

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Aeribacillus pallidus AC6'DA YÜKSEK SEVİYEDE EKSPRES EDİLEN
FLAGELLİN GENİNİN (*hag*) KLONLANMASI, PROMOTOR YAPISI,
FLAGELLAR SPESİFİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN (SİGMA-D)
İZOLASYONU ve SAFLAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Elif SEVİM

EYLÜL 2010
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Aeribacillus pallidus* AC6'DA YÜKSEK SEVİYEDE EKSPRES EDİLEN
FLAGELLİN GENİNİN (*hag*) KLONLANMASI, PROMOTOR YAPISI,
FLAGELLAR SPESİFİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN (SİGMA-D)
İZOLASYONU ve SAFLAŞTIRILMASI**

ELİF SEVİM

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27.08.2010
Tezin Savunma Tarihi : 24.09.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fahri UÇAR
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU**

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Aeribacillus pallidus* AC6’da yüksek seviyede ekspres edilen flagellin geninin (*hag*) klonlanması, promotor yapısı ve *Aeribacillus pallidus* AC6’nın flagellar spesifik transkripsiyon faktörünün (σ D) izolasyonu ve saflaştırılması ” adlı bu çalışma K.T.Ü Bilimsel Arastırma Fonu–2007.111.04.03 nolu proje ve TÜBİTAK Yurt Dışı Arastırma Burs Programı tarafından sağlanan destek ile Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, konunun seçilmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, Yrd. Doç Dr. Cemal SANDALLI’ya, Arş. Gör. Kadriye İNAN’a, yüksek biyolog Hakan KARAOĞLU’na, bu çalışmayı yapabilmem için desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sayın Rize Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU’na ve başta değerli Bölüm Başkanım Prof. Dr. Vagif ATAMOV olmak üzere tüm Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve K.T.Ü. Trabzon Fen Edebiyat Fakültes çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamın büyük bir kısmını gerçekleştirmem için gerekli bütün desteği esirgemeyen Cornell Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümünden Prof. Dr. John D. HELMANN’a ve tüm laboratuvar ekimine çok teşekkür ederim. Ayrıca 2214- Yurt Dışı Arastırma Burs programı kapsamında doktora tez döneminde ABD, Cornell Üniversitesinde bulunmam için beni destekleyen TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta ANNEM ve BABAM olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Yoğun çalışma dönemimin en yoğun ve sıkıntılı zamanlarında maddi ve manevi her konuda yanımda olan eşim Ali SEVİM’e teşekkürlerimi sunuyorum.

Elif SEVİM
Trabzon, 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Termofilik Gram Pozitif Basiller.....	1
1.1.1. <i>Aeribacillus</i>	2
1.1.1.1. <i>Aeribacillus pallidus</i>	2
1.2. Canlılarda Flajella.....	3
1.2.1. Ökaryotik Flajella	3
1.2.2. Arkeal Flajella	4
1.2.3. Bakteriyel Flajella.....	6
1.2.3.1. Flagellin (Filament Proteini)	10
1.3. Hücrede Yüksek Seviyede Ekspres Edilen Genler ve Regülasyonu	13
1.4. Bakterilerde Transkripsiyonel Seviyede Gen Regülasyonu.....	14
1.5. Prokaryotlarda promotör Yapısı ve Tanınması	14
1.6. Bakteriyel RNA Polimeraz Enzimi ve Transkripsiyon.....	15
1.7. Sigma (σ) Faktör.....	18
1.7.1. σ^{70} -Familyası	18
1.7.1.1. Grup-1 Temel σ -faktörleri.....	19
1.7.1.2. Grup-2 Temel Benzeri σ -faktörleri.....	19
1.7.1.3. Grup-3 Alternatif σ -faktörleri.....	20
1.7.2. σ^{54} -Familyası	22
1.8. σ -Faktör- kor RNAP ilişkisi ve Promotor Bölgenin Tanınması	22
1.9. σ^D - Faktörü	25
1.10. Tezin Amacı ve Önemi	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	28

2.1.	Mikroorganizmalar	28
2.1.1.	<i>Aeribacillus pallidus</i> AC6.....	28
2.1.2.	<i>Bacillus subtilis</i> CU1065	28
2.1.3.	<i>Bacillus subtilis</i> HB4035	28
2.1.4.	<i>Bacillus subtilis</i> JH642	28
2.1.5.	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	29
2.1.6.	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Lys	29
2.2.	Plazmitler	29
2.2.1.	pGEM [®] -T Easy Klonlama Vektörü	29
2.2.2.	PDG1663 İntegrasyon Vektörü	30
2.2.3.	pET11a.....	31
2.3.	Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler	31
2.3.1.	Kullanılan Besiyerleri	31
2.3.1.1.	Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar besiyeri.....	31
2.3.1.2.	Schaeffer's Sporülasyon Sıvı besiyeri (SSB).....	31
2.3.1.3.	Modified Competence (MC) Sıvı Besiyeri	32
2.3.1.4.	DSM (Different Sporulation Medium) Agar.....	33
2.3.2.	Kimyasallar	33
2.3.3.	Antibiyotikler	33
2.4.	<i>Aeribacillus pallidus</i> AC6 total protein profili.....	34
2.5.	AC6 <i>hag</i> Geninin Çoğaltılması	35
2.5.1.	AC6 <i>hag</i> Geni için Filogenetik Çalışmalar	37
2.6.	Sigma-D (<i>sigD</i>) Geninin Çoğaltılması.....	39
2.7.	DNA fragmentlerinin pGEM [®] -T Easy Vektörüne Klonlanması.....	41
2.8.	<i>E. coli</i> DH5 α 'ya Transformasyon.....	41
2.9.	<i>lacZ:hag</i> Füzyon Vektörlerinin Oluşturulması	42
2.10.	<i>Bacillus subtilis</i> CU1065 Genomuna İntegrasyon.....	44
2.10.1.	<i>Bacillus subtilis</i> CU1065 Kompetent Hücre Hazırlanması	44
2.10.2.	Hücre Genomuna İntegrasyon.....	44
2.10.3.	Klonların Seçimi.....	45
2.11.	Beta-Galaktosidaz Testi	45
2.11.1.	Beta Galaktosidaz Deneyi İçin Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanışları	47

2.12.	Total RNA İzolasyonu	48
2.13.	RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	49
2.14.	5'-RACE PCR.....	50
2.14.1.	İlk Zincir cDNA'nın Sentezi	51
2.14.2.	cDNA'nın Temizlenmesi	52
2.14.3.	dCTP Kuyruğunun Takılması	52
2.14.4.	Oligo-C kuyruklu cDNA'nın Çoğaltılması.....	52
2.15.	AC6 ve <i>B. subtilis sigD</i> Geninin Ekspresyonu.....	54
2.15.1.	<i>sigD</i> Genlerinin Çoğaltılması.....	54
2.15.2.	<i>sigD</i> Genlerinin pET11a Vektörüne Klonlanması.....	54
2.15.3.	<i>sigD</i> genlerinin <i>E. coli</i> BL21 Hücresinde Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	55
2.16.	σ^D Proteinlerinin Saflaştırılması.....	56
2.16.1.	DEAE Sepharose Kromatografisi	57
2.16.2.	mono-Q Kromatografisi.....	58
2.17.	<i>Bacillus subtilis</i> RNA Polimeraz Enziminin Saflaştırılması.....	58
2.17.1.	Rekombinant <i>B. subtilis</i> suşun inşası.....	58
2.17.2.	Hücre Lizisi	59
2.17.3.	Ni-NTA Kromatografisi	59
2.17.4.	Heparin Kolon Kromatografisi.....	59
2.18.	σ^D proteinlerinin ve kor RNAP Enziminin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	60
2.19.	<i>in vitro</i> Transkripsiyon.....	60
2.19.1.	pEC3'ün Oluşturulması.....	60
2.19.2.	<i>in vitro</i> Transkripsiyon Reaksiyonu.....	62
2.19.3.	cDNA'ların Oluşturulması	62
2.20.	Real Time- qPCR.....	65
2.21.	Floresent Anisotropy (FA) Deneyi	66
2.21.1.	Floresent İşaretli Çift İplikli DNA'ların Oluşturulması.....	66
2.21.2.	σ^D - <i>hag</i> Promotor Bağlanma Aktitesinin Belirlenmesi	67
2.22.	Biyoinformatik ve Diğer Analizler	67
2.23.	GenBank Kayıt Numaraları.....	68
3.	BULGULAR	69

3.1.	AC6 <i>hag</i> geninin ve 5' upstream Sekanslarının Klonlanması ve Diğer Flagellin Genleri ile İlişkisinin Belirlenmesi.....	69
3.1.1.	Kısmi Flagellin Protein Sıralarının Belirlenmesi	69
3.1.2.	<i>hag</i> Geninin Tüm Gen Sıralarının inverse-PCR Yardımı ile Belirlenmesi.....	71
3.1.3.	AC6 <i>hag</i> Geninin Diğer Flagellin Genleri ile Karşılaştırılması.....	73
3.2.	AC6 Sigma-D (<i>sigD</i>) Geninin Klonlanması ve Diğer <i>sigD</i> Genleri ile İlişkisinin Belirlenmesi	77
3.2.1.	AC6 <i>sigD</i> Geninin Diğer <i>sigD</i> Genleri ile Karşılaştırılması.....	80
3.3.	AC6'da Yüksek Ekspres Edilen <i>hag</i> Geninin Promotor Analizi	83
3.3.1.	<i>in vivo</i> Promotor Analizi ve Aktivitesinin Belirlenmesi	83
3.3.1.1.	Transkripsiyon Başlangıç Yerinin Belirlenmesi	83
3.3.1.2.	<i>hag:lacZ</i> Füzyon Vektörlerinin Yapılandırılması	84
3.3.2.	<i>in vitro</i> RNAP-promotor Kompleksi Oluşumunun Belirlenmesi.....	91
3.3.2.1.	AC6 ve <i>B. subtilis</i> σ^D Proteininin Saflaştırılması.....	92
3.3.2.2.	<i>B.subtilis</i> Kor RNAP Enziminin Saflaştırılması	97
3.3.2.3.	σ^D -RNAP Kompleksinin Yeniden Oluşturulması ve <i>in vitro</i> Transkripsiyon.....	101
3.3.2.4.	AC6 ve <i>B. subtilis</i> σ^D Proteinlerinin <i>hag</i> Promotor Bölgesine Bağlanma İlgileri	105
3.4.	AC6 <i>hag</i> Geni mRNA'sının Sekonder Yapısı	108
3.5.	AC6 <i>hag</i> Geni Transkripsiyon Bitiş Kodonunun Belirlenmesi.....	109
3.6.	AC6 <i>hag</i> Genin Kodon Kullanım Frekansının Belirlenmesi	109
4.	TARTIŞMA	112
5.	SONUÇLAR	126
6.	ÖNERİLER	128
7.	KAYNAKLAR.....	129
8.	EKLER.....	141
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada Aydın ili Çamköy köyü Çamur kaplıca suyundan izole edilen termofilik bir bakteri olan *Aeribacillus pallidus* AC6 bakterisi kullanıldı. AC6 hücresinde yüksek seviyede ekspres edilen bir protein belirlendi ve MALTI-TOF analizleri sonucunda bu proteinin flagellin protein olduğu belirlendi. Bu protein sekanslarından yola çıkılarak AC6 flagellin (*hag*) genin birkısmı çoğaltıldı. Genin geri kalan kısmı invers-PCR yöntemi ile tamamlandı.

5'-RACE tekniği ile flagellin geninin transkripsiyon başlama bölgesinin translasyon başlama kodonundan 79 ve 80 bp upstream bölgede yer alan G ve T bazları olduğunu gösterildi. Transkripsiyon başlama kodunu belirlendikten sonra incelenen upstream bölgede σ^D faktör tarafından tanınan promotor bölge sekanslarının varlığı gözlemlendi. Yapılan β -galaktosidaz deneyi sonucunda, AC6 *hag* geninin -35 bölgede TAAA sekanslarına, -10 bölgede CCGATAT sekanslarına sahip olduğu ve bu sekansların bakteriyel RNAP enziminin σ^D faktörü tarafından tanındığı tespit edildi.

AC6 *hag* promotor ve σ^D faktör etkileşimlerinin *in-vitro* olarak açıklanabilmesi için, AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinleri ve *B. subtilis* kor RNAP enzimi saflaştırıldı. Yapılan *in vitro* transkripsiyon deneyleri sonucunda, AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinlerinin kor RNAP enzimi ile yeniden yapılandığını ve σ^D proteinlerinin AC6 *hag* promotor bölgesinde transkripsiyonu aktive ettiği gösterildi. AC6 *hag* promotorunun uzun -10 promotor elementi içindeki CGG motifinin σ^D proteinin promotor bölgesinin tanınma ve bağlanmasında önemli olduğu tespit edildi.

AC6 *hag* geni mRNA'sının sekonder yapısı incelendiğinde, *hag* transkriplerinin 5' ve 3' uçlarında stem-loop yapılarının varlığı tespit edildi. AC6 *hag* geni için tercih edilen kodonların *B. subtilis* bakterisi için yüksek sıklıkta kullanılan, *G. kaustophilus* ve *G. stearothermophilus* bakterileri için düşük sıklıkta kullanılan a.a. kodonları olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Flagellin geni (*hag*), σ^D , *Aeribacillus pallidus* AC6, *hag* promotor elementleri, *in vitro* transkripsiyon

SUMMARY

Cloning and Promoter Architecture of Flagellin Gene (*hag*) Expressed at High-level and Isolation and Purification Flagellar-specific Transcription Factor (σ^D) in *Aeribacillus pallidus* AC6

Aeribacillus pallidus AC6, a thermophilic bacteria, isolated from hot spring water was used in this study. An over-expressed protein was determined and results of MALDI-TOF analyses showed that the over-expressed protein is similar flagellin protein. The AC6 flagellin gene was amplified based on this protein sequences. Rest of the flagellin gene was amplified by inverse PCR.

5'-RACE experiment showed that transcriptional start bases of *hag* gene are G and T residue located 79 and 80 bp upstream from translational start codon. When Upstream sequences were examined, we have seen that upstream sequence revealed potential sequence recognized σ^D -dependent RNA polymerase. After β -galactosidase experiment, We determined that AC6 *hag* gene has TAAA sequences at -35 region and CCGATAT sequences at -10 region and these region recognized by σ^D of bacterial RNA polymerase.

For describing interactions between AC6 *hag* promoter and σ^D factor as in-vitro, σ^D protein of AC6 and *B. subtilis* and kor RNAP of *B. subtilis* were purified. In vitro transcription assay showed that σ^D proteins and kor RNAP enzyme reconstructed as holoenzyme form and this holoenzyme was activated transcription at AC6 *hag* promoter region. We determined that CCG motif of a long -10 region (CCGATAT) of promoter is important for the recognition and binding by σ^D .

When secondary structure of mRNA of AC6 *hag* gene was examined, we noted the presence of a potential stem-loop structure at 5' and 3' ends of *hag* gene transcripts. As a result of investigation, while AC6 *hag* gene includes same high frequencies codons of *B. subtilis*, it does not include same high frequencies codons of *G. kaustophilus* and *G. stearothermophilus*.

Key Words: Flagellin gene, σ^D , *Aeribacillus pallidus* AC6, promoter elements of *hag* gene, *in vitro* transcription

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Aksonema'nın 9+2 yapısının görünüşü.....	4
Şekil 2. Flajella tipleri	7
Şekil 3. Bakteriyel flajellanın kısımları.....	8
Şekil 4. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hücrelerinin flajella yapısı	9
Şekil 5. Flagellin geninin yapısal görünümü	11
Şekil 6. L ve R tip protofilament yapısının gösterimi	12
Şekil 7. Flagellin proteininin 3 boyutlu yapısı.....	12
Şekil 8. Transkripsiyon başlangıç aşamasında kapalı ve açık promotor komplekslerinin oluşumu.....	17
Şekil 9. σ - faktörünün şematik ve yapısal görünümü	24
Şekil 10. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü	29
Şekil 11. pDG1663 integrasyon vektörünün şematik görünümü.....	30
Şekil 12. pET11a ekspresyon vektörünün şematik görünümü	31
Şekil 13. 5' RACE prosedürünün şematik görünümü.....	50
Şekil 14. pEC3 plazmitinin şematik görüntüsü	61
Şekil 15. İn vitro transkripsiyon deneyinin şematik olarak gösterilimi	64
Şekil 16. Floresant Anisotropy Deneyinde kullanılan FAM işaretli DNA dupleksleri	67
Şekil 17. AC6 bakterisinin total hücre protein profili.....	69
Şekil 18. AC6'nın MALDI-TOF analiz sonuçları.....	70
Şekil 19. Flagellin geninin nükleotit ve protein sekansı	72
Şekil 20. Flagellin proteininin amino asit içeriği.....	73
Şekil 21. AC6'nın flagellin protein sekansı bakımından filogenetik ağacı.....	74
Şekil 22. Protein ve DNA seviyesinde AC6 flagellin geninin firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu	75
Şekil 23. AC6 flagellin proteininin N ve C-terminal domainlerinin ClustalW analiz sonuçları.....	76
Şekil 24. Değişik grup bakterilere ait Sigma-D geni için korunmuş bölgelerin gösterilimi	78
Şekil 25. <i>sigD</i> geninin nükleotit ve protein sekansı.....	79
Şekil 26. AC6 Sigma-D proteini amino asit içeriği	80

Şekil 27.	AC6'nın σ^D protein sekansı bakımından filogenetik ağacı	81
Şekil 28.	Protein ve DNA seviyesinde AC6 <i>sigD</i> geninin Firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu	82
Şekil 29.	5'-RACE tekniği ile <i>hag</i> geni transkripsiyon başlangıç noktasının tespiti	84
Şekil 30.	AC6 <i>hag</i> geni promotor fragmentlerinin gösterilimi	86
Şekil 31.	Promotor fragmentlerinin %1'lik agaroz gel elektroforezindeki görüntüsü	87
Şekil 32.	Promotor fragmentlerini içeren rekombinant integrasyon vektörünü taşıyan <i>B.subtilis</i> CU1065 ve HB4035 hücrelerinin <i>lacZ</i> geni ekspresyonu.....	88
Şekil 33.	<i>hag:lacZ</i> füzyon vektörünü içeren yaban tip ve mutant tip <i>B. subtilis</i> hücrelerinin Beta-galaktosidaz aktivitesinin gösterilimi	89
Şekil 34.	<i>hag</i> geni promoter bölgesinin yapısı ve nükleotit sekansı.....	91
Şekil 35.	AC6 ve <i>B.subtilis sigD</i> PCR ürünlerinin %1'lik agarose jelde görüntüsü	92
Şekil 36.	AC6 σ^D proteinin DEAE-Sepharose kolon saflaştırılması	94
Şekil 37.	AC6 σ^D proteinlerinin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü	95
Şekil 38.	<i>B. subtilis</i> σ^D proteinin DEAE-Sepharose kolon saflaştırılması	96
Şekil 39.	<i>B. subtilis</i> σ^D proteinlerinin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü	97
Şekil 40.	Ni-NTA kolon kromatografisi sonrası toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jelinde analizi	98
Şekil 41.	Heparin kolon kromatografisi sonrası RNAP enziminin Bradford ve SDS-PAGE analizleri	99
Şekil 42.	<i>B. subtilis</i> kor RNAP enziminin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü.....	100
Şekil 43.	DNA kontaminasyonu grafiği.....	103
Şekil 44.	1/10 dilüsyonda gerçekleştirilen Q-PCR grafiği	104
Şekil 45.	AC6 veya <i>B. subtilis</i> σ^D - RNAP holoenziminden <i>in vitro</i> olarak mRNA sentezi.....	105
Şekil 46.	Florosent Anisotropy Deney Sonuçları.....	107
Şekil 47.	AC6 <i>hag</i> geni mRNA'sının 5' ucu sekonder yapısı.....	108
Şekil 48.	AC6 <i>hag</i> geni mRNA'sının 3' ucu sekonder yapısı.....	109
Şekil 49.	AC6 <i>hag</i> geninin kodon kullanımının <i>G.kaustophilus</i> , <i>G. stearothermophilus</i> ve <i>B.subtilis</i> kodon kullanım frekansları ile karşılaştırılması.....	111

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çeşitli bakteriyel σ -faktörlerin dağılımı ve tanıdıkları ortak promotor sekansları.....	21
Tablo 2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler.....	34
Tablo 3. AC6 <i>hag</i> geninin çoğaltılması için kullanılan primerler.....	35
Tablo 4. <i>hag</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı	35
Tablo 5. <i>hag</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü	35
Tablo 6. İnvers PCR için genomik DNA kesimi.....	36
Tablo 7. Self- Ligasyon protokolü	36
Tablo 8. İnvers PCR için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı.....	37
Tablo 9. İnvers PCR protokolü	37
Tablo 10. GenBank'tan sağlanan flagellin genleri ve protein sekansları	38
Tablo 11. GenBank'tan sağlanan <i>sigD</i> nükleotit ve protein sekansları.....	39
Tablo 12. <i>sigD</i> geninin çoğaltılması için kullanılan primerler	40
Tablo 13. <i>sigD</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı.....	40
Tablo 14. <i>sigD</i> geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü	40
Tablo 15. Ligasyon reaksiyonu	41
Tablo 16. İntegrasyon vektörünün inşasında kullanılan primerler çiftleri ve promotor fragmentleri.....	43
Tablo 17. Promotor türevlerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı.....	44
Tablo 18. Touchdown PCR reaksiyon içeriği.....	53
Tablo 19. Touchdown PCR döngüsü.....	53
Tablo 20. qPCR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği	65
Tablo 21. İnvers PCR ile flagellin geninin 3' ve 5' bölgelerini belirlemek için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri.....	71
Tablo 22. Nükleotit Blast sonucunda AC6 <i>hag</i> genine benzer türler ve flagellin genleri.....	73
Tablo 23. Nükleotit Blast sonucunda <i>sigD</i> genine sahip benzer türler	80
Tablo 24. <i>B. subtilis</i> CU1065'de <i>hag</i> geni promotor fragmentlerini <i>in vivo</i> ekspresyonu.....	90
Tablo 25. Kor RNAP enziminin saflaştırma basamaklarındaki enzim konsantrasyonları.....	101

Tablo 26. <i>in vitro</i> transkripsiyon sonrası total RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	102
---	-----

SEMBOLLER DİZİNİ

a.a	: Amino asit
AC6	: <i>Aeribacillus pallidus</i> AC6
Amp	: Ampisilin
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl	: Kalsiyum klorür
CAI	: Kodon Adaptasyon İndeks
Cm	: Kloramfenikol
CoCl ₂	: Kobalt klorür
C _t	: Threshold Cycle
Da	: Dalton
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
DSM	: Farklı sporlaşma besiyeri
DTT	: Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
FPLC	: Fast protein liquid chromatography
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kan	: Kanamisin
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz
LB	: Luria Bertani Broth

lt	: Litre
M	: Molar
MC	: Modified Competence Besiyeri
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mls	: Makrolid direnci (Eritromisin- Linkomisin)
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mRNA	: Mesajcı RNA
Na ₂ CO ₃	: Sodyum bikarbonat
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomol
NTP	: Nükleotid trifosfat
OD	: Optical Density
ONPG	: ortho-Nitrophenyl-β-galactoside
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
Q-PCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAP	: Kor RNA Polimeraz enzimi
rRNA	: ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dedosilsülfat
sn	: Saniye
spec	: Spektinomisin direnci
SSB	: Schaefer's Sporulasyon Besiyeri
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
U	: Unit

UV	: Ultra Violet
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
β	: Beta
Δ	: Delta
σ	: Sigma
ω	: Omega
α	: Alfa
$^{\circ}\text{C}$: Derece
μg	: Mikro gram
μl	: Mikro litre
μM	: Mikro molar
μmol	: Mikro mol
\AA	: Angstrom

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Termofilik Gram-Pozitif Basiller

Birkaç yıl önce bakterilerin en geniş ve en çeşitli grubu olan *Bacillus* grubu, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus* ve *Geobacillus* olmak üzere 9 cinse bölünmüştür. Bu yeni cinsler 16S rRNA geninin sekans bilgileri baz alınarak filogenetik olarak ayrılmıştır (Banat vd., 2004). Orijinal *Bacillus* genusu, aerobik ve fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, gram pozitif endospor oluşturabilen bakterileri içerir (Claus ve Berkeley, 1986). *Bacillus* genusunda sınıflandırılan bazı organizmaların termofilik, aerobik, spor oluşturabilen organizmalar olduğu görülmüş ve yapılan 16S rRNA çalışmaları ile de bu organizmaların termofilik basiller ile yüksek bir benzerlik oranının olduğu tespit edilmiştir. Termofilik özellik gösteren gram-pozitif *Bacillus* genusu *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* olarak iki genusa ayrılmıştır (Nazina vd., 2001).

Geobacillus'lar çubuk veya yuvarlağımsı çubuk şekilli, tek ya da kısa bir zincir oluşturan, gram pozitif fakat Gram boyama reaksiyonları bazen değişken olan, elipsel ya da silindirik spor oluşturabilen, bir bakteridir. Sporları, hücrede terminal veya subterminal şekilde yerleşme gösterirler. Kemoorganotropik canlılardır. Aerobik ve fakültatif anaerobik organizmalardır. Zorunlu termofiliktirler. Büyüme sıcaklıkları 37–75°C arasındadır. Fakat optimum büyüme sıcaklıkları 55–65°C arasındadır. Optimum pH aralıkları 6,2–7,5'dir. % 48,2–58 G:C oranına sahiptirler. Doğada geniş çapta yayılış gösteren mikroorganizmalardır (Nazina vd., 2001).

Bu güne kadar 19 *Geobacillus* türü tanımlanmıştır. Bu türler; *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus uzenensis* (Nazina vd. 2001), *Geobacillus caldxylosilyticus* (Fortina vd., 2001), *Geobacillus toebii* (Sung vd., 2002), *Geobacillus debilis*, *Geobacillus pallidus* (Banat vd., 2004), *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus vulcani* (Nazina vd., 2004), *Geobacillus lituanicus* (Kuisiene vd., 2004), *Geobacillus tepidamans* (Schaffer vd., 2004), *Geobacillus caldoproteolyticus* (Chen vd., 2004),

Geobacillus jurassicus (Nazina vd., 2005), *Geobacillus zalihae* (Abd Rahman vd., 2007) gibi 35 ve 78 °C’de üreyebilen türleri içermektedir.

Anoxybacillus cinsi ise gram-pozitif spor oluşturabilen çubuk şeklinde, alkalifilik yada alkalitolerant, termofilik, aerop veya fakültatif anaerop bakterileri içerir. DNA’ları % 42-57 mol G+C oranına sahiptir. Terminal endosporlara sahip hücrelerde sadece bir spor vardır. Kemoorganotropik canlılardır (Pikuta vd., 2003). Bu güne kadar tanımlanmış 11 türü bulunmaktadır. Bu türler *A. amylolyticus* (Poli vd., 2006), *A. rupiensis* (Derekova vd., 2007), *A. gonensis* (Beldüz vd., 2003), *A. flavithermus* (Pikuta vd., 2000), *A. kamchatkensis* (Kevbrin vd., 2005), *A. ayderensis* (Dulger vd., 2004), *A. bogrovensis* (Atanasova vd., 2008), *A. contaminans* (De Clerk., 2004), *A. kestanbolensis* (Dülger vd., 2004), *A. pushinensis* (Pikuta vd., 2003), *A. voinovskiensis* (Yumoto vd., 2004) gibi termofilik çevrelerde üreyebilen türleri içermektedir.

Son yıllarda yapılan yeni bir çalışma ile *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* genuslarından oluşan termofilik basillere yeni bir genus daha eklenmiştir. Minana-Galbis vd (2009) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda *Aeribacillus* olarak isimlendirilen yeni bir termofilik basil cinsi literatüre eklenmiştir.

1.1.1. *Aeribacillus*

Aeribacillus genusu DNA’nın G+C içeriği, yağ asiti ve polar lipid profillerine göre *Geobacillus* cinsinden ayrılmıştır. *Aeribacillus* cinsi aerobik, termofilik, alkalitolerant, hareketli, gram-pozitif, çubuk şeklinde (0.8-0.9 X 2-5 µm), tek tek veya çiftli ve zincir şeklinde form alabilen hücrelidir. Eliptik ve silindirik endosporlara sahiptirler. Katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitif, öncül polar lipidler fosfotidilgliserol ve difosfotidilgliserol’dür. DNA G+C oranı 39-41 mol% arasındadır. *Aeribacillus pallidus* ise bu genusun tip suşudur (Minana-Galbis vd., 2009).

1.1.1.1. *Aeribacillus pallidus*

Bacillus pallidus olarak tanımlanan bakteri 16S rRNA sekansları baz alınarak incelendiği zaman, *Geobacillus* cinsi içerisinde *G. caldxylosilyticus*, *G. toebii* ve *G.*

debilis'e yüksek bir oranda benzediğini göstermiştir ve *Geobacillus pallidus* olarak yeniden adlandırılmış ve literatürdeki yerini almıştır (Banat vd., 2004).

Minana-Galbis vd (2009) tarafından yapılan son bir çalışma ile yağ asiti içerikleri, polar lipid profili ve 16S rRNA sekanları baz alınarak yapılan inceleme sonucunda *G. pallidus* olarak bilinen tür *Aeribacillus pallidus* olarak sistematikteki yeni yerini almıştır.

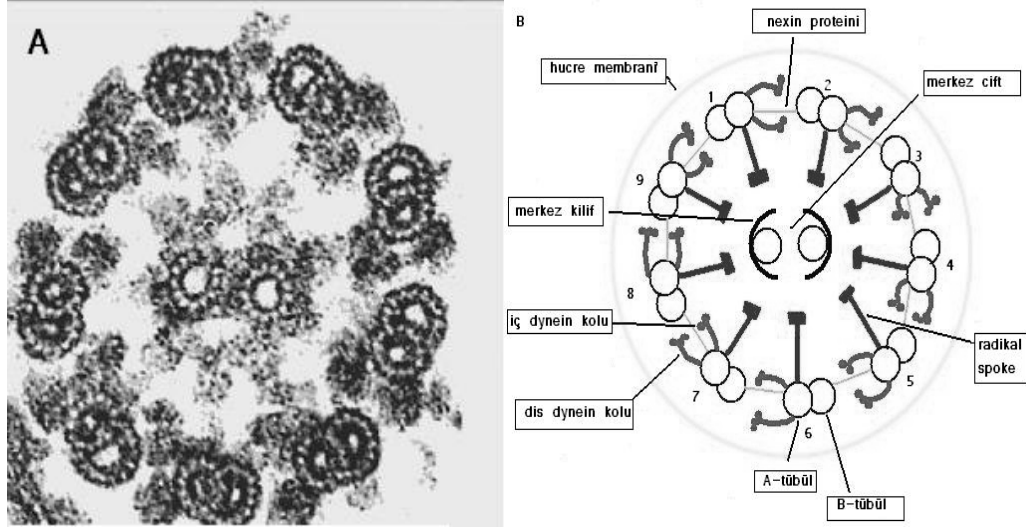
Aeribacillus pallidus gram pozitif, 0,8-0,9 µm genişliğe, 2-5 µm uzunluğa sahip, terminal sporlar oluşturabilen bir bakteridir. Kolonileri R-tipi, yassı ve krem renklidir. 30-70 °C'de üreyebilen bu bakterinin optimum büyüme sıcaklığı 60 °C civarındadır. DNA'sındaki G+C oranı 39-41 mol% arasındadır. Bazı suşları maltoz ve trehalozdan gaz oluşturabilir. Zayıf nişasta hidroliz reaksiyonu gösterirler ve *Aeribacillus pallidus* türü peritriş flajellarlarıyla hareketlidirler (Scholz vd., 1987).

1.2. Canlılarda Flajella

Flajella canlılarda hareketten sorumlu organeldir. Bakteriyal, arkeal ve ökaryotik flajella olmak üzere üç kısma ayrılabilir.

1.2.1. Ökaryotik Flajella

Flajella ve sil mikroorganizmaların hareketi ile ilgili en önemli organellerdendir (Blake vd., 1998). Sil ve ökaryotik flajellanın kırbaç benzeri hareketi aksoneme olarak isimlendirilen bir merkez tarafından gerçekleştirilir (Dillon ve Fauci, 2000). Aksonemenin tipik olarak 9x2+2 yapısı vardır ve bu yapının yatay kesitinin diyagramı Şekil.1'de verilmiştir. Aksonema merkezde tekli iki mikrotübül ve bunun çevresini dıştan saran dokuz çift mikrotübülden oluşur. Merkez mikrotübüller bir kılıf ile çevrilidir ve dışta bulunan dokuz çift mikrotübül radikal çubuk aracılığı ile bu kılıfa bağlanır. Dışta bulunan mikrotübül çiftleri neksin olarak isimlendirilen bir protein ile birbirine bağlanırlar (Omoto, 1991). Aynı zamanda mikrotübüller dynein olarak isimlendirilen kimyasal ATP enerjisini hareket enerjisine çeviren motor protein kolları içerir. Dynein'lar sitoplazmik ve anoksemal dynein olmak üzere ikiye ayrılabilir (Karp, 2000). Flajella en dıştan hücre membranı ile çevrilidir.



Şekil 1. Aksonema'nın 9+2 yapısının görünümü. A) Aksonemanın enine kesitinin elektron mikroskobu görüntüsü. B) Aksonemanın enine kesitinin diyagramı

İlkel hareketsiz sillilerde aksonemanın yapısı doğal $9 \times 2 + 2$ anatomisinden bazı değişiklikler gösterir. Bu canlılarda dış çift mikrotübüllerde dynein kolları bulunmadığı gibi merkez mikrotübül çiftide yoktur. Aksonemanın bu organizasyonu $9 \times 2 + 0$ dizilimi olarak işaret edilir. Ek olarak $9 \times 2 + 1$ dizilimi mevcut olup bu dizilimde merkezde yalnızca tek bir mikrotübül bulunur (Omoto ve Kung, 1979).

1.2.2. Arkeal Flajella

Canlılar aleminin üçüncü dalı Carl Woese ve çalışma arkadaşları tarafından ilk kez 1970'li yıllarda rRNA'nın küçük alt birim sekansları baz alınarak önerildi. Woese'un analizleri bakteriler ve arkealar olmak üzere iki farklı prokaryotik grubun var olduğunu ortaya çıkardı. Arkealar çekirdek membranlarının olmaması ve polisistronik mRNA içermeleri gibi özellikleri ile bakterilere, benzer promotör ve TATA bağlanma bölgeleri özelliği taşıyan transkripsiyon sistemleri ile ökaryotlara benzemesinin yanı sıra, sadece arkealara ait özelliklere de sahiptirler. Bu özelliklere örnek olarak eter bağları ve tek katlı hücre duvarları verilebilir (Thomas vd., 2001). Arkealar Methanogenleri, Ekstrem Halofilleri, Thermoplasmaları ve belirli sülfür bağımlı Termofilleri kapsayan mikroorganizmalar grubudur (Kalmokoff ve Jarrell, 1991).

Arkealara özel flajella oluşumu çoğu arkeaların karakteristik bir özelliği olup, flajellaya sahip bazı arkeaların tam genom sekansları yayınlanmıştır (Thomas vd., 2001). Flajella ve tip IV siller prokaryotik hücrelerde yaygınca bulunan etkili hareket organelleridir ve bu hareket organelleri çok iyi incelenmiştir. Arkeal flajella sistemleri ise artan bir ilgiyle araştırılmaya başlanmıştır. Arkeal flajella görünüş olarak bakteriyel flajellaya benzese de, arkeal flajellar sistem bakteriyel flajella sisteminden farklıdır ve bakteriyel tip IV pillus sistemi ile ortak bazı özellikleri vardır. Bu benzerlikler arkeal flajellar filamentin multiflagellin doğası ve bu iki sistem arasındaki N-terminal sekanslardaki homolog proteinlerin varlığıdır (Sandy vd., 2006).

Arkeal flajella bakterilerinkine benzer ve tip IV pilinde farklı olarak bir çengel ve bu çengele bağlı bir filamentten oluşur. Arkealardaki çengel uzunluğu bakterilerde gözlenenenden daha fazla değişkenlik gösterir (Bardy vd., 2002). Çoğu arkeada bulunan değişik hücre duvarı yapılarından dolayı, arkeal flajellanın alt-sitoplazmik membrana demirlenmiş olabilmesi muhtemeldir (Sandy vd., 2006).

Flajellar filament, *Halobacterium*, *Methanococcus*, *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanothermus*, *Natrialba* (önceden *Natronobacterium*), *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Thermococcus* ve *Thermoplasma* genuslarına ait türlerde karakterize edilmiştir. Arkeal filament bakteriyel filamentten birçok farklılıklar gösterir. Bu farklılıklardan biri filamentin çapıdır. Arkeal filament bakteriyel filamentten daha incedir. Arkeal filament yaklaşık olarak 10-14 nm kalınlığa sahip iken, bakteriyel filament yaklaşık olarak 20 nm kalınlığındadır. Diğer bir özellik ise, istisnaları olmasına rağmen tipik bakteriyel filament sola sarmal bir biçimde organize edilirken, arkeal filamentler çoğunlukla sağa sarmal şeklinde organize edilir (Thomas vd., 2001). Bu özelliklerin yanı sıra en önemli olan diğer bir özellik de arkealarda bulunan multi flagellin genleridir. Arkealar bir kural olarak kromozom üzerinde 2-6 arasında ard arda bulunan multi flagellin genleri içerirler. Bugüne kadar rapor edilen arkeal Flajellar filament multi genleri; *Halobacterium halobium*' da beş (Gerl ve Sumper, 1988), *Methanospirillum hungatei* (Southam vd.,1990) ve *Methanococcus voltae*' de (Kalmokoff vd., 1988) iki veya üç, *Methanococcus deltae*, *Methanococcus vannielii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanoculleus marisnigri*, ve *Methanothermus fervidus*' da iki ve daha fazla olduğudur (Kalmokoff ve Jarrell, 1991). *Sulfolobus* türleri bir istisna olarak tek bir flagellin genine sahiptirler. Diğer taraftan ise çoğu bakteri flajellar filamenti oluşturmak için tek bir tip flagellin altbirimine sahiptirler. Multiflagellin geni içeren bakteri türleri çok yaygın değildir (Sandy vd., 2006).

Arkeal flagellin DNA sekansları ile N-terminal protein sekanslarının bakteriyel flagellin sekans ve proteinleri ile karşılaştırmaları sonucunda bakterilerde olmayan 12 amino asitlik bir sinyal peptidinin olduğu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar birçok arkeada da bulunmuştur ve tüm arkealarda bir öncül peptidin varlığı bulunmuştur. Arkeal flagellinin N-terminal aminoasit sekansları incelendiğinde, olgun bir proteinin yaklaşık ilk 50 aminoasitinde yüksek bir korunmuşluk ve hidrofobiklik tespit edilmiştir. Bu korunmuş bölgeler mezofillerin, termofillerin ve hipertermofillerin flagellin proteinlerinin A*GIGTLIVFIAMVLVAAVAA(S/G/A)VLINT(A/S)G(Y/F)LQQK (pozisyon 2 değişkendir) ilk 34 aminoasitinde de belirlenmiştir (Thomas vd., 2001).

Arkealar genellikle ekstrem çevrelerden izole edildikleri için flajellalarında bu ekstrem şartlarda stabil olması gerekmektedir. Methanogenler ve halofiller ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki; arkeal flajellar filament bakteriyel eşdeğerlerine göre proteaz uygulamalarına daha dirençli olmalarının yanısıra yüksek sıcaklıklarda da daha stabil kalabilmektedir (Fedorov vd., 1994).

1.2.3. Bakteriyel Flajella

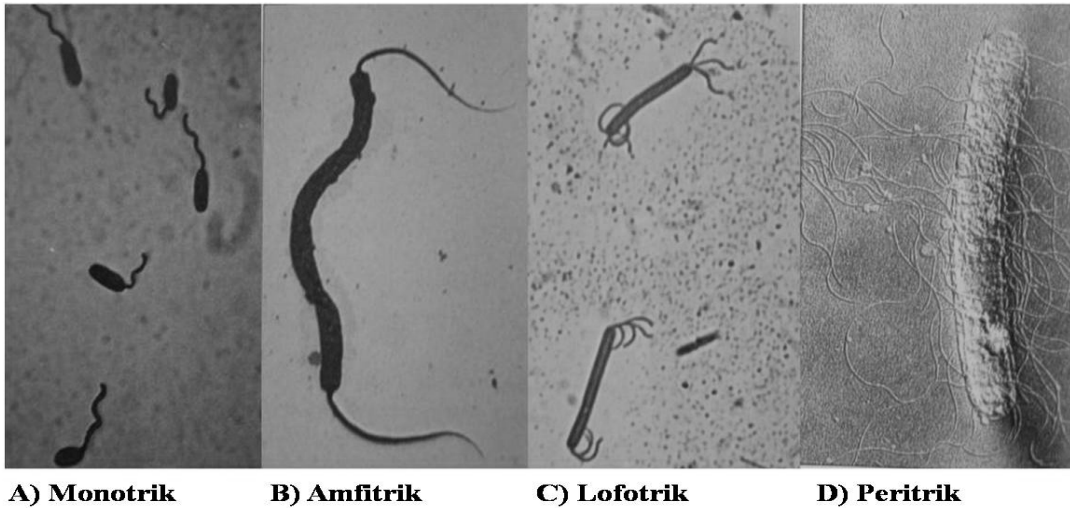
Bakteriyel flajella, bakteri hücre yüzeylerinden dışarı doğru uzanan hareket ve beslenmeden sorumlu organellerdir. Işık ve elektron mikroskobu ile gözlenebilirler. Bakteriyel ve arkeal hücrelerin bir besiyeri içerisinde hızlı ve direkt hareket kabiliyeti flajellanın varlığına bağlıdır (Macnab, 2003).

Genellikle 10 ile 20 nm çapında, 5 ile 20 µm boyunda olan bu protein benzeri uzantılar Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin bazılarında bulunurlar. Bakteri hücrelerinin hareketi flajellanın pervane gibi dönmesi ile gerçekleştirilir. Hareket bakterinin sıvı ortam içerisinde ilerlemesini sağlar. Hareket için, hücre metabolizmadan sağlanan kimyasal enerji mekanik enerjiye çevirilir (Perry vd., 2002).

Hücre yüzeyindeki flajellanın konumu ve sayısı bakteri sınıflandırılmasında önemli bir özellik olarak kullanılır. Bazı bakteriler hücrenin bir ucundan uzanan bir tek polar flajellaya sahiptirler ve bu bakteriler monotrik olarak isimlendirilir. Diğer grup bakteriler ise hücrenin her iki ucunda da tek bir flajella içerirler ve bu bakteriler amfitrik olarak isimlendirilirler. Farklı bir grup olan lofotrik bakteriler ise hücrenin bir veya her iki ucunda da tutam şeklinde flajellaya sahiptirler. Son grup olan peritrik bakteriler ise tüm hücre yüzeyinden uzanan çok sayıda flajellaya sahiptirler (Şekil 2) (Madigan vd., 2009).

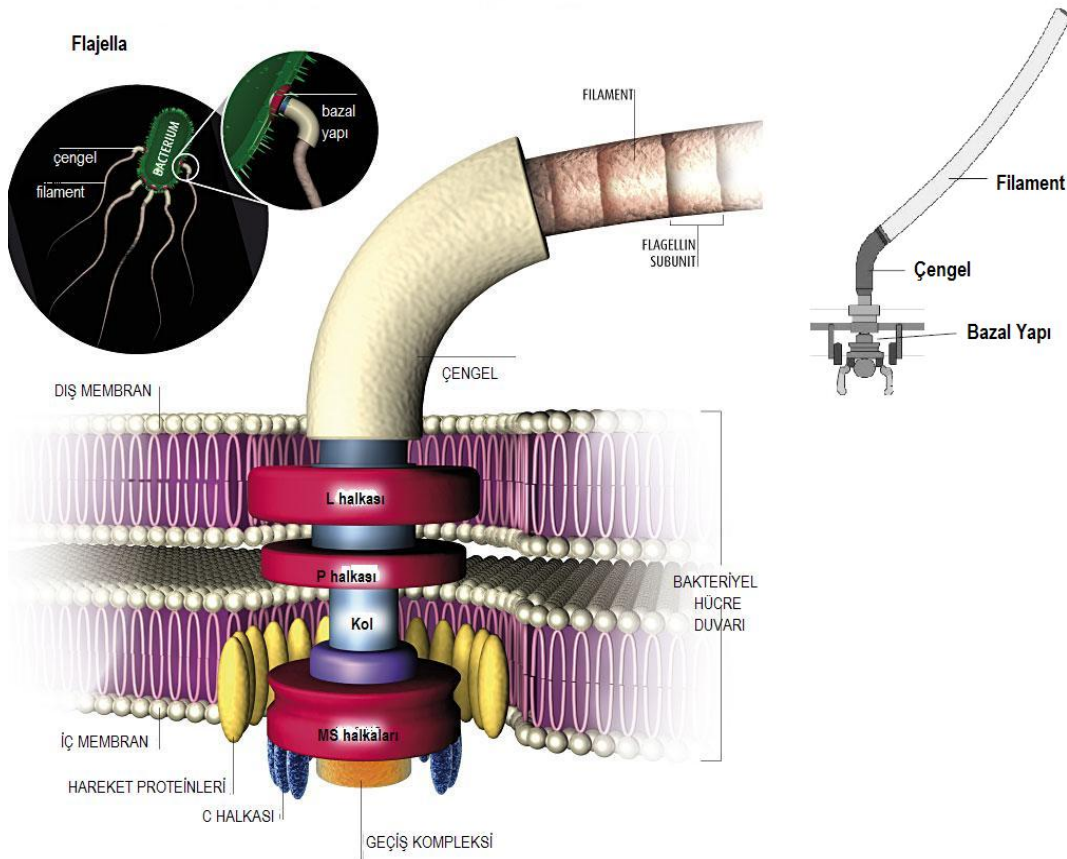
Flajella bakterilere yararlı çevreleri arayıp bulma ve zararlı çevrelerden kaçınma imkanı sağlar. Bu tip davranışlar refleks veya yönelme (taksis) olarak adlandırılır ve birçok farklı yönelme çeşiti vardır. Bakteriler belirli kimyasalları sıvı içerisinde hissediler ve besince zengin toksik materyalce az olan bu bölgeye doğru yüzerler, bu yönelme hareketine kemotaksis denir. Aynı şekilde çözülmüş oksijenin bol olduğu bölgeye doğru yönelmeye aerotaksis, fotosentetik bakteriler için optimal ışığın olduğu bölgeye doğru yönelmeye fototaksis ve bir kaç bakterinin kabiliyeti olan magnetik alana doğru yönelmeye ise magnetotaksis adı verilir (Ingraham ve Ingraham, 2002).

Bakteriyel flajella bazal yapı, çengel ve filament olmak üzere üç ana yapıdan oluşur (Şekil 3). Bazal yapı; bir seri halkalar dizisi, hareket (Mot) proteinleri, geçiş kompleksi ve flajella spesifik dış aktarım aparatını içerir. Halkalar flajellayı sitoplazmik membrana (MS halkaları), peptidoglukan tabakaya (P halkası) ve dış membrana (L halkası) demirler. Gram-pozitif bakterilerde ince bir peptidoglukan tabaka ve dış membran bulunmadığı için flajella P ve L halkalarından yoksundur (Şekil 4). Geçiş proteinleri (FliG, FliM ve FliN), bakterinin kompleks bir kemotaksi sistemi ile birlikte algıladıkları itici veya cezbedici çevresel ortamlara bir cevap olarak flajellanın yönünü sağlar. Bakterilerde MotA ve MotB olmak üzere iki adet hareket proteini vardır. Bu proteinler, bir kanal benzeri şekillenirler ve flajellanın hareketi için gerekli olan kuvveti sağlarlar (Bardy vd., 2003).



Şekil 2. Flajella tipleri

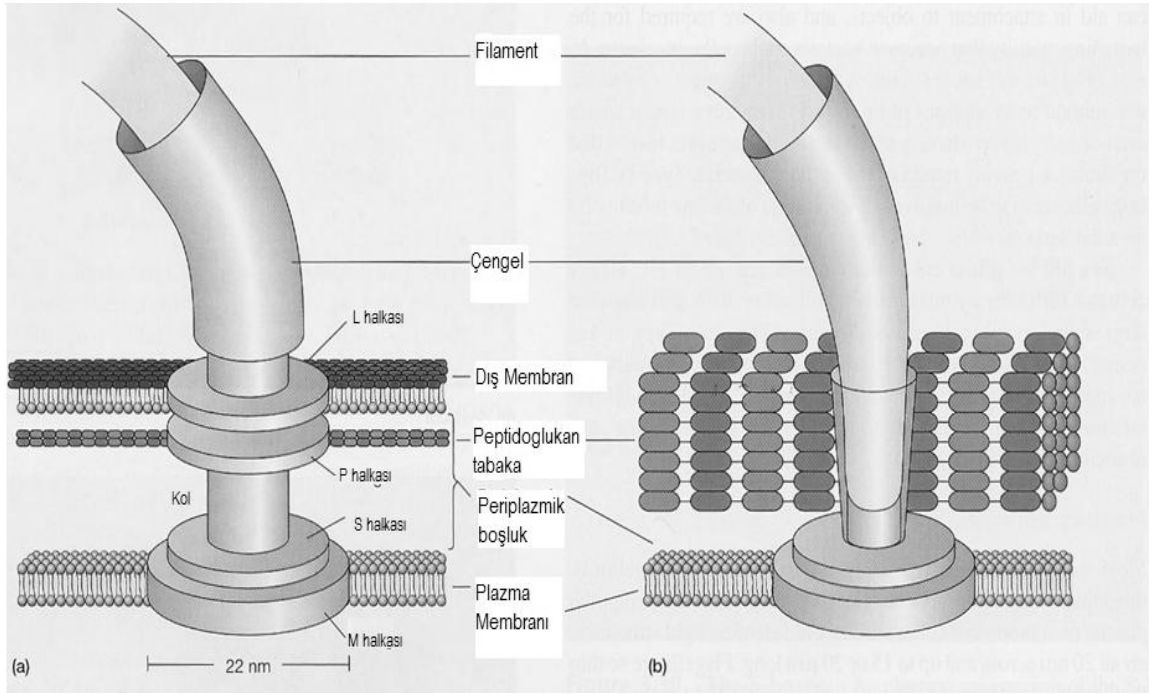
Bazal yapı ve filament arasındaki kısım, flajellanın çengel kısmıdır. Çengel kısa, birazcık eğik ve filamentten biraz daha geniş bir çapa sahiptir. Çengelin uzunluğu büyük bir değişkenlik göstermeyip yaklaşık olarak 70-90 nm aralığındadır. Düşük pH, üre ve diğer flagellin çözücülerini çengel üzerinde çok az etkilidir ve çengel antijenik olarak flagellinden farklıdır. Filament ile bazal yapı arasındaki bağlantıyı sağlayan çengel esas olarak tek bir polipeptit alt biriminden oluşur. Çengel proteininin moleküler ağırlığı *E. coli*'de 42 kD civarında iken, *B. subtilis*'te 33 kDa civarındadır. Çengel ile filamentin birleşmesi için HAP1 ve HAP3 olarak isimlendirilen çengel ile ilişkili iki proteinin varlığı gerekir (Doetsch ve Sjoblad, 1980; Bardy vd., 2003).



Şekil 3. Bakteriyel flajellanın kısımları

Filament olarak isimlendirilen üçüncü kısım ise hücrenin dış kısmında yer alır ve flagellinin en büyük parçasını oluşturur (Kubori vd., 1997). Filament yaklaşık olarak 20

nm kalınlığında ve genellikle flagellin olarak adlandırılan tek bir proteinin binlerce kopyasından oluşur. Pek yaygın olamamakla birlikte bazı türler birden fazla değişik flagellin protein içeren filamente sahiptirler. Flajellanın uç kısmı HAP2 olarak adlandırılan bir uç proteini ile kapatılır. Filament yapısının uzaması nadir görülen bir şekilde gerçekleşir. Bireysel flagellin monomerleri hücre yüzeyine en yakın kısımdan değil, filamentin oluşturulan en uç kısmına giderek orada yerleşir ve böylece filament yukarı doğru büyür. HAP2 proteini yeni flagellin monomerlerinin montajı için gereklidir. HAP2 proteinin flagellin monomerlerini birbiri üzerine düzenli bir şekilde dizilmesi ve etrafa dağılmasını sağlar (Bardy vd., 2003).



