

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Anoxybacillus gonensis* G2 BAKTERİSİNİN  
ALÜMİNYUMA DİRENÇLİLİK GENİNİN BELİRLENMESİ,  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**FATİH ŞABAN BERİŞ**

**ARALIK 2006  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Anoxybacillus gonensis* G2 BAKTERİSİNİN  
ALÜMİNYUMA DİRENÇLİLİK GENİNİN BELİRLENMESİ,  
EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Fatih Şaban BERİŞ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Doktora”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27/11/2006  
Tezin Savunma Tarihi : 11/12/2006**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. E. Edip KEHA  
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2006**

## ÖNSÖZ

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin alüminyum direnç geninin belirlenmesini, ekspresyonunu ve biyokimyasal karakterizasyonunu içeren bu çalışma, KTÜ Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2004.111.04.01 numaralı araştırma projesi ile sağlanan imkanlar ile KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda tamamlanarak "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konumun seçilmesinde, çalışmaların planlanmasında ve verilerin değerlendirilmesinde her türlü desteğini gördüğüm ve çalışmanın tamamlanabilmesi için her türlü laboratuvar imkanlarını sunan danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e sonsuz teşekkür ve içten dileklerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca, tez çalışmamın takibinde değerli fikirlerini esirgemeyerek destek veren tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında çalışmalarımın çeşitli aşamalarında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım ve arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya, Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na, Yüksek Biyolog Hakan KARAOĞLU'na, Araş. Gör. Kadriye İNAN'a, Araş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK'a, Esra ERBAŞ'a, Ali Adem BAHAR'a, Aykut SAĞLAM'a, Kimya Bölümü öğretim elemanlarından Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a, Öğr. Gör. Dr. Barbaros DİNÇER'e ve Moleküler Biyoloji, Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarları'nda çalışan arkadaşlarıma destek ve anlayışlarından ötürü teşekkür ederim.

Çalışmamın başlangıcında her türlü desteği esirgemeyen sayın hocam merhum Prof. Dr. Saadettin GÜNER'e de huzurlarınızda teşekkür ederim.

Çalışmamın önemli aşamalarında desteğini esirgemeyen Gent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya, Fizyoloji ve Mikrobiyoloji Bölümü, Protein Biyokimyası ve Protein Mühendisliği Laboratuvarı'ndaki danışmanım Prof. Dr. Josef vanBeeumen'e, Prof. Dr.

Savvas Savaides'e, Dr. Lina Desmet'e ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma gösterdikleri ilgi, yardım ve desteklerinden dolayı da teşekkür ederim.

Çalışmamın ve akademik hayatımın her anında, her türlü maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren hayat arkadaşım Zehra BERİŞ'e eşsiz sabır ve desteğinden ötürü şükranlarımı sunmaktan onur duyar, varlığıyla hayatıma yeni tatlar katan fakat zaman zaman çalışmalarımı engelleyen oğlum Seymen'e de teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Fatih Ş. BERİŞ

Trabzon, 2006

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	IV
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİL DİZİNİ .....	X
TABLO DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Metallerin Canlı Yaşamındaki Rolü .....	1
1.2. Alüminyum (Al).....	3
1.2.1. Alüminyumun Bitkiler Üzerindeki Etkisi.....	4
1.2.2. Alüminyumun Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi. ....	5
1.2.3. Alüminyumun Hayvan ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri .....	6
1.3. Metaller Karşı Hücrel Sistemler ve ATPaz'ların Rolü.....	7
1.3.1. P-tipi ATPaz (P-ATPaz) Süperailisi .....	10
1.3.2. F-tipi ATPaz Süperailisi (H <sup>+</sup> veya Na <sup>+</sup> -taşıyan F, V ve A Tipi ATPaz).....	11
1.3.3. ABC-tipi (ATP-Binding Cassette) ATPaz Süperailisi.....	11
1.3.4. AAA-tipi ATPaz Süperailisi.....	13
1.3.5. E-tipi ATPaz Süperailisi.....	13
1.4. Termofilik Bakteriler ve Termofilik Enzimlerin Önemi .....	13
1.4.1. <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Bakterisi .....	15
1.5. Çalışmanın Amacı ve Önemi .....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	18
2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller .....	18
2.2. <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Bakterisinin Al Dirençliliğinin Tespiti .....	20
2.3. <i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Bakterisinin Al Direnç Geninin (Al <sup>R</sup> ) Klonlanması .....	21
2.3.1. Genomik DNA (gDNA)'nın İzolasyonu .....	21
2.3.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi .....	21
2.3.2. Klonlama Vektörü pUC18'in İzolasyonu .....	22

2.3.3.	gDNA'nın ve Klonlama Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi....	23
2.3.4.	Kesim Ürünlerinin Alıcı <i>E. coli</i> JM101 Konak Hücrelerine Aktarılması ve Klon Kütüphanesinin Oluşturulması .....	23
2.3.5.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu.....	24
2.3.6.	Klonların İçerdiği gDNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	24
2.3.7.	Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi .....	25
2.3.8.	Plazmide Aktarılan gDNA Parçasının Tüm DNA Baz Diziliminin Eldesi .....	25
2.3.9.	DNA Sıra Analizi Sonuçlarının Genbank Verileri ile Karşılaştırılması.....	27
2.4.	İlgili Gen Ürününün Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	27
2.4.1.	Al <sup>R</sup> Geninin pET11a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması .....	27
2.4.1.1.	Al <sup>R</sup> Geninin Yakalanması İçin Primer Dizaynı ve Genin Eldesi .....	27
2.4.1.2.	Al <sup>R</sup> Geninin pTOPO-T/A Vektörüne Aktarımı.....	29
2.4.1.3.	pTOPO-Al <sup>R</sup> Plazmidinin Alıcı <i>E. coli</i> TOP10 Hücrelerine Aktarımı .....	29
2.4.1.4.	Al <sup>R</sup> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması ve Alıcı Konak Hücrelere Aktarımı .....	30
2.4.2.	Proteinin Ekspresyonu .....	32
2.4.2.1.	Genin Uygun Ekspresyon Zamanının Belirlenmesi .....	32
2.4.2.2.	Proteinin Çözünürlülük Karakterinin Belirlenmesi.....	32
2.4.2.2.1.	SDS-PAGE Analizi .....	32
2.4.2.3.	Proteinin Sıcaklığa Dayanıklılık Derecesinin ve Zamanının Belirlenmesi .....	34
2.4.2.4.	Proteinin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	34
2.4.2.5.	Proteinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Yoğunlaştırılması .....	35
2.4.2.6.	Protein Örneğinin Gümüş Boyaması.....	35
2.4.2.7.	Proteinin Aminoasit Sırasının N-Ucu Sıra Analizi İle Belirlenmesi.....	36
2.4.3.	Proteinin ATPaz Özelliğinin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	36
2.4.3.1.	Kullanılan ATPaz Reaksiyonları.....	36
2.4.3.1.1.	İkili Enzim Yöntemi (Coupled Enzyme Assay).....	36
2.4.3.1.2.	Standart ATPaz Yöntemi .....	37
2.4.3.2.	Biyokimyasal Karakterizasyonlar .....	38
2.4.3.2.1.	ATPaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi .....	38
2.4.3.2.2.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	38
2.4.3.2.3.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	39
2.4.3.2.4.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	39
2.4.3.2.5.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Tuz Gerekliliği .....	39

2.4.3.2.6.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Diğer Metallerin Etkisi .....	40
2.4.3.2.7.	ATPaz Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi.....	40
2.5.	Alüminyum Dirençliliğinin <i>E. coli</i> 'de Disk Difüzyon Metodu İle Yeniden Belirlenmesi .....	41
2.6.	Enzimin Kristallendirme Çalışmaları .....	41
3.	BULGULAR .....	43
3.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Bakterisinin Al Dirençliliğinin Tespiti .....	43
3.2.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 Bakterisinin Al Direnç Geninin Klonlanması ve Baz Sırasının Belirlenmesi.....	43
3.3.	İlgili Gen Ürününün Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	54
3.3.1.	Alüminyum Direnç Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	54
3.3.2.	Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması .....	58
3.3.3.	Proteinin Enzimatik Özelliklerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	62
3.3.3.1.	İkili Enzim Yöntemi ile Aktivitenin Varlığının Tespiti .....	62
3.3.3.2.	Standart ATPaz Yöntemi ve Biyokimyasal Karakterizasyonlar .....	63
3.3.3.2.1.	ATPaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi .....	63
3.3.3.2.2.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	64
3.3.3.2.3.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Kinetik İncelemeler .....	65
3.3.3.2.4.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Tuz Gerekliliği .....	66
3.3.3.2.5.1.	Magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) .....	66
3.3.3.2.5.2.	Sodyum ( $Na^{+}$ ).....	67
3.3.3.2.5.3.	Potasyum ( $K^{+}$ ).....	67
3.3.3.2.5.	ATPaz Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi .....	69
3.3.3.2.6.	ATPaz Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi.....	73
3.3.3.2.6.1.	EDTA.....	73
3.3.3.2.6.2.	$\beta$ -merkaptotanol.....	74
3.3.3.2.6.3.	Sodyum Azidür.....	74
3.3.3.2.6.4.	Ouabain.....	75
3.4.	Alüminyum Dirençliliğinin <i>E. coli</i> Hücresinde Yeniden Belirlenmesi.....	76
3.4.1.	Disk Difüzyon Metodu .....	76
3.5.	Enzimin Kristallendirme Çalışmaları .....	76
4.	TARTIŞMA .....	78
5.	SONUÇLAR .....	85
6.	ÖNERİLER .....	86

7.	KAYNAKLAR .....	87
	ÖZGEÇMİŞ.....	93



## ÖZET

Bu çalışmada, 100 mM'a kadar  $Al^{+3}$ 'e dirençli olduğunu belirlediğimiz, *Anoxybacillus gonensis* G2 termofilik bakterisinin alüminyum dirençlilik genine ait özellikler araştırılmıştır. İlgili gen klonlandıktan sonra DNA dizin analizi yapıldı ve amino asit sırası tespit edildi. Gen dizisi, Genbank ile karşılaştırılarak, gen hakkında detaylı bilgilere ulaşıldı. Karşılaştırmalar sonucunda ATPaz'lara olan benzerliği nedeniyle, ilgili gen önce bir ekspresyon vektörüne klonlandı ve bu sayede bol miktarda üretilerek saflaştırıldı. Saf enzimin ATPaz aktivitesi belirlendikten sonra, bu aktiviteye ait biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

*A. gonensis* G2 bakterisinin sahip olduğu alüminyum dirençlilik geni, 666 baz çifti büyüklüğünde ve 222 amino asit içerdiği bulundu.  $Al^R$  geninin Genbank karşılaştırmaları da hem alüminyum dirençliliği genlerine yüksek oranda benzediğini hem de ATPaz benzerliğini ortaya koydu. Enzimin çalıştığı optimum pH 6,0 ve sıcaklık değeri ise  $73^{\circ}C$  olarak belirlendi. Enzimin  $K_m$  değeri 10  $\mu M$ ,  $V_{max}$  değeri ise 7,2 ünite olarak tespit edildi.  $Zn^{+2}$  ve  $Al^{+3}$  iyonlarının enzimin aktivitesini arttırdığı,  $Ag^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  iyonlarının ise aktiviteyi azalttığı bulundu. 100 mM  $Li^+$ , 100 mM  $Co^{+2}$  ve 200 mM  $Cu^{+2}$  iyon konsantrasyonlarının aktiviteyi tamamen inhibe ettiği belirlendi. EDTA'nın aktiviteyi 80 mM konsantrasyonda % 62 ve sodyum azidürün 50 mM konsantrasyonda % 86 azalttığı, 200 mM  $\beta$ -merkaptolanin ve 7 mM Ouabainin konsantrasyonlarının ise enzimi tamamen inhibe ettiği tespit edildi. Enzimin kristallendirilebilmesi için en uygun şartların, % 10 izopropanol ve % 22 PEG-4000 içeren 1 M HEPES (pH 7,5) tamponun olduğu tespit edildi. Enzimin, bu şartlar altında iğne şeklinde kristal yapılar oluşturduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *Anoxybacillus*, Alüminyum, ATPaz, Enzim Kristalizasyonu.

## SUMMARY

### Cloning, Expression and Characterization of the Aluminum Resistancy Gene of *Anoxybacillus gonensis* G2

In this study, we studied the properties of aluminum resistance gene from a thermophilic bacteria, *A. gonensis* G2 that is resistant up to 100 mM  $Al^{+3}$ . First of all, the gene was cloned and then, the nucleotide and amino acid sequences of this gene were determined. We obtained more information about the gene after Genbank similarities of the gene were done. According to these data, we found that the gene is similar to some ATPases. This gene also was cloned into the expression vector in order to obtain more and pure gene product. This gene product was used to determine the ATPase activity and the biochemical features of the activity.

We found that the aluminum resistance gene from *A. gonensis* G2 has 666 base pairs and 222 amino acids. It was confirmed that this gene is responsible for aluminum resistancy and is similar to some ATPases by Genbank comparisons. We determined the optimum pH value for the activity is 6,0 and the temperature is 73°C. We calculated that  $K_m$  is 10  $\mu$ M and  $V_{max}$  is 7,2 units for the activity. The activity was increased by  $Zn^{+2}$  and  $Al^{+3}$  ions and decreased by  $Ag^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ , and  $Cd^{+2}$  ions. Especially,  $Li^+$ ,  $Co^{+2}$ , and  $Cu^{+2}$  ions completely inhibited the activity at high concentration, 100, 100, and 200 mM, respectively. We determined the activity was reduced to 62% with 80 mM of EDTA and 86% with 50 mM sodium azide. 200 mM of  $\beta$ -mercaptoethanol and 7 mM of ouabain completely inhibited the activity.

The optimum crystallization conditions were determined as 1 M HEPES (pH 7,5) including 10% isopropanol, 22% PEG-4000. We obtained the crystal structure of the enzyme like needle.

**Key words:** *Anoxybacillus*, Aluminum, ATPase, Enzyme Crystallization.

## ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Miyozin-ATPaz'ın ATP bağlanma cebi ve ATP hidrolizi .....	9
Şekil 2. Miyozin-ATPaz'ın ATP hidrolizindeki muhtemel reaksiyon yolları.. .....	9
Şekil 3. ATPaz reaksiyonunda kullanılan standart birleştirilmiş enzim yöntemi reaksiyon şeması .....	37
Şekil 4. Asılı damla yöntemi .....	42
Şekil 5. Oturan damla yöntemi .....	42
Şekil 6. pUC18 ve pHK281'in kesim sonuçları .....	44
Şekil 7. M13-Reverse (-49) primeri ile elde edilen DNA sırası (833 bp).....	45
Şekil 8. M13-Forward (-21) primeri ile elde edilen DNA sırası (845 bp) .....	45
Şekil 9. pHK281 plazmidi .....	46
Şekil 10. M13-Reverse (-49) primeri ile elde edilen DNA sırasında ortaya konulan Al <sup>R</sup> gen bölgesi (altı çizili kısım).....	47
Şekil 11. pHK281'deki eksik bölgeyi içeren pF2'nin sahip olduğu DNA sırası (846 bp) ..	47
Şekil 12. <i>A. gonensis</i> G2 bakterisinin Al <sup>R</sup> geninin DNA ve aa sırası (666 bp).....	49
Şekil 13. pHK281'in Fatih1 ve Fatih2 primerleriyle verdiği PCR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	54
Şekil 14. pTOPO-Al <sup>R</sup> plazmidinin DNA'sının kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	55
Şekil 15. pET11a ve pTOPO-AIR plazmidlerinin <i>NdeI</i> ve <i>BamHI</i> kesim sonuçlarının % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	56
Şekil 16. Kesim sonrası % 1'lik jelden saflaştırılmış <i>NdeI</i> ve <i>BamHI</i> bölgesi AIR ve aynı enzimlerle kesilmiş alıcı pET11a vektörünün % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	56
Şekil 17. C5 plazmidinin % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	57
Şekil 18. pET11a-AIR plazmidinin 4'lü kesiminin % 1'lik agaroz jel elektroforezi .....	57
Şekil 19. <i>E. coli</i> BL21(DE3) ve C43(DE3) konak hücrelerinde ekspresyonun karşılaştırılması .....	58
Şekil 20. Farklı inkübasyon sıcaklık ve sürelerinin C5 plazmidini içeren <i>E. coli</i> C43(DE3) hücresinde denemesi.....	59
Şekil 21. Proteinin sitosolik karakterde olduğunun gösterilmesi .....	59
Şekil 22. Pellet ve süpernatant kısımlarına ait denatürasyon sıcaklığı uygulaması .....	60
Şekil 23. 65°C sıcaklıkta farklı sürelerde denatürasyon .....	60

Şekil 24. S-Sepharose matriksi MES pH 6,0 tamponu kullanılarak yapılan iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar .....	61
Şekil 25. Proteinin HiLoad (Superdex 200, 16/60) kolonu ile jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar .....	62
Şekil 26. 0,5 mM ATP kullanılarak yapılan ATPaz aktivite tespiti .....	63
Şekil 27. pH-ATPaz aktivitesi grafiği.....	64
Şekil 28. Sıcaklık-ATPaz aktivitesi grafiği.....	64
Şekil 29. ATP için Michaelis-Menten Eğrisi .....	65
Şekil 30. ATP için Lineweaver-Burk Eğrisi .....	65
Şekil 31. ATPaz aktivitesine Mg <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	66
Şekil 32. ATPaz aktivitesine Na <sup>+</sup> iyonunun etkisi.....	67
Şekil 33. ATPaz aktivitesine K <sup>+</sup> iyonunun etkisi .....	68
Şekil 34. ATPaz aktivitesinde kofaktör etkisi .....	68
Şekil 35. ATPaz aktivitesine Zn <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	69
Şekil 36. ATPaz aktivitesine Cu <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	70
Şekil 37. ATPaz aktivitesine Co <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	70
Şekil 38. ATPaz aktivitesine Cd <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	71
Şekil 39. ATPaz aktivitesine Mn <sup>+2</sup> iyonunun etkisi .....	71
Şekil 40. ATPaz aktivitesine Li <sup>+</sup> iyonunun etkisi.....	72
Şekil 41. ATPaz aktivitesine Ag <sup>+</sup> iyonunun etkisi .....	72
Şekil 42. ATPaz aktivitesine Al <sup>+3</sup> iyonunun etkisi.....	73
Şekil 43. ATPaz aktivitesine EDTA'nın inhibitör etkisi .....	73
Şekil 44. ATPaz aktivitesine $\beta$ -merkaptolanol'ün inhibitör etkisi.....	74
Şekil 45. ATPaz aktivitesine sodyum azidürün inhibitör etkisi .....	75
Şekil 46. ATPaz aktivitesine ouabainin inhibitör etkisi.....	75
Şekil 47. Enzimin kristallendirme çalışmalarını sonucunda elde edilen iğne şeklinde kristalleri .....	77

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Kullanılan SDS-PAGE bileşenleri .....	33
Tablo 2. Asılı damla yöntemine göre kullanılan kristallendirme ortamları .....	42
Tablo 3. <i>A. gonensis</i> G2 bakterisinin Al dirençliliğinin gösterilmesi için farklı pH ve konsantrasyonlarda $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ içeren GM ortamındaki inkübasyon sonuçlarının $OD_{600}$ 'deki ölçüm değerleri .....	43
Tablo 4. $Al^R$ geninin aminoasit sırasının protein-BLAST karşılaştırması sonucu elde edilen benzerlik kategorileri ve oranları.....	50
Tablo 5. $Al^R$ geni aa sırasının diğer organizmalarla karşılaştırılması.....	51
Tablo 6. <i>A. gonensis</i> G2 bakterisinin diğer bazı organizmalardaki PP-loop superalesi ATPaz'larla aa sırası karşılaştırması .....	53
Tablo 7. Disk difüzyon deneyi sonuçları .....	76

## SEMBOLLER DİZİNİ

<i>A. gonensis</i>	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
aa	amino asit
AAA	ATPases Associated with various cellular Activities
ABC	ATP-Binding Cassette
ADP	adenozin difosfat
Al	alüminyum
Al <sup>R</sup>	alüminyum direnç geni
AMP	adenozin monofosfat
APS	amonyum persülfat
ATP	adenozin trifosfat
ATPaz	adenozin trifosfataz
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
bp	baz çifti
DNA	deoksiribo nükleik asit
dNTP	deoksinükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraasetik asit
FAS	ferrik amonyum sülfat
FBA	fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz
gDNA	genomik DNA
GI	glukoz izomeraz
HEPES	4-2-hidroksietil) piperazin-1-etanosulfonik asit
IPTG	izopropil $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosit
kbp	kilobaz çifti
kDa	kilo dalton
LB	Lauria-Bertani
LBA	Lauria-Bertani agar
LDH	laktik dehidrogenaz
M	marker veya molar
MBI	Fermentas

ME	merkaptoenatol
MES	2-morfolinoetansulfonik asit
mM	milimolar
mmol	milimol
MW	moleküler ağırlık
NAD	nikotinamid adenin dinükleotit
NBF	nükleotit bağlanma birimi
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NPP	nükleotid pirofosfataz/fosfodiesterazları
NTPDaz	nükleosidtrifosfat difosfohidrolazları
OD	optik yoğunluk
ORF	açık okuma dizileri
PAGE	poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	protein blotlama solüsyonu
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
pDNA	plazmit DNA
PEG	polietilen glikol
PEP	fosfoenol prüvat
Pi	inorganik fosfat
pmol	pikomol
PP	pirofosfat
ppm	milyonda bir
PVDF	poliviniliden diflorid
SDS	sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetikasit-EDTA
TCA	trikloroasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil $\beta$ -D-galaktopiranosid
$\mu$ M	mikromolar

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Metallerin Canlı Yaşamındaki Rolü

İnsanoğlu, yaşam kalitesini arttırmak ve sonsuz beklentilerini karşılamak amacıyla endüstriyel gelişmeleri başdöndürücü bir hızla gerçekleştirmektedir. Endüstrinin ve endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, aslında son teknolojiyle donatılmış olan canlılara özellikle de mikroorganizmaları anlamaya ve keşfetmeye doğru yeniden bir dönüş olmakta ve bu organizmalar taklit edilen canlı ve model organizma olarak karşımıza yeniden çıkmaktadır. Biyolojik sistemler üzerinde yapılan çalışmalar arttıkça canlıların yapısını oluşturan ve çeşitli fonksiyonlarının yerine getirilmesinde rol oynayan, sürekli etkileşim içinde buldukları metallerin de aslında canlı-metal ilişkisi çerçevesinde ayrı birer araştırma alanı olarak karşımıza çıkması hiç de şaşırtıcı değildir.

Biyosferde yer alan mikro alemden makro aleme kadar gerek hücresel seviyede ökaryotlarda olduğu gibi gelişmiş bir hücre sistemine sahip olsun gerekse prokaryotlarda olduğu gibi daha basit hücrelere sahip olsun gözle görülebilen veya görünemeyen tüm canlı gruplarını ele aldığımızda, canlılığın en küçük birimi olan hücre karşımıza çıkmaktadır. Biyolojik manada hücre, kimyasal manada milyonlarca metalin ve ametalin sistemli bir şekilde birarada bulunmasını gerektirmektedir. Hücrenin temel yapısını, oluşturan hidrojen, karbon, oksijen, azot, fosfor ve kükürt gibi elementleri makro elementler; yine hücresel fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynayan sodyum, klor, magnezyum, potasyum ve kalsiyum gibi elementleri de mikro elementler olarak adlandırmaktayız (Harrison ve Hoare, 1980; Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Bu temel elementlerin yanısıra, iz elementler olarak bilinen demir, çinko, bakır, mangan, kobalt, iyot, molibden ve alüminyum gibi elementler daha çok enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak rol oynayan elementlerdir (Harrison ve Hoare, 1980; Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Kiziroğlu, 1990). Buraya kadar bahsedilen elementler, anorganik ve organik moleküllerin oluşmasını ve işlevsel olmalarını sağlarlar ve organizma bünyesinde belli oran ve düzen içerisinde yer almaktadır.



Canlılıkta bu kadar önemli roller üstlenen metaller içerisinde biyolojik rolleri olmayan ve her organizmada bulunmayan alüminyum, kurşun, civa, gümüş, altın gibi metaller özellikle mikroorganizmalar olmak üzere potansiyel toksik etkiler gösterebilmektedirler (Harrison ve Hoare, 1980; Hussein vd., 2005). Gerekli olmayan metallerin toksikliği, ligand etkileşimlerinden dolayı gerekli olan metaller yerine bağlanma özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bunlara ilave olarak hem gerekli olan hem de olmayan metaller organizma bünyesinde yüksek oranda bulduklarında hücre membranı, enzim spesifikliği, DNA yapısı gibi yapı ve fonksiyonlara zarar verebilmektedir (Hussein vd., 2005).

Endüstriyel atıkların kontrolsüzce atılması ve madenlerin işlenmesi gibi insan aktiviteleri çevrede metallerin birikmesine neden olmaktadır. Metallerin ve ağır metallerin endüstriyel atık sularında ve toprakta varlığı, sadece büyük bir çevresel kirliliğe yol açmayıp aynı zamanda da ortamın mikroorganizma bütünlüğünü değiştirmektedir. Sadece çeşitli metal türlerinin birikimi değil, konsantrasyonu, ortamın pH'sı ve metal iyonlarının çözünebilirliği gibi faktörler de çevresel toksisiteyi arttırmaktadır. Sonuç olarak, bu durum karşısında mikroorganizmalar kendi yaşamlarını devam ettirebilmek için çeşitli tolerans veya dirençlilik mekanizmaları geliştirmişlerdir. Metal toksikliğinin azaltılmasında veya önlenmesinde, metallerin dışarı atılması, şelatlayıcı ajanlar ile tutulması veya metabolize edilmesi gibi mekanizmalar bilinmektedir (Fischer vd., 2002). Bu sistemler içerisinde moleküler mekanizmalara örnek olarak *Synechococcus* PCC 7942 bakterisinin  $Cd^{+2}$  dirençli suşu verilebilir. Artan  $Cd^{+2}$  konsantrasyonuna bağlı olarak *smtA* geninin kopya sayısının artırılmasıyla hem  $Cd^{+2}$ 'ye hem de diğer divalent katyonlara bağlanma yeteneğindeki bir prokaryotik metalotionin kodlanmaktadır (Geisler vd., 1998). Biyoteknolojik araştırmalarda model ve konak organizma olarak kullanılan *E. coli*'ye ait *insA-7* geninin ekspresyonunun  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Co^{+2}$ 'ye adapte olabilen suşlarında arttığı bulunmuştur. Bugün, *insA-7* geninin  $Zn^{+2}$ 'ye toleransında rol aldığı tespit edilmiştir (Brocklehurst ve Morby, 2000).

Metaller içerisinde alüminyumun insan sağlığına olan etkilerinin tespit edilmesiyle birlikte, bu metale olan ilgi de artmıştır. Alüminyumun hücresel seviyedeki zararlarının belirlenmesinden sonra, tolerans ve direnç mekanizmalarının belirlenmesi üzerine olan araştırmalar da artmaktadır. Bitkilerdeki organik asit salınımıyla alüminyumun şelatlanması mekanizması dışında hücresel toksisitenin önlenmesi veya tolere edilmesiyle

ilgili çalışmalar henüz tamamlanamamıştır (Fischer vd., 2002). Bu bakımdan alüminyum dirençliliği ile ilgili akılda olan sorular devam etmektedir.

## 1.2. Alüminyum (Al)

Alüminyum, dünya yüzeyinde % 8,3 bulunma yoğunluğu ile oksijen (% 45,5) ve silisyumdan (% 25,7) sonra en çok bulunan üçüncü elementtir (Fischer vd., 2002). Toprakta ve dolayısıyla suda, magnezyum, demir, çinko gibi metallere daha çok bulunabilmesine rağmen, fizyolojik fonksiyonelliği açısından dünyada yaşayan organizmalar için biyolojik olarak gerekli metaller içinde bulunmamaktadır (Hickman vd., 1982). Doğada bol ve toksik formlarda bulunmasına rağmen organizmalara neden belli formlarının etki ettiği yönünde soruların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Alüminyumun dünyada en bol bulunan element olan silisyum ile kolaylıkla reaksiyona girerek alüminyumsilikat ve oksijenle bauxite oluşturabilmesi sadece bazı çözünebilir formlarının toksik etkide olmasını sağlamaktadır (URL-1, 2004). İşte bu nedenle de alüminyumun biyolojik olarak bulunabilirliği azalmaktadır. Örneğin, insanda bulunabilecek alüminyumun kaynağı, alınan alüminyum katkılı ilaçlar, suya veya yiyeceklere karışmış alüminyumdur.

Toprağın veya suyun pH'sının düşmesi, alüminyumun daha çözünebilir ve biyolojik olarak bulunabilir duruma sokmaktadır. Alüminyumun doğal olarak bulunduğu topraklarda toprak asitliği, alüminyumlu bileşiklerin çözünebilir formlara dönüşmesinden dolayı düşmekte ve bu da özellikle tahıl üretiminin azalmasına yol açmaktadır. Dünya tarım alanlarının yaklaşık % 40'lık bir kısmı asidik topraklardan oluşmaktadır. Düşük su tutma kapasitesi, toprak kabuklanması ve erozyon gibi fiziksel etkiler asidik toprakların düşük üretkenliğini daha da kötüleştirir (Hamilton, 2002). Normalde, alüminyum toksikliği toprağın kireçlenmesiyle iyileştirilebilir. Bu işlem toprağın pH'sını artırır ve alüminyumun çözünebilir formlara dönüştürülmesini sağlar. Ancak bu işlemler, oldukça pahalıdır ve toprağın gerçek pH değerinde kalmasını sağlamaz. Bu nedenle, gelişmiş ülkeler alüminyuma dirençli bitkilerin kullanımı üzerine durmaktadırlar.

Bazı nötr veya hafif asidik topraklarda bitkiler için zararlı etki oluşturulmasına rağmen, pH'nın 4,5'tan düşük olduğu durumlarda çözünebilir toksik formlar oluşmaktadır (Fischer vd., 2002; Jo vd., 1997; Kawai vd., 2000). Alüminyum bulunduğu

ortamlarda, florür, sülfat ve fosfatlarla kompleks bileşikler oluşturur. Bu formlar arasında inorganik monomerik alüminyum, Al toksikliği ile ilgili olan formdur. Total Al yerine inorganik monomerik alüminyum miktarının bilinmesi, Al toksikliğinin belirlenmesinde oldukça iyi bir indikatördür. pH 4'ün altındaki solüsyonlarda Al-“tolerans” mikroorganizmalar ancak “asit-tolerans” bakteriler olarak karşımıza çıkmaktadır. Toprakta Al içeren bir mineral çözüldüğü zaman, altı H<sub>2</sub>O grubuyla bağ yapabilen form olan Al<sup>+3</sup> salınır. Toprak solüsyonunun asitliği düştüğünde Al(OH)<sup>+2</sup>, Al(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Al(OH)<sub>3</sub>, Al(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> formları oluşmaktadır. Yine, OH:Al oranı arttığında, polinükleer hidroksil-Al türleri (Al<sub>13</sub> = AlO<sub>4</sub>Al<sub>12</sub>(OH)<sub>24</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub><sup>+7</sup>) oluşur (Gabelich vd., 2004; Mossor-Pietraszewska, 2001). Tüm bu formlar içerisinde Al<sup>+3</sup> diğerlerine nazaran daha fazla toksik etkidir. Toprak pH'sı 5 ve aşağısına düştüğünde, çözünebilir Al toprak suyuna karışır. Bu durumda çözünebilir Al, oldukça önemli büyüme engelleyici faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

### 1.2.1. Alüminyumun Bitkiler Üzerindeki Etkisi

Dünyamızda tarıma elverişli alanların % 49'u ve tahıl üretim alanlarının yaklaşık olarak % 12'si asidik topraklardan oluşmaktadır (Kim vd., 2001). Mineral asit topraklar, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> gibi iyonları doğal olarak bulunduran topraklardır. Bu iyonların toprakta olması, pH'nın düşmesine neden olmaktadır. Düşük asitlikteki topraklarda Al, bitkiler açısından toksik etkiye sahip çözünebilir formlar olarak bulunur. Büyük miktarlarda humik asit ve bitki artığı içeren organik asitli topraklar, daha az miktarlarda Al içeriğine sahiptirler. Çoğu ekonomik öneme sahip zirai bitkiler için Al iyonları, mikromolar konsantrasyonlarda kök büyümesini inhibe eder. Örneğin, buğdayda Al'nin +1 ve +2 değerliğine sahip olan formlarına nazaran, +3 değerliğindeki formu daha da toksik etkiye sahiptir (Mukherjee, 1997).

Al'nin bitkilerdeki ilk hedef dokusu kök apeksidir. Daha sonraki etkileri, hücre duvarı ve membran sistemi ve hücre içi fonksiyonel moleküllerdir (DNA, proteinler, enzimler ve polisakaritler). Eğer kök ucu bölgesi etkilenirse, bitkinin topraktan su ve diğer besin maddelerini alımı engellenmiş olacaktır. Al'nin yan kök oluşumunu engellemesinin yanında, kök hücresi bölünmesini ve büyümesini de inhibe edici etkileri bulunduğu tespit edilmiştir. Böylece kökten suyun alınımını, hücreler arası madde alış-verişini engeller (Schildknecht ve Vidal, 2002). Bu etkiler sonucunda, verim olumsuz

yönde etkilenmektedir (Echart vd., 2002; Nawrot vd., 2001; Silva vd., 2001a ve b). Özellikle, buğday, kanola, soya, yulaf, çavdar, turp ve pirinç gibi önemli tarım bitkileri başta olmak üzere bir çok bitki, alüminyuma karşı toleranslıdır (Echart vd., 2002; Fischer vd., 2002; Silva vd., 2001a ve b; Wu vd., 1997).

Alüminyumun bitkiler üzerine etkilerini şu şekilde sıralayabiliriz. Hücre duvarındaki pektin moleküllerine bağlanır ve büyümeye engel olur. Membrana bağlı proteinlere ve lipit tabakaya bağlanır. Al stresi altında kök hücreleri, vakuol oluşumu gözlenir, golgi fonksiyonları azalır, plastid bölünmesi azalır, nükleus yapısı değişikliğe uğrar, sitoplazma kaybı olur. Meristem hücrelerin büyüme farklılığından dolayı organizasyonu ve düzeni bozulur ve vasküler sistem tanımlanamaz. Toprakta fosfor, kalsiyum, demir, magnezyum ve mangan alımı durur. Böylece hücreler yerine getirilmesi gereken tüm canlılık fonksiyonları durmuş olur (Delhaize ve Ryan, 1995).

