

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ANOXYBACILLUS GONENSIS* PDF21 SUŞUNUN HÜCRE DUVARI LİTİK
ENZİMİNİN OPTİMUM SICAKLIK, pH VE ISIL KARARLILIĞININ
İYİLEŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esmâ CEYLAN

HAZİRAN 2018
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus gonensis* PDF21 Suşunun Hücre Duvarı Litik Enziminin Optimum Sıcaklık, pH ve Isıl Kararlılığının İyileştirilmesi” adlı bu çalışma, 12262 No’lu KTU BAP 02 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi ile desteklenerek Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, konunun seçilmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocamlarım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve tezimin her bir basamağında bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren Dr. Öğretim Üyesi Halil İbrahim Güler’e ve Arş. Gör. Dr. Ayşenur Eminoğlu’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan Doç. Dr. Kadriye İNAN’a, Dr. Öğretim Üyesi Uğur UZUNER’e, Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Dr. Fulya AY ŞAL’a, Arş. Gör. Ayşegül ÖZER’e, Şihab Sakıb BAYRAKTAR’a ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez yazım sürecimde yardımlarını esirgemeyen Cansu ALTUNTAŞ’a, Kemal Vehbi İMAMOĞLU’na, Muammer KURNAZ’a ve Asiye SEZGİN’e teşekkür ederim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç verip yanımda olan ve her konuda bana yardımcı olan Cansu ALBAY’a ve değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Esmâ CEYLAN

Trabzon, 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus gonensis* PDF21 Suşunun Hücre Duvarı Litik Enziminin Optimum Sıcaklık, pH ve Isıl Kararlılığının İyileştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı, baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarında yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/06/2018

Esmâ CEYLAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	2
1.3. Hücre Duvarı Litik Enzimi	3
1.4. Peptidoglikan Tabaka (PG)	3
1.4.1. PG Yapısı ve Düzenlenmesi	3
1.4.2. PG Sakkulusun Biyosentezi	8
1.4.3. PG Sakkulusun Gelişmesi	9
1.5. PG Degredasyonunda Görevli Enzimlerin Sınıflandırılması	11
1.5.1. Glikozid Hidrolazlar (GH) [EC 3.2.1.]	11
1.5.2. Heksoz Aminidazlar	12
1.5.3. Lizozimler	12
1.5.4. Litik Transglikozilazlar (LT)	13
1.6. Hücre Duvarı Litik Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	14
1.6.1. Zimografik Analizler	14
1.6.2. Türbidimetrik Analiz	14
1.6.3. Petri Deneyi (Lyso plate)	15
1.7. Füzyon Protein Oluşturma	15
1.7.1. Füzyon Proteininin Sahip Olması Gereken Özellikler	16
1.7.2. Prolince Zengin Diziler	17
1.8. Çalışmanın Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler	19

2.1.2.	Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Vektörler.....	20
2.1.3.	Biyoinformatik Analizler.....	20
2.2.	Metot.....	21
2.2.1.	Ribulokinaz / Hücre Duvarı Litik Enzimi (Rib-AgCWL) Füzyon Proteininin Oluşturulması.....	21
2.2.1.1.	Hücre Duvarı Litik Enzim Geninin PCR ile pET-Lyz'den Çoğaltılması.....	21
2.2.1.2.	<i>Ribülokinaz</i> Geninin PCR Yöntemi ile pAC26RK'dan Çoğaltılması.....	21
2.2.1.3.	<i>AgCWL</i> ve <i>Rib</i> Fragmentlerinin Birleştirilmesi.....	22
2.2.1.4.	Rib-AgCWL Füzyon Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	23
2.2.1.5.	<i>Rib-AgCWL</i> 'nin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	24
2.2.2.	<i>AgCWL-Pro</i> Füzyon Proteininin Oluşturulması.....	25
2.2.2.1.	Prolince Zengin Dizinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	25
2.2.2.2.	<i>AgCWL</i> 'nin PCR ile pETLyz'den Çoğaltılması.....	26
2.2.2.3.	<i>AgCWL</i> ve Prolince Zengin Dizinin Birleştirilmesi.....	26
2.2.2.4.	<i>AgCWL-Pro</i> Füzyon Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	27
2.2.2.5.	<i>AgCWL-Pro</i> Füzyon Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	27
2.2.3.	Protein Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	28
2.2.3.1.	<i>AgCWL</i> , <i>Rib-AgCWL</i> ve <i>AgCWL-Pro</i> Gen Ürünlerinin Ekspresyonu.....	28
2.2.3.2.	Hücre Ekstraktının Elde Edilmesi.....	28
2.2.3.3.	<i>AgCWL</i> , <i>Rib-AgCWL</i> ve <i>AgCWL-Pro</i> Proteinlerinin Saflaştırılması.....	29
2.2.3.3.1.	Isı Şoku Uygulaması.....	29
2.2.3.3.2.	Kobalt-Afinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma.....	29
2.2.3.3.3.	Küçük Moleküllerin Diyalizle Uzaklaştırılması ve Proteinlerin Konsantre Edilmesi.....	30
2.2.3.3.4.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	30
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
2.2.4.1.	Zimogram.....	31
2.2.4.2.	Türbidimetrik Analiz.....	31
2.2.4.3.	Petri Deneyi.....	32
2.2.5.	<i>AgCWL</i> , <i>Rib-AgCWL</i> ve <i>AgCWL-Pro</i> Proteinlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	32
2.2.5.1.	Optimum Sıcaklık.....	32
2.2.5.2.	Optimum pH.....	32

2.2.5.3.	Metal İyonlarının Etkisi.....	33
2.2.5.4.	Isıl Kararlılığı.....	33
2.2.5.5.	pH Kararlılığı.....	33
2.2.5.6.	Tuz Konsantrasyonunun Enzim Üzerine Etkisi.....	34
3.	BULGULAR.....	35
3.1.	<i>Rib-AgCWL</i> 'nin Baz Diziliminin Belirlenmesi	35
3.2.	<i>AgCWL-Pro</i> Füzyon Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi.....	35
3.3.	<i>Rib-AgCWL</i> ve <i>AgCWL-Pro</i> Füzyon Genlerinin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	36
3.4.	Protein Ekspresyonu ve Saflaştırması.....	37
3.5.	<i>AgCWL-Pro</i> ve <i>Rib-AgCWL</i> Proteinlerinin Üç Boyutlu Yapısı	38
3.6.	Enzim Aktivitesinin Zimogram ve Petri Deneyi ile Belirlenmesi.....	39
3.7.	<i>AgCWL</i> ve <i>AgCWL-Pro</i> Enzimlerinin biyokimyasal Karakterizasyonu	39
3.7.1.	Optimum Sıcaklık.....	40
3.7.2.	Optimum pH.....	40
3.7.3.	Metal İyonlarının Etkisi.....	41
3.7.4.	Isıl Kararlılığı.....	42
3.7.5.	pH Kararlılığı.....	44
3.7.6.	Tuz Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	46
4.	TARTIŞMA.....	48
5.	SONUÇLAR.....	52
7.	KAYNAKLAR	54
8.	EKLER	59
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans

ÖZET

ANOXYBACILLUS GONENSIS PDF21 SUŞUNUN HÜCRE DUVARI LİTİK ENZİMİNİN OPTİMUM SICAKLIK, pH VE ISIL KARARLILIĞININ İYİLEŞTİRİLMESİ

Esmâ CEYLAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2018, 58 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* PDF21 bakterisinin hücre duvarı litik enzimi (AgCWL) ve aynı enzimin C-terminalinde proline zengin bir dizi taşıyan rekombinant formu olan *AgCWL-Pro*, pET-28a(+) vektörüne klonlanarak ekspres edilmiş ve Co⁺² afinite kromatografisi ile saflaştırılarak karşılaştırmalı olarak biyokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Baz dizi analizi sonucu 597 bp büyüklüğünde olduğu ve 192 amino asiti kodladığı görülen yaban tip proteine ait genin (AgCWL) nükleotit ve amino asit dizileri NCBI veri tabanına sırası ile KX840343 ve ASW27133 numaraları ile kaydedilmiştir. Biyokimyasal karakterizasyonları sonucu proline zengin dizinin, AgCWL enziminin optimum sıcaklığını 45°C'den 50°C'ye, optimum pH sınırı 6,5' dan pH 7'ye yükseltirken, kararlılığı üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir. Belirli iyonların aktiviteler üzerindeki etkileri incelendiğinde, KCl, LiCl₂ ve MnCl₂ AgCWL'nin aktivitesini arttırırken, sadece MnCl₂ AgCWL-Pro'nun aktivitesini arttırmış, KCl ve LiCl₂ ise, AgCWL-Pro'nun aktivitesini etkilememiştir. CaCl₂, AgCWL'nin aktivitesini azaltırken, AgCWL-Pro'ninkini ise tamamen inhibe etmiştir. Bu sonuçlara göre prolin kuyruğu aynı zamanda metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini de değiştirmiştir. Sonuç olarak, C-terminaline takılan proline zengin kuyruğun, CWL enziminin optimum sıcaklık ve optimum pH özelliklerini iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile literatürde ilk defa *Anoxybacillus* cinsinde hücre duvarı litik enzim ailesine ait bir enzim rekombinant olarak üretilerek, biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hücre Duvarı Litik Enzimi, Füzyon, Biyokimyasal Karakterizasyon, Proline Zengin Dizi, Etiket, Kuyruk

Master Thesis

SUMMARY

THE IMPROVEMENT of OPTIMUM TEMPERATURE, pH and THERMAL STABILITY of CELL WALL LYTIC ENZYMES from *ANOXYBACILLUS GONENSIS* PDF21

Esmâ CEYLAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2018, 58 Pages, 2 Appendix page

In this study, a cell wall lytic enzyme (AgCWL) of *Anoxybacillus gonensis* PDF21 bacterium and its recombinant form AgCWL-Pro carrying the proline-rich sequence at the C-terminus of the same gene was generated. Both were cloned into the pET-28a(+) vector and expressed. purified by Co^{+2} affinity chromatography for comparative biochemical characterization. The base sequence analysis showed that the result is 597 bp in size and 192 amino acids. The wild-type gene (AgCWL) nucleotide and amino acid sequences were registered with the NCBI database sequence with the accession numbers KX840343 and ASW27133, respectively. Comparative biochemical characterization of the resulting proline-rich tail fusion did not show any significant effect on stability, while raising the optimum temperature of AgCWL enzyme from 45°C to 50°C, optimum pH from 6.5 to pH 7.0 The effects of certain ions on the activity were examined, KCl, LiCl_2 and MnCl_2 increased the activity of AgCWL-Pro, while MnCl_2 increased the activity of AgCWL-Pro only, whereas KCl and LiCl_2 did not affect the activity of AgCWL-Pro. While CaCl_2 reduced the activity of AgCWL, it completely inhibited AgCWL-Pro. According to these results, proline tag also changed the effect of metal ions on enzyme activity. As a result, it has been observed that attaching the C-terminal proline tail can improve the optimum temperature and optimum pH properties of the enzymes. In this study, for the first time in literature, an enzyme belonging to the cell wall lytic enzyme family, *Anoxybacillus*, was recombinantly produced and biochemical characterization was carried out.

Keywords: Cell Wall Lytic Enzyme, Fusion, Biochemical Characterization, Prolyne Rich Sequence, Label, Tail

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarları. A) Gram pozitif bakteriler sitoplazmik membranın dışında teikoik asitlerin gömülü olduğu, kalın bir PG tabakasına (15-80 nm) sahiptir. B) Gram negatif bakteriler, dış membrana lipoproteinlerle bağlanarak, membranın iç yüzeyine lokalize olan ince bir PG tabakası (2-7 nm) içerirler (Mark, 2011). 4
- Şekil 2. PG monomerleri. A) PG, GlcNAc ve MurNAc birimlerinin β -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmasından oluşan lineer glikan zincirlerinden oluşur. MurNAc monomerinin şekilde R grup olarak gösterilen yarı laktik grubu peptid dalları ile kovalent bağ yapar. B) MurNAc birimlerinin intramoleküler düzenlenmesi, LT'lere özgü bir işlemdir (Clark, 2000)..... 4
- Şekil 3. PG'de çapraz bağların kurulması. E. coli'de peptid dalları L-alanin, D-glutamat, mezo-diaminopimelik asit (m-DAP), D-alanin ve sentezin devam etmesi için bir terminal D-alanin içerir. Komşu dal peptitler arasında çapraz bağlar genellikle 3. ve 4. amino asitler arasında oluşur ve çapraz bağlar için gerekli olan enerji terminal D-ala'nın uzaklaştırılmasıyla sağlanır (Höltje, 1995)..... 5
- Şekil 4. PG'nin 3 boyutlu yapısının düzenlenmesi ile ilgili teoriler (a) Klasik modelede PG glikan zincirleri çapraz peptid bağları ile sitoplazmik membrana paralel olacak şekilde konumlanır, (b) glikan zincirler sitoplazmik membranda çıkıntı oluşturacak şekilde konumlanırken, (c) glikan zincirler dal peptitler ile sitoplazmik memrana yatay şekilde konumlanmaktadır (Mark, 2000)..... 7
- Şekil 5. PG biyosentezi. Sitoplazmada, MurA ve MurB, UDP-MurNAc sentezini katalize ederler. Pentapeptid amino asitleri müteakiben MurC-F enzimleri aracılığıyla, ATP kullanarak laktik UDP-MurNAc yan ürününe eklenir. Sitoplazmik membranda, UDP-MurNAc ardından C55-P adlı membran akseptörüne transfer edilir ve integral membran transferaz MraY tarafından lipid I'e dönüşür. MurG, lipid I molekülüne UDP-GlcNAc molekülünü ekleyerek lipid II 'yi oluşturur. PG monomerleri tamamlandığında FtsW tarafından sitoplazmik membrana taşınır (Mark, A., 2000). 9
- Şekil 6. PG'nin "three-for-one" büyüme hipotezi (Mark, 2000). 10
- Şekil 7. PG'yi kesen enzimler (Höltje, 1995). 12
- Şekil 8. *Rib* ve *AgCWL*'nin füzyonu için dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimi. *RibLmt-F* ve *LmtRib-R* primerleri, büyük oranda birbirine komplementer olup daha sonra gerekli olduğunda iki genin ayrılabilmesini sağlayacak bir restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi (*KpnI*) içermektedir. 22
- Şekil 9. *Rib* ve *AgCWL* genlerinin PCR ile füzyon yöntemi 23
- Şekil 10. pET-Rib-AgCWL vektörü. 24

Şekil 11.	Prolince zengin dizinin PCR ile çoğaltılması.	26
Şekil 12.	AgCWL ve Pro'nun PCR ile füzyonu	27
Şekil 13.	Rib-AgCWL'yi taşıyan pGEM-T Easy rekombinantlarının EcoRI endonükleazı ile kesim sonucu, 1-9: EcoRI endonükleazı ile kesimi yapılan rekombinant plazmitler, PCR: Kontrol olarak Rib-AgCWL PCR fragmenti.....	35
Şekil 14.	AgCWL-Pro genlerinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması AgCWL-Pro genini taşıyan pGEM-T rekombinantlarının EcoRI endonükleazı ile kesim sonucu, 1: DNA Markır, 2-5: EcoRI endonükleazı ile kesimi yapılan rekombinant plazmitler.....	36
Şekil 15.	Rib-AgCWL ve AgCWL-Pro genlerinin pET-28a(+) vektörüne klonlanması. A 1: BamHI restriksiyon endonükleazı ile lineer hale getirilen pET28a(+) vektörü 2-3: BamHI restriksiyon endonükleazları ile kesilen pET-AgCWL-Pro 4: DNA Markır. B 1: DNA Markır 2-3: BamHI restriksiyon endonükleazı ile kesilen pET-RibAgCWL 3: Kontrol olarak kullanılan AgCWL-Pro PCR fragmenti (777 bp).....	37
Şekil 16.	AgCWL, AgCWL-Pro ve Rib-AgCWL proteinlerinin SDS-PAGE analizi 1:Rib-AgCWLfüzyon proteininin kaba ekstraktı, 2: His tag kuyruğu ile saflaştırılmış AgCWL proteini, 3: protein marker, 4: His tag ile saflaştırılmış AgCWL-Pro füzyon proteini.	38
Şekil 17.	Füzyon proteinlerin 3 boyutlu yapıları (a) AgCWL-Pro proteini pembe renkli kısım prolin kuyruğu göstermektedir. (b) Rib-AgCWL füzyon proteini.....	38
Şekil 18	AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin zimogram görüntüsü ve petri deneyi a). 1: pozitif kontrol lizozim 10 mg/ml, 2: boş kuyu, 3-4: AgCWL 10 mg/ml, 5-6: AgCWL-Pro 10 mg/ml, b) Petri deneyi 1: pozitif kontrol (Lizozim), 2: AgCWL, 3: AgCWL-Pro, 4: negative kontrol BSA.....	39
Şekil 19.	AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği	40
Şekil 20.	AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin optimum pH grafiği.....	41
Şekil 21.	Metal iyonlarının AgCWL enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 22.	Metal iyonlarının AgCWL-Pro enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 23.	AgCWL enziminin ısı kararlılığı.....	43
Şekil 24.	AgCWL-Pro enziminin ısı kararlılığı.....	44
Şekil 25.	AgCWL enziminin pH kararlılığının belirlenmesi.	45
Şekil 26.	AgCWL-Pro enziminin pH kararlılığının belirlenmesi.	45
Şekil 27.	Tuz konsantrasyonunun AgCWL enzim aktivitesi üzerine etkisi.	46
Şekil 28.	Tuz konsantrasyonunun AgCWL-Pro enzim aktivitesi üzerine etkisi.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Peptidoglikan (PG) tipleri (Mark, 2000)	6
Tablo 2. Çalışmada kullanılan vektörler ve bakteri suşları.....	20
Tablo 3. <i>Rib</i> ve <i>AgCWL</i> 'nin füzyonunda kullanılacak primerlerin nükleotit dizilimi. (Altı çizili bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini göstermektedir.)	21
Tablo 4. Prolince Zengin Dizinin çoğaltılmasında kullanılacak primerlerin nükleotit dizilimi (altı çizili bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini göstermektedir).	25
Tablo 5. Kobalt-Afinite Kromatografisinde kullanılan tamponlar.	29



KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

AgCWL	: <i>Anoxybacillus gonensis</i> hücre duvarı litik enzimi
Amp	: Ampisilin
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CWL	: Hücre duvarı litik enzimi
D-glu	: D-glutamat
Da	: Dalton
D-ala	: D-alanin
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GH	: Glikozid hidrolazlar
GlcNAc	: N-asetilglikozamin
GST	: Glutasyon S-Transferaz proteini
IPTG	: Isopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
IUMBB	: International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kan	: Kanamisin
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
<i>lacZ</i>	: Beta-galaktosidaz geni
L-ala	: L-alanin
LB	: Luria Bertani Sıvı Besiyeri
LiCl ₂	: Lityum klorür
LT	: Litik transglikozilazlar
MBC	: maltoz bağlanma proteini
m-DAP	: Mezo-diaminopimelik asit

mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
MnCl ₂	: Mangan klorür
MurNAc	: <i>N</i> -asetilmüramik asit
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
OD	: Optik Yoğunluk
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PBC	: Penisilin bağlama proteini
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PG	: Peptidoglikan
Pro	: Prolince zengin dizi
Rib	: Ribülokinaz enzimi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
<i>rpoB</i>	: DNA-bağlı RNA polimeraz beta alt ünitesi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
Sn	: Saniye
T _m	: Erime Sıcaklığı
U	: Ünite
UDP	: Ürüdün difosfat
UV	: Ultraviyole
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid
γ	: Gama
β	: Beta
Δ	: Delta
α	: Alfa

°C : Derece
μg : Mikrogram
μl : Mikrolitre



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar; ökaryotlar, arkebakteriler ve öbakterilerlerdir. Bakteriler dünya üzerinde çok geniş bir yayılım göstermektedirler. Yaşadıkları sıcaklıklara göre üç grup altında toplanan bakterilerde sakrofiller, -10°C 'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda üreyebilen fakat optimum üreme sıcaklığı 15°C veya daha düşük sıcaklıklar olan bakterileri temsil etmektedir. Mezofiller normal ortam sıcaklıklarında ($15-50^{\circ}\text{C}$) üreyen ve insan sağlığı açısından patojen olabilen bakterileri de içermektedirler. Termofiller ise genel olarak 50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin 100°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinen bakteri grubu olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Trent, 2000).

Termofilik bakterilerin sahip oldukları enzimler, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları nedeni ile endüstriyel yönden büyük önem arz etmektedirler. Eşsiz bir yapı ve işlev özelliğine sahip olan termofilik enzimler (Vieille ve Zeikus, 1996), günümüzde moleküler biyoloji uygulamalarında (*Taq* DNA polimeraz), nişasta endüstrisinde (α -amilaz, glukoz izomeraz) ve yüksek kararlılık isteyen organik ürünlerin sentezi, teşhis ve tanı işlemleri, kâğıt endüstrisi ve hayvanların beslenmelerinde kullanılan ürünlerin sentezi gibi daha birçok endüstri kollarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Vieille ve ark., 1996). Özellikle endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler mezofilik ve psikofilik enzimlere göre büyük avantajlara sahiptirler. Bu enzimler, mezofilik bir organizma içerisinde sentezlenebildiklerinden bu durum, enzimin saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlamaktadır. Bu enzimler yüksek sıcaklıklara ve aktiviteleri denatüre edici ajanlara karşı oldukça kararlıdır ve yüksek substrat konsantrasyonlarında iyi bir şekilde çalışırlar. Ayrıca çalışma ortamının diğer mikrobiyal kontaminasyonlardan etkilenme olasılığı oldukça düşüktür.

Termofilik enzimlerin gösterdiği yüksek kararlılık ve aktivite, mezofilik enzimlerden farklı olarak bulundukları bazı amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Çeşitli denatüre edici ortamlara sağladıkları direnç göz önüne alındığında termofilik enzimlerin oldukça rijit bir yapıda olmaları gereklidir. Yapılarına bakıldığında özellikle aktif bölgede rol oynayan

amino asitlerin oldukça korunmuş olduğu gözlenmektedir (Veronese ve ark., 1984; Wrba ve ark., 1990; Kanaya ve Itaya, 1992).

Bu çalışma ile karakterize edilen hücre duvarı litik enzimi (CWL), termofilik bir enzim olup, *Anoxybacillus gonensis* PDF21 tarafından sentezlenmektedir.

