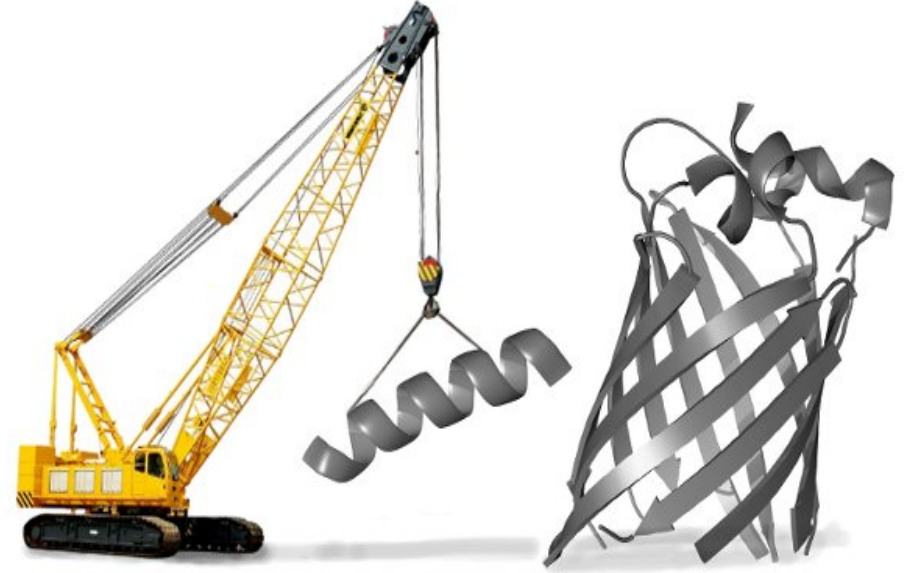


PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ:

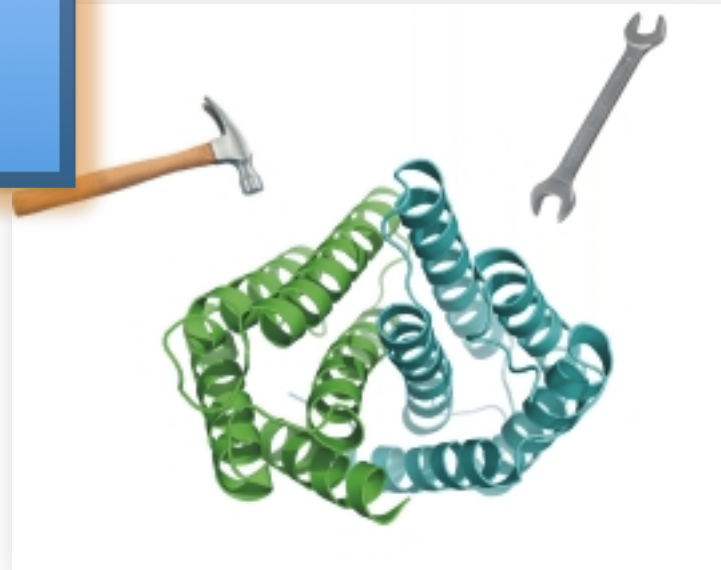
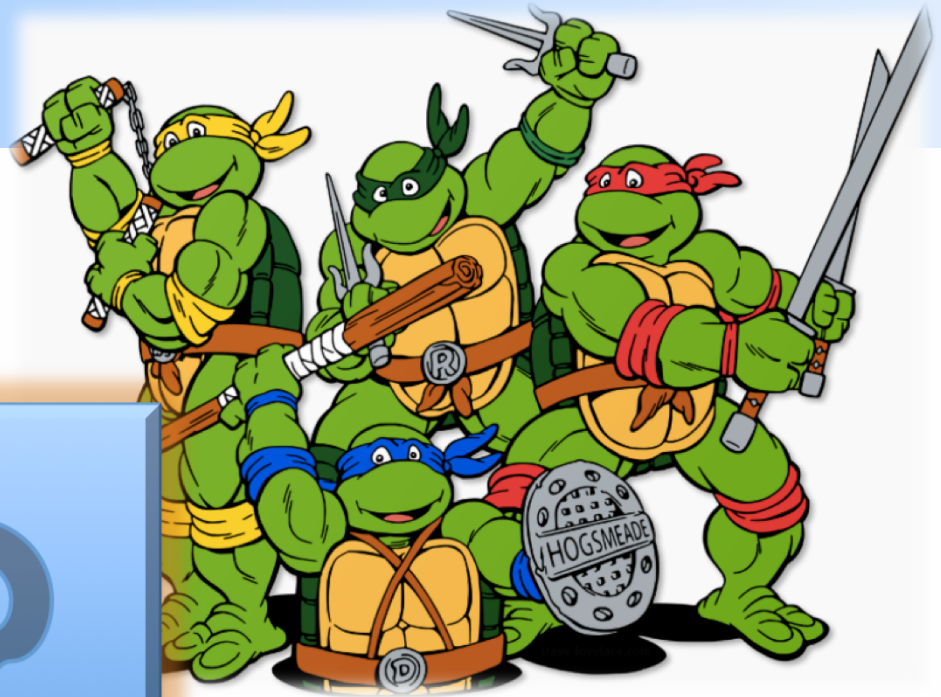


İstenilen özellikleri geliştirilmiş ya da değiştirilmiş yeni proteinlerin dizayn edilmesi ve kullanılabilir hale getirilmesidir.

Dizayn edilen değişiklik bu proteinleri kodlayan genlerin değiştirilmesi ile meydana gelir.

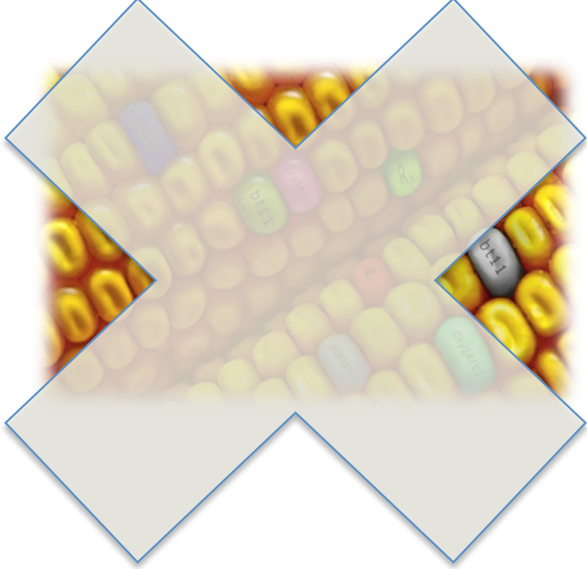
Protein Mühendisliği

GDO mudur?.



Protein Mühendisliği

GDO değildir.



- Dizayn edilen değişiklik proteinleri kodlayan genlerde meydana getirilir.
- Protein mühendisliği Genetik Mühendisliğinin bir alt kolu sayılabilir.

Protein mühendisliğinde son ürün modifiye edilmiş bir AA ya da AA dizisi içeren bir proteindir

- Son ürün genetiği değiştirilmiş bir organizma değil bir proteindir.
- Değiştirilmiş proteinler yeni kimyasal bileşiklere benzetilebilir.
- Ancak toksisite açısından zararlı olabilecek kimyasal bileşiklerden farklı olarak güvenli ve doğayla dost bileşikler olarak rağbet görmektedir.

Protein Mühendisliği

Proteinler canlılıktaki önemi dışında modern biyoteknolojinin de temelini oluşturmaktadır.

Son 30 yıldır gelişen tekniklerle beraber protein mühendisliği,

- İlaç geliştirilmesi,
- Hastalıkların araştırılması
- Gıda
- Kozmetik
- Tekstil
- Malzeme bilimleri
- Çevre temizlenmesi
- Tarım
- Nanobiyoteknoloji vb geniş disiplin alanlarda uygulama alanı bulmaktadır.

Yakın bir gelecekte her evde, hastanede ya da endüstride protein mühendisliği ile tasarlanmış enzimlerin, ilaçların ya da başka proteinlerin kullanılıyor olması kaçınılmaz gibi görünmektedir.

Sürdürülebilir endüstriyel proseslerin geliştirilmesi için protein mühendisliği önemli bir yaklaşımdır.

Protein Mühendisliği

**En genel ifade ile protein mühendisliği,
moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılması yolu ile proteinlerin
yapı ve fonksiyonlarının moleküler düzeyde anlaşılıp,
genetik yapılarının değiştirilerek,
istenilen yapı ve fonksiyona sahip yeni proteinlerin üretilmesini
sağlamak üzere yapılan çalışmalardır.**

Protein Mühendisliği

Mezofilik organizmalardan izole edilen enzimler çeşitli endüstriyel üretim proseslerinde kullanılabilirler

- Fakat bu mezofilik enzimler endüstriyel proseslerde kullanılan **yüksek sıcaklık,**
- **organik solvent ve**
- **yüksek basınç** gibi koşullar karşısında kolayca denature olurlar.

Ekstremofilik organizmalardan izole edilen enzimler bu koşullara mezofilik olanlardan daha dayanıklıdır.

Bununla beraber ekstermofilik enzimlerin kullanılabilirliği onların ulaşılabilirliği ile paraleldir.

Protein Mühendisliği

Endüstriyel zor koşullara dayanıklı yeni enzimlerin belirlenmesi ve saflaştırılması her zaman kolay olmamaktadır.

Bundan dolayı,
daha kolay elde edilebilir olan mezofilik enzimlerin,
istenilen bir fonksiyon için ya da
arttırılmış stabilite için
protein mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmesi bu kısıtlılığın
üstesinden gelmek için mükemmel bir yaklaşımdır.

Protein Mühendisliği

Ekstremofilik organizmalardan izole edilen enzimler daha az stabil olan mezofilik homologlarını geliştirmek üzere model olarak kullanılırlar.

ÖRNEĞİN:

Termofilik proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kararlılıklarını nasıl koruduklarının anlaşılması biyoteknolojik uygulamalar için yeni termostable prtoeinler dizayn etmek için önemlidir.

Diğer yandan, birçok amino asit değişikliği stabilite üzerinde önemli değişiklikler yaratmaz.

Proteinler aa değişimlerini tolere edebilirler, bazı değişimler kritik etkileşimleri korurlar.

Bir amino asit değişiminin etkisi proteinin katlanmış ve katlanmamış durumlarına etkilerinin kombinasyonudur.

Protein Mühendisliği

Bununla birlikte,

van der Waals, hidrofobik etkileşimler, H-bağları gibi protein yapısını stabilize eden etkileşimleri etkilemeyip,

sadece bir tip etkileşimi değiştirecek (örneğin elektrostatik etkileşimleri) AA değişimleri dizayn etmek kolay değildir.

Tek bir AA tüm protein yapısına katkısı değerlendirilmelidir.

Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği bir yandan geliştirilmiş proteinlerin elde edilmesini sağlarken

Deterjan endüstrisi için bazik ortama dayanıklı enzimler vb

Bu çalışmalar sayesinde diğer yandan **enzim/protein yapısının ve fonksiyonlarının moleküler temellerinin anlaşılmasını** sağlamaktadır

Termostabilite ve pH dayanıklılığının anlaşılması vb

Protein Katlanma bozukluğu hastalıklarının anlaşılması vb

Protein Mühendisliği

Proteinler her zaman endüstriyel uygulamalar ya da medikal amaçlar için doğal hali ile uygun olmayabilirler.

Bu durumlarda protein mühendisliği ile özellikleri geliştirilebilir:

- Enzimatik reaksiyonun etkinliğini arttırmak
- Çok pahalı olan bir kofaktörün elimine edilmesi
- Spesifiteyi arttırmak için substrat bağlama bölgesini değiştirmek
- Thermal toleransı değiştirmek
- pH stabilitesini değiştirmek
- Proteaz dayanıklılığının geliştirilmesi
- Protein katlanmasının anlaşılması
- 3D yapı ve amino asit dizisi arasındaki bağlantıların anlaşılması

Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği 3 temel strateji ile gerçekleştirilmektedir.

1.Rasyonel Dizayn

2.Yönlendirilmiş Evrim (Non-Rational Dizayn)

3.Yarı Rasyonel Dizayn

} Kütüphane Tabanlı
Yöntemler /
Random Mutagenesis

Doğadaki sıradışı enzimler, **mutasyonlar** ve **DNA dizisindeki rekombinasyonlar** sonucu ortaya çıkmıştır.

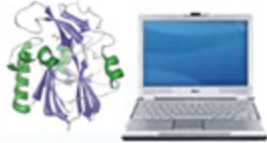
Protein mühendisliği de doğayı bu yönde taklit etmektedir

Hernekadar her bir yaklaşımın bazı kısıtlılıkları olsa da tüm yöntemleri **substrat spesifitesinin değiştirilmesi**, **kofaktör spesifitesinin değiştirilmesi**, **enentoseçicilik**, **stabilitenin arttırılması**, enzim özelliklerinin anlaşılması gibi birçok farklı çalışmada başarıyla uygulanmıştır.

Rasyonel dizayn ya da random mutagenesis yöntemlerinden elde edilen bilgiler bir diğerinin uygulanması için de kullanılabilir.

RATIONAL DESIGN

1. Computer aided design



2. Site-directed mutagenesis



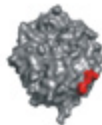
Individual mutated gene

3. Transformation

4. Protein expression

5. Protein purification

6. *not applied*



Constructed mutant enzyme

7. Biochemical testing

**IMPROVED
ENZYME**

DIRECTED EVOLUTION

1. *not applied*

2. Random mutagenesis



Library of mutated genes
(>10,000 clones)

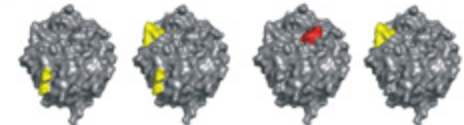
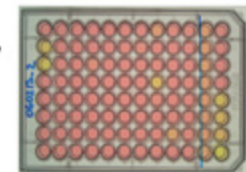
3. Transformation

4. Protein expression

5. *not applied*

6. Screening and selection

- stability
- selectivity
- affinity
- activity



Selected mutant enzymes

Rasyonel Protein Dizaynı

RASYONEL DIZAYN / HESAPLAMALI DIZAYN YAKLAŞIMI

- çalışılacak proteinin **amino asit dizi** bilgisi,
- **üç boyutlu yapısı**
- **fonksiyon** bilgisi gerektirmektedir.
- Rasyonel dizayn **insersiyon**, delesyon ya da **yerdeğiştirme** gibi kontrol edilebilir amino asit değişiklikleri sağlamaktadır.
- **Tek bir amino asit değişikliği** yapılabileceği gibi **belli uzunluktaki bir dizinin değiştirilmesi** de sağlanabilir.

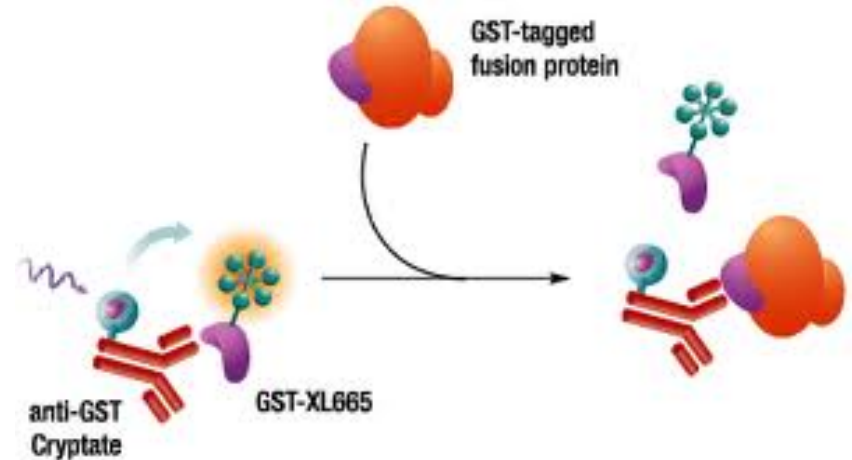
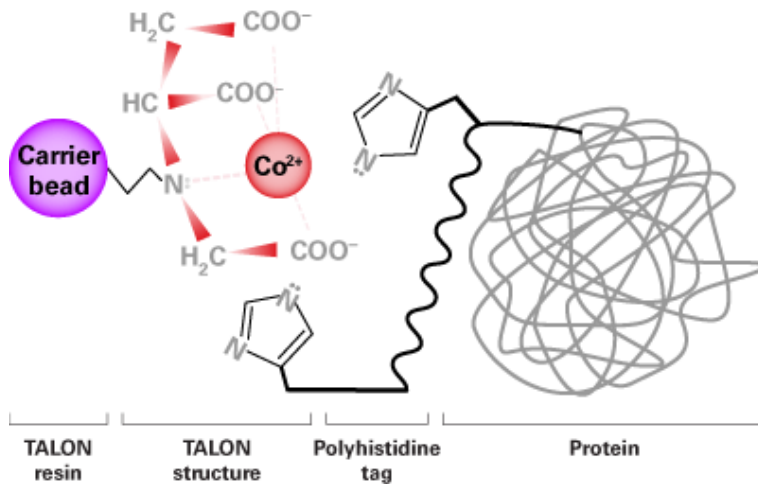
Rasyonel Protein Dizaynı

Rasyonel Dizayn sayesinde gerçekleştirilen kontrollü değişiklikler;

- **amaca yönelik iyileştirmenin yanısıra,**
- **tek bir amino asit residunun değiştirilmesinin protein yapısı, fonksiyonu ve katlanma özelliklerini nasıl değiştirdiğinin anlaşılması açısından da önemlidir.**

Rasyonel Protein Dizaynı

Rasyonel dizayn aynı zamanda füzyon proteinleri oluşturulması için de uygun bir yaklaşımdır. (örn: Histidin kuyruğunun takılması, GST tag)



Protein Mühendisliği

Literatüre baktığımız zaman coenzim ya da substrat spesifitesi, oksidative ya da termal stabilite gibi özelliklerin geliştirilmesinin başarıyla gerçekleştirildiğini görmekteyiz.