Elbette ki Al'ye karşı oluşan cevaplar, her bitkide aynı değildir. Atlas 66, Chinese Spring, BH1146, Chisholm ve Century gibi buğday kültürvarları alüminyumun toksik etkisine karşı toleranslı, Redcoat, Arthur, Canadian Hard Red Spring gibi dünyada yaygın olarak kullanılan buğday kültürvarları ise oldukça duyarlıdırlar. Bunlara benzer olarak kanola, soya, yulaf, çavdar, turp ve pirinç gibi önemli tarım bitkilerinin geliştirilmiş bazı kültürvarları alüminyuma karşı toleranslıdır (Echart vd., 2002; Fischer vd., 2002; Silva vd., 2001a ve b; Wu vd., 1997).

### 1.2.2. Alüminyumun Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi

Alüminyumun toksik etkisi sadece bitkiler için değil, aynı zamanda bakteriler için de geçerlidir. Mikroorganizmaların bünyesinde veya yaşadıkları ortamda fazla miktarda bulunması durumunda ortamdaki alüminyum iyonları, DNA ve proteinlerle bağ yaparak fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra, hücrede aktif rol oynayan  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ve  $Ca^{+2}$  gibi iyonları da inhibe etmektedir (Schott ve Gardner, 1997). Örneğin, canlılık faaliyetleri için gerekli olan ATP'ye, hidrolizi için mutlak gerekli olan magnezyum iyonlarından  $10^7$  kat daha fazla bağlanmakta ve böylece kullanımını engelleyerek mikroorganizmaların büyümesini durdurmaktadır (Fischer vd., 2002). Bunların dışında  $Al^{+3}$  iyonları, hücrenin yapıtaşları olan nükleik asit, protein ve polisakaritlerdeki oksijen atomlarının en önemli bağlayıcısıdır (Mossor-Pietraszewska, 2001). Bakteriler bu tür

toksik etkilere karşı, hücre içi metal konsantrasyonlarını belli sınırlar içerisinde tutmak zorundadır. Bu dengenin yanı sıra, bu tür metallere yönelik tolerans mekanizması geliştirerek kendilerini bu zararlı etkilere korumaya çalışmaktadırlar. Hücre içindeki alüminyum, alüminyuma toleranslılığı sağlayan proteinlerle bağlayarak toksik etkiyi minimuma indirmeye çalıştıkları düşünülmektedir (Jo vd., 1997).

### **1.2.3. Alüminyumun Hayvan ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri**

Alüminyum, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaptığı etkiler kadar, bu metalle kirlenmiş su, hava ve gıdalar ile beslenen diğer organizmaları da etkileyecektir.

Yapılan deneyler, alüminyumun hayvanlar üzerinde önemli derecede zararlı etkisinin olduğunu göstermiştir. Deneklere, alüminyum klorür, alüminyum nitrat ve alüminyum sülfat içme sularına katılarak verilmiş ve önemli fonksiyonel bozuklukların ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu bozukluklar; kilo alınımının yavaşlaması veya kaybı, karaciğer hücrelerinde irileşme, hücre AMP, ADP ve ATP seviyelerinde düşüş, beyinde ATPaz aktivitesinin belirgin bir şekilde düşmesi, öğrenme ve aktivitelere cevapta kayıplar, motor reflekslerinin çalışmasının yavaşlaması, kanın hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonunda düşüş ve organların vücut büyüklüğüne olan oranlarının değişmesi şeklinde olmaktadır (URL-1, 2004 ve URL-2, 2004).

İnsan hayatı açısından ele alındığında, günlük hayatımızda sıklıkla kullandığımız alüminyum, hücrelerde farklı bileşikler meydana getirerek oldukça zararlı bir etkide bulunmaktadır. Alüminyumun insan vücuduna alınımı genellikle kirlenmiş içme sularının kullanımı, antasit türü ilaçların aşırı bir şekilde tüketilmesi ve solunum yolu ile olmakta ve etkisi, gastrointestinal, hematolojik, steskeletal (iskelet sistemi ile ilgili) ve nöral olmak üzere 4 kısımda incelenebilir. Gastrointestinal etkiler, magnezyum, demir, flor, fosfor ve kalsiyum gibi oldukça önemli iyonların geri emiliminin engellenmesi ve bu etkilere bağlı olarak ortaya çıkan sekonder hastalık durumlarıdır. İskelet sistemine etkileri, kalsiyum ve fosfor kaybına bağlı olarak kemik yumuşaması ve kemiklerde mineralleşmenin düşmesidir. Kanda oksijen taşınmasını sağlayan hemoglobinin yapımının ve kaslara oksijen ileten miyoglobinin kullanımının engellenmesi, vücudun gereksinim duyduğu demirin emilim yeri olan bağırsaklardan ihtiyaç duyulan diğer dokulara taşımakla sorumlu transferrin proteininin iş göremez hale gelmesi hematolojik olarak verdiği zararlardandır. İnsan üzerine

zararlı etkileri olan alüminyumun bir diğer önemli etkisi de nörolojik olarak beyin üzerinedir. Alüminyumun kronik dozda alüminyum alımı (normalden 10 ila 30 kat fazla) dolayısıyla beyin hücrelerinde birikimi ile ciddi beyin rahatsızlıklarına, beyin hücrelerinin yıkımına ve sinirlerin çalışmasına engel olmaktadır. Bu etkiler, Alzheimer, Parkinson, Amiotrofik Lateral Sklerozis veya Lou Gehrig's hastalıkları gibi bulgular ortaya çıkarmaktadır (Srinivasan vd., 1999; URL-1, 2004; URL-2, 2004).

### **1.3. Metaller Karşı Hücrel Sistemler ve ATPaz'ların Rolü**

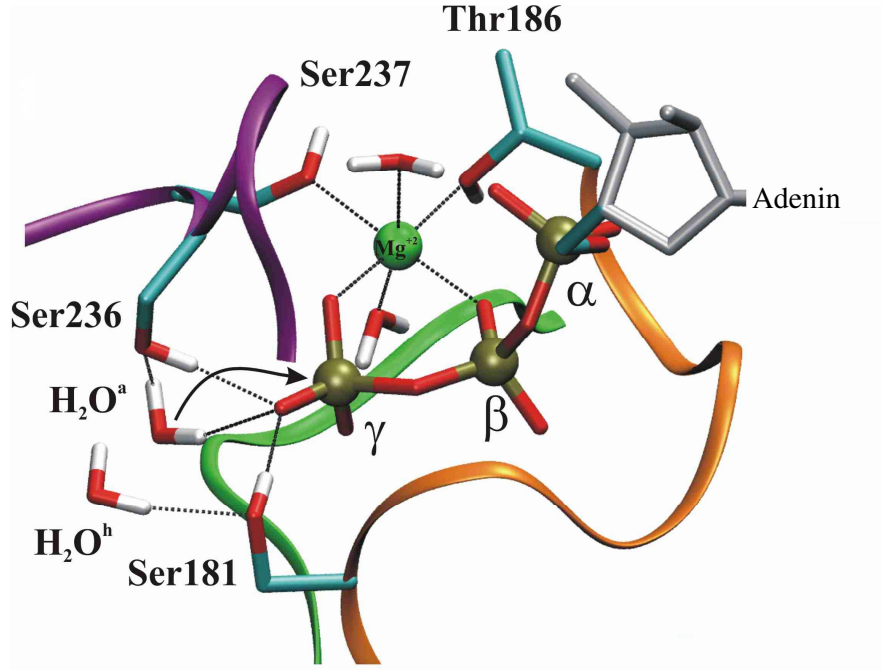
Birçok metal iyon formları, histidin ve sistein birimleri gibi fonksiyonel gruplarla çok kuvvetli bağlar yapmaktadır. Böyle bir reaksiyon gerçekleştiğinde, katalitik veya biyolojik aktiviteleri inhibe etmektedir. Fizyolojik çalışmalar göstermiştir ki, hücre içerisinde biriken ihtiyaç fazlası veya toksik etkili metal iyonları, ya hücre içerisinde metalotiyoninler veya fitoşelatörler ile şelatlanmaktadır ya da sitoplazmik membrana yerleşik durumdaki iyon pompaları kullanılarak dışarı atılmaktadır (Rosen, 2002; Rensing vd., 1999; Solioz ve Vulpe, 1996). Bu yöntem canlılar tarafından aynı zamanda, metal toleransı veya dirençliliğinde de kullanılan bir yöntem olarak görülmektedir (Tong vd., 2003; Bernard vd., 2004; Tong vd., 2002; Capelli, 2002). Yukarıda bahsedilen ve hücre dışına iyonların aktarılmasında görevli olan iyon pompaları, membrana yerleşmiş durumda bulunan adenosin trifosfatazlar (ATPaz'lar) olarak karşımıza çıkmaktadır (Koolman ve Röhm, 2003). Bu güne kadar konu ile ilgili yapılan çalışmalarda,  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi zehirli iyonlara karşı toleransta veya dirençlilikte yine ATPaz'ların rol aldığını görmekteyiz (Stoyanov vd., 2003; Ridder ve Dijkstra, 1999; Solioz vd., 1994; Nies, 1999; Jensen vd., 1999; Rensing vd., 1998).

ATPaz'lar, ATP'yi ADP ve serbest fosfat iyonlarına hidrolizleyen katalitik enzimlerdir (URL-3, 2006). ATPaz'lar için adenosintrifosfataz, adenilpirofosfataz, adenosintrifosfat hidrolaz sinonim isimleri de kullanılabilir (URL-4, 2006). Bu olay sırasında elde edilen enerji, diğer kimyasal reaksiyonların işlemesi için kullanılır. Bu olay, canlılığın tüm formlarında kullanılır (URL-3, 2006). Canlı ortamda ATP'nin ATPaz'lar tarafından parçalanması daima hücrenin özel bir iş yapmasına bağlıdır. Buna örnek olarak, aktif taşıma ve kas hareketi verilebilir (Karlson, 1992). Aktif transport sayesinde, membrana yerleşik durumdaki yer alan ATPaz'lar sayesinde konsantrasyon veya yük

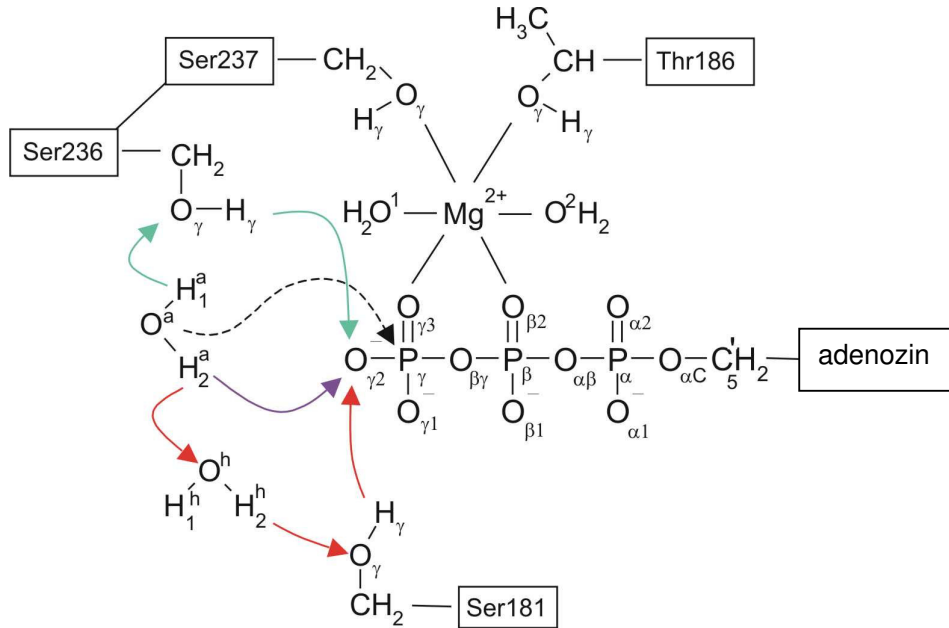
gradientine karşı ilerlemeyi sağlar. Dolayısıyla genellikle ATP hidrolizi sonucunda oluşturulan enerji girişine ihtiyaçları vardır. İşte bu durumlarda taşıyıcı ATPaz'lar karşımıza çıkmaktadır. Taşıyıcı ATPaz'ların bir çok çeşidi vardır. Katyonlar, peptidler, çoklu ilaç direnç proteinleri gibi apolar bileşikler taşınan maddelere örnek olarak verilebilir (Koolman ve Röhm, 2003). Katyon taşıyan iyon pompaları olan ATPaz'lar aynı zamanda metal dirençliliği gibi önemli fonksiyonlarda da rol oynamaktadırlar (Stoyanov vd., 2003; Ridder ve Dijkstra, 1999; Solioz vd., 1994; Nies, 1999; Jensen vd., 1999; Rensing vd., 1998).

Miyozin proteini çizgili kaslarda yer alan miyofibrillerin en önemli proteinidir. Molekülün baş kısmı,  $Ca^{+2}$ -bağımlı ATPaz olarak görev yapar. Bu sayede ATP hidrolizlenerek enerji açığa çıkarılır ve bu enerji kas kasılmasında kullanılır (Koolman ve Röhm, 2003). ATP'nin hidrolizini daha iyi anlamak için miyozin-ATPaz'ının suyla tetiklenen katalitik mekanizmasına bakabiliriz. Miyozinin ATP bağlanma cebinde 3 farklı loop bölgesi bulunur: Anahtar-1, Anahtar-2 ve P-loop bölgeleri. Şekil 1'de bu bölgeler sırasıyla mor, yeşil ve turuncu olarak verilmiştir. Anahtar-1'de yer alan 237. pozisyondaki serin ve P-loop'ta yer alan 186. pozisyondaki treonin amino asitlerinin hidroksil grupları ile magnezyum iyonu ( $Mg^{+2}$ ),  $Mg^{+2}$  ile birlikte de ATP'nin  $\beta$  ve  $\gamma$  fosfatları koordinasyon içinde tutulur. Aynı zamanda Anahtar-1'in 236. pozisyondaki bir başka serin amino asidinin hidroksil grubu, P-loop'un 181. pozisyonundaki serin amino asidinin hidroksil grubu ile  $\gamma$  fosfatın bir oksijeni etkileşim içerisinde. Daha sonra bir su molekülü  $\gamma$  fosfata saldırır.  $\beta$  ve  $\gamma$  fosfatlar arasındaki bağ kırılır ve hidrolizin hızla gerçekleşmesiyle Anahtar-1 eski konumuna döner (Şekil 1). Burada ATP hidrolizi ile ilgili olarak suyun aktifleştirmesine yönelik olarak 3 farklı mekanizma ortaya atılabilir. Mor ok direk yolu, yeşil ok Ser236 yolunu ve kırmızı ok ise Ser181 yolunu göstermektedir. Kesikli çizgiler ise aktifleştirilmiş suyun, ATP'nin  $\gamma$  fosfatına saldırmasını göstermektedir (Şekil 2).

Bugün bilinen ATPaz'lar, P, F, ABC, AAA ve E tipi süperailere dâhildir.



Şekil 1. Miyozin-ATPaz'ın ATP bağlanma cebi ve ATP hidrolizi



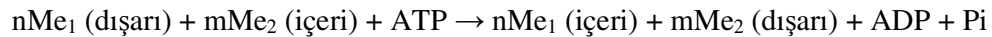
Şekil 2. Miyozin-ATPaz'ın ATP hidrolizindeki muhtemel reaksiyon yolları.



### 1.3.1. P-tipi ATPaz (P-ATPaz) Süperailisi

Bu süperailiye dahil olan ATPaz'ların tamamı bakterilerde, arkebakterilerde ve ökaryotlarda bulunmaktadır. ATP'yi hidrolize ederek katyon alınımını/salınımını kontrol ederler. Plazma veya endoplazmik retikulum membranında yer alırlar. Bu protein komplekslerinin çoğu birden fazla alt birime sahiptir. Ökaryotlarda plazma membranına veya endoplazmik retikular membran sisteminde bulunurlar. Prokaryotlarda ise, sitoplazmik membran içerisinde yerleşiktirler (URL-5, 2006). P tipi ATPaz'larda genellikle korunmuş bölge, 7 aminoasitlik D-K-T-G-T-[LIVM]-[TIS] şeklindedir. PROSITE korunmuş motif verilerine göre 6 farklı motif olarak gözlenmektedir. DKTGTLT motifi 356 üye ile en fazla görülen motiftir. Bunun yanısıra, 28 üye ile DKTGTIT, 3'er üye ile DKTGTVT ve DKTGTLS, 1 üye ile DKTGTMT motifi gelmektedir. İnsanda ise DKTGTII motifi görülmektedir. 27 farklı alt aileye sahiptir (URL-6, 2006).

Birçok ökaryotik P tipi ATPazlar, ATP'yi hidrolizleyerek iyon taşınmasında görev alan katalitik alt ünitelerinde homodimerlere sahiptir.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz,  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz ve fungal  $\text{H}^+$ -ATPaz buna en iyi örnektir. Bu güne kadar üzerinde çalışılmış P tipi ATPaz'lara örnek vermek gerekirse,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ( $\text{Na}^+$  dışarı;  $\text{K}^+$  içeri),  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (gastrik;  $\text{H}^+$  dışarı;  $\text{K}^+$  içeri),  $\text{Na}^+$ -ATPaz,  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz (atım, vakuolde birikim),  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mn}^{+2}$ -ATPaz (dışarı),  $\text{Mn}^{+2}/\text{Cd}^{+2}$ -ATPaz (MntA),  $\text{Mg}^{+2}/\text{Ni}^{+2}$ -ATPaz (birikim),  $\text{Cu}^+/\text{Ag}^+$ -ATPaz (atım),  $\text{Ag}^+$ -ATPaz (atım),  $\text{Cu}^+$  taşıyan ATPaz (hücreiçi, transgolgi membranda), *S. aureus* plazmit p1258'te yer alan  $\text{Cd}^{+2}$ -ATPaz (CadA),  $\text{Zn}^{+2}$ -,  $\text{Cd}^{+2}$ -,  $\text{Pb}^{+2}$ -ATPaz (atım),  $\text{Zn}^{+2}$ -,  $\text{Cd}^{+2}$ -,  $\text{Co}^{+2}$ -,  $\text{Hg}^{+2}$ -,  $\text{Ni}^{+2}$ -,  $\text{Cu}^{+2}$ -,  $\text{Pb}^{+2}$ -ATPaz (atım),  $\text{Cd}^{+2}$ -,  $\text{Zn}^{+2}$ -,  $\text{Co}^{+2}$ -ATPaz (atım),  $\text{Pb}^{+2}$ -ATPaz (atım),  $\text{K}^+$ -ATPaz (birikim),  $\text{Na}^+$ -ATPaz (atım) ve  $\text{K}^+$ -ATPaz (atım) bu süpersınıfa dahil olan ATPazlardandır (Axelsen ve Palmgren, 1998; Stoyanov vd., 2003; Capelli, 2002; Tong vd., 2003; Bernard vd., 2004; Tong vd., 2002; Ridder ve Dijkstra, 1999; Solioz ve Vulpe, 1996; URL-4, 2006). Örneklerden de görüldüğü üzere, mono ve divalent ağır metal ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ) dirençlilik veya tolerans sistemlerinde yer alan ATPaz'lar da bu sınıfa dahildir. Sınıfın katalizlediği reaksiyonu, Me, metal ve n, herhangi bir tamsayı olmak üzere aşağıdaki şekilde özetleyebilmekteyiz (URL-5, 2006).

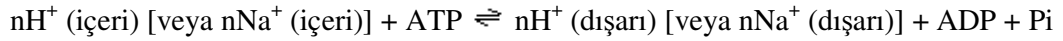


### 1.3.2. F-tipi ATPaz Süperailisi ( $H^+$ veya $Na^+$ -taşıyan F, V ve A Tipi ATPaz)

F tipi ATPaz'lar, bakterilerde olduğu kadar ökaryotik mitokondri ve kloroplastlarında yer almaktadır. V tipi ATPaz'lar ökaryotların vakuollerinde ve bakterilerde bulunurlar, protein trafiği, atık madde işlenişi ve pH düzenlenmesi gibi hücresel işlerden sorumlu ATPaz'lardır. Beyin izoform ATP6B2 bu gruba örnek olarak verilebilir. A tipi ATPaz'lar ise arkebakterilerde bulunurlar. Bütün sistemler, membrana gömülü en az 3  $F_0$  (a:b:c = 1:2:~12) ve en az 5  $F_1$ 'e bağlı ( $F_1$ ,  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ : $\delta$ : $\epsilon$ ) birbiriyle benzersiz altüniteye sahip çoklu altünite sistemleridir. Ökaryotik sistemler bakteriyel olanlardan daha kompleks yapıya sahiptirler (URL-5, 2006).

Bütün ökaryotik F tipi ATPaz'lar, 1 ATP başına mitokondri dışına veya kloroplast tilakoidlerinin içine 3-4  $H^+$  pompalarlar. Bakteriyel F tipi ATPaz'lar ise bakteri dışına 1 ATP başına 3-4  $H^+$  veya  $Na^+$  (sistemlerine bağlı olarak) pompalarlar. Ayrıca bu enzimler aksi istikamette proton akışıyla birlikte bir "elektrokimyasal gradient = proton akış kuvveti" oluştururlar ve ATP sentaz olarak görev alarak ATP sentezlerler. V tip ATPaz'lar ATP başına 2-3  $H^+$  pompalarlar fakat bu enzimlerin ATP sentaz özellikleri yoktur. F tipi ATPaz'lar ile V tipi ATPaz'lar arasında, V tipi ATPaz'ların membran sektöründeki düzenleyici yapılardan kaynaklanan bir "proton kayması" olarak karşımıza çıkan belirgin bir fark vardır (URL-5, 2006).

Sınıfın katalizlediği reaksiyonu n, herhangi bir tamsayı olmak üzere aşağıdaki şekilde özetleyebilmekteyiz (URL-5, 2006).



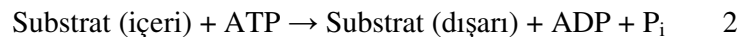
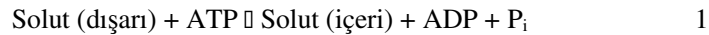
### 1.3.3. ABC-tipi (ATP-Binding Cassette) ATPaz Süperailisi

ABC süper ailesi, hem birikim hem de atım taşıma sistemlerini içerirler ve bazı istisnalar dışında genellikle iki farklı grupta yer alırlar. ABC tipi ATPaz ailesi, protein fosforilasyonu yapmaksızın taşıma işlerinde kullanılacak olan ATP hidrolizini sağlamaktadırlar (URL-5, 2006). Prokaryotlardan insana kadar geniş bir canlı grubunda bulunabilen bu tür ATPaz'lar, metabolik ürünler, lipidler, steroller ve ilaçlar gibi bileşenleri hücre dışına atılımını veya hücre içine alınımını sağlamakla görevlidirler. Prokaryotlarda genellikle şeker ve vitaminler gibi gerekli bileşikler ve metal iyonlarının

hücre içine alınımında, ökaryotlarda ise molekülleri plazma membranının dışına veya endoplazmik retikulum, mitokondri gibi membranla sarılı organellerin içine aktarmakta görevlidirler (URL-7, 2006; URL-8, 2006).

Birçok alt aileye sahip olan ABC tipi ATPaz'lar istisnalar olmakla birlikte transfer ettikleri substratlara göre sınıflandırılmaktadırlar. Yapılarında 2 integral membran birimi/proteini ve bir yada iki sitoplazmik birim/protein (ATP bağlanma domaini veya nükleotit bağlanma birimi-NBF) içermektedirler (URL-5, 2006; URL-7, 2006; URL-8, 2006). Birikim fonksiyonu olan sistemlerde ilave olarak, Gram negatif bakterilerde periplazmada, Gram pozitif bakterilerde ise ya sitoplazmik membranın dış yüzeyinde bağlı bir lipoprotein olarak yada dış membrana bağlı olarak bir hücre yüzeyi ilişkili protein olarak bir veya daha fazla sayıda ekstrasitoplazmik solute-binding reseptör de içermektedirler. Hem integral membran kanal bileşenleri hem de sitoplazmik ATP hidrolizleyici birimleri homo- yada heterodimer yapıda bulunabilirler. ABC transporterların her iki ailesi de translokasyon membran proteininin ya N yada C ucuna bağlı bir yada iki reseptör içermektedir. Bu durum, enzim kompleksinin iki hatta dört substrat bağlanma bölgesine sahip olduklarını göstermektedir (URL-5, 2006). ABC-tipi ATPaz'lar özellikle insanda çoklu-ilaç dirençliliği (multidrug resistance) fonksiyonunun oluşmasında etkindirler. Bugüne kadar insanda kolesterol, lipid, peptid ve üre gibi bileşenlerin taşınmasında rol oynayan 7 altsınıfta toplam 50 ve prokaryotlarda karbohidrat, lipid, vitamin B12, nikel/demir/mangan/kobalt gibi metallerin alınımını sağlayan 25 alım, lipopolisakkarit,  $\beta$ -glukan,  $\beta$ -eksotoksin, lipoprotein, ilaç gibi bileşenlerin ve sodyum iyonunun hücreden dışarı atılımını sağlayan 29 atım olmak üzere 54 alt sınıf tanımlanmıştır (URL-7, 2006; URL-8, 2006).

Sınıfın katalizlediği reaksiyonları, birinci reaksiyon birikim, ikinci reaksiyon ise dışarı atım mekanizmasını göstermek üzere aşağıdaki şekilde özetleyebilmekteyiz (URL-5, 2006).



### 1.3.4. AAA-tipi ATPaz Süperailisi

AAA tip ATPaz'lar ise, hücrel fonksiyonlardan sorumlu olan ATPaz'ları (ATPases Associated with various cellular Activities) içeren üyelerden oluşmaktadır. ATP:ADP antiporter ATPaz'lar olarak da anılırlar. Özellikle hücre döngüsü fonksiyonları, veziküler taşıma, mitokondriyal fonksiyonlar, peroksizom paketlemesi ve proteolizis gibi fonksiyonlarda görev alırlar. ATP bağlanma bölgesi içeren yaklaşık 230 aminoasitlik oldukça korunmuş bölgeye sahip ATPaz'lardır. Bütün organizmalarda bulunmaktadır (URL-5, 2006; URL-9, 2006).

### 1.3.5. E-tipi ATPaz Süperailisi

“Ecto-ATPaz” veya “Extracellular ATPase” olarak da anılan E-tipi ATPaz'lar, hücre dışı ATP hidrolizi yapan enzimlerin genel adıdır.  $Ca^{+2}$  veya  $Mg^{+2}$  iyonları tarafından aktive edilmeleri, F-, P- ve V-tipi ATPaz'ların duyarlı oldukları inhibitörlere karşı dirençli olmaları ve sıklıkla nükleosittrifosfatları hidrolize etme özellikleri ile tanımlanırlar. Birçok plazma membran preparatlarındaki dominant ATPaz aktivitesi iyon pompası ATPaz'lardan farklılık göstermektedir. Bu nedenle, E-tipi ATPaz aktivitesi tanımlaması bu karakteristik özellikler için uygundur. E-tipi ATPaz'lar, hem çözünebilir hem de membrana bağlı ATPaz'ları içerirler. Lenfosit fonksiyonları, böbrek rahatsızlıkları, epilepsi, kanser gibi klinik olgulardaki E-tipi ATPaz'ların rolleri muhtemeldir. 1999 yılında Belçika, Diepenbeek'te yapılan İkinci Uluslararası Ekto ATPaz ve İlişkili Ekto-nükleotidaz Çalıştayı'nda (2<sup>nd</sup> International Workshop Ecto ATPases and Related Ecto-nucleotidases) E-tipi ATPaz'lar, ekto nükleosidtrifosfat difosfohidrolazları içeren 6 alt aileye sahip E-NTPDaz ve ekto nükleotid pirofosfataz/fosfodiesterazları içeren 4 alt aileye sahip E-NPP olarak iki aileye ayrılmışlardır (URL-10, 2006).

## 1.4. Termofilik Bakteriler ve Termofilik Enzimlerin Önemi

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında ökaryotlar, bakteriler ve arkebakteriler olarak üç ana grup altında toplandığı görülmektedir (İnan, 2005). Genellikle

bakteriler, en iyi büyüyebildikleri sıcaklık değerlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıflandırmaya göre, optimum 15°C’de büyüyen fakat -10°C’lerde büyüme gösteren bakterileri de içeren “sakrofiller”, 20-45°C sıcaklık aralığında yaşayabilen ve insan patojen bakterileri de içeren “mezofiller” ve 55-105°C arasında yaşayabilen bakteriler “termofiller” olarak gruplandırılabilirler. Sıcaklık değerlerinden de anlaşılacağı gibi termofilik bakteriler, kaplıca sularında, tropikal topraklarda, gübre yığınlarında, sıcak su kaynaklarında yaşayabilirler (URL-11, 2006).

Enzimler, gerek bakterilerin gerekse mayaların kullanımıyla birlikte indirek olarak gıda üretiminde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardan izole edilmiş enzimlerin ilk defa kullanımıysa 1914 yılında deterjan endüstrisinde ve ilk defa büyük çapta elde edilmeleri ve kullanımları da 1960’larda başlamıştır. Endüstriyel enzim üretimi, enzim özelliklerinin tanımlanabilmesiyle ve üretim teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte hızla artmıştır. İlk ticari bakteri kökenli enzim, 1959 yılında *Bacillus* cinsinden elde edilen protezlar olmuş ve Novozyme (Danimarka) firması ile büyüyerek 1965 yıllarında büyük bir deterjan sektörü haline gelmiştir. Günümüzde endüstriyel enzim firmaları bir çok alanlar için enzim üretmekte ve pazarlamaktadırlar. 2005 yılı itibariyle ticari değeri 2 milyar doları bulan ticari enzimler, toplam enzim üretiminin % 74’ünü oluşturmakta ve deterjan (% 37), tekstil (%12), nişasta (% 11), fırıncılık (%8) ve hayvan besini (%6) gibi alanlarda kullanılmaktadır (URL-12, 2005).

Endüstriyel amaçlı kullanılacak olan enzimlerin, yüksek sıcaklıklarda bozulmadan kalabilmeleri, fizyolojik pH ve sıcaklıklarda aktifliği, alkaline koşullara dayanıklılığı gibi özellikleri taşımaları kullanım maliyetini düşürmektedir (URL-12, 2006). Normal şartlarda yaşayan bir mezofil bakteriden gerekli enzimlerin eldesi, kolay olabilir ancak bu enzimin fabrikasyon şartlarında kullanılabilmesi için anılan özelliklere getirilmesi gereklidir. Bugün bu tür özelliklerin kazandırılması için DNA teknolojisi, protein mühendisliği gibi bilim dalları çalışmalar yapmaktadır. Termofilik organizmalar, yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşayabilen organizmalardır. Bu organizmaların bu tür ekstrem şartlara olan adaptasyonu, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanmaktadır (Sağlam-Ertunga, 2006). Mezofilik bir organizmadan elde edilen enzim, yüksek sıcaklıkta kararlılığını yitirirken, termofilik karakterde olan bir enzim uzun süre dayanıklı kalacaktır. Örneğin, nişasta üretiminde nişastanın jelatinizasyonu esnasında enzim ile hidrolizinden önce 80°C’ye kadar ısıtmak gereklidir. Bu nedenle de kullanılacak olan enzim en az bu sıcaklığa kadar dayanıklı olmak zorundadır (Duchiron

vd., 1997). Bir diğerk örnek şeker endüstrisinde dekstranazların kullanımınıdır. Dekstranazlar (EC. 3.2.1.11), polisakkarid dekstranın  $\alpha$ -1,6-glikosidik bağını hidrolize eden enzimlerdir ve endüstride ham şeker üretiminde sukrozun elde edilmesi için dekstranın parçalanması sırasında kullanılırlar. Burada karşılaşılan problem, pahalı üretim metodlarından kurtulmak için işlemin 55-60°C sıcaklığında buhar basıncında gerçekleştirilmesi gerekliliğidir. Bu nedenle kullanılacak olan dekstranaz enziminin 75°C'ye kadar dayanıklı olması gereklidir. Bu noktada da yine *Thermoanaerobacter* genusuna dahil bakterilerden elde edilen termofilik dekstranazlar iş görmektedir (Wynter vd., 1997). Anılan özelliklerinden dolayı termofilik bakteriler ve bu tür organizmalardan elde edilen enzimlerin yada bu bakterilere has özelliklerin araştırılması uygulanabilirlik açısından önem kazanmaktadır.

#### **1.4.1. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisi**

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisi Balıkesir Gönen Kaplıcası'ndan 2003 yılında Beldüz ve ark. tarafından izole edilerek literatüre kazandırılmış yeni bir termofilik bakteri türüdür. Çomak şekilli, gram pozitif, kendine özgü hareketli ve spor oluşturabilen, 0,75 x 5,0  $\mu$ m büyüklüğünde bir bakteridir. Besi ortamında oluşturduğu koloniler, pürüzlü ve krem renkli görünümündedir. Önemli biyokimyasal özellikleri, zayıf katalaz-pozitif, oksidaz-pozitif, nişasta ve jelatini parçalayabilen, karbon kaynağı olarak glukoz, glikojen, raffinoz, sukroz, ksiloz, fruktoz ve mannitol kullanabilme yeteneğindedir. % 4 NaCl içeren sıvı besiyerinde büyüeyebilen *A. gonensis* bakterisinin pH aralığı 6,0-10,0 olarak belirlenmiştir. Termofilik bir organizma olması dolayısıyla büyüme sıcaklık aralığı, 55-60°C'dir. Oksijen kullanımı açısından fakültatif anaerobiktir (Beldüz vd., 2003).

#### **1.5. Çalışmanın Amacı ve Önemi**

Yer kabuğunda doğal olarak çeşitli seviyelerde var olan metaller, madencilik, endüstri ve zirai çalışmalar neticesinde ekosisteme salınmakta ve dolayısıyla doğal dengeyi bozarak başta insan sağlığı olmak üzere canlıların yaşamlarını kötü yönde etkilemektedirler. Doğal konsantrasyonlarının üzerine çıkıldığında hemen hemen bütün metaller toksik etki oluşturmaktadır. Çevresel metal toksikliğinin giderilmesinde, bugün

kullanılan teknolojilerin başında bitkiler ve mikroorganizmalar yoluyla metallerin tutulması veya metabolize edilmesiyle bertarafı gelmektedir. Metallerle kirlenmiş maddelerin veya çevrenin, endüstriyel olarak temizlenmesi gerekli işlemlerin zaman alması ve maliyetlerinin pahalılığı nedeniyle tercih edilmemektedir. Alternatif olarak, bitkisel arıtımın (fitoremedasyon) yanısıra metallerin mikroorganizmalarca tutulması ve ortamdaki arındırılması daha kullanışlı ve maliyeti düşük çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, metaller ile kirlenmiş ortamların temizlenmesinde ABD'nin 2000 yılı bütçesi 7-8 milyar dolardır ve bu paranın % 35'i metal remedasyonu için harcanmıştır. Yine 2000 yılı verilerine göre metallerin bitkisel olarak arıtılmasında 20 milyon dolarlık market payı 2005 yılında 150 milyon dolara çıkmıştır (Pilon-Simits ve Pilon, 2002).