1.2. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Tüm üyeleri termofilik olan *Anoxybacillus* cinsi, Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılmıştır (Pikuta ve ark., 2000). Sürekli bir değişim içerisinde olan *Anoxybacillus* cinsine yeni üyeler eklenmeye devam etmektedir. Günümüzde bu cinse ait 21 tür olduğu bilinmektedir (URL-1). Bu cinse ait üyeler Gram pozitif olmakla birlikte endospor oluşturlar. Orta dereceli termofilik (37-60°C) olan üyeler, hareketli ya da hareketsiz olup alkalofilik veya alkolotolerant özellik gösterirler. G+C içeriği %42-50 arasında değişmektedir. *Anoxybacillus flavithermus*, *A. kestanbolensis*, *A. ayderensis*, *A. pushchinoensis*, *A. voinovskiensis*, *A. gonensis*, *A. contaminans*, *A. kamchatkensis*, *A. amyolyticus*, *A. bogrovensis*, *A. caldiproteolyticus*, *A. calidus*, *A. eryuanensis*, *A. kaynarcensis*, *A. mongoliensis*, *A. rupiensis*, *A. salavatliensis*, *A. tengchongensis*, *A. tepidamans*, *A. thermarum*, *A. geothermalis* ve *A. vitaminiphilus* bu cinsin tanımlanan türleri olarak bilinmektedir.

Günümüze kadar bu cinse ait üyeler tarafından üretilen ve endüstriyel öneme sahip olduğu bilinen çeşitli termofilik enzimler çalışılarak literatüre kazandırılmıştır. Örneğin; gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılan glikoz izomeraz enzimi *Anoxybacillus gonensis* türünden elde edilebilmektedir (Karaoğlu, 2013). Bunun yanında, gıda ve kâğıt endüstrilerinde ve biyo-yakıt üretiminde geniş bir kullanım alanı olan ksilanazlar birçok *Anoxybacillus* cinsi tarafından üretilmektedir.

Yapılan bu çalışma ile ilk defa *Anoxybacillus gonensis* PDF21 suşundan hücre duvarı litik enzim ailesine ait gen (CWL) izole edilip, pET28a(+) vektörüne klonlanmış, proline zengin bir kuyruk eklenerek rekombinant olarak enzim üretilmiş, biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.3. Hücre Duvarı Litik Enzimi

Hücre duvarı litik enzimi, hücre duvarında çapraz bağlı peptidoglikan (PG) tabakası bulunan bakterilerin büyümesi ve gelişmesinde hayati öneme sahiptir. Bakteri hücreleri kovalent bağlı, sıkı paketlenmiş sakkulus ile tamamen çevrelenmiştir. Bu nedenle, PG'de bulunan bağları hidroliz eden enzimler, peptidoglikan tabakayı genişleterek hem hücre büyümesinde hem de hücre bölünmesinde görev yaparlar (Lommatzsch ve ark., 1997).

1.4. Peptidoglikan Tabaka (PG)

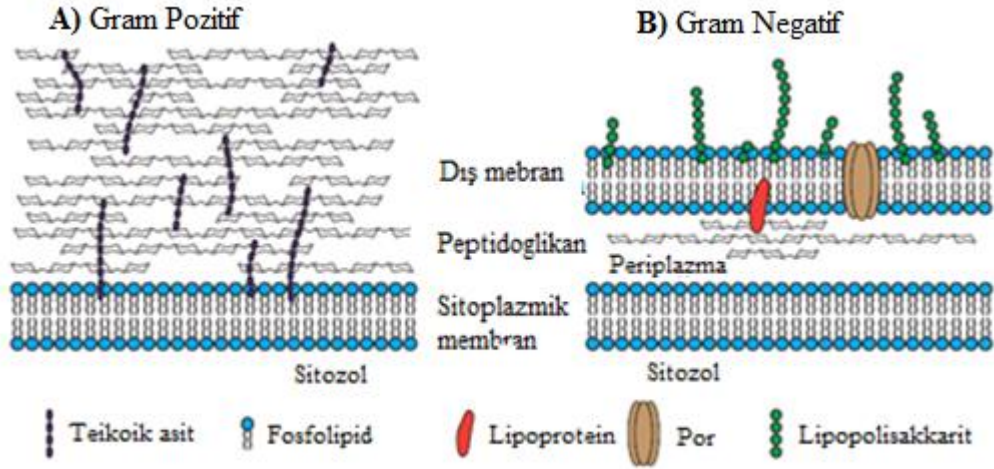
Hemen hemen bütün bakteriler sitoplazmik membranın dışında peptidoglikan tabaka ile çevrelenmiştir. Peptidoglikan, hücre dayanıklılığı ve hücre içi turgor basıncına karşı hücre duvarının bütünlüğünü korumak için özelleşmiş hücre duvarının ana bileşendir (Schleifer ve Kandler, 1972).

PG, hücreyi çevreleyen ve sakkulus adı verilen ağısı yapıyı oluştururken, aynı zamanda proteinler, teikoik asit ve diğer glikopolimer gibi hücre duvarı bileşenleriyle hücre şeklinin devamlılığını sağlamak için bağlantı kurar (Neuhaus ve Baddiley, 2003; Dramsi ve ark., 2008). PG metabolizmasının inhibisyonu, hücre açısından ölümcül olduğundan, bu metabolizmanın çok sayıda önemli antibiyotiğin geliştirilmesinde birincil hedefdir.

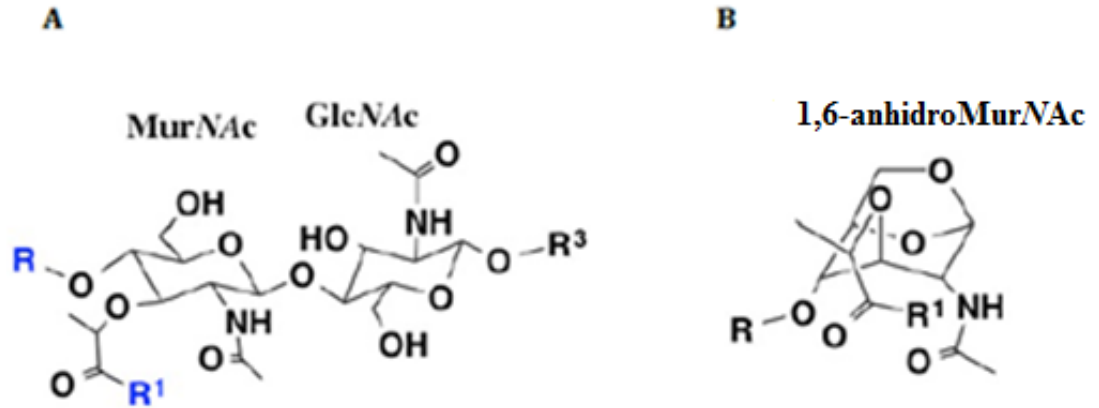
1.4.1. PG Yapısı ve Düzenlenmesi

Gram pozitif (+) bakteriler, çok sayıda çapraz bağlara sahip çok katmanlı PG'den oluşan kalın hücre duvarı (30-40 nm) ile karakterize edilir (Dmitriev ve ark., 1999) (Şekil 1). Diğer yandan, Gram negatif (-) bakteri türlerinde ise, sitoplazmik membran ile dış tabaka arasında 2-3 nm ile 7 nm arasında değişen ince bir PG tabakası bulunur (Murray ve ark., 1965; Labischinski ve ark., 1991; Gan ve ark., 2008). PG, glikan ipliklerinin birbirine kısa peptid dalları ile çapraz bağlanması sonucu oluşan heteropolimer bir yapıdır (Schleifer ve Kandler, 1972; Vollmer ve ark., 2008a). Her bir glikan iplik, *N*-asetilglikozamin (GlcNAc) ve *N*-asetilmüramik asit (MurNAc) birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması sonucu oluşur (Şekil 2.A). Glikan ipliklerin çoğu MurNAc biriminin 1. ve 6. karbonu arasında eter bağı

içeren 1-6 anhidroMurNAc ile sonlanır ve zincir uzunluğu türe ve büyüme koşullarına göre değişebilir (Şekil 2.B) (Vollmerve ark., 2008a).



Şekil 1. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarları. A) Gram pozitif bakteriler sitoplazmik membranın dışında teikoik asitlerin gömülü olduğu, kalın bir PG tabakasına (15-80 nm) sahiptir. B) Gram negatif bakteriler, dış membrana lipoproteinlerle bağlanarak, membranın iç yüzeyine lokalize olan ince bir PG tabakası (2-7 nm) içerirler (Mark, 2011).

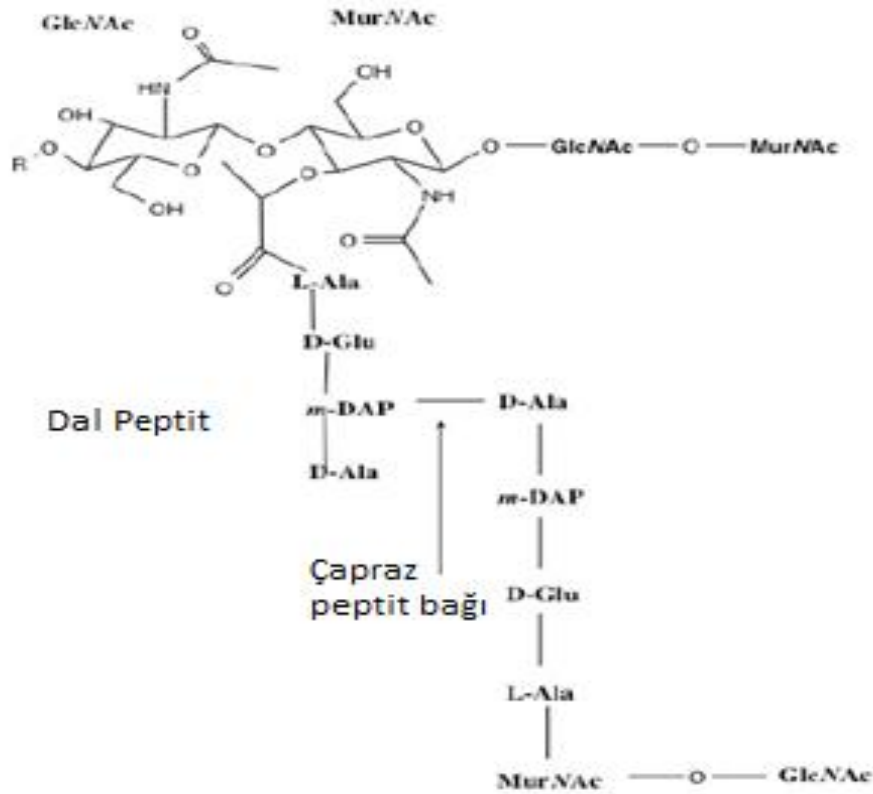


Şekil 2. PG monomerleri. A) PG, GlcNAc ve MurNAc birimlerinin β -1,4 glikozidik bağı ile bağlanmasından oluşan lineer glikan zincirlerinden oluşur. MurNAc monomerinin şekilde R grup olarak gösterilen yarı laktil grubu peptit dalları ile kovalent bağ yapar. B) MurNAc birimlerinin intramoleküler düzenlenmesi, LT'lere özgü bir işlemdir (Clark, 2000).

Türlerlere göre değişen peptit dalları, MurNAc birimlerinin 3. karbonuna (C-3) D-laktil eklenmesiyle oluşur. Çoğu gram negatif bakteride, peptit dalları L-alanin, D-glutamat, mezo-diaminopimelik asit (*m*DAP) ve D-alanin (D-ala) içerir (Şekil 3). PG'nin

olgunlaşması, komşu iplikler arasındaki çapraz bağlarla gerçekleşir. Bu bağlar, birinci iplikte yer alan peptit dalının 4. amino asidi (D-ala) ile komşu ipliğin 3. amino asidi arasında oluşur. Bu süreçte gerekli bağ enerjisini sağlamak için terminal D-ala'nın uzaklaştırılması gerekir.

Glikan modifikasyonları, olgunlaşmış PG sakkulusunda gerçekleşir. Bu modifikasyonlar, fosforilasyon (Ghuysen, 1968) veya MurNAc biriminin 6. pozisyonundaki karbon atomunda O-asetilasyon (Clarke, 1993; Weadge ve ark., 2005) ve GlcNAc ve MurNAc N-deasetilasyonunu içerir (Vollmer ve Tomasz, 2000, 2002). Bu enzimatik tepkimelere ek olarak, MurNAc birimlerinin 1-6 anhidromuramik aside indirgenmesi, glikan zincirin uçlarında indirgenemeyen bir yapının oluşmasını sağlar (Ward, 1973; Gmeiner ve ark., 1982).



Şekil 3. PG'de çapraz bağların kurulması. *E. coli*'de peptit dalları L-alanin, D-glutamat, mezo-diaminopimelik asit (m-DAP), D-alanin ve sentezin devam etmesi için bir terminal D-alanin içerir. Komşu dal peptitler arasında çapraz bağlar genellikle 3. ve 4. amino asitler arasında oluşur ve çapraz bağlar için gerekli olan enerji terminal D-ala'nın uzaklaştırılmasıyla sağlanır (Höltje, 1995).

Özellikle Gram pozitif (+) bakterilerin farklı üyelerinde bulunan peptit dallarındaki farklılaşmanın varyasyonlara neden olduğu düşünülmektedir. Örneğin: peptitler arası bağ oluşumunun yanı sıra; çapraz bağın oluşma tipi, enzimde yer alan her bir amino asitin özgülüğü de peptit dallarının kompozisyonundaki çeşitliliğe katkı sağlar. PG varyasyonları, çapraz bağ oluşumunu temel alarak sınıflandırılmıştır (Tablo 1). Örneğin, A1 γ 'nin sınıflandırılmasında; birinci zincirin 3. pozisyonundaki m-DAP ile diğer zincirin 4. pozisyonundaki D-Ala'nın doğrudan çapraz bağ oluşturması dikkate alınmıştır (Schleifer ve Kandler, 1972). Bu varsayımın yanı sıra, bakteri türlerinin bireysel PG'leri, moleküler düzeyde farklılık gösterir. Örneğin, aynı türe ait bakterilerde 100'den fazla farklı PG metaboliti bulunabilir (Glauner ve ark., 1988).

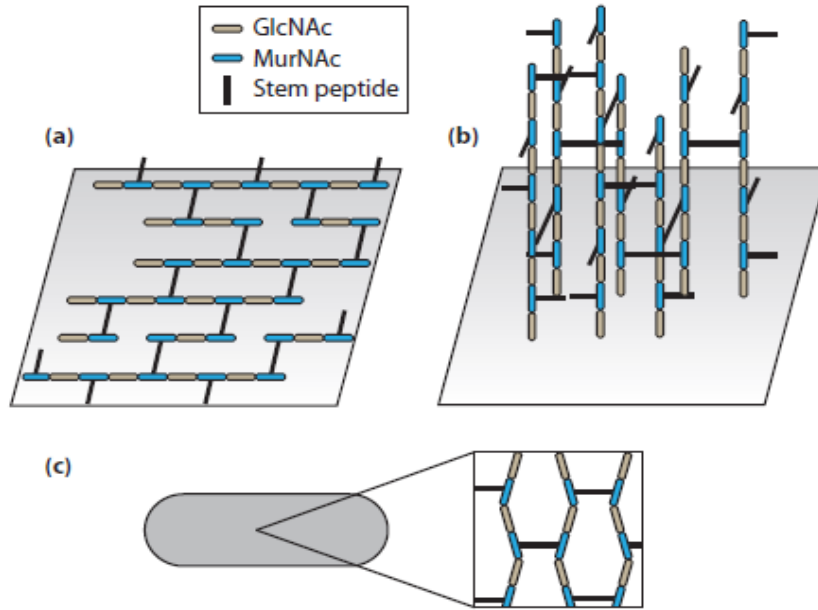
Tablo 1. Peptidoglikan (PG) tipleri (Mark, 2000)

Grup A 3. (diaminoasit) ve 4. (D-alanin) pozisyon arasındaki çapraz bağ			
Alt Bölüm	Çapraz Bağ Tipi	Alt Grup	3.pozisyonundaki aminoasit
A1	Direkt	α	L-lizin
		β	L-ornitin
		Γ	m-diaminopimelikasit
A2	Alt birim peptidlerinin oligomerleri		L-lizin
A3	Monokarboksil L-aminoasit	α	L-lizin
		β	L-ornitin
		Γ	m-diaminopimelikasit
A4	Dikarboksilik asit	α	L-lizin
		β	L-ornitin
		γ	m-diaminopimelikasit
Grup B 2. (D-glutamik asit) ve 4. (D-alanin) pozisyonundaki çapraz bağlar			
Alt Bölüm	Çapraz Bağ Tipi	Alt Grup	3.pozisyonundaki aminoasit
B1	L-lizin ile peptidler arası köprü	α	L-lizin
		β	L-homoserin
		γ	L-glutamik asit
B2	D-aminositler ile peptidler arası köprü	α	L-alanin
		β	L-homoserin
		γ	L-diaminobütirikasit

PG'nin 3 boyutlu yapısının düzenlenmesi hücre yüzeyi ile ilişkilendirilmiş ve bu konuyla ilgili birçok teori ileri sürülmüştür (Şekil 4). Bu modellerden biri olan "Çevresel katmanlı" (Circumferential Layered) modelde, PG sıkıca paketlenmiş ince tabakalar halinde, sakkulusun yüzeyine paralel konumda düzenlenmiş olarak bulunur (Verwer ve ark., 1978). Bu model, glikan iplikleri ve hücreyi saran sitoplazmik membranla aynı doğrultuda olan peptit çapraz bağlarını anlatır (Gan ve ark., 2008). Bu model, sakkulus geçirgenliğinin belirlenmesinin yanı sıra (Demchick ve Koch, 1996; Yao ve ark., 1999), PG'nin kalınlığının

tahmin edilmesi (Labischinski ve ark., 1991), glikan zincirlerin uzunluğunun belirlenmesi (Glauner ve ark., 1988; Harz ve ark.,1990) ve mevcut PG miktarının da öngörülmesini sağladığından, geniş çapta kabul görmüştür (Wientjes ve ark., 1991).

Daha az destek gören ve Çevresel Katmanlı modele aykırı olan diğer bir modelde; glikan zincirler, dal peptidlerle birlikte sitoplazmik membrandan çıkıntı yaparak, dışa doğru dikey olarak konumlanmış ve sakkulusun tersiyer yapılanmasını sağlamıştır (Dmitriev ve ark., 1999; Meroueh ve ark., 2006). Bu model düşünüldüğünden daha fazla PG gerektirdiği için hücre duvarının kalınlığının tahmin edilmesini olanaksız kılmaktadır (Minke ve Blackwell, 1978; Rogers ve ark., 1981). Örneğin *E. coli* de bu modele göre 9 nm'den daha fazla PG tabakası olması beklenirken, bu tabakanın 4 nm'den daha kalın olmadığı gözlemlenmiştir (Gan ve ark., 2008). Günümüzde gelişen teknoloji ile gerçekleştirilen elektron mikroskobisi ve biyokimyasal çalışmaların ardından, PG'nin temel yapısının tek tabakalı glikan zincirlerinden oluştuğu düşünülmektedir.

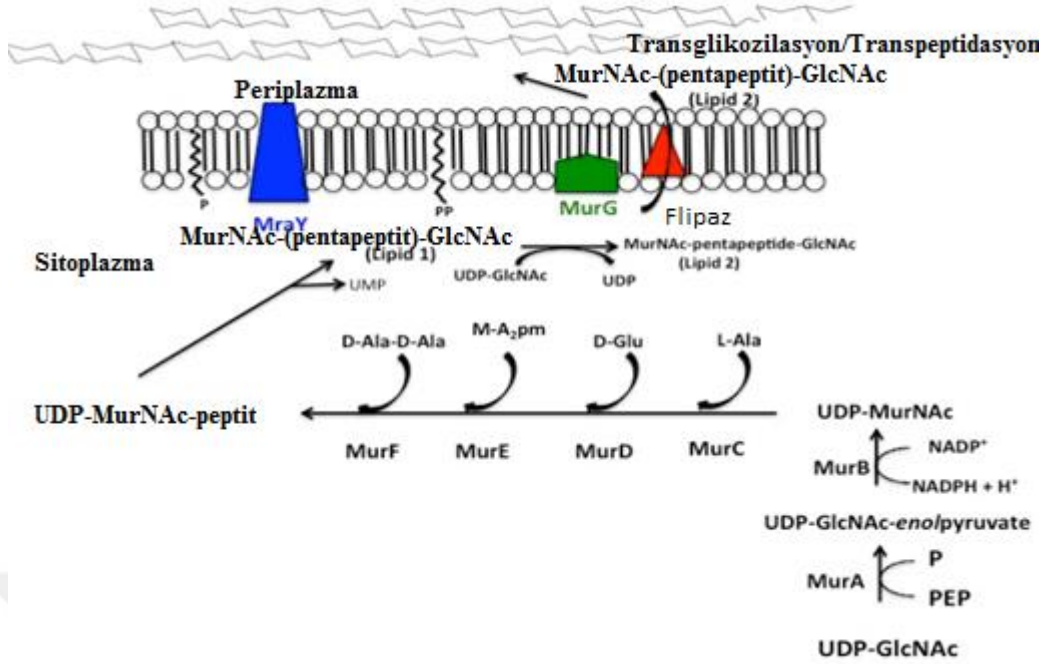


Şekil 4. PG'nin 3 boyutlu yapısının düzenlenmesi ile ilgili teoriler (a) Klasik modelde PG glikan zincirleri çapraz peptit bağları ile sitoplazmik membrana paralel olacak şekilde konumlanır, (b) glikan zincirler sitoplazmik membranda çıkıntı oluşturacak şekilde konumlanırken, (c) glikan zincirler dal peptitler ile sitoplazmik memrana yatay şekilde konumlanmaktadır (Mark, 2000).

1.4.2. PG Sakkulusun Biyosentezi

PG biyosentezi, sitoplazmada gerçekleşen yaklaşık 20 çeşit kimyasal reaksiyondan oluşur (Şekil 5). İlk basamak, üründin difosfat (UDP)-GlcNAc molekülünün MurA ve MurB aracılığı ile UDP-MurNAc molekülüne dönüşmesidir (Kahne ve ark., 2005). Dal peptit, daha sonra Mur ligaz (MurC-MurF) enzimleri olarak bilinen bir dizi enzim reaksiyonlarına tabi tutulur. Bu reaksiyon, muropeptit ürünü ile sonlanır. Elde edilen muropeptit ardından C55-P adlı membran akseptörüne transfer edilir ve integral membran transferaz MraY tarafından lipid I ürünü elde edilir (Ikeda ve ark., 1991). Membran ilişkili bir protein olan MurG, lipid I molekülüne UDP-GlcNAc molekülünü ekleyerek lipid II oluşumunu sağlar (Ha ve ark., 2001; Mengin-Lecreulx ve ark.,1991). Lipit II (MurNAc-(pentapeptide)-GlcNAc), tam bir PG monomer birimi taşıyıcıya bağlandığında FtsW tarafından sitoplazmik membrandan taşınır (Mohammadi ve ark., 2011). Hem PG'yi kesen hem de PG sentezinde rol alan enzimler aracılığıyla, var olan sakkulusa eklenir.

