T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT SOYLARDA PENİSİLİN ASİLAZ ÜRETKENLİĞİ VE NİTELİKLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

HÜSEYİN BALCI
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2015

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT SOYLARDA PENİSİLİN ASİLAZ ÜRETKENLİĞİ VE NİTELİKLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

HÜSEYİN BALCI
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE
2015

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

IMPROVEMENT OF PRODUCTIVITY AND PROPERTIES OF PENICILLIN ACYLASE PRODUCING RECOMBINANT STRAINS BY DIRECTED EVOLUTION

HÜSEYİN BALCI

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE

2015

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/01/2015 tarih ve 2015/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/02/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hüseyin BALCI'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE : Prof. Dr. Neş'e BİLGİN

ÜYE : Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. İnci ÖZDEMİR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Penisilin G asilaz, β-laktam antibiyotiklerinin endüstriyel olarak üretiminde kullanılan anahtar bir enzimdir. Penisilin G ve diğer β-laktam antibiyotiklerinin penisilin G asilaz ile hidrolizi sonucunda 6-aminopenisillanik asit (6-APA) oluşmakta ve oluşan 6-APA ise yarı sentetik antibiyotiklerin üretiminde kullanılmaktadır. Endüstride bu amaç için en çok kullanılan *Escherichia coli* penisilin G asilazı olmasına rağmen, bu enzimin özellikle kataliz reaksiyonlarındaki etkinliği istenilen seviyede değildir. Bu çalışmada, *Escherichia coli* penisilin G asilazının enzimatik aktivitesini artırmak amacıyla, hataya eğilimli polimeraz zincir reaksiyonunun birbirini izleyen turları *Escherichia coli pac* genine uygulandı. Arka arkaya yapılan iki tur hataya eğilimli polimeraz zincir reaksiyonunun ardından, artmış enzim aktivitesine sahip en iyi mutant olan M2234 seçildi ve analiz edildi. M2234'ün yapılan DNA dizi analizi sonucunda, aktif merkezden uzakta yer alan 297'inci amino asit rezidüsünün lizinden izolösine değiştiği görüldü (K297I). Yapılan nitelendirme çalışmalarının ardından, mutant enzimin yaban tip enzime göre 4 kat fazla spesifik aktiviteye sahip olduğu ve ayrıca pH 10'da daha yüksek kararlılık sergilediği görüldü. Bu çalışma güncel bilgiler ışığında değerlendirildiğinde, *E. coli pac* geni mutantlarının oluşturulmasında hataya eğilimli PCR yönteminin kullanıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Yönlendirilmiş Evrim, Hataya Eğilimli PCR, *E. coli* Penisilin G Asilaz, 3D Homoloji Model, Katalitik Aktivite.

SUMMARY

Penicillin G acylase is the key enzyme used in the industrial production of β-lactam antibiotics. This enzyme hydrolyzes penicillin G and other β-lactam antibiotics releasing 6-aminopenicillanic acid (6-APA), which used in the production of semisynthetic antibiotics. Although *Escherichia coli* penicillin G acylase is most commonly used in industry for this purpose, this enzyme is not good enough for catalysis reactions. In this work, to improve the enzymatic activity of *Escherichia coli* penicillin G acylase, sequential rounds of error-prone polymerase chain reaction were applied to the *Escherichia coli pac* gene. After two rounds of error-prone polymerase chain reaction, the best mutant M2234 with enhanced activity was selected and analyzed. DNA sequence analyses of M2234 revealed that one amino acid residue (K297I), located far from the center of the catalytic pocket, was changed. This mutant (M2234) has a specific activity 4.0 times higher than the parent enzyme and also displayed higher stability at pH 10. To our knowledge, there was no report in which the error-prone PCR method was used to improve the properties of penicillin acylase.

Keywords: Directed Evolution, Error-Prone PCR, *E. coli* Penicillin G Acylase, 3D Homology Model, Catalytic Activity.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Füsun Gümüşel ve Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk'e, deneysel katkılarından dolayı değerli arkadaşım Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk'e, ihtiyaç duyduğumda yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Nagihan Akbulut'a, genel yardımlarından dolayı Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya, yapısal çalışmalardaki desteğinden dolayı Dr. Tjaard Pijning'e, penisilin G ve 6-APA'yı sağladığı için Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.'ye ve hep yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. β-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER, β-LAKTAM ASİLAZLAR ve PENİSİLİN ASİLAZLAR	4
2.1. β-Laktam Antibiyotikleri	4
2.1.1. Penisilinler	5
2.1.2. 6-aminopenisillanik Asit (6-APA)	6
2.2. β-Laktam Asilazlar	7
2.2.1. Penisilin Asilazlar	9
2.2.1.1. Penisilin G Asilaz	10
2.2.1.2. Penisilin Asilazların Katalitik Mekanizması	13
2.2.1.3. Penisilin Asilazların Mikrobiyal Üretimi	15
2.2.1.4. Penisilin Asilazların Saflaştırılması	16
2.2.1.5. Penisilin Asilazların Kullanım Alanları	17
3. YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM	19
3.1. Yönlendirilmiş Evrim Metotları	20
3.1.1. Rekombinasyona Dayanmayan Yönlendirilmiş Evrim Metotları	20
3.1.1.1. Hataya Eğilimli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Error-Prone PCR)	20
3.1.1.2. Rekombinasyona Dayanmayan Diğer Yönlendirilmiş Evrim Metotları	21

3.1.2. Rekombinasyona Dayalı Yönlendirilmiş Evrim Metotları 23
3.1.2.1. DNA Karıştırma (DNA Shuffling) 23
3.1.2.2. Rekombinasyona Dayalı Diğer Yönlendirilmiş Evrim Metotları 24
3.2. Mutant Kütüphanelerin Taranmasında ve Seçilmesinde Kullanılan Yöntemler 26
3.3. Enzim Mühendisliğinde Yönlendirilmiş Evrim Uygulamaları ve Penisilin Asilaz ile Yapılmış Mutagenez Çalışmaları 28
4. GEREÇ 32
4.1. Kullanılan Sarf Malzemeler 32
4.2. Kullanılan Cihazlar 35
5. YÖNTEM 37
5.1. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar 37
5.1.1. Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti Kullanılarak *E.coli* ATCC 11105 Soyundan Geneomik DNA İzolasyonu 37
5.1.2. Maksiprep Yöntemi ile Plazmit İzolasyonu 38
5.1.3. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin PCR ile Çoğaltılması 39
5.1.4. Çoğaltılan *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanması 41
5.1.5. TSS Yöntemi ile Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyon 43
5.1.6. Kaynatma ile Lizis (STET) Yöntemi Kullanılarak Plazmit İzolasyonu 44
5.1.7. Klon Adaylarının Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi 45
5.1.8. Klon Adaylarının Ekspresyon Çalışması ile Doğrulanması 45
5.1.9. 6-APA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması 47
5.1.10. Penisilin G Asilaz Aktivite Testi 48
5.2. Hataya Eğilimli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Error-Prone PCR) Çalışmaları 49
5.2.1. Hataya Eğilimli PCR (Error-Prone PCR) 50
5.2.2. PCR ile Klonlama ve Kütüphane Oluşturma 51
5.2.3. Artmış Enzim Aktivitesine Sahip Mutantların Taranması 53

5.2.4. DNA Dizi Analizi Çalışmaları 56
5.3. Penisilin G Asilazın Saflaştırma ve Nitelendirme Çalışmaları 56
5.3.1. Penisilin G Asilazın Saflaştırılması 57
5.3.2. Bradford Testi ile Protein Miktarının Belirlenmesi 58
5.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 59
5.3.4. Penisilin G Asilazın Nitelendirilmesi 60
5.4. Moleküler Modelleme Çalışmaları 62
6. BULGULAR 63
6.1. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanması ve Ekspresyonu 63
6.2. Hataya Eğilimli PCR (Error-Prone PCR) ve Mutant Kütüphane Taranması 66
6.3. Penisilin G Asilazın Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi 71
6.4. Moleküler Modelleme Çalışmaları 79
7. TARTIŞMA 81
8. SONUÇ 87
9. ÖNERİLER 89

KAYNAKLAR 90
ÖZGEÇMİŞ 100
EKLER 101

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
α	:	Alfa
β	:	Beta
β-ME	:	β-merkaptoetanol
ºC	:	Derece santigrat
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
µM	:	Mikromolar
bç	:	Baz çifti
fmol	:	Femtomol
g	:	Gram
kb	:	(Kilo) baz
kDa	:	(Kilo) dalton
M	:	Molar
mg	:	Miligram
Mg^{+2}	:	Magnezyum iyonu
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Mn^{2+}	:	Mangan iyonu
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
pmol	:	Pikomol
sn	:	Saniye
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
6-APA	:	6-aminopenisillanik asit
APS	:	Amonyum persülfat
ATP	:	Adenozin trifosfat
BSA	:	Sığır serum albümin

cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
CRP	:	cAMP reseptör proteini
dATP	:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	:	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	:	Deoksiguanozin trifosfat
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DNA	:	Deksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit trifosfat
dTTP	:	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EG	:	Etilen glikol
EtOH	:	Etanol
GC	:	Gaz kromatografisi
HPLC	:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IPTG	:	İzopropil-β-D-tiogalaktozit
NIPAB	:	6-nitro-3-(fenilasetamido)benzoik asit
OD	:	Optik yoğunluk
PAA	:	Fenil asetik asit
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAB	:	p-dimetilaminobenzaldehit
PEG8000	:	Polietilen glikol 8000
PGA	:	Penisilin G asilaz
PMSF	:	Fenil metil sülfonil florür
rpm	:	Dakika başına rotasyon
SDS	:	Sodyumdodesilsülfat
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	β-laktam antibiyotikleri penisilin G (1) ve sefalosporin C'nin (2) yapısı.	5
2.2:	Penisilinlerin genel yapıları.	6
2.3:	β-laktam asilazların klasik ve alternatif sınıflandırılması.	9
2.4:	β-laktam asilazların klasik sınıflandırılmasının alternatif gösterimi.	9
2.5:	Penisilin G asilaz ile penisilin G'nin hidrolizi.	10
2.6:	*E. coli*'de penisilin G asilazın sentezi ve işlenmesi.	11
2.7:	PGA'nın üç boyutlu yapısının karton gösterimi.	12
2.8:	Penisilin G'nin, penisilin G asilaz tarafından PAA ve 6-APA'ya hidrolizinin mekanizması.	15
5.1:	Mutant adaylarının taranmasında ve seçilmesinde kullanılan basamakların şematik gösterimi.	55
6.1:	FG11-PA16 primer çifti ile yapılan optimizasyon çalışması sonucu çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel profili.	63
6.2:	*pac* geninin FG11-PA16 primer çifti ile büyük ölçekte üretilmesi.	64
6.3:	*Eco*RI ve *Hin*dIII ile kesilmiş klon adaylarının agaroz jel profili.	65
6.4:	Hataya eğilimli PCR çalışmasının birinci turunda yapılan mutajenik ve kontrol PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili.	66
6.5:	Hataya eğilimli PCR çalışmasının ikinci turunda yapılan mutajenik ve kontrol PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili.	67
6.6:	Saflaştırılmış penisilin G asilazların SDS-PAGE profilleri.	72
6.7:	Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait optimal sıcaklık grafiği.	72
6.8:	Sıcaklığın mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının kararlılığı üzerine etkisi.	73
6.9:	Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait optimal pH grafiği.	74

6.10: pH'nın mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının kararlılığı üzerine etkisi. 74
6.11: 10 mM derişime sahip metal iyonlarının ve amonyum tuzlarının mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. 75
6.12: Çeşitli efektör maddelerin mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. 76
6.13: Stabilize edici ajanların mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. 77
6.14: Organik çözücülerin mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazların aktiviteleri üzerine etkileri. 78
6.15: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlara ait substrat özgüllüğü grafiği. 79
6.16: *E. coli* M2234 mutant enziminin Phyre2 kullanılarak oluşturulan üç boyutlu modelinin stereo figürü. 80

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
4.1:	Kullanılan sarf malzemeler.	32
4.2:	Kullanılan cihazlar.	35
5.1:	*E. coli* ATCC 11105 *pac* geninin çoğaltıldığı PCR'da kullanılan primerler.	40
5.2:	*pac* geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı.	40
5.3:	Klonlama çalışmasında kullanılan restriksiyon enzim kesim protokolü.	41
5.4:	*pac* geninin klonlanmasında kullanılan ligasyon protokolü.	43
5.5:	Hataya eğilimli PCR çalışmasında kullanılan primerler.	50
5.6:	Hataya eğilimli PCR çalışmasında kullanılan PCR koşulları ve programı.	51
5.7:	Klonlamada kullanılan PCR koşulları ve programı.	52
5.8:	SDS-PAGE'de kullanılan jeller ve içerikleri.	59
6.1:	M2234 PGA'sında DNA ve amino asit değişiklikleri.	69
6.2:	Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait amino asit dizilerinin karşılaştırılması.	70
6.3:	Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait saflaştırma tablosu.	71

1. GİRİŞ

Enzim aracılı prosesler çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Günümüzde enzimlerin sayısı binlerle ifade edilmekte ve bir çoğu ticari önem taşımaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin başında mikrobiyal kökenli enzimler gelmektedir. Enzimler gıda, deterjan, ecza, deri, kağıt, tekstil ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

Endüstride enzimlerin biyokatalizörler olarak kullanılabilmesi çeşitli reaksiyonları katalizleyebilme kabiliyetlerine bağlıdır. Endüstriyel uygulamalarda biyokatalizörlerin, kendiliğinden sahip oldukları fizyolojik özelliklerinin yanı sıra yüksek aktivite, enantiyo seçicilik, kararlılık ve substrat seçiciliği gibi özellikleri de göstermeleri istenmektedir. Geliştirilen model sistemlerle enzimlerin aktivite, kararlılık, enantiyo seçicilik ve substrat özgüllüğü gibi özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Protein mühendisliği çalışmalarında son yıllarda ilgi odağı haline gelen yönlendirilmiş evrim yaklaşımının kullanılmasıyla, yapı ve etki mekanizmasının bilinmediği durumlarda, enzimlere yeni özellikler kazandırmaya yönelik çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır. Yönlendirilmiş evrim kapsamında, rekombinasyon ve non-rekombinasyon temelli yöntemler gen havuzundaki çeşitliliği artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu metotlarla oluşturulan kütüphaneler yüzlerce ya da on binlerce varyanttan oluşabilir. Non-rekombinasyona dayanan yöntemler arasında en çok kullanılanların başında hataya eğilimli polimeraz zincir reaksiyonu (error-prone PCR) gelmektedir. Rekombinasyona dayanan teknikler içinde ise DNA karıştırma (DNA shuffling) en çok kullanılan yöntemdir [Arnold and Volkov, 1999], [Chen, 2001], [Williams et al., 2004].

Bu yöntemlerde hedef gen ya da gen setleri, rastgele mutagenez ve/veya rekombinasyon çalışmalarına alınır. Oluşan varyantlar görüntüleme ve seçme için uygun ekspresyon sistemlerine aktarılır. Bu nedenle görüntüleme ve seçme, varyant izolasyonunda büyük önem taşımaktadır. Yönlendirilmiş evrimde önemli olan, mutasyonlar sonucunda elde edilen varyantlardan istediğimiz özelliğe sahip olanların seçilmesidir [Arnold and Georgiou, 2003].

Penisilin antibiyotiklerindeki amit bağının hidrolizini katalizleyen penisilin asilazlar (E.C. 3.5.1.11) yaklaşık 60 yıl önce keşfedilmiştir. Bu enzimler, hidrolazlar sınıfının amino hidrolazlar alt sınıfında yer alırlar ve N-terminal nükleofilik

hidrolazlar ailesinin bir üyesidirler. Penisilin asilazlar, bakterilerde, mantarlarda ve mayalarda bulunmaktadır. Enzimin doğadaki rolü tam olarak anlaşılmamakla birlikte, karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere fenil asetil bileşiklerinden fenil asetik asitin oluşturulmasında gerekli olduğu düşünülmektedir. Endüstride ise yaygın olarak penisilin G ve diğer β-laktam antibiyotiklerinin hidrolizi ile 6-aminopenisillanik asit'in (6-APA) üretilmesinde ve bir β-laktam çekirdeği ile uygun bir D-amino asit türevinin katalizlenmesi yoluyla da yarı-sentetik antibiyotiklerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Endüstride bu amaç için en çok kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) penisilin asilazı olmasına rağmen, bu enzimin özellikle kataliz reaksiyonlarındaki etkinliği istenilen seviyede değildir. Diğer taraftan günümüzde antibiyotiklere karşı direnç gösteren patojenlerin sayısının gittikçe artması, patojenlere karşı etkili yeni antibiyotiklerin sentezlenmesini zorunlu kılmıştır. Yaban tipi penisilin asilazın yarı-sentetik antibiyotiklerin üretimi için katalitik etkinliğinin oldukça düşük olmasından dolayı, özellikleri artırılmış yeni mutant enzimlerin geliştirilmesi farmasötik endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Günümüzde özellikleri geliştirilmiş mutant enzimlerin oluşturulmasında klasik rekombinant DNA tekniklerinin yanı sıra, yönlendirilmiş evrim metotları da sıklıkla kullanılmaktadır [Tishkov et al., 2010].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tez çalışmasında penisilin asilaz özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmış, bunun için; *Escherichia coli* ATCC 11105 soyuna ait penisilin asilaz geninden yönlendirilmiş evrim yöntemi ile mutant kütüphanelerin oluşturulması, elde edilen mutant kütaphanelerin istenilen özellik yönünden taranması için geçerli tarama/seçme yöntemlerinin geliştirilmesi, iyileştirilmiş enzim özelliklerinin yaban tipi enzim ile karşılaştırılması ve seçilen mutant soy/soylarda meydana gelen mutasyon/mutasyonların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Günümüzde yönlendirilmiş evrim yaklaşımı, enzim özelliklerinin geliştirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mutant kütüphanelerinin oluşturulmasının ardından, seçme ve görüntüleme yöntemlerinin her ikisi de denenebilmektedir. Günümüzde yönlendirilmiş evrim metotlarının genel olarak iki temel kullanım alanı vardır. Bunlardan bir tanesi endüstri, diğeri ise araştırma ve

geliştirmedir. Birinci alanda, yüksek katalitik aktiviteye ve kararlılığa sahip enzimlerin üretilmesi amaçlanmaktadır. İkinci alanda ise çeşitli katabolik yollarda görev alabilen yeni enzimlerin üretilebilmesi için yeni metotlar geliştirilmektedir. Bu sayede evrensel biyoteknolojik bilgi birikiminin oluşturulması amaçlanmaktadır.

Lipaz, esteraz, proteaz gibi çeşitli enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesinde yönlendirilmiş evrim metotlarının geniş ölçüde kullanılmasına karşın, penisilin asilaz özelliklerinin geliştirilmesinde kullanımlarına ilişkin örnek sayısı oldukça azdır. Penisilin asilazın substrat özgüllüğü ve aktivitesinin arttırılmasında klasik rekombinant DNA teknikleri kullanılmakta, enzim üretiminin arttırılmasında besi yeri optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Enzim kararlılığının arttırılmasında protein mühendisliğine ek olarak immobilizasyon yöntemleri de kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak yarı-sentetik antibiyotiklerin üretiminde kullanılan penisilin asilazın özelliklerinin iyileştirilmesinde yönlendirilmiş evrim metotlarının uygulanması, penisilin asilazın "*in vitro*" evrimine yönelik yaklaşımlara katkıda bulunacaktır. Ayrıca tez kapsamında hedeflere ulaşılması halinde, yönlendirilmiş evrim çalışmaları çerçevesinde edinilecek deneyimler ülkemizde bu alanda çalışmak isteyen araştırmacıların çalışmalarına katkı sağlayacak ve yol gösterici olabilecektir. Elde edilmesi olası üretken soylar ve özellikleri iyileştirilmiş enzimler uygulamaya aktarılabilecek yeni seçenekler oluşturacaktır.

2. β-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER, β-LAKTAM ASİLAZLAR ve PENİSİLİN ASİLAZLAR

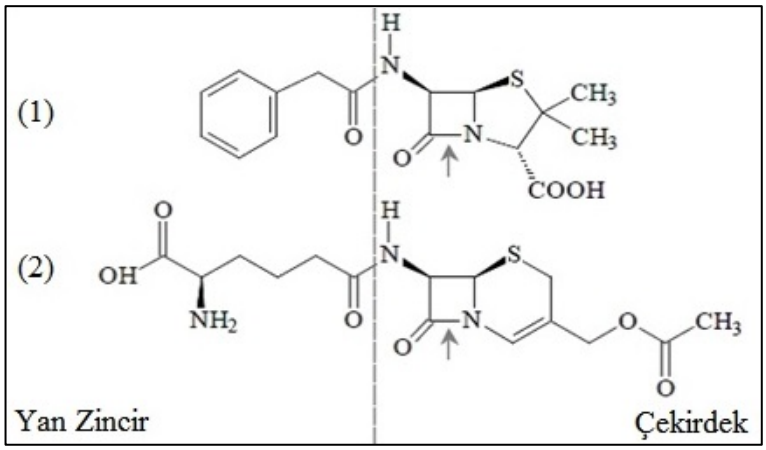
2.1. β-Laktam Antibiyotikleri

1928 yılında Alexander Fleming, *Staphylococcus aureus* bakterisinin büyümesini bir mantar türünün engellediğini keşfetmeden önce, küflerle bulaşa uğramış bakteri kültürlerindeki büyümenin engellendiği çeşitli bilim adamları tarafından da rapor edilmiştir. Daha sonraları Alexander Fleming, mantarlar üzerindeki çalışmalarını derinleştirmiş ve *Staphylococcus aureus*'un büyümesini inhibe eden mantar türünü *Penicillium notatum*, ürettiği anti bakteriyel maddeyi de penisilin olarak adlandırmıştır. Fleming, tavşanların sıvı besinlerinin içerisine penisilini ilave ederek onun toksik olmadığını göstermiş ve aynı zamanda tavşanların göz enfeksiyonunu tedavi etmiştir. Buna rağmen Fleming, penisilini doğal bir antiseptik olarak görmüş ve 1939 yılında, Howard Walter Florey ve Ernst Boris Chain tarafından penisilinin saflaştırılıp, tedavi edici etkisinin kesin olarak ispat edilmesine kadar da bu görüş hakim olmuştur. İkinci dünya savaşı sırasında bu alandaki araştırmalar artarak devam etmiş ve 1942 yılında, bir *Penicillium* küfünün ilk büyük ölçekli fermentasyonu Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiştir. Penisilinin büyük ölçekte üretimi sayesinde savaş sırasında birçok askerin enfeksiyon nedeniyle ölmesinin önüne geçilebilmiştir.

Penicillium chrysogenum türü penisilin G ve diğer beş β-laktam antibiyotiğini üretebilmektedir. Bu antibiyotikler sadece yan zincirlerinde birbirlerinden farklılık göstermektedirler. Araştırmalar spesifik bir antibiyotiğin veriminin, kültür ortamına ilgili antibiyotiğin yan zincirinin bir öncülünün eklenmesi ile artırılabileceğini göstermiştir (örneğin; penisilin G için üretim ortamına fenil asetik asitin eklenmesi gibi). Uygun yan zincir öncüllerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, fermentasyon ortamına fenoksi asetik asitin eklenmesiyle, asit dirençli penisilin V elde edilmiştir [Savidge, 1984].

1948 yılında Giuseppe Brotzu Sardunya Adası'ndaki bir kanalizasyon borusundan *Cephalosporium acremonium* adlı küf mantarını izole ettiğinde, penisilin benzeri yeni bir antibiyotik keşfedilmiş oldu. Bu organizmanın ham filtratları, *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı *Penicillium* türlerinin gösterdiğine benzer

bir aktivite göstermiş ve elde edilen bu yeni anti-bakteriyel maddeye sefalosporin C adı verilmiştir. Antibiyotikler arasındaki bu ilişki onların kimyasal yapıları ile de uyumludur ve hepsi korunmuş bir β-laktam halkasına sahiptirler. Penisilin G'de bu β-laktam halkası bir thiazolidin halkasına, sefalosporin C'de ise altı üyeli başka bir halkaya bağlıdır ve ikisi birlikte β-laktam çekirdeğini oluştururlar. β-laktam çekirdeğine penislin G'de bir fenil asetil grubu, sefalosporin C'de ise bir D-2-aminoadipil grubu bağlanır (Şekil 2.1) [Polderman-Tijmes, 2004]. Yan zincirler, β-laktam antibiyotiklerinin anti-bakteriyel spektrumları ve farmasötikal özellikleri üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptirler. Taşıdıkları çekirdek yapısına göre, β-laktam antibiyorikleri penisilin yada sefalosporin olarak adlandırılırlar. Günümüzde β-laktam antibiyotikleri, bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan en etkili ilaçlardır ve penisilin G'nin keşfinde rol oynadıkları için Fleming, Florey ve Chain 1944 yılında fizyoloji ve tıp alanında Nobel ödülü almışlardır [Polderman-Tijmes, 2004].



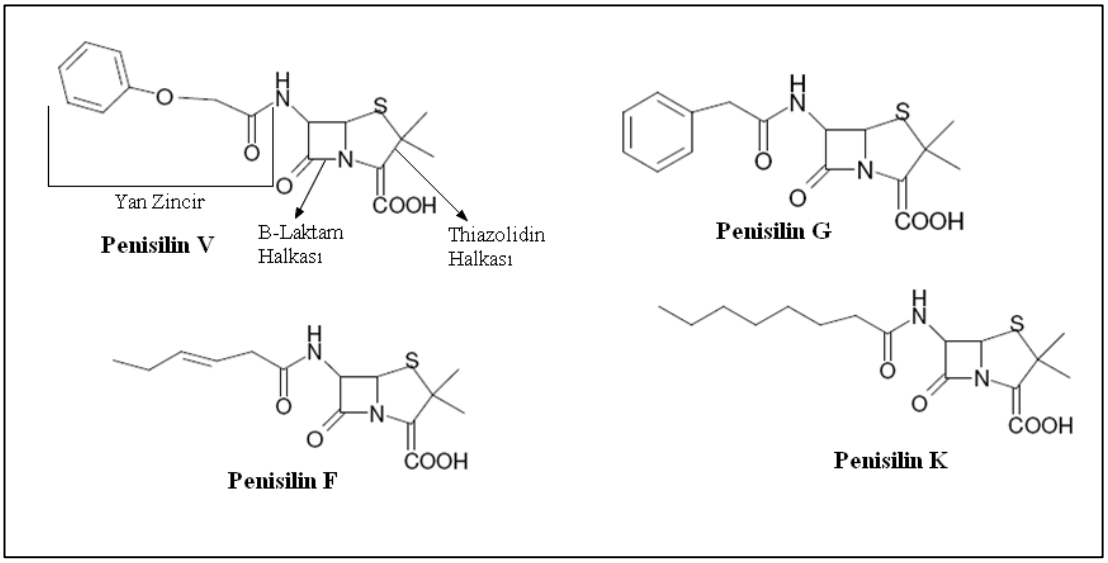
Şekil 2.1: β-laktam antibiyotikleri penisilin G (1) ve sefalosporin C'nin (2) yapısı. Açil gruplar yan zincirleri (sol taraf), halkalı gruplar ise çekirdek yapılarını (sağ taraf) oluşturmaktadır. Oklar farmasötik olarak gerekli β-laktam bağlarını göstermektedir. Yan zincirler ve çekirdekler arasındaki kesikli çizgiler ise β-laktam asilazlar tarafından hidroliz edilen bağları göstermektedir.

2.1.1. Penisilinler

Penisilinler ilk keşfedilen doğal antibiyotiklerdir ve *Penicillium* türlerinden çeşitli formlarda elde edilirler. Doğal ve yarı-sentetik olmak üzere iki farklı çeşidi olmasına rağmen, yapısal olarak bütün penisilin molekülleri bir β-laktam

çekirdeğinden (6-APA) ve bu çekirdeğe bağlı bir yan zincirden meydana gelmektedir. 6-APA çekirdeği L-sistein ve D-valin amino asitlerinden oluşmaktadır.

Kimyasal olarak penisilinler; bir β-laktam halkası, bir thiazolidin halkası ve uygun bir yan zincirden meydana gelmektedir. Yan zincire göre değişik isimler almaktadırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Penisilinlerin genel yapıları.

Doğal penisilinler küflerden fermentasyon yoluyla üretilirken, yarı-sentetik penisilinler 6-APA çekirdeğine farklı açil yan zincirlerin eklenmesiyle elde edilirler. Bu sayede β-laktamazlara karşı dirençli ve geniş anti-bakteriyel spektruma sahip yeni yarı-sentetik penisilinleri elde etmek mümkün olmaktadır.

2.1.2. 6-aminopenisillanik Asit (6-APA)

Farmasötik ürünlerin enzimatik olarak üretilmesi uzun zamandan beri kullanılan bir yöntemdir. Çeşitli antibiyotiklerin ve stereoidlerin üretiminde mikrobiyal dönüşüm reaksiyonları geniş ölçüde kullanılmaktadır [Elander, 2003]. Penisilinler geniş ölçüde kullanılan β-laktam antibiyotikleridir. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmeleri, geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip olmaları ve düşük toksisitelerinden dolayı, dünya çapında üretilen antibiyotiklerin yaklaşık %19'unu penisilinler oluşturmaktadır [Demain and Elander, 1999]. Bununla beraber bu antibiyotiklerin gereksiz kullanımı dirençli patojenlerin gelişmesine neden

olmaktadır. Günümüzde yarı-sentetik antibiyotiklerin kullanılmasıyla bu problemin üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Bu sayede daha az yan etkiye sahip, daha az toksik ve daha geniş spektrumlu antibiyotikler üretilebilmektedir. Yeni geliştirilen bu yarı-sentetik penisilinlerin çoğu 6-APA'dan üretilmektedir. 6-APA, doğal benzil penisilinlerin kimyasal ya da enzimatik deaçilasyonu sonucunda üretilmektedir [Vandamme and Voets, 1974]. 6-APA üretimi için kimyasal metotların kullanımı hem oldukça külfetli hem de piridin, fosfor pentaklorid ve nitrozilklorid gibi zararlı kimyasalların kullanımını gerektirmektedir. Buna karşın enzimatik üretim, bölge ve stereo özgüldür ve reaksiyon koşulları daha uygundur. Ayrıca 6-APA'nın enzimatik olarak üretimi, kimyasal üretime göre daha ucuzdur. Eğer enzimatik 6-APA üretimi fermantasyonla üretilen penisilin G üretimine entegre edilebilirse maliyet daha da aşağılara çekilebilmektedir [Parmar et al., 2000].

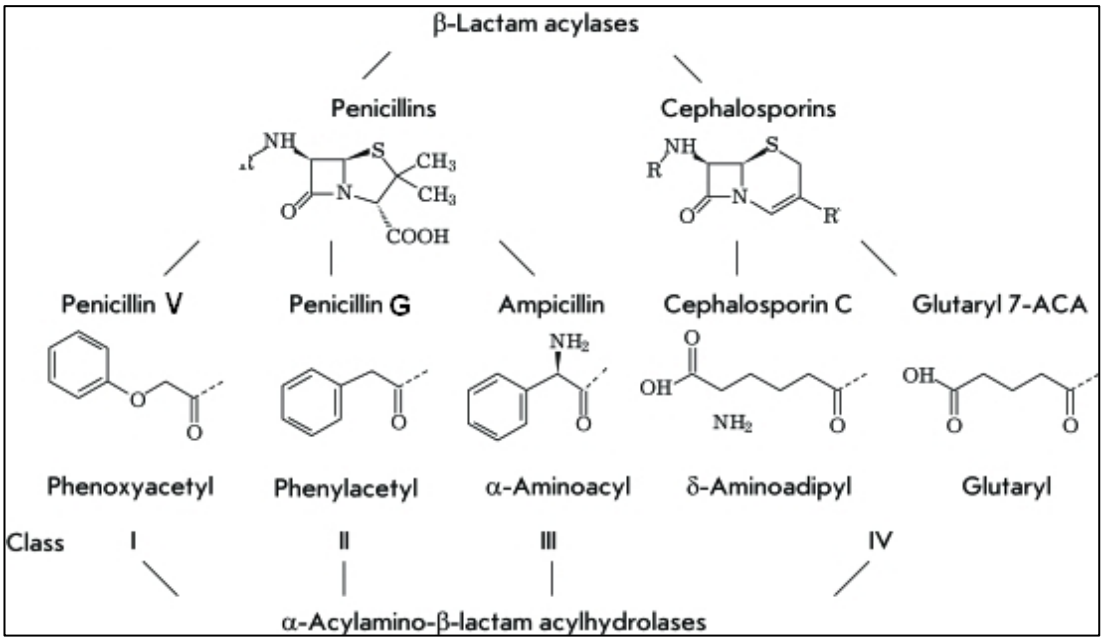
6-APA'nın 2000 yılında dünya genelinde enzimatik olarak yıllık üretimi 9000 ton olarak gerçekleşmiştir [Arroyo et al., 2003]. 6-APA'nın üretim maliyeti, yarı-sentetik penisilinlerin üretimini doğrudan etkilediği için, 6-APA'nın daha az maliyetle daha fazla üretilmesini sağlamak için günümüzde kayda değer bir çaba vardır. Geliştirilmiş özgüllüğe, aktiviteye, saflığa ve kararlılığa sahip ucuz enzimlerin üretilmesi, daha ucuz 6-APA'nın üretilmesini ve dolayısıyla daha ucuz yarı sentetik antibiyotiklerin üretilmesini sağlayacaktır. Penisilinlerden 6-APA'nın üretiminde ve yarı-sentetik penisilinlerin üretiminde penisilin asilazlar kullanılmaktadır [Parmar et al., 2000].