Bu özelliklerin değiştirilmesi proteinin primer yapısının değiştirilmesi ile mümkün hale gelmektedir.

Primer dizide yapılacak sadece tek bir nokta mutasyonu bile proteinin yapısı ya da fonksiyonunda önemli değişikliklere neden olmaktadır. Öteyandan biliyoruz ki birçok durumda proteinler meydana gelen mutasyonları tolere edebilmektedir.

Bu durum dizayn ettiğimiz mutasyon bölgesinin hesaplanmasının ve uygulanan stratejinin önemini ortaya koymaktadır.

Protein Mühendisliği

Protein karakteristiklerinin değiştirilmesinde kullanılan birçok rasyonel dizayn stratejisi bulunmaktadır:

- **Hidrojen bağlarının arttırılması**
- **Tuz köprülerinin oluşturulması**
- **Yüzey elektrostatik etkileşimlerin optimizasyonu**
- **Disülfid köprülerinin oluşturulması**
- **Hidrofobik etkileşimlerin arttırılması**
- **Çekirdek yapısının geliştirilmesi**
- **Kavite değiştirilmesi**
- **Yüzey looplarının kısaltılması ve sıkılaştırılması**
- **Oligomerizasyonun arttırılması.....**

Proteinler evrim boyunca farklı stratejiler geliştirerek Bulundukları ortama adapte olmuşlardır.

Protein Mühendisliği

Rasyonel dizayn yapılırken istenilen değişiklikler proteine “site directed mutagenesis yöntemi ile sokulmaktadır.

- Protein veri bankalarında artan yüksek çözünürlüklü protein yapıları,
- Hangi amino aside hangi mutasyon gerçekleştirildiğinde nasıl değişikliklerin olabileceğinin modellenebildiği hesaplamalı metodların gelişmesi sayesinde

rasyonel dizayn gittikçe daha fazla ve daha başarılı kullanılabilir hale gelmiştir.

Protein Mühendisliği

Yöntemin Eksiklikleri

- Çalışılacak proteinin yapısal bilgisine ihtiyaç duyar ancak her istenilen proteinin yapısal bilgisine ulaşamaması bu yöntemin en önemli dezavantajıdır
- Mutasyon dizaynına bağlı olarak uzun mesafe etkileşimlerinin hesaplanmasındaki güçlük diğer bir dezavantajıdır.

Protein Mühendisliği

1. Rasyonel dizayn yaklaşımının başlangıç noktası protein yapı ve fonksiyonuna bağlı olarak **moleküler bir modelin** oluşturulmasıdır.
2. Bunu takiben deneysel olarak **mutasyonun (değişikliğin) gerçekleştirilmesi** ve
3. Elde edilen yeni dizayn **proteinin analiz** edilmesidir.

Eğer sonuç başarısız ya da kısmen başarılı ise 2. Aşama dizayna geçilir ve birinci aşamadan elde edilen bilgiye göre yeni mutantlar dizayn edilir.

Bu yöntem tekrarlanarak hedeflenen özellikler yakalanana kadar devam edilebilir (dizayn cycle)

Protein Mühendisliği

3-D yapısı ve amino asit dizi bilgisi bilinen bir protein için adım adım rasyonel dizayn stratejisini incelersek;



1. Literatürden, çalışılacak olan proteinle ilgili ulaşılabilir tüm bilgileri toplamak

- deneysel analizler,
- ilgili proteinin homologlarının ve diğer family lerden benzerlerinin araştırılması,
- Homolog dizilerin belirlenmesi

2. multiple sequence alignment.

- Protein amino asit dizilerinin ve
- Protein ikincil yapılarının incelenmesi

(**ncbi, expasy** for databases and tools)

Protein Mühendisliği

3. Homolog proteinlerin yapısal eşleşmeleri yapılarak protein yapılarının karşılaştırılması

- dikkate değer değişiklikleri belirle,
- hangi homolog daha stabil (eğer stabilite ile ilgileniyosan), neden?
- daha stabil olanda fazladan hangi etkileşimler mevcut,

salt bridges, elektrostatik etkileşimler, disülfid köprüsü vs. herhangi bir sterik çatışma ya da cavitide farklı bir paketlenme var mı ?

- Loop uzunluklarını ya da diğer farklılıkları incele (Pymol, Swiaa PDB Viewer yardımcı programlar)
- Eğer karşılaştırılacak bir kristal yapı mevcut değilse ilgilenilen proteinin **homology modellemesi yapılır**

4. Mutasyonları belirlemek için uygun algoritmaları içeren programların uygulanması

- bu tür toolları on www.expasy.org/tools/ 'dan bulabilirsiniz
- Discover, Version 2.95 (Accelrys)

5.Katlanma koşullarında proteinin simulasyonu

- en az stabil görünen bölgeleri belirleyerek değiştirilecek bölgeleri belirle,
- mutasyonları dizayn et.

6. Mutantları modelle

- mutasyonun istenilen özelliği geliştirip geliştirmediğini
- Protein yapısına nasıl bir etkisi olduğunu kontrol et

7. Laboratuvar ortamında mutantları üret

- Site-directed mutagenesis,
- Protein ekspresyonu,
- Protein saflaştırılması
- Üretilen ve saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon çalışmalarını yap

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

1. Literatürden çalışılacak olan proteinle ilgili ulaşılabilir tüm bilgileri toplamak

(ilgili proteinin homologlarının ve diğer ailelerden benzerlerinin araştırılması, homolog dizilerin belirlenmesi deneysel analiz sonuçlarının incelenmesi)

```
AAB24882      TYHMCQFHCRCYVNNHSGEKLIECNERSKAFSCPSHLQCHKRRQIGEKTHEHNQCGKAFPT 60
AAB24881      -----YECNQCCKAFAQHSSLKCHYRTHIGEKPYECNQCCKAFSK 40
               **** : .***: * *:*** * :****.:* *****..

AAB24882      PSHLQYHERTHTGKPYECHQCGQAFKKCSLLQRHKRTHTGKPYE-CNQCCKAFAQ- 116
AAB24881      HSHLQCHKRTHTGKPYECNQCCKAFSQHGLLQRHKRTHTGKPYMNVINMVKPLHNS 98
               **** *:*****:****:***.: .*****: :*.:::
```

Örnek: Homolog Protein. Farklı iki türden homolog dizilerin karşılaştırılması.
“*” her iki proteinde korunmuş bölgeleri gösterir.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.ebi.ac.uk/>

<http://www.wwpdb.org/>

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

1. Literatürden çalışılacak olan proteinle ilgili ulaşılabilir tüm bilgileri toplamak

BLAST → **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool. It is a tool to perform database searches for a protein or nucleic sequence.

```
GENE ID: 1756 DMD | dystrophin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)
```

```
Score = 114 bits (286), Expect = 2e-24, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 58/71 (81%), Positives = 62/71 (87%), Gaps = 0/71 (0%)
```

```
Query 1 ALQSSLKEQQNGFNYS DTVKEMAKKAPSEICQKYLSEFEEIEGHWKKLSSQLVESCQKL 60  
ALQSSL+EQQ+G YLS TVKEM+KKAPSEI +KY SEFEEIEG WKKLSSQLVE CQKL  
Sbjct 861 ALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKL 920  
  
Query 61 EEHMNKLRLKFK 71  
EE MNKLRLK Q  
Sbjct 921 EEQMNLRLRKIQ 931
```

(+) işareti → **K** and **Q**, the **N** and **S**, the **A** and **S**, and the **Q** and **R** all denote "positives".

K (lysine) and Q (glutamine) are both polar.

N (asparagine) and S (serine) are both neutral and polar...and so on.

Benzer aminon asitler birbiriyle yerdeğiştirmişse proteinin yapısında bir fark olmayacaktır.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

1. Literatürden çalışılacak olan proteinle ilgili ulaşılabilir tüm bilgileri toplamak

CLUSTAL OMEGA

```
AAB24882      TYHMCQFHC RYVNNHSGEKL YECNERSKAFSCPSHLQCHKRRQIG EKT HEHNQCGKAFPT 60
AAB24881      -----YECNQCGKAFAQHSSLKCHYRTHIG EKP YECNQCGKAFSK 40
               *****: .***: * *:*** * :*****.:* *****..

AAB24882      PSHLQYHERHTHTGEKPYECHQCGQAFKKCSLLQRHKRHTHTGEKPYE-CNQCGKAFAQ- 116
AAB24881      HSHLQCHKRHTHTGEKPYECNQCGKAFSQHGLLQRHKRHTHTGEKPYMNVINMVKPLHNS 98
               ***** *:*****:*****:***.: .*****:*****: *.: :
```

What do the consensus symbols mean in the alignment?

An * (asterisk) indicates positions which have a single, fully conserved residue.

A : (colon) indicates conservation between groups of strongly similar properties - scoring > 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix.

A . (period) indicates conservation between groups of weakly similar properties - scoring =< 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix.

Note that the same symbols display for DNA/RNA alignments, so while * (asterisk) characters are still useful, the other characters should be ignored for DNA/RNA alignments.

What do the colours mean when I show them on protein alignments?

This protein-only option colours the residues according to their physicochemical properties:

Residue	Colour	Property
AVFPMILW	RED	Small (small+ hydrophobic (incl.aromatic -Y))
DE	BLUE	Acidic
RK	MAGENTA	Basic - H
STYHCNGQ	GREEN	Hydroxyl + sulfhydryl + amine + G
Others	Grey	Unusual amino/imino acids etc

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Homolog: aynı atadan gelen iki türdeki gen ya da proteinleri ifade eder.

Homolog proteinler dizi olarak benzerdiler ancak her benzer dizi homolog değildir.

Ortolog: 2 farklı türde bulunan homolog genlerdir, genin orijini ortak bir atadan gelmektedir.

Paralog: Aynı tür içinde bir protein duplike oluyorsa, duplike genler birbirinin paraloğudur.

NCBI→ National Center for Biotechnology Information

[Yandex](#)
[Önerilen Siteler](#)
[Daha fazla Eklenti alın](#)

[NCBI](#)
[Resources](#)
[How To](#)

[Sign in to NCBI](#)

National Center for Biotechnology Information

[NCBI Home](#)
[Resource List \(A-Z\)](#)
[All Resources](#)
[Chemicals & Bioassays](#)
[Data & Software](#)
[DNA & RNA](#)
[Domains & Structures](#)
[Genes & Expression](#)
[Genetics & Medicine](#)
[Genomes & Maps](#)
[Homology](#)
[Literature](#)
[Proteins](#)
[Sequence Analysis](#)
[Taxonomy](#)
[Training & Tutorials](#)
[Variation](#)

Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

[About the NCBI](#) |
 [Mission](#) |
 [Organization](#) |
 [Research](#) |
 [NCBI News](#)

Get Started

- [Tools](#): Analyze data using NCBI software
- [Downloads](#): Get NCBI data or software
- [How-To's](#): Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- [Submissions](#): Submit data to GenBank or other NCBI databases

3D Structures

Explore three-dimensional structures of proteins, DNA, and RNA molecules. Examine sequence-structure relationships, active sites, molecular interactions, biological activities of bound chemicals, and associated biosystems.

Popular Resources

- [PubMed](#)
- [Bookshelf](#)
- [PubMed Central](#)
- [PubMed Health](#)
- [BLAST](#)
- [Nucleotide](#)
- [Genome](#)
- [SNP](#)
- [Gene](#)
- [Protein](#)
- [PubChem](#)

NCBI Announcements

Planned change in bacterial strain-level information management

Nov 21, 2013

Please be aware that there is an upcoming change (January 2014) in how NCBI manages

Exploring next-gen sequencing experiments with SRA-BLAST

Nov 19, 2013

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

[Yandex](#)
[Önerilen Siteler](#)
[Daha fazla Eklenti alın](#)

[NCBI](#)
[Resources](#)
[How To](#)
[Sign in to NCBI](#)

Protein

[Save search](#)
[Advanced](#)
[Help](#)

[Show additional filters](#)

Display Settings: ☒ Summary, 20 per page, Sorted by Default order

Results: 1 to 20 of 126935
 << First < Prev Page 1 of 6347 Next > Last >>

☐ [RecName: Full=Formate dehydrogenase; AltName: Full=NAD-dependent formate dehydrogenase](#)
 1. **364 aa protein**
 Accession: O13437.1 GI: 74654561
[GenPept](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#) [Identical Proteins](#)

☐ [formate dehydrogenase \[Escherichia coli\]](#)
 2. **715 aa protein**
 Accession: AAA23754.2 GI: 14717816
[GenPept](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

☐ [formate dehydrogenase \[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2\]](#)
 3. **1016 aa protein**
 Accession: AAL22876.1 GI: 16422600
[GenPept](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#) [Identical Proteins](#)

☐ [formate dehydrogenase \[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. SG9\]](#)
 4. **1015 aa protein**
 Accession: EGE34155.1 GI: 326627812
[GenPept](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#) [Identical Proteins](#)

☐ [formate dehydrogenase \[Photorhabdus temperata J3\]](#)
 5. **1015 aa protein**

Species
 Animals
 Plants
 Fungi
 Protists
 Bacteria
 Archaea
 Viruses
 More ...

Genetic compartments
 Chloroplast
 Mitochondrion
 Plasmid
 Plastid

Enzyme types
 Oxidoreductases

Source databases
 DDBJ
 EMBL
 GenBank
 PDB

Filters: [Manage Filters](#)
Top Organisms [\[Tree\]](#)
 Escherichia coli (23800)
 Homo sapiens (21864)
 Salmonella enterica (7251)
 Klebsiella pneumoniae (2511)
 Staphylococcus aureus (1572)
 All other taxa (102805)
[More...](#)

Find related data
 Database:

Search details
 formate dehydrogenase[Protein Name] OR (formate[All Fields] AND dehydrogenase[All Fields])
 [See more...](#)

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

←

→

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1181204

🔍 ↻

NAD-dependent formate d... x

🏠

★

⚙️

🌐

Yandex

🔍

Önerilen Siteler ▾

📄

Daha fazla Eklenti alın ▾

Protein

Protein ▾

Search

Advanced

Help

Display Settings: (v) GenPept

Send to: (v)

NAD-dependent formate dehydrogenase [Candida methylica]

GenBank: CAA57036.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: (v)

LOCUS

CAA57036

364 aa

linear

PLN 18-APR-2005

DEFINITION

NAD-dependent formate dehydrogenase [Candida methylica].

ACCESSION

CAA57036

VERSION

CAA57036.1 GI:1181204

DBSOURCE

embl accession [X81129.1](#)

KEYWORDS

.

SOURCE

Candida methylica

ORGANISM

[Candida methylica](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.

REFERENCE

1

AUTHORS

Allen, S.J. and Holbrook, J.J.

