

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RASYONEL ENZİM TASARIMI YOLUYLA
NEOPULLULANAZİN OKSİDATİF VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI**

Selin ECE

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 29.07.2013

Bornova-İZMİR

2013

Selin Ece tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Rasyonel Enzim Tasarımı Yoluyla Neopullulanazın Oksidatif ve Termal Stabilitésinin Arttırılması” başlıklı bu alışma E.Ü. Lisansüstü Eđitim ve Öđretim Yönetmeliđi ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eđitim ve Öđretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.07.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

ÖZET**RASYONEL ENZİM TASARIMI YOLUYLA
NEOPULLULANAZIN OKSİDATİF VE TERMAL STABİLİTESİNİN
ARTTIRILMASI**

ECE, Selin

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serap EVRAN

Temmuz 2013, 66 sayfa

Bacillus stearothermophilus kaynaklı neopullulanaz (E.C. 3.2.1.135), α -1,4 ve α -1,6-glikozidik bağların hidrolizi veya α -1,4 ve α -1,6-glikozidik bağların oluşturulduğu transglikozilasyon reaksiyonlarını katalizleyebilen bir enzimdir. Nişasta ve deterjan endüstrilerinde yüksek kullanım potansiyeline sahip bir enzim olmasına rağmen, 60°C'den yüksek sıcaklıklarda ve oksidatif kimyasalların varlığında yüksek aktiviteye sahip değildir.

Bu çalışmada, neopullulanazın termal ve kimyasal kararlılığının rasyonel enzim dizaynı yoluyla artırılması amaçlandı. Bölge-yönlendirilmiş mutajenez kullanılarak, enzim yüzeyindeki oyuklara hacimli yan gruplara sahip amino asitler yerleştirildi. Kimyasal kararlılığın artırılması amacı ile metiyonin artığı oksidasyondan etkilenmeyen alanin ile değiştirildi. *E.coli* hücrelerinde rekombinant üretilen enzimler metal-şelat afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Mutant enzimlerin katalitik parametreleri ve kararlılık özellikleri doğal enzim ile karşılaştırıldı. Diferansiyel tarama kalorimetrisi ve sirküler dikroizm ölçümleri ile amino asit değişimlerinin protein kararlılığı ve sekonder yapı üzerindeki etkileri incelendi. Val533Leu ve Ala416Ile değişimlerinin termal kararlılık, Met475Ala değişiminin oksidatif kararlılık özelliklerini geliştirdiği belirlendi.

Anahtar sözcükler: Neopullulanaz, enzim mühendisliği, enzim kararlılığı, rasyonel dizayn.

ABSTRACT**INCREASING THE OXIDATIVE AND THERMAL STABILITY
OF NEOPULLULANASE BY RATIONAL ENZYME DESIGN**

ECE, Selin

MSc in Biochemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serap EVRAN

July 2013, 66 pages

Neopullulanase (E.C. 3.2.1.135) from *Bacillus stearothermophilus* catalyzes both the hydrolysis of α -1,4 and α -1,6 glycosidic linkages and α -1,4 and α -1,6 transglycosylation reactions. Although neopullulanase is a potentially valuable enzyme for starch and detergent industries, it loses its activity in the presence of oxidatives and at the temperatures over 60 °C.

In this work, we aimed to increase the thermal and oxidative stability of neopullulanase by means of rational enzyme design. Certain amino acid residues which are located in the surface cavities were exchanged with the amino acids involving larger sidechains. In order to increase the chemical stability, one methionine residue was mutated to alanine, which is not prone to oxidation. Wild-type neopullulanase and its variants were recombinantly expressed in *E.coli* cells and purified by metal chelate affinity chromatography. The catalytic parameters and stability profiles of mutant enzymes were compared with those of wild-type neopullulanase. The effects of amino acid exchanges on the protein stability and secondary structure were investigated by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. It was concluded that Val533Leu and Ala416Ile exchanges resulted in enhanced thermal stability and Met475Ala exchange resulted in improved oxidative stability.

Key words: Neopullulanase, enzyme engineering, enzyme stability, rational design.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli görüş ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Serap EVRAN' a, tez çalışmamın rasyonel dizayn ile ilgili bölümünde sağladığı katkıları, kıymetli görüş ve yorumları için sayın Prof. Dr. Rainer MERKL ve Jan-Oliver JANDA' ya, laboratuvarlarında tüm imkanlarını kullanarak çalışmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Reinhard STERNER'e, çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyerek tecrübelerini benim ile paylaşan başta Klaus-Jürgen TIEFENBACH olmak üzere Regensburg Üniversitesi Biyofizik ve Biyofizikokimya Enstitüsü' nün tüm çalışanlarına, aynı laboratuvarı paylaştığım, çalışmalarımın her anında desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım doktora öğrencisi Canan ÖZYURT ve yüksek lisans öğrencisi Handan ÖZTÜRK' e, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana yardımcı olan Araş. Gör. Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ ve Uzman Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK' e, TÜBİTAK-IntenC projesi kapsamında (TÜBİTAK 210T074) tez projemi maddi olarak destekleyen ve bana burs imkanı sağlayan TÜBİTAK'a ve desteklerini daima hissettiğim aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Pullulan ve Pullulan Hidrolizleyen Enzimler.....	1
1.2 Protein Mühendisliği.....	2
1.3 <i>Bacillus stearothermophilus</i> Neopullulanaz Enzimi.....	3
2. MATERYAL VE METOT.....	8
2.1 Kullanılan Bakteriler.....	8
2.1.1 <i>E. coli</i> Turbo.....	8
2.1.2 <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL.....	8
2.2 Vektörler	8
2.2.1 pET 21a (+).....	8

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3 PCR Primerleri.....	9
2.3.1 Vektöre spesifik primerler.....	9
2.3.2 Gene spesifik primerler	9
2.3.3 Belirlenen amino asit değişimlerine yönelik tasarlanan primerler.	9
2.4 DNA ve Protein Standartları.....	11
2.5 Enzimler.....	11
2.6 Kimyasallar.....	11
2.7 Kitler	11
2.8 Diğer Sarf Malzemeler.....	11
2.9 Cihazlar.....	12
2.10 <i>E.coli</i> Büyüme Ortamları	12
2.11 Tamponlar ve Çözeltiler.....	14
3. METOTLAR.....	15
3.1 Mikrobiyolojik Metotlar	15
3.1.1 Sterilizasyon.....	15
3.1.2 <i>E.coli</i> inkübasyon ve saklama koşulları.....	15
3.1.3 Kimyasal kompetent <i>E.coli</i> hücrelerinin hazırlanması.....	15

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.1.4 Kimyasal kompetent <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyon	16
3.2 Moleküler Biyoloji Metotları.....	16
3.2.1 <i>E.coli</i> 'den plazmit DNA ekstraksiyonu.....	16
3.2.2 Genomik DNA izolasyonu	17
3.2.3 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	18
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi.....	18
3.2.5 DNA'ya uygulanan enzimatik işlemler.....	19
3.2.6 DNA fragmentlerinin standart PCR ile çoğaltılması.....	21
3.2.7 Koloni PCR.....	22
3.2.8 Mutajenez yöntemleri.....	23
3.2.9 DNA dizi analizi.....	25
3.3 <i>E.coli</i> ' de Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması.....	25
3.3.1 Heterolog protein ifadesi ve nikel-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	25
3.4 Analitik Yöntemler.....	28
3.4.1 Protein konsantrasyonunun tayini.....	28
3.4.2 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel	

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
elektroforezi (SDS-PAGE).....	28
3.4.3 Doğal ve mutant neopullulanaz enzimlerinin karakterizasyonu...	29
3.5 Hesapsal Yöntemler.....	31
3.5.1 Esnek yüzey kavitelerini doldurma yaklaşımı ve Rosetta _{VIP}	31
3.5.2 Otomatize edilmiş kararlılık tahmin aracı ‘Eris’.....	32
3.5.3 Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik mutasyonların belirlenmesi.....	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1 Doğal Neopullulanazın Klonlanması, Üretilmesi, Saflaştırılması, Oksidatif ve Termal Kararlılığının İncelenmesi.....	34
4.2 Doğal Neopullulanazın Katalitik Parametrelerinin İncelenmesi.....	36
4.3 Mutant Neopullulanaz Gen Fragmentlerinin Oluşturulması, Varyantların Klonlanması, Üretilmesi ve Saflaştırılması.....	37
4.4 Doğal ve Mutant Neopullulanaz Varyantlarının CD Ölçüm Sonuçları.....	43
4.5 Doğal Neopullulanazın ve Mutant Varyantların DSC Ölçüm Sonuçları.....	52

İÇİNDEKİLER (Devam)Sayfa

4.6 Doğal Neopullulanaz ve Termal Kararlılığı Geliştirilmiş Varyantların Katalitik Aktiviteye Dayalı Kararlılık Sonuçları.....	55
4.7 Doğal Neopullulanazın ve Termal Kararlılığı Arttırılmış Varyantların Katalitik Parametreleri.....	58
4.8 Met475Ala Varyantının Oksidatif Kararlılığı.....	59
5. GENEL DEĞERLENDİRME.....	61
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>B. stearothermophilus</i> kaynaklı neopullulanazın dimer yapısının ribbon diyagramı.	4
1.2 <i>B. stearothermophilus</i> kaynaklı neopullulanaz protomeri.....	5
2.1 pET-21a(+) vektörü.....	9
3.1 Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu.....	19
3.2 Ligaz enziminin etki mekanizması.....	19
3.3 Ligasyon işlemi.....	20
3.4 Koloni PCR işleminin şematik gösterimi.....	21
3.5 SOE-PCR adımlarının şematik gösterimi.....	23
3.6 Quickchange TM adımlarının şematik olarak gösterimi.....	24
3.7 Metal şelat afinite kromatografisi matriksi.....	27
4.1 Gradient PCR sonucu elde edilen DNA bantlarının ve <i>B. stearothermophilus</i> genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü.....	34
4.2 Doğal neopullulanazın metal şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü ...	35
4.3 Neopullulanazın UV absorpsiyon spektrumu.....	35
4.4 Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile muamele edilen doğal neopullulanazın göreceli aktivitesindeki değişim.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Doğal neopullulanaza ilişkin α -siklodekstrin için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.....	37
4.6 Doğal neopullulanaza ilişkin β – siklodekstrin için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.....	37
4.7 Termal kararlılığı arttırmaya yönelik rasyonel dizayn yoluyla belirlenen amino asit artıklarının neopullulanaza ait A-protomerinin üç boyutlu yapısı üzerinde gösterimi.	38
4.8 Oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik amino asit değişiminin üç boyutlu yapı üzerinde gösterimi.....	39
4.9 Neopullulanazın içerdiği sekonder yapılar ve amino asit artıklarının korunmuşluk dereceleri.....	40
4.10 Val239Leu varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.	42
4.11 Val374Ile varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.	42
4.12 Ala566Leu varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 Doğal neopullulanazın termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.....	44
Şekil 4.14 Doğal neopullulanazın termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.....	44
4.15 Asn413Gln+Ala416Ile varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.....	45
4.16 Asn413Gln+Ala416Ile varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.....	46
4.17 Ser407Thr varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.....	46
4.18 Ser407Thr varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.....	47
4.19 Val533Leu varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.....	47
4.20 Val533Leu varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.....	48
4.21 Ala566Leu varyantının termal uygulama öncesinde alınan	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
CD spektrumu.....	48
4.22 Ala566Leu varyantının termal uygulama sonrasında	
alınan CD spektrumu.....	49
4.23 Asp46Glu varyantının termal uygulama öncesinde alınan	
CD spektrumu.....	49
4.24 Asp46Glu varyantının termal uygulama sonrasında alınan	
CD spektrumu.....	50
4.25 Asn413Gln varyantının termal uygulama öncesinde alınan	
CD spektrumu.....	50
4.26 Asn413Gln varyantının termal uygulama sonrasında	
alınan CD spektrumu.....	51
4.27 Ala416Ile varyantının termal uygulama öncesinde alınan	
CD spektrumu.....	51
4.28 Ala416Ile varyantının termal uygulama sonrasında alınan	
CD spektrumu.....	52
4.29 Doğal neopullulanaza ilişkin DSC ölçümü.....	52
4.30 Ala416Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.31 Ala566Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	53
4.32 Asn413Gln+Ala416Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	53
4.33 Ser407Thr varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	54
4.34 Val239Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	54
4.35 Val374Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	54
4.36 Val533Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.....	55
4.37 Doğal ve mutant enzimlerin 60°C’ deki termal kararlılıklarının karşılaştırılması.....	55
4.38 Doğal neopullulanaz ve Ala416Ile, Val533Leu varyantlarının 70°C’ deki termal kararlılıklarının karşılaştırılması.....	56
4.39 Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının termal kararlılıklarının 60°C’de zamana bağlı olarak karşılaştırılması.....	56
4.40 Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının termal kararlılıklarının 70°C’de zamana bağlı olarak karşılaştırılması.....	57
4.41 Val533 ve Ala416 artıklarının neopullulanaza ait A-protomerinin üç boyutlu yapısı üzerinde gösterimi.....	58
4.42 Met475Ala varyantının farklı konsantrasyonlardaki	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

H₂O₂ ile muamelesi sonucu kalan aktivitesi.....59

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>B. stearothermophilus</i> neopullulanaz enzimi üzerinde gerçekleştirilen protein mühendisliği çalışmaları ve sonuçları.....	6
3.1 Alkali lizis prensibi ile plazmit izolasyon yönteminde uygulanan basamaklar, kullanılan çözelti içerikleri ve kullanım amaçları.....	16
3.2 %12.5 SDS-PAGE jel hazırlamak için kullanılan çözeltiler.....	29
4.1 Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik belirlenen amino asit artıklarının bulundukları domainler.....	41
4.2 Metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılan varyantların protein konsatrasyonları.....	43
4.3 Substrat olarak β -siklodekstrin kullanılarak belirlenen katalitik parametreler.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

bp

Baz çifti

kDa

Kilodalton (1×10^3 g/mol)

Kısaltmalar

Açıklama

Ala

Alanin

Arg

Arginin

Asn

Asparagin

Asp

Aspartat

APS

Amonyum persülfat

B. stearothermophilus *Bacillus stearothermophilus*

CD

Sirküler dikroizm spektrofotometresi

DNS

Dinitrosalisilik asit

DSC

Diferansiyel tarama kalorimetresi

*E. coli**Escherichia coli*

Gln

Glutamin

Glu

Glutamat

Gly

Glisin

His

Histidin

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Ile	İzolösin
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozid
IDA	İminodiasetik asit
Leu	Lösin
Met	Metiyonin
<i>npl</i>	Neopullulanaz geni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
Thr	Treonin
Val	Valin

1.GİRİŞ

1.1Pullulan ve Pullulan Hidrolizleyen Enzimler

Pullulan, salgıladığı siyah renkli melanin pigmenti nedeniyle “siyah maya” olarak bilinen *Aureobasidium pullulans*’ın fermentasyon ortamından elde edilen non-iyonik bir polisakkarittir (Kumar *et al.*, 2012). İnvertaz, amilaz, glukoz oksidaz, β -glukozidaz, fruktoziltransferaz ve proteolitik enzimlerin küçük bir kısmı pullulan üzerinde aktivite gösterebilir. Pullulan ilk olarak Bender tarafından 1958 yılında bildirilmiş ve yapısı yine aynı grup tarafından 1959 yılında aydınlatılmıştır (Bender *et al.*, 1959). Pullulan, α -1,4-glikozidik bağları ile bağlanmış maltotrioz ünitelerinden meydana gelir. Bu maltotrioz üniteleri ise birbirine α -1,6-glikozidik bağlarıyla bağlıdır. Ekonomik olması, deniz alglerinden ve diğer bitkilerden üretilen benzer yapıdaki polimerler ile yarışabilecek niteliklere sahip olması pullulanın en büyük avantajlarından. Biyolojik olarak parçalanabilmesi nedeniyle gıda ambalaj filmlerinde, çabuk bozulan meyve ve sebzelerin taşınmasında kullanılan konteynerlerin kaplanmasında kullanılabilmektedir. Ayrıca non-toksik, non-immünojenik, non-karyojenik ve non-mutajenik özelliklerinden dolayı gen iletimi, hedefli ilaç terapisi, doku mühendisliği gibi alanlarda, yaraların iyileştirilmesinde ve daha bir çok biyomedikal uygulamada kullanılabilmektedir.

Bugüne kadar pullulanı hidrolizleyebilen dört farklı enzim bildirilmiştir (Kuriki *et al.*, 1988). (i) Glukoamilaz (EC 3.2.1.3) pullulanı indirgen olmayan uçlardan parçalayarak glukoz açığa çıkarır; (ii) *Klebsiella pneumoniae* kaynaklı pullulanaz (EC 3.2.1.41) pullulandaki α -1,6-D-glikozidik bağları hidrolizleyerek maltotrioz açığa çıkarır; (iii) *Aspergillus niger* kaynaklı izopullulanaz (EC 3.2.1.57) pullulandaki α -1,4-D-glikozidik bağları hidrolizleyerek izopanoz (α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-glukopiranoz) açığa çıkarır; (iv) neopullulanaz pullulandaki α -1,4-D-glikozidik bağları hidrolizleyerek panoz (α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopiranoz) açığa çıkarır.

Panoz, maltoz ve glukozun α -1,6-glikozidik bağ ile meydana getirdiği bir trisakkarittir (Hii *et al.*, 2012). Panoz, gıda pigmentlerinde meydana gelen renk solmasına karşı bir ajan, gıda anti-oksidan ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. İnsanın ağız florasındaki mikroorganizmalar tarafından fermente edilemediği için yiyecek ve içeceklerde kullanımı oldukça avantajlıdır. Ayrıca, ağızdaki bakterilerin sükrozu kullanarak ürettikleri çözünmez glukan sentezini inhibe etmesi nedeniyle, diş çürüklerini önlemeye yönelik ürünler için umut vericidir. İnsanların ince bağırsaklarında bulunan *Difidobacterium* ve *Lactobacillus* mikroorganizmalarının proliferasyonunu teşvik etmek ve *Salmonella* ve

Escherichia coli gibi istenmeyen bakterilerin büyümesini engellemek için de panoz kullanılabilir (C. Martin and A. M. Smith, 1995; Nakamura, 1996; Tester *et al.*, 2004). Tüm bu avantajlarına ve potansiyel kullanım alanlarına rağmen, endüstriyel proseslerde etkin bir biçimde çalışabilecek amilolitik enzimlerin eksikliğinden dolayı büyük ölçekte verimli panoz üretimi sağlanamamaktadır.

1.2 Protein Mühendisliği

En basit tanımıyla protein mühendisliği, istenen özelliklerin kazandırılması amacıyla protein yapısındaki amino asitlerin değiştirilmesi, yeni amino asitlerin eklenmesi veya yapıda var olan amino asitlerin uzaklaştırılmasını ifade etmektedir. Proteine kazandırılmak istenen özellik daha iyi katalitik aktivite, belli bir reseptöre veya liganda karşı daha yüksek afinite, iyileştirilmiş termal kararlılık veya çözünür fraksiyonda ekspresyon olabilir.

Protein mühendisliği uygulamalarında rasyonel dizayn ve yönlendirilmiş evrim olmak üzere iki temel yaklaşım vardır. Yönlendirilmiş evrimin temel esası laboratuvar ortamında doğal evrimi taklit etmeye dayanır. Rastgele mutasyonlar oluşturularak mutant varyantları içeren bir kütüphane elde edilir. Ardından bu kütüphanedeki varyant ilgili özellik için taranır ve istenen özelliğe sahip varyantlar seçilir (Eijsink *et al.*, 2004).

Rasyonel dizayn yaklaşımında, spesifik amino asit artıkları başka amino asit artıklarıyla değiştirilir ve böylece mutant protein oluşturulur. Bu yaklaşımda elde edilen mutant proteinler, doğal proteinin nükleotit dizisi üzerinde gerçekleştirilen nokta mutasyonlarını ve bunun sonucunda genellikle tek bir amino asit değişikliğini içerir. Tek bir amino asidin değiştirilmesi bile protein fonksiyonu üzerinde oldukça büyük değişikliklere neden olabilmektedir (Songyang *et al.* 1995).

Amino asit değişiklikleri, yapı-temelli modelleme veya dizi karşılaştırmaları sonucunda belirlenir. Bu değişiklikler, önceden belirlenen bölgelerde olmak koşulu ile, aktif merkez yakınında ya da proteinin geneline yayılmış olarak bulunabilir. Termal kararlılığı arttırılmak istenen bir enzim için iki farklı strateji uygulanabilir. Yapı-temelli stratejiye göre, yapı rijit ise enzim yüksek sıcaklıklarda daha karardır. Buna göre proteinin üç boyutlu yapısı esas alınarak disülfid bağları ve tuz köprüleri tasarlanabilir veya döngü bölgelerinde glisin yerine prolin yerleştirilebilir. Evrimsel-biyoinformatik esaslı stratejiye göre ise, kararlılığın sağlanmasında korunmuş amino asitlerin ana rolü oynadığı esas alınır. Bu strateji uygulandığında ilgili diziler karşılaştırılır ve hedef protein korunmuş diziyi içerecek şekilde değiştirilir.

Protein yapısı üzerinde istenen özelliği kazandıracak amino asidi seçebilmek için, o proteinin yapısının aydınlatılmış olması ve fonksiyonel mekanizmasının

bilinmesi gerekmektedir. Bir başka deyişle, rasyonel dizayn uygulanabilirlik açısından sadece yapısı bilinen proteinler ile kısıtlıdır.

Amilolitik enzimler, nişasta, kağıt ve deterjan endüstrisinde geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Guzman-Maldonado and Paredes-Lopez, 1995; Bajpai, 1999; Gupta et al., 2003). Bu endüstri kollarında mikrobiyal kontaminasyon riskini engellemek, substrat ve ürün çözünürlüğünü (dolayısıyla proses hızını) arttırmak için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca enzimlerin üretim ortamında bulunan oksitleyici ajanlara karşı da dayanıklı olması gerekmektedir. İstenilen bu özellikleri geliştirebilmek için rasyonel dizayn etkili bir biçimde kullanılmıştır. Örneğin, *Bacillus circulans* kaynaklı ksilanaz enziminin termal kararlılığı, esnek yüzey oyuklarının rasyonel dizaynı yoluyla iyileştirilmiştir. Yapı üzerinde belirlenen ikili ve üçlü mutasyonlar sonucu elde edilen mutant varyantların yarı ömrü doğal enzimin yarı ömrüne göre sırasıyla, 7.5 ve 15 kat artmıştır (Joo et al., 2010). *Bacillus licheniformis* kaynaklı α -amilaz enziminin kristal yapısı temel alınarak yapılan hesapsal analizler sonucu kararlılığı arttırmaya yönelik yedi amino asit değişimi daha belirlenmiş ve bu değişimlerin eklenmesiyle elde edilen enzim varyantının termal kararlılığı 23°C arttırılmıştır. Amino asit değişimlerinin enzimin katalitik aktivitesi üzerine olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Declerck et al., 2003).

Metiyonin oksidasyonu, ortamda bulunan oksitleyici ajanların sebep olduğu önemli protein hasarlarından birisidir. Bu yüzden metiyonin artıklarının bölge-yönlendirilmiş mutajenez ile değiştirilmesi enzimlerin kimyasal kararlılığını arttırmak için izlenen yollardan biridir. Örneğin, bakteriyel kaynaklı serin proteazın yapısında gerçekleştirilen M222A değişimi sonucunda enzimin oksidatif kararlılığı iyileştirilmiştir (Weng et al., 2009). Benzer şekilde, *B. stearothermophilus* α -amilaz enzimi de M197A değişimi ile oksidasyon ajanlarına karşı daha stabil hale getirilmiştir (Khemakhem et al., 2009).

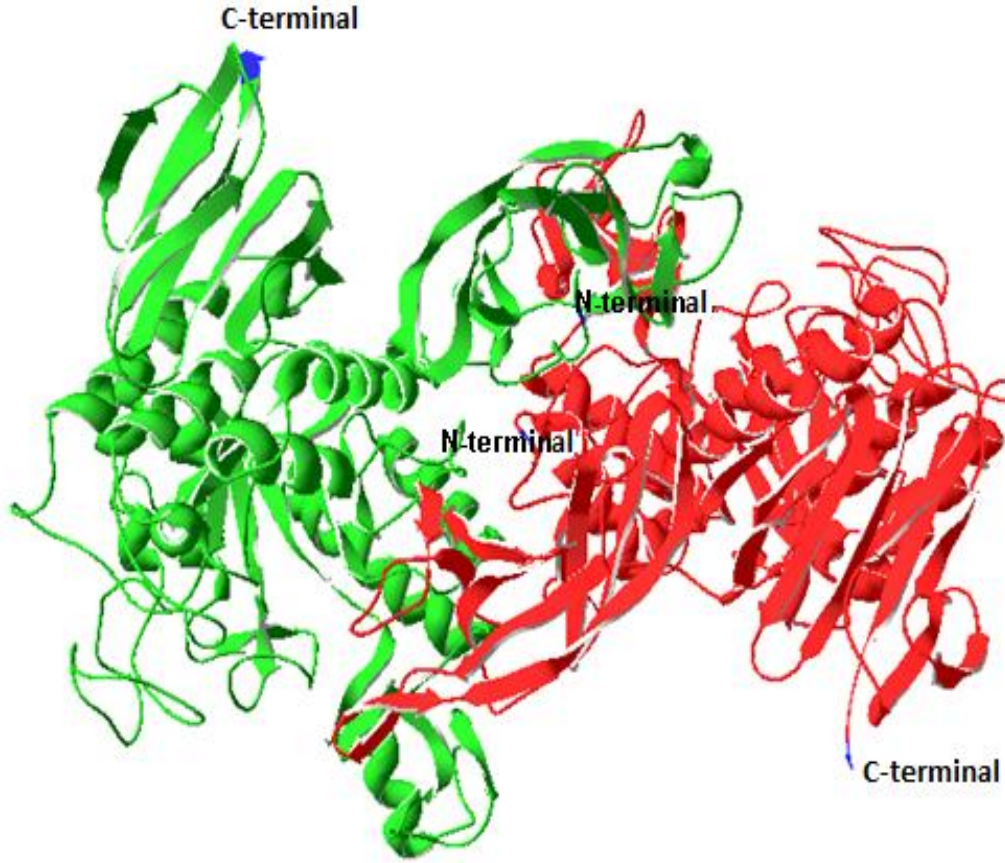
1.3 *Bacillus stearothermophilus* Neopullulanaz Enzimi

Bacillus stearothermophilus kaynaklı neopullulanaz (E.C. 3.2.1.135) α -amilaz ailesi üyesidir. İlk kez 1988 yılında Kuriki ve arkadaşları tarafından *B. stearothermophilus* TRS40 suşundan izole edilip karakterize edilmiş ve farklı özelliklerinden dolayı diğer α -amilaz ve pullulanazlardan ayrılmıştır (Kuriki et al., 1988).

