

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CHAETOMIUM THERMOPHILUM FORMAT
DEHİDROGENAZ ENZİMİ ÜZERİNE HIS-TAG UZANTISININ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HACER ESEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CHAETOMIUM THERMOPHILUM
FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ
ÜZERİNE HIS-TAG UZANTISININ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HACER ESEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BARIŞ BİNAY

GEBZE
2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HIS-
TAG EXTENSION ON CHAETOMIUM
THERMOPHILUM FORMAT
DEHYDROGENASE ENZYME**

HACER ESEN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. BARIŞ BİNAY

GEBZE

2022

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13.01.2022 tarih ve 2022/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/01/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hacer ESEN'in tez çalışması Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :Doç. Dr. Barış BİNAY

ÜYE

:Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem TAŞDELEN YÜCEDAĞ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Özlem YALÇIN ÇAPAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Enzimleri istenen miktarlarda elde etmek ve fonksiyonlarını incelemek için çeşitli protein ifade sistemleri kullanılabilir. Polihistidin etiketi eklemek, endüstriyel uygulamalar için FDH'ler gibi çeşitli enzimleri elde etmenin yararlı bir yoludur. *Chaetomium thermophilum*'dan (CtFDH) elde edilmiş olan NAD⁺ bağımlı format dehidrogenaz, NAD⁺'nın NADH'ye indirgenmesiyle birlikte formatın ve karbondioksit'e dönüştürülmesi için kullanılır. Bu çalışma, N-terminal Histidin etiketli CtFDH (N-CtFDH) ve C-terminal Histidin etiketli CtFDH (C-CtFDH)'ın, Histidin etiketinin konumunun enzimin etkinliği ve kinetik parametreleri üzerindeki etkisini öğrenmek için yapılmıştır. İlgili proteinlerin çözünürlüğü, etiket konumundan etkilenmemiş, ancak N-terminal bölgesindeki Histidin etiketi, spesifik aktivitede ve enzimin kinetik yeteneğinde bozulmaya neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar, enzimin C terminalinin polihistidin etiketi için uygun bölge olduğunu göstermiştir. C-CtFDH yaklaşık olarak N-CtFDH'den üç kat daha büyük özgül aktivite ve iki kat daha yüksek katalitik verimliliğe sahiptir. Sonuçlar, CtFDH'nin N-terminal veya C-terminal ucuna bir Histidin etiketinin eklenmesinin protein üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu proteinin amino ucunun CtFDH'nin fonksiyonu için çok önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Chaetomium thermophilum*, format dehidrogenaz, N- veya C-terminal, His etiketi pozisyonu, katalitik özellik, çözünürlük.

SUMMARY

Several protein expression systems can be used to get enzymes in required quantities and study their functions. Incorporating a polyhistidine tag is a beneficial way of getting various enzymes such as FDHs for industrial applications. The NAD^+ dependent formate dehydrogenase from *Chaetomium thermophilum* (CtFDH) can be utilized for interconversion of formate to carbon dioxide coupled with the conversion of NAD^+ to NADH. In this study, N-terminal His tagged CtFDH (N-CtFDH) and C-terminal His tagged CtFDH (C-CtFDH) was constructed to learn the effect of His tag location on the activity and kinetic parameters of enzyme. The solubility of proteins was not affected by tag position, however, an interference on N-terminal region caused to a deterioration in specific activity and kinetic ability of enzyme. The obtained results indicated that the C-terminus of enzyme is appropriate region for tag engineering. The C-CtFDH has approx. three fold larger specific activity and two fold higher catalytic efficiency than N-CtFDH. The results suggest that insertion of a His-tag at the N-terminal or C-terminal end of CtFDH has different effects on the protein and the N-terminal fragment of protein is crucial for function of CtFDH.

Keywords: *Chaetomium thermophilum*, formate dehydrogenase, N- or C-terminal, His- tag position, catalytic property, solubility.

TEŞEKKÜR

Tez konusunu öneren, bu çalışmayı yapabilmem için gerekli olan tüm olanakları sağlayan, her türlü yardımları ile beni destekleyen, güler yüzünü, bilgi ve tecrübelerini esirgemeksizin bana yardımcı olan ve yanında çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam Doç. Dr. Barış BİNAY'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmama olan desteğinden dolayı TÜBİTAK(Proje no:214Z292) projesine teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana destek olan Gebze Teknik Üniversitesi GETM Laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her zaman desteklerini gördüğüm sevgili annem, babam ve eşim başta olmak üzere ailemin tüm fertlerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	2
1.1. Enzimlerin Sınıflandırılmaları	2
2. FORMAT DEHİDROJENAZ ENZİMİ	4
2.1. Dehidrogenazlar	4
2.2. Format Dehidrogenaz Enziminin Genel Özellikleri	4
2.3. NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Yapısal Özellikleri	5
2.4. NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Katalitik Özellikleri	6
2.5. NAD ⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Pratikteki Uygulamaları	6
2.5.1. Kofaktör Yenilenmesi	6
2.5.2. CO ₂ Miktarının Düşürülmesi	7
2.5.3. Metanol Zehirlenmesi Tespitinde Kullanımı	8
2.5.4. Böbrek Taşı Saptanmasında Kullanımı	8
2.5.5. <i>Trichomonas Vaginalis</i> Kaynaklı Vajinitis Teşhisi	8
2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi	9
2.6.1. Genel Olarak Rekombinant DNA Teknolojisi	9
2.6.1.1. His-Tag Etkisi	9
2.7. Gen Kopyalanması	11
2.8. Protein Saflaştırması	11
3. MATERYAL ve METOD	13
3.1. Materyal	13

3.1.1. Laboratuvar Ekipmanları	13
3.1.2. Kimyasallar, Ticari Kitler ve Enzimler	14
3.1.3. Mikroorganizmalar ve Rekombinant Plazmitler	15
3.1.4. Protein Belirteci	15
3.1.5. Tamponlar ve Çözeltiler	16
3.1.5.1. Besiyeri Çözeltileri	16
3.1.5.1.1. LB Agar Besiyeri Hazırlama	16
3.1.5.1.2. LB Broth Besiyeri Hazırlama	16
3.1.5.1.3. Ampisilin Stok Çözeltisi Hazırlama	16
3.1.5.1.4. Otoindüksiyon için Besiyeri Hazırlama	16
3.1.5.2. Protein Saflaştırma Tamponları	17
3.1.5.3. Enzim Aktivite Tamponları	17
3.1.5.3.1. Sodyum Asetat Hazırlanışı	17
3.1.5.3.2. NAD ⁺ Tampon Çözeltileri	17
3.1.5.3.2. Sodyum Format Tampon Çözeltileri	18
3.2. Metod	18
3.2.1. Rekombinant Plazmitlerin Yapısı	18
3.2.2. <i>Chaetomium Thermophilum</i> FDH Enziminin <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu	18
3.2.3. Plazmit İzolasyonu	19
3.2.4. CtFDH'lerin <i>E. Coli</i> 'de İfade Edilmesi	20
3.2.5. Metal Afinite Kromatografisi yoluyla CtFDH'lerin Saflaştırılması	21
3.2.6. Enzim Aktivitesi ve Kinetik Deneyler	22
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	24
4.1. Rekombinant Plazmitlerin Yapısı	24
4.2. Proteinlerin İfade Edilmesi ve Saflaştırılması	24
4.3. Etiket Pozisyonunun CtFDH'nin Katalitik Özellikleri Üzerine Etkisi	25
4.4. Sonuçlar	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	37
EKLER	38

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	: Santigrat derece
k _{cat}	: Turnover sayısı; birim zamanda bir enzimin tek bir aktif bölgesi tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısı
K _m	: Substrat afinitesi
pH	: Asitlik ya da bazlık derecesi
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Millimolar
C	: Karbon
CO ₂	: Karbon Dioksit
dH ₂ O	: Damıtılmış saf su
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
HCl	: Hidroklorik Asit
NaCl	: Sodyum klorür
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAD (P) ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaPi	: Sodyum Fosfat
nm	: Nanometre

OD	:	Optik Yoğunluk
sn	:	Saniye
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
APS	:	Amonyum persülfat
ATP	:	Adenozin trifosfat
BCA	:	Bicinchoninic Asit
C-CtFDH	:	C terminal Histidin etiketli <i>Chaetomium thermophilum</i> Format Dehidrogenaz
Ct	:	<i>Chaetomium thermophilum</i>
CtFDH	:	<i>Chaetomium thermophilum</i> Format Dehidrogenaz
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotit
FDA	:	Amerika Birleşik Devletleri'nin Gıda ve İlaç İdaresi
FDH	:	Format Dehidrogenaz
FMN	:	Flavin mononükleotit
His	:	Histidin
His-tag	:	Histidin etiketi
IPTG	:	İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
LB	:	Luria bertani
MtFDH	:	<i>Myceliophthora thermophila</i> Format Dehidrogenaz
N-CtFDH	:	N terminal Histidin etiketli <i>Chaetomium thermophilum</i> Format Dehidrogenaz
Ni-NTA	:	Nikel-nitriloasetik asit
PMSF	:	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
RNA	:	Ribonükleik asit
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodecil Sulfat-Poliakrilamid Jel
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
U	:	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: NAD^+ bağımlı format dehidrogenaz tepkimesi.	4
3.1: Protein belirtecinin jeldeki görüntüsü.	16
3.2: Konakçı hücre <i>E. Coli</i> NEB® 5 α ' e transforme edilen N-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.	19
3.3: Konakçı hücre <i>E. Coli</i> BL21 (DE3)'e transforme edilen N-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.	20
3.4: Konakçı hücre <i>E. Coli</i> BL21 (DE3)'e transforme edilen C-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.	21
3.5: Saflaştırılmış N-CtFDH'in SDS PAGE'de gösterimi.	22
3.6: Saflaştırılmış C-CtFDH'in SDS PAGE'de gösterimi.	22
4.1: <i>Candida boidinii</i> FDH'nin yapısı ile üst üste CtFDH'nin türdeşlik modeli. a) CtFDH monomeri, b) öngörülen substrat bağlanma bölgesi.	26
4.2: N-CtFDH enzimi için Format yönünde Michaelis Menten eğrisi.	27
4.3: N-CtFDH enzimi için NAD^+ yönünde Michaelis Menten eğrisi.	27
4.4: C-CtFDH enzimi için Format yönünde Michaelis Menten eğrisi.	27
4.5: C-CtFDH enzimi için NAD^+ yönünde Michaelis Menten eğrisi.	28

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kullanılan cihazların listesi.	13
3.2: Kullanılan kimyasallar, ticari kitler ve enzimlerin listesi.	14
4.1: N-CtFDH ve C-CtFDH enzimlerine ait kinetik parametreler.	25



1. GİRİŞ

Rekombinant proteinlerin üretimi, biyoteknolojik uygulamalar için esastır. Bu proteinler araştırmalarda kullanılmaları ve faydalı olmaları için yüksek miktarda ifade edilmeli ve saflaştırılmalıdır. Pek çok rekombinant protein, saflaştırma için proteinin N veya C terminaline özgül bir dizinin (veya etiketinin) eklenmesiyle modifiye edilebilir [1]. Glutasyon S-transferaz, FLAG-etiketi, maltoz bağlayıcı protein, Strep-etiketi, S-etiketi, tioredoksin ve Histidin (His) etiketleri bilinen etiketlerden bazılarıdır [2]. Bunların arasında His-etiketleri, düşük moleküler ağırlıklarından dolayı yaygın olarak kullanılır [3].