TITLE

Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding
NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast
Candida methylica

JOURNAL

Gene 162 (1), 99-104 (1995)

PUBMED

[7557425](#)

REFERENCE

2 (residues 1 to 364)

AUTHORS

Hall, L.

TITLE

Direct Submission

JOURNAL

Submitted (18-AUG-1994) L. Hall, University of Bristol, Dept of
Biochemistry, School of Medical Sciences, Bristol, BS8 1TD, UK

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Identify Conserved Domains

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Identical proteins for CAA57036.1

Sequence 8 from patent US 8481294 [AGU06650]

Sequence 3 from patent US 7709261 [ADL90985]

Sequence 3 from patent US 7256016 [ABW41332]

See all...

LinkOut to external resources

MODBASE, Database of Comparative Protein
Structure M [MODBASE, Database of Comparat...]

Transcript/Protein Information
[RANTHER Classification System]

//

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1181204

Yandex Önerilen Siteler **Daha fazla Eklenti alın**

biochemistry, School of Medical Sciences, Bristol BS8 1TB, UK

FEATURES

source Location/Qualifiers
 1..364
 /organism="Candida methylica"
 /db_xref="taxon:45353"

Protein 1..364
 /product="NAD-dependent formate dehydrogenase"

Region 39..338
 /region name="LdhA"
 /note="Lactate dehydrogenase and related dehydrogenases
 [Energy production and conversion / Coenzyme metabolism /
 General function prediction only]; COG1052"
 /db_xref="CDD:31252"

Region 128..311
 /region name="2-Hacid_dh_C"
 /note="D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD
 binding domain; pfam02826"
 /db_xref="CDD:202418"

CDS 1..364
 /coded_by="X81129.1:126..1220"
 /db_xref="GOA:Q00498"
 /db_xref="HSSP:2NAC"
 /db_xref="InterPro:IPR006139"
 /db_xref="InterPro:IPR006140"
 /db_xref="InterPro:IPR016040"
 /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q00498"

ORIGIN

```

1  mkivlvlyda gkhaadeekl ygctenklgi anwldkqghe littsdkege tseldkhipd
61  adiiittpfh payitkerld kaknlksvvv agvgsdhdld dyinqtgkki svlevtgsnv
121 vsvaehvmt mlvlvrnfvp ahegiinhdw evaaiaakday diegkatiati gagrigyrvl
181 erllpfnpke llydyqalp keaeeekvgar rvenieelva qadivtvnap lhagtkglin
241 kellskfkkg awlvntarga icvaedvaav lesqqlrgyg gdvwfqpap kdhpwrdrmn
301 kygagnamtp hysgttldaq tryaegtgni lesfftgkfd yrpqdiilln geyvtkaygk
361 hdkk

```

Transcript/Protein Information
 [PANTHER Classification System]

Related information

BLink

Related Sequences

Identical Proteins

CDD Search Results

Conserved Domains (Concise)

Conserved Domains (Full)

Domain Relatives

Nucleotide

PubMed

Related Structures (List)

Related Structures (Summary)

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

NAD-dependent formate dehydrogenase
 [Candida methylica] Protein

formate dehydrogenase (664) Structure

formate dehydrogenase (126935) Protein

See more...

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

←

→

↻

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

🔍

NCBI Blast:emb|CAA57036.1| (...)

NCBI Blast:emb|CAA57036....

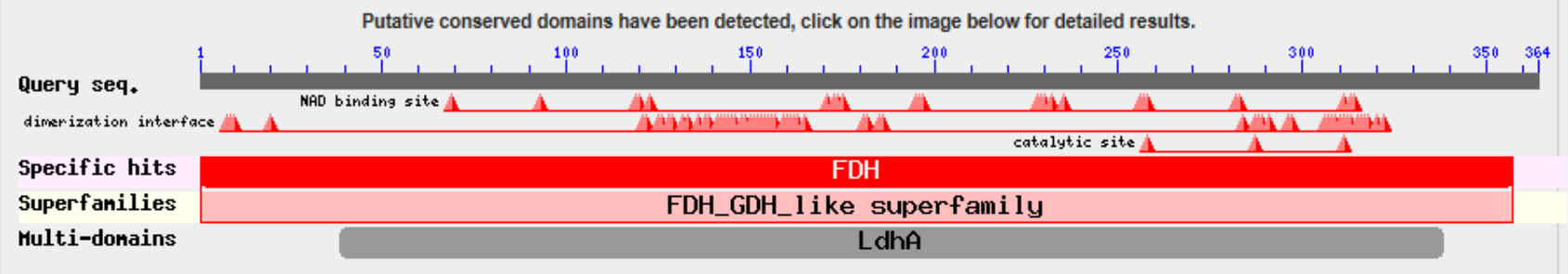
Yandex

Önerilen Siteler ▾

Daha fazla Eklenti alın ▾

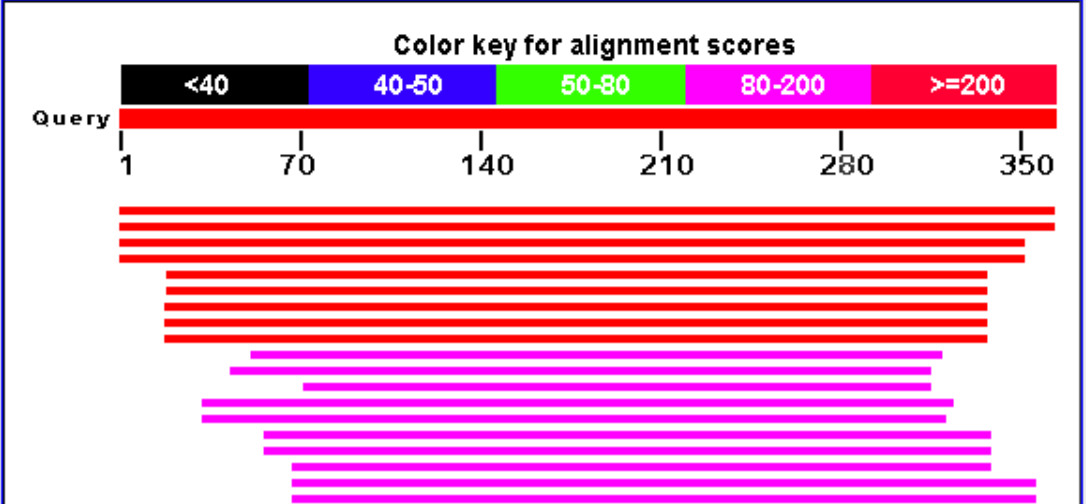
Graphic Summary

Show Conserved Domains



Distribution of 77 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments



kırmızı → >200
Pembe → 80-200
vb

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NCBI Blast:emb|CAA57036.1| (... NCBI Blast:emb|CAA57036.... x

Yandex Önerilen Siteler Daha fazla Eklenti alın

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Chain A, Candida Boidinii Formate Dehydrogenase (Fdh) K47e Mutant >pdb 2FSS B Chain B, Candi	726	726	99%	0.0	97%	2FSS_A
☐	Chain A, Candida Boidinii Formate Dehydrogenase (Fdh) C-Terminal Mutant >pdb 2J6I B Chain B, C	721	721	99%	0.0	97%	2J6I_A
☐	Chain A, Apo-Form Of Nad-Dependent Formate Dehydrogenase From Higher-Plant Arabidopsis Tha	366	366	96%	3e-124	54%	3NAQ_A
☐	Chain A, Nad-Dependent Formate Dehydrogenase From Higher-Plant Arabid Thaliana In Complex V	365	365	96%	4e-124	54%	3N7U_A
☐	Chain A, Nad-dependent Formate Dehydrogenase From Bacterium Moraxella Sp.c2 In Complex Witl	319	319	87%	2e-105	50%	2GSD_A

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Yandex Önerilen Siteler ▾ Daha fazla Eklenti alın ▾

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_300193276 NCBI Blast:emb[C... NCBI Blast:em... Related structures...

Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▴ Previous ▴ Descriptions

Chain A, Apo-Form Of Nad-Dependent Formate Dehydrogenase From Higher-Plant Arabidopsis Thaliana
Sequence ID: [pdb|3NAQ|A](#) Length: 357 Number of Matches: 1
▸ See 1 more title(s)

Range 1: 10 to 351 GenPept Graphics ▾ Next Match ▴ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
366 bits(939)	3e-124	Compositional matrix adjust.	188/351(54%)	247/351(70%)	9/351(2%)
Query 2	KIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDGHELIITSDKEGETSELDKHIPDA	61			
Sbjct 10	KIVGVFYKANEYATKNPNFLGCVENALGIRDWLESQGHQYIVTDDKEGPDCELEKHIPDL	69			
Query 62	DIITTPFHPAYITKERLDKAKNLKSVVAVGSDHIDLIDYINQTKKISVLEVTGSNNV	121			
Sbjct 70	HVLISTPFHPAYVTAERIKKAKNLKLLLTAGIGSDHIDLQAAAAAG--LTVAEVTGSNNV	127			
Query 122	SVAEHVMTMLVLVRNFVPAHEQIINHWDWEVAAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLE	181			
Sbjct 128	SVAEDELMLRILILMRNFVPGYNQVVGGEWNVAGIAYRAYDLEGKTIIGTVGAGRIGKLLQ	187			
Query 182	RLLPFNPKELLYDYQALPKEAEKVGARRVENIEELVAQADIVTVNAPLHAGTKGLINK	241			
Sbjct 188	RLKPFPGCN-LLYHDLQMAPELEKETGAKFVEDLNEMLPKCDVIVINMPLTEKTRGMFNK	246			
Query 242	ELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGGDVWFQPPAPKDHPWRDMRNK	301			
Sbjct 247	ELIGKLKKGVLIVNNARGAIMERQAVVDAVESGHIGGYSGDVWDPQAPAPKDHPWRMPNQ	306			
Query 302	YGAGNAMPHTSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGFYRQDIILLNGE	352			
Sbjct 307	-----AMTPHTSGTTIDAQLRYAAGTKDMLERYFKGE-DFPTENYIVKDGE	351			

Related Information

[Structure](#) - 3D structure displays

[Identical Proteins](#) - Proteins identical to the subject

Q: cm FDH
S: A. thaliana

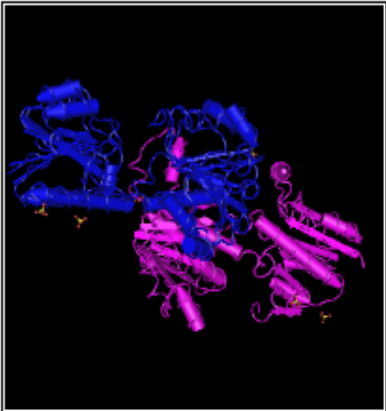
Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▴ Previous ▴ Descriptions

Chain A, Nad-Dependent Formate Dehydrogenase From Higher-Plant Arabid Thaliana In Complex With Nad And Azide
Sequence ID: [pdb|3N7U|A](#) Length: 351 Number of Matches: 1
▸ See 12 more title(s)

Range 1: 4 to 345 GenPept Graphics ▾ Next Match ▴ Previous Match

Related Information

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



3NAQ_A

[Search references in pubmed]

Chain A, Apo-Form Of Nad-Dependent Formate Dehydrogenase From Higher-Plant Arabidopsis Thaliana

E-value: 3.41e-124, bit-score: 366, aligned-length: 351, Identity to query: 54%

	10	20	30	40	50	60	70	80	
gi 1181204	2	KIVLVLYDAGKHADEEKLYGCTENKLGIANWLKQGH	ELITSDKEGETSELDKHIPDADIIITPFHPAYITKERL	DK	81				
3NAQ_A	10	KIVGVFYKANEYATKNPNFLGCVENALGIRDWLESQGH	QYIVTDDKEGPDCELEKHIPDLHVLIS	TPFHPAYVTAERIKK	89				

	90	100	110	120	130	140	150	160	
gi 1181204	82	AKNLKSVVVGAGVSDHIDLQYINQTK	kkISVLEVTGSNNVSVVAEHVVM	TMLVLRNFPVPAHEQIINH	DWEVAAIAKDAYD	161			
3NAQ_A	90	AKNLKLLLTAGIGSDHIDLQAAAAAG	--LTVAEVTGSNNVSVVAEDEL	MRILILMRNFPVPGYNQVVKGE	NNVAGIAYRAYD	167			

	170	180	190	200	210	220	230	240	
gi 1181204	162	LEGKTIATIGAGRIGYRVLERLLPFNPKE	LLYYDYQALPKEAEKVGARRVENIEELVAQADIVTV	NAPLHAGTKGLINK	241				
3NAQ_A	168	LEGKTIGTVGAGRIGKLLQLRKPFGCN	-LLYHDLRLQMAPELEKETGAKFVEDLNEMLPKCD	VIINMPLTEKTRGMFNK	246				

	250	260	270	280	290	300	310	320	
gi 1181204	242	ELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAA	ALESGQLRGYGGDVWFQPPAPKDHPRD	MRNKygagnAMTPHYSGTTLDAQT	321				
3NAQ_A	247	ELIGLKKGVLIIVNNARGAIMERQAVVD	AVESGHIGYSGDVWDQPPAPKDHPRYMPNQ	-----AMTPHTSGTTIDAQL	321				

	330	340	350	
gi 1181204	322	RYAEGTKNILESFFTCKFDYRPQDI	ILLNGE	352
3NAQ_A	322	RYAAGTKDMLERYFKGE-DFTENYIV	KDGE	351

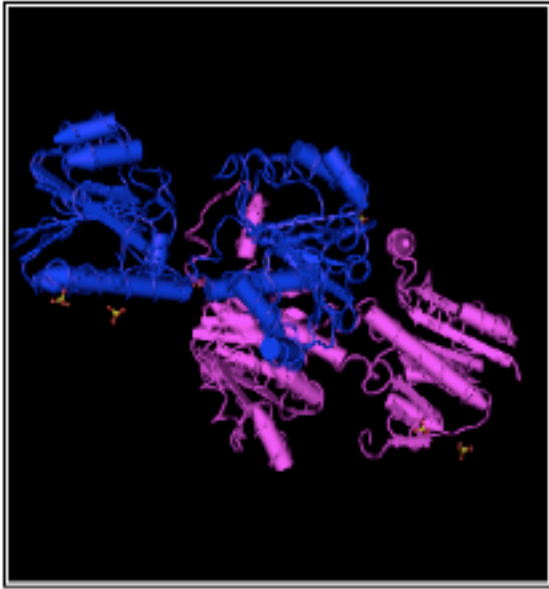
View Structure and Alignment in Cn3D

Cn3D not installed?
Download it [here](#)

View align data

Save align data

Page 1



Cn3D ("see in 3D")

NCBI'dan ilgili proteinin 3-boyutlu yapısını web browserınızda görmeyi sağlayan yardımcı bir uygulamadır.

[Cn3D yapı, dizi ve eşleşmeyi gösterir.](#)
[Eşleşmeyi edit etme özellikleri de vardır.](#)

**View Structure and
Alignment in Cn3D**

Cn3D not installed?
Download it [here](#)

View align data

Save align data

NCBI'in sayfasından tutorail a ve örneklere ulaşabilirsiniz.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Deneyisel analiz sonuçlarının incelenmesi/ Literatür taraması

[←](#) [→](#) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/?term=format+dehydrog> [Home - PubMed - NCBI](#) [format dehydrogenase - B...](#)

[Yandex](#) [Önerilen Siteler](#) [Daha fazla Eklenti alın](#)

[NCBI](#) [Resources](#) [How To](#) [Sign in to NCBI](#)

Bookshelf [Browse Titles](#) [Save search](#) [Limits](#) [Advanced](#) [Help](#)

[Display Settings:](#) ☒ Summary, 20 per page, Sorted by Relevance [Send to:](#) ☐

Results: 10

- 
[Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.](#)
 Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors.
 Washington (DC): ASM Press; 2001.
[Top results in this book](#) [Table of Contents](#)
- 
[The Social Biology of Microbial Communities: Workshop Summary.](#)
 Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats.
 Washington (DC): National Academies Press (US); 2012.
[Top results in this book](#) [Table of Contents](#)
- 
[Madame Curie Bioscience Database \[Internet\].](#)
 Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-.
[Top results in this book](#) [Table of Contents](#)
- 
[Genomes. 2nd edition.](#)
 Brown TA.
 Oxford: Wiley-Liss; 2002.
[Top results in this book](#) [Table of Contents](#)
- 
[WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants.](#)
 Geneva: World Health Organization; 2010.