Neopullulanaz, maltotrioz ünitelerinden oluşan lineer bir polimer olan pullulanı substrat olarak kullanabilir ve pullulanı hidrolizlediğinde büyük oranda panoz açığa çıkarır. Panozun yanı sıra maltoz ve glukoz da açığa çıkar. Substrat olarak nişastayı kullandığında ise seçimli olarak amilozu hidrolizler. Enzimin teorik olarak hesaplanan moleküler ağırlığı yaklaşık 69,000 Da'dur. Ancak SDS-

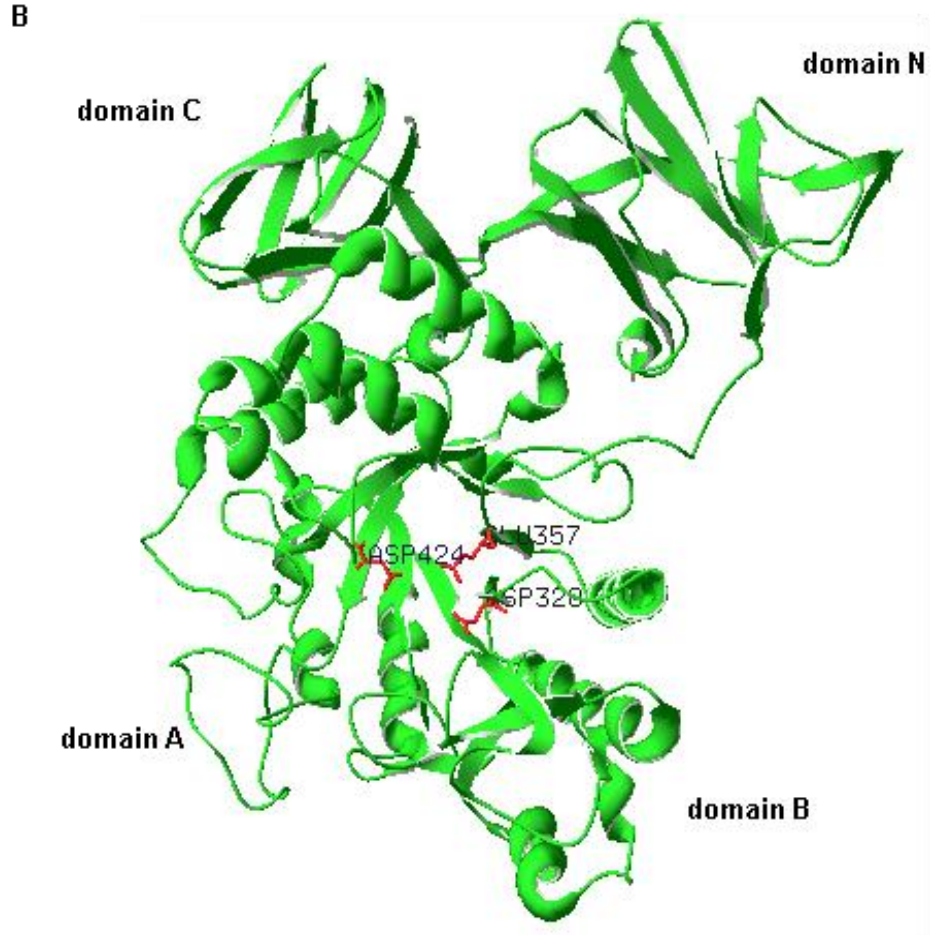
PAGE jel elektroforezinde analizlendiğinde 62,000 Da moleköl ağırlığına sahip bir protein bandı verir.

Neopullulanazın optimum sıcaklığı 60-65°C arasında değişmektedir. Bununla birlikte, enzim 70°C’ de yaklaşık olarak 2 saat inkübe edildiğinde katalitik aktivitesini tamamen yitirmektedir. Enzim, 60°C’de 60 dakika bekletildikten sonra ise aktivitesinin yaklaşık olarak % 90’ını koruyabilmektedir. Enzimin optimum pH’ sı ise 6.0’ dır (Vihinen *et al.*, 1990).



Şekil 1.1 *B. stearothermophilus* kaynaklı neopullulanazın dimer yapısının ribbon diyagramı. (PDB kodu: 1J0H)

Neopullulanaz sulu çözelti ortamında dimer formu oluşturur (Şekil 1.1). Her bir protomer, dört farklı domainden meydana gelmektedir. Yapıda bulunan N-domaini (1-123.artıklar) neopullulanaz için spesifik olan domainidir. A-domaini (124-246. ve 300-506. artıklar) $(\beta\alpha)_8$ -fiçı yapısını içermektedir. Nispeten daha küçük olan B-domaini (247- 299. artıklar) sadece bir tane α -helix ve yarım döngüden meydana gelmektedir. C-domaini ise (507-588. artıklar) sekiz tane antiparalel β -tabakasından meydana gelir.



Şekil 1.2 *B. stearothermophilus* kaynaklı neopullulanaz protomeri. Protomer 588 amino asitten meydana gelmekte olup, molekül ağırlığı 62 kDa'dur. Katalitik artıklar olan Asp328, Glu357, ve Asp424 yapı üzerinde gösterilmiştir (Hondoh *et al.*, 2003).

Aktif merkezde gerçekleştirilen mutasyonlar Asp328, Glu357 ve Asp424 artıklarının katalitik açıdan esansiyel olduğunu göstermiştir. Enzimin substrat spesifikliğı ve transglükolizasyon aktivitesi bölge-yönlendirilmiş mutajenez ile değiştirildiğinde, polisakkaritlerin substrat olarak kullanımının etkilendiğı ve spesifikliğın azaldığı görülmüştür (Kuriki *et al.*, 1996). *B. stearothermophilus* α -amilaz enziminde korunmuş bir artık olduğu bilinen His238 artığı Asp ile değiştirildiğinde enzimin termal kararlılığının düştüğü görülmüştür. *B. stearothermophilus* neopullulanazdaki karşılığı olan Glu332 artığı His ile değiştirildiğinde ise enzimin katalitik açıdan inhibe olduğu görülmüştür (Lamminmki and Vihinen, 1996). Neopullulanaz enzimi üzerinde gerçekleştirilen protein mühendisliğı çalışmaları ve sonuçları Tablo 1.1' de ifade edilmiştir.

Tablo 1.1 *B. stearothermophilus* neopullulanaz enzimi üzerinde gerçekleştirilen protein mühendisliği çalışmaları ve sonuçları.

http://www.brendaenzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.135 sayfasından alınmıştır)

Mühendislik	Organizma	Sonuç	Referans
D328H	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
D328N	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
D424H	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
D424N	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
E357H	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
E357Q	<i>B. stearothermophilus</i>	Bölge-yönlendirilmiş mutajenez; inaktif mutant	Domań-Pytka and Bardowski, 2004
I358V	<i>B. stearothermophilus</i>	Mutasyon, substrat olarak α - 1,6-dallanmış oligosakkaritlere ve pullulana olan ilginin azalmasına neden olmuştur.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996
I358W	<i>B. stearothermophilus</i>	Mutasyon α -1,6-dallanmış oligosakkaritler ve polisakkaritler ile etkileşimi azaltmıştır.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996
M375L	<i>B. stearothermophilus</i>	Mutasyon, doğal enzime kıyasla transglikolizasyon aktivitesini arttırmıştır.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996
S422V	<i>B. stearothermophilus</i>	Mutasyon, doğal enzime kıyasla transglikolizasyon aktivitesini arttırmıştır.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996
Y377D	<i>B. stearothermophilus</i>	Mutasyon, doğal enzime kıyasla transglikolizasyon aktivitesini düşürmüştür.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996
Y377F	<i>B. stearothermophilus</i>	Transglikolizasyon aktivitesinde artış görülmüştür.	Kuriki <i>et al.</i> , 1996

Yapılan çalışmalarda, neopullulanazın α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini, α -1,6-glikozidik bağların hidrolizini, α -1,4-glikozidik bağ oluşumu ile sonuçlanan transglikolizasyon reaksiyonunu ve α -1,6-glikozidik bağ oluşumu ile sonuçlanan transglikolizasyon reaksiyonunu gerçekleştirebildiği gösterilmiştir (Takata *et al.*, 1992). Bu dört reaksiyon tipik olarak, sırasıyla, α -amilaz, pullulanaz, siklomaltodekstrin glukanotransferaz ve 1,4- α -D-glukan dallandıran enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler birbirleri ile yapısal açıdan çeşitli benzerlikler gösterse de katalizledikleri ilgili reaksiyonların birbirinden farklı olduğu düşünülmektedir. Neopullulanaz ile yapılan çalışmalar ise yukarıda bahsedilen dört farklı reaksiyonun aynı mekanizma üzerinden katalizlenebildiğini göstermektedir.

Tüm bu özellikler dikkate alındığında neopullulanazın kendi sınıfındaki enzimlere göre birçok avantaja sahip olduğu görülmektedir. Amilopektin varlığında seçimli olarak amilozu hidrolizlemesi, amilozsuz nişasta üretimi açısından büyük bir avantajdır. Çünkü amiloz amilopektine göre daha yavaş metabolize edilir ve bu yüzden hipoglisemiye sahip kişilerin, sporcuların ve çabuk enerjiye dönüşen gıdalara ihtiyaç duyan kişilerin diyetleri için önemlidir. Ayrıca amiloz içermeyen nişasta daha kolay jelatinize olduğu için gıdalarda stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak da kullanılmaya uygundur. Diğer amilolitik enzimlere kıyasla daha iyi leke çıkarma özelliği, muamele edildiği bölgeyi dezenfekte etmesi ve genel olarak daha iyi temizlik sağlaması nedeniyle, deterjanlarda da kullanım potansiyeline sahiptir.

Bu tez çalışmasında, yukarıda bahsedilen endüstriyel uygulamalarda kullanım açısından yüksek potansiyele sahip *B. stearothermophilus* organizmasına ait neopullulanaz enziminin termal ve oksidatif kararlılığının arttırılması amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Kullanılan Bakteriler

Klonlama ve protein ekspresyonu amacı ile kullanılan bakteri suşları ve genel özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

2.1.1 *E. coli* Turbo

E. coli Turbo (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hücrelerinin genetik özellikleri şu şekildedir: F', *pro*^{A+B+}, *lacI*^q, $\Delta(lacZ)M15/fhuA2$, $\Delta(lac-proAB)$, *glnV*, *gal* R(*zgb-210::Tn10*), Tet^s, *endA1*, *thi-1*, $\Delta(hsdS-mcrB)5$. Bu hücreler *E. coli* 5a hücreleri gibi T1-faj dirençlidir. Faj dirençliliği nedeniyle *E. coli* 5a hücreleri yavaş büyüme göstermektedir. *E. coli* Turbo hücreleri ise 37°C'de inkübasyonun 8. saatinde görünür koloniler oluşturmaktadır.

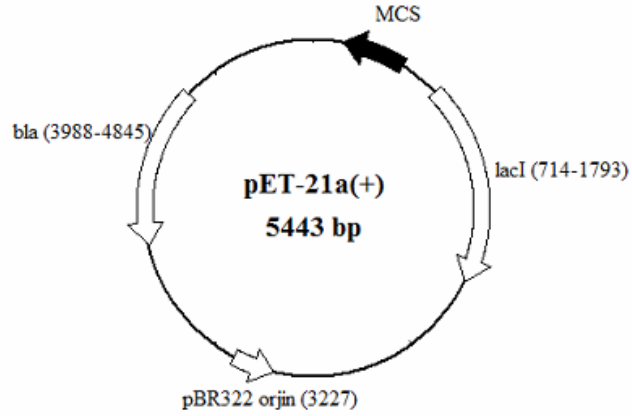
2.1.2 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL

E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies, USA) hücrelerinin genetik özellikleri şu şekildedir: *E. coli* B F⁻ *ompT* *hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU proL*Camr] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]. Bu hücreler ColE1 ile uyumlu, pACYC-temelli plazmit içerirler. Bu plazmit *argU* ve *proL* tRNA genlerinin ekstra kopyalarını içermektedir. Hücreler ayrıca, ColE1⁻ ve pACYC-uyumlu pSC101-temelli ve *argU*, *ileY*, ve *leuW* tRNA genlerinin ekstra kopyalarını içeren plazmidi de taşır.

2.2 Vektörler

2.2.1 pET 21a (+)

pET sisteminde (Novagen, Darmstadt), *E. coli* promotorlarına dayalı sistemlerden (*lac*, *tac*, *pL*) farklı olarak T7 promotoru bulunur ve hedef genin transkripsiyonu *E. coli* RNA polimeraz yerine T7 RNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Bu amaçla kromozomunda T7 RNA polimeraz genini taşıyan özel *E. coli* suşları hazırlanmıştır. Bu suşlarda transkripsiyon izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) indüksiyonu sonucu gerçekleşir. Hedef genin transkripsiyonu vektördeki *lac* operatörü, *lacI* ve büyüme ortamına eklenen IPTG tarafından kontrol edilir (Studier *et al.*, 1990).



Şekil 2.1 pET-21a(+) vektörü. Klonlama bölgesinde (MCS) *XhoI* (158), *EagI* (166), *NotI* (166), *HindIII* (173), *SalI* (179), *SacI* (190), *EcoRI* (192), *BamHI* (198) restriksiyon enzim kesim bölgeleri yer almaktadır. Klonlama bölgesinin 3' bölgesinde altı histidin kodonu bulunmaktadır. C-terminalde altı histidin artığı ((His)6-tag) içerecek şekilde ifade edilen protein, nikel-şelat afinite kromatografisinden yararlanılarak saflaştırılabilir. pET21a(+) vektörü beta-laktamaz kodlayan ampisilin dirençlilik geni (*bla*) içermektedir ve vektörü taşıyan hücreler bu şekilde seçilebilir.

2.3 PCR Primerleri

Gerekli restriksiyon enzimi tanıma bölgelerini içerecek şekilde tasarlanan primerler Metabion (Martinsried, Almanya) firmasından temin edildi. Aşağıda nükleotit dizileri verilen primerlerde, restriksiyon enzim tanıma bölgeleri alt çizgi ile gösterilmiştir.

2.3.1 Vektöre spesifik primerler

5' T7 Promotor

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

3' T7 Terminatör

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

2.3.2 Gene spesifik primerler

5'neopul-*NotI*

5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG AGG AAA GAA GCC-3'

3'neopul-*XhoI*

3'-CCG CTC GAG CCA ACG TTC TAT TGC ATA AAG TAC-3'

2.3.3 Belirlenen amino asit değişimlerine yönelik tasarlanan primerler

Bölge-yönlendirilmiş mutajenezde kullanılan primerler aşağıda belirtilmiştir. Amino asit değişikliklerini içeren nükleotitler alt çizgi ile belirtilmiştir.

5'neopul-Asp46Glu5'- ATGGTGACCCGTATGAATGGCAAATGGAGC-3'**3'neopul-Asp46Glu**5'- GCTCCATTTTGCCATTCATACGGGTCACCAT-3'**5'neopul-Val239Leu**5'- GGTATCCGCCTTATGCTCGATGCCGTGTTTAAC-3'**3'neopul-Val239Leu**5'- GTTAAACACGGCATCGAGCATAAGGCGGATACC-3'**5'neopul-Val374Ile**5'- GCGGTGACCAGTTTGACGCAATCATGAACTACC -3'**3'neopul-Val374Ile**5'- GGTAGTTCATGATTGCGTCAAACCTGGTCACCGC-3'**5'neopul-Val404Leu**5'- CAAATGATGCATCTTCTTCATTCGTATCCG -3'**3'neopul-Val404Leu**5'- CGGATACGAATGAAAGAAGATGCATCATTTG-3'**5'neopul-Ser407Thr**5'- CTTCATACGTATCCGAACAATGTCAACGAG-3'**3'neopul-Ser407Thr**5'- CTCGTTGACATTGTTCCGATACGTATGAAG -3'**5'neopul-Asn413Gln**5'- TATCCGAACAATGTCCAAGAGGCCGCATTCAAT -3'**3'neopul-Asn413Gln**5'- ATTGAATGCGGCCTCTTGGACATTGTTCCGATA -3'**5'neopul-Ala416Ile**5'- AATGTCAACGAGGCCATCTTCAATTTGCTCGGC -3'**3'neopul-Ala416Ile**5'- GCCGAGCAAATTGAAGATGGCCTCGTTGACATT -3'**5'neopul-Asn413Gln+Ala416Ile**5'- CAATGTCCAGGAGGCCATTTTCAATTTGCTCG -3'**3'neopul- Asn413Gln+Ala416Ile**5'- CGAGCAAATTGAAAATGGCCTCCTGGACATTG-3'**5'neopul-Val533Leu**5'- GATGAAACGGTGTTACTCATCATCAATCGG -3'**3'neopul- Val533Leu**5'- CCGATTGATGATGAGTAACACCGTTTCATC-3'**5'neopul-Ala566Leu**5'- GGGAAGGTTTGCACTCGAGGCAGAAACGC -3'

3'neopul- Ala566Leu

5'- GCGTTTCTGCCTCGAGTGCAAACCGTTCCC -3'

5'neopul-Met475Ala

5'- GAGTGCCGGAAGTGCGCGGTGTGGGATCCGATG -3'

3'neopul- Met475Ala

5'- CATCGGATCCACACCGCGCACTTCCGGCACTC -3'

2.4 DNA ve Protein Standartları

Agaroz jel elektroforezinde standart olarak Fermentas™ 1 kb Plus DNA Ladder (O'Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kullanıldı. İlgili DNA standardına ait polinükleotit büyüklükleri (bp): 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75 olarak verilmiştir.

Protein standardının (Pierce Unstained Molecular Weight Marker, Thermo Scientific, Waltam) içeriğinde β -galaktozidaz (116 kDa), albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), Reaz Bsp98I (25.0 kDa), beta-laktoglobulin (18.4 kDa) ve lizozim (14.4 kDa) bulunmaktadır.

2.5 Enzimler

DNA polimeraz (GoTaq DNA-Polimeraz) Promega'dan (Mannheim); Dream Taq Polymerase Fermentas™, dan (St. Leon-Rot), Q5 High Fidelity DNA Polymerase New England Biolabs' tan (Frankfurt a. M.) Pwo DNA-Polimeraz Roche Diagnostics'den (Mannheim); restriksiyon endonükleazlar (*XhoI* ve *NotI*) NEW ENGLAND BIOLABS' tan (Frankfurt a. M.), T4-DNALigaz Roche Diagnostics'den (Mannheim) temin edildi.

2.6 Kimyasallar

Çalışmaların tamamında kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Kimyasalların temin edildiği firmalar şu şekildedir: Amersham Pharmacia (Biotech Freiburg), Biorad Laboratories (München), Calbiochem EMD Biosciences (La Jolla), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich), Oxoid (Wesel), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.7 Kitler

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit ve GeneJET™ Gel Extraction Kit MBI Fermentas'tan (St.-Leon-Rot) temin edildi.

2.8 Diğer Sarf Malzemeler

Diyaliz torbası (Tip 27/32, 14 kDa) Carl Roth GmbH +Co'dan (Karlsruhe), elektroporator küvetleri (2mm) Peqlab'dan (Erlangen), steril falkon tüpleri Falcon (15 mL ve 50 mL) Becton Dickinson'dan (Franklin Lakes, USA), PCR tüpleri

(0,2 mL) Peqlab'dan (Erlangen), steril petri kapları (150/25 ve 94/16) Greiner Bio-One 'dan (Nürtingen), metal-şelat afinite kromatografisi kolonu His-Trap FF 5 mL GE Healthcare Life Sciences' tan ve steril filtreler 0.2 µm Minisart Sartorius'tan temin edildi.

2.9 Cihazlar

Laboratuvarda, ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare, München), agaroz ve SDS-elektroforez sistemleri (Hoefer Pharmacia Biotech, USA ve Embi Tec, CA) Econo Gradient Pump kromatografi pompası (BioRad, USA), sirküler dikroizm spektrofotometresi (CD) J-815 (Jasco, Japan), diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) CSC 6100 Nano DSC II (Calorimetry Sciences, USA), ısıtıcı blok (Biosan, Türkiye), inkübatör GFL 3033 (GFL, Burgwedel) ve inkübatörler Certomat H ve Certomat BS-1 (Braun Biotech, Melsungen), Multi-Doc-It dijital görüntüleme sistemi (UVP Inc., USA), thermal cycler (Eppendorf, Hamburg; BioRad, USA ve Applied Biosystems, New York), UV transilluminatör 2000 (BioRad, USA), UV-VIS spektrofotometre Cary 60 (Agilent Technologies, USA), UV-Vis Biyofotometre (Eppendorf, Hamburg), Ultrafree-20 Nanopore su sistemi (Millipore, Eschborn), santrifüj 5810R, 5415D, 5415R (Eppendorf, Hamburg), santrifüj mikro 200R (Hettich, UK) cihazları kullanıldı.

2.10 *E. coli* Büyüme Ortamları

Hazırlanan büyüme ortamlarının sterilizasyonu otoklavda (121°C, 2 bar, 20 dakika) gerçekleştirildi. Seçici katı ortamların hazırlanması için ortamların sıcaklığı yaklaşık 60°C'ye getirildi ve 1000X stok konsantrasyonunda hazırlanmış ve steril filtreden geçirilmiş antibiyotik çözeltisi eklendi. Kullanılan büyüme ortamları ve içerikleri (Sambrook *et al.*, 1989) aşağıda listelenmiştir.

Luria-Bertani-(LB)

%0,5 (w/v) Maya özütü, %1,0 (w/v) NaCl, %1,0 (w/v) Tripton

Nutrient- Broth (NB)

%1,3 Nutrient broth (w/v)

LB-Agar

LB-Medium ve %1,5 (w/v) Bacto-Agar

2.11 Tamponlar ve Çözeltiler

Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı. İlgili antibiyotik çözeltileri aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Steril filtreden geçirildikten sonra -20°C'de saklandı.

Ampisilin stok çözeltisi (1000×)

150 mg/mL ampisilin (Na-tuzu) suda çözüldü ve steril filtreden geçirildi.

Streptomisin stok çözeltisi (1000×)

50 mg/mL suda çözüldü ve steril filtreden geçirildi.

Kloramfenikol stok çözeltisi (1000X)

50 mg/mL suda çözüldü ve steril filtreden geçirildi.

İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozid stok çözeltisi

0.5 M IPTG suda çözüldü, steril filtreden geçirildi ve -20 °C’de saklandı.

PCR-dNTP çözeltisi (10 mM)

Her bir dNTP (N = A, C, G ve T) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde suda çözüldü ve -20 °C’de saklandı.

Agaroz (% 1)

1 g agaroz 100 mL 1× TAE tamponunda ısıtılarak çözüldü.

Etidyum bromür stok çözeltisi

10 mg/mL Etidyum bromür (EtBr) kullanıldı.

Diyaliz tamponu

10 mM / 50 / 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Sodyum asetat tamponu

0.2 M sodyum asetat tamponu (pH 6.0)

Metal-şelat afinite kromatografisi tamponları

Yürütücü tampon: 50 mM KP (pH 7.8), 500 mM NaCl, 10 mM imidazol

Elüsyon tamponu: 50 mM KP (pH 7.8), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol

***E. coli* hücre süspansiyon ve homojenizasyon tamponu**

50 mM KP (pH 7.8), 500 mM NaCl, 5 mM imidazol

HisTrap FF Crude kolonların rejenerasyon tamponu

20 mM KP, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.4

250 mM NiCl₂, pH 4.05

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%1)

%10 (w/v) APS suda çözüldü ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Coomassie boyama çözeltisi

%0.2 (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, %50 (v/v) etanol, %10 (v/v) asetik asit. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Protogel™

%30 (v/v) akrilamid, %0.8 (v/v) bisakrilamid, +4°C’de saklandı.

SDS-PAGE ayırma jeli tamponu

%0.4 (w/v) SDS, 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

SDS-PAGE üst jel tamponu

%0.4 (w/v) SDS, 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

SDS-PAGE yürütme tamponu (pH 8.5)

%0.1 (w/v) SDS, 0.025 M Tris, 0.2 M Glisin

SDS-PAGE örnek tamponu (2X):

%2 (w/v) SDS, %10 (w/v) Gliserol, %5 (v/v) β -Merkaptoetanol, %0.01 (w/v) Bromfenol mavisi, 1.25 M Tris/HCl, pH 6.8

RF1 Tampon çözeltisi (Kimyasal kompetent hücre hazırlamak için)

100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Potasyum Asetat, 10 mM CaCl₂
%15 Gliserol, pH 5.80 (0.2 M Asetik asit). Hazırlanan çözelti steril filtreden geçirildi ve +4°C' de saklandı.

RF2 Tampon çözeltisi (Kimyasal kompetent hücre hazırlamak için)

10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, %15 Gliserol, pH, 7.00.
Hazırlanan çözelti steril filtreden geçirildi ve +4°C' de saklandı.

DNS reaktifi

10 g DNS, 0.5 N 800 mL NaOH içerisinde ısıtılarak çözüldü ve hacim dH₂O ile 1 L' ye tamamlandı.

Potasyum -Sodyum Tartarat Çözeltisi (DNS reaktifi için)

Potasyum-sodyum tartarat (%40) 1 L dH₂O içinde çözüldü.

 α -siklodekstrin çözeltisi

486 mg α -siklodekstrin 10 mL dH₂O içinde çözüldü. Çözelti her aktivite ölçümü öncesi taze hazırlandı.

 β -siklodekstrin çözeltisi (42 mM)

568 mg β -siklodekstrin %2 (v/v) propanol, %100 propanol içeren dH₂O'da çözüldü. Çözelti her aktivite ölçümü öncesinde taze hazırlandı.

2.12 Bilgisayar Yazılımları

ÄKTA Unicorn versiyon5.01 (318)

© GE HEALTHCARE

Bioedit V.7.0.9

© IBIS BIOSCIENCES, Tom

Sigma Plot 8.0/10.0

© 2004/2006 SPSS INC.

3. METOTLAR

3.1 Mikrobiyolojik Metotlar

3.1.1 Sterilizasyon

Bakteri büyüme ortamları kullanılmadan önce otoklavlandı. Büyüme ortamlarının içerdikleri sıvı hacmine göre sterilizasyon süresi uzatıldı. 50 mL büyüme ortamları için sterilizasyon koşulları 20 dak, 121°C, 2 bar ve 500 mL büyüme ortamları için sterilizasyon koşulları 30 dakika, 121°C, 2 bar şeklinde uygulandı. Pipet uçları otoklavlandıktan sonra etüvde bekletilerek kurutuldu.

3.1.2 *E. coli* inkübasyon ve saklama koşulları

LB besi ortamına inoküle edilen *E. coli* hücreleri 37°C’de uygun sürelerde inkübe edildi. Inkübasyon sırasında karıştırma hızı 500 mL büyüme ortamı için 160 RPM ve 5 ve 50 mL büyüme ortamı için 200 RPM olarak belirlendi. Plazmit taşıyan hücreler için büyüme ortamına uygun antibiyotik (150 µg/mL ampicillin, 50 µg/mL kloramfenikol veya 50 µg/mL streptomisin) eklendi.

İlgili antibiyotiği içeren katı agar (LB-Agar) petrilere yayılan hücre süspansiyonları gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Inkübasyonun ardından tek düşen koloniler katı besi yerinden sıvı büyüme ortamına inoküle edildi. Depolama amaçlı olarak petrilere +4°C’de saklandı. Sıvı süspansiyon ortamında bulunan hücreler ise gliserol stoklarında ve -80 °C’de saklandı. Gliserol stoğu elde edilmesi amacıyla, %16 (w/v) oranında gliserol içerecek sıvı kültür-gliserol karışımı hazırlandı.

3.1.3 Kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerinin hazırlanması

Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanması için kullanılan metot Hanahan protokolünü temel almaktadır (Hanahan, D. 1983, 1985). Bu metotun transformasyon etkinliğinin CaCl₂ protokolünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kompetent hücreye DNA transformasyonu, öncelikle hücre membranının zayıflatılması ve ardından uygulanan ısı şoku ile DNA’nın hücre içine girişinin sağlanması esasına dayanır. Ekipmana ihtiyaç duyulmaması ve iyi transformasyon verimine sahip olması yöntemin başlıca avantajlarıdır (Cohen *et al*, 1972).

Kimyasal kompetent hücrelerin hazırlanması amacı ile şu protokol uygulandı: LB-Agar petriden alınan tek koloni 5 mL sıvı LB ortamına inoküle edildi. Elde edilen gece kültüründen 1mL alındı ve 100 mL sıvı LB ortamına inoküle edildi. OD₆₀₀ 0.3-0.4 olana kadar hücreler 37°C’de inkübe edildi. Inkübasyondan alınan hücreler buz üzerinde 15 dak bekletildi. Daha sonra hücreleri çöktürmek amacıyla santrifüj işlemi uygulandı (+4°C, 15 dak, 5,000 g). Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 20 mL soğuk RF1 tamponu ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler 15 dak boyunca buzda bekletildi. Daha sonra hücreleri

çöktürmek amacıyla tekrar santrifüj işlemi uygulandı (5,000 g, 15 dak, +4°C) ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 20 mL RF2 tamponu ile süspanse edildi ve buzda 15 dak bekletildi. Daha sonra, her bir eppendorf tüpte 50 µL kompetent hücre içerecek şekilde bölüştürüldü ve -80°C’ de saklandı.

