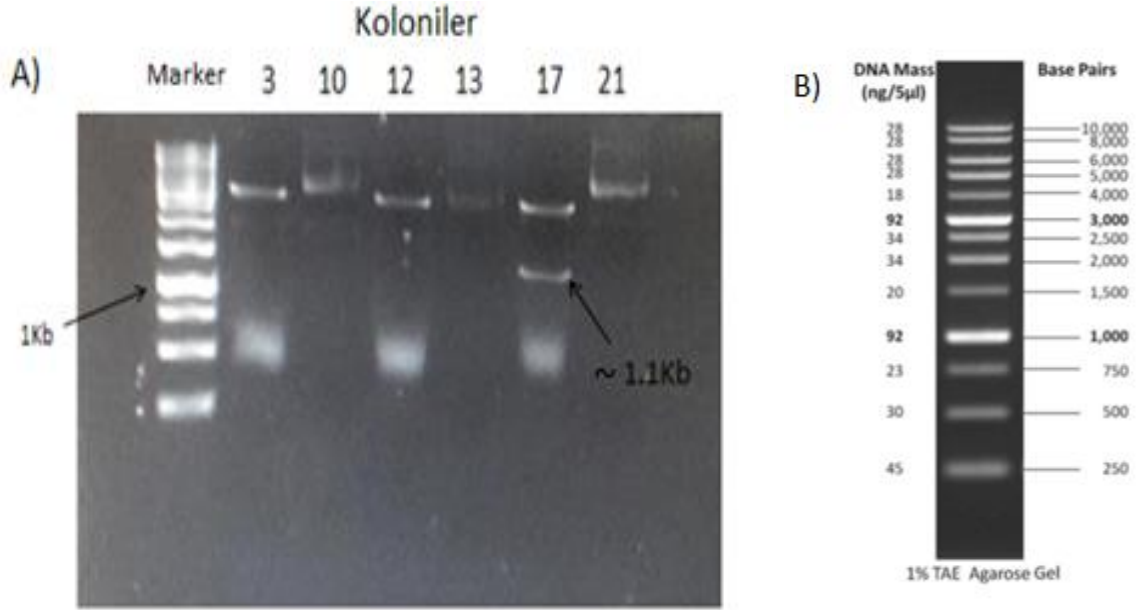


Şekil 4. 2 *CdFDH* içeren DH5 α kolonileri

4.3 Koloni Taraması

Ligasyon reaksiyon karışımı verilen kompetent hücrelerin X-Gal-Amp-IPTG içeren LB agar besiyerine ekimi ve inkübasyonu sonrası oluşan beyaz kolonilerden 6 tane seçilerek steril koşullarda ampisilinli sıvı LB besiyerine inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 16 saat inkübe edilen kolonilerin rekombinant *CdFDH*'i alıp almadığını görmek için 3,10,12,13,17 ve 21 numaralı kolonilerden EcoSpin Plazmid Isolation Kit (ECO TECH) kiti ile plazmit izole edilmiştir. Plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra *SacI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 3,5 saat kesilmiştir. Kesilen plazmidler agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucunda 17 numaralı koloniden elde edilen plazmidten *CdFDH* geni

(1015 bp) büyüklüğünde parçanın çıktığı görülmüş ve insert dizinin *CdFDH* genine ait olup olmadığı Sanger dizi analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 A) *SacI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen ürünlerin UV görüntüsü. B) DNA marker

4.4 DNA Dizi Analizi ve Homoloji BLAST

Dizi analizi sonucunda 1015 bp uzunluğunda *Cdfdh* geninin NCBI'da kayıtlı format dehidrogenazlarla benzerliğini araştırmak amacıyla blastn uygulaması kullanılmıştır (Şekil 4.4). *CdFDH*'inin veri tabanında en yüksek düzeyde *Candida methylica* (*Cm*), *Candida boidinii* (*Cb*) format dehidrogenazlarına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Candida methylica* ile %99,08 *Candida boidinii* ile %99,07 oranında benzerlik görülmektedir. Ekspresyon vektörüne doğru yönde klonlandığı doğrulanan koloni seçilerek ekspresyon çalışmalarına bu koloni ile devam edilmiştir.

```

# 5'3' Frame 3
ggaaattaactatgaaacatcaccatcaccatcaccatcatgcatgcgaggagctcaaagaag
  K L T M K H H H H H H M H A G A Q M K
atcgtttagtcttatatgatgctggtaagcacgctgctgatgaagaaaaattataggt
  I V L V L Y D A G K H A A D E E K L Y G
tgtactgaaaataaattaggtattgctaattggttaaaagatcaaggctcatgaactgatt
  C T E N K L G I A N W L K D Q G H E L I
actacttctgataaagaaggtgaaacaagtgaattggataaacatatcccagatgctgat
  T T S D K E G E T S E L D K H I P D A D
attatcatcaccactcctttccatcctgcttatatcactaaggaaagacttgacaaggct
  I I I T T P F H P A Y I T K E R L D K A
aagaacttaaaattagtcggtgcccgtgggtggttctgatcacattgatttagattat
  K N L K L V V A A G V G S D H I D L D Y
attaatcaaacaggtgaagaaatctcagtcctggaagttacaggttctaattgttctct
  I N Q T G K K I S V L E V T G S N V V S
ggtgctgaacacggtgctgatgaccatgcttctggttagaaatttcggtccagcacat
  V A E H V V M T M L V L V R N F V P A H
gaacaaattattaaccacgattgggaggttgctgctatcgctaaggatgcttacgatatc
  E Q I I N H D W E V A A I A K D A Y D I
gaaggtaaaactatcgctaccattgggtgctggtagaattggttacagagcttggaaaga
  E G K T I A T I G A G R I G Y R V L E R
ttactcccatttaatccaaaagaattattatactacgattatcaagctttacaaaagaa
  L L P F N P K E L L Y Y D Y Q A L P K E
gctgaagaaaaagttggtgctagaagagttgaaaatattgaagaattagttgctcaagct
  A E E K V G A R R V E N I E E L V A Q A
gatatcggtacagttaatgctccattacacgcaggtacaaaagggttaattaataaggaa
  D I V T V N A P L H A G T K G L I N K E
ttattatctaaatttaaaaaaggtgcttgggttagtcaataccgcaagaggtgctatttgt|
  L L S K F K K G A W L V N T A R G A I C
ggtgctgaagatggtgagcagctttagaatctggtcaattaagaggttacgggtggtgat
  V A E D V A A A L E S G Q L R G Y G G D
gtttgggtcccacaaccagctccaaaggatcacccatggagagatatgaggaataaatat
  V W F P Q P A P K D H P W R D M R N K Y
ggtgctggtaatgccatgactcctcactactctggtactaccttagacgctcaaacaaga
  G A G N A M T P H Y S G T T L D A Q T R
tacgctgaaggtactaaaaatattttggaatcattcttaccggtaaatgattacaga
  Y A E G T K N I L E S F F T G K F D Y R
ccacaagatattatcttattaaatggtgaatacgttactaaagcttacggtaaacacgat
  P Q D I I L L N G E Y V T K A Y G K H D
aagaaataactgcagccaagcttaattagctgagctggn
  K K - L Q P S L I S - A X

