

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN *CANDIDA BOIDINII*'DEN  
MOLEKÜLER OLARAK KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nazlı ARLI**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**

**HAZİRAN 2017**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN *CANDIDA BOIDINII*'DEN  
MOLEKÜLER OLARAK KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nazlı ARLI  
(150305122)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**

**HAZİRAN 2017**

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150305122 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Nazlı ARLI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN *CANDIDA BOIDINII*'DEN MOLEKÜLER OLARAK KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Fahri AKBAŞ** .....  
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN** .....  
İstanbul Üniversitesi

**Doç. Dr. Gözde YEŞİL** .....  
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : 24 Nisan 2017  
**Savunma Tarihi** : 9 Haziran 2017



*Aileme...*

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans programının başlangıcından itibaren çalışmamı yönlendiren; bilgi, tecrübe, emek ve yardımlarını esirgemeyerek sabır ve anlayışla öğrenmeye katkıda bulunan sayın danışman hocam Doç. Dr. Fahri Akbaş'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Büşra Yıldızhan Özdemir, Zekiye Dişçi, Öykü Zeybek ve Merve Bali'ye,

Arada mesafeler yokmuşcasına bu süreçte ve her daim yanımda olduklarını hissettiren canım arkadaşlarım Fulden Bağcı ve Gloria Cato'ya,

Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve şefkatle yanımda olan, bana inanıp güvenen, varlıkları ile güç bulduğum sevgili kardeşlerim ve çok kıymetli anne babama tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 3.2016/31 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2017

Nazlı ARLI  
Uzman Mühendis

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Nazlı ARLI

İmza

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY .....	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 <i>Candida</i> Cinsi Mayalar .....	4
2.1.1 Tarihçe.....	4
2.1.2 Genel özellikler .....	5
2.1.3 Ekoloji ve patojenisite.....	6
2.1.4 Metilotrof organizma olarak <i>C. boidinii</i> .....	8
2.2 Format Dehidrogenaz Enzimi .....	10
2.2.1 Genel olarak enzimler .....	10
2.2.2 Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) koenzimi .....	12
2.2.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikler.....	12
2.2.2.2 Hücrelerdeki konum ve konsantrasyon.....	14
2.2.2.3 Biyosentez.....	14
2.2.2.4 Fonksiyonlar.....	15
2.2.3 Format dehidrogenaz enzimi.....	16
2.2.3.1 Format dehidrogenaz enziminin sınıflandırılması .....	16
2.2.3.2 Format dehidrogenaz enziminin lokasyonu ve fizyolojik rolü .....	16
2.2.3.3 NAD <sup>+</sup> -bağımlı format dehidrogenaz enziminin yapısal özellikleri ...	18
2.2.3.4 NAD <sup>+</sup> -bağımlı format dehidrogenaz enziminin katalitik özellikleri ..	19
2.2.3.5 NAD <sup>+</sup> -bağımlı format dehidrogenaz enziminin pratikteki uygulamaları .....	20

2.3 Rekombinant DNA Teknolojisi .....	28
2.3.1 Genel olarak rekombinant DNA teknolojisi .....	28
2.3.2 Rekombinant DNA teknolojisi ile enzim üretimi .....	30
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1 Gereç .....	33
3.1.1 Cihazlar .....	33
3.1.2 Kimyasallar .....	34
3.1.3 Ticari kitler.....	36
3.1.4 Enzimler .....	37
3.1.5 Mikroorganizmalar.....	37
3.1.6 Primerler.....	37
3.1.7 Vektör sistemleri .....	38
3.1.8 DNA ve protein markörleri .....	40
3.1.9 Tampon ve çözeltiler.....	40
3.1.9.1 Büyütme besiyeri çözeltileri .....	40
3.1.9.2 Agaroz jel elektroforezi çözeltileri.....	41
3.1.9.3 SDS-PAGE çözeltileri.....	42
3.1.9.4 Western blot çözeltileri .....	43
3.1.9.5 Enzim aktivite testi çözeltileri.....	43
3.2 Yöntem.....	45
3.2.1 <i>C. bovidii</i> ATCC 18810 mikroorganizmasının büyütülmesi.....	45
3.2.2 Genomik DNA izolasyonu .....	45
3.2.3 Primer tasarımı .....	46
3.2.4 FDH geninin PCR ile çoğaltılması.....	47
3.2.5 TA klonlama.....	48
3.2.6 <i>E. coli</i> One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinin transformasyonu.....	49
3.2.7 Transformasyon analizi .....	50
3.2.8 PCR ürününün protein ekspresyon vektörüne (pET-14b) alınması .....	52
3.2.9 Dizi analizi .....	57
3.2.10 <i>E. coli</i> One Shot® BL21(DE3) hücrelerinin transformasyonu.....	57
3.2.11 Gen ekspresyonunun IPTG ile indüklenmesi.....	58
3.2.12 Protein pürifikasyonu .....	58
3.2.13 SDS-PAGE analizi .....	59
3.2.14 Western blot analizi.....	60
3.2.15 FDH enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	61



3.2.15.1 Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	62
3.2.15.2 Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	62
3.2.15.3 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	63
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>64</b>
4.1 <i>C. boidinii</i> ATCC 18810 Suşundan Genomik DNA İzolasyonu Bulgusu .....	64
4.2 PCR ile Çoğaltılan FDH Gen Bölgesi Bulgusu .....	64
4.3 TA Klonlama Bulguları.....	64
4.4 PCR Ürününün pET-14b Vektörüne Alınması Bulguları .....	67
4.5 Dizi Analizi Bulguları.....	70
4.6 Gen Ekspresyonunun IPTG ile İndüklenmesi ve Protein Pürifikasyon Bulguları .....	71
4.7 SDS-PAGE Analizi Bulguları.....	72
4.8 Western blot Analizi Bulgusu .....	74
4.9 Enzim Aktivite Testleri Bulguları.....	74
4.9.1 Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	75
4.9.2 Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	75
4.9.3 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	76
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>77</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>82</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>91</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>

## KISALTMALAR

<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b><i>A. fumigatus</i></b>	: <i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>ATCC</b>	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b>BSA</b>	: Bovin serum albumin
<b>BSL</b>	: Biyolojik güvenlik düzeyi
<b><i>C. albicans</i></b>	: <i>Candida albicans</i>
<b><i>C. boidinii</i></b>	: <i>Candida boidinii</i>
<b>°C</b>	: Celsius
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DPBS</b>	: Dulbecco fosfat tamponlu salin
<b>EC</b>	: Enzim komisyonu
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>FDH</b>	: Format dehidrogenaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>g</b>	: Gram
<b>H<sup>-</sup></b>	: Hidrit iyonu
<b>His-tag</b>	: Histidin etiketi
<b>IPTG</b>	: İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>L</b>	: Litre
<b>LB</b>	: Luria bertani
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre

<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NAD</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit
<b>NADP</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>Ni-NTA</b>	: Nikel-nitriloasetik asit
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik yoğunluk
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>sn</b>	: Saniye
<b>TAE</b>	: Tris asetik asit EDTA
<b>TBST</b>	: Tris tamponlu salin Tween 20
<b>TEMED</b>	: Tetrametiletildiamin
<b><i>T. vaginalis</i></b>	: <i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>Tween 20</b>	: Polisorbitat 20
<b>UV-vis</b>	: Ultraviyole görünür ışık
<b>X-gal</b>	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil $\beta$ -D-galaktopiranosid

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1</b> : Kullanılan cihazların listesi .....	33
<b>Tablo 2</b> : Kullanılan kimyasalların listesi .....	34
<b>Tablo 3</b> : Kullanılan ticari kitlerin listesi.....	36
<b>Tablo 4</b> : Kullanılan enzimlerin listesi .....	37
<b>Tablo 5</b> : FDH geni için tasarlanan primerler .....	37
<b>Tablo 6</b> : pTZR57R/T vektör sisteminin özellikleri .....	38
<b>Tablo 7</b> : pET-14b vektör sisteminin özellikleri .....	39
<b>Tablo 8</b> : <i>C. boidinii</i> genomik DNA kalıplı PCR karışımı bileşenleri .....	47
<b>Tablo 9</b> : <i>C. boidinii</i> genomik DNA kalıplı PCR döngü koşulları .....	47
<b>Tablo 10</b> : PCR ürünlerinin ucuna 3'-A kuyruk eklemeye kullanılan bileşenler... 49	
<b>Tablo 11</b> : 3'-A kuyruklu PCR ürünleri ve pTZR57R/T vektörünün ligasyonunda kullanılan bileşenler .....	49
<b>Tablo 12</b> : pTZR57R/T+FDH plazmidlerini alan hücrelerin tespiti için yapılan koloni PCR karışımı bileşenleri .....	51
<b>Tablo 13</b> : pTZR57R/T+FDH plazmidlerinin NdeI ve ScaI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.....	52
<b>Tablo 14</b> : pTZR57R/T+FDH plazmidlerinin NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.....	52
<b>Tablo 15</b> : pET-14b vektörünün NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi .....	55
<b>Tablo 16</b> : pET-14b ve PCR ürünü ligasyonunda kullanılan bileşenler.....	55
<b>Tablo 17</b> : pET-14b/FDH vektörü için koloni PCR karışımı bileşenleri .....	56
<b>Tablo 18</b> : pET-14b/FDH vektörü için koloni PCR döngü koşulları .....	56
<b>Tablo 19</b> : pET-14b/FDH vektörünün NcoI restriksiyon enzimi ile kesim işlemi..57	
<b>Tablo 20</b> : SDS-PAGE jellerinin bileşenleri .....	59
<b>Tablo 21</b> : Farklı substrat konsantrasyonlu enzimatik aktivite reaksiyon karışımları .....	62
<b>Tablo 22</b> : Enzimatik aktivite belirlemede kullanılan potasyum fosfat ve Tris tamponları ile hazırlanan reaksiyon karışımları .....	62

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1	: Metilotrof mayalarda metanol kullanım yolağı .....	9
Şekil 2	: Enzim-substrat etkileşiminde “anahtar-kilit” ve “indüklenmiş uyum” modeli.....	11
Şekil 3	: Nikotinamid adenin dinükleotit yapısı .....	13
Şekil 4	: <i>C. boidinii</i> format dehidrogenaz enziminin kristal yapısı .....	19
Şekil 5	: Trimetil L-lösinin enzim temelli üretim şeması.....	23
Şekil 6	: Metanolün metabolik biyotransformasyonu ve klinik görünümü.....	24
Şekil 7	: Gen klonlamasının genel şeması.....	29
Şekil 8	: Endüstriyel ölçekte biyolojik yöntemlerle enzim üretim şeması .....	32
Şekil 9	: pTZR57R/T vektör haritası.....	38
Şekil 10	: pET-14b vektör haritası .....	39
Şekil 11. A	: Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1173) .....	40
Şekil 11. B	: Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811)...	40
Şekil 12	: <i>C. boidinii</i> FDH geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün UV görüntüsü .....	65
Şekil 13	: Ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant pTZR57R/T+FDH vektörü.....	65
Şekil 14	: pTZR57R/T+FDH vektörünün NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen ürünlerin UV görüntüsü .....	67
Şekil 15	: Ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant pET-14b/FDH vektörü .	68
Şekil 16	: pET-14b/FDH vektörünü alan hücrelerin tespiti için yapılan koloni PCR elektroforezi sonrası UV görüntüsü.....	69
Şekil 17	: pET-14b/FDH vektörünü alan hücrelerin verifikasyonu için NcoI restriksiyon enzim kesimi UV görüntüsü.....	70
Şekil 18	: pET-14b/FDH plazmid vektörünün dizileme sonucu.....	71
Şekil 19	: Dizileme sonucuna göre elde edildiği varsayılan rekombinant FDH protein dizisi .....	71
Şekil 20	: pET-14b/FDH vektörünü alan bakteri hücrelerinin IPTG ekspresyon sistem kontrolü için SDS-PAGE analizi .....	73
Şekil 21	: pET-14b/FDH vektörünü alan bakteri hücrelerinin IPTG indüksiyonu sonrası kaba özüt ve saflaştırılmış örnek olarak SDS-PAGE analizi.....	73
Şekil 22	: Western blot uygulanmış nitroselüloz membranın UV görüntüsü .....	74
Şekil 23	: Format konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	75

<b>Şekil 24</b>	: Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	76
<b>Şekil 25</b>	: Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	76



# FORMAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN *CANDIDA BOIDINII*'DEN MOLEKÜLER OLARAK KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve KARAKTERİZASYONU

## ÖZET

Modern biyoteknoloji endüstrisinde enzim üretimi önemli bir yer tutmaktadır. Klasik yöntemlerle bitkisel ve hayvansal kaynaklardan enzim eldesinin ekonomik olmaması, kalite ve miktar standardizasyonunun yakalanmasının zor olması gibi faktörler mikrobiyal kaynaklara olan eğilimi artırmıştır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ve mikroorganizmalarda kolaylıkla manipüle edilmesi ile birlikte rekombinant enzimlerin endüstriyel pazarının büyüyerek 2016 yılında 4.61 milyar dolara çıktığı açıklanmıştır ve 2017-2022 öngörü raporlarına göre %5.8'lik yıllık bileşik büyüme oranı ile 6.3 milyar dolara ulaşması beklenmektedir.

NAD<sup>+</sup>-bağımlı format dehidrogenaz (FDH, EC 1.2.1.2), format iyonlarını CO<sub>2</sub>'ye yükseltgeyerek NAD<sup>+</sup> molekülünü NADH'a indirgeyen bir enzimdir. Enzimatik indirgemenin önemli olduğu reaksiyonlarda NAD(H) ve NADP(H) gibi pahalı kofaktörlere ihtiyaç vardır. Ekonomik alternatifler sunmak amacıyla kofaktörlerin geri dönüştürüldüğü metotlar dizayn edilmiştir. Bu metotlarda; kofaktör geri dönüşümünde hiçbir yan ürün biriktirmeyen, ana reaksiyonun substratına karşı inert olan böylelikle istenmeyen izomerler oluşturmayan, termodinamik denge olarak uygun olan, geniş pH aralığında çalışabilen, ucuz substratlara gereksinim duyan FDH enzimi sahip olduğu bu avantajlı özellikleri ile en çok tercih edilen enzimlerden biridir. Özellikle farmasötikler için önemli olan optikçe aktif bileşiklerin üretiminde ve rutin biyokimya laboratuvarlarında tanılama testlerinde kullanımından dolayı FDH enziminin sentetik üretimi son yıllarda önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar, çeşitli metilotrof maya ve bakterilerden FDH enziminin rekombinant olarak üretilebildiğini göstermiştir.

Bu çalışmada, *Candida boidinii* (*C. boidinii*) mayası ATCC 18810 suşunda FDH enzimini kodlayan gen bölgesinin rekombinant tekniklerle *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterilerine klonlanması, gen ürünü olan proteinin eksprese edilmesi ve karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak *C. boidinii* mayasının genomik DNA'sı izole edilmiş, tasarlanan primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilerek hedef FDH gen bölgesi çoğaltılmış ve beklenen 1104 bp'lik bant görülmüştür. Çoğaltılan gen TA klonlama metodu ile pTZR57R/T vektörüne klonlanmış, elde edilen rekombinant vektör pTZR57R/T+FDH ile *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri transforme edilmiştir. Transformasyon gerçekleştikten sonra rekombinant vektör NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve hedef gen bölgesi ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET-14b vektörü ile birleştirilerek *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyonun başarısı koloni PCR, restriksiyon enzim kesimi ve dizi analizleri ile onaylanmıştır. Sonrasında elde edilen rekombinant pET-14b/FDH vektörü ile ekspresyon hücresi olarak kullanılan *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerinin transformasyonu gerçekleştirilmiştir. FDH enziminin üretimi için gen ekspresyonu IPTG ile indüklenmiş, Ni-NTA afinite kolon kromatografisi ile

hücredeki diğer proteinlerden ayrıştırılarak saf bir şekilde eldesi sağlanmıştır. Hedef proteinin varlığını görmek için SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapılmış ve beklenen 41 kDa'luk bant görülmüştür. Son olarak FDH enziminin ideal koşullardaki aktivitesini bulmak için testler yapılmış, enzimatik reaksiyon ürününün 340 nm'deki absorban değerlerine bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarının sonucunda; pH 8.0 Tris tampon çözeltisinde, 40 mM format substrat konsantrasyonunda, 60°C'a kadar olan sıcaklıklarda enzimin aktif olarak çalıştığı belirlenmiştir.

Farmasötik endüstrisinde ve rutin biyokimya laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan bu enzim ülkemizde yurtdışı kaynaklardan temin edilmekte ve pahalıya mâl olmaktadır. Bu çalışma, NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enziminin yerli olarak üretilmesi ve endüstriyel sahada büyük ölçekte üretime geçilmesi için veri sağlaması açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** NAD<sup>+</sup>-bağımlı format dehidrogenaz, *Candida boidinii*, *Escherichia coli*, klonlama, ekspresyon, karakterizasyon



## **MOLECULAR CLONING, EXPRESSION and CHARACTERIZATION of FORMATE DEHYDROGENASE ENZYME from *CANDIDA BOIDINII***

### **SUMMARY**

Enzyme production has an important place in modern biotechnological industry. Factors as expensiveness of enzyme extraction from plantal and animal sources, difficulty of getting standardization in terms of quality and quantity have increased the tendency toward microbial sources. With the development of recombinant DNA technology and its manipulability on microorganisms, the global industrial market for recombinant enzymes was indicated at 4.61 billion dollars in 2016. This market is expected to reach 6.3 billion dollars by 2022 in terms of value, at a compound annual growth rate of 5.8% from 2017.

NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) is an enzyme that catalyzes the oxidation of formate ions to CO<sub>2</sub> concurrently reduction of NAD<sup>+</sup> molecule to NADH. Expensive cofactors like NAD(H) and NADP(H) are needed in reactions where enzymatic reduction is important. Cofactor regeneration methods have been developed on the purpose of offering affordable alternatives. In these methods, FDH is one of the most preferred enzymes thanks to its advantageous properties. No by-product accumulation, inertness to the reaction substrate, suitable thermodynamic equilibrium, wide pH range features raise FDH enzyme into a privileged position. Synthetic production of this enzyme has gained importance in recent years since it is frequently used for the production of optically active compounds in pharmaceutical industry and diagnostic tests in clinical biochemistry laboratories. Studies showed that FDH enzyme can be produced recombinantly from various methylotrophic bacteria and yeasts.

In this study, cloning of the gene encoding FDH enzyme from *Candida boidinii* (*C. boidinii*) ATCC 18810 yeast strain into *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterium, expression and characterization of the gene product, FDH enzyme, was aimed. In line with this purpose, first, genomic DNA of *C. boidinii* was isolated, target gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR) and the expected 1104 bp band was seen. Amplified gene was cloned into pTZR57R/T vector via TA cloning method and *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R cells were transformed with the recombinant vector pTZR57R/T+FDH. The vector within the transformed cells was digested with NdeI and BamHI restriction enzymes and the target FDH gene transferred to pET-14b expression vector that was treated with the same restriction nucleases. *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R cells were transformed with the new recombinant vector, pET-14b/FDH. Transformation success was verified with colony PCR, restriction enzyme digestion and sequence analysis. Afterwards, pET-14b/FDH vector was transferred to *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) expression cells. FDH enzyme production was induced with IPTG and produced protein was purified with Ni-NTA affinity column chromatography. SDS-PAGE and Western blot analyzes were carried out to see the presence of FDH protein and both of them displayed expected 41 kDa bands. Finally, enzyme assays were done to determine ideal activity conditions. Results were

evaluated by 340 nm wavelength absorbances of enzymatic reaction product, NADH. In consequence of characterization studies, it was determined that recombinant FDH enzyme works efficiently at pH 8.0 Tris buffer solution with 40 mM formate substrate concentration until the temperature reaches 60°C.

This enzyme which is frequently used in pharmaceutical industry and clinical biochemistry laboratories is provided from foreign sources in our country thereby it becomes costly. This study is important in the way of providing data for national production of FDH enzyme and starting large scale production in industrial area.

**Keywords:** NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase, *Candida boidinii*, *Escherichia coli*, cloning, expression, characterization



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Format dehidrogenaz enzimi; dördüncül yapısı, prostetik grup varlığı ve türü, substrat spesifitesinde farklılıklar gösteren enzim gruplarını kapsayan bir enzim çeşididir. Enzimin gruplandırması nikotinamid adenin dinükleotidi ( $\text{NAD}^+$ ) indirgeme kabiliyetini baz almakta ve buna göre iki gruba ayrılmaktadır.  $\text{NAD}^+$ -bağımlı olmayan format dehidrogenaz grubu genellikle anaerob bakteriler ve arkelerden izole edilen, molibden-tungsten kofaktörlerine ve demir-sülfür merkezlerine sahip heteromerik yapıda bulunan enzimlerden oluşmaktadır.  $\text{NAD}^+$ -bağımlı format dehidrogenaz grubu ise  $\text{NAD}^+$  moleküllerine yüksek spesifite gösteren, prostetik grup veya metal iyonları içermeyerek homodimerik yapıda bulunan, genellikle metilotrof bakteriler, mayalar ve bitkilerden izole edilen enzimlerden oluşmaktadır.

$\text{NAD}^+$ -bağımlı format dehidrogenaz (FDH, EC 1.2.1.2) enzimi, format iyonlarını  $\text{CO}_2$ 'ye yükseltgeyerek  $\text{NAD}^+$  molekülünü  $\text{NADH}$ 'a indirger. D-özgü 2-hidroksi asit dehidrogenaz süper familyasına ait olan bu enzim, özdeş iki alt birimden ve iki aktif bölgeden oluşur. Farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin dizi analizlerinde kataliz, koenzim ve substrat bağlanması için kritik öneme sahip tüm aminoasit rezidülerinin yüksek derecede konservatif yapıda olduğu görülmüştür.

Kinetik olarak karakterize edilen tüm  $\text{NAD}^+$ -bağımlı FDH enzimleri, Bi-Bi reaksiyon mekanizması özelliği gösterir. Bu reaksiyonlarda, substratların bağlanması değişmeyen bir sırayla ilerler. İlk olarak  $\text{NAD}^+$ , ardından format enzime bağlanır. Enziminin katalitik mekanizması, substrattaki hidrit iyonunun  $\text{NAD}^+$ 'ın nikotinamid kısmındaki  $\text{C}_4$  atomuna doğrudan transferidir. Dehidrogenazların aktif bölgesindeki hidrit iyon transferini içeren katalizin genel mekanizmasını çalışmak için model enzimdir çünkü katalitik mekanizmada proton transfer basamağı yada asit-baz kataliz aşaması yoktur.

$\text{NAD}^+$ -bağımlı FDH enzimi, farmasötik endüstrisi başta olmak üzere endüstride yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Optikçe aktif bileşiklerin farmasötikler için önemli ara ürünler olarak kabul edilmesi ile birlikte bu kimyasalların hazırlanmasında

enzimatik indirgeme reaksiyonları kullanılmaya başlanmıştır. Bu reaksiyonlar, NAD(H) ve NADP(H) gibi pahalı kofaktörlere ihtiyaç duyduğundan kofaktörlerin geri dönüştürülmesi için yöntemler geliştirilmiştir ve bu yöntemlerde NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enziminin verimliliği kanıtlanmıştır. Enzimin katalizlediği reaksiyonun tersinmez olarak gerçekleşip prosesteki ürünü yüksek verimle üretmesi, pH 5.5-11.0 gibi geniş bir aralıkta aktivite göstermesi, kararlı bir yapıda olup sistemlerde haftalarca-aylarca kullanılabilmesi ve düşük maliyetli substrat kullanımı gibi avantajlı özellikleri endüstride tercih edilmesini sağlamıştır. NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enzimi, medikal alanda biyokimyasal tanılama testlerinde kullanılmaktadır. Metanol zehirlenmesi vakalarında, metanolün metabolik biyotransformasyonu sonucu oluşan format FDH enzimi tarafından herhangi bir biyolojik sıvıda saptanarak teşhis edilebilmektedir. Üriner sistem taş hastalığının tespitinde FDH enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır. İdrarla atılan oksalat miktarının artışı üriner sistem taşı oluşma riskini artıran faktörlerden biri olarak bilinmektedir. Bu sebeple, taş oluşma riskinin değerlendirilmesinde ve sık taş düşüren hastalarda sebebin araştırılmasında oksalat miktarının ölçülmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Oksalat, oksalat dekarboksilaz ile format molekülüne dönüştürülüp sonrasında NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enziminin katalizlediği reaksiyon ürününün miktar ölçümü ile tespit edilebilmektedir. *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*, *T. vaginalis*) vajiniti hastalığının tanısında da FDH enzimi kullanılmaktadır. *T. vaginalis* paraziti metabolik son ürün olarak çok miktarda formik asit üretir ve güçlü inflamatuvar sonuçlara yol açar. Hasta örneğinde bulunan formatın FDH enzimi ile yükseltgenmesi sonucu oluşan NADH ölçümleriyle hastalığın teşhisi kolaylıkla yapılabilmektedir.

FDH genleri yüksek ökaryotlarda henüz fonksiyonel olarak tanımlanmamıştır. Veri bankalarında FDH'ın koenzim bağlanan bölgesine homoloji gösteren insan cDNA klonları bulunmuştur fakat D-özgü 2-hidroksi asit dehidrogenazların NAD<sup>+</sup> bağlanan kısımlarının dizilerindeki yüksek benzerlikten dolayı bu dizinin aynı süper familyadaki başka bir enzime ait olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır. Damarlı bitkilerin fotosentez yapan dokularında bulunan FDH'ın bir şok proteini olduğu; kimyasal reaktifler, düşük sıcaklık, susuzluk, elverişsiz toprak kompozisyonu gibi maruziyetlerle yapraklardaki sentezin belirgin ölçüde arttığı görülmüştür. Anaerob bakteri ve arkelerde bulunan FDH enziminin rolü net olarak anlaşılacakla birlikte, bitkilerde olduğu gibi stres faktörlerine maruz kalındığında sentezin başladığı

düşünülmektedir. Tüm metilotrof mikroorganizmalarda bulunan NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'nin temel fonksiyonu formatın karbondioksit'e yükseltgenmesi ile enerji eldesidir. Metilotrof mayalar *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Torulopsis* cinslerinden oluşmaktadır ve ortak bir metanol kullanım yolağına sahiptir. Bu yolda bulunan ve kilit enzimlerden biri olan FDH enzimi metanollü ortamda yüksek seviyede eksprese edilerek çok miktarda üretilebilmektedir.

*C. boidinii* ökaryotik, tek hücreli, fakültatif anaerob, kemoheterotrof, 4-6 µm boyutlarında, gram-pozitif, oval veya silindirik şekilli, ince duvarlı, maya tipi bir mantardır. Anamorfik *Saccharomycetales* takımında bulunan bu mayalar multilateral tomurcuklanma ile çoğalır. Birçok kaynaktan izole edilebilen bu organizma, coğrafi olarak farklı bölgelerde bulunan çeşitli ağaç türlerinin bitki özü sıvısında yüksek miktarda bulunur. Gıdalarda ise alkollü ve alkolsüz içeceklerde, fermente zeytinde ve süt ürünlerinde rastlanır. Metanol metabolizmasındaki enzimlerin verimli ve stabil bir şekilde izole edildiğı, enzimleri kodlayan genlerin metanol tarafından indüklenen gen promotörleri tam olarak tanımlandığı, sentetik tuz temelli ucuz besiyerlerinde yüksek hücre yoğunluğunda büyüebildiğı için *C. boidinii* bu yoldaki enzimlerin eldesinde model organizma olarak kabul edilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile birlikte rekombinant organizma ürünü olan enzimlerin mevcut pazardaki oranı artarak %60'lara ulaşmıştır. Doğal olarak var olmayan genetik kombinasyonların oluşturulmasına ve ürünlerin büyük ölçekte üretilmesine olanak sağlayan önemli bir biyoteknolojik uygulama olan rekombinant DNA teknolojisi ile *C. boidinii* kaynaklı NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enzimi *E. coli* bakterilerinde endüstriyel ölçekte üretilmekte ve ticari olarak satışı yapılmaktadır.

Bu çalışmada, *C. boidinii* kaynaklı NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enziminin rekombinant tekniklerle *E. coli* bakterilerine klonlanması, ekspresyonunun sağlanması, en az ticari enzim kadar kararlı ve yüksek aktiviteli rekombinant FDH enzimi eldesi amaçlanmıştır. Elde edilecek bu enzim ile biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere yerli bir kit yapımı hedeflenmiştir. Özellikle farmasötik endüstrisinde ve rutin biyokimya laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan bu enzim, ülkemizde yurtdışı kaynaklardan temin edilmekte ve pahalıya mâl olmaktadır. Bu çalışma, bu enzimin yerli olarak üretilmesi ve endüstriyel sahada büyük ölçekte üretime geçilmesi için veri sağlaması açısından önemlidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Candida* Cinsi Mayalar

#### 2.1.1 Tarihçe

*Candida* cinsinin keşfi Antik Yunan Çağ'a kadar uzanmaktadır. Farkedilmesi karşılaşılan ilk kandidiyaz formu olan ağız pamukçuklanması ile olmuştur. Bununla ilgili en eski rapor M.Ö 400'lü yıllarda Hipokrat'ın "Of the Epidemics" metinlerinde görülmüştür [1].

1839 yılında Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck tifodan ölen bir hastadan izole ettiği orofarengeal ve özafajiyal örneklerde pamukçuklar görmüştür. Mikroskop altında detaylı bir inceleme yaparak günümüzde bölmeli hif, dallanmış psöдохif ve blastokonit olarak bilinen yapıları tanımlamış fakat bu oluşumların tifo bakterisine ait olduğunu düşünmüştür [2]. 1841 yılında Emil Berg sağlıklı bebeklere aftöz membran materyali aşılıyarak pamukçuk oluşumunu gözlemlemiş ve sebebinin bir mantar olduğunu kesin olarak belirtmiştir [3]. 1847'de Fransız mikolog Charles Philippe Robbin pamukçuğa sebep olan bu mantarı *Oidium albicans* olarak isimlendirmiştir [1, 4]. 1888 yılında bu mantar E. C. Hansen tarafından *Monilia* cinsine dahil edilmiştir [5, 6]. Sonrasında yapılan çalışmalarla birlikte pamukçuğa yol açan bu organizmanın *Monilia* cinsine ait olmadığı ortaya çıkmış ve 1923 yılında Christine Berkhout benzer özellikteki dokuz tür için *Candida* ismini önermiştir. Berkhout'un sunduğu bu öneriyi dönemin önde gelen mikologları Maurice Langeron ve Paul Guerra askosporojen olmayan mayaların rasyonel sistematığının başlangıcı olarak belirtmiştir [1, 7].

1954'te düzenlenen 8. Botanik Kongresi'nde *Candida*'nın resmi isim olarak onaylanması ile bu cinsin etiyoloji ve taksonomisi ile ilgili belirsizlik son bulmuştur. 1987'düzenlenen 14. Botanik Kongresi'nde ise *Deuteromycota* şubesinde *Blastomycetes* sınıfında *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde yer aldığı belirtilmiştir [6].

### 2.1.2 Genel özellikler

*Candida* türleri; ökaryotik, tek hücreli, fakültatif anaerob, kemoheterotrof, 4-6 µm boyutlarında, gram-pozitif, oval veya silindirik şekilli, ince duvarlı, maya tipi mantarlardır [8, 9].

Anamorfik *Saccharomycetales* (eski ismi ile *Cryptococcales*) takımında bulunan bu mayalar multilateral tomurcuklanma ile çoğalır [10]. Tomurcuklanma ile üremede tomurcuğun belirmesi, büyümesi ve ana hücreden ayrılması olmak üzere üç temel basamak vardır. İlk olarak gelişimini tamamlamış maya hücresinin duvarı bir noktada incelik ve esnekleşir. Hücre duvarının esnek olan bu kısmı hücre içeriğinin basınç etkisiyle dışarı doğru tomurcuk adı verilen küre şeklinde ufak çıkıntılar yapar. Aynı anda lokal olarak polisakkarit sentaz zimojenin aktivasyonu ile yeni bir hücre duvarı oluşmaya başlar. Ana hücre ve tomurcuk arasında oluşan kitin halkası bölmeler (septum) oluşturmak için büyür. Tomurcuklanma sürecinden hemen önce veya eş zamanlı olarak ana hücrenin çekirdeği bölünür ve tomurcuk erişeceği final boyutun yarısına veya üçte birine ulaştığında ikiz çekirdeklerden biri tomurcuğa doğru hareket eder. İki çekirdek buldukları ayrı hücrelerde organize olur, aralarındaki bağlantıyı daraltarak tamamen kapatır ve hücreler birbirinden bağımsız hale gelir [11]. Tomurcukların ana hücreden ayrılmadığı durumlarda aralarındaki bağlantıyı sağlayan ipliksi ve boğumlu yapılar yalancı hif (psödohif) olarak adlandırılır [5, 6]. *Candida* türlerinin büyük çoğunluğunun uygun şartları bulduğunda oluşturduğu bu hifler, maya ile gerçek hif arasındaki ara oluşumdur. *C. boidinii* mayaları da ayırt edici bir özellik olarak iyi gelişmiş yalancı hifler oluşturur [12]. Gerçek hifler apikal uzantı biçiminde, bölmeli ve düzgün kenarlıdır. Bu oluşum, klinik örneklerden en çok izole edilen *Candida albicans* (*C. albicans*), nadiren izole edilen *Candida norvegensis* ve *Candida dubleniensis* türlerinde görülür [5, 6]. Fırsatçı patojenlerde gerçek ve yalancı hiflerin patojenik etki yarattığı bilinmektedir [13]. Maya ve hif formları arasındaki değişim sıcaklık, pH, besin gibi çevresel faktörlerden etkilenir ve tersinirdir [10].