3.1.4 Kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyon

-80°C’de depolanan kimyasal kompetent hücre süspansiyonu (50 µL) buz üzerine alındı ve 15 dak bekletildi. İlgili plazmit DNA (50-100 ng) hücre süspansiyonuna eklendi. Eklenen DNA hacminin toplam kompetent hücre süspansiyonu hacminin %10’undan fazla olmamasına dikkat edildi. Buzda 30 dak, 42°C’de 30 s, ikinci kez buzda 2 dak inkübasyon adımları sırasıyla uygulandı. Hücre süspansiyonuna 200 µL LB besi ortamı eklendi ve 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonun tamamı seçici antibiyotik içeren LB-Agar petriye yayıldı.

3.2 Moleküler Biyoloji Metotları

3.2.1 *E. coli*’den plazmit DNA ekstraksiyonu

Çalışmalarda kullanılan hücrelerden plazmit DNA ekstraksiyonu, alkali lizis prensibine dayanmaktadır (Le Gouill *et al.*, 1994). Ekstraksiyon işleminde uygulanan basamaklar, kullanılan çözeltiler ve kullanım amaçları Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1 Alkali lizis prensibi ile plazmit ekstraksiyon yönteminde uygulanan basamaklar, kullanılan çözelti içerikleri ve kullanım amaçları.

REAKTİF	AMAÇ
Santrifüj	Bakteriyel hücreyi pellet şeklinde çöktürmek
<u>1.Çözelti (Tris pH 8.0)</u> EDTA, glukoz, RNaz, Lizozim	- Glukoz hücre membranının parçalanmasını sağlayan ozmotik şoku verir. - EDTA nükleazları inhibe eder. - RNaz RNA’ yı degrade eder. - Lizozim bakteriyel hücre duvarının parçalanmasını sağlar.
<u>2.Çözelti (Alkali pH 12.0)</u> NaOH SDS	NaOH ve SDS tam hücre lizisini sağlar.

	Alkali pH sirküler plazmide zarar vermezken, kromozomal DNA'nın denatüre olmasını sağlar.
<u>3.Çözelti (Asidik pH 5.4)</u> Sodyum veya potasyum asetat	- Alkali pH'ı nötralize eder. - Proteinlerin SDS-protein kompleksi oluşturarak çökmesini sağlar. - Kromozomal DNA renatüre olur ve proteinler ile birlikte çöker.
Santrifüj	- Protein-DNA agregatlarının pellet şeklinde çökmesini sağlar. - Plazmit DNA üst fazda kalır.
Silika membran kolon	Yüksek konsantrasyonda tuz içeren tampon çözeltide plazmit DNA'yı bağlar.
Elüsyon	Distile su kullanılarak plazmit DNA bağlı bulunduğu membrandan elüye edilir.

3.2.1.1 Plazmit DNA ekstraksiyonu (Mini-prep)

E. coli'den plazmit DNA ekstraksiyonu için GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas, St.-Leon-Rot) kullanıldı. Gece boyu inkübe edilen 5 mL hücre süspansiyonu 8,000 rpm'de 2 dak santrifüjlendi. İzolasyon, kitte verilen protokole göre yapıldı. Kolondan elüsyon için 50 µL steril H₂O kullanıldı. Plazmit -20 °C'de saklandı.

3.2.2 Genomik DNA ekstraksiyonu

B. stearothermophilus TRS 40 suşu (DSM-6834) liyofilize edilmiş olarak DSMZ'den (Braunschweig, Almanya) temin edildi. Genomik DNA'nın elde edilmesi için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit genomik DNA ekstraksiyonu kiti (Invitrogen, Carlsbad) kullanıldı. Suş, ilgili protokole uygun olarak açıldıktan

sonra 55°C’de, NB ortamında gece boyu inkübe edildi ve genomik DNA kitte verilen protokole uygun olarak izole edildi.

3.2.3 DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA çözeltilerinin konsantrasyonu UV-VIS Biyofotometre (Eppendorf, Hamburg) kullanılarak belirlendi. Çift iplikli DNA için 1 OD’nin 50 µg/mL konsantrasyona karşılık geldiği dikkate alınarak, DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$C_{ds\ DNA} = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot f}{1000}$$

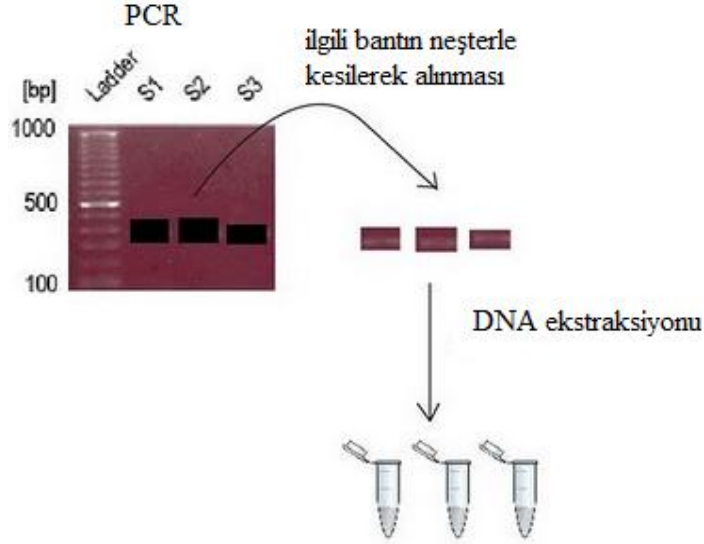
Formül 3.1 DNA konsantrasyonunun hesaplanması (C_{dsDNA} , çift iplikli DNA’nın konsantrasyonu (µg/µL); A_{260} , 260 nm’deki absorbans; f, seyrelme faktörü).

3.2.4 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılır ve etidyum bromür eklenmesiyle UV ışık altında görünür hale gelirler (Sharp *et al.*, 1973). Agaroz (%1, w/v), 300 mL 1X TAE tamponunda kaynatılarak çözüldü. 50-60 °C’ye soğutulmasının ardından 10 mg/mL stok EtBr çözeltisinden 5 µL eklendi. Jel ünitesine yayılan agarozun katılması beklendi ve üzerine 1X TAE tamponu eklendi. DNA örnekleri 10X DNA yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez 100 volt.saat uygulandı. DNA fragmentleri UV ışıkta Bio-Rad UV Transilluminator 2000 görüntüleme cihazı (Biorad, München) yardımıyla belirlendi.

3.2.4.1 DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

UV ışık altında görüntülenen DNA fragmentleri temiz bir neşter kullanılarak jelden kesildi ve eppendorf tüpe alındı. DNA ekstraksiyonunda MBI Gene JETTM Gel Extraction Kit (Fermentas, St.-Leon-Rot) kullanıldı. Kolondan H₂O ile elüye edilen DNA örneği -20 °C’de saklandı.



Şekil 3.1 Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için jelden ilgili bantın alınması (örnek gösterim).

3.2.5 DNA'ya uygulanan enzimatik işlemler

3.2.5.1 Çift iplikli DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla kesimi

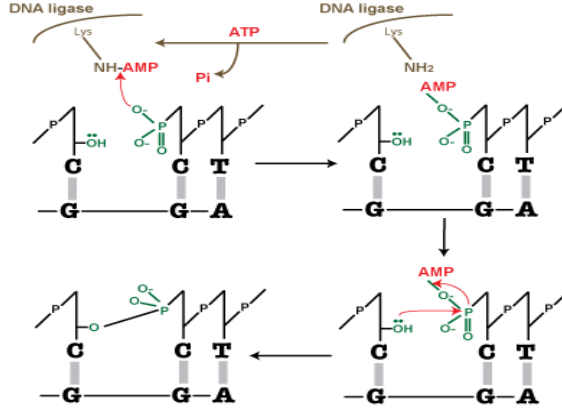
Çift iplikli DNA'nın spesifik olarak kesimi için palindromik dizileri tanıyan restriksiyon endonükleaz tip II enzimleri kullanıldı. (Sambrook *et al.*, 1989). Restriksiyon enzimleri deoksiriboz ile fosfat grupları arasındaki fosfodiester bağlarına etki etmektedir ve bu nedenle kesim sonucu 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçları oluşmaktadır. Toplam reaksiyon hacmi 30 μ L olacak şekilde en fazla 1 μ g DNA örneği veya 2 μ g vektör, ilgili restriksiyon enzimleri ile (20 U) 2 saat boyunca 37 °C'de muamele edildi. İki restriksiyon enzimi birlikte kullanıldığı için üretici firma tarafından önerilen tampon kullanıldı. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin toplam hacmi, reaksiyon hacminin % 10' unu aşmayacak şekilde hesaplandı. Bu şekilde restriksiyon enzimlerinin depolanması için kullanılan gliserolün aktiviteyi etkilemesi engellendi. Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen örnekler agaroz jel elektroforezine uygulandı. UV ışık altında görüntülenen fragmentler ligasyonda kullanılmak üzere agaroz jelden ekstrakte edildi.

DNA fragmenti.....	24.7 μ L
BSA.....	0.3 μ L
10XNEB4.....	3 μ L
<i>Xho</i> I.....	1 μ L
<i>Not</i> I.....	1 μ L
	30 μ L

pET21a(+) vektörü.....	24.7 μ L
BSA.....	0.3 μ L
10XNEB4.....	3 μ L
<i>Xho</i> I.....	1 μ L
<i>Not</i> I.....	1 μ L
	30 μ L

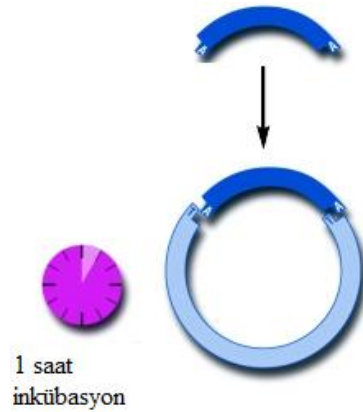
3.2.5.2 Ligasyon

Ligasyon, rekombinant geni taşıyan DNA parçaları ile vektörün bir enzim aracılığı ile birbirlerine bağlanması işlemidir. Bu işlem için ligaz sınıfı enzimler görev yapar.



Şekil 3.2 Ligaz enziminin etki mekanizması.

Bağlamadaki sorunlardan biri, vektörün yabancı DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır. Bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri, vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir. Aynı enzimle kesilmiş DNA parçaları ve doğrusal konuma getirilmiş taşıyıcı DNA molekülleri bir araya getirildiğinde, birbirlerini tamamlayıcı özellikteki (yapışkan) uçları taşımalarından dolayı baz eşleşmeleri yoluyla moleküller bağlanma sağlanır. Sonrasında ligaz enzimi nükleotitler arasında fosfodiester bağları kurarak açık uçları kapatır. Bu yöntem rekombinant DNA elde etmek için kullanılan en basit ve etkili yoldur.



Şekil 3.3 Uygun vektör ile karıştırılan gen fragmenti T4 DNA Ligaz enzimi varlığında inkübe edildiğinde plazmidin halka yapısına katılır.

Ligasyon için restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş DNA fragmenti ve vektör kullanıldı. Reaksiyon 20 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına 1U T4-DNA-Ligaz (Fermentas, St.-Leon-Rot) ve uygun tampon eklendi. Termal cycler’da gece boyu 16°C’de inkübe edildi. Ligasyon örnekleri inkübasyonun ardından +4°C’ de muhafaza edildi. Ligasyon karışımından 10 µL alındı ve rubidyum klorür protokolü ile hazırlanan kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi.

3.2.6 DNA fragmentlerinin standart PCR ile çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucu (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) DNA fragmentlerinin *in vitro* amplifikasyonu gerçekleşir. DNA’nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve enzimatik DNA sentezi (uzama) adımlarının tekrarlanmasıyla DNA fragmentleri eksponansiyel olarak çoğaltılır. PCR 50 µL hacimde, termal cycler’da (kapak sıcaklığı 110°C) gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Kalıp DNA	1µL
5’ primer (1 µM)	1 µL
3’ primer (1 µM)	1 µL
7,5 mM MgCl ₂ içeren	
5× Green GoTaq® reaksiyon tamponu	10 µL
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
GoTaq® DNA polimeraz	0.5 µL
1U <i>Pwo</i> DNA polimeraz	0.5 µL
H ₂ O	35 µL

Standart PCR programı şu şekilde uygulandı:

1. Denatürasyon (95 °C, 3 dak)
2. Denatürasyon (95 °C, 45 s)
3. Primer bağlanması (55°C, 45 s)
4. Uzama (72 °C, 1dak/kb)
5. Son uzama (72 °C, 5 dak)
6. 4°C, ∞.

2-4. adımlar 30 kez tekrarlandı. Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı (TB) GC-içeriği ve primer uzunluğu dikkate alınarak aşağıdaki formül (Formül 3.2) yardımıyla 65°C olarak hesaplandı (Chester ve Mars-hook, 1993).

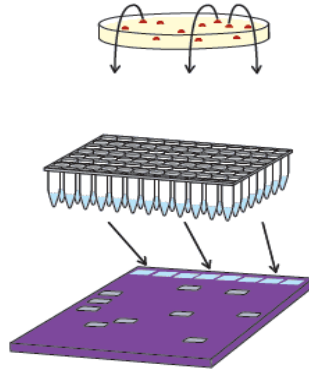
$$TB = (TB1-TB2)/2 - 3^{\circ}C$$

Formül 3.2 Optimum bağlanma sıcaklığı, TB Bağlanma sıcaklığı ($^{\circ}C$) ve TB1 & TB2 5' ve 3' primerlerin erime sıcaklıkları.

3.2.7 Koloni PCR

İlgili DNA fragmentini içeren vektörü taşıyan hücrelerin taranmasında koloni PCR kullanıldı. Transformasyonun ardından seçici antibiyotik ortamı içeren petrilerde hücreler inkübe edildi. Tek düşen koloniler pipet ucu yardımıyla ayrı PCR tüplerine alındı ve standart PCR karışımından 10 μ L eklendi. Hücrelerin parçalanması için standart PCR programında ilk denatürasyon basamağı 95 $^{\circ}C$ 'de 5 dak olarak değiştirildi ve vektöre spesifik primerler (pET21a(+) vektörü için T7 Promotor ve T7 Terminatör primerleri) kullanıldı. Koloni PCR karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı.

5 $\times$ Green GoTaq® tamponu.....	10 μ L
0,5 U GoTaq® DNA polimeraz.....	0.2 μ L
dNTP karışımı (10 mM)	1 μ L
T7 Promotor ve T7 Terminatör primerleri (1 μ M)	10 μ L
H ₂ O.....	<u>36.8 μL</u>
	50 μ L



Şekil 3.4 Koloni PCR işleminin şematik gösterimi.

Amplifikasyon için standart PCR programı uygulandı.

1. Denatürasyon(95 $^{\circ}C$, 5 dak)
2. Denatürasyon (95 $^{\circ}C$, 45 s)
3. Primer bağlanması (55 $^{\circ}C$, 45 s)
4. Uzama (72 $^{\circ}C$, 1dak/kb)
5. Son uzama (72 $^{\circ}C$, 5 dak)
6. 4 $^{\circ}C$, ∞ .

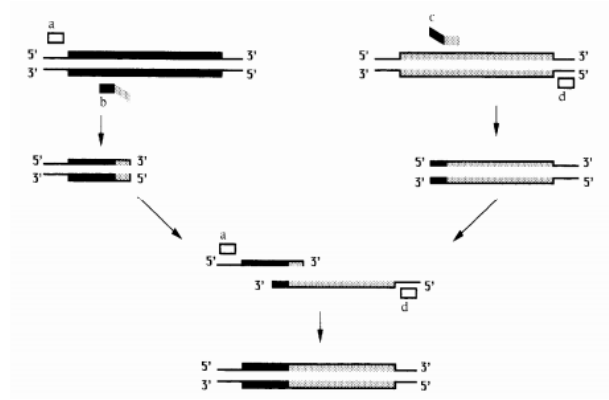
2-4. adımlar 30 kez tekrarlandı. Agaroz jelde PCR ürünlerinin büyüklüğü karşılaştırıldı ve bu şekilde klonlanan geni içeren vektörleri taşıyan koloniler belirlendi. PCR sonucunda hedef geni almamış vektörlerden yaklaşık 300 bp

büyükliğünde fragmentler oluşmaktadır. Hedef geni almış vektörler ise daha büyük fragmentler (*npl* geni için yaklaşık 1,800 bp) vermektedir.

3.2.8 Mutajenez yöntemleri

3.2.8.1 SOE-PCR

Overlap extension (SOE) PCR’ da birbirinin komplementeri iki mutajenik primer kullanılır ve istenen PCR ürünü iki ayrı fragmentin birleştirilmesiyle elde edilir (Ho *et al.*, 1989). İstenen nükleotit değişikliklerini içeren 5' ve 3' mutajenik primerler 25-35 bp büyüklüğündedir. 5' dış primer ile 3' mutajenik iç primer birlikte ve 3' dış primer ile 5' mutajenik iç primer ile birlikte kullanılarak iki ayrı PCR gerçekleştirilir. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması ve agaroz jelden ekstrakte edilmesinin ardından, başlangıçtaki kalıp DNA’nın kullanılmadığı üçüncü bir PCR gerçekleştirilir. Bu adımda birinci aşamada elde edilen PCR ürünleri 5' ve 3' dış primerleri ile birlikte kullanılır. (Şekil 3.5, Warrens *et al.* 1997)



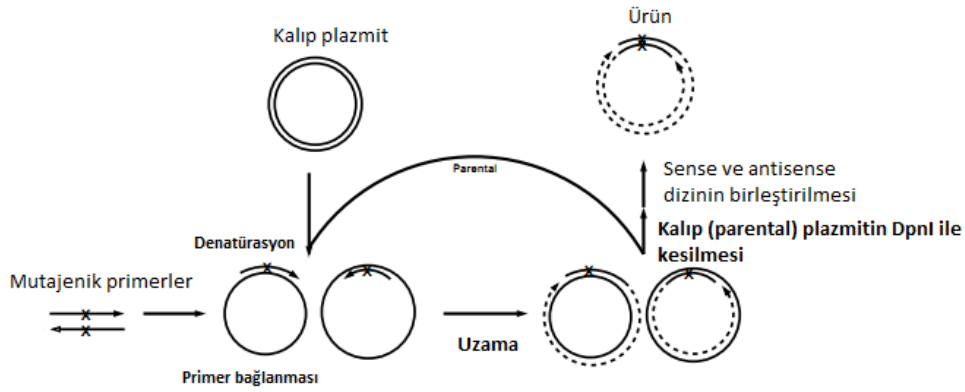
Şekil 3.5 SOE-PCR adımlarının şematik gösterimi.

3.2.8.2 Quickchange protokolü

Mutasyon oluşturma amacıyla kullanılan bu protokol Regensburg Üniversitesi Biyofizik ve Biyofizikokimya çalışanları tarafından Stratagene (LA Jolla, CA, USA) Quickchange™ bölge-yönlendirilmiş mutajenez protokolünün modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur.

Stratagene tarafından geliştirilen Quickchange™ protokolünde, bir çift mutajenik komplementer primer kullanılarak kalıp plazmit tamamen amplifiye edilir ve böylece istenen mutasyonu taşıyan ilgili gen fragmenti hızlı bir şekilde elde edilir (Wang, W. and Malcolm, B., 1999). 25-45 bp uzunluğunda sense ve antisense primerler ile iki ayrı PCR gerçekleştirilerek, kalıp plazmidin tamamı sense ve antisense olarak amplifiye edilir. Hiçbir primerin kullanılmadığı üçüncü PCR adımı transformasyonda kullanılacak plazmit ürünü elde edilmiş olur. Kimyasal kompetent hücreler ile gerçekleştirilen transformasyon adımı önce kalıp DNA *DpnI* ile kesilerek ortamdan uzaklaştırılır. *DpnI* ile kesim aşaması çok

önemlidir. *DpnI* sadece metillenmiş bölgeler ile etkileşir ve metillenmiş DNA' yı parçalar. Böylece kalıp DNA ortamdan uzaklaştırılırken, elde edilen PCR ürünü kesime uğramaz. Bu adım transformasyon sonucu elde edilebilecek ve kalıp DNA' yı taşıyan kolonileri önlemek için oldukça kritiktir. Dikkat edilmesi gereken nokta, kalıp plazmidin JM101 gibi metilasyon defektli suştan elde edilmemiş olmasıdır. Aşağıda Quickchange protokolünün adımları şematize edilmiştir (Şekil 3.6, Loening, 2010):



Şekil 3.6 Quickchange™ adımlarının şematik olarak gösterimi.

Quickchange protokolü ile gerçekleştirilen PCR karışımlarının içerikleri ve koşulları aşağıda verilmiştir.

1. E1 ve E2 PCR reaksiyonları
 - 5 µL NEB Q5 High Fidelity 10X Buffer
 - 80 pmol primer (E1 için ileri ve E2 için geri primer)
 - 50 ng kalıp plazmit
 - 1 µL dNTP (10mM)
 - 1 µL NEB Q5 High Fidelity DNA Polymerase (2-3 U/µL)
 - H₂O (Reaksiyon karışımı 50 µL' ye tamamlandı)
- a 95°C 3'
 - b 95°C 45"
 - c 55°C 1'
 - d 72°C 2' (2 dak/1 kb)
- b-d arasındaki döngüler 4 kez tekrarlandı.

2. QCM Reaksiyonu

25 µL E1 reaksiyon ürünü

25 µL E2 reaksiyon ürünü

1 µL NEB Q5 High Fidelity DNA Polymerase

a 95°C 3'

b 95°C 45"

c 55°C 1'

d 72°C 2' (2 dak/1 kb)

b-d arasındaki döngüler 18 kez tekrarlandı.

3. 25 µL QCM reaksiyon ürünü, 1 µL *DpnI* (20 U/µL) muamele edilerek 1.5 saat boyunca 37 °C' de bekletildi.

4. Ardından QCM ürünü kimyasal kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi.

3.2.9 DNA dizi analizi

Vektörlere klonlanan genlerin dizi analizi Geneart (Regensburg, Almanya) veya İYTE BİYOMER laboratuvarlarında yapıldı. DNA dizi analizi için Sanger Yöntemi kullanıldı (Sanger *et al.*, 1977) ve analizler ABIPRISM® 3700 DNA Analyzer cihazında (Applied Biosystems, New York) gerçekleştirildi. Dizi analizi için gönderilen örnekler 10 µL hacimlerde ve ~300 ng DNA içerecek şekilde hazırlandı. Vektöre spesifik primerler firma tarafından temin edildi. ABI formatıyla alınan analiz sonuçları BioEdit programı yardımıyla değerlendirildi.

3.3 *E. coli*' de Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırılması

3.3.1 Heterolog protein ekspresyonu ve nikel-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması

3.3.1.1 Proteinlerin küçük ölçekte ekspresyonu

Proteinlerin küçük ölçekteki ekspresyonu için ilgili antibiyotiği içeren 50 mL LB ortamı 250 mL cam erlene alındı. Büyüme ortamına, OD₆₀₀= 0.1 olacak şekilde tek koloniden oluşturulmuş taze kültür inokule edildi ve 37 °C, 200 RPM'de inkübe edildi. OD₆₀₀= 0,4-0,6'ya ulaştığında değişen konsantrasyonlarda IPTG eklendi. Ekspresyon için inkübe edilen hücreler santrifüjlendi (4,000 RPM, 10 dak, +4 °C) ve ardından hücre pelleti 10 mL 50 mM KP (pH 7.8) tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu buz üzerine alındı ve sonikasyon (% 40 güç; 2s sonikasyon-2s bekletme toplam 1 dak) uygulandı. Homojenattan alınan 100 µL örnek santrifüjlendi (10,000 rpm, 10 dak, +4°C). Supernatant (çözünür fraksiyon

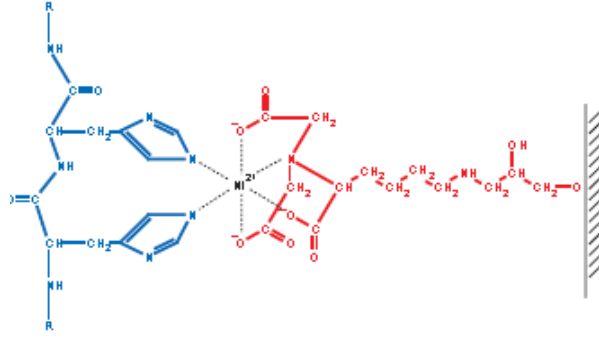
= Ç) ayrıldı ve çözünmeyen fraksiyon (pellet = P) ayrıldı. Pellet 100 µL 0.1 M KP (pH 7.5) tamponunda tekrar süspanse edildi. Çözünür fraksiyon (Ç) ve çözünmeyen fraksiyon (P) SDS-PAGE'e uygulandı ve hücre tarafından sentezlenen hedef proteinin hangi fraksiyonda olduğu tespit edildi. IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen hücrelerin protein ekspresyonları karşılaştırıldı.

3.3.1.2 Poteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu

Proteinlerin büyük ölçekte ekspresyonu için ilgili antibiyotiği içeren 1L LB ortamı 3 L cam erlene alındı. Büyüme ortamına, OD₆₀₀= 0,1 olacak şekilde tek koloniden oluşturulmuş taze kültür inokule edildi ve 37 °C, 160 RPM'de inkübe edildi. Test ekspresyonunda belirlenen konsantrasyonda IPTG, OD₆₀₀= 0,4-0,6'ya ulaştığında ortama eklendi. Protein ekspresyonu için inkübasyon sıcaklığının 20 °C veya 30°C olarak belirlendiği durumlarda, erlenler IPTG ilavesinden önce yaklaşık 30 dakika bekletildi. Ekspresyon için inkübe edilen hücreler santrifüjlendi (4,000 RPM, 10 dak, +4°C) ve ardından hücre pelleti her 1 L ortam için 35 mL, 50 mM KP (pH 7.8), 500 mM NaCl ve 5 mM imidazol içeren tamponda süspanse edildi. Hücre süspanسیونu buz üzerine alındı ve sonikasyon (%50 güç; 2s sonikasyon-2s bekletme toplam 5 dak) uygulandı. Homojenat santrifüjlendi (13,000 RPM, 30 dak, +4°C) ve çözünür fraksiyon (Ç) afinite kolonuna uygulandı.

3.3.1.3 Metal şelat afinite kromatografisi

Metal şelat afinite kromatografisi (Porath *et al.*, 1975) HisTrap™ FF crude kolon (GE Healthcare, kolon hacmi: 5 mL, maksimum basınç: 0.3 MPa) kullanılarak ÄKTA purifier 10 sistemiyle gerçekleştirildi. Bu kolonlarda matriks olarak Sefaroz 6'ya (fast flow) kovalent bağlı iminodiasetik asit (IDA) kullanılmaktadır. IDA, metal iyonunu (Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ or Fe³⁺) şelatlar ve bu şekilde metal iyonu immobilize edilir (Şekil 3.7). Protein moleküllerinin yüzeyindeki elektronca zengin amino asitler (histidinin imidazol halkası, triptofanın indol halkası ve sisteinin sülfidril grubu) metal iyonu ile etkileşir ve proteinler immobilize metal iyonuna olan afinitelerine göre ayrılır. N- veya C-terminalde (His)₆-tag bulunan rekombinant proteinler kolona uygulandığında metal iyonu (bu çalışmada Ni²⁺ iyonu) ile etkileşim sonucu kolonda spesifik olarak tutunurlar. Proteinlerin elüsyonu, imidazol gradienti ile veya doğrudan belirli konsantrasyonda imidazol içeren tamponla sağlanır.