Metallerin organik kirleticiler gibi degradesi olmaması, bu metallerin ortamdaki uzaklaştırılması için gerek bitkilerin gerekse bakterilerin kullanımını zorunlu kılmıştır. Son yıllarda metal tolere edebilen veya metallere dirençli bakterilerin bu tür kullanım alanlarının olması, biyomineralizasyon, biyoremedasyon veya biyoleaching gibi biyoteknolojik çalışma alanlarını doğurmuştur. Mikrobiyal-arıtım sistemleri bugün madencilik, mineral ve atık su temizliği gibi kullanım alanlarına sahiptir (Klaus-Joerger vd., 2001). Bakteriler tarafından metal tolerans ve dirençlilik mekanizmalarının bilinmesi, hem bu sistemlerin aydınlatılması hem de bu özelliklerin kullanılabilir diğer canlılara aktarılmasıyla (transgenik bitkiler) bu özelliklerden daha farklı şekilde yararlanılabilmeyi sağlayacaktır. Hücresel sistemlerin metal tolerans yolları, insan sağlığı başta olmak üzere canlılarda görülen metal kaynaklı hastalıkların tedavisinde de önemli bir rol oynayacaktır.

Hayatımızın her alanında etkileşim içerisinde bulunduğumuz metallerden biri olan alüminyuma karşı tolerans veya direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında yapılan çalışmalara bakıldığında, genellikle bitkilerin sahip olduğu mekanizmalar tam olarak bilinmemekte fakat bakterilerin tolerans mekanizmaları tam olarak açıklanamamaktadır (Echart vd., 2002; Fischer vd., 2002; Silva vd., 2001a ve b; Wu vd., 1997; Suwalsky vd., 2004). Önerilen bu çalışma, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı araştırmacıları (Prof. Dr. Ali Osman Beldüz ve Yrd. Doç. Dr. Sabriye Çanakçı) tarafından 2003 yılında Balıkesir Gönen Kaplıcası'ndan izole edilerek yeni bir tür olarak literatüre kazandırılan *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin alüminyuma dirençlilik seviyesinin tespitini, dirençlilik ile ilgili genin belirlenmesini ve bu mekanizmada rol oynayabilecek olan enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu içermektedir. Alüminyum dirençlilik geninin termofilik bir bakteriden klonlanarak ekspres edilmesi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin ortaya

konulması ile alüminyum tolerans veya dirençlilik mekanizmalarının araştırılmasına ışık tutacak ve biyoremedasyon ile ilgili uygulama alanlarında kullanılabilceği açıktır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin genomik DNA kütüphanesinin oluşturulması sırasında tespit edilen alüminyum dirençliliği geninin klonlanması, bakterinin dirençlilik özelliğinin belirlenmesi ve gen ürününün karakterizasyonunu içeren çalışmalar aşağıda verilmiştir.

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmamız sırasında kullanılan kimyasal maddeler, enzimler, gerekli sarf malzemeler, gen aktarımında kullanılan plazmit vektörleri, konak bakteri suşları ve çeşitli gen çoğaltım çalışması için gerekli primerler ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve ilgili bilgileri şu şekildedir.  $\beta$ -merkaptotanol (Merck, 805740), agaroz type II medium EEO (Sigma, A5093), agar (Merck, VM259713),  $AgNO_3$  (Merck, K25387510), akrilamid (Sigma, A8887),  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  (Fluka, 237078), amonyum molibdat (AppliChem, A2246.0250), amonyum persülfat (Merck, A734116), amonyum sülfat (Sigma, A4418), ampisilin (AppliChem, A0839.0100), ATP•2Na (Sigma, A2383), *Bam*HI restriksiyon enzimi (New England BioLabs=NEB, R0136S), bromofenol mavisi (Sigma, B5525), bisakrilamid (Sigma, M2022),  $CaCl_2$  (Merck, 137923),  $CdCl_2$ , Merck, CC655817),  $CoCl_2$  (Aldrich, 25,559-9), Coomassie Brilliant Blue G (Fluka, 27815), Coomassie Brilliant Blue R (Fluka, 27816),  $CuCl_2$  (Sigma, C3279), dNTP (Promega, U120-4B), dual color protein marker (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad, 161-0374), *Dra*I restriksiyon enzimi (NEB, R0129S), *Eco*RI restriksiyon enzimi kesim tamponu (=NEBuffer *Eco*RI, NEB, B0101S), *Eco*RI restriksiyon enzimi (NEB, R0101S), EDTA (Merck, K90262021), etanol (Sigma, A3678-1000), etidyum bromür (Sigma, E7637), formaldehit (Promega, Q427B), fosfoenol piruvat (Fluka, 79415), glasiyel asetik asit (Merck, K19581956), gliserol (Riedel-deHaën, 15524), glisin (Sigma, G7126), glukoz (Roche, 1929526), gres yağı,  $H_2SO_4$  (Fluka, 339741), HEPES (Sigma, H0891), HiLoad (Superdex 200, 16/60) (Amersham Pharmacia, 17-1043-01), *Hind*III restriksiyon enzim (NEB, R104S), HotGoldStar DNA polimeraz

enzimi (Eurogentec, ME-0073-05), IPTG (Sigma, I5502), izopropanol (Riedel-deHaën, 24137), karbenisilin (Sigma, C1389), KCl (Merck, K23759135),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (AppliChem, A2945,100), ksilen siyanol (Sigma, X4126), laktat dehidrogenaz (Sigma, L1006), LiCl (Sigma, L9650), maya özütü (Sigma, Y4000), MES Na tuzu (AppliChem, A3101.0025), metanol (J. T. Baker, TBF0196396 1499),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, TA682332),  $\text{MnCl}_2$  (Merck, A665517), Mohr tuzu (ferrik amonyum sülfat =  $\text{FAS} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Merck, A384191), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED, Janssen Chimika, 13.84571),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck, A339898),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, A664174),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, 72048), NaCl (AppliChem, A2942,5000), NADH (Sigma, N4505),  $\text{NaN}_3$  (Sigma, S8032), *NdeI* restriksiyon enzimi (NEB, R0111L), NEBuffer *BamHI* (NEB, B0136S), NEBuffer 2 restriksiyon enzimi kesim tamponu (NEB, B7002S), NEBuffer 4 restriksiyon enzimi kesim tamponu (NEB, B7004S), ouabain (Sigma, O3125), PCR tamponu (10X Taq DNA polimeraz tamponu, Promega, M190G), PEG 4000 (Fluka, 95904), pepton (Oxoid, L37), Midrange protein marker (Promega, V5231), pTOPO salt solution (Invitrogen, KNM4500), pürivat kinaz (Sigma, P7768), fosfoenol piruvat (Fluka, 79415), Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, 17-5072-01), SDS (Amresco, 0227), Smart DNA Ladder (Eurogentec, MW-1700-02), sodyum asetat (Merck, TA404965), S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, 17-0511-01), T4 DNA ligaz enzimi (Promega, M1804), T4 DNA ligaz tamponu (Promega, C1263), TCA (ACROS Organics, 152130010), tiyöüre (AppliChem, A2535.0500), tripton (Merck, V441613949), Tris-HCl (Sigma, T1503), X-gal (AppliChem, A1007.0005),  $\text{Y}^+$ /Tango Buffer (NEB, BY5),  $\text{ZnCl}_2$  (Merck, K3318113), *XbaI* restriksiyon enzimi (NEB, R0145S).

Çalışmada kullanılan besi yerleri içeriklerine göre laboratuarda hazırlandı. Kullanılan besi yerleri, LB (Lauria-Bertani) besi yeri litrede 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl (pH 7,4), LBA besi yeri 1 litre LB besi yerine 12 g agar ilavesiyle hazırlanmıştır. GM besi yeri, litrede % 1 glukoz, % 0,05 pepton, % 0,02 maya özütü ve % 0,02  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  içerecek şekilde hazırlandı. Kullanılan bir diğer besi yeri olan SOC besi yeri ise litrede %2 tripton, % 0,5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$  ve 20 mM glukoz (pH 7,4) içerecek şekilde hazırlandı. Otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

Çalışmada kullanılan diğer sarf malzemeler ile ilgili bilgiler şu şekildedir. Amicon filtrasyon membranı (Millipore, UFC9 010 24), 18 mm cam plaka (Hampton Research, HR3-239), diyaliz membranı (Medicell Int. Ltd.), PVDF-Membran Immobilon P<sup>SQ</sup> Protein

Membranı (Millipore, ISEQ26260 veya IPVH00010), Whatman kağıdı (Whatman, GB005).

Çalışmada kullanılan kitler ve ilgili bilgiler şu şekildedir. Bio-Rad Protein Assays Kit (Bio-Rad, 500-0002), DNA Extraction Kit (MBI Fermentas, K0513), PCR QIAquick Purification Kit (Qiagen, 28106), Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120), QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, 12165), Structure Screen-1 Kit (Molecular Dimension Ltd., MD1-01), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330), TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, KNM4500).

Çalışmada kullanılan vektörler ve bunların aktarımında kullanılan bakteri suşları şunlardır. pET11a (Novagen, 69436-3), pGEM-T Easy (Promega, A1360), pTOPO-T/A (Invitrogen, 710-021849), pUC18 (MBI Fermentas, SD0051), *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega, P9811), *E. coli* C43(DE3)pLysS (Avidis, CC-002B), *E. coli* JM101 (NEB, E4106S), *E. coli* MC1061, *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, C664).

Yapılan PCR çalışmalarında ve DNA dizi analizi sırasında kullanılan primerlerin adları, 5'→3' yönünde DNA sıraları ve sentez ettirildikleri firmalar ile ilgili bilgiler ise şu şekildedir. M13-Forward (-21) primeri (TgT AAA ACg Acg gCC AgT, Promega, Q5391), M13-Reverse (-49) primeri (gAg Cgg ATA ACA ATT TCA, Promega, Q5401), HK281 primeri (gCg gAA ACg Tgg AAg CTT, Iontek, Türkiye), Fatih1 (CAT ATg AAA AAg gAA AAA gCA gTT g) ve Fatih2 (ggA gCA AAT gTg CgA TgA ggA TCC) primerleri (Gent University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Laboratory of Microbiology, Belçika).

## **2.2. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Al Dirençliliğinin Tespiti**

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin Al dirençliliğinin tespiti için, sıvı LB besiyerinde hazırlanan gece kültürü kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda Al içeren GM besiyerinde 3 gün boyunca kültür edildi (Kawai vd., 2000). Kontrol grubu olarak Al içermeyen GM besiyeri kullanıldı. Kültür serilerinde 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 ppm ve mM seviyelerinde olacak şekilde steril  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  ilavesi yapıldı. Konsantrasyonlar dışında Al'un farklı pH değerlerindeki verebileceği muhtemel sonuçları da görebilmek amacıyla, tüm besiyerleri 4,1 – 5,5 – 6,0 ve 7,0 olmak üzere dört farklı pH değerinde inkübasyon gerçekleştirildi. Büyüme olup olmadığına bakılarak dirençlilik tespit edildi.

### **2.3. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Al Direnç Geninin (Al<sup>R</sup>) Klonlanması**

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin genomik DNA kütüphanesinin oluşturulması esnasında üç farklı yaygın kullanılan enzim ele alınarak başlandı. Bu amaç için, *Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile genomik DNA kesildi ve pUC18 vektörüne klonlandı. Çalışmalar sonucunda belirlenen alüminyum dirençlilik geni, *Eco*RI restriksiyon enzimi ile oluşturulmuş kütüphanedeki daha sonra “pHK281” olarak adlandırılan plazmitte tespit edildi.

#### **2.3.1. Genomik DNA (gDNA)’nın İzolasyonu**

*Anoxybacillus gonensis* G2’den saf ve temiz halde DNA izolasyonu yapabilmek için gerekli olan alt kültür, önceden hazırlanılan gliserol stoğundan LBA besiyerine tek koloni düşürülecek şekilde çizgi ekim yapılarak bir gece boyunca 55°C’de büyütülerek hazırlandı. Elde edilen bu alt kültürden alınan tek bir koloni, 30 ml LB besiyerine inoküle edildi ve çalkalayıcılı su banyosunda 55°C’de 200 rpm’de büyütülmesi ile hazırlandı. Bu kültür daha sonra steril 30 ml’lik propilen tüplerde 6000xg’de 10 dakika boyunca çöktürüldü ve elde edilen pelletten gDNA izolasyonu “Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uyularak yapıldı. Elde edilen genomik DNA steril ddH<sub>2</sub>O’da çözülerek % 0,7’lik agaroz jel elektroforezine tabii tutularak tespit edildi ve kullanılına kadar -20°C’de saklandı.

##### **2.3.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi**

Çalışma boyunca izole edilen, restriksiyon endonükleazlarla kesilen genomik DNA ve plazmid DNA’ların ve ligasyon ürünlerinin kontrolü veya saflaştırılması işlemlerinde agaroz jel elektroforezi tekniği uygulandı.

Jel elektroforezinde genellikle % 0,7-1'lik agaroz oranı tercih edildi. Agaroz seçiminde Type II, Medium EEO (Sigma) tercih edildi. Öncelikle istenen hacimde uygun miktarda agaroz tartılıp bir erlene döküldü ve üzerine istenen hacimde tampon % 1 TAE tamponu (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Asetik asit, 2 mM EDTA içerek şekilde 5X stok olarak hazırlanır) eklenir ve mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi. Elle tutulacak kadar (yaklaşık 45-50°C) soğutulan jel solüsyonuna son hacimde 0,5 µg/ml etidyum bromür (stok 10 mg/ml) eklendi ve kabarcık oluşturmayacak şekilde çalkalandı. Daha sonra istenen jel tepsisine döküldü. Jele uygulanacak DNA örneğinden çalışmaya uygun miktarda alındı ve 1 µl yürütme boyası (% 0,25 bromofenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol, % 30 gliserol) eklenerek karıştırıldı ve pipetör yardımıyla kuyulara yüklenir. Jelin hazırlandığı tampondan içeren jel tankına kondu ve yürütme (genellikle 100-150 V akım ile) yapıldı. Yürütme sonrası jel, BioDoc Analyze (Biometra) sistemi yardımıyla UV ışıkta görüntülendi ve kaydedildi.

### 2.3.2. Klonlama Vektörü pUC18'in İzolasyonu

Genomik DNA kesim ürünlerinin ve daha sonraki çalışmalarda tekrar kullanılacak olan pUC18 klonlama vektörü, içerisinde bulunduğu *E. coli* JM101 konak hücresinden izole edilerek hazırlandı. Bunun için öncelikle plazmidi taşıyan konak hücre gliserol stoğundan 50 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine ekilerek 37°C'de 200 rpm'de bir gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültürden 50 µg/ml ampisilin içeren LBA petrisine tek koloni düşecek şekilde çizgi ekim yapıldı ve petri 37°C'de bir gece boyunca büyütüldü. Bu petriden alınan tek bir koloni 50 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB besiyerine ekildi ve aynı şartlarda büyütüldükten sonra, 13000 rpm'de 2 dakika çöktürülerek elde edilen pelletten plazmid DNA izolasyonu "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uyularak yapıldı. Elde edilen pDNA nuclease-free suda çözüldü ve % 0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabii tutularak tespit edildi ve kullanılabileceği kadar -20°C'de saklandı.

### 2.3.3. gDNA'nın ve Klonlama Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

İzole edilen gDNA'dan 100 µl alınarak, 15 µl *EcoRI* kesim tamponu, 2 µl *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanılarak toplam 150 µl son hacimde 37°C'de gece boyunca kesildi. Kesim ürünleri, % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek belirlendi. Bu kesimle eş zamanlı olarak kesim ürünlerinin klonlanacağı pUC18 vektörü de aynı enzim ile 10 µl pDNA, 2 µl kesim tamponu, 1 µl enzim kullanılarak toplam 20 µl son hacimde 37°C'de 2 saat boyunca kesildi. Kesim ürünleri daha sonra % 0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak tespit edildi.

### 2.3.4. Kesim Ürünlerinin Alıcı *E. coli* JM101 Konak Hücrelerine Aktarılması ve Klon Kütüphanesinin Oluşturulması

Kesim sonucu elde edilen DNA parçaları, klon kütüphanesi oluşturmak için daha önceden aynı enzimle kesilerek hazırlanan pUC18 plazmidine klonlandı. pUC18 plazmidine klonlama işlemi, 10 µl son hacimde olmak üzere 6 µl gDNA kesim ürünü, 2 µl pUC18 kesim ürünü, 1 µl yapıştırma tamponu (T4 DNA ligaz tamponu) ve 1 µl enzim (T4 DNA ligaz) kullanılarak 16°C'de 15 saat süre ile gerçekleştirildi.

Yapıştırma işleminden sonra, Maniatis vd.'ne (1982) göre CaCl<sub>2</sub> metodu ile alıcı özellik kazandırılmış olan *E. coli* JM101 suşlarına aktarım yapıldı. Bunun için 3 ml LB besiyerine stok kültürden ekim yapılarak sulu sallayıcıda 37°C'de 200 rpm'de gece kültürü atıldı. Büyüme sonrasında OD<sub>600</sub> = 0,1 olacak şekilde 30 ml LB besiyerine bu kültürden ekim yapılarak aynı şartlarda büyümeye devam ettirildi. OD<sub>600</sub> = 0,45-0,55 olduğunda 4°C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüpe 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek pellet dikkatli bir şekilde çözüldü. Tüpler 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra aynı koşullarda santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüpe 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ilave edildi. Pelletler çözüldükten sonra elde edilen son süspansiyon 200'er µl olacak şekilde steril ependorf tüplerine bölündü ve 2 saat buzda bekletildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiş oldu. Kullanılmayacak tüpler ise 4°C'de saklandı.

Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe 1 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42°C su banyosunda 2 dakika bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe (içerisine ligasyon ürünü konulmayan kontrol tüpü de dâhil) 200 µl LB besi yeri eklendi. Tüpler 37°C’de iki saat bekletildikten sonra daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml ampisilin içeren, üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş 9 cm çaplı petriyer) yayılarak 37°C’de 1 gece inkübe edildi. Büyüme sonucunda içerisine plazmit alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

### **2.3.5. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu**

Mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA’larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapılarak 37°C’de 200 rpm’de gece boyu inkübe edildiler. Elde edilen kültürler 13.000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Plazmid DNA’lar Birnboim ve Doly’e (1979) göre izole edildi. Daha sonra bu plazmid DNA’lar aynı restriksiyon enzimi ile yukarıda bahsedildiği gibi kesilerek kesim ürünleri % 0,7’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutularak tespit edildi. DNA baz dizilimi analizi işlemine tabi tutulmak istenen klonlar tespit edilerek bu klonlardan, gliserol stokları hazırlanarak daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

### **2.3.6. Klonların İçerdiği gDNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi**

Elde edilen klonlardan baz dizilimine tabi tutulmaya karar verilmiş olanlardan (yaklaşık 2 kbp’den daha büyük DNA parçalarını içeren rekombinant plazmidler) uygun miktar ve saflıkta plazmid DNA izole edilebilmesi için gliserol stoklarından ampisilinli LB besi yerlerine ekim yapıldı ve 37°C’de 200 rpm’de gece kültürleri hazırlandı. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültürler, 14.000 rpm’de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD<sub>260</sub>’da belirlendikten sonra

DNA baz dizilimi analizi için Macrogen Inc.(Güney Kore) firmasına gönderildi. Sıra analizi için, pUC18 plazmidinde yer alan evrensel M13-Reverse (-49) (5'-gAg Cgg ATA ACA ATT TCA-3') ve M13-Forward (-21) (5'-TgT AAA ACg Acg gCC AgT-3') primerleri kullanıldı.

### 2.3.7. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

*EcoRI* restriksiyon enzimi kullanılarak yapılmış olan klonlamalar sonucu elde edilen pHK281 plazmidinin DNA baz dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler, hem direk DNA baz dizilimleri kullanılarak hem de Expasy DNA→Protein Translate Tools (URL-13, 2006) internet ara yüzü ile aminoasit sırası belirlenerek elde edilen veriler ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (URL-14, 2006) internet ara yüzü kullanılarak gen bankasındaki verilerle karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

### 2.3.8. Plazmide Aktarılan gDNA Parçasının Tüm DNA Baz Diziliminin Eldesi

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen sonuçların gerek birbirleriyle çakışan bölgelerinin bulunmaması gerekse aktarılmış olan toplam gDNA parçasının toplam büyüklüğüne sahip olmaması nedeniyle gereken ara parçanın tamamlanması için ikinci bir DNA dizi analizine ihtiyaç duyuldu. Alüminyum direnç geninin 5' kısmı tespit edildiği ancak 3' ucunun eksik kalan bölgede olduğu belirlendi. Bu nedenle, nükleotid sırası belirlenmiş olan Reverse ve Forward sıraların arasında kalan eksik kısmın baz diziliminin belirlenmesi için, bu kısma doğru bir primer tasarlanarak elde edilebilecek olan PCR ürünün pGEM-T Easy vektörüne aktarılarak DNA dizi analizi düşünüldü. Reverse sıranın son kısmında bulunan GC içeriği yüksek olan kısımları dikkate alınarak 20 nükleotit uzunluğundaki 5'-gCg gAA ACg Tgg AAg CTT-3' primeri tasarlandı ve bu primere, "HK281" adı verildi.

Ara bölgenin PCR'de yakalanabilmesi için HK281 primeri ile evrensel M13-Forward primeri birlikte kullanıldı. Yapılan PCR şartlarında, 1'er µl HK281 ve evrensel M13-Forward primerleri, 2,5 µl dNTP (2 mM), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl PCR tamponu (10X Taq DNA Polimeraz Tamponu, Promega), 1 µl plazmid DNA'sı ve 1 ünite Taq DNA



polimeraz enzimi (Promega) kullanıldı. Son hacim 50 µl'de Biometra PCR cihazında aşağıdaki program ile yürütüldü.

- |                        |         |             |
|------------------------|---------|-------------|
| 1. Ön ayrılma          | 95°C'de | 1 dakika,   |
| 2. Ayrılma             | 94°C'de | 1 dakika,   |
| 3. Primerin Bağlanması | 50°C'de | 1,5 dakika, |
| 4. Uzama               | 72°C'de | 1,5 dakika, |

2-3. basamaklar 41 kez tekrarlandıktan sonra,

- |                |         |           |
|----------------|---------|-----------|
| 5. Final Uzama | 72°C'de | 5 dakika, |
| 6. Bekleme     | 4°C'de  | ∞.        |

PCR ürünleri % 0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra, ara bölgeye ait olduğu bilinen DNA parçası, MBI Fermentas DNA Extraction Kit # K0513 kullanılarak üretici firmanın protokolüne uyularak jelden izole edildi. İzole edilen parça, daha sonra pGEM-T Easy Vektörü'ne (Promega, USA) aktarıldı. Bunun için, 1 µl jelden izole edilmiş DNA parçası, 1 µl vektör, 5 µl T4 DNA ligaz tamponu (2X) ve 1 µl T4 DNA ligaz kullanılarak 10 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon, 16°C'de bir gece bekletilerek tamamlandı. Bu çalışmadan elde edilen klonlardan istenen sonuç alınamayınca, ikinci bir yol olarak ara bölgenin restriksiyon enzimleri aracılığıyla kesilmesi düşünülerek bu yola başvuruldu. Bu nedenle, öncelikle pHK281 plazmidinin sırası bilinen bölgelerinin restriksiyon haritası çıkarıldı ve plazmid, *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle aynı anda kesildi. Bu kesim işlemi, 10 µl plazmid DNA, 1'er µl *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri, 2 µl Y<sup>+</sup>/Tango Buffer (NEB) kesim tamponu kullanılarak 20 µl son hacimde 37°C'de gerçekleştirildi. Elde edilen kesim ürünleri, % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak tespit edildi. İkili kesim sonucunda istenen parça yine MBI Fermentas DNA Extraction Kit # K0513 kullanılarak jelden izole edildi ve aynı enzimlerle kesilerek hazırlanmış pUC18 plazmidine klonlandı. Yukarıda bahsedilen transformasyon işlemleri gerçekleştirilerek alıcı *E coli* JM101 hücrelerine aktarıldı ve yine aynı seçim metodu ile doğru klon tespit edildi. Bu seçim sonucunda tespit edilen "pF2" plazmidi evrensel M13-Reverse (-49) ve M13-Forward (-21) primerleri kullanılarak aynı şekilde DNA dizin analizine tabi tutuldu.

### 2.3.9. DNA Sıra Analizi Sonuçlarının Genbank Verileri ile Karşılaştırılması

pF2 plazmidinin sahip olduğu DNA parçasından elde edilen ve bir önceki sıra analizi sonuçları ile karşılaştırılarak aktarılmış olan DNA parçası tespit edildi. Bu parça içerisinde yer alan alüminyum direnç genine ait DNA baz dizilimi ve ilgili genin protein sırası aynı şekilde internet ara yüzleri kullanılarak değerlendirildi. Bununla birlikte benzer geni içeren organizmaların protein sıraları CLUSTAL-W (1.82) programı (URL-15, 2006) ile birlikte değerlendirildi.

### 2.4. İlgili Gen Ürününün Biyokimyasal Karakterizasyonu

İlgili gen ürününün karakterizasyonu için öncelikle tam sırası belirlenmiş olan gen uygun bir şekilde bir ekspresyon vektörüne aktarıldı. Bu vektör vasıtasıyla elde edilen protein saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri tespit edildi.

#### 2.4.1. Al<sup>R</sup> Geninin pET11a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

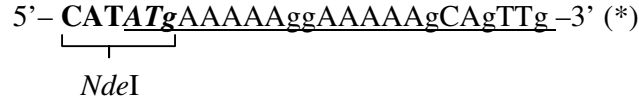
##### 2.4.1.1. Al<sup>R</sup> Geninin Yakalanması için Primer Dizaynı ve Genin Eldesi

pHK281 pDNA'sını içeren *E. coli* JM101 bakterisinin gliserol stoğundan 50 µg/ml karbenisilin içeren 6 ml LB besi yerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de gece kültürü atıldı. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmid DNA izolasyonu, QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uyularak tamamlandı. İzole edilen pDNA'dan 3 µl alınarak, 2 µl 10X *Eco*RI kesim tamponu ve 1µl *Eco*RI restriksiyon enzimi ile toplam 20 µl son hacimde 37°C'de 2 saat boyunca kesildi ve aktarım doğrulandı. Kesim ürünü, DNA standardı olarak Smart DNA Ladder (200 lanes, MW-1700-02, Eurogentec) ile birlikte % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi.

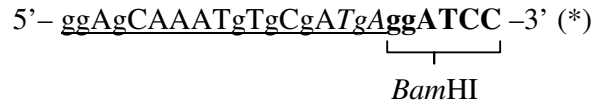
pHK281 plazmidinde genin üst ve alt bölgelerinde de bakteriyel sıralar bulunduğundan bu sıralardan kurtulmak ve sadece ilgili geni bir ekspresyon vektörüne

aktarabilmek için uçlarında *Bam*HI ve *Nde*I restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri bulunan iki adet primer tasarlandı. Bu primerler şu şekildedir:

Fatih1 : *Nde*I kesim bölgesi ve Al<sup>R</sup>'nin başlangıç kodonunu (ATG) içeriyor, genin 5' ucuna uyumlu.



Fatih2 : *Bam*HI kesim bölgesi ve Al<sup>R</sup>'nin stop kodonunu (TGA) içeriyor, genin 3' ucuna uyumlu.



\* Altı çizili kısımlar, Al<sup>R</sup> geninin kendisinde var olan sıralardır. İtalik yazımlar, başlangıç ve bitiş kodonlarını göstermektedir.

Bu primerler ve pHK281 plazmid DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda, 5' ucunda *Nde*I ve 3' ucunda *Bam*HI restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri bulunan alüminyum direnç geni elde edildi. Yapılan PCR şartlarında, 1'er µl Fatih1 ve Fatih2 (stok: 200 pmol/µl), 1 µl dNTP (20 mM), 5 µl PCR tamponu (10X; Hot Gold Star Buffer, Eurogentec), 1 µl plazmid DNA'sı ve 1 ünite Hot Gold Star DNA polimeraz enzimi (Eurogentec) kullanıldı. Son hacim 50 µl'de Eppendorf Gradient Cyclers (Eppendorf) cihazında aşağıdaki program ile yürütüldü.

1. Ön ayrılma	95°C'de	2 dakika,
2. Ayrılma	95°C'de	45 saniye,
3. Primerin Bağlanması	50°C	1 dakika,
4. Uzama	72°C'de	1,5 dakika,
2-4. basamaklar 5 kez tekrarlandıktan sonra,		
5. Ayrılma	95°C'de	30 saniye,
6. Primerin Bağlanması	55°C	45 saniye,
7. Uzama	72°C'de	1 dakika,
5-7. basamaklar 30 kez tekrarlandıktan sonra,		
8. Final Uzama	72°C'de	10 dakika.
9. Bekleme	4°C	∞

Reaksiyon sonucu, DNA standardı olarak Smart DNA Ladder (Eurogentec) ile birlikte % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi ve kullanıma kadar -20°C'de bekletildi.

#### 2.4.1.2. Al<sup>R</sup> Geninin pTOPO-T/A Vektörüne Aktarımı

Elde edilen PCR ürünü, % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabii tutulduktan sonra PCR QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak jelden saflaştırıldı ve "desalting" işlemi yapıldı. Saflaştırılmış fragment, pTOPO-T/A klonlama vektörüne (Invitrogen) aktarıldı. Bunun için, 4 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 1 µl pTOPO Salt Solution ve 1 µl pTOPO-T/A vektörü son hacim 6 µl'de 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Elde edilen pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidi, elektrokompotent *E. coli* TOP10 hücrelerine aktarıldı.

#### 2.4.1.3. pTOPO-Al<sup>R</sup> Plazmidinin Alıcı *E. coli* TOP10 Hücrelerine Aktarımı

Kullanılacak olan *E. coli* TOP10 hücresi gliserol stokundan 5 ml LB besi yerine 37°C'de 200 rpm'de gece kültürü atıldı. Bu kültürden, yine Maniatis vd.'ne (1982) göre CaCl<sub>2</sub> metodu ile alıcı özellik kazandırılmış olan *E. coli* TOP10 hücreleri elde edildi. Aktarım için pDNA'dan 2 µl alındı ve 50 µl alıcı hücreye eklendi. Karışım 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 30 saniye 42°C'de bekletildi ve yine 2 dakika buzda bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 250 µl SOC besi yeri eklendi ve 37°C'de 300 rpm'de 1 saat büyümeye konuldu. Süre sonunda 100 µl SOC kültüründen alınarak 25 mg/ml kanamisin içeren LBA petrilere yayıldı ve gece boyunca 37°C'de büyümeye konuldu.

Doğru klonlar elde edildikten sonra hazırlanan gece kültürlerinden Birnboim ve Doly'e (1979) göre pDNA'lar izole edildi ve yukarıda bahsedildiği gibi *EcoRI* kesimi yapılarak doğrulandı. Daha sonra istenen özellikte bir plazmid seçilerek, *EcoRI*, *BamHI/NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesilerek pTOPO-T/A vektörüne doğru klonlanıp klonlanmadığı kontrol edildi. Bunun için ayrı ependorf tüplerinde *EcoRI*, *BamHI/NdeI* ve *HindIII* kesim reaksiyonları hazırlandı. Reaksiyonlarda 1 µl restriksiyon

enzimi, 1X olacak şekilde ilgili enzime uygun tampon, 1 µl pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidini ve 20 µl'ye tamamlanacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklendi ve reaksiyonlar 37°C'de 2 saat boyunca yürütüldü.

Yukarıdaki kesimler tamamlanarak yapılan agaroz jel elektroforezi ile klonun istenen doğru parçayı içerdiği tespit edilmiş oldu. Daha sonra bu klon tekrar kültüre edilerek içerdiği plazmid DNA, QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile izole edildi.

#### **2.4.1.4. Al<sup>R</sup> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması ve Alıcı Konak Hücrelere Aktarımı**

pTOPO+Al<sup>R</sup> plazmidini, ilgili proteinin ekspresyonunun sağlanması amacıyla genin pET11a ekspresyon vektörüne aktarılmasında aracı vektör olarak kullanıldı. Bunun için kullanılan pET11a vektörünün konak hücresi kültüre edilerek pET11a plazmidini, QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile daha önce de belirtilen şekilde izole edildi.

Hem aktarımda kullanılacak olan Al<sup>R</sup> geni pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidinden hem de pET11a plazmidini *NdeI* ve *BamHI* enzimleriyle kesilerek klonlama için hazırlandılar. Bu reaksiyonlarda, 5 µl plazmid DNA, 5 µl *BamHI* kesim tamponu, 2,5'er µl *NdeI* ve *BamHI* enzimleri alınarak son hacim 50 µl olacak şekilde 35 µl steril ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak 37°C'de 3 saat boyunca kesildi.

Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra klonlamada kullanılacak olan pET11a vektör kısmı ve Al<sup>R</sup> geni, QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak jelden saflaştırıldı. Klonlama için 6 µl 2X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi, 5 µl pET11a vektörü (50 ng/µl) ve 1 µl insert DNA (Al<sup>R</sup> geni, 21 ng/µl) kullanılarak reaksiyon 4°C'de gece boyu sürdürüldü. Ligasyon ürünü daha sonra % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak jelden izole edildi.

Kullanılacak olan *E. coli* MC1061 hücresi gliserol stoğundan 5 ml LB besi yerine 37°C'de 200 rpm'de gece kültürü atıldı. Bu kültürden, 1/100 oranında 200 ml LB besi yerine sulandırılarak 1 litrelik erlen içerisinde 37°C'de 300 rpm'de bir gece büyümeye konuldu. Kültürün OD<sub>600</sub> değeri, 0,6 olunca 30 ml'lik propilen tüplere eşit bir şekilde

bölündükten sonra buz içerisinde 30 dakika tutuldu. Bu tüpler, 5.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pellete 100 ml steril soğuk ddH<sub>2</sub>O eklendi ve süspansiyon haline getirildi. Aynı şartlarda tekrar santrifüjlendikten sonra, 4 ml steril soğuk % 10 gliserol eklendi ve yine süspansiyon edildi. Tekrar santrifüjlenerek elde edilen pellet 600 µl soğuk steril % 10 gliserolde çözüldü. Elde edilen süspansiyon 40 µl hacimlerde 500 µl'lik tüplere aktarıldı ve kullanıma kadar -70°C'de saklandı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E. coli* MC1061 hücre kültürlerinden 2 tüp alınarak içerikleri 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve buza yerleştirildi. Tüplerin birine 3 µl ligasyon ürünü kondu, diğerine hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser) 25 µF, 2,5 kV ve 200 Ω'a ayarlandı. Tüplerdeki karışımlar, önceden soğutulmuş 0,2 cm.lik elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve cihazın elektriksel tetik kısmına yerleştirildi. 4,5-5 milisaniye süre ile elektrik uygulanarak elektroporasyon tamamlandı. Kuvvetler cihazdan alınarak hızlıca içlerine 1 ml SOC besi yeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra steril bir cam tüpe dökülerek 37°C'de 225 rpm'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyon sonunda, 100'er µl SOC kültürlerinden alınarak 50 µg/ml karbenisilin içeren LBA petrilere yayıldı ve gece boyunca 37°C'de büyümeye konuldu. Aktarım sonunda seçilen bir koloniden elde edilen plazmidler, Birnboim ve Doly'e (1979) göre izole edildikten sonra uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulandı. Bunun için ayrı ependorf tüplerinde *DraI*, *HindIII*, *EcoRI/XbaI* ve *BamHI/NdeI* kesim reaksiyonları hazırlandı. Reaksiyonlarda 1 µl restriksiyon enzimi, 1X olacak şekilde ilgili enzimlere uygun kesim tamponu, 7,5 µl pDNA ve 20 µl'ye tamamlanacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklendi ve reaksiyonlar 37°C'de 2 saat boyunca yürütüldü.