Şekil 4. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hücrelerinin flajella yapısı. A) Gram negatif bakteri hücresi, B) Gram pozitif bakteri hücresi.

Elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmaları flajellanın montajında görülebilen ilk yapılar M-S halkaları olduğunu göstermiştir. Bazal yapıya demirlenen diğer proteinler çengel kısmı ile birlikte filament yapılmadan önce ilk yapıya eklenir. Flajelladaki filament kısmının aksine, çengel bölgesi belirli bir uzunluğa sahiptir (55 nm, yaklaşık olarak 120 FlgE alt birimi). Son gösterilen model çengel uzunluğunun nasıl düzenlendiğini açıklar. Bu modele göre; çengel uzunluğu direkt olarak bazal yapının altında bulunan ve geçiş

kompleksini içeren C halkası olarak adlandırılan yapı tarafından kontrol edilir. Bu model de; çengel proteinleri olan FlgE altbirimleri C halkasını doldurur ve daha sonra toptan taşınır ve monte olunur. Çengelin uzunluğu C halkasının kapasitesi ile belirlenir (Makishima vd., 2001).

1.2.3.1. Flagellin (Filament Protein)

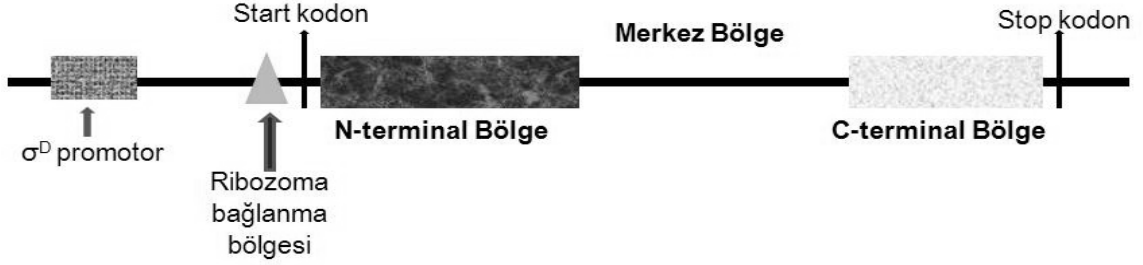
Filamentin oluşumunu sağlayan flagellin genlerinin sayısı organizmalarda değişiklik gösterebilir. Bazı bakteriler yalnızca tek bir flagellin genine sahiptirler ve bu genden ekspres edilen flagellin altbirimlerinin tekrarları ile oluşan filament ile basit bir flajellaya sahiptirler. Bu bakterilere, *Borrelia burgdorferi* (Wallich vd., 1990), *Escherichia coli* (Ku wajima vd., 1986) ve *Roseburia cecicola* (Martin ve Savage, 1988) örnek verilebilir. Oysaki diğer grup bakteriler çoklu flagellin genleri ile filamenti oluşturular. *Bacillus thuringiensis* subsp. alesti (Lovgren vd., 1993), *Campylobacter spp.* (Guerry vd., 1991), *Campylobacter jejuni* (Nuijten vd., 1990) ve *Salmonella typhimurium* (Homma vd., 1987) bu bakterilere örnek olarak verilebilir. *Campylobacter spp.*'de iki farklı flagellin altbirimi (FlaA ve FlaB) bulunmaktadır ve bu iki flagellin tam hareket için gereklidir.

Flagellin proteinleri karakteristik amino asit özelliklerini paylaşırlar. Valine, lösin ve izölösin (20.4, 23.4, 21.9 mol%) flagellin proteininde en sık bulunan aminoasitlerdir. α -helix ve β -sheet breaker amino asit olan prolin flagellin proteininde az miktarda bulunurken, α -helix formunu oluşturan alanin ise flagellin proteinde bol bulunan diğer bir amino asittir (Wilson ve Beveridge, 1993). Genellikle, flagellin proteinleri triptofan, tirozin ve histidin amino asitleri bakımından fakirdirler ve sistein amino asitini bazı istisnalar dışında içermezler. Bu istisnalara örnek olarak *Roseburia cecicola*'da tek bir sistein amino asitinin, iki farklı *Pseudomonas putida* suşunda ise üç sistein amino asitinin olması verilebilir (Winstanley ve Morgan, 1997).

Farklı bakteri türleri, farklı moleküler ağırlıkta flagellin proteini üretirler. Kobayashi vd., (1959) termofilik *Bacillus sp.* 2184 suşundan 15 kDa, Ku wajima (1986) *E. coli* suşunda 62 kDa, McDonough (1965) ise *Salmonella typhimurium* bakterisinde 40 kDa flagellin proteini olduğunu göstermişlerdir (Joys, 1988).

Flagellin proteinleri, hem amino asit sekansları hem de boyutları baz alınarak N-terminal domain, C-terminal domain ve merkez bölge olmak üzere üç bölgeye ayrılırlar. Bu bölgeleri ayıran belirli bir çizgi yoktur. Fakat N-terminal ve C-terminal domainler

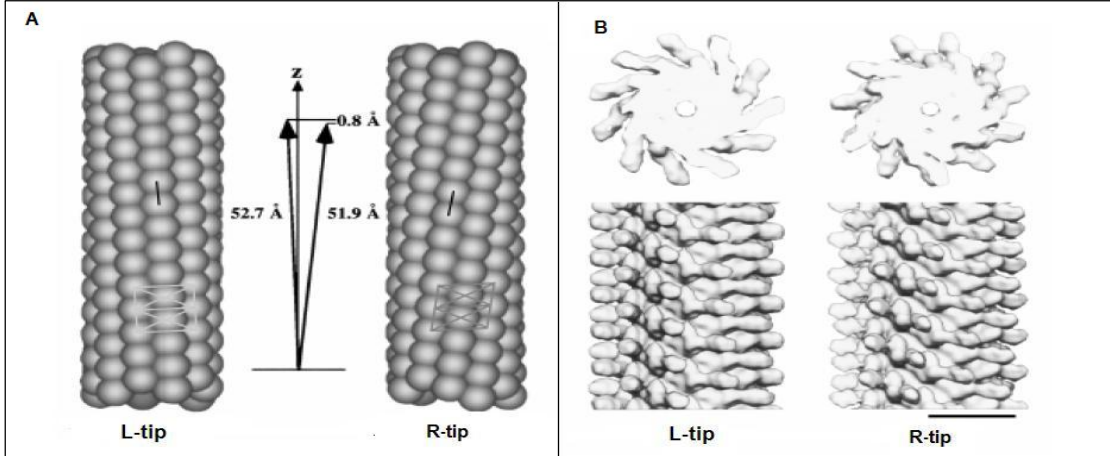
genellikle proteinin ilk 100 ve son 50 amino asiti ile temsil edilirler (Şekil 5) (Winstanley ve Morgan, 1997).



Şekil 5. Flagellin geninin yapısal görünümü

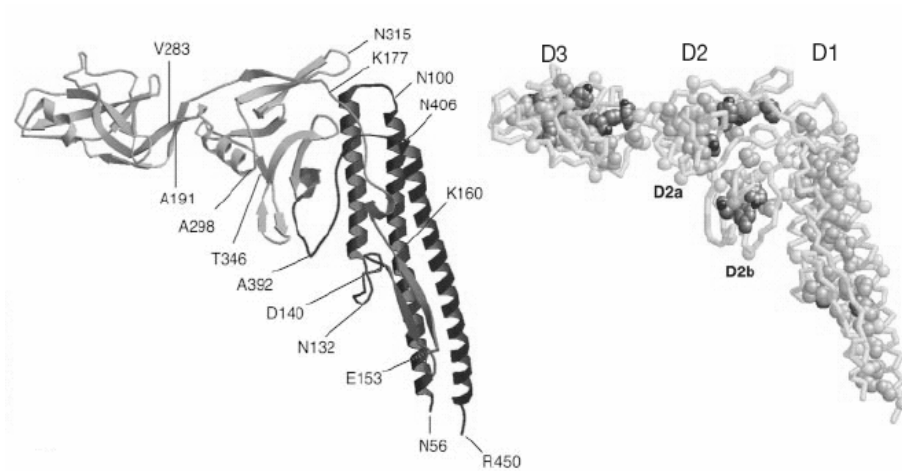
Bu bölgeler farklı bakteri türlerinde yüksek derecede korunmuş bölgelerdir (Winstanley ve Morgan, 1997). Merkez bölge ise N- terminal ve C-terminal bölge arasında kalan kısımdır ve farklı türlerin flagellin proteinlerinde 276 amino asitten 575 amino asite kadar uzanan değişik büyüklüklerde olabilir (Wilson and Beveridge, 1993). N-terminal ve C-terminal bölgelere göre daha az korunmuş olan Merkezi Bölgenin flagellin proteininde yapısal bir fonksiyonu yoktur fakat Merkez bölgenin Flajellanın antijenik değişkenliğinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Winstanley ve Morgan, 1997). N ve C-terminal domain bölgelerinde delesyonlar yapılarak gerçekleştirilen deneyler göstermiştir ki; mutant suşların Flajellar filamentinde ya yapısal deformasyonla meydana gelmekte ya da filamentin montajı gerçekleştirilememektedir (Homma vd., 1987).

Filamentin montajında flagellin altbirimleri sıkı bir yapı oluşturmak için birbirini sıra dizilirler ve her 2 dönüşte yaklaşık 11 altbirim vardır. Bu yapı protofilament olarak adlandırılır. Bununla birlikte protofilamentlerin dizilim konfigürasyonu filamenti L-tipi (Left: sol sarmallı) ve R-tipi (right: sağ sarmallı) olmak üzere 2 farklı yapıya ayırır. L-tip filamentte dönüş mesafesi 52,7 Å iken R-tip filamentte dönüş mesafesi 51,9 Å dur. Bu da göstermektedir ki; flagellin alt birimleri R tip protofilamentte daha sıkı paketlenmektedirler (Şekil 6) (Keiichi, 2004).



Şekil 6. L ve R tip protofilament yapısının gösterimi. A, L ve R tipi protofilamentler arasında mesafenin şekilsel gösterimi. B, L ve R tip filamentlerin 3D elektron yoğunluk haritası (çözünürlük 10 Å, bar 100 Å).

Flagellin proteininin atomik yapısının aydınlatılması için tasarlanan bir araştırmada R-tip *Salmonella* flagellin proteini fragmenti kristalize edildi. Daha sonra geliştirilen kristalografik teknikler ile 2 Å çözünürlükte atomik model elde edildi. Bu fragment D1, D2 ve D3 olarak işaretlenen 3 farklı bölgeden oluştuğu gözlemlendi. Bu fragmentin bir bumerang görünümde olup 70 Å uzunluğunda ve merkezde 20 Å genişliğindedir (Şekil 7) (Samatey vd., 2001).



Şekil 7. Flagellin proteininin 3 boyutlu yapısı

1.3. Hücrede Yüksek Seviyede Ekspres Edilen Genler ve Regülasyonları

Prokaryot genomlardaki yüksek gen ekspresyonunun oluşması genellikle üç kriterden en az birinin varlığını gösterir. Bu kriterlerden ilki güçlü promotor sekanslarıdır. Güçlü promotor sekansları DNA'ya bağlanan spesifik bağlanma faktörleri ile ilgilidir. İkinci olarak genin güçlü bir Shine Dalgarno (SD) ribozom bağlanma sekansına sahip olmasıdır. Son kriter ise genin en uygun kodon kullanımını sergilemesidir (Karlin ve Mrazek, 2000).

Translasyon aşamasının ilk adımı olan ribozoma bağlanma aşamasında mRNA'nın 5' ucunda yer alan SD sekansıdır ve bu sekans translasyonun başlaması için bir sinyal olarak bilinir. Bu sekans 16S rRNA'da bulunan tamamlayıcı anti-SD sekansı ile bağlanarak translasyonun başlamasında büyük bir rol oynar. SD sekansları GGAGG sekanslarına sahip bir kor kısmı içerir. Oysaki çoğu SD sekansında bu kor kısmında ufak farklılıklar vardır ve bu durum 16S rRNA'nın 3' ucunda bulunan tamamlayıcı anti-SD sekansı ile farklılık gösterebilir. SD sekansının etkinliği tamamlayıcı anti-SD sekansı ile potansiyel baz eşleşmesi ve başlama kodonu ile arasındaki mesafe ile belirlenir. Genellikle başlama kodonu ve SD sekansları arasında 5 ile 13 baz vardır. En uygun aralık *E. coli* için 8-10 baz arasındadır. *B. subtilis* AGGAGG şeklinde açık bir SD sekansına sahiptir (Osada vd., 1999; Ma vd., 2002).

Translasyon uzama aşamasının kodon kullanımı sıklığından etkilendiği ileri sürülmektedir. Amino asitlerin çoğu bir veya daha fazla kodon tarafından kodlanır. Sinonim (eş) olarak adlandırılan bu kodonların genellikle üçüncü bazı birbirinden farklıdır. Sinonim kodonlar hücre tarafından aynı frekansta kullanılmazlar. Bunların kullanımı farklı genomlarda ve bazen aynı genomda bile farklılık gösterir. Yapılan çalışmalar tercih edilen kodonları taşıyan mRNA'ların, tercih edilen kodonları taşımayan mRNA'lara göre daha hızlı ve daha çok ekspres edildiklerini göstermiştir. Kodon kullanım derecesinin gen ekspresyon seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Yüksek ekspres edilen genler, düşük frekansta ekspres edilen genlere göre daha fazla tercih edilen kodonu kullanma özelliği gösterirler (Ermolaeva, 2001).

Prokaryot hücrelerde gen ekspresyonu ve protein bolluğu çeşitli seviyelerde regüle edilir. Bu seviyeler *i*) transkripsiyonun başlangıcı (promotorun gücü, promotor biçimi, transkripsiyonel faktörler) *ii*) transkripsiyon sonlanması (mRNA'nın kararlılığı ve katlanması) *iii*) kodon kullanımı *iv*) translasyon başlangıcı ve uzama *v*) protein katlanması ve degradasyonu (Karlin ve Mrazek, 2000).

1.4. Bakterilerde Transkripsiyonel Seviyede Gen Regülasyonu

Gen regülasyon prensiplerinin çoğu bakteriyel hücreler üzerindeki çalışmalar ile geliştirilmiştir, özellikle de *E. coli* en çok kullanılan model organizmadır (Helmann, 2004). Bakteriler normal hücre fonksiyonları veya çevresel değişikliklere adaptasyon için gerek duydukları binlerce farklı protein kodlar. Bakteri hücreleri bu proteinlere aynı zamanda ve aynı miktarda ihtiyaç duymazlar. Bundan ötürü gen ekspresyonunun regülasyonu bakterilere yaşam çemberlerinde veya değişen dış ortamlara adaptasyonlarında gerekli olan proteinlerin üretimini kontrol etme imkanı sağlar. Gen ekspresyonunun transkripsiyon ve translasyon aşamaları boyunca bir çok adımda farklı regülasyon mekanizmaları vardır. Gen ekspresyonunun ilk adımı, DNA'dan RNA'ya genetik kodun çevrimi olan transkripsiyon aşamasıdır ve gen regülasyonunda en göze çarpan adımdır. Bu adımda DNA'ya bağımlı RNA polimeaz (RNAP) anahtar enzimdir. RNAP, kalıp DNA'dan RNA'yı kopyalayan bir enzimdir (Wosten, 1998).

Bakteriyel hücrelerde, çoğu gen regülasyonu transkripsiyonel seviyede gerçekleşir. Ekspres edilen genler, aktif olarak transkripsiyona ve translasyona uğrarlar. RNAP'ın aktivitesini kontrol için rol oynayan faktörlerin çoğu gen regülasyonunun merkezidir. Bu regülatörler, aktivatör proteinleri, represör proteinleri ve σ faktörleridir (Helmann, 2004). DNA'ya bağlanan represör ve aktivatörler gibi proteinler, transkripsiyonun verimini önemli derecede etkileyebilmesine rağmen, transkripsiyon reaksiyonunun spesifikliği RNA polimeraz enzimi (RNAP) ve promotor bölgesi arasındaki etkileşimine dayalıdır (Haldenwang, 1995).

1.5. Prokaryotlarda Promotor Yapısı ve Tanınması

Prokaryotlarda tanımlanan promotor bölgesi tipik olarak +1 olarak isimlendirilen RNA'nın sentezinin başladığı noktanın upstream bölgesindeki DNA sekansları olarak karakterize edilir. Promotor transkripsiyon başlangıç noktasının 10 bp upstream bölgede 5'-TATAAT-3' benzer sekansları içeren ve -10 bölgesi olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir. Diğer bir korunmuş bölge ise -10 bölgesinden yaklaşık olarak 16-18 bp upstream bölgede bulunan (TTGACA) sekanslarına sahip ve -35 bölgesi olarak adlandırılan bir bölgedir. Promotor elementleri olan bu -35 ve -10 bölgeleri beraberce RNAP enziminin promoter bölgeyi tanınması için gerekli bilgiyi sağlar (Helmann, 2004). Bu promotor

elementlerinin yanısıra -15 ve -14. pozisyonlarda bulunan TG ikili nükleotidi gram pozitif bakterilerde oldukça korunmuştur fakat *E. coli* promotorlarında bu ikili nükleotidin korunmuşluğu daha azdır. Promotor yapısını oluşturan -10 ve -35 sekansları spacer olarak adlandırılan sıklıkla 16 ile 18 adet korunmamış nükleotitler ile birbirinden ayrılır. Promotor elementlerinin korunmuş sekanslarından sapma genellikle promotor aktivitesindeki düşüş ile sonuçlanır. Oysaki bazı prokaryotik promotorlar -35 elementinden yoksun olmasına rağmen eğer -10 bölgesinde TG nükleotitlerini içeriyorsa fonksiyonel olabilirler (Wosten, 1998).

Bazı *E. coli* promotorlarında -35 ve -10 elementlerine ilave olarak üçüncü bir önemli elementin olduğu belirlenmiştir. Upstream element veya UP element olarak isimlendirilen bu üçüncü element -35 elementinin hemen upstream bölgesinde yer alan A ve T nükleotitlerince zengin bir bölgedir. Güçlü promotorlar, -35, -10 ve UP elementlerinde birini veya birkaçını içeren zayıf promotora göre bu üç elemente de sahip oldukları ve böylece güçlü ekspresyon sağladıkları muhtemeldir (Busby ve Ebright, 1994).

Bakterilerde transkripsiyonun başlangıcı, çok adımlı bir prosedürdür. Bu adımdaki kilit nokta σ -faktör olarak bilinen faktörlerin bağlandığı RNAP holoenziminin promotor olarak bilinen spesifik DNA bölgesine bağlanmasıdır. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar göstermiştir ki σ -faktörleri, promotorun -35 ve -10 elementlerinin tanınmasından sorumludur (Wosten, 1998; Busby ve Ebright, 1994).

1.6. Bakteriye RNA Polimeraz Enzimi ve Transkripsiyon

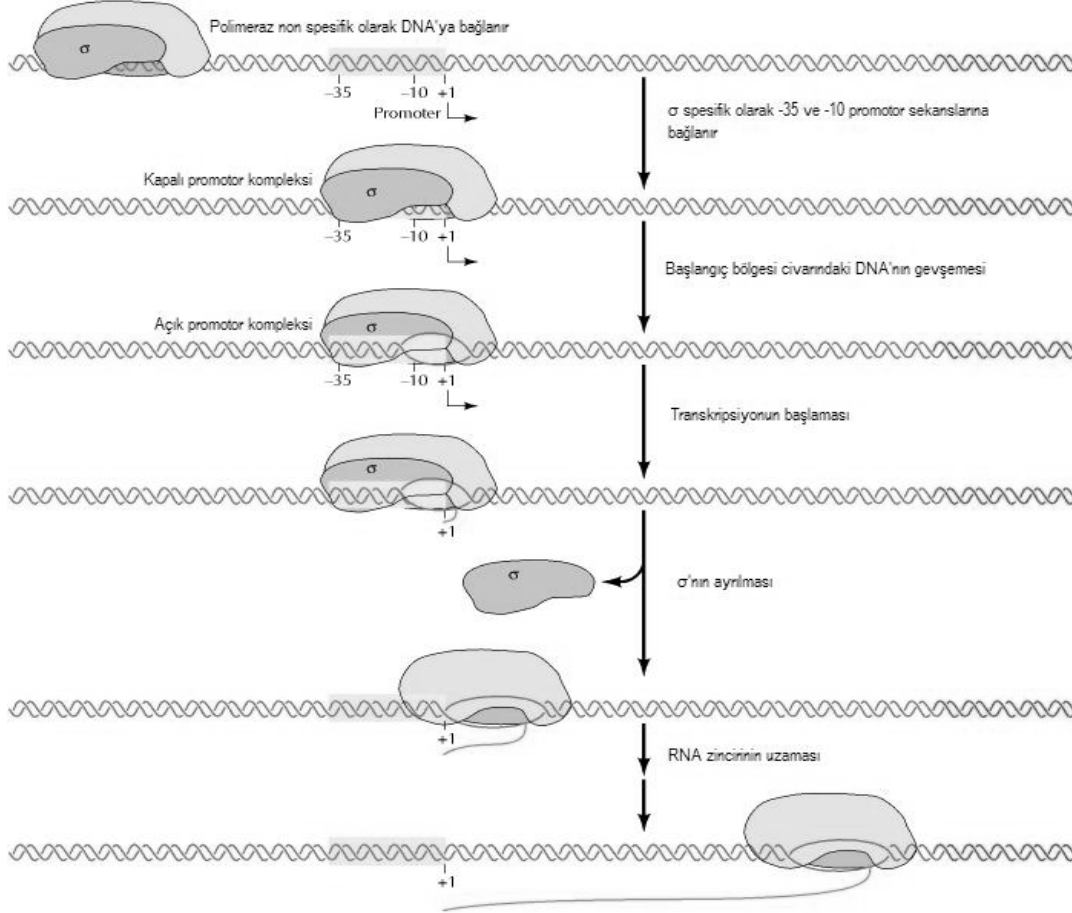
DNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi yaşayan tüm canlı organizmalarda gen ekspresyonu ve transkripsiyonunun anahtar enzimidir. Bakterilerde, RNAP çok alt üniteli bir protein kompleksidir. RNAP enzimi iki formda bulunur. Katalitik özellikli α I, α II, β , β' ve ω altbirimlerinden oluşan (toplam moleküler ağırlığı yaklaşık 400kDa) kor RNAP birinci form olup, bir kalıp DNA'dan RNA'ya doğru ribonükleotitlerin polimerizasyonunu katalizler. İkinci form ise, σ olarak bilinen spesifik bir alt ünite ile birleşerek oluşturulan RNAP holoenzim formudur ve bu form spesifik promotor bölgesini tanıma ve transkripsiyonu başlatabilme kabiliyetindedir. Kor enzim bölgesi σ olarak bilinen ikinci polipeptid zincirine geri dönüşümlü olarak bağlanır ve holoenzim yapısını oluşturur (Haldenwang, 1995; Borukhov ve Nudler, 2003). Kor RNAP, nükleosit trifosfat substratlarının varlığında bir kalıp DNA'dan RNA sentezleyebilme özelliğine sahiptir.

Oysaki, kor RNAP transkripsiyonu kendi başına başlatamaz. Transkripsiyonun başlatılabilmesi için, σ -faktör olarak bilinen ek bir polipeptide ihtiyaç vardır (Wosten, 1998).

Transkripsiyon süreci başlangıç, uzama ve sonlanma olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Başlangıç aşaması boyunca, holoenzim formu promotorun -35 ve -10 promotor elementlerine bağlanır. RNAP enziminin promotor bölgeyi tanıyarak bu bölgeye bağlanması transkripsiyonun ilk aşamasıdır ve bu aşamanın gerçekleşebilmesi için kor RNAP enziminin σ -faktör ile birleşerek holoenzim yapısını oluşturması gerekmektedir. Çünkü yalnızca holoenzim promoter bölgesini tanıyabilir. Holoenzimin σ altbirimi ve -35 ile -10 bölgeleri arasındaki spesifik etkileşim, RNAP'ın promotor bölgeye sıkıca bağlanmasını sağlar. Bu bağlanmada RNA polimeraz DNA'nın geniş bir kısmı (-40 ile +20 arasında yaklaşık 60 bp'lik bir bölge) ile etkileşir. Başlangıç aşaması boyunca, holoenzim bu iki korunmuş promotor bölgesine bağlanır ve kapalı promotor kompleksi olarak isimlendirilen bir form oluşturur. Bu bağlanmada RNAP yaklaşık olarak bir heliks dönüşü kadar (-10 ile +2 bölgeleri arası) DNA bölgesini denatüre eder ve sonuç olarak açık promotor kompleksi olarak isimlendirilen bir yapı oluşur (Şekil 8). DNA'nın denatürasyonunun başlayabilmesi için σ varlığı mutlaka gereklidir. DNA'nın denatürasyonu ile oluşan açık promotor kompleksi yaklaşık 9-12 nükleotitlik bir ilk RNA'nın sentezlenebilmesi için sabit tutulur. Birbirinden ayrılmış DNA zincir bölgesi transkripsiyon baloncuğu olarak isimlendirilir. İlk RNA'nın sentezlenmesiyle başlangıç aşamasından uzama aşamasına geçiş yapılır. Bu geçiş, σ alt biriminin holoenzim RNAP-DNA kompleksinden ayrılması ile oluşan konformasyon değişikliği ile belirlenir. Sigma alt biriminin ayrılması, eş zamanlı olarak güçlü bir uzama kompleksi oluşumuna yol açar (Hermann, 2004; Brukhov ve Nudler., 2003).

Uzama aşamasında RNA zincirinin uzatılabilmesi için ribonükleotit trifosfatların varlığına gerek duyulur. Uzama aşaması boyunca kalıp DNA RNAP'ın aktif bölgesi aracılığıyla işlenir. Sonuç olarak transkripsiyon balonu aktif bölgeye giren kalıp DNA'nın erimesiyle aşağı kısımlarına doğru yayılır. Açılan bu kalıp DNA zincirinden mRNA sentez edilmeye devam eder ve aktif bölgede birbirinden ayrılan komponenter DNA zincirleri tekrar birbiri üzerine yapışır. Kalıp DNA, RNAP ve uzayan RNA zincirini içeren kompleks sıklıkla 'üçlü kompleks' olarak isimlendirilir. Uzama aşamasında RNAP bazen uzama faktörleri olarak bilinen ek protein faktörleri ile ilişkili olabilir. Genellikle RNAP enzimi

sonlanma yapısını veya faktörünü fark edinceye kadar RNA zinciri RNAP tarafından sentezlenmeye devam eder (Helmann, 2004).



Şekil 8. Transkripsiyon başlangıç aşamasında kapalı ve açık promotor komplekslerinin oluşumu

Transkripsiyonun sonlanma aşaması da, başlangıç aşaması gibi gen ekspresyonunun kontrolü için önemlidir. Bakterilerdeki transkripsiyon sonlanma mekanizmalarından biri rho-bağımsız veya gerçek sonlanmadır. Bu süreç mRNA sekansındaki sekonder yapı formasyonu ile gelişir. Bu sekonder yapı yaygın mRNA sonlanma motifi ile ayırt edilir. Bu motif yüksek guanin ve sitozin içeren bir kökle oluşan stem-loop yapısıdır. Bu stem-loop yapısı urasilce zengin bir bölge ile takip edilir. Bu yapı transkripsiyonun sonlanmasını sağlayacak şekilde görev yapar ve kor RNAP üçlü kompleksten ayrılır. Diğer bir durumda

ise rho faktör olarak bilinen bir protein RNA'nın yapılandırılmamış bir bölgesine bağlanır ve transkripsiyonun sonlanmasını tetikler (Ermolaeva vd., 2000; Helmann, 2004).

1.7. Sigma (σ) Faktör

Transkripsiyon aşamasının en önemli elemanı olan σ -faktörü, evrimi boyunca çok sıkı bir şekilde korunmuştur. Genel olarak tüm σ -faktörler belirli özellikleri paylaşırlar. Hepsi holoenzim formunu oluşturmak için belirli bağlanma bölgelerinden kor RNAP'a bağlanırlar. σ - faktörün diğer bir özelliği ise, holoenzimin bağlanabileceği ilgili promotor bölgesini belirleme kabiliyetidir. İşte bu özelliğinden dolayı σ -faktörler çokça incelenmiştir. Aynı zamanda σ -faktör, transkripsiyonun başlangıç aşaması için kesinlikle olması gereken DNA'nın denatürasyonu adımının başlanmasında rol oynar (Helmann, 2004).

Bakterilerin çoğu, farklı korunmuş sekanslara sahip promotor bölgelerine bağlanacak RNAP holoenzimlerini oluşturmak için, birçok farklı σ -faktörü sentezlerler. σ -faktörlerindeki bu çeşitlilik, bakteriye spesifik çevresel baskılayıcılara cevap için, gen regülasyonu sağlamasının yanısıra temel gen ekspresyonunun devam ettirmesini de sağlar (Wosten, 1998).

Bakteriyel σ -faktörleri protein sekans benzerlikleri temel alınarak σ^{70} ve σ^{54} familyaları olarak iki gruba ayrılabilirler. Bakterilerde σ -faktörlerinin büyük çoğunluğu σ^{70} familyasına aittir. Tüm bakteriler yapısal ve fonksiyonel olarak altgruplara ayrılmış σ^{70} familya üyesi faktörlerden bir veya daha fazla içerirler. Bu faktörler belirli büyüme şartları altında spesifik fonksiyonlar için gerekli genlerin ekspresyonunu kontrol ederler. Örneğin bu genler strese cevapta, harekette, spor oluşumunda, spesifik besin maddelerinin alınımı ve salınımında veya antibiyotik oluşturulmasında gereklidirler. Çoğu bakteri σ^{54} familyası faktörüne de sahiptir. Yalnızca bir grup σ faktöre sahip olan σ^{54} familyası, belirli büyüme şartlarında gerekli değildir (Gruber ve Gross, 2003; Wosten, 1998).

1.7.1. σ^{70} - Familyası

Bakteriyel σ^{70} protein familyası fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre 3 farklı gruba ayrılır.

1.7.1.1. Grup-1 Temel σ -faktörleri

Temel σ -faktörlerini içeren Grup-1 tüm bakterilerde gösterilmiştir. Bunlar bakteriyel büyümede ekspres edilen çoğu genin transkripsiyonundan sorumludurlar ve hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için gereklidirler. Bakteri türlerinde yalnızca bir temel σ -faktörünün varlığı gösterilmiştir. Bu temel Grup-1 σ -faktörü *E.coli*'de *rpoD* geni tarafından kodlanan ve σ^{70} olarak bilinen, *Mycobacterium spp*'de *mysA* tarafından kodlanan, *Streptomyces spp*'de *hrdB* geni tarafından kodlanan, *B. subtilis* ve diğer Gram pozitif organizmalarda *sigA* geni tarafından kodlanan ve σ^A olarak bilinen proteinlerdir (Tablo 1). *E. coli* ve *B. subtilis*'de temel σ -faktörü tarafından tanınan promotor bölgesi sekansları incelendiğinde, bu sekansların çok benzer olduğu bulunmuştur. Diğer çoğu bakterilere ait temel σ -faktörleri tarafından tanınan promotor bölgeleri sekanslarında çok benzer olduğu yapılan sonraki çalışmalar ile açığa çıkarılmıştır. Bu promotor sekansları -10 bölgesindeki TATAAT ve -35 bölgesindeki TTGACA sekansları ile karakterize edilir (Wosten, 1998).

1.7.1.2. Grup-2 Temel benzeri σ -faktörleri

Bu grupta yer alan σ -faktörleri, bakterinin büyümesi için gerekli değildir. Bu grupta yer alan σ -faktörlerinin tanıdıkları promotor sekansları Grup-1 ile yüksek benzerliğe sahiptir. Özetle bu grupta yer alan σ -faktörleri Grup-1 ile benzer promotor sekanslarını tanımlarına rağmen, hücre büyümesi için gerekli değildirler ve bu özelliğinden dolayı Grup-1'den ayrılırlar. Enterobakterler, yüksek GC oranına sahip Gram pozitif bakteriler ve siyanobakteriler Grup-2'ye ait σ -faktörleri içerirler (Tablo 1). Enterobakterler ve *Pseudomonas*'lar bakteriyel büyüme fazlarından sabit faza spesifik olarak bilinen *RpoS* tarafından kodlanan σ^S Grup-2 σ -faktörlerindedir. Siyanobakteriyel Group-2 σ -faktörleri, *Anabaena sp.* ve *Synechocystis sp.*'deki *SigB* ve *SigC* genleri tarafından kodlanan faktörlerdir. Yüksek GC oranına sahip Gram pozitif bakterilerde bulunan Grup-2 σ -faktörler ise *Streptomyces spp.*'deki *hrdA*, *hrdC*, *hrdD* ve *hrdE* genleri tarafından kodlanan proteinlerdir. Ayrıca *Corynebacterium glutamicum*'da bulunan ve *sigB* geni tarafından kodlanan proteinde bu grupta yer alır (Lonetto vd., 1992; Wosten, 1998).

1.7.1.3. Grup-3 Alternatif σ -faktörleri

Grup-3 σ -faktörleri alternatif σ -faktörler olarak da isimlendirilirler. Bu grup faktörleri, a.a sekansları bakımından temel σ -faktörlerinden oldukça farklıdır ve spesifik regülonların transkripsiyonunu kontrol ederler. Bu grup içerisinde flajellar, ekstrasitoplazmik fonksiyonel (ECF), ısı şoku ve sporulasyon oluşumunu sağlayan genlerin kontrolünü gerçekleştiren σ -faktörler vardır (Wosten, 1998).

Flajellar yapıların sentezinden sorumlu olan σ -faktörü bu grup içerisinde yer alır. *E. coli* ve *S. typhimurium*'da fonksiyonel flajella oluşumunu sağlayan 50'den fazla gen vardır ve bu genler 3 sınıfa ayrılırlar. Enterobakterlere ait flajella genleri hiyerarşisinde ilk olarak *flhD* ve *flhC* Sınıf-1 genleri vardır ve bu genler Sınıf-2 genlerinin transkripsiyonunu kontrol ederler. Sınıf-2 ise flajella sentezinde bazal yapı ve çengel kısmı için ihtiyaç duyulan öncül genleri ve Sınıf -3 genlerin transkripsiyonunu kontrol eden σ -faktör *fliA* genini içerir. Bu gen ürünü σ^{28} olarak isimlendirilir. Sınıf-3 genler ise, σ^{28} proteini tarafından ekspresyonları kontrol edilen, çoğunlukla filamentin oluşumunda görev alan genlerdir. *B.subtilis*'teki σ^D fonksiyonu enterobakterlerdeki σ^{28} ile aynıdır. *B. subtilis* ve *E. coli*'de σ^{28} ve σ^D bağımlı promotor sekanslarının analizi bu σ -faktörlerini taşıyan RNAP enziminin -10 bölgesinde GCCGATAT ve -35 bölgede TAAA sekanslarını tanıdığını göstermiştir (Tablo 1) (Chen ve Helmann, 1992; Helmann, 1991; Helmann vd., 1988a).

Birçok bakteri türü spesifik dış çevre sinyalleri için cevapta fonksiyonel olan genlerin kontrolünü sağlayan bir dizi ECF σ -faktör içerirler. ECF σ -faktörleri *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Myxococcus xanthus*, *Streptomyces antibioticus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Photobacterium sp.* gibi birçok bakteride tanımlanmıştır. *B. subtilis* SigV, SigW, SigX, SigY ve SigZ olmak üzere 5 farklı ECF σ -faktörü içerir. ECF σ -faktörü tarafından tanınan promoter bölgeleri -10 bölgesindeki TCTRA ve -35 bölgesindeki GAACTT sekansları ile karakterize edilirler (Wosten, 1998; Huang vd., 1997).

Tablo 1. Çeşitli bakteriyel σ -faktörlerinin dağılımı ve tanıdıkları ortak promotor sekansları (Wosten, 1998).

Grup	Organizma, σ -faktör ismi ^a	Ortak promotor sekansları ^b		
		-35	Ara	-10
σ^{70}- Familya				
1. Temel σ -faktörleri	Gram-negatif bakteri, σ^{70} ; Gram-positif bakteri σ^A ; <i>Mycobacteria</i> , MysA; <i>Streptomyces</i> , HrdB	TTGACA	16-18	TATAAT
2. Temel benzeri σ -faktörleri				
2.1. Sabit faz σ -faktörleri	<i>Enterobacteria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <u>RpoS</u>			CTATACT
2.2. Siyanobakteriyel σ -faktörü	<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Anabaena</i> , SigB-E			
2.3. Yüksek GC içerikli gram-pozitif bakterilerin σ -faktörleri	<i>Mycobacteria</i> , MysB; <i>Corynebacteria</i> , SigB; <i>Streptomyces</i> , HrdA, HrdC-E			
3. Alternatif σ -faktörleri				
3.1. Flajellar σ -faktörleri	<i>Enterobacteria</i> , σ^{28} ; <i>Streptomyces</i> , <u>WhiG</u> ; <i>Bacillus subtilis</i> , σ^D	TAAA	15	GCCGATAT
3.2. ECF σ -faktörleri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , AlgU; <i>Escherichia coli</i> , FecI; <i>Myxococcus xanthus</i> , CarQ; <i>Mycobacteria</i> , σ^E ; <i>B. subtilis</i> , SigV-Z	GAACCT	16-17	TCTRA
3.3. Isı şoku σ -faktörleri				
3.3.1. σ^{32}	Gram-negative bacteria, σ^{32} ; <i>M. xanthus</i> , <u>SigB</u> ; <i>S. aurantiaca</i> , SigC	CTTGAAA	11-16	CCCATnT
3.3.2. σ^B	<i>B. subtilis</i> , <i>Stapylococcus</i> , σ^B ; <i>Mycobacteria</i> , <i>Streptomyces</i> , SigF	GTTTAA	12-14	GGGTAT
3.4. Spor oluşumu σ -faktörleri				
3.4.1. σ^H	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^H	AGGAWWT	12-14	RGAAT
3.4.2. σ^F	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^F	WGCATA	14-15	GGnRAYAMTW
3.4.3. σ^E	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^E	GKCATATT	13-15	CATACAMT
3.4.4. σ^G	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^G	TGAATA	17-18	CATACTA
3.4.5. σ^K	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^K	AC	16-17	CATAnAnTA
σ^{54}- Familya	<i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>			
		-24	Ara	-12
		TGGCAC	5	TTGCW

^a: sadece altı çizgili σ -faktörlerinin benzer ortak promotor sekansları verilmiştir.

^b: dejenerat kodlar: N; A,T,C veya G, R; A veya G, W; A veya T, Y; C veya T, M; A veya C, K; G veya T

Bakteri hücresi yüksek sıcaklık veya etanol, ağır metal, hidrojen peroksit gibi diğer çevresel streslere maruz kaldığı zaman, bu streslere cevap olarak hızlı bir şekilde ısı şok proteinleri sentezlerler. *E. coli* ve diğer birçok Gram negatif organizmada ısı şok proteinlerinin sentezlenmesinden sorumlu genler *rpoH* geni tarafından sentez edilen σ^{32} faktörü ile kontrol edilir. Değişik Gram negatif bakterilerin σ^{32} tarafından tanınan promotor bölgeleri incelendiğinde -10 bölgede CCCATnT ve -35 bölgede CTTGAAA sekanslarının korunmuş olduğu görülür (Tablo 1). *B. subtilis* ve diğer bazı Gram pozitif organizmalarda ise σ^{32} 'nin fonksiyonu *sigB* geni tarafından kodlanan σ^B faktörünce gerçekleştirilir. *B. subtilis*'in σ^B bağımlı promotorları analiz edildiğinde -10 bölgede GGGTAT ve -35 bölgede GTTTAA sekanslarının yüksek oranda korunduğu tespit edilmiştir (Yura vd., 1993; Hecker vd., 1996).

Çoğu bakteri elverişsiz şartlara cevap olarak fizyolojik değişikliklere maruz kalır. Bu elverişsiz şartlar boyunca ana hücre metabolik aktivitesini yüksek oranda indirgeyerek hayatta kalmaya çalışır. Oysaki *Bacillus*, *Clostridium* ve misel oluşturabilen *Streptomyces* cinslerine ait Gram pozitif mikroorganizmalar yüksek dirençli spor formlarına farklılaşırlar. Spor oluşumu *Bacillus* spp'de kompleks bir regülatör ağ ile kontrol edilir. Bu regülasyonda σ^H , σ^E , σ^K , σ^F ve σ^G olmak üzere 5 σ -faktör etkilidir (Tablo 1 ve Tablo2) (Haldenwang, 1995; Wosten,1998).

1.7.2. σ^{54} -Familyası

Bu familya temel σ^{70} -faktör familyasından yapısal ve fonksiyonel olarak oldukça farklıdır. Bu familya faktörlerinin proteinlerinde temel σ^{70} -faktör familyası proteinleri ile belirlenebilir herhangi bir protein benzerliği yoktur. Temel σ^{70} familyasının tersine, σ^{54} -faktörleri hemen hemen her zaman hedef promotor bölgelerini aktifleştirmek için ATP-bağımlı aktivatör proteinlere ihtiyacı olan kor RNAP'lar ile holoenzim yapısını oluştururlar (Borukhov ve Severino, 2002).

1.8. σ -Faktör- kor RNAP İlişkisi ve Promotor Bölgenin Tanınması

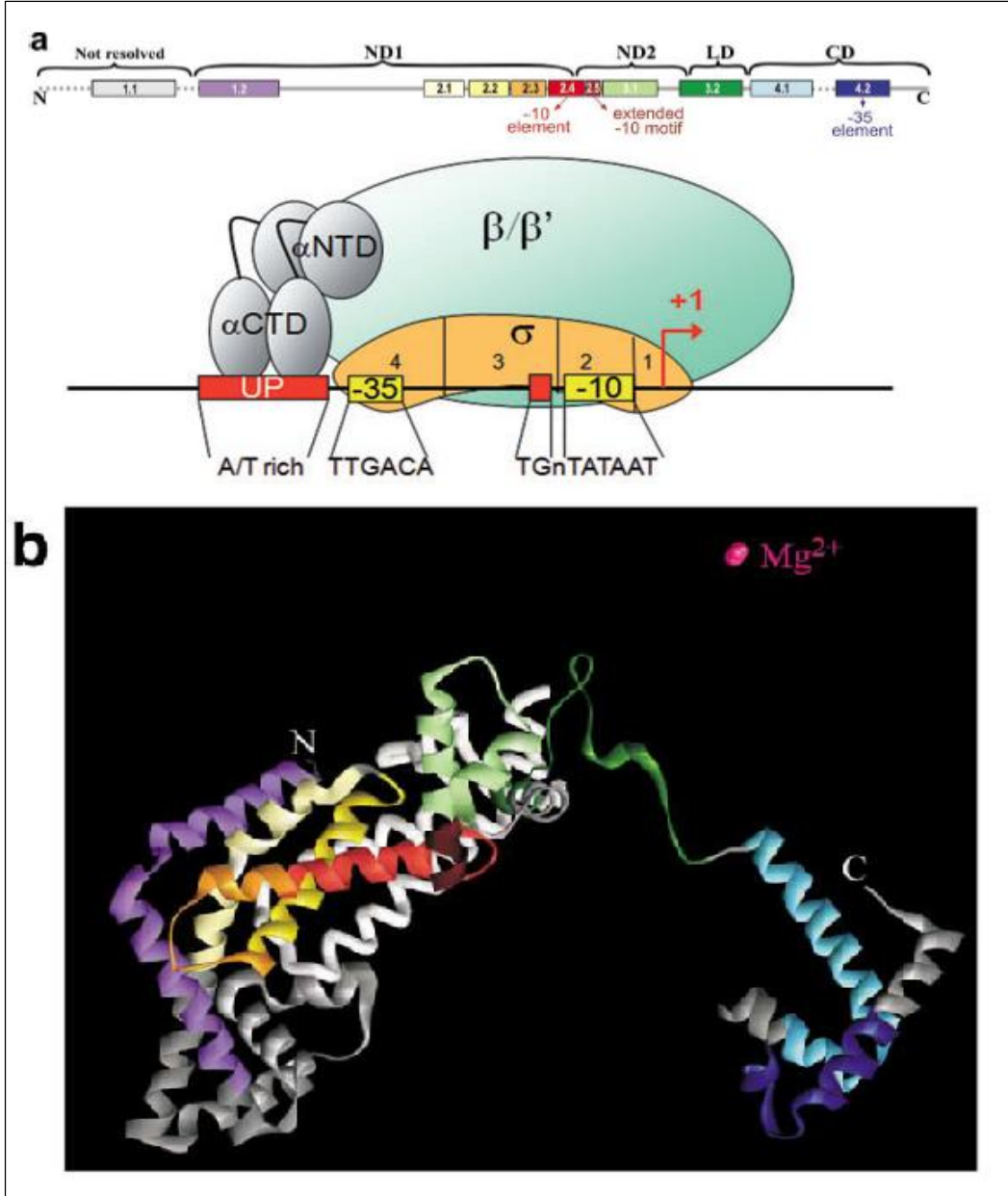
Farklı yapısal sınıflardaki Grup-1 σ -faktörlerinin tümü ve Grup-2 σ -faktörlerinin bir bölümünü protein sekansları bakımından karşılaştırıldıklarında 4 korunmuş bölgeye

ayrılırlar. Aynı zamanda *Thermus thermophilus* bakterisinin σ^{70} familya proteinleri üzerine yapılan araştırmalar göstermiştir ki, σ^{70} familyasının proteinleri esnek bağlayıcılar ile herbiri birbiri ile bağlantılı olan en az üç α -heliks domaininden oluşur. Evrimsel olarak korunmuş bu bölgeler yapısal olarak σ domainler ile kabaca uyuşmaktadır (şekil 9) (Brukhov ve Severino, 2002, Helmann, 2004).

İlk korunmuş bölge olan N-terminal Bölge-1 (ND1) en az korunmuş bölgedir. Serbest σ -faktörleri, DNA ile etkileşimini engelleyen bir otoinhibitör domaine sahiptir. Biyofiziksel veriler Alt bölge 1.1'in RNAP'ın DNA'ya bağlanma kanalını, bağlanabileceği bir promotor bulununcaya kadar tıkadığını göstermiştir. ND1 bölgesindeki diğer alt bölgelerin -10 promotor elementlerinin tanınması ve DNA yumuşama basamağının başlatılabilmesi için belirleyici bir rol oynar. Kor RNAP ile σ arasındaki birincil etkileşim, Bölge 1.2 ve 2.2 boyunca kuvvetli bir şekilde gerçekleşir. Evrimsel olarak RNAP'ın β' altbirimininde sarmal bobin elementi korunmuş ve Bölge 1.2 ve 2.2 ile benzer sekanslara sahiptirler. Holoenzim formasyonunda, Bölge 1.2 ve 2.2'in inhibisyonundan sorumlu bir enzim, diğer taraftan -10 promotor bölgeyi tanıyan β' sarmalının tanıma özelliğinide inhibe eder. Genetik, biyokimyasal ve yapısal çalışmalar göstermiştir ki korunmuş olan Bölge 2.4 -10 promotor bölgesinin tanınmasında rol oynar. Bir DNA kalıbından direkt olarak RNA'nın sentezlenebilmesi için, promotor DNA belirli bir bölgede yumuşamaya başlar. Katalitik olarak, bu erime -12 ve +3 pozisyonları arasında tüm -10 elementini içine alacak şekilde gerçekleşir. Bölge 2.3 korunmuş birkaç aromatik amino asite sahiptir ve bu a.a.'lerin DNA sarmalının açılmasında rol oynayabileceği düşünölmektedir (Wosten, 1998; Brukhov ve Severino, 2002).

İkinci N-terminal domain bölgesi (ND2) korunmuş alt bölgeler olan 2.5 ve 3.1'i kapsar. Bazı bakteriyel promotor, promotor elementlerinden -35 elementini içermeyizler. Bu özelliğe sahip bakterilerde promotorun -10 elementinin upstream bölgesine doğru spesifik bir 5'-TG-3' motifi bulunur. Genetik ve yapısal veriler Bölge 2.5 ve TG motifi arasındaki etkileşimin bu sınıf promotorun kompleks formunu oluşurmada sorumlu olduğunu göstermiştir (Busby, 2009; Brukhov ve Severino, 2002). Alt bölge 3.1 helix-turn-helix DNA'ya bağlanma motifi içerir ve alt bölge 3.2'den daha az korunmuştur (Wosten, 1998).

Üçüncü domain bölge ND2 ve C domainleri arasında bağlantı görevi yapar. Aynı zamanda, çoğu bakteriyel transkript purin nükleosit trifosfat ile başlar. Bölge 3.2'nin bu görevden sorumlu olabileceği düşünölmektedir (Brukhov ve Severino, 2002).



Şekil 9. σ -faktörün şematik ve yapısal görünümü. (a) σ -faktörünün yapısal domainlerini ve korunmuş bölgelerini göstermektedir. Evrimsel olarak korunmuş bölgeler renkli kutularda, yapısal domainler ise kutuların üstünde gösterilmiştir. Altkısmında RNAP holoenzimi tarafından promotor bölgesinin tanınması şematize edilmiştir. (b) *T. thermophilus*'ın σ^A -faktörünün RNAP holoenzimine bağlanmasının yapısal diyagramı. β' altbiriminin sarmal domainine bağlanma yeri beyaz olarak gösterilmiştir (Busby, 2009).

Dördüncü domain bölgesi olan C-domaini -35 promotor elementini tanıyan ve bazı transkripsiyon aktivator proteinleri için kontak bölgesi olarak hizmet eden alt birimleri

içerir. Bölge 4.1'in transkripsiyonun başlangıcı boyunca belirli transkripsiyonel aktivatörlere bağlandığı ileri sürülmektedir (Wosten, 1998). Genetik, biyokimyasal ve yapısal çalışmalar göstermiştir ki, bölge 4.2 – 35 promotor elementini tanıır (Brukhov ve Severino, 2002). Bu bölge promotor kompleksinin oluşumu için çoğu promotorlarda gereklidir. Bu bölge aynı zamanda RNAP enziminin diğer β altbirimine bağlanmadan sorumludur. β altbirimi mutasyon ile uzaklaştırıldığı zaman, RNAP holoenzim formu oluşabilir fakat Bölge 2 ve 4 arasındaki mesafe kısa kalır. Fakat aynı zamanda β -altbiriminden yoksun bu holoenzim -10/-35 promotor bölgelerini tanıyabilme özelliğini kaybeder. Bilindiği gibi β -alt birimi -10 promotor bölgesinin tanınmasında etkili değildir. Fakat domainler arası mesafenin değişimi bu sonucun ortaya çıkmasını sağlar (Brukhov ve Severino, 2002, Gruber ve Gross,2003; Helmann, 2004).

1.9. σ^D - Faktörü

Sigma-D faktörü σ^{70} familaysına ait Grup-3 içerisinde yer alan alternatif sigma faktördür ve geç logaritmik fazda aktif bir şekilde bulunur. En erken belirlenen σ -faktörlerinden biri olan σ^D (σ^{28}), 28,000 Da moleküler ağılığında bir proteindir. *B. subtilis*'te geç logaritmik fazda hücre başına 220 ± 50 molekül σ^D bulunduğu bildirilmiştir (Haldenwang, 1995).

σ^D 'nin biyolojik fonksiyonu, *B. subtilis* kromozomundan *sigD* geninin genetik mühendisliği metodları ile silinmesi sonucu belirlenmiştir. *sigD* mutant suşun büyüebildiği fakat büyümesinin filamentöz ve flajella oluşturamadan gerçekleştiği tespit edildi. Yapılan Western blot analizleri mutant suşta flagellin polipeptidinin olmadığını gösterdi. Bu sonuçlar σ^D 'nin flagellin gen transkripsiyonunu kontrol ettiğini ortaya çıkardı. *sigD* geni *B. subtilis* kromozomunda çengel ve bazal yapıların kodlandığı 26 kb'lık *flaA* operonunun yanında yer alır (Helman vd., 1988a,b).