Şekil 3.7 Metal şelat afinite kromotografisi matriksi.

AKTA™ Purifier 10 (GE Healthcare, München) sisteminde şu protokol uygulandı: Akış hızı 4 mL/dak (5 mL kolon) olarak belirlendi. Kolon, 2 kolon hacmi tampon A (50 mM KP (pH 7,8), 500 mM NaCl, 10 mM imidazol) ile dengelendi ve homojenizasyon tamponunda hazırlanmış 30–60 mL protein çözeltisi uygulandı. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kolon, 5 kolon hacmi tampon A ile yıkandı. 10-500 mM aralığındaki imidazol gradienti, tampon A ve tampon B'nin (50 mM KP (pH 7,8), 500 mM NaCl, 500 mM imidazol) uygun oranlarda karıştırılmasıyla sağlandı ve fraksiyonlar (2 mL) toplandı. Kolon, 5 kolon hacmi tampon B ile yıkandıktan sonra, 5 kolon hacmi tampon A ile tekrar dengelendi. Kolonun temizlenmesi için 5 hacim H₂O ve ardından 3 hacim %20 etanol ile yıkandı. Kolon oda sıcaklığında etanolde saklandı.

Proteinlerin elüsyonu sırasında sistem tarafından 260 ve 280 nm'deki absorpsanlar kaydedildi ve kromatogram elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE'e uygulandı ve seçilen fraksiyonlar gerçekleştirilecek ölçümlerin niteliğine bağlı olarak 5L, 10/50 veya 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponuna karşı gece boyu diyalizlendi. Diyalizatta çökelek oluşması durumunda santrifüj yapıldı (13,000 RPM, 15 dak, 4 °C).

3.3.1.4 Proteinlerin ultrafiltrasyon ile değiştirilmesi

Diyaliz sonrası, gerekli olduğu durumlarda, proteinlerin değiştirilmesi amacıyla Amicon® santrifüj tüpüne (Amicon Ultra 15; moleküler cut off: 30 kDa) alınan örnekler santrifüjlendi (4,000 rpm, +4°C) Santrifüj süresi, protein örneğinin hacmine göre belirlendi.

3.3.1.5 Proteinlerin depolanması

Saflaştırılan ve değiştirilen protein çözeltileri sıvı azot içine peristaltik pompa yardımıyla damlatıldı ve -80 °C'de depolandı.

3.4 Analitik Yöntemler

3.4.1 Protein konsantrasyonunun tayini

Aromatik amino asitler (triptofan, tirozin ve fenilalanin) ve disülfid köprüleri 250-300 nm aralığında UV ışığı absorblarlar. Bu nedenle proteinin amino asit

dizisinden molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ_{280}) hesaplanabilir (Pace *et al.*, 1995). Formül 3.3' te gösterildiği gibi hesaplanan molar ekstinksiyon katsayısı ve proteinin molekül kütlesi kullanılarak spesifik ekstinksiyon katsayısı hesaplanabilir ($^{0.1\%}A_{280}$) (Formül 3.4).

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Trp } 5500 + \sum \text{Tyr } 1490 + \sum \text{Cys } 125$$

Formül 3.3 Molar ekstinksiyon katsayısının hesaplanması (ϵ_{280} : 280 nm'de molar ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)).

$$^{0.1\%}A_{280} = \epsilon_{280}/MW$$

Formül 3.4 Spesifik ekstinksiyon katsayısının hesaplanması. $^{0.1\%}A_{280}$, 280 nm'deki spesifik ekstinksiyon katsayısı (cm^2/mg). MW; Proteinin molekül kütlesi (g/mol).

Lambert-Beer yasasına göre, 280 nm'deki ekstinksiyon katsayısından yararlanarak protein konsantrasyonu hesaplanabilir (Formül 3.5).

$$A_{280} = ^{0.1\%}A_{280} \cdot c \cdot d$$

$$c = A_{280} / (^{0.1\%}A_{280} \cdot d)$$

Formül 3.5 Ekstinksiyon katsayısından yararlanarak protein konsantrasyonunun hesaplanması.

$^{0.1\%}A_{280}$; 280 nm'deki spesifik ekstinksiyon katsayısı (cm^2/mg), A_{280} ; 280 nm'de ölçülen absorbans, c; konsantrasyon (mg/mL), d; Işık yolu (cm).

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 220-350 nm aralığında absorpsiyon spektrumu alındı. UV spektrumunda 310-340 nm aralığında absorbansın sıfır veya sıfıra yakın olması gerekmektedir. Çünkü bu durum proteinin agregatlaşmadığını gösterir.

B. stearothermophilus kaynaklı neopullulanazın moleküler ağırlığı 69,145.1 Da, molar ekstinksiyon katsayısı $136,180 M^{-1}cm^{-1}$ ve spesifik ekstinksiyon katsayısı ise $1.969 cm^2/mg$ olarak hesaplandı.

3.4.2 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (Laemmli, 1970) için kullanılacak jeller Tablo 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Çoklu jel dökme sisteminde 13 jel hazırlanması amacıyla aşağıdaki jel içerikleri hazırlandı.

Tablo 3.2 %12.5 SDS-PAGE jel hazırlamak için kullanılan çözeltiler.

	Alt jel (% 12.5)	Üst jel (% 6)
Alt jel veya üst jel tamponu	19.5 mL	7.38 mL
%30(w/v)akrilamid/metilen bisakrilamid çözeltisi (37,5:1 oranında)	26.2 mL	5.9 mL
H ₂ O	31.58 mL	15.95 mL
Tetrametiletildiamin	89 µL	29 µL
Amonyum persülfat (% 10)	195 µL	89 µL

SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler 1:1 oranında 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dak inkübe edildi. SDS-PAGE'e 10 µL örnek uygulandı ve 50 mA, 300 V altında yaklaşık 30 dak jelde yürütüldü.

3.4.3 Doğal ve mutant neopullulanaz enzimlerinin karakterizasyonu

3.4.3.1 Neopullulanaz varyantlarının katalitik parametrelerinin belirlenmesi

Neopullulanaz varyantlarının katalitik parametrelerinin belirlenmesi amacı ile substrat olarak β-siklodekstrin kullanıldı. Enzimin, bu substratın değişen konsantrasyonlarında (0.25-20 mM) sahip olduğu aktivite DNS metodu (Miller, Gail Lorenz, 1959) kullanılarak belirlendi.

3.4.3.2 Doğal ve mutant neopullulanaz varyantının oksidatif kararlılığının belirlenmesi

Neopullulanaz varyantlarının oksidatif kararlılığının incelenmesi amacı ile doğal ve mutant enzim, farklı hidrojen peroksit konsantrasyonları (1-50 mM) içeren tampon ortamında inkübe edildi. İnkübasyon oda sıcaklığında ve 15 dak süre boyunca gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından hidrojen peroksitin aşırısı katalaz (5U) ilavesi ile ortamdan uzaklaştırıldı ve enzim aktivitesi DNS metodu kullanılarak belirlendi. Hidrojen peroksit ile muamele edilmemiş enzimin aktivitesi aynı koşullarda belirlendi ve göreceli aktivite değerleri hesaplandı.

3.4.3.3 Doğal ve mutanat neopullulanaz varyantlarının termal kararlılığının belirlenmesi

Doğal neopullulanaz ile aynı koşullarda üretilen ve metal şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılan neopullulanaz varyantları 60°C ve 70°C' de farklı

sürelerde inkübe edildi. Kalan aktivitenin belirlenmesi amacı ile, substrat olarak β -siklodektrin kullanıldı ve enzimatik aktivite sonucu açığa çıkan indirgen şeker DNS metodu ile belirlendi.

3.4.3.4 Doğal ve mutant neopullulanaz varyantlarının sirküler dikroizm (CD) ve diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ölçümleri

Sirküler dikroizm spektroskopisi (CD) ve diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) proteinlerin yapısını belirlemede kullanılan önemli araçlardır (Kelly, 2005). CD spektroskopisinde, bir moleküle ait farklı yapısal özelliklerden kaynaklanan spektral bantlar kolayca saptanabilir. Proteinlerin yapısal analizlerinde kullanılan CD tekniğinin bir avantajı da bütünleyici yapısal bilginin belli sayıda spektral bölgeden elde edilebiliyor olmasıdır. Proteinlerde, ilgilenilen kromoforlar peptit bağı (240 nm'nin altında absorbands verir), aromatik amino asit yan zincirleri (260 ile 320 nm arasında absorbands verir), ve disülfid bağlarını (260 nm civarında yoğunlaşan geniş bir dalga boyu aralığında zayıf absorbands verir) içerir. CD çalışmaları sonucunda, ilgili proteine ait sekonder yapı kompozisyonu (% heliks, katlanma, döngü, vb.), kofaktör bağlama bölgelerinin doğruluğu, proteindeki konformasyonel değişiklikler ve protein katlanması hakkında bilgi edinilebilir.

DSC ise, protein ve diğer makromoleküllerin molar ısı kapasitelerini sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçer (Freire, 1995) ve proteinin termodinamik özellikleri hakkında bilgi verir. Proteinin 'katlanma/açılma' reaksiyonu, diğer tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi ısı etkilerin eşliğinde gerçekleşir. Sabit basınç altında, proteinin katlanmış yapısının açılmasıyla ortaya çıkan ısı miktarı prosesin entalpisini ifade etmektedir. DSC ile sulu çözelti formundaki proteinin ısı kapasitesi, sıcaklığın fonksiyonu olarak doğrudan ölçülebilir. Isı kapasitesi profilinin altındaki alan katlanmış proteinin açılma sürecinin entalpisini ifade eder. Maksimum ısı kapasitesi profilinin sıcaklığı ise geçiş bölgesinin sıcaklığını anlamayı sağlar. Katlanmış ve açılmış yapıların ısı kapasiteleri arasındaki fark ise entalpi ve entropinin sıcaklığa olan bağımlılığını tanımlar. Böylece protein kararlılığının sıcaklığa olan bağımlılığı tanımlanmış olur. Tüm bu parametrelere ek olarak, katlanmış proteinin açılmasının ne şekilde gerçekleştiğini de DSC kullanarak anlamak mümkündür. Dolayısıyla DSC yöntemiyle belirlenebilecek parametreler şu şekilde özetlenebilir: Bir molekülün mutlak kısmi ısı kapasitesi, sıcaklıkla indüklenen geçiş haliyle bağlantılı olan entalpi değişimi (ΔH), entropi değişimi (ΔS) ve ısı kapasitesi değişimi (ΔC_p) gibi termodinamik parametreler ve açılma (bölüşüm) fonksiyonu, geçiş hallerinin popülasyonu ve bu geçiş hallerinin termodinamik parametreleri. DSC diferansiyel modda çalışır. Bu

da sulu çözelti formunda bulunan proteinin ısı kapasitesinin ölçümünün, tampon çözeltinin ısı kapasitesi ölçümüne göre gerçekleştiği anlamına gelir. İdeal koşullar altında, yani örnek haznesinin ve referans haznesinin ısı kapasitesinin ve hacminin aynı olduğu durumda, sadece örnek/tampon taraması yapmak yeterli olacaktır. Ancak, deneysel koşullar altında bu iki hazne birebir identik değildir. Bu yüzden, örnek taramasını gerçekleştirmeden önce örnek haznesi içine de tampon ekleyerek tampon/tampon taraması yapmak gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken başka bir parametre de sıcaklık artış hızıdır. Doğal proteinin katlanmış yapısının sıcaklıkla açılma profilini doğru bir şekilde anlayabilmek için sıcaklığın çok hızlı arttırılmaması gerekir. Aksi takdirde geçiş bölgelerinin, sıcaklık değişimlerinden çok hassas bir şekilde etkilendiği durumlarda profilin tanımlanması, oluşan gürültülü tarama sonuçları nedeniyle mümkün olmamaktadır.

Çalışmada, uygun konsantrasyona seyreltilen veya deriştirilen protein çözeltilerinin DSC ölçümleri 35-100°C (veya 110°C) aralığında, CD ölçümleri ise 25-100°C aralığında yapıldı.

3.5 Hesapsal Yöntemler

3.5.1 Esnek yüzey kavitelelerini doldurma yaklaşımı ve Rosetta_{VP}

Protein yüzeyinde bulunabilecek oyuklar, neredeyse bütün proteinlerde mevcuttur ve boyut olarak en az 100 amino asitten meydana gelirler. Bu yapılar, bir proteinin rasyonel dizaynında o proteine ait düşünülen ilk özelliktir (Hubbard *et al.*, 1994). Deneysel ve teorik olarak gerçekleştirilen pek çok çalışma proteinlerdeki oyukların termal kararlılık ile olan ilişkilerini ortaya çıkarmıştır (Akasako *et al.*, 1997; Szilágyi and Závodszky, 2000; Dubey and Jagannadham, 2008). Proteinin yoğun bir şekilde katlanması, kararlılık açısından önemlidir. Bu yüzden kararlılığı arttırmaya yönelik rasyonel stratejilerin pek çoğu, çekirdeğe yakın bulunan amino asit artıklarının değiştirilerek oyukun doldurulması prensibine dayanır. Ancak yapılan amino asit değişimleri, seçilen artıkların protein çekirdeğine yakın olması nedeniyle aktivite kaybına neden olurlar (Yoshida *et al.*, 2005). Bu noktada, mutasyon gerçekleştirmek amacıyla seçilen artığın ısıl yönden kararsız olması ve enzimin katalitik özelliklerinde büyük bir rolünün olmaması en önemli parametrelerdir. Günümüzde, çekirdek artıklarının mutasyonlara karşı yüzey artıklarından daha hassas olduğu ve dolayısıyla enzim aktivitesi açısından daha çok tehlike oluşturduğu büyük bir çoğunluk tarafından kabul edilmektedir (Bowie *et al.*, 1990; Matthews, 1993; Cordes and Sauer, 1999; Guo *et al.*, 2004; Tokuriki *et al.*, 2007). Yüzey artıklarının, onları çevreleyen komşu artıklarla etkileşimi çekirdek artıklarına göre daha azdır. Bu yüzden yüzeyde bulunan oyukların rasyonel dizayn ile yeniden tasarlanması çekirdeğe

yakın oyuklara göre termal kararlılık ve aktivitenin korunması açısından daha umut vericidir (Joo *et al.*, 2010).

Protein oyuklarında, kararlılığı arttırmaya yönelik mutasyonları doğru bir şekilde belirlemek amacıyla kullanılan Rosetta_{VIP} protokolünde (Borgo and Havranek, 2011) ilk olarak proteinin yapısal modelinde bulunan oyuklar bulunur. Bu oyuklar, gerçekleştirilecek amino asit değişimi sonucu oyuğun dolmasını sağlayacak potansiyel amino asit artıklarının belirlenmesi için kullanılır. Mutasyon potansiyeli olan her bir artık için optimizasyon işlemi gerçekleştirilir. Bu optimizasyon işleminde seçilen artık dışındaki amino asit artıkları sabit tutulur fakat artığın kendisinin bu sabit omurga yapısı üzerinde serbestçe hareket etmesine izin verilir. Bu durum omurga yapısının esnekliğinin, potansiyel mutasyonlar üzerinde yapabileceği girişim etkisini, (hesapsal olarak istenen bir durumdur) devre dışı bırakır. İlk adımda en yüksek skoru alan amino asit değişimi yapıya katılır. Bu yapı, seçim-optimizasyon ve relaksasyon adımlarından oluşan ikinci bir tur için başlangıç yapısını oluşturur. Yeni oyukların bulunamadığı durumda ise protokol sona erer.

3.5.2 Otomatize edilmiş kararlılık tahmin aracı ‘Eris’

Hesapsal yöntemler ile protein kararlılığının tahmin edilmesi hala aşılması oldukça zor bir engeldir ve bu zorluklara sebep olan başlıca bir kaç nokta vardır. Yakın zamandaki gelişmeler sayesinde, moleküler dinamik simülasyonları aracılığıyla $\Delta\Delta G$ değerinin doğru bir şekilde hesaplanması mümkün hale gelmiştir. Fakat bu hesaplamalar hesapsal olarak büyük bedellere sebep olur (yani hesaplamaların etkinliği düşüktür). Büyük-ölçekli modern $\Delta\Delta G$ tahmin metotları, buluşsal algoritmalar ile birlikte etkin kuvvet alanları ve ampirik parametreleri kullanarak mutasyonlardan kaynaklanan kararlılık değişimlerini belirler. Bir başka deyişle, hesaplamalar deneysel verilerle ilişkili olarak gerçekleştirilir. Bununla birlikte, buluşsal algoritmalarla ilişkin dezavantaj yaratan iki durum söz konusudur. Bu metotun kullanılabilmesi için deneysel olarak elde edilmiş $\Delta\Delta G$ verilerine ihtiyaç duyulur. Çünkü bu deneysel veriler yapılan hesaplamalarda parametre olarak kullanılmaktadır. Bu durumda genellikle tıpkı alanin-tarama denemelerinde olduğu gibi, büyük artıkların küçük artıklar ile değiştirildiği mutasyonların etkisi altında kalınmış olur. Bu özellikteki deneysel verilerin hesapsal çalışmalara uygulanabilirliği iyi değildir. Diğer bir dezavantaj, proteinin omurga yapısının esnekliğinin ve omurga gerginliğinin bu metotlarda hesaba katılmamasıdır. Ancak omurga esnekliği, atomik çarpışmaların analizi için çok kritiktir. Bu etkenin hesaba katılmaması doğruluk payının düşmesine sebep olur ve buluşsal metotların uygulama alanını kısıtlar.

Tüm bu sorunları çözmek, etkinliği, aktarılabilirliği ve uygulanabilirliği yüksek seviyede tutmak için Eris metodu geliştirilmiştir (Yin *et al.*, 2007). Eris atomik modelleme ile fiziksel kuvvet alanını kullanırken, aynı zamanda hızlı bir şekilde yan zincir katlanmasını ve omurga relaksasyon algoritmalarını da kullanır. Serbest enerji van der Waals bağlarının, çözünmenin, hidrojen bağlarının ve omurga-bağımlı istatistiksel enerjilerinin toplamı olarak ifade edilir. Bu parametreler birbirinden bağımsız olarak çalışılır. Ek olarak, hesaplama sırasında bazı atom çarpışmaları veya omurga gerilmelerinin saptanması durumunda devreye giren omurga relaksasyonu Eris' in sahip olduğu tamamlayıcı bir basamaktır.

Eris, 5 farklı proteinden elde edilen 595 mutant üzerinde denenmiştir. Bu denemelerin sonucuna göre, tahmin edilen ve deneysel olarak ölçülen $\Delta\Delta G$ değerleri arasında yüksek tutarlılık bulunmaktadır. Bu denemeler için korelasyon katsayısı 0.75 ($P= 2 \times 10^{108}$) olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu korelasyon katsayısı, Eris'e alternatif olarak adı geçen çeşitli metotların korelasyon katsayıları ile oldukça kıyaslanabilecek bir değerdedir.

Önceki metotlardan farklı olarak Eris, küçük yan grupları, büyük yan gruplar ile değiştiren amino asit değişimlerini de yüksek doğruluk ile tahmin etme özelliğine sahiptir. Eris'e bu özelliğini, omurga yapısını etkin bir şekilde rahatlatabiliyor olması ve mutasyonların oluşturulması sonucu gerçekleşen çarpışmaları çözümleyebiliyor olması vermektedir. Eris küçükten-büyüğe değişimler için yapılan kararlılık hesaplamalarında diğer web-temelli yöntemlere üstünlük sağlamaktadır.

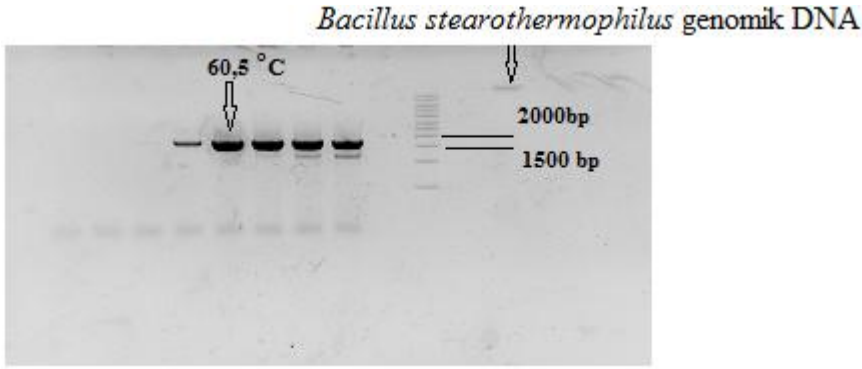
3.5.3 Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik mutasyonların belirlenmesi

Neopullulanazın termal ve oksidatif kararlılığının iyileştirilmesine yönelik mutasyon tahminlerinin hesapsal yöntemler kullanılarak belirlenmesi, Regensburg Üniversitesi, Biyofizik ve Biyofizikokimya çalışanları Prof. Dr. Rainer Merkl ve doktora öğrencisi Jan-Oliver Janda tarafından gerçekleştirildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

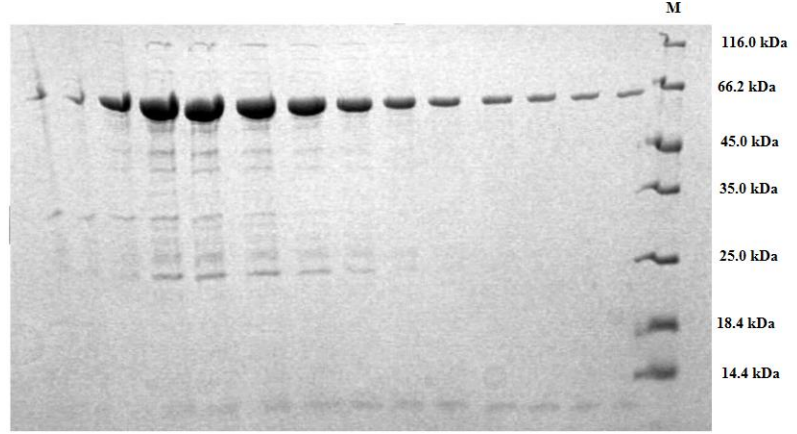
4.1 Doğal Neopullulanazın Klonlanması, Üretilmesi, Saflaştırılması, Oksidatif ve Termal Kararlılığının İncelenmesi

Neopullulanazı kodlayan gen fragmentinin amplifikasyonu, kalıp olarak *B. stearothermophilus* genomik DNA'sı kullanılarak PCR ile gerçekleştirildi. Primer olarak sırasıyla *NotI* ve *XhoI* restriksiyon tanıma bölgelerini içeren 5' ve 3' primerler kullanıldı. İlk aşamada, teorik olarak hesaplanan optimum primer bağlanma sıcaklığını kesinleştirmek için 55-70°C arasında gradient PCR yapıldı. Gradient PCR koşulları şu şekilde uygulandı: 1. 95°C, 3 dak; 2. 95°C, 30 s; 3. 55-70°C, 30 s; 4. 72°C, 45 s; 5. 72°C 10 dak. 2.-4. basamaklar 30 kez tekrarlandı. Neopullulanaz geninin amplifikasyonu için optimum primer bağlanma sıcaklığı 60.5°C olarak belirlendi.



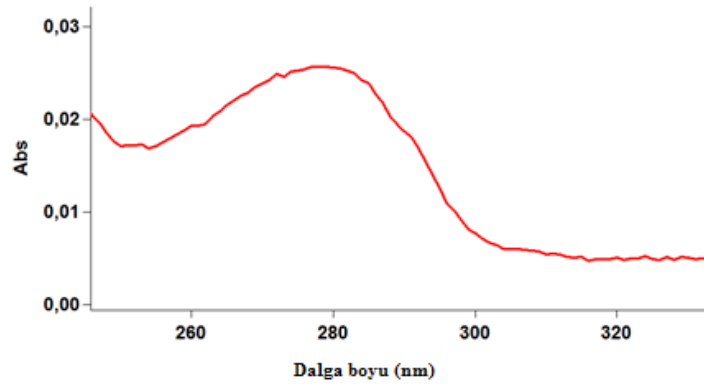
Şekil 4.1 Gradient PCR sonucu elde edilen DNA bantlarının ve *B. stearothermophilus* genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü.

Elde edilen gen fragmenti ve pET 21a(+) vektörü, *NotI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Ardından vektör ve fragment arasında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon karışımının *E. coli* Turbo hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. 37°C'de gece boyu inkübasyonun ardından petride belirlenen koloniler için koloni PCR uygulandı. pET21a(+)/*npl* vektörünü taşıyan ve koloni PCR ile tespit edilen *E. coli* Turbo hücrelerinden plazmit DNA izole edildi. Klonlanan gen fragmenti için DNA dizi analizi gerçekleştirildi. pET21a(+)/*npl* vektörünün ekspresyon suşu olan *E. coli* CodonPlus BL21 (DE3) RIPL hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Büyük ölçekte üretim, 2 L LB besi yerine inoküle edilen hücreler ile 30°C' de gece boyu yapıldı. Protein ekspresyonunu indüklemek için 0.5 mM IPTG kullanıldı. Metal-şelat afinite kromatografisinde elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE'e uygulandı. Saflaştırılan enzim, imidazolü ve sodyum klorürü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) tamponuna karşı +4°C'de gece boyu diyalizlendi.



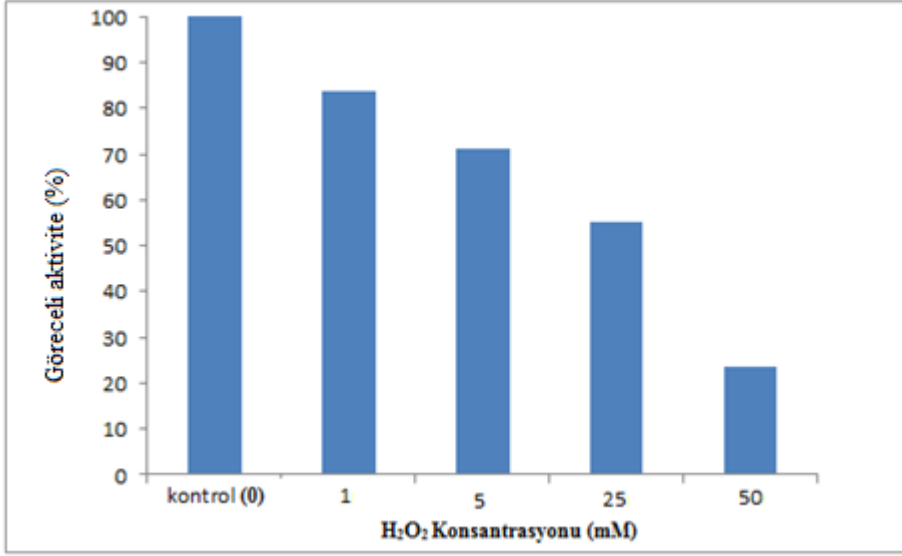
Şekil 4.2 Doğal neopullulanazın metal şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü (Moleküler ağırlık standartı M ile gösterilmiştir).

Saflaştırılan neopullulanazın 220-340 nm aralığındaki UV absorpsiyon spektrumu Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Neopullulanazın UV absorpsiyon spektrumu.

Nikel-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılan neopullulanazın hidrojen peroksit varlığında gösterdiği kararlılık, enzimin farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile muamele edilmesi yoluyla test edildi. Farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarına bağlı olarak enzim aktivitesindeki değişim Şekil 4.4' te verilmiştir.