Images search in Bookshelf



Search details

"format dehydrogenases"[All Fields]
 OR ("format"[All Fields]
 AND "dehydrogenases"[All Fields]) OR "format"

[Search](#) [See more...](#)

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

[format dehydrogenase \(25\)](#)

[PubMed Help - PubMed Help](#)

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Browser address bar: <http://thomsonreuters.com/web-of-science/>

Browser tabs: Home - PubMed ..., formate dehydro..., Web of Scienc...

Navigation bar: THOMSON REUTERS, Products & Services, Our Thinking, Support & Training, Contact Us

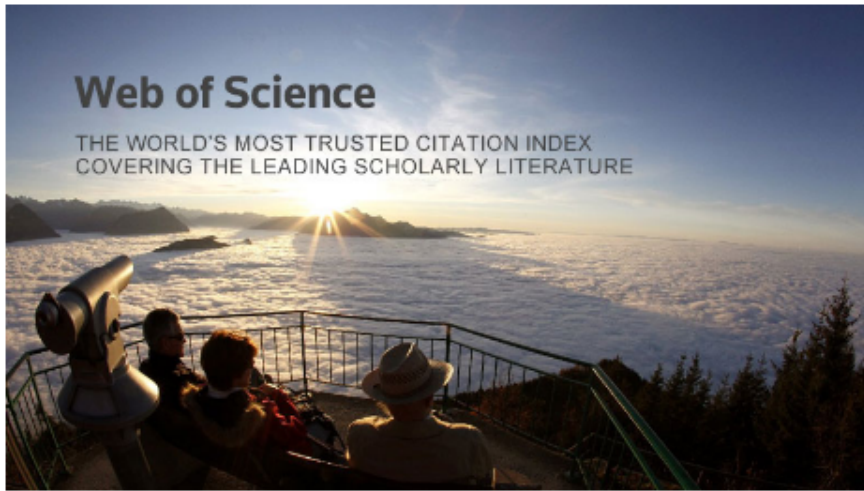
Breadcrumb: Home / Products & Services / Scholarly & Scientific Research / Scholarly Search and Discovery / Web of Science

Web of Science

The world's most trusted citation index covering the leading scholarly literature

Literatür taraması

- web of science
- Kütüphaneler
- Google vb



Web of Science

THE WORLD'S MOST TRUSTED CITATION INDEX
COVERING THE LEADING SCHOLARLY LITERATURE

Leading scholarly literature from the world's most trusted index

[+] Feedback

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

2. Multiple sequence alignment.

Protein ikincil yapılarının incelenmesi (ncbi, expasy for databases and tools)

-- Multiple sequence alignment.

The screenshot shows the ClustalW2 web interface. At the top, there is a browser window with the URL http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform. Below the browser window, a cookie notice is displayed, stating that the website uses cookies and providing a link to the Cookie and Privacy statements. The main navigation bar includes links for EMBL-EBI, Services, Research, Training, and About us. The ClustalW2 logo is prominently displayed. Below the logo, there is a navigation bar with links for Input form, Web services, and Help & Documentation. The main content area shows the title "Multiple Sequence Alignment" and a description of ClustalW2 as a general purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins. A note indicates that ClustalW2 is no longer being maintained and suggests using Clustal Omega instead. A red box highlights the input field, and a red arrow points to it, indicating that a minimum of 2 sequences is required.

Cookies on EMBL-EBI website

This website uses cookies to store a small amount of information on your computer, as part of the functioning of the site. Cookies used for the operation of the site have already been set. To find out more about the cookies we use and how to delete them, see our [Cookie](#) and [Privacy](#) statements.

[Dismiss this notice](#)

EMBL-EBI

Services Research Training About us

ClustalW2

Input form Web services Help & Documentation

[Tools](#) > [Multiple Sequence Alignment](#) > ClustalW2

Multiple Sequence Alignment

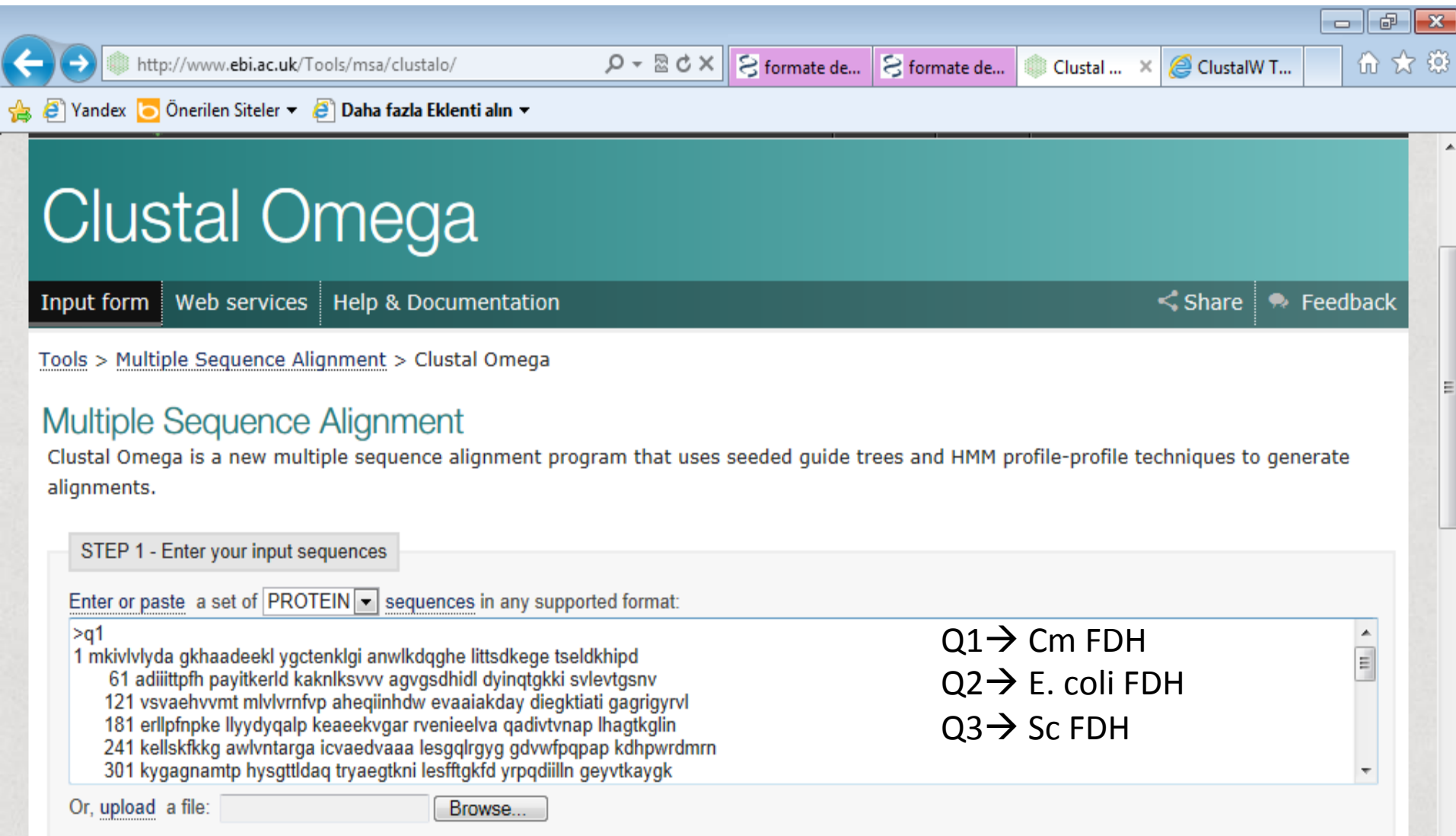
ClustalW2 is a general purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins.

Note: **ClustalW2 is no longer being maintained.** Please consider using the new version instead: [Clustal Omega](#)

• A minimum of 2 sequences is required

STEP 1 - Enter your input sequences

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

```
cm1  -----mkiv
ec   -----mkkvvtvcpycasgckin
se   mdvsrrqffkicaggmagttvaalgftpkmalagarnyklrrakeirnsctycsvgcgl

cm1  lvlydagkhaadeeklygc-----
ec   vvvd-ngkivra-----eaaaggktnggtlclkgyygwdfindtqiltprlktpmirr
se   mysl-gdgaknakeaiyhiegdpdpvsergalcpkgaglldyvhse----drlrypeyra

cm1  -----t--enklgianwldqghelittsdkege
ec   qrggklepvsdealnvaerlsaikeygpd-----aiqttg-----srgtgne
se   pgsdkwgriswddaftriaklmkadrdanfiekneggvtnrwlstg---mlcasaasne
                                         *

cm1  tseldkhipdadiiittpfhpayitkerldkaknlksvvvagvgshidldyingtgkki
ec   tnyv-----mgkfaravigtnnvdc-----carvuhgpsv
se   tgml-----tgkfars-lgmlavdn-----garvuhgptv
      *           *           *           *

cm1  svle-vtgsnvvs-vaehvvmtmlvlvrnfvpahqeiinhdwevaaiak-----
ec   aglhqsvngamsnaineidntdlvfvgynpadshpivanhvinakr-ngakiivcdpr
se   aslaptfgrgamtnhwdiknanvvmvmggnaaeahpvgrwameaknnndatlivvdpr
```

-- İkincil yapıların araştırılması (ncbi, expasy for databases and tools

IBIVU - www.ibi.vu.nl

Centre for Integrative Bioinformatics VU
vrije Universiteit amsterdam

YASPIN

IBIVU - www.ibi.vu.nl

Yandex Önerilen Siteler Daha fazla Eklenti alın

Related Str... NAD-depe... Protein Mo... YASPIN ...

Main page Research Teaching Programs Members Publications Vacancies Related sites

YASPIN Secondary Structure Prediction results for job Untitled

[Back to YASPIN main page](#)

[Download the YASPIN prediction results file here](#)
[Download the PSI-BLAST generated PSSM](#)

The YASPIN secondary structure predictions for your query sequence is directly under its corresponding amino acid.

The numbers under each position are the confidence values for each prediction as calculated by the HMM. The higher the number from 0-9 the more confident the prediction. The values are separated into overall confidence (Conf), helix prediction confidence (Hconf), strand prediction confidence (Econf) and coil prediction confidence (Cconf).

You are using the dssp-trained NN.

Query Name: input
Sequence Length: 1015

Amsterdam üniversitesinin bir veri bankasıdır.
İlgili dizileri girerek ikincil yapıları karşılaştırabilirsiniz

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

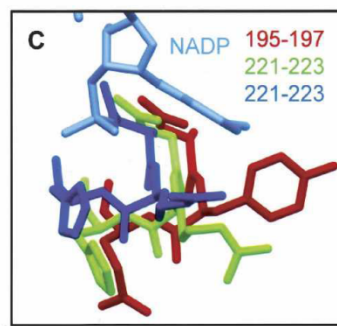
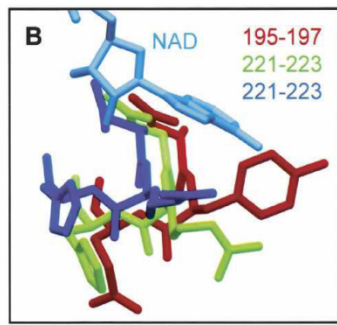
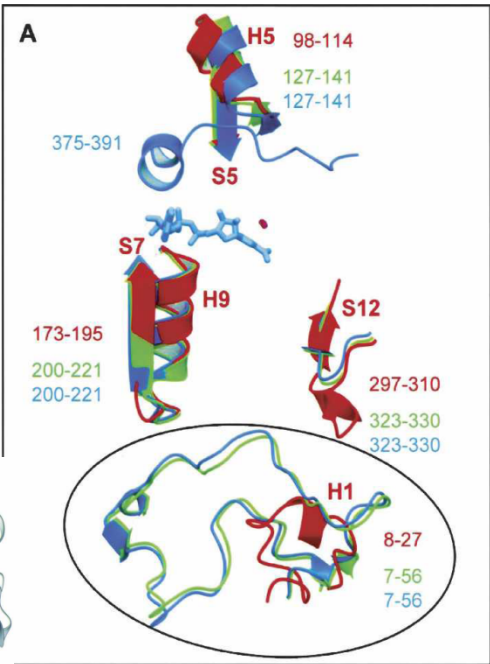
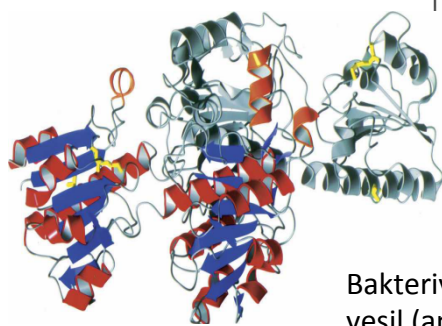
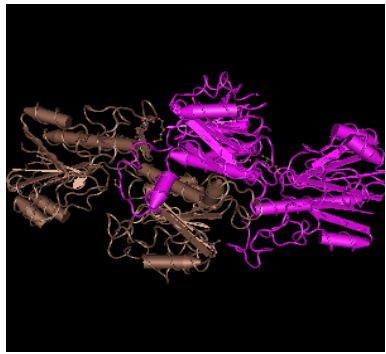
3. Homolog proteinlerin yapısal eşleşmesini yaparak protein yapılarını karşılaştırılması

(dikkate değer değişiklikleri belirle, hangi homolog daha stabil (eğer stabilite ile ilgileniyosan), neden?)

- daha stabil olanda fazladan hangi etkileşimler mevcut, salt bridges, elektrostatik etkileşimler, disülfid köprüsü vs.

- herhangi bir sterik çatışma ya da cavitide farklı bir paketlenme var mı ?
- Loop uzunluklarını ya da diğer farklılıkları incele

Pymol, Swiaa PDB Viewer yardımcı programlar)



Bakteriyal ve yeast FDH in karşılaştırılması: A) CbFDH kırmızı, PsFDH yeşil (apo), katalitik kanala yakın Cterminal alfa heliksli Holo-PsFDH mavi, NAD camgöbeği, B) adenin bölgesinin NAD ile bağlanması ile ilgili amino asitler, CbFDH kırmızı, apo-FDH yeşil, holoPsFDH mavi,

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

proteinlerin kristal yapılarını bulabilirsiniz

Structure [Save search](#) [Limits](#) [Advanced](#) [Sign in to NCBI](#)

[Display Settings:](#) ☐ Summary, 20 per page, Sorted by Default order [Send to:](#) ☐ **Filter your results:**

[All \(664\)](#)
[NMR \(2\)](#)
[X-ray \(660\)](#)

[Manage Filters](#)

Refine your results • What's this?

Protein Domain Families
 Families (650)
☐ LDH-like_MDH: L-lactate dehydrogenase-like... (61)
 Superfamilies (655)
☐ LDH_MDH_like: NAD-dependent, lactate... (171)

Complexes
 Protein-Protein (550)
 Protein-DNA (1)
 Protein-RNA (1)
 Protein-Chemical (577)

Literature
 PubMed (481)
 PMC (109)

Taxonomy (663)
☐ Homo sapiens, (human), species, primates (64)

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

RASYONEL DIZAYN / HESAPLAMALI DIZAYN YAKLAŞIMI

- çalışılacak proteinin **amino asit dizi** bilgisi,
- **üç boyutlu yapısı**
- **fonksiyon** bilgisi gerektirmektedir.

Kristal yapısı bilinmeyip modellenmiş proteinler olabilir

Proteinmodelportal.org

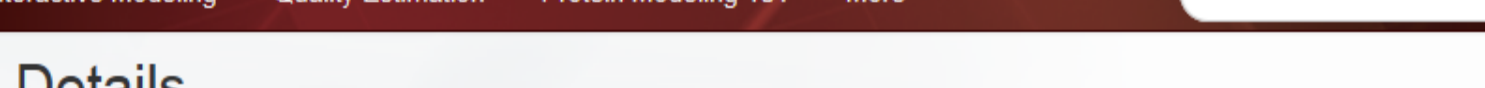
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

[Home](#)
[Interactive Modeling](#)
[Quality Estimation](#)
[Protein Modeling 101](#)
[More](#)

Model Details

Summary:

1 364



Domain annotation: [\[InterPro \]](#)

[Colors:](#)
[Query](#) |
 [Sequence](#) |
 [Structures](#) |
 [Models](#) |
 [Domains](#)

[O13437](#) [FDH_CANBO](#) ; Formate dehydrogenase; EC=1.2.1.2; NAD-dependent formate dehydrogenase; Candida boidinii (Yeast).