İstenen klon doğrulandıktan sonra, tekrar kültüre edilip QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ile temiz ve saf bir şekilde izole edilerek tekrar DNA sıra analizine tabii tutuldu. Elde edilen bu yeni plazmid, pET11a+Al<sup>R</sup> olarak adlandırıldı. Daha sonra bu plazmid Maniatis vd.'ne (1982) göre CaCl<sub>2</sub> metodu ile alıcı özellik kazandırılmış olan *E. coli* BL21(DE3) ve C43(DE3) konak hücrelerine aktarıldı.

## 2.4.2. Proteinin Ekspresyonu

### 2.4.2.1. Genin Uygun Ekspresyon Zamanının Belirlenmesi

İlgili proteini eksprese etmek için pET11a+Al<sup>R</sup>, *E. coli* BL21(DE3) ve *E. coli* C43(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Aktarım sonucunda oluşan kolonilerden bir tanesi, iki farklı tüp olacak şekilde 100 µg/ml karbenisilin içeren LB ortamına ekildi. Bu tüpler, 200 rpm'de hem 28°C'de hem de 37°C'de bir gecelik büyümeye konuldu. Elde edilen kültürler, 100 kez sulandırılmış ve OD<sub>600</sub> = 0,6 olduğunda son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde IPTG ilave edilerek (uyarılarak) tekrar büyümeye kondu. Uyarımdan sonraki 0., 2., 4. saatlerde ve gece kültürü örnekleri alındı ve çöktürüldü. Bu örnekler, uygun ekspresyon zamanı ve sıcaklığını belirlemede kullanıldı.

### 2.4.2.2. Proteinin Çözünübilirlik Karakterinin Belirlenmesi

Çöktürülmüş hücreler, 1X PBS tamponu (1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3; 20 ml/L kültür)'de çözüldü. Daha sonra -80°C'de 30 dakika süre ile donduruldu ve oda sıcaklığında eritildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Eritme işleminden sonra örnekler, 15 ml hacimlerde 50 ml'lik falkon tüplere bölündü ve sonikatör yardımıyla parçalandı. Sonikasyonda, 20 saniye Pulse ON, 20 saniye Pulse OFF olacak şekilde 2 dakika boyunca % 30 amplitude değerleri kullanıldı. Elde edilen süspansiyondan alınan 1,5 ml örnek, 13.000 rpm'de 30 dakika 4°C'de çöktürülerek süpernatant kısmı farklı bir tüpe aktarıldı. Böylece elde edilen süpernatant ve pellet kısımlarından 15'er µl alınarak, % 12'lik sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) tabi tutuldu ve proteinin çözünebilir olup olmadığı gözlemlendi.

#### 2.4.2.2.1. SDS-PAGE Analizi

Protein ekspresyonu ve saflaştırılması ile ilgili özelliklerinin (uygun ekspresyon zamanı ve sıcaklığı, çözünebilir karakteri, parçalanma sıcaklığı ve zamanı, kromatografik

yöntemler ve saflaştırma basamakları gibi) belirlenmesi esnasında Maniatis vd.'ne (1982) göre % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Elektroforez, 0,75 mm kalınlığında % 5'lik yükleme ve % 12'lik ayırma jeli olacak şekilde hazırlandı (Tablo 1) ve elde edilen jel, Coomassie-Blue boyası ile boyanarak sonuçlar tespit edildi. Uygulanan yöntem şu şekildedir.

Poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutulacak örnekler belirtilen miktarlarda alınarak bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. İçerisine 1:1 oranında yükleme tamponu (150 mM Tris-HCl pH 6,8, % 4 SDS, % 0,1 bromofenol mavisini, % 20 gliserol, % 6  $\beta$ -merkaptoetanol) eklendi ve örnekler ısıtıcı blok ünitede (Eppendorf Thermomixer Comfort 1,5 ml) 95°C'de 10 dakika inkübe edilerek proteinler parçalandı. Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu (25 mM Tris bazı, 250 mM glisin, % 0,1 SDS, pH 8,3) ile dolduruldu. Pipetör yardımı ile ilk kuyuya 5  $\mu$ l protein markırı (Promega Midrange Marker) olmak üzere örnekler kuyulara yüklendi. Boya, jelden çıkana kadar 1 saat 27 mA'de (150 V) yürütüldü. Jel, Coomassie Brilliant mavisini içeren "boyama çözeltisi" (% 0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 10 glasiyel asetik asit, % 50 metanol) içinde hafifçe sallanacak şekilde yaklaşık 2-3 saat bekletildi. Boyanan jel daha sonra "boya uzaklaştırma çözeltisi" (% 36 metanol, % 9 glasiyel asetik asit) ile gece boyu yıkanarak protein bantlarının görünür hale geçmesi sağlandı. Elde edilen sonuçlar bir bilgisayar tarayıcısı ile taranarak görüntülendi.

Tablo 1. Kullanılan SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	Yükleme Jeli (% 5)	Ayırma Jeli (% 12)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl pH 6,8)	1,25 ml	---
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)	---	2,5 ml
% 10 SDS	0,1 ml	0,1 ml
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	1,67 ml	4 ml
dH <sub>2</sub> O	6,87 ml	3,29 ml
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,1 ml	0,1 ml
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	0,01 ml	0,004 ml



### 2.4.2.3. Proteinin Sıcaklığa Dayanıklılık Derecesinin ve Zamanının Belirlenmesi

Proteinin sıcaklığa bağlı dayanıklılığının test edilmesi için bakterinin termofilik karakterinden dolayı, 50, 55, 60, 65 ve 70°C olmak üzere beş sıcaklık değeri seçildi. Bu sıcaklıklarda, 15, 30, 45, 60, 120, 180 dakika ve gece boyu olmak üzere 6 farklı sürede tutularak uygulama gerçekleştirildi. Tüm bu uygulamaların ardından 1 µl ısı muameleli örnek alındı ve % 12'lik SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Bu işlemler sonucunda belirlenen sıcaklık ve süre daha sonraki işlemlerde temel alınarak kullanıldı.

### 2.4.2.4. Proteinin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

Protein örneği 65°C'de 30 dakika tutulduktan sonra 13.000 rpm'de 45 dakika 4°C'de çöktürüldü ve tüm süpernatant ayrı bir tüpte toplandı. Bu örnek, 3 tüpe bölünmüş ve 3 farklı tampon sistemi kullanılarak diyaliz yapıldı. Diyaliz esnasında 0,2 µm'lik diyaliz membran (Membran Immobilon P<sup>SQ</sup>, Mediacell International Ltd.) kullanıldı. 1. tüp için, 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 2. tüp için 20 mM Tris-Cl, pH 8,0 ve 3. tüp için ise 20 mM MES pH 6,0 tamponları hazırlandı. Her bir örnek ayrı diyaliz tüplerine kondu ve kendisine uygun tamponun içerisine konarak oda sıcaklığında 3 saat veya 5°C'de gece boyu diyaliz edildi.

Her bir örnek, 4 tüpe bölündü ve 10 kez ilgili tamponla sulandırıldı. Bu örnekler, tamponlarına uygun olarak, MES tamponu kullanılan örnekler için S-Sepharose Fast Flow ve Tris-Cl tamponu için Q-Sepharose Fast Flow kolonlarına yüklendi. Bu işlemler için 2,5x20 cm kolon seçildi ve kolona üst tarafından 2-3 cm aşağısına kadar matriks yüklendi. Matriksin kolon içerisinde dengeye ulaşması için beklendi. Kolon dengelendikten sonra 50 mM NaCl içeren tamponlarla yıkandı. Kolon tam olarak kurumadan protein örnekleri her biri kendi tamponu ile ilgili kolona yüklendi. Yükleme esnasında elde edilen fraksiyonlar falkon tüp vasıtasıyla toplandı. Kolon, 10 ml 4X tampon ile birlikte yıkandı ve yıkama esnasında oluşan fraksiyonlar ayrı bir falkon tüpte toplandı. Daha sonra sırasıyla 50, 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 mM NaCl ile muamele edildi ve fraksiyonlar 1'er ml olacak şekilde 1,5 ml ependorf tüplere alındı. Son olarak 1 M NaCl çözeltisi kolondan geçirildi ve kolona 20 mM tampon eklenerek kromatografi sonlandırıldı. Kromatografi sonucunda elde edilen fraksiyonlar, % 12'lik SDS-PAGE'e tabi tutuldu.

En iyi sonucu veren kromatografi yöntemi belirlendikten sonra, bu örneğe ait protein içeren fraksiyonlar tek bir tüpte toplandı. Amicon filtrasyon membranı (cut off 5 ve 10 kDa, Millipore) kullanılarak 13.000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlendi ve üstte kalan kısım yeni bir tüpe alındı. Bu filtrasyon sonucu elde edilen örnekler, böylece yoğunlaştırılarak jel filtrasyonuna hazır hale getirildi.

#### **2.4.2.5. Proteinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Yoğunlaştırılması**

Filtrasyon ile yoğunlaştırılan protein örneği, jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak daha da yoğun hale getirildi. Uygulamada, "ÄKTA™explorer Chromotography Systems" cihazı ile HiLoad (Superdex 200, 16/60, Amersham Pharmacia) kolonu kullanıldı. Öncelikle kolondan dengeleyici tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,22 µm filtre sterilizasyonlu) geçirildi. Daha sonra örnek kolona yüklendi. Fraktör, her bir ependorf tüpüne 1 ml olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar alındı. Elde edilen fraksiyonlardan 5'er µl alınarak 1:1 oranında yürütme boyası ile birlikte, % 12'lik SDS-PAGE'e tabi tutuldu. Saf protein konsantrasyonu, Bradford metoduna dayanılarak Bio-Rad Protein Assays kiti ile üretici firmanın yönergelerine uyarak belirlendi.

#### **2.4.2.6. Protein Örneğinin Gümüş Boyaması**

S-Sepharose pH 6,0 kolonundan elde edilen protein örneğinin farklı proteinler ile kirlenip kirlenmediğinin araştırılması için örnek gümüş boyama işlemine tabi tutuldu. Bunun için % 12'lik SDS-PAGE yapıldıktan sonra jelle aşağıdaki işlemler uygulandı.

- Jel öncelikle temiz bir kap içerisinde % 50 metanol ve % 12 glasiyel asetik asetik karışımında gece boyu bekletilerek fikse edildi.
- Fiksasyon işleminden sonra 3 kez 20'şer dakika boyunca % 50'lik etanolde yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra jel, 1 dakika 50 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O/250 ml H<sub>2</sub>O'da bekletildi ve akabinde 3 kez 20'şer dakika saf su ile yıkandı.

- 250 ml son hacimde 500 mg AgNO<sub>3</sub> ve 188 µl formaldehit içeren suda 20 dakika tutuldu ve 3 kez 20'şer dakika saf su ile yıkandı.
- Ardından, 250 ml son hacimde 15 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O ve 125 µl formaldehit içeren suda bantlar görünene kadar bekletildi ve bir kez saf su ile yıkandı.
- Jel, % 50 metanol ve % 10 glasiyel asetik asit karışımında 10 dakika bekletildikten sonra % 50 metanolde 30 dakika bekletilerek tespit edildi.

#### **2.4.2.7. Proteinin Aminoasit Sırasının N-Ucu Sıra Analizi ile Belirlenmesi**

Proteinin N-ucu sıra analizi (N-terminal protein/peptide sequencing) için tekrar % 12'lik SDS-PAGE analizi yapıldı. Farklı olarak jelde markır olarak dual color protein marker kullanıldı. Yürütme sonunda jel herhangi bir boyama işlemine tabi tutulmadan "blotting buffer" (25 mM Tris-HCl, 192 mM glisin ve % 10 absölü metanol) içerisine konuldu. Farklı bir kap içerisinde de jel ile aynı büyüklükte PVDF protein membranı (Millipore) aynı % 100 metanolde bekletildi. Eş büyüklükte 6 adet Whatman kâğıdı (GB005, 1,2 mm) ve protein membranı blotlama tamponunda iyice ıslanana kadar bekletildi. Blotlama düzeneğine, 3 tane Whatman kâğıdı, PVDF membranı, jel, 3 tane Whatman kâğıdı olacak şekilde yerleştirildi ve düzenek kapatılarak yürütme tankına yerleştirildi. Tank blotlama tamponuyla dolduruldu ve 50 voltta 2-3 saat yürütüldü. Daha sonra membranın 5 dakika Coomassie Brilliant boyaması ile boyandı ve yıkama tamponuyla yıkanarak dizi analizine gönderildi.

#### **2.4.3. Proteinin ATPaz Özelliğinin Biyokimyasal Karakterizasyonu**

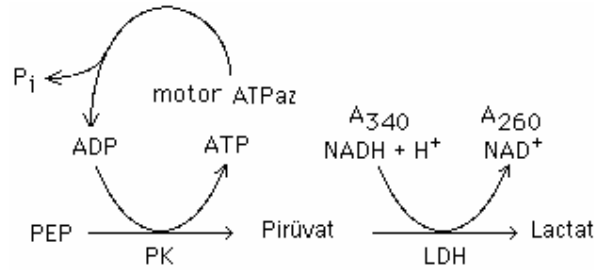
##### **2.4.3.1. Kullanılan ATPaz Reaksiyonları**

###### **2.4.3.1.1. İkili Enzim Yöntemi (Coupled Enzyme Assay)**

ATPaz aktivitesi, NADH oksidasyonu ile ATP hidrolizinin oranının belirlenmesine dayanan standart ikili enzim yöntemi kullanıldı. Aşağıdaki şekilde yöntemin özeti verilmektedir (Şekil 3). Spektroskopik ölçümler, 340 nm'de yapıldı. Proteinin ATPaz

aktivitesi, Ogawa vd.'ne (2000) göre miligram proteinin dakikada hidrolizlediği mmol ATP olarak hesaplandı. Denemeler 37°C'de ısıtmalı spektroskopi küvetinde gerçekleştirildi.

Reaksiyon için önce 10 µg/µl saflaştırılmış proteinin, 500 µl reaksiyon karışımına (50 mM HEPES, pH 7,4, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADH, 0,5 mM fosfoenol piruvat, 18 ünite laktat dehidrogenaz, 24 ünite piruvat kinaz/1 ml) ilavesiyle başlatıldı. Karışım 5 dakika 37°C ön inkübasyondan sonra, son hacimde 0,5 ve 1 mM olacak şekilde ATP ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. ATPaz aktivitesini gösterecek olan 340 nm'deki optik yoğunluktaki düşüş, bilgisayar yardımıyla belirlendi ve hesaplamalar bilgisayar kontrolünde gerçekleştirildi.



Şekil 3. ATPaz reaksiyonunda kullanılan standart birleştirilmiş enzim yöntemi reaksiyon şeması.

#### 2.4.3.1.2. Standart ATPaz Yöntemi

ATPaz reaksiyonu sonucunda substrat olan ATP'nin, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkan Pi'nin kolorimetrik olarak molibdat çöktürmesiyle belirlenmesi esasına dayanan bu yöntem, Goldenberg ve Fernandez'e (1966) göre uygulandı.

Reaksiyonun birinci basamağını standart ATPaz reaksiyonu oluşturmaktadır. ATPaz reaksiyonunda, 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP ve 10 µg/µl saf enzim kullanıldı ve 500 µl son hacimdeki reaksiyon bakterinin büyüme sıcaklığı olan 55°C'de 15 dakika süre ile yürütüldü.

Reaksiyonun ikinci basamağında ise, ATPaz reaksiyonu sonucu oluşan Pi'nin dolayısıyla ATPaz aktivitesinin belirlenmesidir. Birinci basamakta elde edilen reaksiyondan 20 µl alınarak 1,5 ml ependorf içerisinde 500 µl tampon 1 (litrede 100 g TCA, 10 g Thiourea, 30 g Mohr tuzu (ferrik amonyum sülfat = FAS•6H<sub>2</sub>O)) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant yeni bir tüpe alındı. Üzerine tampon 2 (200 ml'de 45 ml konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22 g amonyum molibdat) eklendi ve karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Süre sonunda, enzim içermeyen reaksiyon karşımı kör olarak kullanılarak fosfor standardı (5 mg/100 ml fosfor standardı olarak 0,2197 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ile birlikte OD<sub>660</sub> ölçümleri yapıldı. Enzimli ve enzimsiz reaksiyonlar arasındaki fark alınarak formülde yerine konuldu ve enzimin salıverdiği Pi miktarı, mg/100 ml olarak hesaplandı. Bu aynı zamanda enzimin ATP'yi parçalama değeri olarak alındı. Kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$\text{mg/100 ml fosfor oluşumu} = \frac{\text{Reaksiyon farkının absorbansı}}{\text{Standart reaksiyonun absorbansı}} \times 5$$

### **2.4.3.2. Biyokimyasal Karakterizasyonlar**

#### **2.4.3.2.1. ATPaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi**

Alüminyum direnç geni ATPaz aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek amacı ile yukarıdaki yöntem kullanılarak reaksiyon çözeltisinin hazırlandığı tampon çözeltinin türü ve pH'sı değiştirilerek reaksiyon 55°C'de gerçekleştirildi. Yapılan deneylerde, pH 4,0-6,0 aralığı için asetik asit-sodyum asetat tamponu, pH 7,0-8,0 aralığında HEPES, pH 9,0 için Tris ve pH 10,0 için glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi ile kullanılması gereken optimum pH ve tampon belirlendi.

#### **2.4.3.2.2. ATPaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

ATPaz aktivitesine optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için, 24-100°C aralığında 10°C'lik artışlarla su banyoları ve termal ısıtıcı üniteler kullanılarak reaksiyonlar

gerçekleştirildi. pH'sı 6,0 olan asetik asit-sodyum asetat tamponunda hazırlanan reaksiyonlar, 24, 35, 45, 55, 65, 75, 85 ve 100°C'lerde yürütüldü. Bu aralıklarda belirlenen sıcaklık değerinden sonra gerçek optimum değerinin belirlenmesi için hazırlanan benzer reaksiyonlar, ilk reaksiyonda elde edilen değerlerin  $\pm 5^\circ\text{C}$  farklarında  $1^\circ\text{C}$ 'lik artışlarla yenilendi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzimin optimum sıcaklığı tespit edildi.

#### **2.4.3.2.3. ATPaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Yukarıdaki iki basamakta (optimum pH ve sıcaklık) elde edilen veriler kullanılarak, kullanılan enzim miktarı sabit tutularak farklı substrat (ATP) konsantrasyonları ile yapılan reaksiyonlar sonucunda enzimin ATPaz aktivitesine etkisi belirlendi. 50 mM asetik asit-sodyum asetat tamponu (pH 6,0), 400 mM NaCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  enzim kullanılarak 1-100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda ATP içerecek şekilde hazırlanan reaksiyonlar  $73^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen verilerden substrat doygunluk ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek optimum substrat konsantrasyonu ve  $V_{\text{max}}$  ve  $K_m$  kinetik verileri elde edildi.

#### **2.4.3.2.4. ATPaz Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi**

Kullanılması gereken ATP konsantrasyonu belirlendikten sonra farklı miktarlarda saf protein kullanılarak, ATPaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonu ilişkisi incelendi. Bu nedenle, 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20 ve 30  $\mu\text{l}$  protein reaksiyon karışımında kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Elde edilen veriler sonucunda Michaelis-Menten Eğrisi çizilerek kullanılması gereken protein miktarı belirlendi.

#### **2.4.3.2.5. ATPaz Aktivitesi Üzerine Tuz Gerekliliği**

Bilindiği üzere ATPaz'lar,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  gibi metallerin bir veya birkaçına kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadır (Schirmer vd., 1998; Herdendorf vd., 2002; Geisler vd., 1998; Melkani vd., 2003). Bu nedenle enzimin hangi tuza veya tuzlara ihtiyaç duyduğunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 400,

600 ve 1000 mM), MgCl<sub>2</sub> (0, 2, 8, 10, 20, 40, 100 ve 200 mM) ve KCl (0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 ve 200 mM) ile deneyler yürütüldü. Her bir tuzun maksimum gereklilik gösteren noktaları belirlendikten sonra, Mg<sup>+2</sup>/Na<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>/K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> reaksiyonları da gerçekleştirildi.

#### 2.4.3.2.6. ATPaz Aktivitesi Üzerine Diğer Metallerin Etkisi

ATPaz reaksiyonuna, metallerin etkisini belirlemek amacıyla monovalent olarak Ag<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup>, bivalent olarak Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve trivalent olarak da Al<sup>+3</sup> iyonlarının klorür ve nitrat tuzları (KCl, NaCl, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, LiCl, AgNO<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub> ve AlCl<sub>3</sub>) kullanıldı.

KCl, NaCl ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları yukarıda belirtilen şekilde kullanıldı. MnCl<sub>2</sub> 0,05; 0,1; 10 ve 50 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0, 5, 10, 50, 100 ve 200 mM, LiCl, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> ve AgNO<sub>3</sub> 0,05; 0,1; 1; 5; 10; 50; 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda denendi. AlCl<sub>3</sub> için ise 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 30, 40 ve 50 mM konsantrasyonlarda kullanıldı. Bu deneylerde elde edilen sonuçlarla, hangi metalin aktivatör hangisinin inhibitör olduğu veya metallerin hangi konsantrasyonda reaksiyonun gidişatına nasıl yön verdikleri gösterildi.

#### 2.4.3.2.7. ATPaz Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

ATPaz reaksiyonuna, enzim inhibitörlerinin etkisini incelemek için genel enzim inhibitörleri olarak bilinen EDTA ve β-merkaptotanol ve ATPaz enzimi inhibitörleri olarak bazı çalışmalarda karşımıza çıkan sodyum azid ve ouabain gibi bileşiklerin inhibitör etkisi incelendi (Hoffmann ve Dimroth, 1991; Muneyuki vd., 1993; Gao vd., 2002; Schneider vd., 1998).

Bu reaksiyonlarda, 50 mM asetik asit-sodyum asetat tamponu (pH 6,0), 400 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µM ATP, 5 µg/µl enzim kullanıldı. EDTA için 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 ve 80 mM, β-merkaptotanol için 0; 1; 5; 10; 100; 200 ve 300 mM, sodyum azidür için 0; 0,05; 0,1; 1; 10; 50; 100 ve 200 mM ve ouabain için ise 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 ve 7 mM konsantrasyonlarında çalışıldı.

## 2.5. Alüminyum Dirençliliğinin *E. coli*'de Disk Difüzyon Metodu ile Yeniden Belirlenmesi

Disk difüzyon metodu, antibiyotik dirençlilik testi metodunun bir adaptasyonu olarak uygulandı. Bunun için, yaklaşık 7 mm çapında filtre kağıdından yapılmış steril disklerle 2 M alüminyum tuzundan ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 5  $\mu$ l emdirildi. Alüminyum direnç plazmidini taşıyan *E. coli* C43(DE3)/pET11a+Al<sup>R</sup> hücreleri induksiyondan 1 ve 2 saat sonra petriye ekildi. Her bir petriye tek bir disk kullanıldı. Kontrol grubu olarak da, plazmid aktarılmamış *E. coli* C43(DE3) konak hücresi kullanıldı. Kontrol grubu petrilere, OD<sub>600</sub> değerleri 0,6, 0,8, 1,0 ve 1,2 olduklarında petrilere ekildi. Bütün petrilere 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Oluşan zonların çapları, mm olarak ölçüldü ve uygun kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

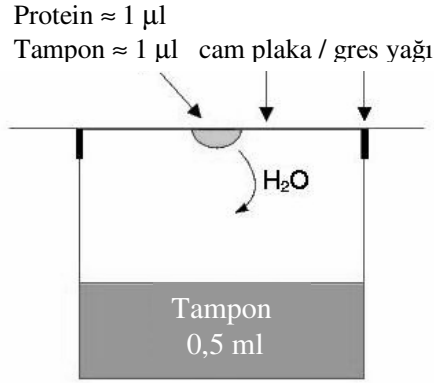
## 2.6. Enzimin Kristallendirme Çalışmaları

İlgili proteinin kristal haline ulaşılabilmesi için, öncelikle farklı kristallendirme ortamları içeren Structure Screen-1 Kit (Kod No: MD1-01, Molecular Dimension Ltd.) kullanıldı. Kitin kullanımında "Hanging drop (asılı damla)" metodu esas alınarak deneylere başlandı (Şekil 4).

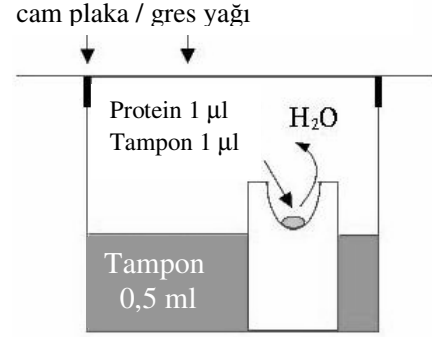
Buna göre, önce inkübasyon petrisindeki ilgili kuyuya ilgili tampondan 500  $\mu$ l eklendi. Daha sonra bu tampondan 1  $\mu$ l alınarak 1  $\mu$ l protein örneği ile 18 mm ince cam plaka (Hampton Research Siliconized Glass Circle Cover Slides, Kod No: HR3-239) üzerinde karıştırıldı. Bu cam örtü plakası, damla içte kalacak şekilde önceden gres yağı ile yağlanmış inkübasyon petrisindeki ilgili kuyuya hava geçişi olmayacak şekilde yerleştirildi. Tüm kuyularda aynı işlem ilgili tamponlarla yapıldı. Çalışma petrilere, 5°C'de bir hafta inkübe edildi. Deneyde kullanılan bileşenler Tablo 2'de verildi. İnkübasyon sonrasında mikroskopik incelemelerle hangi tamponun uygun olduğuna karar verildi.

Daha iyi sonuçlara ulaşabilmek için, seçilen tampon ortamları (çöktürücü tampon, solüsyon ve tuzun farklı konsantrasyonları ile farklı pH'lar) değiştirilerek yeniden deneyler sonradan belirlenen konsantrasyonlara göre tekrarlandı. Yeniden oluşturulan tampon ortamları Tablo 2'de verilmiştir. Bu denemelerde hanging drop ile beraber prensip olarak aynı fakat uygulamada farklı olan "sitting drop (oturan damla)" yöntemi de kullanıldı (Şekil 5).





Şekil 4. Asılı damla yöntemi



Şekil 5. Oturan damla yöntemi

Tablo 2. Asılı damla yöntemine göre kullanılan kristallendirme ortamları

Sıra	Tampon	Tuz	Çöktürücü
1		% 10 amonyum sülfat	
2		% 20 "	
3		% 30 "	
4		% 40 "	
5		% 50 "	
6		% 60 "	
7	HEPES 0,1 M pH 7,5	% 10 2-izopropanol	% 22 PEG 4000
8	"	"	% 20 "
9	"	"	% 18 "
10	"	"	% 16 "
11	"	"	% 14 "
12	"	"	% 12 "
13	"	% 12 2-izopropanol	% 20 "
14	"	% 10 "	"
15	"	% 8 "	"
16	"	% 6 "	"
17	"	% 3 "	"
18	"	% 0 "	"
19	"	% 20 "	
20	"	% 18 "	
21	"	% 15 "	
22	"		% 25 PEG 4000
23	"		% 22 "
24	"		% 17 "

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Al Dirençliliğinin Tespiti

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin Al dirençliliğinin tespitinde farklı konsantrasyonlarda Al içeren ve pH'larda GM besiyerlerine yapılan ekimlerde inkübasyonlar sonucu aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 3).

Tablo 3. *A. gonensis* G2 bakterisinin Al dirençliliğinin gösterilmesi için farklı pH ve konsantrasyonlarda  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  içeren GM ortamındaki inkübasyon sonuçlarının  $OD_{600}$ 'deki ölçüm değerleri

Tanım	pH: 4,1		pH: 5,5		pH: 6,0		pH: 7,0	
Kontrol	0,484	+	0,397	+	0,406	+	0,395	+
50 ppm	0,494	+	0,581	+	0,509	+	0,603	+
100 ppm	0,466	+	0,579	+	0,491	+	0,541	+
200 ppm	0,424	+	0,533	+	0,461	+	0,464	+
10 mM	0,429	+	0,444	+	B*	B	0,536	+
50 mM	0,495	+	0,419	+	0,418	+	0,427	+
100 mM	0,452	+	0,436	+	0,383	+	0,466	+
150 mM	-	-	-	-	-	-	-	-
200 mM	-	-	-	-	-	-	-	-

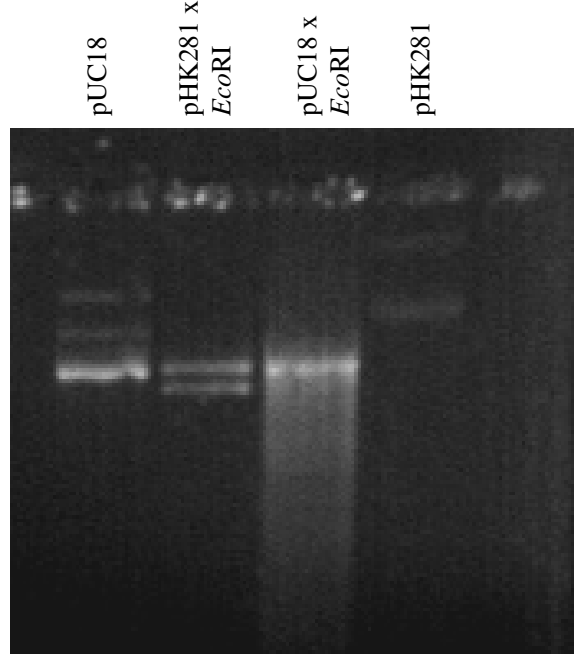
\*B: belirlenemedi

Bu sonuçlara göre *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin Al'ye karşı dirençliliği tüm pH'larda 100 mM olarak belirlendi.

#### 3.2. *Anoxybacillus gonensis* G2 Bakterisinin Al Direnç Geninin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

*Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin genomik DNA kütüphanesinin oluşturulması esnasında üç adet yaygın kullanılan enzim (*Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III) kullanıldı. Çalışmalar sonucunda belirlenen alüminyum dirençlilik geni, *Eco*RI restriksiyon

enzimi ile oluşturulmuş kütüphanede tespit edildi ve geni içeren plazmid, “pHK281” olarak adlandırıldı. pHK281 plazmidinin kesim sonuçları ise Şekil 6’da görülmektedir.



Şekil 6. pUC18 ve pHK281’in kesim sonuçları

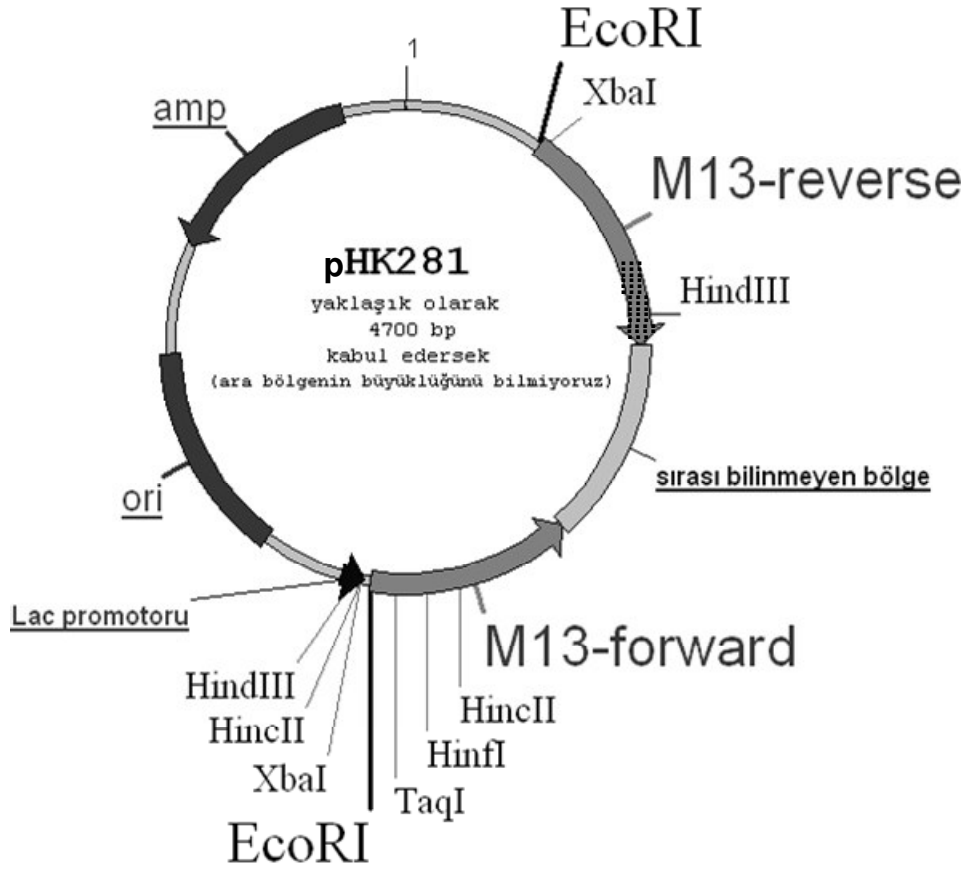
İlgili plazmidin DNA dizin analizinde, pHK281 plazmidinin oluşturulmasında pUC18 plazmidi kullanıldığı için evrensel M13-Reverse (-49) (5'-gAg Cgg ATA ACA ATT TCA-3') ve M13-Forward (-21) (5'-TgT AAA ACg Acg gCC AgT-3') primerleri kullanıldı. Bu sonuçlarda, M13-Reverse primeri ile 833 baz çifti (bp), M13-Forward primeri ile de 845 bp'lik kısımlar elde edildi (Şekil 7, 8 ve 9).