Polihistidin etiketi tipik olarak ardışık 6 Histidin'den oluşur, ancak bu sayı 2 ile 10 arasında değişebilir. Histidin'de ki imidazol halkası, Cu^{+2} , CO^{+2} , Ni^{+2} veya Zn^{+2} gibi matrikse immobilize metal iyonları ile bağlar oluşturarak protein saflaştırmasını kolaylaştırır [2]. Kullanımları, hücre lisatlarından protein eldesini arttırmada faydalı olmuştur. Bazı durumlarda, bu etiketler yalnızca protein saflaştırmasını kolaylaştırmakla kalmayabilir, aynı zamanda protein ifadesini, katlanmasını veya çözünürlüğünü de indükleyebilir [4]. His etiketlerinin avantajları olmasına rağmen, bu uzantılar protein konformasyonunu bozmak, aktiviteyi ve enzimlerin stabilitesini azaltmak gibi istenmeyen bazı sonuçlara neden olabilir [5]-[7].

Format dehidrogenaz, NAD^{+} 'nin NADH 'ye indirgenmesiyle birlikte formatın CO_2 'e dönüşümünü katalize eden bir oksidoredüktazdır. Bu enzimler, farklı endüstrilerdeki çeşitli biyoteknolojik uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir. FDH, farmasötik endüstrisinde, 6-hidroksibispiron (Buspiron'un ana metaboliti, anksiyete / depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaç), -N-boc-adamantan glisin, (Saxagliptin'in dikkat çekici bir bileşeni, tip 2 diabetes mellitus ilacı) [8]-[10] gibi kiral ara maddelerin enzimatik sentezinde pahalı kofaktörler (NAD (P) H) için bir geri dönüşüm aracı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, sera gazlarını azaltmak için kullanılabilir. FDH, metanol zehirlenmesi, nefrolitiazis ve patojenik protozoanların teşhisi gibi farklı tıbbi uygulamalarda bir format algılayıcısı olarak kullanılabilir [11]-[14].

1.1. Enzimler

Enzimler biyolojik mekanizmalardaki katalizörlerdir ve canlı organizmalardaki tüm metabolik olaylardan sorumludurlar. Metabolik kimyasal tepkimelerin özgülüğünü ve hızını yaklaşık 12 kat artırırlar. Enzimlerin çoğu protein yapısında olmasına rağmen, bunların küçük bir grubu ribozimler gibi katalitik RNA'dır. Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül, kuaterner yapı içeren protein yapısındaki konformasyon katalitik aktivitelerini etkiler. Bazı faktörler enzimlerin katalitik aktivitesini etkileyebilir. Örneğin, enzimler sıcaklık, pH vb. ile bozunmuş veya alt ünitelerine ayrılmışsa, işlevlerini kaybedebilirler. Ek olarak, enzimler kendilerini oluşturan aminoasitlere parçalandığında, etkinlikleri de olumsuz yönde etkilenebilir [15].

Herhangi bir yan gruba ihtiyaç duymayan bazı enzimler tek başlarına çalışabilirken, diğerleri Fe^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} gibi kofaktör olarak adlandırılan veya biyositin, koenzim A gibi koenzimler adı verilen organik moleküllere ihtiyaç duyar. Koenzimler ve kofaktörler enzimlere sıkıca bağlanabilir veya kovalent bağlar oluşturabilir. Metal iyonuna koenzime bağlandığında katalitik olarak aktif olan enzime, holoenzim denir. Holoenzimlerde bulunan protein yapılarına apoenzim veya apoprotein denir. Enzimlerin substratlarını nasıl bağladığını açıklayan iki model vardır. Bunlardan ilki, enzim ve substratın tamamlayıcı bölgelerinin yardımı ile birbirine bağlandığını iddia eden “kilit ve anahtar” modelidir. Bu model, 1894 yılında Emil Fischer tarafından önerilmiştir. Ancak, bugünlerde, 1958’de Daniel E. Koshland tarafından keşfedilen “indüklenmiş uyum modeli, 1958’de “kilit ve anahtar” modelinden çok daha fazla tercih edilmektedir. Bu model, bir substrat, enzimlerin spesifik aktif bölgelerine bağlandığında, aktif bölgenin konformasyonunun değişeceğini ve daha sonra enzimin substratı kapsayacağını ileri sürer [15].

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılmaları

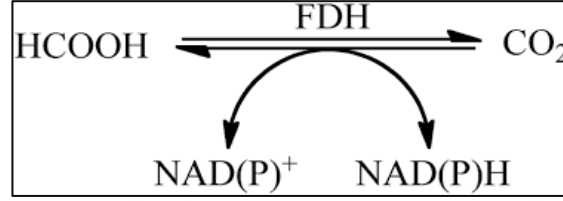
Uluslararası Biyokimya Derneğinin enzim komisyonunca kabul olunan esaslara göre enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflar:

- Oksidoredüktazlar: Oksidasyon redüksiyon tepkimelerini katalize eden enzimler.
- Transferazlar: Grup transferi tepkimelerini katalize eden enzimler.
- Hidrolazlar: Hidrolitik tepkimeleri katalize eden enzimler.
- Liyazlar: Çifte bağlara grup ekleyen veya bunlardan grup ayıran enzimler.
- İzomerazlar: İzomerizasyon tepkimelerini katalize eden enzimler.
- Ligazlar: ATP veya diğer fosfatlardan yararlanarak, bunlardaki pirofosfat bağının parçalanması sonucu iki molekül arasındaki yeni bağların meydana gelmesine olanak sağlayan enzimler şeklindedir [16], [17].



2. FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ

Format dehidrogenaz, oksidoredüktaz ailesine ait bir enzimdir. NAD^+ bağımlı format dehidrogenaz (EC 1.2.1.2, FDH) enzimi, format iyonlarını CO_2 'e yükseltgeyip aynı zamanda NAD (P)^+ molekülünü NAD (P)H formuna indirgeyen değerli bir enzimdir [18] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: NAD^+ bağımlı format dehidrogenaz tepkimesi.

2.1. Dehidrogenazlar

Dehidrogenazlar organizmada oksidasyon-indirgeme mekanizmasını katalize eden oksidoredüktazın alt sınıfıdır. Bu tip enzimler, enzimatik tepkimelerde NAD^+ , NAD (P)^+ , FAD, FMN kofaktörleri kullanır [18].

2.2. Format Dehidrogenaz Enziminin Genel Özellikleri

FDH'ler D- özgü 2-hidroksi asit dehidrogenazlar süper familyasına aittir. Doğada, üç tip FDH bulunur. Birinci tip FDH'ler, karmaşık bir kuaterner yapıya sahip heterooligomerler içeren ark ve anaerobik mikroorganizmalardan elde edilir. Bu tip FDH'ler ayrıca yüksek moleküler ağırlığa sahiptir ve aktif bölgelerinde demir-kükürt kümeleri, molibden, tungsten iyonları gibi bazı prostetik grupların varlığı ile tarif edilebilir. Ayrıca, oksijene karşı çok fazla duyarlılık gösterirler [19]. Kompleks NAD^+ bağımlı format dehidrogenazlar, ikinci tip FDH'lerdir ve ayrıca molibden, demir ve selenyum gibi ağır metallere ihtiyaç duyarlar. Üçüncüsü en basit olanıdır ve NAD^+ bağımlı FDH olarak adlandırılır. Bu enzim grubu iki aktif bölgeye sahiptir ve ayrıca yapılarında metal iyonları veya prostetik gruplar içermezler [19]. NAD^+ bağımlı FDH'ler, format anyonunun karbon dioksit oksidasyonunun katalizlenmesi açısından çok önemlidir. Aynı zamanda, maya ve bakteri hücrelerinde C_1

bileşiklerinin katabolizmasının son aşamasında meydana gelen NAD^+ 'ın NADH 'e indirgenmesini gerçekleştirilirler [20]. 1921'de, ilk önce *Phaseolus vulgaris* adı verilen bir tesiste format dehidrogenaz bulundu [21]. İlk olarak 1951'de Davison, bezelye ve fasulye tohumlarında etanol, süksinat ve glutamat ile NADH oluşumu üzerine çalıştı [22]. 1970'lerin başında, FDH enzimleri maya, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalarda çalışıldı. FDH'lerin mikroorganizmalar ve bitkiler üzerinde önemli bir rolü vardır. Biyosentezi arttırılmış bitkilerde FDH'ler mitokondride stres altındaki koşullarda bulunurken, metanol kullanan bakteri ve maya gibi mikroorganizmada FDH'ler farklı özellikler gösterebilir. Patojenik bakteri ve mantarlarda FDH, stres proteini olarak bulunur [20]. FDH'nin önemli bir avantajı, %100 verim elde etmeyi sağlayan geri dönüşümsüz tepkimeleri katalizlemesidir. FDH'lar, 6 ila 9 arasında değişen farklı pH aralığında en verimli şekilde çalışılabilirler [23].

2.3. NAD^+ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Yapısal Özellikleri

NAD^+ bağımlı FDH'ler herhangi bir prostetik veya metal iyonu içermez. Ökaryotik organizmalar ve bazı metilotrofik bakteriler de enzimin moleküler kütlesi 70 kDa ila 100 kDa arasında değişmektedir [20]. NAD^+ bağımlı FDH'ler genellikle homodimerler oluşturur ve iki kimyasal olarak özdeş alt birimden oluşur ve FDH'ler hem format hem de NAD^+ 'a karşı oldukça özgüdür. Alt birimler, " NAD^+ bağlayıcı etki alanı" ve "katalitik etki alanı" olmak üzere iki alandan oluşmaktadır [23]. Tüm FDH'ler iki gruba ayrılabilir; Bakterilerden ve bitkilerden elde edilen FDH'ler birinci gruptur ve maya ve mantarlardan elde edilen FDH'ler diğer gruptur. Aynı grubun enzimleri arasındaki türdeşlik yaklaşık %80-85'dir ve farklı gruplardan iki enzim arasında %50-55 daha fazladır [24]. Özellikle, substrat ve koenzimin bağlandığı ve katalitik aktivitenin meydana geldiği amino asit kalıntıları, evrimsel dönemden beri büyük ölçüde korunmaktadır. Popov [24], kalıntıların Fenilalanin 98, İzolözin 122, Asparajin 146, Alanin / Glisin 198, Glisin 200, Glisin 203, Arginin 284, Glutamin 313 ve Histidin 332'nin katalitik olarak önemli olduğunu göstermiştir.