2.2. β-Laktam Asilazlar

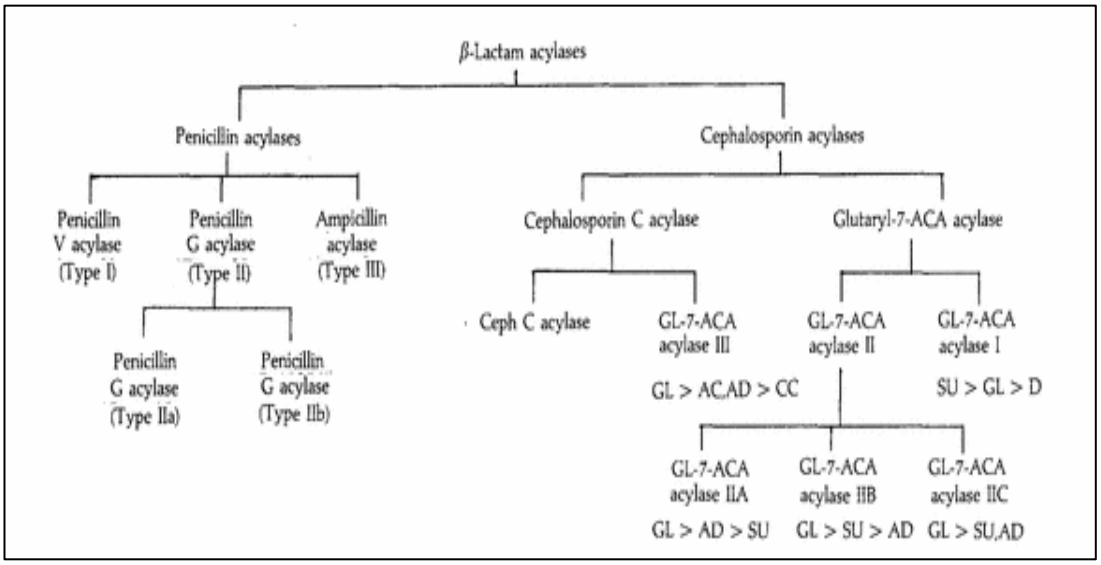
β-laktam asilazlar, β-laktam antibiyotiklerinin yapısında bulunan β-laktam çekirdeği ile karboksilik asit arasındaki amit bağlarını kesen enzimlerdir. Bu gruba ait ilk enzim 1950 yılında *Penicillum chrysogenum* Q176 soyundan izole edilen penisilin G asilaz (PGA) enzimidir. Bundan on yıl sonra aynı enzimin ters reaksiyonla yarı-sentetik β-laktam antibiyotiklerinin oluşumunu katalizleyebildiği bulunmuştur. Günümüzde çeşitli prokaryot türlerinde aynı veya farklı substrat özgüllüğüne sahip ve bu reaksiyonları katalizleyebilen enzimler bulunmaktadır.

β-laktam asilazların klasik sınıflandırılması hidroliz ettikleri β-laktam antibiyotiklerine göre yapılmaktadır. Bu enzimler ilk olarak penisilin ve sefalosporin

asilazlar olarak iki gruba ayrılmışlardır. Bu ayırma, substratların yapısında yer alan β-laktam çekirdeğine göre yapılmıştır. Penisilin asilaz substratlarının yapısında 6-aminopenisillanik asit (6-APA) bulunurken, sefalosporin asilaz substratlarının yapısında 7-aminosefalosporanik asit (7-ACA) ve türevleri bulunmaktadır. Daha sonraları bu enzimler alt sınıflara ayrılmışlardır. Bu sınıflandırma substratların taşıdıkları yan zincirlere göre yapılmıştır (Şekil 2.3) [Polderman-Tijmes, 2004]. Buna göre; Penisilin V asilazlar (PVA; penisilin V'yi hidrolize ederler), Penisilin G asilazlar (PGA; penisilin G'yi hidrolize ederler), Ampisilin asilazlar yada diğer adıyla α-amino asit ester hidrolazlar (AEH; ampisilini hidrolize ederler), Sefalosporin C asilazlar (CA; sefalosporin C'yi hidroliz ederler) ve Glutaril 7-ACA asilazlar (GA; glutaril 7-ACA'yı hidroliz ederler) olarak gruplandırılmışlardır. β-laktam asilazların substrat yapısında yer alan 6-APA ve 7-ACA yapılarına afinitesi az olduğu için alternatif bir isimlendirmeye de gidilmiştir. Bu isimlendirme açil gruplarına göre yapılmıştır ve α-açilamino-β-laktam açilhidrolazlar genel adı ile adlandırılmışlardır. Enzimler bu grup içerisinde 4 sınıfa (I-IV) ayrılmışlardır (Şekil 2.3) [Polderman-Tijmes, 2004]. Bu sınıflandırmada; Penisilin V asilazlar (PVA) Sınıf I içerisine, Penisilin G asilazlar (PGA) Sınıf II içerisine, Ampisilin asilazlar (α-amino asit ester hidrolazlar; AEH) Sınıf III içerisine ve Sefalosporin asilazlar ise Sınıf IV içerisine yerleştirilmişlerdir. Sefalosporin asilazlar, daha sonra ya substrat özgüllüğüne göre çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır ya da gen yapısına, enzim özelliklerine ve molekül büyüklüğüne göre alternatif bir sınıflandırmaya tutulmaktadır. Alifatik amitleri ya da penisilin G analoglarını hidroliz edebilen penisilin G asilazları üretebilen bakteri türlerinin izole edilmesi ile penisilin G asilazlar (Sınıf II) iki alt gruba ayrılmışlardır. Sınıf IIa: aromatik ya da fenilasetil amitleri hidrolize ederler, Sınıf IIb: alifatik amitleri hidrolize ederler (Şekil 2.4) [Deshpande et al., 1994]. Günümüzde β-laktam asilazların sınıflandırılması, enzimlerin amino asit dizilimine, moleküler yapılarına ve kataliz mekanizmasına göre yapılmaktadır. Bununla beraber, literatürde halen substrat özgüllüğüne göre yapılan klasik isimlendirme kullanılmaktadır [Polderman-Tijmes, 2004], [Deshpande et al., 1994], [Tishkov et al., 2010].



Şekil 2.3: β-laktam asilazların klasik ve alternatif sınıflandırılması.



Şekil 2.4: β-laktam asilazların klasik sınıflandırılmasının alternatif gösterimi. Suksinil-7-ACA (SU), glutaril-7-ACA (GL), adipil-7-ACA (AD) ve sefalosporin C (CC).

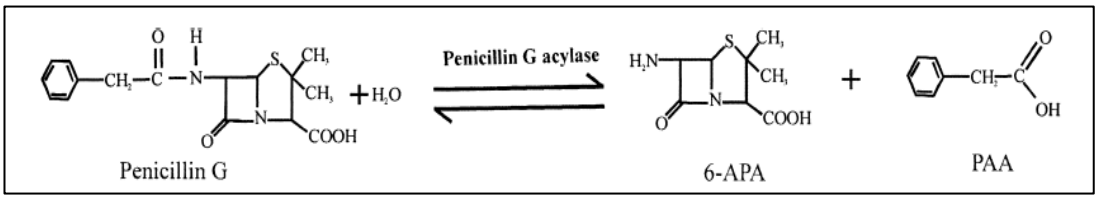
2.2.1. Penisilin Asilazlar

Penisilin asilaz, ilk olarak *Penicillum chrysogenum* Q176 soyundan izole edilmiştir. Günümüzde penisilin asilaz üreticisi çok sayıda mikrobiyal kaynak bilinmekte ve geniş ölçüde çalışılmaktadır. Penisilin asilazların biyoteknolojik

uygulamaları, β-laktam antibiyotiklerin, küçük peptitlerin ve rasemik karışımlardan saf izomerlerin elde edilmesinde kullanılan geleneksel kimyasal yöntemlere ciddi bir alternatif oluşturmuştur. Bununla birlikte penisilin asilazların ana kullanım alanı yarı-sentetik penisilinlerin endüstriyel olarak üretimidir. Penisilin asilazın Enzim Komisyonu tarafından verilen ismi penisilin amidohidrolazdır (E.C. 3.5.1.11), ancak yaygın kullanılan adları, penisilin asilaz ya da penisilin amidazdır. Penisilin asilazlar, substrat özgüllüğüne göre genel olarak üç gruba ayrılırlar. 1) Penisilin G asilazlar (PGA); penisilin G'yi hidrolize ederler, 2) Penisilin V asilazlar (PVA); penisilin V'yi hidrolize ederler, 3) Ampisilin asilazlar; ampisilini hidrolize ederler. PGA ve PVA, 6-APA üretiminde kullanılmaktadırlar [Parmar et al., 2000], [Calleri et al., 2004], [Arroyo et al., 2003], [Giordano et al., 2006].

2.2.1.1. Penisilin G Asilaz

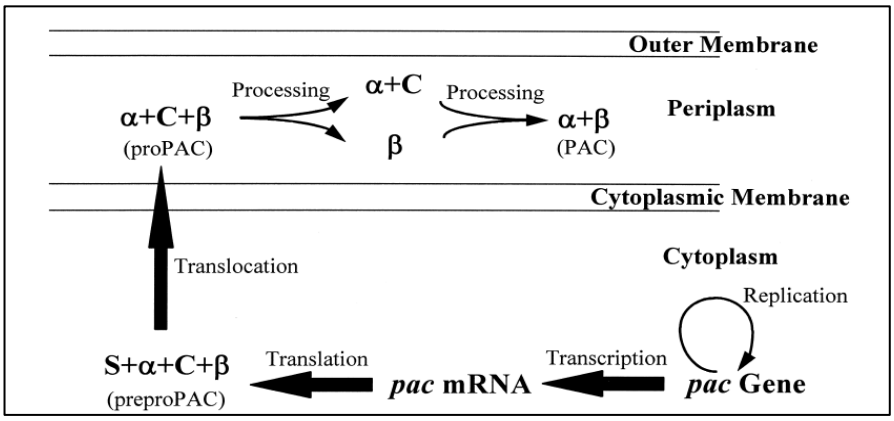
Penisilin G asilaz (PGA) (E.C. 3.5.1.11), β-laktam asilazlar olarak bilinen büyük bir enzim grubunun üyesidir [Diaz et al., 2001], [Wen et al., 2005]. Yarı-sentetik β-laktam antibiyotiklerinin endüstriyel olarak üretilmesinde kullanılırlar [Valle et al., 1991]. Farklı mikroorganizmalardan çeşitli PGA proteinleri tanımlanmasına rağmen, en iyi bilinen ve endüstriyel olarak kullanılan penisilin G asilazlardan birisi *E. coli* ATCC 11105 soyundan elde edilendir. Penisilin G asilaz, penisilin G'yi fenil asetik asit (PAA) ve 6-APA'ya hidroliz etmesine rağmen, bakteriyel antibiyotik direncinde rol oynamaz (Şekil 2.5) [Rajendhran and Gunasekaran, 2004].



Şekil 2.5: Penisilin G asilaz ile penisilin G'nin hidrolizi.

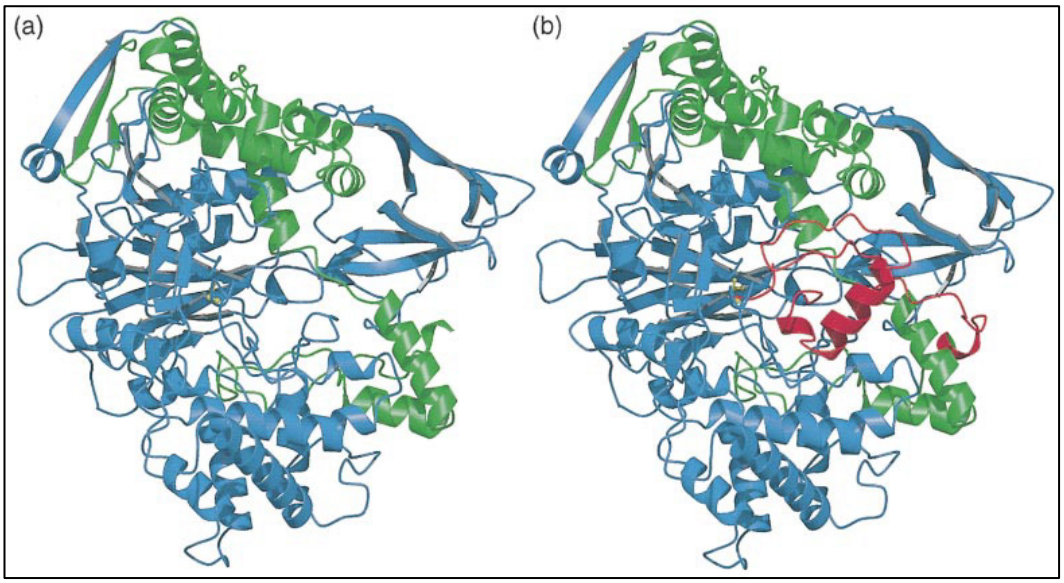
E. coli'de PGA'nın üretimi ve aktif enzim oluşumu, üç temel düzenleyici mekanizma (katabolit represyon, PAA ile uyarım ve sıcaklıkla düzenleme) eliyle transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde kontrol edilir [Valle et al., 1986], [Oh et

al., 1987], [Chou et al., 1999a], [Lindsay and Pain, 1991], [Ignatova et al., 2000a], [Ignatova et al., 2000b], [Xu et al., 2005a], [Xu et al., 2005b], [Pan et al., 2003]. Katabolit represyon ve PAA ile uyarım, PGA sentezinin transkripsiyonel düzeyde kontrolünden sorumluyken, sıcaklıkla düzenleme ise translasyonel ve post-translasyonel seviyede kontrolünden sorumludur. Heterodimer bir yapıya sahip olan PGA, *E. coli*'nin sitoplazmasında tek bir polipeptitden oluşan inaktif öncül polipeptit (preproPAC) olarak sentezlenir. Bu öncül; 26 amino asitlik bir sinyal peptit (1-26 arası amino asitler), 209 amino asitlik bir α alt birim (27-235 arası amino asitler), 54 amino asitlik bir ara peptit (236-289 arası amino asitler) ve 557 amino asitlik bir β alt birim (290-846 arası amino asitler) içermektedir ve yaklaşık olarak 95 kDa büyüklüğündedir [Schumacher et al., 1986], [Sizmann et al., 1990], [Duggleby et al., 1995], [McVey et al., 2001]. Sinyal peptit, proenzimin (preproPAC) periplazmaya translokasyonunda rol oynar ve periplazma içerisine transfer esnasında proteolitik kesime uğrar. Bunun sonucunda α alt birim, ara peptit ve β alt birimden oluşan proPAC meydana gelir. Oluşan proPAC yaklaşık olarak 92 kDa büyüklüğündedir. α ve β alt birimler arasında yer alan ara peptit hem aktif bölgeyi bloke eder hem de proteinin katlanmasını etkiler. Enzimin periplazmada işlenmesi sırasında ara peptit bölgesi kesilerek ayrılır ve iki farklı alt birimden (α ve β) oluşan aktif enzim meydana gelir (Şekil 2.6) [Chou et al., 2000]. Ara peptidin kesilmesi ya otokatalitik bir mekanizma eliyle [Kasche et al., 1999] ya da proteolitik enzimler üzerinden endoproteolitik bir mekanizma yoluyla gerçekleşir [Bruns et al., 1985], [Schumacher et al., 1986] ve kesim sonrası aktif bölge serbest hale gelir. Ara peptidin kesim mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.



Şekil 2.6: *E. coli*'de penisilin G asilazın sentezi ve işlenmesi.
S: sinyal peptit, α: alfa alt birim, C: ara peptit, β: beta alt birim.

Aktif *E. coli* PGA'sı 86 kDa'luk bir heterodimerdir. 24 kDa'luk bir α alt birimden ve 62 kDa'luk bir β alt birimden oluşmaktadır (Şekil 2.7) [Hewitt et al., 2000]. İki alt birim kovalen olmayan bağlarla bir arada tutulmaktadır [Bruns et al., 1985].



Şekil 2.7: PGA'nın üç boyutlu yapısının karton gösterimi. a) Olgun/aktif PGA. α alt birim: yeşil, β alt birim: mavi. b) Öncül PGA. α alt birim: yeşil, β alt birim: mavi, ara peptit: kırmızı. N-terminal nükleofilik serin rezidüsü ise her iki şekilde de sarı renk ile gösterilmiştir.

β-Laktam asilazların genetik ve yapısal karakterizasyonu, bu enzimlerin N-terminal nükleofil (Ntn) hidrolaz süper ailesine ait olduğunu göstermiştir. Bu ailenin üyeleri; N-terminal bölgesinde bir katalitik serin, sistein ya da treonin amino asitlerini içerirler [Brannigan et al., 1995]. Penisilin G asilazın β zincirinin N-terminalinde yer alan serin rezidüsü, aktif merkezde rol alır ve kataliz mekanizması aktif merkezinde serin içeren açil enzim mekanizması ile uyumluluk gösterir [Virden, 1990]. PGA'ın üç boyutlu yapısı bilinmektedir ve enzim Ntn-hidrolaz ailesi içinde sınıflandırılmaktadır [Calleri et al., 2004], [Brannigan et al., 1995].

E. coli W'nin *pac* geni, *hpa* kümesinin yakınında yer alır ve alternatif farklı promotorlar üzerinden monosistronik olarak transkribe edilir. *pac* geninin ekspresyonu fenil asetik asit ve fenoksi-asetik asit ile uyarılır ve metabolik karbohidratlar (ör. glukoz ve fruktoz) ve poli alkoller (ör. gliserol) ile baskılanır. Glukoz ile baskılama siklik adenozin monofosfat (cAMP) reseptör proteini (CRP) bağımlı tipik bir süreçtir ve cAMP eklenmesi ile kısmen üstesinden gelinir. Fenil

asetik asit indüksiyonunda gerekli olan düzenleyici proteinlerin neler olduğu henüz belirlenememiştir [Rajendhran and Gunasekaran, 2004], [Srirangan et al., 2013].

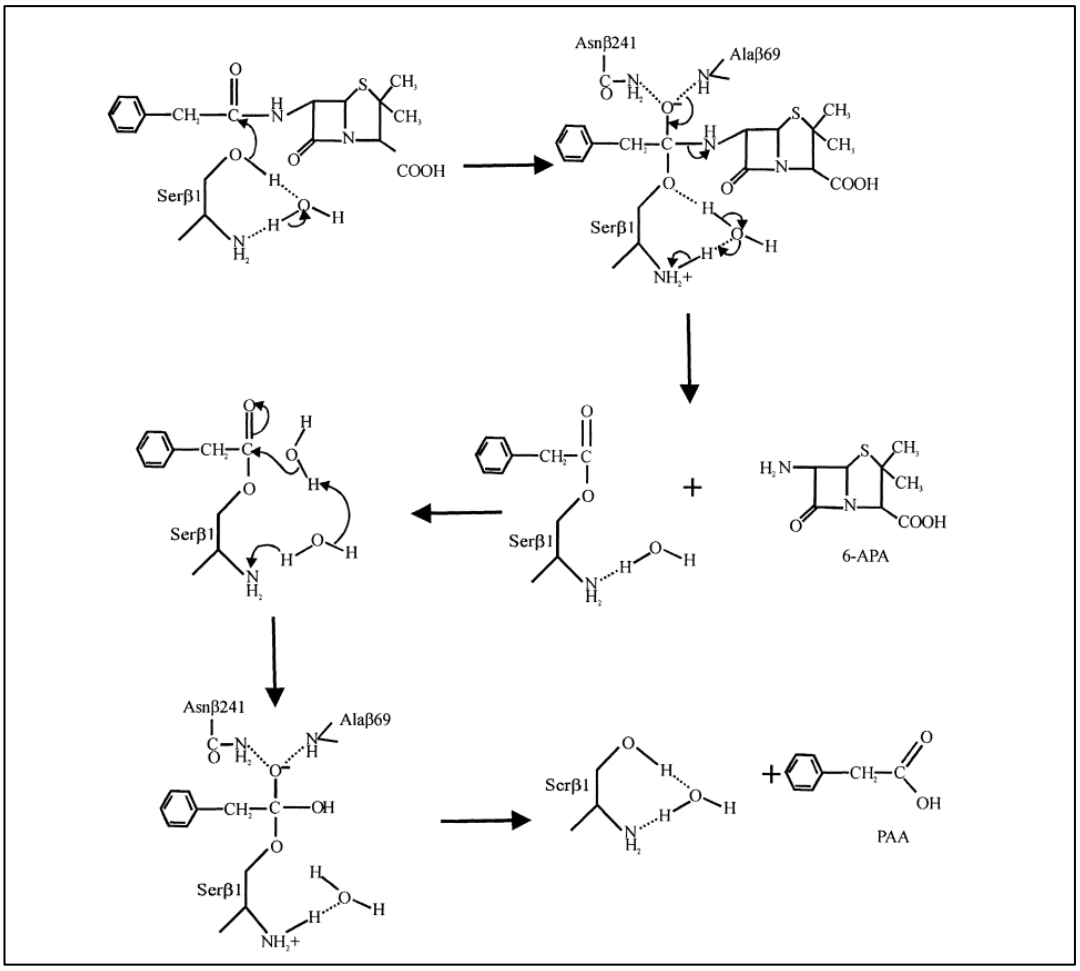
PGA geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir. Farklı PAA amidlerini ve esterlerini hidrolize edebilir. Bunun yanı sıra 4-hidroksifenilasetik asit (4HPA) gibi farklı PAA türevlerini de hidrolize edebilir. Ayrıca tienilasetik asit ve heksanoik asit gibi diğer aromatik ve alifatik asit esterlerini ve amidlerini de hidrolize edebilir. Bu yüzden birçok doğal esterler ve amidler PGA ile hidrolize edilerek merkezi katabolik yolaklarda kullanılırlar. *pac* genine ek olarak β-laktamaz genini içeren *E. coli* soyu karbon kaynağı olarak penisilin G'nin PAA grubunu kullanabilmektedir. Fenilasetillenmiş bileşiklerin parçalanmasında gerekli olan PGA'nın otokatalitik aktivasyonunun sıcaklıkla düzenlendiği düşünülmektedir. Bu otoproteolitik mekanizma 28 ^{o}C'ta daha etkilidir. Bu durum, *E. coli* bu sıcaklığın yukarısındaki sıcaklık değerlerinde büyütüldüğünde, PGA üretiminin neden azaldığını açıklamaktadır. Özellikle 37 ^{o}C'taki enzim üretimi, kayda alınmayacak kadar az miktardadır. Bu yüzden, *E. coli* bağırsak florasından ayrıldığında, düşük sıcaklık yeni çevrenin algılanması için sinyal görevi görecek ve yeni ekolojik çevrede fenil asetillenmiş bileşikler ile karşılaşma PGA'nın aktivasyonuna neden olacak ve aktivite sonucu oluşturulan aromatik asitler karbon kaynağı olarak kullanılabilecektir [Diaz et al., 2001].

2.2.1.2. Penisilin Asilazların Katalitik Mekanizması

X-ışını kristallografi çalışmaları, penisilin asilazların moleküler yapılarının aydınlatılmasını sağlamıştır. PGA'nın yüksek çözünürlüklü kristal yapıları sayesinde, molekülün protein yapısı, substrat bağlanma bölgesi, aktif merkezi ve katalitik mekanizması gibi detay bilgileri ortaya çıkarılmıştır. Enzim, fenil-asetik asit ya da türevlerinin bağlanabildiği bir açil bağlanma bölgesi ile 6-APA ya da başka bir nükleofilin bağlanabildiği bir nükleofil bağlanma bölgesi içermektedir. Aktif bölgesinde, β alt biriminin N-terminalinde yer alan serin rezidüsü önemli bir rol oynamaktadır. Serin rezidüsünün hidroksil grubu ise bir nükleofil olarak hareket etmektedir [Rajendhran and Gunasekaran, 2004].

Penisilin G asilazın katalitik mekanizması serin proteazların reaksiyon mekanizmasına benzer şekilde bir açil-enzim ara ürününün oluşmasını gerekli kılar.

Kısmi alkali pH'da, penisilin G asilaz, penisilin G'yi PAA ve 6-APA'ya hidroliz eder. Bu hidroliz esnasında fenil asetil grubu, 6-APA'dan suya transfer olur (Şekil 2.8) [Rajendhran and Gunasekaran, 2004]. Aktif bölgede yer alan serin rezidüsünün (βSer1) Oγ hidroksil grubu tarafından, amit bağının karbonil karbonuna yapılan bir nükleofilik ataktan sonra, bir kovalen açil-enzim ara ürünü oluşur. Bu ara üründe negatif yüklü oksianyon, oksianyon çukuru rezidüleri βAsn241 ve βAla69 ile hidrojen bağı yapmak suretiyle kararlı hale gelir. Birinci ürün olan 6-APA'nın aktif bölgeden ayrılmasından sonra, açil-enzim kompleksi, su ya da başka bir nükleofilin nükleofilik atağı ile deaçillenir. Bunu takiben ikinci ürün olan PAA ve serbest enzim oluşur. Bütün bu reaksiyon basamakları geri dönüşümlüdür. Penisilin G asilaz aynı zamanda yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerinin üretiminde de kullanılır. Bu durumda enzim, bir β-laktam çekirdeği (6-APA ya da türevleri) ile bir açil grubunun birleşmesini kataliz eder. Reaksiyon asidik pH'da ve suyun az olduğu şartlarda gerçekleşir. Bu birleşme reaksiyonunda, aktive olmuş bir açil verici (genelde bir PAA türevinin metil esteridir ya da bir amid'dir), aktif bölgede yer alan serin üzerinden enzimi açiller ve bunun sonucunda da amonyak ya da metanol açığa çıkar. Daha sonra oluşan açil-enzim kompleksi, yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerini oluşturmak üzere 6-APA ya da 7-aminodeasetoksisefalosporanik asit (7-ADCA) gibi bir β-laktam nükleofili tarafından deaçillenir [Rajendhran and Gunasekaran, 2004], [Srirangan et al., 2013].



Şekil 2.8: Penisilin G'nin, penisilin G asilaz tarafından PAA ve 6-APA'ya hidrolizinin mekanizması.

2.2.1.3. Penisilin Asilazların Mikrobiyal Üretimi

Penisilin asilaz bazı bakteriler, aktinomisetler, mantarlar ve mayalar tarafından hücre içi enzim olarak üretilir. Mikroorganizmalar penisilin asilaz üretimi için geniş ölçüde incelenmiştir. Penisilin asilazın büyük ölçekli üretimi için; *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces lavendulae*, *Achromobacter* sp., *Proteus rettgeri*, *Actinoplanes* sp., *Bovista plumbea*, *Kluyvera atrophila*, *Pseudomonas melanogenum* ve *Penicillium chrysogenum* mikroorganizmaları geniş ölçüde kullanılmaktadır [Parmar et al., 2000], [Wen et al., 2005]. *E. coli* penisilin G asilazı en iyi çalışılan penisilin asilazlardan birisidir. Moleküler ağırlığı 24 kDa ve 62 kDa olan, sırasıyla, α ve β olarak adlandırılan iki alt birimden meydana gelen bir heterodimerdir [Chou et al., 1999a]. Ancak moleküler ağırlıkları, sırasıyla, 23,9 ve 62,2 kDa olan α ve β alt birimlerinden meydana gelen bir rekombinant *E. coli* penisilin G asilazı da rapor

edilmiştir [Vohra et al., 2001]. Moleküler ağırlığı 83,2 kDa olan ve tek bir polipeptit zincirinden meydana gelen bir PVA ise *Fusarium* sp. SKF 235'den elde edilmiştir [Sudhakaran and Shewale, 1995] .

Mantarlardan, mayalardan ve aktinomiseslerden aktif penisilin asilazın üretimi çeşitli besi yerlerinde gerçekleştirilmektedir. *E. coli*'de penisilin G asilaz üretimi genel olarak "corn-steep liquor", pepton, glukoz ve uyarıcı olarak % 0,1-0,2 PAA içeren besi yerinde gerçekleştirilmektedir. *Bacillus megaterium*'da ise penisilin G asilaz üretimi, maya özütü, sükroz ve PAA içeren kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. PAA tuzları ve çeşitli PAA türevleri penisilin asilaz üretiminde uyarıcı olarak kullanılmaktadır. Ancak PAA'nın yüksek konsantrasyonları penisilin asilazın oluşumunu baskılamaktadır. Penisilin V asilaz genel olarak mantarlar ve aktinomisesler tarafından üretilmektedir. Fakat *Pseudomonas acidovorans* gibi bazı bakteriler de endüstriyel ölçekte PVA üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. PVA ayrıca; *Beijerinckia indica* var., *Penicillium* SKB3133, *Fusarium* sp. SKF 235, *Penicillium chryogenum*, ve *Aeromonas* ACY95 tarafından da üretilmektedir. Penisilin V asilazlar genellikle glukoz varlığında katabolik olarak baskılanmaktadır [Parmar et al., 2000].

2.2.1.4. Penisilin Asilazların Saflaştırılması

Penisilin asilazlar stoplazmada sentezlendikten sonra, gram negatif bakteriler tarafından periplazmaya, gram pozitif bakteriler ve mantarlar tarafından ise büyüme ortamına salınmaktadır. Penisilin asilazların saflaştırılması, genellikle birden çok saflaştırma basamağının kullanımını gerekli kılmaktadır. Gram negatif bakterilerden penisilin asilazların saflaştırılması hücre kültürünün santrifüj ile çöktürülüp, hücre peletinin elde edilmesi ile başlamakta ve elde edilen peletin yıkanması, parçalanması ve ortaya çıkan hücre lizatının santrifüj edilerek üst sıvının toplanması ile devam etmektedir. Üst sıvıda bulunan nükleik asitlerin streptomisin sülfat çöktürmesi ile uzaklaştırılmasından sonra, elde edilen üst sıvı içerisinde bulunan enzim amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırmaya uğratılmaktadır. Bu basamağı, amonyum tuzlarını uzaklaştırmak için yapılan "desalting" işlemi ve sonrasında uygulanan çeşitli kromatografi yöntemleri takip etmektedir.

Penisilin asilazların saflaştırılması sırasında, tüm hücre lizatının yerine sferoplastların hazırlanarak periplazmik fraksiyonların kullanılması, işlem karmaşıklığının azaltılmasını sağlaması açısından faydalı olmaktadır. Bununla beraber, bu yaklaşım ile laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda etkili sonuçlar alınmasına rağmen, büyük ölçekli üretimler için aynı şey söz konusu değildir. Bazı durumlarda, kısmi saflaştırılmış enzim sonraki kromatografik saflaştırma basamaklarına tutulmadan doğrudan immobolize edilerek endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Saflaştırma yapılmaksızın *E. coli* hücre lizatlarından enzimi doğrudan elde etmek için immobilize metal afinite membranlarının kullanıldığı immobilizasyon metotları da geliştirilmiştir. Penisilin asilazların geri kazanılmasında ve saflaştırılmasında hemen hemen tüm kromatografi teknikleri başarıyla kullanılmaktadır. Son zamanlarda, *E. coli*'de hücre dışına salgılanan penisilin G asilazı doğrudan hücre kültüründen tek basamakta, yüksek saflıkta ve yüksek verimde saflaştırmak amacıyla, teğetsel akış filtrasyonu anyon değiştirici membran kromatografisi (TFF-AMEC; tangential flow filtration anion exchange membrane chromatography) yöntemine dayanan tek basamaklı bir saflaştırma metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen bu metot, suş geliştirme ve kültürasyon gibi tüm biyolojik süreç basamakları göz önüne alındığında, PGA'nın etkili bir şekilde üretilmesi, toplanması ve saflaştırılması için etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır [Parmar et al., 2000], [Srirangan et al., 2013].

2.2.1.5. Penisilin Asilazların Kullanım Alanları

Endüstride genel olarak yarı-sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin üretiminde kullanılan penisilin asilazlar, peptit sentezi gibi diğer önemli reaksiyonları da katalizleyebilme kabiliyetine sahiptir.

Yarı-sentetik penisilinler doğal penisilin G ve V'ye oranla daha gelişmiş özelliklere sahiptirler. Daha kararlıdırlar, kolay emilirler ve daha az yan etkiye sahiptirler. Ayrıca doğal penisilinlere karşı oluşan mikrobiyal direncin üstesinden gelinebilmesi için pratik bir çözüm sunarlar. Yarı-sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin büyük ölçekli üretimleri için biyoteknolojide kullanılan prosesler, penisilin asilazlar tarafından hidrolize edilen β-laktam çekirdeği içeren D-amino asit

türevleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu dönüşümler termodinamik ya da kinetik olarak kontrol edilen sentez reaksiyonları ile gerçekleştirilmektedir [Arroyo et al., 2003].

Penisilin asilazlar, doğrudan enzimatik sentez ve açil grubu transfer reaksiyonları ile amino asitlerin amino gruplarının korunmasında kullanılmaktadır. Penisilin asilazların bu özelliğinden peptitlerin ve türevlerinin sentezinde yararlanılmaktadır. Örneğin tatlılığı arttırılmış olan aspartamın sentezinde biyokatalizör olarak *E. coli* penisilin G asilazı kullanılmakta, enzimden ayrıca D-fenil dipeptidlerin elde edilmesinde yararlanılmaktadır [Arroyo et al., 2003], [Langen et al., 2000a].

Penisilin asilazların sulu ortamda ve susuz organik ortamda amino asitler, β-amino esterler, ikincil alkoller ve aminler gibi kiral bileşiklerin rasemik karışımlarının ayrılmasında etkili olduğu çeşitli araştırıcılar tarafından gösterilmiştir. Elde edilen saf enantiyomerler biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır. Örneğin, etil-3-amino-4-pentonat'ın rasemik karışımı, *E. coli* penisilin G asilazı kullanılarak enantio seçici açilasyon reaksiyonu ile ayrılmıştır ve S-izomer elde edilmiştir. Elde edilen S-izomer, anti platelet ajanı olan Xemilofiban'ın sentezinde kiral "synthon" olarak kullanılmaktadır [Arroyo et al., 2003], [Langen et al., 2000b].

3. YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM

Enzimlerin endüstriyel biyokatolizörler olarak kullanılabilmeleri için istenilen reaksiyon koşullarına uygun özelliklere (yüksek aktivite, substrat özgüllüğü, organik çözücüye dirençlilik, pH ve sıcaklık kararlılığı) sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte doğal enzimler çeşitli reaksiyon koşullarında kullanılmak için her zaman elverişli değildir. Bu nedenle enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesi ve istenilen reaksiyon koşullarına uygun hale getirilmesi gerekmektedir [Zhao et al., 2002].

Son yıllarda yönlendirilmiş evrim yöntemleri ticari öneme sahip enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde gerek akademik gerekse ticari laboratuvarlar tarafından sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [Patnaik et al., 2002], [Kampen and Egmond, 2000], [Loo et al., 2004], [Arnold and Volkov, 1999], [Stebel et al., 2008], [Powell et al., 2001], [Kuchner and Arnold, 1997]. Bu yaklaşımın geliştirilmesinden önce enzim özelliklerinin iyileştirilmesinde ve yapı-işlev ilişkisinin anlaşılmasında sıklıkla akılcı protein tasarımı kullanılmaktaydı. Günümüzde de halen yaygın olarak kullanılmasına rağmen, akılcı protein tasarımında karşılaşılan bazı sorunlar vardır. Bunlardan en önemlisi enzimlerin yapı ve işlevleri arasındaki ilişki hakkındaki bilgilerimizin sınırlı olmasıdır ki akılcı protein tasarımı enzimlerin yapısının ve katalitik mekanizmasının bilinmesini gerektirmektedir. Buna ek olarak enzim molekülleri reaksiyon ortamında, enzim işlevinde oldukça önemli rol oynayan çeşitli konformasyonların bir karışımı halinde bulunduğu için yapılan mutasyonların etkilerinin tahmin edilmesi oldukça güç olmaktadır [Williams et al., 2004], [Rubingh, 1997], [Chen, 2001], [Bornscheuer and Pohl, 2001].

Akılcı protein tasarımının aksine yönlendirilmiş evrim, enzimin yapı ve işlevi arasındaki ilişkinin bilinmesini gerektirmez. Bunun yerine rastgele oluşturulan mutasyonlara ve oluşan bu mutasyonların seçilmesine dayanmaktadır. İstenilen özelliği elde etmek için gen üzerinde rastgele mutasyonlar oluşturulur ve bu mutant genleri içeren kütüphanelerden istenilen özellik yönünden gelişmiş mutantlar çeşitli seçme ve görüntüleme yöntemleri ile tanımlanır. Bu seçilen mutant soy ya da soylar, bir sonraki mutasyon ve seçim basamağında gen kaynağı olarak kullanılır [Williams et al., 2004], [Rubingh, 1997], [Eijsink, 2005].

3.1. Yönlendirilmiş Evrim Metotları

İstenilen özelliğe sahip enzimleri elde edebilmek için çeşitli yönlendirilmiş evrim metotları ve stratejileri geliştirilmiştir. Kullanılan tekniklerin çeşitli olmasına rağmen, yönlendirilmiş evrimin temel bazı kalıpları vardır. Başlangıç basamağını istenilen enzimi kodlayan yabanıl genin izole edilmesi ve tanımlanması oluşturmaktadır. Daha sonra ilgili gen; hataya eğilimli PCR, DNA karıştırma ya da diğer modern metotlarla rastgele mutasyona uğratılır. Elde edilen mutant gen kütüphanesi uygun bir ekspresyon sistemi içine yerleştirilir ve istenilen özelliğe sahip soylar; yüksek hacimli görüntüleme, katı faz dijital görüntüleme vb. tekniklerle tanımlanır. İstenilen özelliği sergilemeyen soylar devre dışı bırakılırken, istenilen özelliğe sahip enzimleri üreten soylar ve genler bir sonraki evrim basamağında kaynak/kalıp olarak kullanılır. Günümüzde bu alandaki gelişmelere paralel olarak enzim özelliklerinin geliştirilmesinde çeşitli yönlendirilmiş evrim metotları kullanılmaktadır [Kaur and Sharma, 2006], [Arnold and Volkov, 1999], [Jaeger et al., 2001], [Wang et al., 2006], [Chusacultanachai and Yuthavong, 2004], [Labrou, 2010].

3.1.1. Rekombinasyona Dayanmayan Yönlendirilmiş Evrim Metotları

3.1.1.1. Hataya Eğilimli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Error-Prone PCR)

Moleküler çeşitliliğin farklı yollarla oluşturulabilmesine karşın, bunun için kullanılan ilk yöntem hataya eğilimli PCR'dır [Kaur and Sharma, 2006], [Patrick and Firth, 2005], [Jaeger et al., 2001], [Wang et al., 2006]. Bu tekniğin temelinde hata onarım özelliği bulunmayan termostabil polimeraz enziminin kullanılması yatmaktadır. Örneğin termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen *Taq* polimeraz, yeni sentezlenmekte olan DNA zincirine her seferinde nükleotit başına 0.1×10^{-4} ile 2×10^{-4} sıklığında yanlış nükleotit eklemekte ve AT/GC transisyonları ile AT/TA transversiyonlarına neden olmaktadır [Zhou et al., 1991]. *Taq* polimerazın kendiliğinden hata oranı, reaksiyon karışımındaki $MgCl_2$

konsantrasyonu arttırılarak, reaksiyon karışımına $MnCl_2$ ya da çeşitli alkoller ilave edilerek, eşit olmayan konsantrasyonlarda nükleotitler kullanılarak ve nükleozit analoglarının trifosfat türevlerinin karışımları kullanılarak arttırılmaktadır [Kaur and Sharma, 2006], [Patrick and Firth, 2005], [Jaeger et al., 2001], [Vanhercke et al., 2005], [Leung et al., 1989], [Cadwell and Joyce, 1992], [Cadwell and Joyce, 1994], [Xu et al., 1999], [Lin-Goerke et al., 1997], [Claveau et al., 2004]. Benzer şekilde mutasyon oranını arttırmaya yönelik olarak üre varlığında çeşitli alkol türevleri kullanılarak yapılan hataya eğilimli PCR çalışmalarında, mutasyon oranının arttığı gözlenmiştir [Claveau et al, 2004]. Üre, izopropanol, propan-1-ol ve bütan-1-ol'ün varlığında polimeraz, kritik bir konsantrasyona kadar aktif kalıp, bu konsantrasyonun dışında geri dönüşümsüz şekilde inhibe olmaktadır. Bu koşullar altında normal hataya eğilimli PCR'da görülen A ve T yer değişiminin aksine, alkol aracılı hataya eğilimli PCR'da G ve C yer değiştirmesi meydana gelmektedir. Alkolün polimerazın kararlılığını kısmi olarak etkileyerek hata oranını arttırdığı belirtilmektedir. *Taq* polimeraz gibi, son zamanlarda geliştirilen Mutazym DNA polimeraz da yüksek hata oranına sahiptir. Bu enzim GC/AT transisyonuna ek olarak, GC/TA transversiyonunu oldukça yüksek oranda gerçekleştirmekte ve hatalı nükleotitleri yeni sentezlenmekte olan DNA'ya $\pm 3.3. \times 10^{-4}$ sıklığında eklemektedir. Neredeyse üç kat daha fazla G ve C mutasyonları oluşturabilmektedir [Vanhercke et al., 2005].

3.1.1.2. Rekombinasyona Dayanmayan Diğer Yönlendirilmiş Evrim Metotları

Hataya eğilimli PCR yönteminin yanı sıra literatürde yer alan ve rekombinasyona dayanmayan yönlendirilmiş evrim metotlarından birisi, mutasyonların belirli bir gen parçasında oluşturulduğu kaset mutagenezi (cassette mutagenesis)'dir. Bu yaklaşımda mutasyona uğratılan kısa gen parçaları enzimin önemli domainlerine aittir. Rastgele nokta mutasyonları taşıyan sentetik oligonükleotitler sentezlenerek, kısa gen parçalarının çoğaltılmasında kullanılır [Kaur and Sharma, 2006], [Jaeger et al., 2001], [Kuchner and Arnold, 1997].

Hataya eğilimli PCR yönteminde rastgele nokta mutasyonları oluşur. Bununla beraber, hedef proteindeki tüm amino asitler eşit oranda değişikliğe uğratılamaz. Bunun asıl nedeni genetik kodun dejenere olmasıdır. 20 amino asidi kodlayan 61 kodon vardır, 3 kodon ise dur kodonudur. 20 amino asidin sadece 2 tanesi tek bir

kodon tarafından ifade edilir. Bunlar UGG ile kodlanan triptofan ve AUG ile kodlanan metiyonin amino asitleridir. Bunun yanında lösin, serin ve arjinin 6 farklı kodon tarafından kodlanmaktadır. Bu sebeple hataya eğilimli PCR ile gerçekleştirilen tüm baz değişikliklerinin yaklaşık üçte biri, amino asit değişikliği ile sonuçlanmaz. Ayrıca tek bir kodonda 2 ya da üç baz değişikliğinin olması oldukça düşük bir ihtimaldir. Üçlü kodonda 1 baz çiftinin değiştirilmesi sonucu 9 farklı kodon oluşturulabilir. Bu nedenle enzimin verilen pozisyonunda az sayıda amino asit değişikliğe uğratılabilir. Bölgeye özgül doyurma mutagenezi (Site-specific saturation mutagenesis) yöntemi ile bu problemin kısmen üstesinden gelinebilir. Bu yöntemle önceden belirlenen herhangi bir bölgedeki tüm amino asitler değiştirilebilir. Site-specific saturation mutagenesis, belirli kodon pozisyonlarında nükleozit fosforamidlerin (dA, dC, dG ve dT) eşit oranlarda kullanılmasıyla sentezlenen mutajenik primerler eliyle gerçekleştirilir. Bununla birlikte bazı mutant populasyonlarında belirli nükleotitlerin öne çıktığına yönelik bir kanı oluşmuştur. Bu durum, oligonükleotit sentezi sırasında nükleozit fosforamidlerin konsantrasyonları değiştirilerek ortadan kaldırılabilir [Jaeger et al., 2001].

Hataya eğilimli PCR metodu bazı kısıtlamalara sahiptir. Birbirine komşu olan noktalarda mutasyonlar nadiren meydana gelir. Ayrıca kullanılan *Taq* polimeraz (A/T yada T/A yer değiştirmelerini daha sık yapar) sınırlı mutasyon frekansına ve düşük ürün verimine sahiptir. Dizi doyurma mutagenezi (SeSaM; sequence saturation mutagenesis) bu sınırlamayı ortadan kaldırmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. SeSaM yönteminde evrensel bir baz, mutasyon girişini sağlamak üzere kullanılır. Yöntem 2-3 gün süren dört basamaktan meydana gelir. Bu basamaklar sırayla; rastgele uzunluktaki DNA parçalarının oluşturulması, DNA parçalarının üniversal baz deoksiinozin kullanılarak terminal transferaz aracılığıyla enzimatik olarak uzatılması, tek zincirli kalıp DNA kullanılarak tam uzunluktaki genin sentezlenmesi ve üniversal bazlar ile standart nükleotitlerin yer değiştirmesi şeklinde gerçekleşir. Üniversal bazın seçici olmayan baz eşleşmesi yapması nedeniyle, hedef dizide her bir nükleotit pozisyonunda mutasyonlar meydana gelebilir [Kaur and Sharma, 2006].

3.1.2. Rekombinasyona Dayalı Yönlendirilmiş Evrim Metotları

3.1.2.1. DNA Karıştırma (DNA Shuffling)

DNA karıştırma yöntemi, "*in vitro*" rekombinasyona dayanan bir metottur ve proteinlerin işlevlerini geliştirmek için onları kodlayan genlerde blok mutasyonlar oluşturmak amacıyla geliştirilmiştir [Stemmer, 1994]. Genel olarak üç basamaktan meydana gelmektedir. İlk olarak küçük DNA parçaları oluşturmak için genler DNaz I ile enzimatik kesime uğratılır ve 10-50 bç uzunluğunda çift zincirli DNA parçaları elde edilir. Daha sonra oluşan bu çift zincirli DNA parçaları denatüre edilerek, tam bir gen elde etmek amacıyla rastgele hibritlenerek primer içermeyen PCR ile çoğaltılır. Seksüel PCR sadece bu DNA parçalarını yeniden birleştirmez, aynı zamanda çok düşük oranlarda nokta mutasyonlarına neden olur. *Taq* DNA polimeraz çok küçük DNA parçalarında % 0.7'ye kadar nokta mutasyon oranı sağlar. Eğer *Pfu* gibi hata düzeltme özelliği olan bir enzim kullanılırsa, daha düşük mutasyon oranı elde edilir. DNA karıştırmanın son basamağında, rekombinasyona uğratılmış gen uygun primerler kullanılarak normal PCR reaksiyonu ile çoğaltılır ve uygun konakçıya aktarılarak istenilen özelliği sergileyen soylar çeşitli seçim yöntemleri ile seçilir. İstenen özelliği taşıyan soylar daha sonraki DNA karıştırma basamaklarında gen kaynağı olarak kullanılır. [Bacher et al., 2002], [Reid, 2000].

DNA karıştırma (DNA shuffling) metodunun geliştirilmesi ile yönlendirilmiş evrim yaklaşımında yeni bir atılım yapılmıştır [Bacher et al., 2002], [Yuan et al., 2005], [Wang et al., 2006], [Harayama, 1998], [Reid, 2000]. DNA karıştırma yönteminden önce, hataya eğilimli PCR ve kaset mutagenezi yöntemleri başlıca metotlar olarak öne çıkmaktaydı. Bu tekniğin geliştirilmesi, hataya eğilimli PCR'ın bazı dezavantajlarının üstesinden gelinmesini sağlamıştır. Hataya eğilimli PCR ile gerçekleştirilen nokta mutasyonları eliyle, devam eden dizi evrimi için gerekli olan blok değişikliklerinin gerçekleşmesi oldukça kademeli bir şekilde olmaktadır. Ek olarak hataya eğilimli PCR, ancak birkaç mutasyon döngüsü yapıldığında kullanışlı olmaktadır. Çok sayıda mutasyon döngüsü yapıldığında ise sınırlayıcı olmaktadır. Mutajenik PCR ile oluşturulan kütüphanenin başlangıç populasyonu %70-99 oranında işlevsel olmayan ürünleri veren soyları içerirken, DNA karıştırma ile oluşturulan soyların çoğu işlevsel ürünler vermektedir [Kaur and Sharma, 2006].

Biyoteknolojik olarak kullanımının ötesinde, DNA karıştırma yöntemi doğal rekombinasyonun ve yeni proteinlerin oluşumunda rekombinasyonun katkısının olup olmadığının anlaşılmasında kullanılabilir. Bu bakımdan DNA karıştırma yöntemi sadece birbirleri ile yakın ilişkili genlere değil, aynı zamanda filogenetik olarak ilişkili ancak birbirleri ile % 40 oranına kadar farklılık gösteren genlere de uygulanabilmektedir. Bu durumda yöntem aile karıştırma (family shuffling) olarak adlandırılmaktadır [Bacher et al., 2002]. Aile karıştırma yöntemi ile aynı gen içinde daha faydalı mutasyon oluşturulabilir ve protein fonksiyonu daha hızlı bir şekilde değiştirilebilir. Ancak bu durum eğer mutant alleller sinerjik olarak hareket ederlerse doğrudur. Eğer mutant alleller, nötr ya da birbirini engelleme eğiliminde ise rekombinasyona bir faydası olmayacaktır.

3.1.2.2. Rekombinasyona Dayalı Diğer Yönlendirilmiş Evrim Metotları

DNA karıştırma yöntemi büyük miktarda kalıp DNA gerektirdiği için bu sorunun üstesinden gelebilmek amacıyla kademeli uzatma işlemi (StEP; staggered extension process) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem DNaz kesimi gerektirmez, kimerik genler kalıp değiştirilerek oluşturulur. Kalıp diziler tekrar eden denatürasyon döngüleri üzerinden ve kısa süreli tutunma ve uzama döngüleri ile sentezlenir. Her bir döngüde, uzayan parçalar komplementerlik gösterdiği kalıplara tutunarak biraz daha uzarlar. Bu durum tam gen dizisi elde edilinceye kadar devam eder [Kaur and Sharma, 2006], [Jaeger et al., 2001].

DNA karıştırma yöntemi yalnızca dizi benzerliği görülen bölgelerde rekombinasyona izin vermektedir ve DNA parçaları birbirine tutunmak için yeterince büyük olduğu zaman ana dizinin kalıpları, kuşak/soy dizilerde korunmuş olma eğilimindedir. Buna alternatif olarak amino asitlerin bağımsız rekombine edilmesini sağlayan sentetik karıştırma (synthetic shuffling) yöntemi geliştirilmiştir. İki ana gende bulunan bütün varyasyonları kodlayan bir oligonükleotit serisi oluşturulur. Genler arasındaki dizi farklılıkları dejenere oligonükleotitler ya da alternatif olarak dejenere olmayan oligonükleotitler kullanılarak oluşturulur. Bu yöntem amino asitlerin ayrı ayrı çeşitlenmesini sağlayarak, genlerin bağımsız olarak rekombinasyonuna izin vermektedir [Kaur and Sharma, 2006], [Jaeger et al., 2001].

Random-priming recombination yönteminde, kalıp dizi ile rastgele eşleşen çok sayıda kısa DNA parçaları oluşturmak için, rastgele oligonükleotit primerleri kullanılır. Bu DNA parçaları, bir seri denatürasyon, tutunma ve sentez reaksiyonlarıyla tam uzunluktaki mutant geni oluşturmak için yeniden bir araya getirilir. Bu işlem esnasında rastgele dizi primerlerinin yanlış eşleşme yapmalarından dolayı ek nokta mutasyonları meydana gelmektedir. Rekombinasyonun sıklığı ve bağımsız hata oranı, primerlerin konsantrasyonları ile uzunluklarının, reaksiyon zamanının ve tutunma sıcaklığının değiştirilmesi ile arttırılabilir ya da azaltılır [Jaeger et al., 2001].

In vitro heterodupleks oluşumu (*in vitro* heteroduplex formation) ve *in vivo* tamir metodu (*in vivo* repair method), tüm operonların ve büyük genlerin rekombinasyonu için etkili bir araçtır. İki yakın ilişkili DNA dizisinden oluşan bir heterodupleks *in vitro*'da oluşturulur ve daha sonra bakteri hücresi içine aktarılır. Yanlış eşleşme bakteri hücresi içinde doğal DNA tamir mekanizması ile tanınır [Jaeger et al., 2001].

Şimdiye dek tanımlanan tüm *in vitro* rekombinasyon metotları, hedef dizilerde yüksek DNA homolojisi gerektirmektedir. Diğer taraftan rekombinasyon olayları ya sadece homoloji bölgelerinde meydana gelecek ya da hiçbirinde meydana gelmeyecektir. Dizi homolojisinden bağımsız olarak birleşmiş gen parçalarının kütüphanelerini oluşturmak için, hibrit enzimlerin oluşturulması için arttırarak kesme yöntemi (ITCHY; incremental truncation for the creation of hybrid enzymes) olarak adlandırılan yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yöntemde baz çiftlerinin iki atasal genin uçlarından Ekzonükleaz III kullanılarak kademeli şekilde uzaklaştırılması sonucu giderek kısalan genleri içeren kütüphaneler hazırlanır. Bir genin 5'-ucundan kesilmiş parçaları ile diğer genin 3'-ucundan kesilmiş parçaları, kimerik dizi kütüphaneleri oluşturmak için birleştirilir. Bu kimerik diziler daha sonra eksprese edilir ve görüntülenir ve artmış enzim aktivitesi sergileyenler seçilir. Bu metot, DNA dizi homolojisinden bağımsız olarak üst üste binmiş 5' ve 3' gen parçalarından gen füzyonlarının oluşturulmasına ve N- ve C-terminal uçları farklılaşmış işlevsel polipeptitlerin oluşmasına izin verir [Jaeger et al., 2001], [Kaur and Sharma, 2006].

Bu yöntemlere ek olarak geliştirilen ve çeşitli araştırıcılar tarafından kullanılan; SCRATCHY, SHIPREC, IVC, RACHITT, OCM, SCOPE, ADO, CLERY, SISDC, Codon Shuffling ve *in vivo* DNA Shuffling gibi yönlendirilmiş evrim metotları da bulunmaktadır [Williams et al., 2004], [Stebel et al., 2008].

3.2. Mutant Kütüphanelerin Taranmasında ve Seçilmesinde Kullanılan Yöntemler

Yönlendirilmiş evrim metotları, büyük mutant kütüphaneleri içinden istenilen özelliği sergileyen varyantların seçilebilmesini sağlayan metotlara bağımlı olduğu için, çeşitli seçim yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Tipik olarak her bir yönlendirilmiş evrim metodu kendisine ait bağımsız bir tarama yöntemini gerekli kılmaktadır ve genellikle böyle bir metodun tasarlanması oldukça zaman almaktadır [Schmidt-Dannert, 2001], [Arnold and Georgiou, 2003].

Mutant kütüphanelerin enzim aktiviteleri genellikle, gerçekleşen reaksiyon sonucu ortaya çıkan renkli ya da floresan ürünün belirlenmesine dayalı doğrudan ölçümle ya da katı-faz ölçümlerle (agar veya filtre üzerinde) belirlenmekte, bu amaçla çok kuyulu mikroplakalar kullanılmaktadır. Bazı durumlarda istenen yeni katalitik aktivitenin belirlenmesi ekspresyon konakçısının fenotipine doğrudan bağlanabilir. Örneğin konakçının oksotrof özelliği ile bir antibiyotiğe ya da sitotoksik bir maddeye karşı dirençliliği seçimde kullanılabilir [Olsen et al., 2000]. Bu türden bir seçim, yaklaşık 10^6'dan fazla üyesi bulunan kütüphanelerin taranmasına izin vermektedir. Bununla birlikte, mikrobiyal metabolizmanın değişen çevre koşullarına yüksek uyum yeteneği nedeniyle konakçıya dayalı bu seçim yöntemleri bazen kullanılamamaktadır.

Kolonilerin agar ya da filtreler üzerinde seçilmesi, büyük kütüphanelerin hızlı bir şekilde taranmasına izin vermektedir. Tipik olarak mutantlar, enzimatik reaksiyon sonucu substratın parçalanması ve ürün oluşumu sonucunda pH'da beliren değişimin bir pH indikatörü kullanılarak belirlenmesi ile seçilmektedir. Bunun yanı sıra renkli ya da floresan ürünün oluşumuyla ve agar üzerinde şeffaf zonun oluşumuyla da seçim yapılabilmektedir. Günümüzde, çoğu katı faz tarama metotları katalitik aktivitenin hassas bir şekilde ölçülmesinde eksik kalmaktadır ve bu yüzden bu tür tarama yöntemleri yönlendirilmiş evrimin daha çok birinci basamağı için uygundur [Schmidt-Dannert, 2001]. Son zamanlarda daha hassas bir tarama için yüksek kapasiteli floresan dijital görüntüleme yöntemi geliştirilmiştir. Dijital görüntüleme yöntemi, eğer uygun floresan ya da kromojenik bir substrat kullanılabilirse büyük kütüphanelerin kantitatif katı-faz görüntülenmesi için oldukça etkili bir tekniktir. Örneğin Kaliforniya merkezli bir şirket olan KAIROS firması katalitik aktivitelerin

yönlendirilmiş evrimi için yüksek kapasiteli spektroskopik katı-faz dijital görüntüleme metotları ve teknolojilerini geliştirmektedir.

Mikroplaka okuyucuları kullanılarak kantitatif kolorimetrik ya da florometrik yöntemler, substratın erişilebilirliği ve enzimin eksprese edildiği yere bağlı olarak kültür üst sıvısında ya da tüm hücre düzeyinde uygulanabilmektedir. Oldukça zaman alan yöntemler olmasına rağmen, bu metotlar, reaksiyon koşullarının geliştirilmek istenen işleve göre uyarlanabilmesi avantajına sahiptir. Bu yöntemler genellikle substrat analoglarına uygulandığı için, ilgili enzimin substrat profili çıkartılmalıdır. Ayrıca seçmeye yönelik bir diğer özelliğin kullanılamadığı koşullarda, sıcaklık kararlılığı gibi diğer önemli özelliklerden yararlanılabilir.

Enzim kütüphanelerinin görüntülenmesi için mikrobiyal hücrelerin ve fajların yüzeyine bağlanan proteinlerin görüntülenmesinde kullanılan teknolojilerin temel alındığı faj ve hücre yüzeyi görüntüleme yöntemleri de geliştirilmiştir [Kim et al., 2000], [Jung et al., 2003], [Cho et al., 2002], [Chen and Georgiou, 2002], [Verhaert et al., 2002], [Fernandez-Gacio et al., 2003]. Öte yandan yüzeye bağlı büyük protein kütüphanelerinin hızlı ve etkili bir şekilde görüntülenmesi için, floresan ile aktive edilmiş hücreleri sınıflandırma (FACS; fluorescence-activated cell sorting) yöntemi oldukça kullanışlı bir diğer yöntemdir [Taylor et al., 2001], [Olsen et al., 2000], [Aharoni et al., 2005].

Bütün bu yöntemlere ek olarak; ribozom gösterimi, mRNA-peptit füzyonu, plazmit gösterimi ve *in vitro* compartmentalizyon gibi bazı yöntemler de mutant kütüphanelerin taranmasında araştırıcılar tarafından kullanılmaktadır. [Lin and Cornish, 2002], [Boersma et al., 2007], [Taylor et al., 2001].

Substrat dönüşümünün hassas bir şekilde tespit edilebilmesinde kullanılan high-throughput (yüksek çıktılı) yöntemler, çoğu katalitik işlevin yönlendirilmiş evrimi için gereklidir. Günümüzde, bazı floresan-temelli teknikler, HPLC, GC ve kapiler elektroforez teknikleri enzim aktivitelerinin high-throughput taranması için kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç sanayinin ve genom dizilemenin artan high-throughput tarama ihtiyaçları için geliştirilen yeni metot ve araçlar daha küçük ve daha otomatize edilmiş high-throughput tarama yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır [Schmidt-Dannert, 2001].

3.3. Enzim Mühendisliğinde Yönlendirilmiş Evrim Uygulamaları ve Penisilin Asilaz ile Yapılmış Mutagenez Çalışmaları

Enzim özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılan akılcı tasarım yöntemlerine alternatif olarak son yıllarda uygulamada geniş yer bulan yönlendirilmiş evrim metotları, enzim özelliklerinin rastgele mutasyonlar eliyle geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yönlendirilmiş evrimde akılcı tasarımdan farklı olarak, enzim yapısının ve enzim-substrat etkileşimlerinin bilinmesine gerek yoktur. Aksine mutant genlerin dizilenmesi ve mutant enzimlerin kinetik parametrelerinin belirlenmesi enzim yapısı ve işlevi hakkında bilgi elde edilmesine katkı sağlayabilmektedir [Rajendhran and Gunasekaran, 2004].

Günümüzde yönlendirilmiş evrim metotlarının lipaz, esteraz, proteaz gibi çeşitli enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesinde geniş ölçüde kullanılmasına karşın, penisilin asilaz enzimi özelinde literatürdeki rapor sayısı oldukça sınırlıdır [Zheng et al., 2003], [Jager et al., 2007]. Penisilin asilaz enziminin substrat özgüllüğü ve aktivitesinin arttırılmasında klasik rekombinant DNA teknikleri (ör. yönlendirilmiş mutagenez) kullanılmakta [Vohra et al., 2001], [Panbangred et al., 2000], [Chou et al., 1999b], [Krzeslak et al., 2009], enzim üretiminin artırılmasında ise besi yeri optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır [Yang et al., 2006], [Rajendhran et al., 2002].

E. coli ve *P. rettgeri*'nin penisilin asilaz üreten soyları, büyümeleri için penisilin asilaz üretiminin gerekli olduğu çevresel koşullara maruz bırakılmıştır. Azot kaynağı olarak farklı amidleri kullanabilen rastgele mutantlar izole edilmiştir [Daumy et al., 1985]. Hücre içinde gerçekleşen deneysel evrimi takiben, konstitütif ve katabolit-baskılanmış mutantlar izole edilmiş ve mutant penisilin asilazın spesifik aktivitesinin kayda değer bir şekilde arttığı görülmüştür.

Başka bir çalışmada *E. coli*'nin *pac* geni mutasyona uğratılmış ve *leu*$^-$ hücrelere aktarılmıştır. Daha sonra transforme edilmiş hücreler lösin kaynağı olarak glutaril-(L)-lösin içeren minimal besi yerine aktarılmış ve burada büyüyebilen mutantlar izole edilmiştir. Mutant penisilin asilaz enzimi, glutaril-(L)-lösini yeni substrat olarak hidrolize edebilme kabiliyetindedir [Forney et al.,1989].

Benzer şekilde *pac* geni, kendiliğinden yüksek oranda mutasyona uğrayabilen *E. coli* mut soyu aracılığı ile mutasyona uğratılmıştır. D-(-)-α-aminofenilasetil-(L)-

lösini (APAL; ampisilin ve sefaleksinin açil grup analoğudur) substrat olarak kullanabilen mutantlar seçilerek izole edilmiştir. En iyi mutantın 10 kez yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [Forney and Wong, 1989].

K. citrophila soyuna ait *pac* genini taşıyan plazmit, *E. coli* (mutT, mutD, *leu*$^-$) soyu içine aktarılmıştır ve lösin kaynağı olarak adipil-L-lösin ya da τ-(D)-aminoadipil-L-lösin içeren minimal besi yerinde üreyebilen mutantlar seçilerek izole edilmiştir [Rao et al., 1994].

Niersbach ve arkadaşları yeni substrat özgüllüğüne sahip bir *E. coli* penisilin asilaz mutantı izole etmişlerdir. N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG)'in kullanıldığı kimyasal mutagenez ile elde edilen mutant penisilin asilaz, pithalil-L-lösin ve pithalil-glisil-L-prolini yeni substratlar olarak hidrolize edebilmektedir. Fakat penisilin G ve sefalosporin G'yi hidrolize edememektedir. Nükleotit ve amino asit dizisinin belirlenmesi sonucu 359'uncu pozisyondaki glisinin aspartik asite dönüştüğü bulunmuştur [Niersbach et al., 1995a].

Niersbach ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise prolin kaynağı olarak fenilasetil-β-alanil-L-prolini hidroliz edebilen mutant soy izole edilmiştir. İmmobilize mutant penisilin asilaz, penisilin G'yi yaban tipe oranla % 30 daha hızlı hidrolize edebilmekte olup, substrat inhibisyonu yarı yarıya azalmıştır. Ek olarak mutant enzimin 45 ^{o}C'ta 3.6 kat daha fazla kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir [Niersbach et al., 1995b].

Enzimlerin faj yüzeyinde fonksiyonel gösterimi, özellikleri değiştirilmiş enzimlerin seçilmesi için fajların kullanılmasının yolunu açmıştır. *A. faecalis*'in heterodimerik penisilin asilazı, fd fajının yüzeyinde başarılı bir şekilde gösterilmiştir [Verhaert et al., 1999]. Faj gösterim tekniği, biyokatalitik işlevleri artırılmış ve özgüllüğü değiştirilmiş enzimleri seçmek için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Faj gösterim tekniği protein mühendisliğinde kullanımının yanı sıra enzimin işlenme basamaklarını kolaylaştırarak hücre dışı ortama salgılanmasını da mümkün kılmaktadır [Rajendhran and Gunasekaran, 2004].

Hataya eğilimli PCR ve DNA karıştırma veya aile karıştırma yöntemlerinin birlikte kullanılması sonucu artmış substrat özgüllüğüne sahip ve yeni substratları hidrolize edebilen enzimler elde edilmiştir. DNA karıştırma yöntemi istenilen özelliklere sahip enzimlerin elde edilmesinde kullanılan oldukça güçlü bir tekniktir. *P. Rettgeri*, *E. coli* ve *K. citrophila pac* genlerinin DNA aile karıştırma'ya uğratılması sonucu elde edilen mutantlar içinden en yüksek aktiviteye sahip olanının,

doğal *P. rettgeri* penisilin asilazına görece % 40 daha fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur [Zheng et al., 2003].

Patnaik ve arkadaşları *Lactobacillus*'un üzerinde az çalışılmış bir türünün asit toleransını artırmak için genom karıştırma metodunu kullanmışlardır. Elde edilen yeni laktobasilin, hem sıvı hem de katı besi yerinde yaban tipe oranla daha düşük pH değerlerinde yaşayabildiği ve ayrıca pH 4'te yaban tipe oranla üç kat daha fazla laktik asit üretebildiği bildirilmiştir [Patnaik et al., 2002].

Otten ve arkadaşları yönlendirilmiş evrim kullanarak sefalosporin asilazın substrat özgüllüğünü değiştirmişlerdir. Elde edilen yeni adipil asilaz enzimi tek basamaklı dönüşüm reaksiyonu ile adipil-7-aminodeasetoksisefalosporanik asidi (adipil-7-ADCA), 7-ADCA'ya dönüştürebilmektedir. 7-ADCA ise yarı-sentetik sefalosporinlerin sentezinde kullanılan önemli bir bileşiktir [Otten et al., 2002].

Yönlendirilmiş evrim (hataya eğilimli PCR) ile mutant bir T7 RNA polimeraz elde edilmiştir. Elde edilen T7 RNA polimerazın, yaban tipe göreceli 20 kez daha fazla hata yapma oranına sahip olduğu bulunmuştur. Bu enzimin *in vivo* ve *in vitro*'da yüksek oranda heterojen RNA ürünleri sentezleyebildiği ve enfeksiyon esnasında yaban tip bakteriofaj T7'nin replikasyon etkinliğini azalttığı bildirilmiştir [Brakmann and Grzeszik, 2001].