```

Şekil 4. 4 *CdFDH*'in nükleotid ve amino asit dizisi

4.5 Clustal Sonuçları

Elde edilen yeni *CdFDH* geni veri tabanlarındaki en yakın benzerleri ile karşılaştırılmıştır. *CmFDH* ve *CbFDH* daha önce yapılmış dizi analizi çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre seçilmiştir. *CmFDH*, *CbFDH* dizisinde korunmuş bölgelerde yer alan Asn187 residusu, NAD⁺ bağlanma residuları olan Asp195, Tyr196 ve Gln197'yi içeren α -heliks ve β -zincir arasındaki döngü üzerinde bulunmakta olan ve

koenzim spesifitesinden sorumlu olan Asn187 amino asidi ile *CdFDH* enziminde bulunan amino asitlerin homolog olduğu görülmüştür. CLUSTAL OMEGA aracılığı ile yapılan dizi karşılaştırmaları Şekil 4.5'te verilmiştir.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CmFDH      MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLDQGHELITTSKKEGETSELDKHIPD 60
CdFDH      MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLDQGHELITTSKKEGETSELDKHIPD 60
CbFDH      MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLDQGHELITTSKKEGETSELDKHIPD 60
*****

CmFDH      ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKSVVWAGVGSOHIDLIDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
CdFDH      ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVWAGVGSOHIDLIDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
CbFDH      ADIIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVWAGVGSOHIDLIDYINQTGKKISVLEVTGSNV 120
*****

CmFDH      VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
CdFDH      VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
CbFDH      VSVAEHVVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVL 180
*****

CmFDH      ERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
CdFDH      ERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
CbFDH      ERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLIN 240
*****

CmFDH      KELLKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDWFPPAPKDHPWRDMRN 300
CdFDH      KELLKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDWFPPAPKDHPWRDMRN 300
CbFDH      KELLKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDWFPPAPKDHPWRDMRN 300
*****

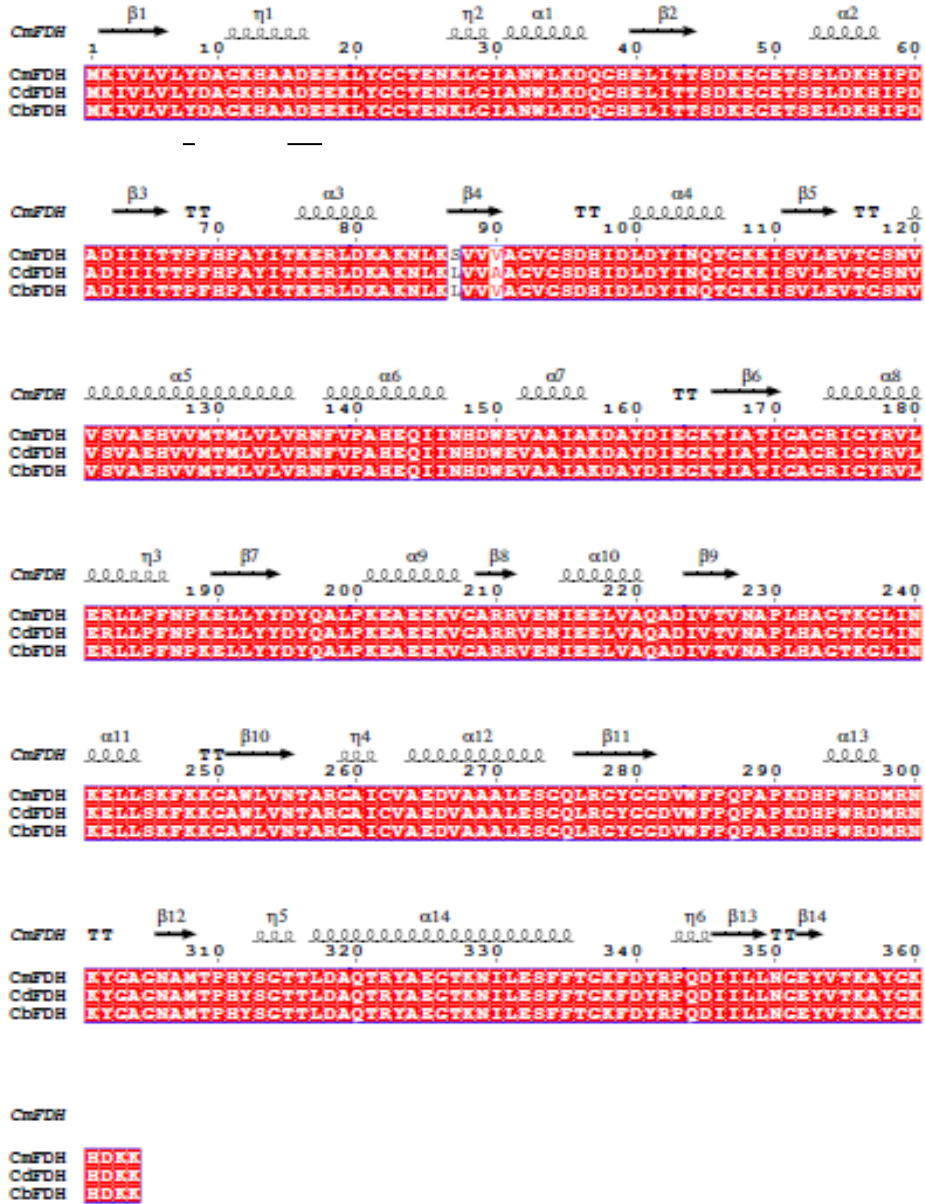
CmFDH      KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGFDFYRQDIILLNGEYVTKAYGK 360
CdFDH      KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGFDFYRQDIILLNGEYVTKAYGK 360
CbFDH      KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGFDFYRQDIILLNGEYVTKAYGK 360
*****