*Candida* türleri kan kültür şişelerinde ve Sabouraud dekstroz agar gibi klasik besiyerlerinde özel şartlara gereksinim duymadan büyüebilir [8]. Oda sıcaklığında veya 37°C'de, kültür besiyerinde, 24-48 saat içerisinde kenarları ve yüzeyleri düzgün, beyaz veya krem renkli, yumuşak, parlak ve homojen görünümlü koloniler oluştururlar. Buldukları ortamda %30-40 neme ihtiyaç duyarlar. Üreyebildikleri pH aralığı 3.0-7.5 olmakla birlikte ideali 4.5-5.0 pH'tır [6, 14, 15].

Ökaryotik yapıda olan *Candida* hücreleri hücre duvarı, hücre membranı, sitoplazma, mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve çekirdekten oluşur [5]. Diğer organizmalarda olduğu gibi hücre duvarının fonksiyonu hücre bütünlüğünü sağlamak, fiziksel ve osmotik hasarlara karşı organizmayı korumak ve organizma ile çevre arasındaki etkileşimi başlatmaktır [16]. *Candida* mayalarının hücre duvarı ile ilgili çalışmalar kompleks bir mikromimariye sahip olduğunu gösterir. Duvarın kalınlığı türlere göre değişkenlik gösterir ve en az 5 katmandan oluşur. Hücre duvarı ağırlığı %80-90 karbohidratlardan, %6-20 proteinlerden ve %1-7 lipitlerden oluşur. Duvarın içeriğinde en fazla orana sahip bileşikler olan karbohidratlar %47-60 oranında glukoz, %40 mannan ve %0.6-9 kitin içerir [17].  $\beta$ -glukanlar,  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,6 glikoz polimerlerinden; kitin,  $\beta$ -1,4 bağları içeren N-asetil D-glukozamin homopolimerlerden oluşur. Bu iki bileşik, rijit hücre duvarının yapısal bileşenleridir. Diğer önemli bileşen olan mannanlar, hücre duvarının dış tabakasındaki ana immünodominant bileşiklerdir. Proteinlere ve fosfatlara bağlı bulunurlar ve yapısal polimerlerin gömüldüğü hücre duvarının amorf matriksini oluştururlar. Hücre duvarı proteinleri ve mannoproteinleri, konak immün sistemi yanıtına yol açan temel bileşenlerdir [16].

### 2.1.3 Ekoloji ve patojenisite

*Candida* türü mikroorganizmalar çoğu ekolojik duruma uyum sağlar ve bundan dolayı doğaya geniş bir şekilde yayılmıştır. Genellikle meyvelerin ve diğer bitkisel organların yüzeyinde, toprakta, deniz suyunda, böceklerde bulunur [10].

*C. boidinii* birçok kaynaktan izole edilebilmektedir. Coğrafi olarak farklı bölgelerde bulunan çeşitli ağaç türlerinin bitki özü sıvısında yüksek miktarda bulunur [18]. Gıdalarda ise alkolsüz içeceklerde, şarapta, birada, fermente zeytinde ve süt ürünlerinde rastlanır [12].

İnsanlarda deri, mukoza ve gastrointestinal kanalın doğal mikrobiyotasına ait olan bu mikroorganizmalar fırsatçı patojenlerdir [19]. Normal konak organizma koşulları altında zararsız olmalarına rağmen bağışıklık sistemi zayıfladığı andan itibaren agresif patojenlere dönüşüp çoğalarak “kandidiyaz” adı verilen hastalığa neden olurlar. Kandidiyaz kendi içerisinde kutanöz, mukozal ve sistemik olmak üzere üç kategoriye ayrılır. Çoğunlukla, kutanöz ve mukozal kandidiyaz AIDS hastalarını, sistemik kandidiyaz ise kanser hastalarını ve organ nakli sonrası immün sistemi baskılayıcı



tedaviler gören kişileri etkiler. Kandidiyaz, %8-10'luk bir oranla nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan dördüncü etkidir. Sistemik kandidiyaz sebepli ölümler enfekte eden *Candida* cinsine bağlı olarak %15-35 arasında değişmektedir. Kandidiyazda en sık izole edilen *Candida* türü *C. albicans* 'tır. Bunun dışında *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, seyrek olarak karşılaşılan *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida dubliniensis*, and *Candida norvegensi* türleri klinik öneme sahiptir [20, 21].

Kutanöz ve mukozal kandidiyazda, konak organizmada meydana gelen değişikliklerin tetiklemesi ile oluşan yalancı hifler doku içine girip çoğalarak koloniler oluşturur. Sistemik kandidiyazda ise kolonizasyon genellikle gastrointestinal kanalda başlar. Buradan kan dolaşımına katılan *Candida* 'lar patojenlerin varlığında aktif hale geçerek fagositoz yapan nötrofiller, eozinofiller ve monositler ile karşılaşır [22]. İnsan nötrofilleri *Candida* patojenlerini öldürmek için iki farklı mekanizma kullanır. İlk mekanizmada; opsonize edilmeyen *Candida* 'ların fagolizozomal ölümleri CR3 kompleman reseptörünün tanınması, ardından sitotoksik bir etki yaratmak için dalak tirozin kinaz (Syr) ile fosfatidilinositol 3 kinazın (PI3K) indüklenmesi ve bunların neticesinde sinyal adaptör proteini olan CARD9'un aktive olması ile gerçekleşir. İkinci mekanizmada ise serum opsonize *Candida* 'ların fagolizozomal ölümleri Fc $\gamma$  reseptörlerine, protein kinaz C (PKC) ve NADPH oksidaz sistem tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlıdır. NADPH oksidaz enziminin faaliyeti sonucu üretilen süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), tek başına veya diğer reaksiyonların ürünü olan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil radikali (OH•), tekli oksijen ve ozon ile birlikte mikrobisidal bir etkiye sahiptir. Ayrıca, granüllerden vakuole çok miktarda salınan miyeloperoksidaz enzimi halojenürlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bağımlı yükseltgenmelerini sağlayarak toksik gazlar üretir ve fungal patojenler üzerinde öldürücü bir etki sağlar [23]. *Candida* 'lar kan dolaşımına katıldığında yeterli fagositik aktivite ile karşılaşmazsa çeşitli doku ve organlara yerleşerek koloni kurar [22].

*Candida* enfeksiyonlarının patogenezindeki temel virülans faktörleri; patojen üzerinde bulunan adezinlerin konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma eğilimi, değişen konak koşulları ile birlikte hücre içinde çeşitli sinyalizasyon yollarının aktifleşmesi sonucu oluşan maya-hif dimorfizmi, mikroorganizmaların biyofilm oluşturma

yeteneği ve konak hücre yüzeyleri ile immün bariyerlerin parçalanmasını sağlayan ekstraselüler hidrolitik enzimlerdir [5, 19].

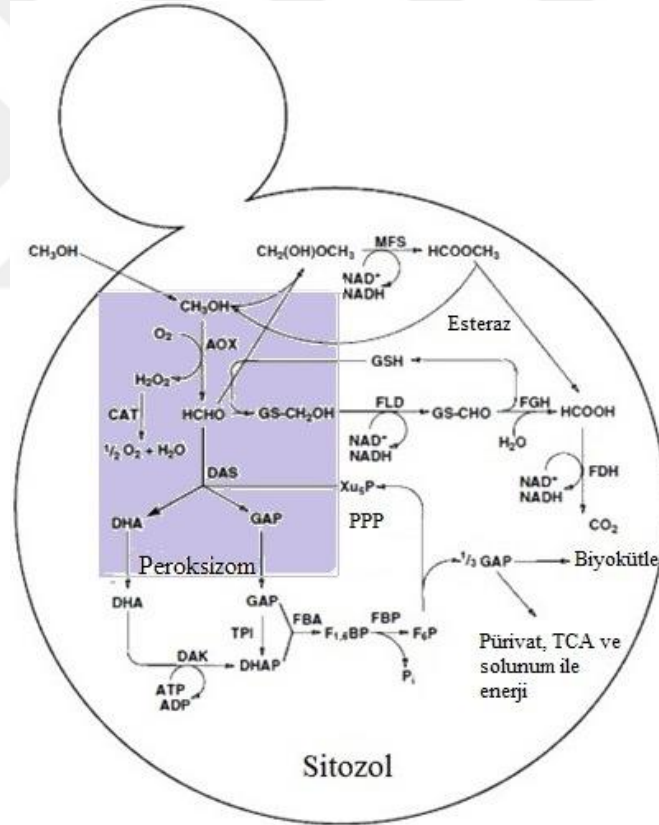
Şimdiye kadar herhangi bir klinik örnekte *C. boydini*'ye rastlanmamıştır fakat yapılan çalışmalarla alerjik astım ve rinitte patojenik bir rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. *C. boydini* bilinen alerjenlerin kaynağı olmasa da invazif bir patojen olan *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)'un temel alerjeni Asp f 3 ile ortak IgE bağlanma epitoplarını paylaşır. *A. fumigatus*; hava ile birlikte taşınan, kronik akciğer enfeksiyonlarına, alerjik bronkopulmoner aspergilloza ve immünokompetan kişilerde alerjiye sebep olan bir mantardır. Organizmanın en önemli alerjeni olan Asp f 3'ü kodlayan genin dizi analizi yapıldığında *C. boydini*'de peroksizomal membran proteinleri olan PMPA ve PMPB'yi kodlayan genlerle belirgin bir benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Protein seviyesinde ise Asp f 3 ve peroksizomal proteinler arasında %36 özdeşlik, %58 benzerlik bulunmuştur. *Aspergillus* duyarlılığı kazanmış kişilerden alınan serumlara *C. boydini* PMPA ve PMPB proteinleri koyulduğunda IgE antikolarına bağlandığı hatta Asp f 3 ile birlikte koyulmaları halinde IgE'ye bağlanmak için yarıştıkları görülmüştür [24]. *C. boydini* proteinlerinin *A. fumigatus* alerjeni olan Asp f 3 ile ortak IgE bağlanma epitopuna sahip olması muhtemel bir alerji etkeni olabileceğini göstermektedir. *C. boydini*, sağlıklı yetişkinlerde sürekli olarak hastalığa yol açmadığından ve minimal potansiyel risk içeren bir organizma olduğundan biyolojik güvenlik düzeyi 1 olarak belirtilmiştir (BSL-1) [25].

#### **2.1.4 Metilotrof organizma olarak *C. boydini***

Temel karbon ve enerji kaynağı olarak metanol kullanan organizmalara “metilotrof organizmalar” denmektedir. İlk defa 1969 yılında izole edilen metilotrof mayalar, potansiyel uygulamaları bakımından oldukça dikkat çekici bulunmuş ve yoğun bir şekilde çalışılmıştır. En önemli metilotrof maya cinsleri *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Torulopsis* 'tir. Bu mayalar, ekspresyonu transkripsiyon düzeyinde sıkı bir şekilde regüle edilen ortak bir metanol kullanım yolağına sahiptir [26-28].

Metanol kullanım yolağında ilk basamak, peroksizomda metanolün alkol oksidaz enzimi tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve formaldehite yükseltgenmesidir. Hücreler için toksik bir bileşik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz enziminin aktivitesi ile su ve oksijene parçalanır. Bu yolağın merkezi ara ürünü olan formaldehit, asimilasyon ve disimilasyon yolağlarının ayrıldığı noktada bulunur. Asimilasyon yolağında, dihidroksiaseton sentaz (DAS) adı verilen

enzim ksilüloz 5-fosfat ( $Xu_5P$ ) molekülündeki glikoaldehiti formaldehite transfer eder. Peroksizomlarda yeteri kadar  $Xu_5P$  olduğunda formaldehit DAS tarafından fikse edilerek dihidroksiaseton (DHA) ve gliseraldehit 3-fosfata (GAP) dönüştürülür. Sonrasında bu  $C_3$  bileşikleri sitozolde metabolize olur. Disimilasyon yolağında, alkol oksidaz tarafından üretilen formaldehit indirgenmiş glutatyon ile enzimatik olmayan bir reaksiyona girerek S-hidroksimetilglutatyon oluşturur.  $NAD^+$ -bağlı, GSH-bağımlı formaldehit dehidrogenaz (FLD), S-hidroksimetilglutatyonu substrat olarak kullanarak S-formilglutatyon ve  $NADH$  üretir. Sonrasında S-formilglutatyon, S-formilglutatyon hidrolaz ile format ve glutatyona hidrolize edilir. Bu yolağın son enzimi olan  $NAD^+$ -bağımlı FDH, formatı yükseltgeyerek  $CO_2$  ve  $NADH$  üretir. Glutatyon-bağımlı formaldehit oksidasyonu, formaldehit detoksifikasyonunda ve  $NADH$  üretimi ile enerji eldesinde önemli bir role sahiptir (Şekil 1) [26, 28, 29].



**Şekil 1:** Metilotrof mayalarda metanol kullanım yolağı. AOX: alkol oksidaz (EC 1.1.3.13), CAT: katalaz (EC 1.11.1.6), FLD: formaldehit dehidrogenaz (EC 1.2.1.1), FGH: S-formilglutatyon hidrolaz (EC 3.1.2.12), FDH: format dehidrogenaz (EC 1.2.1.2), DAS: dihidroksiaseton sentaz (EC 2.2.1.3), TPI: trioz fosfatizomeraz (EC 5.3.1.1), DAK: dihidroksiaseton fosfat (EC 2.7.1.29), FBA: fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz (EC 4.1.21.13), FBP: fruktoz 1,6-bifosfat (EC 3.1.3.11), MFS: metilformat sentaz, DHA: dihidroksiaseton, GAP: gliseraldehit 3-fosfat, DHAP: dihidroksiaseton fosfat, F1,6BP: fruktoz 1,6-bifosfat, F6P: fruktoz 6-fosfat, Pi: fosfat,  $Xu_5P$ : ksilüloz 5-fosfat, GSH: glutatyon, PYR: pürivat; PPP: pentoz fosfat yolağı, TCA: trikarboksilik asit döngüsü [28].

Metanol metabolizmasındaki genlerin ekspresyonu, metilotrof mikroorganizmaların glikozun ve etanolün olmadığı ortamlarda veya metanollü ortamlarda büyütülmesi ile iki farklı şekilde aktive edilebilmektedir. Metanol üzerinde büyüme esnasında bu yolda bulunan kilit enzimlerin her biri total çözünür proteinlerin %20-30'una ulaşır. Bu durum, enzimleri kodlayan genlerin promotörlerinin metanol tarafından kuvvetli bir şekilde aktive edildiğini gösterir. Etkili ve kontrol edilebilir bir şekilde düzenlenen metanolla indüklenebilir promotörler, metilotrof mayalar aracılı heterolog gen ekspresyon sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [26].

Metanol metabolizmasındaki enzimlerin verimli ve stabil bir şekilde izole edildiği, enzimleri kodlayan genlerin metanol tarafından indüklenip glikoz ve etanol tarafından baskılanan promotörleri tam olarak tanımlandığı, sentetik tuz temelli ucuz besiyerlerinde yüksek hücre yoğunluğunda büyüebildiği için *C. boidinii* bu yolağın enzimlerinin eldesinde model organizma olarak kabul edilmektedir [26, 28].

## **2.2 Format Dehidrogenaz Enzimi**

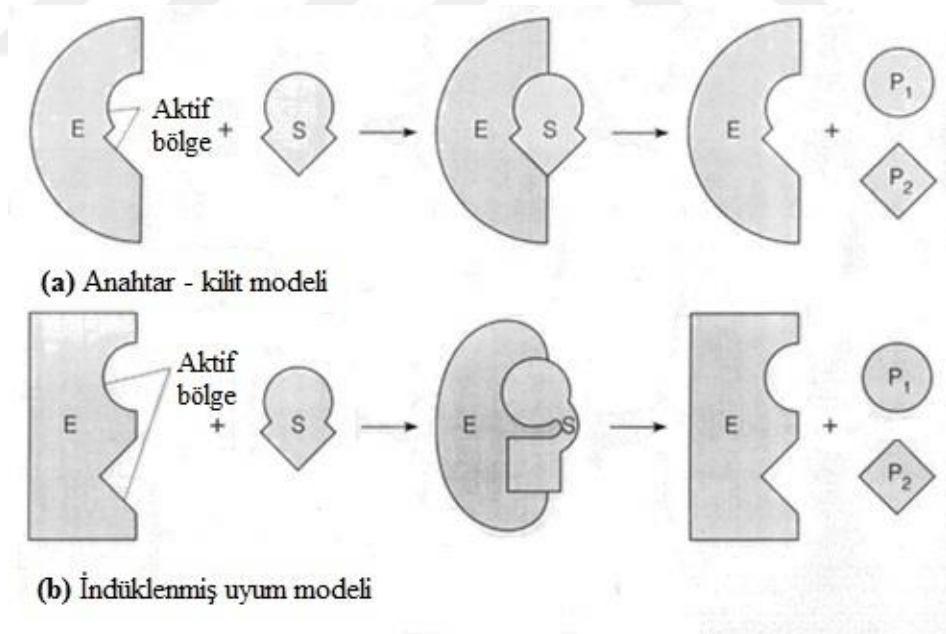
### **2.2.1 Genel olarak enzimler**

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen, *in vitro* olarak da etkinlik gösterebilen, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, özel yapı kazanmış makromoleküler biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Tepkime hızını bir milyonun üzerinde bir hızla ivmelendirerek katalizörün olmadığı durumlarda gerçekleşmesi yıllar alan reaksiyonların saniyeler içinde gerçekleşmesini sağlarlar. İki temel özellikleriyle karakterize edilirler. Birincisi, hızlandırdıkları reaksiyondan tükenmeden ve herhangi bir değişikliğe uğramadan çıkarlar. İkincisi, reaktant ve ürün arasındaki kimyasal dengeyi değiştirmeden reaksiyonu hızlandırırılar [30].

Küçük bir grup katalik RNA moleküllerinin dışında tüm enzimler protein yapıdadır. Enzimlerin katalitik aktivitesi birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarına yani doğal protein konformasyonunun bütünlüğüne bağlıdır. Enzim denatüre olup alt birimlerine yada kendisini oluşturan aminoasitlere ayrıştığında katalitik aktivitesini genellikle kaybeder. Bazı enzimler aktivite göstermek için kofaktör adı verilen ekstra inorganik iyonlara ( $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  gibi) ve/veya koenzim adı verilen kompleks organik moleküllere (biyositin, nikotinamid adenin dinükleotit, flavin adenin dinükleotit) ihtiyaç duyar. Kendisine çok sıkı bir biçimde kofaktör ve/veya koenzim

bağlanan, katalitik olarak aktif olan enzimlere holoenzim denir. Bu tür bir enzimin protein kısmı apoenzim yada apoprotein, kofaktör yada koenzim kısmı prostetik grup olarak bilinir [31].

Enzimlerin biyokimyasal reaksiyonlarla üzerinde etki ettiği ve ürüne dönüştürdüğü maddelere substrat denir. Enzimler, yapılarındaki yarıık veya cep şeklindeki aktif bölgeleri ile substratlarına bağlanır. Enzim-substrat etkileşimi iki modelle açıklanır. İlki, 1894 yılında Emil Fischer tarafından ortaya atılan “anahtar-kilit modeli”dir. Bu modele göre, enzimin aktif bölgesi substrat molekülünün geometrik şekline komplementer bir şekle sahiptir ve sadece bu uyuma sahip enzim ve substratlar birbirine bağlanabilir. İkincisi, 1958 yılında Daniel Koshland tarafından geliştirilen “indüklenmiş uyum modeli”dir. Bu modelde, enzimin kısmen esnek bir yapıda olduğu ve substratın enzimin son şeklini belirlediği belirtilir. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlandığında aktif bölgenin konformasyonu değişir, tamamen bağlanma gerçekleştiğinde ise katalitik reaksiyon gerçekleşir (Şekil 2). Substratlar enzimlerin aktif bölgelerine hidrojen bağları, hidrofobik apolar etkileşimler, koordine kovalent bağlar veya bunların tümünü kullanarak bağlanabilir [32, 33].



Şekil 2: Enzim-substrat etkileşiminde “anahtar-kilit” ve “indüklenmiş uyum” modeli [34].

Keşfedilen ilk enzimler, fonksiyonlarını belirten kelimelerin yada substratlarının sonuna -az ekinin getirilmesiyle adlandırılmıştır. Zamanla yeni enzimlerin keşfedilmesi ile birlikte aynı enzimin birden fazla isminin olması, farklı enzimlerin aynı isme sahip olması gibi karmaşıklıklar ortaya çıkmıştır. Bu problemi ortadan

kaldırmak amacıyla 1961’de Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu’na enzimlere yeni bir isimlendirme normu getirilmiş ve enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre altı alt gruba ayrılmıştır:

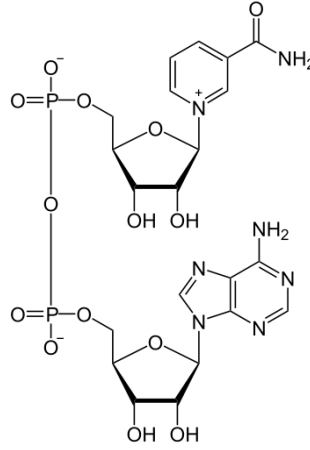
1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 1 kategorisini oluştururlar.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir bileşikten diğer bileşiğe transferini katalizleyen enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 2 kategorisini oluştururlar.
3. Hidrolazlar: Kimyasal bir bağın hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 3 kategorisini oluştururlar.
4. Liyazlar: Yükseltgenme ve hidroliz yapmadan belirli kimyasal bağları kırabilen ve bunu çoğunlukla yeni bir çift bağ yada halka yapısı oluşturarak yapan enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 4 kategorisini oluştururlar.
5. İzomerazlar: Molekülün bir izomerden diğerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 5 kategorisini oluştururlar.
6. Ligazlar: İki ayrı molekülün birleşerek yeni bir bileşik oluşturması için C-O, C-N, C-S ve C-C bağlarının oluşmasını katalizleyen enzimlerdir. EC numara sınıflandırmasında EC 6 kategorisini oluştururlar [31, 32, 35].

### **2.2.2 Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) koenzimi**

NAD, tüm canlı hücrelerde bulunan önemli bir koenzimdir. Yükseltgenmiş (NAD<sup>+</sup>) ve indirgenmiş (NADH) olarak iki farklı formda bulunur.

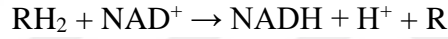
#### **2.2.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikler**

NAD, fosfat grupları aracılığıyla birbirine bağlanan ve riboz halkası içeren iki nükleotitten oluşur. Nükleotitlerden birinin birinci karbon atomunda (1’karbon) adenin, diğer nükleotidin aynı konumunda nikotinamid bulunur. Bu nükleotitler, 5’karbonlarındaki fosfat gruplarının köprülüğü aracılığıyla birleşirler (**Şekil 3**).



Şekil 3: Nikotinamid adenin dinükleotit yapısı [36].

NAD bileşiği, metabolizmada gerçekleşen redoks reaksiyonlarında elektron alır ve verir. Bu reaksiyonlarda, reaktanttan bir proton ve iki hidrojen atomu hidrit iyonu (H<sup>-</sup>) biçiminde uzaklaştırılır. Proton çözeltiliye salınırken, hidritin nikotinamid halkasına transferi ile reaktant yükseltgenir, NAD<sup>+</sup> da NADH'a indirgenir.



Hidrit elektron çiftinde, elektronlardan biri NAD<sup>+</sup>'ın nikotinamid halkasındaki pozitif yüklü nitrojene, diğeri nitrojenin karşısında bulunan C<sub>4</sub> atomuna transfer edilir. NADH molekülü diğeri molekülü indirgeyerek tekrar NAD<sup>+</sup>'a yükselttiğinde tersinir reaksiyon gerçekleşmiş olur. Böylelikle, koenzim NAD<sup>+</sup> ve NADH formları arasında tükenmeden dönüşebilir [36].

NAD'ın tüm formları higroskopik ve amorf beyaz toz biçimindedir. Katı olarak kuru ve karanlık yerlerde muhafaza edildiğinde dengededir. Çözeltileri renksizdir, 4°C ve nötral pH'ta bir hafta dengede kalır [37]. Asit ve alkalilerde hızlıca ayrışabilir ve bu ayrışma enzim inhibitörü olan ürünlerin oluşmasına yol açabilir [38].

NAD<sup>+</sup> ve NADH içerdikleri adeninden dolayı ultraviyole ışığı (UV) güçlü bir şekilde absorbe eder. NAD<sup>+</sup>'ın pik yaptığı absorpsiyon 259 nanometre (nm) dalga boyuna ve 16,900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> sönümlenme katsayısına sahiptir. NADH daha yüksek dalga boyunda absorpsiyon yapar ve 6,220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> sönümlenme katsayısıyla 339 nm'de ikinci bir pik verir. Koenzimin yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları arasındaki UV absorpsiyon farkından yararlanarak spektrofotometre aracılığıyla 340 nm'deki absorpsiyon miktarının ölçülmesiyle enzim testlerinde moleküllerin birbirine dönüşümü kolaylıkla belirlenebilmektedir [39].

NAD<sup>+</sup> ve NADH floresan ışımlarında da farklılık gösterir. Çözeltideki NADH 460 nm'de emisyon piki verirken, NAD<sup>+</sup> floresan ışık yaymaz. NADH proteinlere bağlandığı zaman floresan sinyalinin özellikleri değişir ve bu değişiklik enzim kinetiği çalışmalarında kullanılır [40].

### 2.2.2.2 Hücrelerdeki konum ve konsantrasyon

Hücre sitozolünde NAD<sup>+</sup>'ın gerçek konsantrasyonunu ölçmek zordur. Yapılan son çalışmalarla konsantrasyonun hayvan hücrelerinde 0.3 mM, mayalarda 1.0-2.0 mM civarında olduğu tahmin edilmektedir. Hücrenin diğer kompartmanlarındaki veriler sınırlı olmakla birlikte mitokondrideki NAD<sup>+</sup> konsantrasyonu sitozoldekine benzerdir [41]. NAD<sup>+</sup> membranlardan difüze olamadığı için özel bir taşıyıcı protein aracılığıyla mitokondriye taşınmaktadır [42]. NAD<sup>+</sup>'ın yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları arasındaki dengeye "NAD<sup>+</sup>/NADH oranı" denir. Bu oran hücrenin metabolik faaliyetlerini belirten redoks durumunu gösterdiği için önemlidir [43].

### 2.2.2.3 Biyosentez

NAD<sup>+</sup>, aminoasitlerden *de novo* yolağı veya önceden oluşturulmuş bileşiklerin geri dönüştürüldüğü kurtarma (salvage) yolağı ile iki farklı şekilde üretilir.

*De novo* yolağında, NAD<sup>+</sup> basit bileşenlerden sentezlenir. Organizmalar arasında reaksiyon dizileri farklılık göstermekle birlikte belirli bir aminoasitten kuinolinik asit üretimi ortak bir özelliktir. Bu aminoasit, hayvanlarda ve bazı bakterilerde triptopan iken belirli bakterilerde ve bitkilerde aspartik asittir. Üretilen kuinolinik asit, fosforiboz transferi ile nikotinik asit mononükleotide dönüştürülür. Bu molekülden adenilat transferiyle nikotinik asit adenin dinükleotit oluşur. Son olarak, nikotinik asit adenin dinükleotitteki nikotinik asit nikotinamide amide edilerek NAD oluşturulur. Sonraki aşamada, bazı NAD<sup>+</sup>'lar NAD kinaz tarafından fosforile edilerek NADP<sup>+</sup>ye dönüştürülür. Organizmaların çoğunda fosfat grup kaynağı olarak ATP kullanılırken, *Mycobacterium tuberculosis* gibi bazı bakterilerde fosforil donörü olarak inorganik fosfat kullanılır [44].

Kurtarma (salvage) yolağında nikotinik asit, nikotinamid ve nikotinamid ribozitten oluşan üç temel vitamin prekürsörü vardır. B<sub>3</sub> vitamini yada niyasin olarak da isimlendirilen bu bileşikler, gıdalarla alınabildikleri gibi hücrenel NAD<sup>+</sup>'ın sindirilmesiyle de üretilebilirler. *De novo* sentez olmasına rağmen, kurtarma



reaksiyonlarının elzem olmasının sebebi  $NAD^+$  a duyulan yüksek gereksinimdir [44]. Mikroorganizmalardaki bu yollar memelilerdekinden farklıdır. *Candida glabrata* mayası ve *Haemophilus influenzae* bakterisi gibi bazı patojenler  $NAD^+$  sentezleyemedikleri için dış kaynaklardan gelen  $NAD^+$  ve  $NAD^+$  prekürsörlerine bağımlıdır [45].

#### 2.2.2.4 Fonksiyonlar

$NAD$  molekülleri redoks metabolizmasında önemli bir yer tutar. Oksidoredüktazların katalizlediği redoks reaksiyonları metabolizma için hayati öneme sahiptir. Bu reaksiyonların gerçekleştiği en önemli olay besinlerden enerji eldesidir. Glikoz ve yağ asitleri yükseltgendiğinde enerji açığa çıkar. Bu enerji beta oksidasyonu, glikoliz ve sitrik asit döngüsü kapsamında  $NAD^+$  a transfer edilerek  $NADH$  a indirgenmeyi sağlar. Ökaryotlarda, sitoplazmada üretilen ve  $NADH$  tarafından taşınan elektronlar mitokondriyal mekikler vasıtasıyla mitokondriye taşınır. Elektronların mitokondriyal  $NAD^+$  ı indirgeyerek oluşturdukları  $NADH$  oksidatif fosforilasyonla  $ATP$  'nin üretildiği elektron taşıma zincirinde sırasıyla yükseltgenir. Bu reaksiyon dizilerinde  $NAD$  'ın hem yükseltgenmiş hem indirgenmiş formu kullanıldığından hücrede  $NAD^+$  ve  $NADH$  belirli konsantrasyonlarda tutulur. Yüksek  $NAD^+/NADH$  oranı koenzimin hem yükseltgeyici hem indirgeyici ajan olmasını sağlar [46].

Redoks dışında  $NAD^+$ ,  $ADP$ -riboz transfer reaksiyonlarında tüketilir. Post-translasyonel bir modifikasyon olan  $ADP$ -ribozilasyon,  $ADP$ -riboziltransferaz enzimleri tarafından katalizlenir. Bu enzimler,  $NAD^+$  molekülündeki  $ADP$ -riboz kısmını alıcı proteinin spesifik aminoasitlerini içeren rezidülere ekler. Bu modifikasyonla birlikte alıcı proteinin aktivitesinde ciddi bir değişim olur.  $ADP$ -ribozilasyonu, tek bir  $ADP$ -riboz ilavesi (mono- $ADP$ -ribozilasyonu) veya dallanmış, uzun zincirlerden  $ADP$ -ribozun proteinlere transferi (poli- $ADP$ -ribozilasyonu) şeklinde olabilir. Bu çoklu yapı,  $DNA$  onarımı ve telomer devamlılığı için oldukça önemlidir [47].

$NAD^+$ -bağımlı bir diğer enzim grubu bakteriyel  $DNA$  ligazlardır.  $NAD^+$  ı substrat olarak kullanan bu enzimler, substrattaki adenozin monofosfatı bir  $DNA$  zincirinin 5' fosfatına verir. Bu ara eleman, diğer  $DNA$  zincirinin 3' hidroksil grubu tarafından tutulur ve yeni bir fosfodiester bağı oluşur. Böylelikle iki  $DNA$  uçlarından birleşmiş

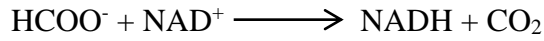
olur. Bu durum ökaryotik DNA ligazlar için geçerli değildir çünkü ökaryotlar DNA-adenozin monofosfat ara ürününü oluşturmak için ATP kullanır [47].

### 2.2.3 Format dehidrogenaz enzimi

#### 2.2.3.1 Format dehidrogenaz enziminin sınıflandırılması

Format dehidrogenaz enzimleri; dördüncül yapı, prostetik grup varlığı ve türü, substrat spesifitesinde farklılıklar gösteren farklı gruptaki enzimleri kapsamaktadır [48]. Bu enzimler yapısal farklılıklarına bağlı olarak iki ana gruba ayrılmaktadır:

1. NAD<sup>+</sup>-bağımlı olmayan format dehidrogenaz: Genellikle anaerobik mikroorganizma ve arkelerde bulunurlar. Bu gruptaki enzimler, yüksek molekül ağırlığına ve kompleks dördüncül yapıya sahip heterooligomerlerdir. Genellikle, aktif bölgelerinde bulunan çeşitli prostetik gruplarla (demir-sülfür grupları, molibden ve tungsten iyonları gibi) ve oksijene gösterdikleri yüksek kararsızlıkla karakterize edilirler.
2. NAD<sup>+</sup>-bağımlı format dehidrogenaz (EC 1.2.1.2): Bu gruptaki enzimler, format iyonunun CO<sub>2</sub>'ye yükseltgenmesini aynı zamanda NAD<sup>+</sup>'ın NADH'a indirgenmesini katalizleyen enzimlerdir.