Nakaniwa ve arkadaşları *Bacillus* sp. TS 47'den elde ettikleri pektat liyaz 47'yi (PL 47), hataya eğilimli PCR kullanarak rastgele mutasyona uğratmışlar ve sıcaklığa dayanıklı bu enzimin *in vitro* evrimini gerçekleştirmişlerdir. Mutant PL 47 geni *Escherichia coli*'de eksprese edilmiş ve PL aktivitesi sergileyen soylar plaka üzerinde taranmıştır. Daha az sıcaklık kararlılığı gösteren üç mutant seçilmiş ve onların enzimleri nitelendirilmiştir. Nitelendirilen bu enzimlerin, PL 47 enzimine görece sıcaklık kararlılığı ve aktivite yönünden daha zayıf olduğu belirtilmiştir. Bu enzimlerin amino asit değişimleri analiz edildiğinde Alanin-325'in sıcaklık kararlılığında rol oynadığı bulunmuştur [Nakaniwa et al., 2004].

DNA karıştırma ve hataya eğilimli PCR, serin hidroksimetiltransferazın katalitik aktivitesinin arttırılmasında kullanılmıştır. *Escherichia coli* AB90054'den elde edilen serin hidroksimetiltransferaz geni (glyA) klonlanmış, dizilenmiş ve *E. coli*'de eksprese edilmiştir. Üç basamak hataya eğilimli PCR ve üç basamak DNA karıştırmanın ardından elde edilen rekombinant soylardan mutant 3E7'nin aktivitesi, yaban tip ile karşılaştırıldığında 8 kat, enzim üretkenliği ise yaklaşık 41 kat artmıştır. Enzimin yapısı incelendiğinde 8 amino asitin yer değiştirdiği bulunmuştur.

Saflaştırılan mutant 3E7 enzimi ile yaban tip serin hidroksimetiltransferaz, SDS-poliakrilamit gel elektroforezinde yürütüldüğünde her ikisinin de yaklaşık 45 kDa'luk tek bir banda sahip olduğu görülmüştür [Zuo et al., 2007].

Pseudomonas aeruginosa lipazı (PAL), 2-metildekanoik asit p-nitrofenil esterin hidrolizini yüksek enantiyo seçicilikle katalizleyebilmesi için yönlendirilmiş evrim ile değişikliğe uğratılmıştır. Art arda gerçekleştirilen hataya eğilimli PCR ve doyurma mutagenezi basamakları sonucunda, yaban tipin E:1.1 olan enantiyoseçiciliğinin, en iyi mutant soyda E:25.8'e çıktığı görülmüştür. Bu mutant enzimin yapısı incelendiğinde 5 adet amino asitin yer değiştirdiği bulunmuştur [Liebeton et al., 2000].

Loo ve arkadaşları *Agrobacterium radiobacter*'den elde edilen epoksid hidrolazın (EchA) enantiyo seçiciliğini hataya eğilimli PCR ve DNA karıştırma yöntemleri kullanarak arttırmışlardır. Aktivite gösteren mutant kütüphaneleri görüntülemek için agar plaka yöntemi kullanılmıştır. Arttırılmış enantiyo seçiciliğe sahip enzimler, para-nitrofenil glisidil eterin (pNPGE) dönüşümünün spektrofotometrik eğim analizi ile taranmıştır. 8 mutantın diğer epoksitler için 3 kat, pNPGE için ise 13 kat artmış enentiyo seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur [Loo et al., 2004].

4. GEREÇ

4.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 4.1: Kullanılan sarf malzemeler.

Kullanılan Malzemeler	Üretici Firmalar
500 bp DNA belirteci	FERMENTAS
6-aminopenisillanik asit (6-APA)	SIGMA A1005
6-nitro-3-(fenilasetamido)benzoik asit (NIPAB)	SIGMA N8883
Agar	BD 214010
Agaroz	SIGMA A6013
Akrilamit	SIGMA A8099
Amoksisilin	SIGMA A8523
Amonyum persülfat (APS)	BIORAD 161-0700
Amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$	MERCK 1.01216
Ampisilin	ROCHE 10835269001
Asetik asit	RIEDEL 27225
Aseton	MERCK 100013
Asetonitril	CARLO ERBA 401201
$BaCl_2$	SIGMA-ALDRICH 217565
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Bradford protein assay dye	BIORAD 500-0006
Brillant blue R 250	SIGMA B7920
Bromofenol blue	SIGMA B6131
BSA	SIGMA-ALDRICH A7906
$CaCl_2$	SIGMA C3306
$CoCl_2$	SIGMA C2644
CTAB (setil trimetil amonyum bromid)	SIGMA H6269
$CuCl_2$	SIGMA C6641
DEAE Sefaroz™ Fast Flow	AMERSHAM BIOSCIENCES
Dikloksasilin	SIGMA D9016

Tablo 4.1: Devam.

Diyaliz membranı	ROTH 0653.1
DMSO (Dimetil sülfoksit)	SIGMA D5879
dNTP (PCR grade nucleotide mix)	ROCHE 04 728 874 001
*Eco*RI	ROCHE 11 175 084 001
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	SIGMA E5134
Etanol	J. T. BAKER 8228
Etidyum bromür	SIGMA E7637
Etilen glikol	MERCK 1.00859.1000
$FeCl_2$	FLUKA 44939
$FeCl_3$	MERCK
$FeSO_4$	SIGMA F7002
Filtre kağıdı (Whatman no.1, 8.5 cm çapında)	WHATMAN
Gliserol	RIEDEL 15524
Glisin	SIGMA G7126
Glukoz	SIGMA G8270
HCl	MERCK 1.00314
*Hind*III	ROCHE 10 656 321 001
İzoamil alkol	MERCK 1.00978.1000
İzopropanol	RIEDEL 24137
İzopropil-β-D-tiogalaktozit (IPTG)	ROCHE 724815
KCI	RIEDEL 12636
K_2HPO_4	MERCK 1.05101.1000
KH_2PO_4	MERCK 1.04877.1000
Kloksasilin	SIGMA C9393
$LiCl_2$	ALDRICH 213233
Lizozim	MERCK 105281
Maya özütü	MERCK 1.03753
Metanol	MERCK 1.06007.2500
$MgCl_2$	MERCK 105832
$MgSO_4$	SIGMA M2773
$MnCl_2$	MERCK 105917

Tablo 4.1: Devam.

NaAc	MERCK 106268
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaOH	MERCK 1.06462.1000
NH_4Ac	SIGMA A7262
$NiCl_2$	SIGMA N5756
Nutrient broth	DIFCO 234000
N-Z-Amin A	SIGMA C0626
Oligonükleotitler	IDT
p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB)	SIGMA D2004
PEG8000	SIGMA P2139
Penisilin G	CALBIOCHEM
Penisilin G	MUSTAFA NEVZAT
Penisilin V	SIGMA P1382
Pepton	MERCK 107214
Pfu polimeraz	STRATAGENE 600670
PMSF (Fenilmetilsülfonil florür)	SIGMA 7626
Protein belirteci (PAGE-Ruler)	FERMENTAS SM0671
Protein standardı	SIGMA SDS-6H
RNase	ROCHE 11 119 915 001
SDS	SIGMA 5750
Sefaleksin	SIGMA C4895
Sefalosporin C	SIGMA C3270
Streptomisin sülfat	SIGMA
Sukroz	SIGMA S0389
T4 DNA ligaz	ROCHE 10 716 359 001
Taq DNA polimeraz	ROCHE 1 418 432
TEMED	SIGMA T7024
Tris baz	SIGMA T1503
Triton X-100	SIGMA T8532
$ZnCl_2$	ANONİM
$ZnSO_4$	ANONİM

Tablo 4.1: Devam.

β-merkaptoetanol	SIGMA M6250
λ DNA	MBI-FERMENTAS

4.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 4.2: Kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firmalar
+4 ^{o}C soğutucu	ARİSTON Nofrost
-20 ^{o}C dondurucu	ARİSTON Nofrost
-80 ^{o}C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
96-kuyulu mikroplaka	TPP 92097
Agaroz jel elektroforez sistemi	BIOMETRA Agagel Mini
Buz makinesi	BREMA Ice Flaker
Çalkalamalı soğutuculu yer inkübatörü	CERTOMAT-BS-T
Çalkalamalı su banyosu	JULABO SW 21
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1083
Etüv	BINDER ED115
Fraksiyon toplayıcı (saflaştırma sistemi)	BIORAD 2110
Hassas terazi	SARTORİUS BL 210S
İnkübatör	EDMUND BÜHLER KS15/ TH15
Jel görüntüleme sistemi	VILBER LOURMAT
Jel kurutucu	BIORAD 583
Liyofilizatör	JOUAN RC 10.10
Liyofilizatör soğutucu motoru	JOUAN RCT 90
Liyofilizatör vakum motoru	ALCATEL Pascal 2005 C1
Manyetik karıştırıcı	HEİDOLPH MR 3001
Masa üstü soğutmalı mikrosantrifüj	HERAEUS Sepatech Biofuge 15R
Masa üstü soğutmalı santrifüj	BECKMAN COULTER Allegra 25R
Mikro plaka okuyucu	BMG Labtech Fluostar Omega
Mikrodalga fırın	BEKO 1550

Tablo 4.2: Devam.

Mikropipet 2 µl	GILSON
Mikropipet 20 µl	GILSON
Mikropipet 200 µl	GILSON
Mikropipet 1000 µl	GILSON
Mikrosantrifüj	BECKMAN COULTER Microfuge 18
Orbitral karıştırıcı	BIOMETRA WT 12
Otoklav	HIRAYAMA Hiclave HVE 50
Otoklav	HIRAYAMA Hiclave HV 110L
Peristaltik pompa (saflaştırma sistemi)	BIORAD Econo Gradient Pump
pH metre	WTW Inolab pH Level 1
Pipet tutucu (şarjlı pipetör)	GILSON
Protein elektroforez sistemi	BIORAD Mini Protean II
Soğutmalı mikrosantrifüj	BECKMAN Coulter Microfuge 22R
Soğutmalı su banyosu	VWR 1160S
Sonikatör	BRANSON Digital Sonifier 250
Spektrofotometre	BIORAD Smartspec 3000
Steril kabin	HERAEUS Herasafe HS 12
Tek kullanımlık steril filtre (0.22 µm)	SARTORİOUS STEDİM 17597
Tek kullanımlık steril filtre (0.45 µm)	SCHLEİCHER&SCHUELL10462200
Terazi	SARTORİUS BL 3100
Terazi	PRECISA 1200C
Termal döngü cihazı	BİOMETRA T3
Tüpler için soğutmalı santrifüj	HERAEUS Labofuge 400R
UV monitör (saflaştırma sistemi)	BIORAD
UV transillüminatör	VILBER LOURMAT TFX 20M
Vorteks	VORTEX GENIE 2
Yazıcı (saflaştırma sistemi)	BIORAD Econo Recorder 1327

5. YÖNTEM

5.1. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

Tüm DNA manipülasyonları Sambrook et al. (1989) ve Ausubel et al. (2001) tarafından tanımlanan standart metotlara göre gerçekleştirildi. Tez çalışmasının birinci basamağında yönlendirilmiş evrim çalışmalarında kalıp olarak kullanılabilecek bir yapının oluşturulması amacıyla, *E. coli* ATCC 11105 soyuna ait *pac* geni pUC19 plazmitine (2.7 kb) [Yanisch-Perron et.al., 1985] klonlandı. Klonlama yapılırken Gümüşel et al. (2001) tarafından daha önce belirtildiği gibi, -52 bölgesinden itibaren yaklaşık 2.6 kb'lik *pac* geni ile birlikte *pac* geninden sonra gelen, *pac* geninin aktivitesinde önemli bir rolü olduğu düşünülen ve *E. coli* kromozomu üzerinde genin 3'-ucunda yer alan yaklaşık 900 bç'lik bölge bir bütün olarak (toplamda 3.5 kb'lik DNA parçası) klonlandı. Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere *E. coli* ATCC 11105 soyundan genomik DNA izolasyonu, Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak, pUC19 plazmitini içeren *E. coli* JM109 soyundan plazmit izolasyonu ise maksiprep (büyük ölçekte) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. *pac* geninin çoğaltılmasında kullanılacak olan ileri ve geri primerler ise Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA, USA) firmasına sentezlettirildi.

5.1.1. Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti Kullanılarak *E. coli* ATCC 11105 Soyundan Geneomik DNA İzolasyonu

2 ml LB besi yerinin *E. coli* ATCC 11105 soyunun -20 ^{o}C stoğu ile %1 oranında aşılanmasını takiben gece boyu 37 ^{o}C'ta, 175 rpm'de büyütülmesi sonucu elde edilen kültürün 1 ml'si eppendorf tüpüne alındı ve 4 °C'ta 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 480 µl 50 mM EDTA, pH 8.0 eklenip pipetlenerek çözüldü. Üzerine 120 µl lizozim (10 mg/ml) eklenerek su banyosunda 37 °C'ta 30-60 dakika süreyle inkübe edildi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. 600 µl "nuclei lysis çözeltisi" (kit ile sağlanan) eklenip nazikçe pipetlenerek karıştırıldı. Su banyosunda 80 °C'ta 5

dakika inkübasyon sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu. Üzerine 3 µl RNaz çözeltisi (kit ile sağlanan) eklenerek karıştırıldı. Su banyosunda 37 °C'ta 15-60 dakika inkübasyon sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu. 200 µl "protein çötürme çözeltisi" (kit ile sağlanan) eklenerek vortekslendi ve 5 dakika buzda bekletildi. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek üst sıvı, içinde 600 µl oda sıcaklığında izopropanol bulunan bir eppendorf tüpüne alınarak karıştırıldı. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 600 µl oda sıcaklığındaki %70 EtOH eklenerek karıştırıldı. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Elde edilen peletler 10-15 dakika liyofilizatörde kurutuldu. DNA peletine 100 µl "sulandırma çözeltisi" (kit ile sağlanan) eklenerek 65 °C'ta bir saat ya da +4 °C'ta gece boyu çözünmeye bırakıldı. Çözünen genomik DNA'lar -20 °C'a kaldırıldı.

5.1.2. Maksiprep Yöntemi ile Plazmit İzolasyonu

Birinci gün, vidalı kapaklı kültür tüplerinde, 100 µg/ml son derişimde ampisilin içeren 2 ml LB besi yeri, pUC19 içeren *E. coli* JM109 hücrelerinin -20 ^{o}C stok kültüründen aşılandı. Akşama kadar 37 ^{o}C'ta çalkalayıcı inkübatörde büyütülerek, 1 lt'lik erlen içinde 100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml LB besi yerinin aşılanmasında kullanıldı. Gece boyu büyütülen hücreler ertesi gün 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atılarak pelet 2.5 ml GET içinde çözüldü ve 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 10 mg lizozim eklenerek oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra, 5 ml 0.2 M NaOH, %1 SDS eklenerek, buzda 5 dakika daha bekletildi. 3.75 ml 3 M NaAc (sodyum asetat, pH 5.0) eklenerek 35 dakika buzda inkübasyondan sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 10 ml üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak, 2 hacim %100 EtOH (-20 ^{o}C) eklendi ve 15 dakika -20 ^{o}C'ta bekletildi. 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra pelet 1 ml TE içerisinde çözüldü ve 4 adet ependorf tüpüne 250 µl dağıtıldı. Ependorf tüpleri 65 ^{o}C'ta 5 dakika inkübe edilerek 1 dakika kuvvetlice vortekslendi. Her bir ependorf tüpüne 25 µl 3 M NaAc ve 625 µl %100 EtOH (-20 ^{o}C) eklenerek -20 ^{o}C'ta 15 dakika tutuldu. Daha sonra 15 dakika santrifüj edilen peletler 250 µl %75 EtOH (-20 ^{o}C) ile yıkandı. 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen peletler kurutuldu. Kurutulan peletler 50 µl distile su içerisinde çözülerek tek tüpte toplandı. Tüpler 50 µl distile su

ile yıkanarak, yıkama çözeltisi de aynı tüpe eklendikten sonra (toplam hacim 250 µl), 65 ^{o}C'ta 5 dakika bekletildi ve -20 ^{o}C'a kaldırıldı.

- GET (50 ml)
  - 50 mM Glukoz (1 M stok çözeltiden 2.5 ml alındı)
  - 10 mM EDTA (0.5 M stok çözeltiden 1 ml alındı)
  - 25 mM Tris, pH 8.0 (2 M stok çözeltiden 625 µl alındı)
  - Distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi.
- LB (1 litre)
  - 10 g Nutrient Broth
  - 5 g Yeast Extract
  - 8 g NaCl
  - 0,52 g Trizma Base
  - Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi.
- Ampisilin
  - 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. 1 g ampisilin, 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü ve çözelti pH'sı 1M NaOH ile 8.5' e ayarlandı. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklandı.

5.1.3. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin PCR ile Çoğaltılması

E. coli ATCC 11105 soyunun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, 3.5 kb büyüklüğündeki DNA parçası, FG11 ileri ve PA16 geri primerleri (ileri primer *Hin*dIII, geri primer ise *Eco*RI kesim bölgesini içermektedir) kullanılarak PCR aracılığı ile çoğaltıldı. FG 11 ileri primeri, *pac* geninin -52 bölgesine tutunacak şekilde, PA16 geri primeri ise *pac* geninden sonra gelen 900 bç'lik parçanın sonuna tutunacak şekilde tasarlandı ve sentez ettirildi. *Hin*dIII ve *Eco*RI tanıma bölgelerini içeren FG11 ve PA16 primerlerinin dizisi Tablo 5.1'de verildi.

Tablo 5.1: *E. coli* ATCC 11105 *pac* geninin çoğaltıldığı PCR'da kullanılan primerler.

FG11 (ileri)	5'-TAC GTA▼AGC TTC GTT GCT AGT ATC AAT TCG-3' *Hin*dIII
PA16 (geri)	5'-TAC GTG▼AAT TCC GGC GAA GTC TCC GTT G-3' *Eco*RI

Gerçekleştirilmek istenen PCR çalışması için uygun Mg^{2+} derişimini belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmasında; 1X PCR tamponu, kalıp olarak 200 ng *E. coli* ATCC 11105 genomik DNA'sı, 80 ng ileri ve 80 ng geri primer, 200 µM dNTP, 0.9 U *Taq* DNA polimeraz ile 1.5 mM, 2 mM, 3 mM ve 4 mM $MgCl_2$ derişimleri kullanıldı. Reaksiyon 25 µl toplam hacim içerisinde gerçekleştirildi. Kullanılan PCR programı Tablo 5.2'de verildi. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

Tablo 5.2: *pac* geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı.

PCR Programı

95 ^{o}C'ta 5 dakika ön denaturasyonun ardından enzim eklenerek PCR başlatıldı.

94 ^{o}C 1'
64 ^{o}C 1' } 30 döngü
72 ^{o}C 3.5'

72 ^{o}C 10'

Mg^{2+} optimizasyonundan sonra 2 mM $MgCl_2$ derişiminin kullanılmasına karar verildi ve klonlama çalışması için istenen miktarda ürün elde edebilmek amacıyla aynı program ve koşullar kullanılarak *pac* geninin preperatif üretimi gerçekleştirildi.

5.1.4. Çoğaltılan *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanması

E. coli ATCC 11105 *pac* geninin PCR aracılığı ile çoğaltılmasının ardından, çoğaltılan *pac* geni ve maksiprep yöntemi ile elde edilen pUC19 plazmiti klonlama amacıyla *Eco*RI ve *Hin*dIII enzimleri ile kesime alındı. µg DNA başına 3 ünite (U) restriksiyon endonükleaz kullanıldı. Enzim kesimleri 37 °C'ta 2 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Kesimin son 30 dakikasında sadece pUC19 tüpüne 0.5 µg RNaz ilave edildi. PCR ürününün ve pUC19 plazmitinin kesim protokolü Tablo 5.3'de verildi.

Tablo 5.3: Klonlama çalışmasında kullanılan restriksiyon enzim kesim protokolü.

pac geni için kesim protokolü	pUC19 plazmiti için kesim protokolü
20 µg PCR ürünü 3U *Eco*RI/µg DNA 3U *Hin*dIII/µg DNA 1X Tampon B Toplam hacim 150 µl	15 µg pUC19 3U *Eco*RI/µg DNA 3U *Hin*dIII/µg DNA 1X Tampon B Toplam hacim 120 µl

Her bir kesim reaksiyonunun sonunda örneklere son konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde 3 M sodyum asetat ve 2.5 hacim soğuk %100 etanol (-20 °C) eklenerek, tuz alkol çöktürmesi uygulandı. Tüpler sıvı azotta 1-2 dakika bekletildikten sonra, 13000 devir/dakikada 4 °C'ta 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı vakumla çekilip atıldıktan sonra, santrifüjlü evaporatörde 15-20 dakika kurutulan peletler 15 µl steril dH_20 içinde çözülerek üzerlerine 3 µl 6X boya eklendikten sonra izole edilmek üzere %1'lik agaroz jele yüklendi. Belirteç olarak *Hin*dIII ile kesilmiş λ DNA kullanıldı. Jelde yürütülmelerini takiben PCR ürünü ve pUC19 plazmiti jelden, "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak izole edildi.

- Promega “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” Kullanılarak Agaroz Jelden DNA izolasyonu

Örneklerin jelde yürütülmelerini takiben ilgilenilen fragmanı taşıyan jel parçası steril bir bistüri yardımıyla agaroz jelden kesilip çıkartıldıktan sonra, ağırlığı daha önce belirlenen 1.5 ml’lik eppendorf içine yerleştirildi ve jel parçasını içeren eppendorf tekrar tartılarak jel parçasının ağırlığı belirlendi. Kesilmiş olan jelin her 10 mg’ı için 10 µl membran bağlama çözeltisi (kit ile sağlanan) ilave edildi. Vortekslenerek 50-65 ^{o}C’ta jel tamamen eriyinceye kadar su banyosunda inkübe edildi. Ayrı bir yerde kitle birlikte gelen toplama tüpünün içine SV mini kolonu yerleştirildi. 50-65 ^{o}C’ta inkübe edilerek eritilen jel karışımı mini kolon üzerine yerleştirilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oda sıcaklığında 16000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı atılarak mini kolon, toplama tüpü içine yeniden yerleştirildi. Mini kolon üzerine 700 µl membran yıkama çözeltisi (kit ile sağlanan ve etanol eklenmiş) eklendi ve oda sıcaklığında 16000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak, mini kolon yeniden toplama tüpüne yerleştirildi. Mini kolon üzerine 500 µl membran yıkama çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 16000 x g’de 5 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve mini kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirilerek kalan etanolün iyice buharlaşması için oda sıcaklığında 16000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından mini kolon 1.5 ml’lik temiz bir eppendorfa transfer edildi. 50 µl nükleaz-içermeyen su (kitle ile sağlanan) mini kolon üzerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oda sıcaklığında 16000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Mini kolon atılarak eppendorf içinde toplanan DNA -20 ^{o}C’a kaldırıldı.

Jelden geri kazanılan örneklere miktar tayini yapıldıktan sonra klonlama basamağına geçildi. Klonlama çalışmalarında 150 ng plazmit için pmol düzeyinde 2 kat gen parçası kullanıldı. Ligasyon 60 µl reaksiyon hacminde ve 1U T4 DNA ligaz kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan ligasyon protokolü Tablo 5.4’de verildi.

Tablo 5.4: *pac* geninin klonlanmasında kullanılan ligasyon protokolü.

Ligasyon Protokolü
150 ng pUC19 Molar düzeyde (pmol) vektörün iki katı oranında PCR ürünü 1X T4 DNA ligaz tamponu Toplam hacim 60 µl

Enzim dışında kalan ligasyon bileşenleri tüpe konulduktan sonra, ligasyon materyali 37 °C'ta 10 dakika ve 0 °C'ta 10 dakika inkübe edildi. 1U T4 DNA ligaz eklendikten sonra, ligasyon karışımı 0°C'ta 30 dakika ve ardından 16 °C'ta gece boyu bırakıldı. Ertesi gün ligasyon tüpleri 70 °C'ta 10 dakika inkübe edilerek T4 DNA ligazın inaktivasyonu sağlandı.

Hazırlanan ligasyon karışımı TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücrelerinin transformasyonunda kullanıldı.

5.1.5. TSS Yöntemi ile Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyon

- Kompetan Hücre Hazırlanması

2 ml LB besi yeri *E. coli* JM109 soyunun -20 °C'taki stok kültürünün 20 µl'si ile bir gece önce aşılandı. 37 °C'ta 200 devir/dakikada çalkalanarak gece boyu büyütüldü. Ertesi gün kültürün 1 ml'si 500 ml'lik erlendeki 100 ml LB besi yerinin aşılanması için kullanıldı. Hücreler 37 °C'ta 200 devir/dakikada çalkalanarak, OD_{600} değeri 0.5 oluncaya kadar büyütüldü. OD_{600} değeri 0.5'e ulaştığı zaman kültür buzda 20 dakika soğutuldu ve hücreler 4 °C'ta 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler buzda soğutulmuş 10 ml TSS içinde çözülerek transformasyona hazır hale getirildi. Hemen kullanılmayacak olan kompetan hücreler eppendorf tüplerine dağıtılarak, daha sonraki kullanımlar için -80 °C'a kaldırıldı.

- TSS Çözeltisi (100 ml)
  - 10 g PEG8000
  - 5 ml DMSO
  - LB ile 95 ml'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi. Soğutulduktan sonra içine filtre ile steril edilmiş 1 M $MgCl_2$'den 5 ml eklenerek karıştırıldı ve 4 ^{o}C'ta saklandı.

- Transformasyon

Eppendorf tüplerine uygun hacimde (5 µl) ligasyon karışımı dağıtıldıktan sonra, hazırlanan kompetan hücreler (200 µl) bu tüplere eklendi ve tüpler 30-60 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 42 °C'ta 2 dakika ısı şoku uygulanan örneklerin her birisine 1 ml LB besi yeri eklenerek, çalkalamalı inkübatörde 37 °C'ta 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 10.000 rpm'de 30 saniye kısa bir santrifüjün ardından örneklerin üst sıvısı atıldı ve hücre peletleri dipte kalan besiyeri (yaklaşık 100 µl) içinde çözüldükten sonra taze hazırlanmış ve ampisilin (100 µg/ml) içeren LB agar petri kaplarına yayıldı, sıvı kısmın kurumasını takiben 37 °C'ta gece boyu büyümeye bırakıldı.

- LB Agar (1 litre)
  - 10 g Nutrient Broth
  - 5 g Maya özütü
  - 8 g NaCl
  - 15 g Agar
  - Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi.

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden kaynatma ile lizis (STET) yöntemi kullanılarak, plazmit izolasyonu (miniprep) gerçekleştirildi.

5.1.6. Kaynatma ile Lizis (STET) Yöntemi Kullanılarak Plazmit İzolasyonu

10 ml ampisilinli (100 µg/ml) LB besi yeri tek koloni ile aşılanarak 37 °C'taki çalkalayıcılı inkübatörde gece boyu büyütüldü. Hücreler 4 °C'ta 4000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı vakum ile çekilip atıldıktan sonra 400 µl STET

çözeltisi içinde çözülerek eppendorf tüpe aktarılan hücrelere 10 mg/ml lizozim solüsyonundan 25 µl eklendikten sonra hemen vortesklenerek (1 dakika), kaynayan su banyosunda 45 saniye bekletildi. Oda ısısında 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen örnekteki kromozomal DNA ve hücre kalıntıları, steril bir kürdan ile alınarak atıldı. Son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 5 M amonyum asetat ve 1 ml izopropanol (-20 °C'ta soğutulmuş) eklenerek vortekslenen örnek, -20 °C'ta 5-10 dk. bekletildikten sonra 13000 rpm'de, 4 °C'ta 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı vakumla çekildikten sonra santrifüjlü evaporatörde kurutulan DNA peleti 50 µl steril dH_2O içinde çözüldü ve -20 ^{o}C'ta saklandı.

- STET (100 ml)
  - 8 g Sukroz
  - 5 ml Triton X-100
  - 5 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
  - 1,86 g EDTA
  - Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi.

5.1.7. Klon Adaylarının Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Transformasyonlar sonucunda elde edilen klon adaylarının istenilen DNA fragmanlarını içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla, klon adaylarından izole edilen plazmitler *Eco*RI ve *Hin*dIII enzimleri ile kesildi. Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimde µg DNA başına 3 ünite (U) restriksiyon endonükleaz kullanıldı. Kesim sonrası klon adayları, *Hin*dIII ile kesilmiş λ DNA belirteç ile birlikte %1'lik agaroz jele yüklenerek istenilen DNA fragmanını içerip içermediği kontrol edildi.

5.1.8. Klon Adaylarının Ekspresyon Çalışması ile Doğrulanması

Klonlama ve transformasyon çalışmalarının ardından, istenilen DNA parçalarını içerdiği düşünülen klon adaylarının penisilin G asilaz üretip üretmediklerini kontrol etmek amacıyla ekspresyon çalışması gerçekleştirildi.

Ekspresyon çalışması 100 μg/ml ampisilin içeren 83 ml kazein besi yerinde, %5 aşılama, 1/3 havalandırma ile 26 ^{o}C'ta ve 100 rpm çalkalama hızıyla gerçekleştirildi. Kültür örnekleri OD_{600} 0.6-0.8 aralığında 100 μM IPTG ile uyarıldı.

Ekspresyon çalışmasında, arka arkaya iki ön kültür aşılamasını takiben ana kültür aşılaması gerçekleştirildi ve kültür örnekleri ilgili OD aralığına ulaştığında IPTG ile uyarıldı. Kültürün 24'üncü saatinde örnek alınarak, alınan bu örneklerde hücre içi penisilin G asilaz aktivitesi değerlendirildi.

- Birinci Ön kültür

Vidalı kapaklı kültür tüplerinde 100 μg/ml ampisilin içeren 2 ml kazein besi yeri, ilgili klon adaylarına ait -20 stoklarından %1 oranında aşılanarak 26 ^{o}C'ta 100 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- İkinci Ön Kültür

150 ml erlenlerde yer alan ve 100 μg/ml ampisilin içeren 15 ml kazein besi yerleri, birinci ön kültürler ile %1 oranında aşılanarak 26 ^{o}C'ta 100 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- Büyük Kültür

250 ml erlenlerde yer alan ve 100 μg/ml ampisilin içeren 83 ml kazein besi yerleri, ikinci ön kültürler ile %5 oranında aşılanarak 26 ^{o}C'ta 100 rpm'de inkübasyona bırakıldı. IPTG uyarımını takiben kültürün 24'üncü saatinde alınan 10 ml hücre kültürünün 4000 rpm'de 20 dakika 4 ^{o}C'ta santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre peleti hücre içi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıldı.

- Kazein Besiyeri (1 litre)
  - 8 g Maya özütü
  - 4 g Kazein Hidrolizat
  - 4.2 g K_2HP0_4
  - 3 g KH_2P0_4
  - Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dakika otoklav edildi.

- IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozit) (10 ml)
  - 100 mM stok çözeltisi hazırlandı. 0.283 g IPTG, 10 ml steril distile su içerisinde çözüldü. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklandı.

- Sonikasyon

Hücre içi penisilin G asilaz aktivitesi için gerekli olan protein özütü, hücrelerin sonikasyon yöntemi ile parçalanması ile elde edildi. 10 ml hücre kültürünün 4000 rpm'de 20 dakika 4 ^{o}C'ta santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre peleti, 1 ml 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponunda çözüldü ve elde edilen hücre süspansiyonu küçük prob kullanılarak %10 şiddette 15 sn vuruş 20 sn duruş olarak 2 dakika sureyle sonikasyon işlemine tutuldu. 10000 rpm'de 30 dakika 4 ^{o}C'ta santrifüjün ardından üst sıvı aktivite testinde kullanıldı.

5.1.9. 6-APA Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Öncelikle 10 mg 6-APA (1 mg/ml) tartılarak 10 ml 50 mM pH 8.0 fosfat tamponu içinde çözüldü. Ardından, 75 mg PDAB (%0.5) 15 ml metanolde çözüldü. Tüpler kör dahil olmak üzere 2 set halinde hazırlandı. Kör tüplerine sadece 500 µl distile su eklenirken diğerlerine 0.1 ile 1 mg/ml derişim aralığında 6-APA eklendi. Tüm örnekler distile su ile 500 µl'ye tamamlandı. Tüplerin hepsine 3 ml asetat tampon eklenerek vortekslendi. Ardından 500 µl PDAB eklendi ve bir kez daha vortekslendi. OD_{415}'teki absorbanslar spektrofotometrede okundu. Alınan değerlere göre standart eğri çizildi. Çizilen grafikten eğim hesaplanarak aktivite hesaplamalarında kullanıldı. Aktivite hesaplamalarında kullanılan formül aşağıda verildi.

$$\text{Aktivite} = \frac{(OD_{415} / \text{Eğim}) \times (1000 / M.A._{6\text{-APA}}) \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Zamanı (dakika)}} \quad (5.1)$$

- Reaksiyon Hacmi: 0.5 ml
- Enzim Hacmi: 0.02 ml veya 0.05 ml
- Reaksiyon Süresi: 3 veya 60 dakika
- $M.A._{6\text{-APA}}$: 216.3 g/mol
- Eğim: 6-APA kalibrasyon eğrisi ile bulunan değer

5.1.10. Penisilin G Asilaz Aktivite Testi

Penisilin G asilaz aktivitesi substrat olarak penisilin G kullanılarak, Balasingham et al. (1972) tarafından tanımlanan metoda göre belirlendi. Ekspresyon, saflaştırma ve saflaştırma sonrası enzim karakterizasyonu çalışmalarında, ufak farklılıklarla aynı yöntem kullanıldı. Ekspresyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılan protokol sırasıyla aşağıda verildi.