σ^D hücrede geç ekspres edilen flajellar genlerin (bazal yapı tamamlandıktan sonra), birkaç kemotaksis proteininin ve otolizin genlerinin ekspresyonunu kontrol eder. Çoğu bakteride geç flajellar genlerin kontrolü σ^D homologları ile gerçekleşmektedir. Enterobakter familyası ve diğer bazı Gram negatif organizmalarda σ^D homologu σ^{28} olarak isimlendirilir. Yayınlanan ve yayınlanmayan veriler karşılaştırıldığında *B. subtilis* hücresinde 65 genin σ^D tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir. (Helmann ve Morgan, 2004).

σ^D tarafından kontrol edilen genlerin çoğu diğer σ -faktörleri tarafından tanınabilen promotor bölgelerince yoksundurlar ve bu genler ekspresyonları için tamamen σ^D 'ye bağımlıdırlar. σ^D tarafından ekspresyonları kontrol edilen genlerin promotor bölgeleri incelendiği zaman, TAAA-N₁₅-GCCGATAT motifinin kuvvetli bir şekilde korunmuş olduğu gözlemlenmektedir (Helmann, 1991).

sigD geninin regülasyonu *flgM* geninin ürünü olan spesifik anti- σ faktör ile gerçekleştirilir. Üstelik σ^D 'nin aktivitesi sentez seviyesinde de düzenlenebilir (Helmann ve Morgan, 2004). Anti- σ faktörler olarak bilinen proteinler transkripsiyonu negatif olarak düzenlerler. Anti- σ faktör ilgili σ -faktör ile geri dönüşümlü olarak birleşir. Bu birleşme σ -faktör transkripsiyonuna ihtiyaç duyuluncaya kadar devam eder. *S. tyhimurium*'da σ^{28} 'in aktivitesinin FlgM tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir. FlgM bir anti- σ faktör olarak rol oynar. Bu anti- σ faktör σ^{28} 'e bağlanır ve onun aktivitesini bazal yapı ve çengel kısmı membranda inşa edilinceye kadar bloklar. Bu bloklama hücrede flajellanın diğer yapıları inşaa edilip flagellin genine ihtiyaç duyulduğu zaman ortadan kalkar. *B.subtilis*'te anti- σ faktörünün, ECF, spor oluşumu ve stress σ -faktörlerinin düzenlenmesinde de rol aldığı tespit edilmiştir (Wosten, 1988).

1.10. Tezin Amacı ve Önemi

Flagellin hareketli bakterilerde en bol bulunan proteinlerden biri olmasına rağmen ekspresyonu için düşük miktarda da olsa σ^D (σ^{28}) faktörüne ihtiyacı vardır (Frederick vd., 1995). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarunca izole edilen *Aeribacillus pallidus* AC6 bakterisinde de bol miktarda flagellin proteini üretildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar özellikle *B. subtilis* gibi çevre orjinli bakterilerde flagellin geninin yüksek oranda sentez edildiğini göstermiştir (Karlin ve Mrazek).

Termofilik bakteriler hem termostabil enzimler hem de bir ekspresyon platformu olarak protein üretimi için önemli kaynaklar olabilirler. Hücrede bolca bulunan proteinlerin tanımlanmasının yüksek seviyede protein ekspresyonuna sebep olan doğal ekspresyon sinyallerinin diğer uygulamalar içinde önemli olabileceği düşünülerek, bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu düşünce çerçevesinde, son yapılan çalışmalar ile *Geobacillus* cinsinden ayrılan *Aeribacillus pallidus* AC6 bakterisinde yüksek seviyede ekspres edilen flagellin geninin

promotor analizi ve transkripsiyonel seviyede bu ekspresyona sebep olan faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroorganizmalar

2.1.1. *Aeribacillus pallidus* AC6

Aeribacillus pallidus AC6 bakterisi Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküller Biyoloji laboratuvarınca izole edildi. *Aeribacillus pallidus* AC6 flagellin geninin ve σ^D proteinin izolasyonu ve *hag* geni promotor bölgesinin analizinde kullanılmıştır.

2.1.2. *Bacillus subtilis* CU1065

B. subtilis CU1065 suşu, hücre genomuna integrasyon için konak hücre olarak kullanılmıştır. Bacillus Genetik Stok Merkezinden (BGSC) elde edilen bu suş SP β (-) trpC2 genotipik özelliklere sahiptir.

2.1.3. *Bacillus subtilis* HB4035

B. subtilis CU1065 hücresinden türevlendirilen bu suş Prof. John Helmann tarafından sağlanmıştır. Hücre *sigD* geni bakımından mutant olup, *sigD* geni bakterinin hücre genomundan silinmiştir. Bu bakteri kanamisin antibiyotığına karşı dirençlidir.

2.1.4. *Bacillus subtilis* JH642

B. subtilis JH642 kromozomu üzerinde RNAP'ın β' altbiriminin C-terminaline histidin kuyruğu eklenmiş rekombinant bir *Bacillus* suşudur. *pheA1*, *rpoC*::(His6-tag), Stp^R, *trpC2* fenotipik özelliğine sahip olan bakteri, spektinomisine dirençlidir ve Prof. John Helmann'dan sağlanmıştır.

2.1.5. *Escherichia coli* DH5 α

E. coli DH5 α suşu klonlama hücresi olarak kullanıldı. DH5 α *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* genotipik özelliklere sahiptir. JM101 Δ (*LacZ*)M15 genini içerir ve böylece rekombinat plazmitlerin mavi veya beyaz koloni görünümüne izin verir.

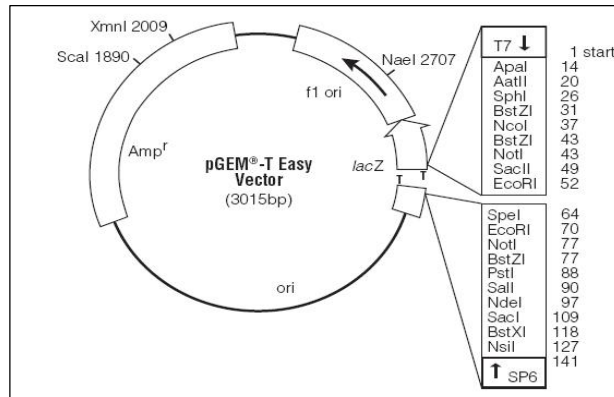
2.1.6. *Escherichia coli* BL21 (D3) LysS

Çalışmada *A. pallidus* AC6 σ^D proteinin ekspresyonu, F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (rB⁻ mB⁻), *gal*, *dcm* (DE3), pLysS (Cam^R) fenotipik özelliğe sahip *E. coli* BL21 (D3) LysS suşunda gerçekleştirildi. Ekspresyon için kullanılan BL21 hücresi John Helmann'dan sağlanmıştır.

2.2. Plazmitler

2.2.1. pGEM[®]-T Easy Klonlama Vektörü

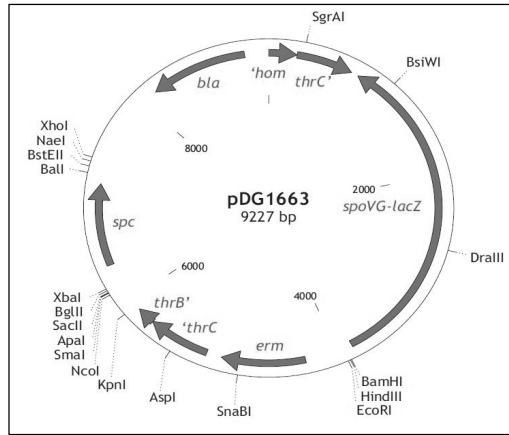
pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörü PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanıldı. pGEM[®]-T Easy PCR ürünlerinin klonlanması için uygun bir sistemdir. Bu vektör pGEM[®]-5Zf(+) vektörünün *EcoRV* ile kesimi ve 3' uçlarına terminal timin bazlarının ilavesi ile türetilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü

2.2.2. pDG1663 İntegrasyon Vektörü

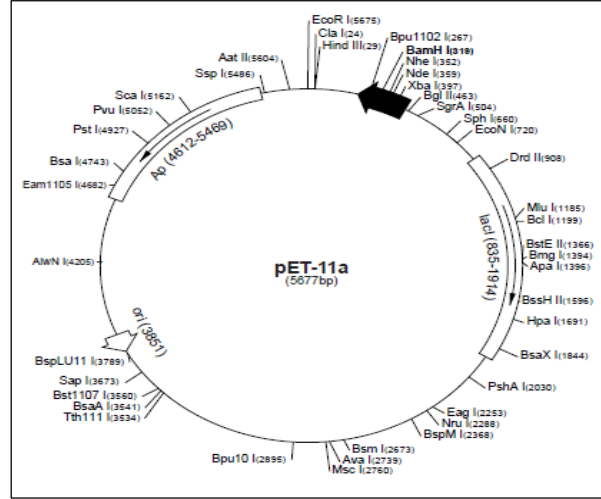
pDG1663 *Bacillus subtilis* 168 genomundaki *thrC* lokusuna *lacZ* füzyonunu integre etmek için dizayn edilen bir vektördür. Promotorsuz *lacZ* geni içeren bu vektörde, *lacZ* geninin önünde çoklu restriksiyon kesim bölgesi bulunmaktadır. Promotor bölgesini içeren fragmentler uygun kesim bölgeleri vasıtasıyla bu vektöre klonlanarak *lacZ* füzyon integrasyon vektörü oluşturulmuştur. Campbell tip integrasyon yöntemiyle *Bacillus subtilis* 168 hücre genomuna integre olan füzyon vektörü Eritromisin-Linkomisin direnci ile seçilir (Şekil 11).



Şekil 11. pDG1663 integrasyon vektörünün şematik görünümü

2.2.3. pET11a

Güçlü T7 RNA polimeraz promotor bölgesi içeren pET11a, yüksek seviyede protein ekspresyonuna izin verir. *sigD* geninin ekspresyonu için kullanılan bu vektör ampisilin direnç geni taşımaktadır (Şekil12).



Şekil 12. pET11a ekspresyon vektörünün şematik görünümü

2.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Antibiyotikler

2.3.1. Kullanılan Besiyerleri

2.3.1.1. Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar Besiyeri

Tripton	1 gr
Yeast ekstrakt	0,5 gr
NaCl	0,5 gr
ddH ₂ O	100 ml

Aeribacillus pallidus AC6 ve *E.coli* JM101 Luria Bertani Broth (pH 7) besiyerinde üretildi. Tripton, Yeast ekstrakt, NaCl Merck firmasından sağlandı. Buyyona istendiğinde % 1,2 agar ilavesi ile LB agar yapıldı.

2.3.1.2. Schaeffer's Sporülasyon Sıvı Besiyeri (SSB)

Nutrient Broth	8 gr
KCl	1 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 gr
MnCl ₂	0,002 gr
dH ₂ O	1000 ml

Besiyerinin pH'sı 7 olarak ayarlandıktan sonra otoklavlanır ve 50°C'ye kadar soğutulur. Daha sonra sırasıyla son hacimde 0,5 mM ve 0,001 mM CaCl₂ ve FeSO₄ ilave edilir.

2.3.1.3. Modified Competence (MC) Sıvı Besiyeri

MC Broth için, ilk olarak aşağıdaki stok solusyonlar hazırlanır ve belirtilen yöntemler ile sterilize edilir.

Solusyon	Sterilizasyon Yöntemi
1 M Potasyum fosfat tampon	Otoklav ile
1 M trisodyum sitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Otoklav ile
1 M Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	Otoklav ile
% 50 Glukoz	Filtre ile
% 50 Potasyum glutamat (KC ₅ H ₈ NO ₄)	Filtre ile
% 10 Kazein hidrolizat	Filtre ile
22 mg/ml demir amonyum sitrat (C ₆ H _{5+4y} Fe _x N _y O ₇)	Filtre ile (ışığa hassas)
2 mg/ml triptofan (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	Filtre ile (ışığa hassas)

Yukarıda belirtilen solusyonlar hazırlanır ve belirtilen yöntemler ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanır. MC besiyeri son konsantrasyonları aşağıda gösterildiği gibi olacak şekilde istenilen hacimde hazırlanır ve filtre ile sterilize edildikten sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklanır.

Ana solusyon	Final Konsantrasyon	50 ml için
1 M Potasyum fosfat buffer	100 mM	5 ml
1 M trisodyum sitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	3 mM	150 µl
1 M Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	3 mM	150 µl
% 50 Glukoz	% 2	2 ml
% 50 Potasyum glutamat (KC ₅ H ₈ NO ₄)	% 0.2	200 µl
% 10 Kazein hidrolizat	% 0.1	500 µl
22 mg/ml demir amonyum sitrat (C ₆ H _{5+4y} Fe _x N _y O ₇)	22 µg/ml	50 µl
2 mg/ml triptofan (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	50 µg/ml	1,25 ml
Steril dH ₂ O		46,7 ml

2.3.1.4. DSM (Different Sporulation Medium) Agar

Nütrient broth	8 gr
% 10 'luk (w/v) KCl	10 ml
% 12'lik (w/v) MgSO ₄ . 7H ₂ O	10 ml
1 M NaOH	500 µl
Agar	15 gr
dH ₂ O	1000 ml

Besiyerinin pH'sı 7 olarak ayarlandıktan sonra otoklavlanır ve 50 °C'ye kadar soğutulur ve aşağıdaki solusyonlardan belirtilen miktarlar eklenerek petri kaplarına dökülür.

1 M Ca(NO ₃) ₂	1 ml
0.1 M MnCl ₂	100 µl
1 mM FeSO ₄	1 ml

2.3.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar; Tris-HCl, Sukroz, Lizozim, Akrilamit, Bis-Akrilamit, Glisin, Trizma Base, Gliserol, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G-250, Kloroform, İsoamiloalkol, Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), Sodyum Asetat, Amonyum Asetat, IPTG (İsopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), X-Gal (5-bromo 4-chloro 3-indolyl beta D-galactopyranoside), Brom Fenol Blue, Agaroz, Sodyum dedosil sulfat (SDS), Metanol, Asetik asit, Ethanol, Etidyum bromür, orto-nitrofenil galaktosidaz, Sodyumbikarbonat, Sodyum fosfat, Potasyum klorür, Magnezyum sülfat, DTT, Triton X-100, Sodyum deoksikolat, Sodyum sarkosilyl, Magnezyum klorür Sigma; Amonyum persulfat, Beta-merkaptetanol, Glucose, Sodyum hidroksit, Kalsiyum klorür, Sodyum klorür Merck; Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri, tamponları ve BSA New England Biolab, dTTP, dATP, dCTP, dGTP Fermentas firmalarından sağlandı.

2.3.3. Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları aşağıdaki Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler	Stok mg/ml	Son µg/ml <i>Bacillus</i>	Son µg/ml <i>E.coli</i>
Eritromisin (% 95 ETOH)	1	1	-
Linkomisin (% 50 ETOH)	25	25	-
Kanamisin (dH ₂ O)	15	10-25	10-50
Ampisilin (dH ₂ O)	100	-	100
Spektinomisin	100	100	-
Kloramfenikol	10	10	30

2.4. *Aeribacillus pallidus* AC6 total protein profili

Nutrient broth besiyerinde büyüyen hücrelerden Dülger, (1997)'e göre protein izolasyonu yapıldı.

- Hücreler 250 ml flasklarda 30 ml LB broth besiyeri içerisinde 55°C de çalkalamalı su banyosunda büyütüldü.
- Kültürden 1 ml alınarak 10 000 rpm'de 2 dak santrifüj edildi.
- Pellet 300 µl TS tampon (50mM Tris-HCl pH 7, %10 sukroz) içerisinde çözüldü.
- Hacmin 1/20'si kadar 10 mg/ml lizozim ilave edildi.
- Karışım 30 dakika buzda bekletildi.
- En yüksek hızda 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe alınarak, total hücre proteini analizinde kullanıldı.

Protein konsantrasyonu Bradford, (1976) metoduna göre belirlendi. Total hücre protein bantları Laemmli, (1970) tarafından tanımlanan % 12'lik SDS-PAGE de gözlemlendi. Proteinler Coomassie brilliant blue R-250 boyasında 2 saat muamele edilerek boyandı ve yıkama solusyonları I ve II uygulanarak bantlar görüntülendi.

SDS-PAGE analizi ile belirlenen protein bantlarından çok yoğun olarak üretilen protein bandı belirlendi. Bu bant SDS-PAGE jelinden kesilerek çıkartıldı ve protein analizi için UMDNJ (University of Medicine & Dentist of New Jersey) Center of Advanced Proteomics Research laboratuvarına gönderildi ve MALDI-TOF analizi gerçekleştirildi.

Gelen protein sekansları NCBI Blast sitesi (URL-1, 2009) kullanılarak analizleri yapıldı.

2.5. AC6 *hag* Geninin oğaltılması

AC6 *hag* geninin belirli bir kısmının çoğaltılması için dejenerat primerler kullanıldı (Tablo 3). Bu primerler peptit analizi ile elde edilen flagellin proteininin korunmuş bölgelerinden yararlanılarak dizayn edildi.

Tablo 3. AC6 *hag* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Primer Kodu	Primer sekansı	Tm (°C)	Uzunluk (nt)
Dejenerat	FlaF1	GCNGGNGAYGAYGCNGCNGGNYTNGC	70,2	26
Dejenerat	FlaR1	GTNCCNARRTTRTTDATNGTRTGYTC	54,8	26
İnvers	FlaGpaF2	CATTCCAGTCCGCGAATTTGG	58,2	22
İnvers	FlaGpaR2	CGGAGCCAATAGTGGACAATC	56,9	21
İnvers	FlaGpaF3	GTTGGCGGTAAGTGTTTAACG	54,5	21
İnvers	FlaGpaF3.2	GTTCCTTTGTGTTGACCGATTGC	57,2	23
İnvers	FlaGpaR3	ACAACCTGGGAGCTACTCAG	54,3	21

N=A/G/C/T; Y=C/T; R=A/G; D=A/G/T; Tm= primer bağlanma sıcaklığı; nt=nkleotit

Genin belirli bir kısmını çoğaltmak için dejenerat primerler ve AC6 genomik DNA'sı kullanarak yapılacak olan PCR reaksiyonu karışımı 50 µl hacimde yapıldı. PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 4 ve Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 4. *hag* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
5X Taq DNA polimeraz Tampon	1X	10 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
10 mM dNTP mix	0,2 mM	1 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0,4 µM	2 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0,4 µM	2 µL
Template DNA	10-500 ng	1 µl
Taq DNA polimeraz		0,2 µl
Distile su		30,8 µl

Tablo 5. *hag* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü

Döngü	Zaman	Sıcaklık (°C)
1X	2 dk	94
36X	30 sn	94
	45 sn	56
	2 dk	72
1X	5 dk	72

İnvers PCR, çalışılan genin yalnızca içerisinde belirli bir sekans bölgesi biliniyorsa genin tamamını bulmak için yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonudur. Standart PCR yöntemi ile bir kısmı belirlenen *hag* geninin tamamını elde etmek için invers PCR yapıldı. İnvers PCR protokolü Ochman, (1988) tarafından tanımlanan şekilde gerçekleştirildi.

Çoğaltılan flagellin geninin içerisindeki restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri NEB Cutter V2.00 software (URL-2, 2009) programı kullanılarak belirlendi. Genin içerisinde bulunmayan restriksiyon endonükleaz enzimleri seçilerek genomik DNA kesimi (Tablo 6) gerçekleştirildi. Restriksiyon kesim reaksiyonu 37°C 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ısı ile enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 6. İnvers PCR için genomik DNA kesimi

İçerik	Hacim
10X restriksiyon tampon	5 µl
2U enzim	X
BSA*	1 µl
Genomik DNA	20 µl
Distile su	30µl tamamlanır

*: gerekli reaksiyonlarda

Self-ligasyon işlemi Tablo 7’de verildiği gibi gerçekleştirildi (Tablo 7). Örnekler 16°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra etanol presipitasyonu ile enzim inaktivasyonu sağlandı.

Tablo 7. Self- Ligasyon protokolü

İçerik	Hacim
10X ligasyon tamponu	40 µl
2U enzim	X
Kesilmiş DNA	10 µl
Distile su	400 µl tamamlanır

İnaktivasyondan sonra örnekler genin bilinen bölgesine komplementer olarak dizayn edilen invers PCR primerleri (Tablo 3) kullanılarak invers PCR gerçekleştirildi. İnvers PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 8 ve 9’da verilmiştir.

Tablo 8. İnvers PCR için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
5X Taq DNA polimeraz tamponu	1X	10 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
10mM dNTP mix	0,2 mM	1 µl
Forward primer (10 pmol/ µl)	0,2 µM	1 µl
Reverse primer (10 pmol/ µl)	0,2 µM	1 µL
Template DNA		10 µl
Taq DNA polimeraz		0,5 µl
Distile su		23,5 µl
Toplam		50

Tablo 9. İnvers PCR protokolü

Döngü	Zaman	Sıcaklık (°C)
1X	2 dk	94
36X	1 dk	94
	1 dk	54
	2,5 dk	72
1X	5 dk	72

PCR ürünlerin görüntülenmesi ve ayırımı için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Genel olarak PCR ürünleri için %1'lik, plazmitler için %0,8'lik jel kullanıldı. Agaroz gerekli miktarlarda tartılıp 1X TAE tamponu içerisinde çözüldü ve sıcaklığı düşürülerek içerisine etidyum bromür ilave edildi. Agaroz jel 110 Volt da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmentleri UV ışığı altında görüntülendi.

2.5.1. AC6 *hag* Geni İçin Filogenetik Çalışmalar

AC6 *hag* geninin diğer flagellin genleri ile karşılaştırılması için filogenetik ağaçlar Mega 4.0 (Tamura vd., 2007) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçlar farklı filumlara ait 33 bakterinin bilinen flagellin protein ve nükleotit sekansları kullanılarak çizildi (Tablo10).

Tablo 10. GenBank^a'tan sağlanan flagellin genleri ve protein sekansları

Türler	GenBank		a.a Sayısı ^b	Taksonomik Filumlar
	Kabul Numaraları	Nükleotit Protein		
<i>Agrobacterium tumefaciens (flaA)</i>	AE00789	CAA65300.1	306	Alphaproteobacteria
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	NC_009922	YP_001514045	270	Firmicutes
<i>Aquifex pyrophilus</i>	U17575	AAA88923.1	501	Aquificae
<i>Azospirillum brasilense (laf1)</i>	U26679	AAA86521.1	414	Alphaproteobacteria
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP000560	ABS75581.1	276	Firmicutes
<i>Bacillus licheniformis</i>	NC_006270	YP_080862	310	Firmicutes
<i>Bacillus pumilus</i>	NZ_ABRX0 1000001	ZP_03053344	299	Firmicutes
<i>Bacillus subtilis</i>	M26947	AAA22437.1	304	Firmicutes
<i>Bacillus thuringiensis (flaB)</i>	X67139	CAG25466.1	280	Firmicutes
<i>Bartonella bacilliformis</i>	L20677	AAA22899.1	375	Alphaproteobacteria
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	L13034	AAA22977.1	391	Betaproteobacteria
<i>Borrelia burgdorferi</i>	X16833	CAA34735.1	336	Spirochaetes
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	X63513	CAA45081.1	285	Spirochaetes
<i>Burkholderia cepacia</i>	AF011370	AAC38199.1	384	Betaproteobacteria
<i>C. saccharolyticus</i>	NC_009437	YP_001180461	273	Firmicutes
<i>Campylobacter jejuni (flaA)</i>	J05635	AAA23024.1	576	Epsilonproteobacteria
<i>Caulobacter crescentus</i>	J01556	NP_421770.1	424	Alphaproteobacteria
<i>Clostridium botulinum</i>	AF461538	AAM75948.1	452	Firmicutes
<i>Clostridium novyi</i>	AB058936	BAB87734.1	270	Firmicutes
<i>Escherichia coli</i>	M14358	AAA23950.1	498	Gammaproteobacteria
<i>Exiguobacterium sp.</i>	NC_012673	YP_002885291	274	Firmicutes
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	NC_006510	YP_148984.1	297	Firmicutes
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	AB453704	BAH80327	271	Firmicutes
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	NC_009328	YP_001127157	275	Firmicutes
<i>Helicobacter pylori (flaA)</i>	X60746	CAA43148.1	510	Epsilonproteobacteria
<i>Legionella pneumophila</i>	X83232	CAA58234.1	475	Gammaproteobacteria
<i>Listeria monocytogenes</i>	X65624	CAA46578.1	287	Firmicutes
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	CP000817	ACA38766.1	270	Firmicutes
<i>Proteus mirabilis (fliC1)</i>	L07270	AAA62396.1	365	Gammaproteobacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M57501	AAA63458.1	394	Gammaproteobacteria
<i>Rhizobium meliloti (flaA)</i>	M24526	AAA26277.1	395	Alphaproteobacteria
<i>Roseburia cecicola</i>	M20983	AAA26411.1	293	Firmicutes
<i>Salmonella typhimurium</i>	D13689	BAA02846.1	495	Gammaproteobacteria
<i>Serpulina hyodysenteriae</i>	X63513	CAA45081.1	285	Spirochaetes
<i>Serratia marcescens</i>	M27219	AAA26556.1	351	Gammaproteobacteria
<i>T. tengcongensis</i>	NC_003869	NP_622175	276	Firmicutes
<i>Treponema phagedenis</i>	M94015	AAC28741.1	286	Spirochaetes
<i>Vibrio parahaemolyticus (flaA)</i>	AF069392	AAC27801.1	376	Gammaproteobacteria
<i>Wolinella succinogenes</i>	M82917	AAA61598.1	518	Epsilonproteobacteria
<i>Yersinia enterocolitica</i>	L33467	AAA93103.1	358	Gammaproteobacteria

^a: Sekanslar GenBank veritabanında mevcuttur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

^b: Nükleotit sırasından belirlenen protein sekanslarıdır. Filogenetik ağaçlar için tüm flagellin protein sekansları kullanılmıştır.

2.6. Sigma-D (*sigD*) Geninin Çoğaltılması

sigD genini çoğaltabilmek için GenBank'ta var olan *sigD* genleri ve protein sekansları ClustalW analizi ile karşılaştırılarak gen içerisindeki korunmuş bölgeler tespit edildi. ClustalW analizinde kullanılan *sigD* genlerinin nükleotit ve protein Kabul Numaraları (Accession Number) Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. GenBank^a'tan sağlanan *sigD* nükleotit ve protein sekansları

Türler	GenBank		a.a Sayısı ^b	Taksonomik Filumlar
	Kabul Numaraları			
	Nükleotit	Protein		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AE007869	AAK88009		Alfaproteobakteri
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	CP000853	ABW19053.1		Firmicutes
<i>Aquifex aeolicus</i>	AE000657	AAC07229.1		Aquificae
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP000560	ABS73994.1		Firmicutes
<i>Bacillus licheniformis</i> *	NC_006270	YP_079041.1		Firmicutes
<i>Bacillus pumilus</i> *	NC_009848	YP_001486789		Firmicutes
<i>Bacillus subtilis</i> *	NC_000964	NP_389529		Firmicutes
<i>Bacillus thuringiensis</i>	X56696	CAA40024		Firmicutes
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NC_002927	NP_889079.1		Betaproteobakteri
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	CP001357	ACN82852.1		Spiroketler
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	CP000124	YP_333573.1		Betaproteobakteri
<i>Campylobacter jejuni</i>	AL111168	CAL34235		Epsilonproteobakteri
<i>Clostridium novyi</i>	CP000382	ABK61448.1		Firmicutes
<i>Escherichia coli</i>	U00096	AAC74989.1		Gammaproteobakteri
<i>Exiguobacterium sp.</i> *	NC_012673	YP_002887299		Firmicutes
<i>Geobacillus kaustophilus</i> *	NC_006510	YP_147099		Firmicutes
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> *	NC_009328	YP_001125219		Firmicutes
<i>Helicobacter pylori</i>	CP001072	ACD47881.1		Epsilonproteobakteri
<i>Legionella pneumophila</i>	CP000675	ABQ55187.1		Gammaproteobakteri
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	CP000817	ACA39177		Firmicutes
<i>Proteus mirabilis</i>	AM942759	CAR43378.1		Gammaproteobakteri
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AE004091	AAG04844.1		Gammaproteobakteri
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CP000143	ABA79201.1		Alfaproteobakteri
<i>Salmonella enterica</i>	AE006468	AAL20868.1		Gammaproteobakteri
<i>Serratia proteamaculans</i>	CP000826	ABV42040.1		Gammaproteobakteri
<i>T. pseudethanolicus</i>	CP000924	ABY94882		Firmicutes
<i>Treponema denticola</i>	AE017226	AAS13200.1		Spirochaetes
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BA000031	BAC60495.1		Gammaproteobakteri
<i>Wolinella succinogenes</i>	BX571661	CAE10670.1		Epsilonproteobakteri
<i>Yersinia enterocolitica</i>	AM286415	CAL12562.1		Gammaproteobakteri

^a: Sekanslar GenBank veritabanında mevcuttur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

^b: Nükleotit sırasından belirlenen protein sekanslarıdır. Filogenetik ağaçlar için tüm flagellin protein sekansları kullanılmıştır.

*: İşaretli türlerin Sigma-D protein sekansları dejenerat primerlerin dizaynı için kullanılmıştır.

ClustalW analizi sonucunda belirlenen korunmuş bölgelerden dizayn edilen dejenerat primerler (Tablo 12) yardımı ile genin bir kısmının çoğaltılması sağlanmıştır.

Tablo 12. *sigD* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Primer Kodu	Primer sekansı	Tm (°C)	Uzunluk (nt)
Dejenerat	SigDF2	AARTTYGAYACNTAYGCNTCNTTYMG	62	26
Dejenerat	SigDR2	GMRTGDATYTGNGADATNCKNGANGTNG	66	28
İnvers	SigDF3	CAGAGATAGGAAACGTGCTGAATTT	55.2	25
İnvers	SigDR3	CTTCCTTAGTCCGTC AAGAATGGCTC	59.1	27

N=A/G/C/T; Y=C/T; R=A/G; D=A/G/T; Tm= primer bağlanma sıcaklığı; nt=nükleotit

Dizayn edilen SigDF2 ve SigDR2 primerleri ve AC6 genomik DNA'sı kullanılarak 50 µl son hacimde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 13 ve Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 13. *sigD* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu karışımı

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)
5X Taq DNA polymerase Tampon	1X	10 µl
MgCl ₂	1.5 mM	3 µl
10mM dNTP mix	0,2 mM	1 µl
Forward primer (10 pmol/ µl)	0,4 µM	2 µl
Reverse primer (10 pmol/ µl)	0,4 µM	2 µL
Template DNA	10-500 ng	1 µl
Taq DNA polymerase		0,2 µl
Distile su		30,8 µl
Toplam		50

Tablo 14. *sigD* geninin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü

Siklus	Zaman	Sıcaklık (°C)
1X	2 dk	94
36X	30 sn	94
	45 sn	48
	1 dk	72
1X	5 dk	72

Çoğaltılan *sigD* geninin içerisindeki restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri NEB Cutter V2.00 software (URL-2, 2009) programı ile belirlendi. Genin içerisinde

bulunmayan restriksiyon endonükleaz enzimleri seçilerek genomik DNA kesimi (Tablo 6) gerçekleştirildi. Restriksiyon kesim reaksiyonu 37°C 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ısı ile enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

Daha sonra self-ligasyon aşaması gerçekleştirildi (Tablo 7). Örnekler 16°C bir gece inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra etanol presipitasyonu ile enzim inaktivasyonu sağlandı.

İnaktivasyondan sonra örnekler genin bilinen bölgesine komplementer olarak dizayn edilen invers PCR primerleri (Tablo 12) kullanılarak invers PCR gerçekleştirildi. İvers PCR reaksiyon karışımı ve protokolü Tablo 8 ve 9 da verilmiştir.

2.7. DNA fragmentlerinin pGEM[®]-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR ürünleri klonlama vektörü olan pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörüne üretici firmanın önerileri doğrultusunda klonlandı. Ligasyon reaksiyonu Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Ligasyon reaksiyonu

İçerik	Hacim
2X Rapid Ligasyon tamponu	5 µL
pGEM-T vektör	1 µL
PCR ürünü	X µL
T4 DNA ligase	1 µL
Total	10 µL

2.8. *E. coli* DH5α 'ya Transformasyon

Kompetent hücre hazırlamak için *E. coli* DH5α hücreleri Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekildi ve 37 °C’de gece boyunca büyütüldü. Bir gecelik kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C’de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,4–0,5 olacak şekilde büyütüldü. Hücreler ardından 4°C’de 4.000×rpm’de hızda 5 dk santrifüj edildi ve pelletin üzerine 10 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek elle çözümleri sağlandı. Hücreler 30 dk buz üzerinde bekletildi ve tekrar 4°C’de 4.000×rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Elde edilen kompetent hücreler +4°C’de 2 gün içinde kullanılmak üzere muhafaza edilebilir.

Transformasyon deneyi Sambrok vd., (1990) tanımladığı şartlarda gerçekleştirildi. Kompetent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu hücrelerin üzerlerine 3–5 µl ligasyon karışımından ilave edildi. Karışım 30 dk buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 90 sn. 42°C’de bekletildi. Ardından ependorf tüplerinin içerisine 200 µl LB Broth besiyeri ilave edilerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler ve petri kaplarında bulunan 50 mg/ml LB-Agar besiyeri üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek sekanslama işlemi için MacroGen Inc., Seoul, Korea firmasına gönderildi.

2.9. *lacZ:hag* Füzyon Vektörlerinin Oluşturulması

lacZ:hag füzyon vektörleri oluşturulurken, pDG1663 plazmiti integrasyon vektörü olarak kullanıldı. Bütün plazmit yapılandırılmasında standart rekombinat DNA teknikleri kullanıldı (Sambrook vd., 1990). AC6 *hag* geninin translasyon başlangıç kodonundan itibaren 185 bp upstream ve 22 bp downstream arasındaki bölge AC6 kromozomal DNA’sı kullanılarak çoğaltıldı. Çoğaltılan bu ana fragment üzerinde delesyonlar yapılarak promotor fragmentleri elde edildi. Promotor fragmentlerini elde etmek için yapılan PCR reaksiyonlarında iProof™ High-Fidelity DNA Polimeraz Kiti (BioRad) kullanıldı. Promotor fragmentlerinin çoğaltılması için kullanılan tüm primerlerin 5’ ve 3’ uçlarına *lacZ* füzyon vektörünün oluşturulabilmesi için *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon kesim bölgeleri eklendi (Tablo 16).

PCR reaksiyonları 50 µl son hacimde 1X iProof HF tampon, 200 µM dNTPmix, 0,5 µM forward ve reverse primer, 300 ng kalıp DNA ve 0,02U/µl polimeraz enzimi olacak şekilde hazırlandı. PCR protokolü Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 16. İntegrasyon vektörünün inşasında kullanılan primerler çiftleri ve promotor fragmentleri

Fragment	Primer çiftleri ^a	Tanımlama
hag185	hag fwd: ATAGAATTCCGTAACCAAACAAGGATGTTTC hag rev: ATAAAGCTTAGATGTTGTGGTTGATTCTC	-185/+22 bp'lik hag regulator bölgeyi içeren <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag138a	hag160 fwd: ATAGAATTTCGTCCTATTTTTCTTTTCAG hag rev: ATAAAGCTTAGATGTTGTGGTTGATTCTC	hag türevi; -138/+22 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag138b	hag160 fwd: ATAGAATTTCGTCCTATTTTTCTTTTCAG hag121 rev: ATAAAGCTTACATGATTTTTTCCTCCTTG	hag türevi; -138/+4 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag117a	hag121 fwd: ATAGAATTCCTATTAACATCAAAAAAAC hag rev: ATAAAGCTTAGATGTTGTGGTTGATTCTC	hag türevi; -117/+22 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag117b	hag121 fwd: ATAGAATTCCTATTAACATCAAAAAAAC hag121 rev: ATAAAGCTTACATGATTTTTTCCTCCTTG	hag türevi; -117/+4 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag98	hag120 fwd: ATAGAATTC CAATCCGATATAAAACATG hag rev: ATAAAGCTTAGATGTTGTGGTTGATTCTC	hag türevi; -98/+22 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment
hag56	hag78 fwd: ATAGAATTCGGCTCTTTTCATACCACAC hag rev: ATAAAGCTTAGATGTTGTGGTTGATTCTC	hag türevi; -56/+22 bp'lik bölgeyi kapsayan <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimli fragment

^a: altı çizili nükleotitler restriksiyon kesim bölgelerini gösterir

Tablo 17. Promotor türevlerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı

PCR Adımları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	98	30 sn	1
Denaturasyon	98	10 sn	
Primer Bağlanma	50	30 sn	35
Uzama	72	30 sn/kb	
Son Uzama	72	10 dk	1

EcoRI/Hind III restriksiyon kesim bölgelerini içeren promotor fragmentleri, aynı kesim bölgeleri ile muamele edilmiş pDG1663 plazmiti içerisine klonlandı ve oluşturulan rekombinant plazmitler *E.coli* DH5 α hücresine transforme edildi.

2.10. *Bacillus subtilis* CU1065 Genomuna İntegrasyon

B. subtilis hücre genomuna integrasyon Campbell (single crossover) tekniği ile gerçekleştirildi. Bu tekniği gerçekleştirmek için kullanılan plazmidin *recA*⁺ bir *E.coli* suşundan izole edilmesi gerekmektedir. *recA*⁺ pozitif bir *E.coli*'den izole edilen plazmitin Campbell tip integrasyonda verimi 100 kat daha fazla arttırdığı görülmüştür. Campbell tip integrasyon için; *E.coli* DH5 α suşundan izole edilen plazmitler, *NcoI* enzimi ile kesilip linerilize hale getirilmişlerdir.

2.10.1. *Bacillus subtilis* CU1065 Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücre hazırlamak için, *B. subtilis* CU1065 suşu ve hücre genomundan *sigD* geni silinmiş rekombinant *B.subtilis* HB4035 (*sigD::kan*) suşu 1 ml Luria Bertani (LB) Broth içerisinde 37 °C'de gece boyu büyütüldü. Bir gecelik kültürden 5 ml MC (Modified Competence) besiyerine 1:100 oranında ekim yapıldı. Hücreler 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,6 olacak şekilde büyütüldü.

2.10.2. Hücre Genomuna İntegrasyon

Hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,6 olunca, 1 ml hücreye 5 μ l lineer hale getirilmiş rekombinant plazmit DNA sı eklendi ve 1 saat 37 °C'de çalkamalı inkübatörde büyütüldü.

Hücreler 1 saat büyütüldükten sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve pellet 100 µl süpernatant içerisinde çözüldü. Hücreler MLS içeren (1 µg/ml Eritromisin ve 25 µg/ml Linkomisin) LB Agar besiyerine yayıldı ve petri kapları koloniler belli oluncaya kadar 1-2 gün 37 °C'de inkübe edildi.

2.10.3. Klonların Seçimi

Transformasyon petrilerinde üreyen ve doğru rekombinat plazmiti içeren hücreler koloni PCR yöntemi ile belirlendi. Üreyen koloniler 1 ml MLS'li LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün promotor fragmentlerini oluşturmak için kullanılan primer çiftlerinden forward primerler ve pDG1663'ün *lacZ* genine spesifik dizayn edilen *spoVG-lacZ*-reverse (ATCGTAACCGTGCATCTGCC) kontrol primeri kullanılarak doğru klonlar seçildi. PCR reaksiyonu ThermoStart™ PCR Master Mix Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon; 10 µl 1X ThermoStart Master Mix, 1 µl 10 pmol/µl her bir stok primerden, 7 µl dH₂O ve 1 µl gece kültürü içerecek şekilde toplam 20 µl'lik hacimde hazırlandı. PCR programı aşağıda tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi ve ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve büyüklükleri DNA markır ile doğrulandı.

PCR Programı

İlk denetürasyon	95 °C'de	15 dk.	
Denatürasyon	95 °C'de	30 sn.	} 30 döngü
Primer bağlanma	50 °C'de	30 sn.	
Uzama	72 °C'de	1 dk.	
Son Uzama	95°C'de	5 dk.	

Doğru rekombinant plazmiti içeren hücreler seçildikten sonra, hücreler X-gal yayılmış MLS'li LB Agar petrilerine inoküle edildi ve 37 °C'de koloniler büyütüldü.

2.11. Beta-Galaktosidaz Testi

Beta galaktosidaz testi için substrat olarak *o*-nitrofenil galaktosidaz (ONPG) kullanılmış ve aşağıda belirtilen Miller (1972)'in standart protokolü uygulanarak

yapılmıştır. Rekombinat plazmitleri taşıyan *B. subtilis* CU1065 ve *B. subtilis* HB4035 hücreleri 2 ml SSB (Schaeffer's Sporulation) sıvı besiyeri içerisinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün, 1:100 oranında taze SSB besiyerine ekim yapılarak 37°C'de çalkamalı inkübatörde hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,9 olana kadar büyütüldü. 600 nm'de OD 0,9 olduğu zaman aşağıdaki protokol izlenerek Beta- galaktosidaz deneyi gerçekleştirilir.

- OD₆₀₀ 0,9 olduğu zaman, 1 ml örnek mikrosantrifüj tüpüne alınır ve 10 dk buz üzerinde bekletilir.
- Daha sonra 10 dk en yüksek hızda santrifüj edilir ve pellet 1 ml % 0,88 NaCl ile yıkanır.
- Tekrar 10 dk santrifüj edildikten sonra pellet -70 °C'de en az 30 dk inkübe edilir.
- Daha sonra pellet 1 ml çalışma tamponu içerisinde çözülür.
- Çalışma tamponu içerisindeki hücre solusyonundan dilüsyonlar hazırlanır.
 - o 0,1 ml hücre süspansiyonu + 0,9 ml çalışma tamponu
 - o 0,2 ml hücre süspansiyonu + 0,8 ml çalışma tamponu
- Daha sonra her bir örneğe final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde lizozim eklenir
- 37 °C'de 10-30 dk inkübe edilir.
- 10 sn vortekslenir.
- 28 °C'de 10 dk inkübe edilir.
- 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) eklenir ve iyice karışması sağlanır ve zaman kaydedilir (t₀).
- Sarı renk açıkça belli olana kadar oda sıcaklığında inkübe edilir ve 0,5 ml 1M Na₂CO₃ ilave edilerek iyice karışması sağlanır ve reaksiyon durdurulup zaman kaydedilir (t_{min}).
- Herbir örnek OD₄₂₀ ve OD₅₅₀ ölçülür.
- Aktivite aşağıdaki formüle göre hesap edilir.

$$\text{Miller Ünit} = 1000 \times [\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})] / [T \times V \times \text{OD}_{600}]$$

$$T = \text{reaksiyon zamanı} = t_{\text{min}} - t_0$$

$$V = \text{çözülen kültür hacmi}$$

2.11.1. Beta-Galaktosidaz Deneyi İçin Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanışları**a- Z tampon (pH 7.0) 1 lt**

Na ₂ HPO ₄	8,5 gr
NaH ₂ PO ₄	4,8 gr
KCl	0,75 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246 gr

b- 1 M DTT (dithiothreitol)

3,1 gr DTT 20 ml 10 mM sodyum asetat (pH 5.2) içerisinde çözülür ve filtre ile sterilize edilerek, 1ml'lik hacimlerde –20°C'de saklanır.

c- Çalışma Tamponu

Z tampon	100 ml
1 M DTT	40 µl (400 nM)

Taze hazırlanır ve 4 °C'de bir hafta saklanabilir.

d- ONPG (4 mg/ml)

<i>o</i> -nitrofenil galaktosidaz	100 mg
Z tampon	25 ml içerisinde çözülür.

Taze olarak hazırlanır ve ışıktan korunur. Bir hafta boyunca –20°C'de saklanabilir.

e- Lizozim

10 mg /ml lizozim dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanır ve –20°C'de saklanır.

f- % 0,88 NaCl**g- 1 M sodyum karbonat (Na₂CO₃)**

2.12. Total RNA İzolasyonu

A. pallidus AC6 suşu 2 ml LB Broth içerisinde 37°C'de bir gece büyütüldü. Ertesi gün 1:100 oranında 5 ml taze LB Broth besiyerine ekim yapılarak, logaritmik artış fazının sonuna kadar (yaklaşık olarak OD₆₀₀ 0,7 olana kadar) büyütüldü. Daha sonra 2 ml hücre kültürü 12 000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek, hücre pelleti toplandı. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak, pellet saklandı.

A. pallidus AC6 pelletinden RNA izolasyonu Rneasy Mini (QIAGEN) Kiti üzerinde oluşturulan modifikasyonlar ile aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

1. Pellet 15 mg/ml lizozim ($7,5 \times 10^8$ - $1,5 \times 10^9$ hücre için) içeren 200 µl lizozim-TE* tamponunda çözüldü (30 mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8,0).
2. 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 25 dk. inkübe edildi. İlk 15 dakikadan sonra 20 µl proteinaz K* (20mg/ml, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 içerisinde çözülmüş) ilave edildi.
3. 1,4 ml RLT Tamponu (1ml tampon içerisine 10 µl β- mercaptoetanol eklenmiş) ilave edildi ve vortekslendi. Eğer süpernatant içerisinde görülebilen partiküller varsa 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi.
4. Süpernatant üzerine 1 ml Etil Alkol (%80*) ilave edildi ve vortekslendi.
5. Tüm karışım Rneasy mini kolonuna transfer edildi ve 13200 rpm (25 °C)'de 30 sn. santrifüj edildi.
6. 700 µl RW1 Tampon kolona ilave edildi ve 30 sn. 13200 rpm (25 °C)'de santrifüj edildi.
7. 500 µl RPE (ETOH) Tampon kolona ilave edildi ve 2 dk. 13200 rpm (25 °C)'de santrifüj edildi.
8. Kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirildi ve 1 dk. 13200 rpm (25 °C)'de santrifüj edilerek tüm RPE/ETOH atıkları uzaklaştırıldı.
9. Kolon tekrar yeni bir 1,5 ml ependorf tüpüne aktarıldı ve kolon içerisine 30 µl Rnase-free H₂O ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 dk. bekletilerek RNA'nın çözülmesi sağlandı. Daha sonra 1 dk. 13200 rpm (25 °C)'de santrifüj edildi.
10. RNA solüsyonu steril yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.
11. RNA solüsyonunun üzerine 6 µl 10X Turbo Dnase Tampon (Ambion) ve 3 µl Turbo DNase ilave edildi ve yavaşça pipetlenerek karışması sağlandı.
12. 37 °C' de 30 dk. inkübe edildi.
13. Karışımın üzerine tekrardan 2 µl Turbo DNase ilave edildi. Yavaşça pipetlenerek karışması sağlandı ve 37 °C'de 30 dk tekrardan inkübasyona bırakıldı.

14. Daha sonra 12 µl DNase İnaktivasyon Solusyonu eklenerek, yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi.
15. 10000 Xg'de 90 sn. santrifüj edildi ve RNA'yı içeren süpernatant dikkatli bir şekilde pellete değdirilmeden steril yeni bir 1,5 ml ependorf tüpüne aktarıldı.
16. 13200 rpm'de tekrar 90 sn santrifüjlenerek, süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir 1,5 ml ependorf tüpüne aktarıldı.

RNA izolasyonu sonunda tüpün içerisindeki RNA miktarı ileriki deneyler için yeterli olmayabilir. Bundan dolayı Etanol presipitasyonu yapılarak, RNA'nın konsantrasyonu artırıldı.

17. RNA solusyonu üzerine 1/10 oranında 3 M Sodyum-Asetat ilave edilerek karışması sağlandı
 18. Daha sonra karışımın üzerine 3 kat hacim % 100 soğuk Etil Alkol ilave edildi ve karıştırıldı. – 20°C'de bir gece inkübe edildi.
 19. 13200 rpm (4 °C)'de 30 dk. santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
 20. Pellet 750 µl % 70 Etil Alkol* ile yıkandı ve 13200 rpm (4 °C)'de 15 dk. santrifüj edildi.
 21. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında 30 dk. kuruması için bırakıldı.
 22. Pellet 20 µl RNase- free H₂O'da çözüldü ve konsantrasyonu hesaplandı.
- *: DPEC'li H₂O ile hazırlanmalıdır.

2.13. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

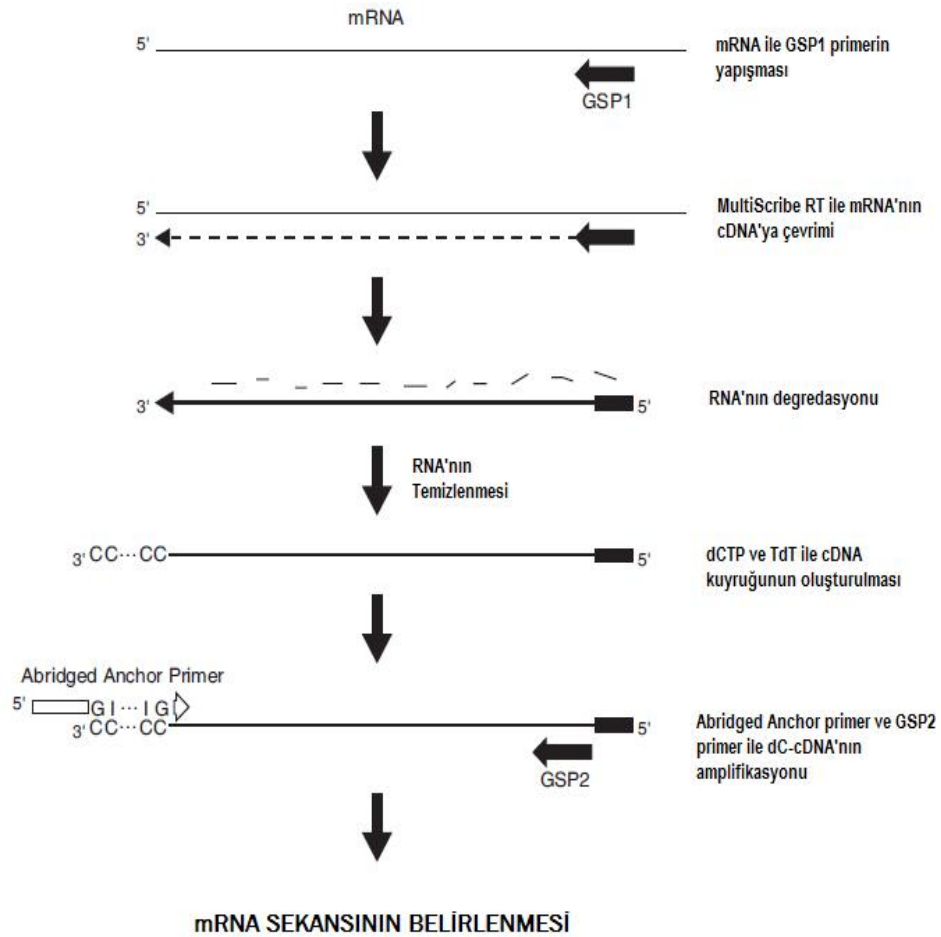
10 µl RNA solusyonu 140 µl DPEC'li H₂O içerisine ilave edilerek karışması sağlandı. Solusyon 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre yardımı ile ölçüldü. Aşağıdaki formüle 260 nm'deki değer yazılarak RNA konsantrasyonu ve 260/280 değeri hesap edilerek RNA'nın saflığı hesaplandı.

$$\text{RNA Konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \times \text{Dilüsyon Faktor} / 10$$

2.14. 5'-RACE PCR

cDNA uçlarının hızlı çoğaltılması (Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)), bir mRNA'nın bilinen internal kısmından bilinmeyen 3' veya 5' uçları arasındaki nükleik asit sekansının çoğaltılması için yapılan bir prosedürdür. mRNA'nın 5' ucunu çoğaltmak için İnvitrogen tarafından hazırlanan 5' RACE System (Version 2.0) Kiti kullanıldı.

Bu sistem kullanılarak, ilk olarak ilk zincir cDNA oluşturuldu, oluşturulan cDNA saflaştırıldı, homopolimerik kuyruk eklendi ve hedef cDNA PCR ile çoğaltılıp, sekans edildi. Bu prosedürler Şekil 13'de özetlenmiştir.



Şekil 13. 5' RACE prosedürünün şematik görünümü

2.14.1. İlk Zincir cDNA'nın Sentezi

İlk zincir cDNA flagellin genine spesifik olarak dizayn edilen Gpal.GSP1 (GGCAGTACGGTCAGCAGATACG) primeri kullanılarak, total RNA'dan Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) enzimi ile sentezlendi. İlk olarak gene spesifik Gpal. GSP1 primeri ile mRNA'nın yapışması sağlandı. Reaksiyon karışımı aşağıda gösterilmiştir.