2.4. NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Katalitik Özellikleri

Genellikle, kinetik olarak sınıflandırılmış FDH'ler NAD⁺'nın ilk substrat olduğu Bi-Bi iki-substrat kinetik şeması sırasını izler. Hem substrat hem de ko-enzim bölgeleri önceden mevcuttur ve substratlardan birinin bağlanması, diğerinin afinitesini 3,5 kat artırır. FDH çeşitli organizmalarda benzer kinetik özellikler gösterir, tüm enzimler format (3-10 mM) ve NAD⁺ (35-90 µM) için benzer K_m değerlerine sahiptir ve rekombinant FDH'ler doğal enzimlerden biraz farklıdır. NAD⁺'ya bağımlı FDH'lerin çoğunluğu NAD⁺'a oldukça spesifiktir ve sadece NAD (P)⁺'yi koenzim olarak kullanmayan bir psödomonas istisnası dışında FDH çift koenzim özgüllüğü sergiler ve NAD (P)⁺'ya karşı yüksek aktivite gösterir. FDH'ler tepkimeleri 6.0 ve 9.0 arasındaki pH değerlerinde katalize edebilirler. FDH oldukça geniş bir pH aralığında çalışabilse de, yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmeye açıktır [20]- [24].

2.5. NAD⁺ Bağımlı Format Dehidrogenaz Enziminin Pratikteki Uygulamaları

2.5.1. Kofaktör Yenilenmesi

Optik olarak aktif bileşikler, kimya ve ilaç endüstrisi için çok önemlidir. Bununla birlikte, FDA'ya göre, ilaç olarak kullanılan tüm kiral bileşiklerin optik saflığı %99'dan fazla olmalıdır. Bu sebeple, ilaç endüstrisindeki enzim uygulamaları artmaktadır. Oksidoredüktazlar, özellikle dehidrogenazlar, kiral olmayan bileşiklerden optik olarak aktif bileşikler üretmek için kullanılabilir çünkü dehidrogenaz substrat ve koenzim arasında hidrit iyonunun transferinde son derece stereospesifiktir. Bu nedenle, bu enzimler çok yüksek optik saflığa sahip (%99.9-99.99) aktif bileşiklerin üretimi için umut vaat etmektedir. Ancak, dehidrogenazlar, pahalı koenzimlerin NAD (P)H (> 12.000 ABD Doları / kg) yenilenmesi sebebiyle kullanılmaktadır. Bu nedenle, azalan nikotinamid koenzimlerinin (NAD (P)H) yenilenmesi kimya endüstrisinde kiral bileşiklerin sentezi için çok önemli hale gelmiştir. Bu koenzimlerin yüksek maliyeti nedeniyle, indirgenmiş (NAD (P)H) koenzimlerin yenilenmesi için kimyasal, elektrokimyasal, fotokimyasal ve enzimatik

yöntemler gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Koenzim yenilenmesi için format, glikoz ve fosfit dehidrogenaz sistemleri uygulanmıştır. Enzimatik NAD (P)H yenilenmesi için format dehidrogenaz avantajları nedeniyle en uygun yenilenme sistemdir [25]. NAD (P)H yenilenmesinde FDH, tepkimede ki bütün kriterleri sağlar;

- FDH ile tepkime, ana tepkimenin kayması için termodinamik basınç sağlayan tepkimenin geri dönüşümsüzlüğü nedeniyle nihai ürünün %99-100'ünü verir.
- FDH geniş bir pH (6.0 - 9.0) aralığının da katalitik aktivite sergiler, bu nedenle FDH bu aralıkta en uygun aktiviteye sahip olan herhangi bir dehidrogenaz ile birlikte kullanılabilir.
- Tepkimenin substratı (format iyonu) nispeten ucuzdur ve tepkime ürünü, CO₂, tepkime karışımından kolayca çıkarılabilir ve nihai ürünün saflaştırılmasını engellemez.
- Çeşitli kaynaklardan elde edilen FDH'ler oldukça kararlı enzimlerdir ve sistemde uzun süre kullanılabilir.
- FDH'ler ucuzdur, ayrıca metilotrofik bakteri veya mayalardan, nispeten düşük üretim maliyeti ile yüksek ölçekli bir enzim üretimi sağlanabilir.

FDH tarafından katalizlenen tepkime, NADH yenilenme sistemi için uygundur. Bununla birlikte, doğal olarak oluşan tüm FDH'ler NAD⁺ 'a oldukça özgüdür. Diğer yandan, NAD (P)H yenilenmesi kimya endüstrisi için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, koenzim özgüllüğü'nü (NAD (P)⁺ ve NAD⁺) değiştirmek amacıyla FDH çok önemli hale gelmiştir [23],[24], [26]-[28].

2.5.2. CO₂ Miktarının Düşürülmesi

CO₂'den format üretimi, CO₂'in sera etkisini ortadan kaldırır ve bunun sonucunda değerli bir kimyasal hammadde olan formatın üretimini sağlar. FDH'lerin CO₂ azaltımını katalize etme potansiyeli vardır, ancak bunlar genellikle ters tepkimeyi, yani format oksidasyonunu tercih ederler. Öte yandan, asetojenlerden elde edilen FDH'lerin tercihen CO₂'in azaltılmasını katalize ettiği bulunmuştur [29], [30].

2.5.3. Metanol Zehirlenmesi Tespitinde Kullanımı

Metanol insan vücudunda karaciğerde alkol dehidrogenaz tarafından formaldehite yükseltgenir. Oluşan formaldehit, formaldehit dehidrogenaz tarafından hızla formik asite dönüşür [31]. Formik asit, format ve bir hidrojen iyonuna ayrılır. FDH enziminin varlığında ortamda bulunan format iyonu NAD^+ 'yi indirger. Üretilen NADH miktarı örnekte bulunan formik asit miktarıyla orantılı olduğundan zehirlenme kolaylıkla anlaşılabilmektedir [32], [33].

2.5.4. Böbrek Taşı Saptanmasında Kullanımı

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre böbrek taşına neden olan ve en sık karşılaşılan taş tipi kalsiyum okzalat taşlarıdır [34]. İdrardaki okzalatın tespiti için standart olarak okzalat oksidaz ve okzalat dekarboksilaz enzimleri kullanılmaktadır. Okzalat, okzalat oksidaz enziminin katalizlediği tepkimeyle formata dönüşür. Sonrasında format FDH enzimi ile NAD^+ tarafından yükseltgenir. Parçalanmış okzalatın oluşturduğu formatın yükseltgenmesi ile artan NADH'nin absorpsiyonu ölçülerek okzalat analizi yapılır [35]. Bu yöntemle idrardan kolaylıkla böbrek taşı tespiti yapılabilmektedir.

2.5.5. *Trichomonas Vaginalis* Kaynaklı Vajinitis Teşhisi

Trichomonas vaginalis, cinsel yolla aktarılan tedavi edilebilir bir enfeksiyon çeşididir. Yapılan çalışmalarda *Trichomonas vaginalis*'in son ürün olarak çok miktarda formik asit ürettiği görülmüştür. *Trikomonas vaginalis*, vajinal örnekteki format ile belirlenebilmektedir. Geliştirilen bu yöntem, FDH'nin hastadaki örnekte bulunan format iyonlarını CO_2 'e yükseltgeyip aynı zamanda NAD^+ molekülünü NADH formuna indirgermesi sonucunda oluşan NADH nitel ya da nicel olarak saptanmasına veya ölçülmesine dayanmaktadır. Hızlı ve basit bir yöntem olmasının yanında, formatın tespiti için canlı hücrelere ihtiyaç duyulmaması ve FDH enziminin aktivitesinin örnekte bulunan diğer maddelerden etkilenmemesi bu yöntemin önemli avantajlarından [4]. FDH enziminin söz konusu uygulamalarda daha verimli kullanılabilmesi için rekombinant DNA teknolojisinin avantajlarını kullanmak gerekmektedir.

2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi

2.6.1. Genel Olarak Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, farklı DNA moleküllerinin farklı biyolojik türlerden kesilmesini ve genetik mühendislik teknolojisi ile bir araya getirilmesini içeren bir teknolojidir. Farklı türlerden moleküller birleştirilerek oluşturulan DNA moleküllerine rekombinant DNA denir. Endonükleaz analizleri, DNA dizilimi ve yönlendirilmiş evrim çalışmaları gibi genetik analizler rekombinant DNA üzerinde yapılabilir. Bu teknolojinin bilimsel temeli, doğada görülen çeşitliliğin önemli nedenlerinden biri olan rekombinasyon olarak adlandırılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi, bir gen veya DNA dizisi ayırımı, nükleotit dizisini tanımlamayı, transkriptlerini incelemeyi, onu oldukça özgül şekillerde değişimi ve uyarlanmış DNA'yı canlı bir organizmaya tekrar yerleştirmeyi mümkün kılar [36]. Bu teknolojiye bir diğer uygulamada kopyalanacak genin başına 6 tane Histidin kodlayacak kodonun eklenmesidir.

2.6.1.1. His-Tag Etkisi

His-tag ifade sistemleri His-etiketlerinin molekül ağırlığı düşük olduğundan yaygın olarak kullanılır ve bağlandığı protein yapısını ve fonksiyonlarını etkilemez. His-etiketini proteinden ayırmaya gerek yoktur. Dahası, His-etiketli füzyon proteinleri Ni-NTA afinite reçinesi ile kolayca saflaştırılabilir [3].

Chen ve ark. [37] yaptıkları çalışmalarda His etiketinin katalitik verim üzerinde bazı olumsuz etkileri olduğunu ve ayrıca, Kondroitinaz ABC I enziminin termostabilitesini 30 °C ve 35 °C'de iken arttırdığını ve 40 °C ve 45 °C'de ise azalttığını gözlemlemişlerdir.

