

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***THERMUS SCOTODUCTUS* K6' DAN İZOLE EDİLEN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK,
ÇOK KOPYALI BİR PLAZMİNİN (pHIG22) FONKSİYONEL ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Biyolog Halil İbrahim GÜLER

**KASIM 2015
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

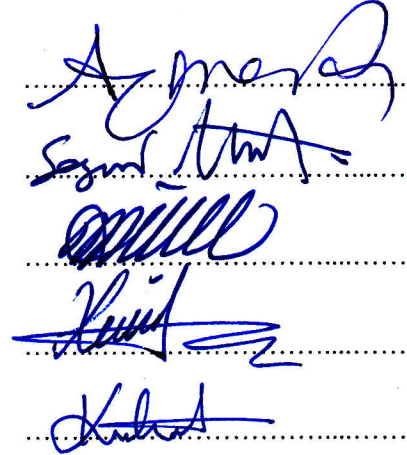
**Biyoloji Anabilim Dalında
Halil İbrahim GÜLER Tarafından Hazırlanan**

***THERMUS SCOTODUCTUS* K6' DAN İZOLE EDİLEN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK, ÇOK
KOPYALI BİR PLAZMİTİN (pHIG22) FONKSİYONEL ANALİZİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 03 /11/2015 gün ve 1625 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Üye : Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
Üye : Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“*Thermus scotoductus* K6’dan izole edilen yeni, kriptik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) fonksiyonel analizi” adlı bu çalışma TÜBİTAK 112T277 numaralı araştırma projesinden sağlanan destekle Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında ‘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 Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, istatistiksel hesaplamalarda yol gösterici olan Yrd. Doç. Dr. Mustafa Çağatay KORKMAZ’a, *Thermus scotoductus* K6’nın temininde yardımlarını esirgemeyen Murat KAÇAĞAN’a, laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Esmâ CEYLAN’a çok teşekkür ederim.

Tezimin yazılma aşamasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Yrd. Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ’a, Yrd. Doç. Dr. Onur TOSUN’a ve Yrd. Doç. Dr. Mutlu GÜLTEPE’ye teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan TÜBİTAK (112T277)’a çok teşekkür ederim.

Destek ve hoşgörülerini esirgemeyen Artvin Çoruh Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölüm Başkanı Doç. Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç verip yanımda olan değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Halil İbrahim GÜLER
Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Thermus scoto ductus* K6’ dan izole edilen yeni, kriptik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) fonksiyonel analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 23/10/2015

Halil İbrahim GÜLER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ	XIV
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojik Açıdan Önemi	2
1.3. <i>Thermus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
1.4.. Plazmitler.....	4
1.4.1 Plazmitlerin Temel Özellikleri	4
1.4.2. Plazmit Tipleri ve Sınıflandırılması	7
1.4.3. Plazmitlerde Replikasyon Mekanizmaları.....	9
1.4.3.1. Teta Tip Replikasyon	9
1.4.3.2. Yuvarlanan Çember Replikasyonu.....	11
1.4.3.3. Zincir Uzaklaştırma Tip Replikasyon	12
1.4.4. Plazmitlerde Kopya Sayısı ve Kontrolü	13
1.4.4.1. Antisense RNA ile Kontrol	14
1.4.4.2. İteronlarla Kontrol.....	15
1.4.5. Plazmit Uyuşmazlığı ve Konak Seçiciliği.....	15
1.4.6. Plazmitlerin Biyoteknolojide Kullanımı	17
1.4.6.1. Vektör Olarak Plazmitler.....	17
1.4.6.2. Vektörlerin Gen Terapisinde Kullanımı	18
1.4.7. <i>Thermus</i> Cinsi Plazmitler	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	23

2.1.2.	Kullanılan Mikroorganizmalar	24
2.1.3.	Kullanılan Vektörler	24
2.1.3.1.	pGEM [®] -T Easy Vektörü	24
2.1.3.2.	pUC18 Vektörü	25
2.1.3.3.	pET28a+ Vektörü	26
2.1.3.4.	pMK18 Vektörü	26
2.1.3.5.	pMKE2 Vektörü	27
2.1.4.	Kullanılan Besiyerleri.....	28
2.1.4.1.	Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar Besiyeri.....	28
2.1.4.2	TM (<i>Thermus</i> Medium) Sıvı-Agar Besiyeri.....	29
2.1.4.3.	Modifiye Edilmiş TM Besiyeri	30
2.1.5.	Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	31
2.2.	Metot	31
2.2.1	Biyoinformatik Analizler	31
2.2.2	pHIG22'nin Minimal Replikonunun Belirlenmesi.....	32
2.2.2.1	pHIG22 Parçalarının HTK Kaseti ile Birleştirilmesi ve <i>Thermus thermophilus</i> HB27'ye Transformasyon Çalışmaları.....	32
2.2.2.1.1.	<i>Thermus thermophilus</i> HB27'ye Transformasyon	36
2.2.2.2.	pUC18/HTK Tabanlı Hibrit Plazmitlerinin Oluşturulması	37
2.2.2.2.1.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon	38
2.2.3.	<i>E.coli</i> 'de Replikasyonun Araştırılması.....	42
2.2.4.	<i>Thermus scotoductus</i> K6 İçin Plazmit Curing Çalışması	44
2.2.5.	pHIG22 Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi	46
2.2.5.1.	Total RNA İzolasyonu.....	47
2.2.5.2.	cDNA Sentezi.....	48
2.2.5.3.	Oluşturulan cDNA'ların PCR ile Çoğaltılması	51
2.2.6.	pHIG22 İçin RNA Analizleri, Transkriptlerin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi.....	53
2.2.6.1.	RACE Tekniği ile 5' Uç Belirleme	53
2.2.6.2.	LACE Tekniği ile 3' Uç Belirleme	57
2.2.6.3.	pHIG22 Transkriptlerinin Düzenleyici Bölgelerinin Analizi.....	61
2.2.7.	pHIG22 Replikasyon Orijini ve Modunun Belirlenmesi	63
2.2.7.1.	TEM Analizi ile pHIG22 Replikasyon Orijininin ve Replikasyon Modunun Belirlenmesi	63

2.2.7.1.1.	TEM (Transmission Electron Microscopy) Analizi İçin DNA Numunelerinin Hazırlanması	65
2.2.8.	pHIG22'nin Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi.....	66
2.2.8.1.	pHIG22 Varyantlarından pMK18 Plazmiti ile Hibrit Oluşturulması	66
2.2.8.1.1.	Çözünebilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu	68
2.2.8.1.2.	Protein Konsantrasyonunun Tayini	69
2.2.8.1.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	69
2.2.8.2.	pHTag Klonları ile pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi	70
2.2.8.2.1.	Co-Affinite Kromatografi Yöntemi ile Saflaştırma	73
2.2.8.3.	pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi İçin Karboksilesteraz Geninin Kullanılması	73
2.2.8.3.1.	Jel Assay Yöntemi (zimogram) ile Karboksilesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	79
2.2.8.3.2.	Tribütirin Petri Assay ile Karboksi Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	79
2.2.8.4.	pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi İçin HisTag Ekli Karboksilesteraz Geninin Kullanılması	80
2.2.8.4.1.	Proteinlerin Nitroselülöz Membrana Aktarılması ve Western Blot Analizi	82
2.2.9.	QPCR Tekniği ile pHIG22 Kopya Sayısının Belirlenmesi	83
2.2.9.1.	Real-Time QPCR İçin Standart Grafik Oluşturulması.....	85
2.2.9.2.	pHIG22 Kopya Sayısının Hesaplanması	86
2.2.10.	<i>Thermus</i> Cinsi Klonlama ve Ekspresyon Vektörlerinin Geliştirilmesi	87
2.2.10.1.	Klonlama Vektörünün Tasarlanması.....	87
2.2.10.2.	Ekspresyon Vektörünün Tasarlanması	88
3.	BULGULAR	90
3.1.	pHIG22'nin Biyoinformatik Analizi	90
3.2.	pHIG22'nin Minimal Replikonunun Belirlenmesi.....	91
3.2.1.	pHIG22 Parçalarının HTK Kaseti ile Birleştirilmesi ve <i>Thermus thermophilus</i> HB27'ye Transformasyon Çalışmaları.....	91
3.2.2.	pUCHTK Tabanlı Hibrit Plazmitlerin Oluşturulması	91
3.3.	<i>E.coli</i> 'de Replikasyonun Araştırılması.....	93
3.4.	<i>Thermus scotoductus</i> K6'da Plazmit Curing.....	93
3.5.	pHIG22 Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi	95
3.6.	pHIG22 İçin RNA analizleri, Transkriptlerin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi.....	97
3.6.1.	Transkript 1 ve 2'nin 5' Ucunun Belirlenmesi (RACE Tekniği).....	97

3.6.2.	Transkript 1 ve 2'nin 3' Ucunun Belirlenmesi (LACE Tekniği)	98
3.6.3.	pHIG22 Transkriptlerinin Dzenleyici Blgelerinin Analizi.....	99
3.7.	pHIG22 Replikasyon Orijini ve Modunun Belirlenmesi	102
3.8.	pHIG22'nin Transkriptlerinin Proteine Dnüşüp Dnüşmediğinin Belirlenmesi	107
3.8.1.	pHIG Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi.....	109
3.8.2.	pHTag Klonlarının Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi	111
3.8.3.	pMKHIG(1,2)Est Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi.....	112
3.8.4.	pMKHIG(1,2)Est-His Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi.....	118
3.9.	QPCR Tekniği ile pHIG22 Kopya Sayısının Belirlenmesi	121
3.10.	pUCHIGK Klonlama Vektörünün Tasarlanması	126
3.11.	pHIGKE2 Ekspresyon Vektörünün Tasarlanması	127
4.	TARTIŞMA.....	129
5.	SONUÇLAR	150
6.	ÖNERİLER	152
7.	KAYNAKLAR.....	153
8.	EKLER	163
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

THERMUS SCOTODUCTUS K6' DAN İZOLE EDİLEN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK, ÇOK KOPYALI BİR PLAZMİNİN (pHIG22) FONKSİYONEL ANALİZİ

Halil İbrahim GÜLER

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2015, 162 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Bu çalışmada, *Thermus scotoductus* K6 bakterisinden izole edilen ve tanımlanan, 2222 bp uzunluğunda, yeni, kriptik, küçük, çok kopyalı, çift zincir, % 62,78 GC içerikli yeni bir plazmit (pHIG22) karakterize edildi ve fonksiyonel analizi yapıldı.

pHIG22 plazmitinin 387. bazı ile 614. bazı arasında kalan 2012 bp'lik bölgenin replikasyondan sorumlu minimal replikonu olduğu belirlendi. TEM analizleri ile plazmitin "Teta" tip replikasyon moduna sahip olduğu, replikasyon orijininin 46. baz ile 239. baz (*Bam*HI kesim bölgesi '0' noktası kabul edildiğinde ve ters oryantasyonda) arasındaki bölge olduğu tespit edildi. pHIG22'nin her iki zincirinden transkript kodlandığı belirlendi. RACE ve LACE analizleri sonucunda, Transkript 1'in 1622 bp büyüklükte (329-1950), Transkript 2'inde 1712 bp büyüklükte (2103-329) olduğu tespit edildi. Transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda; SDS-PAGE, Zimogram, 2D jel analizi ve MALDI-TOF/TOF analizleri sonucunda transkriptlerin herhangi bir protein kodlamadığı sonucuna varıldı. Transkriptlerin düzenleyici bölgeleri incelenerek, her iki zincirde promotör diziler olduğu belirlendi. *E.coli* suşlarında replike olmadığı belirlenen pHIG22'nin *T. scotoductus* K6 bakterisindeki kopya sayısı Real-time qPCR tekniği ile 148 olarak hesaplandı. pHIG22 minimal replikonu ve farklı DNA parçaları kullanılarak, *E.coli-Thermus* suşlarında replike olabilen pUCHIGK shuttle klonlama vektörü ve pHIGKE2 shuttle ekspresyon vektörü dizayn edildi.

Anahtar Kelimeler: *T. scotoductus* K6, plazmit pHIG22, kriptik plazmit, shuttle vektör

PhD. Thesis

SUMMARY

FUNCTIONAL ANALYSIS OF A NOVEL, CRYPTIC, SMALL AND MULTICOPY
PLASMID (pHIG22) FROM *THERMUS SCOTODUCTUS* K6

Halil İbrahim GÜLER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2015, 162 Pages, 2 Appendix Pages

In this study, a small, novel, cryptic, multicopy and double strand plasmid (pHIG22) which has 2222 bp in long and with a total G + C content of 62,78 from *Thermus scotoductus* K6 was characterized and functionally analyzed. A 2012 bp region among 387 and 614 bp of pHIG22 was determined as minimal replicon of plasmid.

Replication mode of pHIG22 was identified as ‘Teta’ and rep origin of it was determined as a region among 46 and 239 (*Bam*HI recognition site is accept as ‘0’ point) bp by TEM analysis. Two transcripts were detected from the both strands of pHIG22. According to RACE and LACE analysis results, Transcript 1 (329-1950) and Transcript 2 (2103-329) were determined 1622 bp in long and 1712 bp in long, respectively. Analysis of SDS-PAGE, Zimogram, 2D gel analysis and MALDI-TOF/TOF analysis show that transcripts do not encode any proteins, and these studies were performed to understand that transcripts whether encode or not encode proteins. The regulator regions of transcripts were investigated and promotor sequences were detected on both strands. The copy number of pHIG22, which has no ability to replicate in *E.coli* strains, in *T. scotoductus* K6 was calculated as 148 by using Real-time qPCR technique. pUCHIGK shuttle cloning vector and pHIGKE2 shuttle expression vector, which can replicate in *E.coli-Thermus* strains, were constructed by using pHIG22 minimal replicon and various DNA fragments.

Key Words: *T. scotoductus* K6, plasmid pHIG22, cryptic plasmid, shuttle vector

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Tipik bir plazmit DNA'sının bakteri hücresi içerisinde görünümü 4
Şekil 2.	pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü 25
Şekil 3.	pUC18 vektörünün haritası 25
Şekil 4.	pET28a+ vektörünün haritası 26
Şekil 5.	pMK18 vektörünün haritası..... 27
Şekil 6.	pMKE2 vektörünün haritası 28
Şekil 7.	pHIG22 fragmentlerinin amplifiye edilmesinde kullanılan primerlerin pHIG22 üzerinde eşleştiği bölgeleri gösterir plazmit haritası..... 34
Şekil 8.	HTK fragmenti ile farklı bölgelerden çoğaltılmış pHIG22 fragmentlerinin nasıl birleştirildiğini gösteren resim 35
Şekil 9.	pUCHTK plazmitinin oluşturulmasının şematize edilmesi..... 38
Şekil 10.	pUCHTK/pHIG22 hibritlerinin (pUCHTK1-11 varyantları) oluşturulmasının şematize edilmesi..... 41
Şekil 11.	pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeleri gösteren resim..... 42
Şekil 12.	<i>E.coli</i> 'de replikasyonun incelenmesini şematize eden resim 43
Şekil 13.	Dizayn edilen primerlerin pHIG22 üzerinde bağlandığı bölgeleri gösteren resim..... 49
Şekil 14.	cDNA oluşturmada kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeleri gösteren harita 51
Şekil 15.	5' RACE yönteminin şematik görünümü 53
Şekil 16.	LACE (ligation based amplification of cDNA ends) tekniğinin şematik gösterimi 57
Şekil 17.	pHIG22 transkriptlerinin düzenleyici bölgelerinin harita üzerinde gösterimi . 62
Şekil 18.	pUCHTK-T1 ve pUCHTK-T2'nin oluşturulmasını şematize eden resim 63
Şekil 19.	Kullanılan restriksiyon endonukleazların pHIG-5 haritası üzerinde gösterimi 65
Şekil 20.	pHIG22/pMK18 hibrit plazmitlerinin oluşturulmasını gösteren resim 68
Şekil 21.	pHTag plazmitlerinin oluşturulma ve klonlama yöntemini anlatan şekil 72
Şekil 22.	pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 plazmitlerinin oluşturulmasını şematize eden resim..... 75
Şekil 23.	pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 plazmitlerinin haritası 76

Şekil 24.	Karboksilesteraz genlerinin pMKHIGNot(1,2) plazmitlerine klonlanmasını şematize eden resim	78
Şekil 25.	HisTag'lı karboksilesteraz genlerinin pMKHIGNot(1,2) plazmitlerine klonlanmasını şematize eden resim	81
Şekil 26.	Klonlama vektörünün dizayn aşamalarının şematize edilmesi	87
Şekil 27.	Ekspresyon vektörünün dizayn aşamalarının şematize edilmesi.....	89
Şekil 28.	Biyoinformatik analizler sonucu elde edilen verilerin pHIG22 haritası üzerinde gösterimi	90
Şekil 29.	pUCHTK-5 hibritinin haritası	92
Şekil 30.	K6 suşu için plazmit curing denemeleri	94
Şekil 31.	cDNA'ların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen fragmentlerin gösterimi	95
Şekil 32.	Clockwise zincirden üretilen cDNA'larının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri	96
Şekil 33.	Anticlockwise zincirden üretilen cDNA'larının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri	97
Şekil 34.	Transkriptlerin başlama ve bitiş noktalarını gösteren harita	99
Şekil 35.	Transkript-1 ve 2 düzenleyici bölgeleri için yapılan Promotör analiz sonuçları	99
Şekil 36.	pTR1-HTK ve pTR2-HTK'yi barındıran JM101 suşlarının görüntüsü	100
Şekil 37.	pTR1-HTK ve pTR2-HTK klonlarını taşıyan hücrelerin çoğalma eğrileri grafiği.....	101
Şekil 38.	pHIG22'nin <i>NcoI</i> ile kesimi sonucunun TEM görüntüleri.....	103
Şekil 39.	pHIG22'nin <i>BamHI</i> ile kesimi sonucunun TEM görüntüleri.....	103
Şekil 40.	pHIG22 plazmitinin değişik formlarının TEM görüntüleri.....	104
Şekil 41.	pHIG22 replikasyon <i>ori</i> bölgesinin harita üzerinde gösterimi	105
Şekil 42.	pHIG-5 hibritinin haritası	105
Şekil 43.	pHIG-5 plazmitinin <i>SacII</i> ile kesim sonrası TEM görüntüsü.....	106
Şekil 44.	pHIG-5 plazmitinin <i>NcoI</i> ile kesim sonucu TEM görüntüsü	107
Şekil 45.	pHIG-3 hibritinin haritası	109
Şekil 46.	%15'lik SDS-PAGE'de hibrit plazmitleri içeren <i>T. thermophilus</i> HB27 suşlarının hücre içi protein profillerinin karşılaştırılması.....	110
Şekil 47.	pHTag-(1,2,3,4,5,6) plazmitlerinin haritası.....	112
Şekil 48.	pMKHIGEst1 ve pMKHIGEst2 klonlarının haritası.....	113
Şekil 49.	pMKHIG-Est-1 ila 12 klonları, negatif kontrol ve pozitif kontrol hücre proteinlerinin karboksilesteraz aktivitesi tayini için yapılan zimogramın görüntüsü.....	114
Şekil 50.	Elde edilen 12 klon ve negatif kontrolün, SDS-PAGE görüntüsü	115
Şekil 51.	Petri assay çalışması ile esteraz aktivitesinin belirlenmesi	116

Şekil 52.	12 farklı klon ve kontrol hücrenin Spot analizi	117
Şekil 53.	MALDI-TOF/TOF analizi sonuçlarına göre belirlenen proteinler.....	118
Şekil 54.	Elde edilen 12 klon, negatif kontrolün ve pozitif kontrolün, Western Blot görüntüsü	120
Şekil 55.	Elde edilen 12 klon, negatif kontrolün ve pozitif kontrolün SDS-PAGE görüntüsü	121
Şekil 56.	<i>rpoB</i> geni için oluşturulan Standart Grafik	122
Şekil 57.	pHIG22 hedef bölgesi için oluşturulan Standart Grafik.....	123
Şekil 58.	Standart Grafik oluşturmada yapılan Melting Curve analizi.....	124
Şekil 59.	pHIG22 ve <i>rpoB</i> geni için elde edilen C _T değerleri	125
Şekil 60.	pUCHIGK vektörünün haritası.....	126
Şekil 61.	pHIGKE2 vektörünün haritası.....	128

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimlerin anlamı	6
Tablo 2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve özellikleri	24
Tablo 3. Her bir pHIG22 fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri	33
Tablo 4. 5 farklı pHIG22 parçasının çoğaltılmasında kullanılan PCR programı	34
Tablo 5. pHIG22 parçaları ve HTK için ligasyon reaksiyonu.....	36
Tablo 6. pUC18 ve HTK için ligasyon reaksiyonu	38
Tablo 7. 11 farklı pHIG22 fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan primerler	40
Tablo 8. pET28a+ plazmitinden replikasyon bölgesinin silinmesi için dizayn edilen primerler	44
Tablo 9. K6 suşu için yapılan curing denemelerinde kullanılan ajanlar ve son konsantrasyonları.....	46
Tablo 10. cDNA sentezinde kullanılan primerler ve özellikleri.....	49
Tablo 11. cDNA sentezi bileşenleri-1.....	50
Tablo 12. cDNA sentezi bileşenleri-2.....	50
Tablo 13. İlk zincir cDNA'ların PCR ile çoğaltılması için dizayn edilen spesifik primerler	51
Tablo 14. cDNA'ların PCR ile çoğaltılması sonucu beklenen fragment büyüklükleri	52
Tablo 15. RACE tekniği ile transkriptlerin 5' uçlarının belirlenmesinde kullanılan primerler ve özellikleri	54
Tablo 16. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-1	54
Tablo 17. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-2	55
Tablo 18. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-3	56
Tablo 19. RACE tekniğinde cDNA'dan PCR için protokol.....	56
Tablo 20. LACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri.....	58
Tablo 21. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-1	58
Tablo 22. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-2.....	59
Tablo 23. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-3.....	59
Tablo 24. LACE tekniğinde kullanılan PCR bileşenleri	60
Tablo 25. LACE tekniğinde kullanılan PCR protokolü.....	60
Tablo 26. pHIG22 transkriptlerinin upstream bölgelerinin ve HTK geninin birleştirilmesi için kullanılan primerler	62

Tablo 27.	HisTag+STOP kodu ilaveli primerler	71
Tablo 28.	pGEM-T Easy için ligasyon reaksiyonu	71
Tablo 29.	Co-Affinite Kromotografisinde kullanılan tamponlar.....	73
Tablo 30.	pHIG22 plazmiti üzerinde <i>NotI</i> tanıma bölgesi oluşturulmasında kullanılan primerler	75
Tablo 31.	<i>NotI</i> tanıma bölgesi oluşturulan pHIG22'nin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler	76
Tablo 32.	Karboksilesteraz geninin PCR ile çoğaltılması için, <i>NotI</i> kesim bölgesi ekli olarak dizayn edilen primerler	77
Tablo 33.	Her iki oryantasyonda elde edilen klonların adlandırılması.....	78
Tablo 34.	Karboksilesteraz geninin 3' ucuna 8X-His dizisi eklenmesi için dizayn edilen primer.....	80
Tablo 35.	Her iki oryantasyonda elde edilen HisTag ilaveli klonların adlandırılması.....	81
Tablo 36.	QPCR çalışmasında kullanılan primerler ve özellikleri	83
Tablo 37.	Roche 1.5 LightCycler qPCR çalışma şartları.....	84
Tablo 38.	Standart Grafik oluşturulması için kullanılan kalıp DNA'ların Özellikleri	86
Tablo 39.	Klonlama ve ekspresyon vektörlerinin dizayn edilmesinde kullanılan primerler	88
Tablo 40.	Çoğalma grafiği için yapılan t-testi sonuçları	101
Tablo 41.	Absolute kantifikasyon ile hesaplanan pHIG22 plazmitinin kopya sayısı.....	125
Tablo 42.	<i>Thermus</i> cinsinde tanımlanan plazmitler ve konakları.....	146

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

a.a	: Amino asit
Amp	: Amfisilin
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
cDNA	: Complementer Deoksiribo Nükleik Asit
CoCl ₂	: Kobalt klorür
C _t	: Threshold Cycle
Da	: Dalton
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
ddATP	: Dideoksiadenintrifosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
ddTTP	: Dideoksitimidintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH ₂ O	: Distile su
dk.	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
DTT	: Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
HTK kaseti	: Highly thermostable kanamycin kaseti
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
<i>Inc</i>	: Incompatibility
kan	: Kanamisin
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz
LB	: Luria Bertani Broth

lt	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mRNA	: Elçi 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	: Nükleotit trifosfat
OD	: Optikal Yoğunluk
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rep ori	: Replikasyon Orijini
<i>rpoB</i>	: DNA-directed RNA polymerase, beta subunit
rRNA	: ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
sn.	: Saniye
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEM	: Transmission Electron Microscopy
TM	: <i>Thermus</i> Medium
Tm	: Erime Sıcaklığı
U	: Ünite

UTR	: Untranslated Region
UV	: Ultra Violet
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -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. Giriş

Plazmitler, konaklarında kendilerine has kopya sayıları olan ekstrakromozomal DNA elementleridir. Kendi başına replike olabilen nükleik asit molekülleri anlamına gelen replikon teriminin de ortaya çıkmasını sağlayan plazmitler, canlı dünyasında 3 ana domaindeki (arkea, bakteriya, ökarya) türlerde bulunmuştur (Woese vd., 1990). Plazmitler bir organizmadaki toplam genetik materyalin önemli bir kısmına sahip olabilirler, öyle ki arkeaların bazı üyelerinde hücrenin genetik materyalinin % 25'den daha fazlasını taşıyor olabilirler (Zillig vd., 1994; Holmes vd., 1995). Plazmitler genetik materyale entegre olabilirler. Üzerlerindeki genetik bilgileri rekombinasyon ve transpozisyonla başka bir hücreye aktarabilirler. Plazmitler, çeşitli mekanizmalarla yeni konaklara aktarılabilirdiğinden, popülasyonlar arasında paylaşılan ekstrakromozomal DNA havuzu olarak da düşünülebilirler.

Plazmitler, kendi başına yaşayan varlıklar olarak kabul edilirler. Solucanların toprakta yuvalandığı, balıkların denizde yüzdüğü gibi plazmitlerde kendi konak hücrelerinde çoğalırlar. Bir plazmit için konağı onun yaşayabildiği ortamdır, bu yüzden bir hücre gibi ifade edilemezler sadece hücrenin bir parçası olabilirler. Bazı yönlerden, plazmitler ulaştıkları hücreden hücreye ölüm taşıma yeteneklerini kaybetmiş virüslere benzerler. Plazmitler, replikasyon enzimlerini, enerji ve hammadde ihtiyaçlarını karşılamak için konak hücreye gerek duyduklarından dolayı bazı viral özellikleri barındırırlar. Virüslerin aksine, plazmitler birçok proteini sentezleyemedikleri için, yaşadıkları hücreyi terk etmezler ve ona zarar vermekten kaçınırlar (Clarck, 2010).

Plazmitlerin taşıdığı genetik bilginin zenginliği dolayısıyla, bunların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri ve bu elementlerin doğal klonlama vektörü olarak kullanılabilme potansiyeli vardır. Plazmitler üzerindeki araştırmalar, hem temel bilimlere sebebiyle hem de klinik, biyoteknolojik ve çevresel sebeplerle her zaman ilgi odağı olmuştur (del Solar vd., 1998).

Plazmitler üzerine yapılan araştırmaların artmasına 3 ana faktör katkı sağlamıştır:

- 1) Bu elementlerin genetik organizasyonunun oldukça basit olması,
- 2) Kolaylıkla izole edilebilir ve *in vitro* da manipüle edilebilir olmaları,

3) Vazgeçilebilir elementler olduklarından, manipülasyonlarının konaklar üzerinde aksi sonuçlar vermemesi.

Plazmitleri en iyi tanımlayan özellik bağımsız, kendi kontrollerinde replike olabilmeleridir. Plazmit replikasyonunun analizi ve kontrolü, moleküler biyolojide yeni mekanizmaların bulunmasını sağlamıştır. Buna en iyi örnek antisens RNA'nın varlığıdır ve bu da bize DNA replikasyonunun mekanizmasını, makromoleküler etkileşimleri ve gen ekspresyonunun kontrolünü anlamamızı sağlamıştır. Bazı plazmitlerin farklı canlı organizmalar arasında genetik bariyer olarak görev yapması; replikasyonu kontrol eden genel mekanizmalar, DNA replikasyonunu içine alan konak mekanizması ve plazmit replikasyon bileşenleri arasındaki iletişim hakkında cevaplanması gereken sorular ortaya çıkarmıştır. Bu plazmit-konak iletişimi, araştırmacıların ilgisini çevresel ve evrimsel alanlara çekmiştir. Plazmit-konak ilişkileri alanındaki çalışmalar klinik mikrobiyolojide ve biyoteknolojide de birçok çalışma alanına sahiptir. Plazmitler kendi başlarına replike olmalarına rağmen, çoğunlukla konak replikasyon mekanizmalarını kullanırlar ve bu yüzden plazmit replikasyon çalışmaları, kromozom replikasyon çalışmalarını da kapsayan mekanizmaların aydınlatılmasını da kolaylaştırır (del Solar vd., 1998).

1.2. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojik Açıdan Önemi

Son yılların en fazla ilgi duyulan araştırma konularından biri termofilik bakterilerdir (Williams, 1995). Termofilik organizmalar, mikrobiyologlar ve biyokimyacılar için oldukça cezbedici bir konudur, hem endüstriyel uygulama alanları için hem de temel bilimlerin gelişmesi için pek çok avantaj sağladığından dolayı son zamanlarda, bu bakteriler üzerine araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (Akhmaloka vd., 2006).

Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkalik şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003). Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknoloji açısından oldukça önem taşımaktadır. Biyoteknolojide termofilik organizmalar, bazı yakıt ve kimyasalların üretilmesinde ve genetik manipülasyonların yapılabilmesinde kullanılmasına rağmen, biyoteknoloji açısından en önemli özellikleri biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen termofilik enzimleri üretmeleridir.

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001).

Termofilik enzimler, belirtilen bu avantajlarından dolayı birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimyasal endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Termal kararlı enzimler, birçok biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı ekolojik alanlardan termofilik mikroorganizmaların fazla miktarda izolasyonu ve bu mikroorganizmalardan faydalı enzimlerin ekstraksiyonu ile biyoteknoloji alanında daha büyük adımlar atılabilir (Kohilu vd., 2001). Bu enzimler ayrıca protein mühendisliğinde termoaktivite ve termostabilitenin tam olarak anlaşılabilmesi için model enzimler olarak kullanılmaktadır (Kumar vd., 2001).

1.3. *Thermus* Cinsinin Genel Özellikleri

Brock ve Freeze'nin 1996 yılında, *Thermus aquaticus*'u keşfetmelerinden beri, termofilik araştırmalarının kayıtlarında hâkim olan bakteriler, *Thermus* cinsine ait bakterilerdir. Sıcak anlamına gelen "thermos" kelimesinden türetilerek isimlendirilen *Thermus* cinsi, şu an sistematığı yapılmış 10 türü içermektedir. *Thermus* cinsinin üyeleri, hem biyokimyasal hem de metabolik olarak oldukça benzerdirler.

Bu cinsin üyeleri gram negatif (-), heterotrofik, hareketsiz, çubuk şeklinde, çoğu zorunlu aerobik, pH 6,0-10,5 aralığında, optimum nötr pH'da, ve 55-80 °C aralığında, optimum 70 °C'de gelişen, düşük konsantrasyonlu organik materyallerin bulunduğu

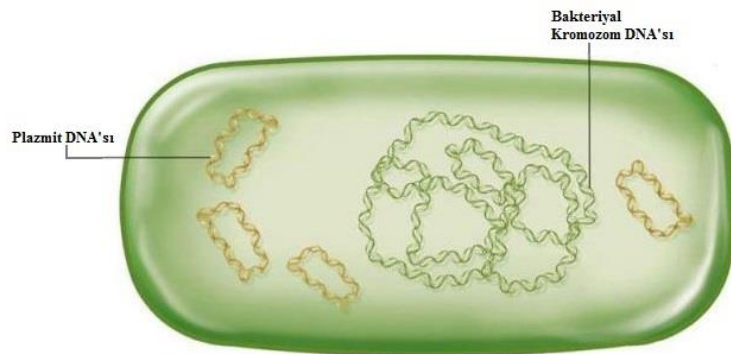
ortamlarda büyüeyebilen bakterilerdir (Williams ve Sharp, 1995). *Thermus* cinsi doğada ve insan yapımı termal çevrelerde en fazla yayılış gösteren termofilik bakterilerdendir (Cava vd., 2009).

Thermus cinsi bakteriler doğal kompetan hücrelerdir. *In vivo* protein mühendisliği açısından *Thermus* cinsi, konak vektör sistemlerin geliştirilmesi, diğer termofilik ve hipertermofilik bakterilerden elde edilen genlerin klonlanması ve ekspresyonu için büyük bir avantaj sağlamaktadır (Hoseki vd.,1999).