CmFDH      HDKK 364
CdFDH      HDKK 364
CbFDH      HDKK 364
****

```

Şekil 4.5 *CdFDH*, *CbFDH* ve *CmFDH* proteinlerinin gösterdiği aminoasit dizi homolojisi

Şekil 4.6'da *CdFDH*'in blast sonucu elde edilen dizisi ile kristal yapısı bilinen *CmFDH* ve *CbFDH* ile sekonder yapı karşılaştırılması yapılmıştır. Kırmızı renk ile gösterilen bölgeler korunmuş bölgeleri ifade etmektedir. Fizikokimyasal yapıları %99'dan fazla benzerlik göstermektedir.

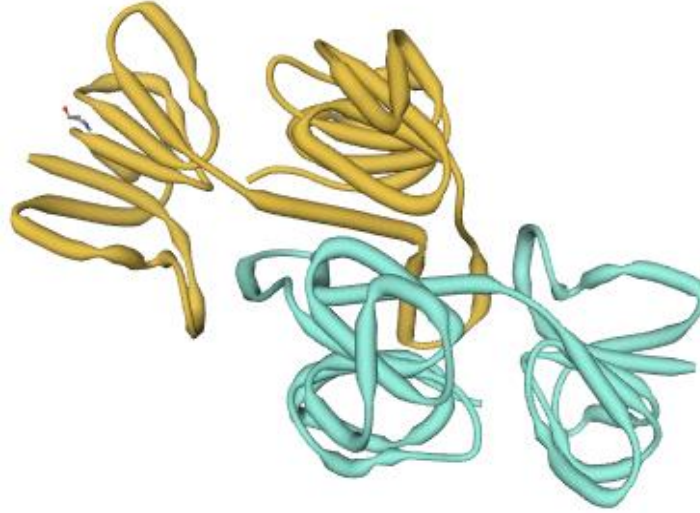


Şekil 4. 6 *CdFDH* dizisi ile kristal yapısı bilinen *CmFDH* ve *CbFDH* ile sekonder yapı karşılaştırılması.

4.6 3-B Homoloji Modelleme

CdFDH geni 364 amino asitten oluşan 38.65 kDa büyüklüğünde ve homo-dimerik bir protein kodlamaktadır. Rekombinant *CdFDH*'in 3-boyutlu yapısı için SWISS_MODEL homoloji modelleme aracılığı ile, 3 boyutlu yapısı bilinen ve %99,30 dizi benzerliği olan NAD^+ -bağımlı *Candida methylica* (*CmFDH*, pdb code: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) FDH'inin aminoasit dizisi kalıp olarak kullanılmıştır (Şekil 4.7).

CmFDH ile *CdFDH* arasındaki ~%99'luk dizi benzerliğinin yanı sıra elde edilen homoloji modelinin, hedef-kalıp eşleşme özelliklerine göre model kalitesini belirleyen "Global Model Quality Estimation" skoru 0.95 ve "Qualitative Model Energy Analysis"e dayanan QMEAN değeri ise 0.95'tür.

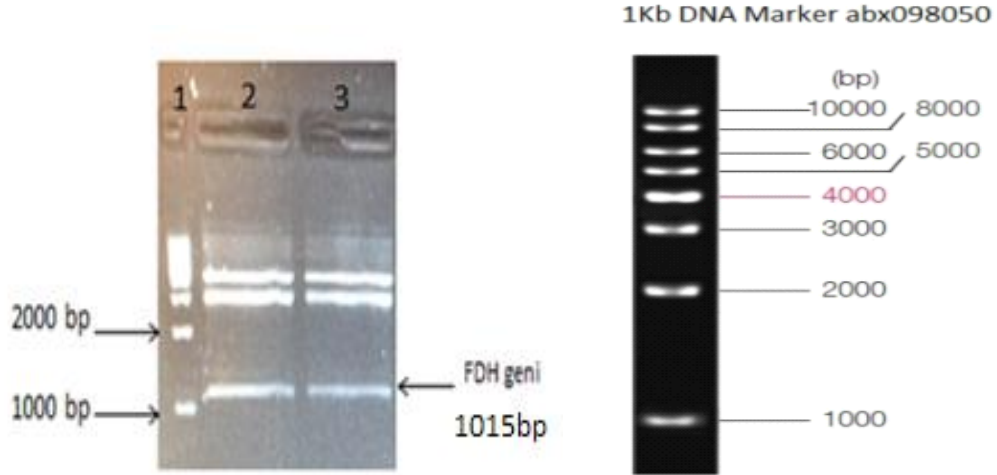


Şekil 4. 7 *CdFDH*'in SWISS homoloji modeli: Şablon olarak *CmFDH* (pdb kodu: 3NAQ_A, resolution 1.70Å) kullanılarak oluşturulan ve özdeş iki alt ünitenin gösterildiği *CdFDH*'in formu

4.7 *CdFDH* geninin Ekspresyon vektörüne klonlanması

Alt-klonlama işlemine dizi analizi ile *CdFDH* varlığı doğrulanan 17 numaralı koloni sıvı LB besiyerine ekilerek devam edilmiştir. 37°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra sonra EcoSpin Plasmid izolasyon kiti (ECO TECH) ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. pGEM-T vektöründe bulunan PZR ürününün pQE-2 vektöründe ekspresyonunu

sağlamak amacıyla CdFDH genini taşıyan pGEM-T plazmidi PstI ve SacI restriksiyon enzimleri ile 37°C’de 3,5 saat muamele edilerek kesilmiş ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesinin ardından (Şekil 4.8) CdFDH gen bölgesi olan ~1015 bp büyüklüğündeki bant jelden kesilerek izole edilmiştir. Jelden saflaştırma sonrası konsantrasyon Tablo 4.2’de gösterilmiştir.



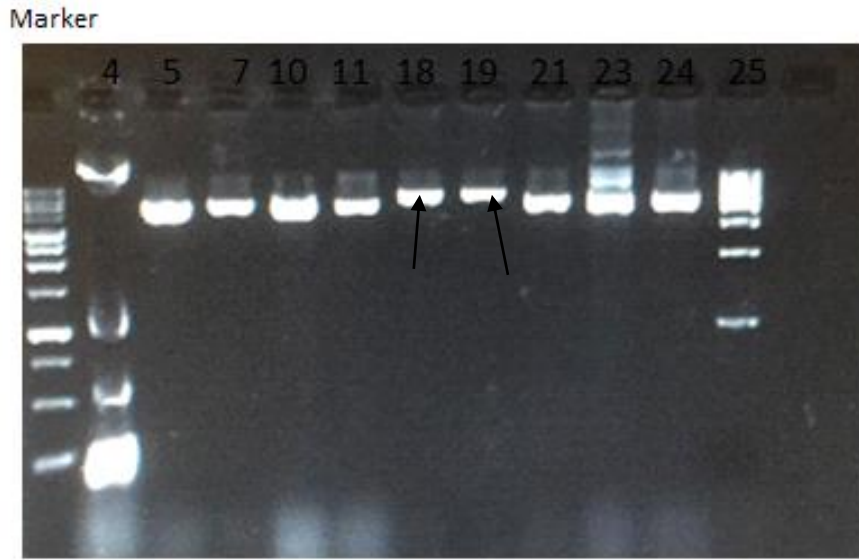
Şekil 4. 8 Restriksiyon enzim kesim sonrası jel elektroforezi UV görüntüsü 1.Marker 2.CdFDH geni 3.CdFDH geni

Tablo 4. 2 Konsantrasyon sonuçları

Konsantrasyon	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
22,01 ng/ul	1,62	0,48

CdFDH’in ekspresyon vektörü olarak kullanılacak pQE-2’ye aktarılabilmesi için -80°C’de saklanan pQE-2 vektörünü taşıyan hücre stoğu ampisilinli sıvı LB besiyerinde gece boyunca inkübe edilmiştir ve “EcoSpin Plasmid izolasyon kiti (ECO TECH)” ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. Nanodrop ile ölçümü yapılan pQE-2 vektörünün konsantrasyonu 1814 ng/μl, saflığı ise 1.85 çıkmıştır. Pürifiye edilen pQE-2 vektörünün SacI ve PstI restriksiyon enzimleri ile kesilen PZR ürünlerine bağlanabilmesi için aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından rekombinant CdFDH/pQE-2 vektörünü oluşturmak için ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon ile elde edilen pQE-2/CdFDH vektörü BL21 hücrelerine aktarılmıştır. Ampisilinli katı LB besiyerine ekimi yapılan hücreler

37°C'deki etüvde gece boyu inkübe edildikten sonra petride oluşan kolonilerinden 11 tanesi seçilerek ampisilinli sıvı LB besiyerinde 37°C ve 250 rpm'de yaklaşık 16 saat inkübe edilmiştir. Seçilip büyütülen kolonilerde hedef gen bölgesinin pQE-2 vektörüne girip girmediğinin anlaşılması için plazmid izolasyon sonrası SacI ile tek taraflı kesim gerçekleştirilmiştir. Kesim sonrası agaroz jel elektroforezinde *CdFDH* genini içerdiği düşünülen kolonilerin yaklaşık 5,854 bp olması beklenmiştir (Şekil 4.9). *Candida diddensiae* kaynaklı FDH gen bölgesinin pQE-2 vektörüne doğru bir şekilde yerleştiği SacI restriksiyon enzim kesimi ile anlaşılan iki koloni (18 ve 19 numaralı) dizinin doğrulanması ve genin vektöre okuma çerçevesine uygun konumda yerleştiğinin doğrulanması için dizi analizine gönderilmiştir.



Şekil 4. 9 pQE-2 /*CdFDH* vektörünü alan hücrelerin tespiti için yapılan restriksiyon enzim kesim sonrası jel elektroforezi

Pozitif sonuç veren 18 numaralı koloni seçilerek ekspresyon çalışmalarına devam edilmiştir. Ampisilinli katı LB agar üzerinde büyüyen 18 ve 19 numaralı koloniler ampisilinli sıvı LB besiyerinde gece boyunca büyütülmesinin ardından %20 oranında gliserol ile karıştırılarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır.