ATGATT CGAATTCTCGCTGCTGGCGTAGGAGAGGTTCTAGAACACCCTCTATAAAAAAACT  
 AGGGATCGCTATGTCCTTAGGGGGTATAGCGTTTTTGTGTTTAGAACGCTCTTTCTTCTTAC  
 GATGTTAGAAAGGAGAGCGAAAGATGAAAAAGGAAAAAGCAGTTGTTGTTTTTCAGCGGTGG  
 CCAAGATAGCACAACTGTTTTATTTGGGCGAAAAAACATTTTGCTGAAGTGGAAGCGGTG  
 ACGTTTGACTATAACCAACGACATCGACTTGAAATTGACGTTGCCGCTTCGATTGCTAAAG  
 AGCTGAATGTACCCCATACGGTGCTTGATATGTCGCTATTAAATCAGCTCGCACCAAATGC  
 GCTTACAAGAAGCGATATAGCAATCGAGCAAAAAGAAGGACAATTGCCGTCCACGTTTGTC  
 GATGGGCGCAATTTATTGTTTTATCATTGCGGCGGTGCTGGCAAAACAAAAAGGGGCAC  
 GTCATCTCGTGACAGGGGTGTGCGAAACGGATTTTAGCGGCTATCCGGACTGTCGCGACGT  
 ATTTATTAAATCGTTAAACGTGACGCTAAATTTAGCGATGGATTACCAATTTGTCATTCAT  
 ACGCCGCTTATGTGGCTCAATAAAGCGGAAACGTGGAAGCTTGCAGATGAGTTAGGTGCGC  
 TTGAGTTCGTGCGCAATAAGACGCTCACGTGCTATAACGGCATCATCGCTGACGGGTGCGG  
 CGAATGTCCAGCGTGCGTGTTGCGCAACGCGGTCTTGACCATATATGAATGAAAGAAGGGA  
 CAAATGTGCGAGATTCACAAATTTATCCGAAGTCATCATC

**Şekil 7. M13-Reverse (-49) primeri ile elde edilen DNA sırası (833 bp)**

AGGGTCGCGGTGCTCTGAGGATCCCGGGGTACCGAGCTCGAATTCACAAGGGTTTAGCCG  
 ACAGTGTCACTGAAGTGTGCCCTCATTGACACAAGCTCGTAACTCCGGACAGTTAAA  
 TTTGACAAAATAATCGCGATCTGGATGTTTGTGTCGAACACTTCTAAAATGTCAGGACTA  
 TATTCAAATACATATTTTCGTTCCCTGGTTGCCAAGAAGTGTGACGCCTTGTAATTCCTCTT  
 CTTTTCTCATGATTCCTTCCTTTTATTTATACGCCGCGGCGATTGCCCCATAATAACGT  
 GTGTAGTTGTGGCAAGACGCGGACGTTGTTTCATCTCTTTAGACTGTACTACTTTGTCAACG  
 AGCCATTCAGTTTTTGAATAATTGAAGGCGAAGCGTAACATCATCCGCTTCGTGTATGT  
 GATCGTTTCCGACTTGACGTAACCGGGACGGTTGGATAGCGTTGATGCACATGTTTGGC  
 GTATGCAAAATCTTCATCGTCAAACACGACAACTTTTAAGCTCACATGCCCGCGATGCGCT  
 GTAAGTCGTTCCATTATCATATCAAGCATTGTAAAATTTGTTTTTCATATTTGAACTTGCGG  
 GCTTTGGTCAAATCGTTAAATCGTCAATGTCATAAAACCAATCTTGCCATACGCTCCCTTG  
 CGTTTCTAAGCCGATGCGTATGTTATGTTCTTTTAATAATGAAATAAGAGCACGAAGTCCT  
 TTTAATAACGCTGGGTTACCTCCAGAAATCGTCACGTGGTTAAAACGGTCCCCACCCATTG  
 GTTTCAGCTGTTGCAAATGTCTTCAGCCGCCATTTGCTTACTTCATTTTTGG

**Şekil 8. M13-Forward (-21) primeri ile elde edilen DNA sırası (845 bp)**



Şekil 9. pHK281 plazmidi (M13-Reverse kısmındaki taralı bölge  $Al^R$  geninin bir kısmını göstermektedir)

M13-Reverse primeri ile elde edilen sıranın son 607 bp'lik kısmının yapılan protein BLAST karşılaştırmaları sonucunda “muhtemel alüminyum direnç geni” olabileceği görüldü (Şekil 10).

Yapılan DNA dizi analizi verileri incelendiğinde, M13-Reverse ve M13-Forward primerleriyle elde edilen iki sıranın da birbirleriyle çakışmadığı bulundu. Ayrıca, her iki sıranın toplam uzunluğuna ( $833+845=1678$  bp) ve dâhil oldukları pUC18 plazmidinin büyüklüğü (2686 bp) de ilave edilirse (4364 bp) elde edilen büyüklük pHK281 plazmidinin varsayılan büyüklüğünü (yaklaşık 4800-5000 bp) karşılamamaktadır. Dolayısıyla analiz edilen her iki gen kısmının arasında yer alan bir DNA kısmının bulunması gereklidir.

ATGATTCTGAATTCTCGCTGCTGGCGTAGGAGAGGTTCTAGAACCCTCTATAAAAAAACT  
 AGGGATCGCTATGTCCTTAGGGGGTATAGCGTTTTTGTGTTTAGAACGCTCTTTCTTCTTAC  
 GATGTTAGAAAGGAGAGCGAAAGATGAAAAAGGAAAAAGCAGTTGTTGTTTTTCAGCGGTGG  
CCAAGATAGCACAACTGTTTTATTTGGGCGAAAAAACATTTTGTGAAGTGAAGCGGTG  
ACGTTTACTATAACCAACGACATCGACTTGAAATTGACGTTGCCGCTTCGATTGCTAAAG  
AGCTGAATGTACCCCATACGGTGCTTGATATGTCGCTATTAAATCAGCTCGCACCAATGC  
GCTTACAAGAAGCGATATAGCAATCGAGCAAAAAGAAGGACAATTGCCGTCCACGTTTGTC  
GATGGGCGCAATTTATTGTTTTATCATTTGCGGCGGTGCTGGCAAAACAAAAAGGGCAC  
GTCATCTCGTGACAGGGGTGTGCGAAACGGATTTTAGCGGCTATCCGGACTGTCGCGACGT  
ATTTATTAATCGTTAAACGTGACGCTAAATTTAGCGATGGATTACCAATTTGTCATTCAT  
ACGCCGCTTATGTGGCTCAATAAAGCGGAAACGTGGAAGCTTGCAGATGAGTTAGGTGCGC  
TTGAGTTCGTGCGCAATAAGACGCTCACGTGCTATAACGGCATCATCGCTGACGGGTGCGG  
CGAATGTCCAGCGTGCGTGTGCGCAACGCGGTCTTGACCATATATGAATGAAAGAAGGGA  
CAAATGTGCGAGATTCACAAATTTATCCGAAGTCATCATC

Şekil 10. M13-Reverse (-49) primeri ile elde edilen DNA sırasında ortaya konulan Al<sup>R</sup> gen bölgesi (altı çizili kısım)

Eksik parçanın yakalanabilmesi için tasarlanan M13-Reverse primeri ile elde edilen parçanın son kısmına uygun olan 20 nükleotid uzunluğundaki HK281 primeri (5'-gCg gAA ACg Tgg AAg CTT gC-3') dizayn ettirildi. HK281 ve M13-Forward primerleri kullanılarak yapılan PCR ile elde edilen DNA parçası *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle kesildi ve elde edilen parça aynı enzimlerle kesilen pUC18'e klonlandı. Elde edilen klonlar içerisinden seçilen doğru klonlardan biri DNA dizi analizine tabi tutuldu. "pF2" olarak adlandırılan bu klonun 846 bp büyüklüğünde bir DNA parçası taşıdığı belirlendi (Şekil 11).

GNNGCAGCTGCGAGAGTTGGTGCGCTTGAGTTCGTGCGCAATAAGACGCTCACGTGCTATA  
 ACGGCATCATCGCTGACGGGTGCGGCGAATGTCCAGCGTGCGTGTGCGCAAACGCGGTCT  
 TGACCAATATATGAATGAAAAGAAAGGAGCAAATGTGCGATGATTCAACAAATTTATCCGC  
 AAGTCATTCATCCGTTTCGCTATGAGCTAAATAAAGATATGCAAATTGCGGCGGCGCACTT  
 TATTCCACATGAAGCGGCCGGGCAATGTGCGAACATGCACGGACATACGTATTTTATCAAC  
 ATTACCGTTGCTGGTGACGAGCTGGATGATTCGGTTTTTTAATTAACCTTTCAACAGTTAA  
 AAAACTCATCCACAATCGTTTTGACCATACGTTAATGAACGATCATAACCGATGTATTTAG  
 CAACACGCAGGCGGAACATTTTCCGACGACAGAAGTCGTAGCGCGCAAAATTGCTGAAATC  
 GTGCAACAACATTTAGACACGTTGCCAAACAAACCGACGTGTGTCCAAGTGTGTTGTGCGGG  
 AGTCCCCGACAAGCTATGTCGTATATCGTCCGAAAGCAGGGAAACAATAATGGAGCGCATT  
 CCCGTCATTGAAATGTTTGGACCAACGATTCAGGAGAAGGGATGGTCATCGGACAAAAAA  
 CGATGTTGCTGCGCACC GCCGGATGCGATTATCGTTGTCGCTGGTGCATTATCGTTTTAC  
 GTGGGACGGTTCTGCAAAAATGAAGTAAAGCAAATGACGGCTGAAGACATTTGGCAACAG  
 CTGAAACAACCTGGGTGGTGACCGTTTTAACCACGTGACGATTTCTGGAGGTAA

Şekil 11. pHK281'deki eksik bölgeyi içeren pF2'nin sahip olduğu DNA sırası (846 bp)

Sonuç olarak pUC18'e klonlanmış olan bakteriyel DNA parçası 2210 bp'dir ve 666 bp'lik muhtemel alüminyum direnç geni içermektedir. pHK281 plazmidinin taşıdığı alüminyum direnç geninin DNA ve amino asit (aa) sırası Şekil 12'de verilmiştir.

Yapılan sıra analizleri sonucunda elde edilen açık okuma dizilerinin (ORF), NCBI veri tabanında bulunan The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verileri kullanılarak nükleotid ve protein sıra analizleri ve karşılaştırmaları yapıldı. Nükleotid karşılaştırmaları için genin 5'→3' yönü esas alınırken, protein karşılaştırmalarında ExPASy Proteomics Server kullanılarak 6 ihtimal dahilindeki amino asit sıraları kullanıldı. Böylece pHK281 plazmidinin yukarıda adı geçen 666 bp'lik alüminyum direnç geni ( $Al^R$ ) olduğu ortaya çıkarılmış oldu. BLAST verilerine dayanılarak benzerliği bulunan organizmalar ve benzerlik oranları Tablo 4'te verilmiştir.

```

1   atg aaa aag gaa aaa gca gtt gtt gtt ttc agc ggt ggc caa gat 45
   M> K  K  E  K  A  V  V  V  F  S  G  G  Q  D

46   agc aca acg tgt tta ttt tgg gcg aaa aaa cat ttt gct gaa gtg 90
   S  T  T  C  L  F  W  A  K  K  H  F  A  E  V

91   gaa gcg gtg acg ttt gac tat aac caa cga cat cga ctt gaa att 135
   E  A  V  T  F  D  Y  N  Q  R  H  R  L  E  I

136  gac gtt gcc gct tcg att gct aaa gag ctg aat gta ccc cat acg 180
   D  V  A  A  S  I  A  K  E  L  N  V  P  H  T

181  gtg ctt gat atg tcg cta tta aat cag ctc gca cca aat gcg ctt 225
   V  L  D  M  S  L  L  N  Q  L  A  P  N  A  L

226  aca aga agc gat ata gca atc gag caa aaa gaa gga caa ttg ccg 270
   T  R  S  D  I  A  I  E  Q  K  E  G  Q  L  P

271  tcc acg ttt gtc gat ggg cgc aat tta ttg ttt tta tca ttt gcg 315
   S  T  F  V  D  G  R  N  L  L  F  L  S  F  A

316  gcg gtg ctg gca aaa caa aaa ggg gca cgt cat ctc gtg aca ggg 360
   A  V  L  A  K  Q  K  G  A  R  H  L  V  T  G

361  gtg tgc gaa acg gat ttt agc ggc tat ccg gac tgt cgc gac gta 405
   V  C  E  T  D  F  S  G  Y  P  D  C  R  D  V

406  ttt att aaa tcg tta aac gtg acg cta aat tta gcg atg gat tac 450
   F  I  K  S  L  N  V  T  L  N  L  A  M  D  Y

451  caa ttt gtc att cat acg ccg ctt atg tgg ctc aat aaa gcg gaa 495
   Q  F  V  I  H  T  P  L  M  W  L  N  K  A  E

496  acg tgg aag ctt gca gat gag tta ggt gcg ctt gag ttc gtg cgc 540
   T  W  K  L  A  D  E  L  G  A  L  E  F  V  R

541  aat aag acg ctc acg tgc tat aac ggc atc atc gct gac ggg tgc 585
   N  K  T  L  T  C  Y  N  G  I  I  A  D  G  C

586  ggc gaa tgt cca gcg tgc gtg ttg cgc aaa cgc ggt ctt gac caa 630
   G  E  C  P  A  C  V  L  R  K  R  G  L  D  Q

631  tat atg aat gaa aag aaa gga gca aat gtg cga tga 666
   Y  M  N  E  K  K  G  A  N  V  R  <-

```

Şekil 12. *A. gonensis* G2 bakterisinin Al<sup>R</sup> geninin DNA ve aa sırası (666 bp)



Tablo 4. Al<sup>R</sup> geninin aminoasit sırasının protein-BLAST karşılaştırması sonucu elde edilen benzerlik kategorileri ve oranları

Sıra	Organizma	% Benzerlik
Alüminyum dirençliliği açısından;		
1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	91
2	<i>Bacillus cereus</i> E33L	91
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	91
4	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	90
5	<i>Bacillus sp.</i> NRRL B-14911	88
6	<i>Arthrobacter viscosus</i>	87
7	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	85
8	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	85
9	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50	83
10	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	83
11	<i>Staphylococcus aureus</i> RF122	82
12	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	80
13	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	80
14	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	79
15	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	76
16	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	71
ATPaz benzerliği açısından;		
1	<i>Bacillus anthracis</i> A2012	91
2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	85
3	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	83
4	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	77
5	<i>Vibrio sp.</i> MED222	77
6	<i>Vibrio cholerae</i> O395	77
7	<i>Vibrio sp.</i> Ex25	76
8	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	76
9	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	76
10	<i>Haemophilus influenzae</i> R2866	76
11	<i>Vibrio cholerae</i> RC385	76
12	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	76
13	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846	76
Hem alüminyum dirençliliği hem de ATPaz özelliği bakımından;		
1	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	85
2	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	83

Alüminyum dirençliliğine sahip olduğu bilinen organizmaların dirençlilik genleri ile pHK281 plazmidinde bulunan dirençlilik geninin aa sıralarının karşılaştırmaları ise CLUSTAL W (1.82) programı ile yapılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Al<sup>R</sup> geni aa sırasının diğer organizmalarla karşılaştırılması

pHK281	----MK-----KEK----AVVVFSGGQDSTTCLFWAKKHF--AE 29
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	----MK-----KEK----AVVVFSGGQDSTTCLFWAIEQF--AE 29
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	---MLRVGSSYPLKKTKEKQYSILRVVFSGGQDSTTCLFWAMERF--EE 45
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	---MMK-----KEK----AVVVFSGGQDSTTCLFWAMERF--EE 30
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	----ME-----NKKKK---AVVVFSGGQDSTTCLFWALKTF--DE 31
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	----MS-----NQQ----ALVIFSGGQDSTTCLIQAIQTYGREN 31
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	----MK-----RQS----ALVVFSGGQDSTTCLFWAMKHY--EY 29
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	MESVLN-----NEK----AIVVFSGGQDSTTCLFYAKKHF--KE 33
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	---MMN-----RET----ALVVFSGGQDSTTCLFWAKRNF--KK 30
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 8	MEISIN-----KEK----ALVVFSGGQDSTTCLFWAKKRY--KE 33
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	----MKR-----AVVVFSGGQDSTTCLAQARHQY--DE 27
	: * .***** * . :
pHK281	VEAVTFDYNQRHRLEIDVAASIAKELNVP-HTVLDMSLLNQLAPNALTRS 78
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	VEAVTFNYNQRHKLEIDCAAEIAKELGIK-HTVLDMSLLNQLAPNALTRT 78
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	VEAVTFDYNQRHSLEIECAQKIAKELGIT-HHILDMSLLNQLAPNALTRS 94
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	VEAVTFDYNQRHSLEIECAQKIAKELGIT-HHILDMSLLNQLAPNALTRS 79
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	VATVTFDYGQRHAEIEIECAKIEAEQLGVS-FRVLDMTLLNQLTESALTRE 80
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	VQAITFQYQQRHAELEERARWIAQDLGVK-QTVLDLSLMRQITHNALMDD 80
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	VETVTFSYGQRHSQELEVAKIEAAEQGVK-HHILDMSLLGQITENALTS 78
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	VELVTFNYGQRHDEIEVAKQIAQDQGMK-HHVLDMSLLSQTLPNALTQH 82
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	VYALSFLYGQKHQKEVELAREIARKAEVE-FDVMDVSFIGTLGHNSLTD 79
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8	VVAVSFDYNQKHKLELECAKDICKKHGVE-HHILDMKLLNQLAPNSLTRA 82
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	VHCVTFDYGQRHRAEIDVARALALKGARAHKVLDTLLNELAVSSLTRD 77
	* ::* *.*:* *:: * :. . :*:::: : :.*
pHK281	DIATIEQ---KEGQLPSTFVDGRNLLFLSFAAVLAKQK GARHLVTGVCETD 125
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	DMEITH---EEGELPSTFVDGRNLLFLSFAAVLAKQV GARHIVTGVCE 125
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	DIAVEDG--EDGELPSTFVPRNLLFLSFAGVLASQIGAKHIVTGVCE 142
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	DIAVEDG--EDGELPSTFVPRNLLFLSFAGVLASQIGAKHIVTGVCE 127
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	EIAVKDG--ENGELPSTFVPRNQLFLSFAAVYAKQIGARHLVTGVCETD 128
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	TAAIET---AENGVPNTFVDGRNALFLLYAAIYAKGQIRI IAGVCETD 127
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	-IAIET---KDGVPNTFVDGRNHLFLSFAAVLAKQRKIRDIVTGVQC 124
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	DMEITN---NEDGIPNTFVPARNLLFLSFAGALAYQIGAKHIITGVCE 129
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	TMVMDQEK--PAGSVPNTFVPRNLLFLLSIAAVYARERGINHLVTGVSQ 128
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8	DMKVEDA--PKDGPPNTFVDGRNLLFLSFAAVFAKQRGINNIITGVSQ 131
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	SIPVPDYEPNADGIPNTFVPRNLLFLTLAAIYAYQVKA EAVITGVCE 127
	: . * .*** .** :** * . * . :*:*.::*
pHK281	FSGYPDCRDVFIKSLNVTNLNLDYQFVIHTPLMWLNKAETWKLADDELGA 175
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	FSGYPDCRDVFKSLNVTNLNLDYQFVIHTPLMWIDKAETWKLADDELGA 175
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	FSGYPDCRDVFIKSLNVTNLNLDYQFVIDTPLMWLNKEETWELA----- 187
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	FSGYPDCRDVFIKSLNVTNLNLDYQFVIDTPLMWLNKEETWELA----- 172
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	YSGYPDCRDVFIKSLNVTNLNLDYQFVIHTPLMWLDKAETWKLADDELGA 178
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	FSGYPDCRDVFKSMNVTNLNLDYDFQIHTPLMYLTKAQTWALADEMGV 177
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	FSGYPDCRDVFKSLNVTNLNLDYEFVIQTPLMWLDKAETWELADQLGK 174
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	FSGYPDCRDSFIKSMNVTLSLMDKDFVIHTPLMWLNKAETWKLADDEL 179
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	FSGYPDCRDAFIKSLNVTNLNLDYQFVIHTPLMWIDKAETWALADDEL 178
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8	FSGYPDCRDVFIKSLNVTNLNLDYQFVLITPLMWIDKAETWKLADDEL 181
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	FSGYPDCRDEFVKALNHAVNLGMAKDIRFETPLMWIDKAETWALADYWG 177
	:***** *.*:* :*. * : : ***** : * .** * :

Tablo 5'in devamı

pHK281	LEFVRNKLTTCYNGI IADGCGECPACVLRKRGLDQYMNEKKGANVR----	221
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	FEFVREKLTTCYNGI IGDGCGECPACQLRKAGLDTYLQEREGANN-----	220
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	-----	
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	-----	
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	LDFVREKLTTCYHGIRGDGCGECPACMLRRRGLLELYLAEKEGDRA-----	223
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	LDYIREQTHTCYNGIVG-GCRECPSCILRERGLAEYLESKKAV-----	219
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	FDYVRQKLTTCYNGIRGTGCRQCPACHLRQAGLEKYLSQKGN-----	217
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	LDYIRTKLTTCYNGI IGDGCGECPACHLRQGLNQYLESKAL-----	222
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	LDLIRNETLTTCYNGIQGDGCGHCPACTLRREGLEKYLKKNQ-----	220
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8	LDIVKNETLTTCYNGIKNGGCECPACKLRKNGYVEFKRLYK-----	222
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	LDLVREETLTTCYNGIKGDGCGHCAACNLNLANGLNHYLSNKAAMAMKQK	227
pHK281	----	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	----	
<i>Arthrobacter viscosus</i> 1	----	
<i>Arthrobacter viscosus</i> 2	----	
<i>Bacillus halodurans</i> strain C-125	----	
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	----	
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	----	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	----	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI	----	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8	----	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	TGLR	231

*A. gonensis* G2 bakterisinin Al<sup>R</sup> geninin aa sırasının karşılaştırması yapıldığında genin “PP-loop superfamily” ATPaz’larına benzerliği de ortaya kondu. Bu karşılaştırmanın sonuçları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. *A. gonensis* G2 bakterisinin diğer bazı organizmalardaki PP-loop superfamily ATPaz'larla aa sırası karşılaştırması

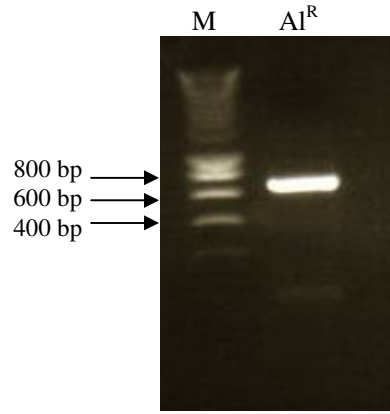
Feature 1	### ####	# #
<i>E coli.</i>	15 QILVAFSGGLDSTVLLH.[4].W.[ 9].RAIHVHHGL.[7].VTHCEN.[23].EAQ	ARQARYQAFAR.[6]. 110
<i>A. gonensis</i> G2	05 KAVVVFSGGQDSTTCLF W.[ 8].EAVTFDYNQ.[5].IDVAAS.[32].EQK.[10].GRNLLFLSFAA.[9]. 115	
<i>Nephroselmis</i>	08 RLLISCSGGQDSVTLLF.[4].L.[ 8].GVVYCNHMW.[7].PAKLAR.[20].EEE	GRSWRLRVLCR.[8]. 151
<i>Bifidobacterium</i>	45 LVLVACSGGRDSMALAA.[4].V.[ 8].GAVIVDHGL.[7].ASEAAD.[24].EAA	ARQARYDELCA.[8]. 142
<i>Desulfotalea</i>	30 KIIIVGVS GGADSIALLH.[4].L.[ 6].IAIYIDHGL.[8].ISFVKG.[27].EDA	ARRLRYQAF AE.[8]. 129
<i>Desulfovibrio</i>	64 HCVVALSGGADSTALLL.[4].L.[ 8].SALHVDHGL.[7].ARAAVT.[27].EEA	GRKARYDLLAA.[8]. 164
<i>Mesorhizobium</i>	21 GAVAAVSGGSDSTALLL.[4].H.[10].LAVTIDHGL.[7].AQAVAK.[23].PAA	ARDARYHLLAE.[8]. 119
<i>Legionella</i>	21 KLIVGFSGGLDSTVLLH.[4].T.[ 7].LAVHINHGI.[7].QRHCEQ.[22].EEA	ARNARYDFFSS.[6]. 113
<i>Helicobacter</i>	15 KNLLGFSGGLDSTCLFF.[4].E.[ 4].DIALVDYNT.[7].IQHAQK.[21].EMQ	ARKIRYDFFET.[8]. 105
<i>Buchnera</i>	13 SFLVAYS GGLDSTVLLY.[4].I.[ 8].RAIHINHNL.[7].SEHCKK.[23].EEK	LRIKRYNIIYN.[6]. 107
	*** **	
Feature 1		
<i>E coli.</i>	111 VLVT AQ.[5].CETFL LALK	RG.[19].LIRPLLARTGEL.[33]. 197
<i>A. gonensis</i> G2	116 HLVTGV CETDFSGYP.[2].RD.[19].IHTPLMWNKAET.[33]. 199	
<i>Nephroselmis</i>	152 YISTGH.[5].IETLLSNVL	RG.[27].IIRPLLGISRLEL.[33]. 246
<i>Bifidobacterium</i>	143 AVLLAH.[5].AETVLIGLL	RS.[19].FARPLLT LTRAET.[33]. 229
<i>Desulfotalea</i>	130 YIMVAH.[5].VEEFFIRLL	RG.[15].LLRPLLSLTKADL.[33]. 212
<i>Desulfovibrio</i>	165 WICTGH.[5].AEDVLMRLV	RG.[17].ILRPLLLTEKDRL.[33]. 249
<i>Mesorhizobium</i>	120 LIVTGH.[5].AETVLMRHA	RD.[25].IVRPLLGTRRSAL.[33]. 212
<i>Legionella</i>	114 CLVLGH.[5].AETVLLQLF	RG.[19].LARPFLTCPRVEL.[33]. 200
<i>Helicobacter</i>	106 HLILAH.[5].LEWFLMQLS	KG.[19].IVRPLLYTPKDTL.[31]. 190
<i>Buchnera</i>	108 ILLTGH.[5].CETFFLSLK	RG.[19].IVRPFLKKT KIEL.[33]. 194

### 3.3. İlgili Gen Ürününün Biyokimyasal Karakterizasyonu

İlgili gen ürününün karakterizasyonu için öncelikle tam sırası belirlenmiş olan gen uygun bir şekilde bir ekspresyon vektörüne aktarıldı. Bu vektör vasıtasıyla elde edilen protein saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri tespit edildi.

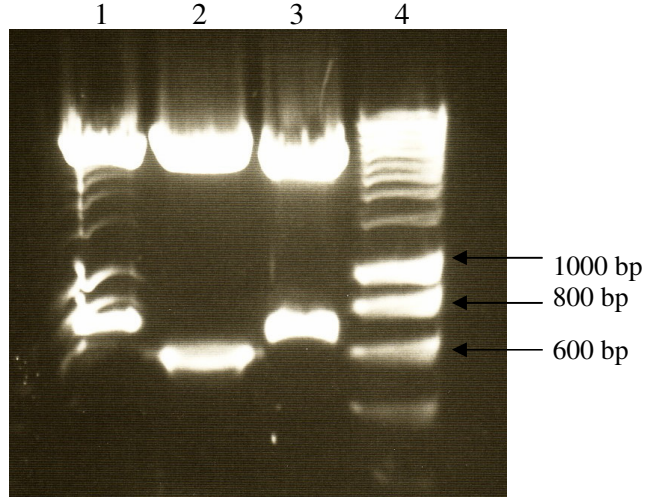
#### 3.3.1. Al<sup>R</sup> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

İlgili gen ürününün karakterizasyonu için öncelikle tam sırası belirlenmiş olan genin ekspresyon vektörüne aktarımının sağlanabilmesi için ihtiyaç duyulan restriksiyon kesim bölgelerini içerecek şekilde tasarlanan primerler (Fatih1 ve Fatih2) kullanıldı. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 675 bp büyüklüğünde, 5' ucunda *NdeI* ve 3' ucunda *BamHI* kesim bölgeleri içeren Al<sup>R</sup> geni elde edildi (Şekil 13).



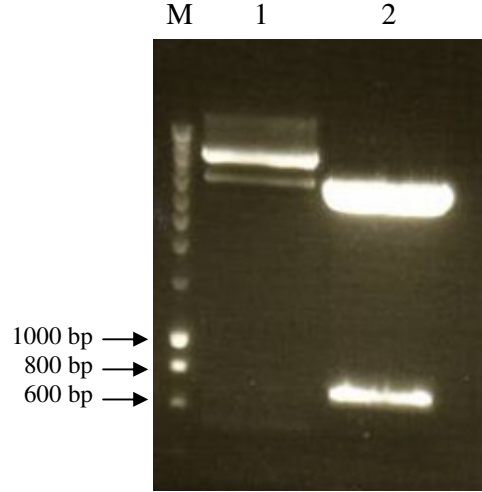
Şekil 13. pHK281'in Fatih1 ve Fatih2 primerleriyle verdiği PCR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforezi (M: Smart DNA Ladder (Eurogentec))

Bu DNA parçası, TOPO-T/A (Invitrogen) klonlama vektörüne klonlandı. Böylece pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidi elde edildi ve bu plazmid, *E. coli* TOP10 hücresine aktarıldı. pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidinin DNA'sı, *EcoRI*, *HindIII* ve *BamHI/NdeI* enzimleriyle kesilerek doğrulukları tespit edildi. Böylece ilgili plazmidin doğruluğu ortaya konmuş oldu (Şekil 14).

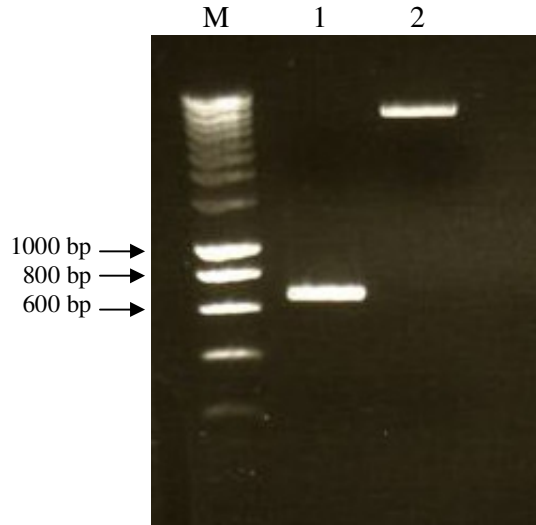


Şekil 14. pTOPO-Al<sup>R</sup> plazmidinin DNA'sının kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforezi (1: *EcoRI*, 2: *HindIII*, 3: *BamHI/NdeI* ve 4: Smart DNA Ladder (Eurogentec))

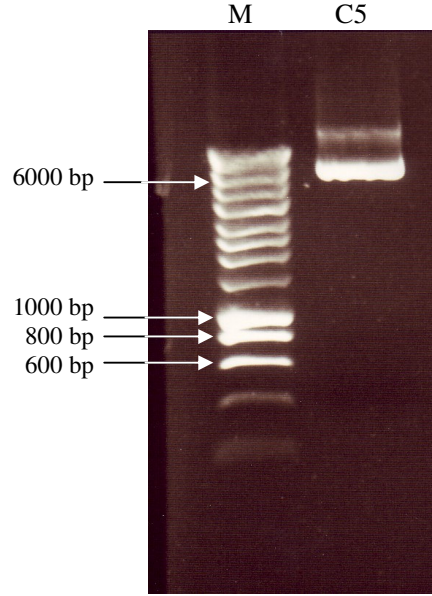
Tek bir doğru koloni seçilerek QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA) ile firmanın öngördüğü şekilde izole edildi ve hem bu DNA hem de bu klon sonraki çalışmalarda kullanıldı. pTOPO+Al<sup>R</sup> den *NdeI* ve *BamHI* enzimleriyle ilgili gen bölgesi kesildi ve agaroz jelden temiz bir şekilde izole edilerek yine aynı enzimlerle kesilmiş olan pET11a ekspresyon vektörüne klonlandı (Şekil 15 ve 16). pET11a+Al<sup>R</sup> plazmidi daha sonra elektrokompotent *E. coli* MC1061 konak hücrelerine aktarıldı. Elde edilen kolonilerden izole edilen pDNA'ların enzim kesimleri sonucu doğru olan (C5 nolu klon, Şekil 17) seçilerek bundan sonraki çalışmalarda kullanıldı. C5 plazmid DNA'sı, *DraI*, *HindIII*, *BamHI/NdeI* ve *EcoRI/XbaI* enzimleriyle kesilerek doğrulukları tespit edildi. Kesim sonuçlarına göre *DraI* kesiminin sonucunun 5600+700 bp, *HindIII* kesiminin sonucunun 5677+600 bp, *BamHI/NdeI* kesiminin sonucunun 5677+600 bp ve *EcoRI/XbaI* kesiminin sonucunun 5377+900 bp şeklinde yapılan hesaplara uyduğu görüldü. Böylece ilgili plazmidin doğruluğu ortaya konulmuş oldu (Şekil 18).