D-özgü 2-hidroksi asit dehidrogenaz süper familyasına ait olan bu enzimler, özdeş iki alt birime ve iki aktif bölgeye sahiptir. Prostetik grup veya metal iyonları içermezler. Enzimin katalitik mekanizması, substrattaki hidrit iyonunun NAD<sup>+</sup>'ın nikotinamid kısmındaki C<sub>4</sub> atomuna doğrudan transferidir. Dehidrogenazların aktif bölgesindeki hidrit iyon transferi mekanizmasını çalışmak için model enzimdir çünkü katalitik mekanizmada proton transfer basamağı yada asit-baz kataliz aşaması yoktur [49].

#### 2.2.3.2 Format dehidrogenaz enziminin lokasyonu ve fizyolojik rolü

##### Mikroorganizmalar

Tüm metilotrof mikroorganizmalarda format dehidrogenaz enzimi bulunmaktadır. Bu canlıların hücrelerinde formatın karbondioksite yükseltgenmesi temel enerji kaynaklarından biridir.

Mayalarda enerji ve karbon kaynağı olarak yalnızca metanolü kullanma *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ve *Torulopsis* cinsleriyle sınırlıdır. Dolayısıyla bu cinslerin tüm

üyelerinde NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH bulunmaktadır [50]. Bakterilerde format yükseltgeyici birkaç çeşit enzim vardır. Bu enzimlerden bazıları aktif bölgelerinde selenosistein içerirken, diğerlerinin aktif bölgelerinde tungsten ve molibden iyonları, demir-sülfür kümeleri bulunmaktadır [51].

Metilotrofların dışındaki diğer mikroorganizmalarda FDH'nin rolü hala net olarak anlaşılamamıştır. Hipotezlere göre, stres faktörlerine maruz kalındığında hücrede enzimin sentezi başlamaktadır [48].

### **Damarlı bitkiler**

FDH, bitkilerde ilk olarak 1921 yılında fasulyede (*Phaseolus vulgaris*) farkedilmiştir [52]. Hakkında detaylı bir araştırma ise 1951'de D. Davison tarafından yapılmıştır. Bezelye tohumundan ve çalı fasulyesinden izole edilen enzimlerin bu canlılardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır [53]. 1992'de fotosentetik olmayan patates dokusunda total mitokondriyal proteinin yaklaşık %9'luk kısmını oluşturan bilinmeyen bir protein bulunmuştur. Bu proteinin geni klonlanmış, sekanslanmış ve polipeptidin *Pseudomonas* sp. 101 bakterisinde bulunan FDH ile %55 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda bu polipeptit fonksiyonel olarak formatın yükseltgenmesini, NAD<sup>+</sup>'in indirgenmesini katalizlemiştir [54].

FDH, genellikle bitkilerin mitokondrilerinde ve fotosentetik dokularında bulunmaktadır. Fotosentez yapan dokularda FDH'nin bir şok proteini olduğu; kimyasal reaktifler, düşük sıcaklık, susuzluk, elverişsiz toprak kompozisyonu gibi maruziyetlerle yapraklardaki sentezin belirgin ölçüde arttığı görülmüştür [55]. Enzimin bu şartlar altındaki temel rolünün üretilen formatın yükseltgenmesi olduğu saptanmıştır [48].

### **Yüksek ökaryotlar**

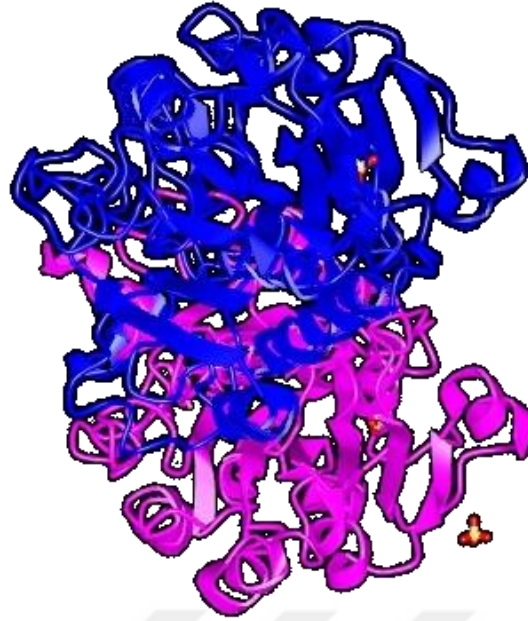
Yüksek ökaryotlardaki FDH genleri henüz fonksiyonel olarak tanımlanmamıştır. Veri bankalarında, farelerde bakteriyel FDH'ların N-terminaline çok yüksek homoloji gösteren aminoasit dizisi kodlayan iki adet cDNA klon dizisi bulunmuştur. Yine veri bankalarında FDH'nin koenzim bağlanan bölgesine homoloji gösteren üç adet insan cDNA klonu bulunmuştur fakat D-özgü 2-hidroksi asit dehidrogenazlarda NAD<sup>+</sup> bağlanan kısımlardaki dizilerin yüksek benzerliğinden dolayı bu dizinin aynı süper familyadaki başka bir enzime ait olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır [48].

### 2.2.3.3 NAD<sup>+</sup>-bağımlı format dehidrogenaz enziminin yapısal özellikleri

Karakterize edilen NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'ların çoğu prostetik grup içermez. Ökaryotik organizmalar ve bazı metilotrof bakterilerdeki FDH enzimleri kimyasal olarak özdeş iki alt birimden oluşur ve enzimlerin molekül ağırlığı genellikle 70-100 kDa arasında değişir. İstisnai olarak *Pseudomonas oxalaticus*'taki NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'lar yüksek molekül ağırlığına (315 kDa), kompleks dördüncül yapıya, demir, sülfür, iki flavin mononükleotidi içeren prostetik gruplara sahiptir [60]. Prokaryotlarda NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'lar ile ilgili çok çalışma yapılmamıştır. *Pseudomonas sp. 101*, *Moraxella sp. C-1*, *Paracoccus sp. 12-A* ve *Mycobacterium vaccae* N10'dan elde edilen FDH'ların moleküler özellikleri, maya ve yüksek bitkilerdeki NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'lar ile aynı aileye sahip olduklarını göstermektedir [56].

Farklı kaynaklardan elde edilen tamamlanmış ya da kısmen tamamlanmış dizi analizlerinde NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enzimlerinin oldukça konservatif bir yapıda olduğu görülmüştür. Dizilenen tüm FDH'ların birincil yapılarında güçlü benzerlikler bulunmuştur. Aynı gruptaki canlıların enzimleri arasındaki mutlak benzerlik %80'in üzerindeyken farklı canlı gruplarındaki enzimler de %50-55 oranında benzerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen FDH enzimleri incelendiğinde ortalama uzunluğunun 365 rezidü, konservatif kısmın ise total rezidülerin yaklaşık %20'si olduğu görülmüştür. Kataliz, koenzim ve substrat bağlanması için kritik öneme sahip tüm aminoasit rezidüleri yüksek derecede konservatif yapıdadır [48, 57].

*C. bovidinii*'de bulunan NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH monomeri, 15 alfa sarmalı ve 13 beta zincirinden oluşmaktadır. Özdeş iki alt birime sahip olan enzim, her bir alt biriminde "NAD bağlanan domain" ve "katalitik domain" olmak üzere iki domain içermektedir. NAD bağlanan domain (N119-S313 arasındaki rezidüler), NAD molekülünün tanınarak bağlanmasından sorumludur ve evrimsel olarak konservatif bir yapıya sahiptir [58]. Katalitik domain, kataliz için gerekli olan ve aktif bölgede doğru bir şekilde konumlanan aminoasitleri içermektedir. Her iki alt birimde de bulunan katalitik domainler dimerin dış yüzeyinde bulunmaktadır ve birbirleriyle temas halinde değildir. NAD bağlanan domain, katalitik domainden daha küçüktür ve elektron yoğunluğu daha iyi tanımlanmıştır. Bunun olası sebebi olarak da konumunun dimerin merkezinde olması ve bundan dolayı çözücüye maruz kalan daha az miktardaki yüklü rezidü ile birlikte küçük yüzey alanına sahip olması gösterilmektedir (**Şekil 4**) [59].



Şekil 4: *C. boidinii* format dehidrogenaz enziminin kristal yapısı [60].

FDH'in aktif bölgesini oluşturan aminoasit rezidülerinin bazıları oldukça önemlidir. Pro77, Phe78, Ile102, Asn118, Gly171, Gly173, Gly176, Arg267, Gln278 ve His310 *Candida methylca* (*C. methylca*) FDH enzimi için önemli aminoasitler iken bunlara ilavaten Phe69, Asn119, Ile175, Arg258, Gln287, Pro288 ve His311 pozisyonlarındaki aminoasit rezidüleri *C. boidinii* FDH enzimi için önemlidir [56, 61].

#### 2.2.3.4 NAD<sup>+</sup>-bağımlı format dehidrogenaz enziminin katalitik özellikleri

Katalizin santral dogmasına göre bir proteinin etkili bir katalizör olabilmesi için reaktantların başlangıçtaki durumlarını destabilize, reaksiyonun geçiş durumunu stabilize etmelidir. Sonuçta, reaksiyon bariyerini düşürerek reaksiyonun hızını artırmalıdır [56].

FDH tarafından katalizlenen reaksiyonun geçiş durumunda hidrit anyonu formattan ayrılarak NAD<sup>+</sup>'in nikotinamid kısmındaki pozitif yüklü C<sub>4</sub>N'ye geçer ve C<sub>4</sub>N hibridizasyonu sp<sup>2</sup>'den sp<sup>3</sup>'e dönüşür. FDH tarafından katalizlenen reaksiyonlarda hidrojen transfer mekanizması esasen elektrostatik etkiler tarafından kontrol edilir. NAD<sup>+</sup>'in pozitif yüklü nikotinamid birimi, negatif yüklü gruplarla ve hidrofobik yan zincirlerle etkileşime girerek aktif bölgede doğru bir şekilde konumlanır. Format ise çoklu hidrojen bağlarıyla pozitif yüklü gruplara bağlanarak yönlendirilir. Kataliz boyunca aktif merkezde stabilize ve destabilize edici etkileşimler gerçekleşir. Koenzimin nikotinamid kısmındaki C<sub>4</sub>N'nin elektrofilik özelliklerinin artması

katalizde önemli bir faktördür. Bu durum,  $\text{NAD}^+$  karboksamit grubunun negatif yüklü ligandlarla etkileşimi ve karboksamitin düzlem dışı bükülmesi ile gerçekleşir. Bunun sonucunda da nötr moleküller olan  $\text{CO}_2$  ve  $\text{NADH}$  üretilir [56].

Kinetik olarak karakterize edilen tüm  $\text{NAD}^+$ -bağımlı FDH'lar Bi-Bi reaksiyon mekanizması özelliğini gösterir. Bu reaksiyonlarda, substratların bağlanması değişmeyen bir sırayla ilerler. İlk olarak  $\text{NAD}^+$ , arkasından format enzime bağlanır. Merkezi üçüncül kompleks aşırı derecede hızlı bir ara çevirim geçirdiğinden hız kısıtlayıcı basamağın enzim-koenzim kompleksi oluşumu yada izomerizasyonu olduğu düşünülmektedir [62]. Bu grupta bulunan FDH'ların çoğunluğu Michaelis kinetiği özellikleri gösterir. FDH tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonlarda proton transfer basamağı yoktur. Substrattaki tekli karbon-hidrojen bağı kırılır ve üründe yeni bir tekli bağ oluşturulur. Bu nedenle, hidrit iyon transferini içeren katalizin genel mekanizmasının araştırılmasında FDH model enzim olarak kabul edilmektedir [56].

Farklı kaynaklardan elde edilen  $\text{NAD}^+$ -bağımlı FDH'ların termostabiliteleri birbirine çok yakındır ve  $45\text{-}55^\circ\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda verimli bir şekilde çalışmaktadır. Reaksiyon hızı  $55^\circ\text{C}$ 'e kadar hızlı bir şekilde artar, bu sıcaklık değeri aşıldığında genellikle aktivite kaybedilir [63]. Aktivite gösterdikleri pH aralığı  $5.5\text{-}11.0$ 'dir fakat ideali genellikle pH  $6.0\text{-}9.0$  arasındadır [56].  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}$  ve p-kloromerküribenzoat FDH'nin güçlü inhibitörlerindedir. Siyanür, siyanat ve azitin enzimik reaksiyonu inhibe etme özelliği vardır çünkü siyanür ve azit enzime bağlanmada format ile rekabet halindedir.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Sn}^{2+}$  iyonlarının enzimatik aktivite üzerinde herhangi bir etkisi yoktur [64].

### **2.2.3.5 $\text{NAD}^+$ -bağımlı format dehidrogenaz enziminin pratikteki uygulamaları**

#### **Kofaktör rejenerasyonu**

Optikçe aktif bileşikler, hücrelerdeki yaşamsal aktivitelerin en seçici ve etkili düzenleyicileridir [48]. Asimetrik karbon atomuna sahip optikçe aktif (kiral) bileşikler, biri diğerinin ayna görüntüsü olan ve aynadaki görüntüleri çakışmayan iki farklı formda bulunur. Enantiyomer adı verilen bu formlar kendilerinden veya çözeltilerinden geçen polarize ışığın titreşim düzlemini sağa (dextrorotatory, D) yada sola (levorotatory, L) çevirmelerine göre optik izomeri gösterir. Optik aktifliği ve üç boyutlu yapısı farklı olan izomerlerin fonksiyonel grupları, moleküler formülleri,

fiziksel ve kimyasal özellikleri aynıdır. Organizmalar tarafından üretilen moleküller kiral yapıda ve tek bir enantiyomer formundadır. Enantiyomerin formu oldukça önemlidir çünkü organizmanın belirli bir moleküle yanıtı genellikle organizmada etkileşeceği moleküle ne kadar uyum sağladığına bağlıdır. Aynı kimyasal yapıda olmalarına rağmen enantiyomerlerin çoğu vücutta farklı metabolik, toksikolojik ve farmakokinetik özellik gösterir [65]. Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi'nin (U.S. Food and Drug Administration) yönergesine göre ilaç olarak kullanılacak kiral bileşiklerin optik saflığı %99'dan az olamaz [66]. Optik saflığı yüksek izomerler, rasemik karışımlardaki spesifik enantiyomerin ayrıştırılmasıyla veya asimetric sentezlerle elde edilebilir. Geleneksel kimyasal metotlarla gerçekleştirilebilen bu işlemlerin prosedürleri genellikle zaman alıcı ve zahmetlidir. Bu durumda enzimler ideal katalizörler olarak devreye girmektedir. Sadece L-aminoasitlerden oluşmaları ve aktif bölgelerinin kiral ayırım yapmasıyla tek bir enantiyomerin sentezini stereospesifik olarak gerçekleştirebilme özelliklerinden dolayı farmasötik endüstrisi için önemli olan optikçe aktif bileşiklerin sentezinde son derece kıymetlidir [67]. Esas itibari ile bu bileşiklerin sentezinde tüm enzim sınıfları kullanılabilir olsa da yüksek derecede enantioselektif ve enantiospesifik olan oksidoredüktazlar, özellikle dehidrogenazlar, asimetric sentez için idealdir [48]. Dehidrogenazlar, genellikle kofaktör ve koenzim varlığında aktivite gösterir [68]. Fakat NADH ve NADPH gibi koenzimlerin yüksek fiyatlarından dolayı ( $10^6$  ve  $10^5$  USD/mol) sadece dehidrogenazları içeren prosesler asimetric sentezde ekonomik kâr sağlamaz. Bu nedenle, bu enzimler ana reaksiyonu gerçekleştirecek enzimin yanında pahalı kofaktörlerin geri dönüştürülmesini (rejenerasyon) sağlayacak şekilde ikinci enzim olarak sıklıkla tercih edilir [48, 69].

Kofaktör rejenerasyonu; kimyasal/fotokimyasal yöntemler, elektrokimyasal yöntemler ve biyolojik yöntemler olarak üç farklı şekilde gerçekleştirilir. Son yıllarda, endüstriyel olarak önemli ürünlerin ve ara ürünlerin sentezinde biyolojik yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu durumun oluşmasında reaksiyonları gerçekleştiren enzimlerin kimyasal yöntemlerden üstün olduğu üç temel özellik vardır:

1. Enzimler yapıları gereği reaksiyonları düşük sıcaklık ve basınçta gerçekleştirir. Kimyasal temelli yöntemler ise çoğunlukla yüksek sıcaklık ve basınçta ihtiyaç duyar. Endüstriyel perspektiften bakıldığında hafif reaksiyon koşulları enerji maliyetinde önemli tasarruf sağlar.

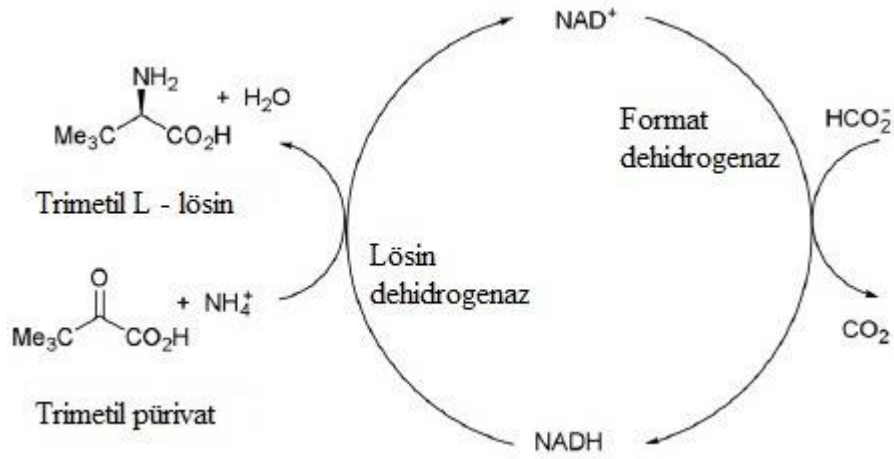
2. Enzimler tamamıyla kimyasal-, bölgesel-, stereo-seecicidir. Dolayısıyla, enzimler çok yuksek bir seecilikle sadece istenen ürünü üretme potansiyeline sahiptir. Bu yuksek seecilik, farmasötik sektör açısından oldukça kullanışlıdır [74].
3. Biyolojik yöntemler evre dostudur. Biyokatalitik proseslerde kullanılan enzimlerin çoğu reaksiyon ortamı olarak su kullandığından çözünür metal komplekslere dayalı kimyasal proseslerde olduğu gibi evre kirliliği yada ağır metal toksisitesi gibi tehlikeler barındırmaz [69, 70].

FDH enzimi sahip olduğu avantajlı özelliklerinden dolayı NADH kofaktör rejenerasyonunda sıklıkla kullanılan bir enzimdir. Bu avantajlardan başlıcaları Őyledir:

1. FDH tarafından reaksiyon katalizlenirken termodinamik denge tamamen ürüne doğru yön değiştirir. Bu durumda reaksiyon tersinmez olarak gerçekleşir ve ürün %99-100'lk bir verimle elde edilmiş olur.
2. FDH'nin katalizlediği reaksiyon ürünü olan CO<sub>2</sub>, kimyasal olarak inert bir bileşiktir ve azaltılan basınçta reaksiyon karışımından kolaylıkla uzaklaştırılabilir.
3. FDH'nin substratı olan format tuzları düşük maliyetlidir ve format iyonu diğer enzimlerin aktivitesini etkilemez.
4. FDH enzimi, 5.5-11.0 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterebilir.
5. Bakteri ve mayalardan izole edilen FDH enzimleri oldukça kararlıdır [48, 71].

NADH rejenerasyonunda *C. boidinii* FDH'nin kullanılması ilk olarak 1983 yılında Shaked ve Whitesides tarafından rapor edilmiştir [72]. Trimetil privattan L-ncl-lösinin (L-tertiary-lösin, L-tert-lösin) endüstriyel ölçekte üretilmesine olanak sağlayan enzim temelli üretimde, kofaktör rejenerasyonunda FDH kullanımı inovatif görülerek 2002 yılında Alman Gelecek dl (German Future Prize) ile ödüllendirilmiş, patentlenmiş ve 2003 yılında Degussa firması tarafından bu prosesin kullanımına geçilmiştir. Bu proseste, lösin dehidrogenaz enzimi ana reaksiyonu gerçekleştirerek amonyum trimetil privatın indirgeyici aminasyonunu katalizlemektedir. İkinci enzim olan FDH, format iyonlarını kullanarak ve NAD<sup>+</sup>ı indirgeyerek katalizin sonraki basamaklarında kullanılacak olan NADH'nin yeniden üretilmesini sağlamaktadır (**Şekil 5**) [73].





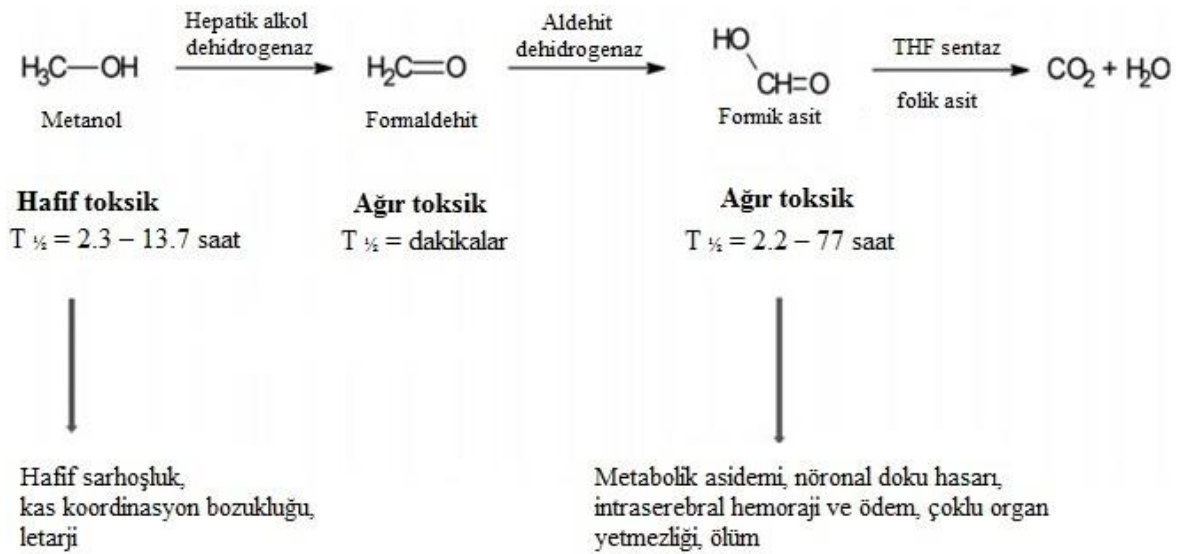
Şekil 5: Trimetil L-lösinin enzim temelli üretim şeması [69].

Farmasötik alanında yapılan çalışmalarda, anksiyete ve depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Buspiron'un ana metaboliti 6-hidroksibuspironun [74] ve tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ilaçlardan biri Saksagliptin'in ara ürünü (*S*)-*N*-*boc*-adamantan glisininin [75] enzimatik üretiminde *Pichia pastoris*'ten elde edilen NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH'nin, kolestrol düşürücü bir ilaç olan Atorvastatin'in önemli bileşenlerinden etil (*R*)-siyano-3-hidroksibütirik asitin [76] ve antiviral ajanlardan rinovirüs proteaz inhibitörlerinin yapıtaşlarından (*R*)-3-(4-florofenil)-2-hidroksi propiyonik asitin enzimatik üretiminde *C. boidinii*'den elde edilen FDH'nin [77] NADH kofaktör rejenerasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür.

### Metanol zehirlenmesi tespiti

Metanol renksiz, berrak, hafif kokulu, uçucu bir sıvıdır. Buz çözücü sıvılar, araba camı yıkama sıvıları, ispirto, şellak, vernik, boya inceltici ve gidericilerin içeriğinde bulunduğundan geniş bir kullanım alanı vardır. Metanol zehirlenmesi çok yaygın olmamakla birlikte metabolik rahatsızlıklar, kalıcı nörolojik fonksiyon bozuklukları, körlük ve ölümlü sonuçlanabilen ciddi bir problemdir [78]. Ağızdan alım, inhalasyon ve deriden absorpsiyon yoluyla zehirlenme gerçekleşebilir. Metanolün toksik etkisi, formaldehit ve formik aside metabolize olmasından kaynaklanmaktadır. Metanol alımından ilk birkaç saat sonra hasta kendini sarhoş, uyuşuk ve uyuklu hisseder. Metanol formik asite metabolize olup birikmeden toksik belirtiler ortaya çıkmaz. Latent dönem sonrası ortaya çıkan bu belirtiler baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma, optik diskte kan toplanması sonucu görüş bulanıklığı ve solukluğu, körlük, konvülsiyon olmakta ve çoğunlukla koma veya ölümlü sonuçlanmaktadır [79-81].

Morbidite ve mortalite oranı yüksek olmasına rağmen erken teşhis yapıldığı müddetçe spesifik ve verimli tedaviler mevcuttur [82]. Zehirlenme devam ederken serumdaki metanol konsantrasyonu azaldığından metanolün doğrudan saptanması için özel ekipman ve donanımlı teknisyen gerektiren kromatografik yöntemler, dolaylı yoldan saptanması için osmolal ve anyon boşluğunun hesaplandığı yöntemler kullanılabilir fakat düşük konsantrasyonların saptanacağı hassasiyet sağlanamadığından genellikle çok verimli olmamaktadır. Metanolün toksik metaboliti formik asitin anyonu olan formatın saptanması ise teşhiste hızlı ve kesin sonuç vermektedir [83]. Metanol karaciğerde alkol dehidrogenaz tarafından formaldehite yükseltgenir. Oluşan formaldehit, formaldehit dehidrogenaz tarafından hızla formik asite yükseltgenir (Şekil 6) [84]. Fizyolojik pH'ta formik asit, format ve bir hidrojen iyonuna ayrışır. Format idrar, plazma, serum, tam kan gibi herhangi bir biyolojik sıvıda ölçülebilir. FDH enziminin varlığında ortamda bulunan format iyonu  $NAD^+$ 'ı indirger. Üretilen NADH miktarı örnekte bulunan formik asit miktarıyla orantılı olduğundan zehirlenme kolaylıkla tespit edilebilmektedir [79, 81]. Formatın enzimatik analizi oldukça hassas, spesifik, ekonomik ve hızlıdır [82]. Zehirlenmenin sonraki evrelerinde ana bileşik olan metanol tükenirken formatın yarı ömrünün yaklaşık 20 saat olması önemli bir avantajdır [85]. Sonuç olarak, metanol zehirlenmesinin teşhisinde format iyonunun FDH ile enzimatik ölçümü çoğu rutin biyokimya laboratuvarında uygulanan bir yöntemdir.



Şekil 6: Metanolün metabolik biyotransformasyonu ve klinik görünümü [86].

## **Oksalat ürolitiyazis (üriner sistem taş hastalığı, böbrek taşı) saptaması**

Böbrek taşları; renal toplama sistemi, üreter ve üretrada idrar tıkanıklığına yol açan, organik matriksle birlikte bulunan kristal agregatlarıdır. Görülme ve tekrarlanma sıklığı yaş, cinsiyet ve ırka göre değişen bu rahatsızlığın genel belirtileri şiddetli ağrılar, kanlı idrar, idrarda görülen kum benzeri materyaller ve ufak taş kırıntılarıdır. Üriner sistemde taş oluşumu kompleks bir fiziksel olaydır. İlk olarak taş oluşturan tuzların idrarda aşırı doyumluğa ulaşmasıyla kristallenme başlar. Küçük kristaloidler birleşerek erimeyen ve karakteristik kristal kafes yapısını ortaya çıkaran çekirdekler oluşturur. Çekirdekler, toplama kanalları ve renal papilladaki epitel hücre yüzeylerinde büyür ve agregate olur. Buldukları yüzeyi terk edemeyen bu kristal kütleler, aşırı doyumlukla çöken yeni kristallerle birlikte daha da büyür ve tabakalı bir yapı oluşturur. Genel olarak taş oluşumunu başlatan kristalizasyon, idrarda bulunan kristalizasyonu destekleyici maddelerin (kalsiyum, sodyum, oksalat, urat gibi) fazlalığı yada kristalizasyonu baskılayıcı maddelerin (magnezyum, pirofosfat, sitrat, nefrokalsin) azlığı gibi anormal idrar içeriğinden kaynaklanmaktadır. Böbrek taşlarının içerik ve oluşum bakımından farklılık gösteren çeşitleri vardır. Taşın kimyasal içeriğinin bilinmesi en uygun tedavi yönteminin seçilmesi için elzemdir [87-90].

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre oksalat ürolitiyazise neden olan ve en sık karşılaşılan taş tipi kalsiyum oksalat taşlarıdır [91, 92]. İdrarda oksalatın saptanması için kullanılan analitik teknikler kimyasal, fiziksel ve enzimatik olmak üzere üç ana kategoriye ayrılmaktadır. Kimyasal teknikler ile oksalat ölçümü, doğrudan kolorimetrik/florometrik olarak veya dolaylı yoldan kalsiyum ölçümleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu analizler yeterince hassas olmadığından ve oksalatın bulunduğu ortamdan izolasyonunu gerektirdiğinden rutin kullanıma uygun değildir. Fiziksel teknikler; gaz kromatografisi, iyon kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisini içermektedir. Bu metotlar hassas sonuçlar vermesine ve gaz kromatografisi hariç idrarın doğrudan analizine olanak sağlamasına rağmen karmaşık prosedürlü olmaları ve genellikle hastane laboratuvarlarında bulunmayan özel teçhizat gerektirdiklerinden dolayı tercih edilmemektedir. Enzimatik teknikler, sahip oldukları spesifikite özellikleri ve preliminere ayırtmaya ihtiyaç duymamaları nedeniyle idrardaki oksalatın belirlenmesinde rutin biyokimya laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır [93-95]. Bu işlem için standart olarak oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) ve

oksalat dekarboksilaz (EC 4.1.1.3) enzimleri kullanılmaktadır. İdrardaki oksalat bu enzimlerin faaliyetleri sonucu oluşan ürünler aracılığıyla belirlenmektedir [87, 93, 94]. Oksalatın oksalat oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonla yükseltgenmesi sonucu hidrojen peroksit ve karbondioksit üretilir. Üretilen hidrojen peroksit çeşitli yöntemlerle tayin edilerek oksalat ölçümü gerçekleştirilmekte ve biyokimyasal testlerde sıklıkla kullanılmaktadır [96, 97]. Oksalat dekarboksilaz enziminin kullanıldığı metotta ise ilk olarak oksalat, oksalat dekarboksilaz ile formata dönüştürülür. Sonrasında format FDH enzimi ile NAD<sup>+</sup> tarafından yükseltgenir. Parçalanmış oksalatın oluşturduğu formatın yükseltgenmesi ile stokiyometrik olarak artan NADH'nin 340 nm'de absorpsiyonu ölçülerek oksalat analizi yapılır. Oksalat dekarboksilaz ve FDH enzimlerinin aktiviteleri idrardaki maddeler tarafından engellenmediği, analizden önce oksalatın izolasyonuna gerek duyulmadığı, uygun analiz cihazlarının kullanımıyla otomatik olarak çok sayıda örnek çalışılabilirdiği için bu metot rutin laboratuvarlarda tercih edilmektedir. İki enzim kullanılarak gerçekleştirilen bu spektrofotometrik yöntemin tek dezavantajı kullanılan enzimlerin aktivite gösterdikleri ideal pH aralıklarının farklı olmasıdır. Oksalat dekarboksilaz düşük pH'ta (pH 3.5-5.0) çalışırken FDH enziminin pH aralığı nispeten yüksektir (pH 7.0-8.0). Dolayısıyla reaksiyonlar gerçekleşirken pH değerlerinin kontrol edilmesi ve enzimlerin sırayla eklenmesi gerekmektedir [87, 93-95].

### ***Trichomonas vaginalis* vajiniti teşhisi**

Trikomonas vajiniti (TV); dünya genelinde yaygın olarak görülen, cinsel yolla aktarılan tedavi edilebilir bir enfeksiyondur. Etken organizma tek hücreli, küresel, kamçılı, hareketli bir parazit olan *T. vaginalis*'tir [98]. Bu organizma, genitoüriner yolun endojen florasında olmadığından invazif bir patojen olarak kabul edilmektedir [99]. *T. vaginalis*'in kuyruğuyla vajinal epitel hücrelere yapışması, oldukça immünojen olan yüzey proteininin (P270) ekspresyonu, sistein proteazlar ve hücre ayırma faktörlerinin sekresyonu patogenez mekanizmasında önemlidir [98, 100]. TV enfeksiyonu veya enfeksiyona geliştirilen inflamatuvar yanıt, hamilelik komplikasyonları [101], pelvik inflamatuvar hastalıklar [102] ve HIV kapma riskini artırma [103] gibi ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir.