1.4. Plazmitler

1.4.1. Plazmitlerin Temel Özellikleri

Plazmitler, kendi kendini eşleyebilen, kromozomdan ayrı bir DNA parçası olarak tanımlandığı gibi kendi başına yaşayan yaratıklar olarak da kabul edilirler. Bir plazmit için konağı onun yaşayabildiği ortamdır, bu yüzden bir hücre gibi ifade edilemezler sadece hücrenin bir parçası olabilirler. Plazmitler bağımsız replike olabilen DNA molekülleridir ve nadiren de olsa hücrede RNA şeklinde olabilirler. Bazı yönlerden, plazmitler ulaştıkları hücreden hücreye ölüm taşıma yeteneklerini kaybetmiş virüslere benzerler. Plazmitler, replikasyon enzimlerini, enerji ve hammadde ihtiyaçlarını karşılamak için konak hücreye gerek duyduklarından dolayı bazı viral özellikleri barındırırlar. Virüslerin aksine, plazmitler birçok proteini sentezleyemedikleri için, yaşadıkları hücreyi terk etmezler ve ona zarar vermekten kaçınırlar (Clarck, 2010). Şekil 1’de tipik bir plazmit DNA’sının bakteri hücresi içerisindeki görünümü gösterilmektedir (URL-1).



Şekil 1. Tipik bir plazmit DNA’sının bakteri hücresi içerisindeki görünümü (URL-1)

Plazmitler, canlı hücrelerde bulunmalarına ve genetik bilgi taşımalarına rağmen kromozom değildirler. İki nedenden dolayı hücre genomu olarak kabul edilmezler. Bunlardan ilki, tek bir plazmit farklı hücre türlerinde bulunabilir ve bir konak hücreden başkasına geçebilir. İkincisi, bir plazmit bir hücrede var iken bir süre sonra o konakta bulunmayabilir. Bu yüzden, plazmitler protein kodlayan genleri taşımalarına rağmen, normal şartlar altında hücrenin büyümesi ve bölünmesi için gerekli değildirler. Bu da plazmitler için kendi başına replike olabilen nükleik asit molekülleri anlamına gelen replikon terimini ortaya çıkarmıştır. Kromozomlar, plazmitler, virüs genomları (hem DNA hem RNA) ve viroidlerin hepsi replikon olarak ifade edilirler. Başka bir deyişle replikon, DNA (ya da RNA) sentezinin başladığı replikasyon orijininin kontrolünü kendi elinde bulundurmasıyla tanımlanır. Bu yüzden bir replikon kendi replikasyonu için gerekli olan enzimleri kodlayan genleri taşımak zorunda olmadığı gibi nükleotit öncülleri ve enerji ihtiyacından da sorumlu değildir. Virüsler ve plazmitler kendileri için gerekli olan çoğu enzimi, hammaddeyi ve enerjiyi sağlamak için konak hücreyi kullanan replikonlar olarak karşımıza çıkar (Clarck, 2010).

Virüsler genellikle replike oldukları hücreyi yok ederler ve yeni kurbanlar aramak için virüs partikülleri şeklinde hücreden ayrılırlar. Plazmitler ise konak hücre ile aynı anda replike olurlar. Konak hücre bölündüğü zaman plazmit de bölünür ve yavru hücrelere plazmitin bir kopyası alınır (Primrose vd.,1984).

Gerçekte plazmitler, konak hücreden bırakılmamayı garantilemek için konak ölümüne yol açan fonksiyonları kullanarak, konağı ona karşı korur ve konak içinde kalmayı garanti altına alırlar (Clarck, 2010). Aşağıdaki Tablo 1'de plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimler verilmiştir (Twyman, 1998).

Tablo 1. Plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimlerin anlamı

TERİM	TANIM
Temel replikon	Plazmitin replike olabilmesi için gerekli olan minimal bölgedir.
Kopya sayısı	Bir plazmitin bir hücrede bulunan sayısını ifade eder. Genellikle plazmit DNA'sının kantitatif ölçümü veya kodlanan gen ürünü ile hesaplanır.
Konjugatif ve konjugatif olmayan plazmitler	Plazmitlerin konjugasyonla kendi transferlerini yapabilme yeteneğine göre belirlenirler.
cop mutanti	Bir plazmitin kopya sayısını düzenleyen geninde mutasyon taşınmasıdır.
Kriptik plazmit	Hiçbir fenotipik özellik göstermeyen plazmittir.
Curing	Doğal yolla ya da uyarılarak plazmitlerin hücreden arındırılmasıdır.
Değiştirme (Dislodgement)	Bir plazmitin ikinci bir plazmitle uyuşmayarak kaybı, genelde ikinci plazmit tarafından kodlanan restriksiyon endonükleazların aktivitesiyle belirlenir.
Epizom	Hem ekstrakromozomal hem de konak genomuna entegrasyon yapabilen plazmit ya da virüslerdir.
Homoplazmit, Heteroplazmit	Bir ya da iki farklı tip plazmit içeren hücreleri tanımlar.
Uyuşmazlık Grubu	Aynı replikasyon orijinine sahip olan plazmitlerin aynı hücrede muhafaza olamamasıdır.
Tekrar dizili plazmit (Invertron)	Ökaryotlarda uzun kusursuz, tekrarlı dizilere sahip olan lineer bir plazmittir.
Killer sistem	Curing yapılmış yavru hücrelerdeki plazmit muhafaza sistemini yok eden sistemdir.
Muhafaza sistemi	Bölünen hücrelerde plazmitin muhafaza edilmesini sağlayan sistemdir.
Miniplazmit	F-plazmiti gibi büyük bir plazmitin temel replikonudur.
Tek yönlü uyuşmazlık	Replikasyon orijinleri farklı olmasına rağmen, Tip-1 plazmitin bir hücre popülasyonuna girerek Tip-2 plazmitin uyuşmazlık sonucu hücreden kaybedilmesi fakat tip-2 plazmitin tip-1 plazmit için aynı özelliği göstermemesidir.
Paylaşım sistemi	Hücre bölünmesi esnasında plazmitlerin yavru hücrelere paylaşılmasıdır. Paylaşım sistemi plazmitlerin iki yavru hücreye eşit paylaşılmasını sağlar.
Plazmit orijini	DNA replikasyonunun başladığı plazmit üzerindeki bölgedir.
Plazmit ayrımı	Farklı tipteki plazmitlerin hücre bölünmesi esnasında yavru hücrelere farklı olarak paylaşımıdır.
Promiscuous plazmit	Geniş konak spektrumuna sahip olan plazmitlerdir.
Prime plazmit	Bir plazmit epizomunun rastgele konak kromozomundan ayrılması ve ayrılırken konak kromozomunun bir parçasını da yanında taşımasıdır.
Gevşek (relaxed) kontrollü plazmit	Replikasyonu için protein sentezine ihtiyaç duymayan, protein sentezi baskılansa bile kopya sayısını arttırabilen; bunu da negatif regulator proteinin uzaklaştırılmasıyla sağlayan plazmittir.
Sıkı (stringent) kontrollü plazmit	Replikasyonu için protein sentezinin devam etmesine ihtiyaç duyan, protein sentezi inhibe edilince kopya sayısı azalan plazmittir.

Plazmitlerin çoğu çift zincir halka DNA molekülleri olarak meydana gelirler. Eğer her iki DNA zinciri sağlam halka halinde ise, kovalent kapalı halka veya CCC DNA olarak tanımlanırlar. Sadece bir zincir sağlam ise, açık halka veya OC DNA olarak tanımlanırlar. Farklı yapısal konfigürasyonlarından dolayı, CCC ve OC DNA agaroz jel elektroforezinde ayrılır. Etidyum bromür (EB) gibi interkalasyon yapan ajanların ilavesi, süpersarmal plazmit DNA'sının açılmasına neden olur. Eğer aşırı miktarda EB ilave edilirse, plazmit ters yönde süpersarmal olacaktır. Bu gerçeğin tespiti plazmit DNA'nın izolasyonunda kullanılır (Primrose vd., 2006).

1.4.2. Plazmit Tipleri ve Sınıflandırılması

Plazmitler, daha önceleri basit özelliklerine göre sınıflandırılırken, günümüzde plazmit sınıflandırılmasında kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Önceleri, F plazmitleri, kolisojenik plazmitler ve R plazmitleri olarak sınıflandırılmasına rağmen, son dönemlerde moleküler biyoloji alanında kaydedilen ilerlemeler, plazmitler üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşması ve bilgi birikiminin artması ile plazmitlerin farklı özelliklerinin ön plana çıktığı yeni sınıflandırma sistemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu sınıflandırmalar genelde plazmitlerin replikasyon mekanizmasına, kopya sayısına, gösterdiği fenotipik ve yapısal özelliğe göre değişmektedir (Wang vd., 2009).

En basit fakat en muhtemel ölçüt konak hücrede gösterdikleri fenotiptir. Bakteriyel plazmitlerin replikasyonunda, transferinde ve hücrede muhafazasının sağlanmasında kullandığı genler, genellikle konak kromozomunda ve başka bir plazmite aktarılabilen mobil elemanlar üzerinde taşınırlar (Twyman, 1998).

Bakteriyel plazmit tarafından ortaya konan fenotip, plazmit molekülünün kendine has bir özelliğini yansıtmaz ve farklı birçok fenotip aynı plazmit tarafından gösterilebilir. Megaplazmitler çoğu antibiyotik için direnç geni taşırlar ve tıp alanında çalışanlar için büyük önem taşırlar. Dahası, taşınabilir elementlerin fazlalığı ve plazmitlerin rekombinasyon yapma eğiliminden dolayı, plazmit yapısı istikrarsızdır. Bu yüzden plazmitlerin sadece fenotiplerine bakarak metotsal bir sınıflandırma yapmak zordur. Çoğu ökaryotik plazmit böylesi bir sınıflandırma sistemine dayalı bir fenotip göstermez; diğer plazmitler için fenotip, DNA ile kodlanmış fonksiyonlardan ziyade plazmit davranışından kaynaklanır (Twyman, 1998).

Çoğu plazmit çift zincirli kapalı halka (CCC) yapısında bulunmasına rağmen, bir plazmiti tanımlamak için diğer yapısal şekilleri göz ardı edemeyiz. Çok sayıda tek zincirli halkasal DNA plazmitlerine *Streptomyces* ve *Clostridium* türlerinde rastlanılmıştır (Schrempf vd., 1975).

Ayrıca lineer çift zincirli DNA plazmitleri birçok bakteriyal ve ökaryotik kaynaktan izole edilmiştir, *Borrelia hermsii*'de bulunan çeşitli yüzey antijenlerini kodlayan lineer plazmitler bunlara örnek verilebilir (Ferdows vd., 1996).

Lineer plazmit barındıran ökaryotlarda, sürekli transkript olan genlerin kromozoma mı ait yoksa plazmitten mi kaynaklandığını belirlemek her zaman belirgin değildir. Normal büyüme şartları altında esansiyal olmayan bir plazmitin alışlagelmiş tanımı, 'normal' büyüme şartları kesin olarak belirlenmedikçe anlamsızdır. Örneğin, bir yapay maya kromozomu esansiyal değildir, aynı zamanda memeli Y-kromozomu da esansiyal değildir, fakat bunlardan ikisi de bir plazmit olarak tanımlanamamaktadır (Twyman, 1998).

Diğer yandan RNA plazmitleri dediğimiz viroidler hiçbir gen taşımayan özelleşmiş tek zincirli halkasal RNA plazmitleridir. İki parçalı, lineer, çift zincirli RNA elementleri mayalarda bulunmuştur. Bunlar öldürücü faktörler olarak bilinirler çünkü konak üzerinde öldürücü fenotip gösterirler. Genomu kapsayan bir protein tabakası kodlayan bu RNA plazmitleri diğer hücreleri enfekte etmezler ve intraselüler olarak aktarılırlar (Primrose ve Twyman, 2006).

İyi bir plazmit sınıflandırma sistemi transfer, replikasyon ve hücrede muhafaza olma gibi özgün özellikleri kullanır. Bakterilerde, plazmit aktarımı dört yol ile olur. Bunlar; hücre birleşmesi, transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyondur. İlk 3 yol plazmite bağlı olarak gerçekleşmezken, konjugasyon plazmit bilgisi dahilindedir ve çoğu plazmitler bu metotla hücreler arasında kendi transferlerini gerçekleştirecek genleri taşırlar (Twyman, 1998).

Ökaryotlarda plazmit transfer mekanizması, sınıflandırmada daha az kullanılan bir kriterdir. Horizontal plazmit transferi genellikle hücreler birleştiği zaman meydana gelir ve çoğunlukla mekaniksel transfer şeklinde olur. Genellikle bakteriler plazmitlerini ökaryotlara aktarırlar, en yaygın olarak görülenler bakteriden mayaya konjugasyonla plazmit aktarımı ve *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmit aktarımında görülür (Twyman, 1998).

Yukarıda belirtilen sınıflandırmalardan farklı olarak, plazmitler *tra* genleri denen transfer genlerini taşıyıp taşımamalarına göre de konjugatif ve non-konjugatif olarak iki

büyük sınıfa ayrılabilirler. *tra* genleri; bakteriyal konjugasyonun oluşmasını sağlayan genlerdir. Genellikle konjugatif plazmitler, diğerlerine göre yüksek molekül ağırlıklıdır ve kromozom başına 1 ila 3 kopya içerir. Non-konjugatif plazmitler ise düşük molekül ağırlıklıdır ve kromozom başına çok sayıda kopya olarak bulunurlar fakat buna istisna plazmitlerin de (R6K istisna bir konjugatif plazmittir, moleküler ağırlığı 25×10^6 daltondur ve bir relaxed (gevşek kontrollü) plazmit olarak muhafaza edilir) literatürde belirtildiği bilinmektedir (Primrose ve Twyman, 2006).

Plazmitler ayrıca hücre başına kopya sayısının az olmasına veya çok sayıda olmasına göre de ayrılarak çok kopyalı ya da az kopyalı plazmitler olarak sınıflandırılabilirler.

1.4.3. Plazmitlerde Replikasyon Mekanizmaları

1.4.3.1. Teta Tip Replikasyon

Teta tip DNA replikasyonu ebeveyn zincirlerin birbirlerinden ayrılmasını, bir primer RNA'nın sentezini (pRNA) ve bu pRNA'nın kovalent olarak uzatılmasıyla DNA sentezinin başlatılmasını içerir (Kornberg vd., 1992). Her iki zincirin sentezi birbirine bağlı olmakla birlikte iki zincirden biri (lider zincir) sürekli iken, diğer zincir (izci zincir) kesikli olarak sentez edilir. Teta tipi DNA sentezi bir veya daha fazla orijinden başlayabildiği gibi replikasyon tek veya çift yönlü de olabilir (Kelman vd., 1995; Zavitz vd., 1991). Elektron mikroskobu (EM) altında replikasyon ara ürünleri tipik teta harfinde görülebildiği için bu adı almıştır. Replikasyon bölgesini kesen enzimler tarafından bu ara ürünler kesildiğinde 'Y' şeklinde moleküller (çatallar) üretir. Replikasyon ara ürünleri tek veya çift yönlü elektroforez ile takip edilebilir. Bu analizler sonucu; replikasyon ara ürünlerinin tabiatı, replikasyonun yönü, orijinin ve terminusun lokasyonu, lider ve izci zincir sentezleri arasındaki uyum derecesi hakkında bilgi elde edilebilir. Bazı istisnalar ile birlikte, teta tip replikasyon mekanizmasını kullanan plazmitler, plazmit tarafından kodlanan bir Rep başlangıç proteinine ihtiyaç duyarlar. Bazı replikonlar ise lider zincir sentezinin erken safhalarında konak DNA pol I'ne ihtiyaç duyabilirler (del Solar vd., 1998).

Teta Tip plazmitlerin replikasyon orijinleri aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

- i. Plazmitin otonom replikasyonunu destekleyebilen minimal cis-aktin bölgesi,

ii. Replikasyon işlemlerinin başlatılabilmesi için DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrıldığı bölge,

iii. Lider zincir sentezinin başladığı baz ya da bazlar.

Bazı istisnalar ile birlikte plazmit DNA replikasyonu, plazmit tarafından kodlanan özel bir Rep başlatıcı proteine ihtiyaç duyar. Replikasyon orijinleri plazmit tarafından kodlanan ve/veya konak tarafından kodlanan proteinler ile etkileşim yapan bölgelere ihtiyaç duyabilirler. Bu bölgeler Rep protein etkileşimlerinin olduğu replikasyon orijininde bulunan özel dizilerin varlığıyla anlaşılır. Teta replikasyonu yapan plazmitlerin çoğu orijininde ilave özellikler bulunmuştur. Bunlardan biri, dizi tekrarları içeren yan yana (komşu) A-T zengini bir bölgedir. Bu bölge, zincirlerin açıldığı ve konak başlatıcı faktörlerin toplandığı yerdir. Diğeri, konak DnaA başlatıcı proteinin bağlandığı bir veya birden fazla bölgede olabilen “dnaA kutuları”dır (Kornberg vd., 1992; Bramhill vd., 1998).

E. coli kromozomunun replikasyon orijininde (*oriC*) bulunan çoklu Dam metilasyon dizileri, P1 ve pSC101 gibi plazmitlerin replikasyon orijininde de bulunabilir (Brendler vd., 1991) Metilasyon, replikasyon için gerekli değildir ve esas rolü posttransreplikasyondur. Dam metilasyon dizileri diğer plazmit replikasyon dizilerinde de bulunmaz (Abeles vd., 1993).

Pol I'den bağımsız replikasyon orijinlerinin yapısal organizasyonunun karşılaştırmalı analizi şunu öngörmektedir: Rep bağlanma bölgesi, bükülmüş bir DNA bölgesine yerleşmesine rağmen, A-T zengini bölgenin tekrarları içindeki DNA esas olarak düzdür (Eckdahl vd., 1990). Aslında DNA, Rep proteinleri ile indüklenen orijin bölgesinin daha fazla bükülmesini sağlayan Rep bağlanma bölgelerinde bükülür. Replikasyon orijinleri mimari rolü olan faktörler için de bölgeler içerebilirler (Örneğin; integrasyon konak faktörü, IHF veya inversiyon stimülasyon faktörü, FIS).

Konak tarafından kodlanan proteinler, farklı *ori* bölgeleri arasında veya aynı plazmitler üzerindeki farklı orijinler arasında bile (plazmit R6K'da olduğu gibi) topolojik benzerlik ister. Düzenleyici plazmit DNA bölgeleri replikasyon orijininin zorunlu unsurlarıdır. Çünkü bu bölgeler fonksiyonel bir replizom oluşturmak için gereklidir (Stenzel vd., 1991). Birçok plazmitin replikasyon orijininde bulunan yapısal faktörlerin bağlanması için gerekli olan DNA bölgelerinin varlığı, *oriC*'de bulunan duruma benzerlik gösterir (Wowlker vd., 1993).

1.4.3.2. Yuvarlanan Çember Replikasyonu

Yuvarlanan çember (RC) mekanizmasında replikasyon tek yönlüdür. Lider zincirin ve izci zincirin sentezi birleşik olmadığından asimetric işlem olarak da düşünülebilir. RC replikasyonun en önemli özelliği biri yeni sentezlenmiş lider pozitif (+) zincirin, kovalent olarak aynı ebeveyn pozitif zincirine bağlı olmasıdır (del Solar vd., 1993; Espinosa vd., 1995). İlk başlarda RC replikasyonunun sadece ssDNA kolifajlarıyla ve G pozitif (+) bakterilerden izole edilen küçük çok kopyalı plazmitlerle sınırlı olduğu düşünülürdü. Halbuki G negatif (-), siyanobakteri ve arkelerden izole edilen plazmitlerde de RC moduyla replike olan plazmitler bulunmuştur. Şu ana kadar tanımlanan RC replikasyon moduyla replike olan plazmitlerin çoğunun 10 kb'den daha küçük olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, bütün küçük plazmitlerin RC moduyla replike olduğu söylenemez. Örneğin, G pozitif (+) bakterilerden izole edilen pRJF1 (2,6 kb) ve pWV02 (3,8 kb) gibi küçük plazmitler teta moduyla replike olurlar (Hefford vd., 1993). RC replikasyonunun ana hatlarını ortaya çıkaran mekanizmalar çoğunlukla stafilokokal plazmitler pT181, pC221, pUB110 ve pC194 ve streptokokal plazmitler pNV158 ve onun Δmob türevi pLS1 ile yapılmıştır (del Solar vd., 1993).

RC replikasyonun şu andaki modeli deneysel olarak ortaya konmuş birçok safha içerir. Replikasyon, plazmit tarafından kodlanan Rep proteiniyle başlatılır. Bu Rep proteini çift zincirli orijin (*dso*) olarak isimlendirilen bir bölgede (+) zincirde spesifik bir kırık oluşturur. Bu serbest 3'-OH ucu lider zincir için primer olarak kullanılır. Bu sentez sırasında, çoğunlukla konak replikasyon proteinleri (en azından DNA pol III, SSB ve bir helikaz) kullanılır. Serbest 3'-OH ucunun uzaması aynı zamanda ebeveyn (+) zincirin uzaklaştırılması ile gerçekleşir. Replizom yeniden oluşturulmuş bir *dso*'ya ulaşınca kadar devam eder. Bu *dso*'da DNA zincir transfer reaksiyonları gerçekleşerek lider zincir replikasyonu sonlandırılır. Lider zincir replikasyonunun son ürünleri, ebeveyn (-) zinciri de içeren çift zincirli bir DNA, yeni sentezlenmiş (-) zincir ve ebeveyn (+) zincire karşılık gelen tek zincirli DNA ara ürünüdür. Zincir uzaklaştırma mekanizmasından farklı olarak, replikasyon moduyla üretilen tek zincirli DNA ara ürünleri plazmit DNA zincirlerinden sadece birine karşılık gelir. ssDNA'nın üretimini, RC mekanizmasında plazmit replikasyonunun mihenk taşı olduğu Erchlich'in laboratuvarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gruss vd., 1989; te Riele vd., 1986). Sonuçta ebeveyn (+) zinciri fiziki olarak *dso*'dan uzak olan tek zincirli orijinde (*sso*) konak proteinleri tarafından başlatılan

sentezle çift zincir DNA'ya dönüştürülür. Son adım konak DNA girazlarıyla replikasyon ürünlerinin süpersarmallaştırılmasıdır.

RC replikasyon plazmitleri birbirleri arasında değiştirilebilir gen modüllerinden oluşur (Projan vd., 1988). Sadece bir tane zorunlu modül vardır. Bu modül plazmit replikasyonu için gerekli fonksiyonları taşır. *dso*, *rep* geni ve replikasyon kontrolünde rol alan plazmit elementlerini içerir. Bu modül, lider zincir başlangıcı ve kontrol bölgesi (LIC) olarak adlandırılır (del Solar vd., 1993). İlave olarak bu plazmitler antibiyotik direnç geni, konjugasyon mobilizasyonundan sorumlu (*mob*) bir gen, bir veya iki *sso* bölgesi içerebilir (del Solar vd., 1993).

RC tipinde replike olan plazmitlerin Rep proteinleri, DNA zincir transferaz aktivitesine sahiptir. Dolayısıyla Tip-I topoizomeraz benzeri bir şekilde plazmitleri kesip yapıştırabilirler (Koepsel vd., 1985). Rep proteinlerinin hiçbiri, tanımlanan birçok DNA bağlanma proteinindeki tipik HTH motifine sahip değildir (istisna olarak plazmit pMV158'in RepB proteinlerinde muhtemel LZ motifi mevcuttur) (de la Campa vd., 1990).

1.4.3.3. Zincir Uzaklaştırma Tip Replikasyon

Zincir uzaklaştırma metoduyla replike olan plazmitlerden en iyi bilineni IncQ ailesinden olan prototip RSF1010 plazmitidir. Bu ailenin üyeleri replikasyonun başlaması için plazmit tarafından kodlanan üç başlatıcı proteine ihtiyaç duyarlar. Bu proteinler replikasyonun başlamasını bileşik orijin bölgesinde teşvik ederler ve sonraki aşamada replikasyon herhangi bir yönde olacak şekilde zincir uzaklaştırma mekanizmasıyla devam eder (Scherzinger vd., 1991; Sakai vd., 1996).

Zincir uzaklaştırma tipi replikasyona sahip olan RSF1010 plazmiti üzerinde birçok çalışma yapıldığından, hemen hemen tüm bilinenler bu plazmit üzerinden tanımlanmıştır. RSF1010 plazmitinin replikasyon orijini çift yönlü replikasyonu destekleyebilen minimal bölge olarak tanımlanır. RSF1010'un replikasyon proteinleri (RepA, RepB ve RepC) ikinci bir plazmit tarafından *trans* olarak ortama ilave edildiği zaman çift yönlü replikasyon bölgede başlayabilir (Scherzinger vd., 1991). Bu bölge aynı zamanda replikasyon orijinini de içerir ve orijin *in vivo* ve *in vitro*'da elde edilen replikasyon ara ürünlerine uygulanan EM analizi ile tespit edilir. Bu minimal *ori* bölgesi, üç özdeş 20 baz çiftlik iterona ilaveten GC'ce (28 bp) ve AT'ce zengin (31 bp) segmentler içeren 174 baz çiftlik bir bölge de içerir. Orijin bölgesi zorunlu olmayan bir bölgede ve zıt zincirlerde yerleşik bulunan iki küçük

palindromik dizi (*ssiA-ssiB*) içerir. İteronlar RepC bağlanma bölgeleridir (Haring vd., 1985; Haring vd., 1989). *ssi* bölgelerindeki ters tekrarlar saç tokası oluşumunu sağlar. Bu saç tokası yapılarında, gövdenin üst kısmındaki baz eşleşmesi replikasyon için önemlidir. Oysa gövdenin alt kısmındaki dizi spesifikliği ve baz komplementerliği primer sentezi için gereklidir (Miao vd., 1993). *ssiA-ssiB* dizileri plazmitin kodladığı RepB primaz tarafından spesifik olarak tanınır. RepB primaz bu dizilerden “sürekli replikasyonu” başlatır (Haring vd., 1989; Honda vd., 1991). Genetik analizler göstermiştir ki, tek bir *ssi* bölgesinin tek bir yönde, iteronlardan uzak bir bölgede zincir uzaması ve primerleşmeyi sağlaması, RSF1010 replikasyonu için yeterlidir. Bu organizasyon RSF1010 replikasyon orijinin üç fonksiyonel lokusa ayrılabilceğini gösterir: iteronlar, *ssiA* bölgesi ve *ssiB* bölgesi. İteronlar ve buna bitişik AT'ce zengin bölge dubleks açılma bölgesi olarak fonksiyon gösterir. *ssiA* ve *ssiB* bölgeleri primerleşme bölgelerini oluşturur (Sakai vd., 1996).

Yukarıda belirtildiği gibi RSF1010'un replikasyonu plazmit tarafından kodlanan üç proteinin ortak çalışması ile başlatılır. RepA, RepB ve RepC'nin fonksiyonu sırasıyla şöyledir: 5'→3' helikaz, primaz ve başlatma aktivitesi (Haring vd., 1989; Sakai vd., 1996). RSF1010 DNA'sının replikasyonu konak tarafından kodlanan DnaA, DnaB, DnaC ve DnaG proteinlerinden bağımsızdır. Çünkü bu proteinlerin rolleri plazmitin kodladığı RepA, RepB ve RepC proteinlerinin ortak çalışmasıyla devralınır (DnaA, DnaB, DnaC ve DnaG'nın yerine). RSF1010'un replikasyonunun başlaması için gereken kalıp, süpersarmal plazmit DNA'dır. DNA Pol III-HE ve SSB, replikasyon için gereklidir (Scherzinger vd., 1991).

1.4.4. Plazmitlerde Kopya Sayısı ve Kontrolü

Belirli bir konak içinde ve belirli sabit şartlar altında farklı bakterilerde plazmit kopya sayısı değişebilmesine rağmen, herhangi bir plazmitin kendine özgü kopya sayısı vardır. Bu karakteristik kopya sayısı; replikasyonun başlangıç adımının düzenlenmesinde görev alan, plazmit tarafından kodlanan kontrol elementleriyle başarılır.

Kontrol sistemleri denge durumunda replikasyon oranını muhafaza ederler. Bunu, her bir hücrede olması gereken ortalama kopya sayısındaki sapmaları düzelterek, plazmit kopya sayısı ve hücre siklusu başına ortalama bir replikasyon olacak şekilde düzenleyerek yaparlar ve böylece replikasyonun hızını korurlar. Kopya sayısını belirlemek ve muhafaza edebilmek için plazmitler negatif regülatör devrelerini kullanır (Pritchard vd., 1978).

Replikasyonu kontrol eden mekanizmalar çeşitli sistemlerde incelenmiştir ve birçok inhibitör tipi belirlenmiştir (Thomas vd., 1988). Bunlar:

- i. Antisens RNA düzenlemesi,
- ii. Başlatıcı proteinlerin bağlandığı DNA bölgeleri (iteronlar) ile düzenleme,
- iii. Hem antisens RNA hem de bir protein ile düzenlemedir.

1.4.4.1. Antisens RNA ile Kontrol

Antisens RNA ile kontrol mekanizmasında model plazmit ColE1'dir. Halihazırda kullanılan klonlama vektörlerinin çoğu ColE1 plazmitinden türevlenen bir *ori* bölgesi taşır ve kopya sayısı kontrolü antisens RNA aracılığıyla yapılır (del Solar vd., 1998). Bu tip plazmitte DNA replikasyonu için gerekli primer, RNA II diye bilinen 555 bazlık replikasyon orijininde bir RNA-DNA hibriti oluşturan bir ribonükleotittir (Tomizawa ve Itoh, 1981). RNA II, RNaz H ile serbest bir 3' OH grubu bırakacak şekilde kesilmişse ancak o zaman bir primer olarak hareket edebilir. RNA II bu şekilde işlem görmedikçe bir primer olarak fonksiyon görmeyecek ve replikasyon gerçekleşmeyecektir. Ayrıca replikasyon kontrolünde RNA I olarak bilinen 108 bazlık küçük RNA molekülü de aracılık eder. Bu RNA I, RNA II gibi DNA'nın aynı bölgesinden ama tamamlayıcı zinciri tarafından kodlanır. Yani, RNA I ve RNA II birbirlerinin tamamlayıcısıdır ve çift zincirli RNA oluşturmak için hibridize olabilirler. Bu dubleks yapı RNA II'nin RNaz H ile parçalanmasını engeller ve böylece replikasyon gerçekleşmez. RNA I plazmit tarafından kodlandığı için plazmitin kopya sayısı fazla olduğunda RNA I de fazla sayıda sentezlenecektir. Böylece konak hücre büyürken ve bölünürken RNA I'in konsantrasyonu düşecek ve plazmit tekrar replike olmaya başlayacaktır (Tomizawa ve Itoh, 1981).

Kopya sayısının korunmasına RNA I'e ek olarak Rop diye bilinen, plazmit tarafından kodlanan, bir protein de yardım eder. Bir dimer formu olan bu Rop proteini, RNA I ve RNA II'nin eşleşmesini artırır. Primer işlendiği için, RNA II, RNA I'in nispeten düşük konsantrasyonlarında bile inhibe edilebilir (Rop proteini primerin uçlardan kesilmesine engel olur). *rop* geninin delesyonu ya da RNA I'deki mutasyonlar sonucunda kopya sayısında artış görülür (Twigge ve Sherratt, 1980).

1.4.4.2. İteronlarla Kontrol

Teta modunda replike olan ve iteron içeren plazmitlerin Rep proteinleri, ya otoregüle edilirler ya da transkripsiyonel kontrol altındadırlar ve iteronlar, plazmit kopya sayısının kontrolünde önemli bir role sahiptirler (Kittell vd., 1992; Chatteraj vd., 1997). İteronların rolü ilk defa, F plazmitlerinde tanımlanmıştır. *oriS* iteronları uyumlu bir plazmite klonlandığında, *oriS*-bağımlı replikasyonun inhibe edildiği gözlenmiştir. Benzeri durumlar P1 veya R1162/RSF1010 gibi iteron içeren başka plazmitlerde de gözlenmiştir (Kim vd., 1985).

pSC101 plazmitinde ve geniş konak spektrumu olan plazmitlerin çoğunda, *ori* bölgesi 17 ile 22 bp uzunluğunda, 3 ila 7 kopyaya sahip iteron sıraları içerirler. pSC101 plazmitinde *ori* bölgesine yakın, RepA proteinini kodlayan *repA* geni bulunur. Sadece plazmitin kodladığı, replikasyon için gerekli olan bu protein iteronlara bağlanır ve DNA sentezini başlatır.

Kopya sayısı kontrolü iki ilave mekanizmayla gösterilir. İlkinde, RepA kendi promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu engeller ve sentezini baskılar (Ingmer ve Cohen, 1993). Eğer kopya sayısı yüksekse RepA'nın sentezi baskılanacaktır. Hücre bölünmesinden sonra, kopya sayısı ve RepA'nın konsantrasyonu düşecek ve replikasyon yeniden başlatılacaktır. RepA proteinindeki mutasyonlar kopya sayısının artmasına sebep olabilir. İkinci olarak, RepA iki plazmitin iteron bölgelerine bağlanarak bu iki plazmiti birbirine bağlayabilir. Böylece onları replikasyonun başlangıcında engellemiş olur. Handcuffing (kelepçeleme) olarak bilinen bu mekanizmaya göre iteron plazmitlerinin replikasyonu hem RepA proteininin konsantrasyonuna hem de plazmitlerin kendi konsantrasyonlarına bağlı olacaktır (Ingmer ve Cohen, 1993).