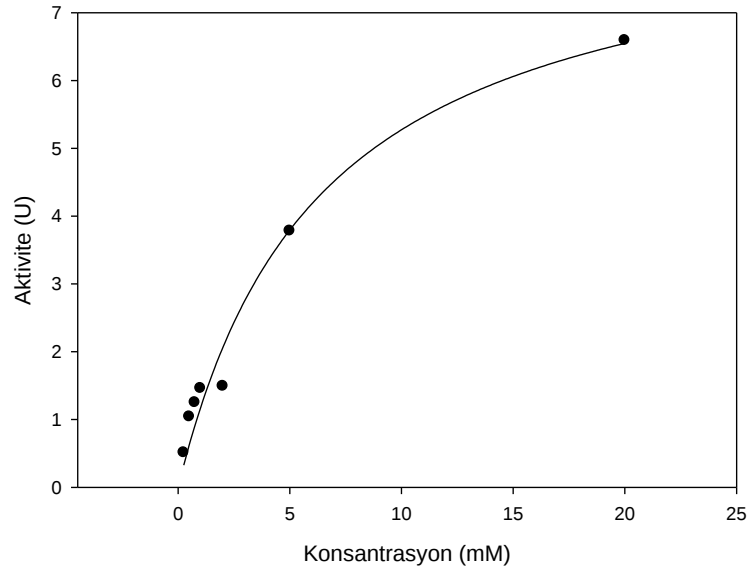
Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile muamele edilen doğal neopullulanazın göreceli aktivitesindeki değişim.

Şekil 4.4’ te belirtildiği gibi, hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artış ile birlikte enzimin aktivitesinde düşüş görüldü. Enzim aktivitesinin, 50 mM H₂O₂ varlığında %66 oranında düştüğü görüldü. Projenin amaçlarından biri, doğal enzimdeki metiyonin artıklarının mutasyonu yoluyla oksidatif kararlılığı arttırmaktır. Projeye kaynak oluşturan çalışmalardan birinde metiyonin artıklarının farklı amino asitlere değiştirilmesinin proteinin oksidatif kararlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Weng et al., 2009; Khemakhem et al., 2009). Literatürde doğal neopullulanazın oksidatif kararlılığına ilişkin bir veri bulunmamaktadır.

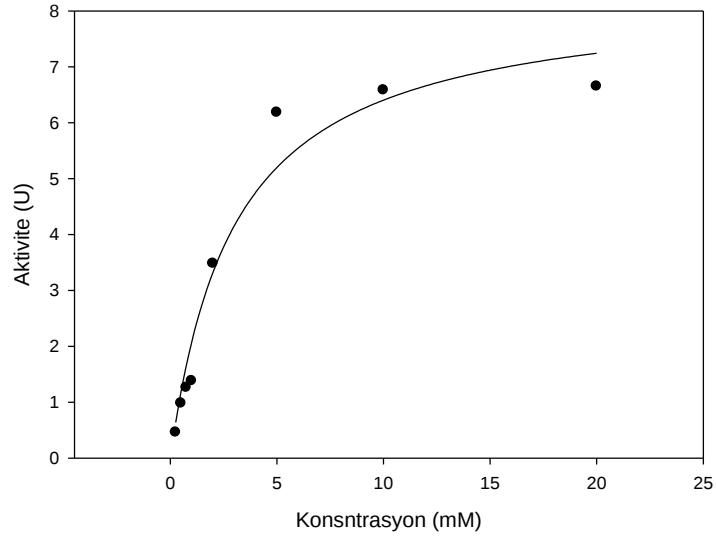
Termal kararlılığına ilişkin deney sonucuna göre, 70°C’de bekletilen enzimin, 2. saatin sonunda aktivitesini %17 oranında kaybettiği belirlendi. Literatürde, enzimin 60°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesini kaybettiği gösterilmiştir (Kuriki *et al.*, 1988).

4.2 Doğal Neopullulanazın Katalitik Parametrelerinin İncelenmesi

Neopullulanazın 0.25-20 mM α -siklodekstrin veya β -siklodekstrin varlığındaki aktivitesi ölçüldü. Aktivite değerleri (U) Sigma Plot (SPSS Inc.) yazılımının hiperbolik fonksiyonu kullanılarak grafiğe geçirildi ve K_M , V_{max} değerleri hesaplandı. α -siklodekstrin için V_{max} 15.8 U, K_M 14.4 mM, β -siklodekstrin için V_{max} 0.46 U, ve K_M 3.76 mM olarak hesaplandı. Elde edilen grafikler Şekil 4.5 ve 4.6’da verilmiştir:



Şekil 4.5 Doğal neopullulanaza ilişkin α -siklodekstrin için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.

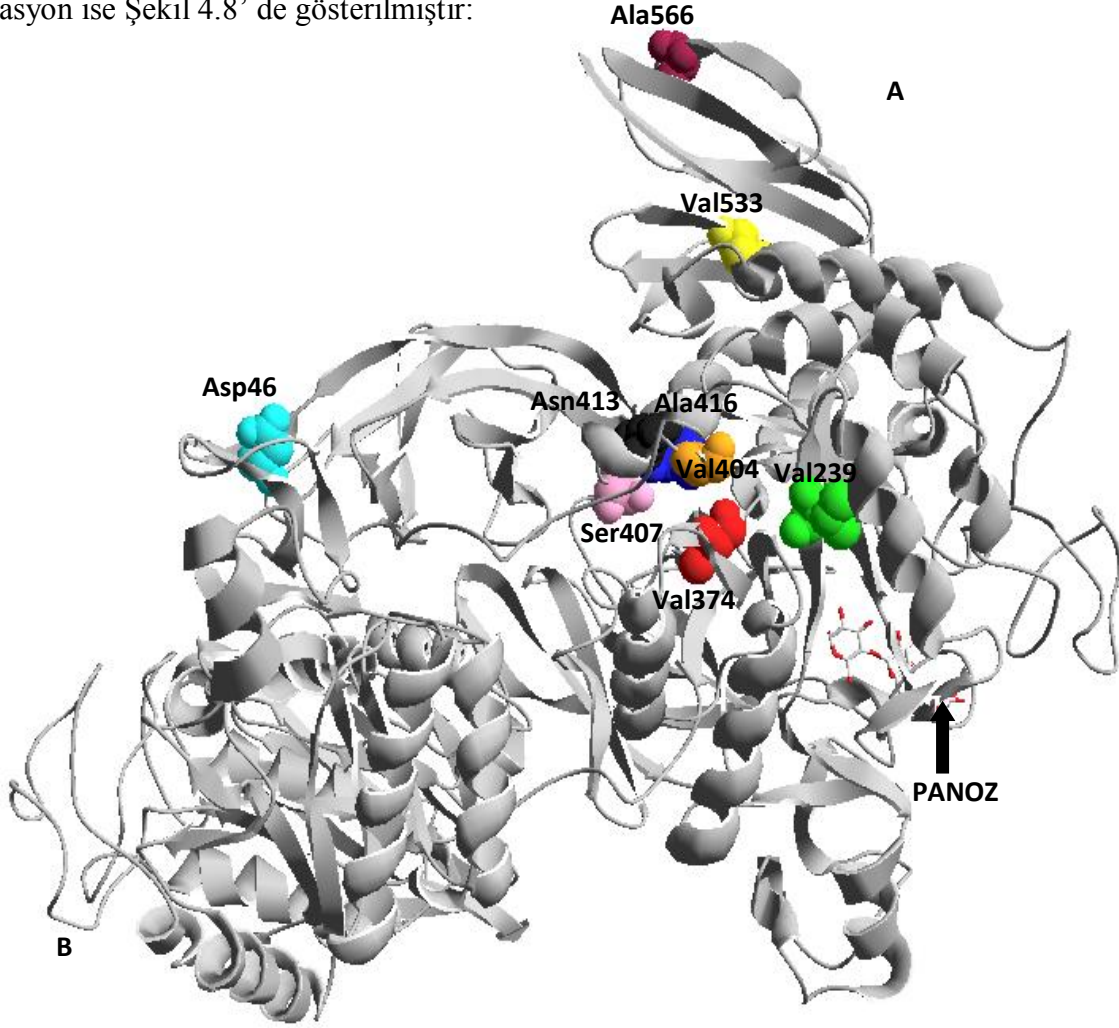


Şekil 4.6 Doğal neopullulanaza ilişkin β – siklodekstrin için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.

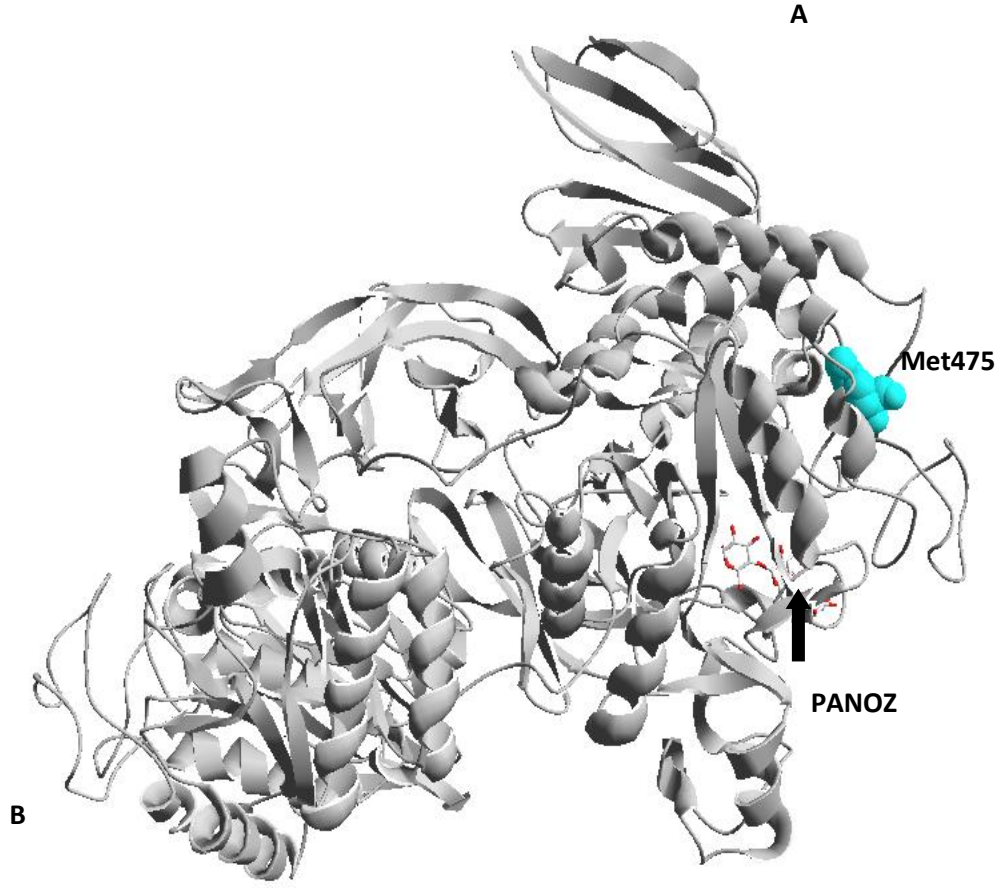
4.3 Mutant Neopullulanaz Gen Fragmentlerinin Oluşturulması, Varyantların Klonlanması, Üretilmesi ve Saflaştırılması

Neopullulanazın termal ve oksidatif kararlılığını arttırmaya yönelik mutasyonlar hesapsal yöntemler kullanılarak belirlendi. Termal kararlılığı arttırmaya yönelik olarak Asp46Glu, Val239Leu, Val374Ile, Val404Leu, Ser407Thr, Asn413Gln, Ala416Ile, Asn413Gln+Ala416Ile, Val533Leu ve Ala566Leu mutasyonları gerçekleştirildi. Oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik ise Met475Ala mutasyonu belirlendi.

Termal kararlılığı arttırmaya yönelik tahmin edilen mutasyonların protein yapısı üzerindeki gösterimi Şekil 4.7’ de ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik mutasyon ise Şekil 4.8’ de gösterilmiştir:

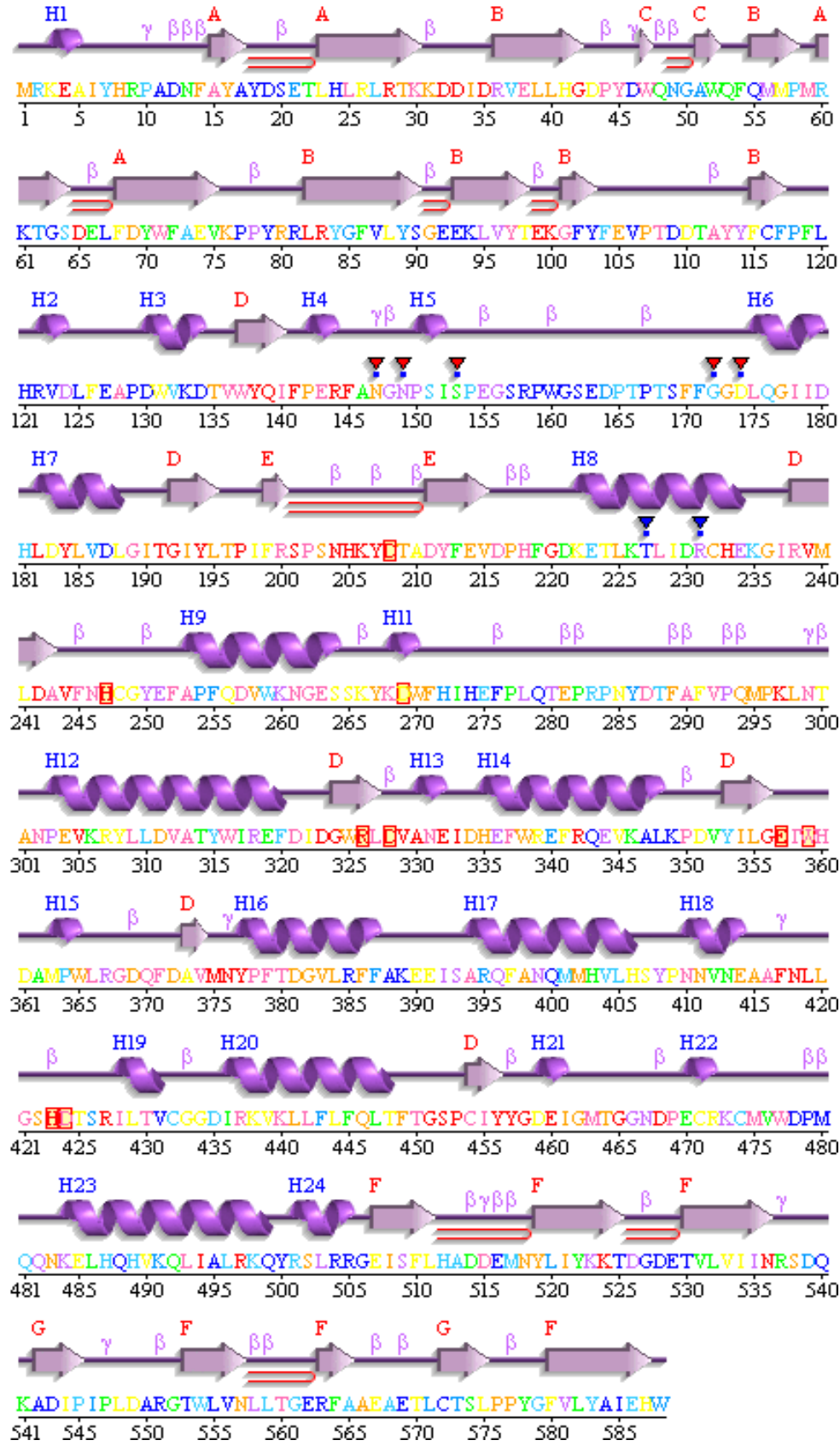


Şekil 4.7 Termal kararlılığı arttırmaya yönelik rasyonel dizayn yoluyla belirlenen amino asit artıklarının neopullulanaza ait A-protomerinin üç boyutlu yapısı üzerinde gösterimi. Pullulanın substrat olarak kullanılmasıyla açığa çıkan panoz, katalitik merkez üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik rasyonel dizayn yoluyla belirlenen amino asit değişiminin üç boyutlu yapı üzerinde gösterimi. Pullulanın substrat olarak kullanılmasıyla açığa çıkan panoz, katalitik merkez üzerinde gösterilmiştir.

B. stearothermophilus'a ait neopullulanazın katalitik merkezinde Asp328, Glu357 ve Asp424 amino asit artıkları bulunmaktadır. Neopullulanazın ait olduğu α -amilaz sınıfı enzimler ile yüksek korunmuşluk gösteren artıkları Asp242, Val244, Asn246, His247, Gly324, Arg326, Asp328, Glu357, His423 ve Asp424'tür. Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik olarak belirlenen amino asit değişimlerinin hiçbiri katalitik bölgede bulunmamaktadır ve korunmuş artıklar arasında değildir. Bu durum, elde edilecek varyantın katalitik aktivitesinin korunması açısından önemlidir. Şekil 4.9' da neopullulanazın içerdiği sekonder yapılar ve amino asit artıklarının korunmuşluk dereceleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Neopullulanazın içerdiği sekonder yapılar ve amino asit artıklarının korunmuşluk dereceleri (Korunmuşluk derecesi en düşükten en yükseğe doğru sırayla; mavi, eflatun, açık mavi, turkuaz, yeşil, sarı, turuncu, pembe, kırmızı şeklindedir).

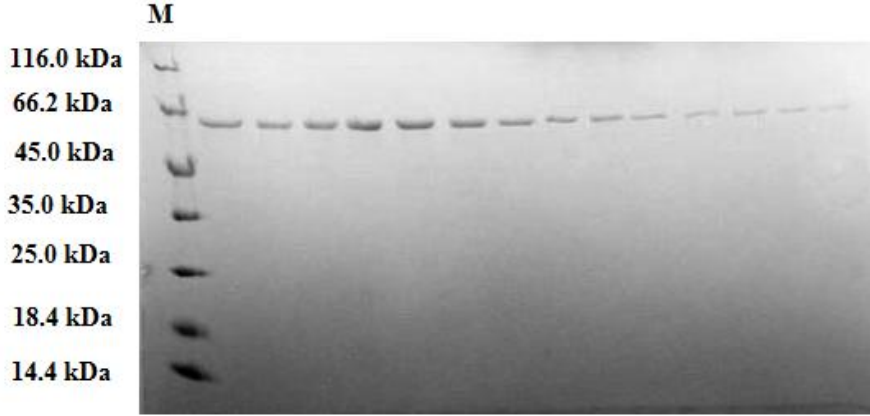
Değiştirilmesi planlanan amino asitlerin bulunduğu domainler Tablo 4.1’ de özetlenmiştir:

Tablo 4.1 Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik belirlenen amino asit artıklarının bulundukları domainler.

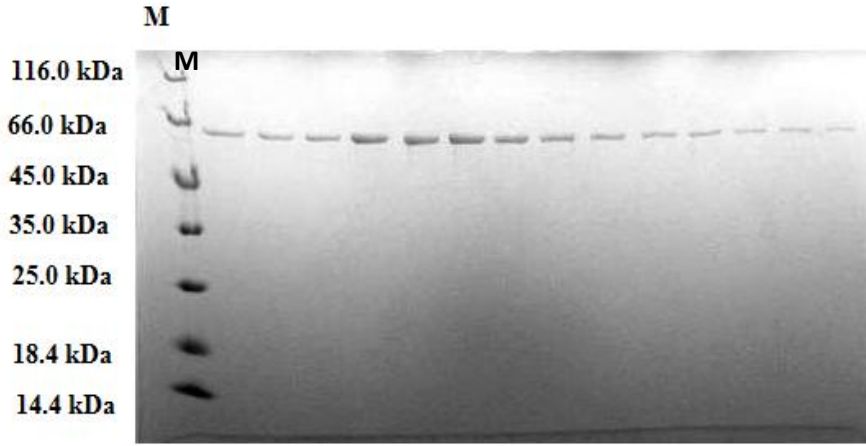
Amino asit artığı	Bulunduğu domain
Asp46	N (12 adet anti-paralel β -tabakası)
Val239	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Val374	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Val404	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Ser407	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Asn413	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Ala416	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Met475	A ((β/α) ₈ - fiçı yapısı)
Val533	C (8 adet anti-paralel β -tabakası)
Ala566	C (8 adet anti-paralel β -tabakası)

Termal ve oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik belirlenen amino asit değişimleri bölge-yönlendirilmiş mutajenez yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Amino asit değişimlerine spesifik olarak tasarlanan primerlere ve doğal genin amplifikasyonu için kullanılan primerlere aynı restriksiyon tanıma bölgeleri eklendi. Mutant fragmentler PCR ile elde edildikten sonra klonlama işlemi, doğal genin klonlama işlemine benzer şekilde gerçekleştirildi.

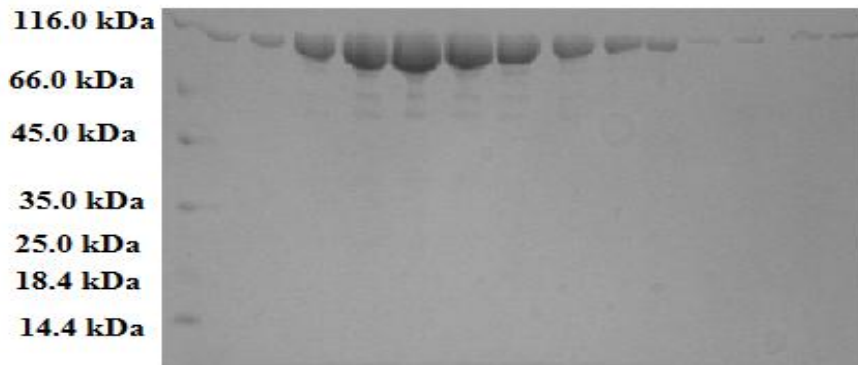
Enzim varyantları, metal-şelat afinite kromatografisi kullanılarak yüksek saflıkta elde edildi. Aşağıda bazı varyantlara ait SDS-PAGE jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.10 Val239Leu varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.



Şekil 4.11 Val374Ile varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.



Şekil 4.12 Ala566Leu varyantının metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü.

Saflaştırılan varyantların protein konsantrasyonları, 280 nm’de verdikleri absorbans ve molar ekstinksiyon katsayıları kullanılarak belirlendi. Deriştirme

gerektiği durumlarda, Amicon ultrafiltrasyon santrifüj tüpleri (Millipore, Eschborn) kullanıldı. Tablo 4.2’ de protein konsantrasyonları verilmiştir:

Tablo 4.2 Metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılan varyantların protein konsantrasyonları. Konsantrasyon değerleri altında verilen deriştirme veya seyreltme oranları, DSC ve CD ölçümleri için geçerlidir. Deriştirme veya seyreltme oranı verilmeyen varyantların DSC ve CD ölçümleri doğrudan diyalizlenmiş protein çözeltisi ile gerçekleştirildi.

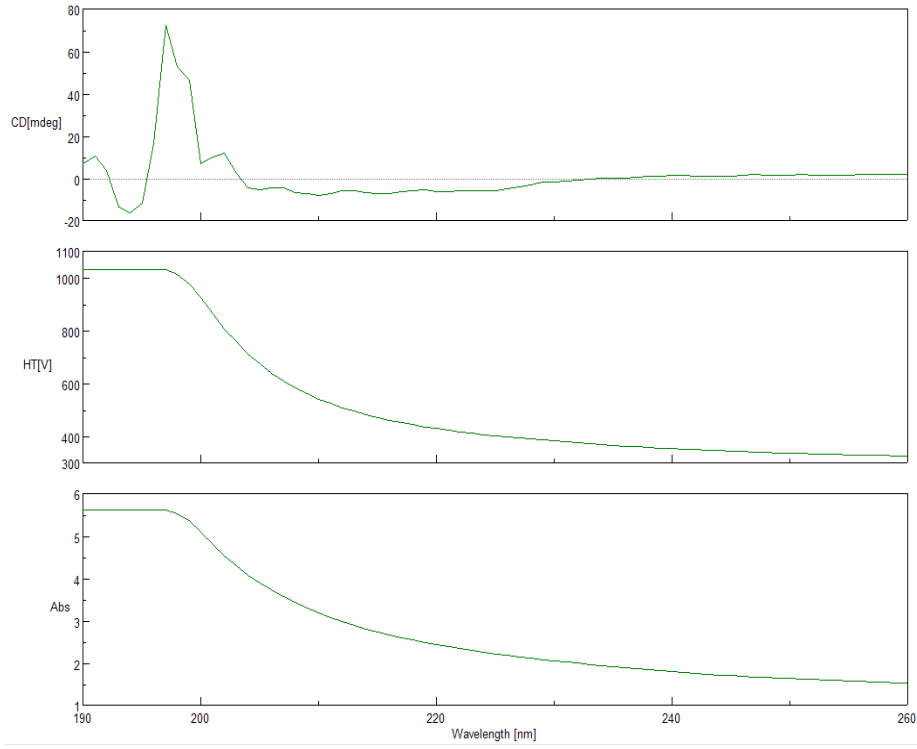
Varyant	Konsantrasyon (uM)	Konsantrasyon (mg/mL)	CD Ölçümü	DSC Ölçümü
Doğal	7.02	0.48	+	+
Asp46Glu	1.96 7 kat deriştirildi	0.14 7 kat deriştirildi	+	alınmadı
Val239Leu	0.87 20 kat deriştirildi	0.06 20 kat deriştirildi	+	+
Val374Ile	0.75 20 kat deriştirildi	0.05 20 kat deriştirildi	+	+
Val404Leu	0.58 20 kat deriştirildi	0.04 20 kat deriştirildi	+	+
Ser407Thr	3.35	0.23	+	+
Asn413Gln	0.16 20 kat deriştirildi	0.01 20 kat deriştirildi	+	alınmadı
Ala416Ile	6.4	0.44	+	+
Asn413Gln+ Ala416Ile	5.12	0.36	+	+
Val533Leu	11.5 2 kat seyreltildi	0.80 2 kat seyreltildi	+	+
Ala566Leu	8.52 2 kat seyreltildi	0.56 2 kat seyreltildi	+	+
Met475Ala	5.0	0.35	alınmadı	alınmadı

4.4 Doğal ve Mutant Neopullulanaz Varyantlarının CD Ölçüm Sonuçları

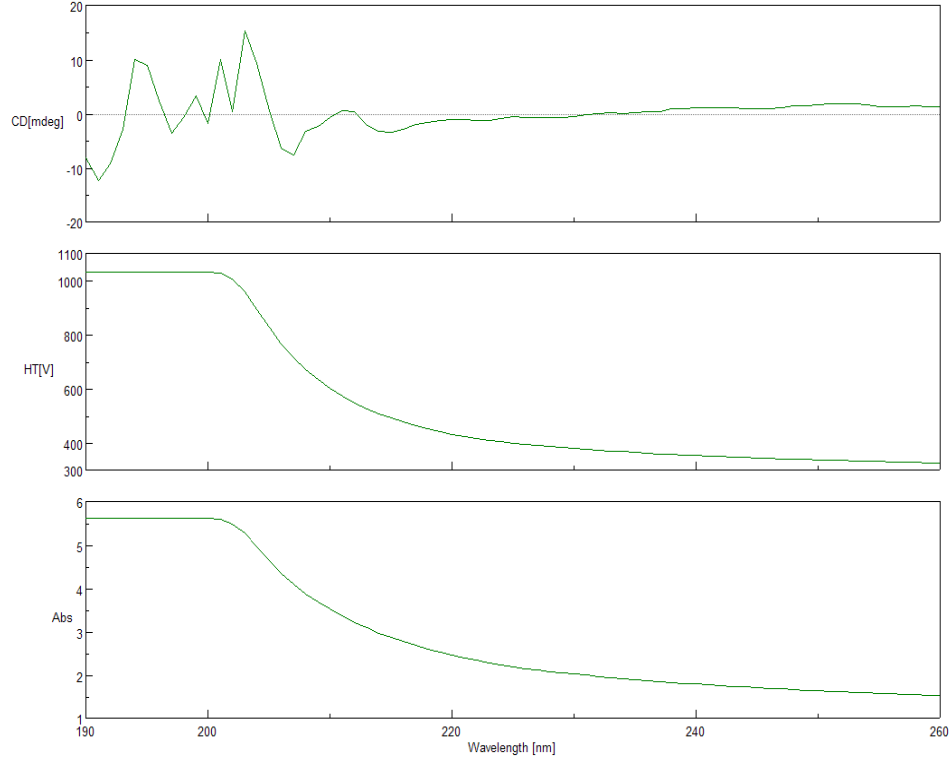
Doğal neopullulanaz ve mutant varyantlar için alınan CD ölçümlerinde, elde edilen spektrumun doğru bir şekilde değerlendirilmesi açısından, protein

konsantrasyonunun 0.2-1 mg/mL arasında olmasına ve 208 ile 260 nm dalga boyları arasında okunan volt değerinin 800' ün üzerine çıkmamasına dikkat edildi.