*T. vaginalis*'in teşhisi çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır. Klinik teşhiste görülen klasik semptomlar cinsel yolla bulaşan diğer enfeksiyonlara benzerlik gösterdiğinden ve bazı

hastalar asemptomatik olduğundan teşhis koymada tek başına yeterli değildir [100]. Mikroskopik görüntüleme yöntemi, trikomodların karakteristik hareketleri ile karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır. Yoğun semptom gösteren hastalarda bu yöntem organizmanın hızlı ve ucuz bir şekilde saptanmasını sağlarken asemptomatik hastalar için güvenilirliği düşüktür. Sebebi, organizmanın vücut sıcaklığından uzaklaştığında ayırt edilmesini sağlayan hareketini kaybetmesi ve hareketsiz trikomodların fark edilememesidir. *T. vaginalis*'in teşhisinde kültür metodu altın standarttır fakat en az 72 saat inkübasyon gerektirdiğinden ve bu süre klinik açıdan uzun bir süre olduğundan araştırma amacı dışında tercih edilmemektedir. Enfeksiyonun teşhisinde immünolojik yaklaşımlarla *T. vaginalis*'in doğrudan veya karakteristik hücre ayırıcı faktörlerinin ve sistein proteaz immünojenlerinin deteksiyonu yapılmaktadır fakat *T. vaginalis* izolatlarının antijenik heterojenliğinin fazlalığı, düşük seviyelerdeki antikörlerin saptanamaması, antikörlerin enfeksiyon geçtikten sonra uzun bir süre ortamda kalmasıyla geçmiş yada güncel enfeksiyonların ayırt edilememesi bu yöntemin dezavantajlarıdır [99, 100, 104]. Moleküler teknikler olan PCR ve dot-blot hibridizasyonu organizmanın tespitinde oldukça spesifiktir fakat çok düşük de olsa yanlış pozitif sonuç verme ihtimali vardır [105].

Yapılan çalışmalarda kültür besiyerinde büyüyen *T. vaginalis*'in metabolik son ürün olarak çok miktarda formik asit ürettiği ve güçlü inflamatuvar sonuçlara yol açtığı görülmüştür. TV, vajinal örnekteki formatın deteksiyonu ile belirlenebilmektedir. Geliştirilen ve patenti alınan (Patent EP0556685A2, Patent CA2089186A1) bu yöntem, hasta örneğinde bulunan formatın FDH enzimi ile yükseltgenmesine ve beraberinde indirgenmiş ürün olan NADH'ın nitel yada nicel olarak saptanmasına veya ölçülmesine dayanmaktadır. Hastadan alınan örnek; içerisinde FDH enzimi, enzimin kofaktörü olan NAD<sup>+</sup>, indirgenmiş NAD<sup>+</sup> (NADH) oluştuğunda renk değişikliği yapan kromojenik indikatör ve elektron transfer ajanlarından oluşan ortama bırakıldığında üretilen NADH'a bağlı olarak teşhis yapılabilmektedir. Yöntemin hızlı ve basit olmasının yanı sıra format metabolitinin tespiti için canlı ve intakt hücrelere ihtiyaç duyulmaması ve FDH enziminin aktivitesinin örnekte bulunan diğer maddelerden etkilenmemesi önemli avantajlardır [99].

## 2.3 Rekombinant DNA Teknolojisi

### 2.3.1 Genel olarak rekombinant DNA teknolojisi

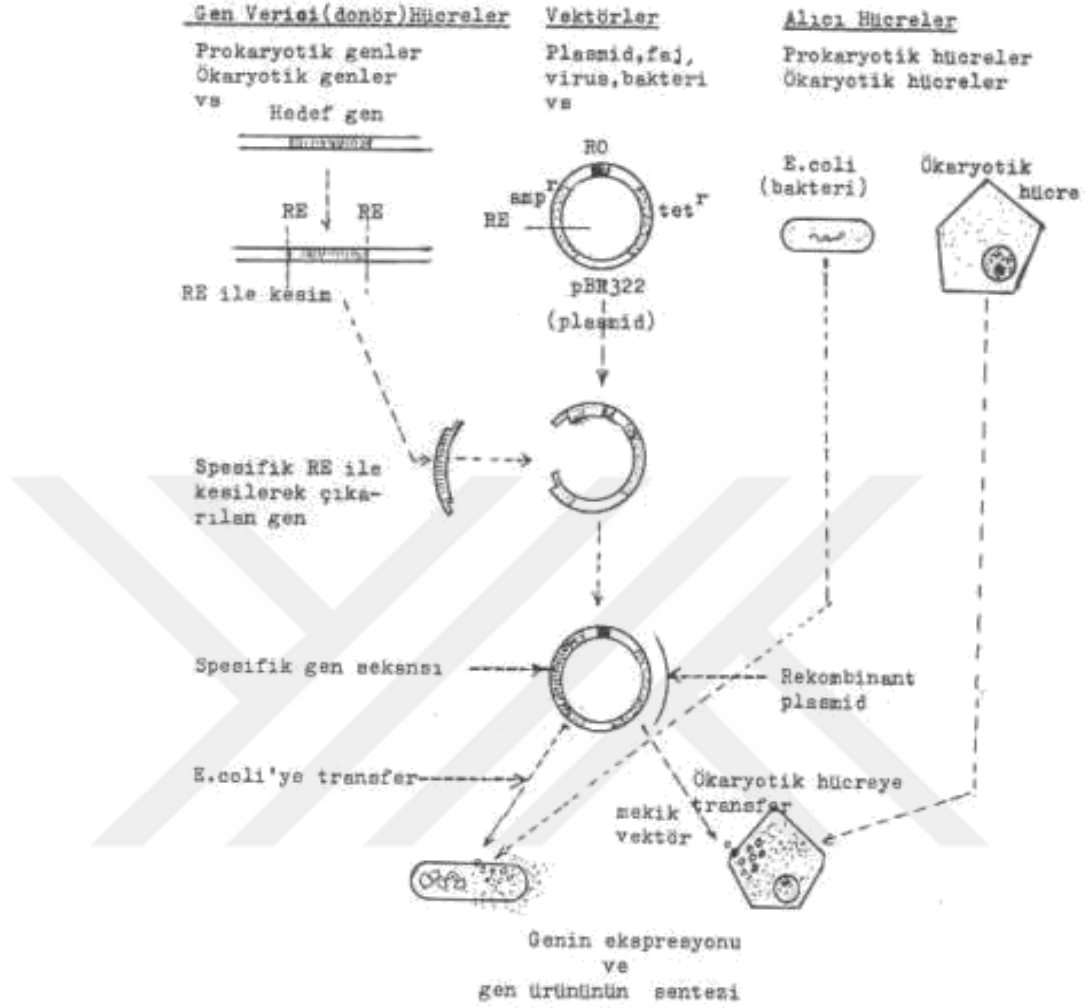
Rekombinant DNA teknolojisi, bir canlıda bulunan belirli bir genin ait olduğu genomdan özel tekniklerle izolasyonunu, taşıyıcı DNA ile birleştirilmesini, uygun bir konak organizma içerisine sokularak çoğaltılmasını ve ekspres edilmesini kapsayan, doğal olarak var olmayan genetik kombinasyonların ortaya çıkarılmasına olanak sağlayan bir teknolojidir.

1950'li yılların başlarında DNA molekül yapısının keşfi ve 1960'lı yılların sonlarında restriksiyon enzimlerinin etki mekanizmasının anlaşılması ile rekombinant DNA teknolojisinin temeli atılmıştır [106]. 1972 yılında Paul Berg insanlarda kanser riski ile bağlantılı maymun SV40 virüsü ile bakteriyel lambda fajını birleştirerek ilk rekombinant DNA molekülünü oluşturmuştur [107]. Mevcut tekniklerin ve teknolojinin gelişmesi ile birlikte 1980'lerden itibaren büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisinin temelini gen klonlaması oluşturur ve bu teknoloji ile protein üretiminde önemli aşamalar şu şekilde sıralanır:

1. Genetik materyalden hedef proteini kodlayan genin saf bir şekilde eldesi ve çoğaltılması,
2. Uygun restriksiyon enzimleri ile kesilen genin ve taşıyıcı molekül olan vektörün birleştirilmesi ile rekombinant DNA oluşturulması,
3. Rekombinant DNA'nın uygun konak hücreye aktarılması,
4. Rekombinant DNA'yı alarak transforme olan hücrelerin seçilimi ve çoğaltılması,
5. İstenilen ürünü üretmek için genin eksprese edilmesidir (**Şekil 7**) [108].

### Gen Klonlanmasının Genel Şeması



Şekil 7: Gen klonlamasının genel şeması [108].

Rekombinant proteinlerin temel olarak yarar sağladığı alanlar; tıp alanında teşhis ve tedavi, endüstriyel alanda gıda, yem, kağıt, deri, tekstil, kozmetik, deterjan, polimer, organik sentez, farmasötik ve atık arıtım endüstrileridir [109]. Rekombinant proteinlere olan küresel talep her yıl %8.7 oranında artmaktadır. 2016-2020 öngörü raporlarına göre global rekombinant protein pazar hacminin yıllık bileşik büyüme oranının %8.1 olması beklenmektedir [110]. Rekombinant yöntemlerle üretilen proteinlerin başında gelen enzimlerin ise 2016 yılında endüstriyel pazarı 4.61 milyar dolar olarak açıklanmıştır ve 2017-2022 öngörü raporlarına göre %5.8'lik yıllık bileşik büyüme oranı ile 6.3 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir [111].

### 2.3.2 Rekombinant DNA teknolojisi ile enzim üretimi

Rekombinant yöntemler ile enzim üretimi, biyoteknolojinin ilgi duyduğu ve yoğun şekilde üzerinde çalıştığı alanlardan biridir. Enzim aracılı proseslerin işlem süresini kısaltması, düşük enerji girdisi ihtiyacı, toksik olmaması, ekonomik ve çevre dostu olması gibi avantajlı özellikleri çeşitli sektörlerde kullanımını yaygınlaştırmış ve ihtiyaç duyulan enzim miktarını artırmıştır [109]. Rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği tekniklerinin gelişmesi ile birlikte enzim endüstrisinde de büyük yenilikler yaşanmıştır.

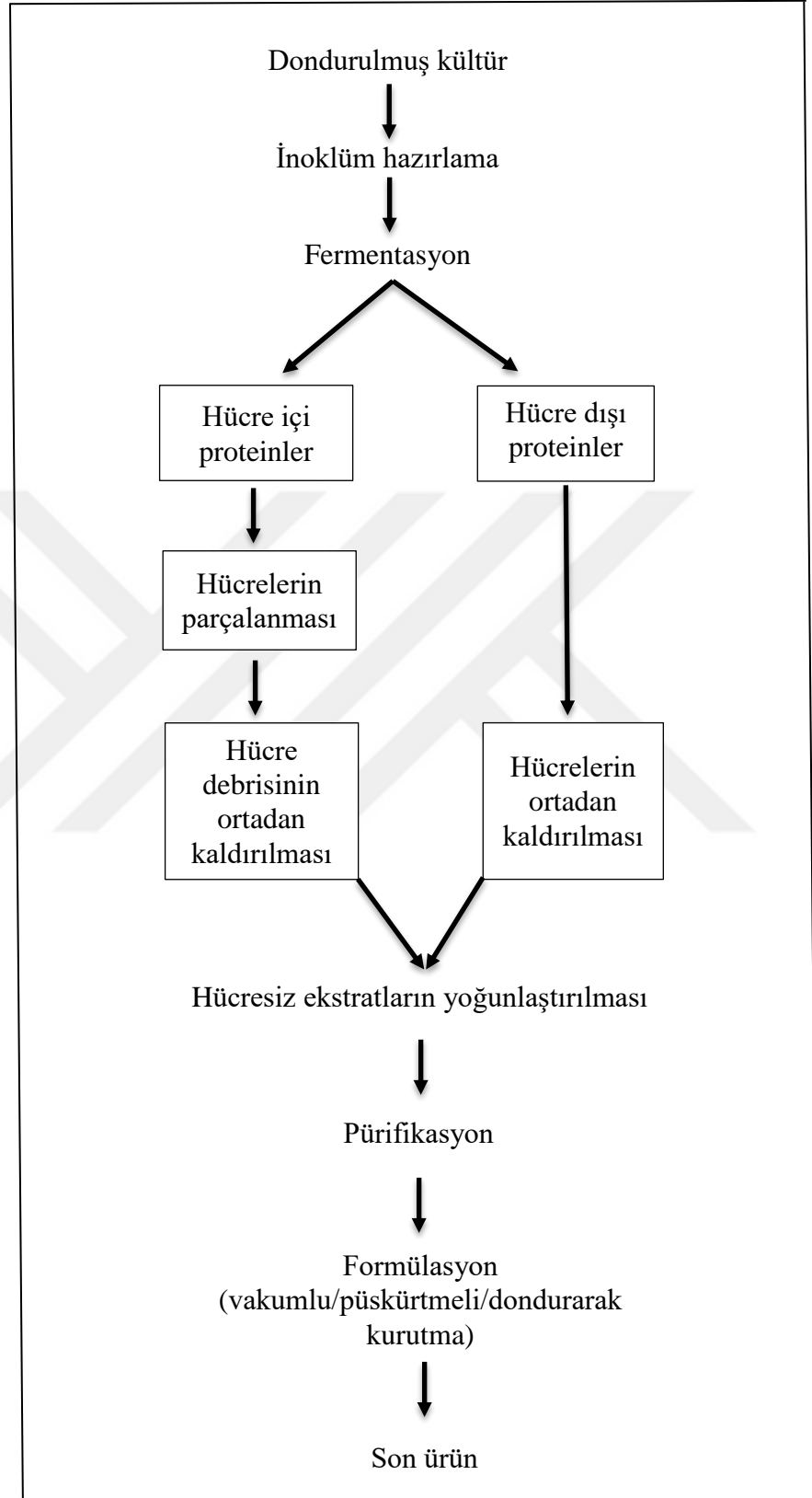
Enzim endüstrisi, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin öneminin artmasıyla 1980'lerden itibaren gelişmeye başlamıştır. Bunun öncesinde kullanılan enzimlerin çoğu bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmekteydi. Bu organizmaların doku miktarı kısıtlı olduğundan, çevresel koşullara bağlı olarak elde edilen ürünün miktarı ve kalitesi standart olmadığından ihtiyaçlar tam olarak karşılanamamakta ve ürünler tüketiciye yüksek fiyattan sunulmaktaydı. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi; bitki, hayvan ve insan orijinli enzimlerin mikroorganizmalarda üretilmesine olanak sağlayarak enzim endüstrisine büyük bir katkıda bulunmuştur. Tüketilen enzimlere artan talep, maliyeti azaltma ihtiyacı, doğal kaynakların yetersiz kalması ve çevre güvenliği gibi faktörler sektörü mikrobiyal enzim kullanımına yönlendirmiştir. Bunun dışında mikroorganizmaların üreme ve büyüme sürelerinin kısa olması, ekonomik ve kolay yollarla elde edilebilmesi, istenen özellikte ve miktarda enzim üretmek için gereken genetik manipülasyonlarının kolay olması küresel olarak bu organizmaların önemini artırmıştır [109, 112, 113].

Enzim üretim süreci; kullanılacak işleme uygun enzimin seçimi, ideal üretim suşunun seçimi, aşırı üretim yapmak için seçilen suşun genetik mühendisliği teknikleri ile yapılandırılması, kültür besiyeri ile üretim koşullarının optimizasyonu, pürifikasyon optimizasyonu ve stabil enzim ürününün formülasyonu olarak altı temel basamaktan oluşmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin üretimi kontrollü fermentasyonla gerçekleştirilmektedir. Fermentasyon basamağının optimizasyonu; besiyeri içeriği, kültür tipi ve uygun sıcaklık, pH, nem gibi proses koşullarını kapsamaktadır. Fermentasyon sırasında enzimler hücre içi ve hücre dışı olarak salınabilmektedir. Hücre içi enzimlerin eldesinde hedef enzimin hücreden çıkarılması, diğer hücre içi proteinlerden ve bileşenlerden ayrılması gerekmektedir. Hücre dışı enzimlerde ise enzim hücre dışına salgılandıktan sonra ortamdaki hücreler vakum filtrasyonu,



separatör veya mikrofiltrasyon ile uzaklaştırılarak ultrafiltrasyon yapılmaktadır. Saf enzim eldesi için genellikle kromatografik yöntemler tercih edilmektedir. Son ürün, gerekli koruyucularla birlikte bulunan sıvı veya tanelendirilmiş kuru form şeklinde bulunmaktadır (**Şekil 8**) [114].





Şekil 8: Endüstriyel ölçekte biyolojik yöntemlerle enzim üretim şeması [114].

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar **Tablo 1**'de yer almaktadır.

**Tablo 1:** Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Otomatik pipetler	CAPP, Eppendorf	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Distile su cihazı	Sartorius Stedim	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Ultra saf su cihazı	Sartorius Stedim	Ultra saf su gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve	Laboratuvar malzemelerinin ve besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Analitik terazi	Precisa	Kimyasal maddelerin miktarını ölçmede kullanılmıştır.
Santrifüj	Hettich, Nüve	Yüksek hızda (maksimum: 14000 rpm) ayırıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır (Hettich). Düşük hızda ve büyük hacimde ayırıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır (Nüve).
Vorteks	Stuart	Küçük hacimdeki sıvı karışımlarını homojen hale getirmede kullanılmıştır.
Isıtıcı blok	Denville Scientific	Örneklerin ve belirli çözeltilerin ısıtılmasında kullanılmıştır.
Buz makinesi	Scotsman	Soğuk koşullar isteyen çalışmalarda buz eldesinde kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4°C)	Beko	Örnekler, belirli kit çözeltileri, tampon ve stok çözeltilerin saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Haier	Örneklerin uzun süreli saklanması için kullanılmıştır.
pH metre	Hanna Instruments	Tampon çözeltilerin pH ayarlamasında kullanılmıştır.
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	Stuart	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

**Tablo 1 (devam):** Kullanılan cihazların listesi.

Orbital çalkalayıcı	Benchmark	SDS-PAGE jelinin boyanmasında, yıkanmasında, Western blot membranının yıkamalarında ve kimyasal substratla muamelesinde kullanılmıştır.
İnkübatörlü çalkalayıcı	Benchmark	Mikroorganizmaların uygun sıcaklıklarda kültüre alınıp çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Etüv	Nüve	Katı besiyerine ekilen bakterilerin uygun sıcaklıkta kültüre alınıp çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Isıl döngüleyici (PCR cihazı)	Bio-Rad, Sacem	Belirlenen sıcaklıklarda ve zaman aralıklarında klonlanacak gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Çeker ocak	Vortice	Agaroz jel hazırlama aşamalarında kullanılmıştır.
Yatay jel elektroforez sistemi	Major Science	Agaroz jele yüklenen PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır.
Dikey jel elektroforez sistemi	Major Science	Poliakrilamid jele yüklenen proteinlerin yürütülmesinde kullanılmıştır.
Jel görüntüleme sistemi	Fusion Fx7	Agaroz ve poliakrilamid jelde yürütülen, nitroselüloz membrana transfer edilen örneklerin görüntülenmesinde kullanılmıştır.
UV-vis spektrofotometre	Thermo Scientific, Biochrom	DNA miktarı ve kalitesi ölçümlerinde, enzim aktivite testlerinde absorpsiyonun belirlenmesinde kullanılmıştır (Thermo Scientific). Bakteri hücrelerinin optik yoğunluğunu ölçmede kullanılmıştır (Biochrom).
Sonikatör	Qsonica	Ekspresyon hücrelerinin lizisinde kullanılmıştır.
Western blot transfer sistemi	Bio-Rad	Poliakrilamid jelde bulunan proteinlerin nitroselüloz membrana transfer edilmesinde kullanılmıştır.
Vakum manifoldu	Welch	Pürifikasyon işlemlerinde atık sıvıların kolonlardan uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.
Nanodrop	Maestro	Protein miktar tayininde kullanılmıştır.

### 3.1.2 Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar **Tablo 2**'de yer almaktadır.

**Tablo 2:** Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
LB broth ve agar	Sigma-Aldrich	Mikroorganizmaların büyütülmesinde kullanılmıştır.
Ampisilin	Sigma-Aldrich	Antibiyotiğe dirençli plazmidleri içeren hücrelerin seçiminde kullanılmıştır.
Agaroz	Invitrogen	PCR ürünlerinin yükleneceği jelin yapımında kullanılmıştır.
EDTA	Thermo Fisher Scientific	Agaroz jel hazırlamada kullanılmıştır.
Etidyum bromür	EMD Millipore	PCR ürünü olan DNA moleküllerinin floresan olarak işaretlenmesinde kullanılmıştır.

**Tablo 2 (devam):** Kullanılan kimyasalların listesi.

DNA jel yükleme boyası	New England Biolabs	DNA moleküllerinin jeldeki kuyucukların tabanına inmesinde ve boyanmasında kullanılmıştır.
X-gal	Thermo Fisher Scientific	Rekombinant plazmidler içeren hücrelerin seçiminde kullanılmıştır.
Absolüt Etanol	EMD Millipore	Bazı ticari kitlerin üzerine prosedürlerinde belirtilen miktarlarda eklenerek kullanılmıştır.
Metanol	EMD Millipore	Belirli çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
İzopropanol	EMD Millipore	Agaroz jel ekstraksiyonu ve PCR pürifikasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich	Agaroz jel ekstraksiyonu ve PCR pürifikasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Akrilamid; N, N'-metilen bisakrilamid	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE analizinde yığıma ve ayırma jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Tris bazı	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE jellerinin, Western blot ve enzim aktivite testlerinin yapıldığı tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
SDS	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE analizinde jellerin hazırlanmasında ve proteinleri denatüre etmede kullanılmıştır.
APS	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
TEMED	Sigma-Aldrich	SDS-PAGE jellerinin polimerizasyonunu başlatmada kullanılmıştır.
DPBS	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE analizinde örneklerin yüklemeye hazır hale getirilmesinde kullanılmıştır.
Coomassie blue boyası R250	Thermo Fisher Scientific	SDS-PAGE jellerinin boyanmasında kullanılmıştır.
Asetik asit (glasiyal)	EMD Millipore	SDS-PAGE boya uzaklaştırıcı tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Glisin	Thermo Fisher Scientific	Belirli tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
IPTG	Thermo Fisher Scientific	Gen ekspresyonunu indüklemeye kullanılmıştır.
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich	Enzim aktivite testlerinde kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Sodyum format	Santa Cruz	FDH enziminin substratı olarak kullanılmıştır.
$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotit hidrat	Sigma-Aldrich	FDH enziminin koenzimi olarak kullanılmıştır.
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich	Sonikasyona hazırlık aşamasında ve belirli tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
BSA	Sigma-Aldrich	Western blot analizinde antikorların nonspesifik bağlanmalarını engelleyici bloker olarak kullanılmıştır.
Süt tozu	Santa Cruz	Western blot analizinde engelleyici ajan olarak kullanılmıştır.
Tween 20	Thermo Fisher Scientific	Western blot analizinde antikorun nonspesifik bağlanmasını engellemede kullanılmıştır.

### 3.1.3 Ticari kitler

Tez çalışmasında kullanılan ticari kitler **Tablo 3**'te yer almaktadır.

**Tablo 3:** Kullanılan ticari kitlerin listesi.

Kit Adı	Marka	Kullanım Amacı
PureLink Genomic DNA Kits	Invitrogen (#K1820-02)	<i>C. bovidinii</i> mayasının genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır.
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (#F-548S)	Hedef gen bölgesinin PCR yöntemiyle yüksek doğrulukla çoğaltılmasında kullanılmıştır.
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (#K0701)	PCR ürününün pürifikasyonunda kullanılmıştır.
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (#K0691)	Agaroz jelde yürümüş PCR ürününün izolasyonunda ve pürifikasyonunda kullanılmıştır.
InsTAclone PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (#K1214)	PCR ürününün TA klonlamasında kullanılmıştır.
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (#K0502)	Küçük hacimli örneklerde hücrede bulunan plazmidlerin izolasyonunda kullanılmıştır.
Genejet Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific (#K0481)	Nispeten büyük hacimli örneklerde hücrede bulunan plazmidlerin izolasyonunda kullanılmıştır.
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific (#K1422)	PCR ürünü ile vektörün birbirine bağlanmasında kullanılmıştır.
TransformAid Bacterial Transformation Kit	Thermo Fisher Scientific (#K2710)	Klonlama ve ekspresyon bakteri hücrelerini kompetan hale getirmede ve rekombinant DNA moleküllerinin bu hücreleri transforme etmesinde kullanılmıştır.
Laemmli Örnek Tampon Çözelti Kiti	Bio-Rad (#1610747)	Örneklerin SDS-PAGE analizine hazır hale getirilmesinde kullanılmıştır.
Ni-NTA Fast Start Kit	Qiagen (#30600)	Liziz edilen ekspresyon hücrelerindeki His-etiketli hedef proteinin pürifikasyonunda kullanılmıştır.

### 3.1.4 Enzimler

Tez çalışmasında kullanılan enzimler **Tablo 4**'te yer almaktadır.

**Tablo 4:** Kullanılan enzimlerin listesi.

Enzim Adı	Marka	Kullanım Amacı
RNAaz A	Invitrogen	<i>C. boidinii</i> 'nin genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır.
Proteinaz K	Thermo Fisher Scientific	<i>C. boidinii</i> 'nin genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır.
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Thermo Fisher Scientific	PCR ürünlerinin 3' ucuna dATP eklenmesinde kullanılmıştır.
NdeI, BamHI, ScaI, NcoI	Thermo Fisher Scientific	PCR ürünleri ve vektörlerin restriksiyon kesiminde kullanılmıştır.
Alkalın fosfataz	Thermo Fisher Scientific	Restriksiyon enzimleri ile kesilen vektörün defosforilasyonunda kullanılmıştır.
T4 DNA ligaz	Thermo Fisher Scientific	Restriksiyon enzimleri ile kesilen parçaların birleştirilmesinde kullanılmıştır.
Lizozim	Vivantis Technologies	Bakteri hücrelerinin duvarını parçalamada kullanılmıştır.

### 3.1.5 Mikroorganizmalar

- *Candida boidinii* ATCC 18810 FDH enzimini üreten gen kaynağı,
- *Escherichia coli* One Shot® Mach1™-T1R kompetan hücreleri (Thermo Fisher Scientific) klonlama konakçısı,
- *Escherichia coli* One Shot® BL21 (DE3) hücreleri (Thermo Fisher Scientific) protein ekspresyonu konakçısı olarak kullanılmıştır.

### 3.1.6 Primerler

Primerler, hedef FDH gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılmıştır. 5' uçlarına NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri tarafından tanınacak restriksiyon bölgelerinin yerleştirilmesiyle Primer3 programında tasarlanan primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) firması tarafından sentezlenmiştir (**Tablo 5**).

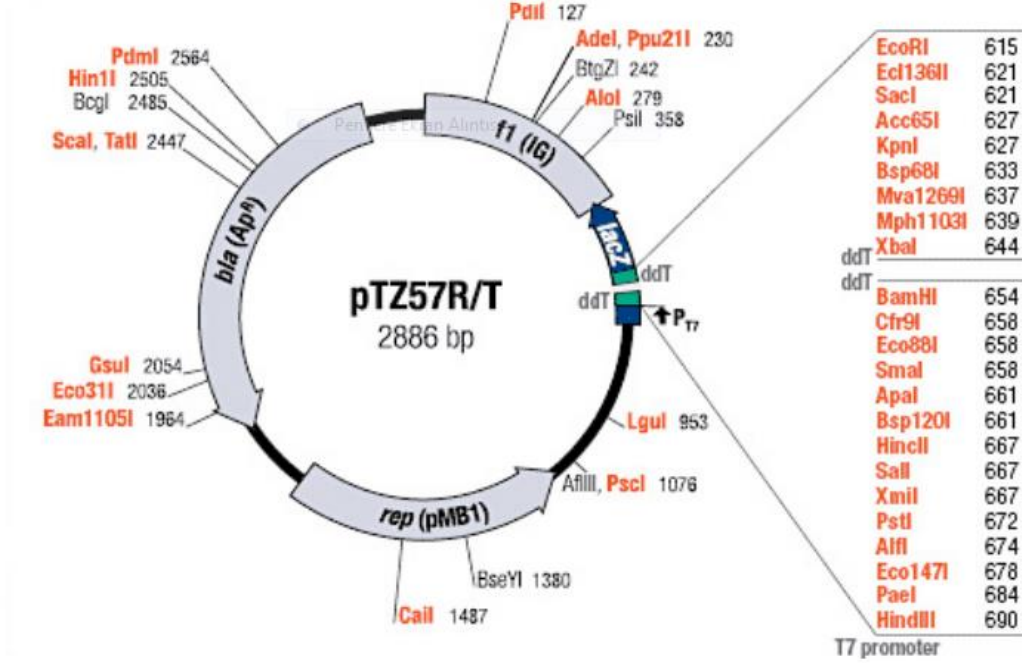
**Tablo 5:** FDH geni için tasarlanan primerler.

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz sayısı	T <sub>m</sub> (°C)
FDH- forward (Primer F)	TCATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATG	29	56.08
FDH-reverse (Primer R)	TAAGCTTATTTCTTATCGTGTTTACC	26	55.92

### 3.1.7 Vektör sistemleri

*C. bovidinii*'den elde edilen FDH geninin *E. coli* hücrelerine aktarılmasında taşıyıcı DNA molekülleri olarak pTZR57R/T (Thermo Fisher Scientific) ve pET-14b vektörleri (Novagen) kullanılmıştır (Şekil 9, Şekil 10; Tablo 6, Tablo 7).

- pTZR57R/T vektörü



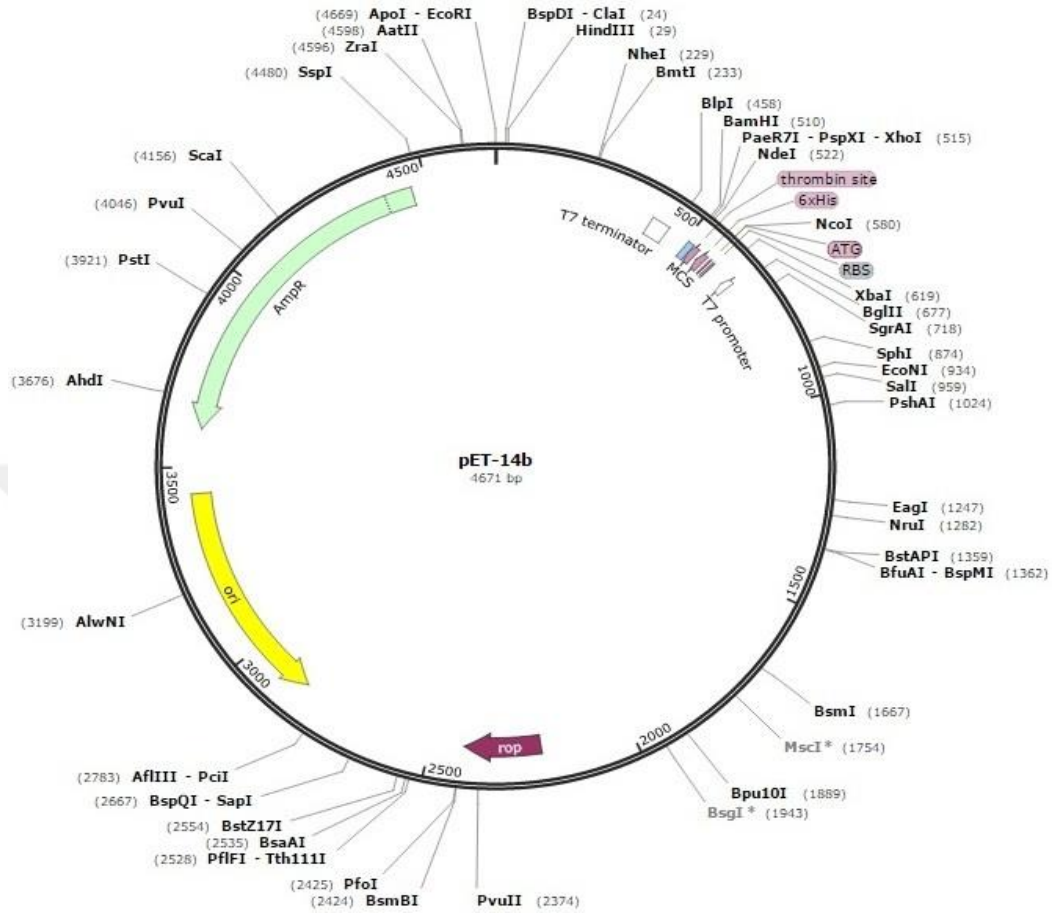
Şekil 9: pTZR57R/T vektör haritası.

Tablo 6: pTZR57R/T vektör sisteminin özellikleri.