4.8 Protein Ekspresyonu

Dizi analizi ile doğrulama yapıldıktan sonra *CdFDH* genini içeren 18 numaralı koloni için protein ekspresyonunu tespit etmek amacıyla büyütülen hücreler lizis edilmesinin ardından sonikasyon yapılarak pellet ve supernatant olarak ayrılmış ve SDS-PAGE analizi ile beklenen büyüklükte protein bandının varlığı kontrol edilmiştir. Gen

ekspresyonu için gece boyu büyütülen 5 ml hacimde LB besiyerindeki kültür yapılmış, ertesi gün 100 ml ampisilinli sıvı TB besiyerine inoküle edilmiştir. Ampisilinli sıvı LB besiyerinde büyüyen bakterilerin OD₆₀₀ değeri 0.6'ya ulaştığında gen ekspresyonunu indüklemek üzere 1 mM IPTG eklenmiştir. IPTG, allolaktozun moleküler bir analogudur. Lac represörüne bağlanarak tetramerik represörün lac operatöründen ayrılmasını ve lac operonundaki genlerin transkript edilerek rekombinant proteinin eksprese edilmesine olanak sağlamaktadır. İndüksiyonu görmek için 37°C, 250 rpm'de 4 saat inkübe edildikten sonra sonike edilip 1,5 ml'lik örnek tüplerine 1 ml alınıp santrifüj edilerek süpernatant ve pelleti birbirinden ayırarak SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsünde sonikasyon sonrası pellette ve süpernatantta 38,65 kDa boyutunda beklenen yerde bant görülmüştür. *CdFDH* ekspresyonunun varlığı görüldükten sonra daha büyük hacimde kültür hazırlanmıştır. 500 ml ampisilinli TB besiyerinde indüklenen hücreler 24°C, 250 rpm'de 22 saat inkübe edildikten sonra saflaştırma öncesi 1 ml örnek kontrol amacıyla ayrılmıştır. Total protein profili için SDS-PAGE ile bakılmak üzere sonikasyon sonrası 1ml örnek de kontrol amacıyla ayrılmıştır. Kalan kültür protein saflaştırması için kullanılmıştır.

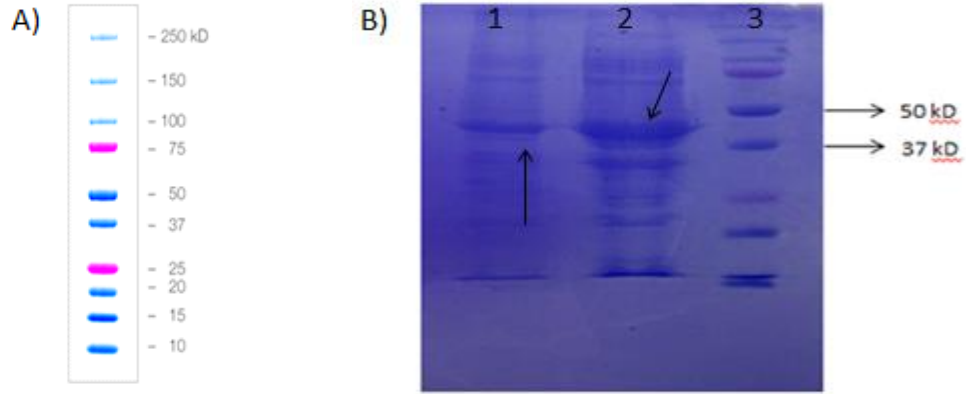
4.9 Rekombinant *CdFDH* Proteinin Saflaştırılması

Histidin kuyruklu *CdFDH* proteini nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) metal-afinite kromatografisi kullanılarak izole edilmiştir. pQE-2 vektöründe bulunan His-tag kodlama dizisi, rekombinant FDH proteininin N-terminalinde 6 tane histidin rezidüsü ile birlikte üretilmesini sağlamaktadır. Histidin, nitriloasetik asitle katı bir matrikse immobilize edilmiş nikel iyonlarının koordinasyon küresindeki boş kısımlarına güçlü bir afinite göstererek bağlanmaktadır. Rekombinant *CdFDH* proteininin bağlandığı kolondan doğal konformasyonunu kaybetmeden ayrılması için dikkatle çalışılmıştır. Elde edilen saf proteinin konsantrasyonu nanodrop ile A280'de 22 mg/ml olarak ölçülmüştür. Saf ürün, kaba özüt ile birlikte SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Saflaştırma adımları ve en son elde edilen proteinin saflığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir.

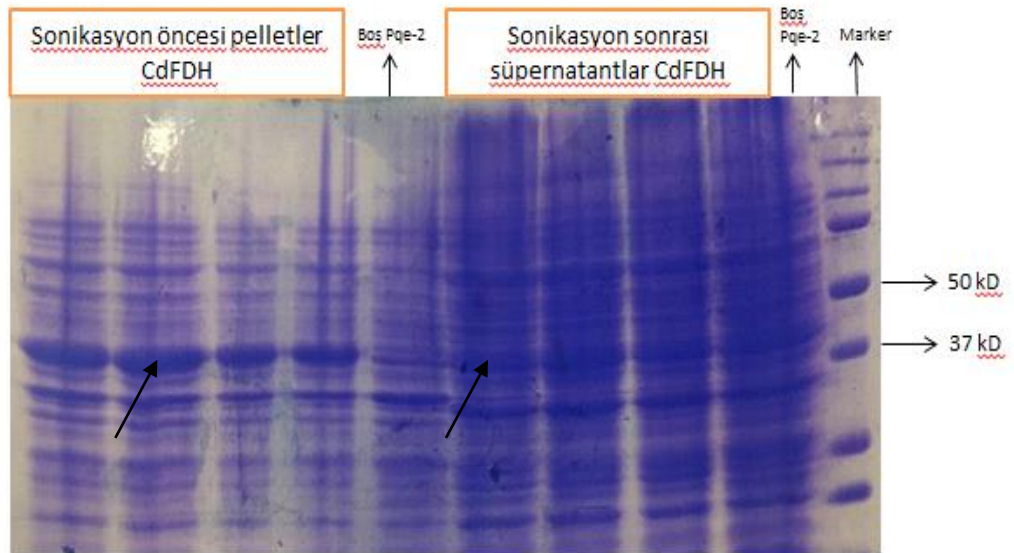
4.10 SDS-PAGE Analizi Bulguları

Protein ekspresyonu için IPTG ile indüklendikten 4 saat sonra sonikasyon sonrası pellet ve süpernatant SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Eksprese edilen rekombinant *CdFDH* proteinin beklenildiği üzere 38,65kDa bant vermiştir (Şekil 4.10). Bu yüzden daha

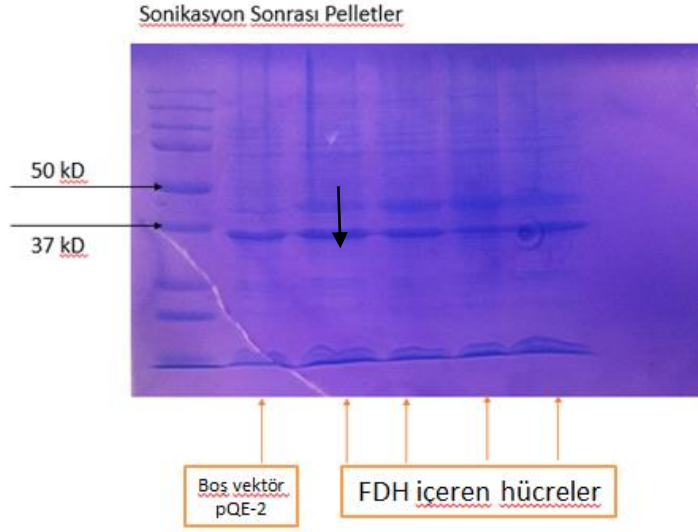
büyük hacimde hücrenin protein ekspresyonunu gerçekleştirmek için IPTG ile indüklendikten sonra 24°C’de 22 saat sonunda sonikasyon öncesi pellet, sonikasyon sonrası pellet ve süpernatantlar SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Ardından afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılan örnek hazırlanarak ayrı ayrı SDS-PAGE yapılmıştır (Şekil 4.13). Eksprese edilen rekombinant *CdFDH* proteinin beklenildiği üzere 38,65kDa bant verdiği, inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte üretiminin arttığı, pürifikasyon sonunda bir miktar kayıp yaşandığı görülmüştür



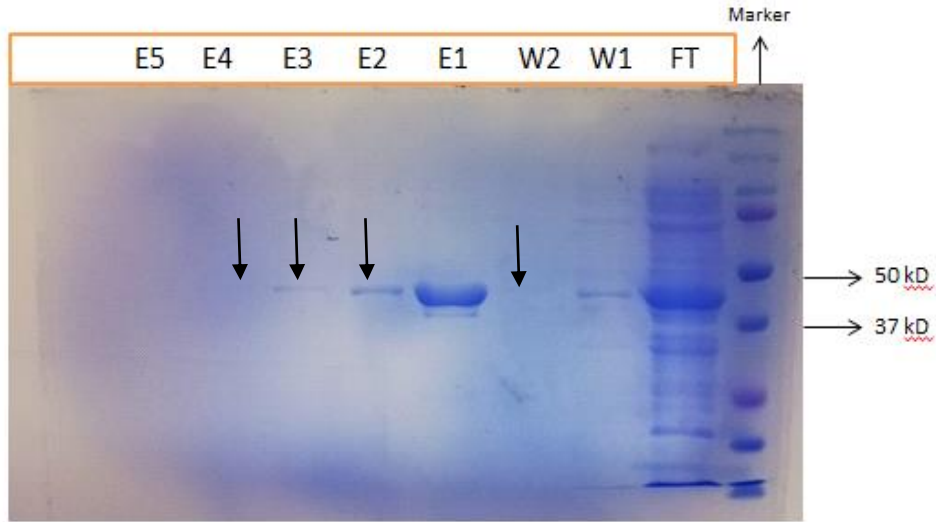
Şekil 4. 10 100 ml kültür ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu A)Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards B)*CdFDH* proteini SDS PAGE Jel Görüntüsü 1.Sonikasyon sonrası pellet 2.Sonikasyon sonrası süpernatant 3.Marker



Şekil 4. 11 500 ml hücre kültürü ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu sonucu SDS PAGE Jel Görüntüsü (Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards)



Şekil 4. 12 500 ml hücre kültürü ile gerçekleştirilen protein ekspresyonu sonucu SDS PAGE Jel Görüntüsü (Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards)

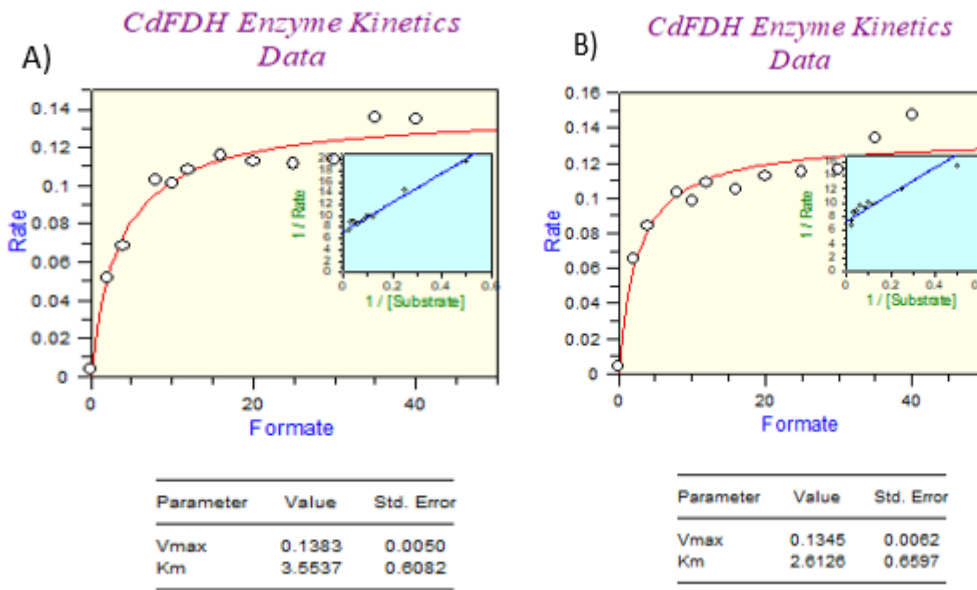


Şekil 4. 13 FDH proteini saflaştırma sonrası SDS PAGE Jel Görüntüsü (Marker: Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) (W: Yıkama tamponu, E: Elüsyon, FT: Flowthrough)

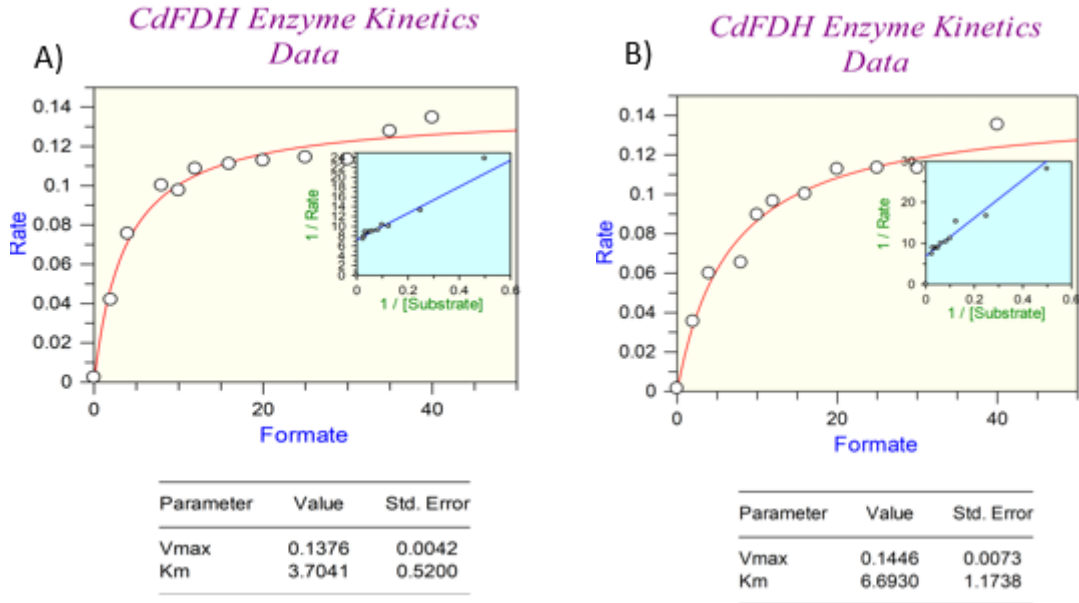