1.4.5. Plazmit Uyuşmazlığı ve Konak Seçiciliği

Plazmitler, aynı replikasyon ve paylaşırma sistemlerine sahip iseler aynı hücrede muhafaza edilemezler. İki farklı plazmitin, seçimsel baskı olmadığı durumlarda aynı hücre içinde birlikte bulunmamasına plazmit uyumsuzluğu denir. Bu terim sadece, ikinci plazmit hücre içine alındığında ve konak DNA restriksiyon sistemi bulunmadığı durumlarda kullanılabilir. Karşılıklı uyumsuz plazmit grupları, aynı uyumsuzluk gruplarına ait olarak düşünülürler. *E. coli*'de 30'un üzerinde, *S. aureus* plazmitleri için de 13 tane uyumsuzluk

grubu tespit edilmiştir. Plazmitler, aynı replikasyon kontrol mekanizmasına sahip iseler uyuşmazlar. Şaşırtıcı olarak, kopya sayısının antisens kontrole bağlı olduğu plazmitlerin RNAI/RNAII bölgelerindeki dizilerin değişimiyle, uyuşmazlık grupların değişimi mümkündür. Buna alternatif olarak aynı *par* bölgesini paylaşıyorlarsa plazmitler uyumsuz olacaktırlar (Austin ve Nordstrom, 1990).

Plazmitlerin konak seçiciliği, kodladıkları replikasyon proteinleri tarafından belirlenir. Plazmitler kendi replikasyonları için gerekli proteinlerin sadece birkaçını, çoğu durumda da bu proteinlerin sadece birini kodlarlar. Replikasyon için gerekli diğer bütün proteinler; DNA polimeraz, DNA ligaz, helikazlar vs. konak hücre tarafından sağlanır. Plazmit tarafından kodlanan bu replikasyon proteinleri replikasyonun gerçekleştiği *ori* (replikasyon orijini) bölgesine çok yakın yerleşmişlerdir. Bu nedenle *ori* bölgesinin etrafında çok küçük bir bölge replikasyon için gereklidir. Plazmitin diğer bölgeleri çıkarılabilir ve yabancı diziler plazmite eklenebilir, bu halde dahi replikasyon yine de olacaktır. Plazmitlerin bu özelliği çok yönlü klonlama vektörlerinin yapımını fazlasıyla kolaylaştırmıştır (Twyman, 1998).

Bir plazmitin konak seçiciliğine *ori* bölgesiyle karar verilir. Plazmit Col E1'den türetilen plazmitlerin *ori* bölgeleri konak seçiciliğinde bir sınırlamaya sahiptir: Bunlar sadece *E. coli*, *Salmonella* vs. gibi enterik bakterilerde replike olabilirler. RF4 ve RSF1010'un da dahil olduğu diğer promiscuous plazmitler geniş bir konak seçiciliğine sahiptirler. Konjugasyonla kolaylıkla aktarılabilen RP4 tipi plazmitler Gram negatif (-) bakterilerin çoğunda replike olurlar. Böylesi promiscuous plazmitler DNA molekülündeki genetik bilginin birçok konağa kolayca transfer edilmesine olanak sağlarlar. RSF1010 gibi plazmitler konjugatif değildirler. Fakat kalıcı olarak muhafaza edildikleri birçok Gram negatif (-) ve Gram pozitif (+) bakteriye aktarılabılırler. Ayrıca *Staphylococcus aureus*'tan izole edilen plazmitlerin çoğu geniş bir konak spesifikliğine sahiptir (Stiffler vd., 1974).

Bunlar pek çok Gram pozitif (+) bakteride replike edilebilirler. Geniş konak seçiciliğine sahip olan plazmitlerin çoğu replikasyon için gerekli olan proteinlerin hepsini olmasa da çoğunu kodlarlar. Bu genleri ekspres edebilirler. Çeşitli bakteri aileleri tarafından tanınabilmeleri için promotörleri ve bağlanma bölgeleri içermelidirler (Primrose ve Twyman, 2006).

1.4.6. Plazmitlerin Biyoteknolojide Kullanımı

1.4.6.1. Vektör Olarak Plazmitler

Mikroorganizmalar arasında gen klonlamasında birçok aracı moleküllerden (vektör) yararlanılmaktadır. Bunların amaca yönelik ve bilinçli olarak seçilmesi ve kullanılması gereklidir. 1970'lerin başında ilk nesil klonlama vektörlerinin tasarlanmasından beri, dizayn edilen plazmitlerin sayısı aşırı derecede artmıştır (Primrose ve Twyman, 2006).

Ticari olarak bulunan çoğu vektör bakteri tabanlı olmasına rağmen, ökaryotik vektörler de geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu tür vektörler, genellikle, ökaryotik hücrelere (memeli, kanatlı hücreleri) yabancı genlerin aktarılması ve ekspresyonu için geliştirilmiş vektörlerdir. Bu nedenle de, yabancı genle birleştirilmiş olan plazmite, kuvvetli viral promotor ve regülatör (terminasyon) sekanslar da ilave edilerek COS hücrelerine transfekte edilirler. Eğer istenirse, önce, yabancı gen taşıyan plazmit bir bakteriye aktarılarak genin fazlaca üretimi sağlanabilir. Ökaryotik hücreye transfekte edilen vektördeki genin ekspresyonu sağlanır. Plazmitler ticari olarak satın alınabilir ya da elden temin edilebilirler. Bu yüzden, günümüz araştırmacıları belirli bir çalışma için hangi plazmiti kullanacaklarını belirleme hususunda, birkaç küçük kritere dikkat etmek zorundadırlar. Bunlar: insört boyu, kopya sayısı, plazmit uyumsuzluğu, seçilebilir marker, klonlama bölgeleri ve özelleşmiş vektör fonksiyonlarıdır. Bu kriterler yapılan çalışmaya göre değişebilir (Primrose ve Twyman, 2006).

İdeal bir klonlama aracı aşağıda verilen üç özelliğe sahip olmalıdır.

- i. Düşük moleküler ağırlıklı olmalı,
- ii. Konak hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilir olmalı,
- iii. Kolaylıkla değerlendirilebilen genlerde tek noktadan kesen restriksiyon endonükleazlara sahip olmalıdır (Clark, 2010).

Düşük moleküler ağırlığın avantajları birkaç tanedir. Bunlardan birincisi; plazmiti kullanmak çok kolaydır. Örneğin, kırılmalarla oluşacak zarara karşı oldukça dirençlidir ve kolaylıkla konak hücreden izole edilebilir. İkinci olarak, düşük moleküler ağırlıklı plazmitler genellikle konakta çoklu kopyalar halinde bulunurlar ve bu sadece onların izolasyon kolaylığı için değil bütün klonlanan genler için gen dozajına yol açmada etkilidir. Son olarak, düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak

endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin minimum seviyede olmasıdır (Primrose ve Twyman, 2006).

Küçük bir DNA fragmentinin vektör içine sokulmasından sonra, oluşan kimerik moleküller uygun bir alıcı içine transforme edilmelidir. Transformasyon verimliliği çok düşük olduğu için, kimerik moleküllerin kolaylıkla değerlendirilebilir fenotiplere sahip olması gereklidir. Genellikle bu fenotipler (antibiyotik direnci, kanamisin direnci vs.) vektör üzerinde bulunabildiği gibi, insört DNA üzerinde bulunan genler tarafından da üretilebilirler (Clark, 2010).

Klonlamanın ilk basamaklarından biri vektör DNA'sının kesilmesi ve bu DNA'nın aynı endonükleaz ile kesilmiş aynı uçlara sahip bir DNA fragmenti ile birleştirilmesidir. Eğer vektörün endonükleaz için birden fazla kesim bölgesi varsa birden fazla fragment üretilecektir. Kesilen iki DNA örneği sonradan karıştırıldığında ve tekrar birleştirildiğinde, oluşan kimeralar muhtemelen vektörün bir parçasını taşıyor olacaktır. Eğer endonükleazın kestiği bölgeye bir DNA parçası sokulunca bir gen inaktif oluyorsa ve bu inaktif olan gen fenotipik olarak değerlendirilebilirse bu çok avantajlı olur. Böylece, kendi üzerine katlanan ya da insört DNA ile birleşen vektörler kolaylıkla ayırt edilebilir (Primrose ve Twyman,2006).

1.4.6.2. Vektörlerin Gen Terapisinde Kullanımı

Gelecekte genetik bozuklukları tedavi etmenin bir yolu gen terapisi olabilir. İmmün Yetmezlik, Kistik Fibrozis ve hatta Hemofili A gibi hastalıklar belli genlerin DNA dizisinde oluşan mutasyonlardan meydana geldiği için, gen terapi denemelerinde hastanın vücudundaki hücrelerin içine mutasyonsuz gen kopyalarından götürmek amacıyla virüsler kullanılmıştır. Gen terapisi kullanılarak laboratuvarında çok sayıda başarılar elde edilmiştir. Ancak, viral gen terapisinin yaygın kullanılması için bazı önemli problemlerin çözülmesi gerekmektedir. Virüslere gösterilen bağışıklık tepkisi hedef hücrelere gen ulaştırılmasını engellemekle kalmaz, hasta için ciddi komplikasyonlara yol açar (Beardsley, 2000).

Bazı viral vektörler, örneğin lentivirüsler, konak kromozomlarından birinde genomlarını rastgele konumlara sokarlar, bu durum hücresel genlerin işlevlerini bozup kansere yol açabilir (McDowell, 2003). Adeno-ilişkili virüs-temelli vektörler bu bakımdan çok daha güvenilirler çünkü insan genomunda hep aynı konumda entegre olurlar.

Viral vektörler ilk olarak moleküler genetik deneylerinde çıplak DNA ile transfeksiyona alternatif olarak geliştirildiler. Kalsiyum fosfat çökmesi gibi geleneksel yöntemlere kıyasla, transdüksiyon, hücre yaşayabilirliğini (viabilitesini) etkilemeden hücrelerin neredeyse tamamının enfekte olmasını mümkün kılar (Warnock vd., 2011).

Buna ilaveten, bazı virüsler hücre genomuna entegre olup kararlı gen ifadesini sağlarlar. Ancak, viral bir vektörün inşası çok daha yoğun ve emek isteyen bir süreç olduğu için çoğu uygulamada transfeksiyon hâlâ tercih edilmektedir.

Genelde belli bir proteinin işlevini çalışmak için, protein kodlayan genler viral vektörler kullanılarak ifade edilebilirler. Belirteç (*marker*) genleri (yeşil floresan protein gibi) kararlı şekilde ifade eden viral vektörler, özellikle retrovirüsler, hücreleri kalıcı şekilde işaretlemek için kullanılır. Bu şekilde işaretlenmiş hücreler kullanılarak, *in vitro*'da enfekte edilmiş hücrelerin bir konak hayvana transfer edildiği ksenotransplantasyon deneylerinde hücreler ve onların yavrularını takip etmek mümkün olur (Hoeben vd., 2013).

Gen insersiyonu, gen nakavtından daha ucuzdur. Ama gen susturması bazen non-spesifiktir ve başka genler üzerinde hedef dışı etkiler gösterebilir, bu yüzden daha az güvenilir sonuçlar verir. Hayvan konak vektörleri de bazen önemli rol oynarlar. Retrovirüsler gen terapisi uygulamalarının ana konularından biridir. Moloney mürin lösemi virüsü gibi rekombinant retrovirüsler, konak genomun içine stabil şekilde entegre olabilirler. Taşıdıkları ters transkriptaz, bu virüslerin konak genom ile bütünleşmesini sağlar (Warnock vd., 2011).

Retroviral vektörler ikileşim-yeterli veya ikileşim-kusurlu olabilirler. İkileşim kusurlu vektörler deneysel çalışmalar için en yaygın seçenektir çünkü viral ikileşme ve paketleme için gerekli genler çıkarılmış veya başka genlerle değiştirilmiştir. Bu virüsler hedef hücrelerini enfekte edebilir ve taşıdıkları yükü teslim edebilirler ama hücrenin parçalanması ve ölümü ile sonuçlanacak tipik litik bir yolak takip etmekten acizdirler (Warnock vd., 2011).

Benzer şekilde, replikasyon-yetkin viral vektörler virion sentezi için gerekli tüm genlere sahiptirler ve enfeksiyon başlayınca kendilerini çoğaltmaya devam edebilirler. Bu vektörlerdeki viral genomlar çok daha uzun olduğu için, hücre içine ulaştırılmak istenen DNA insersiyonunun uzunluğu replikasyon kusurlu viral vektörlerdekine kıyasla sınırlıdır. Viral vektöre bağlı olarak, maksimum DNA parça uzunluğu genelde 8-10 kb kadardır (Coffin vd., 1997). Bu durum çoğu genomik dizinin kullanımını kısıtlasa da, cDNA dizileri rahatlıkla sığar (Christopher vd.,2013).

Moloney retrovirüs gibi retrovirüslerin başlıca sakıncası, transdüksiyon olabilmesi için hücrelerin aktif olarak bölünüyor olma gereksinimidir. Bunun sonucu olarak, nöron gibi hücreler retrovirüs enfeksiyonu ve transdüksiyonuna çok dirençlidir. Ayrıca, ensersiyon mutagenesi bir endişe konusudur, çünkü konak genomunun içine entegrasyon kansere yol açabilir (Liu vd., 2000).

1.4.7. *Thermus* Cinsi Plazmitler

Thermus cinsine ait bakterilerden izole edilen plazmitler genelde, herhangi bir fenotipik özellik göstermeyen kriptik plazmitler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Kobayashi vd., 2005). Kriptik plazmitler genelde düşük moleküler ağırlıklı olup, bu özelliğin birçok avantajı bulunmaktadır. Kırılmalarla oluşacak zarara karşı oldukça dirençli olmaları, genellikle konakta çoklu kopyalar halinde bulunmaları, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin minimum seviyede olması bu avantajlardan sadece birkaç tanesidir (Primrose ve Twyman, 2006). Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda kriptik plazmitlerin, klonlama ve ekspresyon vektörü olarak dizayn edilip kullanılması moleküler çalışmalar açısından oldukça önemlidir.

Çoğu *Thermus* izolatu konağına herhangi bir avantaj sağlamayan bir ya da daha fazla plazmit barındırır. Bu gibi plazmitlerden elde edilen DNA fragmentleri termofilik bakteriler için klonlama vektörleri olarak geliştirilebilirler (Vasquez vd.,1984; Koyama vd., 1990; Wayne ve Xu, 1997). Fakat yapılan birçok çalışmada *Thermus* cinsine ait plazmitlerin fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir (Takayama vd., 2004). Bu da yapılan çalışmaların yetersiz olduğunu ifade etmektedir.

Literatürde *Thermus* cinsinden izole edilen iki plazmitin replikasyon bölgelerinin belirlendiği ve bu bölgeler kullanılarak *E.coli-Thermus* shuttle vektörleri dizayn edildiği belirtilmiştir (Lasa vd.,1992). Şu ana kadar literatürde, *Thermus* türlerinde tanımlanan plazmit sayısı 19'dur (Takayama vd., 2004; Kobayashi vd., 2005; Ruan vd., 2007; Cava vd., 2009; Ohtani vd., 2012).

Tanımlanan bu 19 plazmitin 11'i genom çalışmalarından elde edilmiş ve fonksiyonel analizleri yapılmamıştır. Sadece sekans bilgileri mevcuttur. *Thermus* sp. YS45 bakterisinden elde edilen pTCCB09 plazmitinin ise sekans bilgisi olmayıp sadece restriksiyon-modifikasyon sisteminde etkili olduğu belirlenebilmiştir. Genel olarak bakıldığında *Thermus* cinsi bakterilerden tanımlanan plazmitlerin çoğu büyük genomlu

plazmitler olup, fonksiyonel analizleri oldukça zahmetli ve zordur. Ayrıca literatürde bu alanda çok bilgi olmaması yapılacak çalışmaları da zorlaştırmıştır. Geriye kalan 8 plazmitten biri olan *Thermus* sp. TK10'dan elde edilen pNHK101 plazmitinin ise sekans bilgisi elde edilmemiş sadece kodladığı 3 ORF hakkında bilgi verilmiştir (Kobayashi vd., 2005). Bunların da fonksiyonel testleri yapılmamıştır. Bu bilgiler dikkate alındığında *Thermus* cinsi bakterilerde tanımlanan sadece 5 plazmit bulunmaktadır. Bu plazmitler; *Thermus aquaticus*'dan tanımlanan pTA103 plazmiti, *Thermus thermophilus* HB8'den elde edilen pTT8 ve pVV8 plazmitleri ve *Thermus* sp. 4C'den elde edilen pS4C ve pL4C plazmitleridir (Ruan ve Xu, 2007; Ohtani vd., 2012). Bu üç bakteriden elde edilen plazmitler hakkında detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Thermus aquaticus'dan tanımlanan pTA103 plazmitinin RC tip replikasyona sahip olduğu, *Thermus thermophilus* HB8'den elde edilen pTT8 plazmitinin Teta moduna sahip olduğu literatürde belirtilmiştir. Diğer iki plazmitin replikasyon modu hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Yine *Thermus* sp. 4C bakterisinden DNA tamir mekanizmasında ve replikasyonda görev alan pS4C ve pL4C plazmitleri izole edilmiştir. Plazmitlerin bakterilerden eliminasyonu, bakteri büyüme sıcaklığında azalmanın meydana geldiği, yüksek sıcaklığın bakterilere zarar verdiği görülmüştür. Plazmit genomunda tespit edilen muhtemel ORF'ler ile yapılan BLAST araştırmaları sonucunda DNA tamir mekanizmasında ve bakteri replikasyonunda görev alan enzimlere yüksek oranda benzerlik gösteren genler bulunmuştur (Ruan ve Xu, 2007). Bu plazmitler kullanılarak *Thermus* cinsi için konak vektör sistemleri oluşturulması ve birçok bakteriye yüksek sıcaklıklarda büyüebilme yeteneğinin kazandırılması önerilmiştir (Ruan ve Xu, 2007). Bu plazmitler arasındaki uyumsuzluk gruplarına bakıldığında ise detaylı bir çalışma yapılmamış olup, pS4C ve pL4C plazmitlerinin aynı hücrede replike olabildiği ve böylece farklı uyumsuzluk gruplarında olduğu (Ruan ve Xu, 2007), pTT8 ve pVV8 plazmitlerinin de farklı uyumsuzluk gruplarında bulunduğu ve aynı hücrede replike olabildiği sonuçları görülmüştür (Takayama vd., 2004). *Thermus* cinsinden izole edilen plazmitlerin bu ve buna benzer genler içermeleri ve böylece Ruan ve Xu'nun önerdiği çalışmaların yapılması kuvvetle muhtemeldir.

Bu çalışma kapsamında *Thermus scotoductus* K6 suşundan izole edilen ve pHIG22 olarak adlandırılan; 2222 bp büyüklükte, % 62,78 GC içeriğine sahip, kriptik, küçük ve çok kopyalı bir plazmitin karakterizasyonu yapıldı. Biyoinformatik araçlar kullanılarak analiz edilen pHIG22 genomunun muhtemel ORF bölgeleri, palindrom ve iteron dizileri,

olası promotor bölgeleri ve düzenleyici bölgeleri belirlendi. Plazmit tarafından kodlanan transkriptler belirlendi ve bu transkriptlerin UTR analizleri yapıldı, proteine dönüşüp dönüşmediği tespit edildi. Belirlenen transkriptlerin düzenleyici bölgeleri incelenerek, promotor özellikte olup olmadığı araştırıldı. Oluşturulan hibrit vektörler aracılığıyla pHIG22'nin minimal replikonu belirlendi ve *E. coli*'de replikasyonu araştırıldı. Yapılan Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM) çalışmaları ile pHIG22'nin replikasyon orijini ve replikasyon modu belirlendi. QPCR tekniği ile pHIG22 plazmitinin *Thermus scotoeductus* K6 hücresindeki kopya sayısı hesaplandı. Farklı plazmitlerin minimal replikonları, çoklu klonlama bölgeleri (MCS), direnç kasetleri, ekspresyon için gerekli düzenleyici bölgeler vb. diziler kullanılarak yapılan genetik modifikasyonlar ile *Thermus-E. coli* shuttle vektörleri oluşturuldu. Oluşturulan bu yeni shuttle vektörler hem *Thermus-E. coli* suşları için klonlama vektörü hem de *Thermus* cinsi için ekspresyon plazmiti olacak şekilde tasarlandı.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Tripton (Merck), Yeast ekstrakt (Merck), Polipepton (Merck), NaCl₂ (Merck), Fe III Citrate (Merck), MgSO₄.7H₂O (Sigma), CaSO₄ (Merck), H₂SO₄ (Merck), MnSO₄.H₂O (Merck), ZnSO₄.7H₂O (Sigma-Aldrich), KNO₃ (Sigma-Aldrich), NaNO₃ (Merck), H₃BO₃ (Merck), CuSO₄.5H₂O (Sigma-Aldrich), Na₂MoO₄.2H₂O (Merck), CoCl₂.6H₂O (Merck), Etil alkol (Applichem), IPTG (Applichem), Amfisilin (Applichem), Kanamisin (AppliChem), EDTA (Merck), dNTP seti (Promega), (Invitrogen), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem), Commassie Brilliant Blue G-250 (Merck), Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck), K₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Trizma Baz (Sigma-Aldrich), Nutrient Agar (Merck), SDS (GERBU), Glisin (GERBU), Akrilamid (Sigma-Aldrich), Bis-akrilamid (Promega), Bromo Fenol Mavisi (Gerbu), Etidyum Bromür (Sigma-Aldrich), Agaroz (Sigma), TEMED (Janssen Chimica), anti-poly Histidine antikoru (Sigma-Aldrich), β-merkaptoetanol (Merck), Lizozim (Merck), Protein Ladder (Promega), Metanol (Sigma), Fenol (Sigma-Aldrich), NaOH (JTBaker), Asetik asit (Riedel-dan Haen), Gliserol (Merck), Ammonium acetate (Sigma-Aldrich), Cytochrome C (Sigma-Aldrich), Uranyl Acetate Dihydrate (Merck), Formvar/Carbon Coated-Copper 200 mesh (Polyscience, Inc.), Lead (II) citrate tribasic trihydrate (Sigma-Aldrich), Acridine Orange (Sigma-Aldrich), Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase antibody (Sigma-Aldrich), Nitroblue tetrazolium, BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stock solution, Roche) kimyasalları kullanılmıştır.

BamHI (Fermentas), *SacI* (Fermentas), *BclI* (NEB), *HindIII* (Promega), *EcoRI* (Promega), *NotI* (Thermo Scientific), *SmaI* (GmbH), *PstI* (Fermentas), *KpnI* (Sigma), *NcoI* (Fermentas), *NdeI* (NEB), *BglII* (Promega), *Sau3A* (Thermo Scientific), *ClaI* (Promega), *DpnI* (Thermo Scientific), restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır.

T4 DNA Ligaz (Promega), T4 RNA ligase (NEB), *Taq* DNA polimeraz (Promega), Terminal Transferase (NEB), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega), DNA Saflaştırma Kiti (Fermentas), Plazmit DNA izolasyon kiti (Fermentas), 5'/3' RACE Kit 2nd Generation

(Roche), Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific), LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche), Thermotools Cloning Kit (Biotools), RNeasy Mini Kit (Qiagen), TALON[®] Metal Affinity Resin (Takara) belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

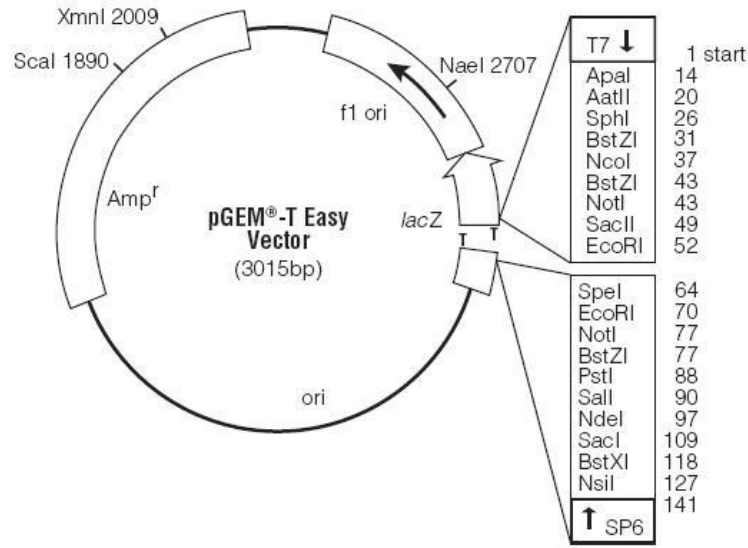
Tablo 2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve özellikleri

Adı	Özellikleri	Kaynak
<i>E. coli</i> JM101	01 F' <i>traD36 proA⁺B⁺</i> <i>lacI^qΔ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV</i> <i>thi⁺</i>	Laboratuvar Stoku
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA</i> <i>glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Laboratuvar Stoku
<i>E. coli</i> BL21 (D3) LysS	F, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), pLysS (Cam ^R)	Laboratuvar Stoku
<i>Thermus thermophilus</i> TH104 (pTT8)	proC4	Dr. Akira Nakamura, University of Tsukuba, Japan.
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	nar	Biotools B&M Labs S.A.
<i>Thermus</i> sp. M5	Doğal izolat	Laboratuvar Stoku
<i>Thermus scotoductus</i> K6	Doğal izolat	Laboratuvar Stoku

2.1.3. Kullanılan Vektörler

2.1.3.1 pGEM[®]-T Easy Vektörü

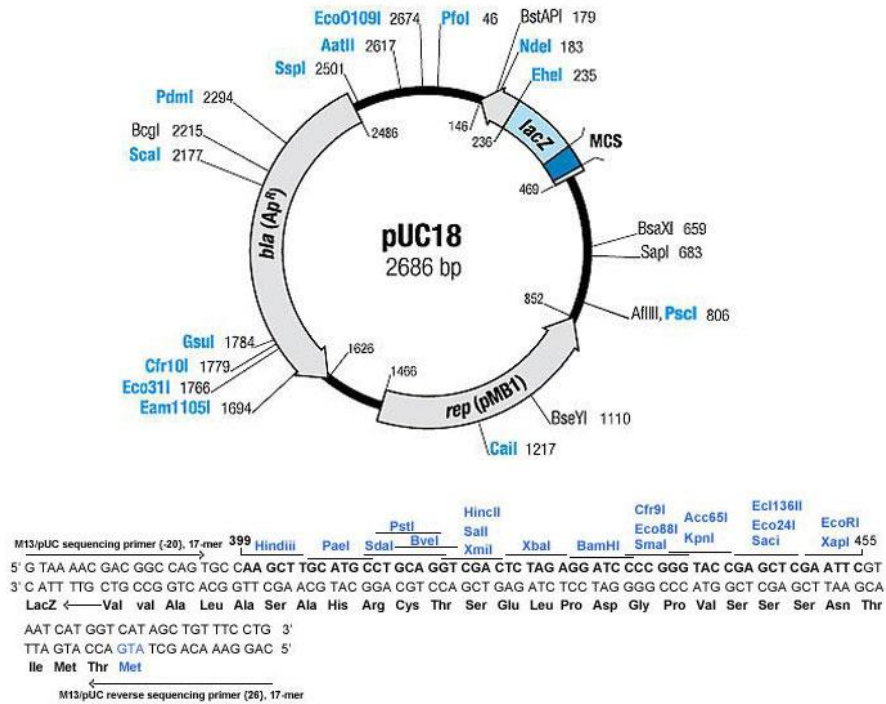
pGEM[®]-T Easy (Promega Inc.) PCR ürünlerinin klonlanması için uygun bir sistemdir. Yüksek kopya sayısına sahip vektör T7 ve SP6 RNA polimeraz promotörlerini içerir. β-galaktosidaz enziminin α-peptid kodlama bölgesi içerisine yerleştirilmiş bir MCS'ye (Çoklu Klonlama Bölgesi) sahiptir (Şekil 2). pGEM[®]-T Easy vektörü, PCR ürünlerinin klonlanmasında ve klonlama stratejilerinde kullanıldı.



Şekil 2. pGEM®-T Easy vektörünün şematik görünümü

2.1.3.2. pUC18 Vektörü

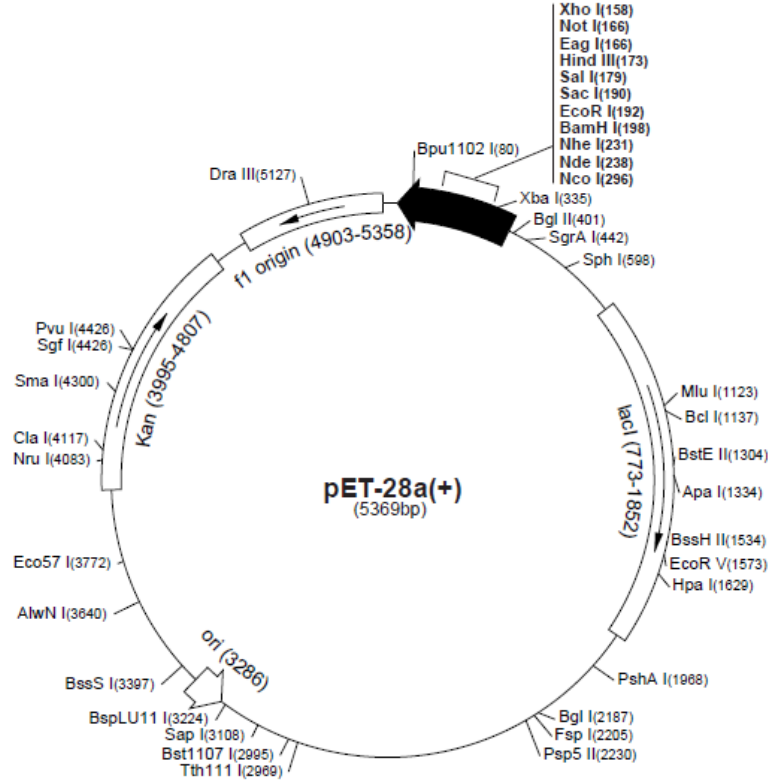
pUC18 klonlama vektörü restriksiyon endonükleazlarla kesim yapılan DNA parçalarının klonlanması için uygun bir sistemdir (Sambrook vd., 1989). pUC18 klonlama vektörü PCR ürünlerinin klonlanmasında ve hibrit vektörlerin tasarlanmasında kullanıldı.



Şekil 3. pUC18 vektörünün haritası

2.1.3.3. pET28a+ Vektörü

pET28a+ vektörü (Novagen Inc.) N-terminal bölgesinde His•Tag[®]/thrombin/T7•Tag[®] ve C-terminal bölgesinde de opsiyonel His•Tag dizisi taşır. Harita üzerinde tek kesim bölgeleri gösterilen vektör (Şekil 4), pHIG22 (Ek-1 ve Ek-2) plazmiti ile hibrit vektörlerin tasarlanmasında ve klonlama stratejilerinde kullanıldı.

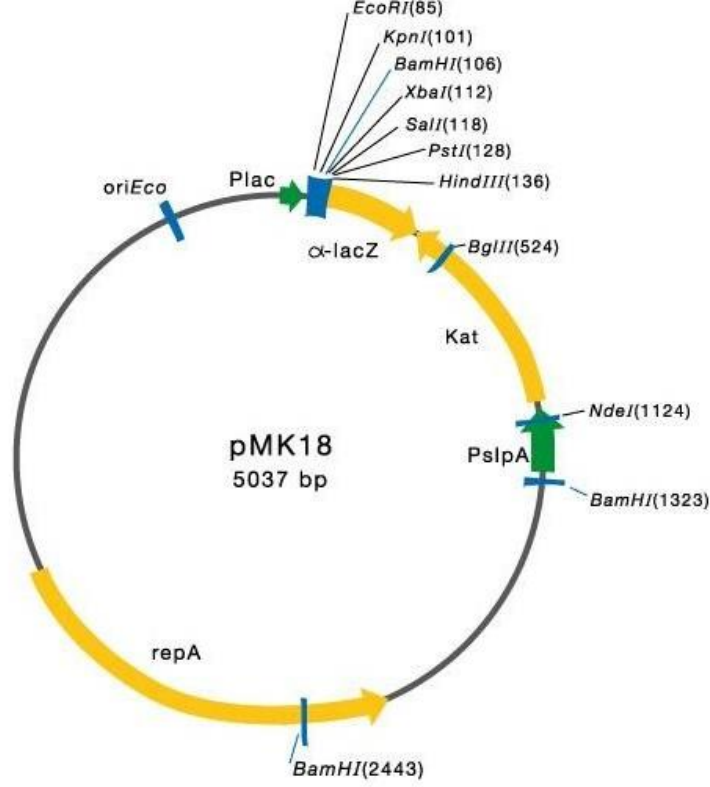


Şekil 4. pET28a+ vektörünün haritası

2.1.3.4. pMK18 Vektörü

pMK18 plazmiti (Biotools Inc.), *Thermus thermophilus* genomundan alınan spesifik dizileri içeren pUC-tabanlı bir plazmittir. Plazmitin taşıdığı HTK (highly thermostable kanamycine cassette) geni shuttle promotora sahip olup, hem *E.coli* hücrelerinde hem de *T. thermophilus* HB27 hücrelerinde aktiftir (Şekil 5). pMK18 plazmiti, shuttle bir vektör olup hem *E.coli* hem de *Thermus* suşlarında replike olabilecek özellikleri taşımaktadır. Plazmitin sahip olduğu HTK kaseti pHIG22 karakterizasyonunda birçok aşamada

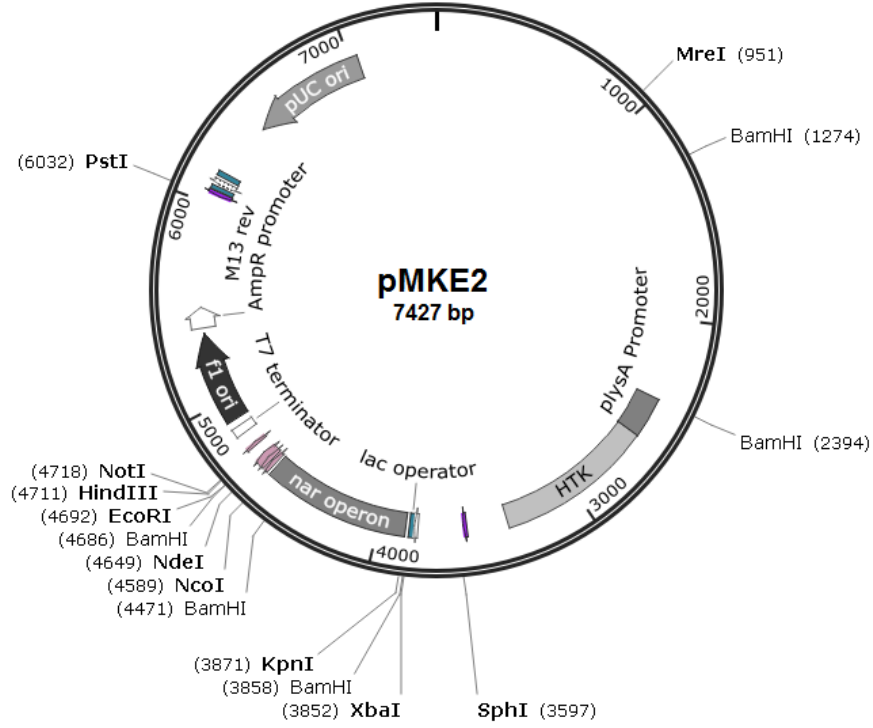
kullanıldı. pHIG22 ile hibrit plazmitlerin oluşturulmasında pMK18 plazmitinden yararlanıldı.