İçerik	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10 pmol/µl Gpal.GSP1	1	2.5µM
RNA sample	X	2 µg
DEPC'li su ile tamamlanır.	4,85	

Karışım hazırlandıktan sonra aşağıdaki adımlar takip edilerek ilk zincir cDNA sentezlendi.

1. 70 °C'de 10 dk. inkübe edildi.
2. 1 dk. buz üzerinde soğutuldu.
3. Kısa bir santrifüj yapılarak aşağıdaki diğer maddeler belirtilen miktarlarda karışıma eklendi. Son hacim 10,5 µl'de ilk zincir cDNA sentez reaksiyonu başlatıldı.

Komponent	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X RT Tampon	1	1X
25 mM MgCl ₂	2,2	5,5mM
2.5 mM dNTPmix	2	500 µM
Rnase inhibitor	0,2	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	0,25	1,25 U/µl
Total	5,65	

4. Reaksiyon karışımı 25°C'de 10 dk. inkübe edildi.
5. Daha sonra 48°C'de 30 dk. inkübe edildi.
6. Son olarak 95°C'de 5 dk. inkübe edilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.

2.14.2. cDNA'nın Temizlenmesi

Sentez edilen cDNA PCR Product Purification Kiti (Fermentas) kullanılarak temizlendi. Prosedür üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

2.14.3. dCTP Kuyruğunun Takılması

Temizlenen ilk zincir cDNA'nın 5' ucuna oligo-C kuyruğu ilave edildi. Aşağıdaki prosedür takip edilerek reaksiyon gerçekleştirildi.

1. Aşağıdaki komponentler temiz bir tüpe ilave edilerek, yavaşça karıştırıldı.

Komponent	Hacim (µl)
DEPC'li su.....	6,5
10X Terminal Transferaz Tampon	5,0
2 mM dCTP	2,5
10X CoCl ₂	2,5
Temizlenmiş cDNA	1

2. Karışım 94 °C'de 2-3 dk. inkübe edildi ve 1 dk. buz üzerinde soğutuldu. Kısa bir süre santrifüj edilerek çepere bulaşmış olan karışım tüpün dibinde toplandı.

3. 1 µl Terminal transferaz enzimi (NEB) ilave edilerek 37 °C'de 10 dk. inkübe edildi. Son olarak enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dk. bekletildi.

2.14.4. Oligo-C kuyruklu cDNA'nın Çoğaltılması

Oligo-C kuyruklu cDNA'nın çoğaltılması Touchdown PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. cDNA'nın çoğaltılması gene spesifik olarak dizayn edilen Gpal.GSP2 (CAGCGAGCTCACGCATACGTT) primeri ile Abridged Anchor primeri (GGCCACGCGTCGTCGACTAGTACGGG/ideoxyl/ideoxyl/GGG/ideoxyl/ideoxyl/GGG/

ideoxyl/ideoxyl/G) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği ve döngüsü Tablo18 ve Tablo 19’de verilmiştir.

Tablo 18. Touchdown PCR reaksiyon içeriği

İçerik	Hacim (μ l)	Son Konsantrasyon
10X PCR Tampon	5	1X
25 mM MgCl ₂	3	1.5 mM
10 mM dNTPmix	1	200 μ M
10 pmol/ μ l Gpal.GSP2 (CAGCGAGCTCACGCATACGTT)	2	5 μ M
10 pmol/ μ l Abridged Anchor	2	5 μ M
dC-kuyruklu cDNA	5	
Taq DNA polymerase	0,5	
dH ₂ O	31,5	

Tablo 19. Touchdown PCR döngüsü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
1	94	15 dk.
20	94	30 sn.
	58-0,5*	30 sn
	72	1 dk.
25	94	30 sn
	48	30 sn.
	72	1 dk.
1	72	10dk.

*: her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 0,5 derece azalacaktır.

% 1,5’lik agaroz kullanılarak yapılan jel elektroforezi PCR ürününün görüntülenmesi için kullanıldı. Etidyum bromür ilave edilen jel, 110 Volt da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntüledi. Görüntülenen DNA fragmenti PCR Product Purification Kiti (Fermentas) ile temizlenerek, GSP2 ve Abridge Anchor Primerleri ile birlikte sekanslama işlemi için Cornell Üniversitesi, Biyoteknoloji Laboratuvarına gönderildi.

2.15. AC6 ve *B. subtilis sigD* Geninin Ekspresyonu

2.15.1. *sigD* Genlerinin Çoğaltılması

İnvers PCR yöntemi ile tüm gen sırası elde edilen *A. pallidus* AC6 *sigD* geni ekspresyon için pET11a vektörüne klonlandı. Geni çoğaltmak için dizayn edilen Gpa.sigDf- 5'-TATCACCCATATGATGGTCCAATCGATGACACTG-3' ve Gpa.sigDr- 5'-TATGGATCCTTAAGATAAAAGCTTAACGAGC-3' primerlerin uçlarına sırasıyla *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ilave edildi.

B. subtilis sigD geni uçlarına *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzim bölgeleri yerleştirilmiş, Bsu sigDf- 5'-TATCACCATATGATGCAATCCTTGAATTATGAAG-3' ve Bsu sigDr- 5'- TATGGATCCTTATTGTATCACTTTTCCAGC-3' primeri ile çoğaltıldı.

SigD genlerini tam uzunlukta çoğaltmak için yapılan PCR reaksiyonu; 50 µl hacimde, 1X iProof HF Tampon, 0,2 mM herbir dNTP'den, 0,5 µM herbir primerden, 100 ng AC6 veya *B. subtilis* CU1065 genomik DNA'dan ve 0,02 U/µl iProof Polimeraz (BioRAD) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan PCR programı aşağıda verilmiştir.

1. Ön Denatürasyon	98 °C'de	30 sn.	} 34 döngü
2. Denatürasyon	98 °C'de	10 sn.	
3. Primer Bağlanma	55 °C'de	30 sn.	
4. Uzama	72°C'de	1 dk.	
5. Son Uzama	72°C'de	10 dk.	

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 10 kb DNA markırı ile yürütülerek, büyükleri doğrulandı.

2.15.2. *sigD* Genlerinin pET11a Vektörüne Klonlanması

SigD PCR ürünleri PCR Purification Kiti (Fermentas) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda temizlendi. Ekspresyon vektörünün inşası için 5 µl pET-11a (40 µg/µl), 9 µl PCR ürünü, 1X BSA, 1X Restriksiyon Tampon (NEB Tampon 3), 10 U *BamHI* ve *NdeI*

enzimlerini içeren 20 µl toplam hacimde restriksiyon kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Restriksiyon kesim reaksiyonu PCR Purification Kiti (Fermentas) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda temizlendi ve 50 µl son hacimde çözüldü.

50 µl son hacimde çözülen reaksiyon karışımı 20 dk. 11.000 rpm’de vakum altında santrifüj edilerek, sıvı kısmın tamamen buharlaşması sağlandı. 8 µl steril dH₂O ile yeniden çözülen reaksiyon karışımına 1µl 10X Ligase Tampon ve 1 µl T4 DNA Ligaz(10U/µl) enzimi ilave edildi ve 16 °C’de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası plazmit, CaCl₂ tekniği ile kompotent hale getirilmiş *E.coli* BL21 (DE3) Lys hücresine transforme edildi ve plazmit içeren hücreler 100 µg/ml ampisilin + 10µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde seçildi.

2.15.3. *sigD* genlerinin *E.coli* BL21 Hücresinde Ekspresyonunun Belirlenmesi

sigD genlerinin hücrede ekspresyonun belirlenmesi için üç doğrulama adımı gerçekleştirilmiştir. Birinci adımda; *sigD* genlerini içeren plazmitlerin transforme edildiği *E.coli* hücrelerinde rastgele belli sayıda hücre seçildi. Bu hücreler 100 µg/ml ampisilin ve 10 µg/ml kloramfenikol içeren 2 ml LB sıvı besiyerinde 37°C’de büyütüldüler. Daha sonra doğru plazmiti içeren hücrenin tespiti için koloni PCR yöntemi kullanılarak doğrulandılar. Koloni PCR 2X Thermo-Start™ PCR Master Mix (Thermo SCINTIFIC) kullanılarak gerçekleştirildi. 20 µl son hacimde; 1X master mix, 0,5 pmol/µl pET T7 (kontrol için dizayn edilmiş; 5’- TAATACGACTCACTATAGG-3’) ve genlerin çoğaltılmasında kullanılan reverse primerler (Gpa.sigDr ve Bsu sigDr), 7 µl dH₂O ve 1 µl hücre kültürü ilave edilerek yapıldı. Genin çoğaltılması için kullanılan program aşağıda verilmiştir.

Ön Denetürasyon	95 °C’de	15 dk.	} 34 döngü
Denetürasyon	95 °C’de	30 sn.	
Primer bağlanma	50 °C’de	30 sn.	
Uzama	72 °C’de	1 dk.	
Son Uzama	72 °C’de	5 dk.	

PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve 10 kb DNA markır kullanılarak doğru büyüklükteki bantlar pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

İkinci adımda; *sigD* genlerini içeren plazmitlerin transforme olduğu ve PCR reaksiyonu pozitif *E.coli* hücrelerinden belirli sayıda seçildi ve 2 ml LB (Amp^{100µg/ml}, Cm^{10 µg/ml}) sıvı besiyerinde 37 °C’de bir gece büyütüldü. Ertesi gün hücreler 1:100 oranında 5 ml taze LB (Amp^{100µg/ml}, Cm^{10 µg/ml}) sıvı besiyerine aşılandı. Hücreler 600 nm’de OD 0,3 oluncaya kadar büyütüldü. OD 0,3 olunca son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. IPTG eklendikten sonra 3 saat daha 37°C’de inkübe edildi. 1,5 ml herbir hücreden alınarak ependorf tüplerine aktarıldı ve 12.000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, pellet -20°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 500 µl dH₂O’da çözüldü ve sonikasyon işlemi ile patladıldı. 13.200 rpm’de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant ve pellet ayrı ayrı saklandı. Pelletin 10 ml Sample Tamponda yeniden çözülmesi sağlandı. Süpernatant ve pellet % 12’lik SDS-PAGE’de yürütülerek sonuçlar gözlemlendi. SDS-PAGE analizi Lammeli vd., 1970’in prosedürüne göre gerçekleştirildi.

Üçüncü adımda, SDS-PAGE analizinde ekspresyon seviyesi güçlü olarak gözlenen örnekler seçildi. Bu örneklere sahip *E.coli* BL21 (DE3) Lys hücreleri 5 ml LB (Amp^{100µg/ml}, Cm^{10 µg/ml}) sıvı besiyerinde 37°C’de bir gece büyütüldü ve Plazmit MiniPrep(Fermentas) Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitler pET11a vektörü için dizayn edilen kontrol pET T7 primeri ile sekanslama işlemi için Cornell Üniversitesi, Biyoteknoloji Laboratuvarına gönderildi. Sekans sonuçları değerlendirilerek, herhangi bir baz değişiminin ve mutasyonun olmadığı plazmiti içeren hücre seçildi ve saflaştırma basamağı için bu hücre kullanıldı.

2.16. σ^D Proteinlerinin Saflaştırılması

Protein saflaştırılması Helmann., 2003’in tanımladığı prosedürde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. DEAE- Sepharose ve mono-Q kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak protein saflaştırılması sağlandı. En iyi ekspresyonun belirlendiği (2.3. Bölüm) *E. coli* BL21(DE3) LysS hücresi 50 ml LB (Amp^{100µg/ml}, Cm^{10 µg/ml}) sıvı besiyeri içerisinde 37 °C’de bir gece boyunca büyütüldü. Ertesi gün 1:100 oranında taze 1 lt LB (Amp^{100µg/ml}, Cm^{10 µg/ml}) sıvı besiyerine aşılanarak 600 nm’de OD 0,3 olana kadar büyütüldü. OD 0,3 olunca, son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklendi. İndükleme işleminden sonra hücreler 3 saat daha büyütüldü ve 12.000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek inklüzyon

yapılarının ve hücresel debrisin bulunduğu pellet kısmı toplandı. Pellet 10 ml % 0,08'lik NaCl ile yıkandı ve – 20°C'de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün pelletin oda sıcaklığında çözülmesi için 10-15 dk. beklendi. Pellet 20 ml TGED Tamponu (pH 8,0) (10 mM Tris-HCl pH:8,0, % 5 gliserol, 1 mM EDTA pH:8,0, 1 mM DTT) içerisinde çözüldü. Hücre süspansiyonu sonikasyon işlemine tabii tutularak hücre yapılarının patlatılması sağlandı. Sonikasyon işleminden sonra hücreler 12000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 3 defa 20 ml % 0,5 Triton X-100 içeren TGEDX tamponu (pH 8,0) ile yıkandı. Daha sonra pellet 1 kez % 2 sodyum deoksikolat içeren TGED tamponu (pH 8,0) ile yıkandı ve inklüzyon yapıları 5 ml TGEDX (pH 8,0) tamponu içerisinde çözüldü. Bu süspansiyondan 1:10 oranında 5 ml TGEDX tamponu (pH 8,0) içerisinde dilüsyon yapıldı. Dilüsyona son hacimde % 1,5 olacak şekilde sodyum sarkosyl yavaş yavaş ilave edildi (Bu basamak çok dikkatli yapılmalıdır. Sarkosyl ilave edilirken yavaş yavaş süspansiyon karıştırılmalı ve süspansiyonun bulanıklığının giderek açıldığı gözlenmelidir). Daha sonra dilüsyonun hacmi TGEDX tamponu (pH 8,0) ile yavaş yavaş 50 ml'ye tamamlandı. Dilüsyon 4 lt TGEDX tamponu (pH 8,0) içerisinde +4°C'de bir gece diyaliz edildi.

2.16.1. DEAE Sepharose Kromotografisi

Diyaliz sonrası elde edilen protein örneği DEAE- Sepharose kolonundan geçirilerek bir kısım protein örnekten uzaklaştırıldı. Kolon hacminin 10 katı kadar % 0,1 Triton X-100 içeren TGEDX tampon (pH 8,0) ile dengelendi. Diyaliz edilen tüm protein örneği kolona yüklendi. Daha sonra kolon 20 ml TGEDX tamponu (pH 8,0) ile yeniden yıkanarak, kolona tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra kolon 1M NaCl içeren TGEDX tamponu (pH 8,0) ile yıkanarak fraksiyonlar toplandı. Her bir fraksiyon AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinleri için ayrı ayrı % 12'lik SDS-PAGE kolonuna yüklenerek proteinleri içeren fraksiyonlar belirlendi. σ^D proteinini içeren fraksiyonlar toplandı ve 1lt 50 mM NaCl içeren TGEDX tamponu (pH 8,0) içerisinde bir gece 4°C'de diyaliz edildi.

2.16.2. Mono-Q Kromatografisi

Diyaliz sonrası protein örneği mono-Q FPLC kolonuna (Pharmacia) yüklendi. Kolon 50 mM NaCl içeren TGEDX tamponu (pH 8,0) ile dengelendi ve tüm protein örneği kolona yüklendi. Fraksiyonlar 50 mM ve 1 M NaCl içeren TGEDX (pH 8,0) tamponları arasındaki gradient ile toplandı. Fraksiyonlar ayrı ayrı %12'lik SDS-PAGE jelinde yürütülerek σ^D proteinlerini içeren fraksiyonlar belirlendi.

σ^D proteinini içeren fraksiyonlar toplandı ve %50 gliserol ve 200 mM NaCl içeren 200 ml TGED tamponu (pH 8,0) içerisinde bir gece 4°C'de diyaliz edildi.

2.17. *Bacillus subtilis* RNA Polimeraz Enziminin Saflaştırılması

2.17.1. Rekombinant *B. subtilis* Suşun İnşası

Kor RNAP enziminin saflaştırılması sırasında σ^D kontaminasyonunu önlemek için, *sigD* geni silinmiş HB4035 hücresi kullanıldı. HB4035 hücrelerinin genomik DNA'sındaki *rpoC* gen bölgesi, JH642'nin 3' ucunda histag kuyruğu takılı olan *rpoC* (β') geni ile yer değiştirilerek gerçekleştirildi. Bu amaç için JH643 ve HB4035 suşları 2 ml LB sıvı besiyeri içerisinde (100 μ g/ml spektinomisin JH642 için, 10 μ g/ml kanamisin HB4035 için) 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün taze 5 ml Modified Compotence (MC) besiyeri içerisine 1:100 oranında ekimleri gerçekleştirildi ve hücreler 600 nm OD 0,6 oluncaya kadar büyütüldüler. OD 0,6 olunca, steril koşullar altında JH642 hücresi 0,2 μ m'lik filtre ile süzülerek. Süzüntü steril bir kaba aktarıldı. Daha sonra 1 ml OD 0,6 HB4035 kültürü ve 1 ml JH642'in süzüntüsü birleştirilerek 37 °C'de bir saat daha çalkalanarak inkübe edildi. Oluşturulan yeni rekombinant hücre 100 μ g/ml spektinomisin ve 10 μ g/ml kanamisin içeren LB agarda seçildi ve *B. subtilis* EC1003 olarak adlandırıldı.

EC1003 RNA polimeraz enzimin saflaştırılması protokolü Helmann, 2003 ve Anthony vd., 2000 tarafından tanımlanan protokol modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

2.17.2. Hücre Lizisi

EC1003 gerekli antibiyotikleri içeren LB Broth sıvı besiyeri içerisinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 10 lt taze besiyeri içerisinde 1:100 oranında ekimi yapıldı ve 600 nm'de OD 0,9-1,2 arasında oluncaya kadar büyütüldü. Hücreler 12.000 rpm'de 15 dk. santrifüj yapılarak toplandı (yaklaşık litre başına 5 gr ıslak hücre). Hücre pelleti -20°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün pellet 3ml /1 gr olacak şekilde P Tampon (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 3 mM Beta merkaptioethanol, % 5 gliserol) içerisinde çözüldü. Süspansiyon içerisinde lizozim son hacimde 100 µg/ml olacak şekilde eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra sonikasyon işlemi ile hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre atıkları 12.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek toplandı ve enzimin içerisinde bulunduğu süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarıldı.

2.17.3. Ni-NTA Kromatografisi

RNAP enzimini içeren süpernatant içerisinde 20 mg protein başına 1 gr olacak şekilde Ni-NTA resin eklendi ve 8°C'de 2 saat karışması sağlandı. Resin- süpernatant karışımı 5 ml Bio- Rad plastik kolonlarına döküldü ve resinin süzülmesi sağlandı. Kolon, hacminin 20 katı kadar 10 mM İmidazol içeren P tampon ile yıkandı. Daha sonra RNAP enzimin alınması için, kolon hacminin 10 katı kadar 400 mM imidazol içeren P buffer ilave edildi ve fraksiyonlar 1 ml'lik hacimler şeklinde toplandı. Toplanan fraksiyonlar %12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek, RNAP enziminin geldiği fraksiyonlar belirlendi. Enzimin belirlendiği fraksiyonlar toplanarak 3 lt 300 mM NaCl içeren TGED tamponunda (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, %10 Gliserol) diyaliz edildi.

2.17.4. Heparin Kolon Kromatografisi

Diyaliz edilen örnekler Heparin (FPLC, Pharmacia) kolonuna yüklendi. Kolon örnek yüklenmeden önce 5 kat hacim 50 mM NaCl içeren Tampon A (pH 8,0) (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, %10 gliserol, 0,1 mM DTT) ile yıkandı. Daha sonra diyaliz olmuş örnek kolona yüklendi. Fraksiyonlar 50 mM NaCl içeren Tampon A ile 1 M NaCl içeren Tampon A arasında gradient oluşturularak 1 ml hacimde toplandı. Tüm

fraksiyonlar SDS-PAGE jeline yüklenerek RNA Polimeraz (150kDa β ve β' ve 37 kDa α alt birim) enziminin bulunduğu fraksiyonlar belirlendi. RNAP bulunduğu fraksiyonlar toplandı ve 1 lt 50 mM NaCl içeren Tampon A içerisinde 1 gece diyaliz edildi. Ertesi gün diyaliz edilen örnekler 200 ml % 50 gliserol içeren Tampon A içerisinde gün boyu diyaliz edildi. RNAP enzimi -20°C'de saklandı.

2.18. σ^D proteinlerinin ve kor RNAP Enziminin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

σ^D ve kor RNAP enziminin protein konsantrasyonları her adım için ayrı ayrı olarak Bradford metoduna ve Nano-Drop Spektrofotometre (NanoDrop Tech. Inc., Wilmington, DE) kullanılarak da belirlendi. Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) solüsyonu protein konsantrasyonlarını belirlemek için kullanıldı.

2.19. *in vitro* Transkripsiyon

in vitro transkripsiyon reaksiyonu *B. subtilis* kor RNAP, σ^D ve AC6 σ^D proteinleri ve pEC3 plazmiti kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

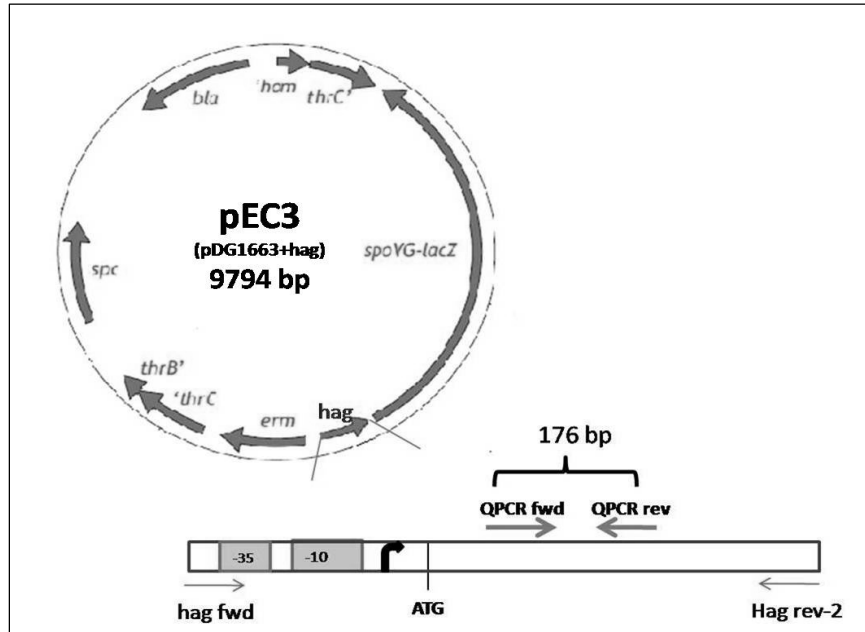
2.19.1. pEC3'ün Oluşturulması

Plazmit pEC3, *hag* geninin translasyon başlama kodonundan 185 bp upstream ve 385 downstream bölgeleri arası *hag* fwd (ATAGAATTCCGTAACCAAACAAGGATGTTC) ve *hag* rev-2 (ATAAAGCTTCTGTATTACCTGCTATACG) primerleri kullanılarak çoğaltıldı. PCR reaksiyonu 50 μ l son hacimde; 1X HF iProof Tampon, 200 μ M herbir dNTP'den, 0,5 μ M her bir primerden, 250 ng/ml AC6 genomik DNA'sından, 0,02 U/ μ l iProof DNA Polimeraz enzimi içerecek şekilde hazırlandı. Beklenen 588 bp'lik fragment, aşağıdaki protokol uygulanarak gerçekleştirildi.

Başlangıç denetürasyonu	98°C	30 sn.	} 29 döngü
Denetürasyon	98°C	10 sn.	
Primer bağlanma	52°C	30 sn.	
Uzama	72°C	30 sn.	
Son uzama	72°C	10 dk.	

Elde edilen PCR fragmenti ve pDG1663 *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile 20 µl son hacimde kesildi ve daha sonra pEC3 oluşturmak için T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak ligasyonu gerçekleştirildi.

Oluşturulan rekombinant pEC3 plazmiti (Şekil 14) CaCl₂ metodu ile kompetent hale getirilmiş *E. coli* DH5α hücresine transform edildi. pEC3 plazmitinin izolasyonu her aşamasında RNase içermeyen solusyonlar hazırlanarak, SDS'li Alkaline Lysis (Miniprep) Metodu (Sambrook vd., 1990) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 14. pEC3 plazmitinin şematik görüntüsü

2.19.2. *in vitro* Transkripsiyon Reaksiyonu

Reaksiyon 50 μ l'lik hacimde gerçekleştirildi (Şekil 15). İlk olarak holoenzim yapısının oluşturulabilmesi için, 100 nM kor RNAP ve 2 μ M (20 kat) σ^D proteini eklendi ve karışım 15 dk. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra aşağıdaki materyaller belirtilen miktarlarda karışıma eklendi.

Stok	50 μ l'lik reaksiyon için	Son hacim
10X Transkripsiyon tamponu	5 μ l	1X
1M KCl	7.5 μ l	150mM
pEC3	X μ l	250 ng/ μ l

Son hacim DEPC'li dH₂O ile 48 μ l'ye tamamlandı. Holoenzim yapısının promotor bölgeyi tanınması için karışım 10 dk. 37 °C'de inkübe edildi. Karışıma son hacim 200 μ M olacak şekilde herbir NTP'den eklenerek reaksiyon başlatıldı. mRNA'ların sentezi için reaksiyonlar farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60) 20dk. inkübe edildi. Kontrol reaksiyonu kor RNAP içerirken, herhangi bir σ^D proteini içermemektedir. Daha sonra reaksiyon 200 μ l stop tamponunun (2,5 M Amonyum Asetat, 10 mM EDTA) eklenmesi ile durduruldu. Reaksiyon etanol presipitasyonu ile temizlendi ve 60 μ l DEPC dH₂O içerisinde yeniden çözülmesi sağlandı.

Reaksiyondaki DNA kontaminasyonu DnaseI (DNase free Kit, Ambion) uygulaması ile uzaklaştırıldı ve mRNA'lar ikinci bir etanol presipitasyonu aşaması ile yeniden temizlenerek konsantrasyonlarının artırılması sağlandı (Şekil 15). mRNA'lar 20 μ l DEPC dH₂O içerisinde yeniden çözüldü. mRNA'lar Real Time PCR için cDNA'ların oluşturulmasında kullanıldı.

2.19.3. cDNA'ların Oluşturulması

cDNA'ların sentezi TaqMan Kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. Konsantrasyonları 2.14'de belirtildiği gibi spektrofotometrik olarak belirlenen mRNA'lardan cDNA, pEC3 içerisinde bulunan flagellin genini çoğaltmak için kullanılan hag rev-2 primeri GSP1 primeri olarak kullanılarak gerçekleştirildi. mRNA'dan cDNA'ların sentezi Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)

enzimi ile gerçekleştirildi. İlk olarak hag rev-2 primeri ile mRNA'nın yapışması sağlandı. Reaksiyon karışımı aşağıda gösterilmiştir.

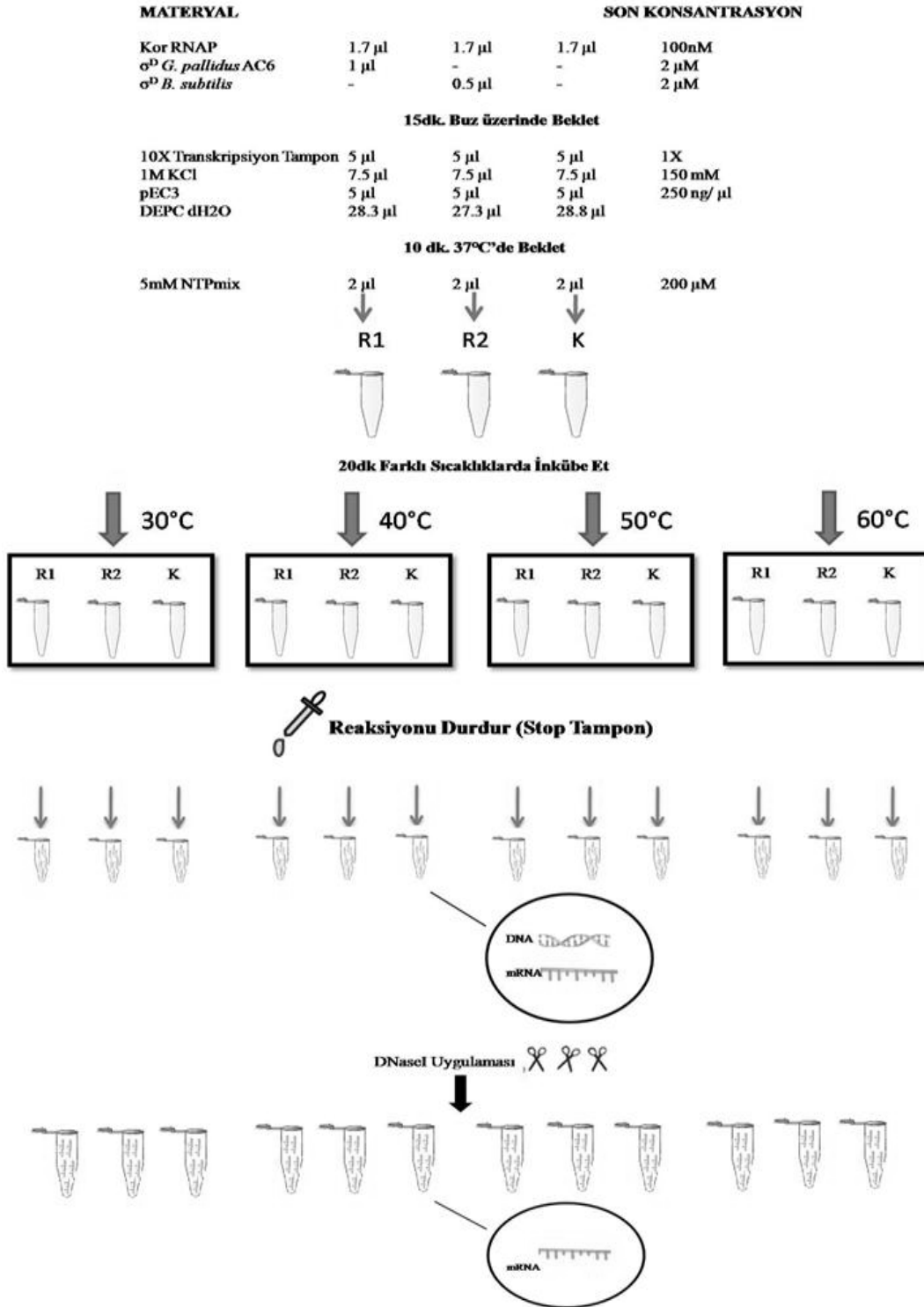
Komponent	Hacim (μ l)	Son Konsantrasyon
10 pmol/ μ l hag rev-2 (GSP1 olarak)	1	2,5 μ M
RNA sample	X	2 μ g
DEPC'li su ile tamamlanır.	4,85	

Karışım hazırlandıktan sonra aşağıdaki adımlar takip edilerek cDNA sentezlendi.

1. 70°C'de 10 dk. inkübe edildi.
2. 1 dk. buz üzerinde soğutuldu.
3. Kısa bir santrifüj yapılarak aşağıdaki diğer maddeler belirtilen miktarlarda karışıma eklendi. Son hacim 10,5 μ l'de cDNA sentez reaksiyonu başlatıldı.

Komponent	Hacim (μ l)	Son Konsantrasyon
10X RT Tampon	1	1X
25 mM MgCl ₂	2,2	5,5mM
2.5 mM dNTPmix	2	500 μ M
Rnase inhibitor	0,2	0,4 U/ μ l
MultiScribe Reverse Transcriptase	0,25	1,25 U/ μ l
Total	5,65	

4. Reaksiyon karışımı 25°C'de 10 dk. inkübe edildi.
5. Daha sonra 48°C'de 30 dk. inkübe edildi.
6. Son olarak 95°C'de 5 dk. inkübe edilerek, enzim inaktivasyonu sağlandı.



Şekil 15. *in vitro* transkripsiyon deneyinin şematik olarak gösterilimi

2.20. Real Time- qPCR

Tüm reaksiyonlar iQ SYBRGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) kullanılarak 25 µl son hacimde üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyonda *in vitro* transkripsiyon sonrası sentezlenen cDNA'lar 1/10 ve 1/5 oranında dilüsyon edilerek iQ 96-kuyucuklu PCR pleytleri (Bio-Rad Laboratories, Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kullanılan QPCRfwd (5'-GGCGACGATGCAGGTCTTGCGAT-3') ve QPCRrev (5'-GCTGCTTGCACAGCGAGCTCACGCATA) primerleri pEC3 plazmitinde bulunan *hag* geninin downstream bölgesinden uygun Tm'ler belirlenerek dizayn edildi (Şekil 14). iQ SYBRGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) karışımının üretici firmanın önerileri doğrusunda Tablo 20'de gösterildiği üzere hazırlanmıştır. Karışım hazırlanıp 24 µl'lik hacimlerde PCR playletlerine aktarıldı ve cDNA örnekleri dilüsyon edildikten sonra 1µl hacimde reaksiyonlara eklendi. Reaksiyonda DNA kontaminasyonunun olup olmadığının kontrolü için, DnaI aşamasından sonra cDNA'ların sentezi için kullanılan mRNA'lar kontrol grubu olarak kullanıldı.

Tablo 20. qPCR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği

İçerik	Son konsantrasyon	1 reak. için hacim (µl)
2X iQ SYBRGreen Supermix	1X	12,5
10 µM QPCRfwd	200 nM	0,5
10 µM QPCRrev	200 nM	0,5
DEPC dH2O		10,5
cDNA (1/5 veya 1/10 dilüsyon)		1

Hazırlanan reaksiyonlar iCycler Real Time PCR'da aşağıda verilen reaksiyon protokolüne göre yapıldı. Reaksiyon sonrası veriler Sequence Detection Programı (Version 1.3, Applied Biosystems) ile işlendi. C_t değeri bu yazılım programı tarafından otomatik olarak hesaplandı. Reaksiyon sonrasında PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

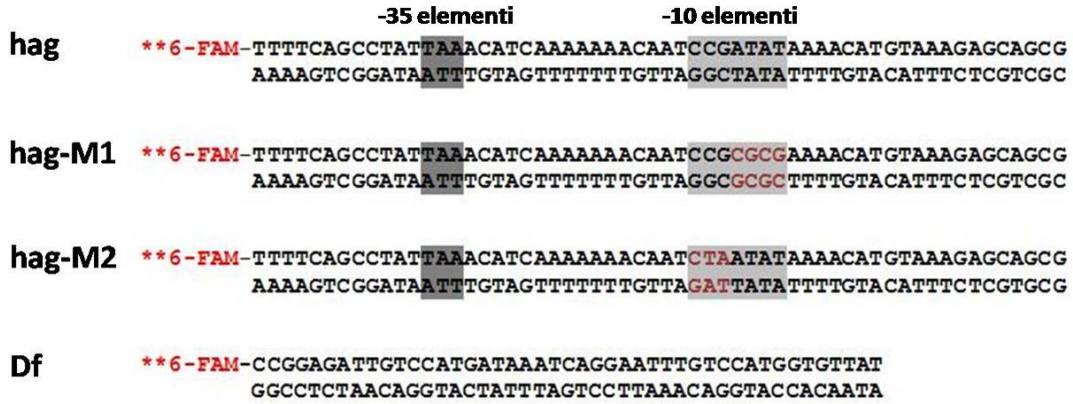
1 döngü	50°C	2 dk.
1 döngü	95°C	10 dk.
40 döngü	95°C	15 sn.
	60°C	1 dk.
1 döngü	95°C	15 sn.
	60°C	30 sn.
	95°C	15 sn.

2.21. Floresent Anisotropy (FA) Deneyi

Çoğu durumda, bir makromolekül solüsyon içerisinde sürekli bir dönüş hareketi sergiler. Eğer bu makromoleküle solüsyon içerisinde başka bir makromolekül bağlı durumda ise, solüsyon içerisindeki dönüş hareketi yavaşlar. İşte bu dönüş arasındaki fark moleküllerin diğer molekül ile kompleks oluşturup oluşturmadığını gösterir. Floresent Anisotropy deneyi bu prensipte çalışan bir protokoldür. Burada floresent bir madde ile işaretlenmiş bir DNA molekülü bir başka DNA veya protein molekülü ile kompleks oluşturursa dönüş hızı yavaşlar ve aradaki bu fark spektrofotometre ile ölçülerek moleküllerin bağlanma kompleksleri aydınlatılır (Heyduk vd., 1996).

2.21.1. Floresent İşaretli Çift İplikli DNA'ların Oluşturulması

AC6 ve *Bacillus* σ^D proteinlerinin AC6 *hag* geni promotor bölgesi ile protein-DNA etkileşimi fluorescence anisotropy deneyi ile gösterildi. Bu deney için *hag* geninin -35 ve -10 promotor elementlerini içeren 6-carboxyfluorescein (FAM) ile işaretli 58 bp oligonükleotiti ve bunun işaretlenmemiş komplementer zinciri ve aynı oligonükleotit çiftlerinin -10 promotor bölgesinde mutasyon yapılmış çiftleri kullanıldı. Kontrol olarak σ^A faktör tarafından tanınan promotor sekansını içeren diğer bir oligonükleotit çifti kullanıldı. FA deneyi için dizayn edilen oligonükleotit çiftleri Şekil 16'da verilmiştir. Çift iplikli DNA floresent işaretli oligonükleotit ile işaretli olmayan komplementer zincirin 1/1,1 oranında karıştırılmasıyla oluşturuldu. Karışım 95°C'de 10 dk. inkübe edildi ve oda sıcaklığında yavaşça soğutuldu. Çift iplikli DNA %8'lik Doğal-TBE elektroforezinde görüntülendi.



Şekil 16. Floresent Anisotropy Deneyinde kullanılan FAM işaretli DNA dupleksleri

2.21.2. σ^D - *hag* Promotor Bağlanma Aktivitesinin Belirlenmesi

FA deneyi *in vitro* transkripsiyonun gerçekleştiği farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60) çift-iplikli DNA fragmentlerine hem AC6 hemde *Bacillus* σ^D proteinlerinin bağlanma aktivitesini belirlemek için 100 μ l hacimde gerçekleştirildi. FA deneyi LS 55 (PerkinElmer Inc.) Luminescence Spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. FA ölçümleri 495 nm Excitation ve 520 nm Emmission dalga boylarında 10 saniye ara ile alınan 6 ölçümün ortalaması hesaplanarak tespit edildi. İlk olarak 100 nM işaretli çift-iplik DNA fragmentleri 50 mM NaCl içeren 99 μ l TGED Tampon içerisine eklendi ve homojen şekilde karıştırıldı ve istenilen sıcaklıkta ilk ölçüm yapılarak serbest DNA fragment dönüş hızı belirlendi. Daha sonra σ^D proteinleri düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru karışımın içerisine azar azar ilave edildi ve protein-DNA bağlanma aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. AC6 için σ^D konsantrasyonu 3- 30 μ M arasında, *Bacillus* için ise 6,25- 62,5 μ M arasında gerçekleştirildi.

2.22. Biyoinformatik ve Diğer Analizler

A. pallidus AC6 *hag* geni mRNA'sının sekonder yapısal analizi mfold (URL-3, 2010) program ile gerçekleştirildi (Zuker, 2003; Mathews vd., 1999) . AC6 *hag* geni mRNA'sının terminasyon yapısı FindTerm (URL-4) program kullanılarak saptandı. AC6 *hag* geninin codon kullanım frekansı Codon Usage Veritabanından (URL-5) *G.*

kaustophilus, *G. stearothermophilus* ve *B. subtilis* için bulunan verilerin referans olarak işleme alındığı CAIcal programı (URL- 6) kullanıldı (Puigbo vd., 2008) *hag* geni için kodon kullanım indeksi değeri (CAI) hesaplandı.

2.23. GenBank Kayıt Numaraları

'*Aeribacillus pallidus* AC6'da yüksek seviyede ekspres edilen flagellin geninin (*hag*) klonlanması, promotor yapısı ve *Aeribacillus pallidus* AC6'nın flagellar spesifik transkripsiyon faktörünün (sigma-D) klonlanması ve saflaştırılması' isimli tezin materyali olarak kullanılan AC6 flagellin (*hag*) geni için GenBank'tan GU991850 numaralı kayıt alındı. Genin tamamı ve GenBank verileri Ek.1'de verilmiştir. AC6 sigma-D (*sigD*) geni için ise GenBank'tan HM126480 numaralı kayıt alındı. *sigD* geninin tamamı ve GenBank verileri Ek.2'de verilmiştir.

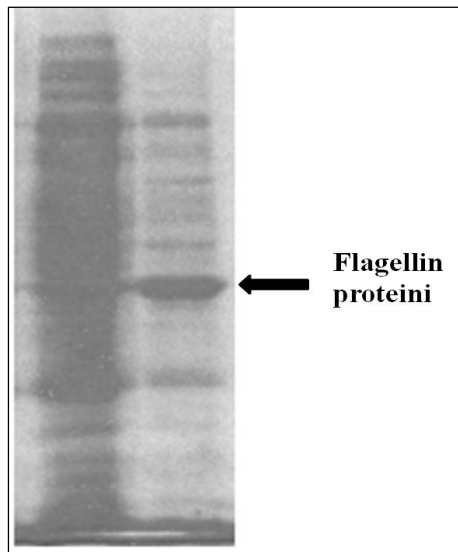
3. BULGULAR

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı tarafından Aydın ili Çamköy köyü Çamur kaplıcası sularından izole edilen AC6 bakterisi kullanıldı. Yapılan 16S ve recN analizleri sonucunda *Aeribacillus pallidus* olarak karakterize edildi.

3.1. AC6 *hag* geninin ve 5' upstream Bölgesinin Klonlanması ve Diğer Flagellin Genleri ile İlişkisinin Belirlenmesi

3.1.1. Kısmi Flagellin Protein Sıralarının Belirlenmesi

A. pallidus AC6 bakterisi 30 ml LB sıvı besiyerinde üretildi ve Dülger (1997)'in prosedürüne göre total hücre proteinleri elde edildi. SDS-PAGE jelinde yapılan total hücre protein profili sonucunda hücrede çok fazla miktarda üretilen bir protein bantı gözlemlendi (Şekil 17). Yoğun olarak üretilen bu bant SDS-PAGE jelinden kesilerek MALDI-TOF protein analizi için UMDNJ (University of Medicine & Dentist of New Jersey) Center of Advanced Proteomics Research laboratuvarına gönderildi.



Şekil 17. AC6 bakterisinin total hücre protein profili

Analiz sonucu elde edilen kısmi protein sekansları göstermiştir ki, hücrede yoğun olarak üretilen bu proteinin N-terminal ucuna yakın olan 25 a.a'lık bir kısmı (NAQDGISLIQTAEGALTETHAILQR), *Bacillus subtilis* flagellin (hag) proteininin 58-82 a.a'leri arasındaki kısmı, *Clostridium thermocellum* flagellin proteininin 65-89 a.a'leri arasındaki kısmına %100 benzerlik göstermektedir. C-terminal ucuna yakın 21 a.a'lık bir kısım ise, (LEHTINNLG TSAENLTAAESR) *Oceanobacillus iheyensis* flagellin (hag) proteininin 276-296 a.a'leri arasındaki amino asit dizisine % 99 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 18).

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Rank	Result Type
1	COG1344: Flagellin and related hook-associated proteins [Clostridium thermocellum ATCC 27405]	gi 48859340	228	100	220	100		
Protein Group		COG1344: Flagellin and related hook-associated proteins [Clostridium thermocellum ATCC 27405]						
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification
1233.5957	1233.6517	0.056	45	39	51 AGDDAAGLSISEK			
2650.3794	2650.3806	0.0012	0	85	89 NAQDGISLIQTAEGALTE THAILQR			Mascot
2650.3794	2650.3806	0.0012	0	65	89 NAQDGISLIQTAEGALTE THAILQR	220	100	Mascot
2	flagellin [Bacillus subtilis]	gi 14278892	226	100	220	100		
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification
2650.3794	2650.3806	0.0012	0	58	82 NAQDGISLIQTAEGALTE THAILQR			Mascot
2650.3794	2650.3806	0.0012	0	58	82 NAQDGISLIQTAEGALTE THAILQR	220	100	Mascot
3	flagellin [Oceanobacillus iheyensis HTE831]	gi 23100182	163	100	163	100		
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification
2241.1106	2241.1016	-0.009	-4	276	296 LEHTINNLG TSAENLTAA ESR	163	100	Mascot
2241.1106	2241.1016	-0.009	-4	276	296 LEHTINNLG TSAENLTAA ESR			

Şekil 18. AC6'nın MALDI-TOF analizi sonuçları

3.1.2. *hag* Geninin Tüm Gen Sıralarının inverse-PCR Yardımı ile Belirlenmesi

MALDI-TOF analizi sonucunda belirlenen benzer bölgeler, GenBank'ta bulunan diğer bakterilere ait flagellin proteinlerinin amino asit dizileri ile karşılaştırıldı ve bu bölgelerin (flagellin geni için) çoğu bakteri grubunda korunmuş bölgeler olduğu gözlemlendi. Benzer amino asit dizilerinden yararlanarak forward ve reverse dejenerat primerler sentez edildi (Tablo3) ve yapılan PCR reaksiyonu sonucunda flagellin geninin iç kısmından yaklaşık olarak 387 bp bir fragment elde edildi.

Çoğaltılan 387 bp DNA fragmenti sekans analizi için pGEM[®]-T Easy vektörüne klonlandı ve Macrogen firmasında fragmentin baz dizisi belirlendi. Belirlenen baz dizisinin %70 oranında *Bacillus subtilis* W23, *Geobacillus kaustophilus* HTA426 ve *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 *hag* genlerine benzediği belirlendi.

Gen dizisi belirlenen 387 bp'lik fragment genin tamamının elde edilmesi için kullanıldı. Bu bölgeden dizayn edilen primerler vasıtasıyla *hag* geninin tamamı ve 5'-upstream bölgesi invers PCR ile tamamlandı (Tablo 21).

Tablo 21. Invers PCR ile flagellin geninin 3' ve 5' bölgelerini belirlemek için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri

Restriksiyon endonükleaz	Primerler	Amplifikasyon ürünü(bp)
<i>Hinf</i> I	FlaGpaF2- FlaGpaR2	648
<i>Bam</i> HI	FlaGpaF3- FlaGpaR3	828
<i>Eco</i> RI	FlaGpaF3.3- FlaGpaR3	1215

FlaGpaF2-FlaGpaR2 primerleri ile yapılan invers PCR reaksiyonu sonucunda flagellin geni 3' ucuna doğru 212 bp, 5' ucuna doğru ise 136 bp uzatıldı. Fakat bu reaksiyon sonucunda genin komple sekansı elde edilemedi. FlaGpaF3-FlaGpaR3 primerleri kullanılarak yapılan invers PCR sonucunda genin stop kodonu ve başlangıç kodonu elde edilerek komple gen sekansı tamamlandı. Promotor bölgesini içeren genin 5' upstream bölgesi ise, FlaGpaF3.3-FlaGpaR3 primerler vasıtasıyla yapılan invers PCR sonucunda elde edildi. Sonuç olarak flagellin gen bölgesi ve genin 5' ucu çoğaltıldı (Şekil 19).

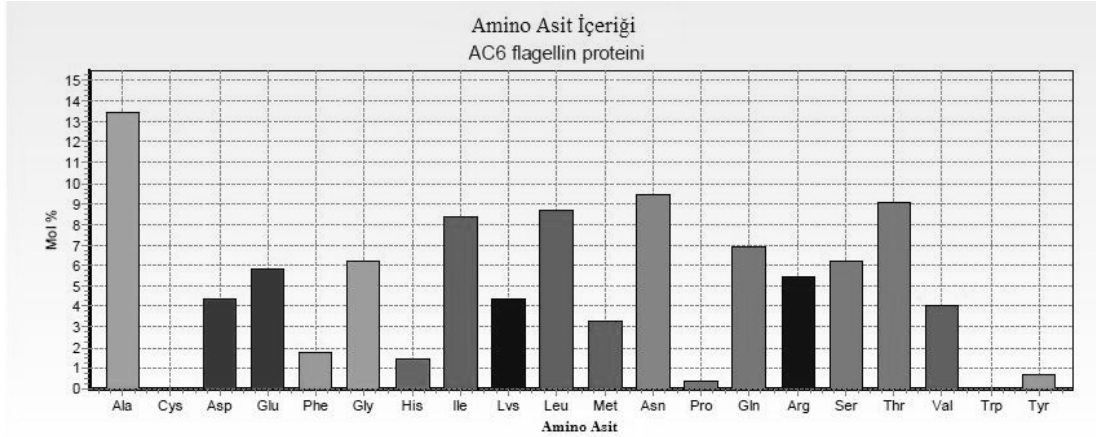
```

GAGGTCTGAAGCTGTAAAAATCGTAACCAACAAGGATGTTCAACCATTTTATTCTATTAAAAAGTCCCATTTTTCTTTTCAGCCTATTAA
ACATCAAAAAACAATCCGATATAAAAACATGTAAGAGCAGCGGGCGGCGACGCGGCTCTTTTCATACCACACGGGACGTGGAAAAACAACAATCAA
GGAGGAAAAAATC ATG AGA ATC AAC CAC AAC ATC TCG GCG TTA AAC ACT TAC CGC CAA CTT TCA TTT AAC AAC ACA
      M  R  I  N  H  N  I  S  A  L  N  T  Y  R  Q  L  S  F  N  N  T
CAA ACT GCA AAA AAC CTT GAA AAA CTT TCT TCC GGC TAC CGC ATC AAC CGC GCT GGC GAC GAT GCA GCA GGT
Q  T  A  K  N  L  E  K  L  S  S  G  Y  R  I  N  R  A  G  D  D  A  A  G
CTT GCG ATC TCT GAA AAA ATG CGC GGC CAA ATT CGC GGA CTG GAA ATG GCG CAA AAA AAT GCT CAA GAC GGC
L  A  I  S  E  K  M  R  G  Q  I  R  G  L  E  M  A  Q  K  N  A  Q  D  G
ATT TCT TTA ATC CAA ACT GCT GAA GGA GCT CTA ACA GAA ACT CAT GCC ATC CTT CAA CGT ATG CGT GAG CTC
I  S  L  I  Q  T  A  E  G  A  L  T  E  T  H  A  I  L  Q  R  M  R  E  L
GCT GTG CAA GCA GCG AAT GAT ACA AAC GTA TCT GCT GAC CGT ACT GCC ATT CAA GAT GAA ATT GAT GCG CTT
A  V  Q  A  A  N  D  T  N  V  S  A  D  R  T  A  I  Q  D  E  I  D  A  L
GTT TCT GAA ATC AAT CGT ATA GCA GGT AAT ACA GAA TTT AAC ACA CAA AAT CTA TTA GAC GGA ACT TTT TCT
V  S  E  I  N  R  I  A  G  N  T  E  F  N  T  Q  N  L  L  D  G  T  F  S
GGT AAA AAA TTC CAC ATC GGA GCC AAT AGT GGA CAA TCT ATT ACA GTA ACA ATT GGA ACT ATG AAT GCA AAT
G  K  K  F  H  I  G  A  N  S  G  Q  S  I  T  V  T  I  G  T  M  N  A  N
GCA TTA GGA ACA ACA TCT TTA AAA ATT GCT AGT GTT AAA GTG GAT ACC GTT ACA AAT GCA AAT GCA GCT ATC
A  L  A  G  T  T  S  L  K  I  A  S  V  K  V  D  T  V  T  N  A  N  A  A  I
ACA GCT ATT GAT AAA GCA ATT GAA CAA GTA TCA ACA GAA CGT TCT AAA CTT GGT GCA ATT CAA AAC CGT TTA
T  A  I  D  K  A  I  E  Q  V  S  T  E  R  S  K  L  G  A  I  Q  N  R  L
GAA CAT ACT ATT AAC AAC TTG GGA GCT ACT TCA GAA AAC TTG ACA GCA GCG GAA TCC CGA ATC CGC GAT GTA
E  H  T  I  N  N  L  G  A  T  S  E  N  L  T  A  A  E  S  R  I  R  D  V
GAT ATG GCA AAA GAA ATG ATG GAA TTT ACG AAA AAC AAT ATC CTT ACC CAA GCA GCA CAA GCA ATG CTT GCT
D  M  A  K  E  M  M  E  F  T  K  N  N  I  L  T  Q  A  A  Q  A  M  L  A
CAG GCA AAT CAA GTA CCT CAA GGG GTT CTT CAA TTG CTT CGA TAA
Q  A  N  Q  V  P  Q  G  V  L  Q  L  L  R  *

```

Şekil 19. Flagellin geninin nükleotit ve protein sekansı. M; Methionin, V; Valin, Q; Glutamin, S; Serin, T; Trionin, L; Lösin, N; Asparagin, D; Aspartik asit, E; Glutamik asit, R; Arjinin, Y; Tirozin, K; Lisin, F; Fenilalanin, H; Histidin, A; Alanin, G; Glisin, I; İzölösün, P; Prolin

AC6 *hag* geni 828 nükleotit çiftinden oluşmaktadır. 828 bp'lik bölge 275 a.a kodlamaktadır. Flagellin proteini kompozisyonu ExPasy ProtParam tool programı (URL-7, 2009) ile incelendiğinde, flagellin proteininin 37 a.a (%13,5) Alanin a.a'den, bunu sırasıyla 26 a.a (% 9,5) ile Asparajin, 25 a.a (% 9,1) ile Treonin, 24 a.a (% 8,7) ile Lösin, 23 a.a (% 8,4) İzölösün, 19 a.a (% 6,9) ile Glutamin, 17 a.a (% 6,2) ile Glisin ve Serin, 16 a.a (% 5,8) ile Glutamik asit, 15 a.a (% 5,5) ile Arjinin, 12 a.a (% 4,4) ile Aspartik asit ve Lizin, 11 aa (% 4) ile Valin, 9 a.a (% 3,3) ile Methionin, 5 a.a (% 1,8) ile Fenial alanin, 4 a.a (% 1,5) ile Histidin, 2 a.a (% 0,7) ile Tirozin ve 1 a.a (% 0,4) ile Prolin a.a'nin izlediği saptandı. Sistein ve Triptofan a.a'leri AC6 *hag* proteininde hiç bulunmamaktadır (Şekil 20).