PG alt birimlerinin membrandan taşınmasında kullanılan moleküler işlemler, uzun süredir tartışmalı bir konu olmuştur. Protein-protein etkileşimlerine dayanarak FtsW'nin bir filippaz fonksiyonuna sahip olduğu düşünülmekte ve PG sentezinde yer alan protein kompleksinin bir parçası olduğuna uzun zamandan beri inanılmaktadır. Biyokimyasal analizler doğrultusunda FtsW'nin lipit II taşıyıcısı olduğu, flipping mekanizmasının henüz tam belirlenemediği fakat kolaylaştırılmış difüzyon aracılığıyla bu reaksiyonda yer aldığı öngörülmüştür (Mohammadi ve ark., 2011).



Şekil 5. PG biyosentezi. Sitoplazmada, MurA ve MurB, UDP-MurNAc sentezini katalize ederler. Pentapeptit amino asitleri müteakiben MurC-F enzimleri aracılığıyla, ATP kullanarak laktik UDP-MurNAc yan ürününe eklenir. Sitoplazmik membranda, UDP-MurNAc ardından C55-P adlı membran akseptörüne transfer edilir ve integral membran transferaz MraY tarafından lipid I'e dönüşür. MurG, lipid I molekülüne UDP-GlcNAc molekülünü ekleyerek lipid II 'yi oluşturur. PG monomerleri tamamlandığında FtsW tarafından sitoplazmik membrana taşınır (Mark, A., 2000).

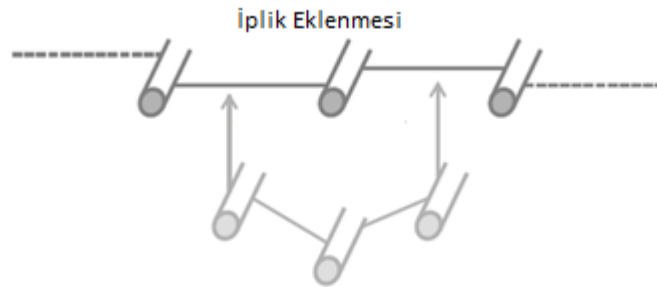
Lipit II prekürsürleri, membrandan geçtikten sonra, glikan ipliklerin birleşmesi esnasında bir donör fonksiyonu üstlenir. Transglykozilazlar olarak bilinen enzimler, uzama basamağını kollektif olarak katalizlerler. Bununla birlikte, glikan iplikleri henüz çapraz bağlı değildir, bu da komşu iplikler arasında transpeptidasyon oluncaya kadar sakkulus bölgesinin mekanik olarak zayıflatılmasına neden olur. PG sentezini tamamlayan enzimler, penisilin bağlama proteinleri (PBP) olarak bilinir (Mark 2011). PBP'leri, PG polimerizasyonunda, hücre duvarı insersiyonunda ve komşu PG ipliklerindeki muropeptitler arasında çapraz bağ kurmada görevlidirler.

1.4.3. PG Sakkulusun Gelişmesi

Bakteriler, PG sentezi ve degradasyonu için belirli bir düzene ihtiyaç duyarlar. Sakkulusun degradasyonu, hücre bölünmesi, hücre büyümesi ve çeşitli salgılama sistemleri

gibi, membrana bağımlı moleküler sistemlerin oluşmasına imkân verir (Koraimann, 2003). Bu degradasyon için gerekli enzimler, litik enzimler olarak bilinirler ve PG'nin yapısında yer alan her bir bağ için mevcut bir litik enzim vardır. *N*-asetilmuramil-L-alanin amidazlar, MurNAc ve dal peptitteki L-alanin arasındaki α -amid bağının hidrolizinden sorumlu iken, karboksi- ve endo-peptidazlar dal peptit içinde bulunan peptit bağlarını keserler. Lizozimler hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalar tarafından yaygın olarak üretilmektedirler. Bu enzimler MurNAc ve GlcNAc arasındaki β -1,4-glikozidik bağları yıkmakla görevlidirler ve bu yıkım sonucunda indirgenmiş bir terminal MurNAc birimi oluştururlar (Young, 1992). Aynı zamanda litik transglikosilazlar (LT) da MurNAc ve GlcNAc birimleri arasındaki β -1,4-glikozidik bağlarını keserler. Ancak lizozimler, bir litik enzimi sınıfına dâhil olurken, LT'ler liyaz sınıfına dâhildir ve bu liyazlar 1,6-anhidromuramoil ürününü oluştururlar (Höltje ve Tomasz, 1975). Bakterilerin yeni sentezledikleri PG dissakkarit öncüllerini, var olan sakkuluslar içerisine nasıl yerleştirdiklerini açıklamaya çalışan birçok teori vardır. Bunlardan bir tanesi Koch tarafından “make before break” adı altında ortaya atılmıştır. Bu teoride, yeni iplikler var olan sakkuluslara eski bağların kırılmasından önce bağlanır. Gram-pozitif türlerde PG olgunlaşması içten dışa doğru sitoplazmik membrana yakın olacak şekilde gerçekleşir (Koch ve Doyle, 1985). Gram-negatif bakterilerde bu görüş “three-for-one” büyüme modeli olarak geliştirilmiştir (Şekil 6) (Mark, 2000). Bu modelde, çapraz bağlı glikan ipliklerin üçlüsü sakkulusa transpeptidasyon ile bağlanır. Ardından, daha önce var olan iplik kesilir ve sakkulustan uzaklaştırılır. Bu model sakkulusun yapısal dayanıklılığını kaybetmeden genişlemesine olanak sağlar.

Sakkulusun genişlemesi için hangi model kullanılırsa kullanılsın, bakteriler hem biyosentez hem de degradasyon enzimlerini üç boyutlu yapılarının düzenlenmesinde kullanırlar. Bu enzimlerin çoklu enzim kompleksleri halinde bulunduğu ve Gram negatiflerde az da olsa sentez ve degradasyonun düzenli olmasına olanak sağladığı ileri sürülmüştür (Romeis ve Höltje, 1994; Höltje, 1998).



Şekil 6. PG'nin “three-for-one” büyüme hipotezi (Mark, 2000).

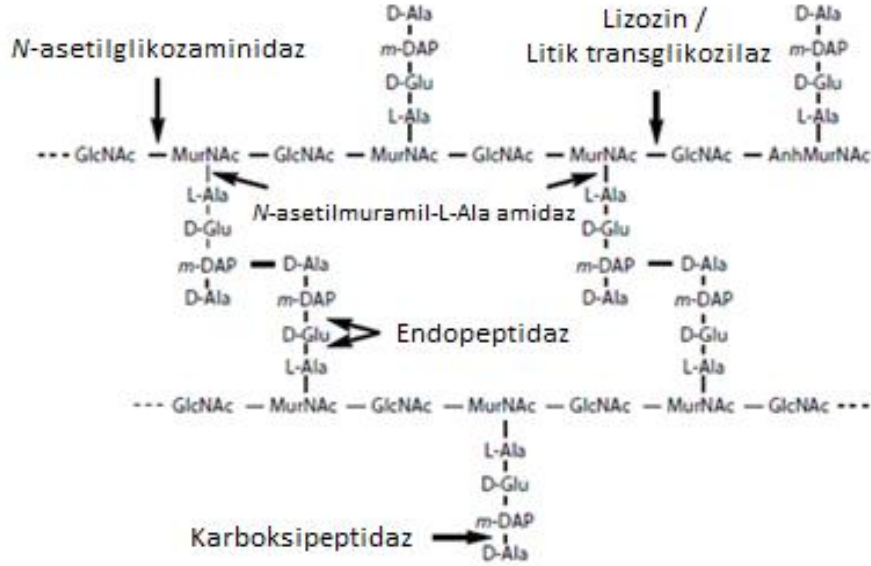
1.5. PG Degredasyonunda Görevli Enzimlerin Sınıflandırılması

1.5.1. Glikozid Hidrolazlar (GH) [EC 3.2.1.]

Glikozid hidrolazlar, iki veya daha çok karbohidrat molekülü arasındaki veya bir karbohidrat ile bir karbohidrat olmayan birim arasındaki glikozidik bağı kesen çok geniş bir enzim grubudur. GH'nın IUBMB Enzim nomenklatörü, daha çok bu enzimlerin substrat özgünlüklerini ve genellikle moleküler mekanizmalarını temel almakta, ancak bu sınıflandırma bu enzimlerin yapısal özelliklerini yansıtmamaktadır. Birkaç yıl önce, Glikozid hidrolazların, ailelere ayrılarak amino asit dizi benzerliklerine dayalı sınıflandırılması benimsenmiştir. Bunun nedeni ise, amino asit dizisi ve protein katlanması arasındaki benzerliğin doğrudan ilişkili olmasıdır (Cantarel ve ark., 2009). Böyle bir sınıflandırma; (1) bu enzimlerin yapısal özelliklerini basit bir substrat özgünlüğünden daha iyi yansıtmaktadır, (2) bu enzimler arasındaki akrabalıkların açığa çıkartılmasına yardımcı olur, (3) mekanistik veri için uygun bir araç sağlar, (4) substrat özgünlüğü ve aile üyelikleri arasındaki akrabalıkların ortaya çıkarılmasındaki güçlükleri ortaya koyar (Henrissat, 199; Henrissat ve ark.,1993). Son güncellemeler ile beraber bugün GH'lar 153 aileye ayrılmaktadır (URL-2). Bunlardan GH 23, GH 73 ve GH 20 aileleri, peptidoglikanın degradasyonunda etkili çok çeşitli enzim gruplarını içermektedirler. GH 23; Lizozim tipi Glikozidazlar [EC 3.2.1.17] ve literatürde litik transglikozilazlar olarak da geçen peptidoglikan liyazlar [EC 4.2.2.n1] enzimlerini de içine alan ailedir (Cantarel ve ark.,2009). Lizozimler ise ayrıca GH 73 ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadırlar.

Önceden belirtildiği gibi, PG metabolizması sakkulusun kesilmesini gerektirir. Sakkulusu içeriden kesmeye muktedir olan PG'yi kesen enzimlerin (Şekil 7) birçok tipi vardır. Bunlardan biri *N*-acetylmuramyl-l-alanin amidazlardır [EC 3.5.1.28] (GH 73) ve bu enzimler MurNAc ve dal peptit arasındaki amid bağlarını hidrolize eder. Bir diğer enzim tipi, glikan ipliklerini kesen β -*N*-asetilheksoz aminidazlar [3.2.1.52] (GH 20) lizozimler ve peptidoglikan transglikozilazlardır ve bu enzimler glikan ipliklerini keserler. Peptidazlar ise, dal peptitleri arasındaki amid bağlarını keser (Vollmer ve ark., 2008). Bu enzimlerin çoğu eğer regülasyona tabii tutulmazsa, otolitik aktivite gösterebilirler. Bu aktivite sonucu PG sakkulusunu parçalarlar ve hücrenin liziz olmasına neden olurlar. Bununla birlikte, bakteriler birden fazla fonksiyonu olan bir takım litik enzime sahiptir. Bu çalışmada klonlanıp kısmi

karakterizasyonu yapılmış olan hücre duvarı litik enziminin, glikozid litik enzim (GH 23) ailesinin bir üyesi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 7. PG'yi kesen enzimler (Höltje, 1995).

1.5.2. Heksoz Aminidazlar

β -N-asetil heksoz aminidazlar (EC 3.2.1.52; *N*-acetyl- β -glukoz aminidaz, GH 20) doğada çok yaygın olarak bulunurlar. Bu enzimler, PG'de dahil olmak üzere birkaç oligosakkarit substratındaki komşu monosakkaritler ile GlcNAc arasındaki glikozidik bağı hidroliz ederler (Şekil 7) (Karamanos, 1997).

1.5.3. Lizozimler

Lizozim (EC 3.2.1.17; muramidaz, GH 73), doğada yaygın olarak bulunur. Bu enzim bakteriler, bakteriyofajlar, funguslar, omurgasızlar ve omurgalıları tarafından sentezlenir, ayrıca biyokimyada en çok araştırılan enzimler arasındadır. Lizozim benzeri katlanması olan 9 adet enzim tipi vardır (Pei ve Grishin, 2005).

Bu enzimlerden 4 tanesi, PG'de β -1,4 glikozidik bağlarını keser. Bunların en bilinen üyeleri, tavuk tipi lizozim, kaz tipi lizozim, bakteriyofaj T4 tipi lizozim, ve *Chalaropsis*

lizozimdir (Evrard ve ark., 1999). GlcNAc uçlarındaki glikan ipliklerini degrades eden ekzo-spesifik lizozimler olduğu gibi endo-spesifik lizozimler de vardır (Vollmer ve ark., 1997).

Lizozimler bakteriyel enfeksiyona karşı savunma mekanizmasının ilk hattında görev alan enzimlerdir. İnsanlar gözyaşı, mukoza ve diğer salgılarında 50 µg/ml konsantrasyona kadar lizozime sahiptirler (Abergel ve ark., 2007).

Bakteriyofajlar lizozimleri konağı enfekte etmek için ya da oluşan yeni bakteriyofajların salınımı için kullanır (Borysowski ve ark., 2006). Gram-pozitif bakterilerin PG'lerine kolayca erişebildiklerinden dolayı, bu bakterilerde daha etkilidirler. Gram-negatif bakterilerin herhangi bir gerçek lizozim kodladığı görülmemiştir; ancak aynı glikozidik bağlara etki eden bazı transglikozilazlar üretirler (Şekil 7).

1.5.4. Litik Transglikozilazlar (LT)

LT'ler; MurNAc ve GlcNAc birimleri arasındaki β -1,4 glikozidik bağları kesen enzimler olup, PG'ler üzerinde etkindir ve lizozim gibi aynı substrat özgülüğüne sahiptir (Şekil 7). Hidrolitik enzimler olan lizozimlerden farklı olarak LT'ler MurNAc (anhidro MurNAc) birimlerinde 1,6-anhidro bağı formu ile glikozidik bağların kesilmesini katalize eden liyazlardır (Höltje ve ark., 1975).

LT'ler; korunmuş bölge motifleri ve amino asit dizilerinin hizalanması baz alınarak dört enzim ailesi şeklinde organize olan büyük bir enzim grubudur (Blackburn ve Clarke, 2001). *E. coli*'nin 4. aile hariç diğer tüm ailelere ait LT'leri ürettiği bilinmektedir. Birinci aile A'dan E'ye kadar beş alt aileye sahip olan bir süper ailedir. Birinci aile enzimlerinin hepsi glutamik asit ve serin amino asitinden yapılmış olan katalitik birimlere sahiptir (Blackburn ve Clarke, 2001). İkinci aile Pseudomonadaceae ve Enterobacteriaceae'nin tüm üyeleri dahil olmak üzere, geniş çapta Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen enzimlerden oluşur ve hücre bölünmesi ve septum oluşumunda görev almaktadırlar (Scheurwater ve ark., 2008).

İlk olarak *E. coli*'de tanımlanmış olan, LT'nin 3. ailesinin temsilcileri membrana bağlı LT-B homologlarıdır. Bu temsilciler sıklıkla Gram-negatif bakterilerde bulunmakta ve kamçı ve pili oluşumunda rol almaktadırlar. Ayrıca, bunlar 5 korunmuş motifle karakterize edilirler. Son olarak, 4. aile enzimleri özellikle bakteriyofajlara aittir ve λ bakteriyofajlar tarafından kodlanır. Bu enzimler faj bağımlı hücre lizisinde önemli bir rol üstlenirler (Blackburn ve Clarke, 2001; Scheurwater ve ark., 2008).

1.6. Hücre Duvarı Litik Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Hüce duvarı litik enzimi aktivitesinin belirlenebilmesi için günümüze kadar çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotların en yoğun olarak kullanılanları zimografik analiz, plak assay (petri deneyi) ve türbidimetrik analizdir (Höljte ve ark., 1998).

1.6.1. Zimografik Analizler

Zimografi, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) dayanan bir elektroforetik yöntem olup, enzim aktivitesini belirlemek için poliakrilamid jel içerisine polimerize olmuş substratın enzim ile reaksiyonuna göre karakterize edilir (Lantz ve Ciborowski, 1994). Örneklerin hazırlanması standart SDS-PAGE uygulamasındaki gibidir. Jelin yürütülmesinin ardından kısa bir yıkama periyodu uygulanır, ardından da enzim aktivitesine göre değişen sıcaklık ve zaman aralığı boyunca jel aktivasyon tamponu ile muamele edilir. Takip eden boyama işlemi ile enzim aktivitesi olan bölgeler ayırt edilir (Wilkesman ve Kurz, 2009).

İlgilenen enzimin tipine göre birçok zimogram analizi çeşidi mevcuttur. Literatürde yaklaşık 400 farklı enzim için yaklaşık 900 farklı zimogram yöntemi bulunmaktadır (Leber ve Balkwill, 1997; Manchenko, 2003). Örneğin proteazlar için kullanılan substrat genellikle jelatindir ve boyamanın ardından aktivitenin olduğu alanlar koyu mavi arka plan üzerinde şeffaf bantlar şeklinde görülür. Ters zimografi yönteminde ise substrat ve enzim jel içerisine eklenir ve aktivitenin varlığı şeffaf ya da açık renkli arka plan üzerinde koyu renkli bantlar şeklinde gözlenir (Lantz ve Ciborowski, 1994).

1.6.2. Türbidimetrik Analiz

Bu yöntem, sıvı bir örnekte süspanse olmuş maddelerin miktar tayini için kullanılır. Bulanıklık ölçümü esasına dayanan bir yöntemdir. Türbidimetride, partikülün bulunduğu süspanسیونun ışığı absorbe etmesi sonucunda ışık şiddetindeki azalma miktarı ölçülerek miktar tayini gerçekleştirilir. Çoğunlukla detektör olarak spektrofotometre kullanılır. Örneğin bakteri hücre duvarını parçalayan lizozim aktivitesi, bakteri süspanسیونuna enzimin eklenmesi ve bulanıklığın spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenebilir.

Solüsyonun bulanıklığındaki azalma bakteri hücre duvarının parçalandığını gösterir (Eisenthal ve Danson, 2002).

Hash'in turbidimetrik deneyinde de (1967) hücre duvarı litik enziminin aktivitesi, PG'nin çözünebilirliğine bağlı olarak azalan bulanıklığın spektrofotometrik olarak ölçümüyle belirlenir. Ölçüm spektrofotometrede 600 nm'de yapılır.

1.6.3. Petri Deneyi (Lyso plate)

Lizozim ve benzeri enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan geleneksel yöntemlerde karşılaşılan zorluklardan dolayı agar petri (lyso-plate) geliştirilmiştir. Bu yöntemde substrat 1 dk sonike edilip uygun tampon içerisinde çözülerek eritilmiş agaroz içerisine karıştırılarak petriye dökülür. Agaroz katılaştıktan sonra enzim eklenmesi için yaklaşık 2 mm çapında kuyucuklar açılır ve enzim bu kuyucuklara uygun miktarda inoküle edilerek uygun sıcaklıkta 12-18 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonucunda kuyucukların etrafında oluşan şeffaflaşmış zon enzim aktivitesinin varlığını gösterir. Aktivite zonunun ölçülmesi ile enzim aktivitesinin miktarı da belirlenebilmektedir (Hikima ve ark., 2001).

1.7. Füzyon Protein Oluşturma

Bir proteinin yapısını ve fonksiyonunu anlamak için, proteinin yüksek miktarda ekspresyonunun sağlanması oldukça önemlidir (Terpe, 2003; Smyth ve ark., 2003). Yapısal analizler için proteinleri yüksek miktarda elde etmede en yoğun olarak kullanılan metot, klonlanmış genlerin *E. coli* hücresi içerisinde ekspresyonudur. Bu yöntemde sıklıkla karşılaşılan problemler, proteinlerin az miktarda ekspresyonu veya çözünmeyen inklüzyon cisimciklerinin oluşumudur. İlgilenilen proteine bir füzyon kuyruğu takarak ekspresyonunu sağlamak, bu problemlerin üstesinden gelmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bunun yanında proteinlerin kolaylıkla saflaştırılabilmesi için N-terminal ya da C-terminal bölgelerine HisTag takılabilir (Hochuli ve ark., 1987), ayrıca enzim aktivitesini ve stabilitesini artırmak için de C-terminal bölgesine Prolince zengin dizi (prolin kuyruk) (Li ve ark. 2014) takılarak füzyon protein oluşturulmaktadır. Füzyon protein oluşturma yönteminde ilgilenilen protein, konakçı bir polipeptit dizisine veya normal fonksiyon gösteren bir proteine bağlanır ve tek bir protein halinde sentezlenmesi sağlanır. Daha sonra

füzyon proteini saflaştırılır ve ardından ya olduğu gibi kullanılır ya da kimyasal veya enzimatik yolla iki protein birbirinden ayrılarak incelenir. Genellikle konakçı protein hücre içerisinde yüksek miktarda ekspresyonu sağlanan, yüksek oranda çözünen, kararlı olan ve saflaştırılması kolay olan proteinlerden seçilir (Ashima ve ark., 2005).

Füzyon oluşturmak için yaygın olarak kullanılan proteinlerden bazıları *E. coli* maltoz bağlanma proteini (MBC) (Guan ve ark., 1988), *Schistosoma japonicum* Glutasyon S-Transferaz proteini (GST) (Smith ve Johnson, 1988) ve histidin affinite kuyruğudur (Hochuli ve ark., 1987).

1.7.1. Füzyon Proteininin Sahip Olması Gereken Özellikler

Son yıllarda moleküler biyoloji çalışmalarında, saflaştırılabilme oranı yüksek olan ve kolaylıkla karakterize edilebilen rekombinant proteinlerin oluşturulması oldukça önem kazanmıştır. Günümüzde rekombinant proteinlerin üretilmesi için çeşitli epitop peptitler veya proteinler geliştirilmiştir. Bu sistemlerin ortak özellikleri: (I) kolaylıkla saflaştırılabilmesi, (II) ilgilenilen proteinin tersiyer yapısına ve kararlılığına minimal etki göstermesi, (III) doğal proteini elde etmek için kolaylıkla ayrıştırılabilmesi ve (IV) farklı proteinlere uygulanabilmesidir (Terpe, 2003).