Yeon ve ark. [38] C ve N-terminal His-etiketlerinin 3 hydroxybutyrate dehydrogenase enziminin kinetik parametreleri üzerine yaptıkları araştırmada N-terminal His-etiketli enzimin katalitik veriminin, C-terminal His-etiketli enzimin katalitik veriminden 1200 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Horchani ve ark. [39] yaptıkları çalışmada, N-terminalinde bir His-etiketi bulunan rekombinant *Staphylococcus aureus* lipaz 'ı *E. coli*'ye ifade etmişler ve his etiketli lipazın tributirin hidrolizi için doğal lipaza göre daha düşük bir özgül

aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. N-terminal His etiketinin eklenmesinin sipesifik aktiviteyi olumsuz etkilemesinin dışında zincir uzunluğu seçiciliği ve termostabiliteyi de olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Alpdağtaş ve ark. [40] yaptıkları çalışmada FDH enzimine eklenen N-terminal His etiketinin enzimin çözünürlüğü ve aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda da, His etiketli *Staphylococcus xylosus* lipaz, *E. coli*'de ifade edilmiş, elde edilen bulgular doğal lipazla karşılaştırıldığında kinetik parametrelerin, stereoselektivitesinin, regioselektivitenin ve termostabilitenin değiştiği gözlemlenmiştir [41], [42]. Genel olarak literatürde Histidin etiketinin eklenmesinin hedef proteinin biyokimyasal özelliklerinde;

- Protein verimini arttırdığı [43],[44],
- Proteolizi önlediği [45],
- Proteinin yeniden katlanmasını kolaylaştırdığı [46],
- Füzyon proteinin antijenliğini koruduğu [47],
- Çözünürlüğü arttırdığı [48]-[51] gibi pozitif etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir.

Öte yandan, His etiketi eklemenin,

- Protein konformasyonunda değişiklik [52],
- Düşük protein verimleri [53],
- Enzim aktivitesinin inhibisyonu[54], [55],
- Biyolojik aktivitede değişiklik [56],
- Yapısal çalışmalarda istenmeyen esneklik [57],
- Toksisite [58].

gibi hedef proteinin biyokimyasal özellikleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir.

2.7. Gen Kopyalanması

Moleküler kopyalama, rekombinant DNA moleküllerini bir araya getirmek ve bu moleküllerin konak organizmalarda çoğaltılmasını sağlamak için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Kopyalama, aynı genetik materyale sahip bir hücre topluluğunu üretmek için bir DNA molekülünün kopyasını yapma işlemidir. Moleküler kopyalama genellikle iki farklı türden DNA moleküllerini kullanır: kopyalanacak DNA molekülünün kaynağı olan türler ve kopyalanmış DNA'nın replikasyonu için canlı konak olarak kullanılacak türler. Moleküler kopyalama adımları aşağıdaki gibidir:

- Konak organizma ve uygun vektör seçimi
- Kopyalanacak DNA'ya ve vektöre kesim endonükleazları ile muamele.
- DNA molekülünü ve vektörü ligazlar ile birlikte bağlama
- Rekombinant DNA'nın konak organizmaya transformasyonu.
- Rekombinant DNA içeren organizmaların antibiyotik direnci vb. ile seçimi.
- İstenilen transforme edilmiş DNA uçlarının ayrılması [36].

2.8. Protein Saflaştırması

Protein saflaştırması genellikle bir veya daha fazla proteinin diğer protein ve protein olmayan kısımların karışımından izole edilmesini amaçlayan bir işlemdir. Protein saflaştırması, bir protein fonksiyonunun karakterizasyonu, yapı ve diğer moleküllerle etkileşimi anlamak için çok önemlidir. Proteinler; proteinin boyut, bağlanma afinitesi ve fiziko-kimyasal özelliklerinin farklılıklarına göre ayrılabilir. Protein saflaştırması için kullanılan yöntemler aşağıdaki gibidir:

- Kromatografi teknikleri: immünoafinite, hidrofobik etkileşim, afinite ve iyon değişimi; yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- Metal bağlama-Polihistidin-etiketi

Afinite etiketlerinin kullanımı, saflaştırma işlemi basitleştirerek rekombinant proteinlerin saflaştırılmasını sağlar. Bu yöntem, afinite kromatografisine dayanır.

Nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) saflaştırma sistemi, 6 adet histidin etiketi taşıyan proteinlere olağanüstü bir seçicilik ve afiniteye sahiptir. İmidazol, Histidinin yan zincirinin bir parçasıdır. Protein saflaştırması için imidazol Ni^{+2} atomlarına bağlanmadan sorumludur. Yüksek konsantrasyonlar da serbest imidazol kullanılması, Histidin imidazol halkasının bağlanmasını geride bırakmaktadır [36].

His-etiketleri sıklıkla rekombinant NAD^+ bağımlı FDH'lerin ifadesi için kullanılır, ancak His etiketinin FDH'nin fonksiyonu ve yapısı üzerindeki etkisi genellikle teorik seviyede kalır. Bu nedenle, bu çalışmada His-tag pozisyonunun *CtFDH* aktivitesi ve kinetik değerleri üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. Bu amaçla, N-terminusunda veya C-terminusunda 6 His-etiketi içeren bir rekombinant FDH olan *CtFDH* için iki farklı His-tag ifade sistemi ayrı ayrı Genscript tarafından oluşturulmuştur. Daha sonra bu rekombinant plazmitler, protein ifadesi için kullanılmıştır. His-tag konumunun, N-terminal His-etiketli *CtFDH*'in katalitik aktivitesi ve çözünürlüğü üzerindeki etkisi, C-terminalinde etiket içeren ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Sonuçlar, His etiketinin pozisyonunun, enzimin uygun şekilde çalışması için önemli olduğunu ve *CtFDH*'nin N-terminal bölgesinde bir etkileşimin, aktivitede azalmaya ve kinetik değerlerin bozulmasına neden olabileceğini göstermiştir.

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Laboratuvar Ekipmanları

Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1’ dedir.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Marka
Otomatik pipetler	Eppendorf
Ultra saf su cihazı	Milli-Q®
Otoklav	Vertical
Analitik terazi	And
Santrifüj	Allegra, Rotina
Vorteks	VWR
Buzdolabı(+4 °C)	Vestel
Isıtıcı blok	Stuart
Derin dondurucu (-80 °C)	Arctiko
pH metre	Hanna Instruments
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	İka
Su banyosu	Stuart
Orbital çalkalayıcı	Stuart
İnkübatörlü çalkalayıcı	N-Biotek
Etüv	Nüve
Sonikatör	Bandelin
SDS-Page Elektroforez sistemi	Bio- Rad
Mikroplaka absorbans okuyucusu	Biotek

3.1.2. Kimyasallar, Ticari Kitler ve Enzimler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, ticari kitler ve enzimlerin listesi Tablo 3.2' de yer almaktadır.

Tablo 3.2: Kullanılan kimyasallar, ticari kitler ve enzimlerin listesi.

Adı	Marka
Imidazol	Sigma-Aldrich
LB-Agar	LAB M
LB-Broth	LAB M
NAD ⁺	Sigma-Aldrich
SDS-PAGE Jeli	CBS Scientific
APS	Fisher Bioreagents
TEMED	Sigma-Aldrich
Brilliant blue	Fisher Bioreagents
Bis Akrilamid	Fisher Bioreagents
Betamercaptoethanol	Alfa Aesar
Sodyum klorür	İsolab
Sodyum Format	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibazik	Fisher Scientific
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	Millipore Corporation
Di- Sodyum hidrojen fosfat	Millipore Corporation
Tris-Bazı	Fisher Bioreagents
İsopropoanol	Fisher Bioreagents
αD laktoz monohidrat	Acros organis
Potasyum fosfat monobazik	Fisher Bioreagents
Tripton	LAB M
Dekstroz	LAB M

Tablo 3.2: Devam.

Adı	Marka
Asetik asit	Sigma-Aldrich
Gliserol	Fisher Bioreagents
PMSF	Sigma-Aldrich
Lizozim	Serva
Ampisilin	Serva
Maya ekstraktı	Multicell
Sodyum asetat	Multicell
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich
Plasmit izolasyon kiti	Macherey- Nagel
BCA Assay Kit	Thermo Scientific
Filtreler	Sartorius
Konsantratörler	Sartorius
Ni- NTA His-trap sütunu	GE Healthcare Life Sciences

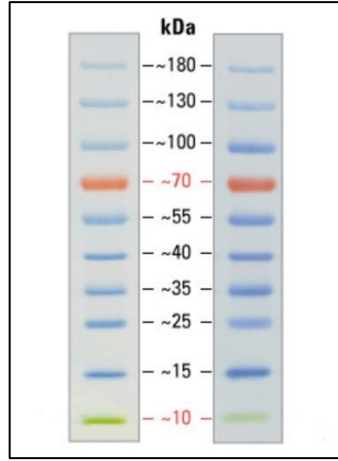
3.1.3. Mikroorganizmalar ve Rekombinant Plazmitler

Rekombinant plazmitler, Genscript'ten satın alınmıştır.

- *Escherichia coli* NEB®5α kompetan hücreleri (New England Biolabs) kopyalama konakçısı,
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücreleri (New England Biolabs) protein ifade konakçısı olarak kullanılmıştır.

3.1.4. Protein Belirteci

Protein belirteci olarak “Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#26616)” kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Protein belirtecinin jeldeki görüntüsü.

3.1.5. Tamponlar ve Çözeltiler

3.1.5.1. Besiyeri Çözeltileri

3.1.5.1.1. LB Agar Besiyeri Hazırlama

4 g LB Agar 100 ml distile suda çözüldü. 121 °C’de 20 dk otoklavlandı.

3.1.5.1.2. LB Broth Besiyeri Hazırlama

25 g LB broth 1 L distile cözüldü.121 °C’de 20 dk otoklavlandı.

3.1.5.1.3. Ampisilin Stok Çözeltisi Hazırlama

0.5 g ampisilin 5 mL distile suda çözüldü. Filtreden geçirilerek 1’er mL’lik hacimlere ayrılarak -20 °C’de depolandı.

3.1.5.1.4. Otoindüksiyon için Besiyeri Hazırlama

1 Lt suda,5 g yeast ekstrakt, 20 g tripton, 5 g Sodyum Klorür, 6.67 g Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat, 3 g Potasyum Fosfat Monobasic, 0,5 g Dekstroz, 6.87 mL %87 lik Gliserol, 3.16 g Alfa D Laktoz Monohidrat çözüldü. 121 °C’de 20 dk otoklavlandı.

3.1.5.2. Protein Saflaştırma Tamponları

Proteinlerin saflaştırılması, HisTrap protein saflaştırma kolonları kullanılarak yapıldı. Tamponlar ve içerikleri aşağıda verilmiştir:

- Tampon A: 2.76 g $\text{NaH}_2\text{P}_0_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM), 29.22 g NaCl (500 mM) ve 2.04 g İmidazol (30 mM), 1 L dH_2O içerisinde çözündürüldü ve pH, NaOH kullanılarak 7.4' e sabitlendi.
- Tampon B: 2.76 g $\text{NaH}_2\text{P}_0_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM), 29.22 g NaCl (500 mM) ve 34.04 g İmidazol (500 mM) 1 L dH_2O içinde çözölmüş ve pH NaOH kullanılarak 7.4' e sabitlenmiştir.
- 100 mM İmidazol (50 mL) ile Tampon A: 42.55 mL Tampon A ve 7.45 mL Tampon B karıştırıldı.
- 200 mM İmidazol (50 mL) ile Tampon A: 31.9 mL Tampon A ve 18.1 mL Tampon B karıştırıldı.
- 400 mM İmidazol (50 mL) ile Tampon A: 10.6 mL Tampon A ve 39.4 mL Tampon B karıştırıldı.