Aktivite çalışmasında sonikasyon üst sıvısından 50 µl alınarak 10 ml'lik deney tüplerine konuldu. Üzerlerine toplam hacim 500 µl olacak şekilde, 450 µl 15 mM taze penisilin G çözeltisi eklenerek, tüpler 40 °C'taki su banyosunda 150 devir/dakikada 1 saat çalkanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon, tüplere 3 ml asetat, pH 2.5 tamponu eklenerek durduruldu. Her bir tüpe 500 µl p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) çözeltisi eklendi. Enzim aktivitesi, reaksiyon ürünlerinden 6-APA'nın PDAB ile verdiği renk reaksiyonunun 415 nm dalga boyunda okunması ile ölçüldü. Bu yöntemde; bir ünite enzim aktivitesi, 40 °C sıcaklıkta pH 8.0'de 15 mM penisilin G'den dakikada bir µmol 6-APA üretebilen enzim miktarı olarak tanımlandı. Enzim eklenmeyen ve sadece 450 µl 15 mM penisilin G çözeltisi ile 50 µl 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponu içeren örnek kör olarak kullanıldı.

Saflaştırma çalışması sırasında elde edilen fraksiyonlardaki enzimatik aktivitenin belirlenmesinde, 40 °C'taki su banyosunda 150 devir/dakikada 3 dakika çalkanarak yapılan inkübasyonun haricinde, ekspresyon çalışmasında belirtilen miktar ve koşullar kullanıldı.

Karakterizasyon çalışmalarında enzim aktivitesinin belirlenmesinde sırasıyla 1.34 ve 5.51 U/mg spesifik aktiviteye sahip saflaştırılmış yaban tipi ve mutant enzim kullanıldı. Saf enzimlerden 20 µl alınarak 10 ml'lik deney tüplerine konuldu. 30 µl 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponu (optimal pH'nın belirlenmesi çalışmasında ise 50 mM konsantrasyonunda farklı pH'lara sahip tamponlar kullanıldı) ile 50 µl'ye tamamlandı. Üzerlerine 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponunda (optimal pH'nın belirlenmesi çalışmasında ise 50 mM konsantrasyonunda farklı pH'lara sahip tamponlar kullanıldı) hazırlanmış 450 µl 15 mM taze penisilin G çözeltisi eklenerek, tüpler optimal sıcaklıkta (optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi çalışmasında ise 25-70 ^{o}C aralığında farklı sıcaklıklar kullanıldı) 150 devir/dakikada 3 dakika çalkanarak inkübe edildi. Enzim aktivitesi 415 nm dalga boyunda absorbansın ölçülmesi ile belirlendi.

- 50 mM Potasyum Fosfat Tamponu, pH 8.0
  - 50 mM KH_2PO_4 ile 50 mM K_2HPO_4 karıştırılarak pH 8.0'a ayarlandı.
- Substrat Çözeltisi
  - Penisilin G çözeltisi, 50 mM, potasyum fosfat, pH 8.0 tamponunda 15 mM olacak şekilde hazırlandı.
- Sodyum Asetat Tamponu, pH 2.5
  - 1.2 g NaOH distile su içerisinde çözülürek 600 ml'ye tamamlandı. 240 ml asetik asit distile su ile 1200 ml'e tamamlandı ve her iki çözelti birbiri ile karıştırıldı.
- p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) Çözeltisi
  - PDAB'ın metanoldeki % 0.5 (ağırlık/hacim) çözeltisi taze olarak hazırlandı.

5.2. Hataya Eğilimli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Error-Prone PCR) Çalışmaları

Tez çalışmasının ikinci basamağı olan yönlendirilmiş evrim çalışmalarında, mutant *pac* geni varyantlarını elde etmek amacıyla hataya eğilimli PCR yöntemi kullanıldı. Mutant *pac* geninin elde edilmesinde kullanılan PCR koşulları Cadwell and Joyce (1994) tarafından tanımlanan metodun modifiye edilmesi ile belirlendi. Hataya eğilimli PCR çalışması arka arkaya yapılan iki turda gerçekleştirildi. PCR

çalışmasının birinci turunda Bölüm 5.1'de gerçekleştirilen klonlama çalışmaları sonucunda elde edilen ve yaban tipi *pac* genini taşıyan pUC19 plazmiti kalıp olarak kullanılırken, ikinci turda ise birinci tur sonucu elde edilen mutantlar arasından yaban tipe göre en yüksek enzim aktivitesi sergileyen mutanta ait plazmit kalıp olarak kullanıldı. Hataya eğilimli PCR çalışmasında kullanılmak üzere ileri ve geri primerler tasarlanarak Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA, USA) firmasına sentez ettirildi. PCR sonucu çoğaltılan *pac* geninin linearize olmuş pUC19 vektörüne (2.7 kb) [Yanisch-Perron et.al., 1985] klonlanması An et al. (2010) ve Tuzlakoğlu-Öztürk et al. (2013) tarafından tanımlanan PCR yöntemine göre gerçekleştirildi.

5.2.1. Hataya Eğilimli PCR (Error-Prone PCR)

Hataya eğilimli PCR çalışmasının birinci turu *E. coli* ATCC 11105 soyuna ait yaban tipi *pac* genini taşıyan pUC19 plazmiti kalıp olarak kullanılarak, ikinci turu ise birinci tur sonucu elde edilen mutantlar arasından yaban tipe göre en yüksek enzim aktivitesi sergileyen mutanta ait plazmit kalıp olarak kullanılarak, FG13 ileri ve FG15 geri primerleri ile gerçekleştirildi. İleri ve geri primerler pUC19 vektörünün çoklu klonlama bölgesine yakın bir bölgeye tutunacak şekilde tasarlandı ve sentez ettirildi. Tasarlanan primerlerin dizisi Tablo 5.5'de verildi.

Tablo 5.5: Hataya eğilimli PCR çalışmasında kullanılan primerler.

FG13 (ileri)	5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC C-3'
FG15 (geri)	5'- CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG C-3'

Hataya eğilimli PCR çalışmasının birinci turunda farklı Mn^{2+} derişimlerini içeren mutajenik PCR'ın yanı sıra, hataya eğilimli PCR verimini karşılaştırmak amacıyla bir tüp kontrol PCR reaksiyonu yapıldı. PCR reaksiyonları 100 µl toplam hacim içerisinde gerçekleştirildi. Kullanılan mutajenik PCR ve kontrol PCR koşulları

ile PCR programı Tablo 5.6'da verildi. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

Tablo 5.6: Hataya eğilimli PCR çalışmasında kullanılan PCR koşulları ve programı.

Kontrol PCR Koşulları	Mutajenik PCR Koşulları	PCR Programı
1X PCR tamponu 0.2 mM dNTP 1.5 mM $MgCl_2$ 20 fmol kalıp DNA 30 pmol ileri primer 30 pmol geri primer 5 U *Taq* DNA polimeraz	1X PCR tamponu 0.2 mM dATP 0.2 mM dGTP 1 mM dCTP 1 mM dTTP 7 mM $MgCl_2$ 20 fmol kalıp DNA 30 pmol ileri primer 30 pmol geri primer 0.05; 0.1; 0.15; 0.25 ve 0.5 mM $MnCl_2$ 5 U *Taq* DNA polimeraz	94 ^{o}C'ta 3' 94 ^{o}C 30" 64 ^{o}C 30" } 30 döngü 72 ^{o}C 3.5' 72 ^{o}C 10'

Hataya eğilimli PCR'ın birinci turunun ardından, ikinci tur çalışmasına geçildi. Hataya eğilimli PCR çalışmasının ikinci turunda, mutajenik PCR koşullarında 0.25 mM $MnCl_2$ ve 2 fmol kalıp DNA kullanılmasının haricinde herhangi bir değişiklik yapılmadı. Diğer bütün PCR koşulları ve PCR programı aynen kullanıldı. İkinci tur sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

5.2.2. PCR ile Klonlama ve Kütüphane Oluşturma

pac geninin hataya eğilimli PCR aracılığı ile çoğaltılmasının ardından klonlama çalışmasına geçildi. İki tur olarak gerçekleştirilen hataya eğilimli PCR çalışmasının her bir turunda çoğaltılan *pac* geninin pUC19 vektörüne klonlanmasında An et al. (2010) ve Tuzlakoğlu-Öztürk et al. (2013) tarafından tanımlanan PCR yöntemi kullanıldı. Hataya eğilimli PCR ile çoğaltılan *pac* geni, pUC19 vektörüne tutunma bölgeleri içerdiği için *Eco*RI ve *Hin*dIII restriksiyon

endonükleazları ile kesime alınmadı. Klonlamada kullanılacak olan pUC19 vektörü ise *Eco*RI ve *Hin*dIII ile kesilerek lineer hale getirildi. µg DNA başına 3 ünite (U) restriksiyon endonükleaz kullanıldı. Enzim kesimleri 37 °C'ta 2 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Kesimin son 30 dakikasında 0.5 µg RNaz ilave edildi. Kesim sonrası sodyum asetat-alkol çöktürmesinin ardından kurutulan pelet uygun hacimde çözülerek, PCR ürünleri ile birlikte izole edilmek üzere %1'lik agaroz jele yüklendi. Jelde yürütülmelerini takiben PCR ürünü ve pUC19 plazmiti "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak jelden izole edildi. İzole edilen örnekler %1'lik agaroz jele yüklenerek miktar tayini yapıldı. Miktar tayininin ardından PCR ile klonlama basamağına geçildi. Klonlama reaksiyonu 50 µl toplam hacim içerisinde gerçekleştirildi. Klonlamada kullanılan PCR koşulları ve PCR programı Tablo 5.7'de verildi.

Tablo 5.7: Klonlamada kullanılan PCR koşulları ve programı.

Klonlama PCR Koşulları	Klonlama PCR Programı
250 ng pUC19 vektörü (*Eco*RI ve *Hin*dIII ile kesilmiş)	94 ^{o}C'ta 3'
Molar düzeyde vektörün 5 katı oranında PCR ürünü 0.2 mM dNTP	94 ^{o}C 30" 55 ^{o}C 30" 72 ^{o}C 7' } 30 döngü
1 x Taq DNA Polimeraz Tamponu 2.5 U *Taq*/*Pfu* DNA Polimeraz (1:1)	72 ^{o}C 10'

Elde edilen PCR ürünü TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine transforme edildi. Hücreler ampisilin (100 µg/ml) içeren LB agar petri kaplarına yayılarak 37 °C'ta gece boyu büyümeye bırakıldı. Transformasyon sonucu elde edilen koloniler tarama ve seçme çalışmalarına alınarak, enzim aktivitesindeki artış yönünden incelendi.

5.2.3. Artmış Enzim Aktivitesine Sahip Mutantların Taranması

Yapılan iki tur hataya eğilimli PCR çalışması sonucunda elde edilen toplam 4500 koloni arasından en yüksek aktiviteye sahip mutantın seçilmesi amacıyla tarama ve seçme çalışmaları gerçekleştirildi. Aktif kolonilerin seçiminde üç basamaktan oluşan bir tarama yöntemi kullanıldı (Şekil 5.1). Seçimin birinci basamağında, 6-nitro-3-(fenilasetamido)benzoik asit (NIPAB) emdirilmiş filtre kağıtları [Zhang et al., 1986] kullanılırken, ikinci basamakta ise 96-kuyulu mikroplakalar kullanıldı. Üçüncü basamakta yüksek aktivite veren pozitif koloniler, erlen düzeyinde gen ekspresyonu çalışmasına alındı.

- NIPAB Emdirilmiş Filtre Kağıdı Yöntemi

Steril filtre kağıtları (8.5 cm çapında Whatman no. 1) 20 mM potasyum fosfat, pH 7.7 tamponunda hazırlanan 2 mg/ml NIPAB çözeltisi ile doyuruldu ve kullanılmadan önce oda sıcaklığında kurutuldu. Transformasyon sonucu elde edilen *E.coli* kolonileri, ampisilin (100 µg/ml) ve 0.1 mM IPTG içeren kazein agar petrilerine steril kürdan yardımı ile ekilerek, 24 saat boyunca 26 ^{o}C'ta büyümeye bırakıldı. Master petrilerine ek olarak IPTG içermeyen replika petriler de hazırlandı. NIPAB emdirilmiş filtre kağıtları, master petrilerde büyüyen kolonilerin üzerine yavaşça bırakıldı ve hafifçe bastırılarak kolonilerin filtre kağıtlarına geçmesi sağlandı. Filtre kağıtları tamamen ıslandıktan sonra, agar petrilerinden alınarak steril bir petri kabına yerleştirildi ve 37 ^{o}C'ta 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından filtre kağıtlarındaki koloniler göz ile incelenerek, renk değişiminin olup olmadığı kontrol edildi. NIPAB'ın hidrolizi sonucu meydana gelen *p*-nitrofenol'ün oluşturduğu sarı renk, bakteriler tarafından penisilin G asilazın üretildiğini göstermektedir. Doğal koloni rengi ise enzim üretiminin olmadığını göstermektedir. Sarı renk oluşumu gösteren koloniler daha sonra ikinci basamak tarama çalışmasına alındı.

- Kazein Agar (1 litre)
  - 8 g Maya özütü
  - 4 g Kazein Hidrolizat
  - 4.2 g K_2HP0_4
  - 3 g KH_2P0_4
  - 15 g Agar
  - Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak 121 ^oC'ta 20 dakika otoklav edildi.

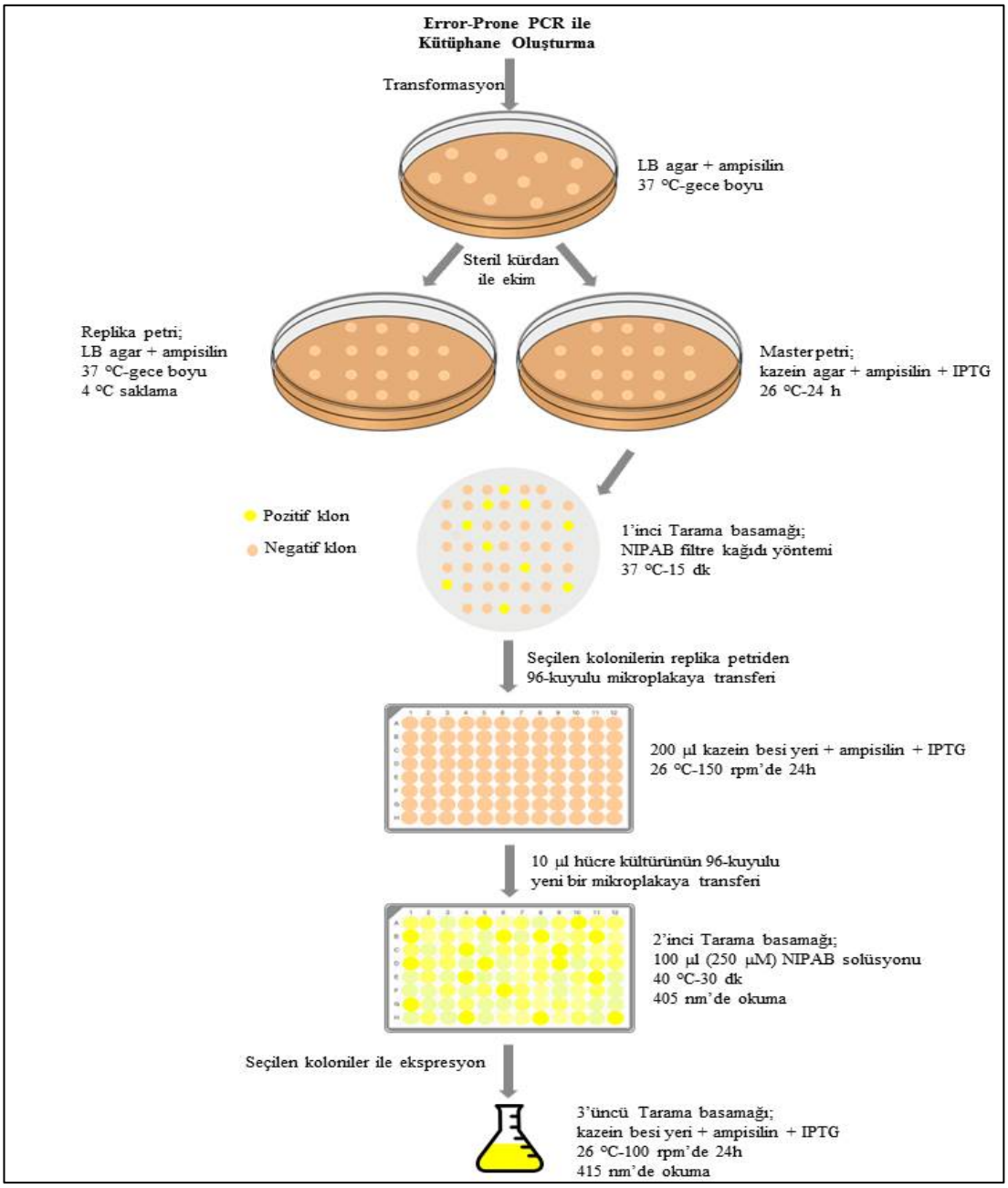
- 96-Kuyulu Mikroplaka Yöntemi

İkinci basamakta, penisilin G asilaz üreten pozitif kolonilerin her biri steril bir kürdan ile replika petrilerden alınarak, her bir kuyusunda ampisilin (100 µg/ml) ve 0.1 mM IPTG ile zenginleştirilmiş 200 µl kazein besi yeri bulunan 96-kuyulu mikroplakaya transfer edildi. Certomat® BS-T inkübatör-çalkalayıcıda (Sartorius, Göttingen, Germany) 26 ^oC'ta 150 rpm yatay çalkalama hızında 24 saat inkübasyonun ardından, penisilin G asilaz aktivitesi substrat olarak NIPAB kullanılarak kantitatif olarak ölçüldü. Bunun için her bir kuyudan 10 µl hücre kültürü alınarak, yeni bir mikroplakaya transfer edildi ve daha sonra her bir kuyuya 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponu, içerisinde hazırlanmış 100 µl 250 µM NIPAB çözeltisi ilave edildi. 40 ^oC'ta 30 dakika inkübasyonun ardından, OD_{405}'teki absorbans değerleri Fluostar Omega Mikroplaka Okuyucu (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) ile belirlendi. Her bir kuyunun aktivitesi 600 nm'deki kültür yoğunluğuna bölünerek normalize edildi ve yaban tip ile karşılaştırıldı. Yaban tipe göre daha yüksek normalize edilmiş aktiviteye sahip koloniler seçilerek üçüncü basamak tarama çalışmasına alındı.

- Erlen Düzeyinde Gen Ekspresyonu Çalışması ile Aktivite Tespiti

Üçüncü tarama basamağı için, ikinci tarama basamağında yaban tipe göre daha yüksek aktivite gösteren koloniler, Bölüm 5.1.8'de anlatıldığı gibi ampisilin (100 µg/ml) içeren kazein besi yerinde 26 ^oC'ta 24 saat boyunca büyütüldü. Kültürler OD_{600} 0.6-0.8 aralığında 100 µM IPTG ile uyarıldı. IPTG uyarımı sonrası kültürün 24'üncü saatinde 10 ml örnek alınarak, alınan bu örneklerde hücre içi penisilin G asilaz aktivitesi değerlendirildi. Penisilin G asilaz aktivitesi substrat olarak penisilin G kullanılarak, Bölüm 5.1.10'da tanımlanan metoda göre belirlendi. Yaban tipe

görece daha yüksek aktivite sergileyen koloniler seçilerek, *pac* genlerinin DNA dizileri belirlendi.



Şekil 5.1: Mutant adaylarının taranmasında ve seçilmesinde kullanılan basamakların şematik gösterimi.

5.2.4. DNA Dizi Analizi Çalışmaları

Yapılan hataya eğilimli PCR çalışması sonucu elde edilen mutantlar arasından yaban tipe görece en yüksek aktiviteyi sergileyen mutant soy seçilerek, sahip olduğu *pac* geninin DNA dizisini belirlemek amacıyla yaban tipi *pac* geni ile birlikte dizi çalışmasına alındı. Dizileme için gerekli genomik materyali hazırlamak için ilgili soylardan Bölüm 5.1.2'de anlatıldığı şekilde maksiprep (büyük ölçekte) yöntemi kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen maksiprep örnekleri "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System'in" (Promega, Madison, WI, USA) kolonlarından geçirilerek temizlendi. İzole edilip temizlenen plazmit örneklerine restriksiyon enzim kesimi uygulandıktan sonra, %1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı. Miktar tayininin ardından örnekler, İONTEK firmasına DNA dizilemesi için gönderildi.

DNA dizilerinin belirlenmesinin ardından yaban tipi ile mutant enzim saflaştırma ve nitelendirme çalışmalarına alınarak, mutasyonun enzim üzerindeki olası etkileri incelendi.

5.3. Penisilin G Asilazın Saflaştırma ve Nitelendirme Çalışmaları

Tez çalışmasının üçüncü basamağı olan saflaştırma çalışmalarında penisilin G asilaz enziminin saflaştırılmasında iki basamaklı bir saflaştırma stratejisi uygulandı. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından örneklere DEAE-Sefaroz FF anyon değiştirici kromotografisi uygulanarak saflaştırma işlemi tamamlandı. Saflaştırma sırasında elde edilen fraksiyonların ve saflaştırılan enzimlerin moleküler ağırlıkları ile saflıkları %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] ile belirlendi. Saflaştırma basamaklarında elde edilen örneklerin ve oluşturulan enzim havuzlarının protein miktarları ise standart olarak sığır serum albümininin (BSA) kullanıldığı Bradford yöntemi [Bradford, 1976] ile belirlendi. Nitelendirme çalışmalarında sıcaklık ve pH başta olmak üzere çeşitli metal iyonlarının, organik çözücülerin ve inhibitörlerin penisilin G asilaz aktivitesi üzerindeki etkileri çalışıldı. Ayrıca çeşitli substratlar kullanılarak saflaştırılmış enzimlerin substrat özgüllüğü belirlendi.

5.3.1. Penisilin G Asilazın Saflaştırılması

Yaban tipi ve mutant soy, ampisilin (100 µg/ml) içeren kazein besi yerinde 26 ^{o}C'ta 100 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Kültürler OD_{600} 0.6-0.8 aralığında 100 µM IPTG ile uyarıldı. Kültürün 24'üncü saatinde örnekler, 4 ^{o}C'ta 7000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek toplandı. Elde edilen hücre peletleri ağırlıklarının 10 katı oranında, mililitre olarak, 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponu içerisinde çözüldü ve elde edilen hücre süspansüyonu, Sonifier® S-250D dijital sonikatör'ün (Branson, Danbury, CT, USA) büyük boy probu kullanılarak 20 sn vuruş 30 sn duruş olacak şekilde %30 şiddette sonikasyon işlemine tutuldu. Açığa çıkan protein miktarının Bradford yöntemiyle izlendiği sonikasyon işlemi her bir örnek için ortalama 5 dakika süreyle uygulandı. 4 ^{o}C'ta 10000 rpm'de 30 dakika santrifüjün ardından, elde edilen sonikasyon üst sıvısının pH'sı 7.0'ye ayarlandı ve içeriğindeki nükleik asit kalıntılarını çöktürmek amacıyla %0.7'lik (ağırlık/hacim) streptomisin sülfat ile muamele edildi. 4 ^{o}C'ta 30 dakika boyunca karıştırmanın ardından, oluşan çökelti 4 ^{o}C'ta 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Santrifüj sonunda elde edilen üst sıvıya son derişimi %40 olacak şekilde amonyum sülfat eklenerek, manyetik karıştırıcıda 4 ^{o}C'ta 2 saat süreyle karıstırıldı. %0-40 doygunlukta çöken proteinler 4 ^{o}C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Çöken kısım atılırken, üst sıvıya son derişimini %60'a ayarlayacak miktarda amonyum sülfat eklenerek, 4 °C'ta gece boyu karıştırıldı ve bu sürenin sonunda 4 ^{o}C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı atıldı ve elde edilen pelet, 10 mM potasyum fosfat, pH 7.0 tamponu içerisinde çözüldü ve aynı tampona karşı önce 2 saat boyunca, ardından tampon yenilenerek gece boyu 4 ^{o}C'ta diyaliz edildi. Gece boyu diyalizin ardından tampon tekrar yenilenerek 2 saat daha diyalize devam edildi. Diyaliz bitiminde, diyaliz örneği 4 °C'ta 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı 10 mM potasyum fosfat, pH 7.0 tamponu ile dengelenen 9.5x1.8 cm boyutlarındaki DEAE-Sefaroz FF anyon değiştirici kromotografi kolonuna (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA) yüklendi ve BIO-RAD saflaştırma sistemi (Hercules, CA, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Kolon, 10 mM potasyum fosfat, pH 7.0 tamponu ile akış hızı 16.8 ml/saat olacak şekilde yıkanarak protein elusyonu gerçekleştirildi. OD_{280}'deki absorbans değerleri gözetilerek seçilen fraksiyonlardaki enzimatik

aktiviteye Bölüm 5.1.10'da anlatıldığı gibi bakılarak, aktif enzimin hangi fraksiyon aralığında olduğu belirlendi ve aktif fraksiyonların SDS-PAGE profilleri çıkarıldı. Fraksiyonların aktiviteleri ve SDS-PAGE profilleri birlikte değerlendirilerek, aktif fraksiyonlar üç farklı havuzda toplandı ve nitelendirme çalışmalarında kullanılmak üzere 4 ^{o}C'ta saklandı. Nitelendirme çalışmaları en yüksek enzim aktivitesinin alındığı ve görece saf olan havuz ile gerçekleştirildi.

5.3.2. Bradford Testi ile Protein Miktarının Belirlenmesi

Saflaştırma aşamalarında elde edilen örneklerin ve oluşturulan enzim havuzlarının protein miktarları, standart olarak sığır serum albümininin ve boya olarak ta Coomassie Brillant Blue G-250'nin kullanıldığı Dye Binding olarak da adlandırılan Bradford yöntemi [Bradford, 1976] kullanılarak belirlendi.

Belirlenen miktardaki enzim örneği eppendorf tüplerine alındı ve distile su ile 800 µl'ye tamamlandı. Üzerine 200 µl Coomassie Brillant Blue G-250 boyası eklenen örnekler, alt üst edilerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Sürenin bitiminde spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda, protein içermeyen köre karşı okundu.

- Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılarak Bradford analizi için kalibrasyon eğrisi hazırlandı. 2-10 µg aralığında BSA miktarlarına sahip örnekler distile su ile 800 µl'ye tamamlandı ve her bir tüpe 200 µl Bradford boyası eklenerek, spektrofotometrede BSA içermeyen köre karşı, 595 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen OD_{595} değerlerinin, verilen BSA miktarlarına karşı yerleştirilmesi ile çizilen grafikten elde edilen eğim, protein konsantrasyonunun ve toplam protein miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

Protein konsantrasyonu (mg/ml)= OD_{595} / eğim / örnek hacmi (µl) (5.2)

Toplam protein miktarı (mg)= Protein konsantrasyonu x örnek hacmi (µl) (5.3)

5.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Saflaştırma sırasında elde edilen fraksiyonlara ait protein örneklerinin ve saflaştırılan enzimlerin moleküler ağırlıkları ile saflıkları, protein belirteçleri kullanılarak %12'lik SDS-PAGE ile belirlendi [Laemmli, 1970]. SDS-PAGE için Tablo 5.8'de verilen ayırma (alt) ve derişim (üst) jellleri hazırlandı.

Tablo 5.8: SDS-PAGE'de kullanılan jeller ve içerikleri.

Ayırma Jeli (Alt Jel)	Derişim Jeli (Üst Jel)
750 µl dH_2O 3750 µl 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8/%0.2 SDS 3 ml Akrilamit/Bisakrilamit (30:1) 90 µl %10 APS 6 µl TEMED	1050 µl dH_2O 1500 µl 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8/%0.2 SDS 390 µl Akrilamit/Bisakrilamit (30:1) 60 µl %10 APS 3 µl TEMED

- Örneklerin Hazırlanması

Eppendorf tüplerine örneklerden 15 µl ve protein belirtecinden 3 µl alınarak, üzerlerine 20 µl'ye tamamlanacak şekilde yükleme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler elle karıştırılılıp kısa bir süre santrifüj edildikten sonra, 5 dakika boyunca kaynayan suda bekletilerek yükleme için hazır hale getirildi.

Jeller dökülüp polimerize olduktan sonra hazırlanan örnekler ve protein belirteci kuyulara yüklendi. Kuyuların bulunduğu cam plakaları taşıyan kasetler, 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulan elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Elektroforez, bantlar ayırma jeline (alt jel) geçene kadar 100 volt'ta, daha sonra 200 voltta gerçekleştirildi. Yürütme işlemi, yükleme tamponundaki bromofenol blue'nun ayırma jelinden çıkmasını takiben 20 dakika daha sürdürülerek durduruldu. Yürütme tamamlandığında çıkarılan jel önce boyama çözeltisinde, ardından da distile su ile yıkandıktan sonra boyanın açılması için arıtma çözeltisinde hafifçe çalkalanarak bekletildi.

- Yükleme Tamponu

  - 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, %1 SDS, 2 mM EDTA, %1 β-merkaptoetanol, %10 gliserol, %0.2 bromofenol blue.

- 5X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

  - 15 g Tris baz, 72 g glisin ve 5 g SDS, distile su içerisinde çözülerek 1 litreye tamamlandı.

- Boyama Çözeltisi

  - 100 ml %10 asetik asit, 100 ml %95'lik alkolde çözülmüş %0.25 Coomassie Blue.

- Arıtma Çözeltisi

  - % 5 asetik asit, % 50 etanol.

5.3.4. Penisilin G Asilazın Nitelendirilmesi

Yaban tipi ve mutant penisilin G asilazı için, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değiştirici kromatografi yöntemleri kullanılarak yapılan iki basamaklı saflaştırma işleminden sonra elde edilen aktif fraksiyonların toplandığı üç farklı havuz arasından her iki enzim için en yüksek enzim aktivitesinin alındığı ve görece saf olan havuz seçilerek nitelendirme çalışmalarında kullanıldı. Nitelendirme çalışmalarında enzim aktivitesi Bölüm 5.1.10'da anlatıldığı şekilde belirlendi. Bu bölümde yapılan tüm ölçümler üç kez tekrar edildi ve ortalama değerleri hesaplanarak standart sapmaları belirlendi.

- pH ve Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

Optimal reaksiyon sıcaklığı, 25-70 ^{o}C aralığındaki farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi. Sıcaklık kararlılığı ise saflaştırılan enzimlerin 25-55 ^{o}C aralığındaki farklı sıcaklık değerlerinde 30 dakika bekletilmelerinin ardından aktivenin ölçülmesi ile belirlendi. En yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklık değeri %100 kabul edilerek, diğer sıcaklıklardaki kalan aktivite değerleri hesaplandı.

Enzimlerin optimal pH değeri, 50 mM derişimde farklı pH (pH 4.0-10) değerlerine sahip tamponlar kullanılarak enzim aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. pH 3.0-6.0 aralığı için sodyum asetat-asetik asit tamponu, pH 6.0-8.0 aralığı için

potasyum fosfat tamponu, pH 8.5-9.0 aralığı için Tris-HCl tamponu ve pH 9.5-10.0 aralığı için ise glisin-NaOH tamponu kullanıldı. pH kararlılığı ise enzimlerin ilgili pH (pH 4.0-10) değerlerine sahip tamponlarda 4 ^{o}C'ta 48 saat boyunca tutulmasını takiben aktivitenin ölçülmesi ile belirlendi. En yüksek aktivitenin elde edildiği pH değeri %100 kabul edilerek, diğer pH'lardaki kalan aktivite değerleri hesaplandı.

- 50 mM Sodyum Asetat-Asetik Asit Tamponu (pH 3.0-6.0)
  - 100 mM sodyum asetat ve 100 mM asetik asit hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH'a ayarlandı ve 50 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 50 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 6.0-8.0)
  - 100 mM KH_2PO_4 ile 100 mM K_2HPO_4 hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH'a ayarlandı ve 50 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH 8.5-9.0)
  - 100 mM Tris ve 100 mM HCl hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH'a ayarlandı ve 50 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 50 mM Glisin-NaOH Tamponu (pH 9.5-10)
  - 100 mM Glisin ve 100 mM NaOH hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH'a ayarlandı ve 50 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- Çeşitli Kimyasalların ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı metal iyonlarının, amonyum tuzlarının, efektör maddelerin ve organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, saflaştırılan enzimler ilgili maddeleri içeren aktivite tamponunda 25 ^{o}C'ta 30 dakika boyunca tutuldu ve sonrasında aktiviteleri ölçüldü. Kimyasal eklenmeyen enzimin aktivitesi % 100 kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplandı. Çalışmada; 10 mM metal iyonları ($FeCl_2$, $FeCl_3$, LiCl, $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $FeSO_4$, NaCl, KCl, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$), 10 mM amonyum tuzları [$(NH_4)_2SO_4$, NH_4Ac], 1 mM ve 10 mM efektör maddeler [etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve β-merkaptoetanol (β-ME)], %10 ve %30 organik çözücü [aseton, etanol, metanol, izopropanol, izoamil alkol, dimetil sülfoksit (DMSO), asetonitril] kullanıldı.

- Stabilize Edici Ajanların Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Stabilize edici ajanların penisilin G asilazın sıcaklık kararlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, saflaştırılan enzimler %10 ve %30 gliserol, etilen glikol (EG) ve dimetil sülfoksit (DMSO) içeren aktivite tamponunda 50 ve 55 ^{o}C'ta 30 dakika boyunca bekletildi ve sonrasında aktiviteleri ölçüldü. Stabilize edici ajan eklenmeyen enzimin aktivitesi % 100 kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplandı.

- Enzimlerin Substrat Özgüllüğünün Belirlenmesi

Saflaştırılan enzimlerin substrat özgüllüğü, 50 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponunda çözülerek hazırlanan 15 mM derişimindeki çeşitli substratların (penisilin G, ampisilin, penisilin V, amoksisilin, sefaleksin, kloksasilin, dikloksasilin ve sefalosporin C) varlığında çalışıldı. Hazırlanan substratlar aktivite testinde kullanıldı ve en yüksek aktivitenin elde edildiği substratın sonucu %100 kabul edilerek, diğer substratların göreceli yüzde değerleri belirlendi.