Geniş çapta kullanılacak rekombinant proteinlerin üretilmesi için, farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi, proteinin yapısına katılmayacak çok küçük peptitlerin kullanımınıdır. Yaygın olarak kullanılan küçük peptitler poly-Arg, Flag-, poly-His, c-myc, S- ve Strep II-tag'dır. Bazı uygulamalarda bu küçük peptitlerin uzaklaştırılması gerekmez. Küçük peptitlerin tersiyer yapıya ve aktiviteye etkisi, bulunduğu yere ve amino asit içeriğine bağlıdır (Bucher ve ark., 2002). Diğer bir yaklaşım füzyon partner olarak büyük peptitlerin veya proteinlerin kullanımınıdır. Bu tip proteinlerin kullanımı hedef proteinin çözünürlüğünü artırır. Büyük protein kullanımının dezavantajı, farklı yollarla uzaklaştırılmasının gerekmesidir. Genellikle belirli bir proteinin füzyon sistemini belirlemek oldukça zordur. Hedef proteinin yapısı, ekspresyon sistemi ve saflaştırılan proteinin kullanım alanı, füzyon sistemini belirlemede dikkate alınan hususlardır (Terpe, 2003).

1.7.2. Prolince Zengin Diziler

Yaban tip enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının geliştirilmesinde, füzyon proteinlerin oluşturulması protein mühendisliği alanında oldukça önemli bir araç haline gelmiştir. 2014 yılında ksilanaz aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada; koyun rumeninde bulunan ve kültivasyonu yapılmamış olan bir mikroorganizma tarafından üretilen, *XynA* tarafından kodlanan bir ksilanazın C-terminalinde prolince zengin bir diziyeye rastlanmıştır. Amino asit dizisine bağlı olarak GH10 ailesine mensup olduğu belirlenen bu enzimin sahip olduğu prolince zengin kuyruğun önemini belirlemek için, prolin kuyruk mutasyonla inaktif hale getirilmiş ve bu şekilde enzimin optimum sıcaklık ve pH'sının düştüğü, oluşan üründe de azalma olduğu gözlenmiştir. Yine koyun rumeninden elde edilen ve C terminalinde prolince zengin diziyi taşımayan *XynB*'ye mutasyon ile prolin kuyruk eklendiğinde, bu enzimin katalitik aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak prolin kuyruğun enzim aktivitesini ve kararlılığını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir (Li ve ark., 2014).

Proteinlerde prolince zengin bölgelerin hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunduğu, fonksiyonu çok iyi bilinmemekle beraber, proteinlerin aktivitesini olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Williamson, 1994). Örneğin, Huang ve arkadaşları (1996) fosfolipaz A2'nin C-terminalinde bulunan prolince zengin dizinin delesyonu ile enzimin substrat spesifitesinin ve substrata bağlanma özelliğinin azaldığını göstermişlerdir. Li ve arkadaşları (2009), *XynAS27*'de bulunan glisin-prolince zengin diziyi delesyon ile inaktif hale getirdiklerinde, enzimin optimum pH ve sıcaklık aralığının değiştiğini fakat katalitik etkinliğin değişmediğini görmüşlerdir. Wen ve arkadaşları (2005) 1,3-1,4-β-D-glukanaza ait prolin kuyruğun delesyonu ile enzim aktivitesi ve sıcaklık toleransının arttığını göstermişlerdir. Prolinin hidrofobik yüzeye sahip olma ve amid bağı oluşturma gibi karakteristik özellikleri düşünüldüğünde, iyi bir hidrojen bağı yapıcısı olduğundan peptit bağlarının oluşumunu artırdığı düşünülmektedir (Hurley ve ark.,1992; Nicholson ve ark., 1992).

1.8. Çalışmanın Amacı

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın amacı, daha önceki çalışmalarda Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı tarafından izolasyonu gerçekleştirilen *Anoxybacillus gonensis* PDF21 bakterisinin AgCWL enziminin

kısmi karakterizasyonun yapılması, aynı enzimin C terminaline His-kuyruk ve prolince zengin dizi içerecek şekilde AgCWL-Pro rekombinant proteini ile C terminaline His-kuyruk ve N terminaline kararlı ve yüksek sıcaklıkta çalıştığı bilinen *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı ribülokinaz enzimi (Rib) eklenerek oluşturulan Rib-AgCWL rekombinat proteinlerin karşılaştırmalı biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması ve AgCWL'nin optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlık parametrelerinin iyileştirmesidir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Yeast ekstrakt (Merck), NaCl (Merck), Trypton (Merck), Taq DNA polimeraz (Promega), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega), EDTA (Merck), X-Gal (Applichem), IPTG (Applichem), CaCl₂ (Aktar Kimya), CuSO₄ (Merck), Kanamisin (Applichem), Etil Alkol, Amfisilin (Applichem), *EcoRI* (Promega), *HindIII* (Promega), T4 DNA ligaz (NEB), BamHI (NEB), Jelden DNA Çıkarma Kiti (Fermentas) Na₂HPO₄ (Merck), Metilen mavisi (Merck), β-merkaptoetanol (Merck), Metanol (JT. Baker), Asetik asit (Sigma), Gliserol (Merck), Amonyom sülfat (Merck), TEMED (Janssen Chimica), Protein markır (Biolab), KCl (Merck), MgCl₂ (Sigma), LiCl (Sigma), CuCl₂ (Sigma), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck), Fosforik Asit (Merck), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck), Trizma Baz (Sigma), Akrilamid (Sigma), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu), NaOH (Merck), TEMED (Janssen Chimica), Peptidoglikan, *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich), KOH (Sigma-Aldrich), Metilen mavisi (Merck), Borik asit (Sigma), Sitrik asit (Merck), MOPS Buffer (Sigma), TALON[®] Metal affinity Resin (Takara) olmak üzere kullanılan kimyasallar, enzimler ve kitler belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Vektörler

Çalışmada kullanılan bakteri ve vektörler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan vektörler ve bakteri suşları

Bakteriler/ vektörler	Referans	Özellikler
<i>E. coli</i> K12 JM101	NEB – Laboratuvar stoğu	F', <i>traD36</i> , <i>proA+B+</i> , <i>lacIq, Δ(lacZ,)M15/Δ(lacproAB)</i> , <i>glnV</i> , <i>thi+</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen	F', <i>ompT</i> , <i>hdsSB</i> , (<i>rB⁻ mB⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), <i>pLysS</i> , <i>Cam^R</i>
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Sigma Aldrich	Hücre duvarı, substrat
pET28a (+)	Novagen	Yüksek ekspresyon seviyesi, T7 promotor, N terminal bölgesinde His*Tag [®] , <i>lacI</i> geni, <i>Kan^R</i> ve MCS (çoklu klonlama bölgesi)
pAC26RK	Tokgöz ve ark., 2014	pET28a klonlu Rib geni
pGEMT Easy I	Promega	Yüksek kopya sayısı, T7 ve SP6 RNA polimeraz promotorları, β-galaktosidaz enziminin α-peptid kodlama bölgesi içerisine yerleştirilmiş bir MCS (Çoklu Klonlama Bölgesi), 3'-T ucu ve <i>Amp^R</i>

2.1.3. Biyoinformatik Analizler

Çalışmada baz dizi analizlerinden elde edilen kromotogramların değerlendirilmesinde Chromas v2.4. programı kullanılmıştır. Elde edilen gen dizileri NCBI veri tabanındaki diğer genlerle NCBI Blast programı ile karşılaştırıldı (URL-3). Clustal Omega online programı ile, gen dizilerinin hizalaması yapıldı (URL-4). Nükleotit dizilerinin amino asit dizilerine çevirimi Expasy Bioinformatics Resource Portal online programı kullanıldı (URL-5). SnapGene®Viewer 3.3.4 ile vektör ve plazmit şekilleri çizildi.

Protein aminoasit sırası, protein benzerliklerinin ve özgün domainlerinin belirlenmesinde NCBI veritabanında bulunan Conserved Domain Database CDD sunucusundan faydalanıldı (URL-7). PyMOL Molecular Graphics System ile enzimin üç boyutlu yapısı çizildi.

2.2. Metot

2.2.1. Ribulokinaz / Hücre Duvarı Litik Enzimi (Rib-AgCWL) Füzyon Proteininin Oluşturulması

2.2.1.1. Hücre Duvarı Litik Enzim Geninin PCR ile pET-Lyz'den Çoğaltılması

AgCWL, daha önceden laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda *Anoxybacillus gonensis* PDF21 suşundan spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış, pET-28a(+) vektörüne klonlanarak *E. coli* JM101 suşuna transform edilmiştir. *E. coli* JM101 suşundan izole edilen pET-Lyz vektörü kalıp olarak kullanılarak, LmtFuz-R ve RibLmt-F primerleri (Tablo 3) ile PCR gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 94°C'de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C'de 30 sn denatürasyon, 54°C'de 60 sn bağlanma (annealing) ve 72°C'de 70 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan fragmentler, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bunun sonucu olarak 597 bp'lik *AgCWL*'nin tamamının elde edildiği belirlendi.

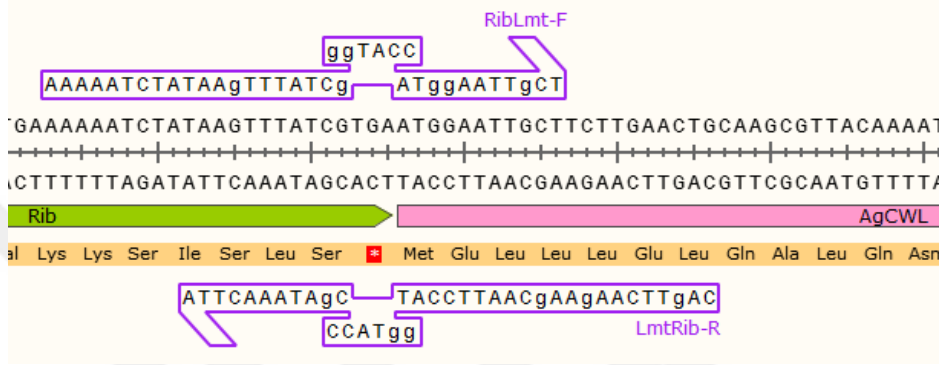
Tablo 3. *Rib* ve *AgCWL*'nin füzyonunda kullanılacak primerlerin nükleotit dizilimi. (Altı çizili bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini göstermektedir.)

Primer Adı:	Primer Sırası:
LmtFuz-R	5'-CgggATCCTCAAACgATgTgACTTgC-3'
RibLmt-F	5'-AAAAATCTATAAagTTTATCgggTACCATggAATTgCT-3'
LmtRib-R	5'-CAgTTCAAagAAgCAATTCCATggTACCCgATAAACTTA-3'
RibikF	5'-CgCTAgCATggggAAAAAgTATgTCATTgg-3'

2.2.1.2. Ribulokinaz Geninin PCR Yöntemi ile pAC26RK'dan Çoğaltılması

Anoxybacillus kestanbolensis AC26 Sarı suşuna ait Ribulokinaz (Rib) geni laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda pAC26RK vektörü içerisine klonlanarak karakterize edilmiş ve literatüre kazandırılmıştır (Tokgöz ve ark., 2014). *E. coli* JM101 suşundan izole edilen pAC26RK plazmiti kalıp olarak kullanılarak, RibikF ve LmtFuz-R primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 94°C'de 3

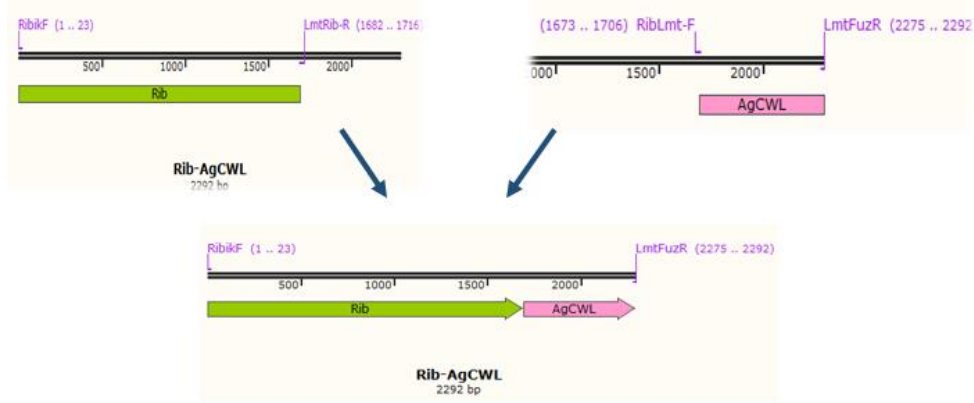
dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü, 94°C’de 30 sn denatürasyon, 58°C’de 60 sn bağlanma (annealing) ve 72°C’de 85 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C’de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR Reaksiyonu sonucunda oluşan fragmentler 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7’lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. 1827 bç’lik ribülokinaz geninin tamamının elde edildiği belirlendi.



Şekil 8. *Rib* ve *AgCWL*’nin füzyonu için dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimi. RibLmt-F ve LmtRib-R primerleri, büyük oranda birbirine komplementer olup daha sonra gerekli olduğunda iki genin ayrılabilmesini sağlayacak bir restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi (KpnI) içermektedir.

2.2.1.3. *AgCWL* ve *Rib* Fragmentlerinin Birleştirilmesi

RibLmt-F primeri, *AgCWL*’nin 5’ ucuna ve *Rib*’nine 3’ ucuna spesifik olarak dizayn edilmiş olup, her iki fragmentin birleştirilmesinde kullanılmıştır (Şekil 8). PCR’da, daha önce elde edilmiş *AgCWL* ve *Rib* fragmentleri kalıp olarak kullanılmıştır. Aynı reaksiyonda 3 primer (RibikF ve RibLmt-F ve LmtFuz-R) aynı anda kullanılarak *Rib* geninin 3’ ucuna *AgCWL* eklenmiş ve iki genin birleştirilmesi sağlanmıştır (Şekil 9). PCR şartları şu şekildedir: 94°C’de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C’de 45 sn denatürasyon, 57,5°C’de 40 sn bağlanma (annealing) ve 72°C’de 150 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C’de 7 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan fragmentler 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7’lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bunun sonucu olarak 2424 bç’lik füzyon geninin tamamının elde edildiği belirlendi.



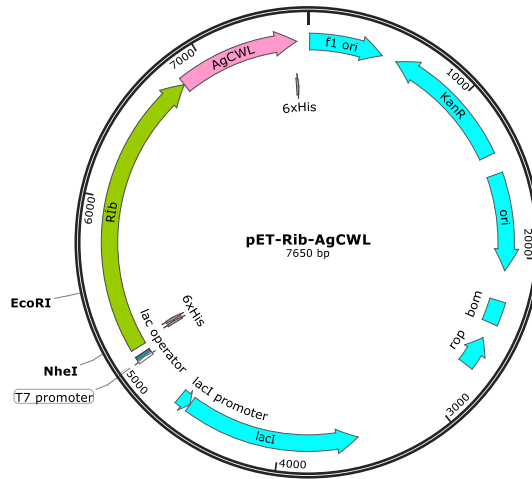
Şekil 9. Rib ve AgCWL genlerinin PCR ile füzyon yöntemi

2.2.1.4. Rib-AgCWL Füzyon Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

PCR ile çoğaltılan gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın belirttiği şartlarda (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T Easy vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA Ligaz), 16 °C’de bir gece inkübe edilerek ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü, kompetent olarak hazırlanan *E. coli* JM101 hücresine CaCl₂ metoduyla transforme edildi. Transformasyon işlemi şu şekilde gerçekleştirildi: 200 µl kompetent hücre içeren tüpe 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 42°C ısıtıcı blokta 2 dakika şoklanarak plazmitin hücre içine girmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37°C’de iki saat bekletildikten sonra LBA petrilere (50 µg/ml ampisilin içeren) yayılarak 37°C’de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon öncesinde LBA petrilere eklenen X-gal ve IPTG vasıtası ile mavi-beyaz koloni oluşması sağlandı. Transformasyon sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve ark. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi ve agaroz jelde yürütüldü. İzole edilen plazmitler *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesildi ve kesim sonuçları agaroz jelde kontrol edildi. *EcoRI* kesim şartları; 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37°C’de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Klon olduğu tesbit edilen rekombinant plazmitler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edildi.

2.2.1.5. Rib-AgCWL'nin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Rib-AgCWL füzyon genini taşıdığı belirlenen rekombinant pGEM-T Easy vektörü ve bu vektörden çıkarılacak fragmentin klonlanacağı pET-28a(+) ekspresyon vektörü, *NheI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazları ile firmaların önerdiği şartlar altında kesildi. Aynı yapışkan uçlara sahip *Rib-AgCWL'nin* ve pET-28a(+) vektörü %0,7'lik agaroz jelde yürütülerek jelden kesilip alındı ve Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) ile temizlendi. Temizlenen Rib-AgCWL füzyon geni ve pET-28a(+) vektörü, DNA ligaz enzimi ile firmanın önerdiği şartlar altında yapıştırıldı. Elde edilen ligasyon ürünü önce *E. coli* JM101 hücresine CaCl_2 metoduyla transforme edildi. pET28a (+) vektörü kanamisin dirençli olduğu için transformasyondan sonra hücreler 1 mg/ml kanamisin içeren LBA'lı petriye yayıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Transformasyon sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edilerek *NheI/BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve kesim ürünleri agaroz jelde kontrol edildi. Klon olduğu tespit edilen rekombinant plazmitler *E. coli* BL21(DE3) pLys hücresine transforme edildi. Oluşturulan bu plazmite pET-Rib-AgCWL adı verildi (Şekil 10). Enzim aktivitesinin olup olmadığını transformant *E. coli* BL21'den enzim izolasyonu yapılarak, AgCWL aktivitesi tayini ile kontrol edildi. AgCWL aktivitesi görüldükten sonra enzim karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.



Şekil 10. pET-Rib-AgCWL vektörü.

2.2.2. AgCWL-Pro Füzyon Proteininin Oluşturulması

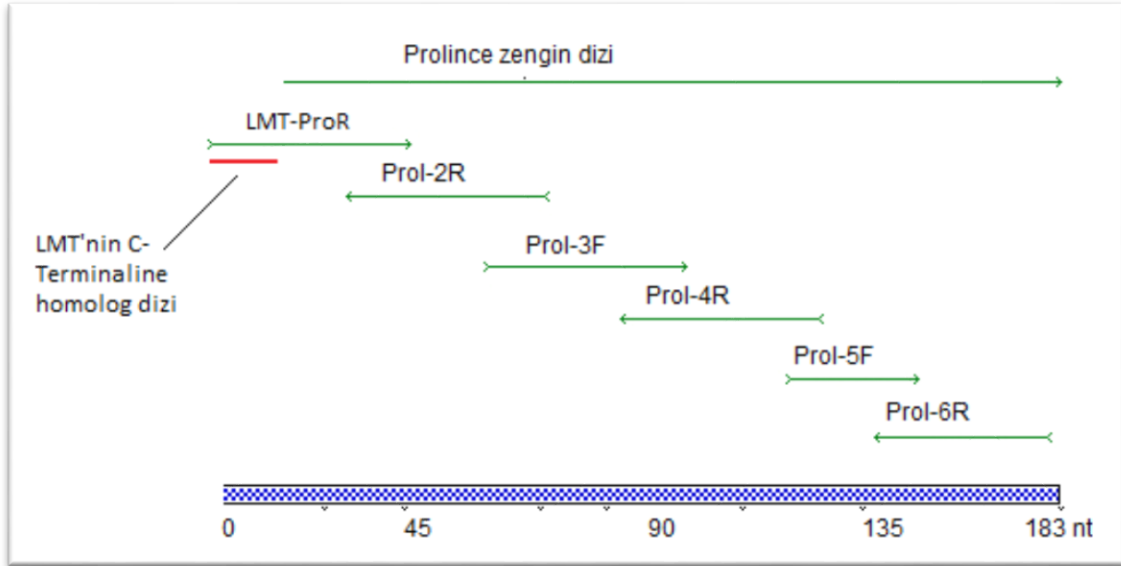
2.2.2.1. Prolince Zengin Dizinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Anoxybacillus gonensis PDF21 hücre duvarı litik enzim geninin, *XylA* ait prolince zengin dizi ile füzyon yapılabilmesi için Tablo 4’de belirtilen spesifik primerler dizayn edildi. Prolince zengin dizinin, *AgCWL* ’nin 3’ ucuna eklenebilmesi için *AgCWL* ’nin son 15 bazlık kısmı, ileri primerin (LMT-ProR) 5’ ucuna homolog olacak şekilde tasarlandı (Şekil 11). Dizayn edilen primerlerin belirlenen bölgelerine restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri (*BamHI*) eklendi.

Tablo 4. Prolince Zengin Dizinin çoğaltılmasında kullanılacak primerlerin nükleotit dizilimi (altı çizili bölgeler restriksiyon tanıma bölgelerini göstermektedir).

Primer Adı	Primer Sırası
LMT-ProR	5'- TgCCgCCgCTTTCATAACgATgTgACTTgC -3'
Prol-1F	5'-ATgAAAgCggCggCATggCCCATCCCCgAgAAACCgAAACCCAACC-3'
Prol-2R	5'- CgCCACgACggCgCTgACgCTgCTggTTggggTTgggTTTCggTT-3'
Prol-3F	5'- AgCgCCgTCgTggCggATTTggCggTCCACAgCgTCCTCCTTTCA-3'
Prol-4R	5'- CAggTTgCTCggCgAAAgCCAgtgCgggATTgAAAggAggACgCT-3'
Prol-5F	5'- TCgCCgAgCAACCTggCgTgAAAgAggATTTCgTgCCCTCTgAgC-3'
Prol-6R	5'- cgc <u>ggATCC</u> CTATCCAggCTggTTgAgCTCAgAgggCACgA -3'
Lyz_RibF	5' -CgC <u>ggATCC</u> ATggAATTgCTTCTTgAAC- 3'

Dizayn edilen spesifik primerlerin homolog bölgelerinin birbirleriyle çakışmasından yararlanılarak, kalıp kullanılmadan LMT-ProR, Prol-1F, Prol-2R, Prol-3F, Prol-4R, Prol-5F ve Prol-6R primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 94°C’de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C’de 30 sn denatürasyon, 61°C’de 60 sn bağlanma (annealing) ve 72°C’de 1,25 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C’de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan fragmentler 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7’lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. 188 bç’lik prolince zengin dizinin elde edildiği belirlendi.



Şekil 11. Prolince zengin dizinin PCR ile çoğaltılması.