Şekil 5. pMK18 vektörünün haritası

2.1.3.5. pMKE2 Vektörü

pMKE2 plazmiti (Biotools Inc.) *E.coli-Thermus* suşlarında replike olabilen shuttle bir vektördür. HTK (Highly thermostable kanamycine cassette) kaseti, MCS bölgesi ve P_{nar} promotor bölgesi içerir (Şekil 6). P_{nar} promotoru MCS bölgesinden klonlanan genlerin *Thermus thermophilus*'da ekspres edilmesini sağlamaktadır. pHIG22 tabanlı ekspresyon plazmitinin oluşturulmasında kullanıldı.



Şekil 6. pMKE2 vektörünün haritası

2.1.4. Kullanılan Besiyerleri

2.1.4.1. Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar Besiyeri

<u>Bileşen adı</u>	<u>Miktar</u>
Tripton	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	1000 mL

Yukarıda belirtilen oranlarda hazırlanan içerikler karıştırıldıktan sonra pH değeri 7,0'a ayarlanır ve besiyeri 121 °C'de 15 dk. süre ile sterilize edilir. Besiyerine istendiğinde % 1,2 agar ilavesi ile LB agar yapılır (Luria S., 1984).

Gerekli olduğunda sıvı ve katı besiyerlerine aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda uygun antibiyotikler ilave edildi. pUC18, pET28a+, pMK18 ve pMKE2 plazmitlerini barındıran *E.coli* JM101, BL21 ve DH5α hücreleri için; amfisilin 50 µg/mL ve kanamisin 50 µg/mL olacak şekilde kullanıldı.

2.1.4.2. TM (*Thermus Medium*) Sıvı-Agar Besiyeri

<u>Bileşen Adı</u>	<u>Miktar</u>
Polipepton	4 g
Yeast Ekstrakt	2 g
NaCl	1 g
*Castenholz sol.	100 mL
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır (pH 7,5).

*Castenholz sol.

Nitrilotriasetik asit	1 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
NaCl	0,08 g
KNO ₃	1,03 g
NaNO ₃	6,89 g
Na ₂ HPO ₄	1,11 g
FeCl ₃ (0.01 M)	1 mL
**Nitch sol.	10 mL
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır (pH 8,2)

**Nitch sol.

H ₂ SO ₄	0,5 mL
MnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CuSO ₄	0,016 g
H ₃ BO ₄	0,5 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,046 g
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır.

Yukarıda belirtilen oranlarda hazırlanan içerikler karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 15 dk. süre ile sterilize edilir. Besiyerine istendiğinde % 2-2,5 agar ilavesi ile TM agar yapılır.

Gerekli olduğunda sıvı ve katı besiyerlerine aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda uygun antibiyotikler ilave edildi. *Thermus thermophilus* HB27 için; amfisilin 30 µg/mL, kanamisin 30-50 µg/mL olacak şekilde kullanıldı. Hibrit vektörleri taşıyan *Thermus thermophilus* TH104 (pTT8), *Thermus* sp. M5 ve *Thermus scotoductus* K6 için; amfisilin 50 µg/mL ve kanamisin 50-60 µg/mL olacak şekilde kullanıldı.

2.1.4.3. Modifiye Edilmiş TM Besiyeri

<u>Bileşen Adı</u>	<u>Miktar</u>
Polypeptone	4 g
Yeast extract	2 g
Tryptone	2 g
NaCl	1 g
Nişasta (Önce bir miktar ddH ₂ O'da çözülür)	2 g
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,12 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	0,13 g
KNO ₃	0,103 g
NaNO ₃	0,689 g
Fe II Sitrat (0,1 M)	200 µl
İz Element	10 mL
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır (pH 7,5)

İz Element Solüsyonu:

H ₂ SO ₄	0,50 mL
MnSO ₄ · H ₂ O	2,28 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,50 g
H ₃ BO ₃	0,50 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,045 g
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır.

Yukarıda belirtilen oranlarda hazırlanan içerikler karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 15 dk. süre ile sterilize edilir. Besiyerine istendiğinde % 2-2,5 agar ilavesi ile TM agar yapılır.

Gerekli olduğunda sıvı ve katı besiyerlerine aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda uygun antibiyotikler ilave edildi. *Thermus thermophilus* HB27 için; amfisilin 30 µg/mL, kanamisin 30-50 µg/mL olacak şekilde kullanıldı. *Thermus thermophilus* TH104 (pTT8), *Thermus* sp. M5 ve *Thermus scotoductus* K6 için, amfisilin 50 µg/mL ve kanamisin 50-60 µg/mL olacak şekilde kullanıldı. Termofilik transformasyon metodu için kullanılacak besiyerine ilave olarak 0,35 mM Ca²⁺ ve 0,4 mM Mg²⁺ eklendi.

2.1.5. Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Plasmapper (Dong vd., 2004), OriFinder (Gao ve Zhang, 2008), Gentle V 1.9.4 (University of Cologne), BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999), FastPCR 6.1.53. beta 3 (Kalendar vd, 2009), BPROM (Softberry, URL-2), Promotor Predictor (URL-3, 2015), Neural Network Promoter Prediction (Reese vd., 2001), MOTIF (GenomeNet, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan) (URL-4), MCAST (URL-5), Gene Finding Programs (URL-6), Online Analysis Tools (URL-7), Repeats, Secondary Structure & Melting Temperature Tools (URL-8), Radar (NCBI) (URL-9), TMpred ve TMHMM programları (URL-10), BLAST (NCBI) (URL-11) Lasergene 9.1 (DNASTAR Inc.), SnapGene Viewer Version 2.2.2 (Biotech LLC) yazılımları ve araçları; primer dizaynı, sekans sonuçlarının incelenmesi, vektör tasarlanması, şekil çizimleri ve *Thermus scotoductus* K6 bakterisinden izole edilen pHIG22 plazmitinin detaylı biyoinformatik analizinde kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Biyoinformatik Analizler

Lasergene 9.1. (DNASTAR Inc.) yazılımı satın alınarak pHIG22 plazmit dizini üzerinde biyoinformatik analizler yapıldı, plazmitlerde replikasyondan sorumlu diziler olan palindrom ve iteron dizileri saptandı. Hibrit plazmitlerin tasarlanmasında ve transkriptlerin belirlenmesinde bu düzenleyici bölgelerden yararlanıldı.

OriFinder (Gao ve Zhang, 2008) programı ile pHIG22 genomundaki muhtemel ORF bölgeleri belirlendi ve yapılan deneysel çalışmalar bu diziler üzerinden tasarlandı.

Neural Network Promoter Prediction (Reese vd., 2001), BPROM (Softberry, URL-2) ve Promotor Predictor (URL-3, 2014) programları ile pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin promotor bölgeleri analiz edildi.

MOTIF (GenomeNet, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan) (URL-4) ve Online Analysis Tools (URL-7) araçları kullanılarak pHIG22 genomundaki muhtemel repA bağlanma bölgeleri ve replikasyon protein motifleri tarandı.

Tüm çalışmalarda kullanılan primerler FastPCR 6.1.53. beta 3 (Kalendar vd, 2009) ve SnapGene Viewer Version 2.2.2. (Biotech LLC) programları kullanılarak dizayn edildi ve çizilen haritalar üzerinde gösterildi.

2.2.2. pHIG22'nin Minimal Replikonunun Belirlenmesi

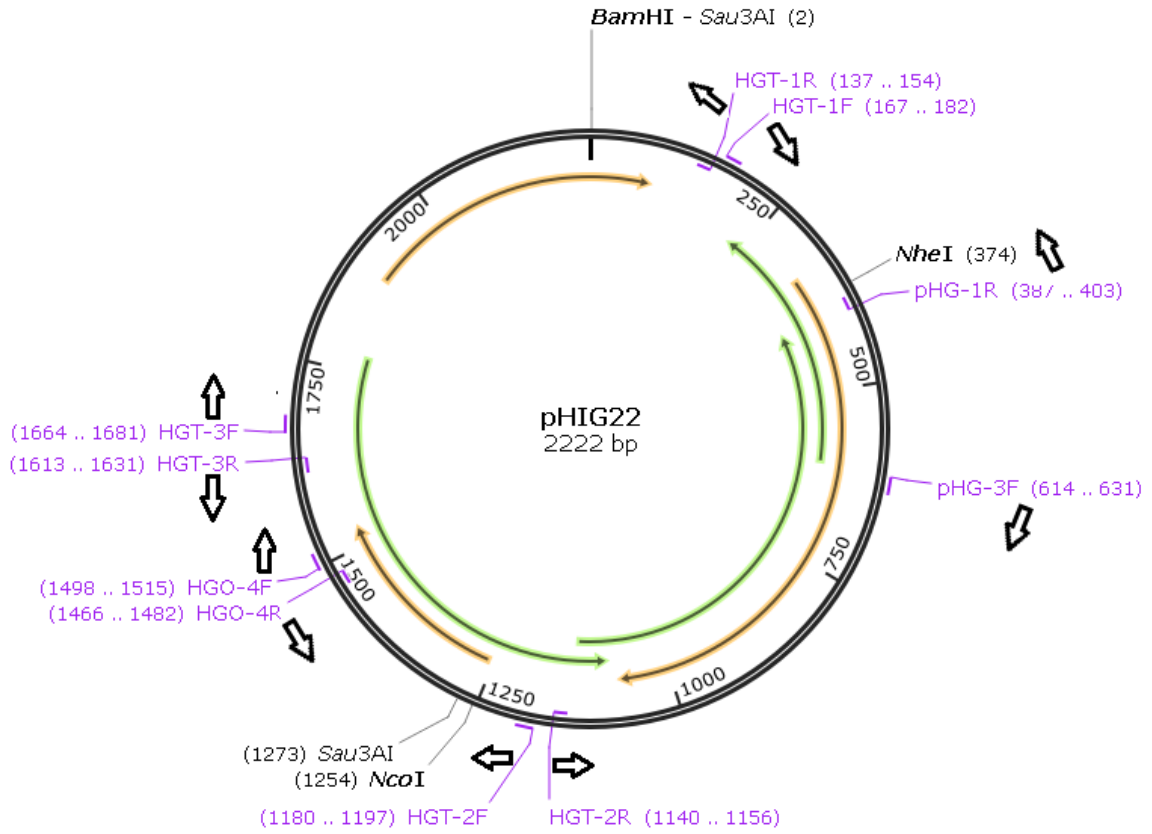
2.2.2.1. pHIG22 Parçalarının HTK Kaseti ile Birleştirilmesi ve *Thermus thermophilus* HB27'ye Transformasyon Çalışmaları

pHIG22 plazmiti kriptik bir plazmit olduğundan, herhangi bir direnç geni taşımamaktadır ve herhangi bir bakteriye transformasyonu sonucu seçilimi mümkün olamamaktadır. Bu yüzden pHIG22 plazmitinin bir direnç geni ile birleştirilmesi ve seçiliminin bu direnç geni ile yapılması gerekmektedir. Yapılan bu çalışma ile pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinden HTK kaseti (*Thermus* cinsinde aktif olan, yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimini kodlamaktadır) ile birleştirilmesi sonucu replikasyonunun incelenmesi hedeflendi.

Biyoinformatik analiz sonuçları dikkate alınarak, pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinden dizayn edilen 5 çift spesifik primer (Tablo 3, Şekil 7) kullanılarak PCR ile plazmitin tamamı veya hemen hemen tamamı çoğaltıldı (pHIG22 plazmitinin 5 farklı bölgeden PCR ile çoğaltılmasının amacı, olası replikasyon orijinini ya da RepA proteinini içeren bölgeleri tespit edebilmektir). PCR protokolü Tablo 4'te verilmektedir.

Tablo 3. Her bir pHIG22 fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri

pHIG22 Parçaları	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')	Çoğaltılan Hedef Bölge (bp)	Oluşturulan Plazmitin Adı
1. Bölge	HGT-1F	CCggAATTCAgCgTCCTCgggT TAg	2210 bp	pHIG-1
	HGT-1R	CCggAATTCggATACACCagg AggTg		
2. Bölge	HGT-2F	CCggAATTCgTgAACTTAggT AgCcag	2199 bp	pHIG-2
	HGT-2R	CCggAATTCACTggTTAgCAgg AAgc		
3. Bölge	HGT-3F	CCggAATTCCAAaggTCCCCAA TCCTAg	2190 bp	pHIG-3
	HGT-3R	CCggAATTCATAgAAgAAgCg TggCAAC		
4. Bölge	HGO4F	ggAATTC CCCCGAAAAGGGCA AGTGC	2207 bp	pHIG-4
	HGO4R	ggAATTC TATggCgTggCgggT g		
5. Bölge	pHG3Fw	ggAATTC CggATCCgACTTCC CTAggAACCTC	2012 bp	pHIG-5
	pHG1Rw	ggAATTC CggATCCgCTgggTT AggTgTTgTg		

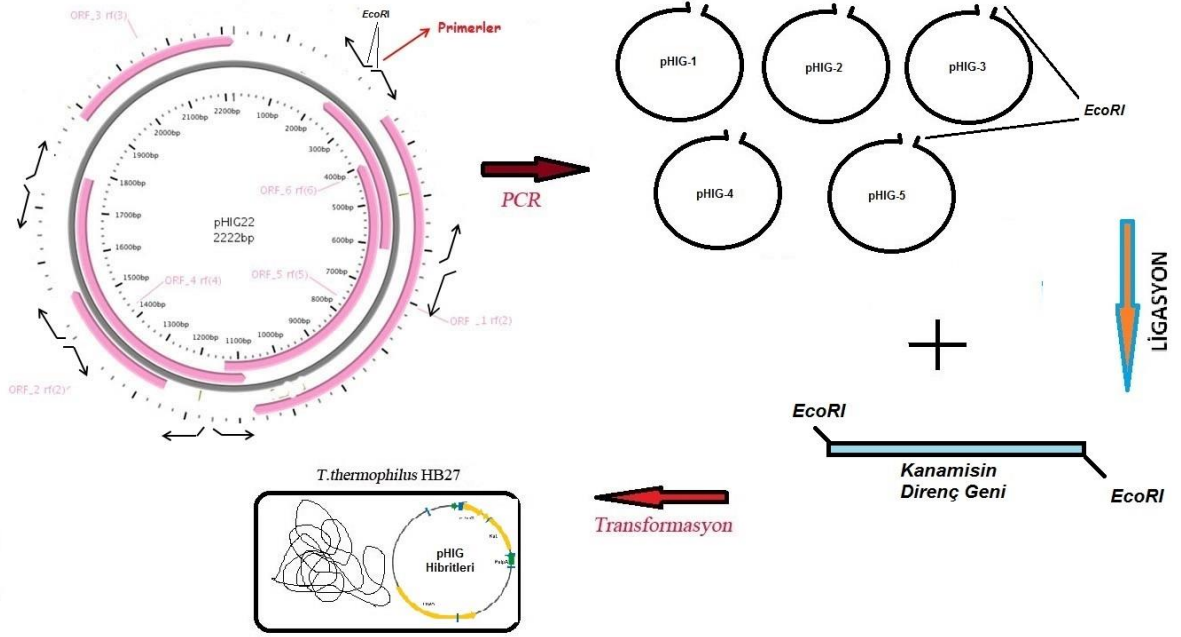


Şekil 7. pHIG22 fragmentlerinin amplifiye edilmesinde kullanılan primerlerin pHIG22 üzerinde eşleştiği bölgeleri gösteren plazmit haritası. Primer isimlerinin yanındaki rakamlar, primerlerin bağlandığı (başlangıç ve bitiş) baz numaralarını göstermektedir

Tablo 4. 5 farklı pHIG22 parçasının çoğaltılmasında kullanılan PCR programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
1 X	94 °C	2 dk.
36 X	94 °C	15 saniye
	62 °C	30 saniye
	72 °C	140 saniye
1 X	72 °C	7 dk.
	4 °C	∞

Çoğaltılan fragmentlerin, pMK18 plazmitinden spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan HTK kaseti ile doğrudan birleştirilmesi ve *Thermus thermophilus* HB27 suşuna transform edilmesi sonucu replike olabilen bölgesinin belirlenmesi amaçlandı. Yapılan çalışmanın şematizesi Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. HTK fragmenti ile farklı bölgelerden çoğaltılmış pHIG22 fragmentlerinin nasıl birleştirildiğini gösteren resim. Her bir pHIG22 PCR fragmenti, pHIG22 plazmitinin hemen hemen tamamını temsil etmektedir

HTK kaseti içeren pMK18 plazmiti, shuttle vektör olup hem *E.coli* hem de *Thermus thermophilus* HB27 kültürlerinde replike olabilmektedir. pMK18 plazmiti “highly thermostable kanamycin (HTK) geni” içermektedir. HTK geni de shuttle promotora sahip olup, hem *E.coli* hücrelerinde hem de *Thermus thermophilus* HB27 hücrelerinde aktiftir. Bu çalışmada kullanılan *Thermus* cinsi bakterilerin optimum büyüme sıcaklığı 65-70 °C’dir. Bu sıcaklıkta normal kanamisin nükleotidil transferaz veya bir başka antibiyotik direnç enzimi etkili değildir. HTK ise daha yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimi kodlamaktadır. Bu yüzden, pHIG22’nin karakterizasyonu çalışmalarında HTK enziminden yararlanıldı, çünkü normal kanamisin genlerinin (Neomycin phosphotransferase II [NPT II/Neo) ürettiği kanamisin enzimleri, *Thermus* cinsi bakterilerin optimum kültür şartlarında aktif değildir.

pHIG22 üzerindeki 5 farklı bölge için dizayn edilen primerler (5' uçlarına *EcoRI* kesim bölgesi ekli) kullanılarak PCR ile çoğaltılan 5 farklı pHIG22 fragmentine ve HTK kasetine *EcoRI* (Thermo Scientific) restriksiyon endonüklazı ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesim reaksiyonu yapıldı.

EcoRI endonükleazı ile kesim sonucu elde edilen aynı yapışkan uçlara sahip 5 farklı pHIG22 fragmentininin HTK kaseti ile birleştirilmesi için aşağıdaki ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 5. pHIG22 parçaları ve HTK için ligasyon reaksiyonu

İçerik	Hacim
10X T4 Ligasyon tamponu	1 µl
HTK kaseti (50 ng/µl)	1 µl
pHIG22 parçaları (40 ng/µl)	3 µl
T4 DNA ligaz (10 U/ µl)	1 µl
ddH ₂ O	4 µl
Toplam	10 µl

Ligasyon ürünlerinin 16 °C'de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası plazmitler, termofilik transformasyon tekniği ile *Thermus thermophilus* HB27 suşuna transform edildi (Koyama vd., 1986).

2.2.2.1.1. *Thermus thermophilus* HB27'ye Transformasyon

Thermus thermophilus HB27 bakterisinden modifiye TM besiyerine gecelik kültür için ekim yapıldı (kültür, yaklaşık 7-10 mL besiyeri içeren 50 mL'lik erlene atılmalıdır) ve 70 °C'de 150 rpm'de bir gece büyütüldü. En fazla 16 saat çoğaltılan hücrelerin yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Önceden 100 mL'lik erlene, 10 mL modifiye TM besiyeri eklendi ve 70 °C'de ısıtıldı. Büyüyen kültür spektrofotometrede 600 nm'de OD 0,1 olacak şekilde önceden ısıtılmış 10 mL'lik besiyerlerine inoküle edildi. 30 dk. 70 °C'de 150 rpm'de inkübe edildi. Üzerine 5-10 µl plazmit DNA ya da ligasyon ürünü eklendi. 70 °C'de 150 rpm'de 4 ila 6 saat arası inkübe edildi. Önceden 70 °C'de ısıtılmış

falkon tüpe kültür alındı ve 3.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı (yaklaşık 150-200 µl kalmasına dikkat edilir), tüpte kalan az sıvı kullanılarak pellet çözüldü ve önceden kademeli ısı artışı ile 70 °C'de ısıtılmış kanamisin (40-75 µg/µl) içeren modifiye TM besiyerlerine yayma ekim yapıldı. 2 ila 4 gün süre sonunda petrilere koloniler görülmeye başladı. Tüm aşamalarda; verimliliği etkileyen sıcaklık düşüşlerini engellemek için, aşamalar hızlı bir şekilde yapıldı (Koyama vd., 1986).

İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen rekombinant plazmitleri taşıyıp taşımadığı belirlendi.

2.2.2.2. pUC18/HTK Tabanlı Hibrit Plazmitlerinin Oluşturulması

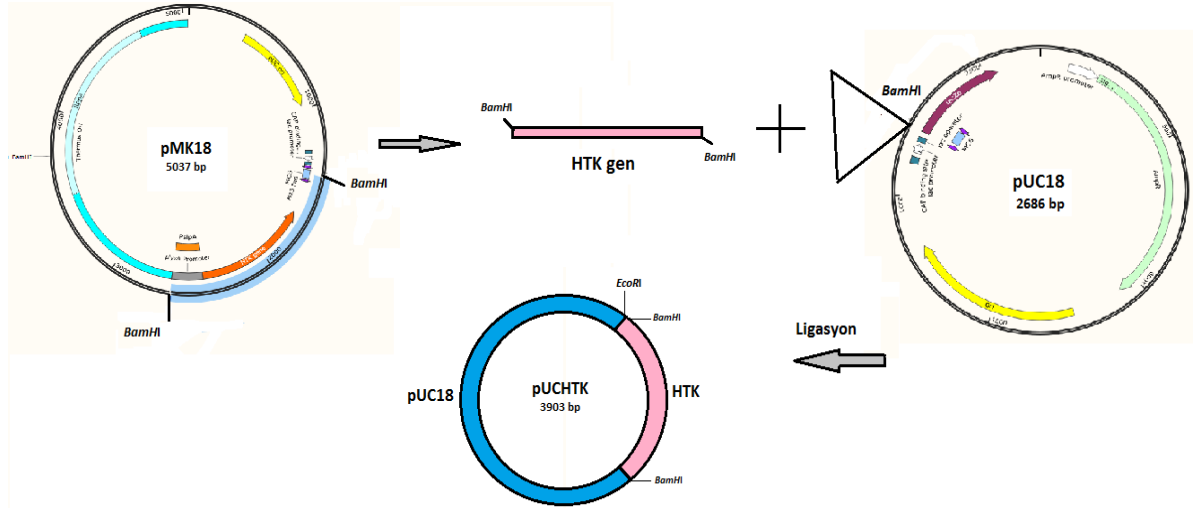
Bilindiği üzere pUC18 plazmiti *Thermus* cinsi bakterilerde replike olamamaktadır. Bu bilgidan yola çıkılarak; pUC18 plazmiti, HTK (yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimi kodlayan bölge) kaseti ve farklı bölgelerden PCR ile çoğaltılan pHIG22 fragmentleri birleştirilerek (pUC18+HTK kaseti+pHIG22) hibrit plazmitler oluşturuldu ve termofilik organizmalara transform edilerek replikasyon incelendi. Doğrudan ligasyon ürünlerinin transform edilmesi yerine, tüm klonların ilk olarak *E. coli* JM101 suşunda oluşturulması ve bu şekilde konak endonükleazlarından etkilenmenin minimize edilmesi amaçlandı. Bu yüzden, pHIG22 plazmitine farklı bölgelerden pUC18 plazmiti ve HTK kaseti sokularak elde edilen rekombinant plazmitler *E. coli* JM101 suşunda oluşturuldu ve elde edilen klonlar termofilik bakterilere transform edilerek pHIG22 parçalarının replikasyonunu sağlayabilmesi ve bu şekilde replike olabilen pHIG22 parçasının tespit edilebilmesi amaçlandı.

İlk olarak pMK18 plazmitinden HTK kasetinin bulunduğu (PslpA promotörü ile birlikte) bölge *Bam*HI restriksiyon endonükleazı ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesilerek çıkarıldı ve aynı endonükleaz ile kesilen pUC18 plazmiti ile bu bölgeden T4 DNA ligaz ile birleştirildi, ligasyon şartları Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. pUC18 ve HTK için ligasyon reaksiyonu

İçerik	Hacim
10X T4 Ligasyon tamponu	1 µl
HTK kaseti (50 ng/µl)	1 µl
pUC18 (20 ng/µl)	3 µl
T4 DNA ligaz (10 U/ µl)	1 µl
ddH ₂ O	4 µl
Toplam	10 µl

Elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna transform edildi. Oluşturulan plazmite pUCHTK adı verildi (Şekil 9).



Şekil 9. pUCHTK plazmitinin oluşturulmasının şematize edilmesi

2.2.2.2.1. *E. coli* JM101'e Transformasyon

Kompetent hücre hazırlamak için *E. coli* JM101 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 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 edildi.

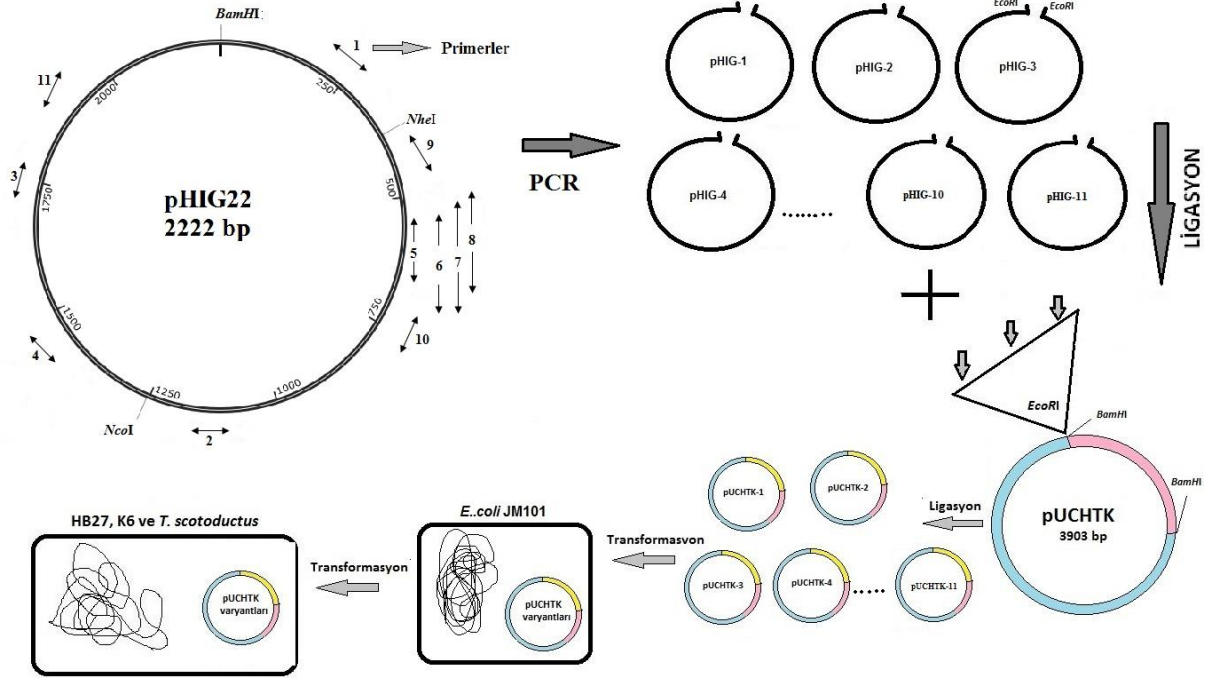
Transformasyon deneyi Sambrook vd., (1990) tanımladığı şartlarda gerçekleştirildi. Kompetent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu hücrelerin üzerlerine 10 µl ligasyon karışımından ilave edildi. Karışım 30 dk. buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 90 saniye 42 °C’de bekletildi. 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. Petriyerler 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakılarak 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerinde seçildi. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen parçaları taşıyan rekombinant plazmitler belirlendi.

Elde edilen pUCHTK plazmitine farklı pHIG22 parçalarının klonlanması için; pHIG22 plazmit genomuna spesifik 11 çift primer dizayn edildi (Tablo 7). Dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak, pHIG22 plazmiti PCR ile çoğaltıldı ve 11 farklı pHIG22 fragmenti elde edildi (daha önce “2.2.2.1 pHIG22 parçalarının HTK kaseti ile birleştirilmesi ve *Thermus thermophilus* HB27’ye transformasyon çalışmaları” başlıklı çalışmada kullanılan beş farklı pHIG22 fragmenti aynı şekilde bu çalışma için de kullanıldı).

Tablo 7. 11 farklı pHIG22 fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan primerler

pHIG22 Parçaları	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')	Primerin Bağlandığı Bölge	Çoğaltılan Hedef Bölge (bp)
1. Bölge	HGT-1F	CCggAATTCAGCgTCCTCgggTTag	137. bp	2210 bp
	HGT-1R	CCggAATTCggATACACCAggAggTg	167. bp	
2. Bölge	HGT-2F	CCggAATTCgTgAACTTAggTAgCag	1180. bp	2199 bp
	HGT-2R	CCggAATTCACTggTTAgCAGgAAgc	1140. bp	
3. Bölge	HGT-3F	CCggAATTCgAAggTCCCCAATCCTA g	1664. bp	2190 bp
	HGT-3R	CCggAATTCATAgAAgAAgCgTggCAA C	1613. bp	
4. Bölge	HGO4F	ggAATTCgAAAAgggCAAgTgC	1498. bp	2207 bp
	HGO4R	ggAATTCCTTATggCgTggCgggTg	1466. bp	
5. Bölge	pHG3Fw	ggAATTCgATCCgACTTCCCTAggA ACCTC	614. bp	2012 bp
	pHG1Rw	ggAATTCgATCCgCTgggTTAggTgT TgTg	387. bp	
6. Bölge	pHG1Rw	ggAATTCgATCCgCTgggTTAggTgT TgTg	387. bp	1949 bp
	HGO1F	ggAATTCACggCgAgCgTACCgAg	667. bp	
7. Bölge	pHGR305	ggAATTCgAAAAgCCgCCgggAgTTgg	305. bp	1871 bp
	HGO1F	ggAATTCACggCgAgCgTACCgAg	667. bp	
8. Bölge	pHG3Fw	ggAATTCgATCCgACTTCCCTAggA ACCTC	614. bp	1934 bp
	pHGR305	ggAATTCGAAAAAGCCGCCGGGAGT TGg	305. bp	
9. Bölge	HGO6F	ggAATTCCTCCCCATAgTCAAag	481. bp	2214 bp
	HGO6R	ggAATTCCTgCCTAACTTCTTCg	457. bp	
10. Bölge	HGO1F	ggAATTCACggCgAgCgTACCgAg	677. bp	2210 bp
	HGO1R	ggAATTCCTgggggCTgAggTTgAg	647. bp	
11. Bölge	HGO3F	ggAATTCCTCCAaggTCAGCgTC	1913. bp	2229 bp
	pHG5Rw	ggAATTCgATCCgCTggAggAgCTTg ATg	1904. bp	

PCR için kullanılan, pHIG22'ye spesifik her bir primerin 5' ucunda *EcoRI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi bulunmakta olduğundan, PCR ile üretilen her bir pHIG22 fragmentinin her iki ucunda da *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi oluşturuldu. Oluşturulan bu fragmentler, daha önce oluşturulan pUCHTK plazmitin *EcoRI* kesim bölgesine klonlandı (Şekil 10). Tüm klonlama işlemleri, *E. coli* JM101 suşunda yapıldı.



