

***Candida boidinii* KAYNAKLI NAD⁺ BAĞIMLI FORMAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN ÜRETİLMESİ, ENZİM AKTİVİTESİNİN VE TERMAL
STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI**

ÖZET

Farklı endüstrilerde geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimler, hastalıkların tanısında kullanılan biyokimyasal analizler için de önemlidir. Format (formik asit) tek karbonlu endojen bir metabolit olup, insan serumunda ve idrarında belirli seviyelerde bulunur. Format düzeylerinin insan serumu ve idrarında özellikle metanol intoksikasyonu, vitamin B eksiklikleri, astım, çeşitli psikiyatrik bozukluklar ve farklı patolojik durumlara bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Format Dehidrojenaz (FDH), format için mutlak özgüllük gösteren ve ortamda bulunan formattan elektronları NAD⁺'ye transfer eden bir enzimdir. Reaksiyonun sonunda oluşan NADH + H miktarı, reaksiyona giren formatın miktarı ile doğru orantılıdır. Tez projesi ile amacımız, NAD⁺ bağımlı FDH enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi, enzim aktivitesinin ve termal stabilitesinin artırılmasıdır.

Çalışmamızda, *Candida boidinii* (Cbo) FDH proteinini kodlayan 1095 baz çift geni, bir şablon olarak kullanılarak Polimez Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. Ürün pET-23b (+) ifade vektörüne klonlandıktan sonra ekspresyon için *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildi. Üretilen CboFDH enziminin saflaştırılması için afinite His-Trap kolonu kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümleri 340 nm'de NADH miktarının fotometrik ölçümü ile gerçekleştirildi. Moleküller arası etkileşimler üzerinde yapılan mutasyonların etkisini tahmin etmek için, Gaussian 09 yazılımına mevcut kristal yapı (PDB: 5DN9) tanıtıldı ve mutasyon yapılacak bölgeler tahmin edildi. Daha sonra, enzim aktivitesini ve termal stabilitesini artırmaya yönelik olarak Val120Thr, Phe285Thr, Gln287Glu, His311Gln ve Phe285Thr/His311Gln mutasyonları gerçekleştirildi. Mutasyonla aminoasitleri değiştirilmiş enzimin yapısı geometrik optimizasyon ile kendi ortamında gerçek forma en yakın şekilde modellendi. Sonuçlar Pymol paket yazılımı ile görselleştirilerek tartışıldı.

Hem yabanıl tip hem de mutant FDH'ler için kinetik ve termostabilite çalışmaları yapıldı. Çalışmada ayrıca, yabanıl tip FDH ve mutant FDH suşlarının enzim aktivitesi üzerinde farklı metal iyonlarının ve organik çözücülerin etkisi araştırıldı. Yabanıl tip ve mutant enzimlerin ikincil yapıları ve termal stabilite çalışmaları dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ile incelendi. Çalışma sonucunda rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen yabanıl tip CboFDH için uygun pH 7.4, optimum sıcaklık ise 40 °C bulunurken; mutant enzimler için optimum pH ve sıcaklıklar, Phe285ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Val120ThrFDH için pH 7, sıcaklık 40 °C, Gln287GluFDH için pH 7, sıcaklık 60 °C, His311GlnFDH için pH 7, sıcaklık 65 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için pH 8, sıcaklık 65 °C olarak bulundu. CD cihazı ile α -heliks ikincil yapıları belirlenen yabanıl tip ve mutant enzimlerin termal denatürasyon (Tm) sıcaklıkları yabanıl tip CboFDH için 64 °C, Gln287GluFDH için 70 °C, His311GlnFDH için 77 °C ve Phe285Thr/His311GlnFDH için 73 °C olarak saptandı. Enzim kinetiği çalışmaları ile yabanıl tip CboFDH için format için K_M değeri 2 mM, K_{cat} değeri $9.2 \times 10^2 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 1.5 mM, K_{cat} değeri $2.62 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; Phe285ThrFDH için format için K_M değeri 0.97 mM ve K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 2.3 mM ve K_{cat} değeri $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; Val120ThrFDH için format için K_M değeri 1.3 mM ve K_{cat} değeri $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 7.9

mM ve K_{cat} değeri $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; Gln287GluFDH için format için K_M değeri 1.65 mM ve K_{cat} değeri $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 3.3 mM ve K_{cat} değeri $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.5 mM ve K_{cat} değeri $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 1.6 mM, K_{cat} değeri $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; Phe285Thr/His311GlnFDH için format için K_M değeri 1.4 mM ve K_{cat} değeri $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, NAD için K_M değeri 7 mM, K_{cat} değeri $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$ olarak hesaplandı. Farklı konsantrasyonlardaki 11 farklı metalin enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında yabancıl tip CboFDH ve mutant FDH'ler için CuCl_2 harici tüm metallerin aktiviteyi %80'e kadar artırdığı gözlenirken; CuCl_2 'ün artan konsantrasyonlarda %77'ye kadar enzim aktivitesini düşürdüğü bulundu. Farklı konsantrasyonlardaki 5 farklı organik çözücünün enzim aktivitesine etkisi sonuçlarında ise yabancıl tip CboFDH ve tüm mutant FDH'lerde aseton, etanol, metanol ve propanolün enzim aktivitesini %20-%31 aralığında artırdığı ancak kloroformun artan konsantrasyonlarda enzim aktivitesini %97'ye kadar düşürdüğü bulundu.