2.2.2.2. *AgCWL*'nin PCR ile pETLyz'den Çoğaltılması

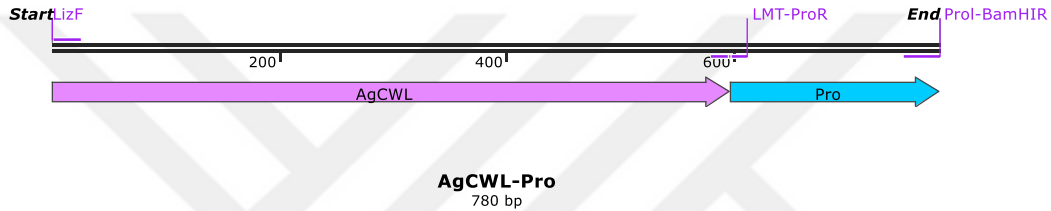
E. coli JM101 suşundan izole edilen pET-Lyz plazmiti kalıp olarak kullanılarak LMT-ProR ve Lyz_RibF primerleri (Tablo 4) ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR reaksiyon şartları şu şekildedir: 94°C'de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C'de 30 sn denatürasyon, 60°C'de 60 sn bağlanma (annealing) ve 72°C'de 70 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan fragmentler 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bunun sonucu olarak 597 bç'lik *AgCWL*'nin tamamının elde edildiği belirlendi.

2.2.2.3. *AgCWL* ve Prolince Zengin Dizinin Birleştirilmesi

LMT-ProR primeri *AgCWL*'nin 3' ucuna ve Prolince zengin dizinin 5' ucuna komplementer olacak şekilde dizayn edilmiş olup, her iki fragmentin birleştirilmesinde kullanılmıştır. PCR ile önceden çoğaltılmış *AgCWL* ve Prolince zengin dizi fragmentleri kalıp olarak kullanılmıştır. Aynı reaksiyonda 3 primer (LMT-ProR, Lyz_RibF, ProI-6R) aynı anda kullanılarak *AgCWL*'nin 3' ucuna Prolince zengin dizi eklenmiş ve iki genin birleştirilmesi sağlanmıştır (Şekil 12). PCR şartları şu şekildedir: 94°C'de 3 dakikalık

denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C’de 45 sn denatürasyon, 57,5°C’de 40 sn bağlanma (annealing) ve 72°C’de 150 sn uzama (extension) ve son olarak da 72°C’de 7 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan fragmentler 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7’lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bunun sonucu olarak 780 bç’lik füzyon genin tamamının elde edildiği belirlendi.

Created with SnapGene®



Şekil 12. *AgCWL* ve *Pro*'nun PCR ile füzyonu

2.2.2.4. *AgCWL-Pro* Füzyon Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

PCR ile çoğaltılan gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın önerdiği şartlarda (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T Easy vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA Ligaz), 16 °C’de bir gece boyunca ligasyona tabi tutularak gerçekleştirildi. Ertesi gün elde edilen ligasyon ürünü, kompetent olarak hazırlanan *E. coli* JM101 hücrelerine CaCl₂ metoduyla transforme edildi ve transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Klon olduğu tespit edilen rekombinant plazmitler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 C° de muhafaza edildi.

2.2.2.5. *AgCWL-Pro* Füzyon Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

AgCWL-Pro füzyon genini taşıdığı belirlenen rekombinant pGEM-T Easy vektörü ile pET28a (+) ekspresyon vektörü *Bam*HI restriksiyon endonükleazı ile kesildi. Aynı yapışkan uçlara sahip *AgCWL-Pro* füzyon fragmenti ve pET-28a(+) vektörü %0,7’lik agaroz jelde

yürütülerek jelden kesilip alındı ve Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) ile firmanın önerdiği koşullar doğrultusunda temizlendi. Temizlenen LMT-Pro füzyon geni ve pET-28a(+) vektörü, DNA ligaz enzimi ile ligasyona tabi tutuldu. Ligasyon sonucu oluşturulan rekombinant vektöre pET-AgCWLPro adı verildi. Elde edilen ligasyon ürünü önce *E. coli* JM101 hücresine CaCl₂ metoduyla transforme edildi. Transformasyon sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildi ve *Bam*HI restriksiyon enzimiyle kesildi. Kesim sonuçları agaroz jelde kontrol edildi. Klon olduğu tespit edilen rekombinant plazmitler, *E. coli* BL21 (DE3) pLys hücresine transform edildi. Enzim aktivitesi olup olmadığını transformant *E. coli* BL21 hücresinden enzim izolasyonu yapılarak, AgCWL aktivitesi tayini kontrol edildi. AgCWL aktivitesi tespit edildikten sonra, enzim karakterizasyon çalışmalarına başlandı.

2.2.3. Protein Ekspresyonu ve Saflaştırılması

2.2.3.1. AgCWL, Rib-AgCWLve AgCWL-Pro Gen Ürünlerinin Ekspresyonu

Enzim üretimi için AgCWL, Rib-AgCWLve AgCWL-Pro genlerini taşıyan vektörleri içeren *E. coli* BL21 hücrelerinin gece kültürlerinden ayrı ayrı sıvı LB besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze kültürler ekildi. Taze kültür O.D.'si 0,6-0,9 oluncaya kadar inkübe edilerek 1 mM IPTG ile indüklendi ve 3,5-4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü.

2.2.3.2. Hücre Ekstraktının Elde Edilmesi

Elde edilen pellet, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde çözülerek %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edildi. Elde edilen hücre solüsyonu, 14.800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak, proteini içeren süpernatant alındı. Elde edilen süpernatantın saflaştırılması aşamasına geçildi.

2.2.3.3. AgCWL, Rib-AgCWLve AgCWL-Pro Proteinlerinin Saflaştırılması

2.2.3.3.1. Isı Şoku Uygulaması

İstenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması için elde edilen kaba ekstrat, 15 dk süreyle 65°C’de bekletildi. Bekletildikten sonra 15 dk 14.800 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüjden sonra süpernant alınarak çöken kısım uzaklaştırıldı.

2.2.3.3.2. Kobalt-Afinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma

AgCWL, Rib-AgCWLve AgCWL-Pro proteinlerinin saflaştırılması, sırasıyla C-terminaline (AgCWL, Rib-AgCWL) ve N-terminaline (AgCWL-Pro) ilave edilen HisTaq kuyruğundan yararlanılarak, kobalt (Co⁺²) içeren bir saflaştırma kiti olan TALON[®]Metal Affinity Resin (Takara) vasıtasıyla, firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi. Tampon içerikleri Tablo 5’de belirtilmiştir. 1-2 mL Co⁺² bağlı His-boncukları, 10 mL yıkama tamponu ile 15 mL’lik falkon tüp içerisinde 3 kez yıkanarak pH adaptasyonu sağlandı. Ardından proteinler ayrı ayrı (4 mL) His-boncukları içeren falkon tüplere transfer edilerek yıkama tamponu ile son hacim 15 mL’ye tamamlandı. En az 2 saat düşük hızda alt üst edilerek dikkatlice çalkalandı. İnkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen santrifügasyonu takiben süpernatant pipetör yardımı ile uzaklaştırıldı. His-boncukları en az 3 kez yıkama tamponu ile yıkanarak bağlanmamış ilgisiz proteinler elimine edildi. Elüsyon basamağına geçmeden önce yıkama tamponu, His-boncuklardan pipetör yardımı ile tamamen uzaklaştırıldı. Elüsyon tamponu kullanılarak, bağlanmış proteinlerin ayrılması sağlandı. SDS-PAGE’de proteinlerin saflığı kontrol edilerek +4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 5. Kobalt-Afinite Kromatografisinde kullanılan tamponlar.

Tampon	NaH ₂ PO ₄ (mM)	NaCl (mM)	İmidazol (mM)	pH
Liziz	50	300	10	7
Yıkama	50	300	20	7
Elüsyon	50	300	250	7

2.2.3.3.3. Küçük Moleküllerin Diyalizle Uzaklaştırılması ve Proteinlerin Konsantre Edilmesi

Kobalt-Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan proteinlerden metal iyonları, imidazol ve tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Uygun boyutta kesilen diyaliz membranı (Sigma-Aldrich), 1mM EDTA içeren %20'lik gliserol çözeltisinde 1-2 dk kaynatıldı. Saf su ile yıkandıktan sonra saflaştırılan protein çözeltisi bir pipet yardımıyla membrana aktarıldı ve en az 10 katı hacimde diyaliz tamponu (50 mM MOPS AgCWL için pH 6,5 AgCWL-Pro için pH 7) içerisinde diyalize bırakıldı. Diyaliz tamponu bir kez yenilenerek, +4°C'de 1 gece magnetik karıştırıcıda karıştırılarak bekletildi. İşlem tamamlandıktan sonra diyaliz membranı içindeki proteinler temiz bir tüpe alınarak, 14.800 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve bozulan (denatüre olan) proteinlerin pellet ile uzaklaştırılması sağlandı.

2.2.3.3.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde, %15'lik SDS-PAGE jeli kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. AgCWL, Rib-AgCWL ve LMT-Pro proteinlerinin moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzimler, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı (NEB, P7710S) ile birlikte SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütüldü. Uygulamada her bir örnekten 50 µg protein kullanıldı. Her bir örneğin üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 SDS; %20 Gliserol; %6 β-merkaptolanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %15'lik SDS-PAGE yüklendi. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, %10 Asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solüsyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

2.2.4.1. Zimogram

Zimografik analizler Bernadsky ve ark. (1994) ve Watt ve Clarke (1994)'in protokolleri temel alınarak uygulandı. Bu yöntemde, liyofilize edilmiş *Micrococcus lysodeikticus* hücreleri (substrat), SDS-PAGE ayırma jeli içerisine katıldı. SDS-PAGE'de yürütülen proteinler, renatüre edildikten sonra metilen mavisi ile muamele edildi. CWL aktivitesi ile *Micrococcus lysodeikticus* 'da bulunan PG parçalandığında bu alanlarda boyanın uzaklaştırılması daha kolay olacaktır. Bu nedenle yıkamanın ardından jelde görülen açık renkli bölgeler, PG' nin parçalandığını yani enzim aktivitesinin var olduğunu gösterir.

Bu işlemde %0,3 *Micrococcus lysodeikticus* 50 mM MOPS tamponu pH 7,0 içinde sonike edildikten sonra, %12'lik poliakrilamid jel içine eklendi. Uygulamada her bir örnekten 50µg protein kullanıldı. her bir örneğin üzerlerine eşit miktarlarda muamele tamponu (10mM DTT, 100 mM Tris-HCl tamponu pH 6,5, %1 SDS, %6 Sükroz, %0,0025 Bromofenol blue) ilave edildive sonrasında 100°C'de 4 dk bekletilerek, Maniatis ve ark. (1982) tarafından tanımlanan %12'lik SDS-PAGE yüklendi. Ardından jel, 18 mA'de yürütüldü. Jel durulandıktan sonra, SDS'i uzaklaştırmak amacı ile 30 dk. oda sıcaklığında saf suda inkübe edildi. Devamında oda sıcaklığında 30 dk renatürasyon tamponunda (25 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 6,5) inkübasyona bırakıldı. Renatürasyon tamponu tazelenerek, 40°C'de lizis bantları belirgin hale gelinceye kadar inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonrası, jel saf suyla yıkandı ve oda sıcaklığında 2 saat boyandı (%0,1 metilen mavisi, %0,01 KOH). Ardından jel, aktivite bantları belirginleşene kadar su ile yıkandı. Pozitif kontrol olarak lizozim (10–20 µg) kullanıldı.

2.2.4.2. Türbidimetrik Analiz

Hash'in türbidimetrik analizi (1967), otolitik enzimlerle PG'nin degradasyonuna dayanan ve solusyondaki bulanıklığın azalmasına bağlı olarak enzim aktivitesinin varlığını gösteren bir yöntemdir.

Litik aktiviteyi değerlendirmek için *Micrococcus lysodeikticus* hücre duvarı (Sigma-Aldrich) substrat olarak kullanılarak türbidimetri deneyi gerçekleştirildi. *M. lysodeikticus*, 50 mM MOPS tamponu (pH 6,5-7,0) içerisinde sonike edildi. Reaksiyon şartları şu şekilde

gerçekleştirildi: 0,35 mg/ml substrat içeren 200 µl 50 mM, pH 6,5-7,0 MOPS tamponu içerisine 0,5 mg/ml enzim ilave edilerek, optimum sıcaklıkta 30 dk. inkübe edildi (Fibriansah ve ark., 2012). Pozitif kontrol olarak lizozim kullanılırken, negatif kontrolde enzim bulunmamaktadır. Tüm aktivite ölçümleri 96 kuyulu mikroplate reader (SpectraMax M5)'da 600 nm absorbansta gerçekleştirildi

2.2.4.3. Petri Deneyi

Lizozim ve benzeri enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan geleneksel yöntemlerde karşılaşılan zorluklardan dolayı, petri deneyi (lyso-plate) geliştirilmiştir. Bu yöntemde substrat (lizozim ve AgCWL için substrat *Micrococcus lysodeikticus*'dur) 50 mM MOPS tamponu pH 6,5-7,0 içerisinde çözülerek eritilmiş agaroz içerisine karıştırılarak petriye döküldü. Agaroz katılaştıktan sonra enzim eklenmesi için, yaklaşık 2 mm çapında kuyucuklar açıldı ve enzim bu kuyucuklara inoküle edilerek uygun sıcaklıkta 12-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kuyucukların etrafında oluşan şeffaflaşmış zon, enzim aktivitesinin varlığını gösterir. Aktivite zonunun ölçülmesi ile enzim aktivitesinin miktarı da belirlenebilmektedir (Minagawa ve ark., 2001).

2.2.5. AgCWL, Rib-AgCWLve AgCWL-Pro Proteinlerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.2.5.1. Optimum Sıcaklık

Enzimlerin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri sırasıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C' ye ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirilen 50mM MOPS tamponu pH 7,0 içerisinde 30 dk'lık seri reaksiyonlar sonucu belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri sonraki çalışmalarda inkübasyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.2.5.2. Optimum pH

Enzim aktivitesine pH'nın etkisini incelemek üzere, pH 5,0- 5,5 için 50 mM sitrat tamponu, pH 6,0- 6,5- 7- 7,5 için 50 mM MOPS tamponu, pH 8,0- 8,5- 9,0 için 50 mM Tris-

HCl ve pH 9,5- 10 için 50 mM glisin tamponları kullanıldı (reaksiyon süresi 30 dk). Belirlenen optimum pH aktivite değerleri daha sonra kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

2.2.5.3. Metal İyonlarının Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini belirleyebilmek için öncelikle AgCWL ve AgCWL-Pro enzimleri 1mM EDTA ile 5 dk inkübe edildi. Sonra, optimum şartlarda enzim reaksiyonunun içerisinde 1 mM'lık MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, LiCl ve KCl gibi çeşitli metal iyonları ilave edilerek belirlendi. İçerisinde metal iyonu ve kimyasal bulundurmeyen kontrol reaksiyonunun aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Reaksiyonlar, spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü ve kalna aktivite hesaplandı.

2.2.5.4. Isıl Kararlılığı

Enzim kararlılığına ısının etkisini incelemek için saflaştırılan enzimler AgCWL için 50 mM MOPS tamponu pH 6,5 ve AgCWL-Pro için 50 mM MOPS tamponu pH 7,0 kullanılarak, belirli zaman aralıklarında (0. dk ve 1-10. Gün) +4°C, 25°C, 45°C, 50°C, 65°C, ve 75°C 'de inkübe edildi. Reaksiyonlar, spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi.

2.2.5.5. pH Kararlılığı

pH kararlılığını belirlemek için saf enzim çözeltisi, pH 5-5,5 sitrat tamponu (50 mM); pH 6-6,5-7,0-7,5 MOPS tamponu (50 mM); pH 8-8,5-9 Tris-HCl tamponu (50 mM) ve pH 9,5 için glisin (50 mM) tamponlarında oda sıcaklığında inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden numune alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi.

2.2.5.6. Tuz Konsantrasyonunun Enzim Üzerine Etkisi

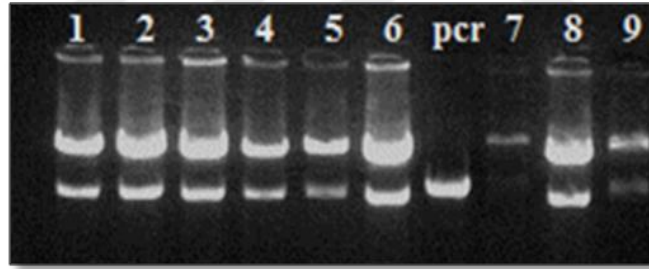
Enzim aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek için optimum şartlarda, enzim reaksiyonunun içerisinde 5-10-20-30-40-50-100-150-200-250-300 mM NaCl ilave edildi. İçerisinde tuz bulunmayan kontrol reaksiyonunun aktivitesi %100 olarak kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. *Rib-AgCWL*'nin Baz Diziliminin Belirlenmesi

Rib-AgCWL geninin baz dizilimini belirlemek amacıyla, ilk olarak *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisinin ribulokinaz genini içeren pAC26RK plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak ribulokinaz geni ve *Anoxybacillus gonensis* *AgCWL* içeren pET-Lyz plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, *AgCWL* PCR ile çoğaltıldı. Uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile bu iki gen birleştirildi ve pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı (Şekil 13). Elde edilen 2400 bç'lik füzyon geninin baz dizileri belirlendi (Macrogen, Hollanda) ve Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı. Sonuçta genin ilk 1827 bç'lik kısmın ribulokinaz genine, geri kalan 597 bç'lik kısmın ise *AgCWL* genine tekabül ettiği görüldü. Elde edilen baz dizilimi Ek.1'de verilmiştir.

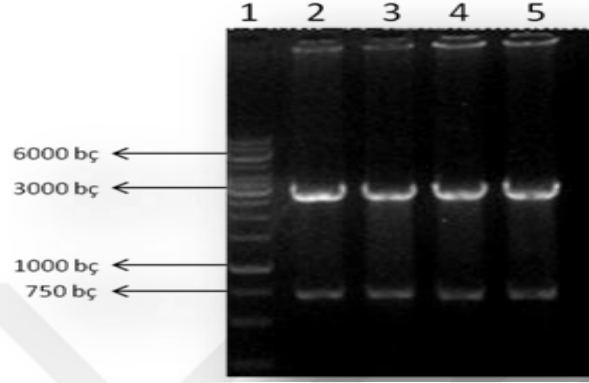


Şekil 13. *Rib-AgCWL*'yi taşıyan pGEM-T Easy rekombinantlarının *EcoRI* endonükleazı ile kesim sonucu, 1-9: *EcoRI* endonükleazı ile kesimi yapılan rekombinant plazmitler, PCR: Kontrol olarak *Rib-AgCWL* PCR fragmenti.

3.2. *AgCWL-Pro* Füzyon Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

AgCWL-Pro'nin baz dizilimini belirlemek amacıyla, ilk önce pET-Lyz plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak *AgCWL* PCR ile çoğaltıldı. Prolince zengin dizinin çoğaltılması için ise kalıp kullanılmadan Lmt-ProR, Prol-1F, Prol-2R, Prol-3F, Prol-4R, Prol-5F ve Prol-6R primerleri ile PCR gerçekleştirildi ve 183 bç'lik prolin kuyruk elde edildi. Uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile bu iki gen fragmenti birleştirildi ve pGEM-T Easy klonlama vektörüne aktarıldı (Şekil 14). Dizin analizi sonucu

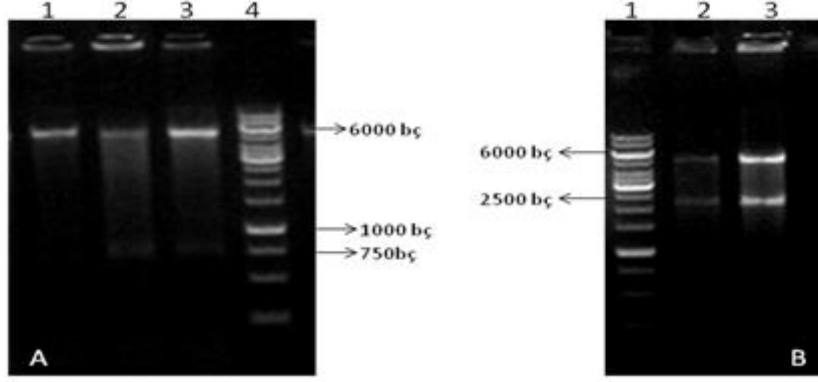
elde edilen veriler Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington DC) verilerle karşılaştırıldı ve elde edilen DNA bölgesinin 5' ucundaki 597 bç'lik kısmın *AgCWL* genine, geri kalan 3' ucundaki 183 bç'lik kısmın da proline zengin diziye tekabül ettiği belirlendi. Elde edilen baz dizilim Ek.2' de verilmiştir.



Şekil 14. *AgCWL-Pro* genlerinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması *AgCWL-Pro* genini taşıyan pGEM-T rekombinantlarının *EcoRI* endonükleazı ile kesim sonucu, 1: DNA Markır, 2-5: *EcoRI* endonükleazı ile kesimi yapılan rekombinant plazmitler.

3.3. *Rib-AgCWL* ve *AgCWL-Pro* Füzyon Genlerinin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

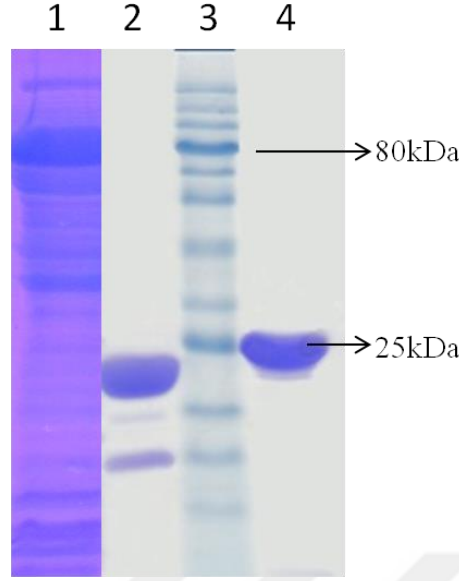
NheI ve *BamHI* restriksiyon enzimlerine ait tanıma bölgelerini taşıyan *Rib-AgCWL* geni, bu enzimler kullanılarak uygun koşullarda pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanırken, 5' ve 3' uçlarında aynı tanıma bölgesini (*BamHI*) taşıyan *AgCWL-Pro* füzyon geni de yalnızca *BamHI* restriksiyon enzimi kullanılarak pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı (Şekil 15). Elde edilen rekombinant vektörler ayrı ayrı *E. coli* BL21 (DE3) pLys suşuna transform edildi.