Şekil 20. Flagellin proteini amino asit içeriği. Met; Methionin, Val; Valin, Glu; Glutamin, Ser; Serin, Thr; Trionin, Leu; Lösin, Asp; Asparagin, Asn; Aspartik asit, Gln; Glutamik asit, Arg; Arjinin, Tyr; Tirozin, Lys; Lisin, Phe; Fenilalanin, His; Histidin, Ala; Alanin, Gly; Glisin, Ile; İzölösin, Pro; Prolin, Cys; Sistein, Trp; Triptofan.

3.1.3. AC6 *hag* Geninin Diğer Flagellin Genleri ile Karşılaştırılması

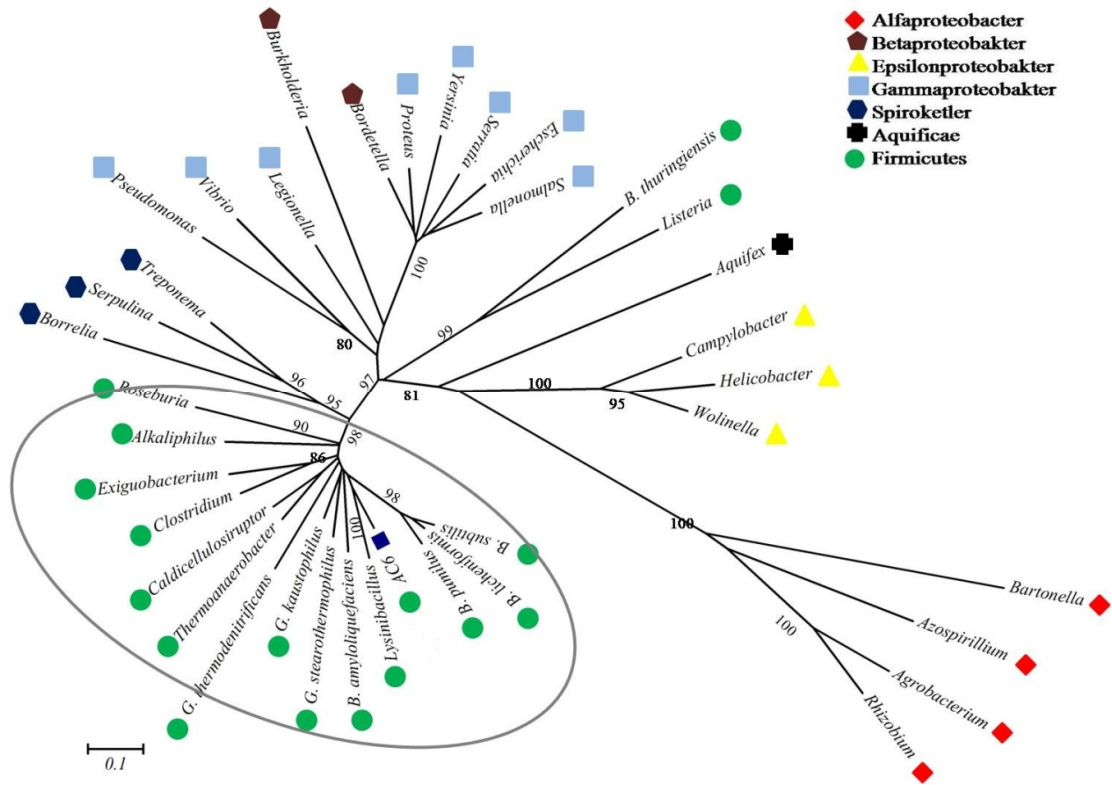
AC6 flagellin geninin tüm nükleotit sırası belirlendikten sonra NCBI Blast (URL-1, 2009) veri tabanında benzer flagellin genleri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma analizi sonucunda AC6 *hag* geni % 83 benzerlik oranı ile en fazla *G.stearothermophilus* flagellin genine benzediği tespit edildi. Diğer benzer flagellin genleri ve benzerlik oranları Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo22. Nükleotit Blast sonucunda AC6 *hag* genine benzer türler ve flagellin genleri

Suş	Kayıt No	Flagellin Gen Sekansları	Çakışan nükleik asit uzunluğu (%)	Flagellin gen benzerliği (%)
<i>Aeribacillus pallidus</i> AC6	AB453704.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	% 100	%83
<i>hag</i> geni	CP000560.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	% 99	% 69
	CP000817.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41,	% 98	% 73
	BA000043.1	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	% 90	% 77

AC6 flagellin geninin sistematikteki yerini belirlemek için tam proteini kodlayan nükleotit sırası Expasy (URL-8, 2010) Programı ile a.a sıralarına dönüştürüldü ve değişik filumlarda bulunan bakteriler arasındaki filogenetik olarak yeri araştırıldı. Tablo 10’da

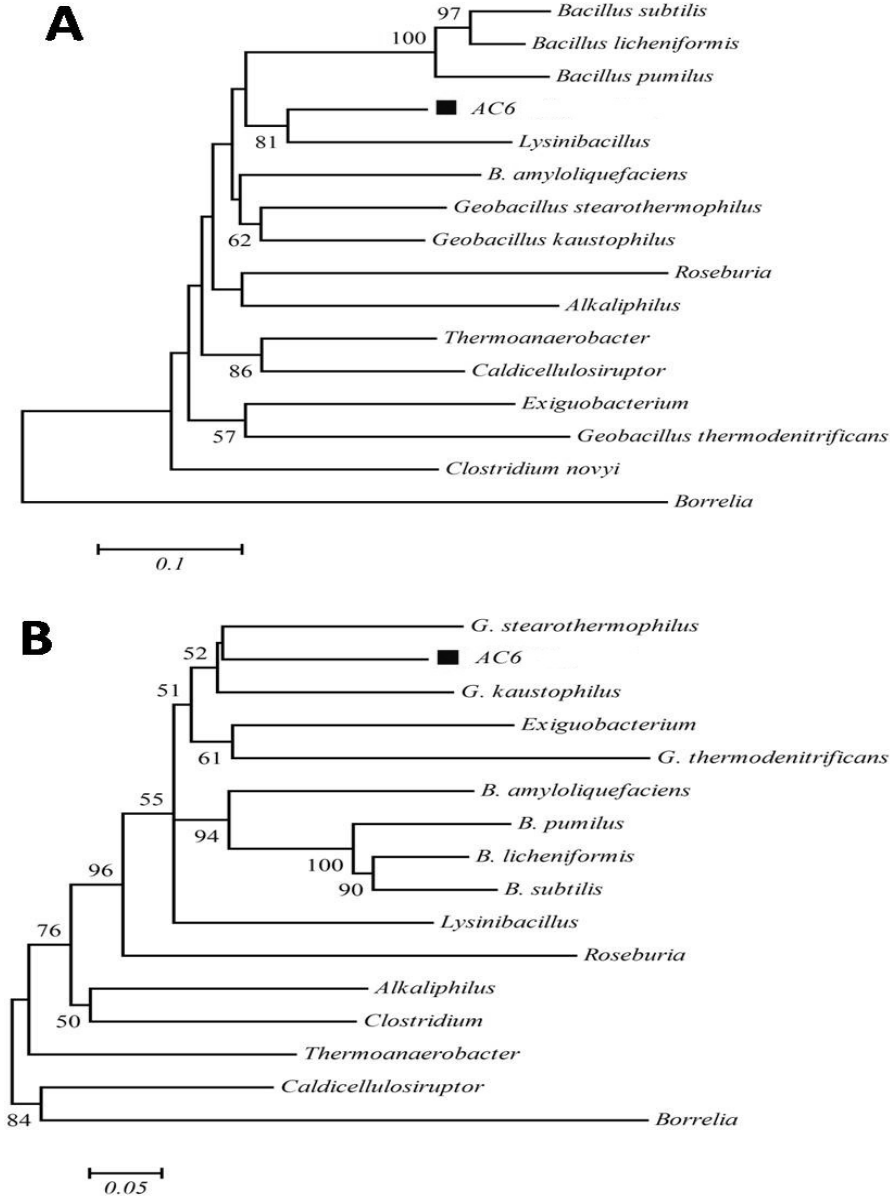
verilen değişik bakteriyel filumlara ait protein ve nükleotit sırası bilinen 33 flagellin proteini bu analizi için kullanıldı. Filogenetik ağaç, Mega (4.0) Programı ile çizildi. Neighbor- Joining metodu ile oluşturulan köksüz filogenetik ağaç göstermiştir ki AC6 izolatı Firmicutes filumu üyeleri ile beraber kümelenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. AC6'nın flagellin protein sekansı bakımından filogenetik ağacı. Anahtarlar herbir türün bağlı olduğu filumu göstermektedir. Bootsrtrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. Seç-bağla değeri % 70'den fazla olanlar kullanılmamıştır.

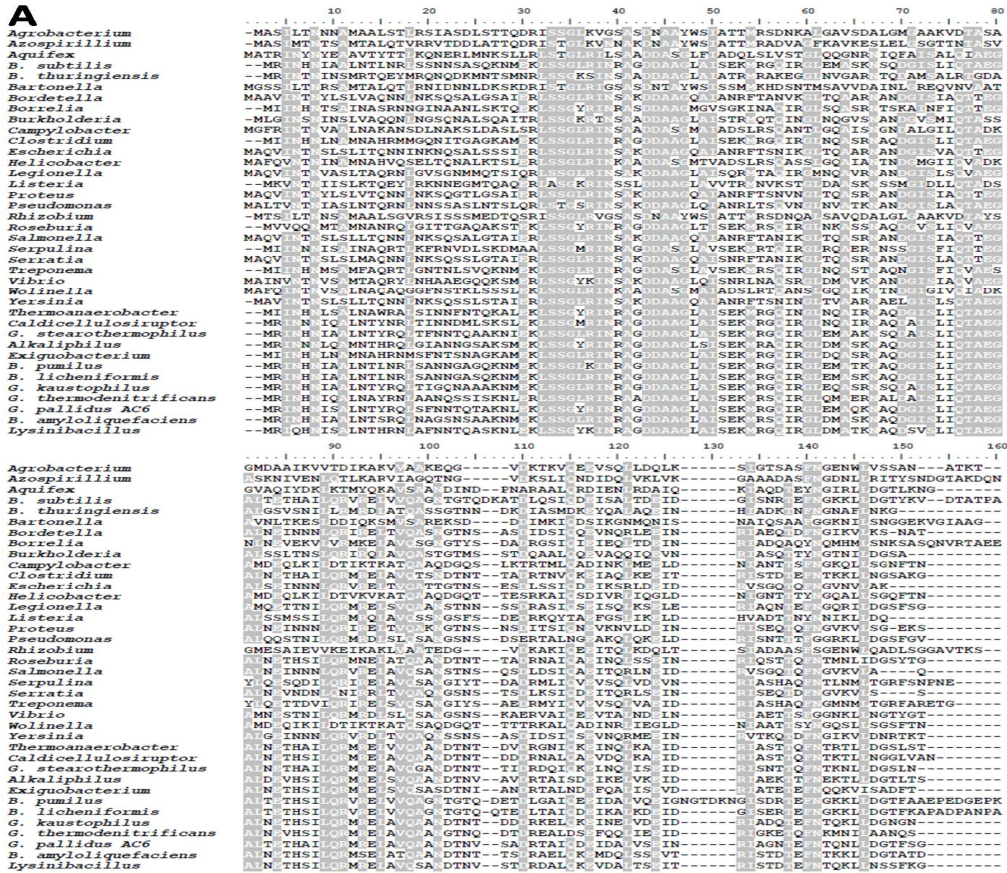
AC6'nın birlikte kümelenediği Firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu DNA ve protein seviyesinde oluşturulan filogramlar ile belirlendi (Şekil 22A ve 22B). Neighbor-Joining metodu DNA ve protein seviyesinde filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanıldı. Protein içerikleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 22A) göstermiştir ki AC6 flagellin proteini Firmicutes filumu içerisinde *Lysinibacillus* ile yakın ilişkilidir. DNA seviyesinde oluşturulan diğer bir filogenetik ağaç (Şekil 22B) sonuçları, AC6 flagellin proteinin *G. stearothermophilus* ve *G. kaustophilus* ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Tüm filumlar içerisinde AC6 flagellin proteinin yerinin tespiti için kullanılan

köksüz ağaçta (Şekil 21) *Borrelia*, AC6'nın içerisinde bulunduğu kümeye en yakın olan dal olarak görülmektedir. Bundan dolayı her iki filogenetik ağaçta da *Borrelia burgdorferi* dış grup (outliner) olarak kullanılmıştır.



Şekil 22. Protein ve DNA seviyesinde AC6 flagellin geninin firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu. A; Protein seviyesine göre oluşturulmuştur. B; DNA seviyesine göre oluşturulmuştur. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. Seç-bağla değeri % 50'den fazla olanlar kullanılmamıştır.

National Center for Biotechnology Information Conserved Domain (URL- 9, 2010) veritabanı kullanılarak AC6 için flagellin proteininin korunmuş domainleri tespit edildi. AC6 flagellin proteininde N terminal bölgede yaklaşık 100 a.a’ın ve C terminal bölgede yaklaşık 50 a.a’ın korunmuş olduğu tespit edildi. Bu korunmuş domain bölgeleri 33 bakteriyel generanın ve AC6 flagellin proteinlerinin ClustalW analizleri ile gözlemlendi (Şekil 23). Yapılan analiz sonucunda N-terminal domainde 30 ve 50. pozisyonlar arasında kuvvetli bir korunmuşluğun olduğu, daha sonraki 50 a.a de ise korunmuşluğun var olmakla birlikte, ilk pozisyon kadar kuvvetli olmadığı gözlemlendi. C-terminal domain bakımından incelendiğinde ise son 50 a.a’ın korunmuşluk gösterdiği ve bunlar içerisinde son 16-18 a.a’ın kuvvetli bir şekilde korunduğu tespit edildi.



Şekil 23. AC6 flagellin proteininin N ve C-terminal domainlerinin ClustalW analiz sonuçları. A) N-terminal domain bölgesini gösterir. B) C-terminal domain bölgesini gösterir.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
B. licheniformis  M Q S L N --- Y E D Q M L S R K E W K P Q A G D D I R R M P V T Y H V G I A V G L E K S V H K D D V L M L G L Y D A E F D E G R D L K F E D T Y A S F R I R
B. pumilis       M Q S L N --- Y E D Q A L A R K E W K P A A G D D M R R M P V T Y H V G I S I G L E K S V H K E D I L M L G L Y D A E F D E G R D L K F E D T Y A S F R I R
B. subtilis      M Q S L N --- Y E D Q V L T R K E W K P K A G D D M R R M P V T Y H V G I S V G L E K S V H K D D M L M L G L Y D A E F D E S R D L K F E D T Y A S F R I R
Exiguobacterium M T H L ----- T Q L D R N M D R M D T A N E L A H E F I H Y H V Q M I V T L E K S V E R D E K L Y M L Y D A I M Y E E H N N K F E D T Y A F R I R
G. kaustophilus  M G S A L -- K G E E R K Y D E I H G R R H A A E E V Q R M P V F Y H V Q L S A T L E S S V P K E E V L L V G L Y D A E F D E S R D L K F E D T Y A S F R I R
G. thermodenitrificans M G S A L T L K G D E Q K Y D D V N G R R H A A E E V Q R M P V S Y H V Q L S A T L E S S V P K E E V -- L V G L Y D A E F D E S R D L K F E D T Y A S F R I R
                                                    ***** ****

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
B. licheniformis  G A I I D G L R E D W L P R T S E T T V E A A I K E L E R Y L N V S P S I A E L G M S E Q D V V T T I N G F A N L S I D E K L H D H E D G E N V Q V M I R D
B. pumilis       G A I I D G L R E D W L P R T S E T T V E A A I K E L E R Y L N V T P T V E E L G M S E Q D V V T T M N G F A N L S I D E K L H Q D D G E N V Q V M I R E
B. subtilis      G A I I D G L R E D W L P R T S E T T V E A A I K E L E R Y L N V S P A I E E L G M T V Q D V V S T M N G F A N L S I D E K L H Q D D G E N I Q V M I R D
Exiguobacterium G A I I D G L R V D W L P R S V E V R I D H V A Q L E C S L H A P T K S L S A C D L P I S E I E R T M A G Y A N M S I D E A V T L Q E E G K V M S V T Y F P
G. kaustophilus  G A I I D G L R E D W L P R S M D A K I E E A I R E C R H M S V T A K I A E L G M T E E E V Q A A S T F S H W P L G Q T T V D E D E G --- L L A V R D
G. thermodenitrificans G A I I D G L R E D W L P R S V D V M I E E T A R L E C R Y M S V T A K V A E L G M T E E E V Q A A V N T F S N W S L G Q T A C E E D D E --- P L A I R D