4.11 Enzim Aktivite Ölçümleri

Saflaştırma işleminden ortalama 3.685 mg/ml protein elde edilmiştir. Ultrafiltrasyon sonrası elde edilen *Cd*FDH proteinin aktivite varlığı kuvarz spektrofotometre kuvetinde

ölçülmüştür. NAD(P)H üretimi, 340 nm'de absorpsiyondaki artış takip ederek izlenmiştir. Ölçümlerde NAD(P)⁺ sabit tutulurken değişken olarak format kullanılmıştır. Koenzim olarak NAD⁺ kullanıldığında enzimin formata olan afinitesi ve enzim aktivitesi değişimi karşılaştırılmıştır. Aktivite ölçümünden elde edilen veriler “Grafit7 Kinetics Software” programı kullanılarak analiz edilmiş ve enzimlerin Km ve k_{cat} değerleri hesaplanmıştır. Yapılan tekrarlı çalışmalarda süpernatantta ölçülebilir bir aktivite ölçülmüştür. Aktivite grafikleri Şekil 4.14, 4.15'te ve aktivite değerleri Tablo 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 14 Rekombinant CdFDH proteinin A) potasyum fosfat pH 6 ve B) potasyum fosfat pH 7 aktivite sonuçları



Şekil 4. 15 Rekombinant *CdFDH* proteinin A) Tris pH 8 ve B) pH 9 aktivite sonuçları

Tablo 4. 3 Rekombinant *CdFDH*'in pH (6-9) aralığındaki aktivite değerleri

	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Km (mM)	3.5537±0.6082	2.6126±0.6597	3.7041±0.5200	6.6930±1.1738
k_{cat} (sn ⁻¹)	0.925	0.90	0.925	1
k_{cat}/K_m	0.26	0.34	0.25	0.15

4.12 Öneriler

Kiral bileşik sentezi biyoteknoloji alanında hızla büyüyen bir alandır. NAD(P)⁺-bağımlı format dehidrogenazlar ve redüktazlar, bu tür reaksiyonlar için en etkili biyokatalizörlerdir. Bu sürecin en önemli dezavantajı, NADH'nin ve özellikle NADPH'nin yüksek maliyetidir.[39] *E. coli*'nin rekombinant proteini toplam hücre proteininin %50'sine kadar biriktirdiği bilinmektedir.[55] Bu çok yüksek protein üretim kapasitesi nedeniyle, *E. coli*, tam hücre biyotransformasyonlarında en yaygın olarak kullanılan konakçı organizmadır.[56] Son on yıl içinde format dehidrogenaz özelliklerinin iyileştirilmesi ve rekombinant *E. coli* suşları ile büyük ölçekli üretimin

geliştirilmesi, hedef bileşiklerin toplam üretim maliyetinde FDH'nin maliyetini önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat bununla birlikte, FDH enziminin kiral olarak saf bileşiklerin büyük ölçekli üretiminde dezavantajlarla karşılaşmıştır.[57] Bu nedenle yeni NAD⁺-bağımlı FDH enzimi arayışları devam etmektedir. Bunların arasında, *Candida* cinsine ait mayaların sahip olduğu enzimlerin yüksek aktivite gösterdiği ve kararlı olduğu tespit edilmiştir. Ekstremofillerden elde edilen enzimlerin avantajları organik çözücüler, yüksek sıcaklık varlığında ve yüksek tuz konsantrasyonlarında işlevsel olmalıdır.[13] Bu nedenle endüstrinin zorlu sentez koşullarında yüksek verim ve kararlılık ile çalışabilecek yeni enzimlerin keşfi için ekstremofillere yönelim artmaktadır.

Tuzlu araziler ve kıyı arazilerinde yetiştirmek üzere tuza tolerans özelliklerinin tarımsal ekin bitkilerine aktarılması için *H. trueperi* SS1'in rekombinant genomik klonlarının tarandığı bir çalışmada *H. trueperi* SS1'den varsayılan çoklu ilaç taşıma ATP bağlama/geçirme proteinini kodlayan tuz tolerans geninin izolasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir.[58]

Bu çalışmada ilk defa yüksek tuzluluk ve asidik pH koşullarında çoğalan bir organizmadan elde edilen yeni bir FDH enzimi üzerine çalışılmıştır. pGEM-T vektörüne klonlanan CdFDH kodlayan gen dizisi ile veri tabanlarında bulunan *Candida methylica* FDH gen dizisi kıyaslandığında %99.08 oranında benzerlik görülmüştür. Çalışma kapsamında CdFDH enzimini kodlayan genin klonlanması, *E.coli*'de heterolog ekspresyonu ve afinite kromatografisi ile saflaştırma başarıyla gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık 38,65 kDa büyüklüğünde aktif bir enzim üretilmiştir. Ayrıca rekombinant enzimin biyokimyasal karakterizasyonu için *E.coli*'de bulunan CdFDH için aktivitenin varlığı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında başarıyla üretimi gerçekleştirilen rekombinant CdFDH'in gelecek çalışmalarda optimum sıcaklık, optimum pH değerleri, substrat spesifitesi, inhibitörler varlığında aktivite analizi ve organik solventler ve farklı tuzlar varlığında stabilitesinin araştırılması sonucunda farklı endüstriyel işlemlerdeki kullanılabilirliği değerlendirilebilecektir. Günümüzde ilaç şirketleri çoğunlukla gerçekleştirdikleri farmasötik bileşiklerin üretiminde ekonomik ve çevresel nedenlerden dolayı enzimatik kofaktör rejenerasyon yöntemlerini tercih etmektedir. FDH, farmasötik endüstrisinde optikçe aktif bileşiklerin üretimi sırasında ana reaksiyon için gereken kofaktörlerin geri dönüştürülmesini sağlayan ikinci enzim olarak kullanılmaktadır. HIV tedavisinde antiviral etkiye sahip Atazanavir (Bristol-Myers Squibb), sıtma tedavisinde antimalaryal etkiye sahip Amorphadiene (Sanofi ve Amyris), antiviral ajanlardan