Şekil 15. *Rib-AgCWL* ve *AgCWL-Pro* genlerinin pET-28a(+) vektörüne klonlanması. A 1: *Bam*HI restriksiyon endonükleazı ile lineer hale getirilen pET28a(+) vektörü 2-3: *Bam*HI restriksiyon endonükleazları ile kesilen *pET-AgCWL-Pro* 4: DNA Markır. B 1: DNA Markır 2-3: *Bam*HI restriksiyon endonükleazı ile kesilen *pET-RibAgCWL* 3: Kontrol olarak kullanılan *AgCWL-Pro* PCR fragmenti (777 bç).

3.4. Protein Ekspresyonu ve Saflaştırması

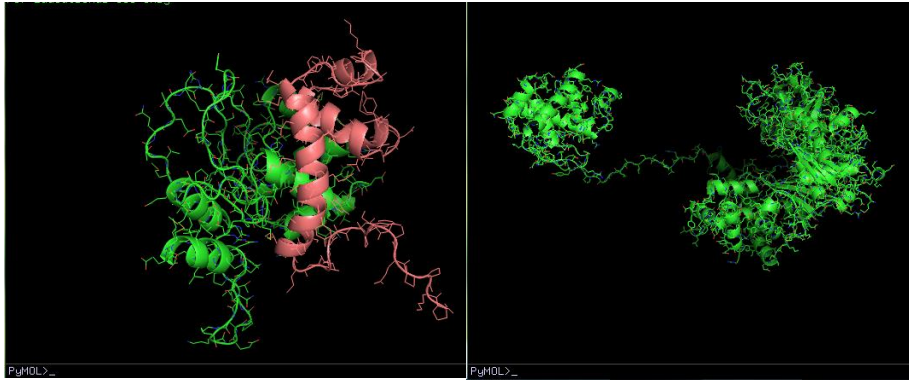
E.coli BL21 (DE3) pLys hücrelerine transform edilen *AgCWL*, *AgCWL-Pro* ve *Rib-AgCWL* genlerinin uygun şartlarda ekspresyonu sağlanarak hücre özütü elde edildi. Ardından ısı şoku uygulaması ile ekstrakta bulunan ve *E. coli* hücrelerine ait ısıl kararlı olmayan proteinler denatüre edildi. Son olarak proteinlerde bulunan HisTaq kuyruğu aracılığıyla TALON[®]Metal Affinity Resin (Takara) saflaştırma kiti yardımı ile enzimler saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimler, SDS-PAGE’de yürütülerek enzimlere ait protein bantları gösterildi. ExPASy programı (URL-5) ile proteinlere ait amino asit dizileri kullanılarak *AgCWL* proteininin 22,24 kDa, *Rib-AgCWL*’nin 84,33 kDa ve *AgCWL-Pro*’nun da 29,37 kDa olduğu belirlendi. Protein markır ile birlikte gerçekleştirilen SDS-PAGE analizinde saflaştırılan proteinlerin moleküler ağırlıklarınının beklendiği gibi olduğu görüldü. *AgCWL* enziminin bulunduğu kuyuda ekstra 15-20 kDa büyüklüğünde bir banta rastlanmıştır (Şekil 16). Bu bantın, post traslasyonel modifikasyondaki varyasyonlar veya degradasyon sonucu oluştuğu düşünülmektedir (URL-6).



Şekil 16. AgCWL, AgCWL-Pro ve Rib-AgCWL proteinlerinin SDS-PAGE analizi 1: Rib-AgCWLfüzyon proteininin kaba ekstraktı, 2: His tag kuyruğu ile saflaştırılmış AgCWL proteini, 3: protein marker, 4: His tag ile saflaştırılmış AgCWL-Pro füzyon proteini.

3.5. AgCWL-Pro ve Rib-AgCWL Proteinlerinin Üç Boyutlu Yapısı

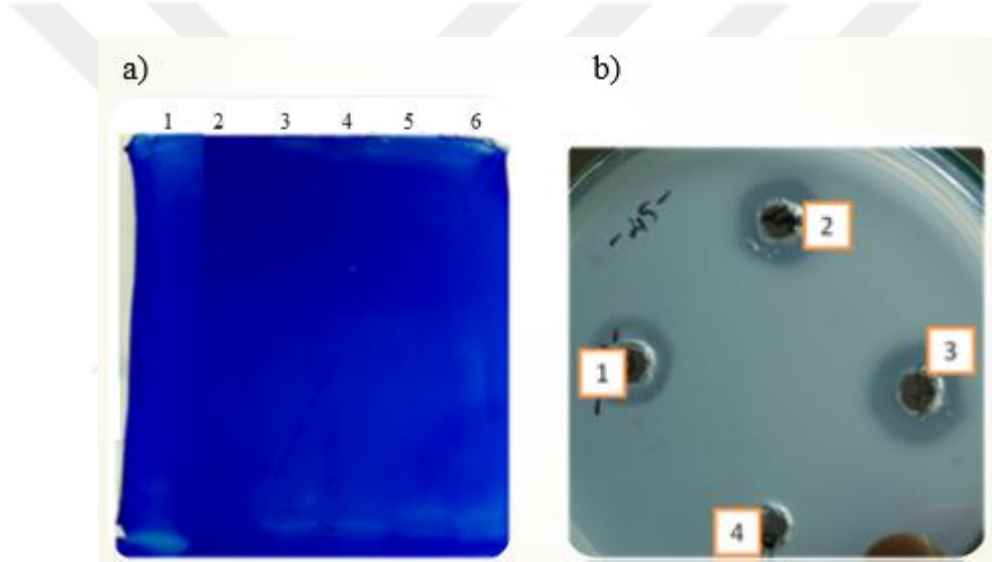
E. coli BL21 (DE 3) hücresine transform edilerek ekspresyonu sağlanan proteinlerin amino asit dizileri ExPASy programı kullanılarak belirlendi ve bu diziler vasıtası ile her bir proteinin üç boyutlu yapısı oluşturuldu. Proteinlerin üç boyutlu yapısı PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) programı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 17).



Şekil 17. Füzyon proteinlerin 3 boyutlu yapıları (a) *AgCWL-Pro* proteini pembe renkli kısım prolin kuyruğu göstermektedir. (b) Rib-AgCWL füzyon proteini

3.6. Enzim Aktivitesinin Zimogram ve Petri Deneyi ile Belirlenmesi

AgCWL, AgCWL-Pro ve Rib-AgCWL'nin litik aktivitesi, zimogram ve petri deneyi ile tespit edildi. AgCWL enzimi için substrat olarak *Micrococcus lysodeikticus* bakterisinin kullandığı bu iki yöntemde, yaban AgCWL, rekombinant AgCWL-Pro ve Rib-AgCWL proteinlerine uygulandığında, Rib-AgCWL enziminde aktivite görülmezken, AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin aktivite verdiği görüldü. Jel görüntüsü Şekil 18a'da gösterildiği gibi enzimin substratı parçaladığı bölgeler açık renkli olarak görüntülendi. Petri deneyi sonucunda Şekil 18b'de gösterildiği gibi kuyucukların etrafında oluşan şeffaf zon ile enzim aktivitesi görüldü.



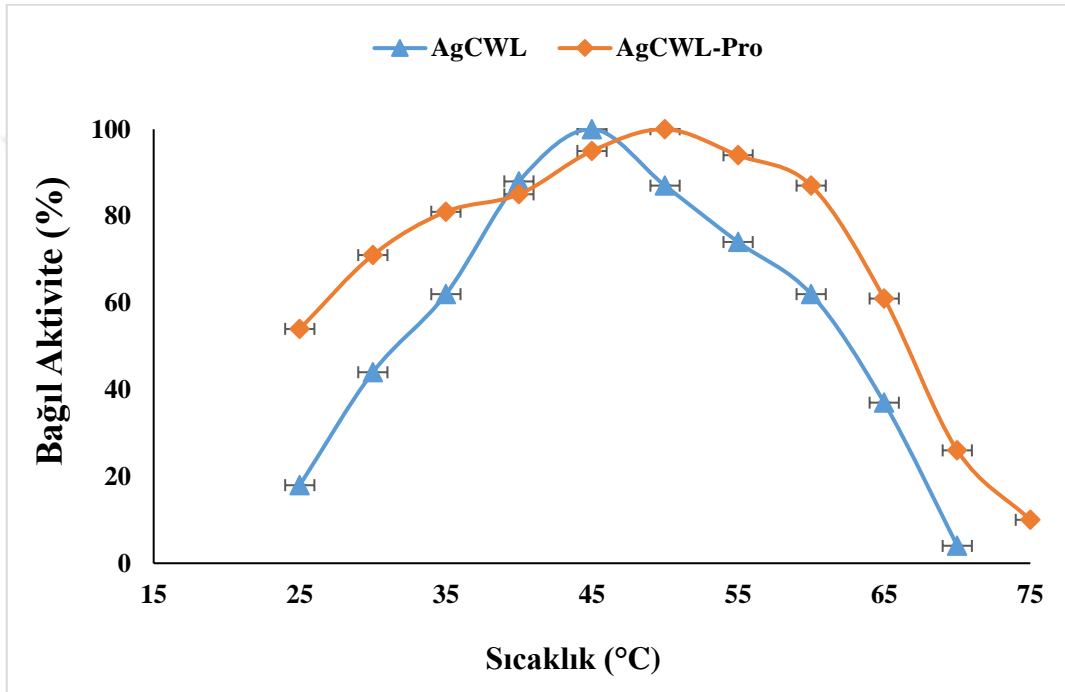
Şekil 18. AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin zimogram görüntüsü ve petri deneyi a). 1: pozitif kontrol lizozim 10 mg/ml, 2: boş kuyu, 3-4: AgCWL 10 mg/ml, 5-6: AgCWL-Pro 10 mg/ml, b) Petri deneyi 1: pozitif kontrol (Lizozim), 2: AgCWL, 3: AgCWL-Pro, 4: negative kontrol BSA.

3.7. AgCWL ve AgCWL-Pro Enzimlerinin biyokimyasal Karakterizasyonu

Rib-AgCWL enziminde aktiviteye rastlanmadığı için karakterizasyon çalışmalarına AgCWL ve AgCWL-Pro enzimleri ile devam edildi.

3.7.1. Optimum Sıcaklık

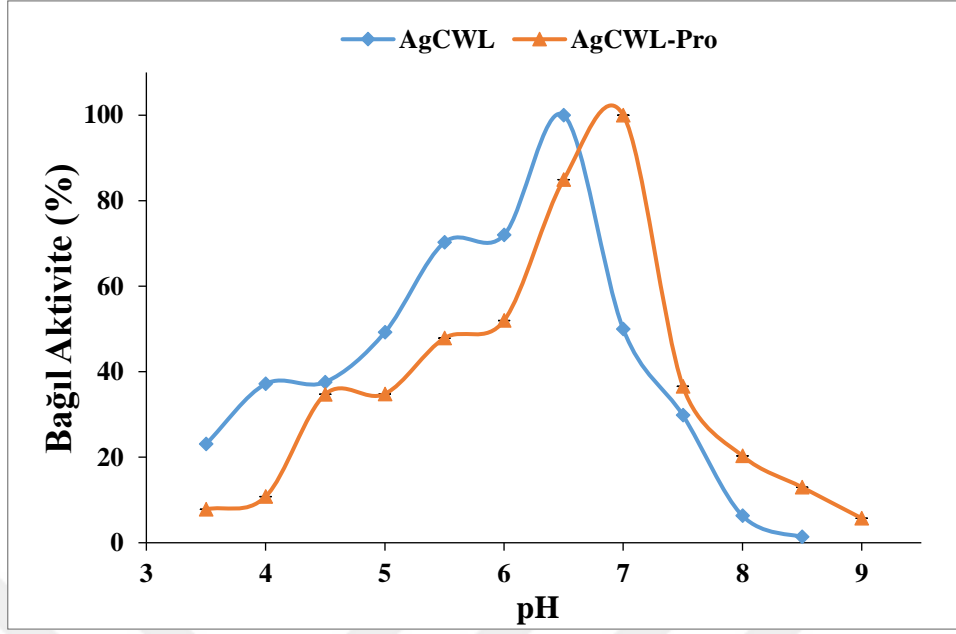
Enzimlerin optimum sıcaklığını belirlemek için 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80°C’lerde enzim aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi. Sıcaklık–aktivite grafiği oluşturulması sonucu AgCWL enziminin optimum sıcaklığı 45°C iken, AgCWL-Pro füzyon proteininin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda reaksiyonlar bu sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 19).



Şekil 19. AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği

3.7.2. Optimum pH

Enzim aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılmasında, pH 5,0- 5,5 için 50 mM sitrat tamponu, pH 6,0- 6,5- 7- 7,5 için 50 mM MOPS tamponu, pH 8,0- 8,5- 9,0 için 50 mM Tris-HCl ve pH 9,5- 10 için glisin tamponları kullanıldı. Sonuç olarak AgCWL'nin en yüksek aktiviteyi pH 6,5'da, AgCWL-Pro'nun ise pH 7,0'de verdiği belirlendi (Şekil 20).

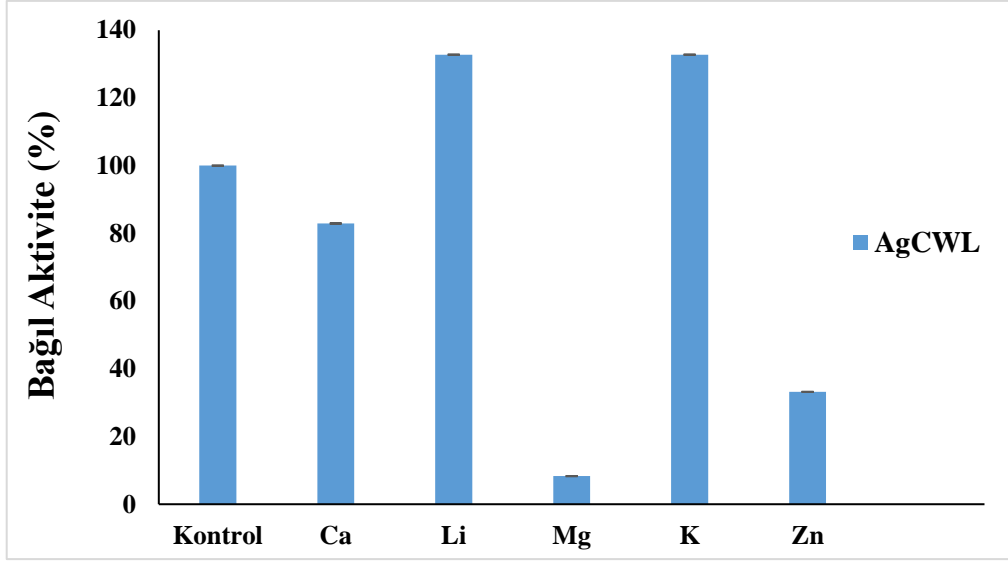


Şekil 20. AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin optimum pH grafiği

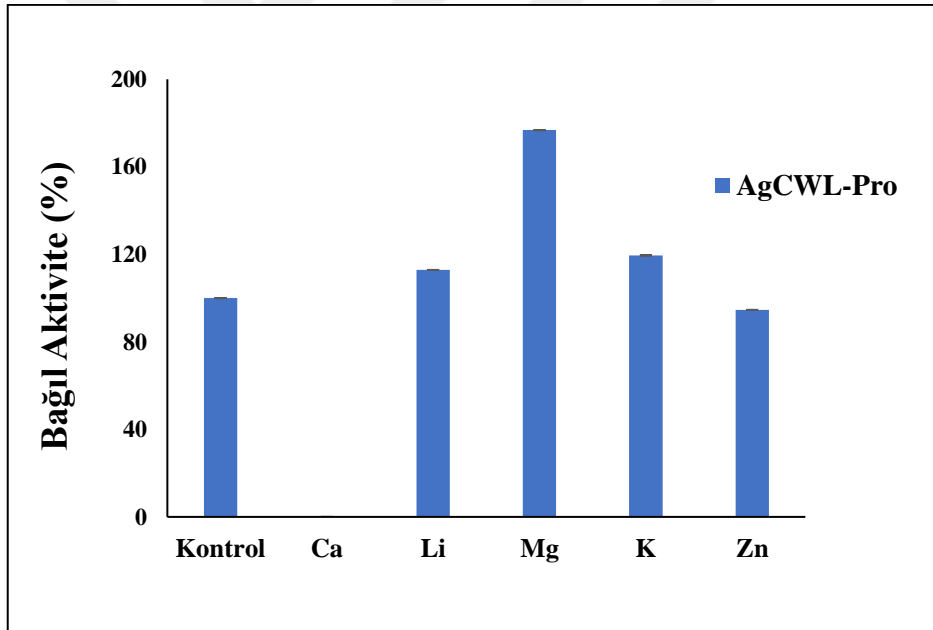
3.7.3. Metal İyonlarının Etkisi

Enzim aktivitesine metal iyonlarının etkisini araştırmak için yapılan deneyde; $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl , $LiCl_2$, $ZnSO_4$ ve $CaCl_2$ metal iyonları kullanıldı. Bu maddelerden, reaksiyona, son hacimde konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde ilave edildi. Metal iyonu içermeyen ölçüm sonucu, % 100 olarak kabul edildi.

Yapılan bu deney sonucunda $CaCl_2$, AgCWL'nin aktivitesini % 70'lere düşürürken AgCWL-Pro'nun aktivitesini inhibe ettiği görüldü. $MgCl_2$, AgCWL'nin aktivitesini % 15' e düşürürken, AgCWL-Pro'nun aktivitesini % 50 arttırdığı görüldü. $MnCl_2$, $LiCl_2$ ve KCl 'nin her iki enzimin de aktivitesini arttırdığı görüldü. Sonuçlar, Şekil 21 ve Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 21. Metal iyonlarının AgCWL enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

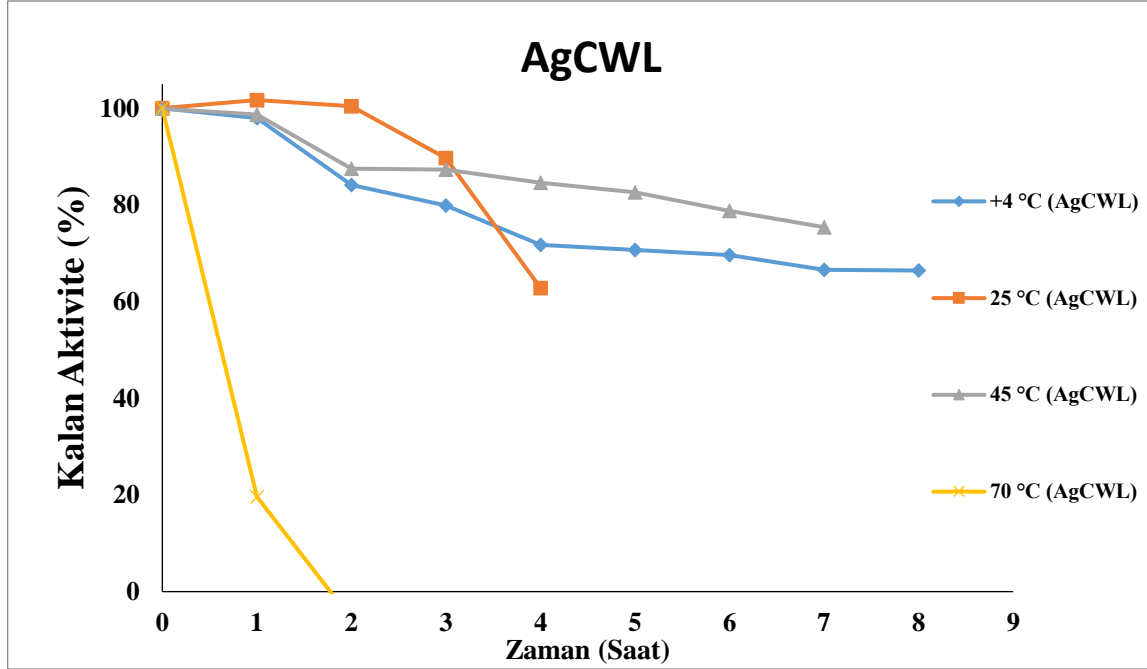


Şekil 22. Metal iyonlarının AgCWL-Pro enzim aktivitesi üzerine etkisi.

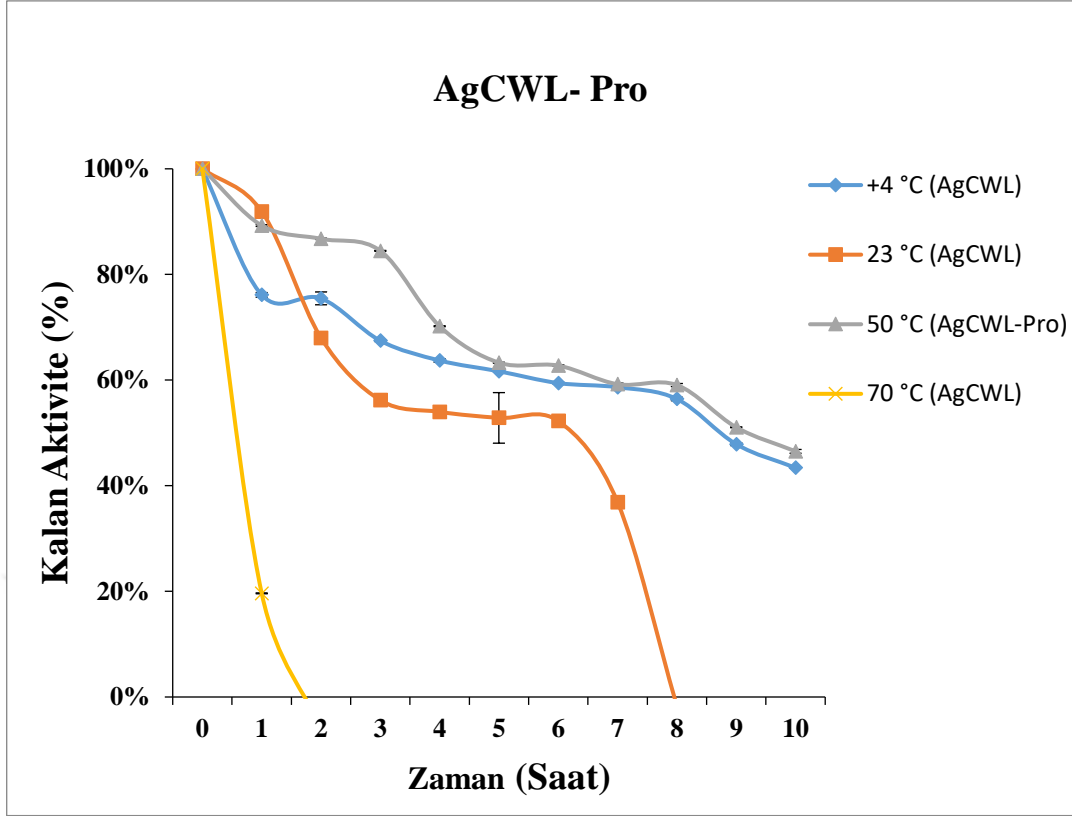
3.7.4. Isıl Kararlılığı

Enzimlerin kararlılığına ısının etkisini incelemek için saf enzimler belirli sıcaklıklarda, belirli zaman aralıklarında (0. dk, 1-10 gün) 4°C, 25°C, 45°C, 50°C, 65°C, ve 75°C’de inkübe edildi. Enzim aktivitesinin % olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken, ilk alınan aktivite değeri (0. dk) %100 kabul edildi. İnkübasyon sonrasında AgCWL enzimi 4°C, 25°C ve 45°C’

de 8. güne kadar aktivitesini önemli derece koruduğu gözlemlendi (Şekil 23). AgCWL-Pro enziminin de benzer şekilde 4°C, 25°C ve 50°C’ de, diğer sıcaklıklara göre aktivitesinin daha iyi olduğu belirlendi. 70°C’de, 2. saatten sonra her iki enzimin de aktivitesini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 25).