Model Information:



Residue range: 2 to 353

Based on template: [2j6iA](#)

Sequence identity: 97%

Resolution: 1.55 (X-RAY)

Model creation date: 2008-07-17

Template verification: 2008-07-17

Model provided by:



[SWISSMODEL](#)

[\[download \]](#)

[BACK TO TOP](#) ↑

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Eğer karşılaştırılacak bir kristal yapı mevcut değilse ilgilenilen proteinin modellemesi yapılır

Hesaplamalı Protein Dizaynı /Moleküler Modelleme

Birçok genom projesi ve farklı protein çalışmaları SwissProt/TrEMBL gibi veri bankalarına sürekli olarak amino asit dizi bilgisi sağlamaktadır.

Ancak ne yazıkki bu hergeçen gün büyüyen amino asit dizi bilgisi bankası bu yeni proteinlerin fonksiyonlarının ve yapıları bilinmeden pek bir işe yaramamaktadır.

Yaklaşık % 1lik kısmının yapısı bilinmektedir.

- Bilgisayar modellemelerine dayalı dizi bilgisi karşılaştırma,
- katlanma tanıma ve
- protein modelleme algoritmalarının gelişmesi

protein yapı belirleme çalışmalarını kolaylaştırmakta, geliştirmektedir ve aradaki boşluk kapatılmaya çalışılmaktadır.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Moleküler Modellemede;

Bilgisayar modelleri ya da simülasyonları atomik düzeyde moleküler etkileşimleri anlamamıza ve araştırmamıza imkan sunmaktadır.

Hesaplamalı protein dizaynı (moleküler modelleme) hedef ***protein yapısında düşük enerji etkileşimleri*** oluşturacak amino asit dizilerini tanımlamaya çalışır.

Yöntemin en önemli kısıtlılığı yapısal ve fonksiyonel spesifite ile ilgili algoritmaların geliştirilebilmesindeki zorluktur.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Moleküler Modellemede;

**Bir model yapıldığında,
minimum potansiyel enerjili duruma erişilebilmesi için
iyileştirilmesi gerekir.**

**Minimum potansiyel enerji: kararlı ve sterik olarak kabul
edilebilir bir yapı anlamına gelir**

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Minimum Potansiyel Enerji Optimizasyon teknikleri başlıca iki gruba ayrılır:

Olasılıksal: yarı-rastgele örneklemelerle düşük enerjiye gitmeye çalışır (Monte Carlo)

Detaylı araştırma gerektirmemesi yöntemin avantajıdır

Ancak tekrarlandığında aynı sonucu vermez

Determinist (belirleyici): detaylı istatistiksel araştırma yaparak düşük enerjiye gitmeye çalışır (Dead End Elimination)

Tekrarlandığında aynı sonuçları verir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Moleküler Mekanik (MM)

Modellenmiş yapının enerjisini hesaplamak ve minimum potansiyel enerji fonksiyonunu bulmak için kullanılan klasik yöntem **Moleküler Mekanik (MM)** dir.

Aşağıdaki fonksiyon ile ifade edilir:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{bond length}} + E_{\text{bond angles}} + E_{\text{torsion angles}} + E_{\text{hydrogen bonding}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{electrostatic}}$$

Bu fonksiyonda sistemin potansiyel enerjisi **2 tip parametre** içerir:

Bağ uzunluğu, açısı ve torsiyonu açısından **bağlı kuvvetler** (internal enerji terimleri)

Etkileşim içindeki atomlar arasındaki van der Waals kuvvetleri, H hidrojen bağları, kolombik kuvvetlerin oluşturduğu **bağlı olmayan kuvvetler**.

Moleküler mekanik yöntemi ile modellenen bir molekülün optimum geometrisi hareketsiz durumdur.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

$$E_{\text{total}} = E_{\text{bond length}} + E_{\text{bond angles}} + E_{\text{torsion angles}} + E_{\text{hydrogen bonding}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{electrostatic}}$$

Bu parametrelerin kombinasyonu **forcefield** olarak tanımlanmaktadır.

İyi bir “forcefield” deneysel olarak belirlenen yapıyla eşleşebilen bir model vermelidir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Enerji Minimizasyonu

Enerji minimizasyonu moleküler mekanik enerji hesaplamalarının temelidir.

Sistemin potansiyel enerjisi bağlı ve bağlı olmayan kuvvetleri kapsar.

Potansiyel Enerji Fonksiyonunun Minimizasyonu bu fonksiyonun minimum değerinin araştırılmasıdır.

Atomik koordinatlar minimum enerjiye ulaşana kadar adım adım hareket ettirilir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Enerji minimizasyonu için derivative ve non-derivatif yöntemler olarak 2 yaklaşım mevcuttur

Derivatif Yaklaşım

Sistemin enerjisini düşürmek için her bir atom, o atomun üzerine etki eden kuvvetlere cevap olarak hareket ettirilir.

Non-derivatif Yaklaşım:

Bu metod fonksiyon değerini takip eder ve potansiyel enerji yüzeyi etrafında dönerek enerjiyi minimize eder.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

En uygun enerji minmizasyon metodu kullanılan bilgisayarın hızı ve gerekli hafızaya göre seçilir.

Minimizasyon metodlarının çoğu tekrarlamalıdır.

Bazı başlangıç değerlerinin girilmesi gerekir

Tüm modelleme problemlerine cevap olabilecek tek bir optimum minimizasyon yöntemi yoktur

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon

MD protein mühendisliği çalışmalarında amino asit değişimi ya da mutasyonun başarı olasılığının belirlenebilmesi için kullanılır.

Tek bir amino asit değişikliğinin proteinin yapısal ve konformasyonel stabilizasyonundaki değişim arasında bağlantı kurabilir

Teori ve deneysel arasındaki arayüzdür.

MD aynı zamanda;

- protein yapı belirlenmesi ve
- X-ray crystallography ve NMR gibi yöntemlerle deneysel olarak elde edilen yapıların iyileştirilmesi için kullanılır.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Moleküler Dinamik bilgisayar simülasyon metodu basit bir metod üzerine kuruludur.

Moleküler sistemdeki tüm atomların koordinatları verilir

Atomik koordinatların fonksiyonu olarak toplam potansiyel enerjinin kesin bir tanımlanması yapılır

Herbir atom üzerindeki kuvvetler hesaplanır

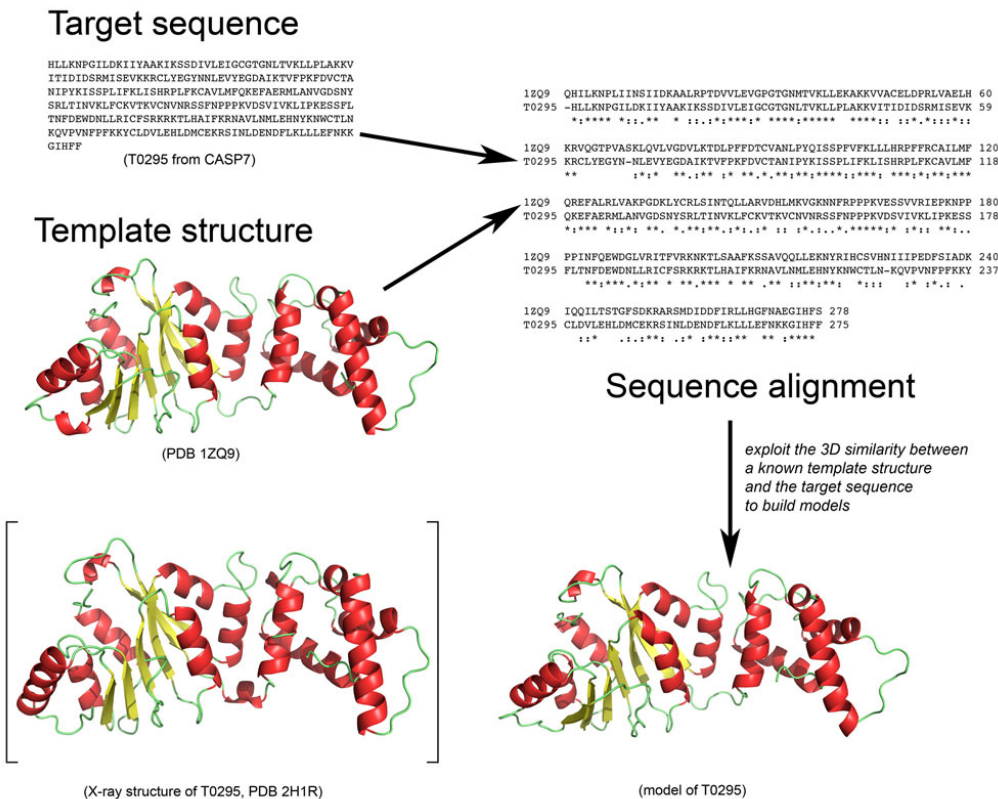
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Homoloji Modelleme / Karşılaştırmalı Modelleme

Homoloji modellemesi
(karşılaştırmalı modelleme)

bilgisayara dayalı yapı belirleme çalışmaları arasında bugün en basit ve umut vaadedici tekniktir.

Burada unutulmamalıdır ki template-free modelleme çalışmaları da aslında lokal dizi eşleşmelerine dayalı yani yine benzerliklere göre yapılmaktadır.

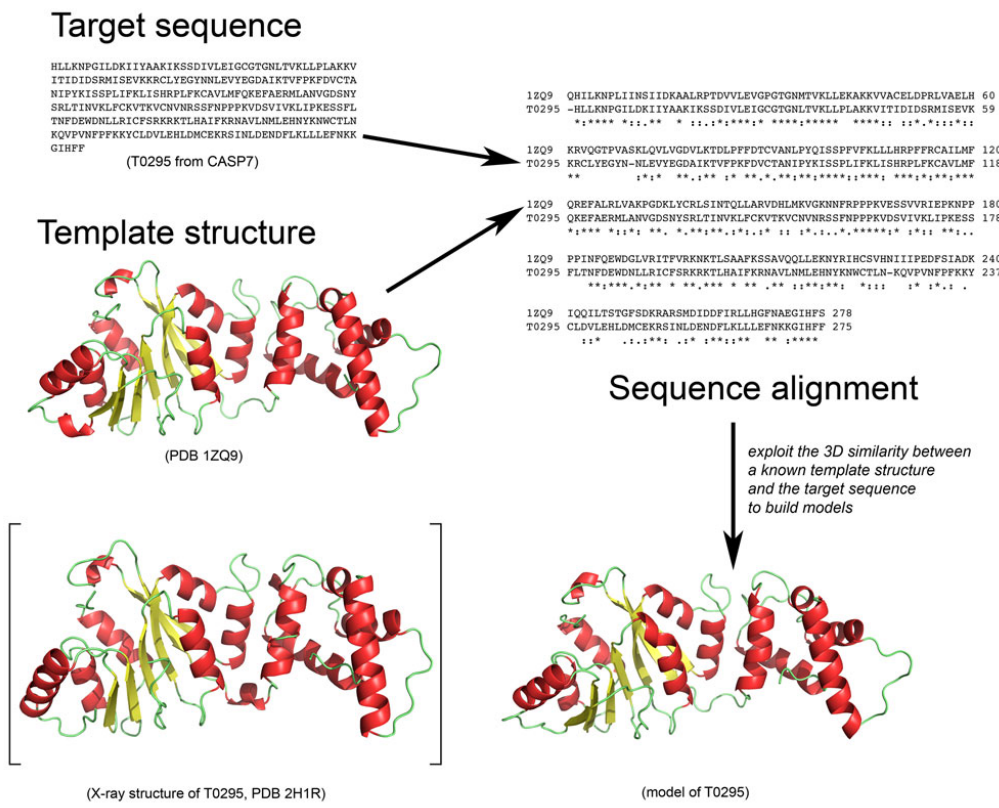


Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Homoloji modelleme yöntemi x-ray crystallography ya da NMR çalışmalarıyla deneysel olarak yapısı belirlenmiş bir proteinin kalıp olarak kullanıldığı, benzerliklerden yola çıkılarak hedef prtoeinin 3 boyutlu yapısının belirlendiği bir yaklaşımdır.

Kalıp olarak kullanılan proteinin yüksek çözünürlükte 3D protein yapı bilgisi

Yapısı belirlenmek istenen hedef proteinin amino asit dizi bilgisini gerektirmektedir.

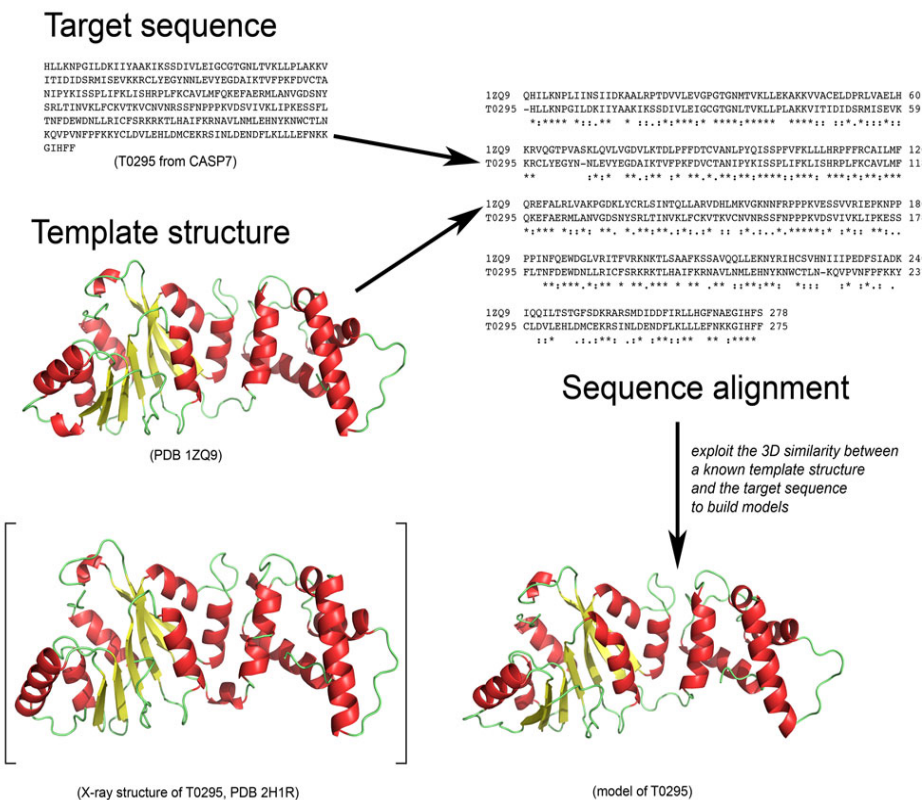


Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Amino asit dizi bilgisi proteinin kendine özgü 3 boyutlu yapısını ve fonksiyonunu belirlemektedir. Evrim boyunca benzer amino asit dizileri benzer yapılar oluşturmaya adapte olmuştur.

Bu temel bilgiden yola çıkan homoloji modelleme tekniği ile homolog proteinler için gerçeğe en yakın yapılar elde edilebilmektedir.

Model protein yapılarının kalitesi ve kullanılabilirliği kalıp ve hedef proteinler arasındaki amino asit dizisi benzerliğinin oranına bağlıdır.