rinovirüs proteaz inhibitörlerinin yapıtaşlarından (R)-3-(4-florofenil)-2-hidroksi propiyonat (Pfizer) ve farmasötik ürünlerde kiral ara ürün olarak kullanılan Trimetil L-lösin (Degussa) bileşiklerinin ticari üretiminde FDH tarafından katalizlenen NADH rejenerasyon yöntemi ile sistem içerisinde kofaktör dönüşümü sağlanmaktadır.^[59] Trikomonas vajiniti enfeksiyonunda, *T. vaginalis*'in ürettiği ve tanılama için önemli olan formik asit dolayısıyla format molekülünün saptanmasında, FDH enzimi aracılığıyla üretilen NADH ölçümünü baz alarak geliştirilmiştir ve tanılamada hızlı ve ekonomik bir yol olarak kullanılmaktadır.^[60]

Tartışma kısmına Ürettiğimiz rekombinant proteinin daha verimli hale nasıl getirebileceğini vurgulayacak cümle ekleyebilirsin demişlerdi. Yani total proteinin ne kadarı senin ürettiğin protein olmalı, bunu sağlamaya yönelik ne yapılabilir bunu tartışmaya ekleyebilirsin demişlerdi, uygun yere eklesen iyi olur.

Ayrıca endüstriyel olarak kullanılabilme potansiyeli taşıyan rekombinant CdFDH proteinin total protein içindeki miktarını arttırabilmek amacıyla ekspresyon koşullarının optimizasyonu ve yüksek hacimde kültür üretimi çalışmalarının yapılması da amaçlanmaktadır. Yüksek miktarda üretimi gerçekleştirilecek FDH proteininin substrat bağlanma veya koenzim bölgelerine protein mühendisliği ile yapılabilecek mutasyonlar sayesinde rekombinant protein veriminin artırılmasının da sağlanabileceği düşünülmektedir.

Biyoteknolojik uygulamalar kadar rutin laboratuvar uygulamalarında da kullanıma aday bir enzim olan *CdFDH*'in yerli kaynaklarla endüstriyel ölçekte üretiminin gerçekleştirilmesi durumunda ülke ekonomisine katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

- [1] V. Popov and V. Tishkov, ‘NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. From a model enzyme to a versatile biocatalyst’, *Protein Structures: Kaleidoscope of Structural Properties and Functions*, pp. 441–443, 2003.
- [2] M. S. Robescu *et al.*, ‘From the Amelioration of a NADP⁺-dependent Formate Dehydrogenase to the Discovery of a New Enzyme: Round Trip from Theory to Practice’, *ChemCatChem*, vol. 12, no. 9, pp. 2478–2487, 2020.
- [3] J. Ruupunen, ‘Catalytic mechanism for reduction of bicarbonate in the active site of formate dehydrogenase’, 2016, Accessed: Aug. 20, 2021.
- [4] A. Alissandratos, H.-K. Kim, and C. J. Easton, ‘Formate production through carbon dioxide hydrogenation with recombinant whole cell biocatalysts’, *Bioresour Technol*, vol. 164, pp. 7–11, Jul. 2014.
- [5] H. Choe, D. H. Cho, M. H. Kim, S. H. Lee, K. D. Jung, and Y. H. Kim, ‘Efficient CO₂-reducing activity of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for formate production from CO₂ gas’, *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e103111, 2014.
- [6] T. Hartmann and S. Leimkühler, ‘The oxygen-tolerant and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is able to catalyze the reduction of CO₂ to formate’, *FEBS J*, vol. 280, no. 23, pp. 6083–6096, Dec. 2013.
- [7] G. Özgün, N. G. Karagüler, O. Turunen, N. J. Turner, and B. Binay, ‘Characterization of a new acidic NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*’, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. C, no. 122, pp. 212–217, 2015.
- [8] C. Hinteregger and F. Streichsbier, ‘Halomonassp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water’, *Biotechnology Letters*, vol. 19, no. 11, pp. 1099–1102, Nov. 1997.
- [9] T. Maskow and S. Kleinstuber, ‘Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol’, *Extremophiles*, vol. 8, no. 2, pp. 133–141, Apr. 2004.
- [10] M. Banat, R. S. Makkar, and S. S. Cameotra, ‘Potential commercial applications of microbial surfactants’, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 53, no. 5, pp. 495–508, May 2000.
- [11] Sharma, Y. Kawarabayasi, and T. Satyanarayana, ‘Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications’, *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, Nov. 2011.
- [12] İ. Yaşa, Ö. Kahraman, E. Tekin, and A. Koçyiğit, ‘Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu.’, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 25, no. 2, Art. no. 2, Jun. 2008.
- [13] D. C. Demirjian, F. Morís-Varas, and C. S. Cassidy, ‘Enzymes from extremophiles’, *Curr Opin Chem Biol*, vol. 5, no. 2, pp. 144–151, Apr. 2001.

- [14] R. U. Haque, F. Paradisi, and T. Allers, 'Haloferax volcanii as immobilised whole cell biocatalyst: new applications for halophilic systems', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, no. 9, pp. 3807–3817, May 2019.