Bu çalışma, bazı patolojik durumlardaki seviyeleri önemli bir belirteç olan formata mutlak spesifik ayrıca endüstriyel kullanım alanları geniş NAD^+ -bağımlı FDH enziminin yerli ve büyük ölçekte üretilebilmesinde veri sağlaması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Candida boidinii*, Format Dehidrogenaz, Format, Protein Mühendisliği, Rekombinant DNA Teknolojisi, Termal Stabilité

PRODUCTION OF NAD⁺ DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE ENZYME FROM *Candida boidinii* AND ENHANCEMENT OF ENZYME ACTIVITY AND THERMAL STABILITY

SUMMARY

Enzymes have a broad range of utility in different industries and they are important for biochemical kits used for diagnostics as well. Formate (formic acid) is an essential endogenous single-carbon metabolite under normal circumstances, it is found in human serum and urine at particular levels. Formate levels were shown to increase in human serum, urine and exhaled breathe condensate due to metabolism of different substances especially in cases of methanol intoxication, vitamins B deficiencies, asthma and various psychiatric disorders. Format Dehydrogenase (FDH) is an enzyme that shows absolute specificity for formate and removes electrons from the formate ion in the environment and transfers them to NAD⁺. The amount of NADH + H at the end of the reaction is calculated as a direct proportion to the amount of the formate entering the reaction. With the thesis project, our aim is to produce NAD⁺ dependent FDH enzyme by recombinant DNA technology and increase enzyme activity and thermal stability. In our study, 1095 base pair gene encoding the *Candida boidinii* (Cbo)FDH protein was amplified by PCR using the genomic DNA from *C. boidinii* as a template. The product was cloned into pET-23b(+) vector and transferred to *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells for expression. The affinity His-Trap column was used for purification of the enzyme. Enzyme activity measurements were performed spectrophotometrically by monitoring the formation of NADH at 340 nm. To predict the influence of mutations done on intramolecular interactions, we introduced the available crystal structure (PDB:5DN9) to Gaussian 09 software and was changed the mutation cites. Subsequently, we modelled the structure of amino acid substituted enzyme, into almost real form in its environment by geometrical optimization. The results were visualized by pymol software and discussed. The determined mutations were performed by the directed mutation method for increase the enzyme activity and thermal stability. Kinetic and thermostability studies were performed for both the wild type and mutant FDHs. In this study different metal ions and organic solvents effect on enzyme activity of wild type FDH and mutant FDH strains were investigated as well. The thermal stability assays and secondary structures of the enzymes were performed by circular dichroism(CD) spectroscopy.

According to the results of the study, the optimal pH for wild type CboFDH produced by recombinant DNA technology was 7.4 and optimal temperature was 40°C ; pH and temperatures optimal for mutant enzymes were as follows: Phe285ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Val120ThrFDH pH 7, temperature 40 °C , Gln287GluFDH pH 7, temperature 60 °C, His311GlnFDH pH 7, temperature 65 °C and for the Phe285Thr/His311GlnFDH, pH 8 and the optimal temperature was found to be 65 °C. Thermal denaturation (T_m) temperature values of wild type and mutant enzymes with α-helix secondary structures determined by CD device were determined as 64 °C for wild type CboFDH, 70 °C for Gln287GluFDH, 77 °C for His311GlnFDH and 73 °C for Phe285Thr/His311GlnFDH. Enzyme kinetics studies for wild type CboFDH for formate revealed that the K_M value was 2 mM and K_{cat} value was 9.2 x 10² S⁻¹, for NAD the K_M value was 1.5 mM and K_{cat} was 2.62 x 10⁴ S⁻¹; for Phe285ThrFDH the K_M for formate was 0.97 mM and the K_{cat} value was 6.23 x 10⁶³ S⁻¹, the K_M value for

NAD was 2.3 mM and the K_{cat} value was $4.59 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Val120ThrFDH the K_M value for formate was 1.3 mM and K_{cat} was $6.23 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, K_M value for for the NAD 7.9 mM and K_{cat} of $1.04 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$; for Gln287GluFDH, the K_M value for formate was 1.65 mM and the K_{cat} was $4.42 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 3.3 mM and the K_{cat} value was $9.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for His311GlnFDH, the K_M value for the format was 1.5 mM and the K_{cat} was $3.28 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 1.6 mM, the K_{cat} value was $8.2 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$; for Phe285Thr / His311GlnFDH, the K_M value for the formate was 1.4 mM and the K_{cat} was $6.95 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$, the K_M value for NAD was 7 mM, and the K_{cat} value was $1.21 \times 10^4 \text{ S}^{-1}$. The effect of 11 different metals in different concentrations on the enzyme activity was found that all metals except CuCl_2 found to enhance the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs by up to 80%; CuCl_2 was found to reduce the activity up to 77% in higher concentrations. The effect of 5 different organic solvents in different concentrations on the enzyme activity was found that acetone, ethanol, metanol and propanol increase the activity for wild type CboFDH and mutant FDHs in range between 20%-31% but chloroform was found to decrease the activity between 37%- 97% at increasing concentrations in all enzymes. This study is important in terms of providing data on the production of a wide range of NAD^+ -dependent FDH enzymes, which are absolutely specific to the formate, which is an important indicator of the levels in some pathological conditions, and the production of large-scale NAD^+ -dependent FDH enzyme.

Keywords: *Candida boidinii*, Formate Dehydrogenase, Formate, Protein Engineering, Recombinant DNA Technology, Thermal Stability