5.4. Moleküler Modelleme Çalışmaları

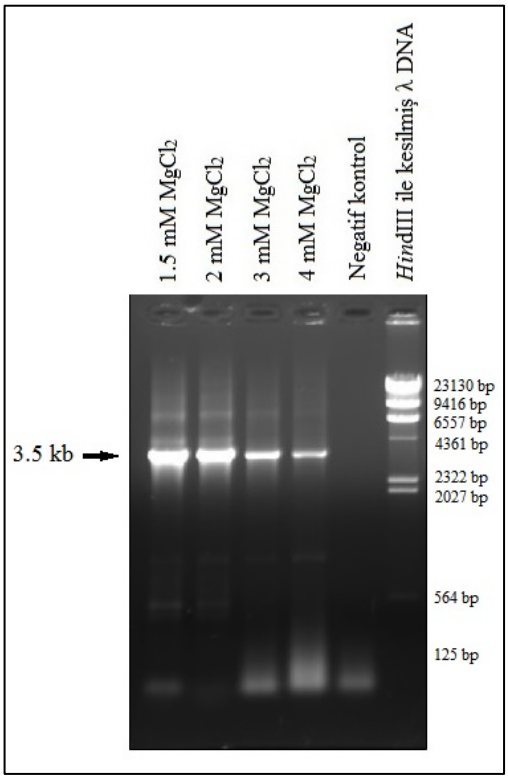
Mutasyon çalışmaları sonucu elde edilen penisilin G asilaz mutantının moleküler modeli, Phyre2 server yardımıyla "one-to-one threading" protokolü kullanılarak oluşturuldu [Kelley and Sternberg, 2009]. Modelleme çalışmasında, Hewitt et al. (2000) tarafından tanımlanan *E. coli* penisilin G asilazının üç boyutlu yapısı (PDB ID: 1E3A) kalıp olarak kullanıldı. Kalıp ve model arasında K297I mutasyonuna ek olarak, üç tane daha amino asit farklılığı görüldü. Bunun dışında iki yapı arasında neredeyse %100 dizi benzerliği görüldü.

6. BULGULAR

6.1. *E. coli* ATCC 11105 Soyuna Ait *pac* Geninin pUC19 Plazmitine Klonlanması ve Ekspresyonu

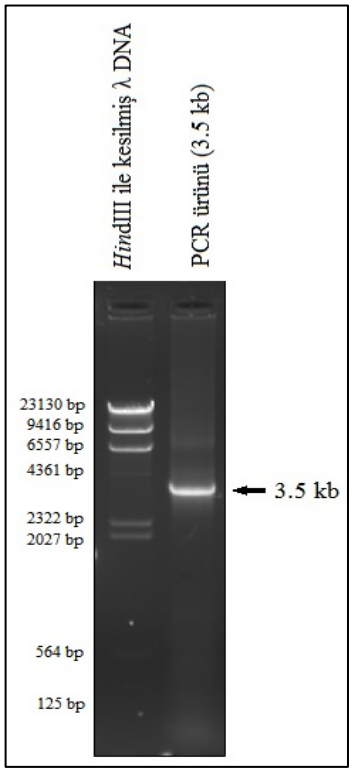
E. coli ATCC 11105 soyuna ait -52 bölgesinden itibaren yaklaşık 2.6 kb'lik *pac* geni ile birlikte *pac* geninden sonra gelen, *pac* geninin aktivitesinde önemli bir rolü olduğu düşünülen ve *E. coli* kromozomu üzerinde genin 3' ucunda yer alan yaklaşık 900 bç'lik bölge bir bütün olarak (toplamda 3.5 kb'lik DNA parçası) tasarlanan primerler kullanılarak *E. coli* ATCC 11105 kromozomal DNA'sından PCR ile çoğaltıldı ve pUC19 plazmitine (2.7 kb) klonlandı.

pac geninin çoğaltıldığı PCR çalışmasında istenilen saflıkta ürün elde edebilmek amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Uygun Mg^{2+} derişimini belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmasında, 1.5 mM, 2 mM, 3 mM ve 4 mM $MgCl_2$ derişimleri kullanıldı. Optimizasyon çalışması sonucu elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profilleri Şekil 6.1'de verildi.



Şekil 6.1: FG11-PA16 primer çifti ile yapılan optimizasyon çalışması sonucu çoğaltılan PCR ürünlerinin agaroz jel profili.

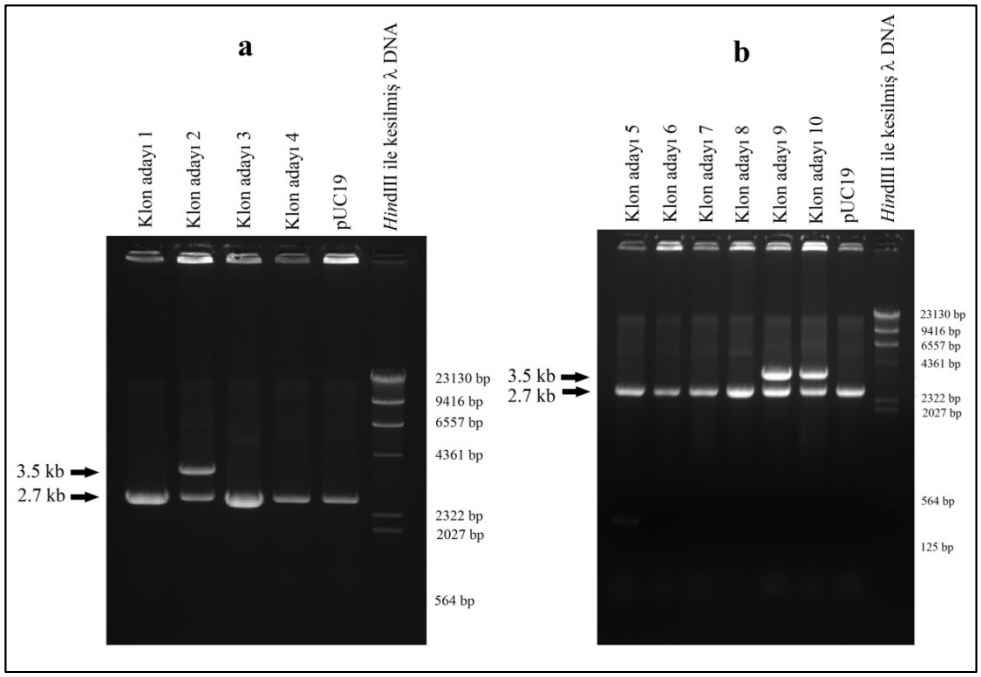
Optimizasyon çalışması sonucunda agaroz jel profilleri incelendiğinde, kontrol kuyusu hariç diğer bütün kuyularda beklenen büyüklükte (3.5 kb) ürün elde edildiği gözlemlendi. Ayrıca kontrol tüpünde herhangi bir üretimin olmaması PCR reaksiyonunun bulaşsız bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi. 2 mM $MgCl_2$ derişiminde verimin oldukça iyi olduğu ve dNTP'lerin diğer Mg^{2+} derişimlerine göre büyük oranda kullanıldığı görüldü. Bu nedenle 2 mM $MgCl_2$ derişiminin büyük ölçek PCR için kullanılmasına karar verildi. Klonlama çalışması için istenen miktarda ürün elde edebilmek amacıyla aynı program ve koşullar kullanılarak *pac* geninin fazla miktarda üretimi gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen ürünün agaroz jel profili Şekil 6.2'de verildi.



Şekil 6.2: *pac* geninin FG11-PA16 primer çifti ile büyük ölçekte üretilmesi.

E. coli ATCC 11105 *pac* geninin PCR aracılığı ile çoğaltılmasının ardından, çoğaltılan *pac* geni ve pUC19 plazmiti klonlama amacıyla *Eco*RI ve *Hin*dIII enzimleri ile kesildi ve sonrasında jelden izole edilerek, yine agaroz jelde miktar tayinleri yapıldı. Miktar tayininin ardından *pac* geninin aynı enzimlerle kesilmiş pUC19 plazmitine klonlanması amacıyla ligasyon gerçekleştirildi. Hazırlanan ligasyon karışımı ile *E. coli* JM109 kompetan hücreleri transforme edildi.

Transformasyon sonucunda elde edilen kolonilerden rastgele 10 tanesi seçilerek, STET yöntemi ile plazmit izolasyonu (miniprep) gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitler *Eco*RI ve *Hin*dIII enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jele yüklenerek istenilen DNA fragmanını içerip içermedikleri kontrol edildi. Elde edilen jel profilleri Şekil 6.3.a ve Şekil 6.3.b'de verildi.



Şekil 6.3: *Eco*RI ve *Hin*dIII ile kesilmiş klon adaylarının agaroz jel profili. a) 1, 2, 3 ve 4 numaralı klon adayları. b) 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı klon adayları.

İzole edilen plazmitlerin *Eco*RI ve *Hin*dIII enzimleri ile kesimi sonrası agaroz jel profilleri incelendiğinde, Şekil 6.3.a'da yer alan klon adayı 2 ile Şekil 6.3.b'de yer alan klon adayı 9 ve klon adayı 10'daki bant büyüklüklerinin beklenen büyüklük (2.7 ve 3.5 kb'lik iki bant) ile uyumlu olduğu görüldü.

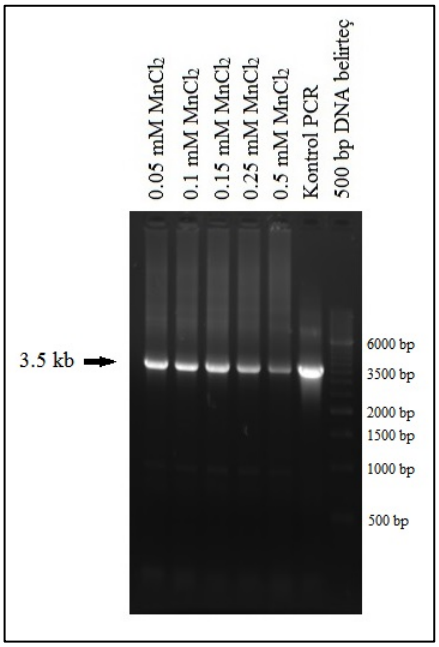
Klonlama ve transformasyon çalışmaları sonucunda elde edilen kolonilerden izole edilen plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası üç tanesinin beklenen büyüklükte parça taşıdığının belirlenmesinin ardından, üç klon adayının penisilin G asilaz üretip üretmediğini belirlemek amacı ile ekspresyon çalışması gerçekleştirildi. Ekspresyon çalışması kazein besi yerinde 26 ^{o}C'ta ve IPTG uyarımlı olarak gerçekleştirildi. Kültürün 24'üncü saatinde örnek alınarak hücre içi penisilin G asilaz aktivitesi değerlendirildi. Aktivite testi sonucunda üç klon adayının da penisilin G asilaz ürettiği ve sırasıyla 0.21, 0.22 ve 0.24 U/ml penisilin G asilaz

aktivitesine sahip olduğu görüldü. 0.24 U/ml penisilin G asilaz aktivitesine sahip olan klon seçilerek, pUC19-*pac*wt11 olarak adlandırıldı ve hataya eğilimli PCR çalışmalarında kullanıldı.

6.2. Hataya Eğilimli PCR (Error-Prone PCR) ve Mutant Kütüphane Taranması

E. coli ATCC 11105 soyuna ait *pac* geninin pUC19 plazmitine klonlanmasının ardından, mutant *pac* geni varyantlarını elde etmek amacıyla hataya eğilimli PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Hataya eğilimli PCR çalışmaları tasarlanan primerlerle arka arkaya yapılan iki turda, Bölüm 5.2.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. PCR çalışmasının birinci turunda, yapılan aktivite testi sonucunda seçilerek pUC19-*pac*wt11 olarak adlandırılan klona ait plazmit kalıp olarak kullanılırken, ikinci turda ise birinci tur sonucu elde edilen mutantlar arasından yaban tipe göre en yüksek enzim aktivitesi sergileyen mutanta ait plazmit kalıp olarak kullanıldı.

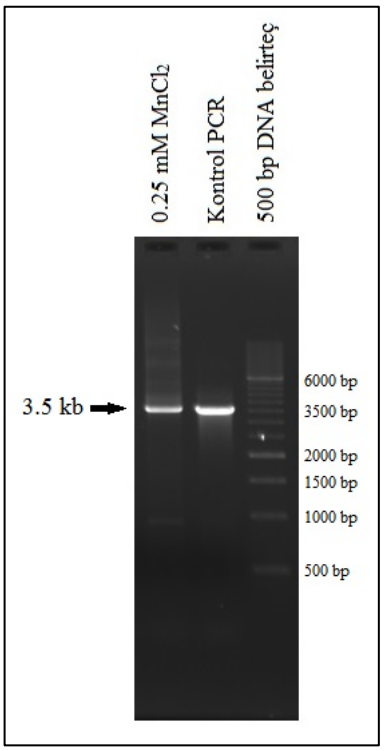
Hataya eğilimli PCR çalışmasının birinci turunda farklı Mn^{2+} derişimlerini içeren mutajenik PCR'ın yanı sıra, hataya eğilimli PCR verimini karşılaştırmak amacıyla bir tüp kontrol PCR reaksiyonu yapıldı. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profilleri Şekil 6.4'de verildi.



Şekil 6.4: Hataya eğilimli PCR çalışmasının birinci turunda yapılan mutajenik ve kontrol PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili.

PCR sonucunda agaroz jel profilleri incelendiğinde, bütün kuyularda beklenen büyüklükte (3.5 kb) ürün elde edildiği gözlemlendi. Kullanılan Mn^{2+} derişimine bağlı olarak PCR veriminin düştüğü gözlemlendi. Kontrol PCR'ında ise ürün veriminin beklendiği üzere diğerlerinden daha yüksek olduğu görüldü. Kontrol PCR'ı hariç diğer bütün mutajenik PCR'larda, yaklaşık 1 kb civarında ekstra bantların oluştuğu gözlemlendi.

Birinci tur hataya eğilimli PCR çalışmasının ardından, ikinci tura geçildi. İkinci tur hataya eğilimli PCR çalışması, mutasyon oranını artırmak amacıyla 0.25 mM $MnCl_2$ ve 2 fmol kalıp DNA kullanılarak gerçekleştirildi. İkinci turda da yine hataya eğilimli PCR verimini karşılaştırmak amacıyla kontrol PCR reaksiyonu yapıldı. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profilleri Şekil 6.5'de verildi.



Şekil 6.5: Hataya eğilimli PCR çalışmasının ikinci turunda yapılan mutajenik ve kontrol PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili.

PCR sonucunda agaroz jel profilleri incelendiğinde, iki kuyuda da beklenen büyüklükte (3.5 kb) ürün elde edildiği gözlemlendi. Kontrol PCR'ında beklendiği üzere ürün veriminin mutajenik PCR'dan daha yüksek olduğu görüldü. Yine aynı şekilde mutajenik PCR'da, yaklaşık 1 kb civarında ekstra bandın oluştuğu gözlemlendi.

E. coli ATCC 11105 soyuna ait *pac* geninin hataya eğilimli PCR ile çoğaltılmasının ardından, mutant *pac* geni kütüphanelerinin oluşturulması amacıyla klonlama çalışmasına geçildi. Hataya eğilimli PCR çalışmasının her bir turunda çoğaltılan *pac* geninin linearize olmuş pUC19 vektörüne klonlanması, Bölüm 5.2.2'de belirtilen PCR reaksiyonu ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu elde edilen koloniler üç basamaktan oluşan tarama ve seçme çalışmalarına alınarak, enzim aktivitesindeki artış yönünden incelendi. Birinci tur hataya eğilimli PCR çalışması sonucu toplam 2000 koloni elde edildi. Elde edilen bu 2000 koloni, ilk olarak NIPAB emdirilmiş filtre kağıdı yöntemi ile muamele edildi. NIPAB emdirilmiş filtre kağıdı yöntemi ile tarama sonucunda, 2000 koloni arasından 100 tanesinin sarı renk oluşturduğu gözlemlendi. Sarı renk oluşturan bu 100 koloni seçilerek, ikinci basamak tarama çalışmasına alındı. 96-kuyulu mikroplakalarda gerçekleşen ikinci tarama basamağında, seçilen 100 koloni penisilin G asilaz aktivitesi yönünden değerlendirildi. İkinci tarama basamağı sonucunda 10 koloninin yaban tipe göre daha yüksek penisilin G asilaz aktivitesine sahip olduğu görüldü ve bu 10 koloni seçilerek üçüncü basamak tarama çalışmasına alındı. Üçüncü tarama basamağında erlen düzeyinde gen ekspresyonu çalışmasına alınan 10 koloni arasından bir koloninin yaban tipe göre en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu görüldü ve bu koloniden elde edilen plazmidin kalıp olarak kullanıldığı ikinci tur hataya eğilimli PCR çalışması gerçekleştirildi.

Hataya eğilimli PCR çalışmasının ikinci turunda gerçekleştirilen klonlama ve transformasyonlar sonucunda toplam 2500 koloni elde edildi. Elde edilen bu 2500 koloninin NIPAB emdirilmiş filtre kağıdı yöntemi ile muamele edilmesi sonucunda, 150 tanesinin sarı renk oluşturduğu gözlemlendi. Filtre kağıdında sarı renk oluşturan bu 150 koloninin tamamı seçilerek, mikroplaka düzeyinde aktivite çalışmasına alındı. 96-kuyulu mikroplakalarda gerçekleştirilen aktivite çalışması sonucunda, 15 koloninin yaban tipe göre daha yüksek penisilin G asilaz aktivitesine sahip olduğu görüldü ve bu 15 koloni seçilerek üçüncü basamak tarama çalışmasına alındı. Üçüncü tarama basamağında gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonucunda, bir klonun yaban tipe göre dört kat daha fazla penisilin G asilaz aktivitesine sahip olduğu görüldü. Yaban tipe göre dört kat daha fazla enzim aktivitesine sahip olan klon seçilerek, M2234 olarak adlandırıldı ve yaban tipi soy ile birlikte DNA dizi analizi çalışmalarına alındı.

DNA dizi analizi sonrası mutant ve yaban tipi *pac* genleri karşılaştırıldığında, iki gen arasında yedi adet baz değişikliğinin (A738T, A890T, T1026A, G1029T, A1119C, G2226A, ve T2418A) olduğu görüldü (Tablo 6.1). Gen içerisinde meydana gelen bu yedi adet baz değişikliğinin, enzimin β alt biriminin N-terminal bölgesinde oluşan bir adet amino asit (K297I) değişikliği ile sonuçlandığı görüldü (Tablo 6.2).

Tablo 6.1: M2234 PGA'sında DNA ve amino asit değişiklikleri.

Baz	Baz Değişikliği	Kodon Pozisyonu	Amino Asit	Amino Asit Değişikliği
738	A→ T	3	246	Sessiz
890	A→ T	2	297	Lys → Ile
1026	T→ A	3	342	Sessiz
1029	G→ T	3	343	Sessiz
1119	A→ C	3	373	Sessiz
2226	G→ A	3	742	Sessiz
2418	T→ A	3	806	Sessiz

Tablo 6.2: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait amino asit dizilerinin karşılaştırılması. Kırmızı: sinyal peptit, mavi: α alt birim, turuncu: ara peptit, yeşil: β alt birim, mor: meydana gelen amino asit değişikliği.

```
WT          MKNRNRMIVNCVTASLMYYWSLPALAEQSSSEIKIVRDEYGMPHIYANDTWHLFYGYGYV
M2234       MKNRNRMIVNCVTASLMYYWSLPALAEQSSSEIKIVRDEYGMPHIYANDTWHLFYGYGYV
            ************************************************************

WT          VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRNYWPDAIRAQIAALSPEDMSILQ
M2234       VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRNYWPDAIRAQIAALSPEDMSILQ
            ************************************************************

WT          GYADGMNAWIDKVNTNPETLLPKQFNTFGFTPKRWEPFDVAMIFVGTMANRFSDSTSEID
M2234       GYADGMNAWIDKVNTNPETLLPKQFNTFGFTPKRWEPFDVAMIFVGTMANRFSDSTSEID
            ************************************************************

WT          NLALLTALKDKYGVSQGMAVFNQLKWLVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQQNSQTAALLPR
M2234       NLALLTALKDKYGVSQGMAVFNQLKWLVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQQNSQTAALLPR
            ************************************************************

WT          YDLPAPMLDRPAKGADGALLALTAGKNRETIAAQFAQGGANGLAGYPTTSNMWVIGKSKA
M2234       YDLPAPMLDRPAKGADGALLALTAGKNRETIAAQFAQGGANGLAGYPTTSNMWVIGISKA
            ******************************************************** ***

WT          QDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGSTAGF
M2234       QDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGSTAGF
            ************************************************************

WT          GDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWVKMLSREETITVKNGQAETFTVWRTVHGNILQTDQ
M2234       GDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWVKMLSREETITVKNGQAETFTVWRTVHGNILQTDQ
            ************************************************************

WT          TTQTAYAKSRAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNWQEWTQQAAKQALTINWYYADVNGNIGYV
M2234       TTQTAYAKSRAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNWQEWTQQAAKQALTINWYYADVNGNIGYV
            ************************************************************

WT          HTGAYPDRQSGHDPRLPVPGTGKWDWKGLLPFEMNPKVYNPQSGYIANWNNSPQKDYPAS
M2234       HTGAYPDRQSGHDPRLPVPGTGKWDWKGLLPFEMNPKVYNPQSGYIANWNNSPQKDYPAS
            ************************************************************

WT          DLFAFLWGGADRVTEIDRLLEQKPRLTADQAWDVIRQTSRQDLNLRLFLPTLQAATSGLT
M2234       DLFAFLWGGADRVTEIDRLLEQKPRLTADQAWDVIRQTSRQDLNLRLFLPTLQAATSGLT
            ************************************************************

WT          QSDPRRQLVETLTRWDGINLLNDDGKTWQQPGSAILNVWLTSMLKRTVVAAVPMPFDKWY
M2234       QSDPRRQLVETLTRWDGINLLNDDGKTWQQPGSAILNVWLTSMLKRTVVAAVPMPFDKWY
            ************************************************************

WT          SASGYETTQDGPTGSLNISVGAKILYEAVQGDKSPIPQAVDLFAGKPQQEVVLAALEDTW
M2234       SASGYETTQDGPTGSLNISVGAKILYEAVQGDKSPIPQAVDLFAGKPQQEVVLAALEDTW
            ************************************************************

WT          ETLSKRYGSNVSNWKTPAMALTFRANNFFGVPQAAAEETRHQAEYQNRGTENDMIVFSPT
M2234       ETLSKRYGSNVSNWKTPAMALTFRANNFFGVPQAAAEETRHQAEYQNRGTENDMIVFSPT
            ************************************************************

WT          TSDRPVLAWDVVAPGQSGFIAPDGTVDKHYEDQLKMYENFGRKSLWLTKQDVEAHKESQE
M2234       TSDRPVLAWDVVAPGQSGFIAPDGTVDKHYEDQLKMYENFGRKSLWLTKQDVEAHKESQE
            ************************************************************

WT          VLHVQR
M2234       VLHVQR
            ******
```

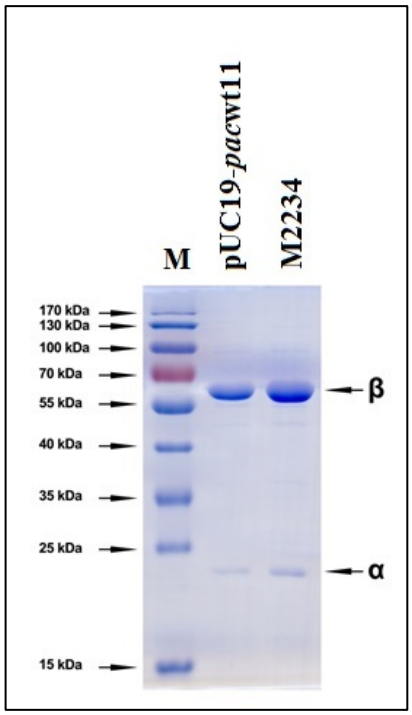
6.3. Penisilin G Asilazın Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi

Yaban tipi (WT) ve mutant (M2234) penisilin G asilaz enzimleri, DEAE-Sefaroz FF anyon değiştirici kromotografisi kullanılarak Bölüm 5.3'de belirtildiği şekilde saflaştırıldı. Saflaştırma sonuçları Tablo 6.3'de verildi. Yaban tipi penisilin G asilaz %44 verim ve 1.34 U/mg spesifik aktivite ile 33 kat saflaştırılırken, mutant enzim ise %50 verim ve 5.51 U/mg spesifik aktivite ile 43 kat saflaştırıldı. Bu sonuçlar, mutant enzimin spesifik aktivitesinin, yaban tipi enzime göre dört kat artmış olduğunu gösterdi.

Tablo 6.3: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait saflaştırma tablosu.

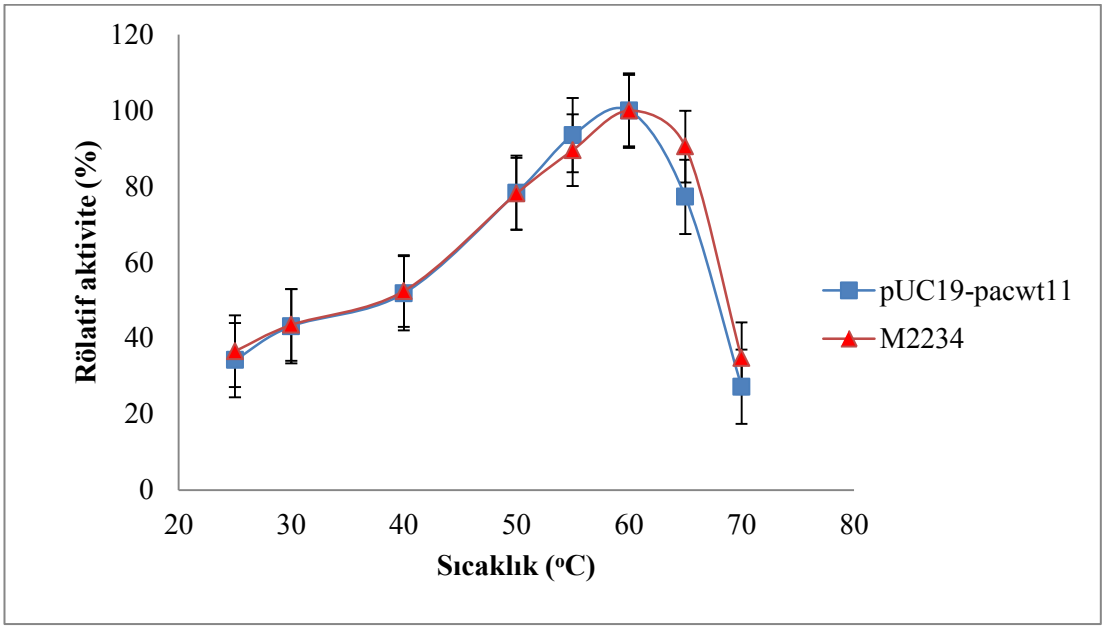
	Toplam Aktivite (U)		Toplam Protein (mg)		Spesifik Aktivite (U/mg)		Saflaştırma Oranı		Verim (%)	
	WT	M2234	WT	M2234	WT	M2234	WT	M2234	WT	M2234
Sonikasyon üst sıvısı	36.62	60.46	890.27	470.92	0.04	0.13	1.00	1.00	100.00	100.00
%40 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürme	31.61	55.25	628.04	309.96	0.05	0.18	1.25	1.39	86.32	91.38
%60 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürme	23.96	44.51	379.56	193.12	0.06	0.23	1.50	1.80	65.43	73.62
DEAE-Sefaroz FF	16.35	30.68	12.23	5.57	1.34	5.51	33.50	42.90	44.65	50.74

Saflaştırılmış enzimlerin SDS-PAGE profilleri incelendiğinde, her iki enzimin de yaklaşık olarak 24 ve 62 kDa moleküler ağırlığa sahip iki farklı alt birimden (α ve β) meydana geldiği gözlemlendi. Elde edilen SDS-PAGE profili Şekil 6.6'da verildi.



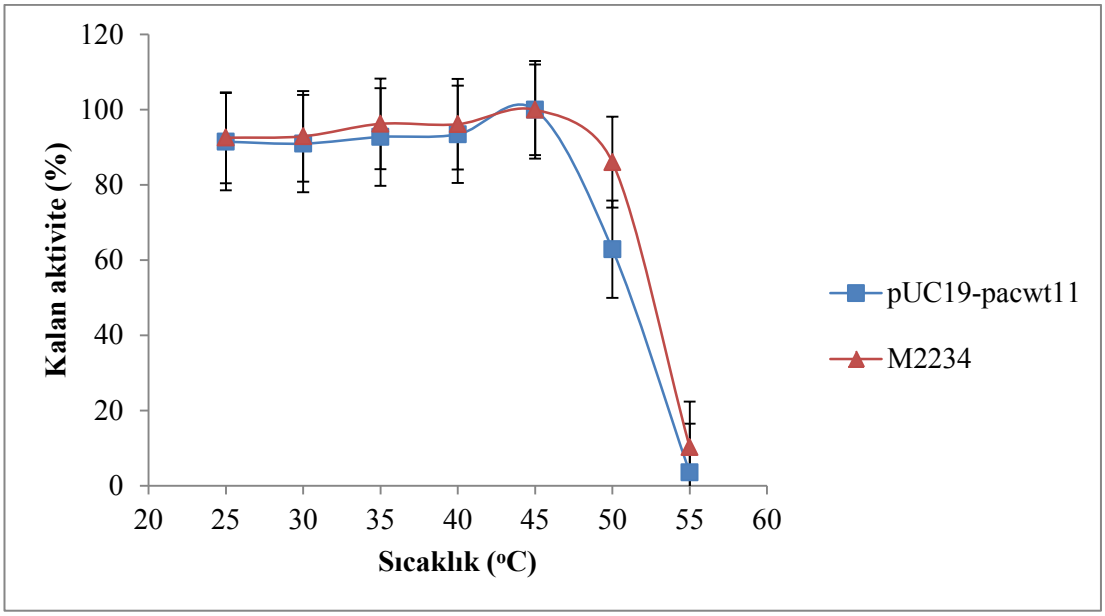
Şekil 6.6: Saflaştırılmış penisilin G asilazların SDS-PAGE profilleri.

Nitelendirme çalışmalarında gerçekleştirilen optimal sıcaklığı belirleme deneylerinde, 25-70 ^{o}C aralığındaki farklı sıcaklık değerlerinde yapılan aktivite testleri sonucunda, her iki enzim için optimum reaksiyon sıcaklığının 60 ^{o}C olduğu bulundu (Şekil 6.7).



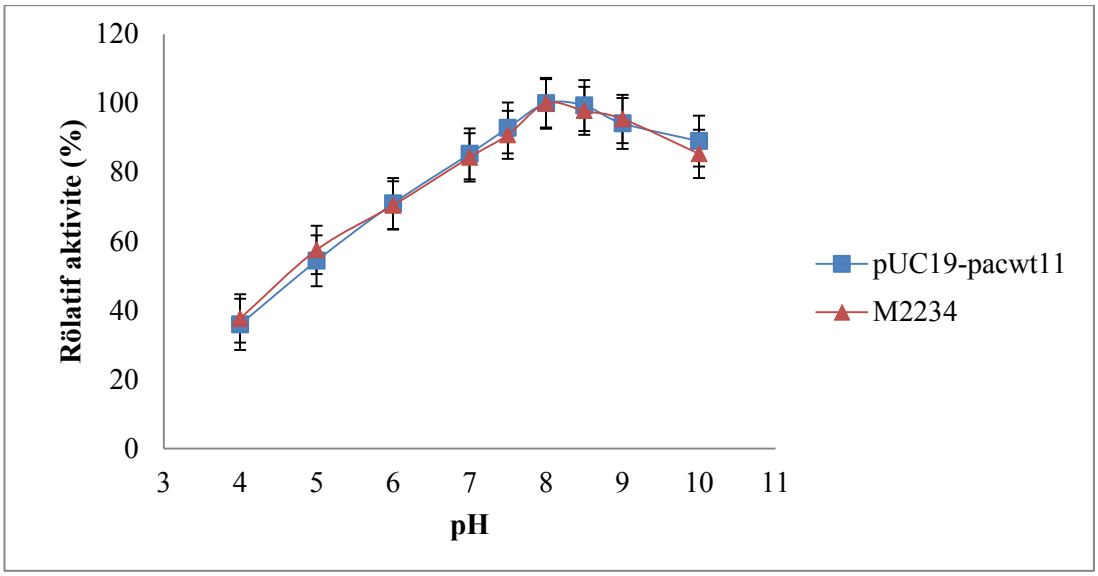
Şekil 6.7: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait optimal sıcaklık grafiği. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Enzimlerin 25-55 ^{o}C aralığındaki farklı sıcaklık değerlerinde 30 dakika bekletilmelerinin ardından gerçekleştirilen sıcaklık kararlılığı deneylerinin sonucunda ise, her iki enzimin de benzer sıcaklık kararlılığı profiline sahip olduğu görüldü (Şekil 6.8). 45 ^{o}C'ta 30 dakika bekletilme sonrası enzimlerin kararlılığını hala koruduğu, ancak bu sıcaklık değerinin üzerine çıkıldıkça aktivitede önemli bir azalmanın meydana geldiği ve 55 ^{o}C'ta aktivitenin neredeyse sıfıra yakın olduğu gözlemlendi.