- [15] D. Alsafadi, S. Alsalman, and F. Paradisi, 'Extreme halophilic alcohol dehydrogenase mediated highly efficient syntheses of enantiopure aromatic alcohols', *Organic and Biomolecular Chemistry*, Oct. 2017.
- [16] D. Delille, A. Bassères, and A. Dessommes, 'Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater', *Polar Biol*, vol. 19, no. 4, pp. 237–241, Mar. 1998.
- [17] R. Margesin and F. Schinner, 'Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology', *Extremophiles*, vol. 5, no. 2, pp. 73–83, Apr. 2001.
- [18] D. M. Ward and T. D. Brock, 'Hydrocarbon Biodegradation in Hypersaline Environments', *Appl Environ Microbiol*, vol. 35, no. 2, pp. 353–359, Feb. 1978.
- [19] S. Zvyagintseva, S. S. Belyaev, I. A. Borzenkov, N. A. Kostrikina, E. I. Milekhina, and M. V. Ivanov, 'Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field', *Microbiology (New York)*, vol. 64, no. 1, Jan. 1995, Accessed: Aug. 20, 2021
- [20] E. B. Ordu, G. Cameron, A. R. Clarke, and N. G. Karagüler, 'Kinetic and thermodynamic properties of the folding and assembly of formate dehydrogenase', *FEBS Letters*, vol. 583, no. 17, pp. 2887–2892, 2009.
- [21] W. Hummel and M.-R. Kula, 'Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds', *European Journal of Biochemistry*, vol. 184, no. 1, pp. 1–13, 1989.
- [22] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, and M. R. Kula, 'Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, No. 12, Pages 2789-2802 (1981)', *Biotechnol Bioeng*, vol. 67, no. 6, pp. 791–804, Mar. 2000.
- [23] V. O. Popov and V. S. Lamzin, 'NAD(+)-dependent formate dehydrogenase', *Biochem J*, vol. 301 (Pt 3), pp. 625–643, Aug. 1994.
- [24] V. I. Tishkov and V. O. Popov, 'Protein engineering of formate dehydrogenase', *Biomol Eng*, vol. 23, no. 2–3, pp. 89–110, Jun. 2006.
- [25] V. I. Tishkov, A. G. Galkin, G. N. Marchenko, Y. D. Tsygankov, and A. M. Egorov, 'Formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101: gene cloning and expression in *Escherichia coli*', *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 18, no. 2, pp. 201–207, Oct. 1993.
- [26] Galkin, L. Kulakova, V. Tishkov, N. Esaki, and K. Soda, 'Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 44, no. 3–4, pp. 479–483, Dec. 1995.
- [27] Hollenberg, C.P. and Janowicz, Z. (1989) European Patent Application EP 0 299 108 A1, Bulletin 89/03.
- [28] S. J. Allen and J. J. Holbrook, 'Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the

- methylotrophic yeast *Candida methylca*', *Gene*, vol. 162, no. 1, pp. 99–104, Aug. 1995.
- [29] Y. Sakai, A. P. Murdanoto, T. Konishi, A. Iwamatsu, and N. Kato, 'Regulation of the formate dehydrogenase gene, FDH1, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an FDH1-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline', *J Bacteriol*, vol. 179, no. 14, pp. 4480–4485, Jul. 1997.
- [30] J. A. Saleeba, C. S. Cobbett, and M. J. Hynes, 'Characterization of the amdA-regulated *aciA* gene of *Aspergillus nidulans*', *Molec. Gen. Genet.*, vol. 235, no. 2, pp. 349–358, Nov. 1992.
- [31] C. M. Chow and U. L. RajBhandary, 'Developmental regulation of the gene for formate dehydrogenase in *Neurospora crassa*', *Journal of Bacteriology*, vol. 175, no. 12, pp. 3703–3709, Jun. 1993.
- [32] C. C. des Francs-Small, F. Ambard-Bretteville, I. D. Small, and R. Remy, 'Identification of a Major Soluble Protein in Mitochondria from Nonphotosynthetic Tissues as NAD-Dependent Formate Dehydrogenase', *Plant Physiology*, vol. 102, no. 4, pp. 1171–1177, Aug. 1993.
- [33] K. Suzuki *et al.*, 'Formate Dehydrogenase, an Enzyme of Anaerobic Metabolism, Is induced by Iron Deficiency in Barley Roots', *Plant Physiol*, vol. 116, no. 2, pp. 725–732, Feb. 1998.
- [34] G. Kurt-Gür and E. Ordu, 'Characterization of a novel thermotolerant NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from hot climate plant cotton (*Gossypium hirsutum* L.)', *3 Biotech*, vol. 8, no. 3, p. 175, Mar. 2018.
- [35] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmeyer, and B. Bühler, 'Enzyme-mediated oxidations for the chemist', *Green Chemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 226–265, 2011.
- [36] T. Quinto, V. Köhler, and T. Ward, 'Recent Trends in Biomimetic NADH Regeneration', *Topics in Catalysis*, vol. 57, pp. 321–331, Mar. 2013.
- [37] M. Poizat, I. W. C. E. Arends, and F. Hollmann, 'On the nature of mutual inactivation between [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺ and enzymes – analysis and potential remedies', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 63, no. 3–4, pp. 149–156, May 2010.