3.1.5.3. Enzim Aktivite Tamponları

3.1.5.3.1. Sodyum Asetat Hazırlanışı

2.72 g Sodyum asetat (20 mM) 1 L distile suda özölerek Asetic Asit kullanılarak pH 5'e sabitlendi.

3.1.5.3.2. NAD^+ Tampon özeltileri

Özgöl aktivite için 10 mM NAD^+ hazırlandı. Kinetik ölçümleri için; Sodyum Format yönü için 4 mM NAD, NAD yönü için sırasıyla 0.1-0.2-0.3-0.4-0.5-0.6-0.7-0.8-1-2-3-4-5-6-7-8 mM NAD^+ hazırlandı.

3.1.5.3.2. Sodyum Format Tampon Çözeltileri

Özgül aktivite için 200 mM Sodyum Format hazırlandı. Kinetik ölçümleri için; Format yönü için sırasıyla 0.5-1-2-2.5-3-3.5-4-5-10-15-20-25-30-35-40 mM Sodyum format, NAD yönü için 40 mM Sodyum Format hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Rekombinant Plazmitlerin Yapısı

Chaetomium thermophilum kaynaklı *fdh* geni (DSM 1495, GenBank Erişim Numarası EGS17433.1) amino asit sekansına (UniProt erişim numarası: G0SGU4) göre Genscript tarafından kodon optimizasyonu yapılarak sentezlenmiştir. Ardından, yaklaşık 1.1 kb *fdh* geni, *Pst*I ve *Xho*I kopyalama bölgeleri arasında pET45b (+) vektörüne yerleştirilmiş ve N-terminal His etiketli CtFDH (N-CtFDH) elde edilmiştir. Daha sonra, C-terminal His etiketli CtFDH (C-CtFDH) eldesi için kesim bölgeleri *Nco*I ve *Xho*I olarak belirlenmiştir. Bu işlemlerin her ikisi de ayrı ayrı Genscript tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. *Chaetomium thermophilum* FDH Enziminin *E.coli*'ye Transformasyonu

CtFDH içeren plasmit, *E. coli* nin NEB® 5α kompetent hücrelerine transforme edilmesi için 80 °C de muhafaza edilen kompetent hücre alınmıştır. Buz kovalanında 5 dk bekletilerek tavlama işlemi yapılmıştır. DNA'lar santifurüjden geçirilerek 5 dk beklemiş olan kompetent hücrelere 1.5 µl eklenmiştir. 30 dk boyunca buz içerisinde bekletilmiş sonrasında 42 sn boyunca 42 °C'de sıcak su banyosuna bırakılmış ve ardından 5 dk buzda bekletilmiştir. 5 dk buzda bekletme işleminden sonra her bir kompetent hücrenin üzerine 250 µl LB Broth eklenmiştir. 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde bir saat kuluçkaya bırakılıp kuluçka sonrasında LB agar +ampisilin (100 µg/mL) ile petriler hazırlanmıştır. 1 saat sonunda çalkalamalı inkübatörden alınan hücrelerden 150 µl alınarak petrilere dökülmüş ve cam boncukla yayma işlemi yapılmıştır. Petriler 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 16 saat kuluçkaya bırakılmıştır.



Şekil 3.2: Konakçı hücre *E. Coli* NEB® 5α'e transforme edilen N-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.

3.2.3. Plazmit İzolasyonu

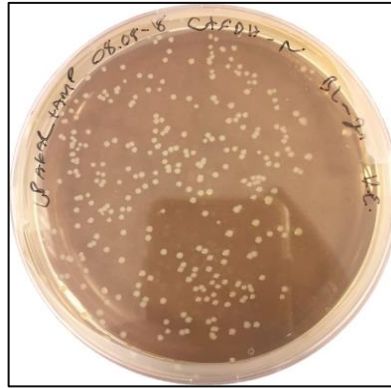
İnkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden bir tanesi seçilip ampicilin (100 µg/mL) içeren 10 mL LB medium içerisinde 24 saat kuluçkaya bırakılmıştır. Dibe çöken tortudan Macherey Nagel Nucleo Spin Plasmid kitiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır. Kit protokolüne göre izolasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Kültür ortamından alınan hücreler, oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant kısım atılmıştır.
- Geride kalan pellet üzerine 250 µL "Nucleo Spin Plasmid A1 Resuspend Buffer" eklenip askıya alma işlemi yapılmıştır.
- Karışımın üzerine 250 µL "Nucleo Spin Plasmid A2 Lysis Buffer" eklenmiş karıştırılıp, 5dk inkübe edilmiştir.
- Karışımın üzerine 300 µL "Nucleo Spin Plasmid A3 Neutralization Buffer" eklenmiş 15000 rpmde 5 dk santrifüjden geçirilmiştir. "Nucleo Spin Plasmid Column" kolonuna transfer edilen karışım, oda sıcaklığında 15000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolonun üzerine 500 µL "Nucleo Spin Plasmid A4 Wash Buffer" eklenip oda sıcaklığında 15000 rpm'de 2 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolon oda sıcaklığında 14000 rpm'de 2 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.

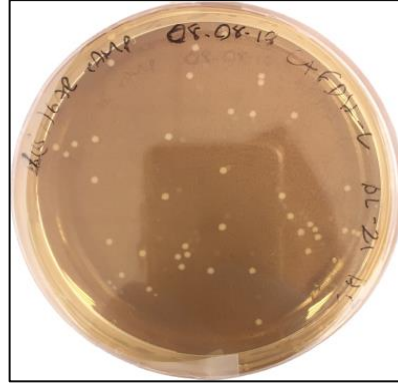
- Kolon, 1.5 mL'lik steril bir eppendorf tüpe alındıktan sonra üzerine 60 °C 'ye ısıtılmış olan 50 µL “Nucleo Spin Plasmid Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. 15000 rpm'de 1 dk santrifüjden sonra kolon ortadan kaldırılmıştır.
- Eppendorf tüpte bulunan örnekteki DNA dizi analizi Euro Finsgenomic tarafından yapılmıştır.
- Örnek daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20 °C) kaldırılmıştır.

3.2.4. CtFDH'lerin *E. Coli*'de İfade Edilmesi

Her iki CtFDH yapısı (N-CtFDH ve C-CtFDH), konakçı hücre *E. Coli* BL21 (DE3)'e aktarıldı. LB plakalarındaki transformantlar, başlangıç kültürlerinin (100 ug/mL ampisilin içeren LB ortamında) ayrı ayrı aşılınması için kullanıldı gece boyunca 37 °C'de 225 rpm'de kuluçkaya bırakıldı. Daha sonra, bu kültürler, otoindüksiyon ortamında 30 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilerek protein ifadelendirilmesi sağlanmıştır [59]. İnkübasyon sonrasında, hücreler 5800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve -20 °C'de saklanmıştır.



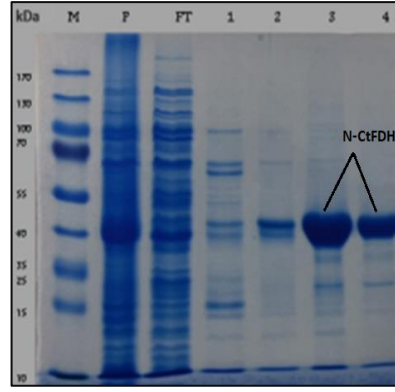
Şekil 3.3: Konakçı hücre *E. Coli* BL21 (DE3)'e transforme edilen N-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.



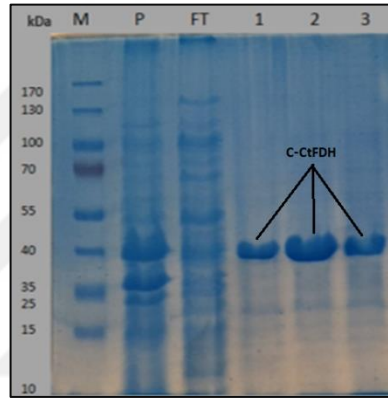
Şekil 3.4: Konakçı hücre *E. Coli* BL21 (DE3)'e transforme edilen C-CtFDH plazmidini içeren transformant koloniler.

3.2.5. Metal Afinite Kromatografisi yoluyla CtFDH'lerin Saflaştırılması

Toplanan hücre pelletleri Tampon A (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 30 mM imidazol pH 7,4), 139 mg PMSF ve 0.8 mg lizozim içeren lizis tamponunda yeniden süspanse edilmiştir. Ardından, kimyasal olarak parçalanmış hücreler sonikasyonla kırılıp elde edilen hücre lizatı 11000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant(dibe çöken tortu dışındaki sıvı) 0.45 μm 'lik bir filtreden süzölmüş, ardından süzöntü bir Ni-NTA His-Trap kolonuna uygulanmıştır. CtFDH'ler (N-CtFDH ve C-CtFDH), farklı imidazol derişimleri içeren (sırasıyla 200 mM ve 400 mM) bir dizi Tampon A ile kolondan saflaştırılmıştır. Her iki CtFDH için bütün saflaştırma fraksiyonları, ekspresyon seviyesi proteinin çözünörlüğünü ve saflığını belirlemek için SDS-PAGE'de görüntölenmiştir (Şekil 3.5, 3.6). Saflaştırılmış proteinlerin derişimleri, BCA Test Kiti ile belirlenmiştir.



Şekil 3.5: Saflaştırılmış N-CtFDH'in SDS PAGE 'de gösterimi. M: Marker (Thermo Scientific™ PageRuler™), P: Pellet, FT: Kolon çıkışı, Elüsyon fraksiyonları; 1: 100 mM, 2-3: 200 mM, 4: 400 mM imidazole.



Şekil 3.6: Saflaştırılmış C-CtFDH'in SDS PAGE 'de gösterimi. M: Marker (Thermo Scientific™ PageRuler™), P: Pellet, FT: Kolon Çıkışı, Elüsyon fraksiyonları; 1: 200 mM, 2-3: 400 mM.

3.2.6. Enzim Aktivitesi ve Kinetik Deneyler

CtFDH'lerin özgül aktivitesi, saflaştırılmış enzim içeren 20 mM sodyum asetat tamponu pH 5.0' da 200 mM sodyum formatına karşı ölçülmüştür. Oksidasyon tepkimesi, 25 °C'de NAD^+ (son derişimde 5 mM) ilavesiyle başlatılmış ve 340 nm'de NADH oluşumunun izlenmesi ile ölçülmüştür [60].