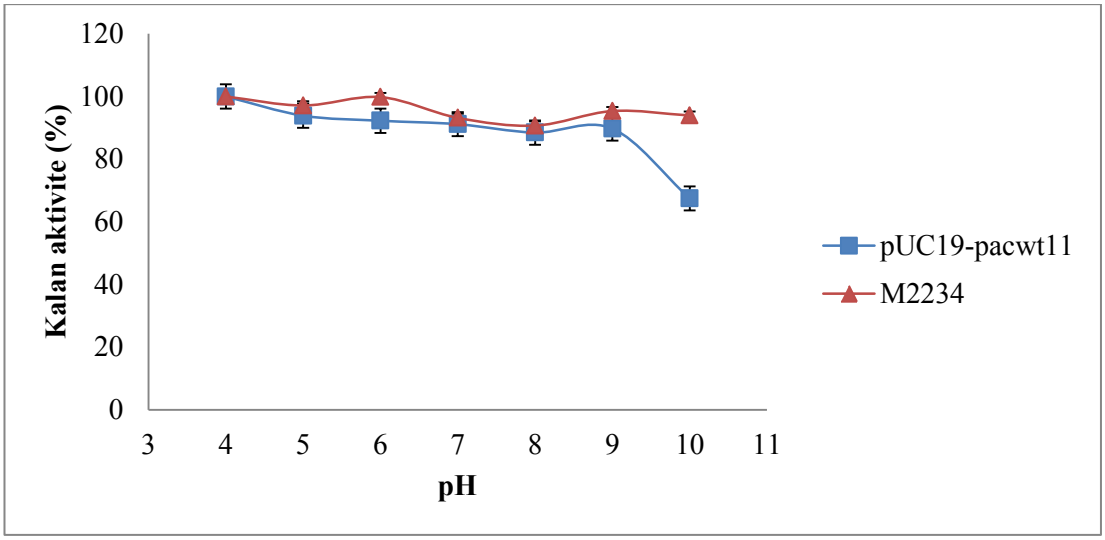
Şekil 6.8: Sıcaklığın mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının kararlılığı üzerine etkisi. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Enzimlerin optimal pH değerini belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen aktivite çalışmaları 50 mM derişimde farklı pH (4.0-10) değerlerine sahip tamponlar kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan aktivite testleri sonucunda, her iki enzim için optimal aktivite pH 8.0'de elde edildi (Şekil 6.9). Enzimler pH 4.0'de optimal aktivitelerinin %35 oranında bir aktiviteye sahipken, bu oran pH 10'da %85-90 civarındaydı.



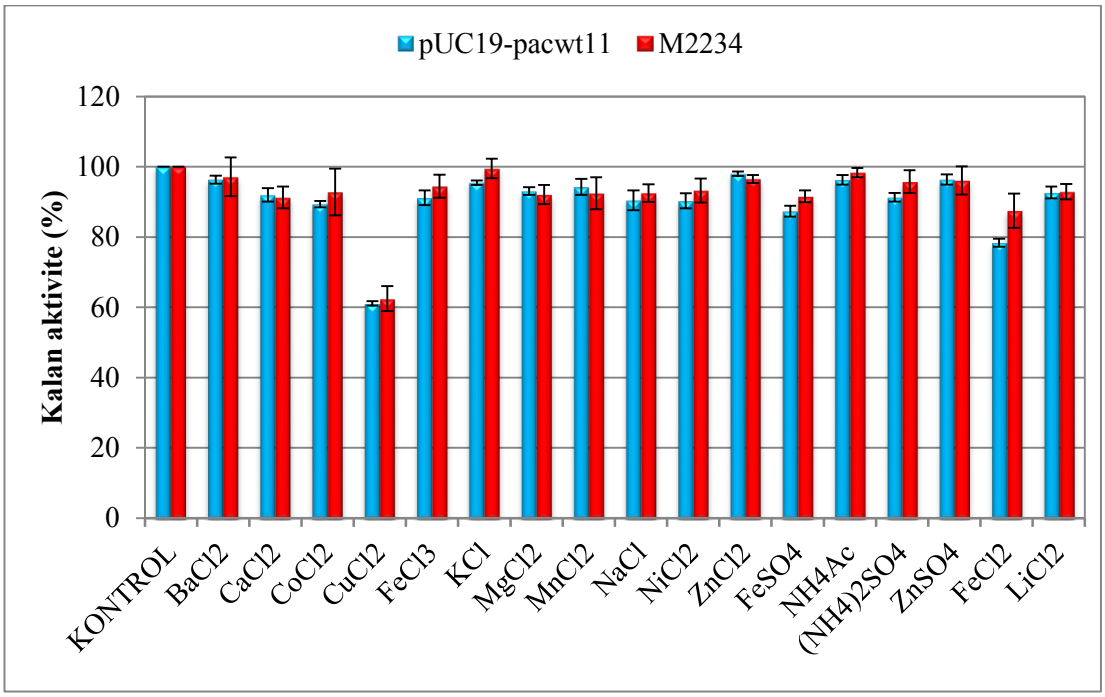
Şekil 6.9: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarına ait optimal pH grafiği. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Enzimlerin 50 mM derişimde farklı pH (4.0-10) değerlerine sahip tamponlarda 4 ^{o}C'ta 48 saat boyunca tutulmasını takiben gerçekleştirilen pH kararlılığı deneylerinin sonucunda, her iki enzimin de pH 4.0-9.0 aralığında kararlı olduğu, ancak mutant enzimin yaban tipe oranla pH 10'da daha kararlı olduğu görüldü (Şekil 6.10). Yaban tipi enzim pH 10'da aktivitesinin yaklaşık olarak %30-35'ini kaybederken, mutant enzimin bu pH değerinde daha kararlı olduğu ve aktivitesinin %94'ünü koruduğu gözlemlendi.



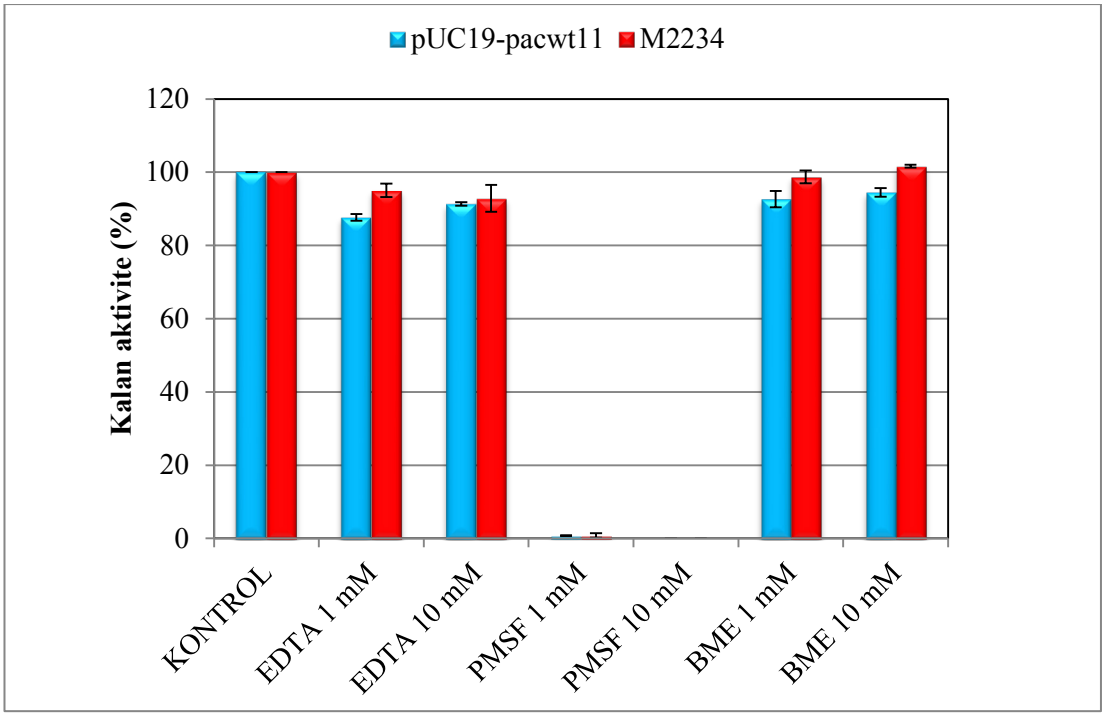
Şekil 6.10: pH'nın mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının kararlılığı üzerine etkisi. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

10 mM derişime sahip çeşitli metal iyonlarının ve amonyum tuzlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, saflaştırılan enzimler ilgili maddeleri içeren aktivite tamponunda 30 dakika boyunca 25 ^{o}C'ta tutuldu ve sonrasında aktiviteleri ölçüldü (Şekil 6.11). Aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, 10 mM derişime sahip metal iyonlarının genel olarak enzim aktivitesini kayda değer bir şekilde etkilemediği görüldü. Metal iyonlarına karşı her iki enzimin de benzer kararlılık profili sergilediği ve kalan aktivite değerlerinin %61-99 arasında değiştiği gözlemlendi. Enzim aktivitesi üzerinde en belirgin etkiyi $CuCl_2$'ün gösterdiği ve $CuCl_2$ ile muamele sonucunda her iki enzimin de başlangıç aktivitelerinin %40'nı kaybettiği görüldü. $CuCl_2$'ün yanı sıra $FeCl_2$'ünde de enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu ve kalan aktivite değerlerinin yaban tipi ve mutant enzim için sırasıyla %78 ve %87 olduğu belirlendi. Metal iyonlarına benzer şekilde amonyum tuzlarının da saflaştırılmış enzimlerin aktivitesi üzerinde kayda değer bir etkiye sahip olmadığı görüldü.



Şekil 6.11: 10 mM derişime sahip metal iyonlarının ve amonyum tuzlarının mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

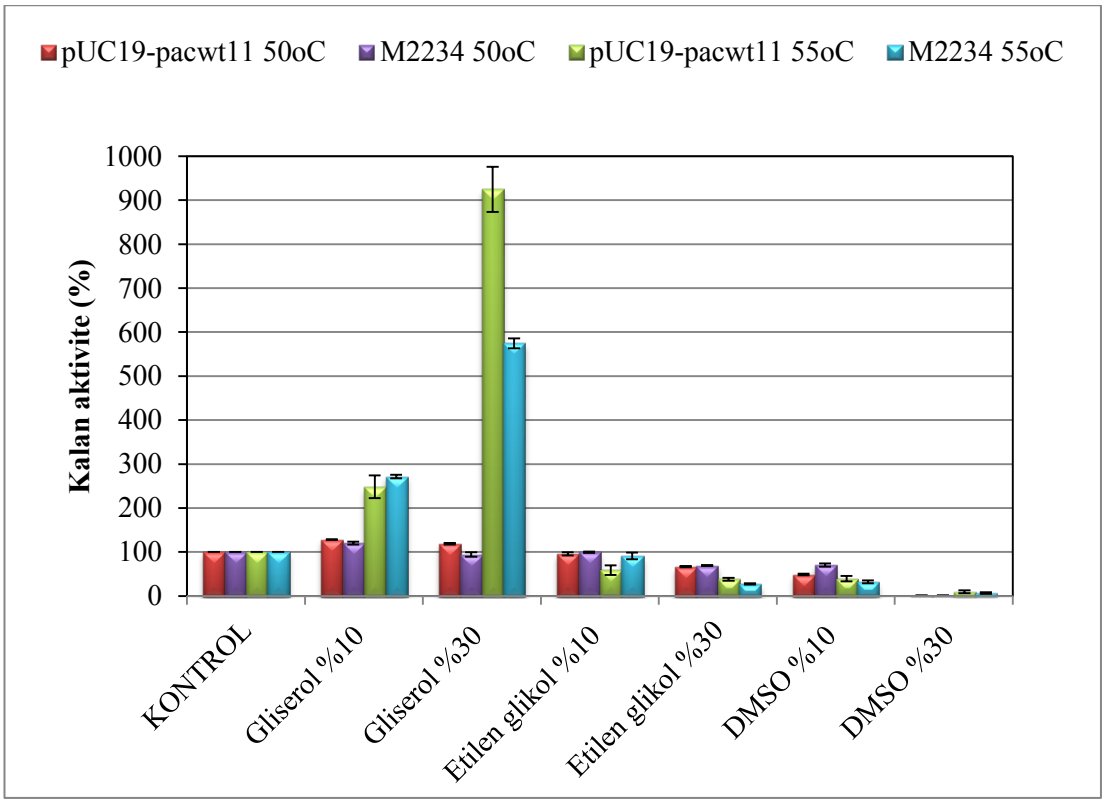
Saflaştırılan enzimlerin 1 mM ve 10 mM derişime sahip çeşitli efektör maddeler [etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve β-merkaptoetanol (β-ME)] ile 25 ^{o}C'ta 30 dakika muamele edilmesi sonucunda, PMSF'nin (1 mM ve 10 mM) her iki enzimin de aktivitesini kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği görüldü. EDTA'nın (1 mM ve 10 mM) ise her iki enzimin aktivitesini çok az (%5-15) inhibe ettiği gözlemlendi. β-merkaptoetanol'ün (1 ve 10 mM) yaban tipi enzimin aktivitesi üzerinde benzer etkiye sahip olduğu, ancak mutant enzimin aktivitesi üzerinde hemen hiç etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 6.12).



Şekil 6.12: Çeşitli efektör maddelerin mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

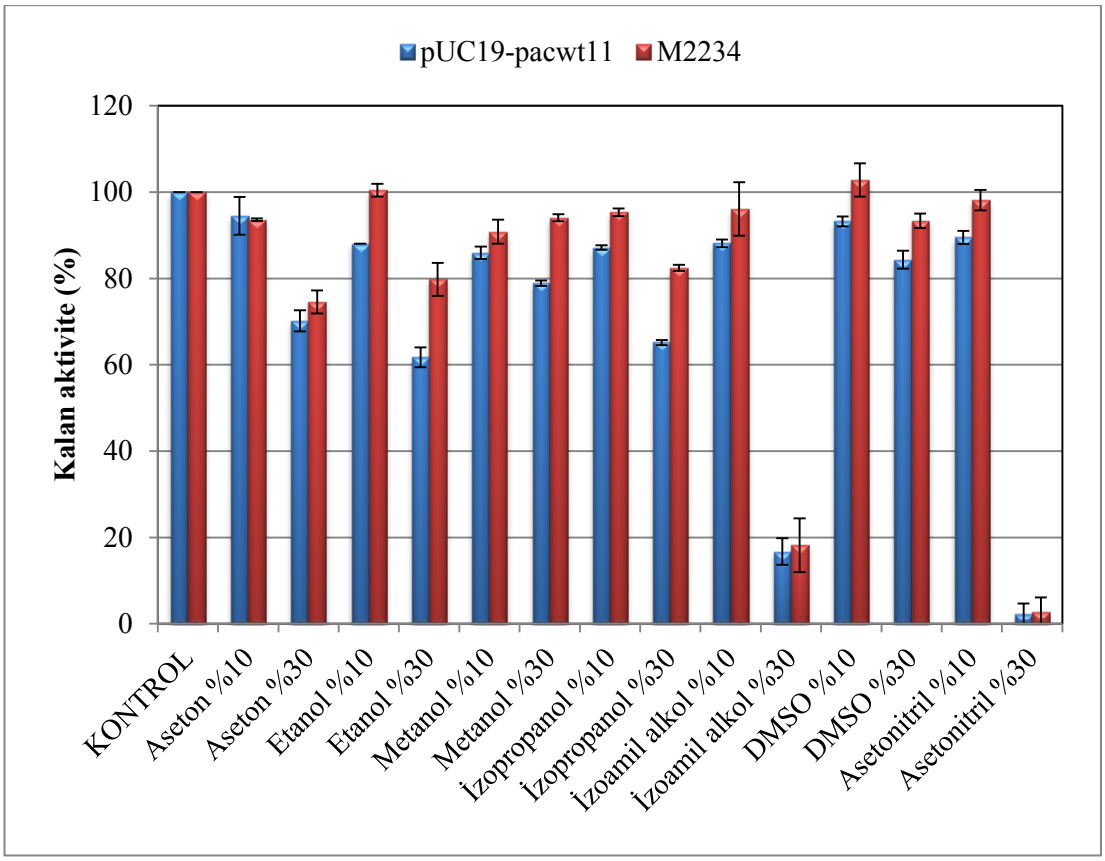
Stabilize edici ajanların penisilin G asilazın sıcaklık kararlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, saflaştırılan enzimler %10 ve %30 gliserol, etilen glikol (EG) veya dimetil sülfoksit (DMSO) içeren aktivite tamponlarında 50 ve 55 ^{o}C'ta 30 dakika boyunca bekletildi ve sonrasında aktiviteleri ölçüldü (Şekil 6.13). Aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, EG ve DMSO'nun %10 ve %30'luk derişimlerinin saflaştırılmış enzimlerin 50 ve 55 ^{o}C'taki sıcaklık kararlılığı üzerinde artırıcı yönde bir etkiye neden olmadığı görüldü. Gliserolün %10'luk derişimi, mutant ve yaban tipi enzimin 50 ^{o}C'taki sıcaklık kararlılığı üzerinde çok az da olsa artırıcı bir etki

gösterirken, %30'luk derişimi sadece yaban tipi enzimin kararlılığı üzerinde artırıcı bir etki gösterdi. Diğer taraftan gliserolün %10 ve %30 derişimleri, her iki enzimin 55 ^{o}C'taki kararlılığını kayda değer bir şekilde artırdı. Bu etkinin %30 derişimde ve özellikle yaban tipi enzimde çok daha belirgin olduğu görüldü.



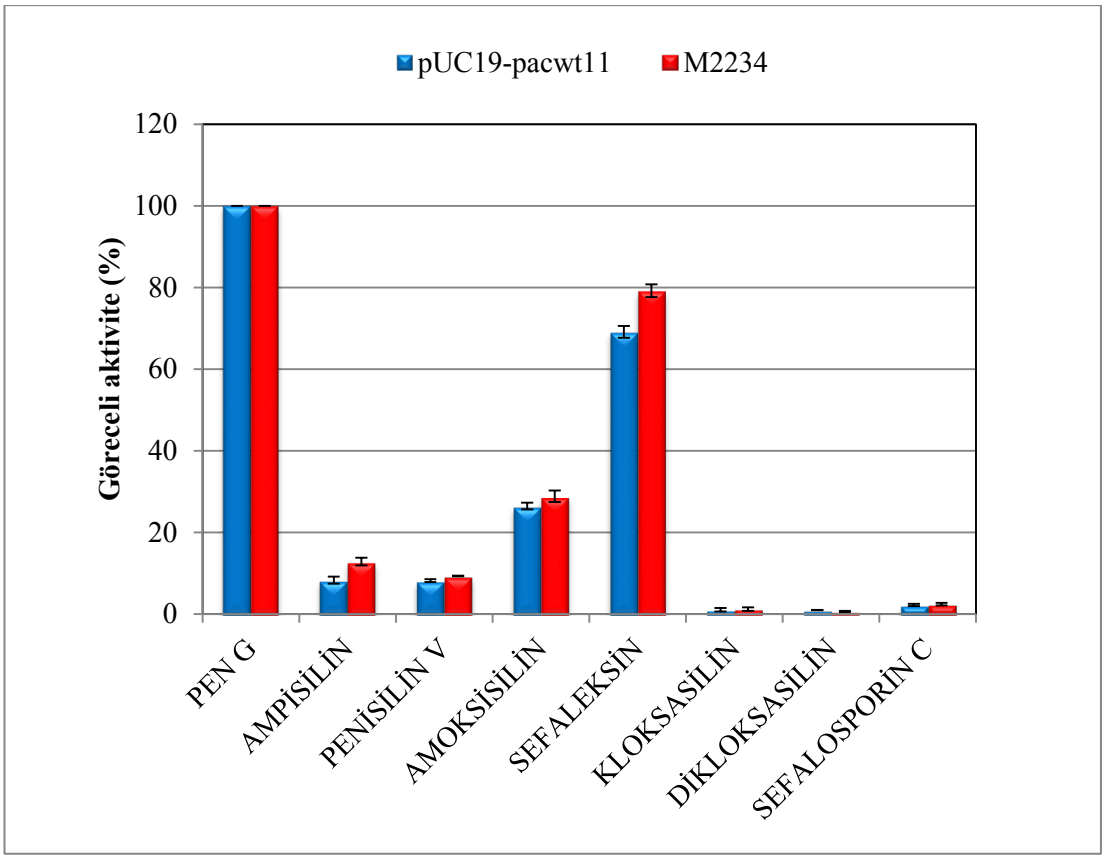
Şekil 6.13: Stabilize edici ajanların mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlarının aktiviteleri üzerine etkileri. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Saflaştırılan enzimlerin %10 ve %30 derişime sahip çeşitli organik çözücüler [aseton, etanol, metanol, izopropanol, izoamil alkol, dimetil sülfoksit (DMSO), asetonitril] ile 25 ^{o}C'ta 30 dakika boyunca muamele edilmesi sonucunda, çoğu organik çözücünün %10 derişimde mutant ve yaban tipi penisilin G asilazların aktivitelerini çok az inhibe ettiği görüldü. İnhibisyon etkisi %30 derişimde daha da yüksekti ve bu derişimde izoamil alkol ile asetonitril diğerlerinden farklı olarak enzimleri oldukça belirgin bir şekilde inhibe etti. Mutant enzimin etanol ve DMSO'nun %10 derişimine karşı bir dayanıklılık gösterdiği ve genellikle test edilen tüm organik çözücülere (%10 ve %30) karşı, yaban tipe göre daha fazla dayanıklılık sergilediği gözlemlendi (Şekil 6.14).



Şekil 6.14: Organik çözücülerin mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazların aktiviteleri üzerine etkileri. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

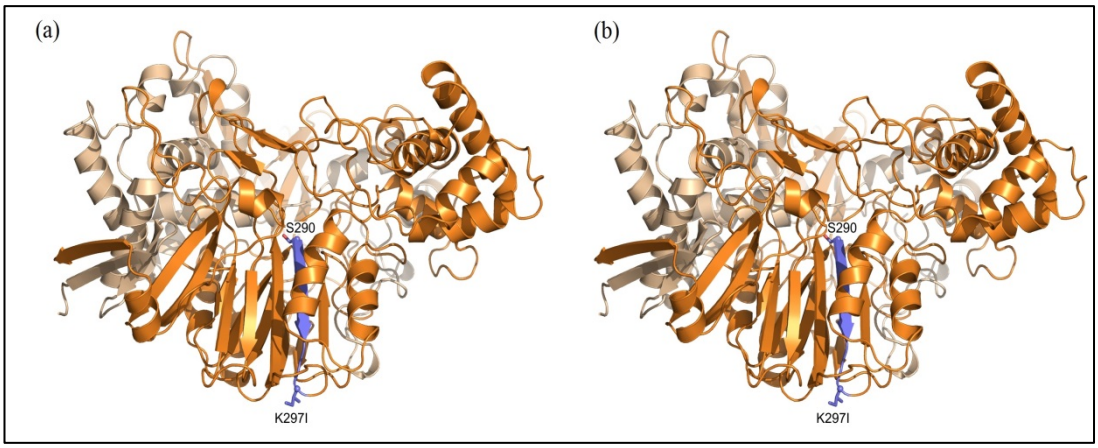
Saflaştırılan enzimlerin substrat özgüllükleri, 50 mM potasyum fosfat tamponunda, pH 8.0 çözülerek hazırlanan 15 mM derişimdeki çeşitli substratlar (penisilin G, ampisilin, penisilin V, amoksisilin, sefaleksin, kloksasilin, dikloksasilin ve sefalosporin C) kullanılarak belirlendi (Şekil 6.15). Penisilin G'nin her iki enzim için de en iyi substrat olduğu görüldü. Mutant enzimin sefaleksin, amoksisilin, ampisilin ve penisilin V'ye karşı yaban tipe göre biraz daha yüksek aktivite sergilediği gözlemlendi. Buna karşın her iki enzim de kloksasilin, dikloksasilin ve sefalosporin C'ye karşı herhangi bir aktivite göstermedi.



Şekil 6.15: Mutant (M2234) ve yaban tipi (WT) penisilin G asilazlara ait substrat özgüllüğü grafiği. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

6.4. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Mutant penisilin G asilazın üç boyutlu modeli Phyre2 kullanılarak elde edildi (Şekil 6.16). Üç boyutlu model incelendiğinde, K297I mutasyonunun enzimin β alt biriminde bulunan ve katalitik serin amino asidinin (S290) birinci rezüdüsü olduğu β ipliğini takip eden yüzey lupunda yer aldığı görüldü. S290 ile K297I mutasyonu arasındaki mesafe yaklaşık olarak 24 Å (Cα–Cα) olarak ölçüldü ve ayrıca izolösinin hidrofobik yan zincirinin çözücü ile temas halinde olduğu belirlendi.



Şekil 6.16: *E. coli* M2234 mutant enziminin Phyre2 kullanılarak oluşturulan üç boyutlu modelinin stereo figürü. a) Yandan görünüm. b) Yandan farklı açıdan görünüm. Açık turuncu: α alt birim, turuncu: β alt birim. β alt birimin birinci β ipliği ile katalitik serin rezidüsü (S290) ve K297I mutasyonu mavi ile gösterilmiştir.

7. TARTIŞMA

Enzimlerin endüstriyel biyokatolizörler olarak kullanılabilmeleri için istenilen reaksiyon koşullarına uygun özelliklere (yüksek aktivite, substrat özgüllüğü, organik çözücüye dirençlilik, pH ve sıcaklık kararlılığı) sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte doğal enzimler çeşitli reaksiyon koşullarında kullanılmak için her zaman elverişli değildir. Bu nedenle enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesi ve istenilen reaksiyon koşullarına uygun hale getirilmesi gerekmektedir [Zhao et al., 2002].

Protein mühendisliğinde enzim özelliklerinin geliştirilmesinde genellikle iki strateji kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi akılcı protein tasarımı, diğeri ise yönlendirilmiş evrim yaklaşımıdır. Yönlendirilmiş evrim metotları temelde rekombinasyona dayalı (ör. DNA karıştırma) ve rekombinasyona dayalı olmayan (ör. hataya eğilimli PCR) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yapı bilgisine gereksinim duyulmaması ve aktif bölgeden uzakta beklenmedik faydalı mutasyonların oluşabilmesi yönlendirilmiş evrim yaklaşımının avantajları olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte yönlendirilmiş evrim yaklaşımı genellikle arka arkaya yapılan birkaç turda gerçekleştirilmekte ve her bir tur sonucunda elde edilen binlerce varyantın taranması gerekmektedir. Binlerce varyantın taranması ise zaman ve iş gücünün yanı sıra ucuz, hızlı ve güvenilir tarama ve seçme yöntemlerinin kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Bütün bunların sonucunda ise genellikle küçük değişiklikler elde edilmektedir. Diğer taraftan akılcı protein tasarımında faydalı mutasyonların oluşma ihtimali daha yüksektir ve elde edilen mutant kütüphanenin boyutu oldukça küçüktür. Bu ise hızlı bir tarama ve seçme yönteminin olmadığı durumlarda, daha az zaman ve iş gücü kullanılmasına imkan vermektedir. Ancak akılcı protein tasarımının başarıya ulaşması için detaylı bir yapı ve işlev bilgisine ihtiyaç vardır. Yapı ve işlev mekanizmasının bilinmediği durumlarda enzimlere yeni özelliklerin kazandırılmasında, yönlendirilmiş evrim yaklaşımı kullanışlı bir metot olarak ortaya çıkmaktadır.

Doktora tez çalışmasında, yönlendirilmiş evrim metodu kullanılarak yüksek aktiviteye sahip penisilin G asilazının üretilmesi ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım amacıyla enzim özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yönlendirilmiş evrim metodu günümüzde enzim özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılan etkili yöntemlerden bir tanesidir [Jaeger et al., 2001], [Wang et al., 2006]. Yönlendirilmiş

evrim yaklaşımının başarısı, mutant kütüphanelerin etkili bir şekilde oluşturulmasına ve geçerli tarama/seçme yöntemlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Tez çalışmasında, elde edilen mutant kütüphanelerin artmış enzim aktivitesi yönünden taranmasında üç basamaktan oluşan bir tarama yöntemi kullanılmıştır. Tarama ve seçme çalışmalarının sonucunda hataya eğilimli PCR ile oluşturulan mutant kütüphaneler içerisinden, M2234 mutantı en yüksek enzim aktivitesine sahip mutant olarak seçilmiştir.

Akılcı protein tasarımı çalışmalarında genellikle aktif bölgeye ve/veya substrat bağlanma bölgesine yakın olan amino asit rezüdülerinin değiştirilmesi daha çok hedeflenir. Çünkü bu bölgelerde yer alan amino asit rezidülerinin değiştirilmesi sonucunda enzimlerin aktif bölge yapılarında değişikliklerin oluşması ve dolayısı ile enzimatik reaksiyonların etkilenmesi daha olasıdır. Diğer taraftan aktif bölgeden uzakta konumlanmış olan amino asitlerin fonksiyonlarının belirlenmesi ise daha zordur ve hangi amino asidin değiştirilmesi gerektiğinin belirlenmesi için detaylı bir yapı bilgisine gereksinim vardır. Doktora tez çalışmasında elde edilen M2234 mutantında, penisilin G asilaz enziminin β alt biriminin N-terminal bölgesinde tek bir amino asit mutasyonu (K297I) meydana gelmiştir. Meydana gelen tek nokta mutasyonu enzimin aktif bölgesine [Duggleby et al., 1995] uzak bir konumda yer aldığı için (~24 Å), mutasyonun enzim aktivitesi üzerindeki olası etkilerini tahmin etmemiz oldukça güç olmaktadır. Tek nokta mutasyonunun aktif bölgeye uzak bir konumda bulunmasından dolayı, aktif bölge rezidüleriyle doğrudan etkileşime girerek enzim aktivitesini etkilemesi olası gözükmemektedir. Ayrıca enzimin oluşturulan üç boyutlu modeli incelendiğinde, oluşan mutasyon sonucunda substratın aktif bölgeye bağlanmasını kolaylaştıracak herhangi bir konformasyonel değişikliğin oluşmadığı da görülmektedir. Bu nedenle, etkisini doğrudan olmayan ve mekanizmasını bilmediğimiz bir takım uzun mesafe etkileriyle göstermiş olabilir ya da oluşan mutasyonun bir sonucu olarak enzimin başka bir bölgesinde değişiklikler oluşmuş olabilir ve bunun sonucunda da enzimatik aktivite artmış olabilir. Elimizdeki veriler ışığında aktivite artışının sebep ya da sebeplerini net bir şekilde söylemek pek mümkün gözükmemektedir. Benzer şekilde aktif bölgeden uzakta meydana gelen mutasyonlar sonucunda enzimlerin katalitik özelliklerinin arttığı çeşitli araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir [Oue et al., 1999], [Jung et al., 2003], [Xu et al., 2003], [Fan et al., 2007], [Stephens et al., 2007], [Zuo et al., 2007].

Diğer taraftan, penisilin G asilaz tek bir polipeptitden oluşan inaktif öncül polipeptit olarak sentez edilir ve sonrasında posttranslasyonel proteolitik kesimlere uğrayarak aktif enzim haline gelir [Sizmann et al., 1990], [Choi et al., 1992], [Kasche et al., 1999]. β alt biriminin N-terminal bölgesinin amino asit dizilimi belirlendiğinde, β alt biriminin amino-terminal bölgesinin genellikle hidrofobik amino asitlerden oluştuğu görülmüştür [Schumacher et al., 1986]. N-terminal bölgesinin hidrofobik amino asitlerden oluşması, enzimin işlenmesinde görev alan endoproteazların kesim bölgelerini tanımaları açısından önemlidir. Diğer taraftan, Lee et al. (2000) tarafından S290 ve K299 rezidülerinin penisilin G asilaz öncülünün otokatalitik işlenmesi için kritik rezidüler olduğu ve K299 rezidüsünün, periplazmada gerçekleşen otokatalitik işlenme reaksiyonlarının pH bağımlı aktivasyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bizim durumumuzda ise, enzimin β alt biriminin N-terminal bölgesinde gerçekleşen K297I mutasyonununda pozitif yüklü yan zincire sahip lizin amino asidinin hidrofobik yan zincire sahip izolösin amino asidi ile yer değiştirmesi sonucunda enzimin N-terminal bölgesinin hidrofobisitesinde artış meydana gelmiştir. Bunun sonucunda da endoproteazların bu bölgeye bağlanması daha da kolaylaşmış olabilir ve dolayısı ile de enzimin işlenerek aktif enzim haline gelmesi daha da hızlanmış olabilir. Sonuç olarak aktivite artışında yukarıda da belirtildiği üzere doğrudan olmayan bir takım uzak mesafe etkileri rol oynamış olabilir ya da enzimin işlenerek aktif enzim oluşması kolaylaşmış olabilir. Aktivite artışında kesin nedenlerin belirlenebilmesi için daha detaylı bir çalışmaya gereksinim vardır.