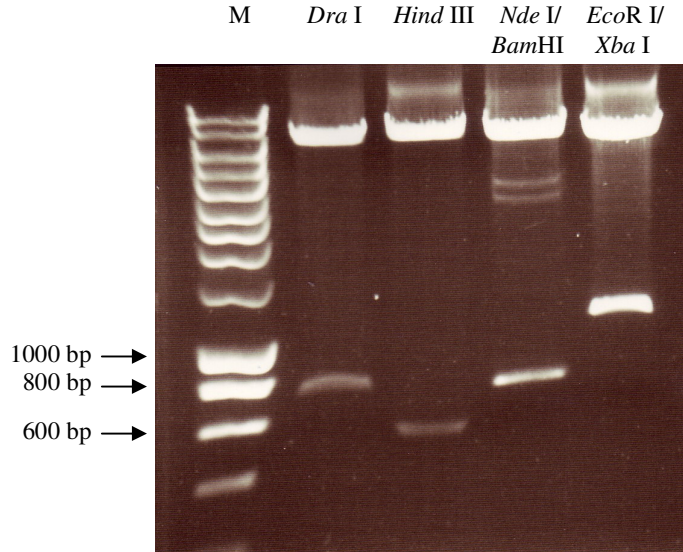
Şekil 15. pET11a ve pTOPO-A1<sup>R</sup> plazmidlerinin *NdeI* ve *BamHI* kesim sonuçlarının % 1'lik agaroz jel elektroforezi (M: Smart DNA Ladder, 1: pET11a'nın *NdeI* ve *BamHI* kesim sonucu, 2: pTOPO-A1<sup>R</sup>'nin *NdeI* ve *BamHI* kesim sonucu)



Şekil 16. Kesim sonrası % 1'lik jelden saflaştırılmış *NdeI* ve *BamHI* bölgesi A1<sup>R</sup> ve aynı enzimlerle kesilmiş alıcı pET11a vektörünün % 1'lik agaroz jel elektroforezi (M: Smart DNA Ladder, 1: A1<sup>R</sup>, 2: pET11a)



Şekil 17. C5 plazmidinin % 1'lik agaroz jel elektroforezi (M: Smart DNA Ladder)

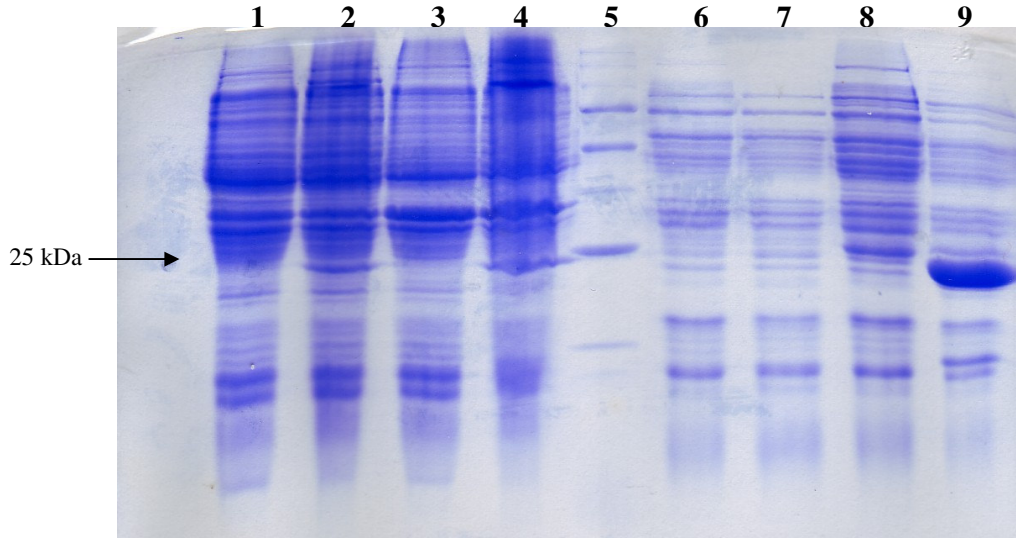


Şekil 18. pET11a-Al<sup>R</sup> plazmidinin 4'lü kesiminin % 1'lik agaroz jel elektroforezi (M: Smart DNA Ladder)

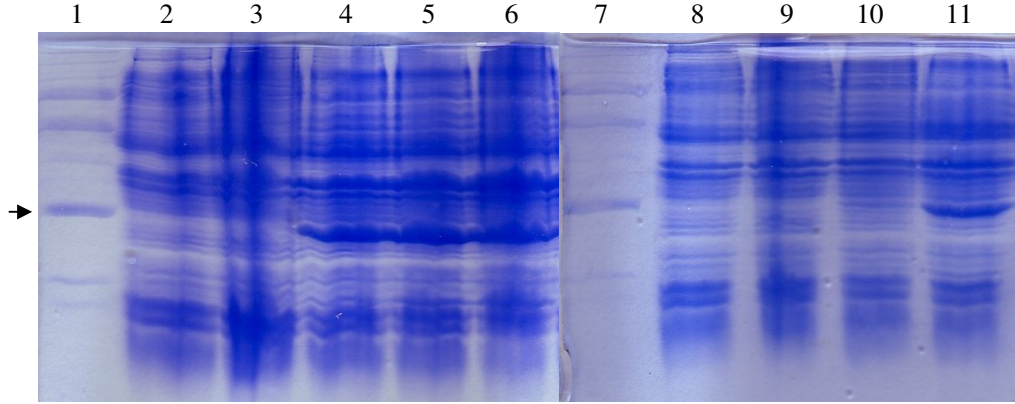


### 3.3.2. Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Ekspresyon çalışmalarında pET11a+Al<sup>R</sup>, *E. coli* BL21(DE3) ve *E. coli* C43(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Başlangıçta iki ayrı (28 ve 37°C) sıcaklıkta inkübasyon yapıldı. Ayrıca *E. coli* BL21(DE3) konak hücresinde elde edilen ekspresyonda, daha fazla hücrel protein olması ve zaman zaman iyi sonuç vermemesi nedeniyle *E. coli* C43(DE3) konak hücresi çalışmalarda tercih edilmiştir (Şekil 19). Yine ekspresyon süresinin belirlenmesinde, gece boyu olarak inkübe edilen kültürden, 0., 2., 4. saatlerde ve gece boyu olarak 1,5 ml örnekler alındı ve bu örnekler Coomassie Brilliant Blue boyalı SDS-PAGE analizine tabi tutuldu. Bunun sonucunda ekspresyon süresinin, 37°C'de ve gece boyu inkübasyonda daha verimli olduğu saptandı. Bundan sonraki çalışmalarda, bu değerler esas alındı (Şekil 20).

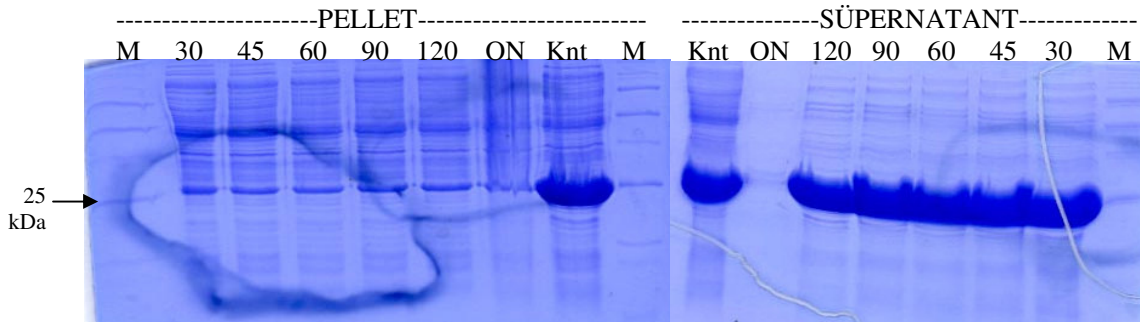


Şekil 19. *E. coli* BL21(DE3) ve C43(DE3) konak hücrelerinde ekspresyonun karşılaştırılması (1: BL21(DE3) Kontrol, 2: BL21(DE3)/pET11a-Al<sup>R</sup>, 3: C43(DE3) Kontrol, 4: C43(DE3)/pET11a-Al<sup>R</sup> pellet sonuçları 5: Protein Markırı, 6-7-8-9: Aynı sıra ile süpernatant sonuçları)



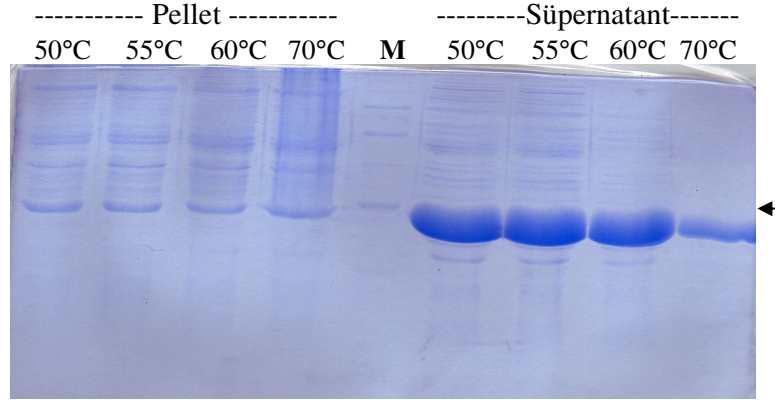
Şekil 20. Farklı inkübasyon sıcaklık ve sürelerinin C5 plazmidini içeren *E. coli* C43(DE3) hücrelerinde denemesi (1 ve 7: Markır, 2: *E. coli* C43(DE3) kontrol, 3: 37°C'de 0. saat, 4: 37°C'de 2. saat, 5: 37°C'de gece boyu, 8: *E. coli* C43(DE3) kontrol, 9: 28°C'de 0. saat, 10: 28°C'de 2. saat, 11: 28°C'de gece boyu inkübasyon, Ok: 25 kDa)

Çöktürülmüş hücreler, 1X PBS tamponu (20 ml/L kültür)'de çözüldü, iki kez dondurma ve eritme işleminden sonra, sonikatör (%30 amplitude, 2 dakika toplam işlem süresi, 20 saniye pulse ON/OFF) yardımıyla parçalandı. Elde edilen süspansiyon, yüksek hızda santrifüjlenerek çöktürüldü ve süpernatant farklı bir tüpe aktarıldı. Hem süpernatant hem de pellet kısmı, Coomassie Blue-boyalı SDS-PAGE'e yüklendi. Bu işlem sonucunda proteinin "sitosolik" (soluble = çözünebilir) karakterde olduğu saptandı (Şekil 21).

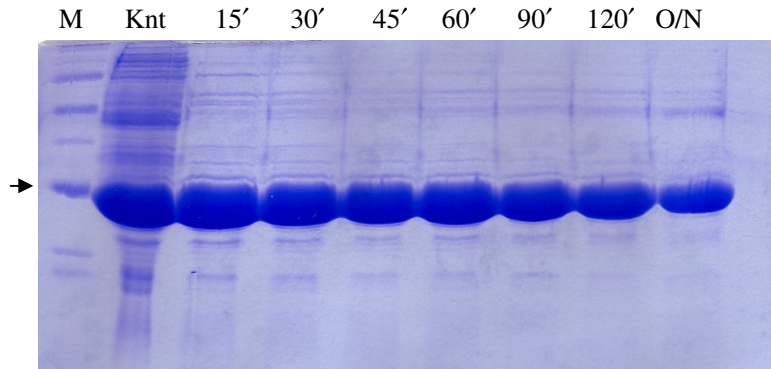


Şekil 21. Proteinin sitosolik karakterde olduğunun gösterilmesi (M: Markır, Knt: kontrol)

Proteinin denatürasyon sıcaklığı ve süresinin tespit edilebilmesi için, 50, 55, 60, 65 ve 70°C'ler olmak üzere 5 farklı sıcaklık derecesi, 15, 30, 45, 60, 120 dakika ve gece boyu olmak üzere 6 farklı sürede uygulama gerçekleştirildi (Şekil 22). Tüm bu uygulamalar sonucunda proteinin, 65°C'de 30 dakika muamele edilmesiyle, ortamda bulunan konak hücre kaynaklı diğer proteinlerin uzaklaştırıldığı görüldü (Şekil 23).



Şekil 22. Pellet ve süpernatant kısımlarına ait denatürasyon sıcaklığı uygulaması (M: Markır; Ok 25 kDa)



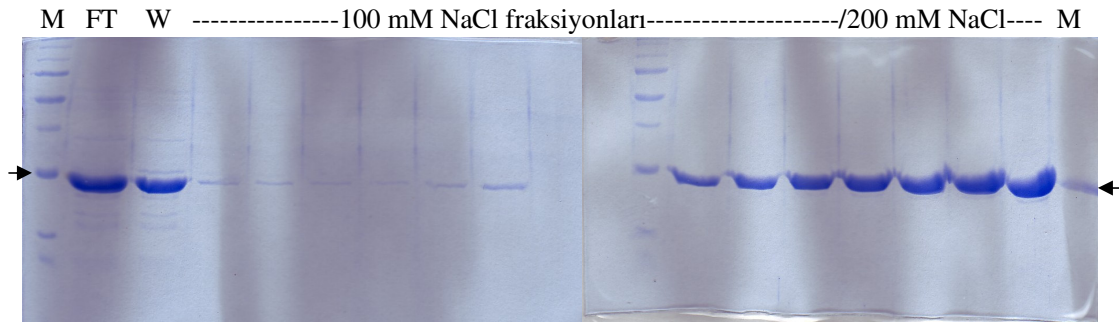
Şekil 23. 65°C sıcaklıkta farklı sürelerde denatürasyon (M: Markır; Knt: Kontrol; Ok 25 kDa)

Protein örneğinin saf olarak elde edilebilmesini sağlamak için kullanılacak olan kolonun ve uygun tamponun seçiminde, proteinin sahip olduğu pI noktası (6,94) esas alındı. Buna dayanarak, 3 farklı pH'da tampon ve buna uygun da matriks seçildi. Bunlar,

1. S-Sepharose kolonu için MES, pH 6,0 tamponu,
2. Q-Sepharose kolonu için Tris-Cl, pH 7,5 tamponu,

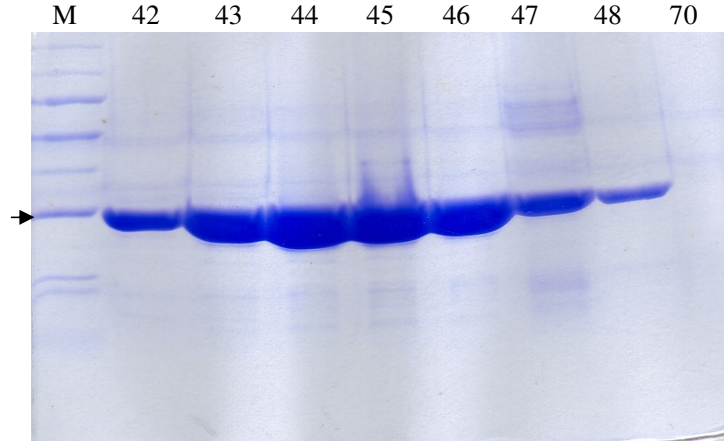
3. Q-Sepharose kolonu için Tris-Cl, pH 8,0 tamponu şeklindedir.

Protein örneğinin denatürasyonundan sonra elde edilen süpernatant, 3 tüpe bölünerek ilgili tamponların 20 mM'lık konsantrasyonlarında diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra örnekler tekrar 5 tüpe bölündü ve her tüpte 10 kez aynı tamponla sulandırıldı. Kolon işleminden sonra elde edilen fraksiyonlar, SDS-PAGE analizine tabi tutulmuş ve saflaştırma için gerekli en uygun ortamın S-Sepharose matriksi ile MES pH 6,0 tamponu olduğuna karar verilmiştir (Şekil 24). Ayrıca kolondan sonra ortamda herhangi bir kontaminant proteininin olup olmadığının daha iyi tespiti için ise, Coomassie Blue boyalı SDS-PAGE'in yanı sıra daha hassas sonuç veren gümüş boyama tekniği de uygulandı. Bu kolondan elde edilen fraksiyonlar biriktirilerek, Amicon filtrasyon membranı (cut off 5 kDa) kullanılarak konsantre edilmiştir. Daha sonra bu örnek, Hiload (Superdex200 16/60) kolonundan geçirilerek daha da saflaştırılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile tespit edildikten sonra, Bio-Rad Protein Assay kiti yardımıyla protein konsantrasyonu belirlendi.



Şekil 24. S-Sepharose matriksi MES pH 6,0 tamponu kullanılarak yapılan iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar (M: Markır; FT: Flow Through; W: Wash; Ok 25 kDa).

Filtrasyon ile yoğunlaştırılan protein örneği, “ÄKTA™explorer Chromotography Systems” cihazı ile HiLoad (Superdex 200, 16/60, Amersham Pharmacia) kolonu kullanılarak jel filtrasyon kromatografisine tabi tutuldu. Böylece protein daha saf ve yoğun olarak elde edildi (Şekil 25).



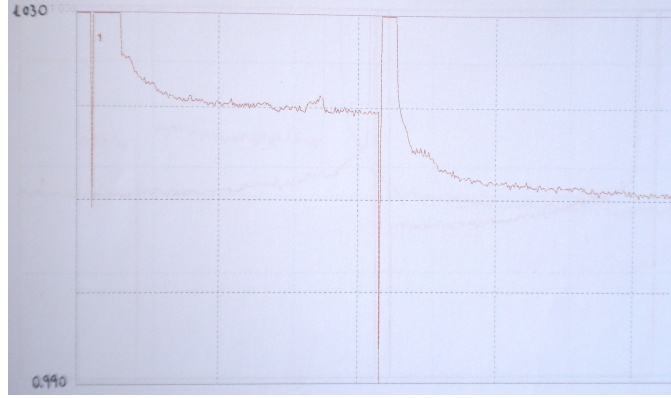
Şekil 25. Proteinin HiLoad (Superdex 200, 16/60) kolonu ile jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar (M: Markır, sayılar elde edilen fraksiyon sayılarını ifade ediyor; Ok 25 kDa).

### 3.3.3. Proteinin Enzimatik Özelliklerinin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Protein-BLAST karşılaştırmaları sonucunda elde edilen verilerde, dirençlilik geninin aynı zamanda “PP-loop superfamily ATPaz”lara olan benzerliğinden dolayı proteinin enzimatik karakterde olabileceği düşünüldü (Tablo 6). Bu nedenle, literatüre bakılarak belirlenen ikili enzim yöntemi denendi. Fakat yöntemin yüksek sıcaklıklarda kararlı olmaması nedeniyle standart ATPaz aktivite testleri kullanıldı.

#### 3.3.3.1. İkili Enzim Yöntemi İle Aktivitenin Varlığının Tespiti

Bu yöntemde ATPaz aktivitesi, Ogawa vd.’ne (2000) göre NADH oksidasyonu ile ATP hidrolizinin oranının belirlenmesine dayanan standart ikili enzim yönteme göre yapıldı. Spektroskopik ölçümler, 340 nm’de yapıldı ve proteinin ATPaz aktivitesi, miligram proteinin dakikada hidrolizlediği mM ATP olarak hesaplandı. Denemeler 37°C’de ısıtmalı spektroskopi küvetinde yürütüldü. ATPaz aktivitesini gösterecek olan 340 nm’deki optik yoğunluktaki düşüş, bilgisayar yardımıyla belirlendi (Şekil 26). Bu deney sonucunda spesifik aktivite 0,1423  $\mu\text{M}/\text{mM}$  protein/dakika olarak hesaplandı.



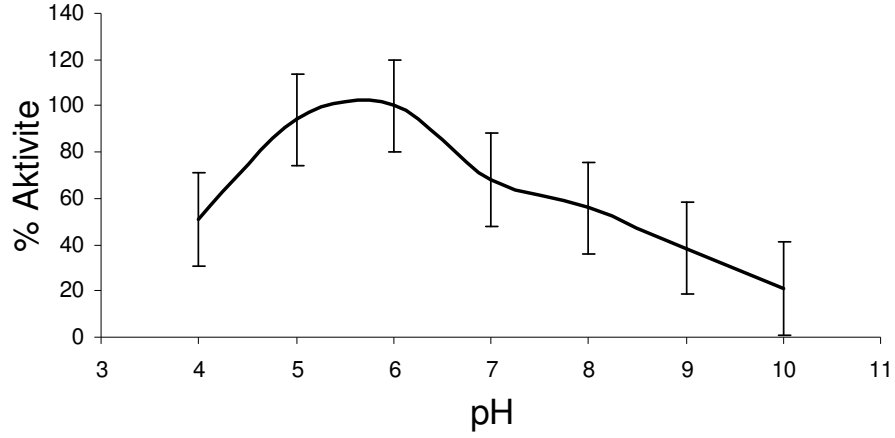
Şekil 26. 0,5 mM ATP kullanılarak yapılan ATPaz aktivite tespiti

### 3.3.3.2. Standart ATPaz Yöntemi ve Biyokimyasal Karakterizasyonlar

Standart ATPaz yöntemi, ATPaz'ın substratı olan ATP'yi, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkarttığı Pi'nin kolorimetrik olarak belirlenmesi esasına dayanan Goldenberg ve Fernandez'e (1966) göre gerçekleştirildi. Enzimin salıverdiği Pi miktarı mg/100 ml olarak hesaplandıktan sonra bu değer, 1 ünite, 100 ml'de 1 dakika sürede hidroliz olan nM ATP değerini verecek şekilde ünite birimine dönüştürüldü.

#### 3.3.3.2.1. ATPaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

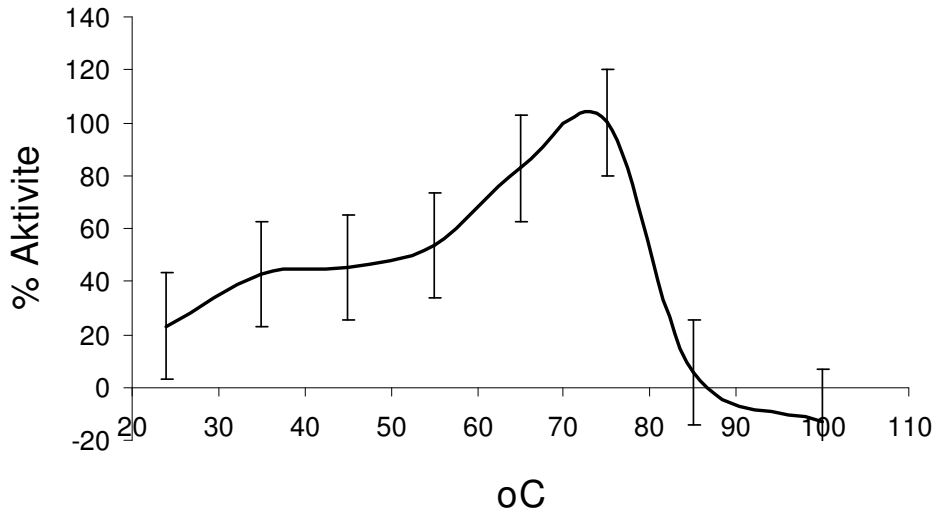
Enzimin en iyi çalışabildiği tampon ve pH'yı bulabilmek için, asetik asit (pH: 4,0–5,0–6,0), HEPES (pH: 7,0–8,0), Tris (pH: 9,0) ve Glisin-NaOH (pH: 10,0) tamponları kullanıldı ve deneyler bakterinin büyüme sıcaklığı olan 55°C'de yürütüldü. Yapılan çalışma ile enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH noktası 6,0 olarak belirlendi (Şekil 27). Bu pH değerinin  $\pm 1$  değerlerinde % 70-80'lik bir aktivitenin olduğu görüldü.



Şekil 27. pH-ATPaz aktivitesi grafiği

### 3.3.3.2.2. ATPaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

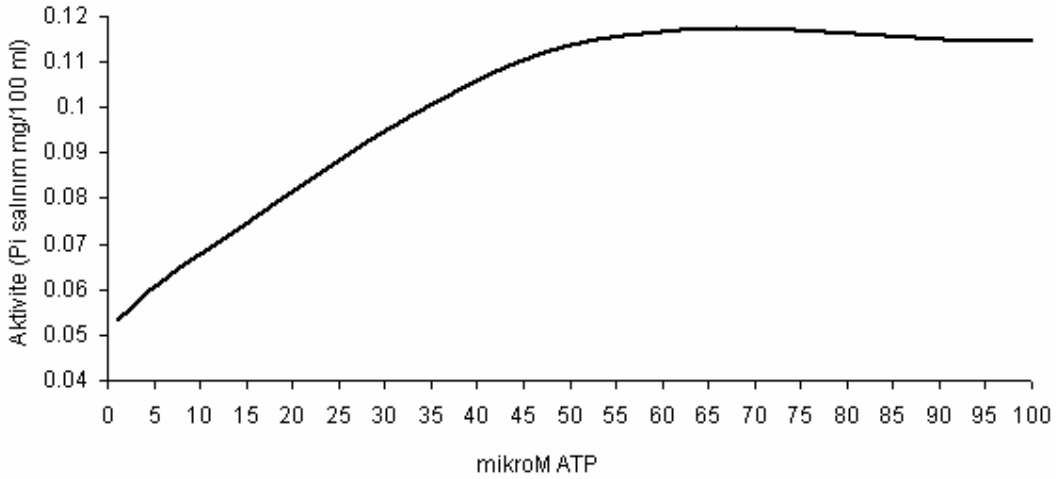
Uygun pH belirlendikten sonra, bu pH ve tampon kullanılarak, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 ve 100°C'lere ayarlanmış su banyoları ve termal ısıtıcılar kullanılarak aktivite-sıcaklık ilişkisi incelendi. Denemeler sonucunda en uygun sıcaklık noktasının 73°C olduğu belirlendi (Şekil 28).



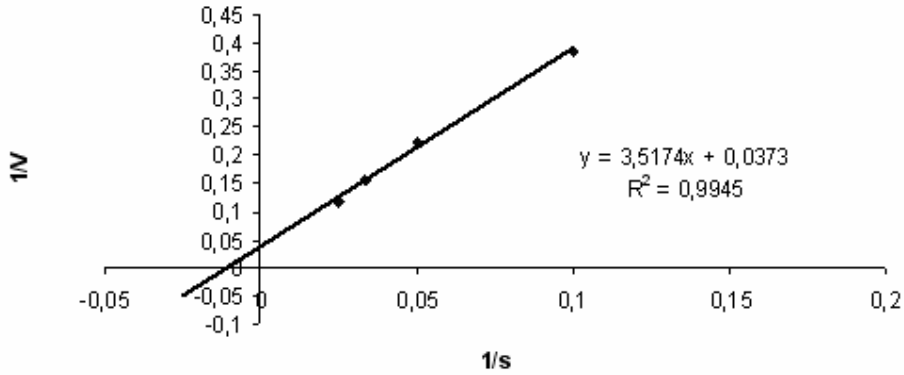
Şekil 28. Sıcaklık-ATPaz aktivitesi grafiği

### 3.3.3.2.3. ATPaz Aktivitesi Üzerine Kinetik İncelemeler

Uygun tampon, pH ve sıcaklık belirlendikten sonra Michaelis-Menten Eğrisi çizildi (Şekil 29). Daha sonra çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x eksenini kestiği nokta  $-1/K_m$  'ye eşitlenerek enzimin  $K_m$  değeri  $10 \mu\text{M}$ , y eksenini kestiği nokta ise  $1/V_{max}$  'a eşitlenerek  $V_{max}$  değeri ise  $7,2$  ünite olarak hesaplandı (Şekil 30).



Şekil 29. ATP için Michaelis-Menten Eğrisi



Şekil 30. ATP için Lineweaver-Burk Eğrisi

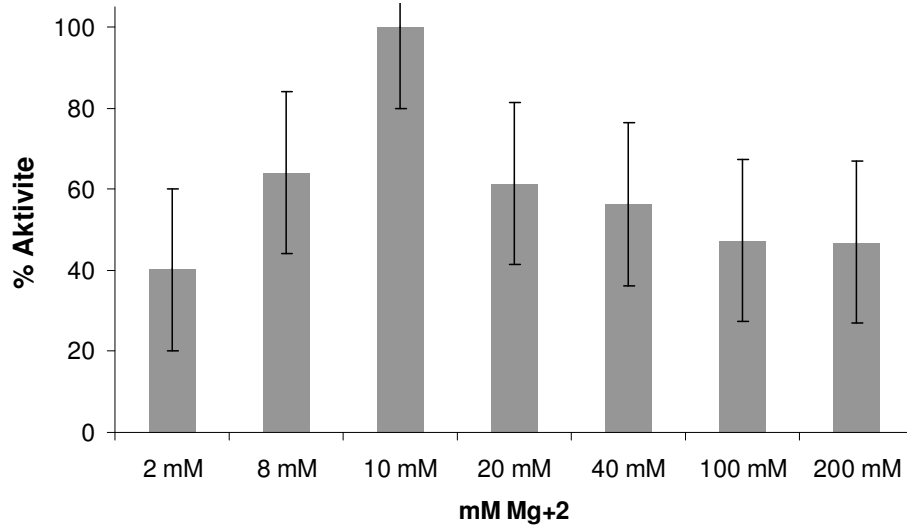


### 3.3.3.2.4. ATPaz Aktivitesi Üzerine Tuz Gerekliliği

ATPaz'ların kofaktör olarak bir veya birkaç metale ihtiyaç duymalarından dolayı  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$  gibi kofaktörlerin aktivite üzerine etkisi incelendi. Bu nedenle, 0, 50, 100, 150, 200, 400, 600 ve 1000 mM konsantrasyonlarda  $\text{Na}^+$ , 0, 2, 8, 10, 20, 40, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda  $\text{Mg}^{+2}$  ve 0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda  $\text{K}^+$  ile deneyler yürütüldü.

#### 3.3.3.2.4.1. Magnezyum ( $\text{Mg}^{+2}$ )

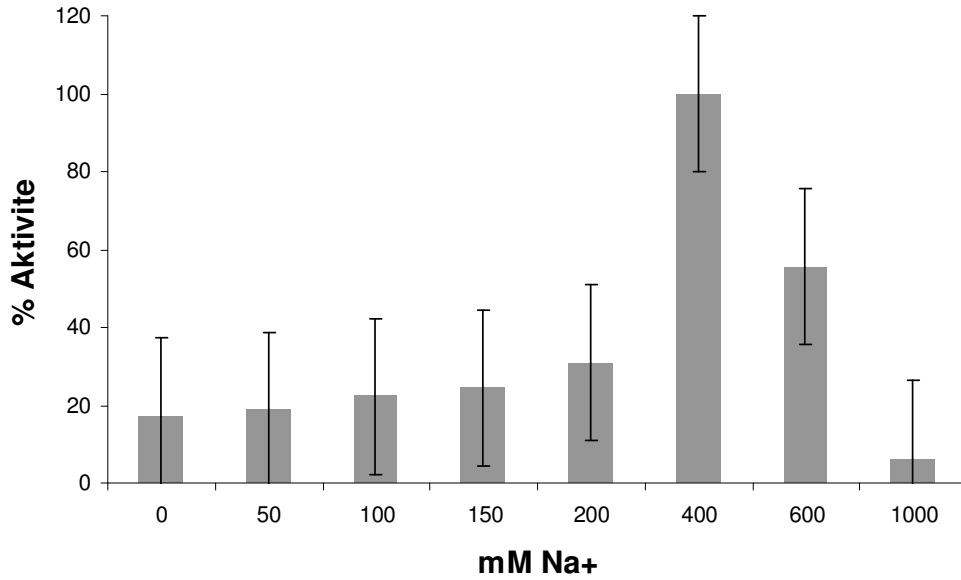
Bilindiği gibi  $\text{Mg}^{+2}$ , birçok ATPaz'ın kofaktörüdür. Fakat literatüre baktığımızda, bu iyonun kullanılmadığı ATPaz reaksiyonlarına da rastlamaktayız (Schirmer vd., 1998; Herdendorf vd., 2002; Geisler vd., 1998; Melkani vd., 2003). Enzimimizin  $\text{Mg}^{+2}$ 'ye bağımlılığını test etmek için reaksiyon ortamına kontrol grubu hariç, 2, 8, 10, 20, 40, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda olacak şekilde  $\text{MgCl}_2$  ilave edildi. Sonuç olarak 10 mM  $\text{Mg}^{+2}$  ilavesinin aktiviteyi 2,85 kat daha fazla arttırdığı tespit edildi. Fakat 10 mM'dan sonra aktivite magnezyum kullanılmada yapılan reaksiyondaki aktiviteye göre 1,34 kata kadar gerilemektedir (Şekil 31).



Şekil 31. ATPaz aktivitesine  $\text{Mg}^{+2}$  iyonunun etkisi

### 3.3.3.2.4.2. Sodyum ( $\text{Na}^+$ )

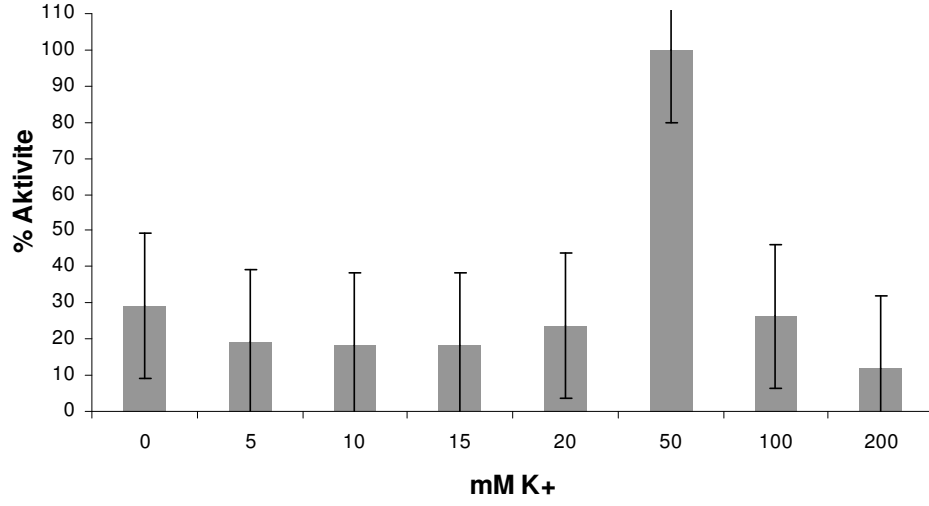
Magnezyumda olduğu gibi  $\text{Na}^+$  iyonu da birçok ATPaz'ın çalışması için gereklidir (Schirmer vd., 1998; Herdendorf vd., 2002; Geisler vd., 1998; Melkani vd., 2003). Bu nedenle, kontrole karşı 50, 100, 150, 200, 400, 600 ve 1000 mM son konsantrasyonda NaCl ilave edilerek reaksiyon gerçekleştirildi. Yapılan deneyler sonucu enzimin 400 mM  $\text{Na}^+$ 'de maksimum verimi verdiği gözlemlendi. Bu konsantrasyonda aktivite 5,7 kat artmıştır (Şekil 32).



Şekil 32. ATPaz aktivitesine  $\text{Na}^+$  iyonunun etkisi

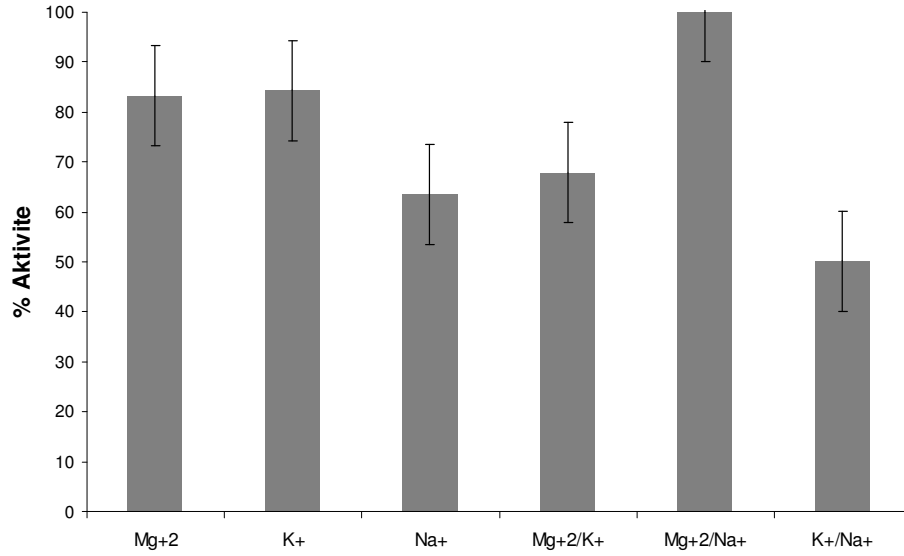
### 3.3.3.2.4.3. Potasyum ( $\text{K}^+$ )

Benzer şekilde, kontrole karşı 5, 10, 15, 20, 50, 100 ve 200 mM son konsantrasyonlarda KCl içeren reaksiyon serileri hazırlanmış ve reaksiyona  $\text{K}^+$  iyonunun etkisi gösterilmeye çalışıldı.  $\text{K}^+$  iyonunun 50 mM konsantrasyonda aktiviteyi 3,3 kat artırdığı gözlemlendi (Şekil 33).