Özellik	Baz Pozisyonu	Fonksiyon
T7 promotör	697 – 716	Vektör içerisine klonlanan DNA molekülünün transkripsiyonunu başlatan T7 RNA polimerazın bağlandığı bölgedir.
lacZ α-peptit	449 – 739	Rekombinant klonların mavi/beyaz seçiminde kullanılan β-galaktosidaz enzimini kodlayan gen bölgesidir.
f1 orijin	2 – 457	Tek zincirli DNA sentezini sağlar.
Klonlama bölgesi	650 – 651	Adenin kuyruklu PCR ürünleri ile birleşme için gereken 3'-ddT bölgesidir.
Çoklu klonlama bölgesi (MCS)	615 – 695	Klonlamada kullanılacak restriksiyon enzimleri için tanıma bölgelerini içeren kısımdır.
bla (Ap <sup>R</sup> )	1896 – 2756	Ampisilin, karbenisilin gibi antibiyotiklere karşı direnç sağlayan β-laktamaz enzimini kodlayan gen bölgesidir.
rep (pMB1)	1122 – 1736	Replikasyonu başlatan bölgedir.



- pET-14b vektörü



Şekil 10: pET-14b vektör haritası.

Tablo 7: pET-14b vektör sisteminin özellikleri.

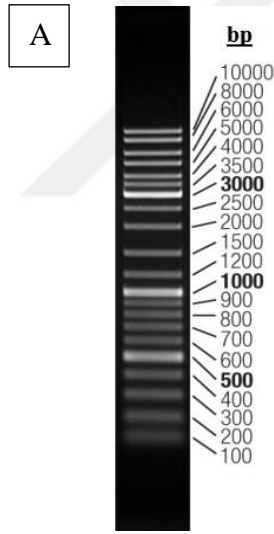
Özellik	Baz Pozisyonu	Fonksiyon
T7 promotör	644 – 662	Vektör içerisine klonlanan DNA molekülünün transkripsiyonunu başlatan T7 RNA polimerazın bağlandığı bölgedir.
Ribozom bağlanma bölgesi (RBS)	591 – 595	PCR ürünlerinin translasyonunu sağlar.
His-tag kodlama dizisi (6xHis)	554 – 571	Hedef proteinin histidin rezidüleri ile birlikte ekspres edilmesini sağlayarak pürifikasyonunu kolaylaştırır.
Trombin bölgesi	527 – 544	Füzyon proteinlerinde bölgeye özgü ayrılma sağlamak için trombinin tanıyacağı ve bağlanacağı bir alan oluşturur.
Çoklu klonlama bölgesi (MCS)	510 – 526	Klonlamada kullanılacak restriksiyon enzimleri için tanıma bölgelerini içeren kısımdır.
T7 terminatör	404 – 451	Transkripsiyonu sona erdiren dizidir.

**Tablo 7 (devam):** pET-14b vektör sisteminin özellikleri.

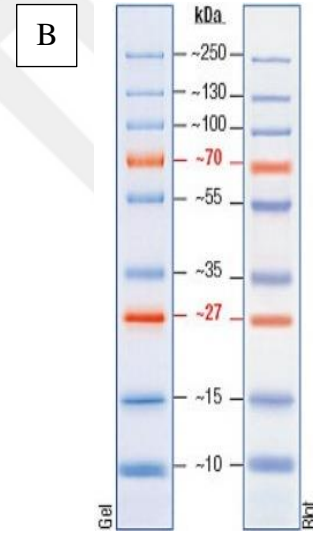
rop	2223 – 2414	Bakteriyel plazmidlerin düşük kopya sayısında kalmasını sağlayan proteini kodlar.
pBR322 orijin (ori)	2845 – 3432	Replikasyonu başlatan bölgedir.
Ampisilin direnç (AmpR) gen bölgesi ( <i>bla</i> kodlayan bölge)	3603 – 4463	Ampisilin, karbenisilin gibi antibiyotiklere karşı direnç sağlar.

### 3.1.8 DNA ve protein markörleri

Tez çalışmasında DNA markörü olarak “Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1173)”, protein markörü olarak “Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811)” kullanılmıştır (Şekil 11. A, Şekil 11. B).



**Şekil 11. A:** Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1173)



**Şekil 11. B:** Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (#SM1811)

### 3.1.9 Tampon ve çözeltiler

#### 3.1.9.1 Büyütme besiyeri çözeltileri

- **LB broth besiyeri**

Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilen besiyerinin içeriğinde 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı bulunmaktadır. 1 L LB broth besiyeri hazırlanırken 1 L

distile su üzerine 20 g LB broth tozu eklenmiştir. 120°C'de 20 dakika otoklav ile sterilize edildikten sonra stok çözelti daha sonraki kullanımlar için buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

Ampisilinli LB broth besiyeri hazırlanırken 1 L soğumuş LB broth üzerine ampisilin stok çözeltisinden 1 ml eklenmiş ve daha sonraki kullanımlar için buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

- **LB agar besiyeri**

Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilen besiyerinin içeriğinde 15 g/L agar, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı bulunmaktadır. 200 ml LB agar besiyeri hazırlanırken 200 ml distile su üzerine 6.4 g LB agar tozu eklenmiştir. 121°C'de 20 dakika otoklav ile sterilize edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır. Sıcaklık yaklaşık 50°C'ye ulaştığında eşit hacimlerde steril petri kaplarına dökülerek katı forma geçmesi beklenmiştir.

Ampisilinli LB agar besiyeri hazırlanırken sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye düşmüş 200 ml LB agar üzerine 200 µl ampisilin ilave edilerek eşit hacimlerde steril petri kaplarına dökülmüştür. Donarak katı forma geçtiğinde daha sonraki kullanımlar için buzdolabına (+4 °C) kaldırılmıştır.

- **Ampisilin stok çözeltisi**

100 mg/ml stok çözeltisi olarak distile su ile hazırlanmıştır. Filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra küçük hacimlere ayrılarak derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

### **3.1.9.2 Agaroz jel elektroforezi çözeltileri**

- **10X Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu**

48.4 g Tris bazi, 3.7 g EDTA, 11.4 ml glasiyal asetik asit 1 L distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

- **%1 agaroz jel çözeltisi**

1 g agaroz, 100 ml TAE tamponunda çözdürülüp üzerine 1 µl etidyum bromür eklenerek hazırlanmıştır.

### 3.1.9.3 SDS-PAGE Çözeltileri

- **%40 poliakrilamid çözeltisi**

39 g akrilamid ve 1 g N,N'-metilbisakrilamid 100 ml distile su içerisinde çözdürülüp filtreden geçilerek hazırlanmıştır.

- **1 M, 1 L Tris pH 6.8 tampon çözeltisi**

181.65 g Tris bazı 800 ml distile suda çözdürüldükten sonra konsantre HCl ile pH değeri 6.8'e düşürülmüştür. Toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **1 M, 1 L Tris pH 8.8 tampon çözeltisi**

181.65 g Tris bazı 800 ml distile suda çözdürüldükten sonra konsantre HCl ile pH değeri 8.8'e düşürülmüştür. Toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

- **%10 SDS çözeltisi**

10 g SDS tozunun 100 ml distile suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

- **%10 APS çözeltisi**

0.5 g APS tozunun 5 ml distile suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

- **10X, 1 L SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi**

30 g Tris bazı, 144 g glisin, 10 g SDS'in 1 L distile suda çözdürülmesi ve pH'nın 8.3'e ayarlanması ile hazırlanmıştır. Elektroforezde 1X'e seyreltilerek kullanılmış ve daha sonraki kullanımlar için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Coomassie blue boyama çözeltisi, 500 ml**

0.5 g Coomassie R250, 50 ml asetik asit, 200 ml metanol ve 250 ml distile su ile toplam hacim 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- **Boya giderici (destaining) çözelti, 1 L**

100 ml metanol ile 100 ml glasiyal asetik asitin 800 ml distile suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır. Stok çözelti daha sonraki kullanımlar için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### 3.1.9.4 Western blot çözeltileri

- **10X, 2 L transfer tampon çözeltisi**

288 g glisin ve 60.4 g Tris bazının 2 L ultra saf su içerisinde tamamen çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

- **BSA stok çözeltisi**

100 mg/ml stok çözeltisi olarak distile su ile hazırlanmıştır. Küçük hacimlere paylaştırılarak derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır.

- **10X, 1 L TBST tampon çözeltisi**

24 g Tris bazı ve 88 g sodyum klorür 900 ml distile suda çözdürülerek ilk aşamada 10X TBS çözeltisi hazırlanmıştır. Konsantre HCl ilavesi ile pH 7.6'ya ayarlanmış, toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Sonrasında, hazırlanan TBS çözeltisinden 100 ml alınarak 1 ml %0.1 Tween 20 ile birlikte 900 ml distile suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

- **%10 süt tozu**

1 g süt tozunun 10 ml TBST içerisinde çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

### 3.1.9.5 Enzim Aktivite Testi Çözeltileri

- **100 mM, 500 ml Tris tampon çözeltisi**

5.45 g Tris bazı 450 ml distile suda çözdürülmüştür. Konsantre HCl ilavesi ile stok çözeltinin pH'ı 9.0'a ayarlanmış ve distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Stok çözelti daha sonraki kullanımlar için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **200 mM, 500 ml potasyum fosfat tampon çözeltisi**

3.6 g potasyum fosfat monobazık 400 ml distile suda çözdürülmüştür. Küçük hacimde 10 M NaOH ilavesi ile stok çözeltinin pH'ı 6.5'e ayarlanmış ve distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Stok çözelti daha sonraki kullanımlar için oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **0.05 M, 10 ml NAD tampon çözeltisi**

0.33 g NAD 10 ml distile suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

- **1 M, 1 ml sodyum format tampon çözeltisi**

0.066 g sodyum format tozu 1 ml distile suda çözdürülerek hazırlanmıştır.



## 3.2 Yöntem

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Komitesi'nden alınan 54022451-050.05.04-sayılı etik kurul onayı ile deneysel çalışmalara başlanmıştır.

### 3.2.1 *C. boidinii* ATCC 18810 mikroorganizmasının büyütülmesi

Liyofilize halde satın alınan *C. boidinii* ATCC 18810 maya suşunun bulunduğu tüpe 1 ml distile su eklenip ıslatıldıktan sonra içerisinde 5 ml distile su bulunan başka bir steril falkona aktarılmıştır. Yaklaşık 1 saatlik inkübasyon ile rehidre edilen stok hücrelerden 10 µl alınarak 10 ml LB broth içeren, aerobik solunuma olanak sağlayan bir tüpe steril koşullarda inoküle edilmiş, inkübatörlü çalkalayıcıda 26°C, 160 rpm koşullarında 72 saat inkübe edilmiştir. Taze kültürü yapılan hücrelerden 1 ml alınarak ve üzerine 1:1 oranında %50 gliserol eklenerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

### 3.2.2 Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA “PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, #K1820-02)” kullanılarak izole edilmiştir.

Kit protokolüne göre izolasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Kültür ortamından alınan hücreler, oda sıcaklığında 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant kısım atılmıştır.
- Geride kalan pelet üzerine 180 µl “PureLink Genomic Digestion Buffer” ve 20 µl proteinaz K eklenip vortekslelendikten sonra 55°C'deki ısı bloğunda yaklaşık 1.5 saat inkübe edilmiştir.
- Isı bloğundan alınan karışımın üzerine 20 µl RNAaz A ilave edilip, vortekslenip, oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- Karışımın üzerine 200 µl “PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer” ve 200 µl absöüt etanol ilavesinden sonra homojen bir karışım oluşturmak için vortekslenmiştir.
- “PureLink Spin Column” kolonuna transfer edilen karışım, oda sıcaklığında 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlelendikten sonra toplama tüpünde biriken süzöntü atılmıştır.

- Kolonun üzerine 500 µl “Wash Buffer 1” eklenip oda sıcaklığında 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolonun üzerine 500 µl “Wash Buffer 2” eklenip oda sıcaklığında 14000 rpm’de 5 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolon, 1.5 ml’lik steril bir eppendorf tüpe alındıktan sonra üzerine 50 µl “PureLink Genomic Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. 14000 rpm’de 1 dk santrifüjden sonra kolon ortadan kaldırılmıştır.
- Eppendorf tüpte bulunan örnekteki DNA miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.
- Örnek, daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

### 3.2.3 Primer tasarımı

*C. boidinii* mayasında FDH enzimini kodlayan gen bölgesinin çoğaltılması için Primer3 programı ile uygun primerler dizayn edilmiştir. Primer tasarlarken, primerlerin 5’ ucuna restriksiyon enzimleri olarak kullanılacak NdeI ve BamHI endonükleazlarına uygun tanıma bölgeleri yerleştirilmiştir. Ticari olarak satın alınan primerler kullanım talimatına göre sulandırılmıştır. Forward ve reverse primerden küçük hacimlerde 1:1 oranında alınıp ayrı bir tüpte karıştırılmış ve PCR reaksiyonlarında bu şekilde kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

FDH (ürün baz sayısı: 1104 bp) gen dizisi:

```

ATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATGGTGCTGGTAAACACGCTGCCGATGAAGAAAAATTATACGG
TTGTACTGAAAACAAATTAGGTATTGCCAATTGGTTGAAAGATCAAGGACATGAAC TAATCACCA
CGTCTGATAAAGAAGGCGGAAACAGTGTGTTGGATCAACATATACCAGATGCCGATATTATCATT
ACAACCTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAAGGAAAGAATCGACAAGGCTAAAAAATTGAAATT
AGTTGTTGTCGCTGGTGTCGGTTCTGATCATATTGATTTGGATTATATCAACCAAACAGGTAGGA
AAATCTCCGTCTTGGAAGTTACCGGTTCTAATGTTGCTCTGTTGCAGAACACGTTGTCATGACC
ATGCTTGTCTTGGTTAGAAATTTTGTTCAGCTCACGAACAAAACATTAACCACGATTGGGAGGT
TGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAACACTATCGCCACCATTGGTGCCGGTA
GAATTGGTTACAGAGTCTTGAAAAGATTAGTCCCATTCAATCCTAAAGAATTATTATACTACGAT
TATCAAGCTTTACCAAAGATGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTAGAAGGTTGAAAATATTGAAGA
ATTGGTTGCCAAGCTGATATAGTTACAGTTAATGCTCCATTACACGCTGGTACAAAAGTTTTAA
TTAACAAGGAATTATTGTCTAAATTCAGAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACTGCAAGAGGTGCC
ATTTGTGTTGCCGAAGATGTTGCTGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTATGGTGGTGA
TGTTTGGTTCCCAACCAGCTCCAAAAGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAAACAAATATGGTG
CTGGTAACGCCACGACTCCTCATTACTCTGGTACTACTTTAGATGCTCAAAC TAGATACGCTCAA
GGTACTAAAAATATCTTGGAGTCATTCTTTACTGGTAAGTTTGATTACAGACCACAAGATATCAT
CTTATTAAACGGTGAATACGTTACCAAAGCTTACGGTAAACACGATAAGAAATAAGCTTA

```



Bu dizi için Sentromer DNA Teknolojileri firmasından satın alınan primerler:

FDH-forward: TCATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATG

FDH-reverse : TAAGCTTATTTCTTATCGTGTTTACC

### 3.2.4 FDH geninin PCR ile çoğaltılması

Genomik DNA izolasyonu sonrası miktarı ve kalitesi belirlenen DNA molekülleri kalıp olarak kullanılarak hedef gen olan FDH geninin çok sayıda kopyası elde edilmiştir. Bu işlem için “Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #F-548S)” kiti kullanılarak PCR yapılmıştır. Gerekli bileşenler ince cidarlı tüplerde **Tablo 8**'de belirtilen miktarlarda iyice karıştırıldıktan sonra **Tablo 9**'da belirtilen sıcaklık ve sürelerde amplifiye edilmiştir.

**Tablo 8:** *C. bovidinii* genomik DNA kalıplı PCR karışımı bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master mix	25 µl
Primer (F+R)	2.5 µl
Genomik DNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	20.5 µl
<b>Toplam</b>	<b>50 µl</b>

**Tablo 9:** *C. bovidinii* genomik DNA kalıplı PCR döngü koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	2 dk	34 döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Final uzama	72°C	5 dk	

PCR tamamlandıktan sonra hedef gen bölgesinin doğru bir şekilde çoğalıp çoğalmadığını görmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. %1'lik agaroz jele 5 µl DNA markörü ve 3 µl DNA yükleme boyaması ile karıştırılmış 10 µl PCR ürünü yüklenerek 120 mA, 110 V'de 30 dk yürütülmüş ve sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. İstenen bant büyüklüğü görüldükten sonra jele

yüklenmeyen PCR ürünü “GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0701)” ile protokolde ufak değişiklikler yapılarak pürifiye edilmiştir.

Pürifikasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- PCR ürünü hacminin iki katı kadar “Binding Buffer”, ilaveden sonraki toplam hacim kadar da izopropanol eklenerek karıştırılmış, kit protokülünde istenildiği gibi karışımın sarı renkli olması sağlanmıştır.
- Karışım, “GeneJET Purification Column” kolonuna aktarılmış, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş, toplama tüpünde biriken süzüntü atılmamış ve toplamda üç kere kolondan geçirilerek son santrifüjde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolonun üzerine 700 µl “Wash Buffer” eklenmiş, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş, toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır. Yıkama basamağı iki defa tekrarlanmıştır. Kolonda “Wash Buffer” kalmış olması ihtimaline karşı 14000 rpm’de 5 dk boş santrifüj yapılmış ve toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolonun üzerine 70°C’de ısıtılmış 50 µl “Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- 14000 rpm’de 2 dk santrifüj sonucu süzüntüde bulunan PCR ürünlerinin miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.
- Örnek, daha sonraki kullanımlar için derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

### 3.2.5 TA klonlama

PCR ile çoğaltılan *C. bovidinii* FDH geninin klonlanması ilk etapta TA klonlama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Vektör sistemi olarak “InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, #K1214)” içeriğinde bulunan pTZR57R/T vektörü kullanılmıştır. 3’-ddT çıkıntıları olacak şekilde modifiye edilmiş olan bu vektöre klonlama bölgesinden bağlanacak PCR ürünlerinin komplementer olması için uçlarına 3’-A eklentileri **Tablo 10**’da belirtilen maddelerle 72°C’de 20 dk inkübe edilerek yapılmıştır.

**Tablo 10:** PCR ürünlerinin ucuna 3'-A kuyruk eklemeye kullanılan bileşenler.

Bileşen	Miktar
PCR ürünü	40 µl
dATP	0.2 µl
PCR tampon çözeltisi	10 µl
Mg <sup>2+</sup>	3 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	2 µl
dH <sub>2</sub> O	44.8 µl
<b>Toplam</b>	<b>100 µl</b>

Sonrasında 3'-A kuyruklu PCR ürünleri ile pTZR57R/T vektörünün birbirine bağlanması için vektör:PCR ürünü oranı 1:1 olacak şekilde ligasyon yapılmıştır. Ligasyon karışımları pozitif (+) ve negatif (-) kontrol olarak **Tablo 11**'de belirtilen şekilde hazırlanmış, oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildikten sonra transformasyon basamağına geçilmiştir.

**Tablo 11:** 3'-A kuyruklu PCR ürünleri ve pTZR57R/T vektörünün ligasyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşen	(+) Kontrol Miktarı	(-) Kontrol Miktarı
3'-A kuyruklu PCR ürünü	5 µl	-
pTZR57R/T vektörü	2 µl	2 µl
Ligasyon tamponu	4 µl	4 µl
T4 DNA ligaz	0.6 µl	0.6 µl
dH <sub>2</sub> O	8.4 µl	13.4 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

### 3.2.6 *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinin transformasyonu

3'-A kuyruklu PCR ürünleri ile birleşerek rekombinant olan pTZR57R/T vektörü (pTZR57R/T+FDH), *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine aktarılmadan önce bu hücreler "TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)" ile kompetan hale getirilmiştir.

Kit protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Transformasyondan bir gün önce 1.5 ml LB broth besiyerine 5 µl *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri steril koşullarda inoküle edilerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

- Ertesi gün taze kültürden 150 µl alınarak 1.5 ml “C-medium”un olduğu başka bir tüpe inoküle edilmiştir. İnkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm’de yaklaşık 3 saat inkübe edilerek belirgin bir bulanıklığa ulaşması beklenmiştir.
- Transformasyon işlemine başlamadan hemen önce, hazırlanan ampisilinli LB agar 37°C’deki etüvde, “T-solution (A)” ve “T-solution (B)” 250 µl’lik eşit hacimlerde karıştırılarak buz üstünde inkübasyona bırakılmıştır.
- Kültürü tamamlanan hücreler 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.
- Geride kalan peletin üzerine 300 µl T solüsyonu karışımı eklenip buz üzerinde 5 dk bekletildikten sonra tekrar 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.
- Geride kalan peletin üzerine 120 µl T solüsyonu karışımı eklenip buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir.
- Buz üzerinde 2 dk bekletilmiş ligasyon karışımından 5 µl, T solüsyonları ile muamele edilmiş hücrelerden 50 µl alınıp ayrı bir tüpte karıştırılarak buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir.
- Son aşamada, ısınmış ve üzerine 50 µl X-gal yayılmış ampisilinli LB agar üzerine steril koşullarda bakteri ekimi yapılarak petri kapları 37°C’deki etüvde 16 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.7 Transformasyon analizi

Rekombinant vektörleri hücre içerisine alan bakterilerin seçilimi mavi-beyaz koloni ayrımı tekniğiyle yapılmıştır. Bu teknikte, rekombinant vektörleri alarak transforme olan hücreler beyaz renkli koloniler olarak gözükürken transforme olmayan hücreler mavi renkli gözükmektedir.

İnkübasyon sonrasında (+) kontrol grubunda görülen mavi-beyaz kolonilerden on üç tane beyaz koloni seçilerek steril koşullarda ampisilinli LB broth besiyerine inoküle edilmiştir. İnkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm’de yaklaşık 6 saat inkübe edilen kolonilerin rekombinant vektörleri gerçekten alıp almadığını görmek için **Tablo 12**’de belirtilen bileşenlerle koloni PCR yapılmıştır.

**Tablo 12:** pTZR57R/T+FDH plazmidlerini alan hücrelerin tespiti için yapılan koloni PCR karışımı bileşenleri.

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Master mix	10 µl
Primer (F+ R)	2 µl
DNA	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Koloni PCR Tablo 9’da belirtilen optimize PCR döngü koşullarında gerçekleştirilmiş, ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş, jel görüntüleme sistemiyle görüntülenmiş ve hedef bandı veren koloniler seçilmiştir.

Seçilen kolonilerdeki plazmidlerin izolasyonu “Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0502)” protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Kit protokolüne göre izolasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Taze kültürü yapılan hücreler 14000 rpm’de 3 dk santrifüjlenerek süpernatant kısım atılmıştır.
- Geride kalan peletin üzerine 250 µl “Resuspension Solution” eklenip tamamen homojen bir karışım elde edilene kadar vortekslenmiştir.
- Karışımın üzerine 250 µl “Lysis Solution” eklenip viskoz ve berrak bir görüntü elde edilene kadar tüp hafifçe alt üst olarak çevrilmiştir.
- Karışımın üzerine 350 µl “Neutralization Solution” eklendikten hemen sonra tüp 5-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Bulutumsu bir forma geçen nötralize bakteri lizatı 14000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant “GeneJET spin column” kolonuna transfer edilmiştir.
- 14000 rpm’de 1 dk santrifüjden sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolonun üzerine 500 µl “Wash Solution” eklenip 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendikten sonra toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır. Yıkama işlemi iki defa tekrarlanmıştır. Geride “Wash Solution” kalmış olması ihtimaline karşı kolon 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir.

- Temiz bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınan kolonun üzerine 70°C'de ısıtılmış 50 µl "Elution Buffer" eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- 14000 rpm'de 2 dk santrifüj sonucu süzüntüde bulunan plazmidlerin miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile belirlenmiştir.

PCR ürünlerinin vektörlere düz mü ters mi girdiğini anlamak için izole edilen plazmidlerin NdeI ve ScaI restriksiyon enzimleri ile kesimi **Tablo 13**'te verilen bileşenlerle 37°C'de 10 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmidlerin bant büyüklüklerini görmek için agaroz jel elektroforezi yapılmış ve beklenen bantları vererek ürünlerin vektöre düz bir şekilde girdiği tayin edilen kolonilerle çalışmalara devam edilmiştir.

**Tablo 13:** pTZR57R/T+FDH plazmidlerinin NdeI ve ScaI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
pTZR57R/T+FDH	10 µl
FastDigest buffer	3 µl
NdeI	1.5 µl
ScaI	1.5 µl
dH <sub>2</sub> O	14 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>30 µl</b>

### 3.2.8 PCR ürününün protein ekspresyon vektörüne (pET-14b) alınması

Seçilen kolonilerdeki PCR ürünlerinin buldukları vektörden izolasyonu, NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve jelden ekstrakte edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kesim işlemi sırasında **Tablo 14**'te verilen bileşenler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.

**Tablo 14:** pTZR57R/T+FDH plazmidlerinin NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
pTZR57R/T+FDH	80 µl
FastDigest buffer	10 µl
NdeI	5 µl
BamHI	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>100 µl</b>

Kesim sonrası agaroz jele yüklenen örneğe elektroforez uygulandıktan sonra “GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0691)” ile jelden ekstrakte edilmiştir.

Kit protokolünde ufak değişiklikler yapılarak aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu iki bant gösteren jelden ~1100 bp’lik hedef bant steril bir bistüri ile kesilmiş, darası alınmış 1.5 ml’lik bir eppendorf tüpe koyularak ağırlığı tartılmıştır.
- Kesilen jel miktarı ile 1:10 (ağırlık:hacim) oranında sodyum asetat, 1:2 oranında “Binding Buffer” ve 1:1 oranında %100 izopropanol eklenmiştir.
- Jel karışımı 60°C’a ayarlanmış ısı bloğunda 10 dk inkübe edilmiştir.
- Jel tamamen eridiğinde karışım “GeneJET Purification Column” kolonuna aktarılmış, 14000 rpm’de 45 sn santrifüj edilmiş, toplama tüpünde biriken süzüntü üç defa aynı kolondan geçirilip santrifüjlendikten sonra atılmıştır.
- Kolonun üzerine 700 µl “Wash Buffer” eklenip 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş, toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır. Yıkama işlemi iki defa tekrarlanmıştır. Geride “Wash Solution” kalmış olması ihtimaline karşı kolon 14000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Temiz bir 1.5 ml’lik eppendorf tüpe alınan kolonun üzerine 70°C’de ısıtılmış 50 µl “Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- 14000 rpm’de 2 dk santrifüj sonucu süzüntüde bulunan plazmidlerin miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile belirlenmiştir.

İzole edilen PCR ürününün ekspresyon vektörü olarak kullanılacak pET-14b’ye aktarımı için vektör ampisilinli LB broth besiyerinde çoğaltılmış, “Genejet Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0481)” ile izole edilmiş ve PCR ürünleri ile uyumlu yapışkan uçlara sahip olması için NdeI ve BamHI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir.

Kit izolasyon protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- İzolasyondan bir gün önce, 10 µl pET-14b vektörü 100 ml ampisilinli LB broth besiyerine inoküle edilerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

- Ertesi gün taze kültür 4100 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.
- Geride kalan peletin üzerine 2 ml “Resuspension Solution” eklenerek homojen bir karışım elde edilene kadar pipetleme ve vorteks yapılmıştır.
- Karışımın bulunduğu falkon tüpe 2 ml “Lysis Solution” eklenip alt üst edilerek hafifçe çevrilmiş, oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilerek viskoz ve berrak bir hale geçmesi beklenmiştir.
- Sonrasında tüpe 2 ml “Neutralization Solution” ilave edilerek 7-8 defa hafifçe çevrilmiştir.
- Karışımın üzerine 0.5 ml “Endotoxin Binding Reagent” eklenerek tüp 7-8 defa hafifçe çevrilmiş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Bulutumsu bir forma geçen nötralize bakteri lizatının üzerine 3 ml %96’lık etanol koyulup 7-8 defa hafifçe çevrilmiştir.
- 4100 rpm’de 75 dk santrifüj sonrası elde edilen süpernatant temiz bir 15 ml’lik falkon tüpe alınıp üzerine 3 ml %96’lık etanol ilave edilerek iyice karıştırılmıştır.
- Kit kolonuna transfer edilen örnek 4100 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Kolona 4 ml “Wash Solution I” ilave edilip 4100 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır.
- Ardından kolona 4 ml “Wash Solution II” ilave edilip 4100 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken süzüntü atılmıştır. Geride “Wash Solution” kalmış olması ihtimaline karşı kolon 14000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Temiz bir 15 ml’lik falkon tüpe alınan kolonun üzerine 70°C’da ısıtılmış 350 µl “Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- 14000 rpm’de 2 dk santrifüjden sonra süzüntüde bulunan plazmid vektörün miktarı ve kalitesi UV-vis spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Saf olarak elde edilen pET-14b vektörü NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile **Tablo 15**’te belirtilen miktarlarda kesilmiştir.



**Tablo 15:** pET-14b vektörünün NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
pET-14b	5 µl
FastDigest buffer	5 µl
NdeI	2.5 µl
BamHI	2.5 µl
dH <sub>2</sub> O	35 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

37°C’de 10 dk inkübasyon ile gerçekleştirilen kesim işleminin ardından vektörün kendi üzerine kapanmaması için defosforilasyonu 5 µl Alkalın Fosfataz enzim ilavesi ile 37°C’de 5 dk inkübe edilerek yapılmıştır. Sonrasında, örnek “GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0701)” ile yukarıda belirtilen şekilde pürifiye edilmiştir.

Pürifikasyonu yapılan PCR ürünü ile pET-14b vektörünün birbirine bağlanması için ligasyon işlemi (+) ve (-) kontrol grubu olarak 1:1 oranında **Tablo 16**’da belirtilen ölçülerde yapılmıştır.

**Tablo 16:** pET-14b ve PCR ürünü ligasyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşen	(+) Kontrol Miktarı	(-) Kontrol Miktarı
PCR ürünü	5 µl	–
pET-14b vektörü	10 µl	10 µl
Ligasyon tamponu	4 µl	4 µl
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl
dH <sub>2</sub> O	–	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

Ligasyon karışımları hazırlandıktan sonra ilk 30 dk oda sıcaklığında, sonrasında buzdolabında (+4°C) gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra ligasyon karışımları ile *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri, “TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)” kullanılarak yukarıda belirtilen şekilde transforme edilmiştir. Ampisilinli LB agar petri kaplarına ekimi yapılan bakteri hücreleri 37°C’deki etüvde gece boyu inkübe edildikten sonra (+) kontrol grubunda oluşan kolonilerden on altı tane seçilerek

ampisilinli LB broth besiyerinde 37°C, 250 rpm’de yaklaşık 5 saat inkübe edilmiştir. Seçilip büyütülen kolonilerde hedef gen bölgesinin pET-14b vektörüne (pET-14b/FDH) girip girmediğini kontrol etmek için “Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #F-548S)” ile **Tablo 17**’de belirtilen miktarlarda ve **Tablo 18**’de belirtilen koşullarda koloni PCR gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 17:** pET-14b/FDH vektörü için koloni PCR karışımı bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master mix	7.5 µl
Primer (F+R)	1 µl
DNA	1 µl
dH <sub>2</sub> O	5.5 µl
<b>Toplam</b>	<b>15 µl</b>

**Tablo 18:** pET-14b/FDH vektörü için koloni PCR döngü koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	98°C	1 dk	
Denatürasyon	98°C	5 sn	31 döngü
Bağlanma	61°C	10 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Final uzama	72°C	1 dk	

PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez uygulanmasıyla hedef bant görüntülenmiştir.

Çoğaltılan koloniler “Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0502)” ile izole edilmiştir.

Herhangi bir kontaminasyondan dolayı koloni PCR’ın yanlış pozitif sonuç vermiş olması ihtimaline karşı verifikasyon amacıyla pürifiye plazmidler NcoI restriksiyon enzimi ile **Tablo 19**’da belirtildiği gibi 37°C’de 10 dk inkübe edilerek kesilmiştir. Kesim sonrası örnekler agaroz jele yüklenerek optimize elektroforez koşullarında yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

**Tablo 19:** pET-14b/FDH vektörünün NcoI restriksiyon enzimi ile kesim işlemi.

Bileşen	Miktar
pET-14b/FDH	6 µl
FastDigest buffer	2 µl
NcoI	1 µl
dH <sub>2</sub> O	11 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

### 3.2.9 Dizi analizi

Dizi analizi PCR ürününün vektöre klonlanması aşamalarında baz dizilerinde olabilecek ve eksprese edilecek proteinin aktivitesini etkileyebilecek mutasyonları belirlemek amacıyla yapılmıştır. PCR ürününü alarak rekombinant olan pET-14b vektörü BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara) firmasına dizi analizine gönderilmiş ve PCR ürününün vektöre doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği kontrol edilmiştir. Analiz sonucuna göre, rekombinant pET-14b/FDH plazmidleri ekspresyon bakterisi olarak kullanılan *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır.