Kinetik deneyler, aynı koşullar altında optimize edilmiş tamponda (20 mM asetat pH 5.0) saflaştırılmış CtFDH'lerle gerçekleştirilmiştir. Format için kinetik parametreler elde etmek için, format derişim aralığı 0-40 mM arasında değiştirilmiştir. Kofaktör (NAD^+) için kinetik parametreleri belirlemek amacıyla, sodyum format sabit bir derişimde (40 mM) kullanılmış ve NAD^+ için derişim aralığı 0.1-8 mM arasında değiştirilmiştir. Michaelis-Menten kinetik sabitleri dörütlü

ölçümlerle elde edilmiştir. Her tepkimede, ilk substrat çeşitli derişimlerde ve ikinci substrat doyunluk derişiminde kullanılmıştır. Enzimlere ait dönüşüm sayısı (k_{cat}) ve Michaelis sabitleri (K_m), Origin V.8 yazılımı (OriginLab, Northampton, MA) kullanılarak hiperbolik regresyon analizi ile belirlenmiştir.

%64.54 özdeşliğe sahip *Candida boidinii* FDH (PDBID: 5DN9) kullanılarak SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) aracılığıyla bir CtFDH türdeşlik modeli üretilmiş ve çizimler PyMOL (Moleküler Grafik Sistemi, Sürüm 2.0 Schrödinger, LLC) programı ile gerçekleştirilmiştir.



4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Rekombinant Plazmitlerin Yapısı

Plazmid pET45b (+), amino terminalinde heterolog gen ile kaynaşacak altı ardışık His koduna sahiptir. *Ct* kaynaklı, kodon ile optimize edilmiş *fdh* geni, 1113 baz çifti içerir. Bu gen fragmanı, Genscript tarafından sırasıyla N-CtFDH ve C-CtFDH yapılarının eldesi için ilgili plazmitte *Pst*I ve *Xho*I kesim bölgeleri ve *Nco*I ve *Xho*I kesim bölgeleri arasına yerleştirilmiştir. Her iki yapıda nükleotid dizisi ve histidin uzantısının pozisyonu Sanger dizilimi yoluyla (Eurofin Co.) doğrulanmıştır. *Ctfdh* geni, 370 amino asit kodlamaktadır ve ifade edilen proteinin teorik moleküler ağırlığı 40.845 kDa'dır. PET vektör sistemleri nedeniyle, doğal proteine birkaç aminoasit kalıntısı eklenebilir ve bu durum doğal proteinin moleküler kütesini değiştirir. Bu nedenle, kopyalama işleminden sonra, CtFDH'in moleküler ağırlıkları, N-CtFDH ve C-CtFDH için sırasıyla 44.302 kDa ve 41.668 kDa'ya değişmiştir.

4.2. Proteinlerin İfade Edilmesi ve Saflaştırılması

Protein ekspresyonu optimize edilmiş koşullar altında *E.coli* BL21(DE3)'süandagerçekleştirilmiştir. Her iki CtFDH (N-CtFDH ve C-CtFDH) çözünür proteinler olarak ifadelendirilmiş ve saflaştırılmıştır. Ayrıca hücre özütleri ile format dehidrogenaz enzim aktivitesi araştırılmıştır. Sırasıyla enzim konsantrasyonları C-CtFDH ve N-CtFDH için 50 mg / L ve 24 mg / L idi. Her bir histidin etiketli enzimin çözünürlüğü neredeyse benzer bulunmuştur. Her bir protein bandının SDS-PAGE'deki görüntüsü, proteinlerin beklenen moleküler ağırlığında olduğunu doğrulamıştır (Şekil 3.5, 3.6). Önceden yapılan çalışmalarda, bir bakteriyel FDH'in N terminal bölgesi ile birleştirilen histidin etiketinin enzimde düşük aktiviteye neden olduğu tespit edilmiştir [40]. Bununla birlikte, Takacs ve ark. [61] maya *Candida boidinii*'den sırasıyla N veya C-terminal His etiketli formuyla FDH proteinini elde edebilmek için pMCSG49 vektörüne pET28a vektörünü kullanarak kopyalama işlemi gerçekleştirmişlerdir. Her iki yapıyı da *E. coli*'de çözünür ve aktif proteinler olarak ifade ettirmişlerdir. Bilindiği üzere, tüm FDH'ler iki gruba ayrılır. Birinci gruptaki FDH'ler bakteri ve bitkilerden, diğer FDH grubu ise maya ve mantarlardan elde edilenidir. Bunların arasında, bakteriyel FDH'ler,

mantar, maya benzerlerinden daha uzun N-terminal bölgesine sahiptir ve bu bölge, altbirimler arası etkileşimlerin oluşumunda rol oynar [62], [30], [24]. Enzim kökenleri arasındaki farklılık, Histidin eklenmesi durumunda çözünürlük ve aktivite ile ilgili bu farklı sonuçlara yol açmış olabilir.

Bakteriyel FDH'ler genellikle karboksil uçlarında [63], [64] polihistidin etiketi ile veya rekombinant sistemler vasıtasıyla etiket olmadan ifade edilebilir [65], [66]. Etiketleme için amino terminalinden uzak durulması, bu bölgenin bakteriyel FDH'ler için önemi nedeniyle bilinçli bir tercih olabilir. Bununla birlikte, maya [67] ve mantarlardan [68], [69] rekombinant FDH'lerin üretimi ile ilgili yapılan araştırmalar, N veya C terminal bölgelerinin, etiketleme için kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmalar arasında sadece bir tanesi Histidin pozisyonunun *CbFDH* (Maya *Candida boidinii* 'den bir FDH) aktivitesi üzerindeki etkisine ilişkin bir karşılaştırma içermektedir. Bahsedilen çalışmada yazarlar, N-terminal Histidin etiketli *CbFDH*'ın, C-terminal Histidin uzantılı *CbFDH*'den daha iyi özgül aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir [61].

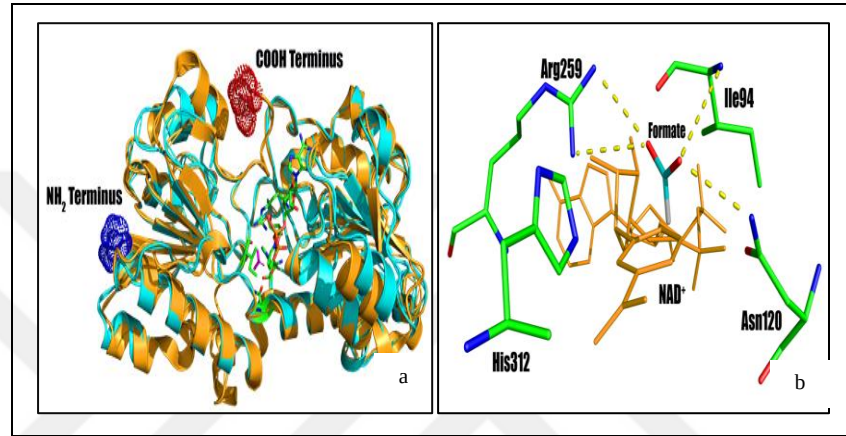
4.3. Etiket Pozisyonunun *CtFDH*'nin Katalitik Özellikleri Üzerine Etkisi

Her iki füzyon protein kinetik karakterler yönüyle de karşılaştırılmıştır. Saflaştırılmış *CtFDH*'lerin özgül aktivite değerleri ve kinetik parametreleri, 20 mM asetat tamponunda (pH 5.0) substrat olarak sodyum format kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: N-*CtFDH* ve C-*CtFDH* enzimlerine ait kinetik parametreler.

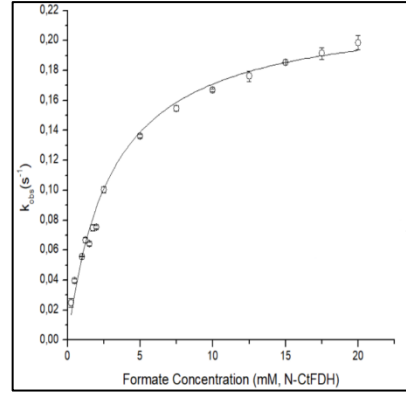
	NAD ⁺			Formate			Özgül Aktivite (U/mg)
	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	
N- <i>CtFDH</i>	0.12±0.01	0.14±0.001	1.17	3.01±0.04	0.22±0.000	0.07	0.16
					1		
C- <i>CtFDH</i>	0.16±0.01	0.36±0.01	2.25	4.05±0.28	0.56±0.01	0.14	0.40

Aynı tepkime koşullarında N-CtFDH özgül aktivite değeri C-CtFDH'nin özgül aktivite değerinin üç katıdır. Özgün ve ark. [68] nın gerçekleştirdiği CtFDH üzerindeki moleküler modelleme çalışmaları, CtFDH'in *Pseudomonas sp.* 101 FDH ile aynı aktif bölge yapısına sahip olduğunu göstermektedir [62], [68], [70]. Bu nedenle, N-terminustaki 6 Histidin kalıntısının aktif bölge etkileşimlerini engelleyebileceğini ve CtFDH'in katalitik özelliklerinin bu durumdan etkilenmiş olabileceğini tahmin edilmektedir (Şekil 4.1).

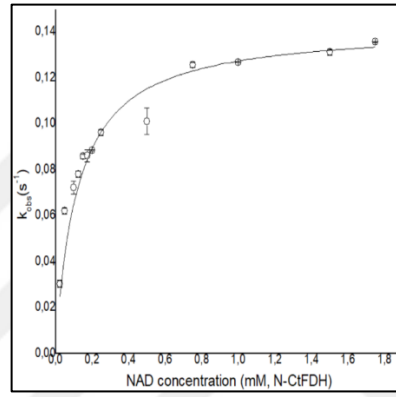


Şekil 4.1: *Candida boidinii* FDH'nin yapısı ile üst üste CtFDH'nin türdeşlik modeli. a) CtFDH monomeri, b) öngörülen substrat bağlanma bölgesi.

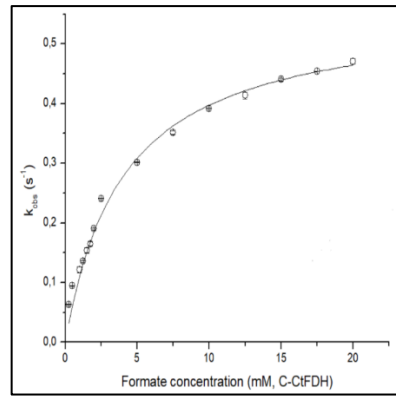
C-CtFDH'in her iki substrat (NAD^+ ve format) açısından Kinetik parametreleri belirlenmiş ve Tablo 1 de özetlenmiştir (Tablo4.1). Elde edilen kinetik değerler C-CtFDH'in aynı zaman diliminde N-CtFDH'den daha fazla format iyonunu CO_2 'e dönüştürebileceğini göstermektedir. Format için NAD^+ bağımlı FDH enzimlerinin tipik K_m sabiti aralığı 1.5-15 mM arasındadır [68]. C-CtFDH ve N-CtFDH için bu aralıkta kalan K_m sabitleri sırasıyla 4.05 mM ve 3.01 mM idi. Bu sonuç, N-CtFDH'in aktif bölge kalıntılarının, formata daha yüksek ilgi gösterdiğini belirtmektedir. Çeşitli FDH'lerin k_{cat} değerleri, $0.3\text{-}8.5\text{ s}^{-1}$ arasındadır [27]. C-CtFDH ve N-CtFDH'in k_{cat} değerleri ise sırasıyla 0.6 ve 0.2 s^{-1} bulunmuştur (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5).