Şekil 10. pUCHTK/pHIG22 hibritlerinin (pUCHTK1-11 varyantları) oluşturulmasının şematize edilmesi

Elde edilen 11 farklı hibrit plazmit, *Thermus thermophilus* HB27, *Thermus* sp. M5 ve *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi barındıran orijinal suş) suşlarına termofilik transformasyon metoduna (Koyama vd., 1986) göre transform edildi.

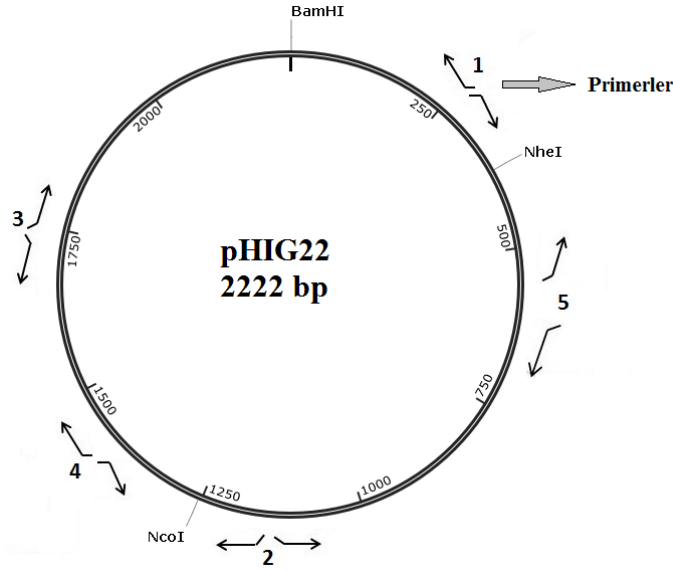
Yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda petrilerde oluşan koloniler kanamisinli TM besiyerinde gecelik kültürlerle alındı, gece kültürlerinin çöktürülmesi ile elde edilen pelletlerden MiniPrep (Fermentas) Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi ve sonuçlar agaroz jelde incelendi. İncelemeler sonucunda replike olabilen hibrit plazmit/plazmitler belirlendi.

Yapılan çalışma sonucunda replike olduğu belirlenen hibrit plazmit/plazmitlerin transform edildiği HB27 hücreleri, pozitif kontrol ve negatif kontrol hücreleri hizmet alımı yolu ile 2D jel analizine tabii tutularak (Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi, Proteomiks Laboratuvarı) pHIG22 tarafından kodlanması muhtemel Rep proteinleri tarandı. 2D jel analizi ile hücrelerin hücre içi protein profilleri karşılaştırılarak farklı spotlar belirlenmeye çalışıldı. Farklı olduğu belirlenen spotlar MALDI-MALDI/TOF analizine (Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi, Proteomiks Laboratuvarı) tabii tutularak incelendi.

2.2.3. *E. coli*'de Replikasyonun Araştırılması

Thermus cinsine ait plazmitlerin *E. coli* suşlarında replike olmadığı literatürden bilinmektedir (Vasquez vd., 1984), bunun teyiti için pHIG22 plazmitinin *E. coli* hücrelerinde replike olup olmadığı araştırıldı. Bu çalışmada, farklı bölgelerden çoğaltılan pHIG22 parçaları (bu parçalardan bir tanesinin *Thermus* cinsinde replike olduğu önceki çalışma ile belirlendiğinden, replike olabilen bu parçanın *E. coli* suşunda replike olmaması beklenmiştir) pET28a+ vektörü ile birleştirilerek hibrit vektörler oluşturuldu ve sonrasında pET28a+ replikasyon orijini silinerek oluşturulan rekombinant plazmitlerde pHIG22 replikasyon orijininin kullanımı sağlanarak *E. coli* suşlarında replikasyonu araştırıldı.

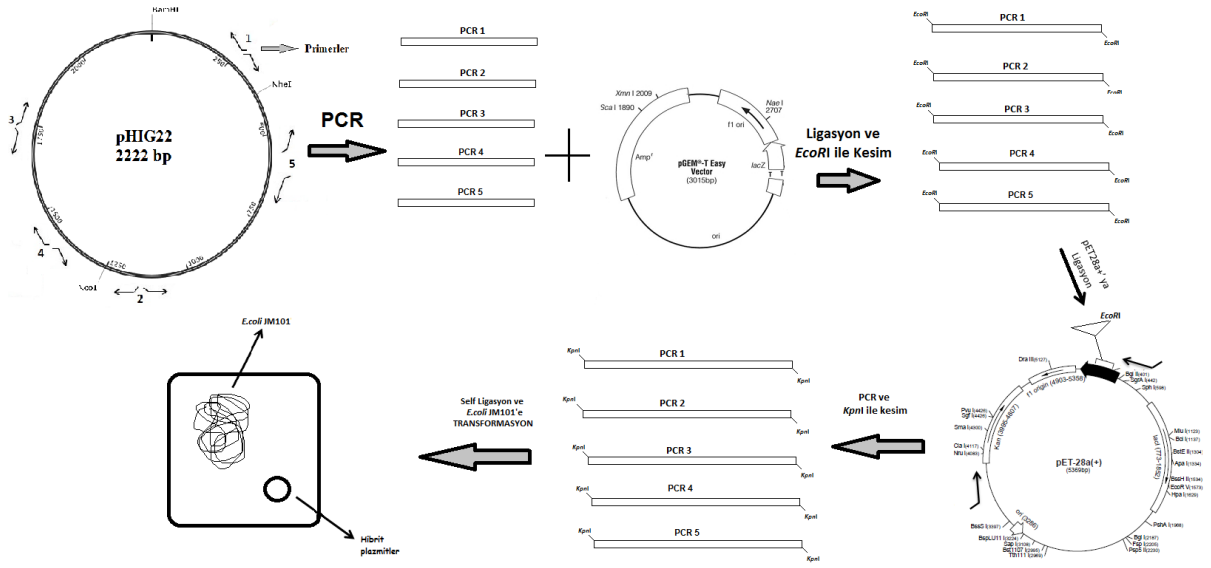
“2.2.2.1 pHIG22 parçalarının HTK kaseti ile birleştirilmesi” başlıklı çalışmada belirtilen spesifik primerler (Tablo 3) kullanılarak pHIG22 plazmitinin tamamı ya da tamamına yakını 5 farklı bölgeden PCR ile çoğaltılmış idi. Aynı pHIG22 parçaları bu çalışma içinde kullanıldı. Şekil 11'deki plazmit haritası üzerinde PCR ile çoğaltılan bölgeler gösterilmektedir.



Şekil 11. pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeleri gösteren resim

Elde edilen PCR ürünleri pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildi. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen

parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edildi. 5 farklı pHIG22 parçasını taşıyan rekombinant plazmitler (pGEM-T/pHIG22 plazmitleri) *EcoRI* endonükleazı ile kesilerek 5 farklı pHIG22 parçası bu plazmitlerden çıkarıldı (5 numaralı pHIG22 parçasından elde edilen pUCHTK-5 plazmitinin HB27 suşunda replike olduğu 3.2.2 başlıklı çalışmada belirlenmiştir). *EcoRI* tanıma dizisini içeren yapışkan uçlara sahip 5 farklı pHIG22 parçası, pET28a+ vektörüne *EcoRI* kesim bölgesinden klonlandı ve *E. coli* JM101 suşuna transform edildi (Şekil 12).



Şekil 12. *E. coli*'de replikasyonun incelenmesini şematize eden resim

E. coli JM101'e transform sonrası izole edilen plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Elde edilen 5 farklı pET28a+/pHIG22 hibritlerinden plazmit izolasyonu yapıldı ve pET28a+ replikasyon orijin bölgesinin çıkarılması ve sadece pHIG22 parçaları ve direnç geni (kanamisin kaseti) içeren konstraktların *E. coli*'de replikasyonunun incelenmesi için, spesifik primerler dizayn edildi (Tablo 8). Böylece, pHIG22 parçalarının ve kanamisin kasetinin doğrudan ligasyon yapılarak hücreye transform edilmesi yerine önceden pET28a+ plazmiti ile birleştirilmesi ve *E. coli* suşlarına transformasyon esnasında oluşabilecek degradasyonların engellenmesi amaçlandı. Bu şekilde spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen

fragmentlerin (pHIG22/kan kaseti) her iki ucunda *KpnI* tanıma dizisi oluşturuldu ve fragmentlerin self ligasyon ile kendi üzerine yapıştırılması sağlandı.

Tablo 8. pET28a+ plazmitinden replikasyon bölgesinin silinmesi için dizayn edilen primerler. Altı çizili sıralar *KpnI* tanıma dizisini göstermektedir

Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')	Tm (C°)
HIGK-F	<u>gggTACCCACgTTAAgggATTTT</u> ggTC	61,2 C°
HIGK-R	<u>gggTACCCATgACTggTggACA</u> g	61,2 C°

pET28a+/pHIG22 konstraktları kalıp olarak kullanılarak, HIGK-F ve HIGK-R primerleri (5' uçlarında *KpnI* restriksiyon tanıma dizileri ekli) ile yapılan PCR sonucunda 5 farklı fragment elde edildi ve bu fragmentler T4 DNA ligaz varlığında self ligasyon ile kendi üzerlerine yapıştırıldı. Elde edilen bu kendi üzerine yapıştırılmış 5 farklı konstrakt, *E. coli* JM101 ve *E.coli* BL21 suşlarına transform edildi ve transformasyon sonuçları incelendi.

2.2.4. *Thermus scotoductus* K6 İçin Plazmit Curing Çalışması

Bakterilerin bazı özelliklerinin belirlenmesinde, bu özelliklerin bakterinin sahip olduğu plazmitten mi kaynaklandığı yoksa bakterinin genomik özelliklerinin fenotipik sonucu olarak mı ortaya çıktığını anlamak için Curing Ajanları dediğimiz etmenlerden faydalanırız. Curing ajanları kimyasal maddeler veya fiziksel uygulamalar olabilirler. Bu ajanların bazıları DNA' da mutasyona neden olurlar. Özellikle plazmitin replikasyonuna müdahale ederler. Bazıları ise bakteri hücresinin yapısal bileşiklerini ve enzimlerini etkilerler. Kullanılan bu ajanlar çeşitli bakterilerin plazmitini kaybetmesine neden olurken, aslında bu tepki o plazmitin maruz kalınan ajana karşı verdiği bir cevaptır. Her plazmit için farklı maddeler farklı etki gösterebilirler. Bu yüzden Curing'de verim plazmite ve özellikle onu taşıyan bakteri hücresinin özelliğine bağlı olarak çok değişkenlik gösterebilir. Çoğu durumda Curing'e neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Şu ana kadar herkes tarafından kabul görmüş tüm plazmitlerde Curing'e neden olan bir etmen

bulunamamıştır. Bu yüzden bütün ajanlar deneme yanılma sonucu ve kullanma şartlarının değiştirilmesiyle ortaya çıkmaktadır (Vasquez vd., 1983; Grinsted vd., 1988).

Plazmit curing çalışmalarının, bakterilerde zor gerçekleşmesi, plazmit curing çalışmalarında kullanılan evrensel bir ajanın olmaması, her suş için ancak deneme yanılma yöntemiyle uygun ajanın tespit edilebilmesi ve hücrenin plazmitini bırakmasının yavaş ve uzun bir sürede olması aşılması gereken bir engeldir (Grinsted vd., 1988; Kulkarni ve Kanekar, 1997).

Yapılan bu çalışmada, *Thermus scotoeductus* K6 suşunun barındırdığı pHIG22 plazmitinin hücreden uzaklaştırılması ve curing yapılan K6 hücresi ile normal K6 hücresinin hücre içi protein profillerinin karşılaştırılarak pHIG22 tarafından kodlanabilecek proteinlerin tespit edilebilmesi amaçlandı ve bunun için aşağıdaki Tablo 9'da belirtilen farklı curing ajanları denendi. *Thermus scotoeductus* K6 izolatı 65-70 °C'de, yüksek O₂ varlığında çoğalabilen ve alt kültürleri zor yapılan bir bakteridir. Bu durum, plazmit curing çalışmalarının zor yapılmasına neden oldu. İlk olarak *Thermus scotoeductus* K6'nın daha kısa sürede çoğalabileceği, daha kolay inkübe edilebileceği uygun bir besiyeri olan modifiye TM besiyeri geliştirildi. Uygun besiyeri için birçok deneme yapıldı ve büyüme şartları değişikliklerine gidildi.

Literatürde *Thermus* cinsi bakterilerde curing ajanı olarak en fazla SDS, Etidyum Bromür ve Akridin Oranj kullanıldığı bilinmektedir (Vasquez vd., 1983; Kulkarni ve Kanekar, 1997). Bu yüzden bu ajanların farklı kombinasyonları kullanılarak (Tablo 9) birçok curing denemesi yapıldı.

Tablo 9. K6 suşu için yapılan curing denemelerinde kullanılan ajanlar ve son konsantrasyonları. Kullanılan tüm ajanlar modifiye TM besiyerinde hazırlandı

Deneme	Kullanılan Ajan	Son Konsantrasyon
1	Etidyum Bromür (1 µg/mL)	1 ppm
2	Etidyum Bromür (10 µg/mL)	10 ppm
3	Etidyum Bromür (50 µg/mL)	50 ppm
4	Etidyum Bromür (100 µg/mL)	100 ppm
5	Akridin Oranj (1 µg/mL)	1 ppm
6	Akridin Oranj (10 µg/mL)	10 ppm
7	Akridin Oranj (20 µg/mL)	20 ppm
8	Akridin Oranj (30 µg/mL)	30 ppm
9	Akridin Oranj (50 µg/mL)	50 ppm
10	SDS (30 µg/mL)	30 ppm
11	SDS (50 µg/mL)	60 ppm
12	SDS (80 µg/mL)	80 ppm
13	Akridin Oranj (1 µg/mL) + SDS (30 µg/mL)	1 ppm +30 ppm

Thermus scotoeductus K6 bakterisi Tablo 9’da belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan modifiye TM besiyerlerinde gecelik kültürler alındı. Büyüyen kültürlerin bir kısmının çöktürülmesi ile elde edilen pelletlerden MiniPrep (Fermentas) Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi ve sonuçlar agaroz jelde incelendi; bir kısmı ile de alt kültürler yapılarak herbir altkültürün plazmit yoğunluklarındaki değişimlerin incelenmesi sağlandı.

2.2.5. pHIG22 Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi

pHIG22 plazmitinden kodlanan transkriptlerin belirlenebilmesi için, ilk olarak *Thermus scotoeductus* K6 Total RNA’sı izole edildi. K6 Total RNA’sının kalıp olarak kullanılması ile plazmitin her iki zincirinde belirli aralıklarla farklı bölgelerden dizayn

edilen spesifik primerler kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Primerlerin dizayn edilme aşamasında biyoinformatik analizler ile tespit edilen muhtemel ORF bölgeleri dikkate alındı.

2.2.5.1. Total RNA İzolasyonu

Thermus scotoductus K6 suşu 2 mL TM besiyeri içerisinde 65 °C'de bir gece büyütüldü. Ertesi gün 1:100 oranında 5 mL taze TM 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.

Thermus scotoductus K6 pelletinden RNA izolasyonu Rneasy Mini (QIAGEN) Kiti üzerinde oluşturulan modifikasyonlar ile aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi.

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 dk.'dan 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 13.200 rpm (25 °C)'de 30 sn. santrifüj edildi.
6. 700 µl RW1 Tampon kolona ilave edildi ve 30 sn. 13.200 rpm (25 °C)'de santrifüj edildi.
7. 500 µl RPE (EtOH) Tampon kolona ilave edildi ve 2 dk. 13.200 rpm (25 °C)'de santrifüj edildi.
8. Kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirildi ve 1 dk. 13.200 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. 13.200 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 Inactivation Solusyonu eklenerek, yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi.

15. 10.000 rpm'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. 13.200 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 solüsyonu 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. 13.200 rpm (4 °C)'de 30 dk. santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

20. Pellet 750 µl % 70 Etil Alkol* ile yıkandı ve 13.200 rpm (4 °C)'de 15 dk. santrifüj edildi.

21. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında 30 dk. kuruması için bırakıldı.

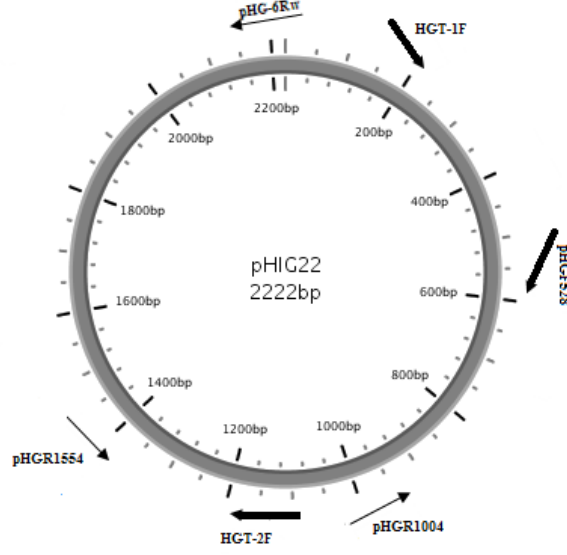
22. Pellet 20 µl RNase- free H₂O'da çözüldü ve NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçüldü.

*: DEPC'li ddH₂O ile hazırlanmalıdır.

2.2.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen K6 Total RNA'sının kalıp olarak kullanılması ile pHIG22 plazmitinin her iki zincirinden transkript kodlanıp kodlanmadığının belirlenebilmesi için, her iki

oryantasyonda belirli aralıklarla spesifik primerler dizayn edildi (Şekil 13). İlk zincir için 3 farklı bölgeden 3 gen spesifik primer, karşı zincir içinde yine 3 farklı bölgeden 3 gen spesifik primer dizayn edildi (Tablo 10).



Şekil 13. Dizayn edilen primerlerin pHIG22 üzerinde bağlandığı bölgeleri gösteren resim. Kalın oklar ilk zincire bağlanan primerleri, ince oklar karşı zincire bağlanan primerleri göstermektedir

Tablo 10. cDNA sentezinde kullanılan primerler ve özellikleri

	Primer Adı	Primer Sırası (5'- 3')	Bağlandığı bölge
İlk zincir	pHG-6Rw	gAgCCCATAgACTgggAggATCCTg	2222. bp
	pHG-R1554	gCgCTgCgggAgAgAgACTTC	1554. bp
	pHG_R1004	CATCACgCACgTTTTCCggAgg	1004. bp
Karşı zincir	HGT-1F	CCggAATTCaGcGTCCTCgggTTag	167. bp
	pHG-F528	gCgAAgCggATgCggAgAg	528. bp
	HGT-2F	CCggAATTCgTgAACTTAggTAgCcag	1180. bp

Dizayn edilen bu primerler kullanılarak ilk zincir cDNA sentezi, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Version 6.0 (Roche) kiti kullanılarak yapıldı. İlk aşamada Tablo 11’de belirtilen bileşenler hazırlandı.

Tablo 11. cDNA sentezi bileşenleri-1

İçerik	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
K6 Total RNA’sı	5 µl	1 µg
Spesifik Primer	1 µl	2 µM
DEPC’li ddH ₂ O ile tamamlanır.	7 µl	

Buz üzerinde hazırlanan karışım 65 °C de 10 dk. inkübe edildi (RNA denatürasyonu için) ve ardından hemen buz üzerine alındı. Daha sonra aşağıda belirtilen bileşenler içeriğe eklendi.

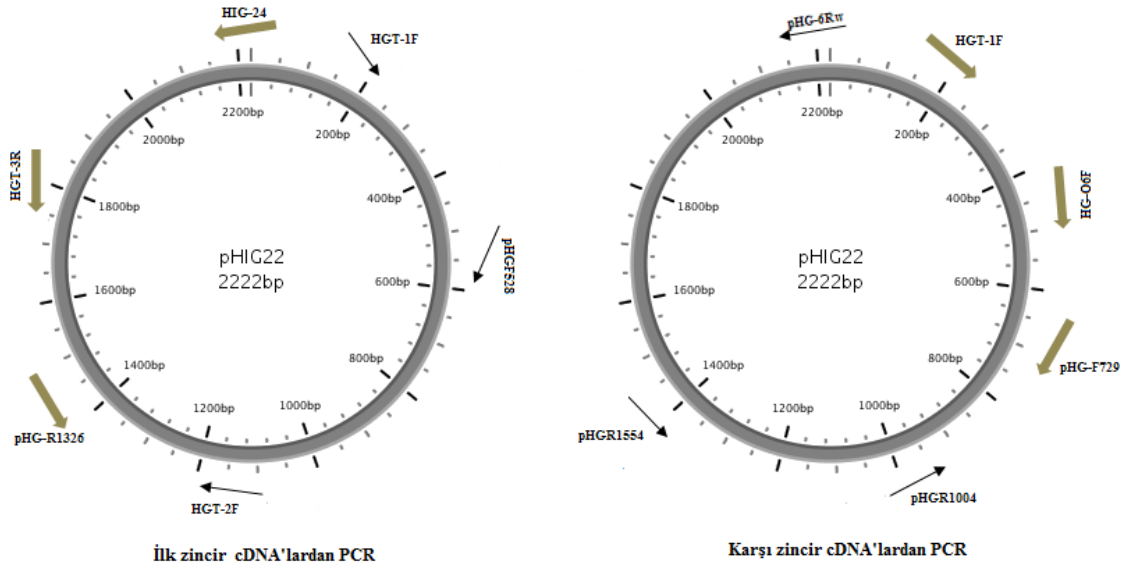
Tablo 12. cDNA sentezi bileşenleri-2

İçerik	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
Transkriptor Reverz Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5x Conc.	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Protektor RNaz İnhibitörü, (40 U/ µl)	0,5 µl	20 U
dNTP Karışım (10 mM)	2 µl	1 mM herbirinden
Transkriptor Reverz Transkriptaz (20 U/ µl)	0,5 µl	10 U
Toplam Hacim	20 µl	

Hazırlanan karışım dikkatlice karıştırıldı ve Thermal cycler (Biorad) cihazında 55 °C de 30 dk., ardından 85 °C de 5 dk. inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşturulan cDNA’lar hemen buz üzerine alındı ve PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere muhafaza edildi.

2.2.5.3. Oluşturulan cDNA'ların PCR ile Çoğaltılması

İki oryantasyonda 6 farklı primer kullanılarak yapılan ilk zincir cDNA sentez prosedüründe, hangi primerlerle ürün oluşturulduğunun tespiti ve oluşan bu ürünlerin muhtemel uzunluklarının belirlenebilmesi için farklı spesifik primerler (Tablo 13) dizayn edilerek PCR çalışması yapıldı. PCR çalışmasında kullanılan primerler, ilk zincir cDNA oluşturmada kullanılan primerlerin zıt yönünde olacak şekilde, cDNA'ların uzunluklarının belirlenebilmesi için belirli aralıklarla dizayn edildi (Şekil 14).



Şekil 14. cDNA oluşturmada kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeleri gösteren harita. İnce oklar ilk zincir cDNA oluşturmada kullanılan primerleri göstermekte olup, kalın oklar PCR reaksiyonunda kullanılan geri primerleri göstermektedir

Tablo 13. İlk zincir cDNA'ların PCR ile çoğaltılması için dizayn edilen spesifik primerler

	Primer Adı	Primer Sırası (5'- 3')	Bağlandığı bölge
İlk zincir	pHG-R1326	ACCGGGAGGTGGAGAGTCTG	1326. bp
	HGT-3R	CCggAATTCATAgAAgAAgCgTggCAAC	1554. bp
	HIG-24	CAGCTCCACCgACggAATgg	24. bp
Karşı zincir	pHG-F729	GCCTCTTCAACCGCCTCAGAG	729. bp
	HG-O6F	CCTCCCCATAgTCAAag	481. bp
	HGT-1F	CCggAATTCAGCgTCCTCgggTTAg	167. bp

Tablo 10’da belirtilen primerler kullanılarak yapılan ilk zincir cDNA sentez reaksiyonundan elde edilen ürünler kalıp olarak kullanılarak, Tablo 13’de belirtilen geri primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Her bir cDNA ürünü için oluşturulan PCR reaksiyonlarında kullanılan primer çiftleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 14. cDNA’ların PCR ile çoğaltılması sonucu beklenen fragment büyüklükleri. Kullanılan ileri primerler ilk zincir cDNA oluşturmada kullanılan primerlerdir. Geri primerler belirli aralıklarla olup, oluşan cDNA’ların büyüklüklerinin belirlenmesine göre dizayn edilmiştir

	İleri Primer	Geri Primer	Beklenen Fragment Büyükülüğü (bp)
İlk zincir	HGT-1F	pHG-R1326	1179 bp
		HGT-3R	1465 bp
		pHG-6Rw	2080 bp
	pHG-F528	pHG-R1326	818 bp
		HGT-3R	1104 bp
		pHG-6Rw	1719 bp
	HGT-2F	pHG-R1326	166 bp
		HGT-3R	452 bp
		pHG-6Rw	1067 bp
Karşı zincir	pHG-6Rw	pHG-F729	1518 bp
		HG-O6F	1766 bp
		HGT-1F	2080 bp
	pHG-R1554	pHG-F729	846 bp
		HG-O6F	1094 bp
		HGT-1F	1408 bp
	pHG-R1004	pHG-F729	297 bp
		HG-O6F	545 bp
		HGT-1F	859 bp

% 1,5’lik agaroz kullanılarak hazırlanan jel elektroforezi PCR ürününün görüntülenmesi için kullanıldı. Etidyum bromür ilave edilen jel, 110 Volt da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmentleri UV ışığı altında görüntüldü. Oluşan ürünler incelenerek hangi zincirden ve hangi bölgeden cDNA oluştuğu belirlendi.

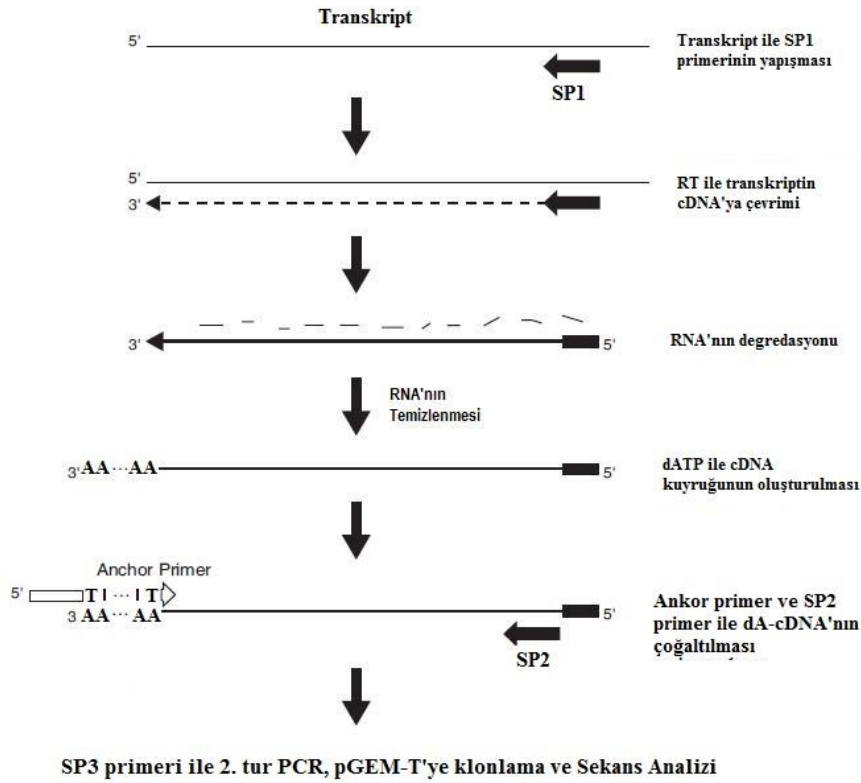
2.2.6. pHIG22 İçin RNA Analizleri, Transkriptlerin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi

pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin 5' ve 3' uçlarının belirlenmesi için aşağıdaki yöntemler uygulandı.

2.2.6.1. RACE Tekniği ile 5' Uç Belirleme

cDNA uçlarının hızlı çoğaltılması (Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)), bir transkriptin bilinen internal kısmından bilinmeyen 3' veya 5' uçları arasındaki nükleik asit sekansının çoğaltılması için yapılan bir yöntemdir. Transkriptin 5' ucunu çoğaltmak için Invitrogen tarafından hazırlanan 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Version 13, Roche) kullanıldı.

Bu sistem kullanılarak, ilk aşamada dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak ilk zincir cDNA oluşturuldu, oluşturulan cDNA saflaştırıldı, homopolimerik kuyruk eklendi ve hedef cDNA'lar PCR ile çoğaltılıp, sekans edildi. Bu prosedürler Şekil 15'te özetlenmektedir.



Şekil 15. 5' RACE tekniğinin şematik görünümü

Transkriptlerin 5' uçlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere SP1, SP2 ve SP3 primerleri (Tablo 15) dizayn edildi. SP1 primerleri pHIG22'nin iki zincirinden kodlanan iki transkripte spesifik olarak bağlanan ve ilk zincir cDNA'ları oluşturmada; SP2 ve SP3 primerleri de transkriptlerin internal bölgesine bağlanarak 1. tur ve 2. tur PCR ile 5' uçların çoğaltılmasında kullanıldı.

Tablo 15. RACE tekniği ile transkriptlerin 5' uçlarının belirlenmesinde kullanılan primerler ve özellikleri

	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')	Bağlandığı bölge	
İlk zincir için	SP1	HIG-784	ggCATggACTTTgCggAAgAgg	784. bp
	SP2	HIG-664	CTCgCCgTCTCggCACTATCC	664. bp
	SP3	HIG-576	gTTggTgggTTgggAgggCTC	576. bp
Karşı zincir için	SP1	HIG-1595	gAATgCCCCCTAACgCCCgTTg	1595. bp
	SP2	HIG-1692	CAAATgCggAgCggCAggAg	1692. bp
	SP3	HIG-1790	gCAggAACCTATCCAgCgCAC	1790. bp

İlk olarak pHIG22 tarafından kodlanan farklı iki zincirdeki transkriptlere SP1 primerlerinin yapışması ve ilk zincir cDNA'ların oluşturulması sağlandı. Bunun için gerçekleştirilen reaksiyon karışımı aşağıdaki Tablo 16'da gösterilmektedir.

Tablo 16. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-1

İçerik	Hacim (µl)
cDNA Sentez Tamponu	4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	2 µl
cDNA Sentez Primeri (SP1-12,5 µM)	1 µl
K6 Total RNA'sı (2 µg)	5 µl
Transkriptor Reverz Transkriptaz	1 µl
DEPC'li ddH ₂ O	7 µl
Toplam Hacim	20 µl

Karışım hazırlandıktan sonra ependorf tüpleri kısa bir santrifüj yapılarak Thermal Cycler (Biorad) cihazına yerleştirildi. İlk olarak 55 °C’de 60 dk. inkübe edildi, ardından enzim inaktivasyonu için 85 °C’de 5 dk. bekletildi. Reaksiyon sonunda elde edilen cDNA’lar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında temizlendi. Temizlenen ilk zincir cDNA’lara, homopolimerik A kuyruğu eklenmesi için Terminal Transferaz enzimi ve dATP kullanıldı. Uygulanan protokolün ilk basamağı Tablo 17’de görülmektedir.

Tablo 17. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-2

İçerik	Hacim (µl)
Temizlenmiş cDNA	19 µl
Reaksiyon Tamponu (10X)	2,5 µl
dNTP Karışım (2 mM)	2,5 µl
Toplam Hacim	24 µl

Karışım hazırlandıktan sonra ependorf tüpleri kısa bir süre santrifüj edilerek çepere bulaşmış olan karışım tüpün dibinde toplandı. 94 °C’de 3 dk. inkübe edildi ve ardından hemen buza alındı. Üzerine 1 µl Terminal Transferaz enzimi eklendikten sonra 37 °C’de 20 dk. inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra enzim inaktivasyonu için 70 °C’de 10 dk. inkübe edildi. Elde edilen ürünler Nested PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere buz üzerine alındı.

A kuyruğu eklenmiş cDNA parçalarının çoğaltılması için SP2 primerleri ve oligo dT-Ankor primeri kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 18’deki gibidir.

Tablo 18. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-3

İçerik	Hacim (µl)
dA Kuyruğu Eklenmiş cDNA	5 µl
Oligo dT-Ankor primer	1 µl
SP2 Primeri	1 µl
dNTP Karışım (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Taq Polimeraz Tamponu (5X)	10 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	28,75 µl
Toplam Hacim	50 µl

Yukarıdaki gibi hazırlanan karışıma Tablo 19’da verilen PCR protokolü uygulandı.