      190     200     210     220     230     240     250     260
B. licheniformis  K T S T P E E K M L K D L S Q L E K I N E S S K E Q L V I S L E Y K E L L T E I C Q V N L S T S R I S Q I S K A I L K K H L L D K V V Q ----
B. pumilis       K T V T P E E K M L K D L E Q L E K M T E S S K E Q L V I S L E Y K E L L T E I C H V N L S T S R I S Q I S K A I F K K H L L D K A I Q S ----
B. subtilis      K N V P P E E K I M K D L A Q L E K I H E S S K E Q L V S L E Y K E L L T E I C Q V N L S T S R I S Q I S K A I F K K N L L E K V I Q ----
Exiguobacterium D S E K P E D T L L Q R L D V L A E V D H S S K E R Q V S L E Y F D E L L T E I C E V E L S T S R I S Q I S K A I K T K H A L G R S Y L E E K T S
G. kaustophilus  R A P L P E E Q I V K Q M E K L E A I G Q N S K E Q L V I S L E Y K E L L T E I C S L H L S T S R I S Q I A K A I W K R R F F E K E P ----
G. thermodenitrificans R A V L P E E Q V V K Q M E K L V G I G Q N S K E Q L V I S L E Y K E L L T E I C S I Q L S T S R I S Q I A K A I W K R R F F A E E Q ----
                                                    *****

```

Şekil 24. Değişik grup bakterilere ait Sigma-D geni için korunmuş bölgelerin gösterilimi. Yıldız şeklinde gösterilen karakterler primer dizayn etmede kullanılan sekansları gösterir.

Bu veriler doğrultusunda gene ait olduğu bilinen 560 bp bölgeden hareketle AC6 sigD geni 5' ve 3' uçlarına doğru bilinmeyen nükleotit sırası invers PCR ve dizayn edilen SigDF3 ve SigDR3 (Tablo 12) primerleri kullanılarak çoğaltılmaya çalışıldı. *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan ilk invers PCR işleminden sonra PCR ürünü sekanslandı. Sekans analizlerinin BioEdit Programı ile işlenmesinden sonra toplam uzunluğu 866 bp olan bir fragment elde edildi ve bu fragment içerisinde SigD geninin açık okuma bölgesi ve ribozoma bağlanma bölgesi tespit edildi (Şekil 25).

AATTCATTCATTTTACGATTTCGCACCGTCAATCTTGGAGTGAAGCAAATATAGCCGGAGATTGACATTTTAGAAGGA

GGAAAAAGGCA ATG GTC CAA TCG ATG ACA CTG AAT GAT GAA AGG GTG TAC TGG GAC AAG

M V Q S M T L N D E R V Y W D K

TGG TTT CGT CAC CGT GAT CAA GAT GCG GGC AAC ATG CTC GTC AAA AAA TAT ATG CCG

W F R H R D Q D A G N M L V K K Y M P

CTT GTC CGC TAT CAT GTC AGT CGT ATT TCA GTG GGT CTT CCA AAA AAT GTC GAT AAA

L V R Y H V S R I S V G L P K N V D K

GAT GAT TTA ATA AGT TTT GGA TTG ATG GGA TTA TAT GAT GCA CTG GAA AAA TTT GAC

D D L I S F G L M G L Y D A L E K F D

CCT ACA CGG GAT TTA AAA TTC GAT ACG TAT GCA TCC TTC CGC ATA CGC GGA GCC ATT

P T R D L K F D T Y A S F R I R G A I

CTT GAC GGA CTA AGG AAA GAA GAT TGG CTT CCA AGA AGT TTT CGG GAA AAA GCA GAA

L D G L R K E D W L P R S F R E K A K

AAA GTG GAA GCA GCC ATT GAG CGG TTG GAG CAA AAA TAT CAT CGC AAT GTG ACG CCT

K V E A A I E R L E Q K Y H R N V T P

AAT GAA GTT GCA GAA GAA TTG GGT ATG ACA CCC GAA GAA GTC GTT CAT GTC GTC AAT

N E V A E E L G M T P E E V V H V V N

GAA AAC TTT TTT GCC AAT GTC TTG TCA ATT GAT GAA CAA TTG CAT GAC CAA GAA GAA

E N F F A N V L S I D E Q L H D Q E E

GGG GAA CAG ATG AAC ATT GTC CTT AAG GAT GAT AAA ACA TTA ACT CCG GAA GAG CAT

G E Q M N I V L K D D K T L T P E E H

CTG TTA AAA GAG GAA TTA TTT GAG CAT TTA ACA AAA TTG ATC TCA CAA TTA AAC GAT

L L K E E L F E H L T K L I S Q L N D

AAG GAG CAG CTC GTA TTA AGC TTG TTT TAT AAA GAA GAG CTG ACA TTA ACA GAG ATA

K E Q L V L S L F Y K E E L T L T E I

GGA AAC GTG CTG AAT TTG TCC ACT TCG AGA ATT TCG CAA ATT CAT TCG AAA GCA TTA

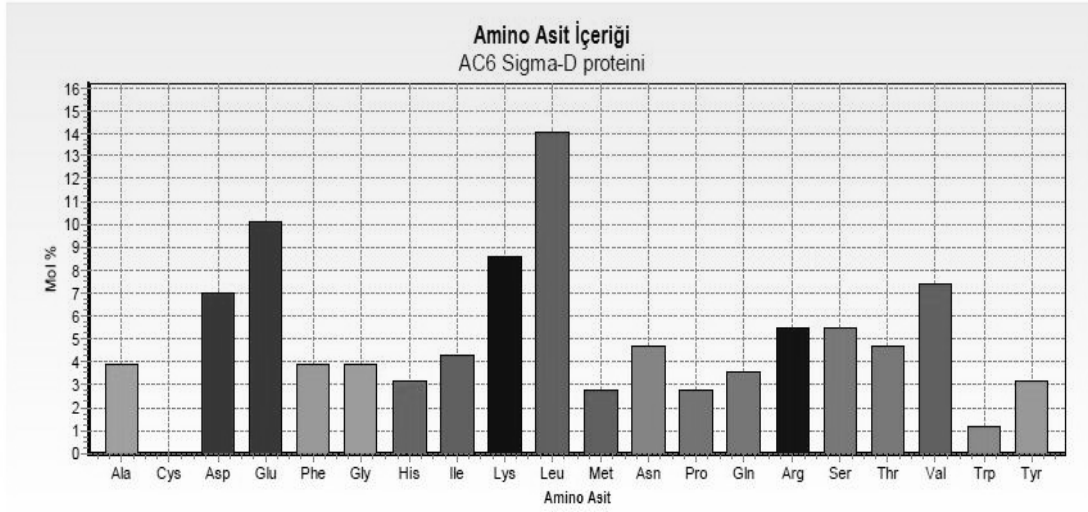
G N V L N L S T S R I S Q I H S K A L

TAT AAA TTA AAA GGA ACG CTC GTT AAG CTT TTA TCT TAA AAAGAA

Y K L K G T L V K L L S *

Şekil 25. *sigD* geninin nükleotit ve protein sekansı. Kutu içerisindeki sekans ribozoma bağlanma bölgesini gösterir. M; Methionin, V; Valin, Q; Glutamin, S; Serin, T; Trionin, L; Lösin, N; Asparagin, D; Aspartik asit, E; Glutamik asit, R; Arjinin, Y; Tirozin, W; Triptofan, K; Lisin, F; Fenilalanin, H; Histidin, A; Alanin, G; Glisin, I; İzölösün, P; Prolin

SigD geni 771 nükleotit çiftinden oluşmaktadır. 771 bp'lik bölge 256 a.a kodlamaktadır. Flagellin proteini kompozisyonu ExPASy ProtParam tool programı (URL-7) ile incelendiğinde, σ^D proteininin en yüksek 36 a.a (%14.1) Lösin, bunu sırasıyla 26 a.a (% 10.2) ile Glutamik asit, 22 a.a (% 8.6) ile Lisin, 19 a.a (% 7.4) ile Valin, 18 a.a (% 7.0) Aspartik asit, 14 a.a (% 5.5) ile Serin ve Arjinin, 12 a.a (% 4.7) ile Trionin ve Asparagin, 11 a.a (% 4.3) ile İzölösün, 10 a.a (% 3.9) ile Glisin ve Fenilalanin, 9 a.a (% 3.5) ile Glutamin, 8 aa (% 3.1) ile Histidin ve Tirozin, 7 a.a (% 2.7) ile Methionin ve Prolin ve 3 a.a (% 1.2) ile Triptofan a.a'lerini ihtiva ettiği saptandı (Şekil 26). Sistein a.a AC6 σ^D proteininde hiç bulunmamaktadır.



Şekil 26. AC6 Sigma-D proteini amino asit içeriği. Met; Methionin, Val; Valin, Glu; Glutamin, Ser; Serin, Thr; Trionin, Leu; Lösin, Asp; Asparagin, Asn; Aspartik asit, Gln; Glutamik asit, Arg; Arjinin, Tyr; Tirozin, Lys; Lisin, Phe; Fenilalanin, His; Histidin, Ala; Alanin, Gly; Glisin, Ile; İzölösin, Pro; Prolin, Cys; Sistein, Trp; Triptofan.

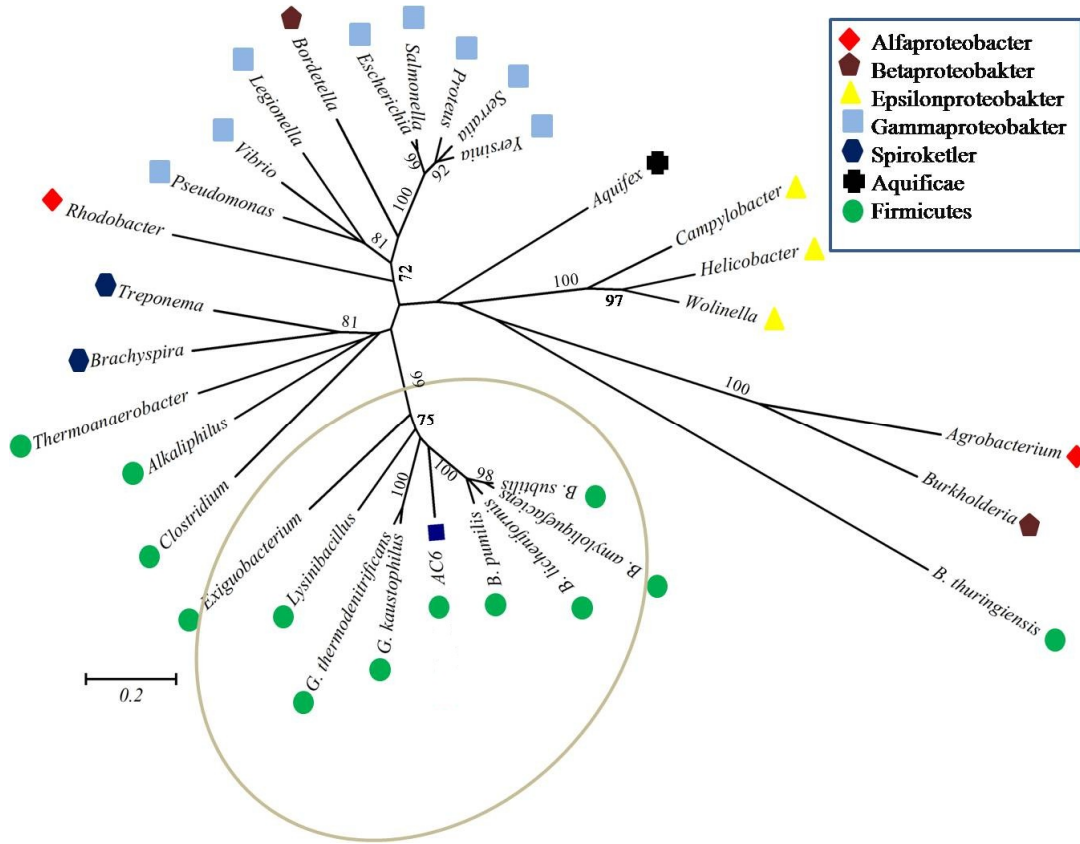
3.2.1 AC6 *sigD* Geninin Diğer *sigD* Genleri ile Karşılaştırılması

AC6 *sigD* geninin tüm nükleik asit sırası belirlendikten sonra NCBI Blast (URL-1, 2009) veri tabanında benzer Sigma-D genlerinin tespiti için Nükleik Asit Blast işlemi gerçekleştirildi. Nükleik Asit Blast işlemi sonucunda AC6 *sigD* geni % 68 benzerlik oranı ile en fazla *Geobacillus sp.* WCH70 *SigD* genine benzediği tespit edildi. Diğer benzer Sigma-D genleri ve benzerlik oranları Tablo 23’de verilmiştir.

Tablo23. Nükleotit Blast sonucunda *sigD* genine sahip benzer türler

Suş	Kayıt No	<i>SigD</i> Gen Sekans Sonuçları	Çakışan nükleik asit uzunluğu (%)	Flagellin gen benzerliği (%)
<i>Aeribacillus pallidus</i> AC6 <i>sigD</i> geni	CP001638.1	<i>Geobacillus sp.</i> WCH70, sigma 28 altbirimi, FliA/WhiG	87	68
	CP000817.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41, RNA polymerase sigma-D faktör (Sigma-28)	86	66
	CP000560.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42, <i>SigD</i> geni	83	69

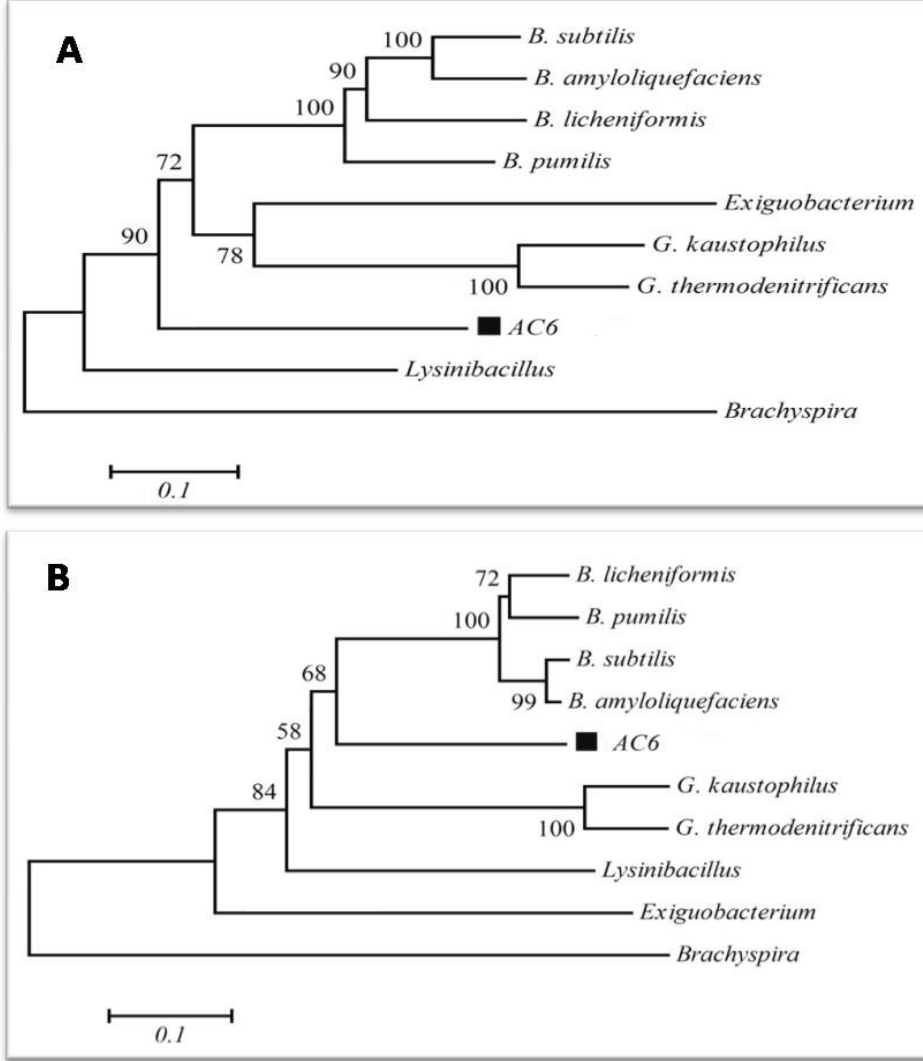
AC6 σ^D geninin sistematikteki yerini belirlemek için tam protein kodlayan nükleotit sırası ExPasy (URL-8) Programı ile a.a sıralarına dönüştürüldü ve değişik filumlarda bulunan bakteriler ile olan benzerliği araştırıldı. Tablo 11’de verilen değişik bakteriyel filumlara ait protein ve nükleotit sırası bilinen 31 σ^D proteini bu analiz için kullanıldı. Neighbor- Joining metodu ile oluşturulan köksüz filogenetik ağaç göstermiştir ki AC6 izolatu Firmicutes filumu üyeleri ile beraber kümelenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. AC6'nın σ^D protein sekansı bakımından filogenetik ağacı. Anahtarlar herbir türün bağlı olduğu filumu göstermektedir. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. Seç-bağla değeri % 70'den fazla olanlar kullanılmamıştır.

AC6'nın birlikte kümelendiği Firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu DNA ve protein seviyesinde oluşturulan filogramlar ile belirlendi (Şekil 28). Neighbor-Joining metodu DNA ve protein seviyesinde filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanıldı. Proteine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 28A) göstermiştir ki AC6 σ^D proteini Firmicutes filumu içerisinde *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* ile yakın ilişkilidir. DNA seviyesinde oluşturulan diğer bir filogenetik ağaç (Şekil 28B) sonuçları, AC6 σ^D proteinin

Lysinibacillus, *G. strearothermophilus* ve *G. kaustophilus* ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Tüm filumlar içerisinde AC6 σ^D proteininin yerinin tespiti için kullanılan köksüz ağaçta (Şekil 27) *Brachyspira* AC6'nın içerisinde bulunduğu kümeye en yakın olan dal olarak görülmektedir. Bundan dolayı her iki filogenetik ağaçta da *Brachyspira hyodysenteriae* dış grup (outliner) olarak kullanılmıştır.



Şekil 28. Protein ve DNA seviyesinde AC6 *sigD* geninin Firmicutes filumu içerisindeki pozisyonu. A; Protein seviyesine göre oluşturulmuştur. B; DNA seviyesine göre oluşturulmuştur. Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. Seç-bağla değeri % 50'den fazla olanlar kullanılmamıştır.

National Center for Biotechnology Information Conserved Domain (URL- 9, 2010) veritabanı kullanılarak AC6 için σ^D proteininin korunmuş domainleri tespit edildi. AC6 σ^D proteininin 3 korunmuş domainin olduğu tespit edildi.

3.3. AC6'da Yüksek Seviyede Ekspres Edilen *hag* Geninin Promotor Analizi

AC6'da flagellin geninde belirlenen yüksek ekspresyon seviyesi transkripsiyonel seviyede analiz edildi. Prokaryotlarda gen ekspresyonu ve protein bolluğu transkripsiyonun başlangıç seviyesinde, promotor gücü, promotorun biçimi ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli faktörler ile kontrol edilir (Karlin ve Mrazek, 2000). Bu sebepten dolayı AC6 *hag* geninin promotor yapısının analizi gerçekleştirildi. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile AC6 *hag* geninin promotor bölgesi analiz edildi.

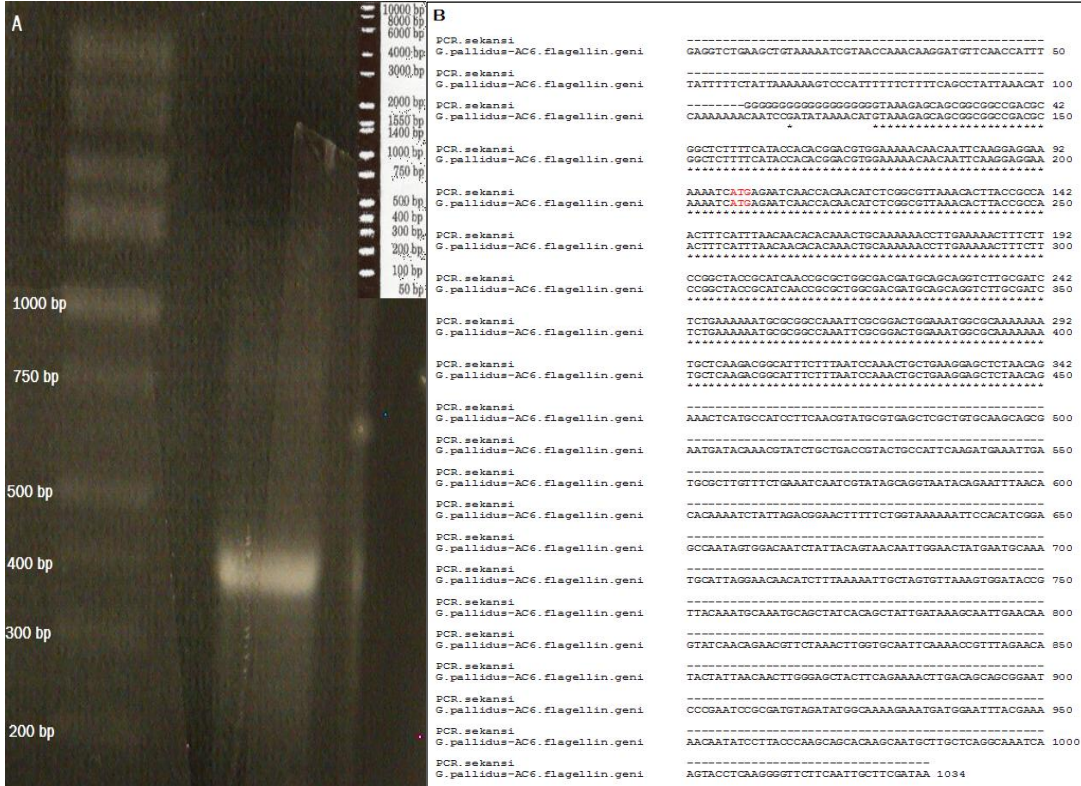
3.3.1. *in vivo* Promotor Analizi ve Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu aşama transkripsiyon başlangıç noktasının belirlenmesi ve bir rapörter gen ile birleştirilmiş promotor fragmentlerinin kullanılarak hücre içerisinde promotor aktivitesinin gösterimi ile gerçekleştirilir.

3.3.1.1. Transkripsiyon Başlangıç Yerinin Belirlenmesi

hag geninin transkripsiyon başlangıç yeri cDNA'nın 5' ucuna doğru çoğaltılması tekniğine dayanan 5' RACE System Kiti kullanılarak incelendi. Geç logaritmik fazda izole edilen flagellin geni mRNA'sının konsantrasyonu 2.8. bölümde tanımlandığı gibi ölçüldü. İzolasyon sonrası mRNA konsantrasyonu 1,31 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı.

AC6'dan izole edilen mRNA Gpal.GSP1 ve Gpal.GSP2 primerleri ile analiz edildi. Bu primerler yardımı ile yapılan Touchdown PCR sonucunda, 5' ucuna doğru uzatılan ürün %1 'lik agaroz jelinde belirlendi (Şekil 31a). PCR ürünü sekansı BioEdit Programı ile incelendi ve transkripsiyonun başlangıç bazı belirlendi (Şekil 31b).



Şekil 29. 5'-RACE tekniği ile genin transkripsiyon başlangıç noktasının tespiti. A; Touchdown PCR ürününün %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü, B; sekanslama sonrası *A. pallidus* AC6 flagellin gen sekansı ile karşılaştırılması

Sekanslama sonucunda transkripsiyon başlama bazının, translasyon başlama kodonundan (ATG) upstream bölgeye doğru 79 ve 80 baz ilerideki G ve T nükleotiti olduğu bulundu. Transkripsiyon başlangıç yerinin belirlenmesinden sonra -10 ve -35 elementlerinin sekans sıraları belirlenmeye çalışıldı. σ^D 'ye bağlı RNA polimeraz tarafından tanınan potansiyel promotor sekansları (-10 bölge; CCGATAT ve -35 bölge; CTAAA) upstream bölgede belirlendi (Şekil 34). Bu sekansların ve 5' UP (upstream promotor) elementlerinin fonksiyonel analizi *lacZ* füzyon vektörü oluşturularak gerçekleştirildi.

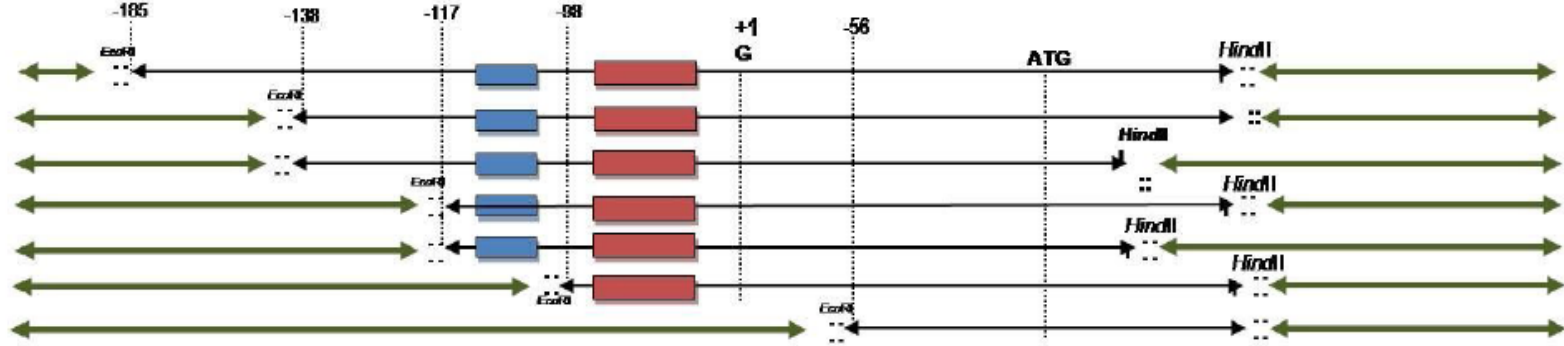
3.3.1.2. *hag:lacZ* Füzyon Vektörlerinin Yapılandırılması

AC6 flagellin geninin promotor bölgesi ve UP elementlerinin tanımlanabilmesi için geliştirilen stratejide, promotor bölgesinde oluşturulan fragmentlerin promotoru bulunmayan bir *lacZ* geninin önüne klonlanması ile gerçekleştirildi. Daha sonra, *lacZ* geni

ekspresyon seviyesi belirlenerek promotor bölgesinin sınırları ve UP elementlerin regülasyondaki öneminin belirlenmesi sağlandı.

Bu amaç için oluşturulan *hag* promotor fragmentlerinin şematik görünümü ve sekansları Şekil 30'de verilmiştir. Translasyon başlangıç kodonundan 22 bp downstream ve 185 bp upstream bölge arası en geniş fragment olarak dizayn edildi ve hag185 olarak isimlendi. Daha sonra oluşturulan hag138a ve hag 138b fragmentlerinde ise translasyon başlangıç kodonundan 138 bp upstream bölge ve 22 bp ve 4 bp downstream arasındaki bölge kullanılarak fragmentler oluşturuldu. Translasyon başlangıç kodonundan itibaren 117 bp upstream ve yine 22 bp ve 4 bp downstream bölgeleri arasını içine alacak şekilde oluşturulan fragmentler hag117a ve hag117b olarak isimlendirildi. Oluşturulan hag185, hag138a, hag138b, hag117a ve hag117b fragmentleri -10 ve -35 promotor elemanları olarak düşündüğümüz sekansları içerirken, upstream ve downstream yönlerinde farklı sekans uzunluklarına sahiptirler. Oluşturulan diğer bir fragment olan hag98 translasyon başlama kodonundan itibaren 98 bp upstream ve 22 bp downstream bölgeleri arasını içerir ve bu bölgede sadece -10 promoter sekansı yer alır. Son olarak oluşturulan hag56 fragmenti translasyon başlama kodonundan itibaren 56 bp upstream ve 22 bp downstream bölgeleri arasını kapsar ve bu bölge hem -10 hemde -35 promotor elemanlarından yoksundur.

A



B

hag185	CGTAACCAACAAGGATGTTCAACCATTTTATTTTTCTATTAATAAAAAGTCCCATTTTTCTTTTCAGCCTAT	-35	TAAA-N ₁₅	-10	CCGATATAAAAACATGT-N ₇₈	+1	TrBN	ATG-N ₂₀
hag138a			GTCCCATTTTTCTTTTCAGCCTAT	TAAA-N ₁₅	CCGATATAAAAACATGT-N ₇₈			ATG-N ₂₀
hag138b			GTCCCATTTTTCTTTTCAGCCTAT	TAAA-N ₁₅	CCGATATAAAAACATGT-N ₇₈			ATG-N ₁
hag117a			TTTTCAGCCTAT	TAAA-N ₁₅	CCGATATAAAAACATGT-N ₇₈			ATG-N ₂₀
hag117b			TTTTCAGCCTAT	TAAA-N ₁₅	CCGATATAAAAACATGT-N ₇₈			ATG-N ₁
hag98				CAATCCGATATAAAAACATGT-N ₇₈				ATG-N ₂₀
hag56								N ₅₆ ---ATG-N ₂₀

Şekil 30. AC6 *hag* geni promotor fragmentlerinin gösterilimi. A) Fragmentlerin şematik gösterilimi, yeşil ok (↔) pDG1663'ü, siyah ok (↔)promotor fragmentlerini, kırmızı kutu (■) -10 promotor elementini, mavi kutu (■) -35 promotor elementini gösterir. B) Promotor fragmentlerinin nükleotid sırası, Gri kutu içerisinde gösterilen nükleotidler -10 ve -35 promotor elemanlarını, altı çizili ve koyu karakterle gösterilen **GT** transkripsiyon başlangıç noktasını, altı çizili ve koyu karakterle gösterilen **A** nükleotidi translasyon başlangıç noktasını (TrBN) gösterir.

Dizayn edilen tüm promotor fragmentleri Tablo 16’de verilen primerler vasıtasıyla belirtilen protokoller uygulanarak çoğaltıldılar. PCR reaksiyonu sonucunda 207, 160, 142, 139, 121, 120 ve 78 bp’lik fragmentler % 1’lik agaroz jelinde gözlemlendi (Şekil 18). Bu promotor fragmentleri ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilerek aynı enzimler ile muamele edilmiş pDG1663 integrasyon vektörüne klonlandılar. Oluşturulan integrasyon vektörleri *B.subtilis* CU1065 yaban tipi ve *B.subtilis* CU1065’den türevlendirilerek genomunda σ^D geni silinmiş HB4035 hücre genomlarına integrasyonu sağlandı. Rekombinant hücreler MLS direnci altında seçildi.

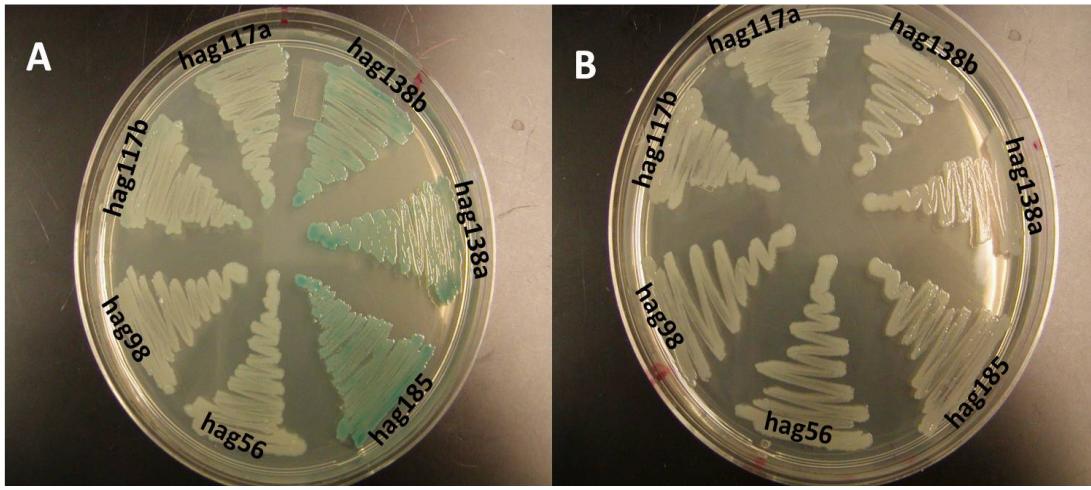
Herbir fragmenti çoğaltmak için kullanılan forward primerler (Tablo 16) ve pDG1663 için dizayn edilen spo-V-lacZ-checkrev (ATCGTAACCGTGTCATCTGCC) primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile seçilen hücrelerden doğru yönde ve tam olarak genoma integre olan koloniler tespit edildi. Doğru olarak tespit edilen koloniler X-gal içeren MLS’li LB agar petrilere ekimleri gerçekleştirildi.



Şekil 31. Promotor fragmentlerinin %1’lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

X-gal içeren MLS’li LB agar petrilinde, hag185, hag138a ve hag138b fragmentlerinin integre olduğu CU1065 yaban tip hücrelerde *lacZ* geninin *in vivo* ekspresyonu sonucu koyu mavi renkli koloniler oluşturdukları gözlenirken rekombinat plazmitleri taşıyan mutant HB4035 transformantlarının hiçbirinde mavi renkli koloni

oluşumu gözlemlenmedi (Şekil 18). Promotor fragmentlerinden hag117a ve hag117b fragmentini içeren CU1065 yaban tip hücrelerinin X-gal içeren agar ortamında çok açık mavi renkli koloniler oluşturduğu gözlenirken hag98, hag 56 fragmentlerini taşıyan yaban tip hücreler de mavi renkli koloni oluşumu gözlemlenmedi. Tüm fragmentleri içeren *sigD* geni bakımından mutant olan HB4035 hücresi ise X-gal içeren agar ortamında büyütüldüğünde, hiç bir rekombinant hücrede mavi renk oluşumu tespit edilemedi. Promotor fragmentlerinin önündeki *lacZ* geninin ekspresyonunu sağladığını gösteren mavi renk koloni oluşturup, oluşturamama sonuçları β -Gal deneyi ile nicelleştirildi.

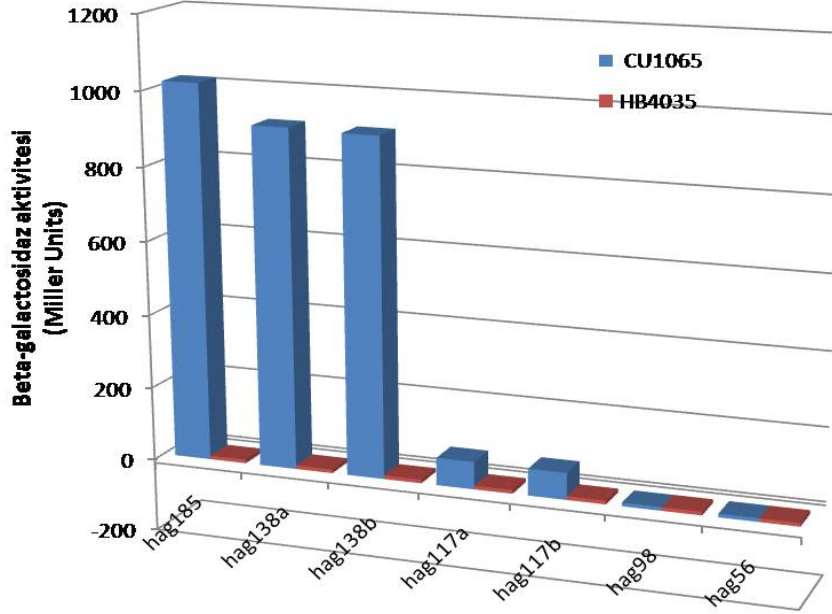


Şekil 32. Promotor fragmentlerini içeren rekombinant integrasyon vektörünü taşıyan *B.subtilis* CU1065 ve HB4035 hücrelerinin *lacZ* geni ekspresyonu. A; *B. subtilis* CU1065, B; *B. subtilis* HB4035

Promotor fragmentlerinin genomlarına integre olduğu *B.subtilis* CU1065 ve σ^D mutant HB4035 hücreleri β -Galaktosidaz deneyi için, 2 ml MSL içeren LB sıvı besiyerinde 37°C'de bir gece inkübe edildiler. Ertesi gün kültürler 1:100 oranında 5 ml taze Schaeffer's Sporulation besiyeri içerisine inoküle edildiler ve 600 nm'de geç logaritmik faza kadar (OD 0,9) yaklaşık 9-10 saat 37°C'de büyütüldüler. OD₆₀₀ = 0,9 olduğu zaman hücreler toplandı ve -20 °C'de bir gece inkübe edildi. Beta-galaktosidaz deneyi Miller (1972)'e göre gerçekleştirildi ve sonuçlar Miller Ünit şeklinde hesaplandı.

Yapılan β -Gal. deneyinde tüm fragmenleri taşıyan CU1065 yaban tip ve HB4035 mutant hücreleri ve kontrol olarak hiçbir fragment taşımayan CU1065 hücresi kullanıldı. Yapılan β -Gal. deneyi sonucunda kontrol reaksiyonda ve promotor fragmentlerini içeren

σ^D mutant HB4035 hücrelerinde hiçbir aktivite belirlenmedi (Şekil 33). HB4035 için promotor fragmentlerinin önünde bulunan *lacZ* geninin σ^D yokluğundan dolayı ekspres edilemediği bu sonuçlar doğrultusunda belirlendi.



Şekil 33. *hag:lacZ* füzyon vektörünü içeren yaban tip ve mutant tip *B. subtilis* hücrelerinin Beta-galaktosidaz aktivitesinin gösterilmesi

Promotor fragmentlerini içeren CU1065 hücrelerinde ise, en yüksek β -Galaktosidaz aktivitesi Miller Ünit olarak hag185 promotor fragmentinin integre olduğu yaban tip hücrede belirlendi. Bunu sırasıyla hag138a ve hag138b fragmentlerinin integre olduğu yaban tip hücrelerdeki β -Galaktosidaz seviyesi takip etti. Aktivite olarak hag138a ve 138b fragmentlerini taşıyan hücreler arasında belirgin bir aktivite farkı belirlenemedi. Promotor elementlerinden -10 ve -35 bölgelerini içeren hag117a ve hag117b fragmentlerinin integre olduğu yaban tip hücrelerde ise aktivitenin belirgin bir biçimde düştüğü tespit edildi. Promotor elementlerinde -35 bölgesinden yoksun olan hag98 ve hem -35 hemde -10 bölgelerinden yoksun olana hag78 fragmentlerinin integre olduğu yaban tip hücrelerde kontrol ve mutant hücrelerde olduğu gibi herhangi bir β -Gal. aktivitesi tespit edilemedi. Bu sonuçlar Tablo 24 'de gösterilmiştir.

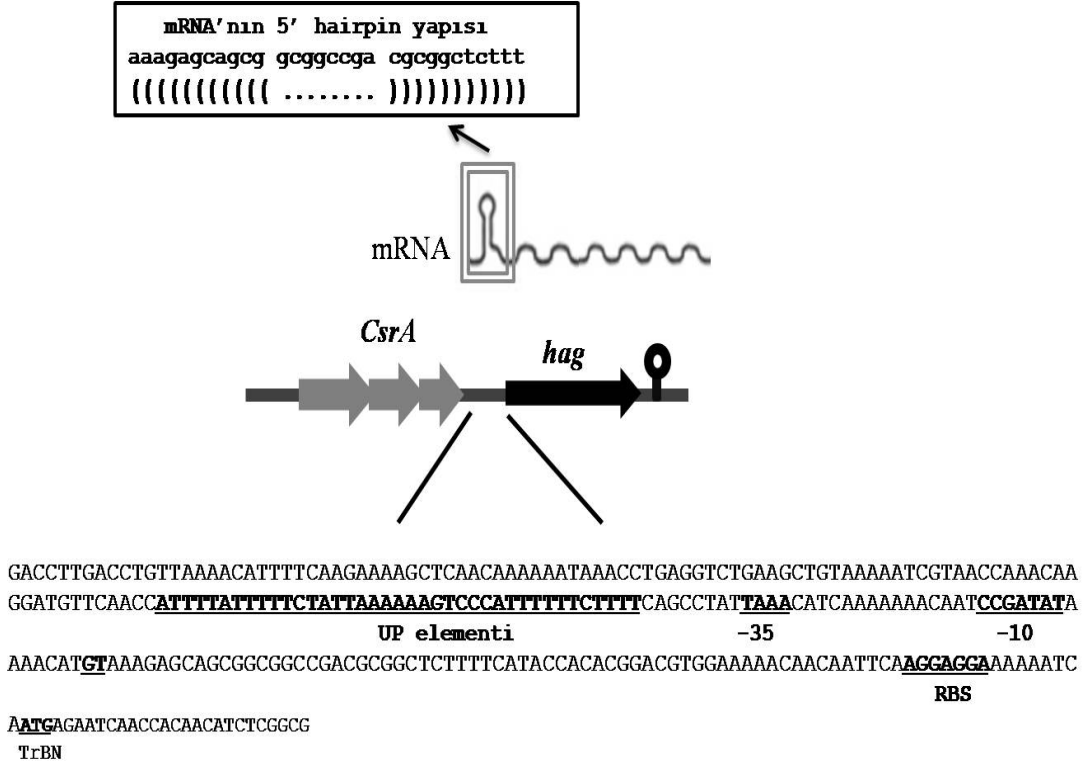
Tablo 24. *B. subtilis* CU1065’de *hag* geni promotor fragmentlerinin *in vivo* ekspresyonu

Promotor fragmentleri	Promotor DNA’nın Uzunluğu*	β - galaktosidaz aktivitesi (Miller Ünit)	% Aktivite
hag185	185/ 22	1016 \pm 49	100
hag138a	138/ 22	914 \pm 99	89,9
hag138b	138/ 4	909 \pm 63	89,4
hag117a	117/ 22	65 \pm 10	6,4
hag117b	117/ 4	63 \pm 15	6,2
hag98	98/ 22	0	0
hag58	56/ 22	0	0

*: translasyon başlangıç kodonundan itibaren Upstream/Downstream bp uzunluğu gösterir.

Promotor fragmentlerinin integre olduğu yaban tip hücrelerdeki β -Galaktosidaz aktivitesinin hag185 fragmentini taşıyan hücrelerde hag117a ve hag117b fragmentinin taşıyan hücrelere göre yaklaşık olarak 17 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Bu fragmentler incelendiğinde tüm fragmentlerin promotor elemanlarını içermesine rağmen hag117a ve hag117b fragmentlerinin UP elementlerinden yoksun olduğu gözlemlendi.

in vivo gerçekleştirilen deneyler sonucunda *hag* geninin transkripsiyon başlangıç noktası, translasyon başlangıç kodununun 79 ve 80 bp downstream yönünde bulunan G ve T bazlarının olduğu tespit edildi. +1 kodonunun belirlenmesinden sonra ve β - gal. deneyleri sonucunda, AC6 *hag* geninin transkripsiyonunun RNAP enziminin alt birimi olan σ^D tarafından kontrol edildiğini ve *hag* promotor bölgesinin σ^D tarafından tanınan CCGATAT -10 elementi sekanslarına ve TAAA -35 elementi sekanslarına sahip olduğu belirlendi. Aktivitenin 17 kat artmasını sağlayan -42 ve -80 nükleotidleri arasındaki sekansların A ve T bazlarınca zengin bölgeler olduğu ve bu bölgelerin *hag* geninin yüksek seviyede transkripsiyonu için gerekli olduğu tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 34. *hag* geni promotor bölgesinin yapısı ve nükleotit sekansı. Koyu ve altı çizgili nükleotit dizinleri UP elementlerini (UP), -35 ve -10 promotor elemanları, transkripsiyon başlama noktasını (+1), ribozoma bağlanma sekansını (RBS) ve translasyon başlama noktasını (TrBN) gösterir. *hag* mRNA'sının 5' ucunda bir hairpin yapısının olduğu tespit edilmiştir.

3.3.2. *in vitro* RNAP-promotor Kompleksi Oluşumunun Belirlenmesi

Saflaştırılmış RNAP ile promotor bölgesinin *in vitro* ortamda bir kompleks oluşturması belirlenebilir ve bu çalışmalar *in vitro* transkripsiyon, gel-motility shift (EMSA), bağlanma deneyleri ve footprinting gibi çeşitli metotlar ile çalışılabilir (Ross ve Gourse, 2009). AC6 *hag* promotor bölgesinin σ^D tarafından kontrol edildiği β -gal. deneyleri ile tespit edilmişti. σ^D -RNAP holoenzim kompleksinin yeniden oluşması ve promotor bölgeyi tanıyarak transkripsiyonu başlatması, σ^D 'nin promotor bölgeye bağlanma ilgisinin belirlenmesi ve RNAP holoenzim-promotor açık kompleksinin oluşumunun belirlenmesi *in vitro* olarak gerçekleştirilen deneyler ile belirlendi ve bu amaç için AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteini ile *B. subtilis* kor RNAP enzimi saflaştırıldı.

3.3.2.1. AC6 ve *B. subtilis* σ^D Proteininin Saflaştırılması

Flagellin geninin promotor yapısının belirlenebilmesi için ikinci yaklaşım olarak promotor-RNAP kompleksinin *in vitro* olarak araştırılmasıdır. Bu yaklaşım için AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinleri saflaştırıldı ve *in vitro* transkripsiyon, Flourecensent Anisotropy (FA) ve Potasyum permanganat footprinting deneylerinde kullanıldı.

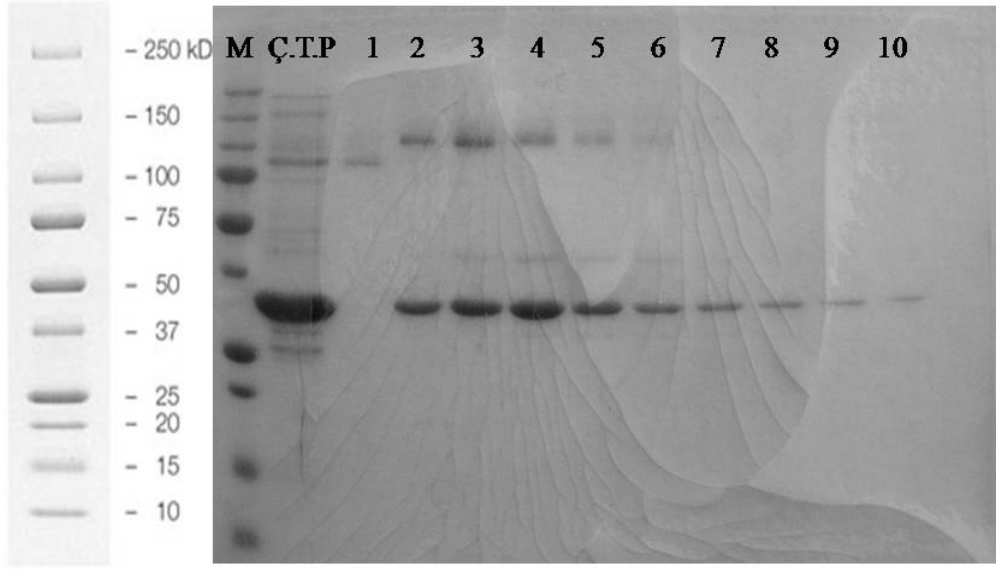
σ^D proteinleri AC6 için Gpa sigDf ve Gpa sigDr primerleri, *B. subtilis* için Bsu sigDf ve Bsu sigDr primerleri kullanılarak çoğaltıldı. PCR reaksiyonu sonucunda çoğaltılan 792 bp ve 786 bp'lik fragmentler Şekil 35'de gösterilmiştir. Çoğaltılan PCR fragmentleri *NdeI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilerek aynı enzimler ile muamele edilmiş pET11a ekspresyon vektörüne klonlandı. AC6 *sigD* genini içeren ekspresyon vektörü pECG1 ve *B. subtilis* *sigD* genini içeren vektör pECB1 olarak isimlendirildi. Oluşturulan ekspresyon vektörleri pECG1 ve pECB1, CaCl metodu ile kompotent hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3) Lys ekspresyon hücresine transform edildi.



Şekil 35. AC6 ve *B.subtilis* *sigD* PCR ürünlerinin %1'lik agarose jelde görüntüsü. 1;*B.subtilis* *sigD*, 2; *A. pallidus* AC6 *sigD*, M; 1 kb DNA markırı.

Rekombinant hücrelerin seçimi ve rekombinant hücrelerde en iyi ekspresyon seviyesini belirlemek için ilk olarak herbir sigma için 10'ar tane rekombinat *E. coli* hücresi seçildi ve genleri çoğaltmak için kullanılan forward primerler ve pET11a için dizayn edilen kontrol reverse primerler yardımı ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada doğru olarak seçilen koloniler küçük hacimlerde IPTG ile indüklendi ve protein izolasyonu gerçekleştirildi. Saflaştırma basamağı gerçekleştirilmeksizin yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda σ^D proteinlerinin en iyi ekspres edildiği hücreler seçildi. Hem AC6 hemde *B. subtilis* σ^D proteinleri için en iyi ekspresyonun görüldüğü hücrelerden pECG1 ve pECB1 plazmitleri yeniden izole edildi *sigD* genleri yeniden sekanslandı. Sekanslama sonuçları her iki proteininde ORF bölgelerinin tam olduğunu ve bu ORF bölgeleri içerisinde herhangi bir mutasyonun olmadığını gösterdi.

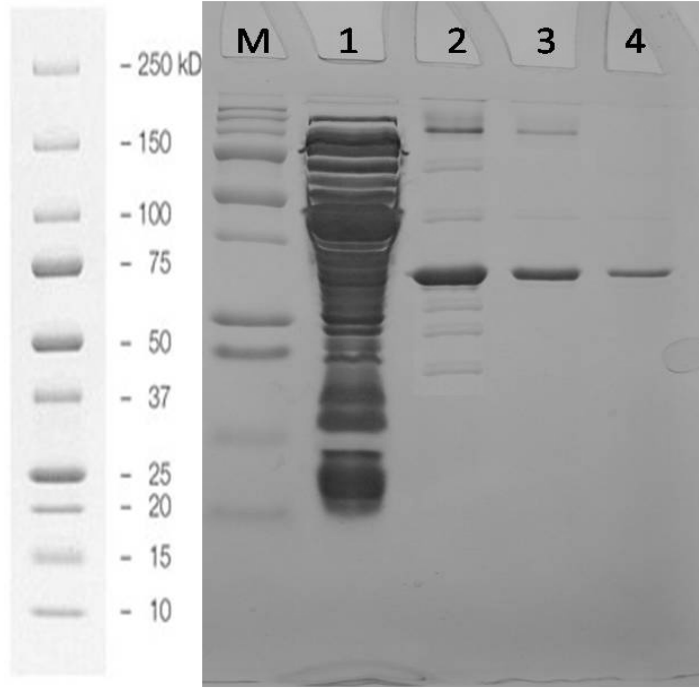
Bu basamaklar sonucunda seçilen rekombinant hücreler büyük hacimlerde üretilip, indüklenerek saflaştırılma işlemi gerçekleştirildi. σ^D proteinlerinin rekombinant hücrede inklüzyon yapıları şeklinde bulunmasından dolayı bu yapılar Sarkosyl yöntemi (Burgess, 1996) ile çözüldü. AC6 *sigD* genini taşıyan pECG1'i içeren *E.coli* hücresi 1 lt hacimde büyütüldü ve IPTG ile indüklenerek proteinin aşırı ekspresyonu sağlandı. Hücreler santrifüj yardımı ile toplandı ve pellet gerekli buffer içerisinde çözüldükten sonra sonikasyon işlemi ile hücrelerin patlatılması sağlandı. Sonikasyon işleminden sonra santrifüjle toplanan pellet kısmındaki inklüzyon yapıları şeklinde bulunan AC6 σ^D proteinlerinin Na-Sarkosyl ile çözülmesi sağlandı. Çözülen proteinler ilk olarak 5 ml DEAE-Sepharose kolon kromatografisine yüklendi. Kolon hacminin 5 katı kadar TGEDX tamponu ile yıkandı. Daha sonra çözülen proteinler kolona yüklendi ve kolon atıkların ve tutunmayan proteinlerin temizlenmesi için hacminin 4 katı kadar TGEDX tamponu ile yeniden yıkandı. Proteinler 10 ml 1M NaCl içeren TGEDX buffer ile yıkanarak 1 ml hacimlerde toplam 10 fraksiyonda toplandı. Toplanan fraksiyonlar SDS poliakrilamid jeline yüklenerek analizleri gerçekleştirildi. SDS-PAGE analizi incelendiğinde AC6 σ^D proteinin 3 ve 4. fraksiyonda yoğun olarak geldiği tespit edildi (Şekil 36).



Şekil 36. AC6 σ^D proteinin DEAE-Sepharose kolon saflaştırılması. M; protein markır (Bio-Rad), Ç.T.P; Sarkosyl metodu ile çözülen toplam protein, 1-10; DEAE-Sepharose kolonundan toplanan fraksiyonlar.

Proteinin yoğun olarak bulunduğu 3. ve 4. fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz edildi ve yoğunlaştırılmış örnekler mono-Q kolomuna (BioPharma, FPLC) yüklendi. Kolon ilk olarak hacminin 5 katı kadar 0,05 M NaCl içeren TGEDX buffer ile yıkandı ve daha sonra diyaliz ile yoğunlaştırılmış örnek kolona yüklendi. Kolondan proteinler 0,05 M- 1 M NaCl içeren TGEDX buffer gradienti ile 1ml'lik hacimlerde 70 fraksiyonda toplandı. Toplanan fraksiyonlar Bradford metoduna göre 96 kuyucuklu mikroplâtelere analiz edilerek, proteinlerin hangi fraksiyonlarda toplanmaya başladığı belirlenmeye çalışıldı. Yapılan analiz sonucunda proteinlerin 32. ve 41. fraksiyonlar arasında geldiği tespit edildi. Bu fraksiyonlar SDS poliakrilamid jeline yüklendi ve SDS-PAGE analizi sonucunda AC6 σ^D proteinin en yoğun olarak 34. ve 35. fraksiyonlarda geldiği tespit edildi. Bu fraksiyonlar karıştırıldı ve bir gece boyunca % 50 Gliserol içeren stok tampon içerisinde diyaliz edildi. AC6 σ^D proteini -20 °C'de saklandı.

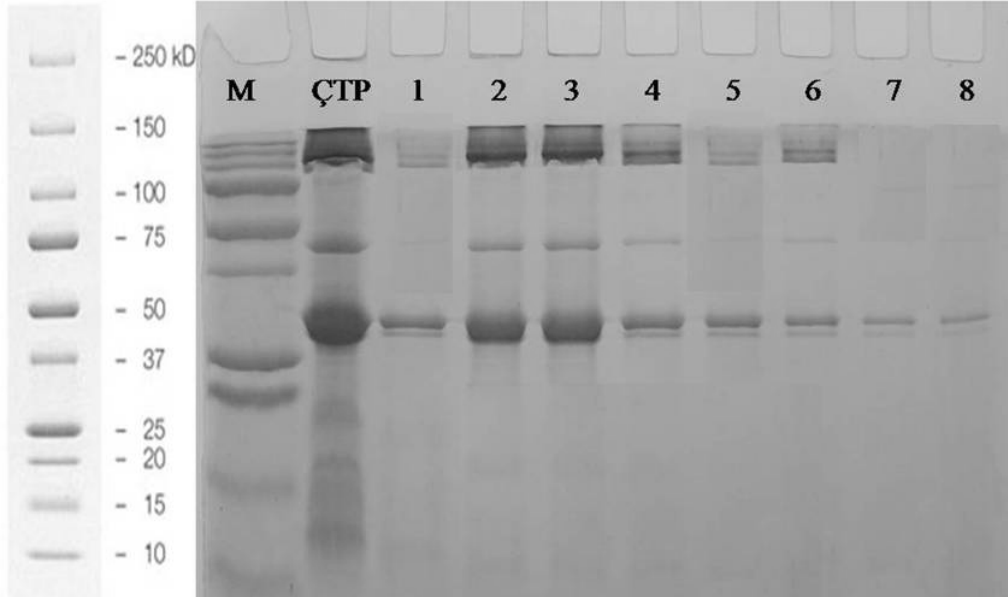
Yapılan saflaştırma basamaklarından sonra AC6 σ^D proteinlerinin DEAE-Sepharose kolon kromatografisinden sonra %90, mono-Q kolon kromatografisinden sonra ise >% 95 saflıkta elde edildi (Şekil 37).



Şekil 37. AC6 σ^D proteinlerinin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü. M. Protein Markır (Bio-Rad), 1. Toplam hücre proteini (Süpernatant), 2. Sarkosyl metodu ile çözülen toplam protein 3. AC6 σ^D 'nin DEAE-Sepharose kolon kromatografisinden sonra diyaliz edilen örnekleri (3. ve 4. fraksiyon), 4. AC6 σ^D 'nin mono-Q kolon kromatografisinden sonra diyaliz edilen örnekler (34. ve 35. fraksiyon)

B. subtilis σ^D protein saflaştırılması için pECB1'i taşıyan *E. coli* hücresi 1 lt hacimde büyütüldü ve IPTG ile indüklenerek proteinin aşırı ekspresyonu sağlandı. Hücreler santrifüj yardımı ile toplandı ve pellet gerekli buffer içerisinde çözüldükten sonra sonikasyon işlemi ile hücrelerin patlatılması sağlandı. Sonikasyon işleminden sonra santrifüjle toplanan pellet kısmındaki inklüzyon yapıları şeklinde bulunan *B. subtilis* σ^D proteinlerinin Na-Sarkosyl ile çözülmesi sağlandı. Çözülen proteinler ilk olarak 5 ml DEAE-Sepharose kolon kromatografisine yüklendi. İlk olarak kolon hacminin 5 katı kadar TGEDX tamponu ile yıkandı. Daha sonra çözülen proteinler kolona yüklendi ve kolon atıkların ve tutunmayan proteinlerin temizlenmesi için hacminin 4 katı kadar TGEDX tamponu ile yeniden yıkandı. Proteinler 10 ml 1M NaCl içeren TGED buffer ile yıkanarak 1 ml hacimlerde toplam 10 fraksiyonda toplandı. Toplanan fraksiyonlar SDS-poliakrilamid jeline yüklenerek analizleri gerçekleştirildi. SDS-PAGE analizi

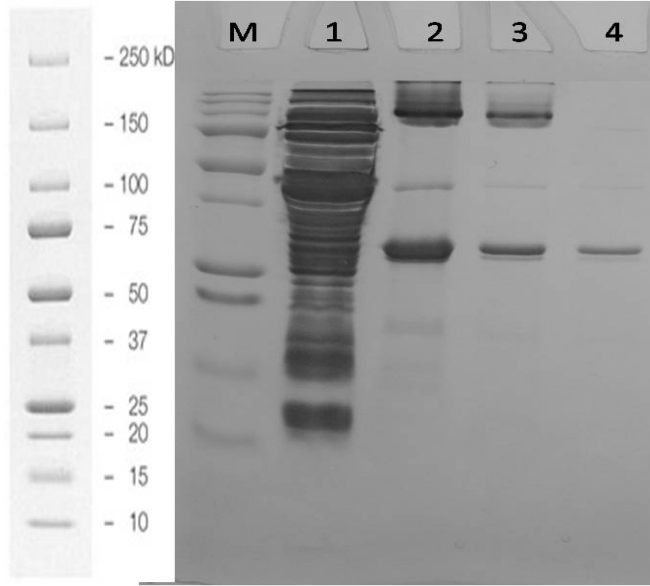
incelendiğinde *B. subtilis* σ^D proteininin 2 ve 3. fraksiyonda yoğun olarak geldiği tespit edildi (Şekil 38).



Şekil 38. *B. subtilis* σ^D proteininin DEAE-Sepharose kolon saflaştırılması. M; protein markır (Bio-Rad), ÇTP; Sarkosyl metodu ile çözölen toplam protein, 1-8; DEAE-Sepharose kolonundan toplanan fraksiyonlar.

Protein yoğun olarak bulunduğu 2. ve 3. fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz edildi ve yoğunlaştırılmış örnekler mono-Q kolonuna (BioPharma, FPLC) yüklendi. Kolon ilk olarak hacminin 5 katı kadar 0,05 M NaCl içeren TGEDX buffer ile yıkandı ve daha sonra diyaliz ile yoğunlaştırılmış örnek kolona yüklendi. Kolondan proteinler 0,05 M- 1 M NaCl içeren TGEDX buffer gradienti ile 1ml'lik hacimlerde 70 fraksiyonda toplandı. Toplanan fraksiyonlar Bradford metoduna göre 96 kuyucuklu mikroplatelerde analiz edilerek, proteinlerin hangi fraksiyonlarda toplanmaya başladığı belirlenmeye ęalıřıldı. Yapılan analiz sonucunda proteinlerin 29. ve 41. fraksiyonlar arasında geldiği tespit edildi. Bu fraksiyonlar SDS poliakrilamid jeline yüklendi ve SDS-PAGE analizi sonucunda *B. subtilis* σ^D proteininin en yoğun olarak 35. ve 36. fraksiyonlarda geldiği tespit edildi. Bu fraksiyonlar karıştırıldı ve bir gece boyunca % 50 Gliserol içeren stok tampon içerisinde diyaliz edildi. *B. subtilis* σ^D proteini -20 °C'de saklandı.

Yapılan saflaştırma basamaklarından sonra *B.subtilis* σ^D proteinleri DEAE-Sepharose kolon kromatografisinden sonra %90, mono-Q kolon kromatografisinden sonra ise >% 95 saflıkta elde edildi (Şekil 39).



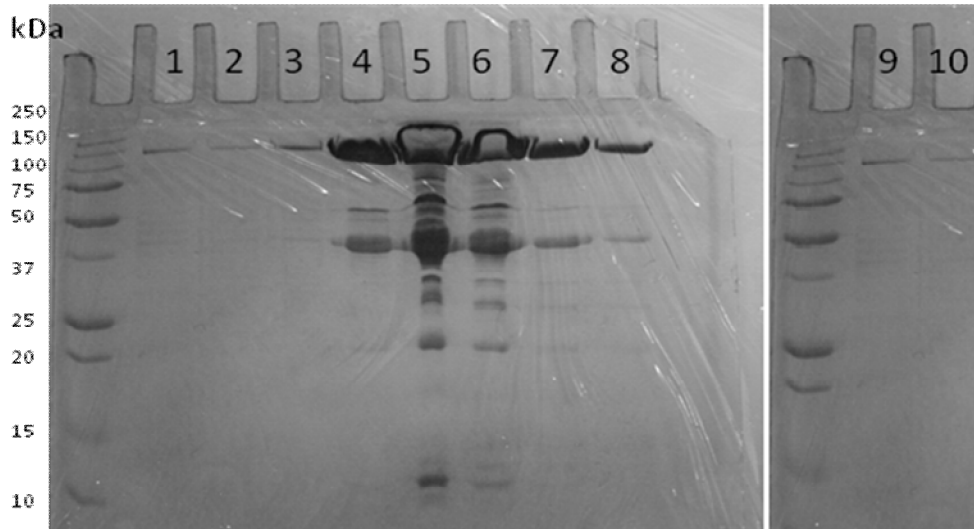
Şekil 39. *B. subtilis* σ^D proteinlerinin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü. M. Protein Markır (Bio-Rad), 1. Toplam hücre proteini (Süpernatant), 2. Sarkosyl metodu ile çözülen toplam protein 3. *B. subtilis* σ^D 'nin DEAE-Sepharose kolon kromatografisinden sonra diyaliz edilen örnekler (2. ve 3. fraksiyon), 4. *B. subtilis* σ^D 'nin mono-Q kolon kromatografisinden sonra diyaliz edilen örnekler (35. ve 36. fraksiyon)

σ^D 'nin proteinlerinin konsantrasyonları hem Bradford metoduna hemde Nano Drop sonuçlarının karşılaştırılması ile belirlendi. 1/100 ve 1/50 konsantrasyonlarda sulandırılan σ^D proteininin 595 nm'deki Absorbans değerlerinin BSA standart eğrisinde yorumlanması ile protein konsantrasyonları Bradford metoduna göre hesaplandı. Bradford metoduna göre AC6 σ^D protein konsantrasyonu 8,35 mg/ml, *B. subtilis* σ^D protein konsantrasyonu ise 18.8 mg/ml olarak hesaplandı. NanoDrop spektrofotometresi ile yapılan ölçümler sonucunda ise AC6 σ^D proteininin konsantrasyonu 8,92 mg/ml, *B. subtilis* σ^D protein konsantrasyonu ise 19,43 olarak hesaplandı.

3.3.2.2. *B.subtilis* Kor RNAP Enziminin Saflaştırılması

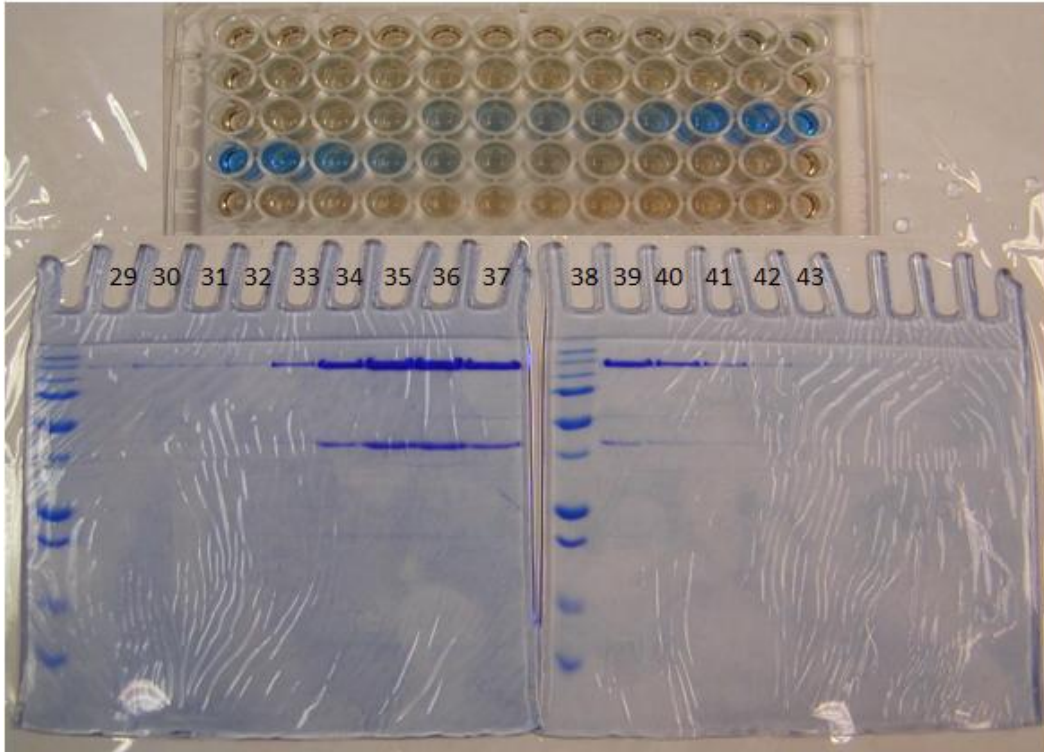
Kor RNAP enziminin σ^D kontaminasyonu olmadan saflaştırılması için EC1003 suşu yapılandırılmıştır. EC1003, *B. subtilis* HB4035 (*SigD::Kan*) bakterisinden türevlendirilmiştir. Kromozomunda *rpoC* (β') geninin 3'-ucunda His-tag füzyonu içeren JH642 (spektinomisin dirençli) bakterisinin bu kromozomal DNA bölgesi, HB4035'in kromozomal DNA'sına integrasyonu sağlanmış ve yeni bir rekombinant hücre yapılandırılmıştır. EC1003 kromozomu *sigD* geninden yoksun ve *rpoC* geninin 3'-ucunda his-tag kuyruğu içerecek şekilde oluşturuldu. Aynı zamanda EC1003, hem kanamisin hemde spektinomisin direnci taşımaktadır.

EC1003 10 lt LB sıvı besiyeri içinde geç logaritmik faza kadar büyütüldü. Hücreler santrifüj işlemi ile toplandı ve sonikatör yardımı ile patlatıldı. RNAP enziminin içerisinde olduğunu düşündüğümüz süpernatant kısma Ni-NTA resin ilave edildi ve 4°C'de 2 saat karıştırıldı. Karışım Bio-Rad 5 ml plastik kolona döküldükten sonra, kolonun hacminin 10 katı kadar 400 mM İmidazol içeren P buffer ile muamele edildi. Kolondan 1 ml'lik hacimlerde 10 fraksiyon toplandı. Fraksiyonlar SDS-PAGE jeline gözlendi ve RNAP enziminin 4, 5, 6, 7 ve 8. fraksiyonlar arasında yoğun olarak toplandığı (Şekil 40) belirlendi.



Şekil 40. Ni-NTA kolon kromatografisi sonrası toplanan fraksiyonların SDS-PAGE jeline analizi

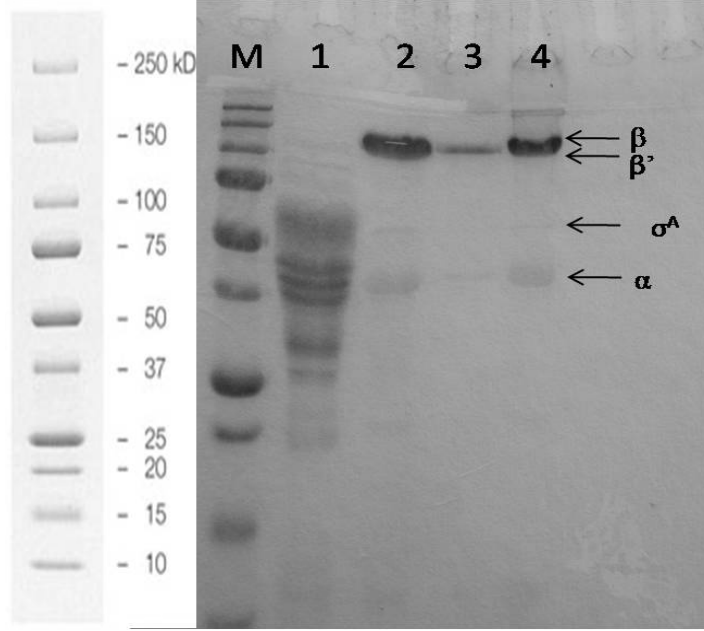
Kor RNAP enziminin en yoğun toplandığı 5. ve 6. fraksiyonlar birleştirildi ve 3 lt 300 mM NaCl içeren TGED buffer içerisinde bir gece diyaliz edildi. Diyaliz edilen 2 ml fraksiyon daha sonra Heparin kolona (FPLC) yüklendi ve kolon 50 mM NaCl içeren Tampon A ile yıkandı. Proteinler kolondan 1 ml'lik hacimlerdeki fraksiyonlar şeklinde 50 mM ve 1 M NaCl gradienti ile toplandı. Toplanan fraksiyonlar Bradford metoduna göre 96 kuyucuklu mikrotalelerde analiz edilerek, proteinlerin hangi fraksiyonlarda toplanmaya başladığı belirlenmeye çalışıldı (Şekil 41). Kor RNAP enziminin 29-42. fragmentler arasında toplandığı tespit edildi. En yoğun konsantrasyonu belirlemek için, fraksiyon SDS-PAGE analizi ile gözlemlendi.



Şekil 41. Heparin kolon kromatografisi sonrası RNAP enziminin Bradford ve SDS-PAGE analizleri

En yoğun olarak kor RNAP enziminin 35, 36 ve 37. fraksiyonlarda geldiği görüldü ve bu fraksiyonlar birleştirilerek 1lt 50 mM NaCl içeren Buffer A içerisinde bir gece boyunca diyaliz edildi. Ertesi gün 200 ml %50 gliserol ve 50 mM NaCl içeren Buffer A'da tekrar 1 gün boyu diyaliz edildiler. Kor RNAP enzimini daha sonra -20 °C'de kullanılmıncaya kadar saklandı.

Yapılan saflaştırma işleminden sonra *B.subtilis* RNAP enzimi Ni-NTA kolon kromotografisinden sonra %90, heparin (FPLC) kromotografisinden sonra ise >% 95 saflıkta elde edildi (Şekil 42).



Şekil 42. *B. subtilis* kor RNAP enziminin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE görüntüsü. M. Protein Markır (Bio-Rad), 1. Toplam hücre proteini 2. Ni-NTA kolon kromotografisi sonrasındaki diyaliz edilen örnek (5. ve 6. fraksiyon), 3. Heparin kolon kromotografisi sonrasındaki birleştirilen örnekler (35, 36 ve 37. fraksiyonlar), 4. Heparin kolon kromotografisinden sonraki diyaliz sonrası örnekler.

Kor RNAP enziminin konsantrasyonu saflaştırma basamaklarının her adımında ayrı ayrı hem Bradford metoduna hemde Nano Drop sonuçlarının karşılaştırılması ile belirlendi (Tablo 25). 1/100 ve 1/50 konsantrasyonlarda sulandırılan kor RNAP enziminin 595 nm'deki absorban değerlerinin BSA standart eğrisinde yorumlanması ile protein konsantrasyonları Bradford metoduna göre hesaplandı. Bradford metoduna göre kor RNAP enziminin konsantrasyonu 1,04 mg/ml olarak, NanoDrop spektrofotometresi ile yapılan ölçümler sonucunda ise kor RNAP enziminin konsantrasyonu 1,13 mg/ml olarak hesaplandı.

Tablo 25. Kor RNAP enziminin saflaştırma basamaklarındaki enzim konsantrasyonları

Saflaştırma basamakları	Bradford Metodu		NanoDrop Ölçümü
	$\mu\text{g/ml}$	mg/ml	mg/ml
Total hücre Proteini	52274	52,27	BM
Ni-NTA kromotog. sonrası	1332	1,32	2,71
Heparin Kromotog. sonrası	433	0,43	0,54
%50 gliserol diyalizi sonrası	1045	1,04	1,13

BM; Belirlenemedi.

3.3.2.3. σ^D -RNAP Kompleksinin Yeniden Oluşturulması ve *in vitro* Transkripsiyon

σ^D 'nin kor RNAP enzimi ile yeniden yapılanma kabiliyeti ve spesifik promotor bölgesini tanıyabilme özelliği runoff transkripsiyon yöntemi ile analiz edildi. Bu analiz için oluşturulan pEC3 plazmiti -10 ve -35 AC6 *hag* promotor elementlerini ve translasyon başlama kodonundan itibaren 385 bp downstream bölgeyi içeren bir fragmenti taşır (Şekil 14). σ^D -RNAP kompleksinin yeniden oluşumu için 20:1 oranında σ^D proteini ve kor RNAP enziminin karıştırlarak buz üzerinde bekletilmesiyle gerçekleştirildi. Karışıma pEC3 ilave edilerek σ^D -RNAP kompleksinin plazmitte bulunan promotor bölgesini tanınması için karışım 37°C'de 10 dk bekletildi. Karışıma NTP'ler eklenerek reaksiyon farklı sıcaklıklarda başlatıldı. Reaksiyonun durdurulmasından sonra *in vitro* transkripsiyon ile çoğaltılan transkriptlerin izolasyonu DNazI uygulaması ve etanol presipitasyonu ile sağlandı. Reaksiyonlardaki total RNA konsantrasyonu spektrofometrik olarak hesaplandı (Tablo 26).

Tablo 26. *in vitro* transkripsiyon sonrası total RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi

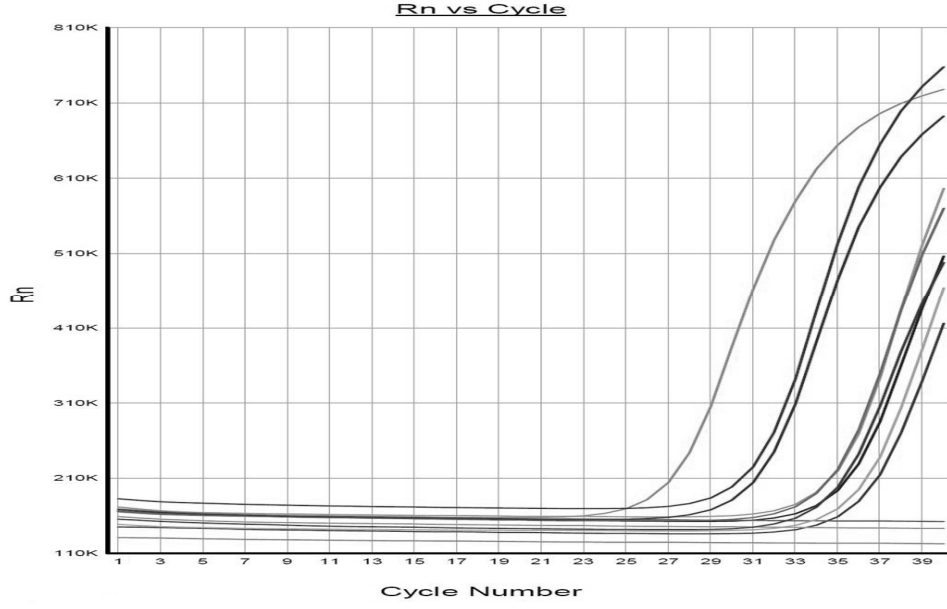
Reaksiyonlar*	Konsantrasyon (ng/μl)		
	I. Uygulama	II. Uygulama	III. Uygulama
G30	421	296	394
B30	363	391	410
C30	60.3	22	43
G40	435	291	277
B40	393	390	380
C40	58.6	23	28
G50	403	277	400
B50	433	457	465
C50	60.3	22	43
G60	377	313	418
B60	367	363	396
C60	59	21	53

*: Reaksiyonlarda gösterilen ilk harf sigma proteinin ait olduğu organizmanın tür isminin baş harfini (G: *Aeribacillus pallidus* AC6, B: *Bacillus subtilis*, C: Kontrol), sayılar ise reaksiyonun yapıldığı sıcaklığı gösterir.

İzole edilen mRNA transkriptlerinin pEC3'ün doğru transkript ürününün olup olmadıkları ve farklı sıcaklıklarda AC6 veya *B. subtilis* σ^D -RNAP holoenzim kompleksi tarafından sentezlenen mRNA'ların transkripsiyon seviyesi Q-PCR (real time) ile tespit edildi. Q-PCR da kullanılacak olan değişik sıcaklıklardaki reaksiyonlardan elde edilen mRNA'lardan ilk olarak ilk zincir cDNA sentez edildi. İlk zincir cDNA'nın sentezi için pEC3 plazmiti yapılandırılırken kullanılan hag rev2 primeri ve her reaksiyon için 2 μg/ml RNA konsantrasyonu kullanıldı. Bu primer kullanılarak sentez edilen ilk zincir cDNA sadece AC6 hag geninin promotorundan sentez edilen 373 bp'lik bir fragmentdir. Transkripsiyon başlama kodonundan başlayarak 373 bp downstream bölgeye kadar uzanan bu ilk zincir cDNA Q-PCR analizinde kullanıldı.

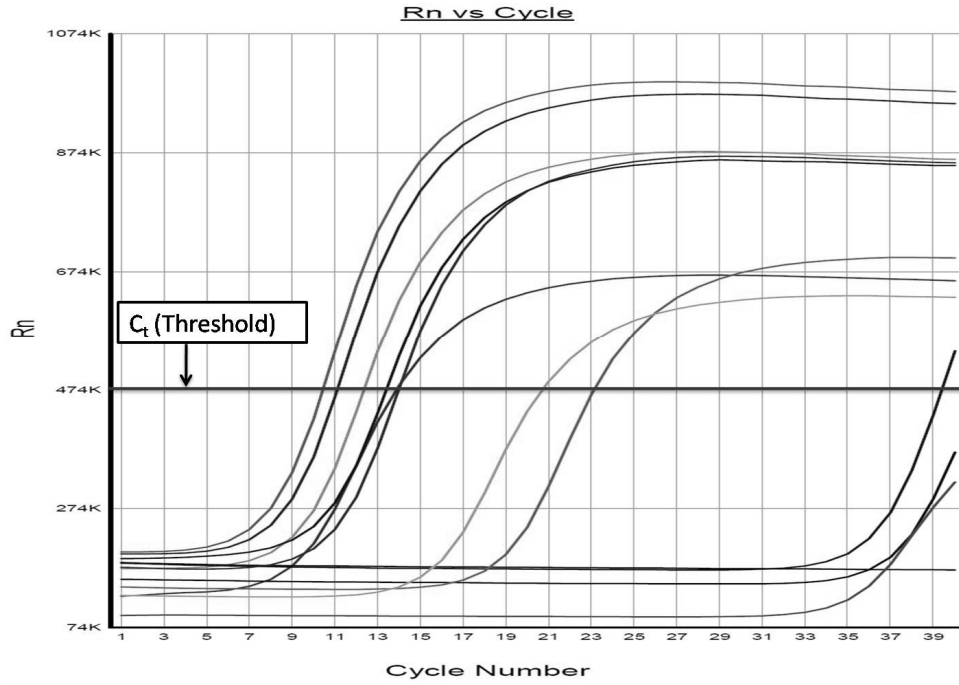
Q-PCR reaksiyonu 96 kuyucuklu mikrolatelerde gerçekleştirildi. Herbir reaksiyon için ayrı ayrı izole edilen cDNA'lar dan 1/5 ve 1/10 dilüsyonlar yapıldı. Q-PCR reaksiyonuna DNazI uygulamasından sonra çift iplikli DNA'nın kalıp-kalmadığının kontrolü için, cDNA'ların sentezi için kullanılan ilk reaksiyon karışımı kontrol grubu olarak kullanıldı. Q-PCR fwd ve Q-PCR rev primerleri sentez edilen hag transkriptlerinin downstream bölgesi içerisinde 176 bp'lik bir bölgeyi çoğaltacak şekilde dizayn edildi. Bu primerler kullanılarak yapılan Q-PCR reaksiyonu 7303 Sequence Detection (Applied Biosystem) Yazılımı kullanılarak analiz edildi. Q-PCR reaksiyonları herbir koşulu aynı olmak suretiyle run off transkripsiyon aşamasından itibaren 3 kere tekrarlanarak yapılmıştır. Her üç reaksiyon sonrasında aynı sonuçlar tespit edilmiştir.

DNA kontaminasyonunun olup olmadığının anlaşılabilmesi için yapılan kontrol Q-PCR'ında ise bütün örneklerde DNA kontaminasyonunun olmadığı saptandı. Döngülerin hiçbirinde PCR reaksiyonunun çalışmadığı Şekil 43'de görülmektedir.



Şekil 43. DNA kontaminasyonu grafiği

1/5 ve 1/10 dilüsyonlar ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda kontrol reaksiyonları dışında her bir reaksiyonun yaklaşık olarak 9. ve 10. döngüde çalışmaya başladığı tespit edildi. Bu sonuçlar *hag* promotor bölgesinin hem AC6 hemde *B. subtilis* σ^D proteini tarafından tanındığı ve transkripsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. 1/10 dilüsyon analizinde programın gösterdiği DNA miktarı eğrisinin tam orta noktası C_t değeri olarak seçildi ve 474K değerinde çizilen C_t (threshold Cycle) devir çizgisi ile her bir reaksiyon için C_t değerleri hesaplandı (Şekil 44).

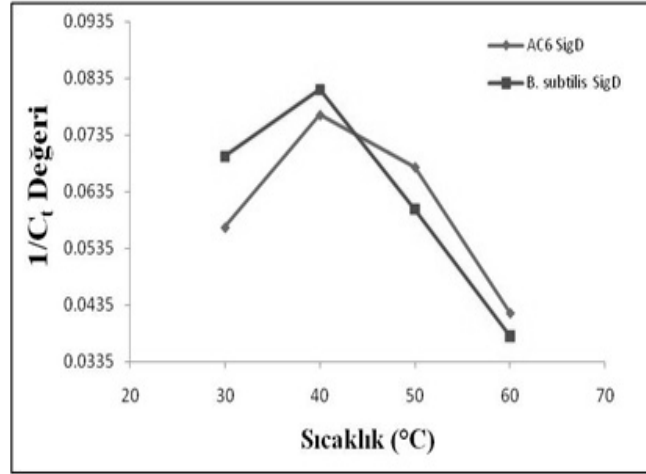


Şekil 44. 1/10 dilüsyonda gerçekleştirilen Q-PCR grafiği

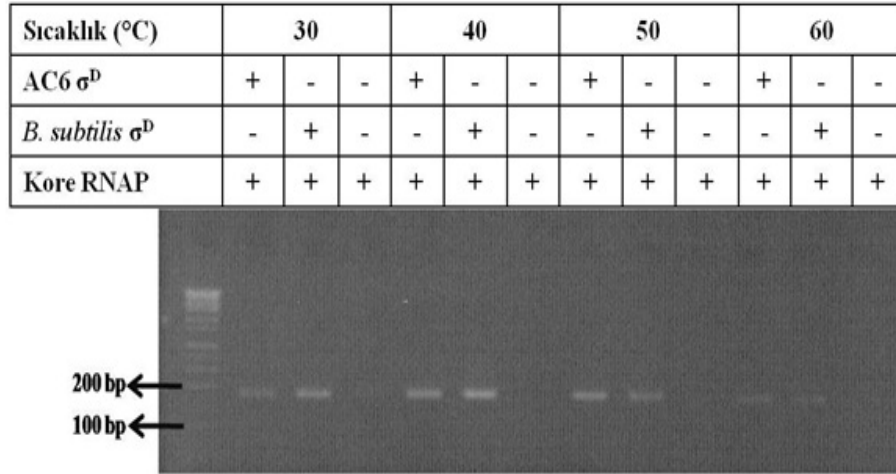
Çizilen $1/C_t$ grafiği incelendiği zaman *B. subtilis* ve AC6 σ^D proteinleri için en iyi transkripsiyon seviyesi 40 °C’de tespit edildi. En düşük transkripsiyon seviyesinin ise 60 °C’de olduğu tespit edildi. *B. subtilis* σ^D proteini tarafından transkripsiyonu sağlanan mRNA’ların 30 ve 40°C’de AC6’dan daha yüksek seviye olduğu, AC6 σ^D proteini tarafından transkripsiyonu sağlanan mRNA’ların sentezinin ise 50 ve 60 °C’de *B. subtilis*’e göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Kontrol reaksiyonlarında transkripsiyon seviyesi olmadığından dolayı program tarafından bu reaksiyonların C_t değerleri hesaplanamadı (Şekil 45A).

Q-PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde gözlemlenebilmesi için 10 µl 1/10 reaksiyon ürünleri %2’lik agaroz jeline yüklendi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda da her iki σ^D için en yüksek transkripsiyon seviyesi 40°C’de belirlenirken en düşük seviye ise 60°C’de belirlendi. σ^D proteinlerinden yoksun olan kontrol reaksiyonunda ise her hangi bir transkripsiyon bandı gözlemlenemedi. PCR ürünlerinin uzunlukları kullanılan DNA markırı ile belirlendi ve ürünlerin yaklaşık olarak 176 bp uzunluğa yakın oldukları tespit edildi (Şekil 45B).

A



B



Şekil 45. AC6 veya *B. subtilis* σ^D -RNAP holoenziminden *in vitro* olarak mRNA sentezi. A) Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen *in vitro* transkripsiyon ürünlerinin transkripsiyon seviyesi. B) Q-PCR ürünleri. Tüm reaksiyonlar 150 mM KCl içeren transkripsiyon tamponu içerisinde gerçekleştirildi.

3.3.2.4. AC6 ve *B. subtilis* σ^D Proteinlerinin *hag* Promotor Bölgesine Bağlanma İlgileri

AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinlerinin AC6 *hag* geni promotor bölgesine bağlanma aktiviteleri değişik sıcaklıklarda yapılan floresent anisotropy (FA) deneyi ile gerçekleştirildi. Moleküllerin bir solusyon içerisinde dönme hızlarının spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanan bu deneyde, protein-DNA veya protein-protein etkileşimleri hızlı ve sayısal olarak belirlenebilir (Heyduk vd., 1996). Karboksifluoresin ile işaretlenmiş floresent *hag* geni promotor sekansını içeren DNA duplexlerine σ^D

proteinlerinin bağlanması sonucu dönüş hızının azalmasına bağlı olarak değişik sıcaklıklardaki *hag* geni promotor bölgesi- σ^D bağlanma aktiviteleri tespit edildi. Dizayn edilen 58 bp'lik *hag* promoter sekansını içeren oligonükleotidler Şekil 16'da gösterilmiştir. Yaban tip promotor sekansının yanı sıra σ -faktörlerinin bağlandığı -10 promotor sekansının incelenmesi için CCGATAT -10 promotor sekansına sahip *hag* geninin bu promotor sekansı değiştirilerek iki mutant promotor sekansı yapılandırılmıştır. Promotor bölgesindeki -10 CCGATAT sekansı CCGCGCG sekansına çevrilerek M1, CTAATAT sekansına çevrilerek de M2 mutanti oluşturuldu. Kontrol olarak *hag* geni promotor sekanslarını içermeyen 46 bp farklı DNA-sekansları kullanıldı.

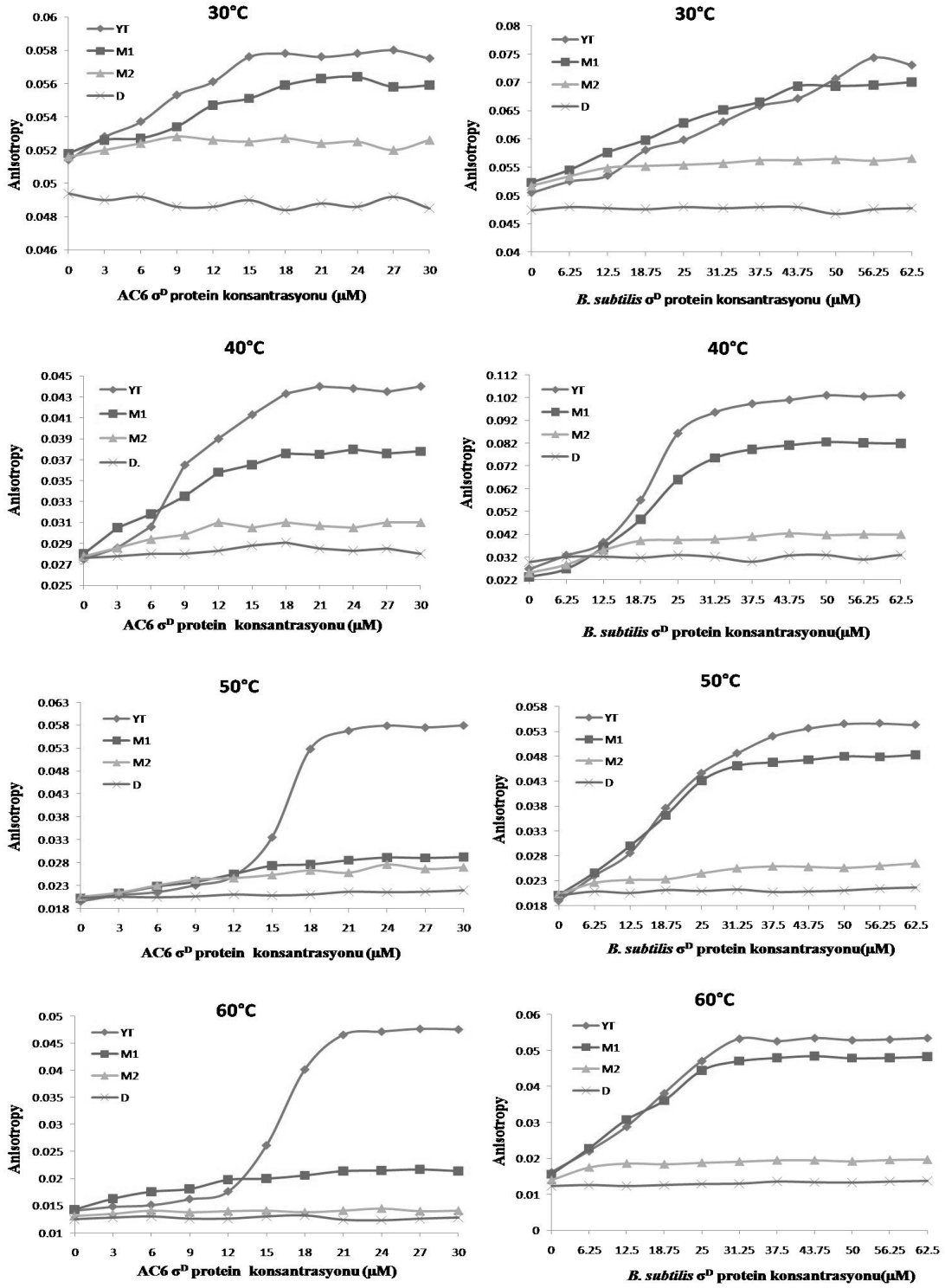
FA deneyinde 100 nM DNA duplekleri 50mM NaCl içeren TGED buffer içerisinde homojen bir biçimde karıştırıldı. İlk olarak temel ölçüm yapılarak DNA dupleksinin anisotropy değeri tespit edildi. Daha sonra σ^D protein solüsyona ilave edildi ve her basamakta ölçümler yapılarak, proteinlerin DNA'ya bağlanma aktiviteleri ve konsantrasyonları tespit edildi.

Yapılan FA deneyi sonunda 30°C de AC6 σ^D proteinin yaban tip promotor dupleksine yüksek oranda bağlanırken, M1 dupleksine zayıf bağlandığı tespit edildi. *B. subtilis* σ^D proteini ise hem yaban tip hemde M1 dupleksine aynı bağlanma aktivitesi ile bağlandığı tespit edildi. Hem AC6 hem de *B. subtilis* σ^D proteinleri M2 ve değişik promotor dubleksine 30°C'de bağlanmadığı yapılan FA deneyi ile tespit edildi (Şekil 46).

FA deneyi 40°C'de gerçekleştirildiği zaman her iki σ^D proteini için aynı sonuçlar elde edildi. AC6 σ^D proteini 40°C'de yaban tip promotor dupleksine güçlü, M1 promotor dupleksine ise zayıfça bağlanırken *B. subtilis* σ^D proteini hem yaban tip hemde M1 mutant dupleksine aynı oranda bağlandığı tespit edildi. M2 ve değişik promotor dupleksilerine 40°C'de her iki σ^D proteininde bağlanmadığı tespit edildi (Şekil 46).

AC6 σ^D proteini 50°C'de sadece yaban tip promotor dupleksine bağlanırken, aynı sıcaklıkta M1, M2 ve değişik promotor duplekslerine bağlanmadığı tespit edildi. Aynı sıcaklıkta *B. subtilis* σ^D proteini ise yabantip ve M1 promotor dupleklerine bağlanırken, M2 ve değişik promotor dupleklerine bağlanmadığı tespit edildi (Şekil 46).

Sonuç olarak 60°C'de gerçekleştirilen FA deneyi, AC6 σ^D proteininin yaban tip promotor dubleksine bağlanırken, M1, M2 ve değişik promotor dubleksine bağlanmadığını göstermektedir. *B. subtilis* σ^D proteini ise yaban tip ve M1 dubleksine bağlanırken, M2 ve değişik promotor dublekslerine bağlanmadığı tespit edildi (Şekil 46).

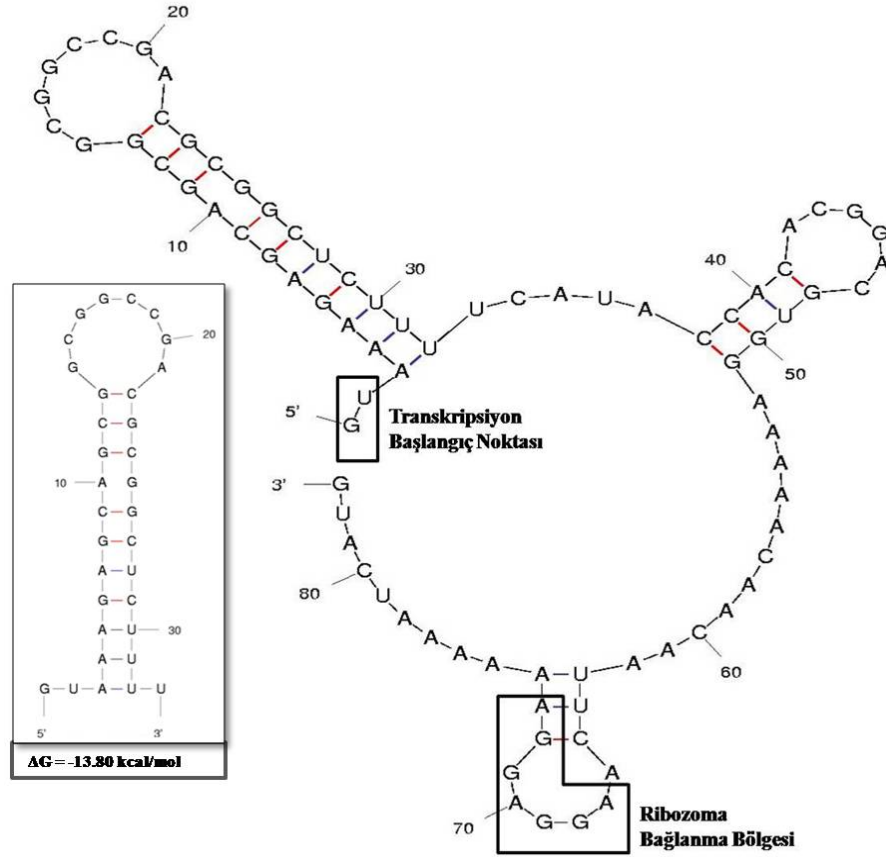


Şekil 46. Floresant Anisotropy Deney Sonuçları. Yaban tip *hag* promotor dubleks (YT), *hag* promotorunun -10 promotor sekans mutantları (M1, M2) ve σ^D spesifik olmayan farklı promotor fragmenti (D) kullanılarak değişik sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

3.4. AC6 *hag* Geni mRNA'sının Sekonder Yapısı

AC6 *hag* geninin mRNA'sının 5' sekonder yapısı mfold (Version 3.2) (URL-3, 2010) programı kullanılarak belirlendi. Programa *hag* geninin transkripsiyon başlangıç noktasından itibaren translasyon başlangıç noktasına kadar olan 83 bp sekanslar yüklendi. En fazla 150 bp kabul eden mfold programı, ilk olarak bu DNA sırasını mRNA'ya çevirerek, mRNA'da meydana gelebilecek katlanmaları tüm olasılıkları değerlendirilerek hesapladı.

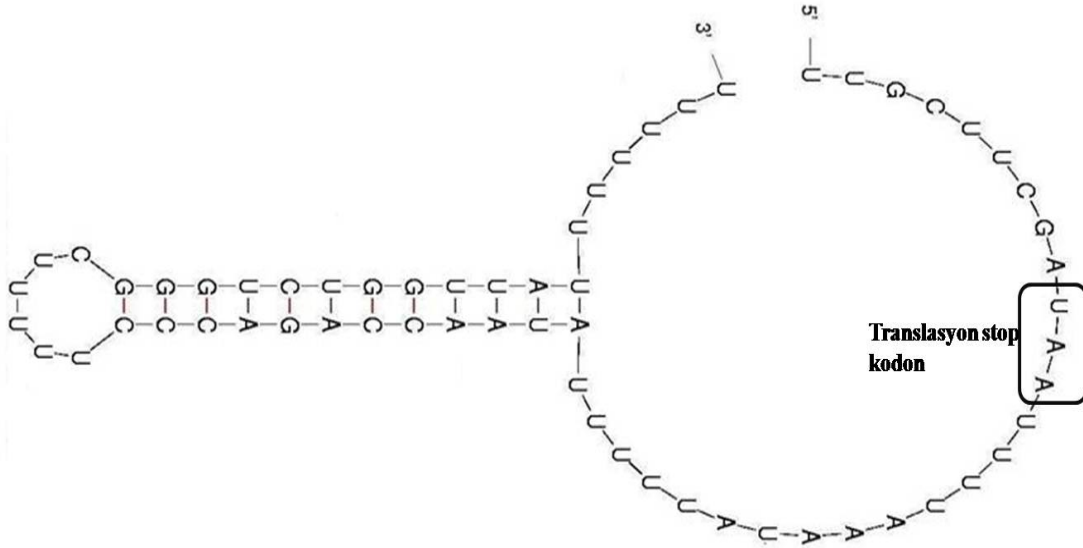
Mfold programı, *hag* geni mRNA'sının 5' ucunda potansiyel bir hairpin yapısının olduğunu tespit etti. AC6 *hag* geni mRNA'sının 5' ucu hairpin yapısının minimum serbest enerjisi mfold programı tarafından (ΔG) -13,8 kcal/mol olarak hesaplandı (Şekil 47).



Şekil 47. AC6 *hag* geni mRNA'sının 5' ucu sekonder yapısı. 5' Hairpin yapısı mfold (Version 3.2) kullanılarak çizilmiştir.

3.5. AC6 *hag* Geni Transkripsiyon Bitiş Noktasının Belirlenmesi

AC6 *hag* geni mRNA'sının 3' transkripsiyon bitiş yeri FindTerm programı (URL-4, 2010) ile tespit edildi. FindTerm programı rho-bağımsız transkripsiyon terminasyonu için gerekli olan stem-loop yapısındaki mRNA motifini gösterir. Programa *hag* genin 3' ucunda translasyon bitiş kodonundan (TAA) itibaren 10 bp upstream ve 52 bp downstream bölgesini kapsayan 62 bp'lik fragment yüklendi. Yapılan analiz sonucunda *hag* geni mRNA'sının 3' ucunda transkripsiyonun sonlanması için gerekli olan stem-loop yapısı içerdiği tespit edildi (Şekil 48).



Şekil 48. AC6 *hag* geni mRNA'sının 3' ucu sekonder yapısı. 3' stem-loop yapısı FindTerm programı kullanılarak çizilmiştir.

3.6. AC6 *hag* Geninin Kodon Kullanım Frekansının Belirlenmesi

Gen ekspresyon seviyesini etkileyen faktörlerden biri olan transkriptlerin kodon kullanımı *hag* geni için CAIcal programı (URL-6, 2010) ile hesaplandı. İlk olarak Sharp ve Li (1987) tarafından önerilen codon adaptasyon indeksi (CAI) uzama faktörleri ve ribozomal proteinler gibi hücrede yüksek oranda sentez olan genlerin tercih ettiği kodon kullanılarak istenilen gendeki kodon kullanım frekansını hesaplar. CAIcal programı bir

referans codon seti kullanarak istenilen genin CAI değerini hesaplar. İndeks 0 ile 1 arasında dağılır. Eğer bir gen referans set içerisinde kullanılan kodonları sıklıkla kullanıyorsa, indeks değeri 1'e yaklaşır (Puigbo vd., 2008).

CAI değerini hesaplamak için *hag* geni ORF sekansı, flagellin geni bakımından AC6'ya en yakın olan *G. kaustophilus*, *G. stearothermophilus* ve *B. subtilis* için verilen kodon kullanım tabloları referans alınarak karşılaştırılması sonucu hesaplandı. Referans set olarak kullanılan kodon kullanım tabloları Codon Usage (URL-5, 2010) veri tabanından sağlandı.

G. kaustophilus ile kodon kullanımını karşılaştırılan *hag* geninin CAI değeri 0,554 olarak hesaplandı. Beklenen CAI değeri ise % 95 güven aralığında 0,56 olarak hesaplandı. CAI değeri 0,5 değerinden çok az büyüktür fakat değer 1'e yaklaşık değildir aynı zamanda beklenen CAI değerinden de düşüktür.

G. stearothermophilus ile kodon kullanımını karşılaştırılan *hag* geninin CAI değeri 0,651 olarak hesaplandı. Beklenen CAI değeri % 95 güven aralığında bu değere eşitir. Değerler incelendiği zaman CAI değerinin 0,5'e yakın 1'den uzak olduğu ve beklenen CAI değeri ile eşit olduğu tespit edildi.

Son olarak AC6 *hag* geni kodon kullanımının *B. subtilis* ile karşılaştırılması sonucu CAI değeri 0,884 olarak hesaplandı. Beklenen CAI değeri ise % 95 güven aralığında 0,78 olduğu bulundu. Sonuçlar değerlendirildiğinde CAI değerinin 1'e yakın olduğu ve beklenen CAI değerinden yüksek olduğu tespit edildi (şekil 49).

4. TARTIŞMA

Doktora tez kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, *A. pallidus* AC6 bakterisinde yüksek seviyede ekspres edilen flagellin (*hag*) geninin promotor analizi ve regülasyonu incelenmiştir. Aynı zamanda *hag* geninin hücrede yüksek ekspresyonuna sebep olabilecek diğer faktörlerin üzerinde durulmuştur. Promotor yapısının ve regülasyonunun aydınlatılmasında *B. subtilis* hücresi kontrol olarak kullanılmıştır.

Aeribacillus pallidus AC6'da yüksek ekspres edilen bir protein belirlenmiş ve bu protein bandının sekans analizleri sonucunda hücrede yüksek ekspres edilen bu proteinin flagellin proteini olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel hücrelere hareket özelliği kazandıran flajella yapısı üç kısımdan oluşmaktadır. Flagellin proteini bakteriyel flajellanın üç kısmından biri olan ve bakteriyel flajellanın % 98'ini oluşturan filament kısmının ana bileşenidir ve tek tip bir protein alt ürününden oluşur (Doetsch ve Soblad, 1980; Wilson ve Beveridge, 1993; Mirel ve Chamberlin, 1989).

Protein sekans analizlerinden yola çıkarak *hag* genine ait tüm nükleotit ve 5'-upstream bölge sekansı elde edilmiştir. İnvers PCR tekniği ile tamamlanan *hag* geninin açık okuma bölgesinin 828 baz çiftinden oluştuğu belirlenmiştir. AC6'nın 828 bp'lik ORF bölgesi 275 a.a kodlamaktadır. Bilinen flagellin proteinlerinin a.a sayısı 276 ile 575 arasında değişmektedir. *Bacillus subtilis* flagellin proteini 304 a.a, *Escherichia coli* 497 a.a, *Salmonella typhimurium* 495 a.a'den oluşmaktadır (Wilson and Beveridge, 1993; Joys, 1988).

Winstanley ve Morgan (1997), tarafından yapılan çalışmada 26 bakteri genusuna ait flagellin proteininin N ve C-terminal domain a.a. sekansları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar açıkça göstermiştir ki tüm flagellin sekanslarında bazı a.a'ler diğerlerine göre bugüne kadar sıkı bir şekilde korunmuşlardır. National Center for Biotechnology Information Conserved Domain veritabanı kullanılarak AC6 flagellin geninde N ve C-terminal domainler bulunmuş ve diğer grup bakterilere ait domainler ile karşılaştırılmıştır. N-terminal domain karşılaştırması, AC6 flagellin proteininde N-terminal bölgede ilk 100 a.a'in, C-terminal bölgede ise son 50 a.a'in diğer a.a.'lere göre yüksek oranda korunduğu tespit edilmiştir. N-terminal bölge içerisinde 30-51. pozisyon arasında yüksek bir korunmuşluğun

olduğu gözlemlenmiştir. C-terminal kısımda son 16-18 a.a.'in korunmuş proteinler bakımından en yoğun bölge olduğu belirlenmiştir.

Flagellin proteinleri karakteristik a.a içeriklerine sahiptirler. Flagellin proteinlerinde asidik ve nötral a.a'ler yüksek oranda bulunurken, bazik a.a ve tirozin, prolin, metionin, triptofan ve histidin amino asitleri düşük oranda bulunur. Sistein amino asiti ise, birkaç istisna dışında flagellin proteinlerinde bulunmaz (Wilson and Beveridge, 1993). AC6 flagellin proteininin amino asit içeriği bakteriyel flagellin proteinlerinin saptanan a.a. ile benzerlik gösterir. AC6 flagellin proteini yüksek oranda kuvvetli α -helix yapısının oluşmasını sağlayan alanin a.a (%13,5) ve düşük oranda histidin (%1,5), Tirozin (% 0,7) ve prolin (% 0,4) içerir. Sistein ve triptofan a.a AC6 flagellin proteininde bulunmamaktadır. AC6 flagellin proteininin a.a içeriği bakımından gösterdiği bu özellikler diğer karakterize edilen flagellin proteinleri ile örtüşmektedir.

Üç filogenetik analiz AC6 flagellin proteini için taksonomik verileri elde etmek için yapıldı. İlk analiz 37 farklı bakteriyel türün flagellin proteinleri ile AC6 flagellin proteininin karşılaştırma analizidir. Oluşturulan köksüz ağaç göstermiştir ki AC flagellin proteini Gram pozitif filum Firmicutes ve Spiroketler ile beraber dallanmıştır (Şekil 21). AC6 Firmicutes filumu ile beraber gruplandığı yapılan filogenetik ağaç ile belirlenmiştir. *Geobacillus* cinsi *Bacillus* genusundan ayrılan bir çok termofilik bakterileri içerir (Banat vd., 2004). Bu sonuçlar ışığında Firmicutes filumu ile sınıflandırılan AC flagellin proteinin DNA ve a.a dizilerinin karşılaştırılması ile oluşturulan köklü ağaçta AC6 flagellinin *G. stearothermophilu*, *G. kaustophilus* ve *B. pumilis* türlerine çok yakın oldukları görülmektedir.

Flagellin proteini bakımından AC6 bakterisine yakın olan Firmicutes filumu içerisinde bulunan türlerin bilinen σ^D proteinlerinin korunmuş bölgelerinden yola çıkarak AC6 *sigD* geninin bir kısmı çoğaltılmış ve invers PCR tekniği ile genin geri kalan nükleotit sekansları tamamlanmıştır. AC6 *sigD* geninin 771 baz çiftinden oluşan ORF bölgesi 256 a.a uzunluğunda σ^D proteinini kodlamaktadır. National Center for Biotechnology Information Conserved Domain veritabanı (URL-9) kullanılarak AC6'da σ^D proteininde 3 korunmuş bölge bulunmuştur. Bakteriyel RNAP enziminin bir alt birimi olan σ -faktör, 2α , β ve β' alt birimlerinden oluşan kor RNAP enzimi ile birleşerek holoenzim formunun oluşturulması ve holoenzim RNAP'ın promotor bölgesini tanıyarak transkripsiyon basamağının başlamasını sağlar (Haldenwang, 1995). σ^D proteinin de içinde bulunduğu

σ^{70} -familyasının protein sekansları karşılaştırılarak yapılan analizi sonucunda σ^{70} familyasında evrimsel olarak korunmuş dört bölgenin olduğunu göstermiştir (Borukhov ve Severinov, 2002). σ^{70} familyasında alternatif σ -faktörler grubunda bulunan σ^D proteinin bu korunmuş bölgelerden 3'ünü içerir, en az korunmuş bölge olarak bilinen 1. bölge σ^D -faktörler arasında bulunmamaktadır (Chen ve Helmann, 1995).

Flagellin proteini hareketli bakterilerde en bol bulunan proteinlerden biridir ve yapılan çalışmalar flagellin geninin transkripsiyonu tamamen σ^D 'ye bağımlı olduğunu gösterilmiştir (Fredrick vd., 1995). σ^D 'ye bağlı *hag* geninin transkripsiyonu geç logaritmik fazda en üst düzeyde olduğu (Ordal vd., 1993) için, AC6 *hag* geninin transkripsiyon başlangıç noktasının tespit etmek için, mRNA izolasyonu geç logaritmik faza kadar büyütülen hücrelerden yapılmıştır.

AC6 *hag* geninin transkripsiyon başlangıç noktası 5'-RACE tekniği ile belirlendi. Translasyon başlangıç kodonundan (ATG) 79 ve 80 bp upstream uzaklıktaki T ve G bazları transkripsiyon başlangıç noktası olarak belirlendi. Transkripsiyon başlangıç noktasının bulunmasından sonra olası promotor bölgesi -10 ve -35 elementleri belirlenmeye çalışıldı. Yapılan inceleme sonucunda -10 ve -35 bölgelerinde *Bacillus subtilis* σ^D tarafından tanınan benzer promotor sekansının bu bölgelerde var olduğu tespit edildi. σ^D en erken belirlenen alternatif σ faktörlerden biridir ve σ^D *Bacillus subtilis*'te geç flajellar (bazal yapı tamamlandıktan hemen sonra sentezlenen) genler olan *hag* (flagellin), *yvyC* ve *yvyF* genlerinin ekspresyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Mirel ve Chamberlin, 1989; Mirel vd., 1994; Chen ve Helmann, 1994). Bunun yanısıra birkaç kemotaksi proteininin ve ana vejetatif otolizinlerin sentezi için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Muller vd., 1997; Fredrick ve Helmann, 1994; Margot vd., 1999). *B. subtilis* hücresinde sentezi için σ^D -faktöre ihtiyaç duyan tüm genlerin promotor bölgeleri incelendiğinde -35 bölgede TAAA ve -10 bölgede CCGATAT konsensus sekanslara sahip olduğu görülmüştür (Helmann, 1991).

AC6 *hag* geninin promotor bölgesinin tespiti, σ^D bağımlı transkripsiyonun gösterimi ve *in vivo* promotor aktivitesinin belirlenmesi için, *hag* geni promotor fragmentleri oluşturulmuştur. Oluşturulan promotor fragmentlerinin bazıları -35, -10 ve UP elementlerini içerirken, bazıları sadece -10 ve -35 elementlerini, bazıları sadece -10 elementini, bazıları ise hiçbir promotor elementini içermeyecek şekilde dizayn edilmiştir (Şekil 30). Oluşturulan bu promotor fragmentleri daha sonra promotorsuz *lacZ* geni içeren pDG1663 integrasyon vektörüne klonlanmıştır. Bakterilerde *in vivo* promotor

aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında çoğunlukla ilgilenilen promotor bölge ile bir rapörter gen arasında füzyon oluşturulur. Daha sonra hücre içerisine atılan bu ikiliden rapörter olanın ekspresyon seviyesine göre promotor aktivitesi belirlenebilir (Ross ve Gourse, 2009). Bakterilerde yaygın olarak kullanılan rapörter genler β -gal (beta-galaktosidaz), GFP (yeşil floresent protein), lusiferaz, GUS (beta-glucunozidase), CAT (Kloramfenikol asetil transferaz) genleridir (Silhavy vd., 1984). *Escherichia coli lacZ* geni tarafından kodlanan beta-galaktosidaz (β -gal) bu rapörterlerden en popüler olanıdır (Pessi vd., 2001).

Bacillus subtilis'de yapılan promotor analizlerinin çoğu *E.coli lacZ* geni ile birlikte füzyon yapılandırılması vasıtasıyla gerçekleştirilir ve beta-galaktosidaz aktivitesi ile test edilir. Transkripsiyonel veya translasyonel seviyede *lacZ* geni ile füzyon olarak yapılandırılmış birçok integrasyon vektörü oluşturulmuştur. Füzyon oluşturulması genin bozulmasına neden olmaz ve asıl genin regülasyon modelinin izlenebilmesine imkan verir. Bu özellikler integrasyon vektörünün kullanım avantajlarından bazılarıdır. Bunun yanı sıra spesifik DNA fragmentinin transkripsiyonel potansiyelinin çalışılması transkriptin olduğu doğal hücrede gerçekleştirilebilir. Gen regülasyonunda promotor fragmentlerinin yanındaki sekansların regülasyondaki rolünün anlaşılması için yapılan delesyon analizlerinde kolayca uygulanabilir. Ek olarak transkripsiyonel ve translasyonel füzyonlar Campbell-tip mekanizma vasıtasıyla yaban tip lokusu içerisine tek kopya halinde integre olarak analiz edilebilirler (Mogk vd., 1996; Tran vd., 1998; , Guerot-Fleury vd., 1996). Çalışmada kullandığımız integrasyon vektörü pDG1663, *Bacillus subtilis* 168 treonin sentaz (*thrC*) lokusunun upstream ve downstream fragmentlerini içerir. Bu fragmentler arasında *B. subtilis spoVG* geninin translasyon başlangıç sinyaline füzyon olmuş promotorsuz *E.coli lacZ* geni yer alır. *spoVG* geninin hemen önünde istenilen fragmentin vektör içine yerleştirilebilmesi için çoklu kesim bölgesi ilave edilmiştir. Aynı zamanda bu fragmentler içinde *B. subtilis*'de seçilimi sağlayan eritromisin ve linkomisine karşı direnç sağlayan (MLS) antibiyotik direnç markırı vardır (Guerot-Fleury vd., 1996). AC6 *hag* geni promotor fragmentleri bu kesim bölgeleri kullanılarak *lacZ* geninin önüne yerleştirilmiş ve *B. subtilis* CU1065 ve *sigD* geni hücre genomundan silinmiş HB4035 suşu içerisine atılmıştır. *Aeribacillus*'lar için bugüne kadar dizayn edilmiş bir integrasyon plazmiti bulunmadığından dolayı *Aeribacillus* cinsinin ayrıldığı ve filogenetik olarak AC6 *sigD* ve *hag* genine en yakın grup olan *Bacillus* cinsi promotor aktivitesinin *in vivo* olarak belirlenmesi deneylerinde kullanılmıştır.

Oluşturulan *hag:lacZ* füzyon vektörleri CU1065 ve HB4035 hücre genomlarına integrasyonları sağlandıktan sonra koloniler X-gal içeren petrilere büyütüldüler. X-gal'li petrilere de büyüyen kolonilerden *hag185*, *hag138a* ve *hag138b* promotor fragmentlerini içeren CU1065 yabancı tip hücreleri koyu mavi renkli koloniler meydana getirirken, *hag117a* ve *hag117b* fragmentlerini içeren CU1065 yabancı tip hücrelerinin bazen belirlenemeyecek seviyede çok açık mavi renkli koloni oluşturdukları gözlemlendi. Diğer promotor fragmentlerinden *hag98* ve *hag56*'yı içeren CU1065 hücrelerinin ve tüm promotor fragmentlerini içeren HB4035 hücrelerinin normal koloni renginde büyüdüğü tespit edildi (Şekil 32). Aynı sonuçlar β -gal. testi sonucunda da elde edildi. β -galaktosidaz aktivitesi sadece *hag185*, *hag138a*, *hag138b*, *hag117a* ve *hag117b* promotor fragmentlerini taşıyan CU1065 hücresinde gözlemlenirken, *hag98* ve *hag56* promotor fragmentlerini taşıyan CU1065 ve tüm promotor fragmentlerini taşıyan HB4035 hücrelerinde β -galaktosidaz aktivitesi tespit edilemedi (Şekil 33). Bu sonuçlar bize AC6 *hag* geninin ekspresyonu için σ^D proteinine kesinlikle gerek olduğunu göstermektedir. σ^D proteini kodlayan *sigD* geni hücre genomundan silinmiş HB4035 hücresine aktarılan promotor fragmentleri σ^D proteini olmadığından dolayı *lacZ* geninin ekspresyonu gerçekleştirilememişlerdir. σ^D proteinin biyolojik fonksiyonunu açıklamak için yapılan çalışmalarda sigma-D geninden yoksun olan *B. subtilis* hücresinin yaşamını sürdürebildiği fakat hareket özelliğini kaybettiği tespit edilmiştir. Yapılan Western Blot analizleri sonucunda bu hücre flagellin polipeptidinin eksik olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda σ^D proteinin flagellin gen ekspresyonu için mutlaka gerekli olduğunu kanıtlamıştır (Helmann vd., 1988a; Helmann vd., 1988b). Yapılan β -galaktosidaz testi sonuçları *Bacillus subtilis*'da olduğu gibi, AC6 flagellin geni transkripsiyonunun RNA polimerazın alt birimi olan σ^D tarafından kontrol edildiğini göstermiştir.

Yapılan β -galaktosidaz deneyinde CU1065 yabancı tip hücrelerinde en yüksek β -galaktosidaz ekspresyon seviyesi *hag185* promotor fragmentini taşıyan yabancı tip hücrede görülmüştür. Bu ekspresyon seviyesini *hag138a* ve *hag138b* promotor fragmentleri takip etmektedir (Tablo 24). En uzun fragment olan *hag185*, bu fragmentten upstream yönde 47 bp daha kısa olan *hag138a* ve upstream yönde 47 bp ve downstream yönde 18 bp daha kısa olan *hag138b* fragmentlerini taşıyan hücreler arasında β -gal seviyesi arasında %10'luk çok küçük bir fark vardır. Bunun yanında sadece downstream yönde aralarında 18 bp uzunluk farkı bulunan *hag138a* ve *hag138b* promotor fragmentlerini taşıyan hücreler arasında β -galaktosidaz seviyesinde neredeyse hiçbir fark yoktur. Bu sonuçlar translasyon

başlama kodonundan sonraki downstream sekansların AC6 *hag* geninin ekspresyon seviyesini etkilemediğini göstermiştir.

Promotor fragmentleri incelendiği zaman *hag185*, *hag138a*, *hag138b*, *hag117a* ve *hag117b* fragmentlerinin promotor elemanlarından -10 ve -35 elementlerini içerdiği görülmektedir (Şekil 30). Buna rağmen β -galaktosidaz ekspresyonu *hag185a*, *hag138a* ve *hag138b* fragmentlerini taşıyan hücrelere göre *hag117a* ve *hag117b* fragmentlerini taşıyan hücrelerde şaşırtıcı derecede düşmüştür. Bu düşük ekspresyona sebep olan *hag117a* ve *hag117b* fragmentleri incelendiğinde *hag185* fragmentinden upstream yönden 68 bp, *hag138* fragmentlerinden upstream yönde 21 bp daha kısa oldukları görülmektedir (Şekil 30). Bu sonuçlar incelendiğinde *hag117a* ve *hag117b* promotor fragmentlerinin -10 ve -35 promotor fragmentlerini içermelerine rağmen son çalışmalar ile promotor yapısı elemanlarına eklenen AT bazlarınca zengin UP elementlerinden yoksun oldukları görülmektedir. RNA polimeraz enziminin alt birimlerinden biri olan α altbiriminin C-terminal domaini, promotorun -35 bölgesinin upstream tarafında bulunan ve upstream element (UP) olarak bilinen sekansları etkiler. α -DNA ilişkisi hem bazal transkripsiyonda hem de aktive edilen transkripsiyonda önemli rol oynar (Gourse vd., 2000). *E.coli*'de bulunan *rnmB* geni σ^{70} tarafından tanınan -10 ve -35 bölgelerine sahiptir. *rnmB*'nin transkripsiyonu üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki; RNAP enziminin altbirimlerinden σ kadar α altbirimi de transkripsiyonun başlamasında önemlidir. Yapılan çalışmalar da α altbiriminin C-terminal bölgesi *rnmB* promotorunun UP bölgesine bağlandığı ve transkripsiyonun aktivasyonu yaklaşık olarak 30 kat arttırdığı gözlemlenmiştir (Rao vd., 1994). UP elementleri yalnızca *E.coli* σ^{70} ($E\sigma^{70}$) promotorları ile sınırlı olmadıkları gibi yalnızca *E.coli* promotorları ile de sınırlı değildir. UP elementlerinin $E\sigma^{32}$ ve σ^F tarafından transkripte edilen belirli promotorlarında aktive ettiği belirlenmiştir (Newlands vd., 1993; Fredrick vd., 1995). Bazı Gram pozitif bakterilerin promotorları UP elementlerini *E.coli* promotorlarından bile daha sık kullanabilir (Graves ve Rabinowitz, 1986; Helmann, 1995). Bu bilgiler ışığında yapılan β -galaktosidaz deney sonuçları göstermiştir ki, AC6 *hag* genini -35 promotor elementinin upstream yönünden bulunan A ve T bazlarınca zengin -42 ve -80 bp arasındaki sekanslar AC6 *hag* geninin tam ekspresyonu için gereklidir (Şekil 34).

Yapılan çalışmada UP elementlerini içeren *hag185* fragmentini taşıyan hücrelerde β -gal. aktivitesinin UP elementlerini içermeyen *hag117a* ve *hag117b* fragmentlerini taşıyan hücrelere göre 17 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 24). Fredrick, (1995)'nin

yaptığı bir çalışma da, UP elementlerinin *B. subtilis hag* geninin ekspresyonunu 20 kat artırdığı ve hag geninin tam ekspresyonu için bu UP elementlerine ihtiyacı olduğunu göstermiştir.

Promotor aktivitesinin *in vivo* olarak gösterilimi deneylerinde AC6 *hag* genin transkripsiyon başlangıç noktası translasyon başlangıç kodonundan 79 ve 80 bp upstream yönden G ve T nükleotidleri olarak belirlenmiştir. Hem transkripsiyon başlangıç noktasının belirlenmesi ile hemde yapılan β -gal. deneyleri sonucunda AC6 *hag* promotorunun -8 ve -14 bp arasındaki CCGATAT sekanslarının -10 promotor elementine, -30 ve -33 bp arasındaki TAAA sekanslarının ise -35 promotor elementine ait oldukları ve bu sekansların σ^D proteini tarafından tanınan promotor sekansları oldukları tespit edilmiştir. Yapılan β -gal. deneyleri sonucunda ise -42 ve -80 bp arasındaki sekanslarının AT bazlarınca zengin UP promotor oldukları ve bu UP promotor elementlerinin AC6 *hag* geninin ekspresyonunu 17 kat arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 34, Tablo 24).

Bakteriyel σ -faktörler RNAP holoenziminin spesifik promotor bölgesinin tanınmasında görev yaparlar ve transkripsiyonda pozitif regülatör olarak rol oynarlar. Bu güne kadar *B. subtilis*, *E. coli* ve birçok mikroorganizmanın σ - faktör proteinlerine sahip oldukları ve hücrede birçok genin ekspresyonunu kontrol ettikleri gösterilmiştir (Grosman vd., 1984; Hirschman vd., 1985; Helmann, 1995; Martin vd., 1993; Gruber ve Bryant, 1998; Losick vd., 1986). Yapılan çalışmalar ile *B. subtilis* ve diğer bazı bakterilerde hücrede spor oluşumu, bazı kemotaksi, geç sentez edilen hareket genlerinin ve flagellin geninin ekspresyonunun σ^D ve homologları tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (Helmann, 1991). *in vitro hag* promotor bölge-RNAP holoenzim kompleksinin incelenmesi için AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteini saflaştırıldı. Komple gen sekansları bilinen iki hücrenin σ^D proteinleri *E. coli* ekspresyon sistemleri ile aşırı ekspresyonları sağlandı. Hücrede inklüzyon yapıları oluşturan σ^D proteinlerinin saflaştırılması sodyum sarkosyl kullanılarak gerçekleştirildi. Çoğu σ -faktör *E.coli* hücrelerinde aşırı ekspresyondan sonra inklüzyon yapıları oluşturur (Helmann, 2003). Inklüzyon yapıları proteinler biyolojik aktiviteden yoksundurlar ve fonksiyonel olarak aktif proteini yeniden elde etmek için çözümlerine, yeniden katlanmalarına ve saflaştırılmaya ihtiyaçları vardır (Singh ve Panda, 2005). Bundan dolayı *E. coli* hücrelerinde aşırı ekspres edilen AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinleri önce % 2 sodyum deoksikolat içeren TGED tamponu içerisinde çözüldü ve aniyonik bir deterjan olan sodyum sarkosyl ile denatüre edildi ve DEAE-Sepharose ve mono-Q kolon kromatografileri ile saflaştırılmaları sağlandı.

Saflaştırılan AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinlerinin Bradford yöntemi ve Nanodrop ölçümleri karşılaştırılarak protein konsantrasyonları tespit edildi ve SDS-PAGE jelinde gözlemlendi. SDS-PAGE jelinde analiz edilen AC6 σ^D proteininin moleküler ağırlığı bu proteinin sekansına göre biyoinformatik olarak tahmin edilen moleküler ağırlığından daha yüksek olduğu gözlemlendi. Biyoinformatik olarak AC6 σ^D proteininin moleküler ağırlığı 28,6 kDa, *B. subtilis* σ^D proteininin moleküler ağırlığı 29,8 kDa olarak hesaplanmasına rağmen, SDS-PAGE jelinde AC6 σ^D proteini yaklaşık olarak 30-35 kDa moleküler ağırlığında gözlemlendi (Şekil 37). SDS-PAGE analizi boyunca σ^D proteinin bu anormal yürümesinin bir çok örneği görülmüştür ve bu sonucun izolasyon aşamasında kullanılan dodesil sülfat ile polipeptidin yüksek asidik bölgeleri arasında oluşan nispeten güçlü etkileşimin bir yansıması olduğu düşünülür (Burton vd., 1982).

σ^D proteininin maksimum seviyesi geç logaritmik büyüme fazında *B. subtilis* hücresinde 220 molekül olarak tahmin edilmiştir. Bu düşük seviyeye rağmen, σ^D 'nin promotor bölgesini tanıması ve promotor bölgesini tanıdığı genin transkripsiyonunu başlatma yeteneği çok yüksektir (Helmann vd., 1988b; Marquez vd., 1990). σ^D 'nin bu özelliğinden dolayı promotor-RNAP holoenzim komplekslerinin aydınlatılması için yapılan *in vitro* deneylerde kullanılacak olan kor RNAP enziminin σ^D kontaminasyonu olmadan saflaştırılması gerekmektedir. Hücre genomundan σ^D proteinini kodlayan *sigD* geni silinmiş *B. subtilis* HB4035 hücresi bu özelliğinden dolayı kor RNAP enziminin saflaştırılması işlemi için kullanıldı. RNAP enziminin alt birimlerinden β 'ünü kodlayan *rpoC* geninin 3' ucuna histidin kuyruğu eklenmiş bir genoma sahip olan *B. subtilis* JH642 (Fujita ve Sadaie, 1998; Qi ve Hulett, 1998) bakterisinin genomik DNA'sındaki bu kısım HB4035 hücresine integrasyonu sağlandı ve sonuçta oluşturulan EC1003 hücresinin hem σ^D proteininden yoksun olması hemde RNAP saflaştırılması için histidin kuyruğuna sahip olması sağlandı. Proteinlerin fonksiyonel analizi ve saflaştırılması için histidin kuyruğu ekleme stratejisi geniş olarak kullanılır. Kashlev, (1993)'de bu metodu *E. coli*'de uygulamışlardır. Histidin residülerinin *rpoC* geninin C-terminal ucuna eklenmesiyle rekombinant *rpoC* geni oluşturulmuş ve kor RNAP enzimi bu metodla kolayca saflaştırılmıştır. *B. subtilis* için ise bu metod Fujita ve Sadai, (1998) tarafından gerçekleştirilmiştir. His-tag kuyruğu içeren *rpoC* genini taşıyan integrasyon plazmidi neomisin seçici markırı ile *B. subtilis* kromozomal DNA'sına integre edilmiş ve His-tag kuyruğu kullanılarak RNAP enziminin kolayca saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

AC6 ve *B.subtilis* σ^D proteinlerinin kor RNAP enzimi ile yeniden yapılanması, AC6 *hag* geni promotor bölgesini tanıyarak promotora bağlanması ve bir RNA transkriptinin sentezini sağlaması *in vitro* transkripsiyon deneyi ile gerçekleştirildi. AC6 *hag* geni promotor fragmentleri *B. subtilis* kromozomuna integre edilmiş ve promotor fragmentlerinin önündeki *lacZ* geninin ekspresyonu *B. subtilis* σ^D ve kor RNAP enzimi tarafından *in vivo* olarak sağlanmıştır. Bundan dolayı hem AC6 hem de *B. subtilis* σ^D proteinleri holoenzim yapısını yeniden oluşturmak için kullanılmışlardır.

in vitro transkripsiyon reaksiyonu farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kullanılan pEC3 plazmiti *hag* geninin UP, -35 ve -10 promotor elementlerinin yanısıra genin translasyon başlama kodonundan itibaren 385 bp downstream bölgesinde içermektedir. Reaksiyon sonucunda holoenzim yapısının oluşup AC6 *hag* geni promotor bölgesine bağlanarak RNA transkriptlerini sentezleyebilme kabiliyeti Q-PCR (real time) yöntemi ile belirlenmeye çalışıldı. Eğer holoenzim yapısı oluşmuş ve AC6 *hag* geni promotor bölgesini tanıyabilmiş ise reaksiyon süresine bağlı olarak downstream yönde belirli uzunluklarda transkriptler oluşacaktır. Bu transkriptlerden sentezlenen cDNA, daha sonra nükleotit sırası bilinen *hag* genin 385 bp downstream bölgesinden dizayn edilen primer çifti vasıtasıyla Q-PCR reaksiyonu ile çoğaltılarak, σ^D proteinleri tarafından transkripsiyonu farklı sıcaklıklar da gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği ve gerçekleşen reaksiyonlardaki transkripsiyon seviyesi tespit edilmeye çalışılarak aydınlatıldı. Yapılan Q-PCR reaksiyonu 7303 Sequence Detection (Applied Biosystem) yazılımı ile analiz edildi. Analiz sonucunda *in vivo* deneylerde de olduğu gibi *B. subtilis* σ^D proteinin AC6 *hag* geni promotor bölgesini tanıyarak tüm sıcaklıklarda RNA sentezini başlatabildiği gösterildi. AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinleri tarafından gerçekleştirilen en iyi ekspresyon seviyesi 40°C’de gözlemlendi. Daha yüksek sıcaklıklarda (50, 60) *B. subtilis* σ^D proteinin tarafından transkript edilen RNA seviyesi düşerken, AC6 σ^D proteini tarafından transkript edilen RNA seviyesi bir miktar artmıştır. Termofilik bir bakteri olan AC6’nın σ^D proteini tarafından transkript edilen RNA’ların seviyesi bu yüksek sıcaklıklarda daha fazla olması beklenirken, RNA seviyesi 40°C’nin altında olmuştur (Şekil 45) ve sıcaklık artıkça transkript seviyesi de düşmüştür. Kor RNAP enziminin *B. subtilis*’ten izole edilmesi ve mezofilik bir bakteri olan *B. subtilis* enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda bozulmaya başlamasından dolayı bu sonuçların elde edildiği düşünülmektedir.

in vitro transkripsiyon deneyinde kontrol reaksiyonları σ^D proteinleri içermezken sadece kor RNAP enzimini ve pEC3 plazmitini içerek şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan

runoff transkripsiyon ve Q-PCR deneyleri sonucunda tüm sıcaklıklardaki kontrol reaksiyonlarında RNAP enziminin AC6 *hag* promotor bölgesine bağlanmadığı ve her hangi bir RNA transkripti oluşturmadığı belirlenmiştir. Chen ve Helmann, (1995) tarafından yapılan bir çalışmada *B. subtilis* kor RNAP enzimi ve σ^D faktörü saflaştırılmıştır ve yeniden oluşturulan σ^D -RNAP holoenziminin σ^D tarafından tanınan birçok promotor bölgesinden transkripsiyonu başlatabildiğini göstermişlerdir. Çalışmada kullandıkları promotor bölgelerden biri *B. subtilis* flagellin geni promotor bölgesidir ve holoenzim formasyonun bu bölgeden transkripsiyonu başlatabildiği gösterilmiştir.

Promotorun -10 ve -35 elementlerinin tanınması spesifik σ -DNA kontağını gerektirmesine rağmen, solusyon içerisindeki σ faktörlerinin promotor DNA'sına çok az ilgisi olduğu kabul edilir (Gruber ve Gross, 2003). Öncül σ faktörde bulunan Bölge 1 (amino termal domain) serbest σ -faktörlerinin DNA ile etkileşimini dönüşümlü olarak engeller. Bölge 1'in öncül σ faktörlerden uzaklaştırılması bu maskeleyen ortadan kaldırır (Dombroski vd., 1992). Oysa ki, çoğu alternatif σ faktör Bölge 1'i içermez ve bu faktörlerin muhtemelen kendine özgü farklı ihibisyon mekanizmaları vardır. Bu spesifik durumlarda σ^D :FlgM kompleksinin yapısal analizi incelendiğinde σ^D 'nin DNA'ya bağlanan iki domaininin (Bölge 2 ve 4) FlgM ile sıkı bir σ yapısı oluşturduğu açığa çıkarılmıştır (Sorenson vd., 2004). Disülfid çapraz bağları kullanılarak yapılan çalışmalar solusyon içerisindeki σ^D için bu sıkı yapısına benzer bir yapının baskın olduğu gösterilmiştir (Sorenson ve Darst, 2006).

σ^D 'nin DNA'ya bağlanmasını maskeleyen sıkı kompakt yapısı solusyon içerisinde dominant olmasına rağmen, Chen ve Helmann (1995) tarafından önceden yapılan bir çalışmada *in vitro* olarak σ^D 'nin promotor DNA'sını spesifik olarak tanıdığı gösterilmiştir. Promotor DNA'sının σ^D tarafından spesifik olarak tanındığının kanıtları mobility shift assay (EMSA), DNA footprinting ve kimyasal modifikasyon deneyleri ile desteklenmiştir (Chen ve Helmann, 1995). σ^D için DNA'ya spesifik olarak bağlandığı gösterilmesine rağmen, bu etkileşim karakterize edilmemiş ve kor RNAP altbiriminin yokluğunda σ faktörlerin spesifik olarak DNA'ya bağlanma aktivitesi tartışmalı olarak aynen kalmıştır. Bazı araştırmacılar ve yaptıkları çalışmalar ile kor RNAP yokluğunda σ faktörün spesifik olarak DNA'ya bağlanmadığını (Schwartz vd., 2008; Sorenson ve Darst, 2006) savunan çalışmaların tersine kor RNAP yokluğunda bile σ faktörlerin promotor elementlerini tanıyabildiği ideasını savunan (Imashimizu vd., 2006; Kudo vd., 1981; Sevostyanova vd., 2007) bir kaç çalışmada vardır. AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinin AC6 *hag* geni promotor

bölgesine bağlanma afinitesi Floresent Anisotropy Deneyi ile incelenmiştir. AC6 *hag* geni yaban tip ve -10 promotor elementinde mutasyonlar içeren floresent işaretli 58 bp'lik promotor bölgesi oligonükleotitleri ve bunların komplementer zincirleri 95°C'de ısıtılarak ve oda sıcaklığında yavaşça soğutularak *hag* geni promotor DNA dubleksleri oluşturulmuştur. AC6 ve *B. subtilis* σ^D faktörlerinin bu promotor DNA dublekslerine bağlanma ilgileri değişik sıcaklıklarda test edilmiştir. İlk olarak 100 nM yaban tip DNA promotor dubleksi 50 mM NaCl içeren TGED tampon içerisinde homojen bir biçimde çözülmüştür. DNA dubleksinin bu tampon içerisindeki dönme hareketi Floresent spektrofotometresi ile ölçülerek ilk ölçüm alınmıştır. Daha sonra belirli miktarlarda σ^D proteinin spektrofotometre küvetine ilave edilerek σ^D proteinlerinin AC6 *hag* geni promotor bölgeye bağlanma ilgisi hesaplanmıştır. Tüm sıcaklıklardaki anisotropy deneylerinde hem AC6 hemde *B. subtilis* σ^D proteini AC6 *hag* geni promotor bölgesine direkt olarak bağlanabildikleri fakat bu bağlanmanın oldukça zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan ölçümlerde *B. subtilis* σ^D proteininin promotor bölgeye tüm sıcaklıklarda AC6 σ^D proteininden daha da zayıf olarak bağlandığı tespit edilmiştir. Chen ve Helman (1995) tarafından gerçekleştirilen bir çalışma *B. subtilis* σ^D proteininin flagellin geni promotor bölgesine zayıf bir şekilde direkt olarak bağlandığını göstermiştir.

Floresent Anisotropy deneylerinde yaban tip promotor DNA dubleksinin yanısıra, deneyde -10 promotor elementinde mutasyonlar yapılmış DNA dubleksleri de kullanıldı. Yapılan çalışmalar GCCGATAT sekansına sahip uzun -10 promotor elementinin GCCG motifinin tüm σ^D familyası ve homologları arasında sıkı bir şekilde korunduğunu ve σ^D faktörün DNA'ya bağlanmada bu motifin önemli olduğu gösterilmiştir (Koo vd., 2009; Wozniak ve Hughes, 2008; Yu vd., 2006). AC6 *hag* geni promotorunun CCGATAT sekansına sahip -10 elementi CCG ve ATAT motiflerinde sırasıyla mutasyonlar meydana getirilmiştir. İlk mutasyon ATAT motifinde yapılarak bu sekans CGCG olarak değiştirilmiştir. Yapılan FA deneylerinde bu mutasyon sonucunda *B. subtilis* σ^D proteinin tüm sıcaklıklarda promotor bölgesine bağlanabildikleri bu mutasyonun bağlanmada etkili olmadığı gözlemlendi. AC6 σ^D proteinin ise bu mutasyona sahip promotor bölgesine 30°C ve 40°C'de bağlanabilirken, 50°C ve 60°C'de bu promotor bölgesine bağlanamamıştır. İkinci olarak CCG motifi CTA olarak değiştirilmiş ve FA deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda hem AC6 hem de *B. subtilis* σ^D proteinlerinin tüm sıcaklıklarda bu mutasyona sahip promotor bölgesine bağlanamadıkları tespit edilmiştir. Koo, (2009) tarafından yapılan çalışmada -10 promotor elementinin GCCG motifinin σ^D proteinin 2.4

alt yapısı ile etkileşerek, promotor- σ^D bağlanmasında önemli olduğu gösterilmiştir. σ^D proteininin 2.4 alt biriminde bulunan D77 ve R80 a.a'lerinin CG bazları ile etkileştiği gösterilmiştir. Promotorun -10 elementinin upstream uzantısı olan GC bazları ise σ^D proteinin 3.0 alt birimindeki R70 a.a ile birleştiği gösterilmiştir. Çalışmada -12C ve -11G bazlarında yapılan tekli mutasyonlar sonucunda promotor aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir ve bu bazların promotorun -10 elementinin sınırı olduğu önerilmiştir. Bunun yanısıra -13C ve -14G bazlarında yapılan tekli mutasyonlar sonucunda promotor aktivitesinde belirgin bir düşüş olmazken, her iki bazda da oluşturulan çiftli mutasyon sonucunda promotor aktivitesinin yaklaşık 20 ile 50 kat arasında düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar GC bazlarından birinin yüksek promotor aktivitesinin olması için yeterli olduğunu göstermiştir ve bu bazların -10 promotor elementinin upstream uzantısı olduğu ortaya koyulmuştur. *flgKL* promotor bölgesi üzerinde yapılan çalışmada -10 elementinin upstream GC bazlarında meydana getirilen tekli mutasyonun promotor aktivitesini engellemezken bu bazlarda meydana getirilen çiftli mutasyon sonucunda promotor aktivitesinde büyük bir düşüş gözlemlenmiştir (Wozniak ve Hughes, 2008). AC6 *hag* promotorunun -10 elementindeki CGG yapısındaki bu üçlü mutasyon sonucunda da σ^D proteinlerinin promotor bölgeye bağlanamadıkları tespit edilmiştir ve bu sonuçlar doğrultusunda -10 elementinin CGG motifinin σ^D 'ye bağlanmada önemli motif olduğu belirlenmiştir.

Yapılan *in vitro* deneyler sonucunda AC6 *hag* geninin bakteriyel σ -faktörlerden σ^D tarafından tanındığını ve *hag* geninin transkripsiyonunun σ^D tarafından sağlandığı gösterilmiştir. σ^D proteinin promotor bölgesine zayıf olarak direkt bağlanabildiği gösterilmiştir. AC6 *hag* geninin yüksek seviyede ekspres olmasına neden olduğu düşünülen promotor yapısı hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak incelenmiştir. Bunun yanısıra hücrede bir proteinin ekspresyonun yüksek olmasını sağlayan mRNA'nın sekonder yapısı, kodon kullanım frekansı, güçlü Shine-Dalgarno sekansının varlığı gibi diğer faktörlerde (Karlin ve Mrazek, 2000), bu çalışmada biyoinformatik olarak incelenmeye çalışılmıştır.

mRNA'nın degradasyonu hücresel bir işlemdir ve gen ekspresyonun kontrolü için yüksek derecede önemlidir. Sürekli olarak sentez edilen bir mesajın hücredeki kararlı durumunun konsantrasyonu direkt olarak onun yarılanma ömrü ile orantılıdır (Emory vd., 1992). mRNA'nın kararlı durumunun seviyesi hem sentez hem de degradasyon ile belirlendiği için mRNA bozulması gen ekspresyonun regülasyonunda transkripsiyon

faktörleri kadar önemlidir. mRNA'nın yarılanma ömrü üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki organizmalar arasında bu oran değişiklik göstermektedir (Feng ve Niu, 2007). *E. coli* mRNA'larının yarılanma ömrü 1 ile 10 dk arasında değişirken, *Saccharomyces cerevisiae*'da yaklaşık olarak 3 dk.'dan 90 dk.'ya kadar uzayabilmektedir (Bernstein vd., 2002; Selinger vd., 2003; Wang vd., 2002). *E. coli* ve *B. subtilis*'de mRNA degradasyonu üzerine yapılan çalışmalar mRNA'nın 5' UTR (Untranslated Region) bölgesinin sekonder yapısının stabilitede özellikle belirleyici faktör olduğunu göstermiştir. *E. coli ompA* ve *B. subtilis aprE* genlerinin transkriptlerinin 5' ucunda bir stem-loop yapısının olduğu belirlenmiştir ve alışılmadık bir şekilde bu stem-loop yapısını içeren transkriptlerin daha uzun yarılanma ömrü olduğu gösterilmiştir (Emory vd., 1992; Hambræus vd., 2002). Yapılan bu çalışmada AC6 *hag* geninin mRNA'sının 5' UTR bölgesinin sekonder yapısı mfold (URL-3, 2010) programı ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda AC6 *hag* geni transkriptinin 5' ucunda bir stem-loop yapısının varlığı gözlemlenmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalar ışığında bu yapının AC6 *hag* geni transkriptlerinin stabilitesini artırdığı düşünülebilir. Bu yapının stabiliteyi artırması sonucunda hücrede uzun süre bulunan AC6 *hag* geni mRNA'sının sürekli olarak translasyona uğramasına yol açabilir. Sonuç olarak AC6 *hag* geninin yüksek seviyedeki ekspresyonunun bir nedeni de mRNA'sının 5' ucundaki stem-loop yapısı olabilir.

AC6 *hag* geni mRNA'sının 3' sekonder yapısı ise FindTerm (URL-4, 2010) programı kullanılarak tespit edildi. Yapılan inceleme sonucunda AC6 *hag* geni transkriptinin 3' ucunda da bir stem-loop yapısının bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 49). Stem-loop yapısı incelendiğinde GC bazlarında yüksek bir gövde (stem) kısmı ile U bazınca yüksek bir loop yapısı görülmektedir. mRNA'nın 3' ucunda görülen bu yapı tipik rho-bağımsız transkripsiyon sonlanma yapısıdır (Mott vd., 1985). Yapılan bu analiz sonucunda AC6 *hag* geni transkriptinin rho-bağımsız şekilde 3' ucunda oluşan bir stem-loop yapısı ile sonlandığı tespit edilmiştir. Bunun yanısıra bakteriyel ve faj mesajlarının 5' ve 3' uçları mRNA'nın stabilizasyonunu gösterir. Çoğu prokaryotik mRNA'ların 3'-terminal stem-loop yapısı mRNA'yı 3' ekzoribonükleazlar tarafından degradasyonuna karşı korucuyu bir bariyer olarak görev yapar (Belasco vd., 1985; Chen vd., 1988).

Son zamanlarda kodon kullanım frekansının bir genin ekspresyonunda önemli olan faktörlerden biri olduğu tespit edilmiştir (Ermolaeva, 2001; Lithwick and Margalit, 2003). Yapılan çalışmalar sonucunda kodon kullanım derecesi ile gen ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Carbone vd., 2003). Çoğu amino asit birden

fazla üçlü kodon tarafından kodlanır. Bu kodonlar sinonim olarak adlandırılırlar ve genellikle üçüncü nükleotitte farklı bir baz kullanımı ile ayrılırlar. Bu sinonim kodonlar aynı organizmanın genlerinde bile eşit frekansta kullanılmazlar (Grantham vd., 1980; Gouy ve Gautier, 1982). Farklı kodonları taşıyan farklı tRNA'ların seviyesi hücre içerisinde aynı değildir. Deneysel çalışmalar göstermiştir ki eğer bir mRNA hücrede tercih edilen kodonlara sahip ise nadir olarak tercih edilen kodonları taşıyan mRNA'lardan daha hızlı tercüme edilmektedirler (Sorensen vd., 1989; Fredrick ve Ibba, 2010). AC6 *hag* mRNA'sının kodon kullanımının frekansı Kodon Adaptasyon İndeksi (CAI) hesaplanarak belirlendi. Bu amaç için CAIcal (URL- 6) programı kullanıldı. CAI değerini hesaplamak için AC6 *hag* gen sekansı sorgu sekansı olarak kullanıldı ve Kodon Kullanım Veritabanından (URL- 5) *B. subtilis*, *G. kaustophilus* ve *G. stearothermophilus* için elde edilen referans sekansı kullanılarak CAI değeri hesaplandı. Genellikle çoğu prokaryotik hücre logaritmik artış fazı boyunca ribozomal protein (RPs) genleri, translasyon ve transkripsiyon faktör (TF) genlerini ve ana şaperon-degradasyon (CH) genlerini çok yüksek seviyede ekspres eder. İşte bu üç sınıf genin (RPs, TF, CH) kodonları baz alınarak referans setler oluşturulmaktadır (Karlin ve Mrazek, 2000). CAI değeri 0 ile 1 arasında değişen bir değerdir ve CAI değeri 1'e yaklaştıkça genin hücrede yüksek seviyede ekspres edildiğini göstermektedir. Yapılan biyoistatistik analizler göstermiştir ki AC6 *hag* geni üçlü kodonları *G. kaustophilus* ve *G. stearothermophilus* ile karşılaştırıldığında CAI değeri 0,554 ve 0,651 bulunmaktadır. Bu değerler 0,5 ortalamasının üzerindedir fakat 1'e yaklaşık değildir. Bu sonuçlar AC6 *hag* geninin *Geobacillus* örneklerinin yüksek sıklıkla kullandığı kodonları kullanmadığını göstermektedir. Fakat CAI değeri *B. subtilis* için bulunan referans sekansları kullanılarak hesaplandığı zaman 0,884 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,5 ortalamasından yüksek ve 1'e yaklaşık bir değerdir. Bu bilgi ışığında AC6 *hag* geni *B. subtilis* hücrelerinde yüksek seviyede ekspres edilen genlerin kullandığı aynı kodonları kullandığını göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Doktora tezi olarak hazırlanan ‘*Aeribacillus pallidus* AC6’da yüksek seviyede ekspress edilen flagellin geninin (*hag*) klonlanması, promotor yapısı, flagellar spesifik transkripsiyon faktörünün (Sigma-D) izolasyonu ve saflaştırılması’ başlıklı bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir.

- 1.AC6 suşunun *hag* genine ait tüm nükleotit sırası ve 5’- upstream bölgesine ait nükleotit sırası belirlendi.
- 2.AC6 *sigD* genine ait tüm nükleotit sırası çoğaltıldı.
- 3.AC6 ve *B. subtilis sigD* genleri pET11a ekspresyon vektörüne klonlanarak, T7 promotoru altında σ^D proteinlerinin aşırı ekspresyonu sağlandı.
- 4.Rekombinant σ^D proteinleri DEAE-Sepharose ve mono-Q (FPLC) kolon kromatografileri ile saflaştırıldı.
- 5.RACE tekniği ile *hag* geninin transkripsiyon başlangıç noktasının translasyon başlama kodonundan itibaren 79 ve 80 bp upstream bölgedeki G ve T nükleotitleri olduğu belirlendi.
- 6.*hag* geni promotor bölgesinin sınırlarının ve promotor elementlerinin belirlenmesi için promotor fragmentleri dizayn edildi. Bu fragmentler, translasyon başlama kodonunun 185 bp upstream bölgesini ve 22 bp downstream bölgeleri içerecek şekilde dizayn edildi. Fragmentler upstream bölgesi uzunluklarına göre isimlendirildi.
- 7.Dizayn edilen *hag* promotor fragmentleri integrasyon vektörü pDG1663’de promotorsuz *lacZ* geninin önüne klonlandılar. *hag:lacZ* füzyonları *B. subtilis* CU1065 ve *sigD* geni bakımından mutant HB4035 hücrelerinin kromozomal DNA’sına integrasyonları sağlandı.
- 8.*lacZ* gen ekspresyon seviyesi ve β -galaktosidaz aktivitesi sonucunda *hag* geni promotor elementleri tespit edildi. *hag* promotorunun -10 promotor elementi, -8 ve -14 sekansları arasında CCGATAT bazları olarak, -35 elementi ise -30 ve -33 sekansları arasında TAAA bazları olarak tespit edildi.
- 9.Yapılan β -galaktosidaz deneyi ve transkripsiyon başlangıç noktasının belirlenmesinden sonra AC6 *hag* geni promotorunun RNAP enziminin alt birimi olan σ^D tarafından tanındığı tespit edildi.

10. Yapılan β -galaktosidaz deneyi sonucunda – 42 ile -80 bp arasında bulunan A ve T bazlarınca zengin bölgenin promotorun UP elementi olduğu ve bu UP elementlerinin *hag* geninin yüksek seviyede transkripsiyonu için gerekli olduğu tespit edildi.
11. *hag* promotor bölgesi ve RNAP holoenzim kompleksinin aydınlatılması için *B. subtilis* kor RNAP enzimi Ni-NTA ve Heparin kolon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırıldı.
12. Yapılan *in vitro* transkripsiyon deneyi sonucunda σ^D proteinlerinin kor RNAP enzimi ile birleşip AC6 *hag* geni promotor bölgesinden transkripsiyonu başlattığı tespit edildi. AC6 ve *B. subtilis* σ^D proteinlerinin en yüksek transkripsiyon seviyesine 40 °C’de ulaştığı tespit edildi.
13. σ^D proteinlerinin AC6 *hag* promotor bölgesine bağlanma aktiviteleri Floresent Anisotropy deneyi ile gerçekleştirildi. FA deneyi AC6 *hag* promotor bölgesinin CCGATAT sekansına sahip uzun -10 promotor elementinin CCG motifinin σ^D proteini tarafından tanınıp bağlanmasında önemli olduğu tespit edildi.
14. *hag* mRNA’sının 5’ ve 3’ sekonder yapısı mfold ve FindTerm programları ile tespit edildi. Yapılan analizler sonucunda *hag* mRNA’sının 5’- ucunda potansiyel bir hairpin yapısının olduğu tespit edildi.
15. *hag* mRNA’sının 3’ ucunda da bir hairpin yapısının olduğu ve *hag* geninin transkripsiyon sonlanmasının rho-bağımsız bir şekilde stem-loop yapısının oluşması ile sonlanabileceği belirlendi.
16. *hag* geninin kodon kullanım sıklığı CAICal programı ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda AC6 *hag* geninin *B. subtilis*’de yüksek seviyede ekspres edilen genlerin tercih ettiği benzer kodonlardan oluştuğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Hareketli hücrelerde yüksek seviyede ekspres edilen proteinlerden biri olan flagellin geninin promotor analizi ve transkripsiyonel seviyede gen regulasyonu *E. coli*, *Salmonella* ve *Bacillus* gibi bir çok bakteride incelenmiştir. Termofilik bir bakteri olan *Aeribacillus pallidus* AC6 hücresinde de çok yüksek bir seviyede ekspres edilen flagellin proteininin promotor yapısı ve transkripsiyonel seviyede regulasyonu incelenmiştir. Bakteriyel RNA Polimerazların alt sınıfı olan σ faktörlerden, σ^D 'nin *Aeribacillus pallidus* AC6 *hag* geninin ekspresyonundan sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda σ^D faktörünün promotor bölgeye bağlanmada -10 promotor elementinin CGGATAT sekanslarındaki CGG motifinin önemli olduğu gösterilmiştir. σ -faktörlerin evrimsel olarak korunmuş bölgelerinde 2.4'ün -10 promotor bölgesini tanıdığı ve bu bölgeden promotora bağlandığı gösterilmiştir. σ^D proteinin 2.4'üncü bölgesindeki a.a'lerde yapılacak olan mutasyonlar ile -10 promotor bölgesine bağlanmada hangi a.a.'in veya a.a.'lerin önemli rol oynadığı tespit edilebilir.

Bir proteinin hücrede yüksek seviyede ekspres edilmesine sebep olan faktörlerden biri olan mRNA'nın sekonder yapısı incelendiğinde 5'- translasyona uğramayan bölgesinde bir hairpin yapısının olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgede yapılacak olan bir delesyon ile bu yapının ekspresyon seviyesi üzerine etkisi belirlenebilir.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda *hag* geni transkripsiyonun rho-bağımsız bir stem-loop yapısı ile sonlandığı tespit edildi. Yapılacak olan 3'-RACE tekniği ile transkripsiyon bitiş noktası tespit edilerek stem-loop yapısının yeri tam olarak tespit edilebilir.

Hücrede yüksek seviyede ekspres edildiği tespit edilen *hag* geninin promotorunun yapısal olarak kuvvetli olduğu tespit edilmiştir. Bu promotor bölgesinin gerek Gram pozitif gerekse de Gram negatif organizmalar için ekspresyon vektörü olarak yapılandırılması çalışmaları ileri çalışmalar olarak düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Abd Rahman, R., N., Leow, T., C., Salleh, A., B. ve Basri, M., 2007. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, BMC Microbiol, 7, 77.
- Anthony, L., C., Artsimovitch, I., Svetlov, V., Landick, R. ve Burgess, R., R., 2000. Rapid purification of His(6)-tagged *Bacillus subtilis* core RNA polymerase, Protein Expr Purif, 19, 3, 350-4.
- Atanassova, M., Derekova, A., Mandeva, R., Sjöholm, C. ve Kambourova, M., 2008. *Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria, Int J Syst Evol Microbiol, 58, 10, 2359-62.
- Banat, I., M., Marchant, R. ve Rahman, T., J., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov, Int J Syst Evol Microbiol, 54, 6, 2197-2201.
- Bardy, S., L., Mori, T., Komoriya, K., Aizawa, S. ve Jarrell, K., F., 2002. Identification and localization of flagellins FlaA and FlaB3 within flagella of *Methanococcus voltae*. J Bacteriol, 184, Vol. 19, 5223-33.
- Bardy, S., L., Ng, S., Y. ve Jarrell, K., F., 2003. Prokaryotic motility structures. Microbiology, 149, 2, 295-304.
- Belasco, J., G., Beatty, J., T., Adams, C., W., von Gabain, A. ve Cohen, S., N., 1985. Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript, Cell, 40, 1, 171-81.
- Belduz, A., O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, Int J Syst Evol Microbiol, 53, 5, 1315-20.
- Bernstein, J., A., Khodursky, A., B., Lin, P., H., Lin-Chao, S. ve Cohen, S., N., 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays, Proc Natl Acad Sci USA, 99, 15, 9697-702.
- Blake, J., R., Sleight, M. ve Liron, N., 1998. Roles of cilia in "Iter feeding and mucus transport. In: (Baum, G. L., Priel, Z., Roth, Y., Liron, N. & Ostfeld, E. J., eds), Proceedings of the International Congress on Cilia, Mucus, and Mucociliary Interactions, 119-126.
- Borukhov, S. ve Severinov, K., 2002. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation, Res Microbiol, 153, 9, 557-62.

- Borukhov, S. ve Nudler, E., 2003. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications, Curr Opin Microbiol, 6, 2, 93-100.
- Bradford, M., M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72, 248-54.
- Burgess, R., R., 1996. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl, Methods Enzymol, 273, 145-9.
- Burton, Z., Burgess, R., R., Lin, J., Moore, D., Holder, S. ve Gross, C.A., 1982. The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E coli* K12, Nucleic Acids Res, 9, 2889-903.
- Busby, S. ve Ebright, R., H., 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes, Cell, 79, 5, 743-6.
- Busby, S., J., 2009. More pieces in the promoter jigsaw: recognition of -10 regions by alternative sigma factors, Mol Microbiol, 72, 4, 809-11.
- Carbone, A., Zinovyev, A. ve Kepes, F., 2003. Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias, Bioinformatics, 19, 16, 2005-15.
- Chen, C., Y., Beatty, J., T., Cohen, S., N. ve Belasco, J., G., 1988. An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for puf mRNA stability, Cell, 52, 4, 609-19.
- Chen, L. ve Helmann, J., D., 1994. The *Bacillus subtilis* sigma D-dependent operon encoding the flagellar proteins FliD, FliS, and FliT, J Bacteriol, 176, 11, 3093-101.
- Chen, X., G., Stabnikova, O., Tay, J., H., Wang, J., Y. ve Tay, S., T., 2004. Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge, Extremophiles, 8, 6, 489-98.
- Chen, Y., F. ve Helmann, J., D., 1992. Restoration of motility to an *Escherichia coli* fliA flagellar mutant by a *Bacillus subtilis* sigma factor, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 11, 5123-7.
- Chen, Y., F. ve Helmann, J., D., 1995. The *Bacillus subtilis* flagellar regulatory protein sigma D: overproduction, domain analysis and DNA-binding properties, J Mol Biol, 249, 4, 743-53.
- Claus, D., B. ve Berkeley, W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872., 174AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Wilkinsin.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N., A. ve De Vos, P., 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches, Int J Syst Evol Microbiol, 54, 3, 941-6.

- Derekova, A., Sjöholm, C., Mandeva, R. ve Kambourova, M., 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria), Extremophiles, 11, 4, 577-83.
- Dillon, R., H. ve Fauci, L., J., 2000. An integrative model of internal axoneme mechanics and external fluid dynamics in ciliary beating, J Theor Biol, 207, 3, 415-30.
- Doetsch, R., N. ve Sjöblad, R., D., 1980. Flagellar structure and function in eubacteria, Annu Rev Microbiol, 34, 69-108.
- Dombroski, A., J., Walter, W., A., Record, M., T., Siegele, D., A ve Gross, C., A., 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA, Cell, 70, 501-12.
- Dülger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dülger, S., Demirbag, Z. ve Belduz, A., O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov, Int J Syst Evol Microbiol, 54, 5, 1499-503.
- Emory, S., A., Bouvet, P. ve Belasco, J., G., 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*, Genes Dev, 6, 1, 135-48.
- Ermolaeva, M., D., Khalak, H., G., White, O., Smith, H., O. ve Salzberg, S., L., 2000. Prediction of transcription terminators in bacterial genomes, J Mol Biol, 30, 1, 27-33.
- Ermolaeva, M., D., 2001. Synonymous codon usage in bacteria, Curr Issues Mol Biol, 3, 4, 91-7.
- Fedorov, O., Pyatibratov, M., Kostyukova, A., Osina, N. ve Tarasov, V., 1994. Protofilament as a structural element of flagella of haloalkalophilic archaeobacteria, Canadian Journal of Microbiology, 40, 1, 45-53.
- Feng, L. ve Niu, D., K., 2007. Relationship between mRNA stability and length: an old question with a new twist, Biochem Genet, 45, 1-2, 131-7.
- Fortina, M., G., 2001. Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* (Ahmad et al. 2000) comb. nov, Int J Syst Evol Microbiol, 5, 6, 2063-71.
- Fredrick, K., L. ve Helmann, J., D., 1994. Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a sigma D-dependent gene encodes a novel protein with both *CheW* and *CheY* homologous domains, J Bacteriol, 176, 9, 2727-35.
- Fredrick, K., Caramori, T., Chen, Y., F., Galizzi, A. ve Helmann, J., D., 1995. Promoter architecture in the flagellar regulon of *Bacillus subtilis*: high-level expression of flagellin by the sigma D RNA polymerase requires an upstream promoter element, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 7, 2582-6.

- Fredrick, K. ve Ibbá, M., 2010. How the sequence of a gene can tune its translation, Cell, 141, 2, 227-9.
- Fujita, M. ve Sadaie, Y., 1998. Rapid isolation of RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*, Gene, 221, 2, 185-90.
- Gerl, L. ve Sumper, M., 1988. Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. Characterization of five flagellin genes, J Biol Chem, 263, 26, 13246-51.
- Gourse, R., L., Ross, W. ve Gaal, T., 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition, Mol Microbiol, 37, 4, 687-95.
- Gouy, M. ve Gautier, C., 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity, Nucleic Acids Res, 10, 22, 7055-74.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R. ve Pave, A., 1980. Codon catalog usage and the genome hypothesis, Nucleic Acids Res, 8, 1, 49-62.
- Graves, M., C. ve Rabinowitz, J., C., 1986. In vivo and in vitro transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms, J Biol Chem, 261, 24, 11409-15.
- Grossman, A., D., Erickson, J., W. ve Gross, C., A., 1984. The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters, Cell, 38, 2, 383-90.
- Gruber, T., M. ve Bryant, D., A., 1998. Characterization of the alternative sigma-factors SigD and SigE in *Synechococcus sp.* strain PCC 7002. SigE is implicated in transcription of post-exponential-phase-specific genes, Arch Microbiol, 169, 3, 211-9.
- Gruber, T., M. ve Gross, C., A., 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space, Annu Rev Microbiol, 57, 441-66.
- Guerout-Fleury, A., M., Frandsen, N. ve Stragier, P., 1996. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*, Gene, 180, 1-2, 57-61.
- Guerry, P., Alm, R., A., Power, M., E., Logan, S., M. ve Trust, T., J., 1991. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility, J Bacteriol, 173, 15, 4757-64.
- Haldenwang, W., G., 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*, Microbiol Rev, 59, 1, 1-30.
- Hambraeus, G., Karhumaa, K. ve Rutberg, B., 2002. A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis aprE* leader mRNA, Microbiology, 148, 6, 1795-803.
- Hecker, M., Schumann, W. ve Volker, U., 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*, Mol Microbiol, 19, 3, 417-28.

- Helmann, J., D., Marquez, L., M. ve Chamberlin, M., J., 1988a. Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis* sigma 28 gene, J Bacteriol, 170, 4, 1568-74.
- Helmann, J., D., Masiarz, F., R. ve Chamberlin, M., J., 1988b. Isolation and characterization of the *Bacillus subtilis* sigma 28 factor, J Bacteriol, 170, 4, 1560-7.
- Helmann, J., D., 1991. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression, Mol Microbiol, 5, 12, 2875-82.
- Helmann, J., D., 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA, Nucleic Acids Res, 23, 13, 2351-60.
- Helmann, J., D., 2003. Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase and associated factors, Methods Enzymol, 370, 10-24.
- Helmann, D., J., Morgan P., C., 2004. RNA Polimerase and Sigma factor. *Bacillis subtilis* and its closest relatives from genes to cell. Editor Abraham L Sonenshein, James A Hoch., Richard Losick., ASM Press, Washington.
- Helmann, J., D., 2004. Sigma Factors, Encyclopedia of Biological Chemistry, 4, 41-44.
- Heyduk, T., Ma, Y., Tang, H. ve Ebright, R., H., 1996. Fluorescence anisotropy: rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction, Methods Enzymol, 274, 492-503.
- Hirschman, J., Wong, P., K., Sei, K., Keener, J. ve Kustu, S., 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor, Proc Natl Acad Sci USA, 82, 22, 7525-9.
- Homma, M., Ohnishi, K., Iino, T. ve Macnab, R., M., 1987. Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in *Salmonella typhimurium*, J Bacteriol, 169, 8, 3617-24.
- Huang, X., Decatur, A., Sorokin, A. ve Helmann, J., D., 1997. The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature, J Bacteriol, 179, 9, 2915-21.
- Imashimizu, M., Hanaoka, M., Seki, A., Murakami, K., S. ve Tanaka, K., 2006. The cyanobacterial principal sigma factor region 1.1 is involved in DNA-binding in the free form and in transcription activity as holoenzyme, FEBS Lett, 580, 3439-44.
- Ingraham, J., L. ve Ingraham, C., A., 2002. Introduction to Microbiology, Second Edition. New York.
- Joys, T., M., 1988. The flagellar filament protein, Can J Microbiol, 34, 4, 452-8.

- Kalmokoff, M., L., Jarrell, K., F. ve Koval, S., F., 1988. Isolation of flagella from the archaeobacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114, J Bacteriol, 170, 4, 1752-8.
- Kalmokoff, M., L. ve Jarrell, K., F., 1991. Cloning and sequencing of a multigene family encoding the flagellins of *Methanococcus voltae*, J Bacteriol, 173, 22, 7113-25.
- Karlin, S. ve Mrazek, J., 2000. Predicted highly expressed genes of diverse prokaryotic genomes, J Bacteriol, 182, 18, 5238-50.
- Karp, G., 2000. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, F.e., John Wiley and Sons, Hoboken, NJ., 346-358.
- Kashlev, M., Martin, E., Polyakov, A., Severinov, K., Nikiforov, V. ve Goldfarb, A., 1993. Histidine-tagged RNA polymerase: dissection of the transcription cycle using immobilized enzyme, Gene, 130, 1, 9-14.
- Keiichi, N., 2004. Dynamic Aspects of the Bacterial Flagellum, Macromolecular Architecture, 333-344.
- Kevbrin, V., V., Zengler, K., Lysenko, A., M. ve Wiegel, J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka, Extremophiles, 9, 5, 391-8.
- Kobayashi, T., Rinker, J., N. ve Koffler, H., 1959. Purification and and chemical properties of flagellin, Arch Biochem Biophys, 84, 342-62.
- Koo, B., M., Rhodius, V., A., Campbell, E., A. ve Gross, C., A., 2009. Mutational analysis of *Escherichia coli* sigma28 and its target promoters reveals recognition of a composite -10 region, comprised of an 'extended -10' motif and a core -10 element, Mol Microbiol, 72, 4, 830-43.
- Kubori, T., Okumura, M., Kobayashi, N., Nakamura, D., Iwakura, M. ve Aizawa, S., I., 1997. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*, Mol Microbiol, 24, 2, 399-410.
- Kudo, T., Jaffe, D. ve Doi, R., H., 1981. Free sigma subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase binds to DNA, Mol Gen Genet, 181, 63-8.
- Kuisiene, N., Raugalas, J. ve Chitavichius, D., 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov, Int J Syst Evol Microbiol, 54, 6, 1991-5.
- Kuwajima, G., Asaka, J., Fujiwara, T., Node, K. ve Kondo, E., 1986. Nucleotide sequence of the hag gene encoding flagellin of *Escherichia coli*, J Bacteriol, 168, 3, 1479-83.
- Laemmli, U., K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 342, 648- 654.

- Lithwick, G. ve Margalit, H., 2003. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation, Genome Res, 13, 12, 2665-73.
- Lonetto, M., Gribskov, M. ve Gross, C., A., 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships, J Bacteriol, 174, 12, 3843-9.
- Losick, R., Youngman, P. ve Piggot, P., J., 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*, Annu Rev Genet, 20, 625-69.
- Lovgren, A., Zhang, M., Y., Engstrom, A. ve Landen, R., 1993. Identification of two expressed flagellin genes in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. alesti, J Gen Microbiol, 139, 1, 21-30.
- Ma, J., Campbell, A. ve Karlin, S., 2002. Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures, J Bacteriol, 184, 20, 5733-45.
- Macnab, R., M., 2003. How bacteria assemble flagella, Annu Rev Microbiol, 57, 77-100.
- Madigan, M., Martinko, J. ve Dunlap, P., 2009. Brock Biology of Microorganisms, 12 th. Edition, New York.
- Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S. ve Aizawa, S.I., 2001. Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus, Science, 291, 2411-3.
- Margot, P., Pagni, M. ve Karamata, D., 1999. *Bacillus subtilis* 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, *sigmaD*, Microbiology, 145, 57-65.
- Marquez, L., M., Helmann, J., D., Ferrari, E., Parker, H., M., Ordal, G., W. ve Chamberlin, M.J, 1990. Studies of sigma D-dependent functions in *Bacillus subtilis*, J Bacteriol, 172, 6, 3435-43.
- Martin, D., W., Holloway, B., W. ve Deretic, V., 1993. Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor, J Bacteriol, 175, 4, 1153-64.
- Martin, J., H. ve Savage, D., C., 1988. Cloning, nucleotide sequence, and taxonomic implications of the flagellin gene of *Roseburia cecicola*, J Bacteriol, 170, 6, 2612-7.
- Mathews, D., H., Sabina, J., Zuker, M. ve Turner, D., H., 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure, J Mol Biol, 288, 5, 911-40.
- McDonough, M., W., 1965. Amino Acid Composition of Antigenically Distinct *Salmonella* Flagellar Proteins, J Mol Biol, 12, 342-55.
- Miller, J., H., 1972. in Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY, 352-355.

- Minana-Galbis, D., Pinzon, D., L., Loren, J., G., Manresa, A. ve Oliart-Ros, R., M., 2004. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov., Int J Syst Evol Microbiol, 60, 1600-4.
- Mirel, D., B. ve Chamberlin, M., J., 1989. The *Bacillus subtilis* flagellin gene (hag) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase, J Bacteriol, 171, 6, 3095-101.
- Mirel, D., B., Lauer, P. ve Chamberlin, M., J., 1994. Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a sigma D-dependent operon of *Bacillus subtilis*, J Bacteriol, 176, 15, 4492-500.
- Mogk, A., Hayward, R. ve Schumann, W., 1996. Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes, Gene, 182, 1-2, 33-6.
- Mott, J., E., Galloway, J., L. ve Platt, T., 1985. Maturation of *Escherichia coli* tryptophan operon mRNA: evidence for 3' exonucleolytic processing after rho-dependent termination, Embo J, 4, 7, 1887-91.
- Muller, J., Schiel, S., Ordal, G., W. ve Saxild, H., H., 1997. Functional and genetic characterization of *mcpC*, which encodes a third methyl-accepting chemotaxis protein in *Bacillus subtilis*. Microbiology, 143, 10, 3231-40.
- Nazina, T., N., Tourova, T., P., Poltarau, A., B., Novikova, E., V., Grigoryan, A., A., Ivanova, A., E., Lysenko, A., M., Petrunyaka, V., V., Osipov, G., A., Belyaev, S., S. ve Ivanov, M., V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th, Int J Syst Evol Microbiol, 51, 2, 433-46.
- Nazina, T., N., Lebedeva, E., V., Poltarau, A., B., Tourova, T., P., Grigoryan, A., A., Sokolova, D., Sh., Lysenko, A., M. ve Osipov, G., A., 2004. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov., Int J Syst Evol Microbiol, 54, 6, 2019-24.
- Nazina, T., N., Sokolova, D., Sh., Grigoryan, A., A., Shestakova, N., M., Mikhailova, E., M., Poltarau, A., B., Tourova, T., P., Lysenko, A., M., Osipov, G., A. ve Belyaev, S., S., 2005. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species, Syst Appl Microbiol, 28, 1, 43-53.
- Newlands, J., T., Gaal, T., Meccas, J. ve Gourse, R., L., 1993. Transcription of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter by the heat shock RNA polymerase (E sigma 32) in vitro, J Bacteriol, 175, 3, 661-8.

- Nuijten, P., J., van Asten, F., J., Gastra, W. ve van der Zeijst, B., A., 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes, J Biol Chem, 265, 29, 17798-804.
- Ochman, H., Gerber, A., S. ve Hartl, D., L., 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, Genetics, 120, 3, 621-3.
- Omoto, C., K. ve Kung, C., 1979. The pair of central tubules rotates during ciliary beat in Paramecium, Nature, 279, 532-4.
- Omoto, C., K., 1991. Mechanochemical coupling in cilia, Int Rev Cytol, 131, 255-92.
- Ordal, G., W., Mairquez-Magania, L. ve Chamberlin, M., J., 1993. in *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Editor Sonenshein, A.L., Hoch, J. ve Losick, R., Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 765-784.
- Osada, Y., Saito, R. ve Tomita, M., 1999. Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5' UTR for translation initiation in various prokaryotes, Bioinformatics, 15, 7-8, 578-81.
- Perry, J., J., Staley, J., T. ve Lory, S., 2002. Microbial Life, First Edition, New York.
- Pessi, G., Blumer, C. ve Haas, D., 2001. lacZ fusions report gene expression, don't they? Microbiology, 147, 8, 1993-5.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov, Int J Syst Evol Microbiol, 50, 6, 2109-17.
- Pikuta, E., Cleland, D. ve Tang, J., 2003. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1(T): emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*, Int J Syst Evol Microbiol, 53, 5, 1561-2.
- Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., de Appolonia, F., Gambacorta, A. ve Nicolaus, B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica), Syst Appl Microbiol, 29, 4, 300-7.
- Puigbo, P., Bravo, I., G. ve Garcia-Vallve, S., 2008. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation, Biol Direct, 3, 38.
- Qi, Y. ve Hulett, F., M., 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro, Mol Microbiol, 28, 6, 1187-97.

- Rao, L., Ross, W., Appleman, J., A., Gaal, T., Leirimo, S., Schlax, P., J., Record, M., T. ve Gourse, R., L., 1994. Factor independent activation of *rrnB* P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength, J Mol Biol, 235, 5, 1421-35.
- Ross, W. ve Gourse, R., L., 2009. Analysis of RNA polymerase-promoter complex formation, Methods, 47, 1, 13-24.
- Samatey, F., A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M. ve Namba, K., 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling, Nature, 410, 331-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F. ve Maniatis, T., 1990. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Sandy, Y., M., Chaban, B. ve Jarrell, K., F., 2006. Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications, J Mol Microbiol Biotechnol, 11, 3-5, 167-91.
- Schaffer, C., Franck, W., L., Scheberl, A., Kosma, P., McDermott, T., R. ve Messner, P., 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov., Int J Syst Evol Microbiol, 54, 6, 2361-8.
- Scholz, T., Demharter, W., Hensel, R. ve Kandler, O., 1987. *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage, Syst Appl Microbiol, 9, 91-96.
- Schwartz, E., C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M., R., Cowburn, D., Darst, S. ve Muir, T., W., 2008. A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding, Chem Biol, 15, 1091-103.
- Selinger, D., W., Saxena, R., M., Cheung, K., J., Church, G., M. ve Rosenow, C., 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation, Genome Res, 13, 2, 216-23.
- Sevostyanova, A., Feklistov, A., Barinova, N., Heyduk, E., Bass, I., Klimasauskas, S., Heyduk, T. ve Kulbachinskiy, A., 2007. Specific recognition of the -10 promoter element by the free RNA polymerase sigma subunit, J Biol Chem, 282, 22033-9.
- Sharp, P., M. ve Li, W., H., 1987. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications, Nucleic Acids Res, 15, 3, 1281-95.
- Silhavy, T., J., Berman, M., L. ve Enquist, L., E., 1984. Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Singh, S., M. ve Panda, A., K., 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, J Biosci Bioeng, 99, 4, 303-10.

- Sorensen, M., A., Kurland, C., G. ve Pedersen, S., 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*, J Mol Biol, 207, 2, 365-77.
- Sorenson, M., K., Ray, S., S. ve Darst, S., A., 2004. Crystal structure of the flagellar sigma/anti-sigma complex sigma(28)/FlgM reveals an intact sigma factor in an inactive conformation, Mol Cell, 14, 127-38.
- Sorenson, M., K. ve Darst, S., A., 2006. Disulfide cross-linking indicates that FlgM-bound and free sigma28 adopt similar conformations, Proc Natl Acad Sci USA, 103, 16722-7.
- Southam, G., Kalmokoff, M., L., Jarrell, K., F., Koval, S., F. ve Beveridge, T., J., 1990. Isolation, characterization, and cellular insertion of the flagella from two strains of the archaeobacterium *Methanospirillum hungatei*, J Bacteriol, 172, 6, 3221-8.
- Sung, M., H., Kim, K., Bae, J., W., Rhee, S., K., Jeon, C., O., Kim, K., Kim, J., J., Hong, S., P., Lee, S., G., Yoon, J., H., Park, Y., H. ve Baek, D., H., 2002. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost, Int J Syst Evol Microbiol, 52, 6, 2251-5.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, Mol Biol Evol, 24, 8, 1596-9.
- Thomas, N., A., Bardy, S., L. ve Jarrell, K., F., 2001. The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure, FEMS Microbiol Rev, 25, 2, 147-74.
- Tran, L., S., Szabo, L., Orosz, L., Sik, T. ve Holczinger, A., 1998. Construction of a single-copy integration vector and its use to study gene expression in *Bacillus licheniformis*, Microbiology, 144, 9, 2573-8.
- URL-1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, 11 Mart 2009.
- URL-2: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>, 13 Mart 2009.
- URL-3: <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>, 23 Nisan 2010.
- URL-4: www.softberry.ru/berry.phtml?group=programs&subgroup=gfindb&topic=findterm, 24 Nisan 2010.
- URL-5 : <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species>, 16 Mayıs 2010.
- URL-6: <http://genomes.urv.es/CAIcal/>, 16 Mayıs 2010.
- URL-7: <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>, 13 Mart 2009.
- URL-8: <http://ca.expasy.org/tools/#proteome>, 23 Nisan 2010.
- URL-9: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>, 27 Haziran 2010.

- Wallich, R., Moter, S., E., Simon, M., M., Ebnet, K., Heiberger, A. ve Kramer, M., D., 1990. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene, Infect Immun, 58, 6, 1711-9.
- Wang, Y., Liu, C.L., Storey, J.D., Tibshirani, R.J., Herschlag, D. ve Brown, P.O., 2002. Precision and functional specificity in mRNA decay, Proc Natl Acad Sci USA, 99, 9, 5860-5.
- Wilson, D., R. ve Beveridge, T., J., 1993. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins, Can J Microbiol, 39, 5, 451-72.
- Winstanley, C. ve Morgan, J., A., 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis, Microbiology, 143, 10, 3071-84.
- Wosten, M., M., 1998. Eubacterial sigma-factors, FEMS Microbiol Rev, 22, 3, 127-50.
- Wozniak, C., E. ve Hughes, K., T., 2008. Genetic dissection of the consensus sequence for the class 2 and class 3 flagellar promoters, J Mol Biol, 379, 5, 936-52.
- Yu, H., H., Di Russo, E., G., Rounds, M., A. ve Tan, M., 2006. Mutational analysis of the promoter recognized by *Chlamydia* and *Escherichia coli* sigma(28) RNA polymerase, J Bacteriol, 188, 5524-31.
- Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H., Yokota, Y., Nakajima, K. ve Hoshino, T., 2004. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka, Int J Syst Evol Microbiol, 54, 4, 1239-42.
- Yura, T., Nagai, H. ve Mori, H., 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria, Annu Rev Microbiol, 47, 321-50.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, Nucleic Acids Res, 31, 13, 3406-15.

8. EKLER

EK.1

LOCUS 1032 bp DNA linear BCT 11-MAR-2010
DEFINITION Geobacillus pallidus strain AC6 flagellin, complete sequence.
ACCESSION GU991850
ORGANISM Geobacillus pallidus
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1032)
AUTHORS Sevim,E., Belduz,A.O. and Helmann,J.D.
TITLE Promotor architechure of flagellin gene (hag) expressed at high-level in Geobacillus pallidus AC6 and Isolation and Purification of Geobacillus pallidus AC6 flagellar-specific transcription factor (sigma D)
FEATURES Location/Qualifiers
promoter 92..95
/note="-35 element"
promoter 111..117
/note="-10 element"
mRNA 125..1032
RBS 191..197
gene 205..1032
/gene="hag"
CDS 205..1032
/gene="hag"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="Flagellin"

/translation="MRINHNISALNTYRQLS FNNTQTAKNLEKLS SGYRINRAGDDAAGLAISEKM
RGQIRGLEMAQKNAQDGLISLIQTAE GAL TETHAILQRMRELAVQAANDTNVSADRTAIQDE IDALV
SEINRIAGNTEFNTQNL LDGTFSGKKFHIGANSQSITVTIGTMNANALGTTSLKIASVKVDVTN
ANAAITAI DKAIEQVSTERSKLGAIQNRLEHTINNLGATSENLTAAESRIRDVDMAKEMMEFTKNN
ILTQAAQAMLAQANQVPQGV LQLLR "

ORIGIN