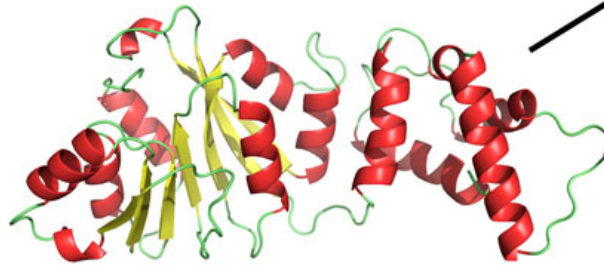
Target sequence

HLLKNPGILDKIIYAAIKSSDIVLEIGCGTGNLTVKLLPLAKKV
ITIDIDSRMISEVKKRCLYEGYNNLEVYEGDAIKTVFPKFDVCTA
NIPYKISSPLIFKLISHRPLFKCAVLPMFQKEFAERMLANVGDSNY
SRLTINVKLFCVKVNCVNRSSFNPPPKVDSVIVKLIPKESSFL
TNFDEWDNLLRICFSRKRKTLHAIFKRNAVLNMLEHNYKNWCTLN
KQVPVNFPFKKYCLDVLEHLDMCEKRSINLDENDFLKLLLEFNKK
GIHFF

(T0295 from CASP7)

1ZQ9	QHILKNPLIINSIIDKAALRPTDVVLEVPGTGNMTVKLLEKAKKVACELDPRLVAELH	60
T0295	-HLLKNPGILDKIIYAAIKSSDIVLEIGCGTGNLTVKLLPLAKKVITIDIDSRMISEVK	59
	*:*** *:!.** * :!:*:***: * *:***: * *:!:*:!:	
1ZQ9	KRVQGTVPVASKLQVLVDLKTDLPPFDTCVANLPYQISSPFVKLLHRPFFRCAILMF	120
T0295	KRCLYEGYN-NLEVYEGDAIKTVFPKFDVCTANIPYKISSPLIFKLISHRPLFKCAVLMF	118
	** *:!* **:!* *: * *:*.**:*:***:!:***: * *:!:*:***	
1ZQ9	QREFALRLVAKPGDKLYCRLSINTQLLARVDHLMKVGKNNFRPPPKVESSVVRIEKNPP	180
T0295	QKEFAERMLANVGDSNYSRLTINVKLFCVKVNCVNRSSFNPPPKVDSVIVKLIPKESS	178
	*:*** *:!:*: **: *.**:*:!.*:! :!: *.!..*.*:***: * *:!: **:!..	
1ZQ9	PPINFQEWDLVRITFVRKNKTLSAAFKSSAVQQLLEKNYRIHCSVHNIIIPEDFSIADK	240
T0295	FLTNFDEWDNLLRICFSRKRKTLHAIFKRNAVLNMLEHNYKNWCTLN-KQVPVNFPFKKY	237
	*:***:*!*** * *:*** * * *.** !:***: * *:!: * *:!.:	
1ZQ9	IQQILTSTGFSDKRARSMDIDDFIRLLHGFNAEGIHFS	278
T0295	CLDVLEHLDMCEKRSINLDENDFLKLLLEFNKKGIHFF	275
	:!* :!:***: :!* :***:*** * *:***	

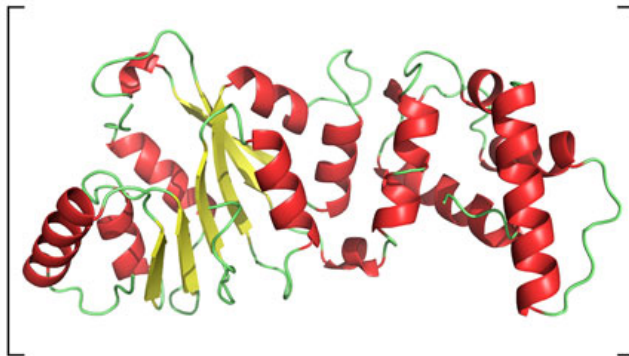
Template structure



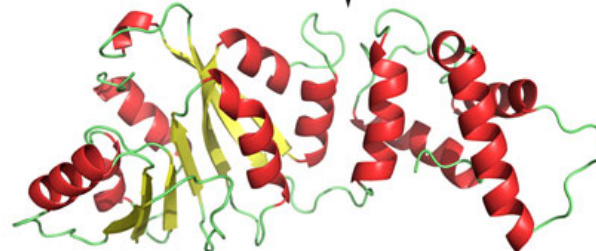
(PDB 1ZQ9)

Sequence alignment

*exploit the 3D similarity between
a known template structure
and the target sequence
to build models*



(X-ray structure of T0295, PDB 2H1R)



(model of T0295)

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Kalıp ve hedef protein % 50'nin üzerinde dizi benzerliği gösteriyorsa modellenen protein yapısı *yapı-tabanlı ilaç dizaynı, protein fonksiyon, etkileşim, antijenik özellikler ve protein mühendisliği* çalışmalarında kullanılabilecek kalitededir.

% 50 dizi benzerliği yaklaşık 1 Å RMS hata payı ile ana zincirin modellenmesine imkan vermektedir.

Bu doğruluk orta çözünürlükte bir NMR yapısı ya da düşük çözünürlükte bir X-ray yapısına çok yakındır.

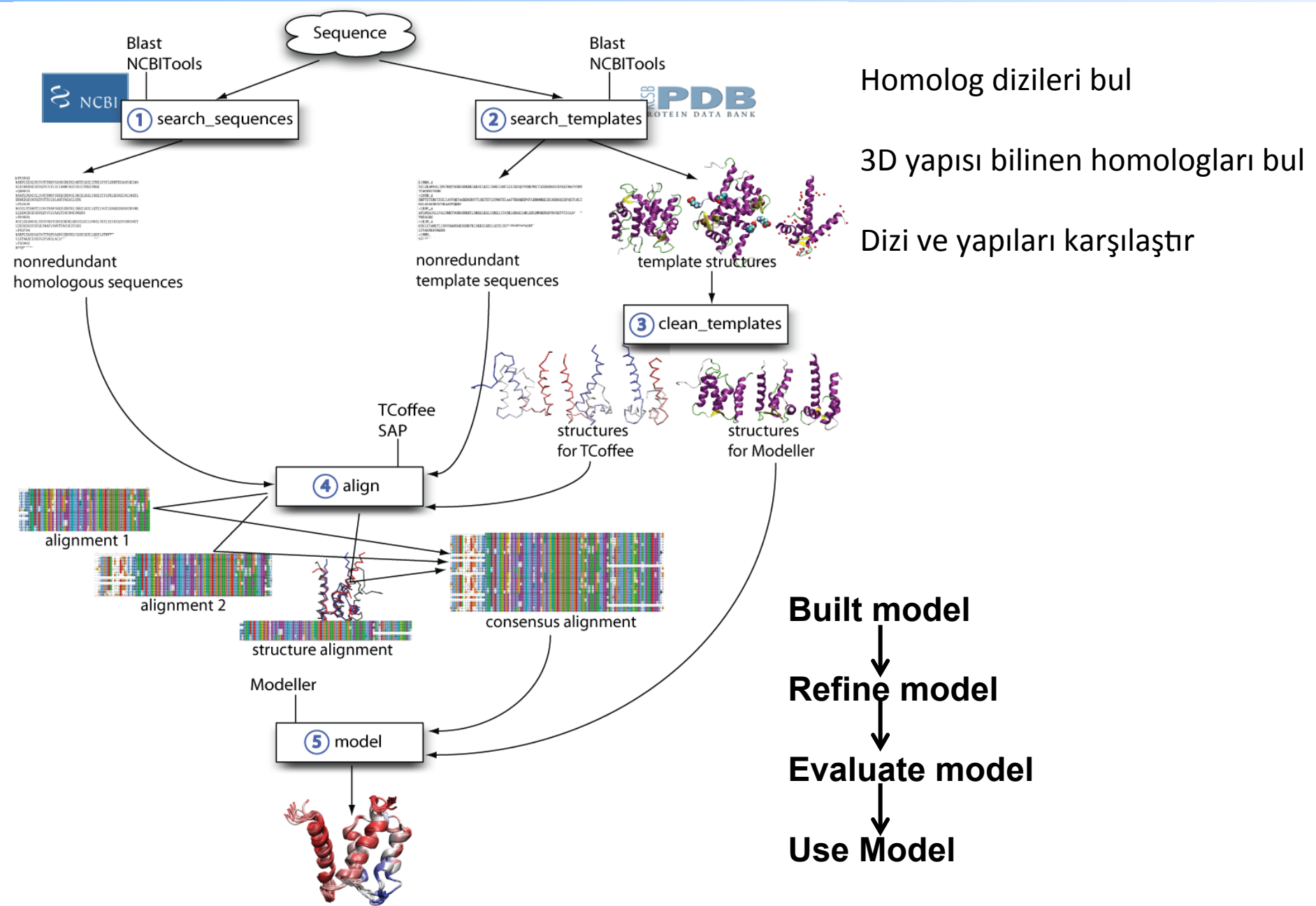
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Amino asit dizi bilgisi kalıp ve hedef protein arasında % 30'dan daha yüksek ise homoloji modellemesi için kullanılan algoritmalar halen güvenli sonuçlar sağlayacaktır.

Proteinlerin ortak bir atadan geldiği ve evrimsel olarak birbiri ile ilişkili olduğunun kanıtlanması için en azından %30luk bir benzerlik gereklidir.

Hernekadar düşük dizi bilgisi benzerliği olan proteinler kullanılarak modelleme yapılabilmesi için *3D-coffee*, *Staccato* ya da *SAlign* gibi programlar geliştirilse de dizi bilgisi benzerliği %30 ve %15 arasında ise yeterli güvenilirlikte modeller elde edilmesi güçtür.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

3. Homolog proteinler arasındaki yapısal farklılıklar hedefimize yönelik olarak dizayn edeceğimiz mutantlar için hangi stratejilerin kullanılması gerektiğini gösterir.

Daha stabil olanda fazladan hangi etkileşimler mevcut?

Elektrostatik etkileşimler, disülfid köprüsü vs.?

Herhangi bir sterik çatışma ya da cavitide farklı bir paketlenme var mı ?

Loop uzunlukları ya da diğer farklılıklar neler?

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Protein karakteristiklerinin değiştirilmesinde kullanılan birçok rasyonel dizayn stratejisi bulunmaktadır:

Yüzey elektrostatik etkileşimlerin optimizasyonu

Hidrojen bağlarının arttırılması

Tuz köprülerinin oluşturulması

Disülfid köprülerinin oluşturulması

Hidrofobik etkileşimlerin arttırılması

Çekirdek yapısının geliştirilmesi

Kavite değiştirilmesi

Yüzey looplarının kısaltılması ve sıkılaştırılması

Oligomerizasyonun arttırılması.....

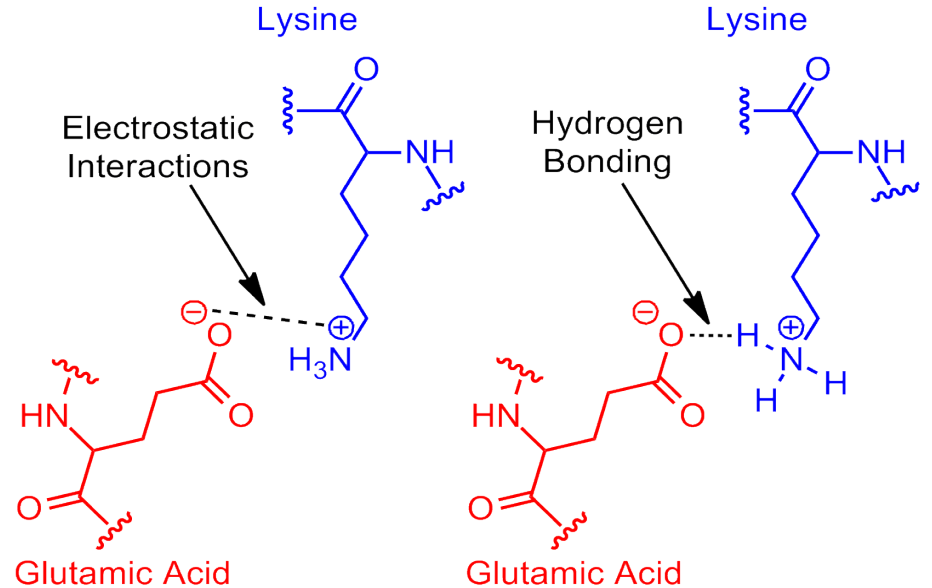
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Yüzey Elektrostatik Etkileşimlerin Optimizasyonu

Elektrostatik etkileşimlerin optimizasyonu amino asit residularının zıt yüklü yan zincirlerinin elektrostatik etkileşimlerindeki (tuz köprüleri/iyonik bağlar , H bağları) değişikliklerdir.

Protein katlanması, fleksibilitesi ve stabilitesinde ve sonuç olarak proteinin biyolojik aktivitesinde kritik bir rol oynamaktadır.

Protein altüniteleri arasındaki etkileşimlerin kurulmasında da elektrostatik etkileşimlerin rolü bilinmektedir.



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Yüzey Elektrostatik Etkileşimlerin Optimizasyonu

İyonik bağlar proteinin iç kısmında nadiren görülür, genellikle yüklü amino asitler protein yüzeyinde yer almaktadır.

Dolayısıyla elektrostatik etkileşimler zıt yüklü residular arasında meydana gelebileceği gibi çözücü ortamı olan su ve yüklü amino asit yan zincirleri arasında da meydana gelebilmektedir.

Polar su molekülleri yüklü yan zincir yüzeylerinde bir kabuk oluşturarak proteinin kararlılığına ve çözünürlüğüne yardım etmektedir.

Birbirlerine ve çevrelerine göre **elektrostatik etkileşimlerin oryantasyonu** ve **lokasyonları** da **elektrostatik etkileşimlerin sayısı** kadar **stabilite**de önemlidir.

Tek bir etkileşim proteini belli bir miktar stabilize ederken, cooperative bir network önemli derecede stabiliteyi etkilemektedir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Mezofilik ve termofilik ya da hipertermofilik proteinler karşılaştırıldığında hipertremofilik ve termofilik proteinlerin mezofilik homologlarına göre yüzeylerinde daha fazla elektrostatik etkileşime sahip olduğu görülmüştür.

Çekirdek (iç kısımdaki) amino asitlere göre yüzey elektrostatik etkileşimlerinin mutasyona uğratılması molekül yapısını bozucu daha az etkiye sahiptir.

Bu nedenle evrim boyunca mutasyonlar daha çok yüzey mutasyonları oluşmuştur.

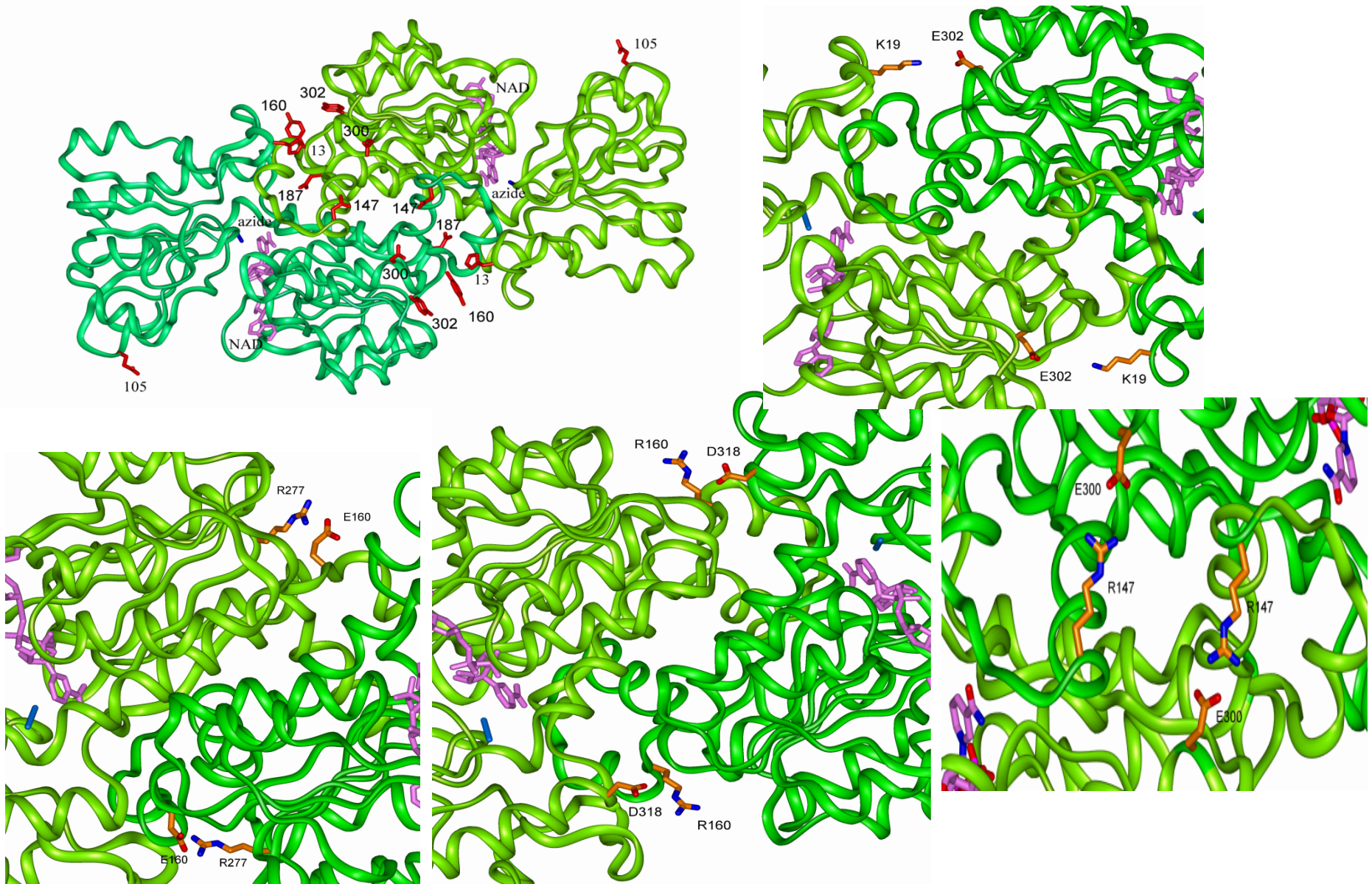
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Tuz köprülerinin protein stabilitesine olan elektrostatik katkısının hesaplandığı araştırmalar tuz köprülerinin karakteri ve pozisyonunun heliks oluşumunu etkilediğini göstermektedir.