Tablo 19. RACE tekniğinde cDNA’dan PCR için protokol

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
1 X	94 °C	2 dk.
	94 °C	15 saniye
36 X	55 °C	30 saniye
	72 °C	40 saniye
1 X	72 °C	7 dk.
	4 °C	∞

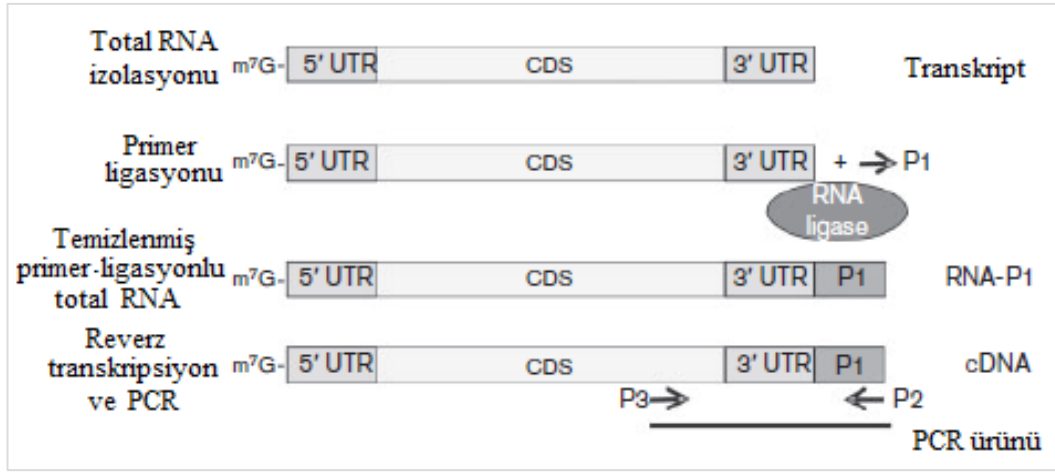
Reaksiyon sonunda elde edilen PCR ürünleri 1:20 oranında ddH₂O ile seyreltilerek 2. tur PCR için kalıp olarak kullanıldı. SP3 primerleri kullanılarak yapılan ikinci tur PCR reaksiyonunda yukarıdaki aynı reaksiyon şartları kullanıldı.

% 1,5’lik agaroz kullanılarak yapılan jel elektroforezi 2. tur PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için kullanıldı. Etidyum bromür ilave edilen jel, 110 Volt da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Görüntülenen DNA fragmentleri pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve

şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildi ve dizin analizi için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi.

2.2.6.2. LACE Tekniği ile 3' Uç Belirleme

pHIG22 transkriptlerinin 3' uçlarının belirlenmesi için LACE (ligation based amplification of cDNA ends) tekniği kullanıldı (Frohman vd., 1988; Ince vd., 2013). Şekil 16'da LACE tekniğinin şematik gösterimi anlatılmaktadır.



Şekil 16. LACE (ligation based amplification of cDNA ends) tekniğinin şematik gösterimi

LACE tekniğinde, ilk olarak 5' ucu fosforillenmiş bir primer (P1) ilgili transkriptin 3' ucuna RNA ligaz ile yapıştırılır. Ardından P1 primerine komplementer olan ters yönde başka bir primer (P2), P1 primerine bağlanır ve reverz transkripsiyon ile cDNA elde edilir. Elde edilen cDNA üçüncü bir primer (P3) kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Oluşan ürün TA klonlaması yapılarak sekans edilir. Yapılan bu çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri Tablo 20'de gösterilmektedir.

Tablo 20. LACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')	Özelliği
P1-HG	[Phos]gACCACgCgTATCg ATgTCgAC(T) ₁₅ VN	5' ucu fosforillenmiş, bir kısmı P2-HG primerine ters yönde komplementerdir, transkriptin 3' ucuna RNA ligaz ile yapıştırıldı ve cDNA sentezlemede kalıp olarak kullanıldı
P2-HG	ATCgATACgCgTggTC	Ankor primer olarak kullanıldı, P1-HG primerine kısmen komplementerdir. cDNA sentezi bu primerin bağlandığı bölgeden başlar
HIG-1595	gAATgCCCCCTAACgCCC gTTg	Transkript 1'in 3' ucunun çoğaltılmasında kullanıldı.
HG-O1R	CTgggggCTgAggTTgAg	Transkript 2'nin 3' ucunun çoğaltılmasında kullanıldı

Yukarıda anlatıldığı gibi yapılan metottaki reaksiyon bileşenleri Tablo 21'de gösterilmektedir.

Tablo 21. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-1

İçerik	Hacim (µl)
K6 Total RNA'sı (2 µg/µl)	10 µl
BSA (0,1 mg/mL)	5 µl
RNA Ligaz Tamponu (10x)	5 µl
ATP (1 mM)	5 µl
5'-Fosforillenmiş Primer (P1-HG) (100 µM)	2 µl
RNA Ligaz (10 U/µl)	6 µl
DEPC'li ddH ₂ O	7 µl
Toplam Hacim	40 µl

Hazırlanan karışım 16 saat 4-8 C° arasında inkübe edilerek transkriptlerin 3' uçlarına fosforillenmiş primerler takıldı. Oluşan ürünün tamamı alınarak Tablo 22'de belirtilen bileşenler karışıma eklendi.

Tablo 22. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-2

İçerik	Hacim (µl)
Önceki Toplam Bileşen	40 µl
Ankor Primer (P2-HG) (5 µM)	10 µl
dNTP Karışım (2mM)	20 µl
Toplam Hacim	70 µl

Hazırlanan karışım 65 C°'de 5 dk. inkübe edilerek RNA'daki sekonder yapıların açılması sağlandı, ardından hemen buz üzerine alınarak soğutuldu ve tamamı alınarak üzerine Tablo 23'te belirtilen bileşenler ilave edildi.

Tablo 23. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-3

İçerik	Hacim (µl)
Önceki toplam bileşen	70 µl
First-strand Tamponu (5X)	20 µl
DTT	5 µl
Rnasin (Promega) (2 U/µl)	1 µl
Superscript RT Enzim (10 U/µl)	4 µl
Toplam Hacim	100 µl

Hazırlanan karışım 55 C°'de 60 dk. inkübe edilerek cDNA sentezi yapıldı. Ardından enzim inaktivasyonu için 72 C°'de 15 dk. bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Oluşan ürünler hemen buz üzerine alınarak sonraki adım olan PCR reaksiyonuna geçildi.

Her iki transkript için elde edilen cDNA'ların 5' uçlarının çoğaltılması için uygulanan PCR bileşenleri ve protokolü sırasıyla Tablo 24 ve 25'te verilmektedir.

Tablo 24. LACE tekniğinde kullanılan PCR bileşenleri

İçerik	Hacim (µl)
5X Taq DNA Polimeraz Tamponu	10 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP Karışım (10mM)	1 µl
P2-HG (10 pmol/ µl)	1 µl
HIG-1595 ve HG-O1R (10 pmol/ µl)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
Taq DNA Polimeraz	0,25 µl
ddH ₂ O	31,75 µl
Toplam Hacim	50 µl

Tablo 25. LACE tekniğinde kullanılan PCR protokolü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
1 X	94 °C	2 dk.
	94 °C	15 sn.
36 X	58 °C	30 sn.
	72 °C	45 sn.
1 X	72 °C	7 dk.
	4 °C	∞

% 1,5'lik agaroz kullanılarak yapılan jel elektroforezi için elde edilen 2 PCR ürününün görüntülenmesinde kullanıldı. Etidyum bromür ilave edilen jel, 110 Volt'da yaklaşık yarım saat yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Görüntülenen DNA fragmentleri pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildi ve dizin analizi için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi.

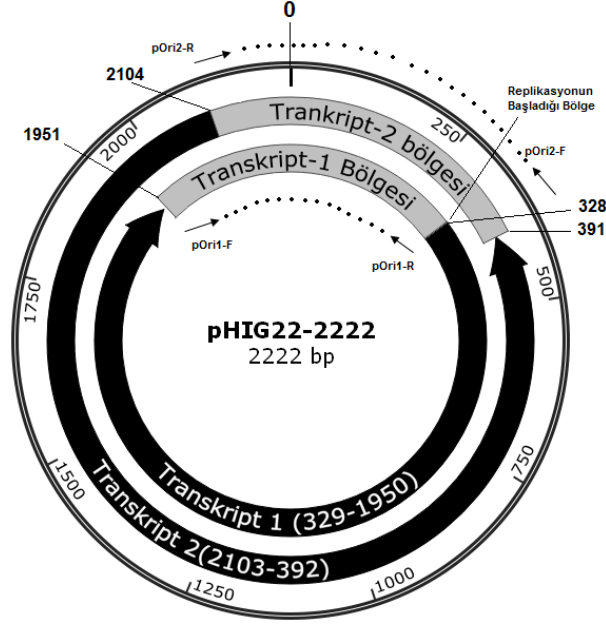
2.2.6.3. pHIG22 Transkriptlerinin Düzenleyici Bölgelerinin Analizi

BPROM (Softberry, URL-2), Promotor Predictor (URL-3, 2015) ve Neural Network Promoter Prediction (Reese vd., 2001) araçları ile yapılan analizler sonucunda her iki düzenleyici bölgede promotor diziler tarandı ve deneysel çalışmalar, elde edilen bu verilere göre devam ettirildi.

Biyoinformatik analiz sonuçlarının deneysel çalışmalarla desteklenmesi için yapılan bu çalışma ile pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin upstream bölgelerinde bulunan düzenleyici bölgelerinin çıkarılarak başka bir genin önüne eklenmesi ve eklenen bölgelerin promotor özelliği olup olmadığının bu genin ekspresyonuna bakılarak belirlenmesi hedeflendi.

pHIG22 plazmitinden kodlanan 2 transkriptin upstream bölgesinde bulunan bölgeler (yaklaşık 500- 600 bp) önceki çalışmalarda kullanılan ve transkripsiyon başlama noktası (+1 pozisyon) bilinen HTK genine (Fernandes-Herrero vd., 1997) upstream bölgesinden birleştirildi. Birleştirilen fragmentler pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Tüm klonlama işlemleri *E. coli* JM101 suşunda amfisilinli ortamda (pGEM-T Easy vektörü β -laktamaz enzimi kullanıldı) yapıldı. Transformasyon sonucu kanamisinli petrilerde (HTK geninin ekspresyonunun teşvik edilmesi için) koloni oluşup oluşmamasına göre sonuçlar değerlendirildi. Yapılan çalışmanın detayları şu şekildedir:

Şekil 17'de gösterilen, pHIG22 tarafından kodlanan 2 transkriptin upstream bölgesi, dizayn edilen spesifik primerler (Tablo 26) (geri primerlerin 5' uçları HTK geninin +1 pozisyonuna komplementer olup, iki parçanın PCR ile birleştirilmesi için uygundur) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı.

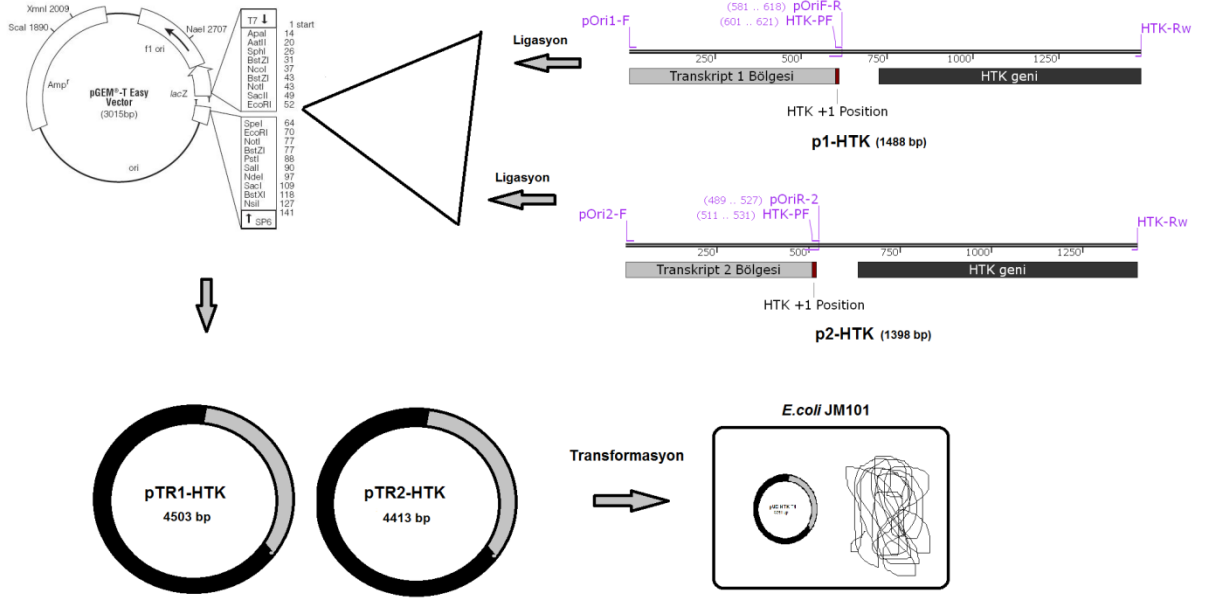


Şekil 17. pHIG22 transkriptlerinin düzenleyici bölgelerinin harita üzerinde gösterimi. Ok işaretleri primerlerin bağlandığı bölgeleri göstermektedir

Tablo 26. pHIG22 transkriptlerinin upstream bölgelerinin ve HTK geninin birleştirilmesi için kullanılan primerler. İtalik dizi pHIG22 dizisini, kalın yazılı dizi ise HTK genine komplementer olan diziyi göstermektedir

Çoğaltılan Bölge	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')
Transkript 1 upstream Bölgesi	pOri1-F	<i>gACCCCgCCAgCgTACACCTC</i>
	pOri1-R	<i>gCCCTTTTCCCCgCATCAAAGAAAAgCCgCCgggAg</i>
Transkript 2 Upstream Bölgesi	pOri2-F	<i>TgTggTTgCAAAGCTAgCggCTg</i>
	pOri2-R	<i>CCCTTTTCCCCgCATCgCCgggggggggCgggCCTTCAG</i>
HTK Kaseti	HTK-PF	<i>gATgCggggAAAAAgggCTCC</i>
	HTK-Rw	<i>CCggAATTCTCCgTTCAAATggTATgCg</i>

PCR ile çoğaltılan her iki fragmentin, HTK geninin +1 pozisyonuna komplementer sarkık uç oluşturması sağlandı. HTK-PF ve HTK-Rw primerleri ile çoğaltılan HTK geni, bu iki fragment ile spesifik primerler (Transkript 1 için pOri1-F/HTK-Rw, Transkript 2 için pOri2-F/HTK-Rw primerleri kullanıldı) kullanılarak PCR ile birleştirildi. Yapılan çalışma Şekil 18'de şematize edilmektedir.



Şekil 18. pTR1-HTK ve pTR2-HTK'nin oluşturulmasını şematize eden resim

Birleştirilmiş 2 fragmente sırasıyla p1-HTK ve p2-HTK adları verildi. Bu 2 fragment pGEM-T Easy vektörüne TA klonlaması kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında klonlandı ve *E. coli* JM101 suşuna transform edildi. Elde edilen plazmitlere pTR1-HTK ve pTR2-HTK adları verildi. Klonları taşıdığı belirlenen hücreler kanamisinli LB agar (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ kanamisin) petrilere çizgi ekim yapılarak koloni oluşup oluşmadığı incelendi.

Büyüme olduğu tespit edilen petrilere LB (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ kanamisin) besiyerine gecelik kültürler atıldı. Ertesi gün büyüyen kültürlerden spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümler yapılarak OD 0,1 olacak şekilde yeni kültürler hazırlandı. Her yarım saatte büyüyen kültürlerden örnek alınarak ölçüm yapıldı ve her iki hücrenin çoğalma eğrisi oluşturuldu. Elde edilen verilere t-testi uygulandı ve sonuçlar yorumlandı.

2.2.7. pHIG22 Replikasyon Orijini ve Modunun Belirlenmesi

2.2.7.1. TEM Analizi ile pHIG22 Replikasyon Orijininin ve Replikasyon Modunun Belirlenmesi

pHIG22 plazmitinin replikasyon modunun ve orijininin belirlenmesi için transmisyon elektron mikroskobu çalışması yapıldı. Türkiye'de bu alanda çalışan bir bilim

insanına ulaşamadığından ve DNA'nın görüntülenebildiği herhangi bir araştırma merkezi bulunmadığından; yapılan çalışmalar, denemelere ve mevcut prosedürlerin geliştirilmesi esasına dayandı.

Burkardth ve ark.'larının geliştirdiği (1978) yöntemler modifiye edilerek hazırlanan numunelere, KTÜ Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı ve ESOGÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında TEM analizi yapıldı ve sonuçlar alındı.

Bilindiği üzere, halkasal plazmitlerde 3 genel replikasyon mekanizması vardır:

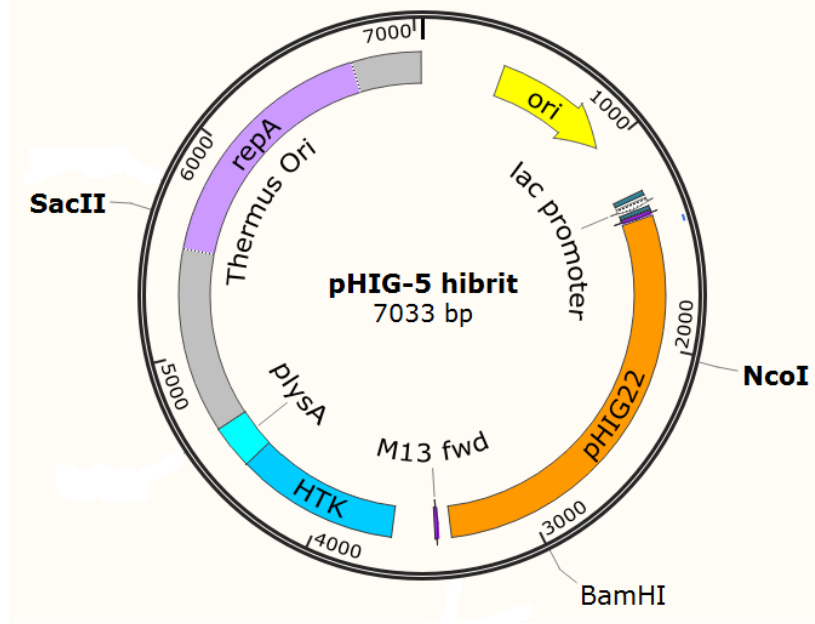
Teta tipi, zincir uzaklaştırma ve yuvarlanan çember (RC). Zincir uzaklaştırma replikasyon modu IncQ ailesindeki geniş konak spektrumlu plazmitlerle ilişkilidir. Bu yüzden pHIG22 plazmiti için Teta tip ve RC replikasyon modlarından birinin geçerli olduğu kabul edilip çalışmalar bu kapsamda yapıldı.

Teta tipi DNA sentezi bir veya daha fazla orijinden başlayabildiği, replikasyonun tek veya çift yönlü olabildiği, elektron mikroskobu (EM) altında replikasyon ara ürünlerinin tipik "Teta" harfinde görülebildiği, replikasyon bölgesini kesen enzimler tarafından bu ara ürünler kesildiğinde 'Y' şeklinde moleküller (çatallar) üretildiği literatürden bilinmektedir (del Solar vd., 1998).

pHIG22 plazmitini tek noktadan kestiği bilinen *BamHI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak ve kesilmemiş pHIG22 plazmiti kullanılarak elektron mikroskop preparatları hazırlandı. Yapılan kesim sonucunda oluşan ara ürünlerin çatallar üretilmediği, kesilmemiş olan plazmitin de "Teta" benzer yapılar oluşturup oluşturmadığı belirlendi. 3 tekrarlı olarak hazırlanan preparatlar TEM altında incelenerek görüntüler incelendi ve karşılaştırıldı. Ayrıca pHIG-5 plazmiti (Şekil 19) (pHIG22 ve pMK18 hibriti olan bu plazmitteki pHIG22 parçası *Thermus scotoductus* K6 suşunda replike olabilen parçadır) *SacII* ve *NcoI* restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesildi ve incelendi. Yapılan bu çalışma ile de pHIG22'nin, pHIG-5 hibritinin replikasyonunda etkili olup olmadığı ve replikasyon çatalı oluşturup oluşturmadığı araştırıldı. Yapılan incelemeler sonucunda pHIG22'nin replikasyon modu ve orijini belirlendi.

pHIG22 plazmitini barındıran *Thermus scotoductus* K6 suşundan ve pHIG-5 hibritini barındıran *Thermus thermophilus* HB27 suşundan modifiye TM besiyerine gecelik kültür atıldı ve gece kültürlerinin çöktürülmesi ile elde edilen pelletlerden MiniPrep (Fermentas) Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen pHIG22 plazmit DNA'ları *BamHI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile pHIG-5 plazmit DNA'ları ise *SacII* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesim

reaksiyonu yapıldı. Kesim sonucu elde edilen ürünler DNA Saflaştırma Kiti (Fermentas) ile temizlendi ve sonrasında ürünlere TEM analizi için aşağıdaki protokol uygulandı.



Şekil 19. Kullanılan restriksiyon endonükleazların pHIG-5 haritası üzerinde gösterimi

2.2.7.1.1. TEM (Transmission Electron Microscopy) Analizi İçin DNA Numunelerinin Hazırlanması

Kullanılan malzemeler:

- Amonyum Asetat : 0,25 M (pH 7,5)
- Sitokrom C : 1mg/mL
- Formwar kaplı Grid (100-200 mesh)
- ddH₂O'da hazırlanmış % 4'lük Uranil Asetat Solüsyonu
- Taze hazırlanmış Kurşun Sitrata boyası: Bir miktar su konular, üzerine 1,33 g Kurşun Sitrata ilave edilir, hafif çözüldükten sonra üzerine 1,76 g Sodyum Sitrata ilave edilir, bulamaç haline gelene kadar elde karıştırılır, sonra üzerine 8 mL 1 N NaOH ilave edilir ve 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.
- % 50'lik ethanol, steril ddH₂O
- Parafilm, Petri Kabı, İnce Uçlu Pens, NaOH'li petri kabı

Yöntem

Bir ependorf tüp içerisine konulan 40 µl 0,25 M Amonyum Asetat (pH 7,5) üzerine 10 µl plazmit DNA (0,5 ila 5 µg/mL) eklendi ve 1 dk. bekletildi. Üzerine 1 µl Sitokrom C (1mg/mL) ilave edildikten sonra birkaç kez alt üst edildi. Bir petri kabının içerisine bir parça parafilm konuldu ve hazırlanan karışım parafilm üzerine damlatıldı, petri kapatıldı ve 1 dk. bekletildi. Gridin formwar kaplı tarafı ince pens yardımıyla damlaya değdirildi ve 1 dk. bekletildi. Ardından zaman geçirilmeden alındı ve ddH₂O'da hazırlanmış Uranil Asetat içerisine Gridin formwar tarafı daldırıldı. 1 dk. bekletildi, çıkarıldı ve kurutma kağıdıyla Gridin kenarından fazla boyası alındı. Daha sonra kalan boyanın yıkanması için Grid 5-10 sn. steril ddH₂O içerisine daldırıldı, çıkarıldı ve fazla sıvı kurutma kağıdı ile alındı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı ve Grid iyice temizlendi. İçerisine parafilm konulmuş, önceden NaOH kullanılarak nemi çekilmiş petri kabına 50-200 µl Kurşun Sitrata damlatıldı, Gridin formwar tarafı gelecek şekilde damla tanesine değdirildi, 30 dk. boyunca boyandı. Boyama işlemi karanlık bir ortamda yapıldı. Ardından Grid 0,1 N NaOH yıkama çözeltisinden hızlıca geçirildi. Daha sonra ddH₂O ile yıkama aşamasına geçildi ve bu işlem 5 kez tekrarlandı, filtre kağıdı ile fazla su alındı. Bu aşamadan sonra kurutma aşamasına geçildi. Kurutma işlemi önceden içerisine 1-2 tane NaOH tanesi konulan ışık geçirmeyen küçük bir petri kabında yapıldı. Petri kabı içerisine konulan Gridlerdeki fazla nem NaOH tanecikleri tarafından tutularak kurutma işlemi tamamlandı ve hazırlanan örnekler ertesi gün TEM altında incelendi.

2.2.8. pHIG22'nin Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi

2.2.8.1. pHIG22 Varyantlarından pMK18 Plazmiti ile Hibrit Oluşturulması

Yapılan bu çalışmada pHIG22 tarafından herhangi bir rep proteini kodlanıp kodlanmadığının belirlenmesi için 2.2.2.1 başlıklı çalışmada kullanılan 5 farklı pHIG22 parçasının pMK18 vektörüne klonlanması ve oluşturulan hibrit vektörlerin ürettiği proteinlerin karşılaştırılarak farklı protein bantlarının (pHIG22 tarafından kodlanan) tespit edilebilmesi amaçlandı.

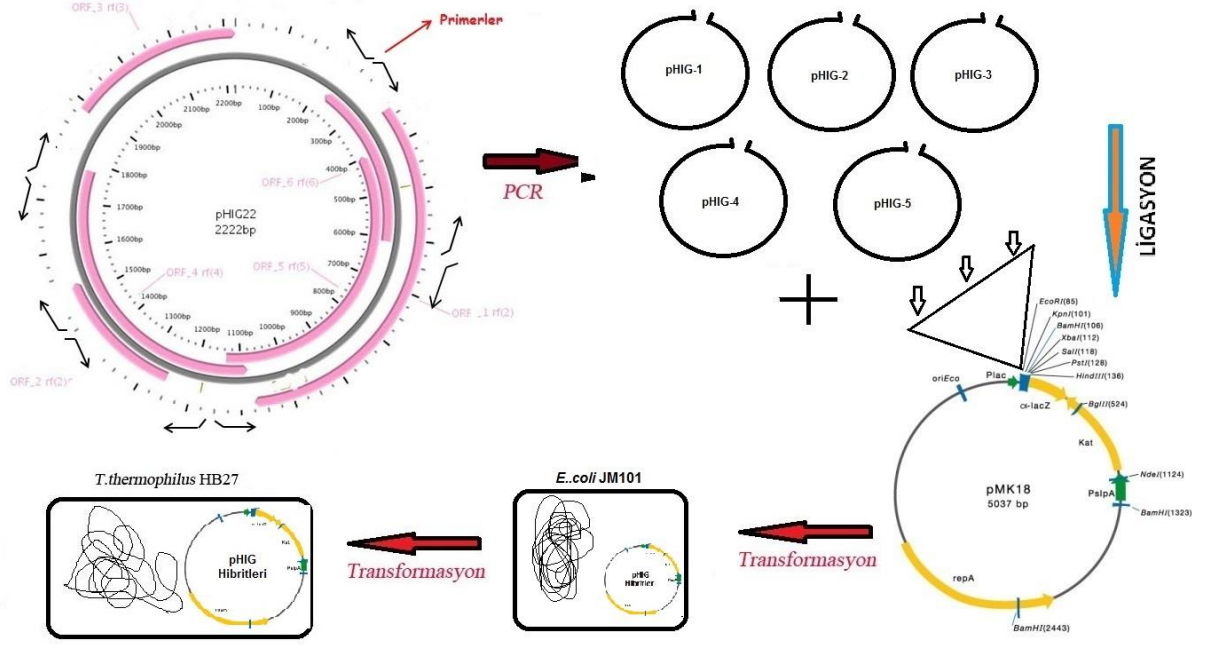
Bu amaçla, 2.2.2.1 başlıklı çalışmada kullanılan pHIG22 fragmentleri (5 farklı bölgeden PCR ile çoğaltılan fragmentler), pMK18 plazmitine *EcoRI* bölgesinden

klonlanarak, hibrit plazmitler oluşturuldu, hibrit plazmitler ilk olarak *E. coli* JM101 hücrelerine transform edildi, *E. coli* hücrelerinden izole edilen plazmitler daha sonra *T. thermophilus* HB27 bakterisine transform edildi.

Hibrit plazmitlerin oluşturulma amacı, pMK18 vektörü ile hibrit edilen pHIG22 plazmitinin farklı bir suşta (*T. thermophilus* HB27) replike edildiğinde kodladığı protein ya da proteinlerin belirlenebilmesidir. pMK18 plazmitini içeren *T. thermophilus* HB27 suşu ile hibrit plazmitleri içeren *T. thermophilus* HB27 suşlarının hücre içi protein profilleri karşılaştırılarak, varsa pHIG22 tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesi amaçlandı.

Bilindiği üzere, plazmitlerde replikasyon orijini ve replikasyondan sorumlu protein ya da proteinler aynı bölgede çakışabilir ya da farklı bölgelerde olabilirler. Olası replikasyon orijini ya da replikasyondan sorumlu protein ya da proteinlerin yerlerinin belirlenebilmesi ve tespit edilebilmesi için; pHIG22'nin farklı bölgelerden çoğaltılarak pMK18 plazmitine insört edilmesi gerekmektedir. Böylece, varsa fonksiyonel proteinlerin tespiti mümkün olabilecektir. Bu yüzden yapılan çalışmada, replikasyon orijini ve rep proteini olma ihtimali yüksek olan bölgeleri içerecek şekilde pHIG22 varyantları oluşturuldu.

Tablo 3'te belirtilen primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan 2150 ila 2222 bp arasında değişiklik gösteren pHIG22 fragmentleri pMK18 plazmitine *EcoRI* bölgesinden klonlanarak hibrit plazmitler oluşturuldu. Tüm klonlama aşamaları *E. coli* JM101 suşunda gerçekleştirildi. Klonların seçimi kanamisinli LB besiyerinde yapıldı. Böylece pHIG22 plazmitinin pMK18 plazmiti ile oluşturduğu 5 farklı hibrit plazmit elde edildi (Şekil 20). Elde edilen hibrit plazmitlere sırasıyla pHIG-1, pHIG-2, pHIG-3, pHIG-4, pHIG-5 adları verildi.



Şekil 20. pHIG22/pMK18 hibrit plazmitlerinin oluşturulmasını gösteren resim

Oluşturulan hibrit plazmitler *T. thermophilus* HB27 suşuna aktarıldı. Bunun için termofilik transformasyon metodu (Koyama vd., 1986) kullanıldı. Hibrit plazmitlerin *T. thermophilus* HB27 suşuna transform olup olmadığının belirlenmesinde, HTK kasetinin (yüksek sıcaklıkta kanamisine direnç sağlama) özelliğinden yararlandı. Aktarılan hibrit plazmitleri içeren suşlar seçildi; klonların pMK18 vektörüne hangi oryantasyonda insört olduğunun belirlenmesi için, izole edilen plazmitler Macrogen (Güney Kore) firmasına dizin analizine gönderildi. Dizin analizi sonuçları incelendi ve oryantasyonlar belirlendi.

pHIG22/pMK18 hibrit plazmitlerini (pHIG-1, pHIG-2, pHIG-3, pHIG-4, pHIG-5) içeren *T. thermophilus* HB27 suşlarının, plazmitsiz *T. thermophilus* HB27 suşunun ve *T. scotoductus* K6 suşunun (pHIG22'yi taşıyan orijinal suş) gece kültürleri yapıldı. Büyütülen kültürlerinin hücre içi proteinleri izole edildi, SDS-PAGE analizi yapıldı ve protein profilleri karşılaştırıldı.

2.2.8.1.1. Çözünebilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

pHIG22/pMK18 hibrit plazmitlerini (pHIG-1, pHIG-2, pHIG-3, pHIG-4, pHIG-5) içeren *T. thermophilus* HB27 suşlarının, plazmitsiz *T. thermophilus* HB27 suşunun ve *T. scotoductus* K6 suşunun (pHIG22'yi taşıyan orijinal suş) gecelik kültürleri, 100 mL

erlenlerde 10 mL modifiye TM besiyeri içerisinde 70 °C de çalkalamalı su banyosunda büyütüldü. Hücrelerin 14.000 rpm'de 15 dk. santrifuj edilmesiyle oluşturulan çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve % 10 sakkarozdan oluşan TS tamponunda çözüldü ve sıvı azot (-196 °C) tankında bir dk. bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı (Beldüz vd., 1993). Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edilerek hücre süspansiyonu 35 dk. buz üzerinde bekletildi, daha sonra 16.000 rpm'de santrifuj edildi ve protein özütünü içeren sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak -20 °C'de saklandı.

2.2.8.1.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonunun tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 mL boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Commasie Brilliant Blue G-250, 5 mL % 95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 mL % 85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 mL'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak BSA kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lük NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 mL yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dk. oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µl her bir izolattan izole edilen protein özütü kullanılarak aynı işlem gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.8.1.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, bu protein özütlerinden uygun miktarlarda (40 µg) alınarak bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M TRIS-HCl pH 6,8, % 4 SDS, % 20 gliserol, % 6 β-merkaptotanol) ilave edildi ve sonrasında 95 °C'de 5 dk. bekletildi. Daha sonra % 15'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi (Laemli, 1970).

Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie Brilliant Blue (% 0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve Yıkama-I (% 50 metanol, % 10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildi. Daha sonra Yıkama-II (% 7 asetik asit, % 5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.8.2. pHTag Klonları ile pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi

Yapılan bu çalışma ile pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin transle olup olmadığı, eğer oluyor ise translasyon için hangi frame'in (sense frame 1-3 veya antisens frame 1-3) kullanıldığı belirlenmesi hedeflendi. Bunun için transkriptte dönüşen bölgelerin tahmini başlangıç noktalarının upstreamlerinden başlayarak (RBS'nin çoğaltılan bölgenin iç kısmında kalması için), yaklaşık 250 ila 350 bp arası bir bölge dizayn edilen spesifik primerler (Tablo 27) ile çoğaltıldı ve bu çoğaltılan parçaların transle olup olmadığı incelendi.

Yani üretilen PCR fragmentlerinin içinde, muhtemel promotor bölgelerinin ve her bir fragmentin transkripsiyon bölgesinin yaklaşık 250-300 nükleotitik kısmı bulunacaktır. Dizayn edilen primerler (Tablo 27) ile fragmentlerin üretimini ve bu fragmentlerin pMK18'e klonlanarak, HisTag'lı proteinin/proteinlerin üretimi araştırıldı. Her bir fragment, üç farklı geri ve bir ileri primer kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Hem sens hem de antisens transkript bölgesi için aynı çalışma yapıldı, sens zincir için üç, antisens zincir için 3 olmak üzere toplam 6 fragment üretildi.