Şekil 33. ATPaz aktivitesine  $K^+$  iyonunun etkisi

Her bir tuzun maksimum gereklilik gösteren noktaları belirlendikten sonra,  $Mg^{+2}/Na^+$ ,  $Mg^{+2}/K^+$  ve  $Na^+/K^+$  reaksiyonları da yürütüldü. Yapılan deneyler sonucunda enzimin, 10 mM  $Mg^{+2}$  ve 400 mM  $Na^+$  iyonları konsantrasyonlarında daha iyi aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 34).

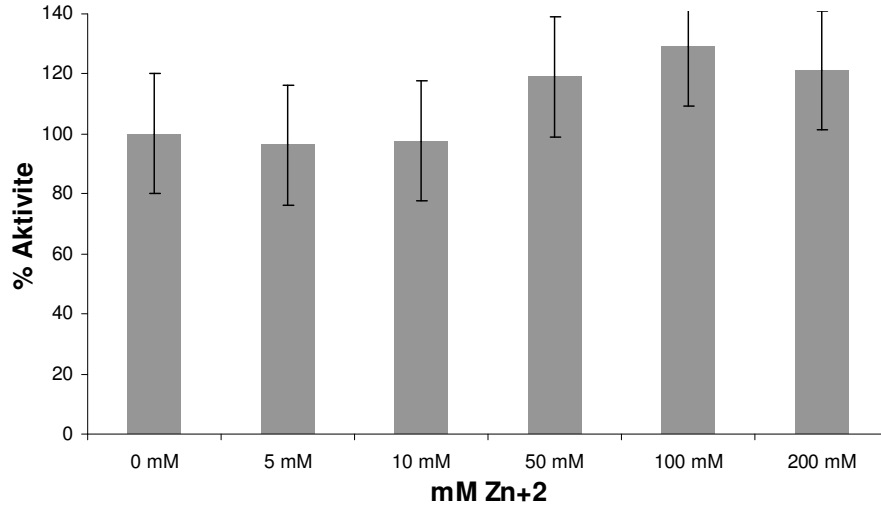


Şekil 34. ATPaz aktivitesinde kofaktör etkisi

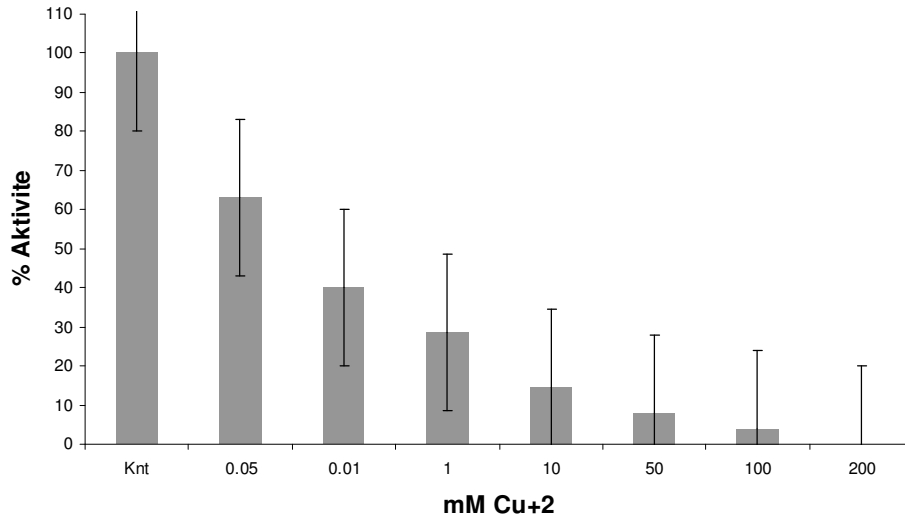
### 3.3.3.2.5. ATPaz Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi

ATPaz aktivitesi üzerine yukarıda bahsi geçen metallerden başka çinko, bakır, kobalt, kadmiyum, mangan, lityum, gümüş ve alüminyum ( $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Li^{+}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Al^{+3}$ ) iyonlarının da etkisi incelendi.

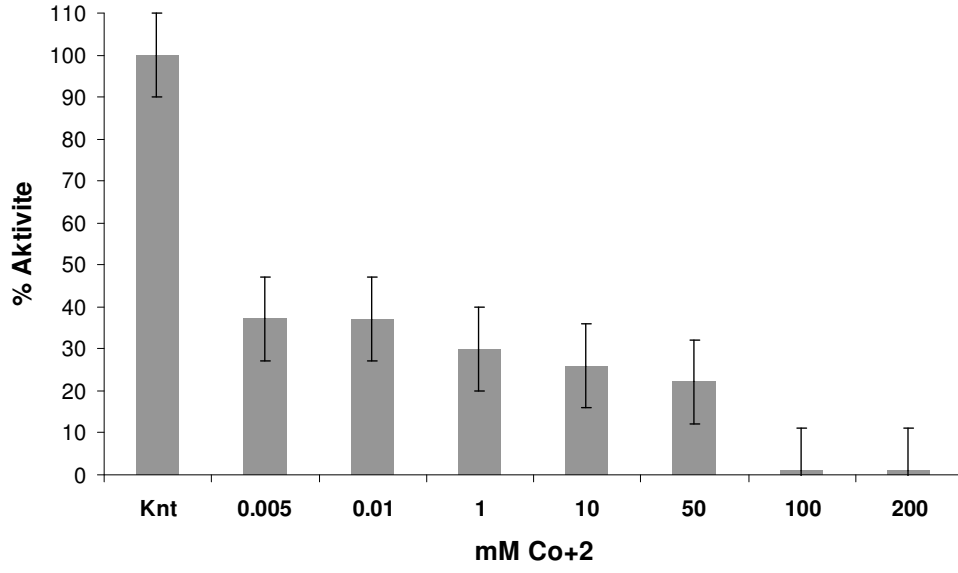
Bu metaller içerisinde yalnızca  $Zn^{+2}$  iyonu 100 mM konsantrasyonda aktiviteyi 1,2 kat arttırdığı gözlemlendi (Şekil 35). Diğer metaller ise genel olarak konsantrasyona bağlı olarak aktiviteyi azaltıcı veya sonlandırıcı etkide bulunmakta oldukları tespit edildi.  $Cu^{+2}$  iyonunun, aktiviteyi göreceli olarak azalttığı ve 200 mM konsantrasyonda aktiviteyi durdurduğu (Şekil 36);  $Co^{+2}$  iyonunun, 0,005 mM konsantrasyonda bile aktiviteyi % 40'lardan aşağıya çektiği ve 100 mM'dan sonraki konsantrasyonlarda durdurduğu (Şekil 37);  $Cd^{+2}$  iyonunun, 0,05 mM konsantrasyondan itibaren aktiviteyi %80'lere kadar azalttığı ve 200 mM konsantrasyonda yarıya kadar düşürdüğü (Şekil 38);  $Mn^{+2}$  iyonunun, 0,1 mM konsantrasyonda aktiviteyi % 53 azalttığı (Şekil 39);  $Li^{+}$  iyonunun, 0,1 mM konsantrasyonda aktiviteyi yarıya düşürdüğü ve 100 mM konsantrasyonda ise durdurduğu (Şekil 40) ve  $Ag^{+}$  iyonunun ise 0,05 mM konsantrasyonda aktiviteyi % 30 kadar azalttığı ve 200 mM'da % 4'lere çektiği gözlemlendi (Şekil 41).  $Al^{+3}$  iyonunun etkisine baktığımızda ise 7 mM konsantrasyonda aktiviteyi % 96'ya kadar arttırdı (Şekil 42).



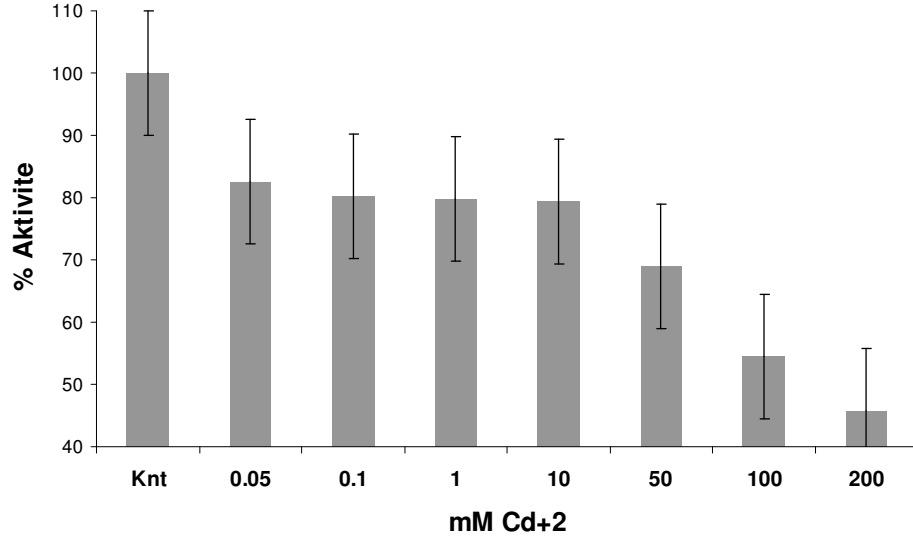
Şekil 35. ATPaz aktivitesine Zn<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



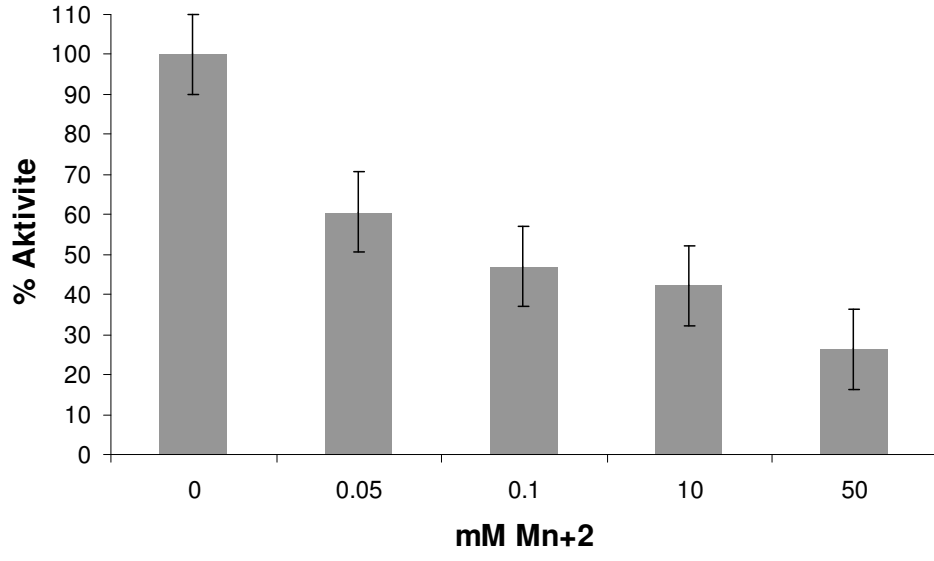
Şekil 36. ATPaz aktivitesine Cu<sup>2+</sup> iyonunun etkisi.



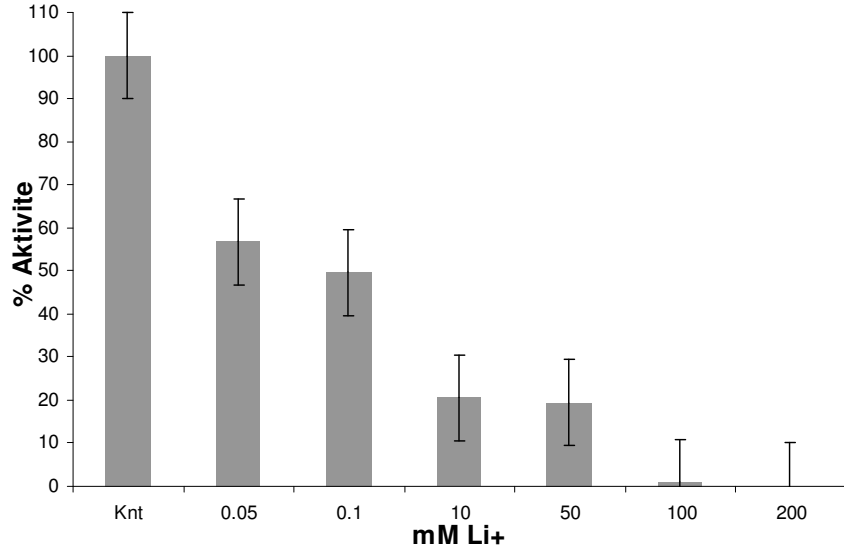
Şekil 37. ATPaz aktivitesine Co<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



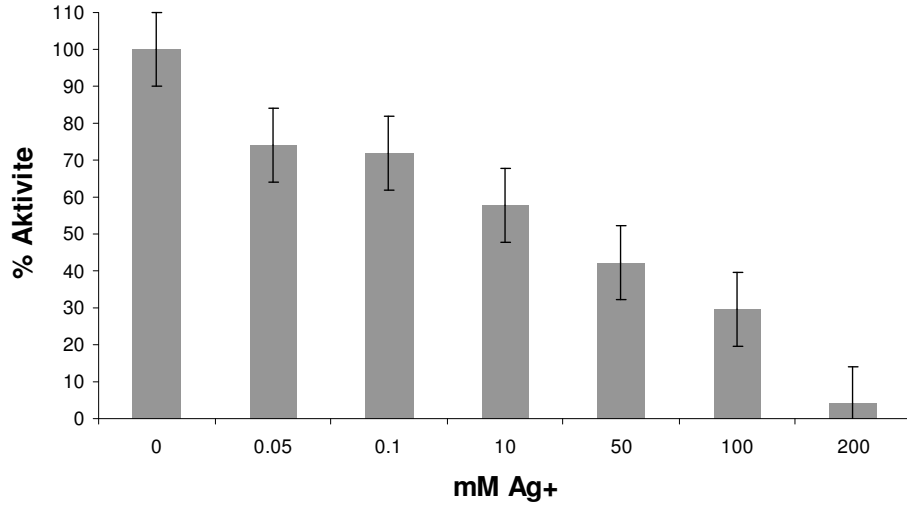
Şekil 38. ATPaz aktivitesine Cd<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



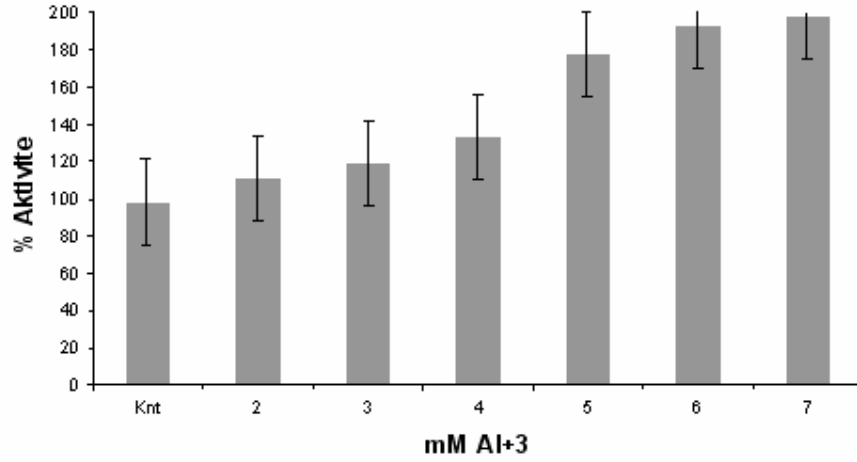
Şekil 39. ATPaz aktivitesine Mn<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



Şekil 40. ATPaz aktivitesine Li<sup>+</sup> iyonunun etkisi



Şekil 41. ATPaz aktivitesine  $Ag^+$  iyonunun etkisi



Şekil 42. ATPaz aktivitesine  $Al^{+3}$  iyonunun etkisi.

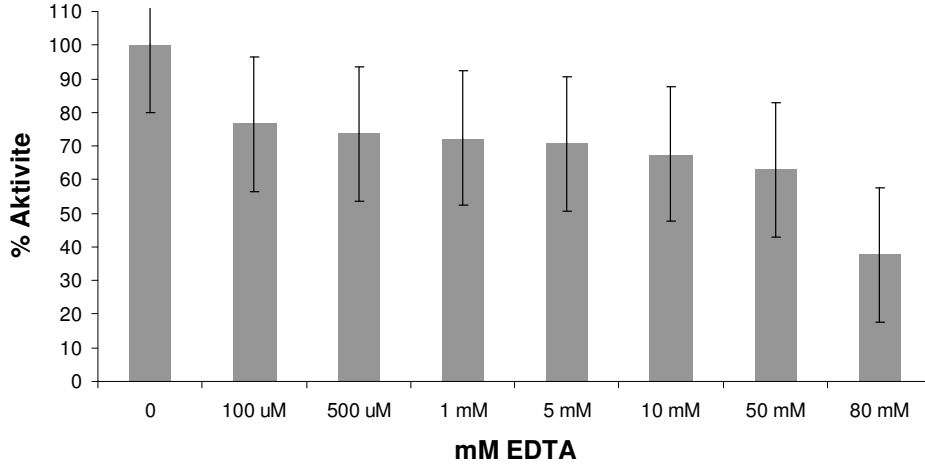
### 3.3.3.2.6. ATPaz Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

#### i. EDTA

ATPaz aktivitesine EDTA'nın etkisini anlamak için kontrol grubu yanında, 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 ve 80 mM EDTA kullanıldı. Deneyler sonunda, 0,1 mM EDTA'nın



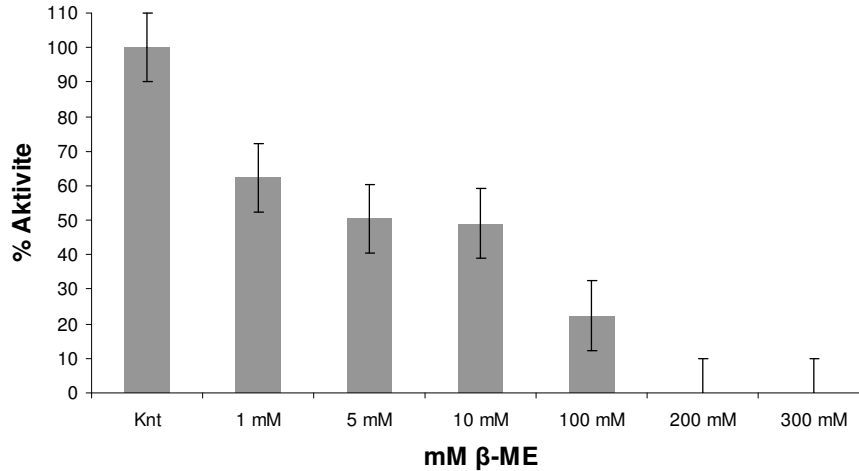
aktiviteyi % 24 azalttığı ve kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 80 mM EDTA'nın ise aktiviteyi % 62 oranında azalttığı görüldü (Şekil 43).



Şekil 43. ATPaz aktivitesine EDTA'nın inhibitör etkisi

ii.  **$\beta$ -merkaptetanol**

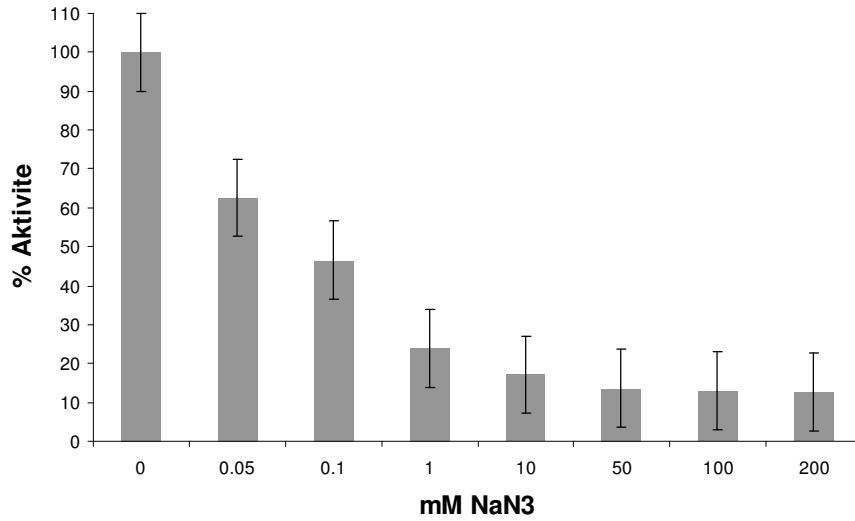
ATPaz aktivitesine  $\beta$ -merkaptetanol'ün etkisini anlamak için kontrol grubu yanında, 1; 5; 10; 100; 200 ve 300 mM konsantrasyonlarda  $\beta$ -merkaptetanol'lü reaksiyonlar düzenlendi. Sonuç olarak  $\beta$ -merkaptetanol'ün, 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi % 38 inhibe ettiği ve 200 mM'dan sonraki konsantrasyonlarda aktiviteyi tamamen durdurduğu görüldü (Şekil 44).



Şekil 44. ATPaz aktivitesine  $\beta$ -merkaptotanol'ün inhibitör etkisi

### 3.3.3.2.6.3. Sodyum Azidür

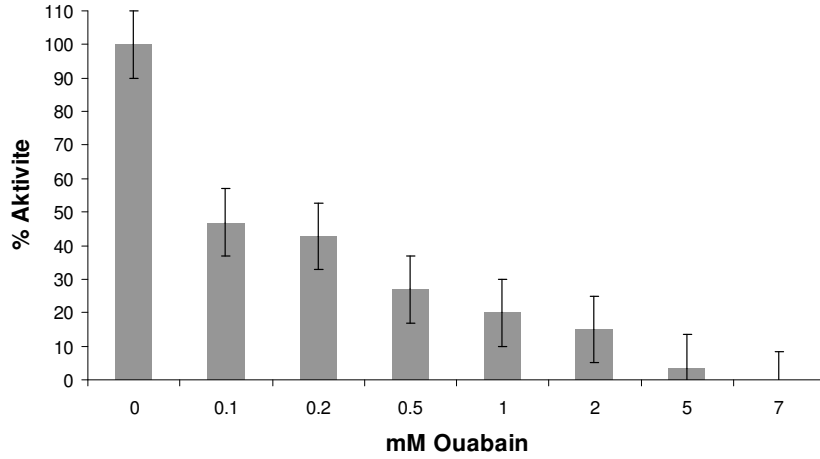
ATPaz aktivitesine sodyum azidürün ( $\text{NaN}_3$ ) etkisini belirlemek için kontrol grubu yanında 0,05; 0,1; 1; 10; 50; 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda sodyum azid kullanıldı. Denemeler sonucunda, 0,05 mM sodyum azidürün aktiviteyi % 37 düşürdüğü, 10 mM'da % 83 ve 50 mM ve sonrasında ise % 86 inhibe ettiği görüldü (Şekil 45).



Şekil 45. ATPaz aktivitesine sodyum azidürün inhibitör etkisi

### 3.3.3.2.6.4. Ouabain

ATPaz aktivitesine ouabainin etkisini belirlemek kontrol grubu yanında reaksiyon karışımlarına 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 ve 7 mM konsantrasyonlarında ouabain eklendi. Deney sonucunda 0,1 mM konsantrasyonda aktiviteyi % 53 düşürdüğü ve konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibitör etkisinin arttığı ve 7 mM konsantrasyonda kullanımının ise ATPaz aktivitesini durdurduğu görüldü (Şekil 46).



Şekil 46. ATPaz aktivitesine ouabainin inhibitör etkisi

### 3.4. Alüminyum Dirençliliğinin *E. coli* Hücrelerinde Yeniden Belirlenmesi

Alüminyum dirençliliğinin *E. coli* hücrelerinde belirlenmesi için disk difüzyon metodu seçildi.

#### 3.4.1. Disk Difüzyon Metodu

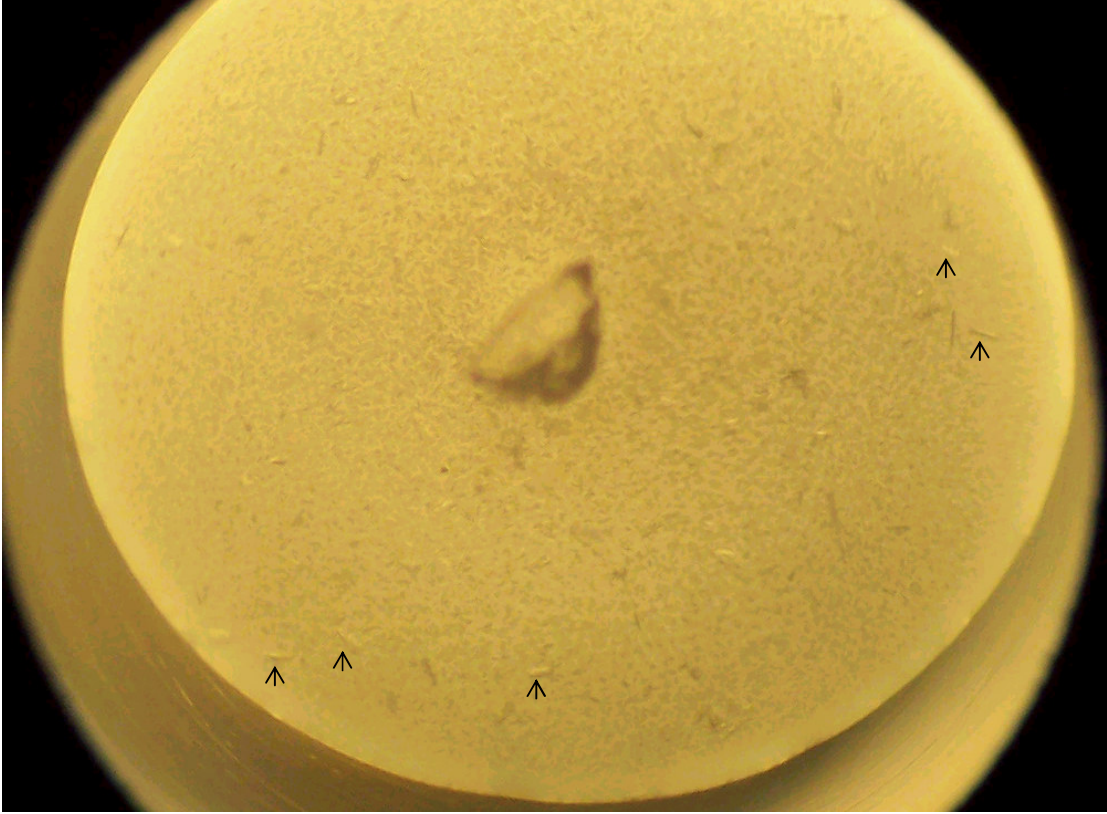
Disk difüzyon metodu, antibiyotik dirençlilik testi metodunun bir adaptasyonu olarak uygulandı. Oluşan zonların çapları, mm olarak ölçülmüş ve uygun kontrol grubuyla karşılaştırıldı. İndüksiyondan sonraki 1. ve 2. saatlerde, ekimden önce kültürün OD<sub>600</sub> değerleri okundu ve buna göre uygun kontrol grubuyla karşılaştırıldı (Tablo 7).

### 3.5. Enzimin Kristallendirme Çalışmaları

İlgili proteinin kristal haline ulaşabilmek için, öncelikle farklı kristallendirme ortamları içeren Molecular Dimension Structure Screen 1 Kit kullanıldı. İnkübasyon sonrasında, yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda kristalleşmenin 0,1 M HEPES pH 7,5, % 10 izopropanol ve % 22 PEG-4000 içeren tamponun kullanımıyla olduğu gözlemlendi. Oluşan kristallerin “iğne” şeklinde olduğu görüldü (Şekil 47).

Tablo 7. Disk difüzyon deneyi sonuçları

OD <sub>600</sub>	Kontrol	Kontrol Ortalama	<i>E. coli</i> C43(DE3)/pET11a+A1 <sup>R</sup>	Direnç Ortalama	İndüksiyon Süresi
1.0	13	13	14	14,3	0.5 saat
	13		15		
	13		14		
1.2	14	14	15	15,3	1 saat
	15		16		
	13		15		
1.6	14	15,3	16	16,3	1.30 saat
	16		17		
	16		16		
1.7	15	15	14	14	2 saat
	15		14		
	15		14		



Şekil 47. Enzimin kristallendirme çalışmaları sonucunda elde edilen iğne şeklinde kristalleri

#### 4. TARTIŞMA

*Anoxybacillus gonensis* bakterisi Balıkesir Gönen Kaplıcası'ndan 2003 yılında Beldüz ve ark. tarafından izole edilerek literatüre kazandırılmış yeni bir termofilik bakteri türüdür. Termofilik bir organizma olması dolayısıyla, büyüme sıcaklık aralığı, 55-60°C'dir (Beldüz ve ark., 2003). Termofilik bakterilerin özellikle büyüme sıcaklık aralığı, diğer ortam bakterileri ile kıyaslandığında yüksek olması nedeniyle endüstriyel açıdan oldukça önem arz etmektedirler. Endüstride, özellikle deterjan sanayi, katı atık üniteleri, içecek endüstrisi gibi gerek termofilik bakterilerin gerekse bu bakterilerden elde edilen enzimlerin kullanımı oldukça sıktır (URL-12, 2006). İlgilenilen bakterinin termofilik karakteri ve yeni keşfedilen bir tür olması özellikle üzerine eğilinmesi gereken bir durumdur. Bu nedenle, yeni bir termofilik bakteri türü olan *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun shotgun klonlama tekniği kullanılarak bakteriye ait genlerin belirlenmesi düşünülmüştür. Bu amaçla bakteri DNA'sı *EcoR*I, *Hind*III ve *Bam*HI restriksiyon endonükleazlarıyla kesilmiş ve aynı enzimlerle kesilerek hazırlanan pUC18 plazmidine klonlanmışlardır. Elde edilen her yeni doğru klon DNA sıra analizine gönderilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sırasında göze çarpan genlerden biri de "muhtemel alüminyum direnç geni"ne ait olan kısımdır. Gen, *EcoR*I kesimleri sonucu elde edilen "pHK281" adlı plazmitte yer almaktadır. Termofilik bakterilerin atık katı madde ve su temizleme ünitelerinde kullanılmaları konuya olan ilgiyi arttırmıştır. Bu amaçla, genin tamamının elde edilmesine ve gen ürününün karakterize edilmesine karar verilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* G2 suşunun alüminyuma dirençlilik geni tam olarak elde edildikten sonra genin ATPaz özelliğinin araştırılabilmesi için indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET11a vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* BL21(DE3) konak hücresinde ekspres edilmiştir. Ekspres edilen enzim saflaştırılıp ATPaz aktivitesi spektroskopik olarak ortaya konulmuştur. Spektrofotometrik aktivite testi ile enzimin bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşaması, *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin alüminyuma dirençliliğinin belirlenmesini içermektedir. Bu amaçla, Jo ve ark. (1997)'na göre bakterinin alüminyuma olan tolerans veya dirençlilik özelliği tespit edilmiştir. Başlangıçta LB besiyeri kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 ppm ve mM)

alüminyum ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) içeren sıvı LB besiyerleri içeren tüpler hazırlandı. Daha önceden hazırlanan *A. gonensis* G2 gece kültürü alüminyum içeren LB besiyerlerine inoküle edildikten sonra  $55^\circ\text{C}$ 'de büyümeye bırakılmıştır. Denemeler esnasında kültür besiyerinde bir gecelik bir büyümeden sonra alüminyum konsantrasyonunun artışına bağlı olarak "beyaz" çökelek görülmüştür. Literatürde kullanımının tavsiye edilmesine rağmen (Jo ve ark., 1997), oluşan çökeltinin sıvı besiyerinde bulunan  $\text{AlCl}_3$ 'ün iyonlaşarak besiyeri ortamında bulunan hidroksil iyonlarıyla,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  şeklinde beyaz çökelti oluşturabileceği düşünüldü. Bu oluşumun ortamda büyüyen bakterinin büyümesini ve büyüme olup olmasının kontrolünü ters yönde etkileyeceği düşünülerek kullanılan besiyeri değiştirildi. Bu nedenle, daha az besin içeriğine sahip GM besiyeri kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Denemeler sonucunda *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin 100 mM alüminyum direncine sahip olduğu görüldü. Bu oran, alüminyuma dirençli diğer mikroorganizmalar ve hatta bitkilerle karşılaştırıldığında yüksek bir orandır.

İlk yapılan DNA sıra analizlerinden sonra ilgilenilen geni taşıyan pHK281 plazmidi ele alınarak genin tamamı elde edilmeye çalışılmıştır. Başlangıçta, MacroGen (Kore) firmasına yaptırılan DNA sıra analizi sonucunda pUC18'e aktarılan parçanın 5' yönünden 833 baz, 3' yönünden itibaren ise 845 bazlık kısmı tespit edildi. 833 bp'lik sıranın son tarafında yaklaşık olarak 600 bp'lik bir kısmın alüminyum direnç genini içerdiği yapılan BLAST karşılaştırmalarında görülmüştür. Fakat genin son kısmı ve stop kodonu yakalanamamıştır. Aktarılan parçanın yaklaşık olarak 2200 bp'lik olduğu hesaba katılırsa, arada tespit edilemeyen ve direnç geninin son kısmını içeren parçanın olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle 833 bp'lik parçanın son kısmında GC içeriği yüksek olacak bir kısımdan 20 bazlık bir primer (HK281 primeri) tasarlanmıştır. Yapılan bu sıra analizi sonucunda elde edilen veriler ile ilk sonuçlar karşılaştırılarak pUC18'e aktarılan DNA parçasına ait sıra tam olarak ortaya konmuştur. Bunun sonucunda elde edilen genin 666 bp büyüklüğünde ve 222 aminoaside sahip olduğu belirlenmiştir. Teorik olarak ağırlığı 24 kDa olarak hesaplanmıştır. İleri aşamalarda yapılan SDS-PAGE analizleri de bu sonucu desteklemiştir. Amino asit sırasının protein-BLAST karşılaştırması yapıldığında, alüminyum dirençliliği, ATPaz benzerliği ve hem alüminyum dirençliliğinden sorumlu hem de ATPaz özelliği gösterebilmesi açısından değerlendirildiğinde elde edilen benzerlik değerleri Tablo 4'de verilmiştir.

Yukarıda bahsedildiği üzere amino asit sırasının protein-BLAST karşılaştırmaları sonucunda ilgili gen ürününün PP-loop superfamily ATPaz'lara benzerliğinden dolayı,

ilgili proteinin ATPaz özelliğinin araştırılması çalışmamızın ikinci aşamasını oluşturmaktadır. PP-loop superfamily üyeleri, “Pyrophosphate-loop ATPases” olarak anılırlar ve tipik olarak ATP’deki  $\alpha$ - $\beta$  bağının hidrolizinden sorumlu reaksiyonları katalizleyen domaine sahip geniş bir süperailedir. PP-loop ATPazlarda tipik olarak N-ucunda “SXGXDS” (X, herhangi bir amino asidi ifade etmektedir) korunmuş bölgesi vardır (Aravind ve ark., 2002). Üzerinde çalıştığımız genin amino asit sırasına baktığımızda, <sup>11</sup>SGGQDS<sup>16</sup> sırasına sahiptir. PP-loop ATPaz özelliği taşıyan benzer proteinler incelendiğinde, ortak sıranın “SGGXDS” olduğunu görmekteyiz (Tablo 6).