DSC ölçümlerinin gerekliliğine, termal uygulama öncesinde ve sonrasında alınan CD spektrumları değerlendirilerek karar verildi.



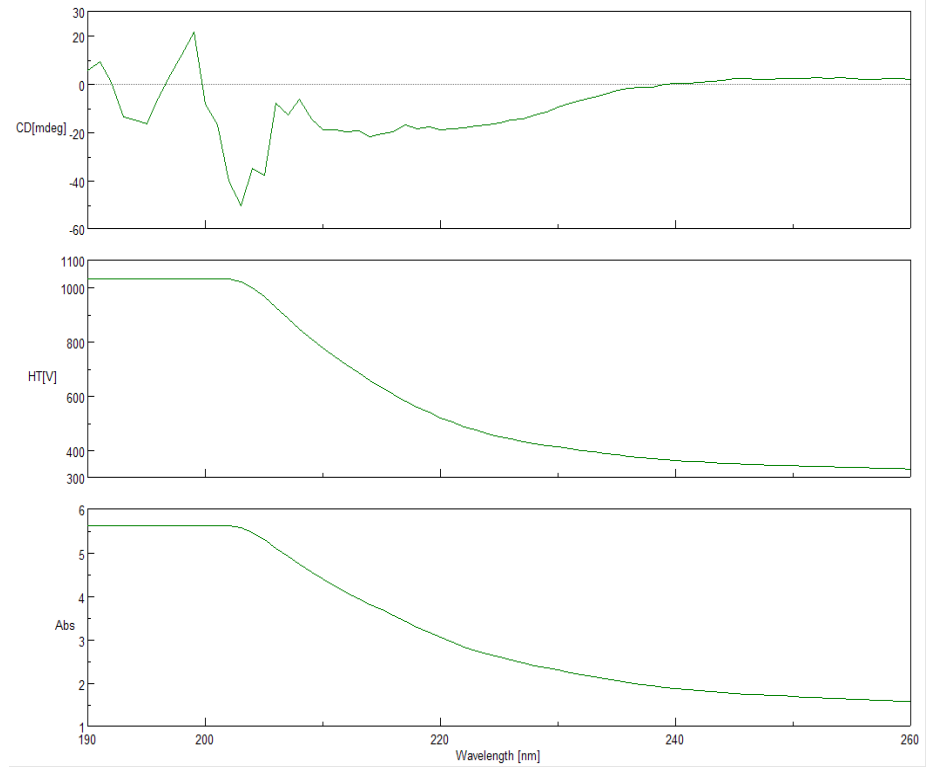
Şekil 4.13 Doğal neopullulanazın termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



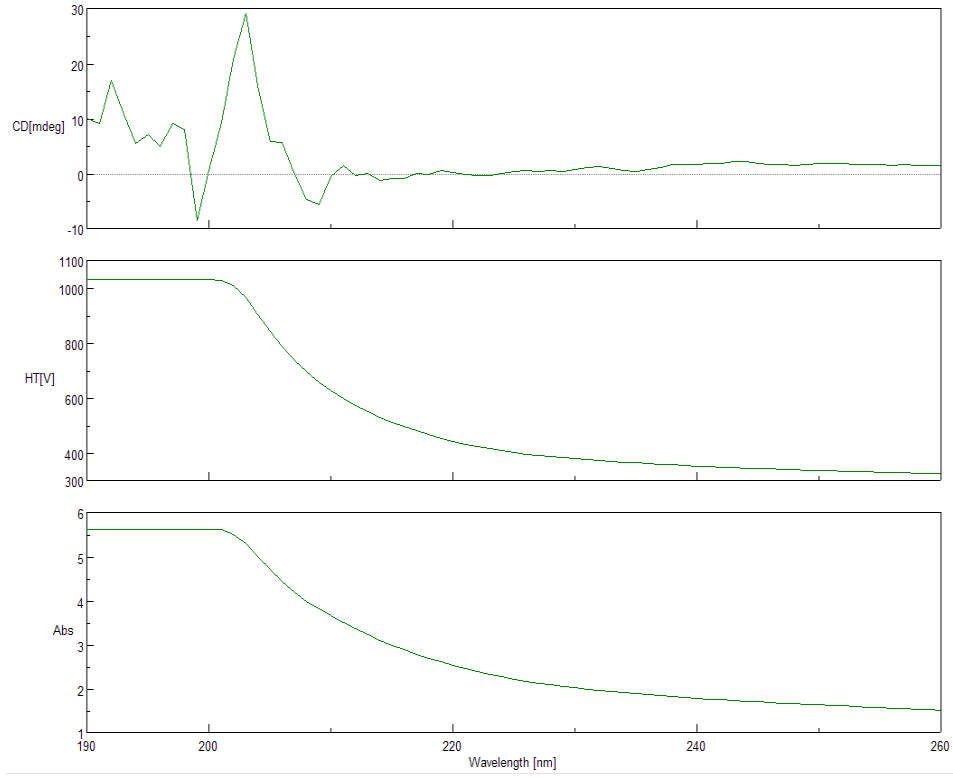
Şekil 4.14 Doğal neopullulanazın termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.

Şekil 4.13’ te, tampon içinde çözelti halinde bulunan ve sıcaklığı 25°C’ de dengelenmiş doğal enzimin 190-260 nm dalga boylarındaki spektral ölçüm sonuçları verilmiştir. Üç ayrı diagramdan oluşan sonuçtaki ilk diyagram, çözeltinin 190-260 nm dalga boylarındaki eliptisitesini ifade etmektedir ve birimi milidegree’ dir. Ölçümü gerçekleştirilen proteinin sekonder yapısı hakkında bilgi edinebilmek için özellikle 200-220 nm arasında görülen eliptisite pikinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. İkinci diagramda ise çözeltinin dinot voltaj değişimi ifade edilmiştir. 200-220 nm dalga boylarında çözeltinin okunan dinot voltajının 800’den fazla olmaması gerekir. 800 değerinde fazla dinot voltaj değerleri alınacak piklerin kalitesini düşürebilir ve sonuçların yüksek oranda gürültü içermesine neden olabilir. Bu yüzden yüksek dinot voltajının görülmesi halinde protein çözeltisinin seyreltilmesi gerekir. Çok düşük dinot voltaj değerleri de sağlıklı sonuç vermeyeceğinden bu kez de örneği konsantre etmek gerekebilir. Üçüncü ve son diyagram ise farklı dalga boylarındaki absorbans değerlerini vermektedir.

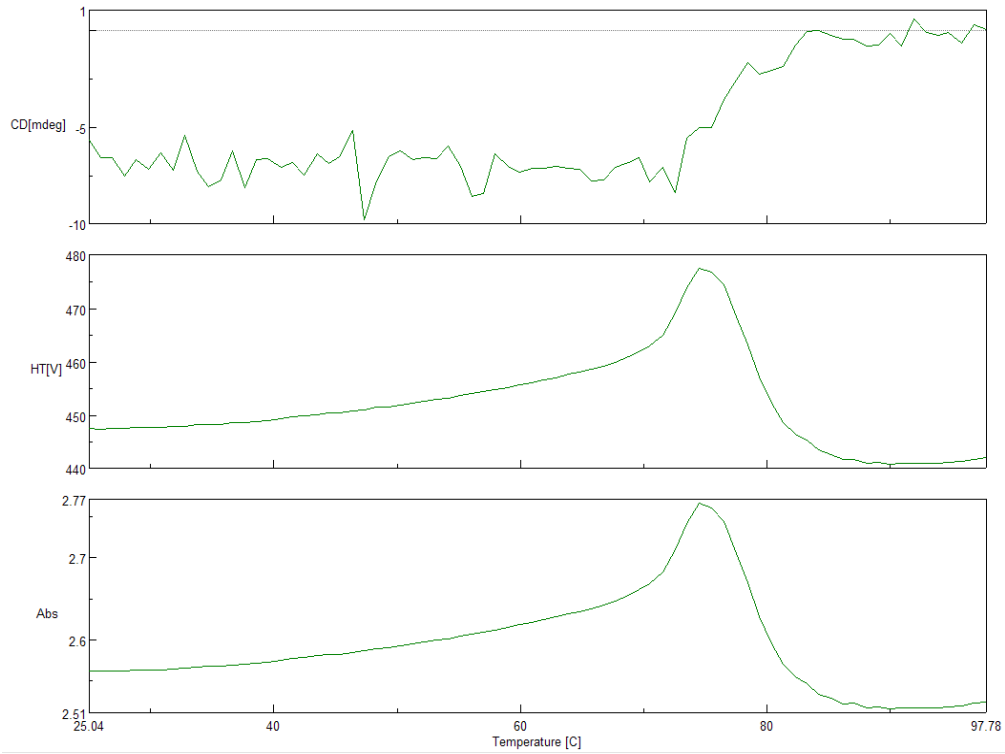
Doğal neopullulanaz için Şekil 4.14’ te verilen sonuçlar ise, aynı enzim çözeltisinin dakikada 1°C hızla 110°C’ ye kadar ısıtılmasının ardından 110°C’ de elde edilen spektral ölçüm sonuçlarını göstermektedir.



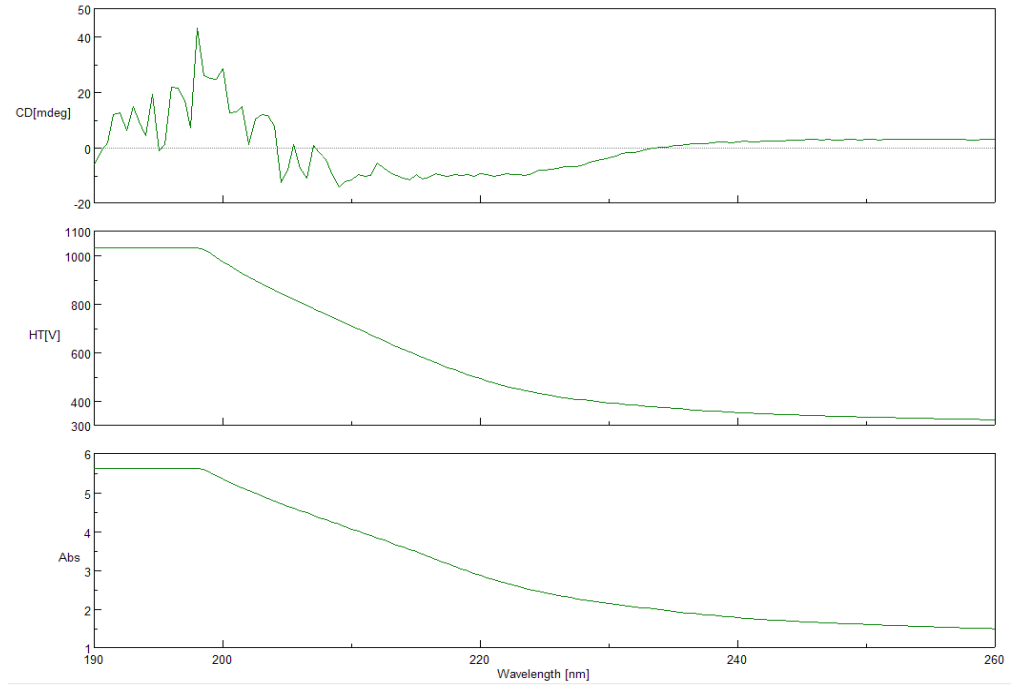
Şekil 4.15 Asn413Gln+Ala416 ile varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



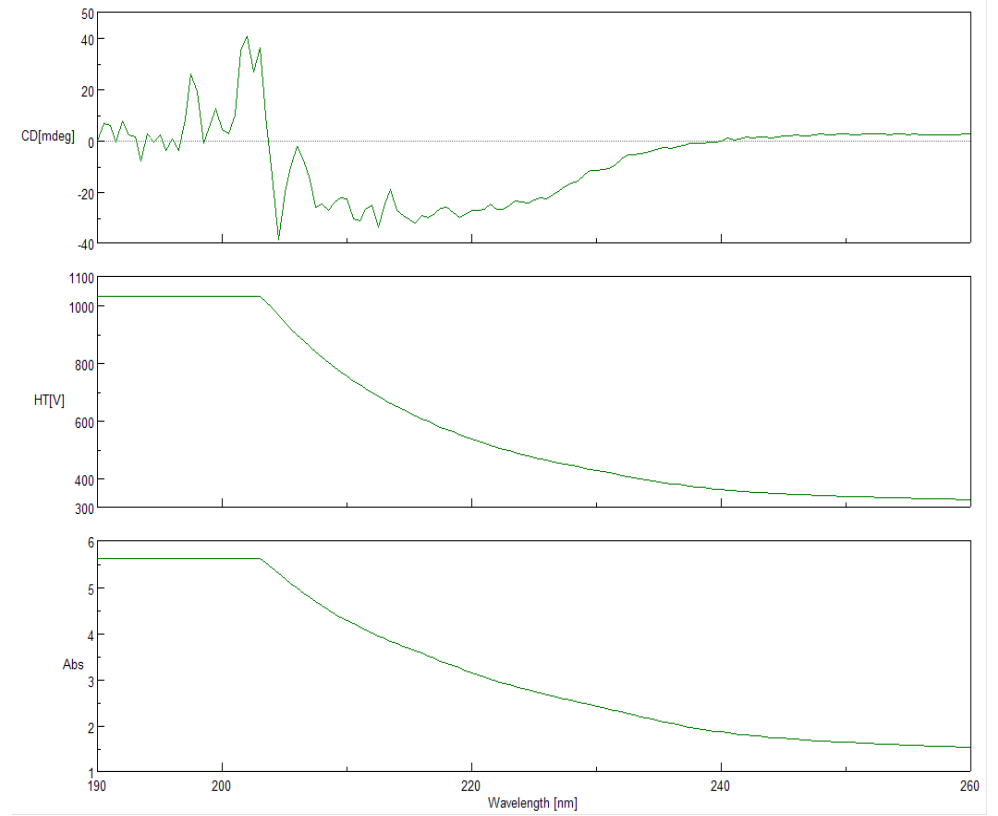
Şekil 4.16 Asn413Gln+Ala416Ile varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.



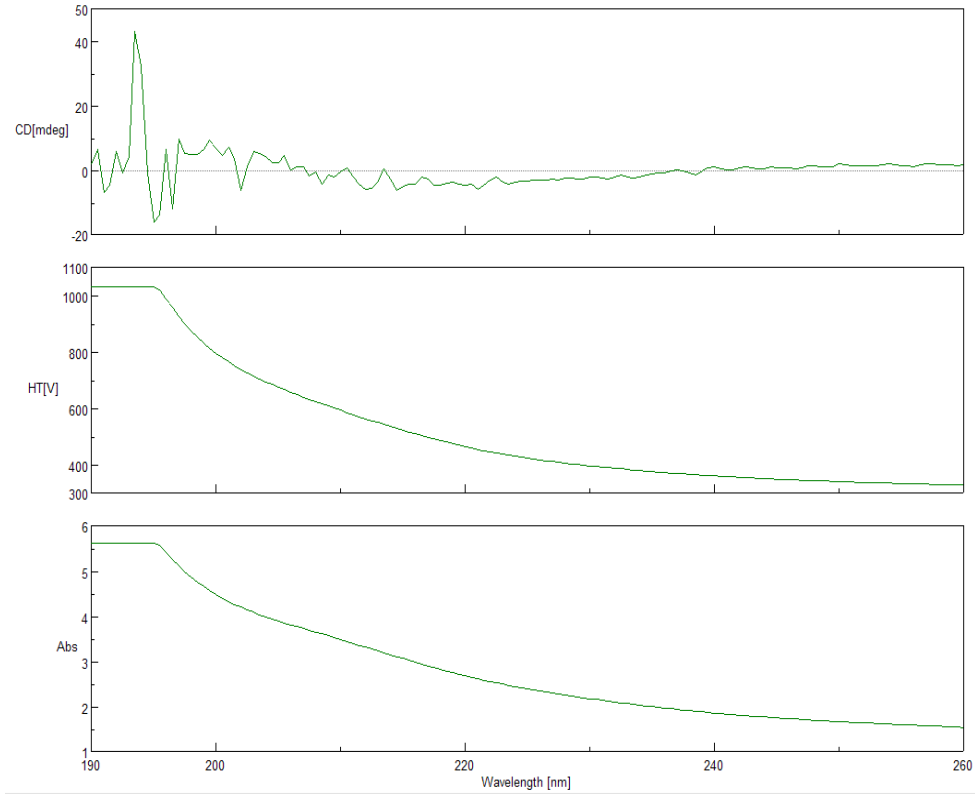
Şekil 4.17 Ser407Thr varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



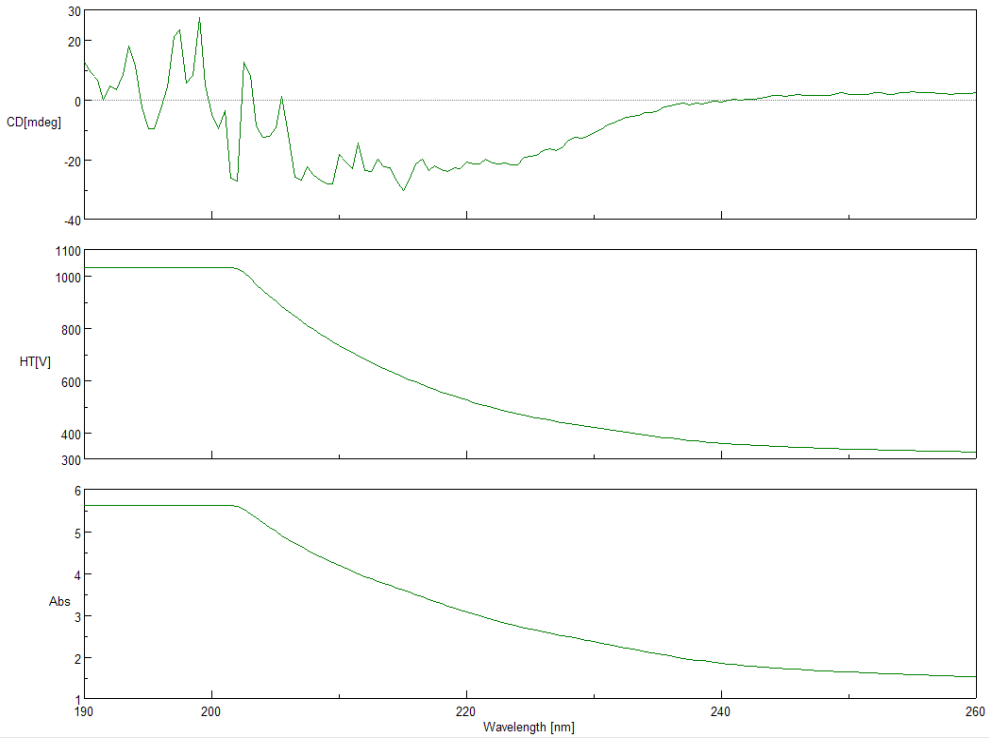
Şekil 4.18 Ser407Thr varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.



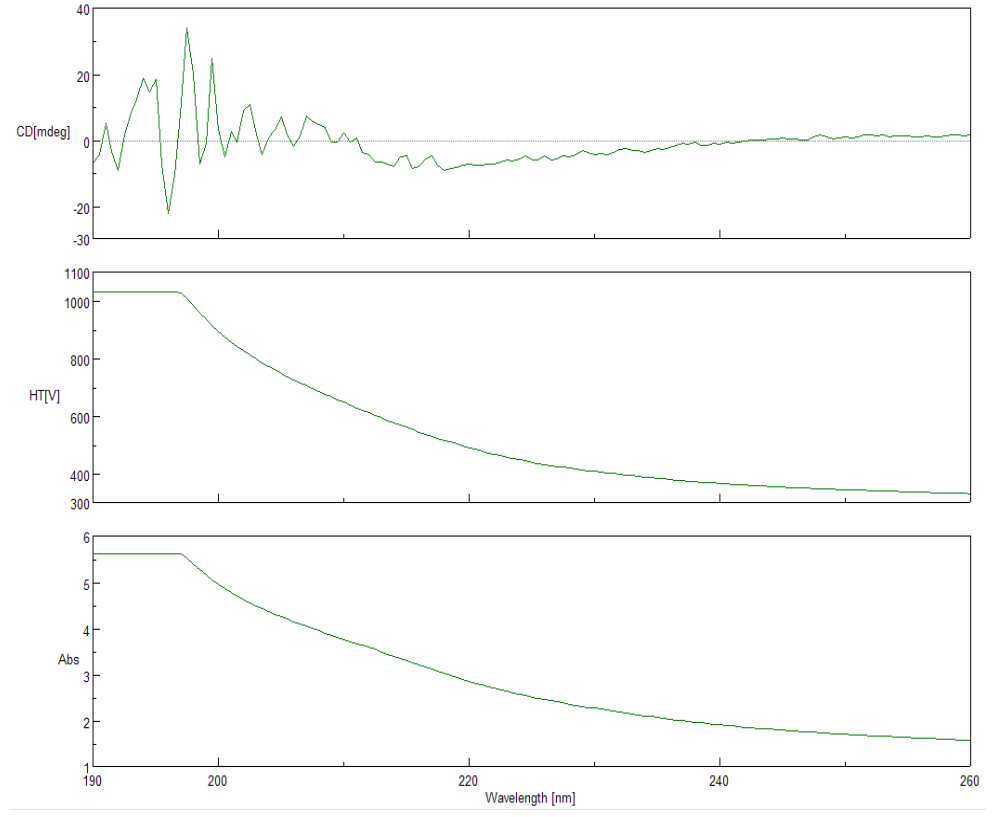
Şekil 4.19 Val533Leu varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu



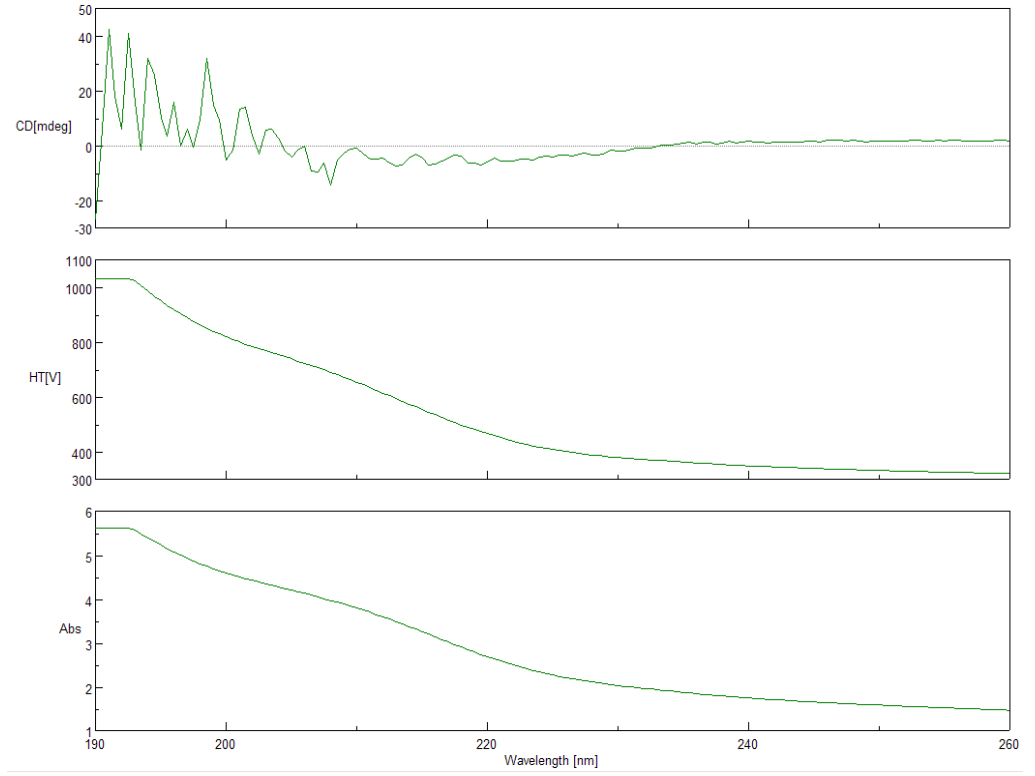
Şekil 4.20 Val533Leu varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu



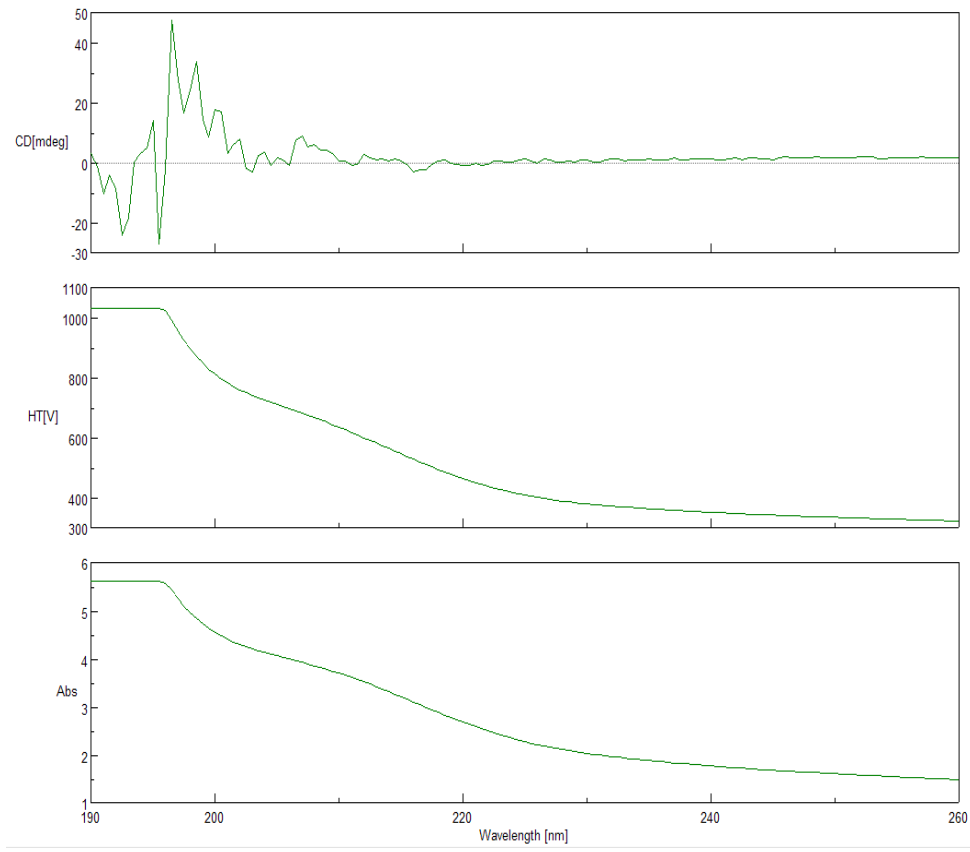
Şekil 4.21 Ala566Leu varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



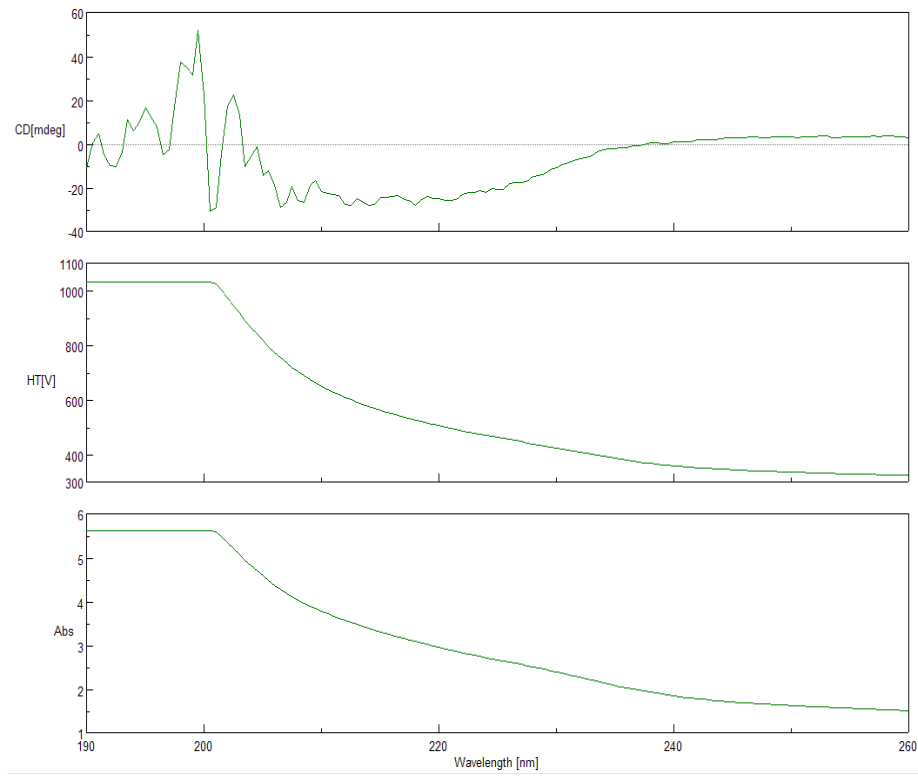
Şekil 4.22 Ala566Leu varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.