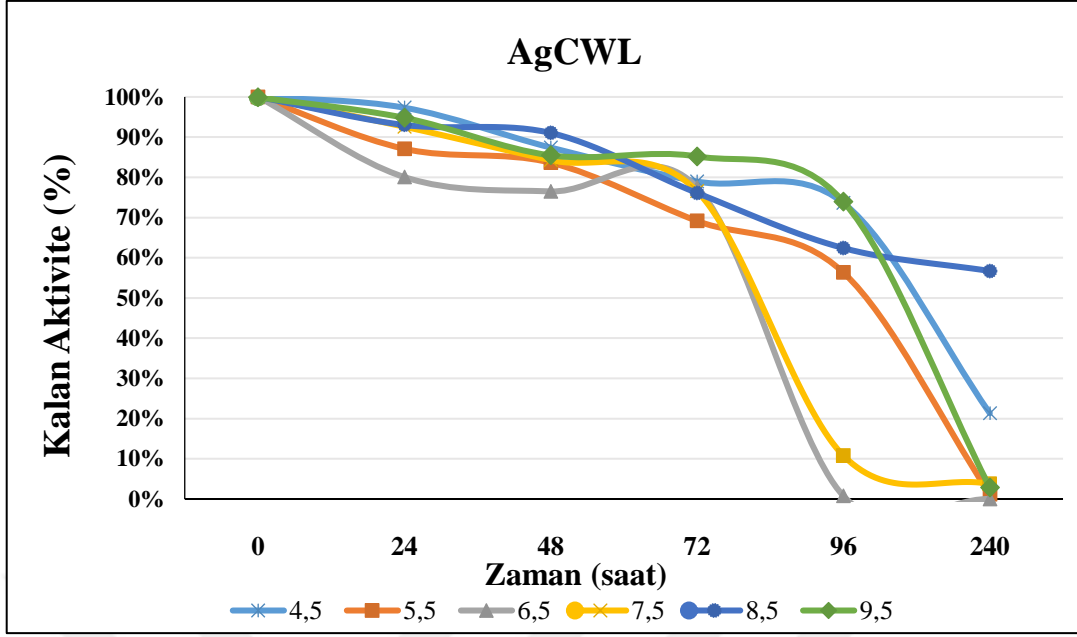
Şekil 23. AgCWL enziminin ısıl kararlılığı



Şekil 24. AgCWL-Pro enziminin ısıl kararlılığı

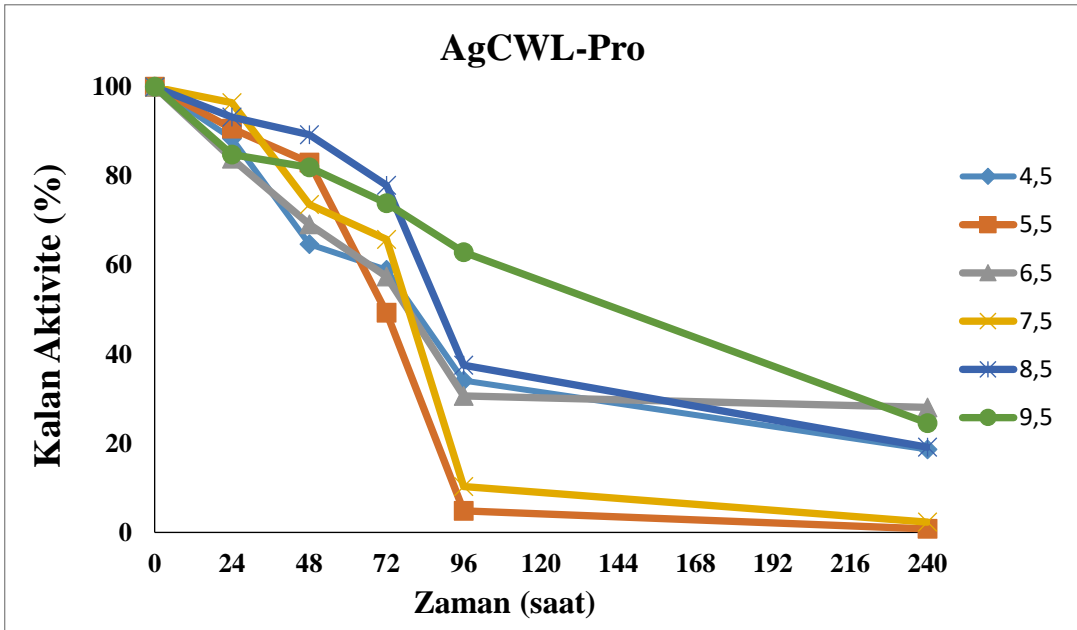
3.7.5. pH Kararlılığı

pH kararlılığını belirlemek için saf enzim, pH 4-4,5-5-5,5- 6- 6,5- 7-7,5- 8- 8,5- 9,0 ve 9,5'da, 25°C'de inkübe edildi ve %kalan aktiviteleri hesaplandı. Enzim aktivitesinin %olarak zamana göre değişen grafiği çizilirken ilk ölçüm değeri (0. dk) %100 kabul edildi. 96. saate kadar, çalışılan tüm pH değerlerinde AgCWL enzimi birbirlerine yakın ve yüksek aktivite gösterirken, 96. saatten sonra pH 4,5'ta %20 ve pH 8,5'da %60 aktivite göstermiştir (Şekil 25).



Şekil 25. AgCWL enziminin pH kararlılığının belirlenmesi.

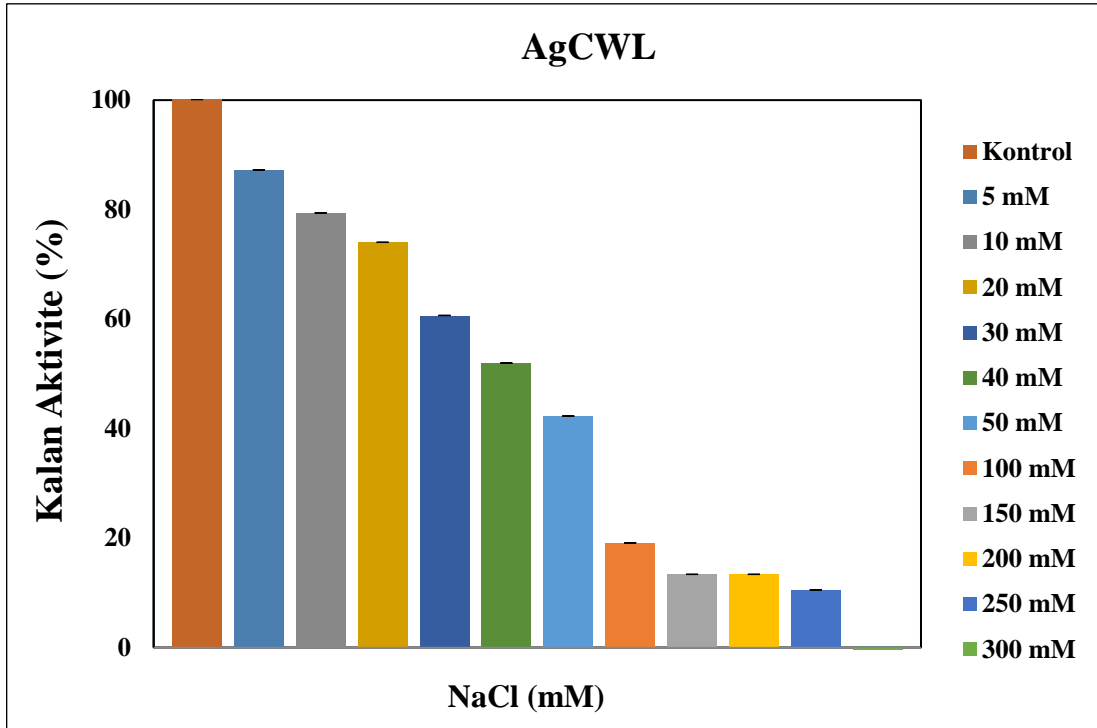
96. saatte pH 9,5'ta %60 aktivite gösterirken, diğer pH değerlerinde aktivitesini kaybettiği gözlemlendi. AgCWL enziminin aktivitesi tüm pH değerlerinde 72. saate kadar enzim aktivitesi önemli derecede korunurken, AgCWL-Pro enziminin 24. saatten sonra aktivitesini kaybetmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 26).



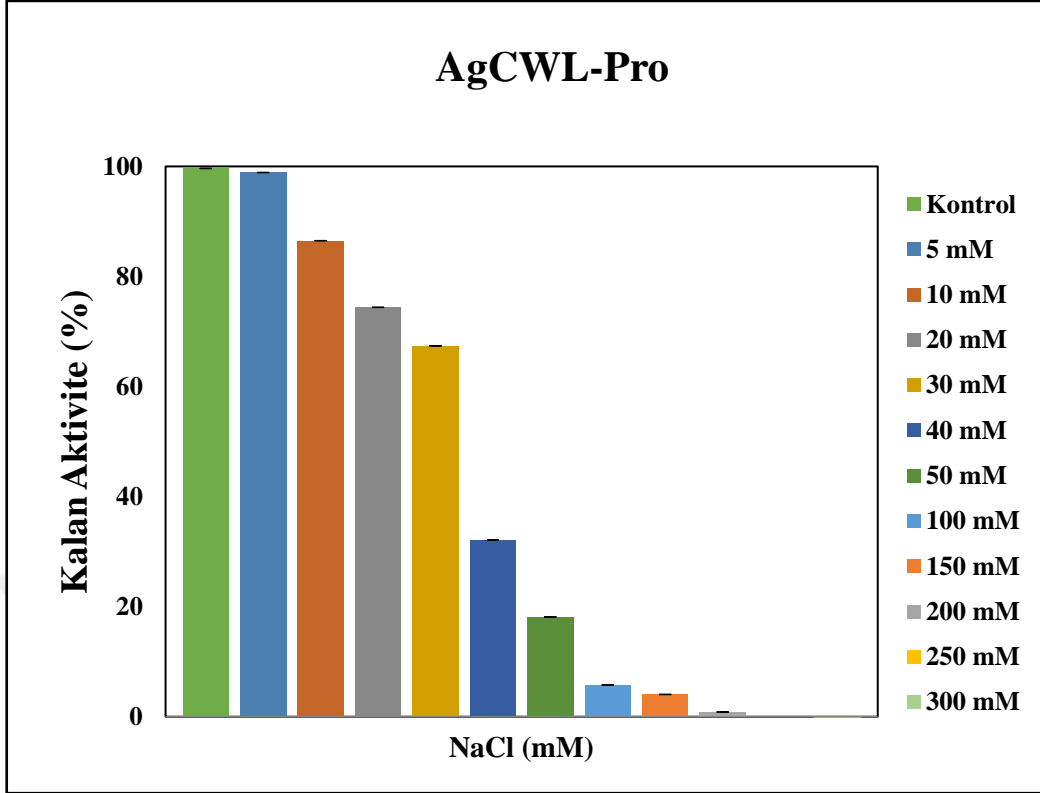
Şekil 26. AgCWL-Pro enziminin pH kararlılığının belirlenmesi.

3.7.6. Tuz Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek için optimum şartlarda reaksiyonuna 5-10-20-30-40-50-100-150-200-250-300 mM NaCl ilave edilerek inkübe edildi ve %kalan aktivite hesaplandı. Yapılan deney sonucunda, tuz miktarının enzim aktivitesini önemli derecede azalttığı belirlendi. AgCWL enzimi 40 mM NaCl kullanıldığında %60 aktivite gösterirken (Şekil 27), AgCWL-Pro enzimi, aynı miktarda NaCl kullanıldığında aktivitesinin %20'ye kadar düştüğü gözlemlendi (Şekil 28).



Şekil 27. Tuz konsantrasyonunun AgCWL enzim aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 28. Tuz konsantrasyonunun AgCWL-Pro enzim aktivitesi üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Bakteriler hem kendi hücre duvarlarını hem de birçok mikroorganizmanın hücre duvarını parçalayan birkaç enzime sahiptir. PG'de etkili olan ve kendi hücre duvarını parçalayan enzimler ya da otolizinler olarak ifade edilen hidrolazların antimikrobiyal etkilerinin sağlık, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılması açısından önem arz etmektedir (Leclerc, 1989). Son yıllarda biyoteknolojinin ilerlemesi ile birlikte rekombinat proteinlerin özelliklerinin geliştirilmesine yönelik pek çok yöntem öne sürülmüştür. Proteinlerin işlev ve kararlılıklarının artırılması endüstriyel uygulamalarda büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda en sık karşılaşılan uygulamalardan birisi proteinin C veya N terminal bölgelerine kararlılıklarını arttıracak bir takım amino asit birimlerinin veya metal bağlanma domainlerinin eklenmesidir. Buradan yola çıkarak, bu tez kapsamında daha önce karakterizasyonu yapılmamış olan *Anoxybacillus* cinsine ait bir CWL enziminin C-terminaline prolin kuyruk eklenerek biyokimyasal özelliklerdeki iyileşme belirlenmiştir.

A. gonensis PDF21 bakterisine ait CWL genini taşıyan pETLyz plazmitinden uygun primerler kullanılarak 597 bç uzunluğundaki *AgCWL* çoğaltılmıştır. *AgCWL* enziminin biyokimyasal özelliklerini iyileştirmek amacıyla iki farklı füzyon proteini oluşturulmuştur. Birincisi, *AgCWL*'nin C terminalinde histidin kuyruğu ve N terminalinde ribülokinaz geni olacak şekilde pET28a(+) vektörüne klonlanmıştır. İkincisi ise *AgCWL*'nin C terminalinde prolince zengin dizi ve histidin kuyruğu içerecek şekilde pET28a(+) vektörüne klonlanmıştır. Her üç vektör de *E. coli* BL21(DE3) LysS suşuna aktarılarak, genlerin ekspresyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Kobalt-afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldıktan sonra, diyalizle tuz ve metal iyonları uzaklaştırıldıktan sonra, enzim assay çalışmalarına başlanmıştır.

PyMOL (Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) programı kullanılarak proteinlerin üç boyutlu yapısı çizilerek incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında prolin kuyruğun *AgCWL* enziminin katlanmasında önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Yine bu program kullanılarak 3-boyutlu yapılar incelendiğinde, Rib*AgCWL* füzyon proteininde, ribülokinaz enzimi ile *AgCWL* enziminin herhangi bir etkileşimde bulunmadığı görülmüş, fakat *AgCWL*'nin moleküler ağırlığı arttığı için mobilitesini kaybettiği düşünülmektedir.

AgCWL (yaban tip) ve AgCWL-Pro füzyon proteinlerinin enzim aktivitesi türbidimetrik analiz, zimogram ve lyso plate ile test edilmiştir. Bulgular ışığında, AgCWL ve AgCWL-Pro füzyon proteinlerinin aktivite gösterdiği fakat Rib-AgCWL füzyonunun aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Rib-AgCWL füzyon proteinin aktivitesini kaybetmesi birkaç nedene bağlı olabilir. Birincisi, enzimin N-terminalinde 80 kDa büyüklüğünde bir proteinin eklenmiş olmasının enzimin mobilitesini sınırladığı olması, ikincisi de enzim-substrat etkileşimini olumsuz yönde etkilemiş olması olabilir. Bu yüzden, bundan sonra yapılan araştırmalarda AgCWL ve AgCWL-Pro ile çalışılmıştır.

AgCWL-Pro'nun optimum pH ve optimum sıcaklığının AgCWL'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. AgCWL-Pro'nun optimum sıcaklık değeri 50°C iken, AgCWL'nin optimum sıcaklık değeri 45°C olarak belirlenmiştir. AgCWL-Pro'nun optimum pH değeri 7,0 iken, AgCWL'nin pH değerinin 6,5 olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, prolin kuyruğun AgCWL enziminin optimum sıcaklık ve optimum pH'sını arttırdığı tespit edilmiştir. Lie ve ark., (2014)'nin yaptığı benzer bir çalışmada, C-terminalinde proline zengin dizi içeren *XynA*'nin yaban tipe göre optimum pH ve optimum sıcaklığı 0,5 birim arttırdığı ve katalitik aktiviteyi de 27 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, *XynAS27*'deki prolin/glisin bölgesi delesyonla çıkarılmış *XynAS27* enziminin, optimum pH ve sıcaklık değerinin değiştiği fakat katalitik aktivitesinin değişmediği tesbit edilmiştir (Wen ve ark., 2005). Irfan ve ark., (2016) yaptığı bir çalışmada, *Geobacillus thermodenitrificans* C5 bakterisinin ksilanaz enziminin (GthC5Xyl) C-terminaline proline zengin dizi ekleyerek rekombinat protein GthC5ProXyl'yi oluşturmuşlardır. Enzimin optimum sıcaklık, pH ve aktivitesi incelenmiş ve sonuç olarak prolin kuyruğun enzim aktivitesini arttırdığı, optimum sıcaklığını 60°C'den 70°C'ye yükselttiği ve optimum pH'ı pH 6'dan pH 7'ye yükselttiği belirlenmiştir. Yang ve arkadaşları (2013), alkali bir α -Amilaz enziminin N-terminaline bir oligopeptit takılmasının, enzim stabilitesini 4,1 kat arttırdığını, optimum sıcaklığını ise 50°C'den 55°C'ye yükselttiğini ve pH stabilitesini 0,5 birim arttırdığını tesbit etmişlerdir.

Metallerin enzimler üzerine etkisi incelendiğinde üç temel fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. Metaller enzimlerin katalitik merkezinde hizmet edebilir, bir bağlayıcı grup olarak enzim-substrat kompleksi oluşumunda görev alabilir ve bir başka enzimin, enzim sistemi üzerindeki etkisini antagonize ederek, fizyolojik etkisini sürdürmesi için gerekli olabilir. Bununla birlikte, enzimler, çözelti içerisinde su dışında protein ve substrata bağlanmak için metallere ihtiyaç duyabilir. Enzimlerin katalitik aktivitesi; metalin kütlesine, iyonik yüküne, iyonik yarıçapına (sulu çözeltilerdeki iyonik yarıçap farklı olabilir), yayılma

oranına, elektriksel alanda hareketine, çözeltilerdeki metalik iyonların hidratlarının konfigürasyonuna ve kararlılığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Leninger, 1950). Metal iyonlarının AgCWL ve AgCWL-Pro enzim aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek için, enzimler saflaştırılarak yapılarındaki ya da tampon çözelti içindeki metal iyonları ortamdaki uzaklaştırılmış ve enzimler $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl , $LiCl_2$, $ZnSO_4$ ve $CaCl_2$ metal iyonları içeren solüsyon içinde inkübe edilmiştir. Böylece, AgCWL enziminin aktivitesini KCl , $LiCl_2$ ve $MnCl_2$ arttırırken, AgCWL-Pro enziminin aktivitesini sadece $MnCl_2$ arttırmıştır. Bununla birlikte, KCl ve $LiCl_2$ ise, AgCWL-Pro enziminin aktivitesini etkilememiştir. $CaCl_2$ AgCWL'nin aktivitesini azaltırken, AgCWL-Pro enziminin aktivitesini ise tamamen inhibe etmiştir. Bu durum, prolin kuyruğun, AgCWL-Pro'nun 3-boyutlu yapısını ve iyon yükünü değiştirerek, metal iyonları ile farklı bir etkileşim yaptığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde Zn-bağımlı bir peptidaz olan AmiB'nin $ZnCl_2$ varlığında aktivitesinin arttığı (Korndörfer ve ark., 2006) ve +2 değerlikli metal iyonlarının proteinin katalitik fonksiyonu üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir (Liu, 2009). Alquéres ve ark., (2011) yaptığı başka bir çalışmada ise, PF2001 enziminin N-terminaline tioredoksin kuyruğu takılarak TRX-PF2001 Δ 60 füzyon proteini oluşturulmuştur ve enzimin metal iyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, K^+ iyonunun enzim aktivitesini etkilemediği, Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini sırasıyla %20 ve %45 kadar önemli derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Ancak, AgCWL enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, bu çalışmada yalnızca AgCWL enzimi ile AgCWL-Pro füzyon proteini, metal iyonları etkisi yönünden karşılaştırılmıştır.

Enzimlerin kararlılığı üzerine ısının etkisini tespit etmek için, AgCWL ve AgCWL-Pro enzimleri, 4°C, 25°C, 45°C, 50°C, 65°C ve 75°C de inkübe edilmiştir. Sonuçlar, AgCWL enziminin aktivitesini diğer sıcaklıklara göre, 4°C, 25°C ve 45°C'de 8. güne kadar önemli derece koruduğunu göstermiştir. AgCWL-Pro ise, 4°C, 25°C ve 50°C' de 8. güne kadar aktivitesini önemli derecede koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, her iki enzimin de 70°C lik inkübasyonun 2. saatinin sonunda aktivitelerini kaybettiği belirlenmiştir. Buna dayanarak prolin kuyruğun AgCWL enziminin termal kararlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa*'dan izole edilen ve bir LT çeşidi olan tAmiB enziminin +4°C'de enzim aktivitesinin 8-10 gün devam ettiğini belirlemiştir (Mark, 2011).