### 3.2.10 *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerinin transformasyonu

Yapılan dizileme sonucuna göre doğru klon belirlendikten sonra *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerine aktarımı sağlanmıştır. Kompetan hale getirilen hücrelerin transformasyonu “TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)” ile gerçekleştirilmiştir. *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinin transformasyonu için yapılan tüm işlemler *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücreleri içinde aynı şekilde yapılmıştır. Farklı olarak, transformasyon aşamasında 5 µl ligasyon karışımı yerine pET-14b/FDH rekombinant vektöründen 2.5 µl koyulmuştur. Steril koşullarda ampisilinli LB agara ekimi gerçekleştirilen bakteriler 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ortaya çıkan kolonilerden seçilerek 1.5 ml’lik ampisilinli LB broth besiyerine ekilmiş, inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm’de yaklaşık 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirgin bir bulanıklık elde edildiğinde taze kültürden 100 µl alınıp üzerine 1:1 oranında %50 gliserol eklenerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuya (-80°C) kaldırılmıştır.

### 3.2.11 Gen ekspresyonunun IPTG ile indüklenmesi

Taze kültürü yapılan hücrelere fazla miktarda sahip olmak için 50 ml'lik ampisilinli LB broth besiyerinde alt kültürü yapılmıştır. Bu kültürün tamamı 500 ml antibiyotiksiz LB broth besiyerine inoküle edilerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 4 saat inkübe edilmiştir. Spektrofotometre ile ölçülen 600 nm dalgaboyundaki optik yoğunluk (OD<sub>600</sub>) 0.53'e ulaştığında, indüklenmemiş örnek (0. saat) olarak kullanılmak üzere örnekten üç ayrı eppendorf tüpe 1 ml alınıp 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek peletleri derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır. Geride kalan hücrelerin gen ekspresyonunu indüklemek için 0.7 mM IPTG eklenerek 37°C, 250 rpm'de 3 saat inkübe edilmiştir. Değerlendirme yapmak üzere örnekten birer saat aralıklarla 1'er ml alınıp 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek peletleri derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır. Bu aşamada alınan örneklerin peletleri kaba özüt olarak SDS-PAGE analizinde, 3 saatin sonunda geride kalan yüksek hacimli örneğin peleti pürifiye edilerek SDS-PAGE, Western blot ve enzim aktivite testlerinde kullanılmıştır.

### 3.2.12 Protein pürifikasyonu

İntraselüler bir protein olan FDH enziminin bulunduğu hücrelerden dışarı çıkarılarak analiz edilmesi için sonikasyon yapılmıştır. IPTG ilavesinden sonraki 3 saatlik inkübasyonun tamamlanmasının ardından 50 ml'lik 5 ayrı falkon tüpe bölünen örnek 4100 rpm'de 15 dk santrifüjle pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısımlar atılıp her bir falkondaki peletin üzerine 2 ml, 100 mM Tris pH 7.5 tamponu eklenmiş, pipetleme ve vorteksle homojenize edilmiş, peletlerin tamamen çözündürülmesi ile tüm lizatlar tek bir falkonda toplanmıştır. Lizatın üzerine 50 mg/ml olacak şekilde 240 µl lizozim ve 2 M, 300 µl NaCl eklenmiştir. Buz üzerinde 10 dk inkübasyondan sonra gece boyu buzdolabında (+4°C) bırakılan örnek ertesi gün %96 güç, 10 sn puls, 15 sn ara, 5 döngü olarak ayarlanan cihazla buz üzerinde sonike edilmiştir. Sonikasyondan sonra lizat 4100 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı pürifikasyon için alınmıştır. pET14-b vektör sistemi ile üretilen ve histidin etiketi içeren FDH proteininin organizmada bulunan diğer proteinlerden ayrılarak saf bir şekilde eldesi için afinite kolon kromatografisi yapılmıştır. "Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, #30600)" kullanılarak gerçekleştirilen bu işlem, proteinin doğal yapısının bozulmayacağı kit protokolündeki nativ yöntem seçeneğiyle tamamlanmıştır.

Kit protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Sonikasyon sonrası yapılan santrifüjle elde edilen süpernatant 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek temiz bir falkon tüpte toplanmıştır.
- Örneğin üzerine "Native Lysis Buffer"dan 10 ml eklenmiş ve ardından tekrar filtreden geçirilmiştir.
- Kolon hazırlandıktan sonra hücre lizatı kolona aktarılmış ve vakum manifoldu ile kolondan boşaltımı gerçekleştirilmiştir.
- Kolon, 4 ml "Native Wash Buffer" ile iki defa yıkanmıştır.
- His-etiketli FDH proteini, 2 ml "Native Elution Buffer" ile bağlanmış olduğu kolondan ayrılmıştır.
- Elde edilen saf FDH proteini; SDS-PAGE, Western blot ve enzim aktivite testlerinde kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

### 3.2.13 SDS-PAGE analizi

FDH proteininin varlığını görmek için SDS-PAGE yapılmıştır. İlk olarak, %10'luk ayırma (separating) jeli ve %5'lik yığıma (stacking) jeli **Tablo 20**'de verilen ölçülere göre hazırlanmıştır.

**Tablo 20:** SDS-PAGE jellerinin bileşenleri.

Bileşen	Ayırma Jelinde Bulunan Miktar	Yığıma Jelinde Bulunan Miktar
%40 poliakrilamid	4.5 ml	0.5 ml
1 M Tris (pH 8.8)	6.75 ml	—
1 M Tris (pH 6.8)	—	0.5 ml
%10 SDS	0.18 ml	0.04 ml
dH <sub>2</sub> O	8.38 ml	2.90 ml
%10 APS	0.18 ml	0.05 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml
<b>Toplam</b>	<b>20 ml</b>	<b>4 ml</b>

Elektroforez camları toz kalmayacak şekilde silinip doğru bir şekilde cam kasete yerleştirildikten sonra ilk olarak ayırma jeli dökülmüştür. Jel hazırlama aşamasında polimerizasyonu başlatıcı APS ve TEMED bileşenleri en son eklenmiştir.

Ayırma jeli tamamen polimerize olduktan sonra üzerine yığıma jeli dökülmüş ve tarak yerleştirilerek donması beklenmiştir. Bu jel hazırlanırken de APS ve TEMED

bileşenleri en son eklenmiştir. Yığıma jelin donmasıyla tarak jelden çıkarılmış, kuyucuklar 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile yıkanmış ve cam kaset elektroforez sistemine yerleştirilmiştir.

IPTG ile indüklenen hücrelerin FDH proteinini eksprese edip etmediğini görmek için indükleme aşamasında saat başı alınan örnekler hazırlanarak poliakrilamid jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler hazırlanırken OD<sub>600</sub> değerinde okunan absorbans değerleri kadar DPBS, absorbans değerlerinin beş katı kadar 4X Laemmlı örnek tampon çözeltisi eklenerek vortekslenmiştir. Protein marköründen de 20 µl alınıp üzerine 20 µl 4X Laemmlı örnek tampon çözeltisinden eklenmiştir. Örnekler ve markör ısıtıcı üzerinde bulunan kaynatılmış suyun olduğu bir kapta 5 dk, hemen ardından buz üstünde de 5 dk inkübe edilerek jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Örnekler ve markör 20 µl olarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendikten sonra elektroforez tankı 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile doldurularak 126 mA, 90 V'de 2 saat yürütülmüştür. Elektroforez bittikten sonra cam kasetlerden çıkarılan jel ile jelin üzerini kaplayacak miktarda eklenen Coomassie blue boyama çözeltisi orbital çalkalayıcı üzerinde 50 rpm'de 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından boyama çözeltisi dökülerek jelin üzerine yüzeyini kaplayacak miktarda boya giderici (destaining) çözelti eklenmiş ve 50 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.2.14 Western blot analizi**

Western blot analizi, SDS-PAGE ile görülen FDH proteininin varlığını immünolojik olarak da doğrulamak için yapılmıştır. “Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, #30600)” materyali olan “Penta-His” antikoruna sahip rekombinant FDH tespit edilmiş ve görüntülenmiştir.

Analiz esnasında uygulanan basamaklar şu şekildedir:

- Poliakrilamid jel elektroforezi tamamlanan jel cam kasetlerden çıkarılıp distile su ile iyice yıkanmıştır. Fazlalık kısımlar blotlama esnasında sorun teşkil etmemesi için kırılmıştır.
- Nitroselüloz membran metanol ile 3 dk inkübe edilmiş ve membranın şeffaf bir duruma geçmesi sağlanmıştır.
- Transfer tampon çözeltisine alınan membran çalkalanarak 3 dk inkübe edilmiştir.

- Başka bir kapta, membran ile aynı ebatlarda kesilmiş 4 filtre kağıdı transfer tampon çözeltisinde 3 dk bekletilmiştir.
- Transfer sisteminin tepsi distile su ile ıslatıldıktan sonra transfer tamponundan alınan 2 filtre kağıdı üst üste koyulmuştur. Bunların üzerine membran koyulup işaretlenmiş, membranın üstüne jel, jelin üstüne geride kalan 2 filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Hava boşluğu kalmaması için her katmanda materyallerin üzerinden silindir rulo ile geçilmiştir.
- Tepsi blot transfer sistemine yerleştirilip 25 V, 300 mA, 7 dk olarak ayarlanan programda çalıştırılmıştır.
- Transfer tamamlandığında jel atılmış, membran TBS tamponunda 5 dk bekletilmiştir.
- Membran, TBS tamponunda hazırlanmış %3 BSA ile oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir.
- Ardından membran, TBS tamponunda %3 BSA ile hazırlanan 1/1100 dilüsyonlu Penta·His antikoru ile +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon tamamlandığında, membran 1X TBST ile 4 defa 5 dk olarak 80 rpm'e ayarlanan çalkalayıcıda yıkanmıştır.
- TBST tamponu içinde hazırlanan 10 ml %10'luk süt tozu membranın üzerine dökülmüştür. İkincil antikor olan HRP konjuge anti-mouse IgG antikoru 1/5000 seyreltilmiş olarak eklenmiştir. Membran, ikincil antikorla oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda 75 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra membran 5 defa 5 dk olarak 90 rpm'e ayarlanan çalkalayıcıda yıkanmıştır.
- Kemilüminesans saptama için 1:1 oranında karıştırılan 1 ml luminol ve peroksit 1 ml distile su ile seyreltilerek membranla birlikte ışık geçirmeyen bir kutuda, 90 rpm'de 3 dk inkübe edilmiştir.
- Membran, bulunduğu ortamdan alınıp suyu süzdükten sonra şeffaf bir poşet şeritin içerisine alınarak görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

### 3.2.15 FDH enzim aktivitesinin belirlenmesi

FDH enziminin aktivitesi, koenzimi olan NAD<sup>+</sup>'ı NADH'a indirgediğinde 340 nm'de oluşturduğu absorbans ile belirlenmiştir. Aktivite UV-vis spektrofotometre ile izlenmiştir. İdeal koşullardaki aktiviteyi bulmak için farklı substrat

konsantrasyonlarında, tampon çözeltilerin farklı pH değerlerinde ve sıcaklıklarda 340 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Blank olarak distile su, tampon çözelti, NAD<sup>+</sup>, FDH'ın olduğu fakat formatın olmadığı reaksiyon karışımları kullanılmıştır.

### 3.2.15.1 Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

FDH enziminin optimum aktivitesi için gereken substrat konsantrasyonunu saptamada enzimin substratı olan formatın farklı konsantrasyonları ile aktivite test edilmiştir.

**Tablo 21**'de belirtilen reaksiyon karışımından altı adet hazırlanmış, sırasıyla üzerlerine 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl ve 12 µl format çözeltisi eklenmiş, 340 nm'deki absorbans değerlerine bakılarak ideal substrat konsantrasyonu saptanmıştır.

**Tablo 21:** Farklı substrat konsantrasyonlu enzimatik aktivite reaksiyon karışımları.

Bileşen	Miktar
Tris tampon çözeltisi	60 µl (20 mM)
NAD çözeltisi	6 µl (1 mM)
FDH	5 µl
dH <sub>2</sub> O	189 µl-227 µl
<b>Toplam</b>	<b>300 µl</b>

### 3.2.15.2 Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Rekombinant FDH enziminin optimum aktivite göstereceği tampon çözelti ve pH değerini bulmak için potasyum fosfat ve Tris tamponları pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 olarak hazırlanmış, 340 nm'deki absorbanlarına bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Reaksiyon karışımları **Tablo 22**'de belirtilen miktarlardaki bileşenlerden oluşmuştur.

**Tablo 22:** Enzimatik aktive belirlemede kullanılan potasyum fosfat ve Tris tamponları ile hazırlanan reaksiyon karışımları.

Bileşen	Miktar
Potasyum fosfat/Tris tampon çözeltisi	60 µl (20 mM)
Format çözeltisi	40 µl (40 mM)
NAD çözeltisi	6 µl (1 mM)
FDH	5 µl
dH <sub>2</sub> O	189 µl
<b>Toplam</b>	<b>300 µl</b>



### **3.2.15.3 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi**

Sıcaklığın FDH enzim aktivitesine olan etkisini görmek için ideal tampon çözeltisiyle Tablo 22'de belirtilen şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları 22°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C sıcaklıklarında 10 dk inkübe edilmiş ve 340 nm'deki absorbans değerlerine bakılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1 *C. boidinii* ATCC 18810 Suşundan Genomik DNA İzolasyonu Bulgusu

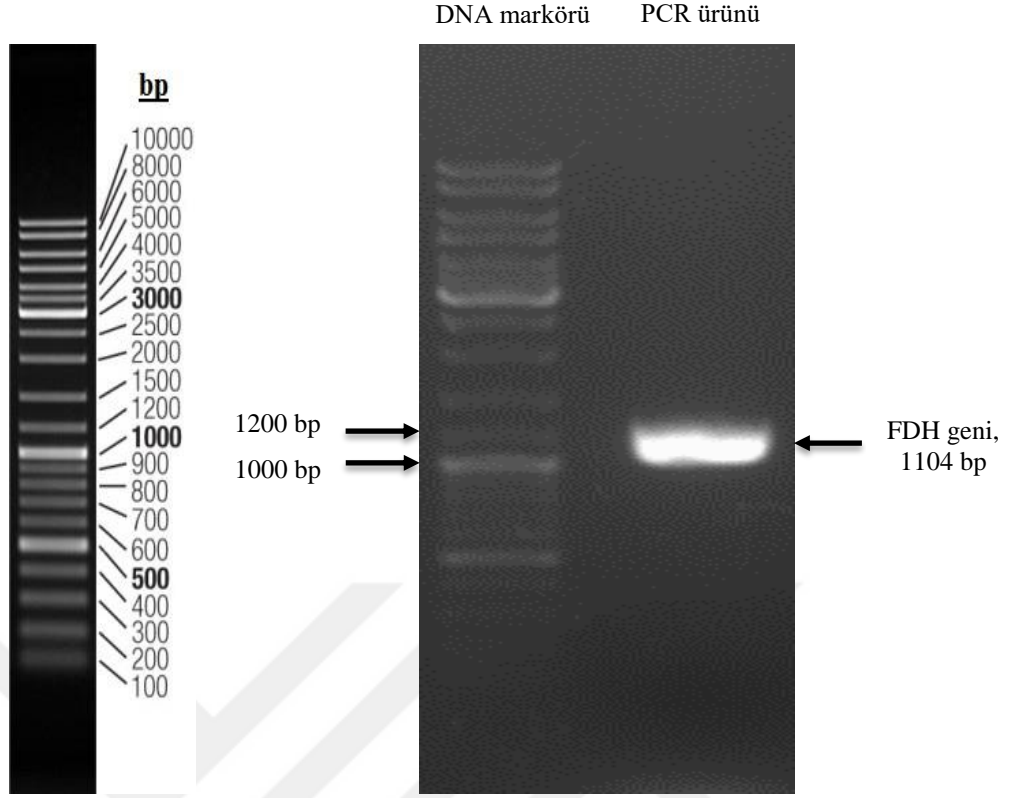
Bu çalışmada, FDH enzimi gen kaynağı olarak metanol metabolizma yolağının model organizması olan *C. boidinii* mayasının ATCC 18810 suşu seçilmiştir. “PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, #K1820-02)” ile izole edilen genomik DNA'nın miktarı 260 nm'deki absorbans değeri ile, saflığı (kalite) ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı ( $A_{260/280}$ ) ile belirlenmiştir. Konsantrasyonu 70 ng/ $\mu$ l, saflığı 1.88 çıkan örnek PCR ile çoğaltılacak hedef gen bölgesi için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

### 4.2 PCR ile Çoğaltılan FDH Gen Bölgesi Bulgusu

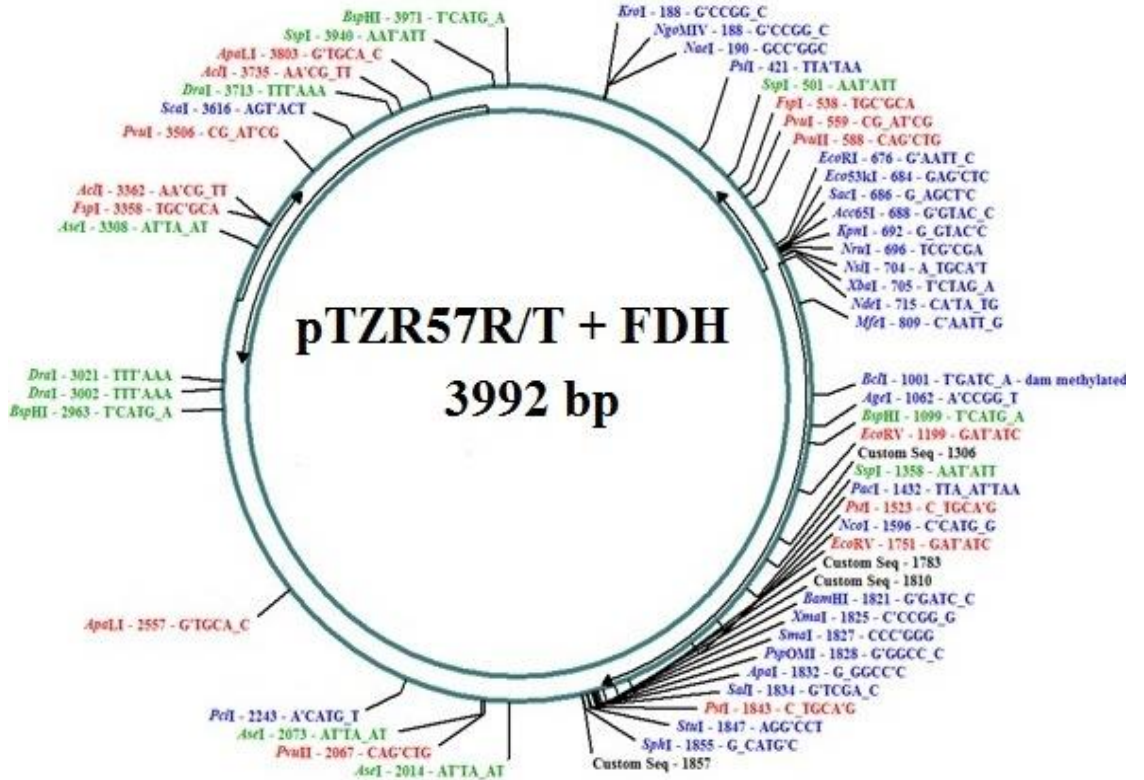
Hedef FDH geninin çoğaltılması için *C. boidinii* genomik DNA'sı tasarlanan primerler ve gerekli bileşenlerle polimeraz zincir reaksiyonuna sokulmuş ve sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. 1104 baz çiftine sahip FDH gen dizisinin PCR ürünü beklenildiği gibi agaroz jelde ~1100 bp'lik bant büyüklüğü vermiştir (**Şekil 12**).

### 4.3 TA Klonlama Bulguları

Çok sayıda kopyası elde edilen FDH geninin 3'-ddT çıkıntıları ile lineer hale getirilmiş pTZR57R/T vektörüne ligasyonunu sağlamak amacıyla PCR ürünlerinin sonuna *Taq* DNA polimeraz enzimi aracılığıyla adenin nükleotitleri eklenmiştir. Bu işlemden sonra hazırlanan ligasyon karışımıyla, adenin kuyruğuyla modifiye edilen PCR ürününün pTZR57R/T vektörüne yerleşmesi ve rekombinant pTZR57R/T+FDH vektörünün oluşması sağlanmıştır (**Şekil 13**).



Şekil 12: *C. boidinii* FDH geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün UV görüntüsü.



Şekil 13: Ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant pTZR57R/T+FDH vektörü.

Transformasyon basamağında pTZR57R/T+FDH vektörü, “TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)” ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine aktarılmış, rekombinant vektörleri hücre içerisine alan bakterilerin seçilimi mavi-beyaz koloni ayrımı tekniği ile yapılmıştır. Bu teknik, ortamdaki laktozu glikoz ve galaktoza parçalayan  $\beta$ -galaktosidaz enziminin aktivitesine dayanmaktadır.  $\beta$ -galaktosidaz, lac operonundaki lacZ geni tarafından kodlanan ve aktif formunda homotetramer yapıda olan bir proteindir. lacZ  $\alpha$  dizisini taşıyan plazmid vektörler,  $\beta$ -galaktosidazın  $\alpha$ -peptidi olarak bilinen kısmını kodlar. Klonlamada kullanılan konakçı *E. coli* hücreleri lacZ $\Delta$ M15 delesyon mutasyonu içeren kompetan hücrelerdir ve bu hücreler de  $\beta$ -galaktosidazın  $\omega$ -peptidi olarak bilinen kısmını kodlar.  $\alpha$  ve  $\omega$  peptidi ayrı ayrı işlevsel olmadığından ancak lacZ  $\alpha$  dizisini içeren plazmidler lacZ $\Delta$ M15 hücrelerine transforme edilip birlikte ekspres edildiklerinde işlevsel bir  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretilir. Mavi-beyaz koloni ayrımı tekniğinde, rekombinant klonlar işlevsel bir  $\beta$ -galaktosidaz üretememeleri ile seçilir. Plazmid vektörlerde lacZ dizisinin içinde yabancı DNA'nın vektöre yerleştirildiği çoklu klonlama bölgesi vardır. Yabancı DNA lacZ  $\alpha$  geninin içine yerleştirildiğinde  $\alpha$ -peptidini üreten gen kesintiye uğrar ve işlevsel bir  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretilemez. Yabancı DNA'yı almayan hücreler ise işlevsel  $\beta$ -galaktosidaz üretir ve enzimin aktivitesiyle ortamdaki X-gal çözünmez mavi pigmentli bir kimyasala yükseltgenir. Böylelikle, yabancı DNA'yı vektöre alamamış hücreler mavi renkleri ile kolaylıkla ayırt edilir.

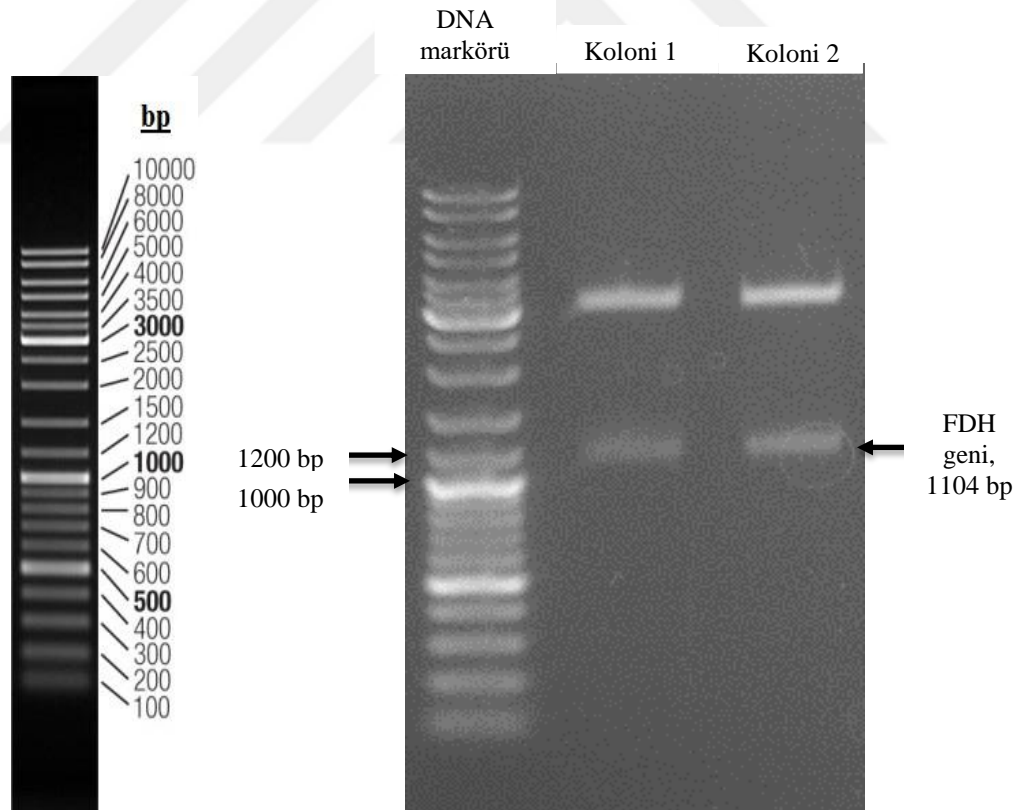
Bu çalışmada, ligasyon karışımları ile muamele edilen kompetan hücrelerin X-gal içeren LB agar besiyerine ekimi ve inkübasyonu sonrası oluşan mavi-beyaz kolonilerden on üç tane beyaz koloni seçilerek steril koşullarda ampisilinli LB broth besiyerine inoküle edilmiştir. İnkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 250 rpm'de yaklaşık 6 saat inkübe edilen kolonilerin gerçekten rekombinant vektörleri alıp almadığını görmek için koloni PCR yapılmış, jel elektroforezinde yürütülmüş, UV ışık altında görüntülenmiştir. Seçilen on üç koloniden yedi tanesi beklenen ~1100 bp'lik bantı göstererek pozitif sonuç vermiştir.

Seçilen kolonilerdeki plazmidlerin izolasyonu “Genejet Plazmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0502)” ile gerçekleştirilmiş, plazmidlerin miktarı UV-vis spektrofotometrede  $A_{260}$  değeri ile, saflığı ise  $A_{260/280}$  ile belirlenmiştir. Kolonilerin konsantrasyonları 118-154 ng/ $\mu$ l, saflığı ise 1.78-1.84 aralığında çıkmıştır.

Seçilen kolonilerde, PCR ürünlerinin vektörlerin içine düz mü ters mi girdiğini saptamak için izole plazmidlerin NdeI ve ScaI restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmıştır. PCR ürünlerinin vektöre düz girmesi halinde bu endonükleazların aktivitesi sonucu 1091 ve 2901 bp, ters girmesi halinde ise 1805 ve 2187 bp olarak iki bant oluşturması beklenmiştir. Seçilmiş yedi koloniden dört tanesi istenilen düz giriş bantlarını vermiş, bu dört koloniden de miniprep sonrası 151 ng/μl ve 154 ng/μl olarak yüksek konsantrasyonda elde edilen iki koloni ile çalışmalara devam edilmiştir.

#### 4.4 PCR Ürününün pET-14b Vektörüne Alınması Bulguları

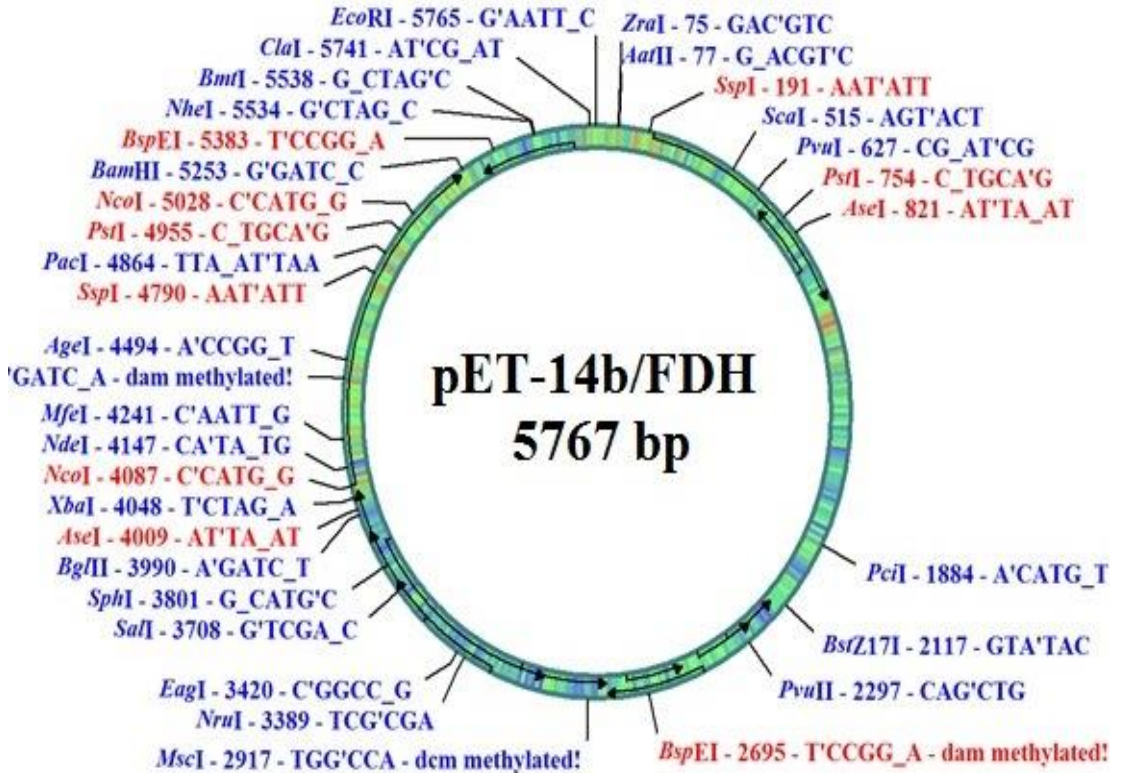
pTZR57R/T vektörüne klonlanan PCR ürünlerinin pET-14b vektöründe ekspresyonunu sağlamak amacıyla, pTZR57R/T+FDH plazmidini NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş ve agaroz jel elektroforezinden sonra hedef gen bölgesi olan ~1100 bp büyüklüğündeki bant jelden kesilerek izole edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: pTZR57R/T+FDH vektörünün NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen ürünlerin UV görüntüsü.

“GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0691)” ile pürifiye edilen DNA örneğinin miktarı UV-vis spektrofotometrede  $A_{260}$  değeri ile, saflığı ise  $A_{260/280}$  ile belirlenmiştir. Koloni 1 için DNA konsantrasyonu 10.38 ng/μl, saflık 1.76; koloni 2 için DNA konsantrasyonu 8.2 ng/μl, saflık 1.77 çıkmıştır. Konsantrasyonu nispeten yüksek olan koloni 1 ile ligasyona devam edilmiştir.

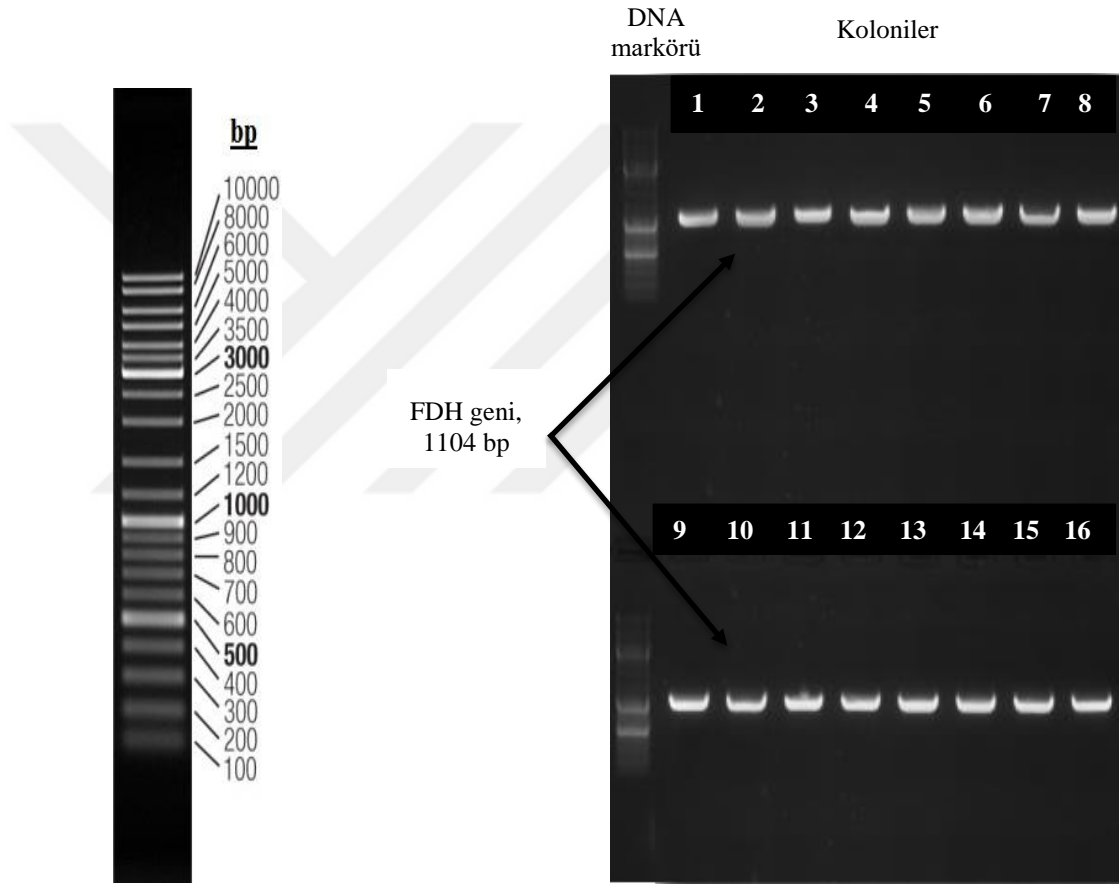
İzole edilen PCR ürününün ekspresyon vektörü olarak kullanılacak pET-14b'ye aktarılabilmesi için vektör ampisilinli LB broth besiyerinde çoğaltılmış ve “Genejet Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0481)” ile izole edilmiştir. UV-vis spektrofotometre ile ölçümü yapılan pET-14b vektörünün konsantrasyonu 1814 ng/μl, saflığı ise 1.85 çıkmıştır. Pürifiye edilen pET-14b vektörünün NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilen PCR ürünlerine yapışarak bağlanabilmesi için aynı restriksiyon enzimleri ile kesimi ve vektörün PCR ürününü almadan kendi üzerine kapanmaması için alkalın fosfataz ile defosforilasyonu gerçekleştirilmiş, ardından rekombinant pET-14b/FDH vektörünü oluşturmak için ligasyonu yapılmıştır (Şekil 15).