Tablo 27. HisTag+STOP kodonu ilaveli primerler. pHIG22 plazmitinden kodlanan transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi ve transle oluyorsa okuma frame'inin belirlenmesi için dizayn edildi. İtalik sıra STOP kodonunu, Altı çizili kısım HisTag ilavesini, italik altı çizili kısım ise pHIG22 genomuna ait bölgeyi ifade etmektedir. Kalın yazılmış bazlar ise değişik frame'lerde transle olabilmesi için araya sokulan bazları ifade etmektedir

pHIG22 Transkripti	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')
Transkript 1	pHTag-1R	<u>AATCACCACCACCACCACCACgAggAggAgA</u> <u>CTgAgg</u>
	pHTag-0R	<u>AATCACCACCACCACCACCACA</u> <u>gAggAggAg</u> <u>ACTgAgg</u>
	pHTag+1R	<u>AATCACCACCACCACCACCACAA</u> <u>gAggAg</u> <u>gAgACTgAgg</u>
Transkript 2	pHTag-1F	<u>AATCACCACCACCACCACCACggCTCCgg</u> <u>gCTCCATC</u>
	pHTag-0F	<u>AATCACCACCACCACCACCACA</u> <u>ggCTCCg</u> <u>ggCTCCATC</u>
	pHTag+1F	<u>AATCACCACCACCACCACCACAA</u> <u>ggCTC</u> <u>CgggCTCCATC</u>
İleri Primerler	pHG-F729	ggAATTCCggATCCgACTTCCCTAggAACCT C
	pHG-R2027	ggAATTCCggATCCgCTgggTTAggTgTTgTg

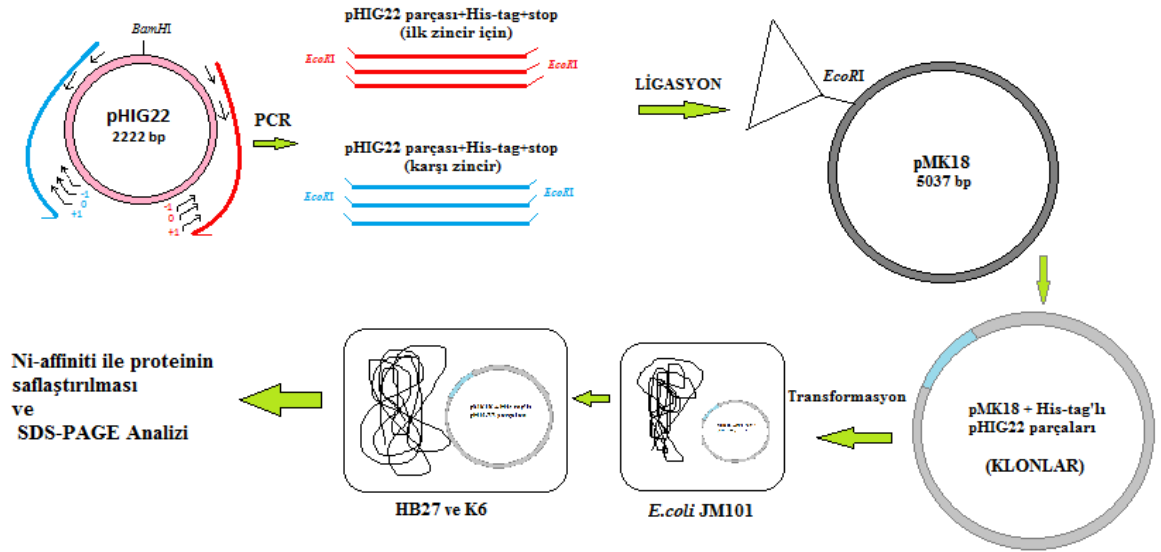
Elde edilen 6 PCR ürünü klonlama vektörü olan pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörüne üretici firmanın önerileri doğrultusunda klonlandı. Ligasyon reaksiyonu Tablo 28'de verilmektedir.

Tablo 28. pGEM-T Easy için ligasyon reaksiyonu

İçerik	Hacim
10X T4 Ligasyon Tamponu	1 µl
pGEM-T Vektör	1 µl
PCR Ürünü	3 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
ddH ₂ O	4 µl
Toplam	10 µl

Ligasyon ürünlerinin 16 °C’de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası plazmitler, CaCl₂ tekniği ile kompetent hale getirilmiş *E. coli* JM101 hücrelerine transform edildi. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen rekombinant plazmitleri taşıyan hücreler belirlendi.

Rekombinant plazmitleri taşıyan hücrelerden izole edilen plazmitler *EcoRI* restriksiyon endonükleazı ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesilerek 6 farklı HisTag ilaveli pHIG22 parçası pGEM-T Easy vektöründen çıkarıldı. Çıkarılan 6 fragment pMK18 vektörüne *EcoRI* bölgesinden klonlandı, tüm klonlama işlemleri *E. coli* JM101 suşunda yapıldı. *E. coli* JM101’de yapılarak elde edilen ve sırasıyla pHTag-1, pHTag-2, pHTag-3, pHTag-4, pHTag-5, pHTag-6 adları verilen 6 farklı rekombinant plazmit *Thermus thermophilus* HB27 hücrelerine termofilik transformasyon metoduna göre transform edildi. Plazmitlerin oluşturulma ve klonlama aşamalarının şematizesi Şekil 21’de görülmektedir.



Şekil 21. pHTag plazmitlerinin oluşturulma ve klonlama yöntemini anlatan şekil

Klonları taşıdığı tespit edilen HB27 hücreleri ve negatif kontrol hücresi (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücresi) ekspres edildi ve hücre ekstraktlarından Nikel kolonları kullanılarak HisTag içeren protein/ proteinler saflaştırıldı.

2.2.8.2.1. Co-Affinite Kromotografi Yöntemi ile Saflaştırma

Klonları taşıdığı tespit edilen HB27 hücreleri ve negatif kontrol hücre özütlerinden HisTag kuyruğu takılmış proteinlerin saflaştırılması, ilave edilen HisTag kuyruğundan yararlanılarak kobalt (Co) içeren bir saflaştırma kiti olan TALON[®] Metal Affinity Resin (Takara) vasıtasıyla gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan tampon içerikleri Tablo 29’da görülmektedir. 1-2 mL Co bağlı His-boncukları, 10 mL yıkama tamponu ile 15 mL’lik falkon tüp içerisinde 3 kez yıkılarak pH adaptasyonu sağlandı. Ardından proteinler ayrı ayrı (4 mL) His-boncukları içeren falkon tüplere transfer edilerek yıkama tamponu ile son hacim 15 mL’ye tamamlandı. En az 2 saat düşük hızda alt üst edilerek dikkatlice çalkalandı. İnkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen santrifügasyonu takiben süpernatant pipetör yardımı ile uzaklaştırıldı. His-boncukları en az 3 kez yıkama tamponu ile yıkılarak bağlanmamış ilgisiz proteinler elemine edildi. Elüsyon basamağına geçmeden önce yıkama tamponu His-boncuklardan pipetör yardımı ile tamamen uzaklaştırıldı. Elüsyon tamponu kullanılarak bağlanmış proteinlerin ayrılması sağlandı.

Tablo 29. Co-Affinite Kromotografisinde kullanılan tamponlar

Tampon	NaH ₂ PO ₄ (mM)	NaCl (mM)	İmidazol (mM)	pH
Liziz	50	300	10	7,0
Yıkama	50	300	20	7,0
Elüsyon	50	300	250	7,0

Ekspres edilen 6 farklı hücreden hangisi ya da hangilerinde ekspresyonun olduğunun belirlenmesi için, Co-Affinite Kromotografisi ile saflaştırılan proteinlere SDS-PAGE analizi uygulandı.

2.2.8.3. pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi İçin Karboksilesteraz Geninin Kullanılması

Yukarıdaki 3.2.8.2 başlıklı çalışmaya benzer olarak yapılan bu çalışmada, pHIG22 transkriptlerinden zayıf da olsa bir ekspresyon varsa bunun tespit edilebilmesi için, düşük

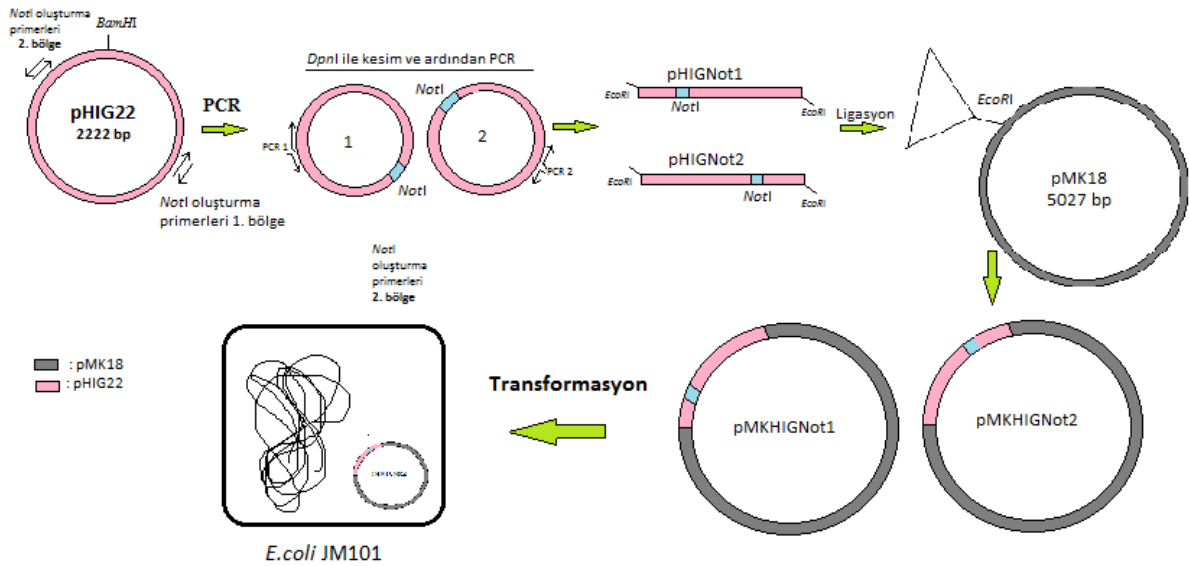
aktivite de dahi belirlenebilecek bir gen seçildi ve benzer bir çalışma yapıldı. Bu çalışma ile de, belirlenen transkriptlerin transle olup olmadığı, eğer transle oluyor ise translasyon için hangi frame'in (sense frame 1-3 veya antisens frame 1-3) kullanıldığının belirlenmesi hedeflendi.

Bu amaçla, pHIG22 plazmitinin her iki zincirinde transkript kodladığı belirlenen bölgelere, daha önce laboratuvarımızda karakterize edilen termofilik bir enzimi kodlayan karboksilesteraz geninin (*Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesteraz) sokulması ve oluşacak proteinlerin belirlenebilmesi için; aktivitesi kolay tespit edilebilen bu genin kodladığı karboksilesteraz enziminin kullanılması hedeflendi. Karboksilesteraz geni 741 bp büyüklükte olup, kodladığı karboksilesteraz enzimi 55 ila 80 °C arasında aktivite vermektedir. *Thermus thermophilus* HB27 bakterisinin optimum büyüme sıcaklığı olan 70 °C'de en iyi aktiviteyi vermektedir. Stabilitesi de oldukça güçlü bir enzim olan karboksilesterazın karakterizasyon çalışmaları daha önceki çalışmalarda KTÜ Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapıldığından dolayı, enzimin tüm özellikleri tam olarak bilinmektedir.

İlk olarak karboksilesteraz geninin pHIG22'ye klonlanabilmesini sağlayacak *NotI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi, spesifik primerler (Tablo 30) kullanılarak pHIG22 plazmitinin her iki zincirinde yaklaşık olarak 1300 bp aralıkla 2 farklı (herbiri ayrı zincirde olmak üzere) bölgede oluşturuldu. Öncelikle, *NotI* tanıma bölgesine sahip komplementer primerler kullanılarak pHIG22 plazmitleri PCR ile çoğaltıldı. 1. bölgede (pHIG22'nin 677. nükleotidi) oluşturulan kesim bölgesine sokulan karboksilesteraz geni, pHIG22 plazmitindeki clockwise ve anticlockwise translasyonun ve doğru frame'in tespit edilebilmesi, 2. bölgede (pHIG22'nin 1967. nükleotidi) oluşturulan kesim bölgesine sokulan karboksilesterazda clockwise ve anticlockwise translasyonun ve translasyon frame'inin tespit edilebilmesi için kullanıldı.

Tablo 30. pHIG22 plazmiti üzerinde *NotI* tanıma bölgesi oluşturulmasında kullanılan primerler. İtalik sıra pHIG22 dizisini, altı çizili sıra *NotI* tanıma dizisini, Kalın yazılı sıra komplementer pHIG22 dizisini göstermektedir

	Primer Adı	Primer Sırası (5'- 3')
1. Bölge (İlk Zincirde)	PHgNotI-1F	gCCgAgAgCggCCgCCggCgAgCgTACCgAg CCCAGAAAAAgAg
	PHgNotI-1R	<i>CTCgCCggCggCCgCTCTCggCACTATCCT</i> gggggCTgAggTTg
2. Bölge (Karşı Zincirde)	PHgNotI-2F	AgCgTACgCggCCgCACCTCTCCCTAgAC CCAggCACCGgAggA
	PHgNotI-2R	<i>gAgAggTgCggCCgCgTACgCTggCggggTCT</i> ATTAggCggTTg



Şekil 22. pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 plazmitlerinin oluşturulmasını şematize eden resim

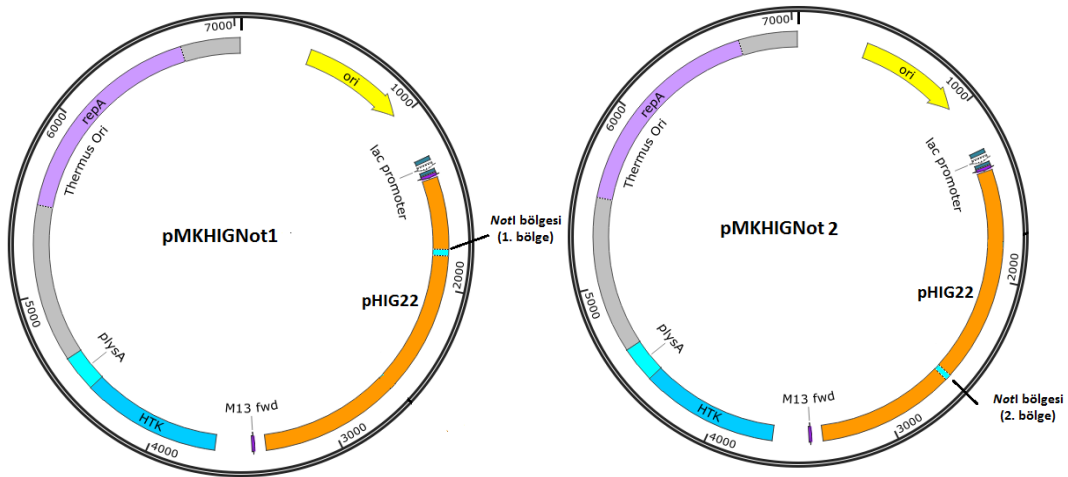
Elde edilen PCR ürünü agaroz jelde kontrol edildikten sonra, kalıp plazmit genomunun uzaklaştırılması için, ürün *DpnI* (Thermo Scientific) restriksiyon endonükleazı ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesildi. Kalıp plazmit genomundan arındırılan ürün DNA Saflaştırma Kiti (Fermentas) ile saflaştırıldı. Daha sonra bu ürün kalıp olarak kullanılarak Tablo 31'de belirtilen spesifik primerler ile tekrar PCR yapıldı. Böylece *NotI* tanıma dizisi, kullanılacak pHIG22 plazmitinin uçlardan uzak olacak şekilde ve orta kısmında kalacak şekilde oluşturulmuş oldu. Klonlama stratejisinin daha iyi anlaşılmasını

şematize eden resim Şekil 22’de gösterilmektedir. *NotI* tanıma bölgesi eklenmiş pHIG22 fragmentlerine sırasıyla pHIGNot1 ve pHIGNot2 adları verildi.

Tablo 31. *NotI* tanıma bölgesi oluşturulan pHIG22’nin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler

	Primer Adı	Primer Sırası (5’- 3’)
1. Bölge (İlk Zincirde)	HG-O4F	CCCgAAAAGggCAAgTgC
	HG-O4R	TTATggCgTggCgggTg
2. Bölge (Karşı Zincirde)	HG-O1F	ACggCgAgCgTACCgAg
	HG-O1R	CTgggggCTgAggTTgAg

PCR ile çoğaltılan *NotI* tanıma bölgesi eklenmiş pHIG22 fragmentleri (pHIGNot1 ve pHIGNot2) ilk olarak pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlandı ve bu vektörden *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilerek çıkarıldı. pHIGNot1 ve pHIGNot2, aynı restriksiyon enzimi ile kesilen pMK18 vektörüne *EcoRI* bölgesinden sokuldu. Bu şekilde iki farklı hibrit plazmit elde edildi. pHIGNot1 parçasının pMK18’e sokulmasıyla elde edilen hibrite pMKHIGNot1, pHIGNot2 parçasının pMK18’e sokulmasıyla elde edilen hibrite ise pMKHIGNot2 adı verildi (Şekil 23).



Şekil 23. pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 plazmitlerinin haritası

Bundan sonraki aşamada *NotI* bölgesinden hibrit plazmitlere sokulacak karboksilesteraz genleri elde edildi.

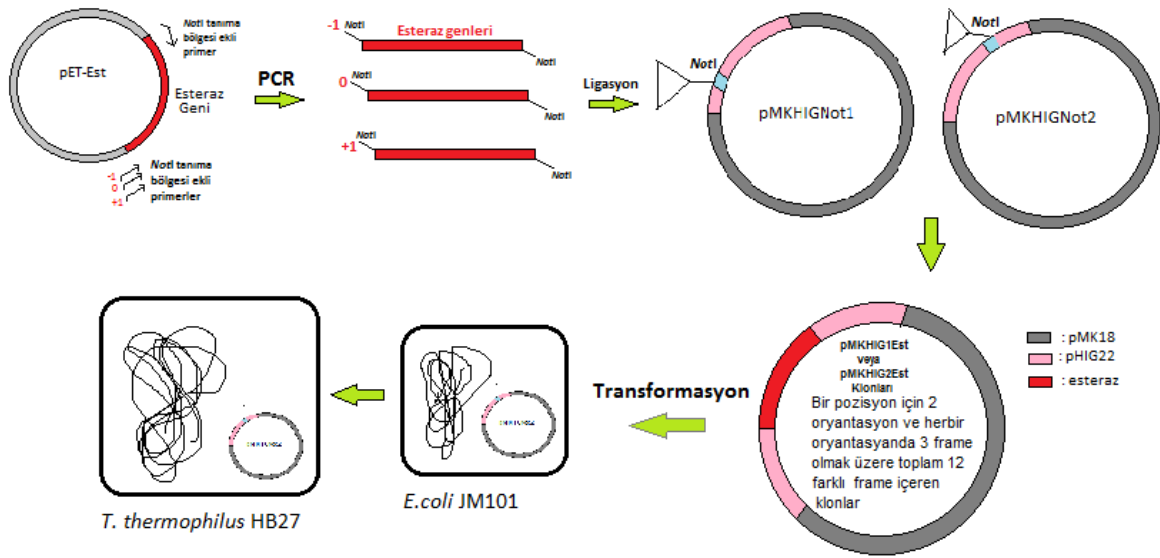
İlk olarak, karboksilesteraz geni dizayn edilen spesifik primerler (Tablo 32) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Primerler dizayn edilirken 5' bölgelerine *NotI* tanıma dizisi ve karboksilesteraz geninin başlama kodonunun upstream bölgesine de translasyonun 3 farklı frame'de başlayabilmesine imkân sağlayacak bazlar eklendi.

Tablo 32. Karboksilesteraz geninin PCR ile çoğaltılması için, *NotI* kesim bölgesi ekli olarak dizayn edilen primerler. İtalik dizi *NotI* tanıma bölgesini, Kalın yazılı dizi frame'in değişmesi için eklenen bazları göstermektedir

Özellik	Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')
Karboksilesteraz geninin 5' ucunun değiştirilmesinde kullanılan primerler	EstNotI-0F	AAATATgCggCCgCATggTgAAgATgAT TCCCCCAG
	EstNotI-1F	AAATATgCggCCgCTATggTgAAgATgA TTCCCCCAG
	EstNotI-2F	AAATATgCggCCgCTTATggTgAAgATg ATTCCCCCAG
Karboksilesteraz geninin 3' ucunun değiştirilmesinde kullanılan primer	EstNotI-R	AAATATgCggCCgCCTACCAATCTAAT gATTCTAAA

Karboksilesteraz genine (741 bp) *NotI* kesim bölgesi eklenerek çoğaltılması için üç adet ileri ve 1 adet geri primer dizayn edildi. Karboksilesteraz geninin başlama kodonu olan ATG'nin başına 0, 1 (+1) ve 2 (-1) baz eklenerek ilgili genin olası tüm frame'lerden translasyona başlayabilmesi hedeflendi.

PCR ile çoğaltılan karboksilesteraz geni fragmentleri agaroz jelde görüntülendi, *NotI* (Thermo Scientific) restriksiyon enzimi ile firmanın öngördüğü şartlar altında kesilerek aynı kesim bölgesine sahip pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 hibritlerine aynı kesim bölgesinden klonlandı. Klonlama stratejisinin daha iyi anlaşılması için yapılan şematize Şekil 24'te gösterilmektedir.



Şekil 24. Karboksilesteraz genlerinin pMKHIGNot(1,2) plazmitlerine klonlanmasını şematize eden resim

Klonlama aşamasında her bir bölge için üç farklı (frame) klon olmak üzere toplam altı klon elde edildi. Ayrıca karboksilesteraz fragmentlerinin vektöre her iki oryantasyonda insört olabileceği ve her iki oryantasyondaki translasyonun tespit edilebilmesi için toplamda 12 farklı klon elde edildi. Bunun için her altı farklı klonlama sonrası elde edilen tüm klonlar Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizin analizine tabi tutuldu ve klonların oryantasyonu bu şekilde belirlendi. Dizin analizi ile teyit edilen klonlara Tablo 33'te belirtilen isimler verildi.

Tablo 33. Her iki oryantasyonda elde edilen klonların adlandırılması

+ (Clockwise) Oryantasyon	1. Bölge	Frame 1	pMKHIG1Est+0
		Frame 2	pMKHIG1Est+1
		Frame 3	pMKHIG1Est+2
	2. Bölge	Frame 1	pMKHIG2Est+0
		Frame 2	pMKHIG2Est+1
		Frame 3	pMKHIG2Est+2
- (Anticlockwise) Oryantasyon	1. Bölge	Frame 1	pMKHIG1Est-0
		Frame 2	pMKHIG1Est-1
		Frame 3	pMKHIG1Est-2
	2. Bölge	Frame 1	pMKHIG2Est-0
		Frame 2	pMKHIG2Est-1
		Frame 3	pMKHIG2Est-2

Tüm klonlama aşamaları *E. coli* JM101 suşunda yapıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen rekombinant plazmitleri taşıyıp taşımadığı belirlendi. Klonlar yapıp teyit edildikten sonra *Thermus thermophilus* HB27 suşuna termofilik transformasyon metoduna göre transform edildi.

Elde edilen klonları taşıyan HB27 suşları için karboksilesteraz aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla aşağıdaki uygulamalar yapıldı.

2.2.8.3.1. Jel Assay Yöntemi (Zimogram) ile Karboksilesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Elde edilen klonları taşıyan HB27 hücre pelletlerinden protein izolasyonu yapıldı ve hücre içi proteinler elde edildi. Elde edilen hücre içi proteinlerin konsantrasyonları Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi ve örnekler Native PAGE analizi uygulandı. Protein jel elektroforezi % 15'lik jel kullanılarak 15 mA'lik akım altında gerçekleştirildi. Protein denatürasyonunu engellemek için SDS ve β -Merkaptoetanol kullanılmadan hazırlanan jele ham hücre özütleri yüklenerek doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı (Laemli, 1970). Enzim ısıtılmadan direkt olarak jele yüklendi. Her bir kuyucuğa 50 μ g protein yüklendi.

Elektroforez sonucunda elde edilen jel ayrı ayrı hazırlanmış olan, aşağıda solüsyon içerikleri verilen SolA ve SolB ile aynı anda reaksiyona sokuldu. Koyu kahverengi ya da kırmızımsı bantlar meydana gelinceye kadar bekletildi (Fujimura vd., 1996).

SolA: 8 mg 1-Naphthyl acetate, 2 mL asetonda çözülür ve 18 mL 0,1 M (pH 7,5) Tris-HCl tamponuna eklenir.

SolB: 20 mg Fast redTR salt, 20 mL 0,1 M (pH 7,5) Tris-HCl ile çözülür.

Yapılan çalışma sonucu elde edilen jeller bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı ve kaydedildi.

2.2.8.3.2. Tribütirin Petri Assay ile Karboksi Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Elde edilen klonları taşıyan HB27 hücresi, pozitif ve negatif kontrol hücrelerinde, karboksilesteraz üretimi, kalitatif olarak Tribütirin agar'da değerlendirildi.

İlk olarak % 1 oranında tribütirin ilave edilerek hazırlanan TM besiyerlerine ekim yapıldı ve 70 °C'de inkübasyona bırakıldı. 3 gün boyunca koloniler etrafında açık zon

oluşumu gözlemlendi ve zon oluşturan hücreler için karboksilesteraz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi (Zerre vd., 1992).

2.2.8.4 pHIG22 Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi İçin HisTag Ekli Karboksilesteraz Geninin Kullanılması

Yukarıdaki 3.2.8.3 başlıklı çalışmaya benzer olarak yapılan bu çalışmada, yine karboksilesteraz geni kullanılarak pHIG22 transkriptlerinden zayıf da olsa bir ekspresyon varsa bunun tespit edilebilmesi amaçlandı. Üstteki çalışmadan farklı olarak, kullanılan karboksilesteraz geninin 3' ucuna HisTag (8X) dizisi ilave edilerek, transle olan proteinlerin tespitinin anti-poly Histidine antikoru (Sigma, H-1029) kullanılarak, Western blot analizi ile belirlenmesi hedeflendi. Çok az miktarda oluşmuş olabilecek olası rep-karboksilesteraz füzyon proteinlerinin jelde görülememe ihtimali düşünülerek bu çalışma yapıldı.

3.2.8.3 başlıklı bir önceki çalışmanın tüm aşamaları detaylı bir şekilde anlatıldığından burada tekrar anlatılmayacaktır. Tüm klonlama aşamaları üstteki çalışmada anlatıldığı gibi yapıldı, farklı olarak karboksilesteraz geninin çoğaltılmasında kullanılan 3' ucu spesifik geri primer değiştirildi (Tablo 34). Primerin, karboksilesteraz geninin 3' ucuna 8X-His dizisi ekleyecek şekilde dizayn edilmesi ve önceki çalışmadaki ileri primerler ile birlikte kullanılarak genin PCR ile çoğaltılması sağlandı.

Tablo 34. Karboksilesteraz geninin 3' ucuna 8X-His dizisi eklenmesi için dizayn edilen primer. İtalik sıra HisTag dizisini göstermektedir

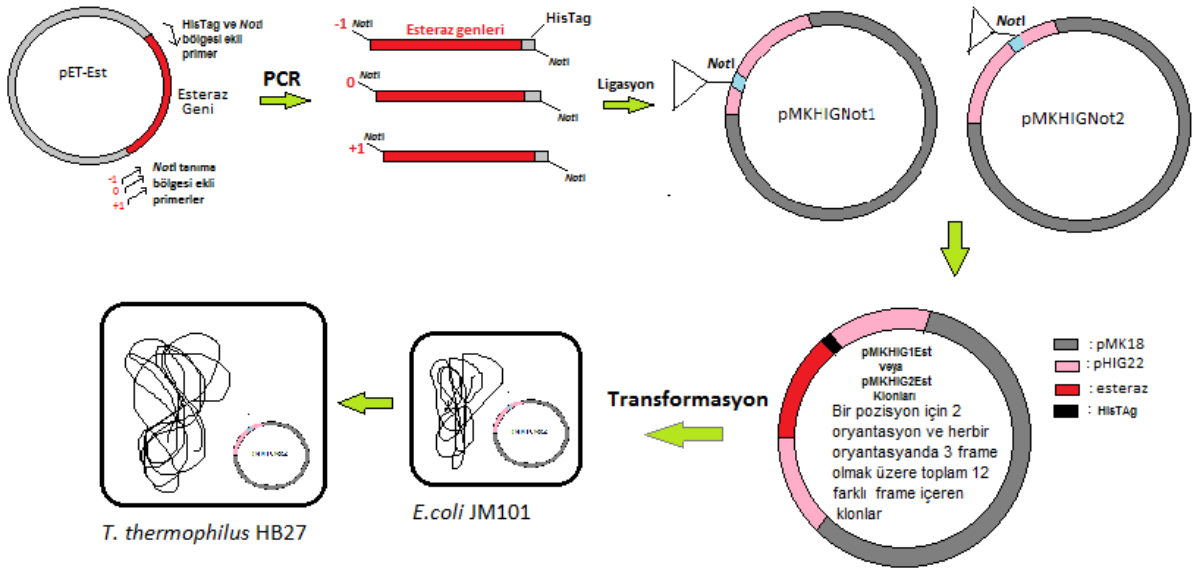
Primer Adı	Primer Sırası (5' - 3')
EstHis8-R	<i>gCggCCgCTCAGTggTgATggTggTgATggTggTgCTTCCAATCT</i> AATgA

HisTag ilaveli karboksilesteraz geni üstteki çalışmada anlatıldığı gibi pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 plazmitlerine klonlandı ve aşağıdaki Tablo 35'de belirtildiği gibi adlandırıldı.

Tablo 35. Her iki oryantasyonda elde edilen HisTag ilaveli klonların adlandırılması

+ (Clockwise) Oryantasyon	1. Bölge	Frame 1	pMKHIG1Est+0His
		Frame 2	pMKHIG1Est+1His
		Frame 3	pMKHIG1Est+2His
	2. Bölge	Frame 1	pMKHIG2Est+0His
		Frame 2	pMKHIG2Est+1His
		Frame 3	pMKHIG2Est+2His
- (Anticlockwise) Oryantasyon	1. Bölge	Frame 1	pMKHIG1Est-0His
		Frame 2	pMKHIG1Est-1His
		Frame 3	pMKHIG1Est-2His
	2. Bölge	Frame 1	pMKHIG2Est-0His
		Frame 2	pMKHIG2Est-1His
		Frame 3	pMKHIG2Est-2His

Üstteki çalışmada olduğu gibi, bu çalışmada da tüm klonlama aşamaları *E. coli* JM101 suşunda yapıldı. Klonlama aşamalarının şematizesi Şekil 25’te gösterilmektedir.



Şekil 25. HisTag'lı karboksilesteraz genlerinin pMKHIGNot(1,2) plazmitlerine klonlanmasını şematize eden resim

İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen rekombinant plazmitleri taşıyıp taşımadığı belirlendi. Klonlama aşamasında her bir bölge için üç farklı (frame) klon olmak üzere toplam altı klon elde edildi. Ayrıca karboksilesteraz fragmentlerinin vektöre her iki oryantasyonda insört olabileceği ve her iki oryantasyondaki translyasyonun tespit edilebilmesi için toplamda 12 farklı klon elde edildi. Bunun için her altı farklı klonlama sonrası elde edilen tüm klonlar Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizin analizine tabi tutuldu ve klonların oryantasyonu bu şekilde belirlendi.

Klonlar yapıp teyit edildikten sonra *Thermus thermophilus* HB27 suşuna termofilik transformasyon metoduna göre transform edildi.

Elde edilen klonları taşıyan HB27 suşları, negatif kontrol hücresi (pMK18 taşıyan HB27 suşu) ve pozitif kontrol hücresi (HisTag'lı LMT geni içeren pET28a+ taşıyan *E.coli* JM101 suşu) için HisTag'lı karboksilesteraz proteinlerinin belirlenebilmesi amacıyla Western Blot analizi yapıldı. Ayrıca hücrelerin protein profillerinde herhangi bir farklılık olup olmadığının da belirlenebilmesi için tüm örnekler SDS-PAGE analizi uygulandı.

2.2.8.4.1. Proteinlerin Nitroselülöz Membrana Aktarılması ve Western Blot Analizi

Western blot analizi için jel semi-dry blotlama cihazı (Bio-Rad) kullanılarak membrana aktarıldı. Bunun için membran ve Whatman kâğıtları jel büyüklüğünde kesildi. Membran ve kâğıtlar blotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glisin, %0,0375-w/v SDS) ıslatıldıktan sonra, cihaza 2 whatman kâğıdı, membran, jel ve 2 whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildiler. Cihaz 0,04 Amper'de 90 dk. çalıştırıldı ve böylece blotlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından membran PBS de hazırlanmış %0,3'lük süt tozunda 2 dk. yıkandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında yine PBS de hazırlanmış % 3'lük süt tozu içinde bloke edildi. Bu işleme takiben, 3 kez 15'er dk. % 0,3'lük süt tozunda yıkandı. Daha sonra 1 gece anti-poly Histidine antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, H-1029) içeren % 0,3'lük süt tozunda oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tekrar 3 kez 15'er dk. % 0,3'lük süt tozunda yıkandı. Ardından 1 saat Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase antibody (1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren % 0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sonra tekrar 3 kez 15'er dk. % 0,3'lük süt tozu içinde ve 2 kez de 10'ar dk. AP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂, pH9.5, 1X) tamponu içinde yıkama

gerçekleştirildi. Son olarak membran 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stock solution, Roche, 11681451001) içeren 10 mL AP tamponu içinde boyandı. Reaksiyon, membranın bolca ddH₂O ile yıkanmasıyla durduruldu. Membran kurutuldu ve taranarak bilgisayara aktarıldı.