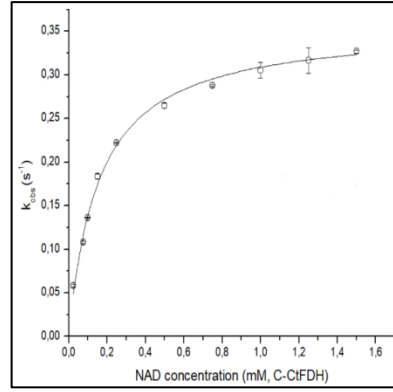
Şekil 4.2: N-CtFDH enzimi için Format yönünde Michaelis Menten eğrisi.



Şekil 4.3: N-CtFDH enzimi için NAD^+ yönünde Michaelis Menten eğrisi.



Şekil 4.4: C-CtFDH enzimi için Format yönünde Michaelis Menten eğrisi.



Şekil 4.5: C-CtFDH enzimi için NAD^+ yönünde Michaelis Menten eğrisi.

Bu sonuçlar Histidin uzantısının konumunun, bu enzimin (CtFDH) katalitik kabiliyeti üzerinde kayda değer etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Histidin etiketlerinin, genel olarak enzim fonksiyonuyla önemli bir şekilde etkileşime girmedikleri farz edilir [4], [71]. Bununla birlikte, bu varsayımla zıt sonuçları içeren birkaç çalışma vardır [6], [7]. Polihistidin etiketi, bazı özgül enzimlerin ve aynı zamanda FDH'lerin çözünürlüğünde ve katalitik aktivitesinde gözle görülür azalmaya sebep olmaktadır [40], [61], [72].

Pseudomonas FDH vahşi tip ile yapılan çalışmada, enzimin amino asit dizisinin N- ve C-terminallerine His-etiket eklenmiş ve enzim modellenmesinden elde edilen sonuçlarda; N-terminal His-etiketin enzim aktif bölgesinden uzakta yer almasından dolayı protein küresi ile etkileşime girmedikleri ve serbest dolaştıkları, C-terminal His-etiketi ise protein globülü ile etkileşime girmedikleri, ama koenzimin bağlanma alanı bölgesindeki aktif sitenin girişinde lokalize olduğu görülmüştür. Koenzimin bağlanma alanı bölgesinde birkaç pozitif yük grubu, aktif bölgede koenzim bağlanmasının bozulması ile NAD^+ 'nın negatif yüklü pirofosfat grubu ile etkileşime girebileceğini düşündürmektedir [73]. *Ogataea parapolymorpha* DL-1 FDH üzerine yapılan çalışmada C-ucundaki His etiketi ilavesinin bir sonucu olarak His kalıntılarının ek pozitif yüklerinin varlığından dolayı, format için K_M değeri vahşi tip enzime kıyasla yarı yarıya azaldığı ve NAD^+ için Michaelis sabiti 7 kat arttığı gözlemlenmiştir [74],[75].

Mantar FDH'leri ile ilgili çalışmalar oldukça nadirdir [69], [70], [71], [72], [76] ve bunlardan biri çözünür ve aktif bir enzim olan *Myceliophthora thermophila* (MtFDH)'den N-terminal His etiketli FDH'nin rekombinant üretimi ile ilgilidir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında CtFDH'in her iki Histidin etiketli enzim de (N / C-His

etiketli), format dönüştürme açısından *MtFDH*'den daha iyi kinetik değerlere sahiptir.

4.4. Sonuçlar

Bu çalışmada, N-veya C-terminalindeki His-tag pozisyonunda farklı olan iki *CtFDH* enzimlerinin çözünürlükleri, özgül aktivitelerini ve kinetik parametrelerini karşılaştırılmıştır. His-etiketin *CtFDH*'in N-ucu veya C-ucu ile birleştirilmesi, enzimin katalitik özellikleri üzerinde farklı etkilere sahiptir. Sonuçlar, N-terminal *CtFDH*'in her iki substrat açısından C-terminal *CtFDH*'den daha düşük katalitik verime, k_{cat} sayısına ve özgül aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bu nedenle, *CtFDH*'in N-terminal bölgesi His-etiketi füzyonu için uygun değildir. Bahsedilen tüm çalışmaların sonuçlarını ve bu çalışmayı değerlendirdiğimizde, FDH etiketinin tüm canlı gruplarındaki format dehidrogenaz enzimleri için uygun konumu hakkında genel bir sonuçtan söz edemeyiz. Bu nedenle, bu uzantının etkileri hakkında genel bir çıkarım elde etmek için benzer ve farklı organizmalardan daha fazla FDH için ayrı ayrı çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Booth W. T., Schlachter C. R., Pote S., Ussin N., Mank N. J., Klapper V., Offermann L. R., Tang C., Hurlburt B. K., Chruszcz M., (2018), "Impact of an N terminal polyhistidine tag on protein thermal stability", American Chemical Society Omega, 3, 760-768.
- [2] Terpe K., (2003), "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", Applied Microbiology and Biotechnology, 60 (5), 523-533.
- [3] Zhao D., Huang Z., (2016), "Effect of His-tag on expression, purification, and structure of zinc finger protein, ZNF191 (243-368)", Bioinorganic Chemistry and Applications, 2016, 8206854.
- [4] Graslund S., Nordlund P., Weigelt J., Hallberg B. M., Bray J., Gileadi O., Knapp S., Oppermann U., Arrowsmith C., Hui R., (2008), "Protein production and purification", Nature Methods , 5 (2), 135-146.
- [5] Studier F. W., Moffatt B. A., (1986), "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes", Journal of Molecular Biology, 189 (1), 113-130.
- [6] Ledent P., Duez C., Vanhove M., Lejeune A., Fonce E., Charlier P., Rhazi-Filali F., Thamm I., Guillaume G., Samyn B., Devreese B., Van Beeumen J., Lamotte-Breusier J., Frere J. M., (1997), "Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters", FEBS Letters, 413 (2), 194-196.
- [7] Panek A., Pietrow O., Filipkowski P., Synowiecki J., (2013), "Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*", Acta Biochimica Polonica, 60 (2), 163-166.
- [8] Wichmann R., Wandrey C., Buckmann A. F., Kula M. R., (1981), "Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD (H) regeneration", Biotechnology and Bioengineering, 23 (12), 2789-2802.
- [9] Goldberg S. L., Nanduri V. B., Chu L., Johnston R. M., Patel R. N., (2006), "Nantioselective microbial reduction of 6-oxo-8-[4-[4- (2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl] butyl]-8-azaspiro [4.5] decane-7,9-dione: Cloning and expression of reductases", Enzyme and Microbial Technology, 39 (7), 1441-1450.
- [10] Hanson R. L., Goldberg S. L., Brzozowski D. B., Tully T. P., Cazzulino D., Parker W. L., Lyngberg O. K., Vu T. C., Wong M. K., Patel R.N., (2007), "Preparation of an amino acid intermediate for the dipeptidyl peptidase IV inhibitor, saxagliptin, using a modified phenylalanine dehydrogenase", Advanced Synthesis and Catalysis, 349 (8,9), 1369-1378.

- [11] Yu X., Niks D., Mulchandani A., Hile R., (2017), "Efficient reduction of CO₂ by the molybdenum containing formate dehydrogenase from *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)", *Journal of Biological Chemistry*, 292 (41), 16872-16879.
- [12] Hovda K. E., Gadeholt G., Evtodienko V., Jacobsen D., (2015), "A novel bedside diagnostic test for methanol poisoning using dry chemistry for formate", *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75 (7), 610-614.
- [13] Ames A. (1988), "Oxalate Metabolism in Relation to Urinary Stone", *Journal of Clinical Pathology*, 42 (3), 334.
- [14] Carol A. M., (1993), "Diagnosis of *Trichomonas Vaginitis* by Detecting Formate in Vaginal Fluid", EP Patent, EP0556685A2.
- [15] David L. N., Micheal M. C., (2008), "Lehninger Principles of Biochemistry", 5th edition, W.H. Freeman and Company-New York.
- [16] Gazanfer B., (1977), "Vitaminler ve Enzimler", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları-Ankara.
- [17] Boyce S., Tipton K. F., (2001), "Enzyme Classification and Nomenclature", *Encyclopedia Of Life Sciences*, 1-11.
- [18] Yücesoy D. T., (2011), "Multifunctional formate dehydrogenase fusion protein binds to gold surface with improved reaction kinetics", 2nd International Conference on Enzyme Science and Technology, 23-24, Singapore, 26-28 February.
- [19] Alekseeva A. A., Savin S. S., Tishkov V. I., (2011), "NAD⁺ dependent formate dehydrogenase from plants", *Acta Naturae*, 3 (4), 38-54.
- [20] Popov V. O., Lamzin V. S., (1994), "NAD⁺ dependent formate dehydrogenase", *Biochemical Journal*, 301 (3), 625-643.
- [21] Thunberg T., (1921), "Archives of Physiology", *Biochemical*, 18, 601-606.
- [22] Davison D. C., (1951), "Studies on plant formic dehydrogenase", *Biochemical Journal*, 49 (4), 520-526.
- [23] Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V. S., (2007), "High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*", *Protein Science*, 16 (6), 1146-1156.
- [24] Tishkov V. I., Popov V. O., (2004), "Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase", *Biochemistry*, 69 (11), 1252-1267.
- [25] Tishkov V. I., Popov V. O., (2006), "Protein engineering of formate dehydrogenase", *Biomolecular Engineering*, 23 (2-3), 89-110.