Penisilin asilazlar genel olarak en çok kullanılan antibiyotik grubu olan yarı sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin endüstriyel olarak üretiminde kullanılırlar [Arroyo et al., 2003], [Giordano et al., 2006]. Ek olarak, peptit sentezi sırasında istenmeyen reaksiyonların oluşmasını engellemek amacıyla amino ve hidroksil gruplarının korunması ve kiral bileşiklerin rasemik karışımlarının ayrılması gibi bir çok önemli reaksiyonda da biyokatalizör olarak kullanılırlar. Yarı sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin üretimi için kullanılan biyoteknolojik sentez basamakları kinetik ya da termodinamik olarak kontrol edilen koşullar altında gerçekleştirilir [Kasche, 1986]. Penisilin asilazların bazı biyodönüşüm reaksiyonlarında kullanımı, sıcaklık ve pH'ya karşı gösterdikleri kararlılıklar ile ortamdaki organik çözülerin enzim üzerinde gösterdiği etkilere bağlıdır. Penisilin asilaz tarafından penisilinlerin hidroliz edilerek 6-APA'nın üretilmesi sırasında,

reaksiyon ortamına bazı yardımcı çözücülerin eklenmesinin penisilinlerin hidrolizini artırdığı rapor edilmiştir [Arroyo et al., 1999]. Diğer bazı çalışmalarda ise, β-laktam antibiyotiklerinin enzim aracılığı ile sentezlendiği reaksiyonlarda, reaksiyon ortamında organik çözücülerin ya da su-yardımcı çözücü karışımlarının kullanılmasının reaksiyon performansını artırdığı rapor edilmiştir [Illanes and Fajardo, 2001], [Wei and Yang, 2003]. Ayrıca reaksiyon ortamında hidrofobik çözücüler kullanıldığında, sentez-hidroliz reaksiyon dengesinin sentez yönünde değiştiği belirlenmiştir [Rajendhran and Gunasekaran, 2004], [Samanta, 2012]. Penisilin G asilazın organik çözücüler ya da su-organik çözücü karışımlarda genel olarak aktivitesini kaybettiği göz önüne alındığında, penisilin G asilazın organik çözücüler içerisinde kararlı olması reaksiyonların hızlandırılması için önem taşımaktadır. Enzim nitelendirme çalışmaları değerlendirildiğinde, test edilen organik çözücülerin çoğunda M2234 mutantının yaban tipe göre daha yüksek katalitik aktivite sergilemesi, mutant enzimi endüstriyel uygulamalarda uygun biyokatalizör olarak kullanılabilir kılmaktadır.

Penisilin asilazların sıcaklık karşısında sergilediği yapısal kararlılık, su içersindeki konformasyonel hareketlilikleri ile ilişkilidir. Hareketlilik serbest su moleküllerinin miktarının azaltılması ile düşürülebilir. Reaksiyon ortamına şekerler, nötral tuzlar ve polyol bileşikleri gibi stabilize edici ajanlar ilave edilerek, ortamdaki serbest su moleküllerinin miktarı azaltılabilmektedir [Arroyo et al., 2000], [Parmar et al., 2000]. Etilen glikol ve gliserolün koruyucu etkisi, sahip oldukları hidroksil gruplarının sayısı ile ilişkilidir [Azevedo et al., 1999]. İki hidroksil grubuna sahip olan etilen glikol stabilize edici bir etki göstermezken, üç hidroksil grubuna sahip olan gliserol enzim kararlılığını artırmaktadır. Ayrıca Arroyo et al. (2000) glikol bileşiklerin polaritesiyle ilişkili olarak kararlılıkta bir artışın olduğunu ve bileşik ne kadar düşük log*P* değerine sahip olursa kararlılığı o derece artırdığını rapor etmiştir. Yaptığımız çalışmada etilen glikolün enzim kararlılığı üzerinde artırıcı bir etkiye sahip olmadığı ve dolayısıyla penisilin G asilaz için inert bir çözücü olduğu belirlenmiştir. Etilen glikolün aksine gliserol ise enzim için oldukça koruyucu bir ajan olarak gözükmektedir. Gliserol (log*P*: -1.84) etilen glikolden (log*P*: -1.21) daha düşük bir log*P* değerine sahip olduğu için, sıcaklık kararlılığını artırıcı etkisi etilen glikolden çok daha yüksek olmuştur. Gliserol konsantrasyonundaki artış ile orantılı olarak, her iki enzim için 55 ^{o}C'taki sıcaklık kararlılığında bir artış meydana gelmiştir.

$CuCl_2$ ve $FeCl_2$ dışında metal iyonlarının hiç birisinin mutant ve yaban tipi penisilin G asilazın aktivitesini kayda değer bir şekilde etkilemediği görülmüştür. Ayrıca yaban tipi ve mutant enzimin aktivitesi üzerinde metal-kelatlayıcı bir ajan olan EDTA'nın çok az etki göstermesi, enzimin katalitik mekanizmasında herhangi bir metal iyonunun görev almadığını göstermektedir [Ignatova et al., 2005]. Her iki enzimin de serin-spesifik bir ayıraç olan PMSF ile çok güçlü bir şekilde inhibe olması, bu enzimlerin aktif bölgesinde serin amino asidinin görev aldığı bilgisini desteklemektedir.

Substrat özgüllüğüne baktığımızda her iki enzimin de benzer özellik sergilediği görülmektedir. Her iki enzim de maksimum aktiviteyi penisilin G varlığında sergilemekte, bunu sırasıyla sefaleksin, amoksisilin ve ampisilin takip etmektedir. Sonuçlar incelendiğinde, mutant enzimin sefaleksin ve amoksisilini de etkili bir şekilde hidroliz ettiği görülmektedir. Bununla birlikte, *E. coli* penisilin G asilazının sefaleksin ile gösterdiği aktivitenin, penisilin G ile gösterdiği aktiviteden yaklaşık olarak 100 kat daha düşük olduğunu belirten çalışma mevcuttur [Forney et al., 1989].

Doktora tez çalışmasında hataya eğilimli PCR yöntemi ile elde edilen mutant kütüphane enzim aktivitesindeki artış yönünden tarama çalışmalarına alınmıştır. Tarama çalışmaları sonucunda kütüphane içerisinden en yüksek enzimatik aktiviteyi sergileyen varyant seçilerek M2234 olarak adlandırılmıştır. Yapılan nitelendirme çalışmaları sonucunda M2234 mutantının aktivite artışına ek olarak pH kararlılığına da sahip olduğu görülmüştür. Mutant ve yaban tipi her iki enzim de pH 8.0'de maksimum aktivite göstermesine rağmen, yaban tipi enzimin aksine mutant enzimin pH 10'da oldukça kararlı olduğu ve 4 ^{o}C'ta 48 saat bekletilmenin ardından aktivitesinin %94'ünü hala koruduğu görülmüştür. Penisilin G asilazın alkali pH'da kararlılık sergilemesi, penisilin G'den hidroliz yoluyla 6-APA'nın üretildiği biyoreaktör sistemlerinde enzimin kullanılmasını elverişli kılmaktadır. Penisilin G'den 6-APA'nın üretildiği biyoreaktör sistemlerinde, pH'yı kontrol etmek amacıyla ortama baz ilave edilmektedir. Bu ise ortamda enzim inaktivasyonuna neden olan lokal alkali koşuların oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısı ile enzimin alkali pH'da kararlı olması enzimin inaktivasyonunu engelleyeceği için, reaksiyonun daha sorunsuz bir şekilde gerçekleşmesini sağlayacaktır. Bunun yanı sıra, hidroliz ve sentez reaksiyonları pH bağımlı reaksiyonlardır [Del Rio et al., 1995]. Açil-enzim kompleksinin oluşması, aktif merkezde yer alan serin amino asidinin proton kaybetmesine bağlıdır. Serbest α-amin gruplarının pK değerleri 6.8 ile 7.9 arasında

olduğu için, penisilin G asilaz tarafından gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında ortam pH'sının pH 8.0'den yukarıda olması gerekmektedir [Giordano et al., 2006]. Bütün bu nedenlerden dolayı mutant enzimin alkali pH'da artmış kararlılığa sahip olması, 6-APA'nın endüstriyel olarak üretiminde kullanım açısından enzimi elverişli kılmaktadır.

8. SONUÇ

Doktora tez çalışmasında *E. coli* ATCC 11105 soyuna ait *pac* geni, tasarlanan primerler kullanılarak PCR aracılığı ile çoğaltılmış ve pUC19 plazmidine klonlanmıştır. Klonlamanın ardından *E. coli pac* geninin mutant varyantlarını elde etmek amacıyla arka arkaya iki tur hataya eğilimli PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. İki tur olarak gerçekleştirilen hataya eğilimli PCR çalışmasının her bir turunda çoğaltılan *pac* geninin pUC19 vektörüne klonlanmasında ligaz-bağımlı olmayan bir yöntem kullanılmıştır. Hataya eğilimli PCR sonrası yapılan tarama ve seçme çalışmaları sonucunda yaban tipi enzime göre en yüksek aktiviteyi sergileleyen mutant soy seçilerek, yaban tipi soy ile birlikte DNA dizi analizi çalışmalarına alınmıştır. DNA dizi analizi sonrası mutant ve yaban tipi *pac* genleri karşılaştırıldığında, iki gen arasında yedi adet baz değişikliğinin (A738T, A890T, T1026A, G1029T, A1119C, G2226A, ve T2418A) olduğu ve gen içerisinde meydana gelen bu yedi adet baz değişikliğinin, enzimin β alt biriminin N-terminal bölgesinde oluşan bir adet amino asit (K297I) değişikliği ile sonuçlandığı görülmüştür.

Güncel bilgiler ışığında değerlendirildiğinde, yapılan çalışma *E. coli pac* geni mutantlarının oluşturulmasında hataya eğilimli PCR yönteminin kullanıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Hataya eğilimli PCR çalışmalarının ardından DEAE-Sefaroz FF anyon değiştirici kromotografisi kullanılarak, yaban tipi enzim %44 verim ve 1.34 U/mg spesifik aktivite ile 33 kat, mutant enzim ise %50 verim ve 5.51 U/mg spesifik aktivite ile 43 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonuçları değerlendirildiğinde, mutant enzimin yaban tipe göre dört kat artmış spesifik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Yapılan nitelendirme çalışmaları sonucunda ilgili mutantın aktivite artışına ek olarak pH 10'da artmış pH kararlılığı sergilediği de belirlenmiştir.

Enzimin katalitik aktivitesindeki artış aktif bölgeden uzakta meydana gelen tek bir nokta mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Tek bir mutasyonun enzim aktivitesini artırdığı göz önünde bulundurulduğunda, hataya eğilimli PCR koşullarının değiştirilmesi ve turlarının sayısının artırılması ile enzim üzerinde oluşturulacak yeni mutasyonlar sayesinde enzim aktivitesinin daha da artırılması ya da özelliklerinin daha da geliştirilmesi mümkün gözükmektedir.

Mutasyonun aktivite artışı üzerine etkisi eldeki veriler ışığında açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak tek nokta mutasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin daha detaylı açıklanabilmesi için ek çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Doktora tez çalışmasından elde edilen veriler, "Improved activity and pH stability of *E. coli* ATCC 11105 penicillin acylase by error-prone PCR" başlığı ile "Applied Microbiology and Biotechnology" (doi: 10.1007/s00253-013-5476-7) dergisinde yayımlanmıştır. İlgili yayın tezin "Ekler" bölümünde verilmiştir.

9. ÖNERİLER

Protein mühendisliği çalışmalarında yapı ve etki mekanizmalarının bilinmediği durumlarda enzim özelliklerinin geliştirilmesinde, yönlendirilmiş evrim yaklaşımı kullanışlı bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edile bulgular, iki tur olarak yapılan hataya eğilimli PCR çalışması sonucunda meydana gelen tek bir mutasyon ile aktivite ve pH kararlılığında iyileşme gösteren mutantların elde edilebileceğini göstermiştir. Bu nedenle hataya eğilimli PCR koşullarının değiştirilmesi ve/veya tur sayılarının artırılması yolu ile faydalı mutasyon sayılarının artırılması ve bu sayede enzim özelliklerinin daha da geliştirmesi mümkün gözükmektedir. Hataya eğilimli PCR yöntemine ek olarak DNA karıştırma yönteminin kullanılması elde edilecek faydalı mutasyon sayılarının daha da artırılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca bu yöntemlerin hedefe yönelik tarama ve seçme yöntemleri ile birlikte kullanılması, kütüphane içerisinden istenilen özelliklere sahip mutantların seçimini daha da kolaylaştıracaktır. Mutasyon çalışmaları sonrası gerçekleştirilecek immobilizasyon çalışmaları ile enzimlerin kararlılıklarının daha da artırılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

Aharoni A., Griffiths A. D., Tawfik D. S., (2005), "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes", Current Opinion in Chemical Biology, 9, 210-216.

An Y., Wu W., Lv A., (2010), "A convenient and robust method for construction of combinatorial and random mutant libraries", Biochimie, 92, 1081-1084.

Arnold F. H., Georgiou G., (2003), "Directed enzyme evolution: screening and selection methods", 1st Edition, Humana Press Incorporated.

Arnold F. H., Volkov A. A., (1999), "Directed evolution of biocatalysts", Current Opinion in Chemical Biology, 3, 54-59.

Arroyo M., de la Mata I., Acebal C., Castillon M. P., (2003), "Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art", Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 507-514.

Arroyo M., Torres R., de le Mata I., Castillon M. P., Acebal C., (1999), "Interaction of penicillin V acylase with organic solvents. Catalytic activity modulation on the hydrolysis of penicillin V", Enzyme and Microbial Technology, 25, 378-383.

Arroyo M., Torres-Guzman R., de le Mata I., Castillon M. P., Acebal C., (2000), "Activation and stabilization of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae* in the presence of glycerol and glycols", Biotechnology Progress, 16, 368-371.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., (2001), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Incorporated.

Azevedo A. M., Fonseca L. P., Prazeres D. M. F., (1999), "Stability and stabilisation of penicillin acylase", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 74, 1110-1116.

Bacher J. M., Reiss B. D., Ellington A. D., (2002), "Anticipatory evolution and DNA shuffling", Genome Biology, 3(8), 1021.1-1021.4.

Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D., (1972), "The isolation and kinetics penicillin amidases from *Escherichia coli*", Biochemica et Biophysica Acta, 276, 250-256.

Boersma Y. L., Droge M. J., Quax W. J., (2007), "Selection strategies for improved biocatalysts", FEBS Journal, 274, 2181-2195.

Bornscheuer U. T., Pohl M., (2001), "Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design", Current Opinion in Chemical Biology, 5, 137-143.

Bradford M. M., (1976), “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, Analytical Biochemistry, 72, 248–254.

Brakmann S., Grzeszik S., (2001), “An error-prone T7 RNA polymerase mutant generated by directed evolution”, Chembiochem, 2, 212-219.

Brannigan J. A., Dodson G., Duggleby H. J., Moody P. C. E., Smith J. L., Tomchick D. R., Murzin A. G., (1995), “A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation”, Nature, 378, 416-419.

Bruns W., Hoppe J., Tsai H., Brüning H. J., Maywald F., Collins J., Mayer H., (1985), “Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing”, Journal of Molecular and Applied Genetics, 3(1), 36-44.

Cadwell R. C., Joyce G. F., (1992), “Randomization of genes by PCR mutagenesis”, Genome Research, 2, 28-33.

Cadwell R. C., Joyce G. F., (1994), “Mutagenic PCR”, Genome Research, 3, S136-S140.

Calleri E., Temporini C., Massolini G., Caccialanza G., (2004), “Penicilin G acylase-based stationary phases: analytical applications”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35, 243-258.

Chen R., (2001), “Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution”, Trends in Biotechnology, 19(1), 13-14.

Chen W., Georgiou G., (2002), “Cell-surface display of heterologous proteins: from high-throughput screening to environmental applications”, Biotechnology and Bioengineering, 79(5), 496-503.

Cho C. M-H., Mulchandani A., Chen W., (2002), “Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents”, Applied and Environmental Microbiology, 68(4), 2026-2030.

Choi K. S., Kim J. A., Kang H. S., (1992), “Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105”, Journal of Bacteriology, 174(19), 6270-6276.

Chou C. P., Lin W. J., Kuo B. Y., Yu C. C., (2000), “Genetics strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli*”, Enzyme and Microbial Technology, 27, 766-773.

Chou C. P., Tseng J-H., Kuo B-Y., Lai K-M., Lin M-I., Lin H-K., (1999a), “Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicilin acylase in *Escherichia coli*”, Biotecnology Progress, 15, 439-445.

Chou C. P., Yu C. C., Tseng J. H., Lin M. I., Lin H. K., (1999b), "Genetic manipulation to identify limiting steps and develop strategies for high-level expression of penicillin acylase in *Escherichia coli*", Biotechnology and Bioengineering, 63(3), 263-272.

Chusacultanachai S., Yuthavong Y., (2004), "Random mutagenesis strategies for construction of large and diverse clone libraries of mutated DNA fragments". In: S. E. Melville, Editor, "Parasite Genomics Protocols", 1st Edition, Humana Press Incorporated.

Claveau S., Sasseville M., Beauregard M., (2004), "Alcohol-mediated error-prone PCR", DNA and Cell Biology, 23(11), 789-795.

Daumy G. O., Danley D., McColl A. S., Apostolakos D., Vinick F. J., (1985), "Experimental evolution of penicilin G acylases from *Escherichia coli* and *Proteus rettgeri*", Journal of Bacteriology, 163(3), 925-932.

Del Rio G., Rodriguez M. E., Munguia M. E., Lopez-Mungui A., Soberon X., (1995), "Mutant *Escherichia coli* penicillin acylase with enhanced stability at alkaline pH", Biotechnology and Bioengineering, 48(2), 141-148.

Demain A. L., Elander R. P., (1999), "The β-lactam antibiotics: past, present, and future", Antonie van Leeuwenhoek, 75, 5-19.

Deshpande B. S., Ambedkar S. S., Sudhakaran V. K., Shewale J. G., (1994), "Molecular biology of β-lactam acylases", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10, 129-138.

Diaz E., Ferrandez A., Prieto M. A., Garcia J. L., (2001), "Biodegration of aromatic compounds by *Escherichia coli*", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(4), 523-569.

Duggleby H. J., Tolley S. P., Hill C. P., Dodson E. J., Dodson G., Moody P. C. E., (1995), "Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre", Nature, 373, 264-268.

Eijsink V. G. H., Gaseidnes S., Borchert T. V., Burg B. V. D., (2005), "Directed evolution of enzyme stability", Biomolecular Engineering, 22, 21-30.

Elander R. P., (2003), "Industrial production of β-lactam antibiotics", Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 385-392.

Fan Y., Fang W., Xiao Y., Yang X., Zhang Y., Bidochka M. J., Pei Y., (2007), "Directed evolution for increased chitinase activity", Applied Microbiology and Biotechnology, 76, 135-139.

Fernandez-Gacio A., Uguen M., Fastrez J., (2003), "Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes", TRENDS in Biotechnology, 21(9), 408-414.

Forney L. J., Wong D. C., (1989), "Alteration of the catalytic efficiency of penicilin amidase from *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, 55, 2556-2560.

Forney L. J., Wong D. C., Ferber D. M., (1989), "Selection of amidases with novel substrate specificities from penicilin amidase of *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, 55, 2550-2555.

Giordano R. C., Ribeiro M. P. A., Giordano R. L. C., (2006), "Kinetics of β-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization", Biotechnology Advances, 24, 27-41.

Gümüşel F., İşsever-Öztürk S., Kiremit-Korkut N., Gelegen Ç., Bermek E., (2001), "Cloning and expression of the penicillin acylase gene (*pac*) from *E. coli* ATCC 11105", Enzyme and Microbial Technology, 29, 499-505.

Harayama S., (1998), "Artificial evolution by DNA shuffling", TIBTECH, 16, 76-82.

Hewitt L., Kasche V., Lummer K., Lewis R. J., Murshudov G. N., Verma C. S., Dodson G. G., Wilson K. S., (2000), "Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft", Journal of Molecular Biology, 302, 887-898.

Ignatova Z., Taruttis S., Kasche V., (2000a), "Role of the intracellular proteolysis in the production of the periplasmic penicillin amidase in *Escherichia coli*", Biotechnology Letters, 22, 1727-1732.

Ignatova Z., Enfors S. O., Hobbie M., Taruttis S., Vogt C., Kasche V., (2000b), "The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*", Enzyme and Microbial Technology, 26, 165-170.

Ignatova Z., Wischnewski F., Notbohm H., Kasche V., (2005), "Pro-sequence and Ca^{2+}-binding: implications for folding and maturation of Ntn-hydrolase penicillin amidase from *E. coli*", Journal of Molecular Biology, 348, 999-1014.

Illanes A., Fajardo A., (2001), "Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11, 587-595.

Jaeger K. E., Eggert T., Eipper A., Reetz M. T., (2001), "Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts", Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 519-530.

Jager S. A. W., Jekel P. A., Janssen D. B., (2007), "Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β-lactam antibiotics", Enzyme and Microbial Technology, 40, 1335-1344.

Jung H. C., Ko S., Ju S. J., Kim E. J., Kim M. K., Pan J. G., (2003), "Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput

screening of mutants showing higher specific activities", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26, 177-184.

Kampen M. D. V., Egmond M. R., (2000), "Directed evolution: from a staphylococcal lipase to a phospholipase", European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 717-726.

Kasche V., (1986), "Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β-lactam antibiotics, peptides and other condensation products", Enzyme and Microbial Technology, 8, 4-16.

Kasche V., Lummer K., Nurk A., Piotraschke E., Rieks A., Stoeva S., Voelter W., (1999), "Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*", Biochemica et Biophysica Acta, 1433, 76-86.

Kaur J., Sharma R., (2006), "Directed evolution: an approach to engineer enzymes", Critical Reviews in Biotechnology, 26, 165-199.

Kelley L. A., Sternberg M. J. E., (2009), "Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server", Nature Protocols, 4, 363-371.

Kim Y-S., Jung H-C., Pan J-G., (2000), "Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants", Applied and Environmental Microbiology, 66(2), 788-793.

Krzeslak J., Braun P., Voulhoux R., Cool R. H., Quax W. J., (2009), "Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*", Journal of Biotechnology, 142, 250-258.

Kuchner O., Arnold F. H., (1997), "Directed evolution of enzyme catalysts", Trends in Biotechnology, 15, 523-530.

Labrou N. E., (2010), "Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution", Current Protein and Peptide Science, 11, 91-100.

Laemmli U. K., (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227, 680-685.

Langen L. M. V., Rantwijk F. V., Svedas V. K., Sheldon R. A., (2000a), "Penicilin acylase-catalyzed peptide synthesis: a chemo-enzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione", Tetrahedron: Asymmetry, 11, 1077-1083.

Langen L. M. V., Oosthoek N. H. P., Guranda D. T., Rantwijk F. V., Svedas V. K., Sheldon R. A., (2000b), "Penicilin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents", Tetrahedron: Asymmetry, 11, 4593-4600.

Lee H., Park O. K., Kang H. S., (2000), "Identification of a new active site for autocatalytic processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli* ATCC 11105", Biochemical and Biophysical Research Communications, 272, 199-204.

Leung D. W., Chen E., Goeddel D. V., (1989), “A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction”, Technique, 1(1), 11-15.

Liebeton K., Zonta A., Schimossek K., Nardini M., Lang D., Dijkstra B. W., Reetz M. T., Jaeger K. E., (2000), “Directed evolution of an enantioselective lipase”, Chemistry and Biology, 7, 709-718.

Lin H., Cornish V. W., (2002), “Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function”, Angewandte Chemie International Edition, 41, 4402-4425.

Lindsay C. D., Pain R. H., (1991), “Refolding and assembly of penicillin acylase, an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation”, Biochemistry, 30, 9034-9040.

Lin-Goerke J. L., Robbins D. J., Burczak J. D., (1997), “PCR-based random mutagenesis using manganase and reduced dNTP concentration”, BioTechniques, 23(3), 409-412.

Loo B. V., Spelberg J. H. L., Kingma J., Sonke T., Wubbolts M. G., Janssen D. B., (2004), “Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling”, Chemistry and Biology, 11, 981-990.

McVey C. E., Walsh M. A., Dodson G. G., Wilson K. S., Brannigan J. A., (2001), “Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism”, Journal of Molecular Biology, 313, 139-150.

Nakaniwa T., Tada T., Takao M., Sakai T., Nishimura K., (2004), “An *in vitro* evaluation of a thermostable pectate lyase by using error-prone PCR”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 27, 127-131.

Niersbach H., Tischer W., Weber M., Wedekind F., Plapp R., (1995a), “Isolation and mapping of a mutant penicillin G acylase with altered substrate specificity from *Escherichia coli*”, Biotechnology Letters, 17, 19-24.

Niersbach H., Kuhne A., Tischer W., Weber M., Wedekind F., Plapp R., (1995b), “Improvement of the catalytic properties of penicilin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by selection of a new substrate specificity”, Applied Microbiology and Biotechnology, 43, 679-684.

Oh S-J., Kim Y-C., Park Y-W., Min S-Y., Kim I-S., Kang H-S., (1987), “Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*”, Gene, 56, 87-97.

Olsen M., Iverson B., Georgiou G., (2000), “High-throughput screening of enzyme libraries”, Current Opinion in Biotechnology, 11, 331-337.

Otten L. G., Sio C. F., Vrielink J., Cool R. H., Quax W. J., (2002), "Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the β-subunit", The Journal of Biological Chemistry, 277(44), 42121-42127.

Oue S., Okamoto A., Yano T., Kagamiyama H., (1999), "Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues", The Journal of Biological Chemistry, 274, 2344-2349.

Pan K. L., Hsiao H. C., Weng C. L., Wu M. S., Chou C. P., (2003), "Roles of degP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*", Journal of Bacteriology, 185, 3020-3030.

Panbangred W., Weeradechapon K., Udomvaraphant S., Fujiyama K., Meevootisom V., (2000), "High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant", Journal of Applied Microbiology, 89, 152-157.

Parmar A., Kumar H., Marwaha S. S., Kennedy J. F., (2000), "Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA)", Biotechnology Advances, 18, 289-301.

Patnaik R., Louie S., Gavrilovic V., Perry K., Stemmer W. P. C., Ryan C. M., Cardayre S. D., (2002), "Genome shuffling of lactobacillus for improved acid tolerance", Nature Biotechnology, 20, 707-712.

Patrick W. M., Firth A. E., (2005), "Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries", Biomolecular Engineering, 22, 105-112.

Polderman-Tijmes J. J., (2004), "Biochemical characterization of alpha-amino acid ester hydrolases", Doctoral Thesis, University of Groningen.

Powell K. A., Ramer S. W., del Cardayre S. B., Stemmer W. P. C., Tobin M. B., Longchamp P. F., Huisman G. W., (2001), "Directed evolution and biocatalysis", Angewandte Chemie International Edition, 40, 3948-3959.

Rajendhran J., Gunasekaran P., (2004), "Recent biotechnological interventions for devoloping improved penicilin G acylases", Journal of Bioscience and Bioengineering, 97(1), 1-13.

Rajendhran J., Krishnakumar V., Gunasekaran P., (2002), "Optimization of a fermentation medium for the production of penicillin G acylase from *Bacillus* sp", Letters in Applied Microbiology, 35, 523-527.

Rao A., Garcia J. L., Salto F., Cortes E., (1994), "Changing the substrat specificity of penicilin G acylase from *Kluyvera citrophila* through selective pressure", Biochemical Journal, 303, 869-875.

Reid A. J., (2000), "DNA shuffling: modifying the hand that nature dealt", In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 36, 331-337.

Rubingh D. N., (1997), “Protein engineering from a bioindustrial point of view”, Current Opinion in Biotechnology, 8, 417-422.

Samanta T. B., (2012), “Enzymatic synthesis of β-lactams: constraints and control”, Indian Journal of Biotechnology, 11, 7-15.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), “Molecular cloning a laboratory manual”, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Savidge T. A., (1984), “Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins”, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 22, 171-224.

Schmidt-Dannert C., (2001), “Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses”, Biochemistry, 40(44), 13125-13136.

Schumacher G., Sizmann D., Haug H., Buckel P., Böck A., (1986), “Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation”, Nucleic Acids Research, 14(14), 5713-5727.

Sizmann D., Keilmann C., Böck A., (1990), “Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105”, European Journal of Biochemistry, 192, 143-151.

Srirangan K., Orr V., Akawi L., Westbrook A., Moo-Young M., Chou C. P., (2013), “Biotechnological advances on penicillin G acylase: pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies”, Biotechnology Advances, 31, 1319-1332.

Stebel S. C., Gaida A., Arndt K. M., Müller K. M., (2008), "Directed protein evolution”. In: J. M. Walker, R. Rapley, Editors, “Molecular Biomethods Handbook”, 2nd Edition, Humana Press Incorporated.

Stemmer W. P. C., (1994), “DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 91, 10747-10751.

Stephens D. E., Rumbold K., Permaul K., Prior B. A., Singh S., (2007), “Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*”, Journal of Biotechnology, 127(3), 348-354.

Sudhakaran V. K., Shewale J. G., (1995), “Purification and characterization of extracellular penicillin V acylase from *Fusarium* sp. SKF 235”, Hindustan Antibiotics Bulletin, 37(1-4), 9-15.

Taylor S. V., Kast P., Hilvert D., (2001), “Investigating and engineering enzymes by genetic selection”, Angewandte Chemie International Edition, 40(18), 3310-3335.

Tishkov V. I., Savin S. S., Yasnaya A. S., (2010), “Protein engineering of penicillin acylase”, Acta Naturae, 2(3), 47-61.

Tuzlakoglu-Ozturk M., Akbulut N., Issever-Ozturk S., Gumusel F., (2013), "Ligase-independent cloning of amylase gene from a local *Bacillus subtilis* isolate and biochemical characterization of the purified enzyme", Applied Biochemistry and Biotechnology, 171(2), 263-278.

Valle F., Balbas P., Merino E., Bolivar F., (1991), "The role of penicillin amidase in nature and in industry", Trends in Biochemical Sciences, 16, 36-40.

Valle F., Gosset G., Tenorio B., Oliver G., Bolivar F., (1986), "Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase structural gene", Gene, 50, 119-122.

Vandamme E. J., Voets J. P., (1974), "Microbial penicillin acylases". In: D. Perlman, Editor, "Advances in Applied Microbiology", 1st Edition, Academic Press Incorporated.

Vanhercke T., Ampe C., Tirry Luc., Denolf P., (2005), "Reducing mutational bias in random protein libraries", Analytical Biochemistry, 339, 9-14.

Verhaert R. M. D., Beekwilder J., Olsthoorn R., Duin J. V., Quax W. J., (2002), "Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding", Journal of Biotechnology, 96, 103-118.

Verhaert R. M. D., Duina J. V., Quax W. J., (1999), "Processing and functional display of the 86 kDa heterodimeric penicilin G acylase on the surface of phage fd", Biochemical Journal, 342, 415-422.

Virden R., (1990), "Structure, processing and catalytic action of penicillin acylase", Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 8, 189-218.

Vohra P. K., Sharma R., Kashyap D. R., Tewari R., (2001), "Enhanced production of penicilin G acylase from a recombinant *Escherichia coli*", Biotechnology Letters, 23, 531-535.

Wang T. W., Zhu H., Ma X. Y., Zhang T., Ma Y. S., Wei D. Z., (2006), "Mutant library construction in directed molecular evolution", Molecular Biotechnology, 34, 55-68.

Wei D. Z., Yang L., (2003), "Effects of ethylene glycol on the synthesis of ampicillin using immobilized penicillin G acylase", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78, 431-436.

Wen Y., Feng M., Yuan Z., Zhou P., (2005), "Expression and overproduction of recombinant penicilin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*", Enzyme and Microbial Technology, 37, 233-237.

Williams G. J., Nelson A. S., Berry A., (2004), "Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences", Cellular and Molecular Life Sciences, 61, 3034-3046.

Xu H. F., Zhang X. E., Zhang Z. P., Zhang Y. M., Cass A. E. G., (2003), "Directed evolution of *E. coli* alkaline phosphatase towards higher catalytic activity", Biocatalysis and Biotransformation, 21(1), 41-47.

Xu H., Petersen E. I., Petersen S. B., El-Gewely M. R., (1999), "Random mutagenesis libraries: optimization and simplification by PCR", BioTechniques, 27(6), 1102-1108.

Xu Y., Weng C. L., Narayanan N., Hsieh M. Y., Anderson W. A., Scharer J. M., Moo-Young M., Chou C. P., (2005a), "Chaperone-mediated folding and maturation of the penicillin acylase precursor in the cytoplasm of *Escherichia coli*", Applied and Environmental Microbiology, 71, 6247-6253.

Xu Y., Hsieh M. Y., Narayanan N., Anderson W. A., Scharer J. M., Moo-Young M., Chou C. P., (2005b), "Cytoplasmic overexpression, folding, and processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli*", Biotechnology Progress, 21, 1357-1365.

Yang Y., Biedendieck R., Wang W., Gamer M., Malten M., Jahn D., Deckwer W. D., (2006), "High yield recombinant penicilin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus Megaterium*", Microbial Cell Factories, 5(36), 1-14.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J., (1985), "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors", Gene, 33, 103-119.

Yuan L., Kurek I., English J., Kenan R., (2005), "Laboratory-directed protein evolution", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69(3), 373-392.

Zhang Q., Zhang L., Han H., Zhang Y., (1986), "A method for screening penicillin G acylase-producing bacteria by means of 2-nitro-5-phenylacetaminobenzoic acid test paper", Analytical Biochemistry, 156, 413-416.

Zhao A., Chockalingam K., Chen Z., (2002), "Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis", Current Opinion in Biotechnology, 13, 104-110.

Zheng Z., Ai-Hui Z., Jing-Ru W., Mao-Lin C., Ren-Bao L., Sheng Y., Zhong-Yi Y., (2003), "Improving the specific synthetic activity of a penicillin G acylase using DNA family shuffling", Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 35(6), 573-579.

Zhou Y., Zhang X., Ebright R. H., (1991), "Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase", Nucleic Acids Research, 19, 6052-6052.

Zuo Z. Y., Zheng Z. L., Liu Z. G., Yi Q. M., Zou G. L., (2007), "Cloning, DNA shuffling and expression of serine hydroxymethyltransferase gene from *Escherichia coli* strain AB90054", Enzyme and Microbial Technology, 40, 569-577.

ÖZGEÇMİŞ

08.08.1978 Uşak Karahallı doğumlu olan Hüseyin Balcı, 1994 yılında İzmit Namık Kemal Lisesi'nden mezun olmuştur. 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 1999 yılında tamamlayarak, 2000 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2004 yılında aldığı yüksek lisans derecesinin ardından 2005 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimine başlamıştır. 2005 yılından bu yana Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde yeni adıyla Gebze Teknik Üniversitesi'nde uzman olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Balci H., Tuzlakoglu-Ozturk M., Pijning T., Issever-Ozturk S., Gumusel F., (2014), "Improved activity and pH stability of *E. coli* ATCC 11105 penicillin acylase by error-prone PCR", Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 4467-4477.