- [38] X. Wang, T. Saba, H. H. P. Yiu, R. F. Howe, J. A. Anderson, and J. Shi, 'Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways', *Chem*, vol. 2, no. 5, pp. 621–654, May 2017.
- [39] L. Wang and R. Yang, 'Molecular hydrogen and spillover hydrogen storage on high surface area carbon sorbents', *Carbon*, vol. 50, Aug. 2012.
- [40] R. K. Singh, R. Kumar, and D. P. Singh, 'Graphene oxide: strategies for synthesis, reduction and frontier applications', *RSC Adv.*, vol. 6, no. 69, pp. 64993–65011, Jul. 2016.
- [41] Y. Jong Suk. "Formic Acid as a Viable Hydrogen Storage Material". Stanford University, 2013.

- [42] Tsujisho, M. Toyoda, and Y. Amao, 'Photochemical and enzymatic synthesis of formic acid from CO₂ with chlorophyll and dehydrogenase system', *Catalysis Communications*, vol. 3, no. 7, pp. 173–176, 2006.
- [43] A. Alissandratos, H.-K. Kim, and C. J. Easton, 'Formate production through biocatalysis', *Bioengineered*, vol. 4, no. 5, pp. 348–350, Oct. 2013.
- [44] A. Andreadeli, D. Platis, V. Tishkov, V. Popov, and N. E. Labrou, 'Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺', *FEBS J*, vol. 275, no. 15, pp. 3859–3869, Aug. 2008.
- [45] E. B. Ordu, R. B. Sessions, A. R. Clarke, and N. G. Karagüler, 'Effect of surface electrostatic interactions on the stability and folding of formate dehydrogenase from *Candida methylica*', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 95, pp. 23–28, Nov. 2013.
- [46] W. Wu, D. Zhu, and L. Hua, 'Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida bodinii* creating effective NADP⁺-dependent FDH enzymes', *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, vol. 61, pp. 157–161, Dec. 2009.
- [47] Andreadeli *et al.*, 'Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1794, no. 6, pp. 976–984, Jun. 2009.
- [48] T. Alekseeva, V. Prevot, M. Sancelme, C. Forano, and P. Besse-Hoggan, 'Enhancing atrazine biodegradation by *Pseudomonas* sp. strain ADP adsorption to Layered Double Hydroxide bionanocomposites', *Journal of Hazardous Materials*, vol. 191, no. 1, pp. 126–135, Jul. 2011.
- [49] S. Fogal, E. Beneventi, L. Cendron, and E. Bergantino, 'Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 22, pp. 9541–9554, Nov. 2015.
- [50] E. G. Sadykhov *et al.*, '[A comparative study of the thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants]', *Prikl Biokhim Mikrobiol*, vol. 42, no. 3, pp. 269–273, Jun. 2006.
- [51] S. Harju, H. Fedosyuk, and K. R. Peterson, 'Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab', *BMC Biotechnol*, vol. 4, p. 8, Apr. 2004.
- [52] M. Zou, B. Guo, and S. He, 'The Roles and Evolutionary Patterns of Intronless Genes in Deuterostomes', *Comparative and Functional Genomics*, vol. 2011, p. e680673, Aug. 2011.
- [53] H. Slusarczyk, S. Felber, M. R. Kula, and M. Pohl, 'Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues', *Eur J Biochem*, vol. 267, no. 5, pp. 1280–1289, Mar. 2000.
- [54] S. Demirci-Duarte, S. Arikan-Akdagli, and D. Gülmez, 'Species distribution,azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years', *Mycoses*, vol. 64, no. 8, pp. 823–830, 2021.

- [55] F. Baneyx, 'Recombinant protein expression in Escherichia coli', *Curr Opin Biotechnol*, vol. 10, no. 5, pp. 411–421, Oct. 1999.
- [56] K. Mädje, K. Schmölzer, B. Nidetzky, and R. Kratzer, 'Host cell and expression engineering for development of an E. coli ketoreductase catalyst: Enhancement of formate dehydrogenase activity for regeneration of NADH', *MicrobCell Fact*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, 2012, Accessed: Aug. 20, 2021.
- [57] N. G. Karagüler, R. B. Sessions, B. Binay, E. B. Ordu, and A. R. Clarke, 'Protein engineering applications of industrially exploitable enzymes: Geobacillus stearothermophilus LDH and Candida methylica FDH', *Biochem Soc Trans*, vol. 35, no. Pt 6, pp. 1610–1615, Dec. 2007.
- [58] S. Gupta, P. Sharma, K. Dev, and A. Sourirajan, 'Isolation of gene conferring salt tolerance from halophilic bacteria of Lunsu, Himachal Pradesh, India', *J Genet Eng Biotechnol*, vol. 18, no. 1, p. 57, Oct. 2020.
- [59] P. Gunasekaran, S.N., Ashok Pandey (2016). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier.
- [60] Miller, C.A. (1993). European Patent No. EP0556685 (A2) Retrieved from <https://www.google.com/patents/EP0556685A2?cl=en>

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] Ö. Başsaraç, G. Kurt-Gür, and E. Ordu, 'Halofilik bir *Candida* türünden NAD(P)⁺-bağımlı Format Dehidrogenaz Klonlanması', *3. Ulusal Proteomik Kongresi*, p. 25, 2020.