- [26] Andreadeli A., Platis D., Tishkov V. I., Popov V. O., Labrou N. E., (2008), "Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NAD (P)⁺ ", FEBS Journal, 275 (15),3859-3869.
- [27] Johannes T. W., Woodyer R. D., Zhao H., (2007), "Efficient regeneration of NAD (P) H using an engineered phosphite dehydrogenase", Biotechnology and Bioengineering , 96 (1), 18-26.
- [28] Serov A. E., Popova A. S., Fedorchuk V. V., Tishkov V. I., (2002), "Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*", Biochemical Journal, 367 (3), 841-847.
- [29] Alissandratos A., Kim H. K., Easton C. J., (2013), "Formate production through biocatalysis", Bioengineered, 4 (5), 348-350.
- [30] Aslan A. S., Valjakka J., Ruupunen J., Yildirim D., Turner N. J., Turunen O., Binay B., (2017), "*Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase has high activity in the reduction of hydrogen carbonate (HCO₃⁻) to formate", Protein Engineering, Design and Selection, 30 (1), 47-55.
- [31] Barceloux D.G., Bond G. R., Krenzelok E. P., Cooper H., Vale J. A., (2002), "American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning", Journal of Toxicology Clinical Toxicology, 40 (4), 415-446.
- [32] Web 1, (1988), <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim335.htm>, (Erişim Tarihi:03/02/2022).
- [33] Web2, (2014),https://www.who.int/environmental_health_emergencies/poisoning/methanol_information.pdf?ua=1, (Erişim Tarihi:03/02/2022).
- [34] Daudon M., Donsimoni R., Hennequin C., Fellahi S., Le Moel G., Paris M., Troupel S., Lacour B., (1995), "Sex and age related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy", Urological Research, 23 (5), 319-326.
- [35] Urdal P., (1984), "Enzymic assay for oxalate in unprocessed urine, as adapted for a centrifugal analyzer", Clinical Chemistry, 30 (6), 911-913.
- [36] Çakar M. M., (2018), "MolecularCcharacterization of NAD⁺ Dependent Formate Dehydrogenase from *Clostridium ljungdahlii*", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [37] Chen Z., Li Y., Yuan Q., (2015), "Study the effect of His-tag on chondroitinase ABC I based on characterization of enzyme", International Journal of Biological Macromolecules, 78 , 96-101.

- [38] Yeon Y. J., Park H. J., Park H. Y., Yoo Y. J., (2014), "Effect of His-tag location on the catalytic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19 (5), 798-802.
- [39] Horchani H., Ouertani S., Gargouri Y., Sayari A., (2009), "The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61 (3-4), 194-201.
- [40] Alpdağtas S., Çelik A., Ertan F., Binay B., (2018), "DMSO tolerant NAD (P)H recycler enzyme from a pathogenic bacterium, *Burkholderia dolosa* PC543: Effect of N-/C-terminal His Tag extension on protein solubility and activity", *Engineering in Life Sciences*, 0, 1-11.
- [41] Mosbah H., Sayari A., Bezzine S., Gargouri Y., (2006), "Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala", *Protein Expression and Purification*, 47 (2), 516-523.
- [42] Sayari A., Mosbah H., Verger R., Gargouri Y., (2007), "The N-terminal His-tag affects the enantioselectivity of *Staphylococcal* lipases: A monolayer study", *Journal of Colloid and Interface Science*, 313 (1), 261-267.
- [43] Rajan S. S., Lackland H., Stein S., Denhardt D.T., (1998), "Presence of an N-terminal polyhistidine tag facilitates stable expression of an otherwise unstable N-terminal domain of mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, 13 (1), 67-72.
- [44] Sun Q. M., Chen L. L., Cao L., Fang L., Chen C., Hua Z. C., (2005), "An improved strategy for high level production of human vasostatin 120–180", *Biotechnology Progress*, 21 (4), 1048-1052.
- [45] Tang W., Sun Z. Y., Pannell R., Gurewich V., Liu J. N., (1997), "An efficient system for production of rekombinant urokinase type plasminogen activator", *Protein Expression and Purification*, 11 (3), 279-283.
- [46] Kou G., Shi S., Wang H., Tan M., Xue J., Zhang D., Hou S., Qian W., Wang S., Dai J., Li B., Guo Y., (2007), "Preparation and characterization of rekombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, 52 (1), 131-138.
- [47] Mayer A., Sharma S. K., Tolner B., Minton N. P., Purdy D., Amlot P., Tharakan G., Begent R. H. J., Chester K.A., (2004), "Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: A step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)", *British Journal of Cancer*, 90 (2), 2402-2410.

- [48] Chen H., Xu Z., Xu N., Cen P., (2005), "Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *Escherichia coli* cell-free system", *Journal of Biotechnology*, 115 (3), 307-315.
- [49] Dyson M. R., Shadbolt S. P., Vincent K. J., Perera R. L., Mccaverty J., (2004), "Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression", *BMC Biotechnology*, 14 (4), 32.
- [50] Hammarström M., Hellgren N., Van Den Berg S., Berglund H., Hard T., (2002), "Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*", *Protein Science*, 11 (2), 313–321.
- [51] Nallamsetty S., Waugh D. S., (2006), "Solubility enhancing proteins MBP and NusA play a passive role during the folding of their fusion partners", *Protein Expression and Purification*, 45 (1), 175-82.
- [52] Chant A., Kraemer P. C. M., Watkin R., Kneale G. G., (2005), "Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA binding site", *Protein Expression and Purification*, 39 (2), 152-159.
- [53] Goel A., Colcher D., Koo J. S., Booth B. J., Pavlinkova G., Batra S. K., (2000), "Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor associated single chain Fv construct", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523 (1), 13-20.
- [54] Kim K. M., Yi E. C., Baker D., Zhang K. Y., (2001), "Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase", *Acta Crystallographica D Biological Crystallography*, 57 (5), 759-762.
- [55] Cadel S., Gouzy D. C., Petres S., Piesse C., Pham V. L., Beinfeld M. C., Cohen P., Foulon T., (2004), "Expression and purification of rat rekombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus-infected insect cells", *Protein Expression and Purification*, 36 (1), 19-30.
- [56] Fonda I., Kenig M., Gaberc-Porekar V., Pristovaek P., Menart V., (2002), "Attachment of histidine tags to rekombinant tumor necrosis factoralpha drastically changes its properties", *Scientific World Journal*, 15 (2), 1312-1325.
- [57] Smyth D. R., Mrozkiewicz M. K., McGrath W. J., Listwan P., Kobe B., (2003), "Crystal structures of fusion proteins with large affinity tags", *Protein Science*, 12 (7), 1313-1322.
- [58] Vries E. G. E., Hooge M .N., Gietema J. A., Jong S., Ferreira C. G., (2003), "Target of Cancer Therapy", *Clinical Cancer Research*, 9 (2), 912.

- [59] Studier F. W., (2005), "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures", *Protein Expression and Purification*, 41 (1), 207-234.
- [60] Galante Y., Hatefi Y., (1978), "Resolution of complex I and isolation of NADH dehydrogenase and an iron sulphur protein.", *Methods In Enzymology*, 53, 15-21.
- [61] Takacs M., Makhlynets O. V., Tolbert P. L., Korendovych I. V., (2017), "Secretion of functional formate dehydrogenase in *Pichia pastoris*", *Protein Engineering, Design and Selection*, 30 (3), 279-284.
- [62] Lamzin V. S., Dauter Z., Popov V. O., Harutyunyan E. H., Wilson K. S., (1994), "High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase" *Journal of Molecular Biology*, 236 (3), 759-785.
- [63] Fogal S., Beneventi E., Cendron L., Bergantino E., (2015), "Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the acidobacterium *Granulicella mallensis* MP5ACTX8", *Applied Microbiology Biotechnology*, 99 (22), 9541-9554.
- [64] Alpdağtaş S., Yücel S., Kapkaç H. A., Liu S., Binay B., (2018), "Discovery of an acidic, thermostable and highly NAD (P)⁺ dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929", *Biotechnology Letters*, 40 (7), 1135-1147.
- [65] Hatrongjit R., Packdibamrung K. A., (2010), "NAD (P)⁺ dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization", *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (7), 557-561.
- [66] Shinoda T., Satoh T., Mineki S., Lida M., Taguchi H., (2002), "Cloning, Nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene for formate dehydrogenase of paracoccus sp. 12-a, a formate assimilating bacterium", *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66 (2), 271-276.
- [67] Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W., (2014), "Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol assimilating yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1 in His-tagged form", *Applied Microbiology Biotechnology*, 98 (4), 1621-1630.
- [68] Özgün G., Karagüler N. G., Turunen O., Turne N. J., Binay B., (2015), "Characterization of a new acidic NAD⁺ dependent formate dehydrogenase from thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 212-217.
- [69] Altaş N., Aslan A. S., Karataş E., Chronopoulou, E., Labrou, N.E., Binay, B., 2017, "Heterologous production of extreme alkaline thermostable NAD⁺-dependent formate dehydrogenase with wide-range pH activity from *Myceliophthora thermophila*", *Process Biochemistry*, 61, 110-118.

- [70] Nilov D. K., Shabalin I. G., Popov V. O., Svedas V. K., (2012), "Molecular modeling of formate dehydrogenase: The formation of the Michaelis complex", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 30 (2), 170-179.
- [71] Uhlen M., Forsberg G., Moks T., Hartmanis M., Nilsson B., (1992), "Fusion proteins in biotechnology.", *Current Opinion in Biotechnology*, 3 (4), 363-369.
- [72] Araujo A. P. U., Oliva G., Henrique-Silva F., Garratt R. C., Caceres O., Beltramini L. M., (2000), "Influence of the histidine tail on the structure and activity of rekombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272 (2), 480-484.
- [73] Pometun A. A., Parshin P. D., Galanicheva N. P., Uporov I. V., Atroshenko D. L., Savin S. S., Tishkov V. I., (2020), "Influence of his 6 sequence on the properties of formate dehydrogenase from bacterium *Pseudomonas* sp. 101" *Moscow University Chemistry Bulletin*, 75 (4), 250-257.
- [74] Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W., (2014), "Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1 in His-tagged form", *App. Microbiol Biotechnol*, 98(4),1621-1630
- [75] Tishkov V. I., Pometun A. A., Stepashkina A. V., Fedorchuk V. V., Zarubina S. A., Kargov I. S., Atroshenko D. L., Parshin P. D., Kovalevski R. P., Boiko K. M., Eldarov M. A., D'Oronzio E., Facheris S., Secundo F., Savin S. S., (2018), "Rational design of practically important enzymes", *Moscow University Chemistry Bulletin*, 73 (1), 1-6.
- [76] Watanabe T., Hattori T., Tengku S., Shimada M., (2005), "Purification and characterization of NAD⁺ dependent formate dehydrogenase from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and a possible role of the enzyme in oxalate metabolism", *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (1), 68-75.

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve ortaöğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2008 yılında Merkez Bankası Derince Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesinde Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2012 yılından beri Gıda Mühendisi olarak çalışmaktadır.



EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Esen H., Alpdağtaş S., Çakar M. M., Binay B., (2019), “Tailoring of rekombinant FDH: Effect of histidine tag location on solubility and catalytic properties of *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase (CtFDH)”, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49 (5), 529-534

Esen H., Alpdağtaş S., Çakar M. M., Binay B., (2018), “Polyhistidine Tag Effect on Solubility and Activity of *Chaetomium thermophilum* Formate Dehydrogenase (CtFDH)” 1st Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, 114, Antalya-TURKEY, 27-30 October