```
1 ggtctgaagc tgtaaaaatc gtaaccaaac aaggatgttc aaccatttta tttttctatt
61 aaaaaagtcc ctttttttct tttcagccta ttaaacatca aaaaaacaat ccgatataaa
121 acatgtaaag agcagcggcg gccgacggcg ctcttttcat accacacgga cgtggaaaaa
181 caacaattca aggaggaaaa aatcatgaga atcaaccaca acatctcggc gtaaactact
241 taccgccaac tttcatttaa caacacacaa actgcaaaaa accttgaaaa actttcttcc
301 ggctaccgca tcaaccgcgc tggcgacgat gcagcaggtc ttgcatctc tgaaaaaatg
361 cgcgccaaa ttcgcggact ggaaatggcg caaaaaaatg ctcaagacgg catttcttta
421 atccaaaactg ctgaaggagc tctaacagaa actcatgcca tccttcaacg tatgctgag
481 ctgctgtgac aagcagcga tgatacaaac gatatctgctg accgtactgc cattcaagat
541 gaaattgatg cgcttgttct tgaaatcaat cgtatagcag gtaatacaga atttaacaca
601 caaaatctat tagacggaac tttttctggt aaaaaattcc acatcggagc caatagtgga
661 caatctatta cagtaacaat tggaaactatg aatgcaaatg cattaggaac aacatcttta
721 aaaattgcta gtgttaaagt ggataccggt acaaatgcaa atgcagctat cacagctatt
781 gataaagcaa ttgaacaagt atcaacagaa cgttctaaac ttggtgcaat tcaaacaccg
841 ttagaacata ctattaacaa ctggggagct acttcagaaa acttgacagc agcggaatcc
901 cgaatccgcg atgtagatat ggcaaaaagaa atgatggaat ttacgaaaaa caatctctt
961 acccaagcag cacaagcaat gcttgctcag gcaaatcaag tacctcaagg ggttcttcaa
1021 ttgcttcgat aa
```

/

EK.2

LOCUS bankit1343642 866 bp DNA linear BCT 16-APR-2010
 DEFINITION Geobacillus pallidus AC6 RNA-Polymerase sigma subunit SigD.
 ACCESSION HM126480
 VERSION
 KEYWORDS
 SOURCE Geobacillus pallidus
 ORGANISM Geobacillus pallidus
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 866)
 AUTHORS Sevim,E., Belduz,A.O. and Helmann,J.D.
 TITLE Promoter Architecture of the Geobacillus pallidus ACG flagellin
 (hag) gene high-level expressed
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 866)
 AUTHORS Sevim,E. and Belduz,A.O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-APR-2010) Biology, Science, Rize 53100, Turkey
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source
 1..866
 /organism="Geobacillus pallidus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="AC6"
 /db_xref="taxon:33936"
 /note="PCR_primers=fwd_name: SigDF2, rev_name: SigDR2"
 RBS
 75..81
 gene
 90..860
 /gene="SigD"
 CDS
 90..860
 /gene="SigD"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="SigmaD"