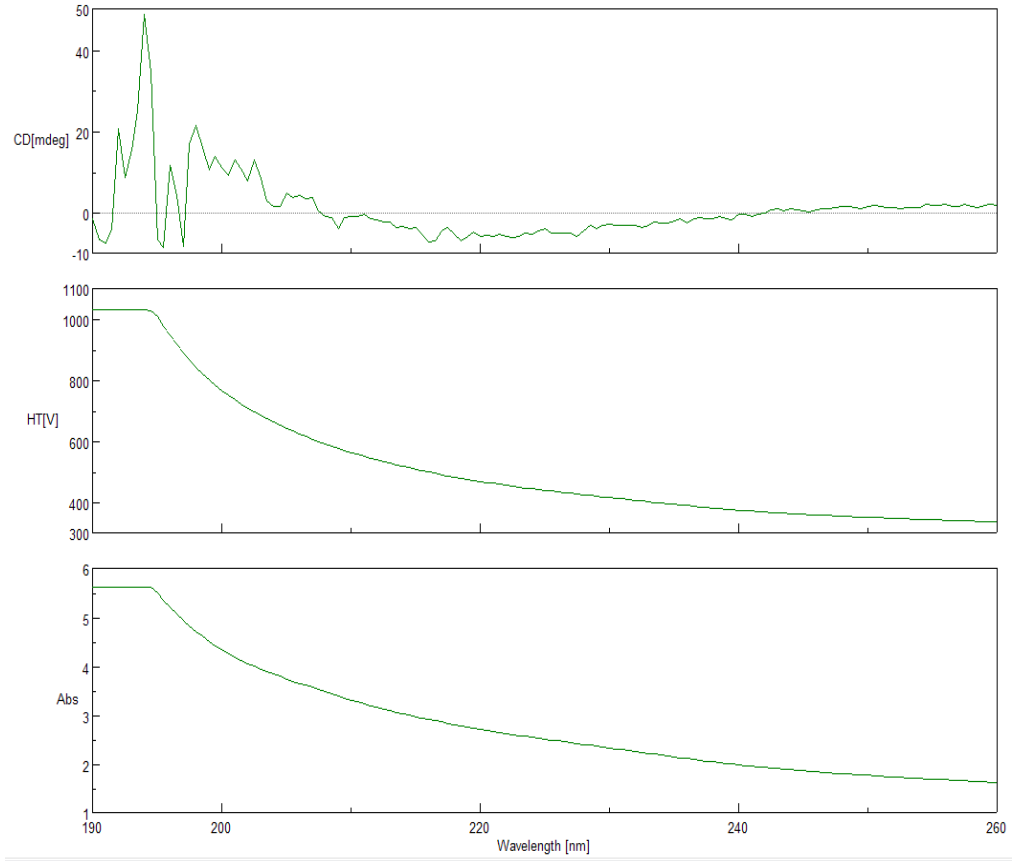
Şekil 4.23 Asp46Glu varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



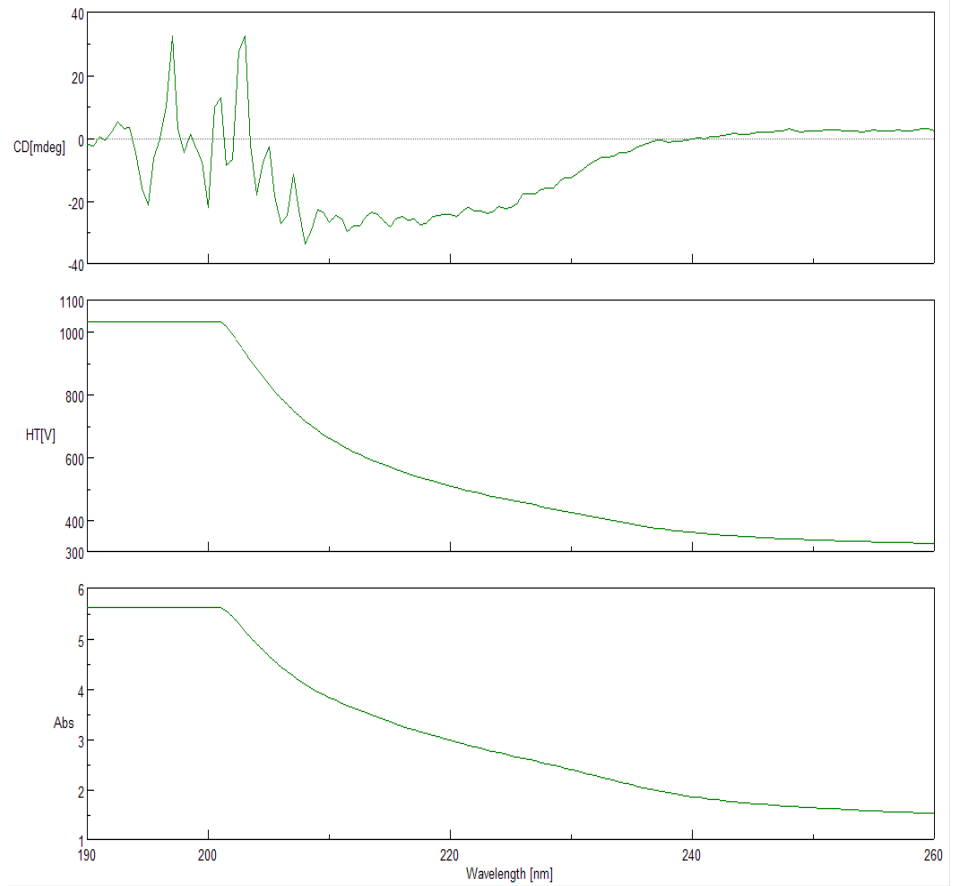
Şekil 4.24 Asp46Glu varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.



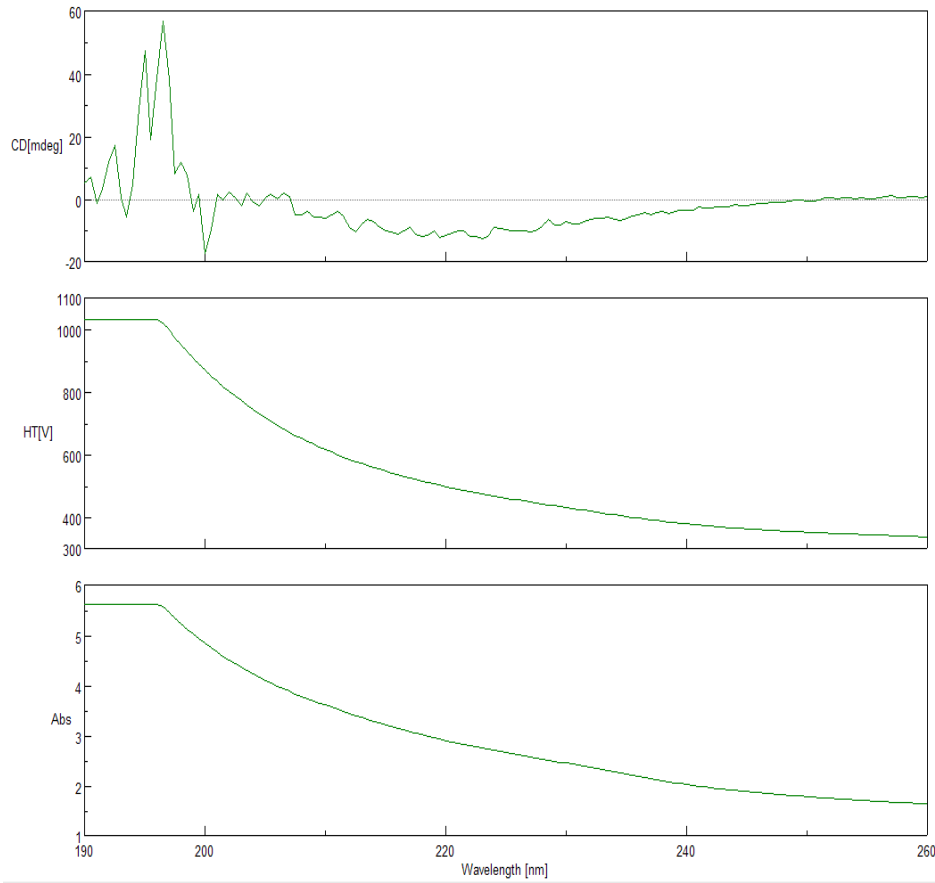
Şekil 4.25 Asn413Gln varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



Şekil 4.26 Asn413Gln varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.



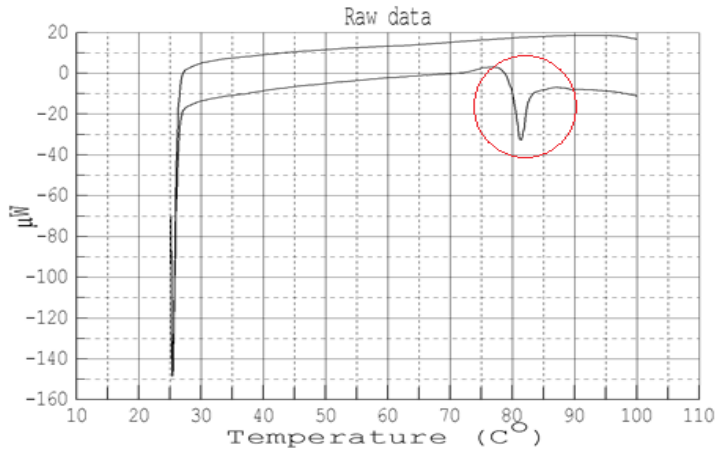
Şekil 4.27 Ala416Ile varyantının termal uygulama öncesinde alınan CD spektrumu.



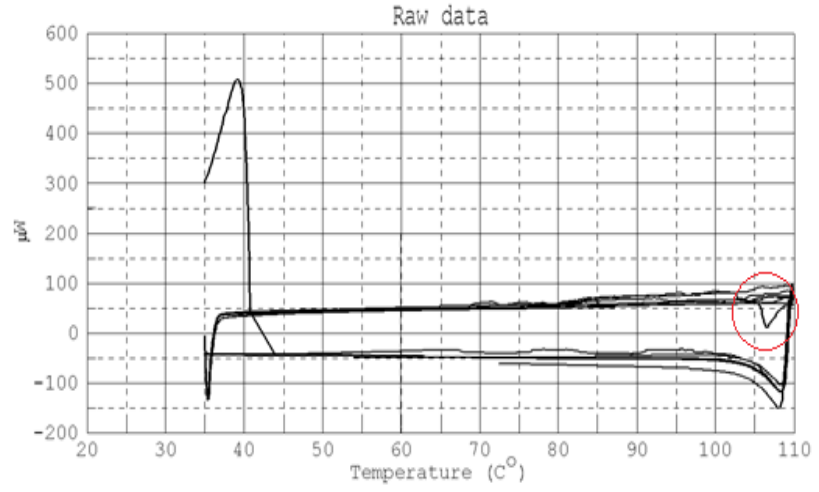
Şekil 4.28 Ala416 ile varyantının termal uygulama sonrasında alınan CD spektrumu.

4.5 Doğal Neopullulanazın ve Mutant Varyantların DSC Ölçüm Sonuçları

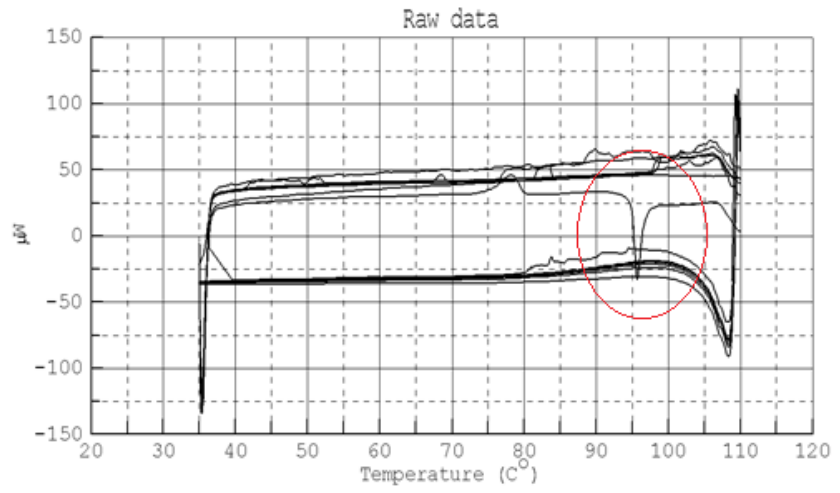
DSC ölçümlerinden elde edilen grafikler Şekil 4.29-4.36'da verilmiştir. Grafiklerde kırmızı daire ile işaretlenen bölgede varyantların denatürasyona bağlı olarak gerçekleşen agregasyon pikleri görülmektedir. Bu pik, doğal neopullulanaz için yaklaşık 80 °C'de gözlenirken, termal kararlılığın artışı nedeni ile bazı mutant varyantlarda 90 °C'de veya 100 °C'nin üzerinde gözlemlendi.



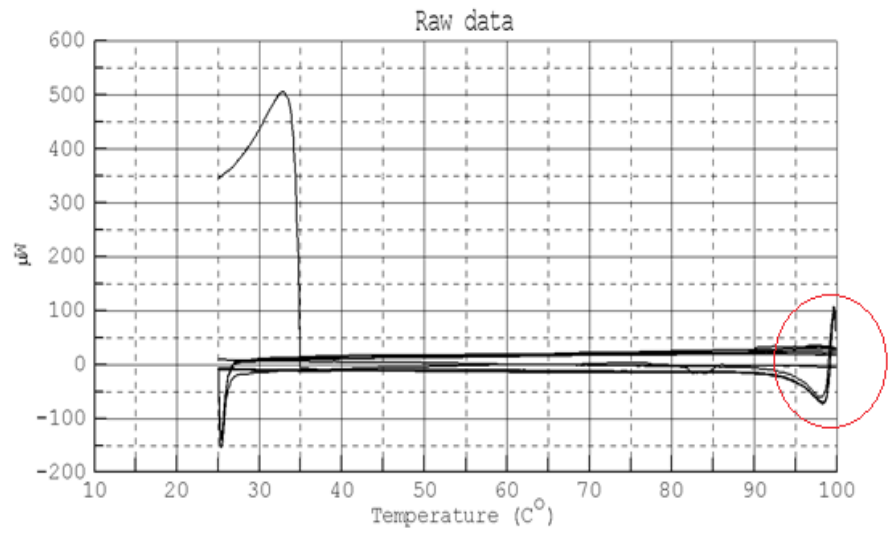
Şekil 4.29 Doğal neopullulanaza ilişkin DSC ölçümü.



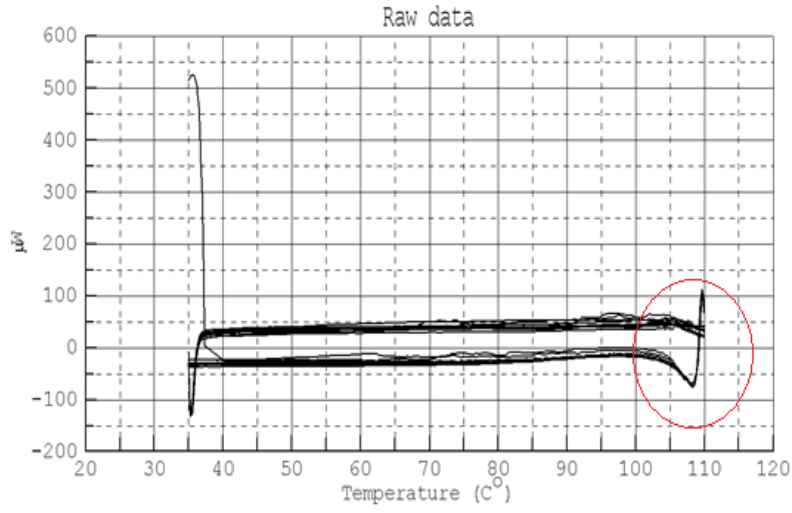
Şekil 4.30 Ala416Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.



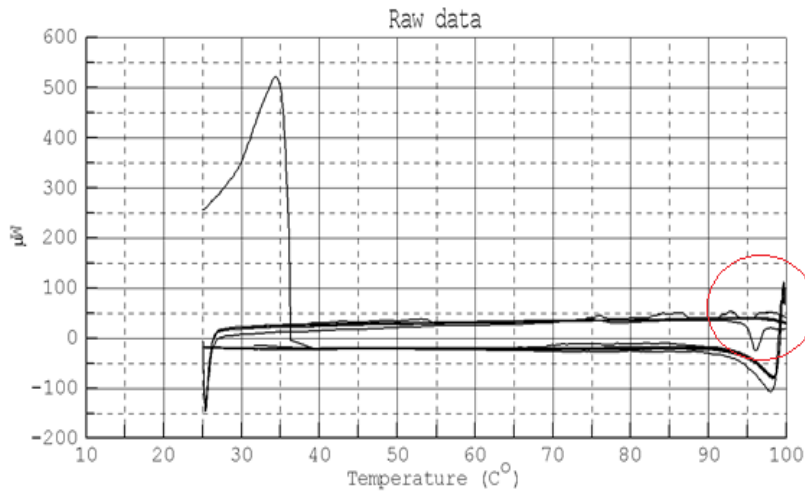
Şekil 4.31 Ala566Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.



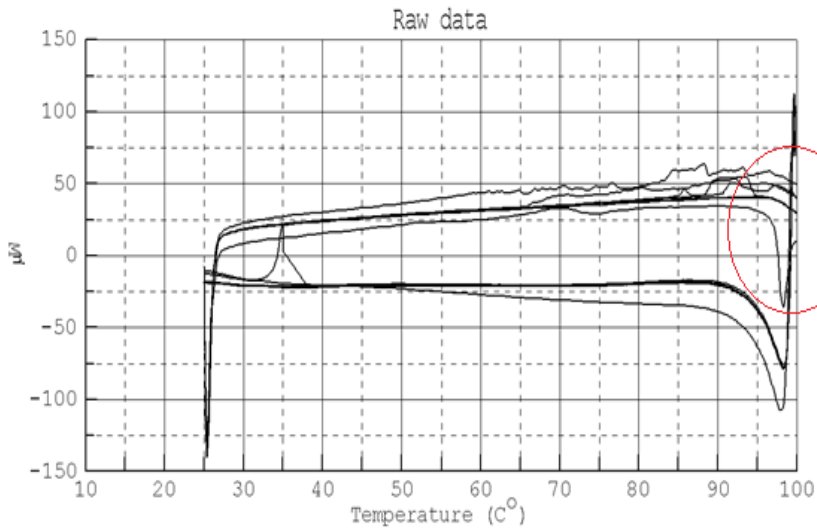
Şekil 4.32 Asn413Gln+Ala416Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.



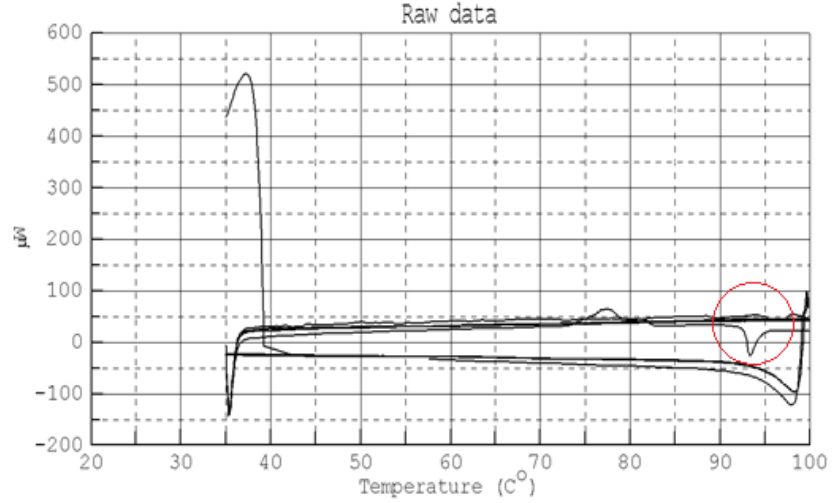
Şekil 4.33 Ser407Thr varyantına ilişkin DSC ölçümü.



Şekil 4.34 Val239Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.



Şekil 4.35 Val374Ile varyantına ilişkin DSC ölçümü.

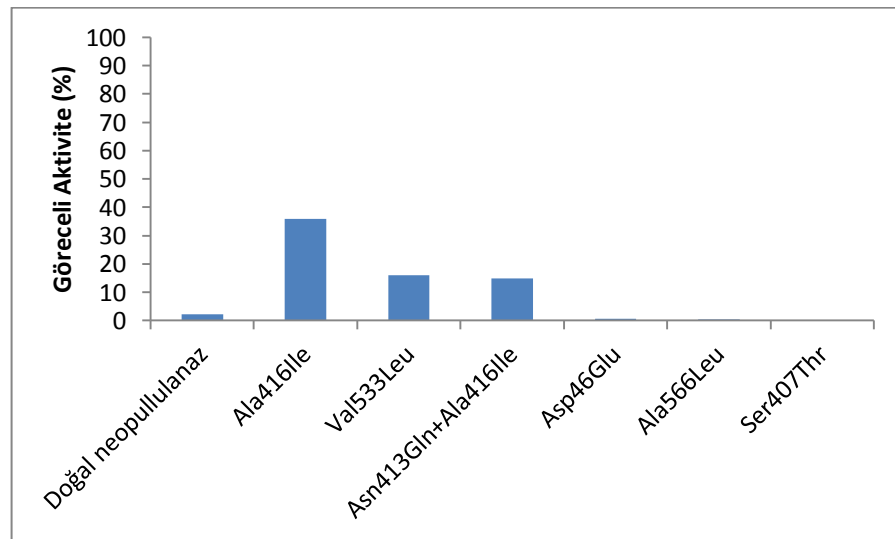


Şekil 4.36 Val533Leu varyantına ilişkin DSC ölçümü.

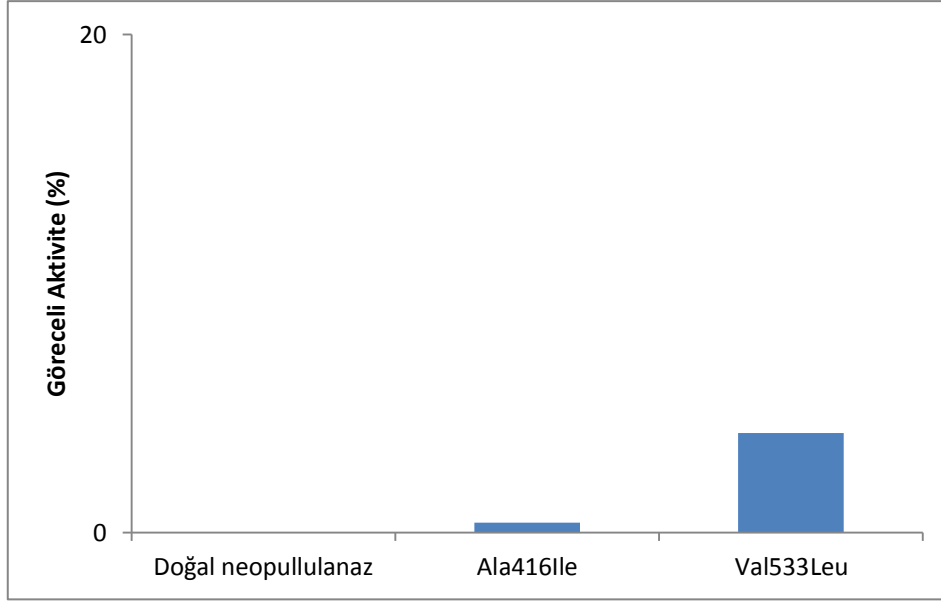
Elde edilen DSC grafiklerinde, elde edilen keskin pik proteinin erime noktası (T_m) hakkında bilgi vermektedir. Erime noktasının kesin bir şekilde hesaplanabilmesi için burada elde edilen grafikler yardımıyla, denge sabiti, serbest enerji değişimi ve ısı kapasitesi değişimi gibi termodinamik değişkenlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Ancak elde edilen ilk sonuçlar olan bu grafikler yardımıyla, test edilen varyantların T_m değerlerinin, doğal neopullulanazın T_m değerinin oldukça üzerinde olduğu görülmektedir. Doğal enzimin T_m değeri yaklaşık olarak 80°C civarındadır. Varyantların T_m değerleri ise 95 °C' nin üzerindedir. Bu sonuç, gerçekleştirilen amino asit değişimlerinin proteinin tersiyer yapı kararlılığı üzerinde olumlu etki yaptığını göstermektedir.