ATPaz özelliğinin çalışılabilmesi için gen, pET11a ekspresyon vektörüne primerler vasıtasıyla elde edildikten sonra klonlanmıştır. Klonlama sonrasında iki farklı konak hücresine aktarılmış ve ekspresyonu sağlandıktan sonra karakterize edilmiştir. Proteinin saflaştırılması esnasında kullanılan klonlama ve ekspresyon vektörleri ve konak hücreler, daha önceki benzer çalışmalarda defalarca kullanılmış ve bu tür çalışmalara uygunluğu çalışanlar tarafından da benimsenmiş vektörlerdir. Ayrıca *E. coli* BL21(DE3) konak hücresinde elde edilen ekspresyonda, daha fazla hücrel protein olması ve zaman zaman iyi sonuç vermemesi nedeniyle *E. coli* C43(DE3) konak hücresi çalışmalarda tercih edilmiştir. Yapılan ön karakterizasyon testlerinde proteinin sitosolik karakterde olduğu belirlenmiştir. Sitosolik karakterde olan ATPazlarla ilgili olarak literatürlere bakıldığında, bu özelliğe sahip *Methanococcus janashii* arkebakterisine ait bir P-tipi ATPaz karşımıza çıkmaktadır (Ogawa, 2000). En uygun ekspresyon sıcaklığı 37°C’de 1 mM IPTG varlığında geceboyu olarak tespit edilmiştir. Proteinin saflaştırılması esnasında konak hücreye ait proteinlerin uzaklaştırılmasında gerekli denatürasyon sıcaklığı 65°C ve denatürasyon süresinin 30 dakika olduğu belirlenmiştir. Proteinin belirtilen sıcaklıkta gece boyunca muamelesinde saflığının değişmediği bulunmuştur. Bu durum, proteinin termofilik karakterde olan bir bakteriden izolasyonunun verdiği avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Böylece rekombinant protein bir mezofilik bakteri kullanılarak ekspresyon edildiğinde, bu sıcaklık ve süre kullanılarak konak bakteriden kaynaklanabilecek protein kontaminasyonu bertaraf edilmiştir.

Proteinin biyokimyasal karakterizasyonuna geçmeden önce sıcaklık muamelesi ve diyaliz işlemlerinden sonra ortamda kalabilecek olası kontaminantların uzaklaştırılması için iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Proteinin teorik izoelektrik noktasının 6,94 olması nedeniyle iki farklı özellikte matriks (anyon ve katyon değiştirici) ve 3 farklı pH değeri (6,0-7,5-8,0) seçilmiştir. Denemeler sonucunda en uygun matriks ve uygulama

pH'sına karar verilmiştir. Yapılan protein jeli analizleri sonucunda proteinin saf olarak elde edildiği görülmüştür.

Proteinin ATPaz aktivitesinin belirlenmesinde başlangıçta “coupled enzyme assay” (ikili enzim yöntemi) kullanılmıştır (Ogawa, 2000). Yöntemin ilk denemelerinde reaksiyon 37°C’de yapılmıştır. Bu sıcaklık değerinde enzimin aktivitesi, 0,1423  $\mu\text{M}/\text{mM}$  protein/dakika olarak belirlenmiştir. Enzimin termofilik karakterinden dolayı, optimum sıcaklık çalışmalarında 37 ile 100°C arasındaki farklı noktaların denenmesi gerekmektedir. Fakat kullanılan yöntem bir sonraki denenen sıcaklık olan 45°C’de sonuç vermemektedir. Bu yöneme has olan bir enzim etkileşimi olarak açıklanabilmektedir. Etkileşim,  $\text{NAD}^+$  tarafından pirüvat kinazın inhibe edilmesi ile açıklanabilir (Newsholme ve Sugden, 1970). Bu nedenden ötürü yüksek sıcaklıklarda çalışabilmek için bu yöntemden vazgeçilmiş ve standart ATPaz yöntemlerine başvurulmuştur. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonunda bundan sonra Goldengerg ve Fernandez (1966) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Yöntemin esası, enzim tarafından ATP’nin parçalanmasından dolayı oluşan inorganik fosfatın amonyum molibdat ile bağlanarak verdiği renk değişiminin spektroskopik olarak  $\text{OD}_{660}$ ’da ölçülmesidir. Yöntem, tüm sıcaklıklarda uygulanabilme esnekliğine sahiptir. Çünkü ilk aşamada enzim ile ATP, uygun şartlarda parçalanmaktadır. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra oluşan inorganik fosfatın molibdat çöktürmesi ise bu noktadan sonra başlamaktadır. Yöntemin istenen hacimlerde uygulanabilmesi de bir avantajdır (Goldengerg ve Fernandez, 1966). Yapılan kinetik analiz çalışmalarında, enzimin  $K_m$  değeri 10  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer, literatür ile karşılaştırıldığında normal sınırlar içerisindedir (Ogawa, 2000).

Yapılan çalışmalarda aktivite-sıcaklık ilişkisini gösteren grafik incelendiğinde (Şekil X), 37-55°C arasında plato oluşturduğu ve buradaki aktivitenin % 40 oranında olduğu, bununla beraber sıcaklığın artmasıyla aktivitenin arttığı görülmektedir. Enzimin optimum sıcaklığı, 73°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık noktasından sonra aktivite hızla düşmekte ve 85°C’den sonra enzim inhibe olmakta, dolayısıyla aktivite sıfırlanmaktadır. ATPaz aktivitesine sahip proteinler ile yapılan çalışmalara bakıldığında en yüksek sıcaklık değerlerini, *Archaeoglobus fulgidus* CopA (P tipi ATPaz) proteininde 75°C, *Methanococcus jannaschii*’de 50°C (Ogawa ve ark., 2000), *Thermus thermophilus* HB8 UvrB proteininde 65°C (Kato ve ark., 1996), *E. coli* GroEL proteininde 49°C (Melkani ve ark., 2003), *E. coli* VCP proteininde (AAA tip ATPaz) 55°C (Song ve ark., 2003),



*Saccharomyces cerevisiae* HSP104 proteinin de 45°C (Schirmer ve ark., 1998) olarak karşımıza çıkmaktadır. Burada bahsi geçen ATPaz özelliğindeki proteinlerin dışında kalan ATPaz'larda genel olarak 25-37°C aralığında aktivite göstermektedirler. Bu verilere dayanarak, *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin alüminyum dirençliliğinden sorumlu olacağı muhtemel ATPaz'ı termofilik karakterde bir enzimdir. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığı olan 55°C'de enzimin aktivitesi % 40 olarak görülmektedir. Büyüme sıcaklığına rağmen enzimin optimum çalışma sıcaklığının yüksek olması, aynı bakteri kökenli olarak yapılan diğer çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Örneğin, fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz (FBA) enziminin optimum sıcaklığı 60°C (Sağlam-Ertunga, 2006), glukoz izomeraz (GI) enziminin ise 85°C (Karaoğlu, 2004) olarak bulunmuştur.

Enzimin optimum pH'sı 6 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak ATPaz'ların çalışma pH'sı 7,0-8,0 arasında yer almaktadır (Ogawa ve ark., 2000, Kato ve ark., 1996, Melkani ve ark., 2003, Song ve ark., 2003, Schirmer ve ark., 1998). Bunun yanısıra BRENDA verilerine göre, pH aralığı 6,0-9,5 gibi geniş bir aralıkta değişebilmektedir (URL-16, 2006).

Rekombinant enzimin kinetik değerlerinin ve optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda ATP kullanıldı. Protein miktarı sabit tutularak yapılan çalışmada elde edilen Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrilerinden optimum substrat konsantrasyonu 20 µM ATP olarak bulundu.  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri sırası ile 7,2 ünite ve 10 µM olarak belirlendi. 50 µM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda hızın değişmediği saptandı (Şekil 29 ve 30). Literatür verileri ile karşılaştırıldığında elde edilen verilerin normal sınırlar içerisinde olduğunu görmekteyiz (Ogawa, 2000).

Birçok enzim aktivite için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Yapılan literatür taramalarında, ATPaz'ların kofaktör olarak  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$  ve  $K^+$  iyonlarının birinin veya ikisinin enzim aktivitesi için kullanıldığı karşımıza çıkmaktadır (Schirmer vd., 1998, Herdendorf vd., 2002, Geisler vd., 1998, Melkani vd., 2003). Bu nedenle, ATPaz aktivitesinin üzerine metallerin etkisini incelemek için başlangıçta kofaktör olarak etki edebilecek olan bu üç metal iyonlarının etkisine bakılmıştır. Çünkü yaptığımız deneyler sonucunda elde ettiğimiz değerler literatür ile uyum sağlamaktadır.

Aynı zamanda enzim aktivitesinin,  $Mg^{+2}$  ve  $Na^+$  iyonlarının birlikte kullanıldığı reaksiyonda daha da arttığını görebiliriz. Buradan enzimin bu iki iyona aynı anda ihtiyaç duyduğunu söyleyebiliriz. Diğer metallerin etkisini incelerken,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Li^+$ ,

$Mn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Al^{+3}$  kullanılmıştır. Bu iyonlar içerisinde  $Al^{+3}$  iyonunun en güçlü aktivatör olduğu gözlemlendi. Söz konusu iyonun 7 mM'lık konsantrasyonu aktiviteyi % 96 artırmaktadır. Bunun yanı sıra  $Zn^{+2}$  iyonu da aktiviteyi arttırmakta fakat artış düşük seviyelerde olmaktadır. Bu nedenle enzimin alüminyumca uyarılabilen bir enzim olduğunu söyleyebiliriz. Literatür verileri genellikle alüminyumun ATPaz'lar üzerine inhibe edici etkisinin bulunduğu yönündedir (Ahn ve ark., 2001, Silva ve Gonçaves, 2003). Denenen diğer iyonlardan  $Mn^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  ve  $Cd^{+2}$  aktiviteyi azaltıcı yönde etki ederken,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Li^{+}$  iyonlarının yüksek konsantrasyonları aktiviteyi tamamen inhibe etmektedir.

Yukarıda bahsettiğimiz metallere  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Li^{+}$  iyonlarının inhibitör etkisi yanında EDTA,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum azidür ve ouabain gibi bilinen enzim ve ATPaz inhibitörlerinin de aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Bilindiği gibi EDTA, birçok monovalent, divalent, trivalent ve tetravalent metallerin şelatlayıcı ajanıdır (URL-17, 2006). İnhibitör etkinin gösterilmesinde, enzim aktivitesini yarı yarıya azaltan değer olan  $IC_{50}$  değeri kullanılmıştır. Yaptığımız deneylerde, EDTA'nın  $IC_{50}$  değeri, 68 mM olarak tespit edilmiştir.  $\beta$ -merkaptotanol'ün proteinler üzerindeki denatürasyon etkisi nedeniyle ATPaz aktivitesine etkisi çalışılmıştır (URL-18, 2006). Yapılan deneyler sonucunda, ATPaz aktivitesi üzerine  $\beta$ -merkaptotanol'ün etkisinin EDTA'ya göre daha fazla olduğu görülmüştür.  $IC_{50}$  değeri, 5 mM olarak bulunmuş ve 200 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarında aktiviteyi tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Sodyum azidür bilinen ATPaz inhibitörüdür (Hoffmann ve Dimroth, 1991; Muneyuki vd., 1993; URL-19, 2006). Yaptığımız çalışmalarda, sodyum azidin  $IC_{50}$  değeri 80  $\mu$ M olarak tespit edilmiştir. 50 mM ve üzeri konsantrasyonlarda ise aktiviteyi % 14'lere kadar inhibe etmektedir. Ouabain ise bilinen bir Na/K ATPaz inhibitörüdür (Gao ve ark., 2002, Schneider ve ark., 1998). Çalışmamızda ouabainin  $IC_{50}$  değeri ise 94  $\mu$ M olarak tespit edilmiş ve 5 mM'ın üstündeki konsantrasyonlarda ise enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir.

Alüminyum dirençliliğini farklı şekilde tekrar görebilmek amacıyla uygulanan disk difüzyon testlerinde, 1 mM son konsantrasyonda IPTG ile indüklenen *E. coli* C43(DE3)/pET11a+ $Al^R$  hücresi kullanılmıştır. Sonuçların (kontrol grubu ile alüminyuma dirençlilik plazmidini taşıyan hücre) arasında sadece 1 mm fark olması düşündürücüdür. Sonuçların yorumlanabilmesi için daha önce buna benzer bir çalışmanın olmaması da referans ve karşılaştırma açısından bir eksiklik. Farkın bu derecede olması, konak hücrenin (*E. coli* C43(DE3)) toksik etkide bulunması muhtemel genlerin ekspresyonu için geliştirilmesine bağlanabilir.

Enzimin kristallendirme çalışmaları, 3 boyutlu yapının aydınlatılmasında gereklidir. Proteinin sitosolik karakterde olması, muhtemelen alüminyum dirençliliğinden sorumlu olması gibi faktörler enzimin yapısına olan ilgiyi daha da arttırmaktadır. Çalışmamızda enzimin 3 boyutlu yapısının elde edilebilmesi için gerekli olacak olan kristal halinin oluşturulmasında kullanılacak şartlar belirlenmiştir.

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, *A. gonensis* G2 suşundan klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) konak hücresinde ekspres edilen Al<sup>R</sup> gen ürününün korunmuş bölgesi itibariyle PP-loop süperairesine dâhil olduğu görülmektedir. ATPaz özelliği göstermesi nedeniyle alüminyum dirençlilik geninin AAA tipi ATPaz olabileceği de muhtemeldir. Termofilik karakter taşıyan bir gen ürününün hem dirençlilikten sorumlu olması hem de ATPaz özelliği göstermesi nedeniyle, çalışma sonucunda elde edilen verilerin metal dirençliliği ile ilgili araştırmalar açısından da cazip kılmaktadır.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *A. gonensis* G2 termofilik bakterisine ait alüminyum dirençlilik genine ait özellikler çalışılmıştır. Öncelikle ilgili gen klonlandı ve DNA ve aa sırası tespit edildi. Gene ait NCBI-BLAST karşılaştırılmaları yapılarak gen hakkında detaylı bilgilere ulaşıldı. Karşılaştırmalar sonucunda ATPaz'lara olan benzerliği nedeniyle, ilgili gen önce bir ekspresyon vektörüne klonlandı ve bu sayede bol miktarda üretilerek saflaştırıldı. Saf enzim üzerinde ATPaz aktivitesi belirlendikten sonra bu aktiviteye ait biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Aşağıda bu çalışmaya ait sonuçlar maddeler halinde verilmiştir.

1. Denemeler sonucunda *A. gonensis* G2 bakterisinin 100 mM  $Al^{+3}$ 'e dirençliliği tespit edildi.
2. *A. gonensis* G2 bakterisinin sahip olduğu alüminyum dirençlilik geni, 666 bp büyüklüğünde olup 222 aa içermektedir.  $Al^R$  geninin NCBI-BLAST karşılaştırmaları da gerek alüminyum dirençliliği açısından gerekse ATPaz benzerliğini açısından doğrulamaktadır (Tablo 4 ve 6).
3. İlgili gen ürününün üretimi için en uygun şartlar, 1 mM IPTG varlığında 37°C'de gece boyu inkübasyon olduğu belirlendi.
4. Enzim soluble karakterde olup, 65°C'de gece boyu dayanıklı kalabilmektedir.
5. Enzimin çalıştığı optimum pH 6,0 ve sıcaklık değeri ise 73°C'dir.
6. Enzimin  $K_m$  değeri 10  $\mu$ M,  $V_{max}$  değeri ise 7,2 ünite olarak tespit edildi.
7. Enzimin aktivitesi  $Zn^{+2}$  ve  $Al^{+3}$  tarafından artmakta fakat  $Ag^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^+$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  tarafından azaltılmaktadır. Özellikle 100 mM  $Li^+$ , 100 mM  $Co^{+2}$  ve 200 mM  $Cu^{+2}$  konsantrasyonlarında tamamen inhibe olmaktadır.
8. Enzim aktivitesini EDTA'nın 80 mM konsantrasyonda % 62, sodyum azidin 50 mM konsantrasyonda % 86 azalttığı,  $\beta$ -merkaptolanolün 200 mM ve ouabainin 7 mM konsantrasyonlarda ise tamamen inhibe ettiği belirlendi.
9. Enzimin kristallendirilebilmesi için en uygun şartların, % 10 izopropanol ve % 22 PEG-4000 içeren 1 M HEPES (pH 7,5) tamponun olduğu tespit edildi. Enzim kristallerinin ise "iğne" şeklinde olduğu gözlemlendi.

## 6. ÖNERİLER

Biyolojik sistemlerin özelliklerinin araştırılması, biyoteknoloji pazarında kullanım alanlarını da arttırmaktadır. Endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, tercih edilen biyolojik model organizmaların sayısı ve özellikleri de değişmektedir. Endüstriyel atıkların temizlenmesinde, bugün canlı veya ölü organizmaların kullanılması tercih edilmektedir. Örneğin, metallerle kirletilmiş olan suların temizlenmesinde, sudaki metalleri tutabilen bitkilerin kullanımı dışında aynı özelliğe sahip bakterilerin kullanılması da önem kazanmaktadır. Ayrıca sadece metal tutma özelliklerinin değil aynı zamanda bakterilerin metallere karşı tolerans geliştirmesinde hücresel sistemlerini nasıl kullandıklarının da bilinmesi hem mekanizmanın aydınlatılmasını hem de bakterilerin kullanım alanlarının farklılaşmasını sağlayacaktır. Bu bilgiler sadece söz konusu olan bakterinin değil, dahil olduğu sistematik gruba ait diğer bakterilerin veya aynı metale karşı direnç kazanmış diğer mikro veya makroorganizmaların hücresel sistemlerini moleküler seviyede anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada termofilik bir bakteri türü olan *Anoxybacillus gonensis* G2 bakterisinin alüminyuma karşı direnç seviyesinin belirlenmesini ve dirençlilik özelliği kazandıran hücresel mekanizmasından sorumlu genin ve özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde alüminyuma karşı bir direnç sınırı ortaya konmuş, dirençlilikten sorumlu olan bir gen tespit edilmiş ve gen ürününün biyokimyasal analizleri tamamlanmıştır. Hücresel mekanizmanın aydınlatılması için ise dirençlilikten sorumlu olduğu düşünülen enzimin üç boyutlu yapısının aydınlatılması ve metal-enzim ilişkisinin ortaya konulması konunun aydınlatılmasında daha da yararlı olacaktır. Aynı amaç doğrultusunda, gerek bakterinin metal tutma kapasitesinden gerekse enzimin metal ilişkisinin ortaya konulmasından sonra bu özelliğinden faydalanılarak bakterinin veya enzimin bir kolon içerisindeki reçineye tutturulması yani immobilizasyonu metal arıtma işlemlerinde faydalı olabilecektir.

Konuya paralel olarak, bakterinin biyoteknolojik olarak özellikle de biyoremedasyon işlemlerinde kullanım alanının genişletilebilmesi için, farklı ağır metallere karşı verdiği cevapların belirlenmesinin de faydalı olacağı düşüncesindeyim.

## 7. KAYNAKLAR

- Ahn, S. J., Sivaguru, M., Osawa, H., Chung, G. C. ve Matsumoto, H., Aluminum inhibits the H-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots, Plant Physiology 126 (2001) 1381–1390.
- Anoop, V. M., Basu, U., McCammon, M. T., McAlister-Henn, L. ve Taylor, G. J., Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. Plant Physiology 132 (2003) 2205–2217.
- Axelsen, K. B. ve Palmgren, M. G., Evolution of substrate specificities in the P-Type ATPase superfamily, J. Mol. Evol. 46 (1998) 84–101.
- Belduz, A. O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., *Anoxybacillus gonensis* sp. Nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 53 (2003) 1315-1320.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M. ve Verbruggen, N., A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, FEBS Letters, 569 (2004) 140–148.
- Birnboim, H. C. ve Doly, J. A., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucl. Acid. Res. 7 (1979)1513-23.
- Brocklehurst, K. R. ve Morby, A. P., Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology, Microbiology, 146 (2000) 2277-2282.
- Capelli, S. M., CopB from *Archaeoglobus fulgidus*: a thermophilic Cu<sup>2+</sup> transporting CPx-ATPase. Doktora Tezi, Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA, USA, 2002.
- Delhaize, E. ve Ryan, P., Aluminum toxicity and tolerance in plants, Plant Physiology, 107 (1995) 315-321.
- Duchiron, F., Legin, E., Ladrat, C., Gantelet, H. ve Barbier, G., New thermostable enzymes for crop fractionation, Industrial Crop and Products, 6 (1997) 265-270.
- Echart, C. L., Barbosa-Neto, J. F., Garvin, D. F. ve Cavalli-Molina, S., Aluminum tolerance in barley: methods for screening and genetic analysis, Euphytica 126 (2002) 309–313.
- Fischer, J., Quentmeier, A., Gansel, S., Sabados, V. ve Friedrich, C. G., Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other Acidophilic bacteria, Arch. Microbiol., 178 (2002) 554–558.

- Gabelich, C. J., Ishida, K. P., Gerringer, F. W., Evangelista, R. ve Kalyan, M., Control of Residual Aluminum from Conventional Treatment To Improve Reverse Osmosis Performance. 9th World Filtration Congress, April, 2004, New Orleans, LA, USA, 1-16.
- Gandolfi, L., Sitella, M. P., Zambenedetti, P. ve Zatta, P., Aluminium alters intracellular calcium homeostasis in vitro, Life Sciences, 66, 23 (1998) 2261–2266.
- Gao, J., Wymore, R. S., Wang, Y., Gaudette, G. R., Krukenkamp, I. B., Cohen, I. S. ve Mathias, R. T., Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides, J. Gen. Physiol., 119 (2002) 297-312.
- Geisler, M., Koenen, W., Richter, J. ve Schumann, J., Expression and characterization of a *Synechocystis* PCC 6803 P-type ATPase in *E. coli* plasma membranes, Biochimica et Biophysica Acta, 1368 (1998) 267–275.
- Hamilton, Christie Anne, Possible role for the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase in aluminum resistance, Doktora Tezi, University of Alberta, Kanada, 2002.
- Harrison, P. M. ve Hoare, R. J., Metals in Biochemistry, First Edition, The Chapman and Hall Ltd., NY., USA, 1980.
- Herdendorf, T. J., McCaslin, D. R. ve Forest, K. T., *Aquifex aeolicus* PilT, Homologue of a Surface Motility Protein, Is a Thermostable Oligomeric NTPase, Journal of Bacteriology, 184, 23 (2002) 6465–6471.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S. ve Hickman, F. M., Biology of Animals, 4<sup>rd</sup> Edition, The C. V. Mosby Co., USA, 1982.
- Hoffmann, A. ve Dimroth, P., The ATPase of *Bacillus alcalophilus*: Reconstitution of energy- transducing functions, European Journal of Biochemistry, 196 (1991) 493-497.
- Hussein, H., Farag, S., Kandil, K. ve Moawad, H., Tolerance and uptake of heavy metals by *Pseudomonads*, Process Biochemistry, 40 (2005) 955-961.
- İnan, Kadriye, Türkiye'nin Çeşitli Kaplıcalarından *Anoxybacillus* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2005.
- Jensen, P. E., Gibson, L. C. D. ve Hunter, C. N., ATPase activity associated with the magnesium-protoporphyrin IX chelatase enzyme of *Synechocystis* PCC6803: evidence for ATP hydrolysis during Mg<sup>2+</sup> insertion, and the MgATP-dependent interaction of the ChII and ChID subunits, Biochem. J., 339 (1999) 127–134.
- Jo, J., Jang, Y., Kim, K., Kim, M., Kim, I. ve Chung, W., Isolation of ALU1-P gene encoding a protein with aluminum tolerance activity from *Arthrobacter viscosus*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 239 (1997) 835-839.

- Jones, D. L. ve Kochian, L. V., Aluminium interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal bindings sites and its potential role in aluminium cytotoxicity, FEBS Letters, 400 (1997) 51–57.
- Kacar, Burhan, Çayın Gübrelenmesi, 1. Baskı, Çay-Kur Yayınları No: 4, Ankara, 1984.
- Karaoğlu, Hakan, *Anoxybacillus gonensis* glukoz (D-ksiloz) İzomeraz Geninin Klonlanması, İzolasyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2004.
- Karlson, P., Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya, Çev: Azmi Telefoncu, 11. Baskı, Arkadaş Tıp Kitapları, Semet Matbaası, Kırklareli, 1992.
- Kawai, F., Zhang, D. ve Sugimoto, M., Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 189 (2000) 143-147.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. Biyokimya, 1. Baskı, Şafak Yayınevi, Erzurum, 1997
- Kim, B. Y., Baier, A. C., Somers, D. J. ve Gustafson, J. P., Aluminum tolerance in triticale, wheat, and rye, Euphytica, 120 (2001) 329–337.
- Kızıroğlu, İlhami. Genel Biyoloji, 2. Baskı, Desen Ofset AŞ Yayınları, Ankara, 1994.
- Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E. ve Granqvist, C. G., Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science, Trends in Biotechnology, 19, 1 (2001) 15-20.
- Koolman, J. ve Röhm, K. H., Renkli Biyokimya Atlası, Çevirenler: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal ve Dr. Özgül Alper, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları, İstanbul, 2003.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Melkani, G. C., Zardeneta, Z. ve Mendoza, J. A., The ATPase activity of GroEL is supported at high temperatures by divalent cations that stabilize its structure, BioMetals, 16 (2003) 479–484.
- Mossor-Pietraszewska, T., Effect of aluminium on plant growth and metabolism, Acta Biochimica Polonica, 48, 3 (2001) 673-686.
- Mukherjee, K., Response of near isogenic wheat lines for an aluminum tolerance gene to variable levels of aluminum stress in a soil system, Yüksek Lisans Tezi, University of Alberta, 1997.
- Muneyuki, E., Makino, M., Kamata, H., Kagawa, Y., Yoshida, M. ve Hirata, H., Inhibitory effect of NaN<sub>3</sub> on the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase of submitochondrial particles as related to nucleotide binding, Biochim Biophys Acta, 1144, 1 (1993) 62-68.



- Nawrot, M, Szarejko, I. ve Maluszynski, M., Barley mutants with increased tolerance to aluminium toxicity, Euphytica, 120 (2001) 345–356.
- Newsholme, E. A. ve Sugden, P. H., The apparent inhibition of phosphofruuctokinase by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide: a problem of coupled-enzyme assays, Biochem J., October; 119, 4 (1970) 787–789.
- Nies, D. H., Microbial heavy-metal resistance, Appl. Microbiol. Biotechnol., 51 (1999) 730–750.
- Ogawa, H., Haga, T. ve Toyoshima, C., Soluble P-type ATPase from an archaeon, *Methanococcus jannaschii*, FEBS Letters, 471, 1 (2000) 99-102.
- Pilon-Smits, E. ve Pilon, M., Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants, Critical Reviews in Plant Sciences, 21, 5 (2002.) 439–456.
- Rensing, C., Ghosh, M. ve Rossen, B. P., Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases, J. of Bacteriology, 181, 19 (1999) 5891-5897.
- Ridder, I. S. ve Dijkstra, B. W., Identification of the Mg<sup>2+</sup>-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein. CheY, Biochem. J., 339 (1999) 223–226.
- Rosen, Barry P., Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes, Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 133 (2002) 689–693.
- Sağlam Ertunga, Nagihan, Termofilik Bir Bakteride Aldolaz Kodlayan Genin Klonlanması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 2006.
- Schildknecht, P. H. P. A. ve Vidal, B. C., A role for the cell wall in Al<sup>3+</sup> resistance and toxicity: crystallinity and availability of negative charges, Int. Arch. Biosci., (2002) 1087-1095
- Schirmer, E. C., Queitsch, C., Kowali, A. S., Parselli, D. A. ve Lindquist, S., The ATPase Activity of Hsp104, Effects of Environmental Conditions and Mutations, The Journal of Biological Chemistry, 273, 25, Issue 19 (1998) 15546–15552.
- Schneider, R., Victor, W., Manfred, N., Wolf, D. L., Ulrike, K., Roberto, A. ve Wilhelm, S., Bovine Adrenals Contain, in Addition to Ouabain, a Second Inhibitor of the Sodium Pump, The Journal of Biological Chemistry, 273, 2 (1998) 784-792.
- Schott, E. J. ve Gardner, R. C., Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Gen. Genet., 254 (1997) 63-72.

- Silva, I. R., Smytha, T. J., Israel, D. W. ve Rufty, T. W., Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium, Plant and Soil, 230 (2001a) 223–230.
- Silva, I. R., Smytha, T. J., Rapera, C. D., Carterb, T. E. ve Ruftyb, T. W., Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids, Physiologia Plantarum, 112 (2001b) 200–210.
- Solioz, M. ve Vulpe, C., CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals, TIBS, 21 (1996) 237-241.
- Solioz, M., Odermatt, A. ve Krapf, R., Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man, FEBS Letters, 346 (1994) 44–47.
- Srinivasan, P. T., Viraraghavan, T. ve Subramanian, K. S., Aluminium in drinking water: An overview, Water SA, 25, 1 (1999) 47-56.
- Stoyanov, J. V., Magnani, D. ve Solioz, M., Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a *lux* biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*, FEBS Letters, 546 (2003) 391–394.
- Suwalsky, M., Norris, B., Villen, F., Cuevas, F., Sotomayor, P. ve Zatta, P., Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes, Food and Chemical Toxicology, 42 (2004) 925–933.
- Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M. ve Upatham, E. S., Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass, Bioresource Technology, 85 (2002) 103-105.
- Tong, L., Nakashima, S., Shibasaka, M., Katsuhara, M. ve Kasamo, K., A novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscilla brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance, Journal of Bacteriology, 184, 18 (2002) 5027–5035.
- Tong, L., Nakashima, S., Hirose, K., Uemura, Y., Shibasaka, M., Katsuhara, M. ve Kasamo, K., A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*, FEBS Letters, 542 (2003) 159–163.
- URL-1: [www.hc-sc.gc.ca/hecs-esc/water/factsheets/aluminum\\_human\\_health.htm](http://www.hc-sc.gc.ca/hecs-esc/water/factsheets/aluminum_human_health.htm), Alüminyumun İnsana Etkisi, 2 Haziran 2004.
- URL-2: [www.alz.org](http://www.alz.org), Alzheimer’s Association, 2 Haziran 2004.
- URL-3: [en.wikipedia.org/wiki/ATPase](http://en.wikipedia.org/wiki/ATPase), ATPase, 12 Eylül 2006.
- URL-4: [www.ecto.au.dk/nomen.htm](http://www.ecto.au.dk/nomen.htm), Ecto-ATPases, 9 Mayıs 2006.
- URL-5: [www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/atp.htm](http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/atp.htm), ATP, 14 Mayıs 2006.

- URL-6: [patbase.kul.dk/Motifs.htm](http://patbase.kul.dk/Motifs.htm), P-tipi ATPaz Motifleri, 2006
- URL-7: [en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding\\_cassette\\_transporter\\_genes](http://en.wikipedia.org/wiki/ATP-binding_cassette_transporter_genes), ATP-binding cassette transporter genes, 9 Mayıs 2006.
- URL-8: [en.wikipedia.org/wiki/ATPbinding\\_cassette\\_transporter\\_genes#Subfamilies](http://en.wikipedia.org/wiki/ATPbinding_cassette_transporter_genes#Subfamilies), Subfamilies, 9 Mayıs 2006.
- URL-9: [aaa-proteins.uni-graz.at/AAA.htm](http://aaa-proteins.uni-graz.at/AAA.htm), AAA, 9 Mayıs 2006.
- URL-10: [ecto.au.dk/intro.htm](http://ecto.au.dk/intro.htm), Introduction, 9 Mayıs 2006.
- URL-11: [weblife.org/humanure/chapter3\\_8.html](http://weblife.org/humanure/chapter3_8.html), Thermophilic Microorganisms, 2006.
- URL-12: [www.tkk.fi/Units/BioprocessEngineering/Kem-70.415/INDUSTRIAL\\_USE\\_OF\\_ENZYMES.DOC](http://www.tkk.fi/Units/BioprocessEngineering/Kem-70.415/INDUSTRIAL_USE_OF_ENZYMES.DOC), Industriyal Use of Enzymes, 20 Ekim 2005.
- URL-13: [www.expasy.org](http://www.expasy.org), Expasy Veri Tabanı, 10 Mayıs 2006.
- URL-14: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), NCBI Veri Tabanı, 23 Ocak 2006.
- URL-15: [www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw), CLUSTAL-W (1,82), 10 Mayıs 2006.
- URL-16: [www.brenda.uni-koeln.de/php/result\\_flat.php4?ecno=3.6.1.3](http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php4?ecno=3.6.1.3), Brenda, 12 Mayıs 2006.
- URL-17: [en.wikipedia.org/wiki/Edta](http://en.wikipedia.org/wiki/Edta), EDTA, 12 Mayıs 2006.
- URL-18: [en.wikipedia.org/wiki/2-Mercaptoethanol](http://en.wikipedia.org/wiki/2-Mercaptoethanol),  $\beta$ -merkaptoetanol, 12 Mayıs 2006.
- URL-19: [en.wikipedia.org/wiki/Sodium\\_azide](http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_azide), Sodyum azid, 12 Mayıs 2006.
- Wu, P., Zhao, B., Yan, J., Luo, A., Wu, Y. ve Senadihra, D., Genetic control of seedling tolerance to aluminum toxicity in rice, Euphytica, 97 (1997) 289–293.
- Wynter, C. V. A., Chang, M., De Jersey, J., Patel, B., Inkerman, P. A. ve Hamilton, S., Isolation and characterization of a thermostable dextranase, Enzyme and Microbial Technology, 20 (1997) 242-247.
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Satake, K. ve Mori, S., Mechanism of aluminium tolerance in *Cyanidium caldarium*, Hydrobiologia, 433 (2000) 57–60.

## ÖZGEÇMİŞ

Fatih Şaban BERİŞ, 1977 yılında Sakarya ili Adapazarı ilçesinde doğdu. İlköğretim ve lise tahsilini Adapazarı'nda tamamladı. 1998 yılında KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden "biyolog" ünvanıyla mezun oldu. 1996-97 Eğitim-öğretim yılı yaz döneminde KTÜ Tıp Fak. Farabi Hastanesi CBC-Biyokimya Laboratuvarı'nda ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde stajlar yaptı. 2001 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'nde "Çay Bitkisinin (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Tekniği ile Moleküler Karakterizasyonu" tezi ile yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 01/10/2004-31/03/2005 tarihleri arasında Avrupa Birliği ERASMUS Öğrenci Değişimi Programı'ndan yararlanarak Belçika'nın Ghent University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Laboratory of Protein Engineering and Protein Biochemistry'de bulundu. KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak 31/12/1999 tarihinden beri araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.