Bir çeşit elektrostatik etkileşim olan tuz köprüleri sıklıkla sekonder yapılarda görülmektedir.

Beta-tabaka yapıları üzerinde çalışmalar daha az olsa da sonuçlar tuz köprülerinin bu yapıları stabilize etmekte de etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Elektrostatik etkileşimler pH bağımlıdır.

Artmış asidite ya da bazite durumunda molekülün tüm yükü değişeceğinden katlanmış form destabilize olacağından ekstrem pH koşullarında proteinler genellikle kararsızdır.

Tuz köprülerinin oluşması ya da kırılması yan zincirlerin pKa değerinde değişikliklere dolayısıyla protein stabilitesinde değişikliğe neden olmaktadır.

Elektrostatik etkileşimler arasındaki mesafe de önemlidir.

Bazı durumlarda elektrostatik etkileşimlerdeki değişikliklerin örneğin tuz köprüsü eklenmesi nin proteinleri destabilize ettiği görülmüştür.

Hendsch and Tidor'un yaptığı bir çalışmada 4Å mesafedeki etkileşimlerin stabilize edici etkisi varken, 4Å dan daha fazla mesafede destabilize edici etkisi tespit edilmiştir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Elektrostatik etkileşimler ve termostabilite arasındaki ilişki birçok proteinde deneysel olarak gösterilmiştir,

pig cytosolic malate dehydrogenase (cMDH) (Trejo et al., 2001),
ubiquitin (Loladze and Makhatadze, 2002),
holo azurin enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* (Tigerstem et al., 2004), **Ribonuclease T1** (Grimsley et al., 1999),
bovine calbindin D (Akke and Forsen., 1990),
cytochrome P450 (Maves and Sligar, 2001),
cold shock and CheY protein families (Dominy et al., 2004).

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Buradan yola çıkılarak mezofilik proteinlerin termostabilitesi elektrostatik etkileşimlerin optimizasyonu ile arttırılmaya çalışılmıştır.

Birçok başarılı sonuç araştırmacıları elektrostatik etkileşimlerin stabiliteyle ilişkisi konusunda görüşbirliği göstermesine rağmen bu ilişki halen karmaşık ve tam anlaşılmamış bir konudur .

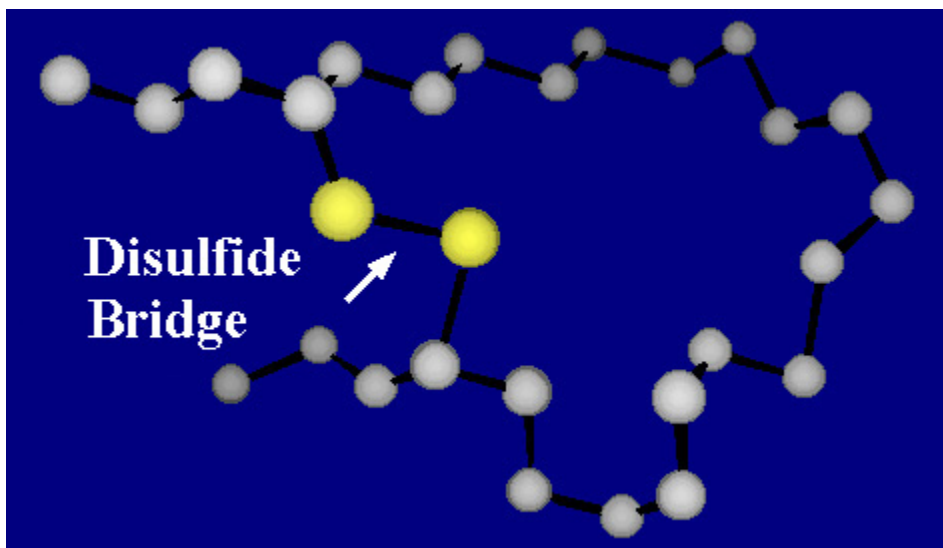
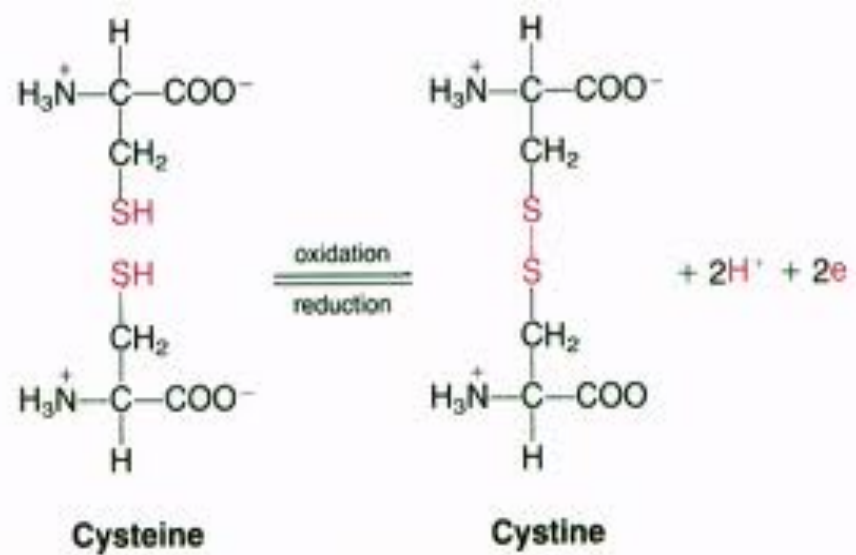
Halen bu konuda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Disülfid Köprüsü Kurulması

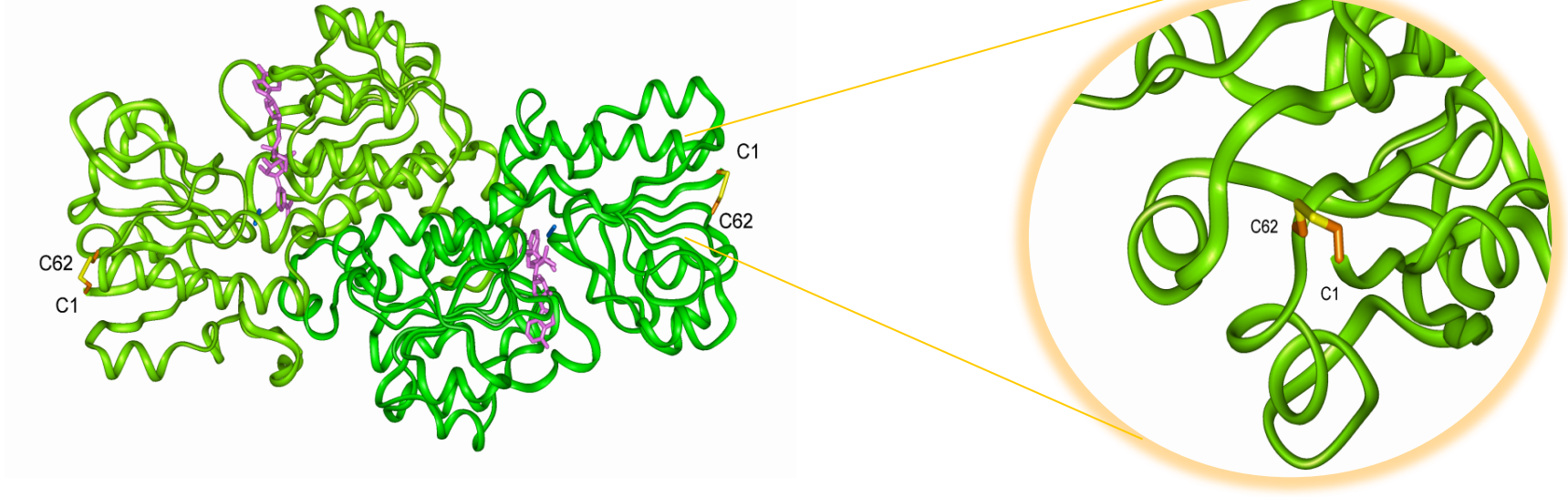
Sistein amino asidinin yan zincirleri arasındaki kovalent bağ (disülfid köprüsü) protein yapısının ve stabilitesinin belirlenmesinde önemlidir.

Sistenin yan zincirinin kovalent bağ kurabildiği tek amino asit olması açısından önemlidir.



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Disülfid Köprüsü Kurulması



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Sıradışı koşullarda yaşayan mikroorganizmalarda büyük oranda disülfid köprülerinin bulunduğu keşfedilmesinden önce **yüksek sıcaklıkta disülfid bağlarının oksidatif dejenerasyona eğilimli** olmasından dolayı stabilite ile bir ilgisi olmadığı düşünülmekteydi.

Literatürdeki çalışmalar thiol gruplarının kovalent bağlanması (disülfid körüsü) kümülatif nonkovalanet bağlar kadar stabilizasyona etkisi olduğunu göstermektedir.

Intra ya da intermolecular disülfid bağları

- katlanma,
- yapı,
- kararlılık ve
- protein fonksiyonunda önemli olmakla beraber

◆ dimer formasyonundaki etkisi düşüktür.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Disülfid bağları genellikle birbirine yakın olmayan sistein residuları arasında meydana gelir.

Genellikle proteinin gömülü iç kısmında yer alır.

Homolog proteinlerde evrimsel olarak farklı derecelerde korunmustur.

Protein mühendisliği ile protein yapısına disülfid köprüsü eklenmesi unfolded formun konfigürsayonel entropisini düşürerek serbest enerjisini yükseltir ve İki residuyu bağlayarak tüm proteindeki residular arasındaki etkileşimlere etki eder.

Birçok proteinin disülfid köprüsü indirgendiğinde katlanmasının bozulduğu gösterilmiştir.

Pratikte ise disülfid köprüsü eklenmesi bazı proteinlerde stabilize edici etki gösterirken bazılarında ise destabilize edici etkisi görülmüştür.

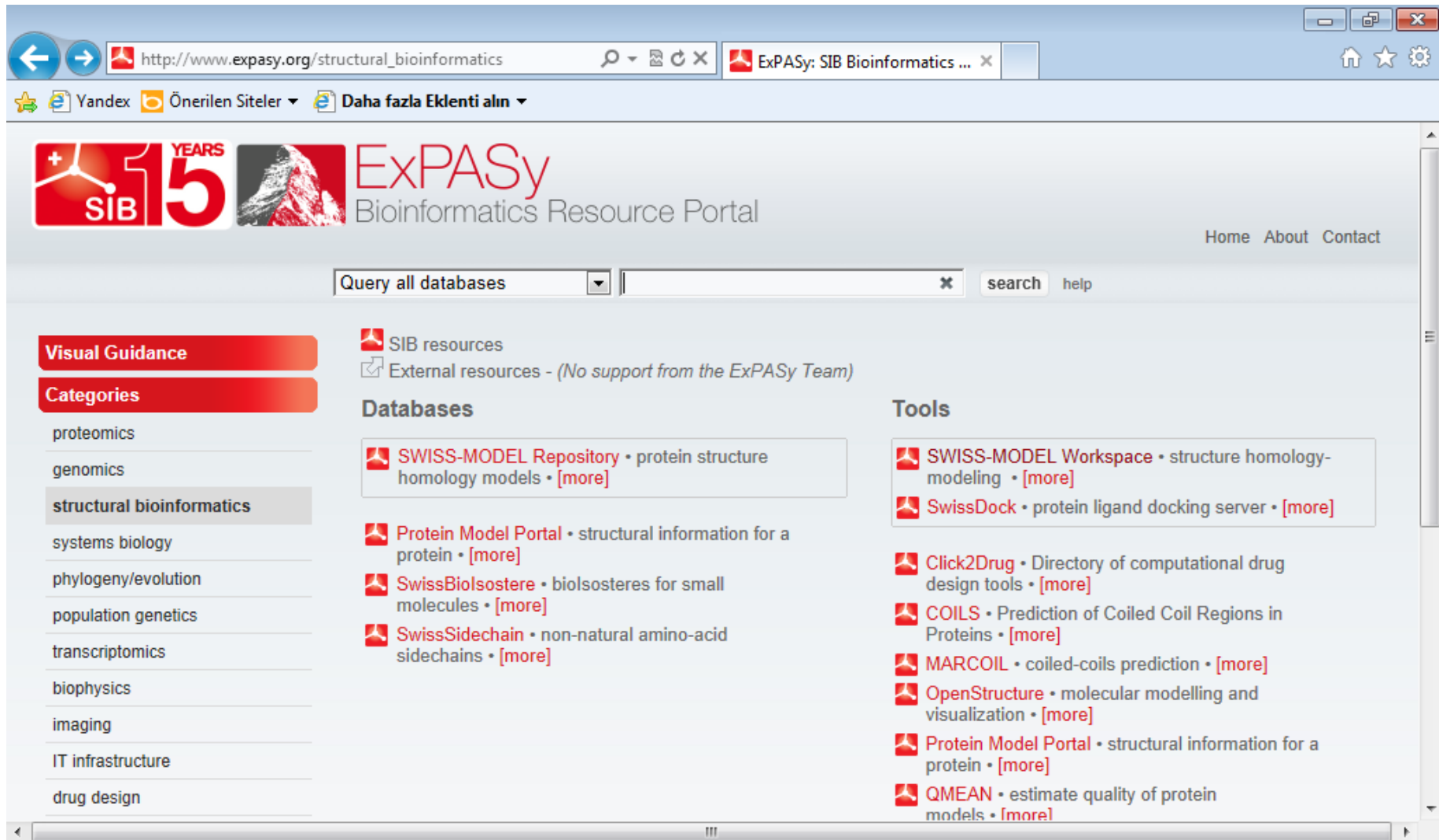
Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

4. Mutasyonları belirlemek için algoritmaları içeren programları n uygulanması
(bu tür toollları on www.expasy.org/tools/ 'dan bulabilirsiniz)

5. Katlanma koşullarında proteinin simüle edilmesi
--en az stabil görünen bölgeleri belirleyerek değıştirilecek bölgeleri belirle,
--mutasyonları dizayn et.

6. Mutantları modelle
--mutasyonun istenilen özelliği geliştirip geliştirmediğini protein
--yapısına nasıl bir etkisi olduğunu kontrol et

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



7. Dizayn edilen mutant proteinlerin laboratuvar ortamında üretilmesi

- site-directed mutagenesis,**
- protein ekspresyonu,**
- protein saflaştırılması**

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Site directed mutagenesis/ Bölgeye Özel Mutasyon:

Enzimlerin özelliklerini geliştirmek, çalışma ve katlanma fonksiyonları gibi özelliklerini aydınlatabilmek için “site-directed mutagenesis” yani bölgeye özel mutasyon rasyonel protein dizaynı için oldukça etkili bir tekniktir.

Bu teknikte bilgisayar modelleri üzerinde dizayn edilen mutasyonlar PCR yoluyla gen dizisi içine yerleştirilir.

PCR primerleri hedeflenen amino asit değişikliğine karşılık gelen nükleik asit değişikliğini içermelidir.

Wild type DNA dizisi bilgisi gerektirir.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Gen içinde mutasyonları yerleştirmek için iki tip PCR uygulanır:

1. “Overlap extension metod”

4 primer kullanarak 2 ayrı PCR yapılır. Primerlerin ikisi mutant kodonu içerir.