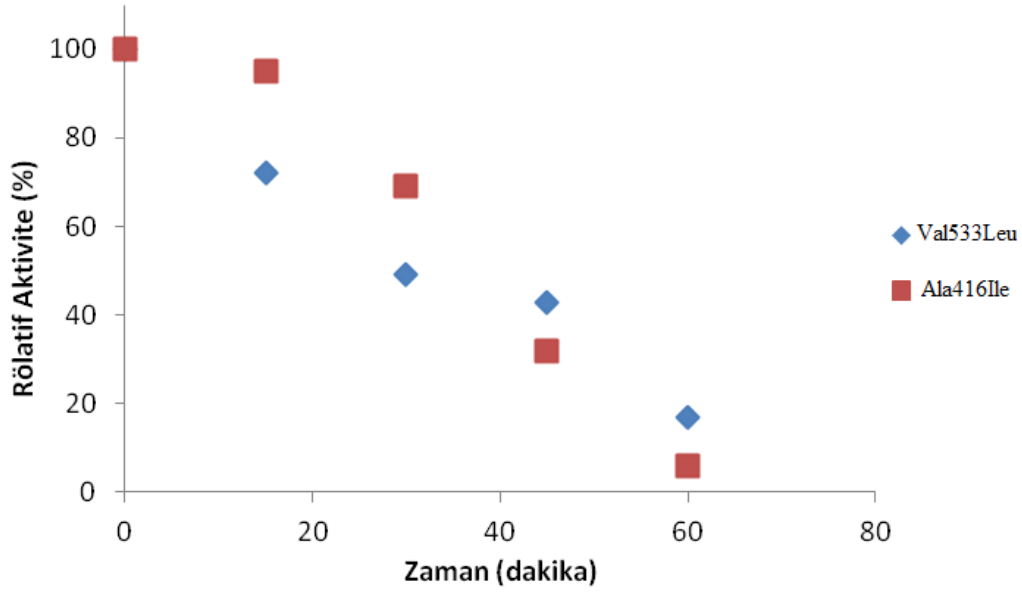
4.6 Doğal Neopullulanaz ve Termal Kararlılığı Geliştirilmiş Varyantların Katalitik Aktiviteye Dayalı Kararlılık Sonuçları



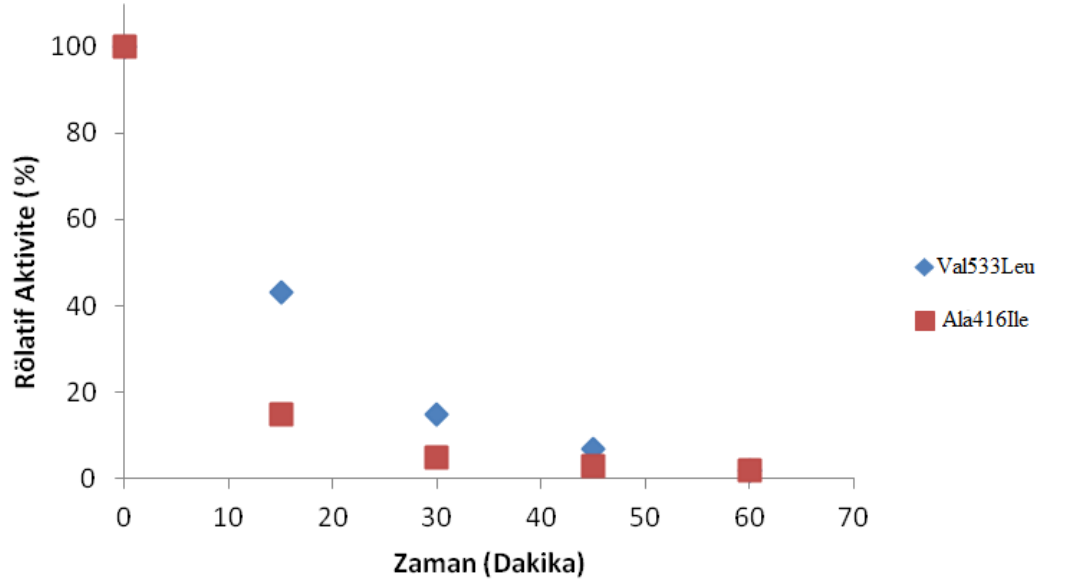
Şekil 4.37 Doğal ve mutant enzimlerin 60°C' deki termal kararlılıklarının karşılaştırılması.



Şekil 4.38 Doğal neopullulanaz ve Ala416Ile, Val533Leu varyantlarının 70°C’ deki termal kararlılıklarının karşılaştırılması.



Şekil 4.39 Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının termal kararlılıklarının 60°C’de zamana bağlı olarak karşılaştırılması.

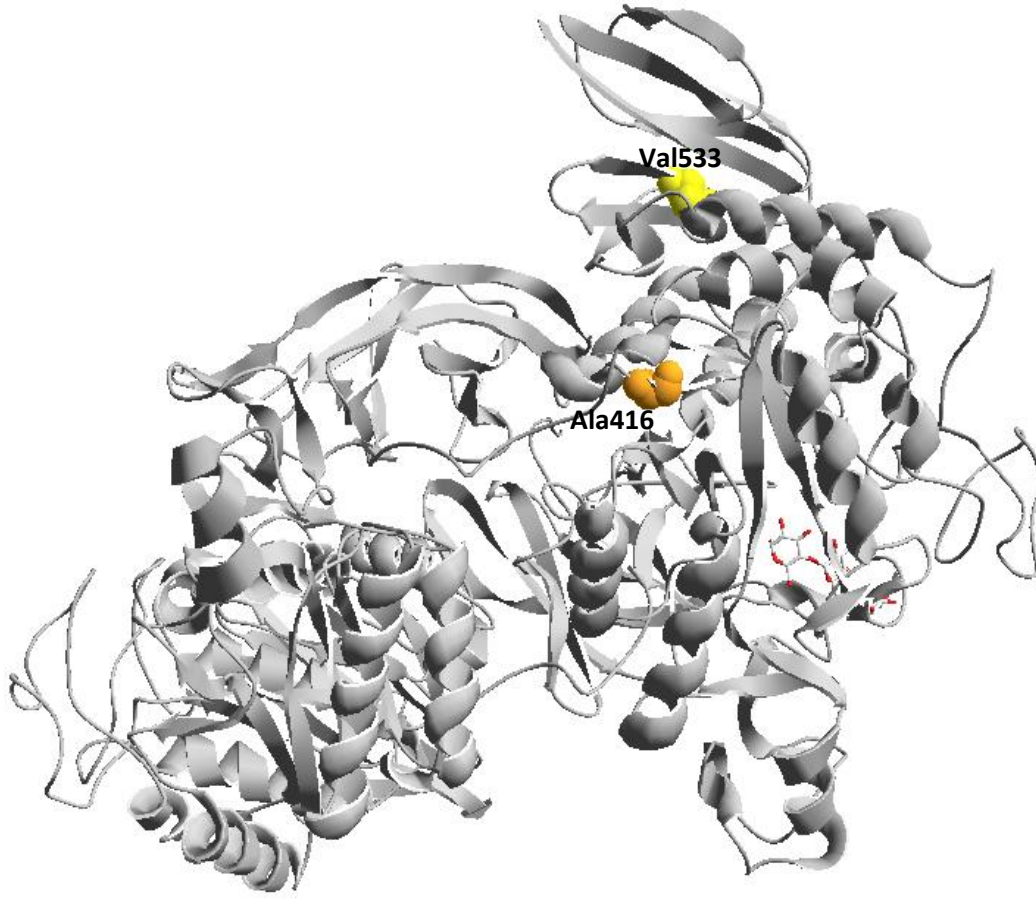


Şekil 4.40 Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının termal kararlılıklarının 70°C’de zamana bağlı olarak karşılaştırılması.

Katalitik aktiviteye dayalı termal kararlılık ölçümleri gerçekleştirildiğinde Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının 60°C’ deki termal kararlılıklarının doğal enzime kıyasla, sırasıyla, 20 kat ve 8 kat arttığı belirlendi. DSC ölçümleri sonucunda, incelenen tüm varyantlarda doğal enzime kıyasla olumlu bir fark belirlendi. Bununla birlikte, termal kararlılık ölçümleri yapıldığında sadece Ala416Ile ve Val533Leu varyantlarının daha iyi sonuçlar verdiği görüldü. Bu durum, DSC’nin konformasyonel kararlılığı göstermesi ile açıklanabilir. Elde edilen sonuçlara göre, gerçekleştirilen amino asit değişimlerinin tamamının konformasyonel kararlılık üzerinde olumlu etkisinin olduğu ancak, bu amino asit değişimlerinde sadece Val533Leu ve Ala416Ile’ nin hem konformasyonel hem de katalitik aktivite üzerinde olumlu etkilerinin olduğu anlaşıldı.

Termal kararlılığın iyileştirildiği bu iki varyant için de yüzey kavitelerinde bulunan amino asit artıkları olan valin ve alanin kendileri gibi hidrofobik karakterde olan fakat daha büyük yan gruplara sahip lösin ve izolösin ile değiştirildi. Benzer bir çalışmada, kaviteler içindeki amino asit artıklarının lokal esnekliği olumsuz etkilemeyecek şekilde daha büyük yan gruplara sahip amino asitler ile değiştirilmesi sonucu GroEL minişaperonlarının kararlılığının

arttırıldığı gösterilmiştir (Wang et al.,2000).



Şekil 4.41 Val533 ve Ala416 artıklarının neopullulanaza ait A-protomerinin üç boyutlu yapısı üzerinde gösterimi. Pullulanın substrat olarak kullanılmasıyla açığa çıkan panoz, katalitik merkez üzerinde gösterilmiştir.

4.7 Doğal Neopullulanazın ve Termal Kararlılığı Arttırılmış Varyantların Katalitik Parametreleri

Gerçekleştirilen amino asit değişikliklerinin katalitik parametrelere etkisinin incelenmesi amacı ile, termal kararlılık ölçüm sonuçlarına göre kararlılıklarının arttığı belirlenen Val533Leu ve Ala416Ile varyantları seçildi. Tablo 4.3'te doğal enzim ve bu iki varyanta ilişkin Michaelis sabiti (K_M), turnover sayısı (k_{kat}) ve katalitik etkinlik k_{kat}/K_M değerleri verilmiştir.

Tablo 4.3 Substrat olarak β -siklodekstrin kullanılarak belirlenen katalitik parametreler.

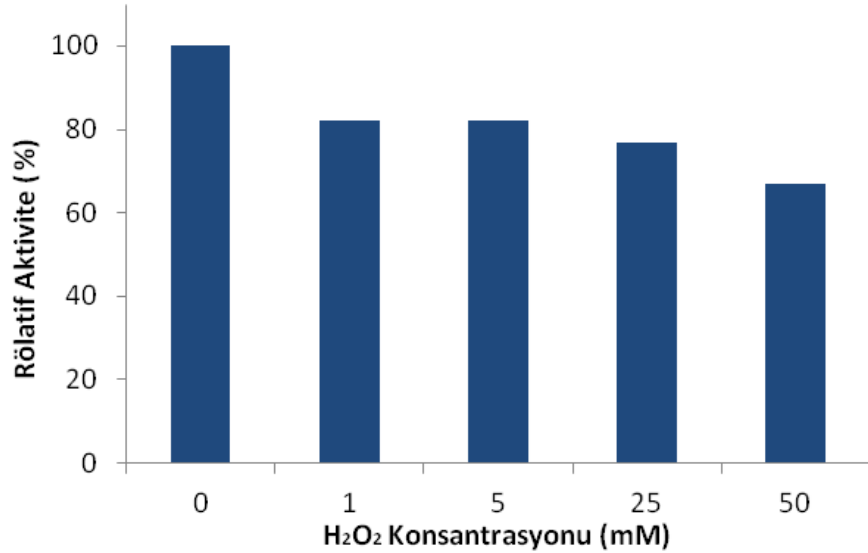
	K_M (M)	V_{max} (U)	k_{kat} (s^{-1})	k_{kat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
Doğal enzim	3.76×10^{-3}	0.46	118	3.1×10^4
Val533Leu	3.65×10^{-3}	0.54	138	3.8×10^4
Ala416Ile	1.21×10^{-3}	0.23	59	4.9×10^4

Val533Leu değişiminin neopullulanazın termal kararlılığını arttırdığı, ancak katalitik parametrelerinde bir değişime neden olmadığı belirlendi. Bu sonuç, katalitik parametrelerde negatif bir değişime neden olmadan termal kararlılığının artırılabilceğini göstermektedir.

Ala416Ile varyantının K_M değeri ise doğal enzimin K_M değerinden yaklaşık olarak 3 kat daha düşüktür. Bu durum varyantın substrata olan ilgisinin arttığını göstermektedir. Gerçekleştirilen amino asit değişimi incelendiği zaman, izolösin artığının alanin artığından hacimce daha büyük olduğu görölmektedir. Kavitede meydana gelen değişimin etkisiyle yakın çevredeki diğer amino asit artıkları ve hatta enzimin omurga konformasyonu pertürbasyona uğradığı ve bunun sonucunda substrat bağlama bölgesinin ve katalitik bölgenin etkilenmiş olabileceği ileri sürülebilir. Neopullulanaz enzimi ile gerçekleştirilen mühendislik çalışmaları, substrat bağlama bölgesinde meydana gelen genişlemenin α -1,6 dallanmış oligo- ve polisakkaritlere karşı ilgiyi arttırdığını göstermiştir (Kuriki *et al.*, 1996). Bir başka çalışmada, su molekülünün giriş yolu üzerinde bulunan amino asit artıklarının daha hidrofobik karakterde artıklar ile değiştirilmesi sonucunda *Saccharomycopsis* kaynaklı α -amilazın transglikolizasyon aktivitesi artırılmıştır (Matsui *et al.*, 1991).

4.8 Met475Ala Varyantının Oksidatif Kararlılığı

Eris programı kullanılarak belirlenen Met475Ala amino asit değişikliğini içeren varyantın aktivite sonuçlarına ilişkin grafik Şekil 4.42’de verilmiştir.



Şekil 4.42 Met475Ala varyantının farklı konsantrasyonlardaki H₂O₂ ile muamelesi sonucu kalan aktivitesi.

Şekil 4.42’de belirtildiği gibi, hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artış ile birlikte varyantın aktivitesinde düşüş gerçekleşmiştir. Enzim, 50 mM H₂O₂ ile muamele sonucunda %33 oranında aktivite kaybetmiştir. Doğal neopullulanaz ise aynı H₂O₂ konsantrasyonunda aktivitesinin %66’ sını kaybetmektedir (Şekil 4.4).

Metiyonin, yan zincirinde bulunan sülfür nedeniyle hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerine karşı oldukça hassastır. Oksidasyona uğrayan sülfür, sülfoksit veya sülfon formunu oluşturur. Oksidasyon riskinin yüksek olduğu ortamlarda protein yapılarında, metiyonin sülfoksit formuna sıklıkla rastlanmaktadır. Metiyonin sülfoksit, metiyoninden oldukça farklı karakterde bir organik bileşiktir. Metiyonin en hidrofobik karaktere sahip aminoasitlerden bir tanesidir. Buna karşın, metiyonin sülfoksit taşıdığı oksijen nedeniyle polar karaktere sahiptir. Ayrıca metiyonin sülfoksit yan zinciri daha hacimlidir. Dolayısıyla oksidasyona uğrayan metiyonin artığı, hem kendi yakın çevresinin hem de bulunduğu proteinin tamamının konformasyonunu ve karakteristiğini ciddi şekilde değiştirebilir ve sonuç olarak protein biyolojik aktivitesini yitirebilir.

Yapılan bir çalışmada (Mulinacci *et al.*, 2011) rekombinant insan büyüme hormonunun (r-hGH) yapısında bulunan Met14 ve Met125 artıklarının oksidasyona ürünlerinin protein yapısı üzerine etkileri incelenmiştir. Bahsedilen artıklar oksidasyona uğrayıp metiyonin sülfoksit formuna dönüştüğünde, protein konformasyonu değişmemiştir. Ancak 220 nm’ de proteine ait sirküler dikroizm sinyali incelendiğinde, yapıya eklenen polar oksijen atomunun protein üzerinde termal destabilizasyona neden olduğu ve katlanmanın olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Sonuç olarak metiyonin oksidasyonunun proteinleri çeşitli şekillerde olumsuz etkilediği çok net bir şekilde söylenebilir.

Projenin amaçlarında öngörüldüğü gibi, gerçekleştirilen metiyonin/alanin değişiminin hidrojen peroksitin neden olduğu oksidasyonu engellediği ve bu nedenle enzimin oksidatif kararlılığının geliştirildiği görülmektedir. Literatürde de benzer yaklaşım kullanılarak D-amino asit oksidaz enziminin yapısındaki kritik metiyonin artıkları lösine değiştirilmiş ve enzimin oksidatif kararlılığı iyileştirilmiştir (Ju *et al.*, 2000).

5. GENEL DEĞERLENDİRME

Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının rasyonel dizayn yoluyla değiştirilmesi veya yeniden tasarlanması, protein kimyasıyla ilgili çeşitli teorileri sınamak (Helinga, 1997), biyolojik yönden aktivitesi iyileştirilmiş enzim varyantları geliştirmek (Helinga *et al.*, 2004) ve doğal olarak gerçekleşmeyen reaksiyonların biyokatalizinde işlev sahibi olabilecek biyokatalizörleri geliştirmek (Röthlisberger *et al.*, 2008) için sıklıkla başvurulmuş güçlü bir araç haline gelmiştir.

Rasyonel dizayn yaklaşımını uygulayabilmek için, enzimin yapısının ve dizisinin bilinmesi ve yapı ve fonksiyon arasındaki ilişkinin aydınlatılmış olması gerekmektedir. Dolayısıyla rasyonel dizayn yaklaşımı bilgi temelli bir yaklaşımdır. Günümüzde NMR spektroskopisi ve X-ışını difraksiyonu ile yapı aydınlatma çalışmaları oldukça hız kazanmıştır ve bu sayede yapısı aydınlatılarak veri tabanlarına kaydedilmiş çok sayıda protein bulunmaktadır. Ayrıca günümüzde proteinin ait olduğu sınıfta bulunan ve yapısı bilinen diğer proteinler üzerinden gidilerek moleküler modelleme yoluyla, yapısı bilinmeyen bir proteinin de seçimliliğini, aktivitesini ve kararlılığını arttırmak mümkün hale gelmiştir.

Bu çalışmada, üç boyutlu yapısı aydınlatılmış olan *B. stearothermophilus* kaynaklı neopullulanazın termal ve oksidatif kararlılığı rasyonel dizayn kullanılarak artırıldı. Çalışmada ilk olarak, daha önceden tanımlanmış ve karakterize edilmiş (Kuriki *et al.*, 1988) doğal neopullulanaz klonlandı. Heterolog ekspresyon ile üretilen ve metal-şelat afinite kromatografisi ile saflaştırılan doğal enzimin termal kararlılığı, oksidatif kararlılığı ve çeşitli katalitik parametreleri belirlendi.

Neopullulanazın termal kararlılığını arttırmak amacıyla ‘*esnek yüzey kavitelerini doldurma*’ yaklaşımından yararlanıldı. Bu yaklaşım Rosetta_{VIP} uygulaması aracılığıyla kullanıldı ve termal kararlılık artışını sağlayabilecek amino asit değişimleri Asp46Glu, Val239Leu, Val374Ile, Val404Leu, Ser407Thr, Asn413Gln, Ala416Ile, Asn413Gln+Ala416Ile, Val533Leu ve Ala566Leu olarak tahmin edildi. Yönlendirilmiş mutajenez kullanılarak, neopullulanazı kodlayan gen fragmenti üzerinde öngörülen nokta mutasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen varyantların sirküler dikroizm ve diferansiyel tarama kalorimetrisi ölçümleri alındı. Bu ölçümler sonucunda belirlenen bazı varyantların katalitik aktiviteye dayalı termal kararlılık ölçümleri gerçekleştirildi. Termal kararlılık açısından olumlu sonuç veren varyantların katalitik parametreleri incelendi.

Oksidatif kararlılığı arttırmaya yönelik olarak ise *Eris* yazılımından yararlanıldı. Neopullulanazın yapısında bulunan tüm metiyonin artıkları (başlangıç kodunu hariç) bu yazılım kullanılarak alanin değişimi için test edildi.

Met475Ala değişimi, serbest enerji değişimi açısından en olumlu sonucu verdi. Heterolog ekspresyon ile üretilip saflaştırılan Met475Ala varyantının oksidatif kararlılığı incelendi. Doğal neopullulanazın oksidatif kararlılığı ile karşılaştırıldığında, Met475Ala varyantının oksidatif kararlılığında artış gerçekleştiği belirlendi.

Literatürde neopullulanazın katalitik özellikleri karakterize edilmiş olmasına rağmen, enzimin endüstriyel uygulamalarını geliştirmeye yönelik protein mühendisliği çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenle, elde edilen sonuçların neopullulanazın endüstriyel uygulamalarına katkı yapacağı öngörölmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bender, H., Lechmann, J. and Wallenfells, K.,** 1959, Pullulan; ein Extracellular Glucans von Pullularia pullulans, *Biochemica Biophysica*, 36: 309-316 pp.
- Borgoa, B. and Havranek, J.J. ,** 2011, Automated Selection of Stabilizing Mutations in Designed and Natural Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10(1073): 1-6 pp.
- Chester, N. and Marshak, D.R.,** 1993, Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer T_m Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction, *Analytical Biochemistry*, 209(2): 284-290 pp.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L.,** 1972, Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 69: 2110-2114 pp.
- Declerk, N., Machius, M., Joyet, P., Wiegand, G., Huber, R. and Gaillardin, C.,** 2003, Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and Modulation of its Stability Over a 50 °C Temperature Range, *Protein Engineering*, 16(4): 287-293 pp.
- Domań-Pytka, M. and Bardowski, J.,** 2004, Pullulan degrading enzymes of bacterial origin, *Crit Rev Microbiol.*, 30(2):107-21 pp.
- Dwyer, M.A., Looger, L.L. and Hellinga, H.W.,** 2004, Computational Design of a Biologically Active Enzyme, *Science*, 304 (5679): 1967-1971 pp.
- Eijsink, V. G.H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V., Van den Burg, B.,** 2004, Directed Evolution of Enzyme Stability, *Biomolecular Engineering*, 22: 21-30 pp.
- Freire, E.,** 1995, Differential Scanning Calorimetry, *Protein Stability and Folding Methods in Molecular Biology*, 40: 191-218 pp.
- Gupta R., Gigras, P., Harapriya, Mohapatra, V., Kumar and Goswami, B.C.,** 2003, *Process Biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- Guzmán-Maldonado, H. and Paredes-López, O.,** 1995, Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 35(5):373-403.
- Hanahan, D.,** 1983, Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids, *J. Mol.*, 166:557-580 pp.
- Hanahan, D.,** 1985, Techniques for Transformation of *E. coli* in DNA Cloning: a practical approach. Oxford University Press (Glover, D.M. ed.), 1: 109-135.
- Hellinga, H.W.,** 1997, Rational Protein Design: Combining Theory and Experiment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19): 10015-10017 pp.
- Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C. and Ariff, A.B,** 2012, Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications, *Enzyme Research*, 10.1155/2012/921362, 14 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R.,** 1989, Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using Polymerase Chain Reaction, *Gene*, 77(1): 51-59.
- Joo, J.C., Pohkrel, S. and Yoo, Y.J.,** 2010, Thermostabilization of *Bacillus circulans* Xylanase via Computational Design of a Flexible Surface Cavity, *Journal of Biotechnology*, 146:31-39 pp.
- Ju, S.S., Lin, L.L., Chien, H.R. and Hsu, W.H.,** 2000, Substitution of the Critical Methionine Residues in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase with Leucine Enhances its Resistance to Hydrogen Peroxide, *FEMS Microbiol Lett*, 186: 215-219 pp.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C.,** 2005, How to Study Proteins by Circular Dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751: 119-139 pp.
- Khemakhem, B., Ali, M.B., Aghajari, N., Juy, M., Haser, R. and Bejar, S.,** 2009, Engineering of the α -amylase from *Geobacillus stearothermophilus* US100 for Detergent Incorporation, *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2): 380-389 pp.
- Kumar, D., Saini, N., Pandit, V. and Ali, S.,** 2012, An Insight to Pullulan: A Biopolymer in Pharmaceutical Approaches, 1(3): 202-219 pp.
- Kuriki, T., Kanako, H., Yanase, M., Takata, H., Shimada, J., Handa, S., Takada, T., Umeyama, H. and Okada, S.,** 1996, Controlling Substrate Preference and Transglycosylation Activity of Neopullulanase by Manipulating Steric Constraint and Hydrophobicity in Active Center, *J. Biol. Chem.* 271: 17321-17329 pp.
- Kuriki, T., Okada, S. and Imanaka, T.,** 1988, New Type of Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and Molecular Cloning and Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 1554-1559 pp.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259): 680-685 pp.
- Lamminmaki, U. and Vihinen, M.,** 1996, Structural Consequences of Neopullulanase Mutations, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1295:195-200 pp.
- Legouill, C., Parent, J.L., Rolapleszczynski, M. and Stankova, J.,** 1994, Analysis of Recombinant Plasmids by a Modified Alkaline Lysis Method, *Analytical Biochemistry*, 219(1): 164 p.
- Loening, A.,** 2005. "Site-directed mutagenesis protocol", http://www.stanford.edu/~loening/protocols/Site_Directed_Mutagenesis.pdf (2005) (Erişim tarihi: 06 Haziran 2013)
- Lopez, M.M. and Makhatadze, G.I.,** 2002, Differential Scanning Calorimetry, Calcium-Binding Protein Protocols: Methods in Molecular Biology, 173: 113-119 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Matsui, I., Ishikawa, K., Miyairi, S., Fukui, S. and Honda, K.,** 1991, An increase in the transglycosylation activity of *Saccharomycopsis* α -amylase altered by site-directed mutagenesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1077:416-419 pp.
- Martin, C. and Smith, A.M.,** 1995, Starch Biosynthesis, *Plant Cell*, 7(7): 971-985 pp.
- Miller, G.L.,** 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, 31(3): 426-428 pp.
- Mulinacci F, Capelle MA, Gurny R, Drake AF and Arvinte T.,** 2011, Stability of human growth hormone: influence of methionine oxidation on thermal folding, *J Pharm Sci.*, 100(2):451-63 pp.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.,** 1987, Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction, *Methods in Enzymology*, 155: 335-350 pp.
- Nakamura, Y.,** 1996, Some Properties of Starch Debranching Enzymes and Their Possible Role in Amylopectin Biosynthesis, *Plant Science*, 1: 1-18 pp.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T.,** 1995, How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein, *Protein Science*, 4(11): 2411-2423 pp.
- Bajpai, P.,** 1999, Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry, *Biotechnology Progress*, 15(2): 147-157.
- Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A.M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., Gallaher, J.L., Althoff, E.A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S., Houk, K.N., Tawfik, D.S. and Baker, D.,** 2008, Kemp Elimination Catalysts by Computational Enzyme Design, *Nature*, 453: 190-195 pp.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.,** 1988, Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science*, 239(4839):487-491 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E.E. and Maniatis, T.,** 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbour.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.,** 1977, DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5463-5467.
- Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard, S.R., Smith D.P. and Eng, C.,** 1995, Catalytic Specificity of Protein-Tyrosine Kinases is Critical for Selective Signalling, *Nature*, 373(6514):536-539 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W.,** 1990, Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes, *Methods in Enzymology*, 185: 60-89 pp.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N. and Imanaka, T.,** 1992, Action of Neopullulanase:Neopullulanase Catalyzes Both Hydrolysis and Transglycosylation at alpha-(1-4)- and alpha-(1-6)-glucosidic linkages, *Journal of Biological Chemistry*, 267(26): 18447-18452 pp.
- Tester, R.F., Karkalas, J. and Qi, X.,** 2004, Starch-composition, fine structure and architecture, *Journal of Cereal Science*, 39(2): 151-165 pp.
- The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA,** http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.135 (Erişim tarihi: 21 Haziran 2013)
- Vihinen, M. and Mantsala, P.,** 1990, Characterization of a Thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12: 427-435 pp.
- Yin, S., Ding, F. and Dokholyan, N.V.,** 2007, Eris: an automated estimator of protein stability, *Nature Methods*, 4(6):467 p.
- Wang, Q., Buckle, A.M. and Fersht, A.R.,** 2000, Stabilization of GroEL Minichaperons by Core and Surface Mutations, *Journal of Molecular Biology*, 298(5): 917-926 pp.
- Wang, W. and Malcolm, B.,** 1999, Two-Stage PCR Protocol Allowing Introduction of Multiple Mutations, Deletions and Insertions Using QuickChange Site-Directed Mutagenesis, *BioTechniques*, 26: 680-682 pp.
- Warrens, A.N., Jones, M.D. and Lechler, R.I.,** 1997, Splicing by Overlap Extension by PCR Using Asymmetric Amplification: An Improved Technique for the Generation of Hybrid Proteins of Immunological Interest, *Gene*, 186: 29-35 pp.
- Weng, M., Zheng, Z.L., Bao, W., Cai, Y.J., Yin, Y. and Zou, G.L.,** 2009, Enhancement of Oxidative Stability of the Subtilisin Nattokinase by Site-Directed Mutagenesis Expressed in *E. coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794: 1566-1572 pp.