Ortamdaki tuz konsantrasyonunun artması ozmotik basınç değişikliklerine neden olduğu için PG’de etkili olan enzimlerin çalışmasını etkilemektedir. Bu sebep ile, tuz konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde AgCWL enzimi, 40 mM NaCl konsantrasyonunda %40 aktivite kaybı gösterirken, AgCWL-Pro enziminin %80’e kadar aktivite kaybı yaşadığı belirlenmiştir. Sonuçlar, her iki enzimin de artan konsantrasyonuna bağlı olarak enzim aktivitelerinin önemli ölçüde kaybolduğu fakat artan tuz konsantrasyonuna karşı AgCWL enziminin AgCWL-Pro enzimine göre daha yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum, AgCWL-Pro enziminin sahip olduğu prolinece zengin dizinin, NaCl ile hidrofobik etkileşim yaparak, enzimin 3 boyutlu yapısında bir değişikliğe sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, hücre duvarı litik enzimi olan AgCWL enzimi ile oluşturulan AgCWL-Pro enziminin karşılaştırmalı biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Bulgular ışığında, belirli metal iyonların varlığında, AgCWL enzim aktivitesinin, AgCWL-Pro enzim aktivitesine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. AgCWL enziminin metal iyonlarına daha kararlı olmasının nedeninin, AgCWL-Pro enzimindeki prolinece zengin dizinin metal iyonlarından etkilenmesi olabileceği düşünülmektedir. Isıl kararlılık açısından, her iki enzimin kararlılığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, AgCWL-Pro’nun aktivitesinin, AgCWL’ye göre, optimum pH’ının 0,5 birim, optimum sıcaklığı 5°C yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile AgCWL-Pro enziminin C-terminaline prolin kuyruk eklenmesi ile enzimlerin optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinin arttırılabileceği gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR

“*Anoxybacillus gonensis* PDF21 suşunun hücre duvarı litik enziminin optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığının iyileştirilmesi” başlıklı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.

1. *A. gonensis* PDF21 suşunun AgCWL pET28a(+) vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) LysS suşunda ekspresyonu yapılmıştır.

2. AgCWL enziminin optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığının iyileştirilmesi amacıyla C terminalinde histidin kuyruk içerecek şekilde ribülokinaz proteini ve prolin kuyruk ile birleştirilerek Rib-AgCWL ve AgCWL-Pro füzyon proteinleri oluşturulmuştur. Füzyon proteinlerinden Rib-AgCWL enzim aktivitesini kaybetmiştir. Bu durum enzimin N-terminaline 80 kDa büyüklüğünde bir proteinin takılması ile enzimin 3 boyutlu yapısını olumsuz yönde etkilemiş olabileceği, aynı zamanda enzimin büyüklüğünün artması ile enzim-substrat ilişkisinin olumsuz yönden etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

3. Prolin kuyruğun, AgCWL enziminin, optimum pH değerini 6,5’den 7,0’ye çıkardığı, optimum sıcaklığını ise 45°C’ den 50°C’ ye yükselttiği belirlenmiştir.

4. AgCWL ve AgCWL-Pro enzimlerinin ısıl kararlılıklarının +4°C de 8. güne kadar korunduğu tespit edilmiştir.

5. CaCl₂, AgCWL’nin aktivitesini %70’lere düşürürken, AgCWL-Pro’nun aktivitesini inhibe etmiştir. MgCl₂, AgCWL’nin aktivitesini %15’ e düşürürken, AgCWL-Pro’nun aktivitesini %50 arttırdığı belirlenmiştir. MnCl₂, LiCl₂ ve KCl’nin her iki enzimin de aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

6. Tuz (NaCl) miktarının her iki enzimin aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Bu azalmanın AgCWL-Pro enziminde daha çok fazla olduğu tespit edilmiştir. AgCWL enzimi 40 mM NaCl kullanıldığında %40 aktivite kaybı gösterirken AgCWL-Pro enzimi aynı miktarda NaCl kullanıldığında aktivitesinin %80’e kadar aktivitenin düştüğü gözlenmiştir.

6. ÖNERİLER

1. Hücre duvarı litik enzim ailesi üyelerinden olan AgCWL enziminin peptidoglikan tabakadaki hangi bağı kırdığı HPLC analizleri ile belirlenerek enzimin hangi çeşit CWL grubuna ait olduğu tespit edilmelidir.
2. AgCWL enzimi aktivitesini arttıracak yönde başka mutasyonların yapılması önerilir.



7. KAYNAKLAR

- Abergel, C., Monchois, V., Byrne, D., Chenivresse, S., Lembo, F., Lazzaroni, J.-C. and Claverie, J.-M., 2007. Structure and Evolution of the Ivy protein family, Unexpected Lysozyme Inhibitors in Gram-negative Bacteria, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 6394–6399.
- Alquères, S. M. C., Branco, R, V., Freire D. M. G., Alves, T. L., Martins, O.mB. and Almeida, R. V., 2011. Characterization of the Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus*: Effects of Thioredoxin Fusion Tag and Triton X-100, SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research, 10.4061, 316939.
- Blackburn, N.T., and Clarke, A.J., 2001. Identification of Four Families of Peptidoglycan Lytic Transglycosylases, Journal of Molecular Evolution, 52, 78–84.
- Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B. and Górski, A., 2006. Bacteriophage Endolysins As A Novel Class Of Antibacterial Agents, Experimental Biology and Medicine, (Maywood) 231, 366–377.
- Brendel, V., Buche, r P., Nourbakhsh, IR., Blaisdell, B.E. and Karlin, S., 2002. Methods and Algorithms for Statistical Analysis of Protein Sequences, Proceedings of the National Academy of Sciences 1992; 6.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active Enzymes Database (Cazy): An Expert Resource For Glycogenomics, Nucleic Acids Research 37, 233–238.
- Demchick, P. and Koch, A.L., 1996. The Permeability Of The Wall Fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, Journal of. Bacteriology, 178, 768–773.
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S. and Arthur, M., 2008. Covalent Attachment Of Proteins To Peptidoglycan, Federation of Europlan Microbiolgycal Society Reviews, 32, 307–320.
- Evrard, C., Fastrez, J. and Soumillion, P., 1999. Histidine modification and mutagenesis point to the involvement of a large conformational change in the mechanism of action of phage lambda lysozyme, Federation European Biochemical Societies Letter, 460, 442–446.
- Fibriansah, G., Gliubich, F. I. and Thunnissen, A. M. W., 2012. On the Mechanism of Peptidoglycan Binding and Cleavage by the Endo-Specific Lytic Transglycosylase MltE from *Escherichia coli*, Biochemistry, 51(45), 9164-9177.
- Gan, L., Chen, S. and Jensen, G.J., 2008. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 18953–18957.
- Glauner, B., Höltje, J.V. and Schwarz, U., 1988. The Composition of the Murein of *Escherichia coli*, Journal of Biological Chemistry, 263, 10088–10095.

- Harz, H., Burgdorf, K. and Höltje, J.V., 1990. Isolation and Separation of The Glycan Strands From Murein Of *Escherichia Coli* By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Biochemistry*, 190, 120–128.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. and Höltje, J.V., 2002. Effects of Multiple Deletions Of Murein Hydrolases On Viability, Septum Cleavage, And Sensitivity To Large Toxic Molecules In *Escherichia Coli*, *Journal of Bacteriology*, 184, 6093-6099.
- Henrissat, B. and Bairoch, A., 1993. New Families In The Classification Of Glycosyl Hydrolases Based On Amino- Acid Sequence Similarities, *Biochemical Journal*, 293, 781-788.
- Höltje, J. V, and Tomasz, A., 1975. Lipoteichoic Acid: A Specific Inhibitor Of Autolysin Activity in *Pneumococcus*, *National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 1690–1694.
- Huang B, Yu BZ, Rogers J, Byeon IJL, Sekar K, Chen X, Sundaralingam M, Tsai MD and Jain M. K., 1996. Phospholipase A2 Engineering Deletion Ofthe C-Terminus Segment Changes Substrate Specificity And Uncouples Calcium And Substrate Binding At The Zwitterionic Interface, *Biochemistry*, 35, 12164–12174.
- Hurley JH, Mason D.A. and Matthews B.W., 1992. Flexible Geometry Conformational Energy Maps For The Amino Acid Residue Preceding A Proline, *Biopolymers*, 32, 1443–1446.
- Ikeda, M., Wachi, M., Jung, H.K., Ishino, F. and Matsushashi, M., 1991. The *Escherichia coli* mraY gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-Pentapeptide: Undecaprenyl-Phosphate Phospho-N-Acetylmuramoyl-Pentapeptide Transferase, *Journal of Bacteriology* 173, 1021–1026.
- Irfan, M., Güler, H. İ., Özer, A., Tunçel Sapmaz, M., Beldüz, A. O., Hasan, F. and Shah, A. A., 2016. C-Terminal proline-rich sequence broadens the optimal temperature and pH ranges of recombinant xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5, *Enzyme and Microbial Technology*, 91, 34–41.
- Karamanos, Y., 1997. Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and Their Potential Substrates: Structure/Function Relationships, *Research in Microbiology*, 148, 661–671.
- Karaoglu, H., Yanmis, D., Sal, FA., Celik, A., Canakci, S. and Belduz, A. O., 2013. Biochemical Characterization Of A Novel Glucose Isomerase From *Anoxybacillus gonensis* G2 T that Displays A High Level Of Activity And Thermal Stability, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 215–224.
- Koraimann, G., 2003. Lytic Transglycosylases In Macromolecular Transport Systems of Gram-Negative Bacteria, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2371–2388.
- Labischinski, H., Goodell, E.W., Goodell, A. and Hochberg, M.L., 1991. Direct Proof Of A More-Than-single-Layered” Peptidoglycan Architecture Of *Escherichia Coli* W7: A Neutron Small-Angle Scatteringstudy, *Journal of Bacteriology*, 173, 751–756.
- Lantz, M. S. and Ciborowski, P., 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases, *Methods Enzymology*, 235:563-594

- Leclerc, D. and Asselin, A., 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, De'partement de phytologie, Faculte' des sciences de l 'agriculture et de l 'alimentation, 749-753
- Lehninger, A. L., 1950. Role of metal ions in enzyme systems, Physiological Reviews, 30, 393-429
- Li, Z., Xue, X., Zhao, H., Yang, P., Luo, H., Zhao, J., Huang, H. and Yao, B., 2014. A C-Terminal Proline-Rich Sequence Simultaneously Broadens the Optimal Temperature and pH Ranges and Improves the Catalytic Efficiency of Glycosyl Hydrolase Family 10 Ruminal Xylanases, Applied and Environmental Microbiology, 3426–3432
- Liu, S. W. and Li, Y-K., 2009. Expression, Purification and Characterization of Human -L-Fucosidase, Journal of the Chinese Chemical Society, 56, 850-858
- Lommatzsch, J., Templin, M.F., Kraft, A.R., Vollmer, W. and Höltje, J.V., 1997. Outer Membrane Localization Of Murein Hydrolases: MltA, A Third Lipoprotein Lytic Transglycosylase in *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 179, 5465–5470.
- Mark, A.L., 2011. Development of A Method To Generate A Soluble Substrate for Lytic Transglycosylases, MSc Thesis, The University of Guelph, Faculty of Graduate Studies, Guelph.
- Mengin-Lecreux, D., Texier, L., Rousseau, M., and van Heijenoort, J., 1991. The Murg Gene of *Escherichia coli* Codes for The UDP-N-Acetylglucosamine: N-Acetylmuramyl- (Pentapeptide) Pyrophosphoryl-Undecaprenol N-Acetylglucosamine Transferase Involved In The Membrane Steps of Peptidoglycan Synthesis, Journal of Bacteriology, 173, 4625–4636.
- Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L. and Mobashery, S., 2006. Three-Dimensional Structure of The Bacterial Cell Wall Peptidoglycan, National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 4404–4409.
- Minagawa, S., Hikima, J., Hirono, I., Aoki, T. and Mori, H., 2001. Expression of Japanese Jounder c-Type Lysozyme cDNA in insect cells, Developmental and Comparative Immunology, 25, 439±445.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E, 2011. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked Cell Wall Precursors Across The Membrane, European Molecular Biology Organization Journal, 30, 1425–1432.
- Murray, R.G., Steed, P., Elson, H.E., 1965. The Location of the Mucopeptide in Sections of the Cell Wall of *Escherichia coli* and Other Gram-Negative Bacteria, Canadian Journal of Microbiology, 11, 547–560.
- Neuhaus, F.C. and Baddiley, J., 2003. A Continuum If Anionic Charge: Structures and Functions Of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67, 686–723.
- Nicholson H, Tronrud D, Bechtel W and Matthews B., 1992. Analysis of The Effectiveness of Proline Substitutions and Glycine Replacements In Increasing The Stability of Phage T4 Lysozyme, Biopolymers, 32, 1431–1441.

- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. Nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 2109-2117.
- Rogers, H.J., Perkins, H.R. and Ward, J.B. 1981. Microbial Cell Walls and Membranes, Journal Medicine of Microbiology, 14, 501–508.
- Romeis, T. and Höltje, J. V., 1994. Specific Interaction of Penicillin-Binding Proteins 3 and 7/8 with Soluble Lytic Transglycosylase in *Escherichia coli*, Journal Biological Chemistry, 269, 21603–21607.
- Scheurwater, E.M. and Clarke, A.J., 2008. The C-Terminal Domain of *Escherichia coli* Yfhf Functions As A Lytic Transglycosylase, J. Biol. Chem, 283, 8363–8373.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O., 1972. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications, Bacteriology Reviews, 36, 407–477.
- Terpe, K., 2003. Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular And Biochemical Fundamentals to Commercial Systems, Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 523–533.
- Trent, D. J., 2000. Extremophiles in Astrobiology: Per Ardua ad Astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 2, 5-11.
- URL-1, www.bacterionet/anoxybacillus, 20 Mayıs 2018.
- URL-2, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases>, 05 Haziran 2018.
- URL-3, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 12 Mayıs 2018
- URL-4, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, 20 Mayıs 2018.
- URL-5, <https://www.expasy.org/>, 20 Mayıs 2018.
- URL-6, https://www.researchgate.net/post/Double_band_in_western_blot, 13 Temmuz 2018
- URL-7, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>, 15 Mayıs 2018.
- Verwer, R.W., Nanninga, N., Keck, W. and Schwarz, U, 1978. Arrangement of Glycan Chains in The Sacculus of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 136, 723–729.
- Vollmer, W., 2008. Structural variation in The Glycan Strands of Bacterial Peptidoglycan. Federation of Europlan Microbiological Society Reviews, 32, 287–306.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan Structure and Architecture, Federation of Europlan Microbiological Society Reviews, 32, 149–167.
- Vollmer, W. and Tomasz, A., 2000. The PgdA Gene Encodes For A Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*, The Journal of Biological Chemistry, 275, 20496–20501.

- Watt, S.R. and Clarke, A.J., 1994. Initial Characterization of Two Extracellular Autolysins From *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Journal of Bacteriology, 176, 4784–4789.
- Weadge, J.T., Pfeffer, J.M., and Clarke, A.J., 2005. Identification of A New Family of Enzymes with potential O-acetylpeptidoglycan Esterase Activity in Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, Biomedicine Microbiology, 5,49.
- Wen TN, Chen JL, Lee SH, Yang N. S. and Shyur LF., 2005. A Truncated Fibrobacter Succinogenes 1,3–1,4-B-D-Glucanase with Improved Enzymatic Activity and Thermotolerance, Biochemistry, 44, 9197–9205.
- Wientjes, F.B., Woldringh, C.L., Nanninga, N., Amount of Peptidoglycan in Cell Walls of Gramnegative Bacteria, Journal of Bacteriology, 173, (1991) 7684–7691.
- Williamson MP., 1994. The Structure And Function Of Proline-Rich Regions In Proteins, Biochemical Journal, 297, 249–260.
- Yang, H., Lu, X., Liu, L., Li, J., Shin, H., Chen, R., Du, G. and Chen, J., 2013. Fusion of an Oligopeptide to the N Terminus of an Alkaline α -Amylase from *Alkalimonas amylolytica* Simultaneously Improves the Enzyme's Catalytic Efficiency, Thermal Stability, and Resistance to Oxidation, Applied and Environmental Microbiology, 79, 3049-3058.
- Yao, X., Jericho, M., Pink, D. and Beveridge, T., 1999. Thickness and Elasticity of Gram-Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy, Journal of Bacteriology, 181, 6865–6875.
- Young, R., 1992. Bacteriophage Lysis: Mechanism and Regulation, Microbiological Review, 56, 430–481.
- Zeikus, J. G., Vieille, C. and Savchenko, A., 1998. Thermozyms: Biotechnology and Structure-Function Relationships, Extremophiles, 3, 179-183.

8. EKLER

Ek 1. *A. gonensis* PDF21 litik mürein transglikozilaz geninin nükleotit sırası

ATGGAATTGCTTCTTGAAGTCAAGCGTTACAAAATTTACAAGGGAAAAAAGAAGCGCCGA
CAACACCGTTTCACGACTTGTTCGCGAGTTGTTAACGACGGAAATGAATGAAGAAACCGA
AACGATGCGTCCGTCACCTTCCACTCATGACGACGCAAGAAACGAACGCACCAACATATGAG
AAAGAAAATGCCTCGCTTTCTTCAAACAGCATGCAGCAGTGGATCGACGAAGCCGCTACAA
AATATGATGTCGATCCGAAGCTCATTTATGCAGTCATTCGCCATGAGTCAAATTTTAACCC
ACAAGCAAAAAGCCGCGTTCGGTTCGATGGGGCTGATGCAGTTAATGCCGAGCACGGCGCGC
ATGCTAGGGGTACAAGACGCATTCGATCCGAAACAAAACATTGAAGGTGGGACAAAATATT
TACGCCAACTTCTCGATCGTTATGACGGGAATGTGGCGCTTGCCTTGCCTTATAACGC
AGGGCCGGGAAATGTCGATAAACACGGAGGCATTCACCTTTTCGCGAAACGATAAACTAC
GTCAAAAAGTCATGCAAACGTAATGCGCAAGTCACATCGTTTGA

597 bç

Ek 2. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geninin nükleotit sırası

ATGGGGAAAAAGTATGTCATTGGTATCGACTATGGGACGGAATCGGGACGCGCCGTCTCG
TTGATCTGGAAGGGAACGAAATTGCGGACCACGTCACCCCGTATCATCACGGAGTCATTGA
TGAAGTGTGCCGGAATCGAACGTACAACACTAGAACCAGACTGGGCACTGCAGCACCCGGGC
GATTATATCGAAGTGTGGCGACCGCTGTTCCAGCTGTATTGCAAAAAGTCAGGGGTTAACCC
CGGCGGATGTGATCGGGGTCGGAATTGATTTTACAGCTTGTACGATGTTGCCGATCTCTGG
CTCCGGCGAGCCGCTTTGCTTGAAGCCCGAATTCAAGCATCGCCCACACAGCTGGGTGAAA
TTGTGGAAGCATCATGCTGCCAGGATGAAGCGAACTTGTCAATGAAATGGCGGCGAAAA
GGGGGGAAGCGTTTTTTACCGCGCTACGGTGGAAAAATTTTCATCGGAATGGATGATTGCGAA
AATTTGGCAGATTCTGAATGAAGATCCGGATATTTATGACCAAACCGATCTCTTTTTAGAG
GCAACCGACTGGGTGATCTTCAAATGACCGGTCAACTTGTGCGCAACAGCTGCACGGCCG
GTTATAAGTCGATTTGGCATAAACAGACGGCTATCCGAGTAAGGAGTTTTTTCAGAGCGCT
TGATCCGCGACTGGAACACTTAACAGAATCGAAACTTCGCGGTTTCGATCGTTCCGCTCGGC
ACAAGGGCAGGAGTACTGACGAAGGAAATGGCGGCCATGATGGGCCTTCTTCCGGGAACAG
CCGTTGCAGTCGGAATGTGATGCTCATGCGGCCGTACCGGGTGTCCGGGTGCTTGAACC
GGGCAAAATGGTGTGATGGCGATGGGAACATCGATATGCCATATGTTACTTGGTACGGAAGAA
AAGTATGTGGAAGGAATGTGCGGGGTTGTGCGAGGATGGCATCATTCGGGATATTTCCGGCT
ATGAAGCCGGGAGTCAGCGGTGGGCGACATTTTCGCTTGGTATGTTGAACAAAGTGTTC
GGCCTATGTGAAAGAAGCAGCGGAAAAAGAGGGAGTTAGTGTCCATGAGTGGCTTGAAAAG
CGAGCCGCTGCCTATCGGCCGGGGAAACAGGACTGCTCGCTTTAGACTGGTGGAAACGGAA
ACCGTTCAGTATTGGTCGACACGGATTTAACCGGGTTGATCATCGGTTATACGTTGCTGAC
GAAACCGGAAGAAATTTACCGTGCATTGCTTGAAGCAACGGCCTTCCGTACACGGAAAATT
ATCGACGCCTTTGTTGGAAGCGGTATCAATGTGGATGAGCTGTATGCATGTGGCGGATTGC
CACAAAAAATAAGTTACTCATGCAAATTTATGCCGATGTGACCAACCGTGAGATTAATAAT
TGCAGCGTCGAAGCAAACCTCCAGCGGTAGGAGCTGCTATGTTTCGCGGCGGTTCGCGGCCGGC
AAAGAAAACGGTGGGTATGAATCAATTATTGAAGCGGCACGAAACATGGGGAAAGTACGGG
AAGAAACATTCAGCCAATTCGGGAGAATGTCGCCATTTATGAACAGTTGTATCAAGAATA
TACGAAGCTGCATGACTATTTTGGTTCGTGGGGAAAACGATGTGATGAAGCGGCTTAAACAT
TGGAAGAGACCGCACGGGCGGTGAAAAATCTATAAGTTTATCGTGA

887 bç

Ek 3. XylA'ya ait Prolince Zengin Dizinin nükleotit sırası

ATGAAAGCGGCGGCATGGCCCATCCCCGAGAAACCGAAACCCAACCCCAACCAGCAGCGTC
AGCGCCGTCGTGGCGGATTTGGCGGTCCACAGCGTCCTCCTTTCAATCCCGCACTGGCTTT
CGCCGAGCAACCTGGCGTGAAAGAGGATTTTCGTGCCCTCTGAGCTCAACCAGCCTGGATAG
180 bç



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Yozgat'ta doğdu. İlköğrenimini Ertuğrul Gazi İlköğretim Okulu'nda, Lise öğrenimini Sorgun Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2007-2008 öğretim yılında K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında bu bölümden ikincilik ile mezun oldu. 2013-2014 öğretim yılında K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı.