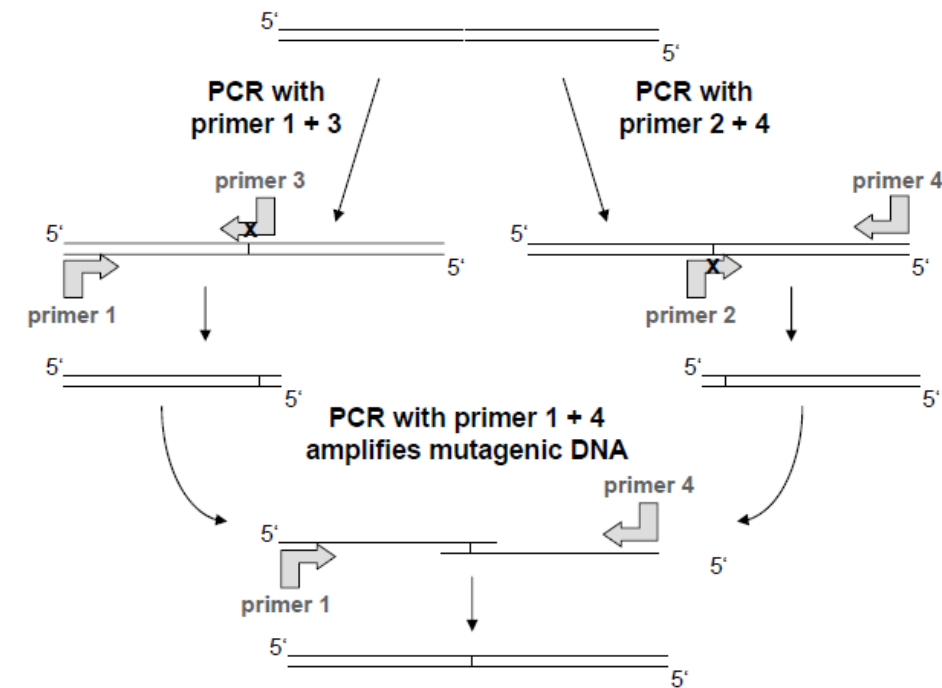


Fig. 2: Principle of site-directed mutagenesis by overlap extension. Mutations introduced by primers 2 and 3 are marked with an 'x'. Further explanations are given in the text.

2 ve 3 mutant kodonları içeren primerlerdir.

ilk PCR sonucunda hedef mutasyonu içeren iki double strand DNA ürünü elde edilir.
ikinci PCR adımı bu dsDNA ürünleri primer 1 ve 4 kullanılarak çoğaltılır ve sonucunda mutasyonu içeren DNA elde edilir.

OE-PCR metodun bir çeşidinde "megaprimer metod" ile **göreceli olarak birbirinden uzak kodonlar üzerinde aynı anda mutasyon yapılmasına izin vermesidir.**

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

“whole plasmid method”

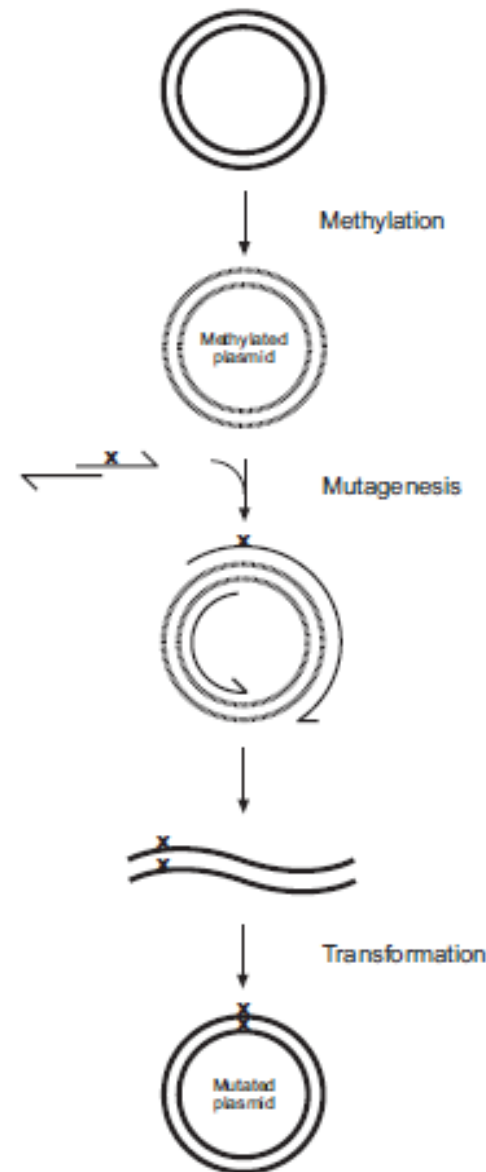
2 primer kullanılarak sadece bir PCR reaksiyonu yapılır. Primerlerin bir tanesi mutant kodonu içerir.

-Metilasyon reaksiyonundan sonra kalıp DNA 2 overlap primer ile çoğaltılır.

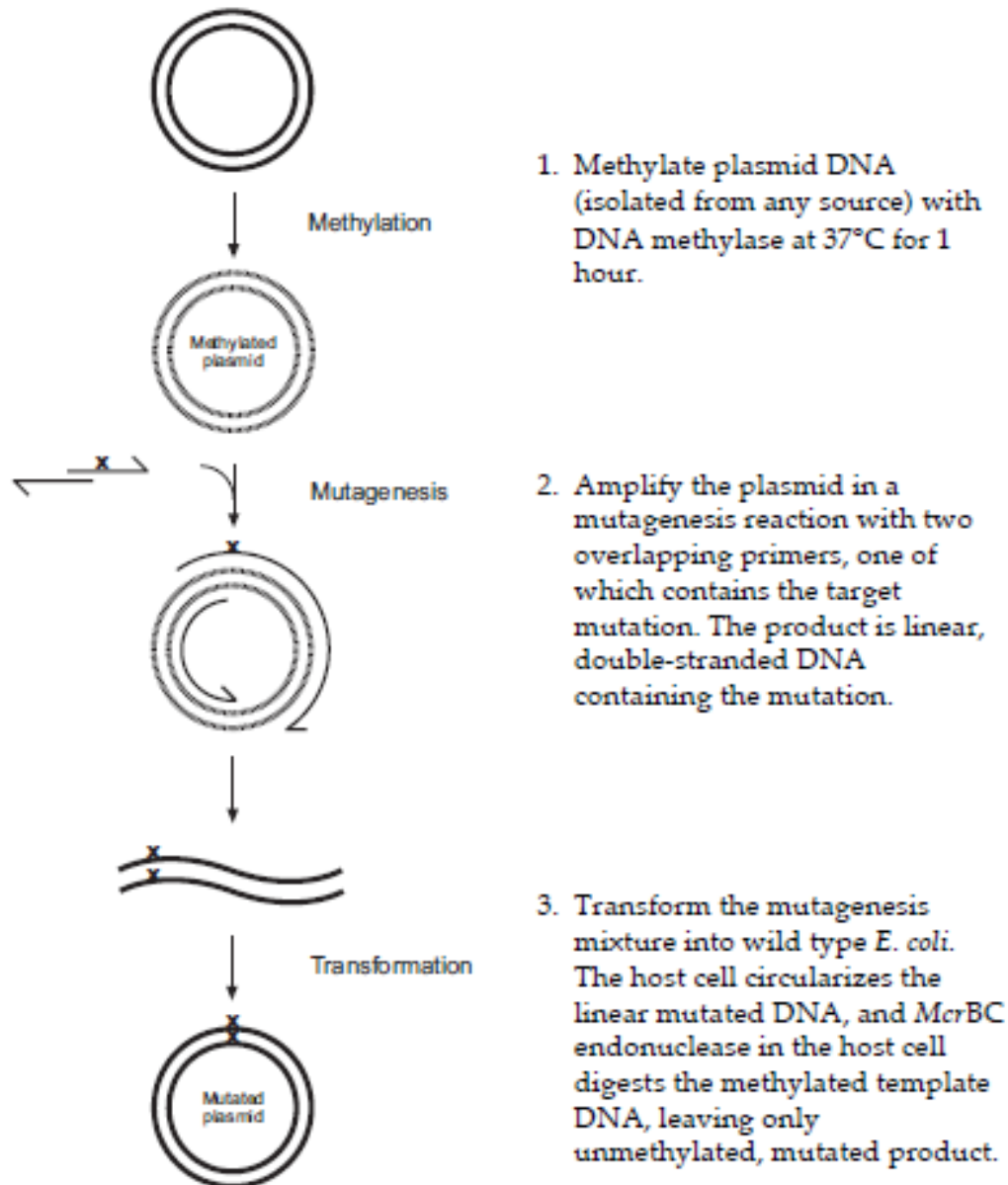
-PCR reaksiyonu mcrBC type E. coli'ye transforme edilir.

Metillenmiş DNA host tarafından parçalanır. Endonükleaz ile kesilme parental metillenmiş wild type (mutasyonsuz) plasmidi elimine eder ve mutant bölgeyi içeren plasmid DNalar E. coli içinde kalır.

-Eğer mcrBC tip hücre kullanılmazsa, orjinal gen ve mutant gen, PCR reaksiyonunun DpnI endonüklezı ile kesim reaksiyonuna maruz bırakılması sonucu seçilebilir.

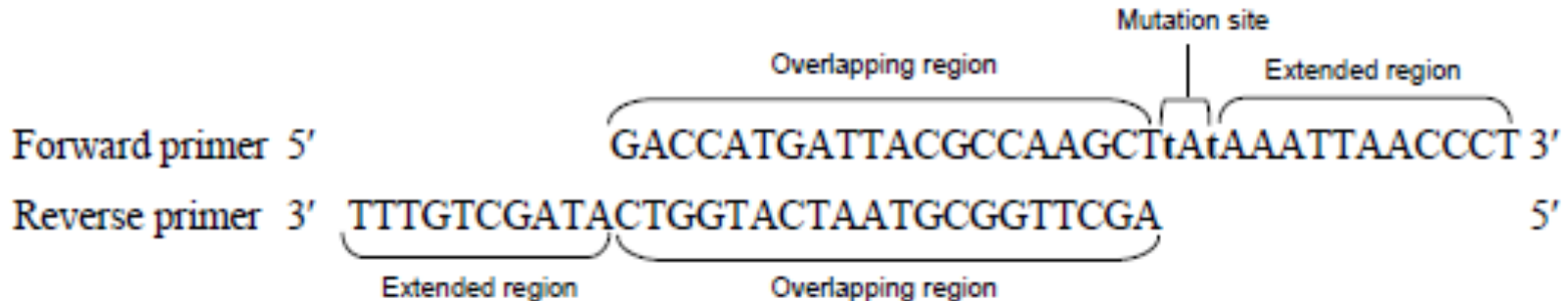


Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn



Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Site Directed Mutagenesis için Primer Dizaynı



Follow the specifications below when designing your primers:

- **Both primers (forward and reverse) should be approximately 30 nucleotides in length**, not including the mutation site on the mutagenic primer
- **Primers should have an overlapping region** at the 5' ends of **15–20** nucleotides, for efficient end-joining of mutagenesis product
- **The mutation site should be located on only one of the primers**, downstream from and adjacent to the overlapping region, and can be up to 21 bases (deletions, insertions, and/or any substitutions)
- **On the mutagenic primer, there should be at least 10 nucleotides** downstream of the mutation site **for efficient annealing**

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Standart PCR primerleri dizayn edilirken dikkat edilmesi gerekenler

- 18-30 nükleotid uzunluğu idealdir
- Primerlerin Melting Temp (T_m) 65-75 C arasında olmalıdır ve
- Aralarındaki fark 5 C olmalıdır. (düşükse primer uzatılabilir GC içeriği yüksek bölgeye kaydırabilir)
- GC içeriği %40-60 olmalı
- 3' ucu C veya G ile bitmelidir (bağlanmayı sağlamak için)
- Sekonder yapıların oluşmasını önlemek için GC /AT oranı dengeli dağılmalıdır.
- 4 ve daha fazla baz tekrarlanmasından kaçınılmalıdır (ACCCC or ATATATAT)
- Primer dimerlerinin oluşumunu önlemek için komplementer olan 3 den fazla baz olmamalıdır.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Site Directed Mutagenesis PCR reaksiyonu örneği

<u>Component</u>	<u>Volume</u>	<u>Final Concentration</u>
10X High Fidelity PCR Buffer	5 µl	1X
10 mM dNTP	1.5 µl	0.3 mM each
50 mM MgSO ₄ *	1 µl	1 mM
Primers (10 µM each)	1.5 µl	0.3 µM each
Methylated DNA (12.5–31.25 ng)**	2–5 µl	As required
Platinum® <i>Taq</i> High Fidelity (5 U/µl)***	0.2–0.5 µl	1–2.5 units
Autoclaved, distilled water	to 50 µl	

<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Cycles</u>	
94°C	2 minutes	1	
94°C	30 seconds		Denaturation
55°C	30 seconds	20	Annealing
68°C	1 min/ 1 kb DNA		Extension
68°C	10 minutes	1	

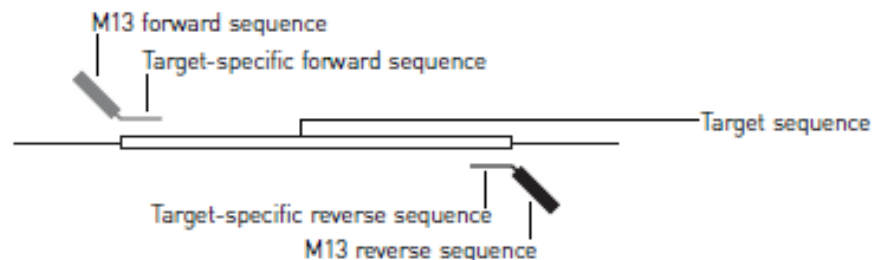
Maintain the reaction at 4°C after cycling.

Protein Mühendisliği / Rasyonel Dizayn

Mutasyonun onaylanması , DNA dizi analizi

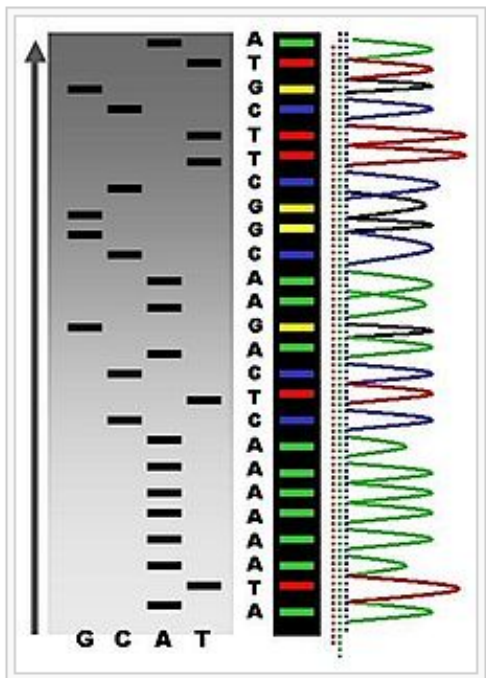
Boya sonlandırmalı dizilemede (*Dye-terminator sequencing*) zincir sonladırıcı ddNTP'ler işaretlenir, böylece işaretlenmiş primer yönteminde olduğu gibi dört reaksiyon yerine, dizileme tek bir reaksiyon içinde yürütülebilir.

Boya sonlandırma dizilemesinde dört dideoksinükleotit bitiricilerin herbiri farklı floresan boya ile işaretlidir, bunların herbiri farklı [dalga boylarında](#) ışık salar



- M13 forward primer sequence: 5' TGTAAAACGACGGCCAGT 3'
- M13 reverse primer sequence: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'

Component	Volume
Genomic DNA (4 ng/μL)	1.0 μL
M13-tailed PCR primer mix (0.8 μM each primer)	1.5 μL
BigDye® Direct PCR Master Mix	5.0 μL
Deionized water	2.5 μL
Total volume for each reaction	10.0 μL



Protein Mühendisliği

7. Dizayn edilen mutant proteinlerin laboratuvar ortamında mutantları üretilmesi

---site-directed mutagenesis,
---protein ekspresyonu,
---protein saflaştırılması

8. Üretilen ve saflaştırılan enzimlerin karakterizasyon çalışmalarını yapılması



Diğer protein mühendisliği yöntemleri ile ortak olduğundan daha sonra bahsedeceğiz