```

/translation= "MVQSMTLNDEVYWDKWFRRHDQDAGNMLVKKYMP LVRYHVSRI SVG
LPKNVDKDDLISFGLMGLYDALEKFDPTRDLKFDTYASFRIRGAILDGLRKEDWLP RSFRE
KAKKVEAAIERLEQKYHRNVTPNEVAEELGMTPEEVVHV NENFFANVLSIDEQLHDQEEG
EQMNIVLKDDKTLTPEEHL LKEELFEHLTKLISQLNDKEQLVLSLFYKE
ELTLTEIGNVLNLSTSRISQIHSKALYKLGTLVKLLS "
  
```

ORIGIN

```

1 aattcattca ttttgacgat tgcaccgtc aatcttgag tgaagcaaat atagccggag
61 attgacattt tagaaggagg aaaaaggcaa tggccaatc gatgacactg aatgatgaaa
121 ggggtgactg ggacaagtgg tttcgtcacc gtgatcaaga tgcgggcaac atgctcgtca
181 aaaaatataat gccgcttgtc cgctatcatg tcagtcgtat ttcagtgggt cttccaaaaa
241 atgctgataa agatgatatta ataagttttg gattgatggg attatatgat gcactggaaa
301 aatttgacc tacacgggat ttaaaattcg atacgtatgc atccttccgc atacgcggag
361 ccattcttga cggactaagg aaagaagatt ggcttccaag aagttttcgg gaaaaagcaa
421 aaaaagtgga agcagccatt gagcggttgg agcaaaaata tcatcgcaat gtgacgccta
481 atgaagttgc agaagaattg ggtatgacac ccgaagaagt cgttcatgct gtcaatgaaa
541 acttttttgc caatgtcttg tcaattgatg aacaattgca tgaccaagaa gaaggggaaac
601 agatgaacat tgtccttaag gatgataaaa cattaactcc ggaagagcat ctgttaaaag
661 aggaattatt tgagcattta acaaaattga tctcacaatt aaacgataag gagcagctcg
721 tattaagctt gttttataaa gaagagctga cattaacaga gataggaaac gtgctgaatt
781 gtcaccattc gagaatttcg caaattcatt cgaagcatt atataaatta aaaggaacgc
841 tcgtaagct tttatcttaa aaagaa
  
```

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Zonguldak'da doğdu. İlk okulu Zonguldak Bahçeli Evler İlköğretim Okulunda, orta öğretimini Rize Mehmet Akif Ersoy Ortaokulu ve Rize Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesini kazandı. 2002 yılında aynı fakülteden Biyolog ünvanı ile mezun oldu, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans programına başladı. 2005 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'nda "Rize İli ve Çevresindeki İçme Sularından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Aktarılabılır Direnç ve TEM-Tipi β -Laktamaz Genlerinin Araştırılması" tezi ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'nda doktora eğitimine başladı. 01.09.2007–31.08.2008 tarihleri arasında Avrupa Birliği ERASMUS Öğrenci Değişimi Programı kapsamında Belçika'nın Ghent Üniversitesi, Faculty of Bioscience Engineering, Department of Biochemical and Microbial Technology, Laboratory of Industrial Biotechnology and Biocatalysis'de bulundu. 10.09.2009–10.09.2010 tarihleri arasında TÜBİTAK-BAYG (Bilim Adamı Yetistirme Grubu) tarafından doktora eğitiminin tez döneminde olan öğrencilere verilen 2214 kodlu Yurt Dışı Araştırma Bursunu kazanarak bu burs kapsamında 12 ay süre ile Cornell University, Department of Microbiology, New York-USA'de bulundu. Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde 31.12.2004 tarihinden beri araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.