Şekil 15: Ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant pET-14b/FDH vektörü.

Ligasyon ile elde edilen pET-14b/FDH vektörü, “TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)” ile *E. coli* One Shot®

Mach1™-T1R hücrelerini transforme etmiştir. Ampisilinli LB agar petri kaplarına ekimi yapılan bakteri hücreleri 37°C’deki etüvde gece boyu inkübe edildikten sonra (+) kontrol grubunda oluşan kolonilerinden on altı tanesi seçilerek ampisilinli LB broth besiyerinde 37°C, 250 rpm’de yaklaşık 5 saat inkübe edilmiştir. Seçilip büyütülen kolonilerde hedef gen bölgesinin pET-14b vektörüne girip girmediğini görmek için “Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #F-548S)” ile koloni PCR yapılmış ve on altı koloninin hepsinin hedef rekombinant plazmid aldığı görülmüştür (Şekil 16).

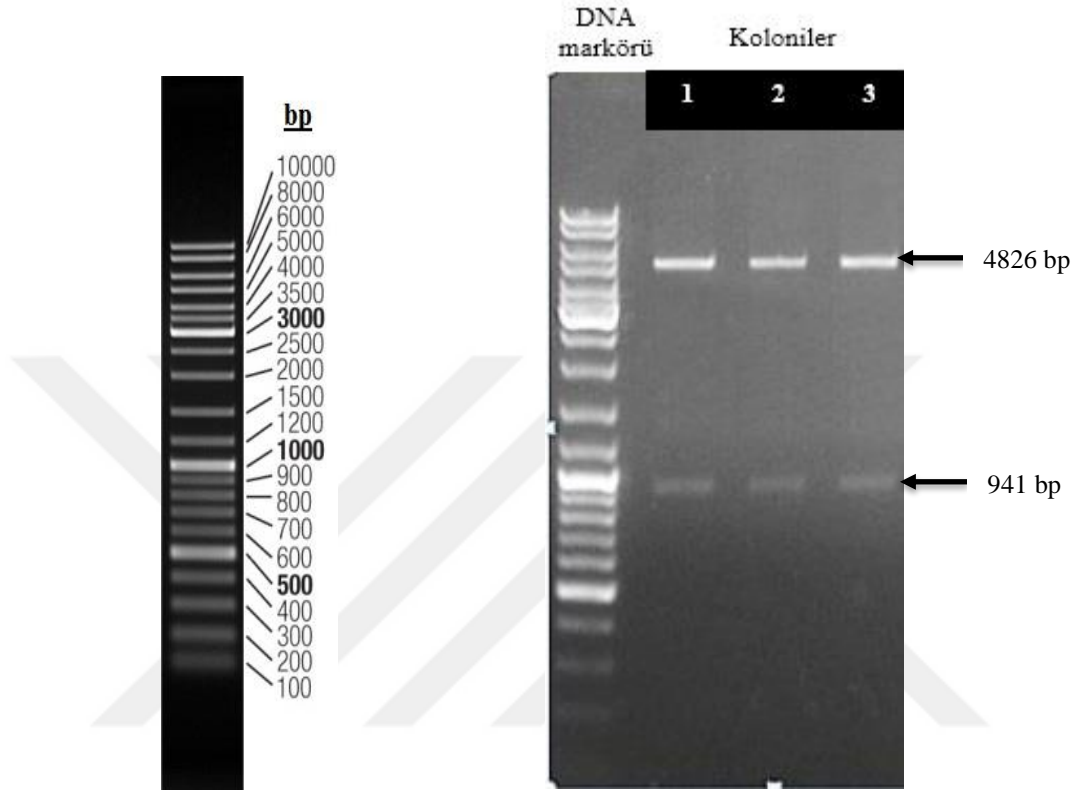


Şekil 16: pET-14b/FDH vektörünü alan hücrelerin tespiti için yapılan koloni PCR elektroforezi sonrası UV görüntüsü.

Hepsi pozitif sonuç veren kolonilerden rastgele üç tanesi seçilerek “Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0502)” ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. UV-vis spektrofotometre ile konsantrasyonlar 12.60 ng/µl, 15.96 ng/µl ve 35.67 ng/µl; saflıklar 1.77, 1.78 ve 1.86 olarak ölçülmüştür.

Herhangi bir kontaminasyondan dolayı koloni PCR’ın yanlış pozitif sonuç vermiş olması ihtimaline karşı verifikasyon amacıyla pürifiye edilen plazmidler NcoI

restriksiyon enzimi ile kesilmiş, kesim sonrası örnekler agaroz jele yüklenerek elektroforez yapılmıştır. Kesim sonrası jel görüntüleme sisteminde 941 bp ve 4826 bp olarak görülmesi beklenen bantların elde edildiği ve böylelikle koloni PCR esnasında herhangi bir kontaminasyon olmadığı görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17: pET-14b/FDH vektörünü alan hücrelerin verifikasyonu için NcoI restriksiyon enzim kesimi UV görüntüsü.

#### 4.5 Dizi Analizi Bulguları

*C. boidinii* kaynaklı FDH gen bölgesinin pET-14b vektörüne doğru bir şekilde yerleştiği NcoI restriksiyon enzim kesimi ile de onaylanan iki koloni dizi analizine gönderilmiştir. Dizilemesi yapılan klonlanmış FDH gen bölgesi ile GenBank veri bankasındaki FDH gen dizisi karşılaştırıldığında her iki kolonininde yüksek oranda benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Pozitif sonuç veren kolonilerden rastgele bir tanesi seçilerek ekspresyon çalışmalarına bu koloni ile devam edilmiştir (Şekil 18, Şekil 19).



```
AGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT
GAAGATCGTTTTAGTCTTATATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAAAAAT
TATATGGTTGTAAGTAAATAAATTAGGTATTGCTAATTGGTTAAAAGATCAAGGT
CATGAACATAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGTGAATTGGATAAACA
TATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCCTCTTCCATCCTGCTTATATCACTA
AGGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTGGT
TCTGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCCT
GGAAGTTACAGGTTCTAATGTTGTTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGC
TTGTCTTGGTTAGAAATTTTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGG
GAGGTTGCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTA AAACTATCGCTAC
CATTGGTGCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGGAAAGATTACTCCCATTTAATC
CAAAGAATTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAGAAGCTGAAGAAAA
GTTGGTGCTAGAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGT
TACAGTTAATGCTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAAATTAATAAGGAATTAT
TATCTAAATTTAAAAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTTGT
GTTGCTGAAGATGTTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGG
TGATGTTTGGTTCCCACAACCAGCTCCAAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAA
ATAAATATGGGGCTGGGAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGAC
GCTCAAACAAGATACGCTGAAGGTAATAAATAATTTTGGAAATCATTCTTTACCGG
TAAATTTGATTACCGACCACAAGATATTTATCTTATTAATGGGGGAATACGTTAC
TAAAAGCTTACGGGAACCCGATAAAGAAATAAGCTTTAAATCGGGATCC
```

Şekil 18: pET-14b/FDH plazmid vektörünün dizileme sonucu.

```
PKRISSRIILFTLRRRYTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSH
MKIVLVLYDAGKHAADDEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITTS DKEGETSELDK
HIPDADI IITPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVVAGVGS DHIDL DYINQTKKISV
LEVTGSNVVSVAEHVVMTMLVLVRFNVP AHEQIINH DWEVAAIAKDAYDIEGKTIA
TIGAGRIGYRVLERLLPFNPKELLYDYQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADI
VTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYG
GDVWFPPQAPK DHPWRDMRNKYGAGNAMTPHYS GTTLDAQTRYAEGTKNILESFFT
GKF D YR P Q D I Y L I K W G N T L L K A Y G K P D K E
```

Şekil 19: Dizileme sonucuna göre elde edildiği varsayılan rekombinant FDH protein dizisi.

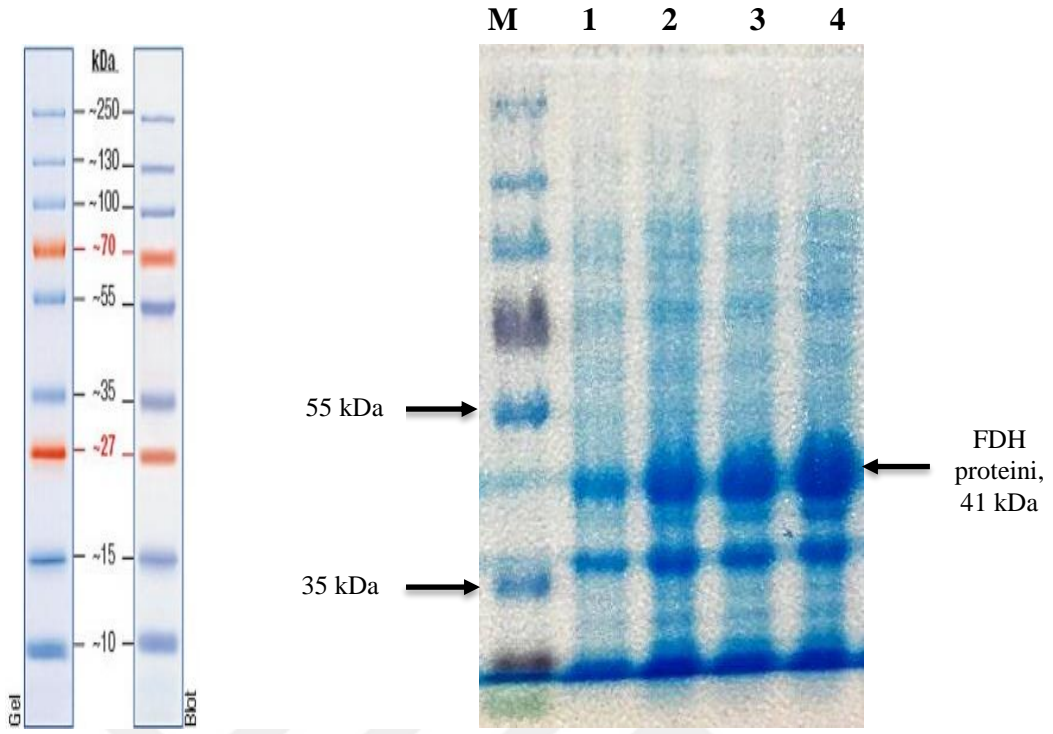
#### 4.6 Gen Ekspresyonunun IPTG ile İndüklenmesi ve Protein Pürifikasyon Bulguları

Dizileme sonuçlarına göre doğru klonu veren pET-14b/FDH vektörü ile proteinin eksprese edileceği kompetan *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücreleri “TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, #K2710)” kullanılarak transforme edilmiştir. Ampisilinli LB agar üzerinde büyüyen transforme hücrelerden iki tanesi seçilerek ampisilinli LB broth besiyerinde büyütülmüş ve kolonilerden biri daha sonra kullanılmak üzere 1:1 oranında gliserollenip derin dondurucuya (-80°C) kaldırılırken diğeri gen ekspresyonunu indüklemek üzere ilk olarak 50 ml hacimde alt

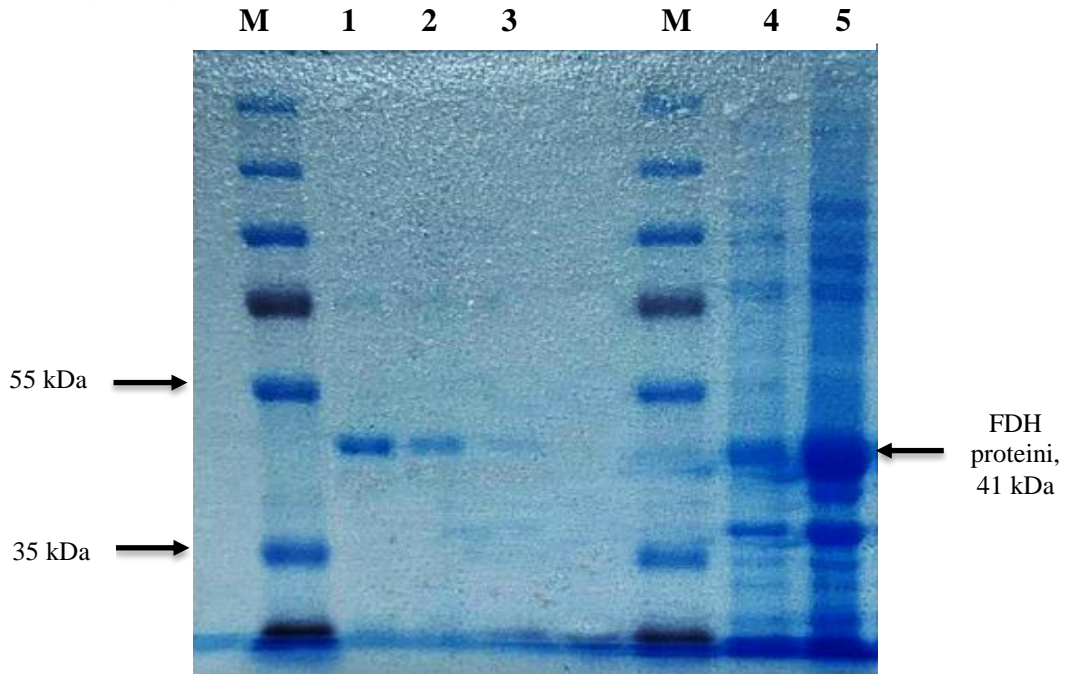
kültürü yapılmış, ardından 500 ml antibiyotiksiz LB broth besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteriler büyürken besiyerine adaptasyon sağladıkları lag fazını tamamladıktan sonra hızla bölündükleri ve çok miktarda protein ürettikleri logaritmik büyüme fazına geçmektedir. 600 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk 0.4'e ulaştığında hücrelerin logaritmik büyüme fazına girdiği varsayılmaktadır. Bu çalışmada, antibiyotiksiz LB broth besiyerinde büyüyen hücrelerin OD<sub>600</sub> değeri 0.53'e ulaştığında indüksiyonu başlatmak üzere 0.7 mM IPTG eklenmiştir. IPTG, allolaktozun moleküler bir analogudur. Lac represörüne bağlanarak tetramerik represörün lac operatöründen ayrılmasını ve lac operonundaki genlerin transkript edilerek rekombinant proteinin eksprese edilmesine olanak sağlamaktadır. İndüksiyonun başarısını görmek için 37°C, 250 rpm'de 3 saat inkübe edilen örnekten her saat başı 1'er ml alınmış, pürifikasyon yapılmadan kaba özüt olarak proteinin ekspresyonuna SDS-PAGE ile bakılmak üzere santrifüjle pelet haline getirilmiştir. 3 saatin sonunda geride kalan büyük hacimli örnek sonike edilip "Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, #30600)" ile pürifiye edilmiştir. pET-14b vektöründe bulunan His-tag kodlama dizisi, rekombinant FDH proteininin N-terminalinde 6 tane histidin rezidüsü ile birlikte üretilmesini sağlamaktadır. Histidin, nitriloasetik asitle katı bir matrikse immobilize edilmiş nikel iyonlarının koordinasyon küresindeki boş kısımlarına güçlü bir afinite göstererek bağlanmaktadır. Rekombinant FDH proteininin bağlandığı kolondan doğal konformasyonunu kaybetmeden ayrılması kit protokolünde tarif edilen şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen saf proteinin konsantrasyonu nanodrop ile A<sub>280</sub>'de 1.103 mg/ml olarak ölçülmüştür. Saf ürün, kaba özüt ile birlikte SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

#### **4.7 SDS-PAGE Analizi Bulguları**

Protein ekspresyonu IPTG ile indüklenmeden önce (0. saat), indüklendikten sonra 1., 2. ve 3. saatlerde alınan örnekler ve indüksiyonun 3. saatinin tamamlanmasının ardından afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılan örnek hazırlanarak ayrı ayrı SDS-PAGE yapılmıştır. Eksprese edilen rekombinant proteinin beklenildiği üzere 41 kDa bant verdiği, 0. saatte çok az miktarda bazal ekspresyon düzeyinde üretildiği, inkübasyon süresinin artması ile birlikte üretiminin arttığı, pürifikasyon sonunda bir miktar kayıp yaşandığı görülmüştür (**Şekil 20, Şekil 21**).



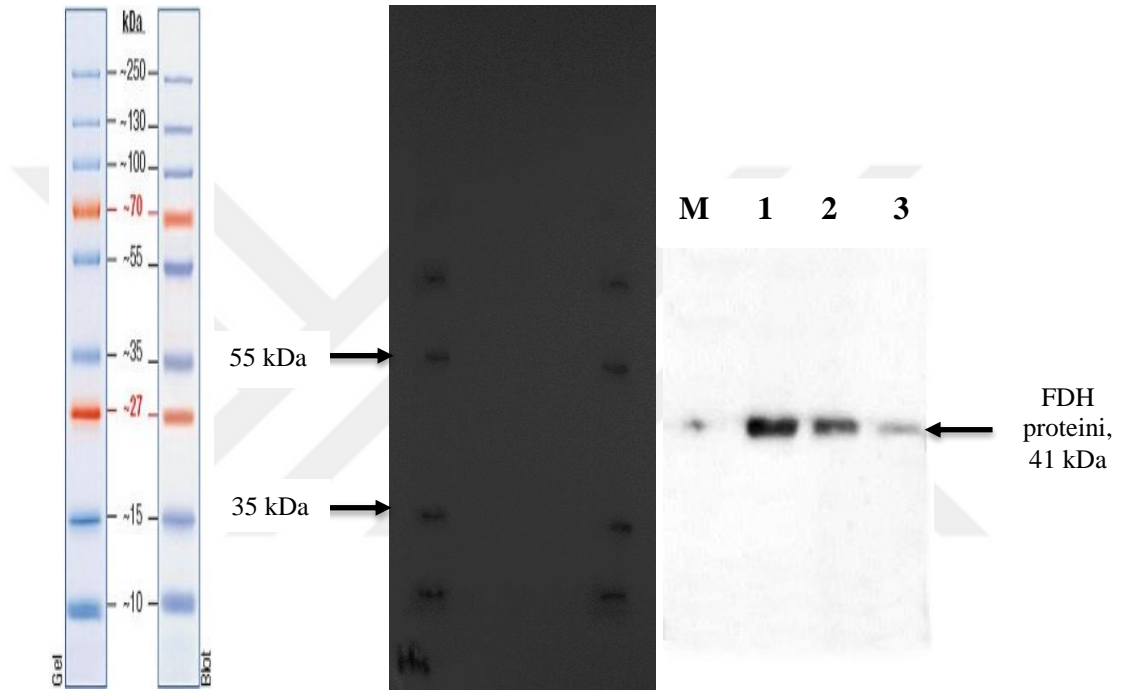
**Şekil 20:** pET-14b/FDH vektörünü alan bakteri hücrelerinin IPTG ekspresyon sistem kontrolü için SDS-PAGE analizi. M: Protein markörü, 1: IPTG indüksiyonundan önce alınan kontrol örneği (0. saat), 2: IPTG indüksiyonundan 1 saat sonra alınan örnek (1. saat), 3: IPTG indüksiyonundan 2 saat sonra alınan örnek (2. saat), 4: IPTG indüksiyonundan 3 saat sonra alınan örnek (3. saat).



**Şekil 21:** pET-14b/FDH vektörünü alan bakteri hücrelerinin IPTG indüksiyonu sonrası kaba özüt ve saflaştırılmış örnek olarak SDS-PAGE analizi. M: Protein markörü, 1: 20 µl saf örnek yüklü kuyucuk, 2: 10 µl saf örnek yüklü kuyucuk, 3: 2 µl saf örnek yüklü kuyucuk, 4: IPTG indüksiyonundan önce alınan kontrol örneği (0. saat), 5: IPTG indüksiyonundan 1 saat sonra alınan örnek (1. saat)

#### 4.8 Western blot Analizi Bulgusu

Western blot, SDS-PAGE ile molekül ağırlığına göre ayrılan saflaştırılmış rekombinant FDH proteinlerini “Penta-His” birincil antikoruyla histidin rezidülerinden yakalayarak hedef proteinin varlığını doğrulamak amacıyla yapılmıştır. Nitroselüloz membran üzerinde belirli markör proteinler işaretlenmiş ve görüntüleme sistemine tanıtılmıştır. Beklenildiği üzere 41 kDa’luk bant görülmüş ve FDH proteininin varlığı bu yöntemle de ispatlanmıştır (Şekil 22).



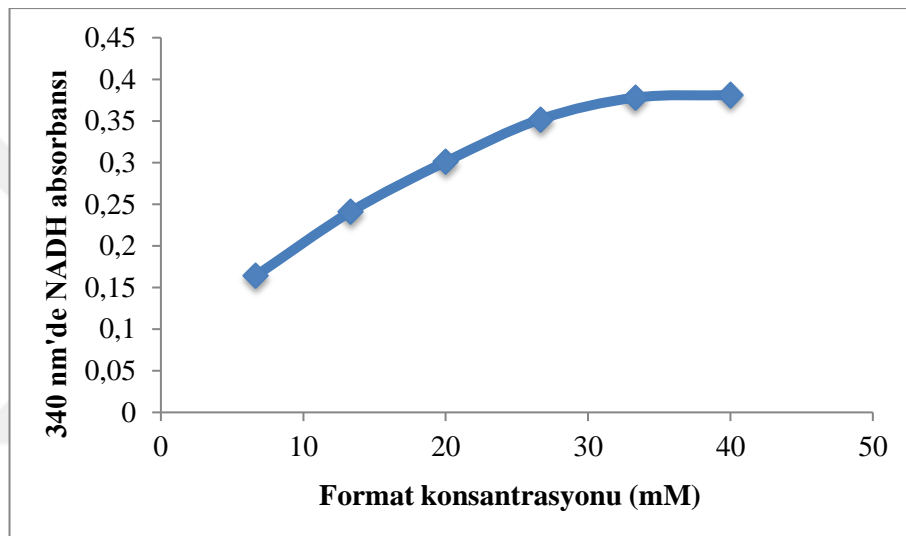
Şekil 22: Western blot uygulanmış nitroselüloz membranın UV görüntüsü. M: Protein markörü, 1: 20 µl saf örnek yüklü kuyucuk, 2: 10 µl saf örnek yüklü kuyucuk, 3: 2 µl saf örnek yüklü kuyucuk.

#### 4.9 Enzim Aktivite Testleri Bulguları

Pürifiye edilen rekombinant FDH enziminin en verimli çalıştığı substrat konsantrasyonu, tampon çözelti, pH ve sıcaklık değerlerini bulmak için aktivite testleri yapılmıştır. FDH enziminin aktivitesi, katalizlenen reaksiyonda koenzim NAD<sup>+</sup>’ın NADH’a indirgenmesinde 340 nm’de oluşturduğu absorbans ve pik ile belirlenmiştir. Bu dalga boyunda okunan absorbans değeri FDH aktivitesi sonucu üretilen NADH konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan yapılan testlerin sonucunda maksimum absorbansların elde edildiği parametre değerleri %100 verimli kabul edilmiş, diğer sonuçlar bunlarla kıyaslanarak relatif aktivite (%) cinsinden değerlendirme yapılmıştır.

#### 4.9.1 Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

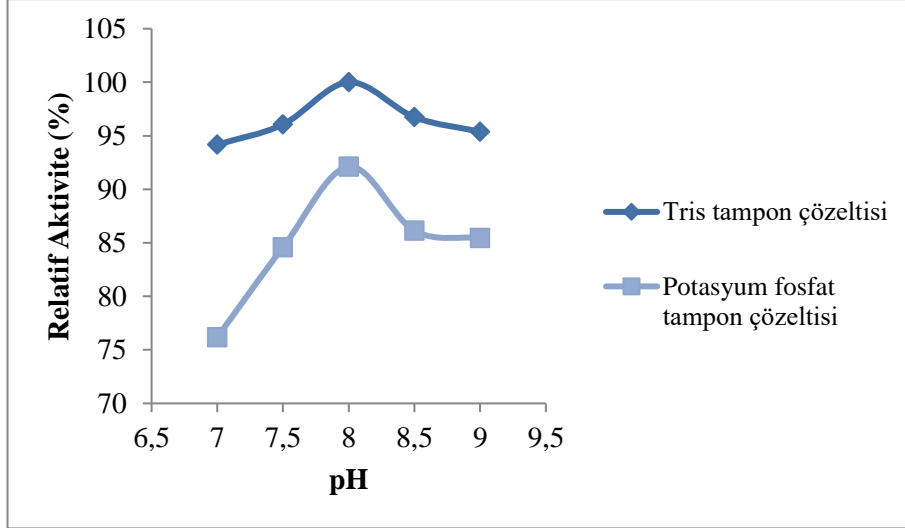
Saflaştırılmış rekombinant FDH enziminin optimum aktivite göstermesi için gereken minimum substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla enzimin substratı olan format farklı konsantrasyonlarda reaksiyon karışımlarına ilave edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. 6.66 mM (2 µl), 13.33 mM (4 µl), 20 mM (6 µl), 26.66 mM (8 µl), 33.33 mM (10 µl) ve 40 mM (12 µl) konsantrasyonlarındaki format çözeltisi reaksiyon karışımlarına eklenmiş, 25°C’de 30 dk inkübe edilmiş ve 340 nm’deki absorbans değerlerine bakılarak ideal substrat konsantrasyonunun 40 mM olduğu saptanmıştır (Şekil 23).



Şekil 23: Format konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

#### 4.9.2 Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

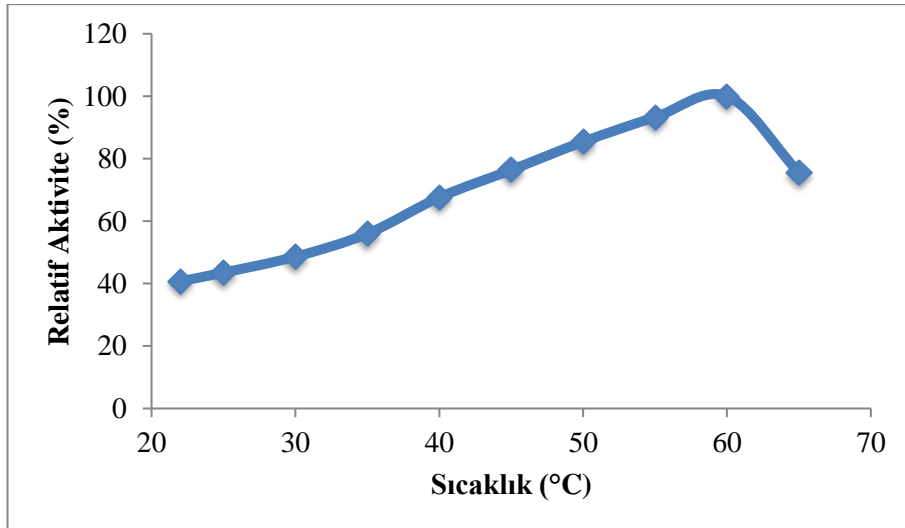
Rekombinant FDH enziminin optimum aktivite göstereceği tampon çözelti ve pH değerini bulmak için pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 olan potasyum fosfat ve Tris tamponları hazırlanmıştır. 20 mM tampon çözelti, 40 mM format, 1 mM NAD, 5 µl rekombinant FDH enzimi ve distile su ile toplam 300 µl hacimde hazırlanan reaksiyon karışımları 25°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. Örneklerin 340 nm’deki absorbanslarına bakılarak yapılan değerlendirmede en yüksek absorbansın 0.584 değeriyle pH 8.0 Tris tampon çözeltisinden elde edildiği görülmüştür (Şekil 24). İdeal pH’lı tampon seçilen bu çözelti yapılan aktivite testlerinde temel tampon olarak kullanılmıştır.



Şekil 24: Tampon çözelti ve pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

#### 4.9.3 Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Sıcaklığın rekombinant FDH enzim aktivitesine olan etkisini görmek için pH 8.0 Tris tamponunda, 40 mM konsantrasyonlu format substratının varlığında hazırlanan reaksiyon karışımları 22°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C sıcaklıklarında 10 dk inkübe edilmiş ve 340 nm'deki absorbans değerlerine bakılmıştır. 22°C-60°C sıcaklık değerleri arasında absorbansın arttığı, 60°C'da maksimum absorbans değerine ulaşıldığı ve bu sıcaklıktan sonra absorbans değerinin düşmesi ile birlikte aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25: Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma, farmasötik endüstrisi ve rutin biyokimya laboratuvarları için önemli olan NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enziminin rekombinant yöntemlerle üretilerek aktif bir şekilde kullanılmasını sağlamak ve biyokimyasal moleküllerin tayininde kullanılması planlanan tanı kiti için gereken FDH enzimini tedarik etmek amacıyla yapılmıştır.

NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH; format iyonunun CO<sub>2</sub>'ye yükseltgenmesini, NAD<sup>+</sup> molekülünün NADH'a indirgenmesini katalizleyen, metilotrof mikroorganizmalarda bulunan metanol yolağının son enzimidir. Çeşitli metilotrof bakteri ve mayalardaki NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH enzimleri dizi analizleri ve aktivite testleri ile incelenmiş ve tanımlanmıştır. Bunların arasında, *Candida* cinsine ait mayaların sahip olduğu enzimlerin yüksek aktivite gösterdiği ve kararlı olduğu tespit edilmiştir. FDH enzimin ticari üretimine geçildiğinde *C. boidinii* sahip olduğu avantajlı özellikleri ile model organizma seçilmiştir.

Günümüzde, çeşitli ilaç şirketleri büyük ölçekte gerçekleştirdikleri farmasötik bileşiklerin üretiminde ekonomik ve çevresel nedenlerden dolayı enzimatik kofaktör rejenerasyon yöntemlerini tercih etmektedir. FDH, farmasötik endüstrisinde optikçe aktif bileşiklerin üretimi sırasında ana reaksiyon için gereken kofaktörlerin geri dönüştürülmesini sağlayan ikinci enzim olarak kullanılmaktadır. HIV tedavisinde antiviral etkiye sahip Atazanavir (Bristol-Myers Squibb), sıtma tedavisinde antimalaryal etkiye sahip Amorphadiene (Sanofi ve Amyris), antiviral ajanlardan rinovirüs proteaz inhibitörlerinin yapıtaşlarından (*R*)-3-(4-florofenil)-2-hidroksi propiyonat (Pfizer) ve farmasötik ürünlerde kiral ara ürün olarak kullanılan Trimetil L-lösin (Degussa) bileşiklerinin ticari üretiminde FDH tarafından katalizlenen NADH rejenerasyon yöntemi ile sistem içerisinde kofaktör dönüşümü sağlanmaktadır [115]. Medikal alanda, biyokimyasal tanılamada kullanılan FDH enzimi birçok ticari kitin içeriğinde yer almaktadır. Metanol zehirlenmesi teşhisi için piyasaya sürülen kitler (Sigma Aldrich, BioAssay Systems) idrar, serum, tam kan gibi biyolojik örneklerdeki metanol metabolizasyon ürünü olan formatın FDH enzimiyle yükseltgenmesi sonucu

oluşan NADH'ın saptanmasına olanak sağlayan, rutin uygulamalarda kullanılan pratik araçlardır. Üriner sistemde birikerek taş oluşturan kalsiyum oksalat bileşiklerinin tespiti için geliştirilen, patenti alınan (US 5604111 A) ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemde, FDH enzimi, oksalat dekarboksilaz tarafından formata dönüştürülen oksalatın tayinini indirgenme ürünü olan NADH deteksiyonu ile sağlamaktadır [116]. Trikomonas vajiniti enfeksiyonunda, *T. vaginalis*'in ürettiği ve tanılama için önemli olan formik asit dolayısıyla format molekülünün saptanmasında, FDH enzimi aracılığıyla üretilen NADH ölçümünü baz alarak geliştirilen ve patenti alınan yöntem (Patent EP0556685A2, Patent CA2089186A1), tanılamada hızlı ve ekonomik bir yol olarak kullanılmaktadır [99].

Bu çalışmada, aktivitesi ve stabilitesi ticari FDH'a yakın olan bir enzim üretilmek istendiğinden gen kaynağı organizması olarak *C. boidinii* mayası (ATCC 18810 suşu) seçilmiştir. Organizmada FDH kodlayan gen intron içermediğinden doğrudan genomik DNA izolasyonu ile klonlama çalışmalarına başlanabildiği görülmüştür. FDH enziminin klonlanması, pTZR57R/T ve pET14-b vektörleri kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, yaygın bir klonlama tekniği olan TA klonlama ile 3'-A kuyruğu eklenmiş PCR ürünleri pTZR57R/T klonlama vektörüne aktarılmıştır. Bu klonlama basamağında, PCR ürünlerindeki adenin eklentisi ile vektör üzerinde hazır bulunan timin çıkıntısının birbirine gösterdiği afinite ile birleşme gerçekleşmiştir. Elde edilen rekombinant pTZR57R/T+FDH vektörü NdeI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, hedef gen bölgesi agaroz jelden izole edilmiş, aynı enzimler ile kesilerek hedef gen bölgesi için komplementer hale getirilmiş pET14-b ekspresyon vektörüne aktarılmıştır.

Klonlama aşamalarında konak organizma olarak içerdiği lacZΔM15 mutasyonu ile rekombinant vektörü içine almayan hücreleri kromojenik olarak gösteren ve duplikasyon süresini kısaltan modifikasyonlar içeren *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri kullanılmıştır.

pET14-b vektörüne klonlanan FDH gen dizisi ile veri bankalarında bulunan *C. boidinii* FDH gen dizisi kıyaslandığında %92 oranında benzerlik yakalandığı, farklılık gösteren nükleotitlerin durdurma kodonu oluşturmadığı ve fonksiyonel bir protein üretimine engel olmadığı görülmüştür. Veri bankalarında FDH enzimini oluşturduğu belirlenen aminoasit dizisi ile dizileme sonucuna göre proteinde olması beklenen aminoasit dizisi karşılaştırıldığında %94 oranında benzerlik bulunmuştur. Elde edilen bu varyant



formun enzimin aktivitesini engelleyecek bir etkiye bulunmadığı aktivite testlerinde anlaşılmıştır.

Rekombinant pET14-b/FDH vektörünün ekspresyonun indükleneyeceği *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) hücrelerine aktarımı yapılmıştır. Bu hücreler, hücre dışı ve yabancı proteinleri degrade eden Lon ve OmpT proteazlarını içermeyecek şekilde modifiye edilen en çok tercih edilen ekspresyon konakçılarından biridir [117, 118]. Sahip olduğu bu avantajlı özelliklerinden dolayı bu çalışmada da kullanılmıştır.

Rekombinant proteinlerin üretiminde en sık karşılaşılan problemlerden biri inklüzyon cisimciği oluşumudur. Sitoplazmada veya periplazmada çözünmeyen protein agregatları olan inklüzyon cisimciklerinin oluşmasında promotör cinsi, protein büyüklüğü, yetersiz disülfid bağı oluşumuyla düzgün katlanmanın olmaması, yüksek sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarında proteinlerin doğru katlanmaya fırsat bulamaması gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir [119]. Bu çalışmada, FDH geninin ekspresyonu IPTG ile indüklenmiştir. pET14-b vektörünün temin edildiği firmanın IPTG indüklemesi için önerdiği konsantrasyon aralığına uygun olarak 0.7 mM IPTG ile 250 rpm, 37°C'de 3 saat inkübasyon sonunda elde edilen proteinde inklüzyon cisimciği oluşumu gibi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

Eksprese edilen FDH proteini, pET14-b vektöründeki His-tag kodlama dizisi sayesinde N-terminalinde 6 adet histidin rezidüsü ile birlikte üretilmiştir. Histidin etiketi içeren rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında immobilize metal afinite kromatografisi yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir [120]. Histidin aminoasitlerinin nikel iyonlarına gösterdiği afiniteden faydalanarak, tek basamakta, proteinin doğal yapısının bozulmadığı koşullarda, minimum düzeyde protein kaybıyla FDH proteininin hücrede bulunan diğer proteinlerden ayrılması sağlanmıştır. Saf olarak elde edilen proteinden histidin etiketi kaldırılmamış ve bu durumun enzimin üç boyutlu yapısını değiştirerek aktivitesini olumsuz etkilemediği görülmüştür.

IPTG ilavesinin ardından 3 saatlik inkübasyon süresince birer saat aralıklarla alınan kaba özüt örneklerindeki ve pürifikasyon işleminden sonra saf olarak elde edilen FDH proteinleri denatüre edilerek SDS-PAGE ve Western blot analizleri yapıldığında gen ekspresyonunun IPTG ile başarılı bir şekilde indüklendiği ve beklenen 41 kDa büyüklüğündeki bantların elde edildiği görülmüştür. IPTG eklenmeden önce alınan örnekte (0. saat), hedef protein için beklenen bant büyüklüğü bölgesinde ince bir

çizgi olarak protein bandı gözükmiştir. Bu durum, indüklenme olmadan önce proteinin bazal ekspresyon seviyesinde üretildiğini işaret edebilir. Sızıntılı ekspresyon olarak bilinen bu durum BL21 (DE3) hücrelerinde ve lac operonunun kullanıldığı sistemlerde karşılaşılabilen bir durumdur [121]. Lac represör proteininin DNA'daki operatörlere %100 verimle bağlanamaması sonucu lac operon promotöründeki gen transkripsiyonu durdurulamadığından ekspresyon olduğu düşünülmektedir. IPTG ilavesinden sonra artan inkübasyon süresiyle birlikte genişleyen protein bantlarının görülmesi protein üretiminin arttığını göstermiştir. İndüksiyondan önce ve sonra bant genişlikleri açısından belirgin bir fark gözlemlendiğinden ve üretilen FDH proteininin hücre üzerinde toksik bir etkisi olmadığından sızıntının bir sorun teşkil etmediği sonucuna varılmıştır. Rekombinant proteinin taşıdığı histidin etiketini tanıyan anti 6-histidin antikoru aracılığıyla FDH proteininin varlığı Western blot yöntemiyle de kanıtlanmıştır.

FDH enziminin aktivitesi, enzimatik reaksiyon ürünü olan NADH molekülünün 340 nm'de gösterdiği absorbans ile belirlenmektedir. Absorbans artışı, FDH aktivitesi sonucu üretilen NADH konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu çalışmada, maksimum düzeyde absorbansın görüldüğü reaksiyonlar 40 mM format substratı ve 1 mM koenzim NAD<sup>+</sup> çözeltisi içeren karışımlarla gerçekleştirilmiştir. 6.66 mM format konsantrasyonu ile başlatılan aktivite testinde yaklaşık 26 mM substrat konsantrasyonuna kadar absorbansın hızla arttığı, bu noktadan itibaren artışın yavaşladığı, yaklaşık 30 mM'den sonra artan substrat konsantrasyonun absorbans artışına yol açmadığı görülmüş ve muhtemel sebep olarak enzimlerin bağlanabileceği kadar substrata bağlanarak doygunluğa erişmiş olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda rekombinant olarak elde edilen FDH enzimlerinin aktivite ölçümlerinde sıklıkla kimyasal kararlılığı yüksek, biyokimyasal olarak inert, pH aralığı 7.5-8.5 arasında değişen potasyum fosfat, sodyum fosfat, sodyum asetat, Tris asetat ve Tris hidroklorür çözeltilerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada üretilen enzime uygun tamponu bulmak için pH 7.0-9.0 arasında 0.5'lik aralıklarla artan potasyum fosfat ve Tris çözeltileri hazırlanmıştır. Absorbansın, dolayısıyla aktivitenin en fazla pH 8.0 Tris çözeltisinde olduğu görülmüş ve yapılan testlerde temel tampon olarak kullanılmıştır. Elde edilen bu sonuç literatürdeki sonuçları destekler niteliktedir.

Yapılan alışmalarda *C. boidinii* mayasının farklı suşlarından doğrudan elde edilen FDH enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 45-55°C aralığında olduğu, genellikle 55°C'e kadar reaksiyon hızının doğrusal olarak arttığı, yaklaşık 57°C'de 20 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitenin %50'sinin kaybolduğu görülmüştür. *C. boidinii* maya kaynaklı FDH geni rekombinant olarak *E. coli* bakterilerinde üretildiğinde ideal sıcaklığın 57°C civarında olduğu saptanmıştır. Belirli aminoasit rezidülerinin mutasyona maruz bırakılması sonucu ideal aktivite sıcaklığının 62°C'ye kadar çıktığı görülmüştür. Bu çalışmada da literatürdeki bilgilere benzer sonuçlar elde edilmiştir. 22°C'den başlayarak 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C'a kadar çıkan sıcaklıklarda 340 nm'deki absorbans değerleri sürekli artmış, 60°C'da maksimum absorbans görüldükten sonra aktivite düşmeye başlamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada *C. boidinii* mayasındaki FDH geni *E. coli* hücrelerinde başarılı bir şekilde klonlanmış, eksprese edilmiş ve aktif bir enzim üretilerek karakterize edilmiştir. Üretilen bu enzim rutin biyokimya laboratuvarında hasta örnekleri ile test edildiğinde, tanılama kullanılan ticari enzimin başarisına yakın sonuçlar elde edilmiştir. Yapılacak daha ileri optimizasyon çalışmaları sonrası rekombinant FDH'in rutin laboratuvar uygulamalarında kullanıma aday bir enzim olduğu sonucuna varılmıştır. Yerli kaynaklarla endüstriyel ölçekte üretimin gerçekleşmesi durumunda ülke ekonomisine büyük katkı sağlanacağı açıktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; *C. boidinii* ATCC 18810 mayasındaki 1104 bp uzunluğundaki NAD<sup>+</sup>-bağımlı FDH geni *E. coli* hücrelerinde başarılı bir şekilde klonlanmış, eksprese edilmiş ve yaklaşık 41 kDa büyüklüğünde aktif bir enzim üretilmiştir. Üretilen bu enzimi kodlayan genin nükleotit dizisi veri tabanında ilgili genin nükleotit dizisi ile kıyaslandığında %92 benzerlik, nükleik asit dizilimine göre oluşması beklenen aminoasit dizisi ile veri tabanındaki aminoasit dizisi ise %94 benzerlik göstermiştir. Farklılık gösteren kısımlar aktif bir enzim üretimine engel olmamıştır. Aktivite için önemli olan sıcaklık ve pH gibi karakteristik enzim özellikleri literatürde bulunan diğer *C. boidinii* suşlarından belirgin bir fark göstermemiştir. Bazik bir ortam olan pH 8.0 Tris tampon çözeltisinde sıcaklık 60°C'a ulaşıncaya dek aktivite gösteren bir enzim olmuştur.

Yurtdışındaki kaynaklardan pahalı bir şekilde alımı gerçekleştirilen bu enzimin laboratuvar ölçeğinde ucuz bir maliyetle ve yüksek etkinlikle rekombinant olarak üretilebildiği görülmüştür. Pilot ve sonrasında endüstriyel ölçekte üretime geçilebilmesi için enzimin kinetik özellikleri ayrıntılı bir şekilde çalışılmalı, gerekirse aktivasyonu ve stabilizasyonu artıracak genetik modifikasyonlar yapılmalı; kültür şartları, indüksiyon ve enzimin aktivite gösterdiği reaksiyon koşulları büyük ölçeğe göre optimize edilmelidir.

FDH, klinik tanılama ve endüstri için oldukça kullanışlı ve gerekli olduğundan daha kaliteli ve stabil bir şekilde eldesi için hala üzerinde çalışılan bir enzimdir. Enzimin aktif sistein aminoasitlerinden kaynaklanan düşük dayanıklılığı, endüstri koşullarındaki çok yüksek sıcaklıklarda inaktive olması, NAD<sup>+</sup> kofaktörüne yüksek ilgi gösterirken NADP<sup>+</sup> kofaktörüne ilgisinin olmaması gibi durumları iyileştirmek için protein mühendisliği teknikleriyle enzim üzerinde çeşitli modifikasyonlar ve mutasyonlar oluşturularak mevcut enzimlerden daha iyi bir enzim üretilebilir mi sorusunun cevabı aranmaya devam etmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] **The Discovery and Naming of *Candida albicans***. McCool, L. Retrieved from <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/DiscoveryNaming%20of%20Candida%20albicans.asp>.
- [2] **Knoke, M. and Bernhardt, H.** (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839, *Mycoses* 49(4): 283-287.
- [3] **Asensio, J.A. and Trunkey, D.D.** (2016). *Current Therapy of Trauma and Surgical Critical Care*, Elsevier.
- [4] **Who named it?** . Enersen, O.D. Retrieved from <http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/23.html>.
- [5] **Yiş, R.** (2007). *Candida Türlerinin Restriksiyon Enzim Analizi ile İdentifikasyonu*. (Tıpta Uzmanlık ). Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- [6] **Yarar, M.** (2014). *Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarında SAP Genlerinin Araştırılması*. (Tıpta Uzmanlık). Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- [7] **Barnett, J.A.** (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy, *Yeast* 21(14): 1141–1193.
- [8] **William E. Dismukes, P.G.P., Jack D. Sobel** (Eds.). (2003). *Clinical Mycology*, Oxford University Press.
- [9] ***Candida boidinii***. (2011). Retrieved from <http://www.westerdijkinstituut.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000012&Rec=74&Fields=All>.
- [10] **Webster, J. and Weber, R.** (2007). *Introduction to Fungi*. New York, Cambridge University Press.
- [11] **Becze, G.I.d.** (1955). A Microbiological Process Report. Yeasts: I. Morphology, *Applied and Environmental Microbiology* 4(1): 1-12.
- [12] **Neidleman, S.L. and Laskin, A.I.**,(Eds.). (1991). *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press.
- [13] **Brand, A.** (2012). Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence, *Int J Microbiol* 2012: 517529.
- [14] **Özer, S.** (2006). *Kan Örneklerinde Polimeraz Zincir Tepkimesi Yöntemi ile *Candida DNA*'sının Saptanması*. (Yüksek Lisans). Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- [15] **Şen, S.** (2013). *Bazı antifungal ilaçların *Candida spp.* türlerine karşı in vitro aktiviteleri üzerine quorum sensing molekülü olan farnesolün etkisinin araştırılması*. (Yüksek Lisans). İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

- [16] Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Murgui, A., Martinez, J. P. (2004). Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens, *FEMS Immunol Med Microbiol* 41(3): 187-196.
- [17] Calderone, R.A. and Braun, P.C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*, *Microbiol Rev* 55(1): 1-20.
- [18] *Candida boidinii*. C.Ramírez (1953). Retrieved from <http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000089&Rec=163&Fields=All>.
- [19] Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., Mendes Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *J Med Microbiol* 62(Pt 1): 10-24.
- [20] Smeekens, S.P., van de Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., Netea, M. G. (2013). Genetic susceptibility to *Candida* infections, *EMBO Mol Med* 5(6): 805-813.
- [21] Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, *PLoS Pathog* 9(9): e1003550.
- [22] Gürbüz, M. (2008). *Klinik örneklerden izole edilen Candida albicans kökenlerinin moleküler analizi*. (Tıpta Uzmanlık). Pamukkale Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- [23] Gazendam, R.P., van Hamme, J. L., Tool, A. T., van Houdt, M., Verkuijlen, P. J., Herbst, M., Liese, J. G., van de Veerdonk, F. L., Roos, D., van den Berg, T. K., Kuijpers, T. W. (2014). Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects, *Blood* 124(4): 590-597.
- [24] Hemmann, S., Blaser, K., Cramer, R. (1997). Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes, *Am J Respir Crit Care Med* 156(6): 1956-1962.
- [25] *Candida boidinii* C. Ramírez. (1953). Microbiología Española Retrieved from <http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000011&Rec=1284&Fields=All>.
- [26] Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2009). Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*, *Biotechnol Appl Biochem* 53(2): 85-92.
- [27] Yurimoto, H., Oku, M., Sakai, Y. (2011). Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis, *Int J Microbiol* 2011: 101298.
- [28] Hartner, F.S. and Glieder, A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts, *Microb Cell Fact* 5: 39.
- [29] Oana Negruță, O.C., Ileana Stoica (2010). Methylotrophic yeasts: Diversity and methanol metabolism, *Romanian Biotechnological Letters* 15(4): 5369-5375.
- [30] Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach, The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts*. United States, Sinauer Associates.

- [31] Nelson, D., and Cox, M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. New York, W.H. Freeman and Company.
- [32] Torun, S. (2016). *Increasing specific activity of NAD<sup>+</sup>-dependent Q105R mutant of candida methylica formate dehydrogenase*. (Yüksek Lisans). İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Bilim Dalı, İstanbul.
- [33] **Mechanism of Enzyme Action**. Ophardt, C. (2003). Virtual Chembook. Retrieved from <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/571lockkey.html>
- [34] Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2000). *Biochemistry*, Benjamin Cummings.
- [35] **Enzyme Nomenclature**. Moss, G.P. (1992, 12 March, 2017). Retrieved from <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- [36] Pollak, N., Dolle, C., Ziegler, M. (2007). The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions, *Biochem J* 402(2): 205-218.
- [37] Windholz, M., Budavari, Susan, Merck & Co (1983). The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. United States, Rahway, N.J. : Merck & Co.
- [38] Biellmann, J.F., Lapinte, C., Haid, E., Weimann, G. (1979). Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme, *Biochemistry* 18(7): 1212-1217.
- [39] Dawson, R.M.C. (1986). *Data for biochemical research*, Clarendon Press
- [40] Lakowicz, J.R., Szmecinski, H., Nowaczyk, K., Johnson, M. L. (1992). Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(4): 1271-1275.
- [41] Yamada, K., Hara, N., Shibata, T., Osago, H., Tsuchiya, M. (2006). The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal Biochem* 352(2): 282-285.
- [42] Todisco, S., Agrimi, G., Castegna, A., Palmieri, F. (2006). Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 281(3): 1524-1531.
- [43] Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic Biol Med* 30(11): 1191-1212.
- [44] Foster, J.W. and Moat, A.G. (1980). Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems, *Microbiol Rev* 44(1): 83-105.
- [45] Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F., Leo, O. (2003). Reconstructing eukaryotic NAD metabolism, *Bioessays* 25(7): 683-690.
- [46] David Nicholls and Ferguson, S. (2002). *Bioenergetics*, Academic Press.
- [47] Ziegler, M. (2000). New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling, *Eur J Biochem* 267(6): 1550-1564.
- [48] Tishkov, V.I. and Popov, V.O. (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry (Mosc)* 69(11): 1252-1267.
- [49] Alekseeva, A.A., Savin, S. S., Tishkov, V. I. (2011). NAD(+)-dependent Formate Dehydrogenase from Plants, *Acta Naturae* 3(4): 38-54.

- [50] **Allen, S.J. and Holbrook, J.J.** (1995). Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylolica*, *Gene* 162(1): 99-104.
- [51] **Khangulov, S.V., Gladyshev, V. N., Dismukes, G. C., Stadtman, T. C.** (1998). Selenium-containing formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*: a molybdopterin enzyme that catalyzes formate oxidation without oxygen transfer, *Biochemistry* 37(10): 3518-3528.
- [52] **Michael P. Farinelli, D.W.F., and Keith E. Richardson** (1983). Isolation, Purification, and Partial Characterization of Formate Dehydrogenase from Soybean Seed, *Plant Physiol.* 73: 858-859.
- [53] **Davison, D.C.** (1951). Studies on plant formic dehydrogenase, *Biochem J* 49(4): 520-526.
- [54] **Colas des Francs-Small, C., Ambard-Bretteville, F., Darpas, A., Sallantin, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C., and Remy, R.** (1992). Variation of the Polypeptide Composition of Mitochondria Isolated from Different Potato Tissues, *Plant Physiol.* 98(1): 273-278.
- [55] **Thompson, P., Bowsher, C. G., & Tobin, A. K.** (1998). Heterogeneity of Mitochondrial Protein Biogenesis during Primary Leaf Development in Barley, *Plant Physiology* 118(3): 1089-1099.
- [56] **Vladimir O. Popov and Lamzin, V.S.** (1994). NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase *Biochemical Journal* 301: 625-643.
- [57] **Vladimir O. Popov and I. Tishkov, V.** (2003). *NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. From a model enzyme to a versatile biocatalyst.* Kerala, Research Signpost.
- [58] **Schirwitz, K., Schmidt, A., Lamzin, V. S.** (2007). High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, *Protein Sci* 16(6): 1146-1156.
- [59] **Lamzin, V.S., Aleshin, A. E., Strokopytov, B. V., Yuxhnevich, M. G., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H., Wilson, K. S.** (1992). Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase, *Eur J Biochem* 206(2): 441-452.
- [60] **Crystal Structure Of Candida Boidinii Formate Dehydrogenase.** Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?showseq=1&mmdbid=138843&buidx=1>.
- [61] **Labrou, N.E. and Rigden, D.J.** (2001). Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase, *Biochem J* 354(Pt 2): 455-463.
- [62] **Peacock, D. and Boulter, D.** (1970). Kinetic studies of formate dehydrogenase, *Biochem J* 120(4): 763-769.
- [63] **Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R., Pohl, M.** (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues, *Eur J Biochem* 267(5): 1280-1289.
- [64] **Schute, H., Flossdorf, J., Sahn, H., Kula, M. R.** (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, *Eur J Biochem* 62(1): 151-160.
- [65] **Nguyen, L.A., He, H., Pham-Huy, C.** (2006). Chiral drugs: an overview, *Int J Biomed Sci* 2(2): 85-100.
- [66] **Development of New Stereoisomeric Drugs.** FDA, U.S. (1992, 12/07/2014 ). Retrieved 5/1/1992, Retrieved from



<https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>.

- [67] **Klibanov, A.M. and Cambou, B.** (1987). Enzymatic production of optically active compounds in biphasic aqueous-organic systems, *Methods Enzymol* 136: 117-137.
- [68] **Dixon, M. and Zervas, L.G.** (1940). The role of coenzymes in dehydrogenase systems, *Biochem J* 34(3): 371-391.
- [69] **Uppada, V.** (2014). Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis, *Current science* 106(7).
- [70] **Moore, J.C., Pollard, D. J., Kosjek, B., Devine, P. N.** (2007). Advances in the enzymatic reduction of ketones, *Acc Chem Res* 40(12): 1412-1419.
- [71] **Frohlich, P., Albert, K., Bertau, M.** (2011). Formate dehydrogenase-a biocatalyst with novel applications in organic chemistry, *Org Biomol Chem* 9(22): 7941-7950.
- [72] **Chi Huey Wong, G.M.W.** (1983). Enzyme-catalyzed organic synthesis: regeneration of deuterated nicotinamide cofactors for use in large-scale enzymatic synthesis of deuterated substances, *Journal of the American Chemical Society* 105(15).
- [73] **Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., Drauz, K.** (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol* 69(1): 1-8.
- [74] **Goldberg, S.L., Nanduri, Venkata B., Chu, Linda, Johnston, Robert M., Patel, Ramesh N.** (2006). Enantioselective microbial reduction of 6-oxo-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione: Cloning and expression of reductases, *Enzyme and Microbial Technology* 39(7): 1441-1450.
- [75] **Ronald L. Hanson, S.L.G., David B. Brzozowski, Thomas P. Tully, Dana Cazzulino, William L. Parker, Olav K. Lyngberg, Truc C. Vu, Michael K. Wong, and Ramesh N. Patel** (2007). Preparation of an Amino Acid Intermediate for the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor, Saxagliptin, using a Modified Phenylalanine Dehydrogenase, *Advanced Synthesis & Catalysis* 349: 1369–1378.
- [76] **Davis, S.C., Grate, J.H., Gray, D.R., Gruber, J.M., Huisman, G.W., Ma, S.K., Newman, L.M., Sheldon, R., Wang, L.A.** (2010). *U.S. Patent No. 7807423* (B2). Retrieved from <https://www.google.com/patents/US7807423>.
- [77] **Tao, J. and McGee, K.** (2002). Development of a Continuous Enzymatic Process for the Preparation of (R)-3-(4-Fluorophenyl)-2-hydroxy Propionic Acid, *Organic Process Research & Development* 6(4): 520-524.
- [78] **Kruse, J.A.** (1992). Methanol poisoning, *Intensive Care Med* 18(7): 391-397.
- [79] **Methanol.** Bozza-Marrubini M, B.A., Locatelli C, Ruggeroni ML (1988, August 2001). Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim335.htm>.
- [80] **Metil Alkol Zehirlenmesi.** ATUDER. Retrieved from [www.atuder.org.tr/FileOut.aspx?url=c8KkA1kD6oiOTcipYjmB](http://www.atuder.org.tr/FileOut.aspx?url=c8KkA1kD6oiOTcipYjmB).
- [81] **Methanol poisoning outbreaks.** (2014). World Health Organization. Retrieved from [http://www.who.int/environmental\\_health\\_emergencies/poisoning/methanol\\_information](http://www.who.int/environmental_health_emergencies/poisoning/methanol_information).

- [82] Hovda, K.E., Gadeholt, G., Evtodienko, V., Jacobsen, D. (2015). A novel bedside diagnostic test for methanol poisoning using dry chemistry for formate, *Scand J Clin Lab Invest* 75(7): 610-614.
- [83] Hovda, K.E., Urdal, P., Jacobsen, D. (2005). Increased serum formate in the diagnosis of methanol poisoning, *J Anal Toxicol* 29(6): 586-588.
- [84] Barceloux, D.G., Bond, G. R., Krenzelok, E. P., Cooper, H., Vale, J. A. (2002). American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning, *J Toxicol Clin Toxicol* 40(4): 415-446.
- [85] Shahangian, S., Robinson, V. L., Jennison, T. A. (1984). Formate concentrations in a case of methanol ingestion, *Clin Chem* 30(8): 1413-1414.
- [86] Roberts, D.M., Yates, C., Megarbane, B., Winchester, J. F., Maclaren, R., Gosselin, S., Nolin, T. D., Lavergne, V., Hoffman, R. S., Ghannoum, M. (2015). Recommendations for the role of extracorporeal treatments in the management of acute methanol poisoning: a systematic review and consensus statement, *Crit Care Med* 43(2): 461-472.
- [87] Barbas, C., Garcia, A., Saavedra, L., Muros, M. (2002). Urinary analysis of nephrolithiasis markers, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781(1-2): 433-455.
- [88] Brzica, H., Breljak, D., Burckhardt, B. C., Burckhardt, G., Sabolic, I. (2013). Oxalate: from the environment to kidney stones, *Arh Hig Rada Toksikol* 64(4): 609-630.
- [89] Özkavukcu, E. (2003). *Üriner taşlarda dansitometrik inceleme ve renkli Doppler US'de izlenen "twinkling artefaktı" ile korelasyonu.* (Tıpta Uzmanlık). Ankara Üniversitesi, Radyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- [90] Bihl, G. and Meyers, A. (2001). Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management, *Lancet* 358(9282): 651-656.
- [91] Chou, Y.H., Li, C. C., Wu, W. J., Juan, Y. S., Huang, S. P., Lee, Y. C., Liu, C. C., Li, W. M., Huang, C. H., Chang, A. W. (2007). Urinary stone analysis of 1,000 patients in southern Taiwan, *Kaohsiung J Med Sci* 23(2): 63-66.
- [92] Daudon, M., Donsimoni, R., Hennequin, C., Fellahi, S., Le Moel, G., Paris, M., Troupel, S., Lacour, B. (1995). Sex- and age-related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy, *Urol Res* 23(5): 319-326.
- [93] Rose, G.A.,(Eds.). (1988). *Oxalate Metabolism in Relation to Urinary Stone. The Bloomsbury Series in Clinical Science*, Springer.
- [94] Urdal, P. (1984). Enzymic assay for oxalate in unprocessed urine, as adapted for a centrifugal analyzer, *Clin Chem* 30(6): 911-913.
- [95] Paul O. Schwille, L.H.S., William G. Robertson, Winfried Vahlensieck (1985). *Urolithiasis and Related Clinical Research*, Springer.
- [96] Kohlbecker, G. and Butz, M. (1981). Direct spectrophotometric determination of serum and urinary oxalate with oxalate oxidase, *J Clin Chem Clin Biochem* 19(11): 1103-1106.
- [97] Potezny, N., Bais, R., O'Loughlin, P. D., Edwards, J. B., Rofe, A. M., Conyers, R. A. (1983). Urinary oxalate determination by use of immobilized oxalate oxidase in a continuous-flow system, *Clin Chem* 29(1): 16-20.

- [98] Coleman, J.S., Gaydos, C. A., Witter, F. (2013). Trichomonas vaginalis vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies, *Obstet Gynecol Surv* 68(1): 43-50.
- [99] Miller, C.A. (1993). *European Patent No. EP0556685 (A2)* Retrieved from <https://www.google.com/patents/EP0556685A2?cl=en>.
- [100] Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis, *Clin Microbiol Rev* 11(2): 300-317.
- [101] Donbraye, E.D.-E., O. O. B.; Okonko, I. O.; Okedeji, I. O.; Alli, J. A.; Nwanze, J. C. (2010). Detection and prevalence of Trichomonas vaginalis among pregnant women in Ibadan, Southwestern Nigeria, *World Applied Sciences Journal* 11(12): 1512-1517.
- [102] Moodley, P., Wilkinson, D., Connolly, C., Moodley, J., Sturm, A. W. (2002). Trichomonas vaginalis is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus, *Clin Infect Dis* 34(4): 519-522.
- [103] Kissinger, P. and Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review, *Sex Transm Infect* 89(6): 426-433.
- [104] Kissinger, P. (2015). Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues, *BMC Infect Dis* 15: 307.
- [105] Briselden, A.M. and Hillier, S.L. (1994). Evaluation of affirm VP Microbial Identification Test for Gardnerella vaginalis and Trichomonas vaginalis, *J Clin Microbiol* 32(1): 148-152.
- [106] Şahin, O. (2013). *Rekombinant DNA Teknolojisinin Eczacılıktaki Uygulamaları* Erciyes Üniversitesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- [107] **Discovery of Recombinant DNA.** (2015). Retrieved from <https://dmohankumar.files.wordpress.com/2011/03/discovery-of-recombinant-dna.pdf>.
- [108] **Gen Klonlaması (Moleküler Klonlama).** Arda, P.D.M. Retrieved from <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EF79299488453EF356>.
- [109] Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech* 6(2): 174.
- [110] **Global Recombinant Protein Market Expected To Register CAGR of 8.1% Over 2016-2020.** (2016). Retrieved 2016-10-26, Retrieved from <http://www.gosreports.com/global-recombinant-protein-market-research-report-2016/>.
- [111] **Markets and Markets** (2016). *Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022.* (Report No: FB 2277) Markets, M. a.
- [112] Demain, A.L. and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnol Adv* 27(3): 297-306.
- [113] Topal, Ş. (2015). Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri, *DergiPark* 10(Issue).
- [114] Matti Leisola, J.J., Ossi Pastinen, Ossi Turunen, Hans E. Schoemaker Industrial Use of Enzymes, *Physiology and Maintenance* 2.

- [115] **P Gunasekaran, S.N., Ashok Pandey** (2016). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier.
- [116] **Peck, A.B.** (1997). *U.S. Patent No. 5604111 A*. Retrieved from <https://www.google.ch/patents/US5604111>.
- [117] **Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A.** (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front Microbiol* 5: 172.
- [118] **Strandberg, L. and Enfors, S.O.** (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 57(6): 1669-1674.
- [119] **Bornhorst, B.J. and Falke, J.J.** (2011). Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, *Protein Expr Purif*.
- [120] **Gopal, G.J. and Kumar, A.** (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*, *Protein J* 32(6): 419-425.
- [121] **Nielsen, B.L., Willis, V. C., Lin, C. Y.** (2007). Western blot analysis to illustrate relative control levels of the lac and ara promoters in *Escherichia coli*, *Biochem Mol Biol Educ* 35(2): 133-137.

## **EKLER**

**EK A:** Etik Kurul Onay Belgesi



**EK A****BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42)  
KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Format Dehidrogenaz Enziminin Candida Albicans'dan Moleküler Olarak Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu
-----------------------	--

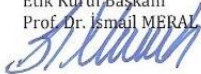
21.02.2017

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	egaslan@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Fahri AKBAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/>
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:4/75	Tarih: 21.02.2017		
	Yürütücülüğünü Doç. Dr. Fahri AKBAŞ ' in yaptığı "Format Dehidrogenaz Enziminin Candida Albicans'dan Moleküler Olarak Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu" başlıklı çalışmanın "Format Dehidrogenaz Enziminin Candida Boidinii Moleküler Olarak Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu" olarak isminin değiştirilmesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.			

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı  
Prof. Dr. İsmail MERAL

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Nazlı Arlı  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 01.10.1992 / İstanbul  
**E-posta** : nazliarli@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Fatih Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü
- **Yüksek lisans** : 2017, Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