2.2.9. QPCR Tekniği ile pHIG22 Kopya Sayısının Belirlenmesi

Real-Time qPCR tekniği ile konak hücre içerisinde stabil olan plazmitlerin kopya sayısı kantitatif olarak hesaplanabilir (Fujimura vd., 1996). Real-Time prensibi altında “Absolute Kantifikasyon” metodu ile çoğaltılan hedef bölgelerin hızlı ve verimli bir şekilde miktarının ya da kopya sayısının hesaplanması yapılabilmektedir (Burgos vd., 2002). Nükleik asitlerin kantitatif analizinde birçok metot kullanılmasına rağmen, qPCR şu anda kullanılan en duyarlı ve hassas yöntemdir (Ferre, 1992; Klein 2002).

QPCR tekniği ile kopya sayısının hesaplanabilmesi için genomda kopya sayısı önceden bilinen bir standart gen kullanılmalıdır. Bu çalışma için *Thermus scotoeductus* K6 (pHIG22’yi barındıran orijinal suş) genomundaki tek kopyalı olduğu bilinen *rpoB* geni kullanıldı. İlk olarak, *Thermus scotoeductus* K6 genomundaki *rpoB* geni ve pHIG22 plazmitinin replikasyon orijin bölgesinin iç kısımlarından seçilen bir bölge (1441. ile 1574. bp arası bölge) için spesifik olan iki primer seti dizayn edildi (Tablo 36).

Tablo 36. QPCR çalışmasında kullanılan primerler ve özellikleri

Kalıp Bölge	Primer adı	Primer sırası (5'-3')	TM	Çoğaltılan Bölge (bp)
K6 Genomu	TSrpoB-F	ggAgTTCTTCAgCCgTAgC CAgCTTTCC	64,6 C°	134 bp (K6 Genom)
	TSrpoB-R	gCACgTCAAACCCCgCCC gCTC	67,6 C°	134 bp (K6 Genom)
pHIG22 Genomu	pHG-5Fw	CggATCCgACTTgACgggC ATACg	63.2 C°	134 bp (pHIG22 Genom)
	pHG-R1554	GCGCTGCGGGAGAGAGA CTTC	63.2 °C	134 bp (pHIG22 Genom)

Bu primer setleri, doğru karşılaştırma ve hesaplama yapılabilmesi için, her iki bölgeden de eşit uzunlukta (134 bp) bir bölgenin çoğaltılabilmesine olanak sağlayacak şekilde dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerin T_m derecelerinin ve % GC içeriklerinin birbirine yakın olması yapılan qPCR çalışmasının spesifitesini arttırdı.

Thermus scotoductus genomunda *rpoB* geni, tek kopyalı bir gendir (GenBank, NCBI, CP001962.1). *rpoB* geninin iç bölgesinden spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan 134 bp'lik bir bölgenin konsantrasyonu, pHIG22 plazmitinin replikasyon orijin bölgesinin iç kısmından çoğaltılan 134 bp'lik bir bölgenin konsantrasyonu ile karşılaştırıldı ve oluşturulan standart grafik ile kopya sayısının belirlenmesinde kullanılan C_T değerleri hesaplandı.

Real-time qPCR amplifikasyonu ve elde edilen verilerin analizi laboratuvarımızda mevcut bulunan LightCycler Versiyon 1.5 (Roche Diagnostics) cihazı ile gerçekleştirildi. Standart grafiklerin oluşturulması ve Threshold Cycle (CT) değeri cihaz yazılımındaki "The Second Derivative Method" yöntemine göre hesaplandı. Çalışmada kullanılan primerlerin T_m derecelerinin ve MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldı. 3 mM MgCl₂ kullanıldı ve primerlerin optimum T_m dereceleri 61 °C olarak belirlenirdi. Firmannın öngördüğü şartlar altında LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche Diagnostics) kullanılarak yapılan çalışmanın şartları Tablo 37'de gösterilmektedir.

Tablo 37. Roche 1.5 LightCycler qPCR çalışma şartları

Analiz Modu	Döngü	Bölüm	Hedef Sıcaklık	Süre	Okuma Modu
Denatürasyon					
Hiçbiri	1		95 C°	30 sn	hiçbiri
Amplifikasyon					
Kantifikasyon	45	Denatürasyon	95 C°	0 sn	hiçbiri
		Bağlanma	61 C°	10 sn	hiçbiri
		Uzama	72 C°	6 sn	tek
Erime Eğrisi					
Erime Eğrileri	1	Denatürasyon	95 C°	0 sn	hiçbiri
		Bağlanma	65 C°	15 sn	hiçbiri
		Erime	95 C°	0 sn	sürekli
			Hız Oranı: 0,1 C°/ sn.		
Soğutma					
Hiçbiri	1		40 C°	30 sn	hiçbiri

Bu çalışmada, SYBR Green-I boyası kullanılmasının nedeni, Real-Time PCR çalışmalarında birçok avantajı bulunmasından dolayıdır. SYBR Green-I boyası, sadece çift zincirli DNA'lara bağlanabilme özelliğinden dolayı, primer dimerlerinin ve spesifik olmayan PCR ürünlerinin belirlenebilmesi açısından oldukça avantajlıdır.

2.2.9.1. Real-time QPCR İçin Standart Grafik Oluşturulması

pHIG22 plazmitini barındıran *Thermus scotoductus* K6 suşunun gecelik kültürü yapıldı ve bu kültürden aşılana yeni kültürden eksponansiyel büyüme fazında hücreler çöktürülerek Total DNA izolasyonu (hem genomik hem de plazmit DNA içerir) yapıldı. Plazmitlerde kopya sayısının hesaplanabilmesi için, plazmitin lineer hale getirilmesi gerektiğinden (halka ve kırık formların lineer olması için), ilk olarak K6 Total DNA'sı *NheI* restriksiyon endonükleazı ile kesildi (*NheI* restriksiyon endonükleazı, PCR ile çoğaltılan bölgelerin iç kısmından kesmeyen bir enzimdir) ve elde edilen kalıp DNA TE solüsyonu ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda olacak şekilde numuneler hazırlandı. Hazırlanan DNA'ların yoğunluğu aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve konsantrasyonları NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçüldü.

$$\text{DNA (kopya)} = \frac{6.02 \times 10^{23} \left(\frac{\text{kopya}}{\text{mol}} \right) \times \text{DNA Miktarı (g)}}{\text{DNA uzunluğu (dp)} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} \quad (1)$$

Bu formül kullanılarak hesaplanan DNA yoğunluğuna göre 25,7 fg *Thermus scotoductus* K6 kalıp DNA'sı 10 kopya genom içermektedir. Bu şekilde 10 katlık seyreltmeler yapılarak aşağıdaki Tablo 38'de gösterilen yoğunluklarda kalıp DNA'lar elde edildi.

Tablo 38. Standart Grafik oluşturulması için kullanılan kalıp DNA'ların özellikleri

Örnek Adı	Konsantrasyon (DNA)	Kopya sayısı / μ l
Kalıp 1	25,7 fg	10
Kalıp 2	0,257 pg	100
Kalıp 3	2,57 pg	1000
Kalıp 4	25,7 pg	10000
Kalıp 5	0,257 ng	100000

Hem *rpoB* geni hem de pHIG22'deki hedef bölge için, standart eğri oluşturulmasında 1×10^5 ila 1×10^9 kopya/L aralığında örnek kullanıldı. Oluşturulan her iki eğri için sonuçlar üç tekrarlı olarak yapıldı, test edildi ve amplifikasyon verimleri elde edildi.

Her seyreltmedeki C_T değerleri iki tekrarlı olarak ölçüldü ve hem *rpoB* hem de pHIG22 için standart eğriler oluşturuldu. C_T değerleri, başlangıç kalıp DNA'ların kopya sayılarının logaritmik artışlarına göre çizildi. Her bir standart eğri, çizilen noktaların lineer regresyonu ile oluşturuldu. PCR amplifikasyon verimi (E) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Rasmussen, 2001).

$$E = 10^{-1/\text{slope} - 1} \quad (2)$$

Amplifikasyonun doğruluğu hem "Melting Curve" analizi hem de jel elektroforezi ile kontrol edildi. Tüm örnekler için erime sıcaklığı pikleri belirlendi ve bu sonuçlara göre tüm amplifikasyonların verimi test edildi. Elde edilen grafikler kantifikasyon çalışması için kullanıldı. Floresans sinyal ölçümü 72 °C'deki her uzama basamağının sonunda yapıldı.

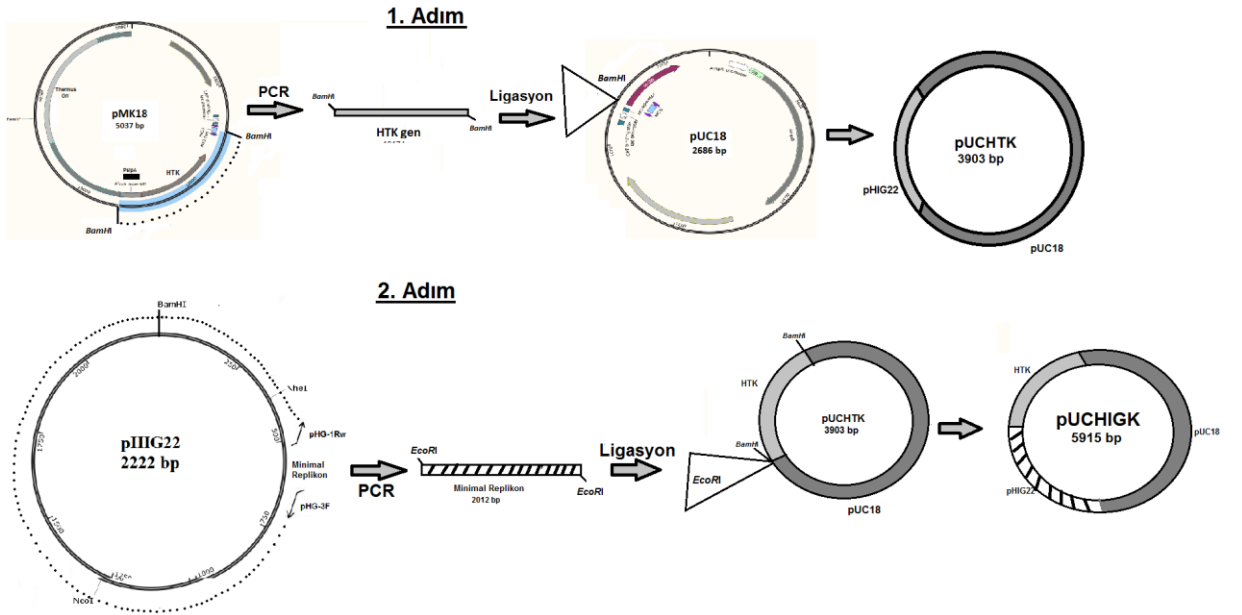
2.2.9.2. pHIG22 Kopya Sayısının Hesaplanması

Thermus scotoductus K6 Total DNA'sının kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan Real-time qPCR amplifikasyonları eş zamanlı olarak yapıldı. Yukarıda belirtildiği üzere üç tekrarlı olarak yapılan qPCR çalışması sonucu, *rpoB* geni ve pHIG22 bölgesine ait C_T değerlerinin elde edilmesiyle, oluşturulan standart grafikler kullanılarak pHIG22 plazmitinin kopya sayısı, *rpoB* geninin kopya sayısına bölünerek hesaplandı.

2.2.10. *Thermus* Cinsi Klonlama ve Ekspresyon Vektörlerinin Geliştirilmesi

2.2.10.1. Klonlama Vektörünün Tasarlanması

pHIG22'nin minimal replikonunun belirlenmesi ile pMK18 plazmiti ve pUC18 plazmiti kullanılarak pHIG22 tabanlı klonlama vektörü oluşturuldu. Klonlama stratejisinin daha iyi anlaşılabilmesi için klonlama aşamaları Şekil 26'da şematize edilmektedir.



Şekil 26. Klonlama vektörünün dizayn aşamalarının şematize edilmesi

İlk olarak pMK18 plazmitinden HTK kaseti (PspA promotörü ile birlikte) *Bam*HI restriksiyon endonükleazı ile kesilerek çıkarıldı ve aynı endonükleazla kesilerek aynı yapışkan uçlara sahip olması sağlanan pUC18 plazmitine bu bölgeden klonlandı. Böylece iki direnç genine (kanamisin ve amfisilin) sahip pUCHTK plazmiti elde edilmiş oldu.

İkinci olarak, dizayn edilen spesifik primerler (pHG-1Rw ve pHG-3F) (Tablo 39) kullanılarak pHIG22'nin minimal replikonu PCR ile çoğaltıldı, pGEM-T Easy vektörüne firmanın öngördüğü şartlar altında klonlanıp ardından *Eco*RI restriksiyon endonükleazı ile çıkarıldı ve aynı endonükleazla kesilerek aynı yapışkan uçlara sahip olması sağlanan pUCHTK vektörüne bu bölgeden klonlandı.

Tüm klonlama aşamaları *E. coli* JM101 suşunda gerçekleştirildi. Elde edilen hibrit plazmite pUCHIGK adı verildi. pUCHIGK plazmiti; kanamisin kaseti, amfisinil kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve pHIG *ori* bölgesini içermektedir.

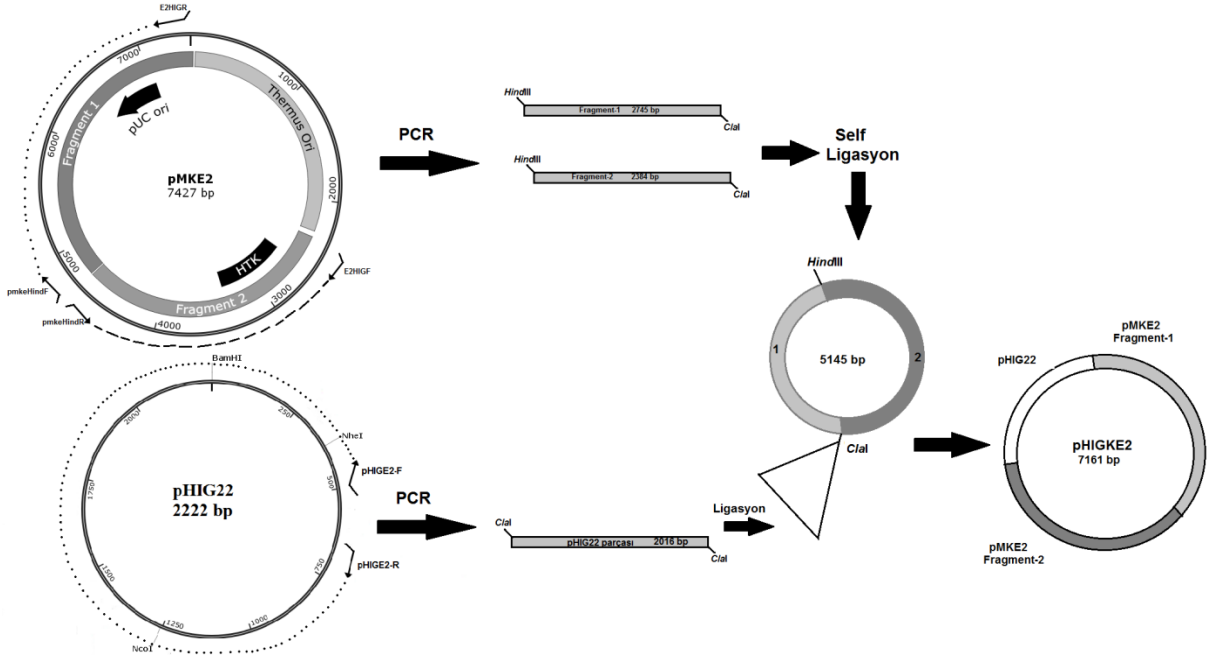
Tablo 39. Klonlama ve ekspresyon vektörlerinin dizayn edilmesinde kullanılan primerler

Vektör Adı	Primer Adı	Primer Sırası (5'-3')	Primerin Bağlandığı Bölge
Klonlama Vektörü	pHG-1Rw	ggAATTCCggATCCgCTgggTTAg gTgTTgTg	387. bp
	pHG-3F	ggAATTCCggATCCgACTTCCCT AggAACCTC	614. bp
Ekspresyon vektörü	E2HIGF	ATCgATCTACCCCCTgAgCA CCCgCTTgTACCACACC	2312. bp
	E2HIGR2	cATCgATCAAggggTggggCTC CaggTgggACCATCCCCCTC	15. bp
	pMKEHindF	gCAAAGCTTgCggCCgCACTC gAgCAC	4708. bp
	pMKEHindR	CgCAAAGCTTgTCgACggAgCT CgAATTC	4692. bp

2.2.10.2. Ekspresyon Vektörünün Tasarlanması

Termofilik proteinlerin mezofilik organizmalar yerine termofilik konaklarda ekspres edilmesi tercih edilir. Bu yüzden termofilik bakterilerden izole edilen plazmitlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu sebeple, pHIG22 plazmitinin *Thermus* cinsinde replike olabileme özelliği kullanılarak, termofilik proteinlerin ekspres edilmesinde kullanılabilecek pHIG22 tabanlı bir ekspresyon vektörünün dizayn edilmesi amaçlandı.

Yapılan bu çalışmada, pHIG22 tabanlı ekspresyon vektörünün tasarlanması için pMKE2 (Biotools Inc.) plazmiti kullanıldı. pMKE2 plazmiti *E. coli-Thermus* suşlarında replike olabilen hibrit bir vektördür. HTK (Highly thermostable kanamycin cassette) kaseti, MCS bölgesi ve P_{nar} promotör bölgesi içerir. P_{nar} promotörü MCS bölgesinden klonlanan genlerin *Thermus thermophilus*'da ekspres edilmesini sağlamaktadır. pMKE2 plazmitinin bu özelliğinden yararlanılarak, pHIG22 tabanlı ekspresyon vektörü geliştirildi. Klonlama stratejisinin daha iyi anlaşılabilmesi için klonlama aşamaları Şekil 27'de gösterilmektedir.



Şekil 27. Ekspresyon vektörünün dizayn aşamalarının şematize edilmesi

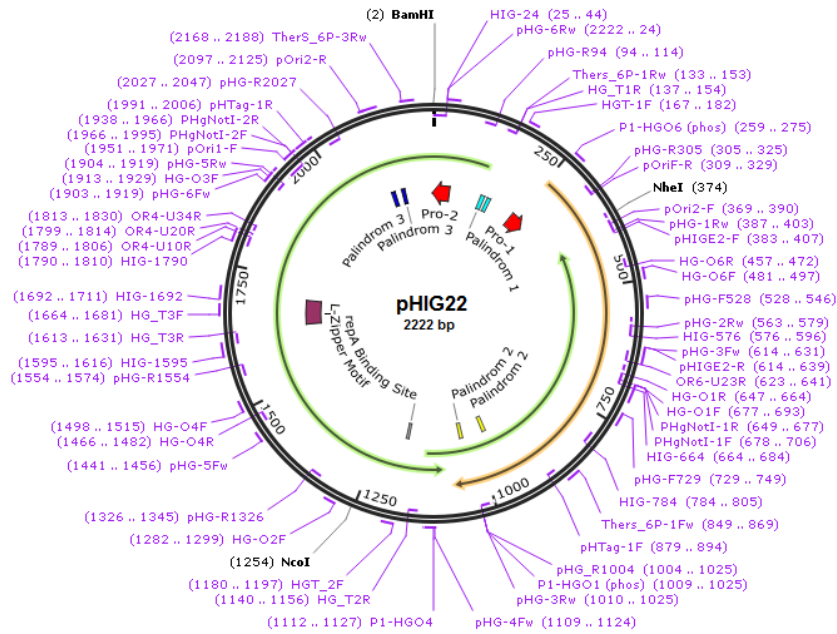
İlk olarak pMKE2 plazmitinden, *Thermus ori* bölgesi dışarda kalacak şekilde, dizayn edilen spesifik primerler (Tablo 39) kullanılarak iki farklı bölge PCR ile çoğaltıldı. Dizayn edilen primerlerin 5' uçlarına *Hind*III tanıma dizisi, 3' uçlarına da *Cla*I tanıma dizisi eklendi. *Hind*III ve *Cla*I restriksiyon edonükleazları ile kesilen fragmentler aynı yapışkan uçlara sahip bölgelerden, oryantasyon farkı olmadan self-ligasyon ile birleştirildi.

İkinci olarak pHIG22 plazmitinin minimal replikonu, 3' uçlarında *Cla*I tanıma dizisi ekli pHIGE2F ve pHIGE2R primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen fragment *Cla*I restriksiyon endonükleazı ile kesilerek, yapışkan uçlara sahip olması sağlandı ve bir önceki aşamada 2 fragmentin birleştirilmesiyle elde edilen vektöre *Cla*I kesim bölgesinden klonlandı. Tüm klonlama aşamaları *E. coli* JM101 suşunda gerçekleştirildi. Elde edilen hibrit vektöre pHIGKE2 adı verildi. pHIGKE2 plazmiti; kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve P_{nar} bölgesi ve pHIG *ori* bölgesini içermektedir.

3. BULGULAR

3.1. pHIG22'nin Biyoinformatik Analizi

Lasergene 9.1. (DNASTar Inc.) programı ile yapılan analiz sonucunda pHIG22 genomunda 3 palindrom dizi, OriFinder (Gao ve Zhang, 2008) programı ile 3 muhtemel ORF bölgesi belirlenmiştir. MOTIF (URL-4), MCAST (URL-5) ve Softberry Analysis (URL-2) araçları kullanılarak, pHIG22 baz dizininin 6 frame'de protein sırasına dönüştürülmesiyle elde edilen aminoasit sıraları analiz edilmiş ve analiz sonucunda Lözin Zipper ve RepA bağlanma motifleri tespit edilmiştir. Neural Network Promoter Prediction (Reese vd., 2001) aracı ile yapılan promotör analizi sonucu her iki zincirde promotör dizileri (Pro-1 ve Pro-2) tespit edilmiştir. Elde edilen biyoinformatik veriler, plazmiti tek kesen restriksiyon endonükleaz bölgeleri ve FastPCR programı kullanılarak pHIG22 genomundan dizayn edilen tüm primerler Şekil 28'deki SnapGene Viewer Version 2.2.2. (Biotech LLC) programıyla çizilen pHIG22 haritası üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 28. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilen verilerin pHIG22 haritası üzerinde gösterimi. Karakterizasyon çalışmalarında dizayn edilen ve kullanılan bütün primerlerin pHIG22 üzerinde bağlandığı bölgeler gösterilmektedir (harita üzerindeki sayılar primerlerin plazmit üzerinde bağlandıkları bölgeleri göstermektedir. Sayılardan ilki primerin başlangıç nükleotidini, ikincisi ise bitiş nükleotidini ifade etmektedir)

3.2. pHIG22'nin Minimal Replikonunun Belirlenmesi

pHIG22 plazmitinin replikasyondan sorumlu minimal bölgesinin belirlenmesi için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1. pHIG22 Parçalarının HTK Kaseti ile Birleştirilmesi ve *Thermus thermophilus* HB27'ye Transformasyon Çalışmaları

pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinden PCR ile çoğaltılan pHIG22 parçalarının HTK kaseti (*Thermus* cinsinde aktif olan gen, yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimini kodlamaktadır) ile birleştirilmesi sonucu pHIG22'nin replikasyonu incelenmiştir. Biyoinformatik analiz sonuçları dikkate alınarak, pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinden dizayn edilen 5 çift spesifik primer kullanılarak PCR ile plazmitin tamamı veya hemen hemen tamamı çoğaltılmış, pMK18 plazmitinden spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan HTK kaseti ile doğrudan birleştirilmiş ve *Thermus thermophilus* HB27 suşuna termofilik transformasyon yöntemine göre transform edilmiştir.

Yapılan transformasyonlar sonucunda, kanamisinli petrielerde herhangi bir koloni oluşumu gözlenmemiştir. Ligasyon ürünlerinin klon haline getirilmeden doğrudan transformasyonu sonucu, *Thermus Thermophilus* HB27'nin restriksiyon endonüklaz sistemi tarafından degrades edildiği düşünüldüğünden farklı bir yaklaşım geliştirilerek aşağıdaki çalışma yapılmıştır.

3.2.2. pUCHTK Tabanlı Hibrit Plazmitlerin Oluşturulması

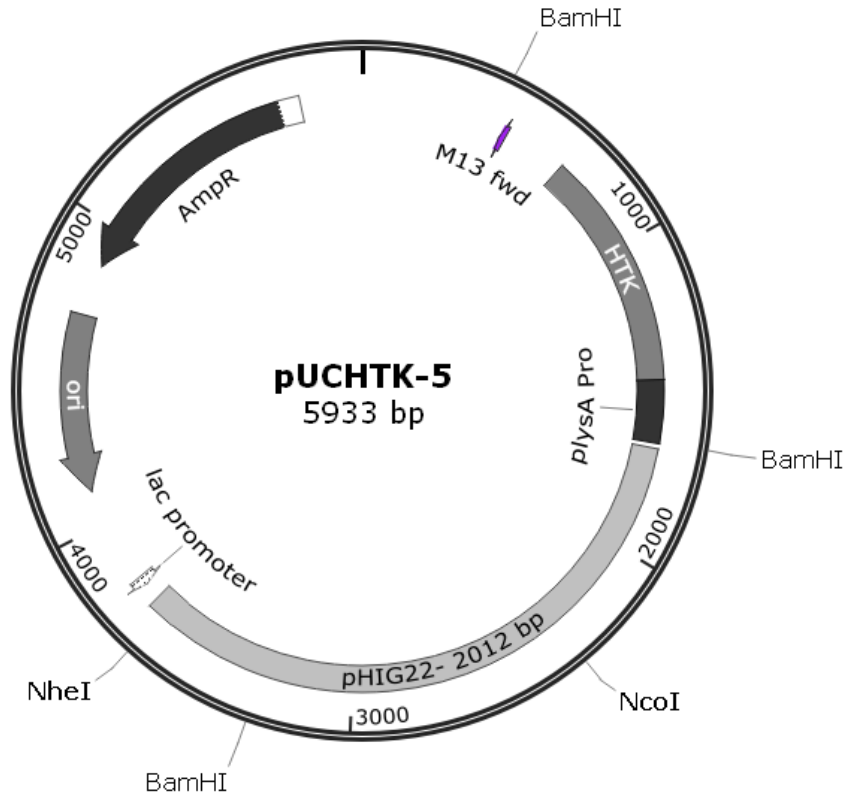
pUC18 plazmitinin *Thermus* cinsi bakterilerde replike olamama özelliği kullanılarak, pUC18 plazmiti, HTK (*Thermus* cinsinde aktif olan gen, yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimini kodlamaktadır) kaseti ve farklı bölgelerden PCR ile çoğaltılan pHIG22 fragmentleri birleştirilerek (pUC18+HTK kaseti+pHIG22) hibrit plazmitler oluşturulmuş ve termofilik organizmalara transform edilmiştir.

Dizayn edilen 11 çift spesifik primer kullanılarak, pHIG22 plazmiti PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen 11 farklı pHIG22 fragmenti pUCHTK vektörüyle (pUC18 ve HTK kasetinin birleştirilmesiyle elde edilen vektör) birleştirilmiştir. *E. coli* JM101 suşunda

oluşturulan klonlar, sırasıyla *Thermus thermophilus* HB27, *Thermus* sp. M5 ve *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi barındıran orijinal suş) suşlarına termofilik transformasyon metoduna göre transform edilmiştir.

Yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda pUCHTK-5 hibritinin (Şekil 29) *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi taşıyan orijinal suş) suşunda replike olabildiği belirlenmiştir. Transformasyon sonucu petrielerde oluşan koloniler kanamisinli TM besiyerinde gecelik kültürlerle alınmış, gece kültürlerinin çöktürülmesi ile elde edilen pelletlerden plazmit izolasyonu yapılmış ve sonuçlar agaroz jelde incelenerek tespit edilmiştir.

Thermus thermophilus HB27 suşuna yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda, pUCHTK-5 hibrit plazmitinin, *Thermus thermophilus* HB27 suşunda da replike olabildiği belirlenmiştir. HB27 klonilerinden yapılan plazmit izolasyonu sonucu pUCHTK-5 plazmiti jelde görüntülenmiştir, ancak alt kültür sayısı yani pasaj sayısı arttıkça pUCHTK-5 plazmitinin hücre kopya sayısının yavaş yavaş azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 29. pUCHTK-5 hibritinin haritası

pUC18 iskeletini kullanan pUCHTK-5 plazmitinin 5 numaralı pHIG22 parçasını kullanarak HB27 ve K6 suşlarında replike olması, 2012 bp büyüklüğünde olan bu pHIG22 parçasının plazmitin replikasyonu için gerekli olan elemanları ve minimal *ori* bölgesini taşıdığını göstermiştir. Böylece, bu bölgenin pHIG22 plazmitinin minimal replikonu olduğu ortaya çıkarılmıştır.

3.3. *E. coli*'de Replikasyonun Araştırılması

Thermus cinsine ait plazmitlerin *E. coli* suşlarında replike olmadığı literatürden bilinmekle beraber, bunun teyidi için pHIG22 plazmitinin *E. coli* hücrelerinde replike olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada, farklı bölgelerden çoğaltılan pHIG22 parçaları (2.2.2.1 pHIG22 parçalarının HTK kaseti ile birleştirilmesi başlıklı çalışmada belirtilen spesifik primerler (Tablo 3) bu çalışma için de kullanılmıştır) pET28a+ vektörü ile birleştirilerek hibrit vektörler oluşturulmuş (bu pHIG22 parçalarından 5 numaralı olanını taşıyan pUCHTK-5 hibritinin *Thermus* cinsinde replike olduğu önceki çalışma ile belirlenmiştir) ve sonrasında pET28a+ replikasyon orijini silinerek oluşturulan rekombinant plazmitlerde pHIG22 replikasyon orijininin kullanımı sağlanarak *E. coli* suşlarında replike olup olmadığı belirlenmiştir.

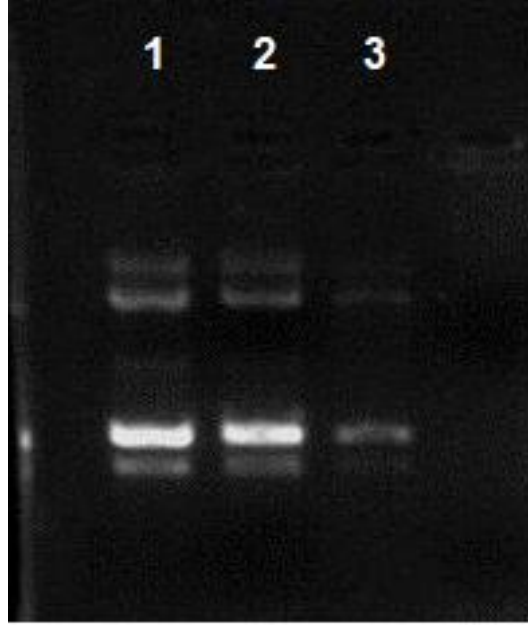
Yapılan transformasyon çalışmaları 3 tekrarlı olarak yapılmış ve kanamisinli petrilerde herhangi bir koloniye rastlanılmamıştır. Bu sonuç, *Thermus* cinsinde replike olabilmeyi sağlayan pHIG22 parçasının ve farklı 4 diğer pHIG22 parçasının kullanılarak oluşturulmuş plazmitlerin, *E. coli* suşlarında replike olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

3.4. *Thermus scotoductus* K6'da Plazmit Curing

Literatürde *Thermus* cinsi bakterilerde curing ajanı olarak en fazla SDS, Etidyum Bromür ve Akridin Oranj kullanıldığı bilindiğinden, bu ajanların farklı konsantrasyonları curing ajanı olarak kullanılmıştır. *Thermus scotoductus* K6 suşu için, Etidyum bromürün farklı konsantrasyonları denenmiş ve curing'de etkili olmadığı belirlenmiştir (veri verilmemiştir). SDS ile Akridin Oranj'ın birlikte uygulanmasıyla elde edilen ilk birkaç alt kültürden yapılan plazmit izolasyonları sonucu hücrelerden elde edilen plazmit

DNA'larının yoğunluklarında kademeli olarak bir azalma meydana geldiği görülmüştür (Şekil 30).

Plazmit yoğunluğunun en fazla azaldığı örneklerin 1 ppm SDS ve 30 ppm Akridin Oranj'ın birlikte kullanıldığı örneklerde olduğu tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonların artırıldığı durumlarda K6 hücrelerinin büyümesinin engellendiği saptandığından, daha yüksek konsantrasyonlar denenmemiştir.

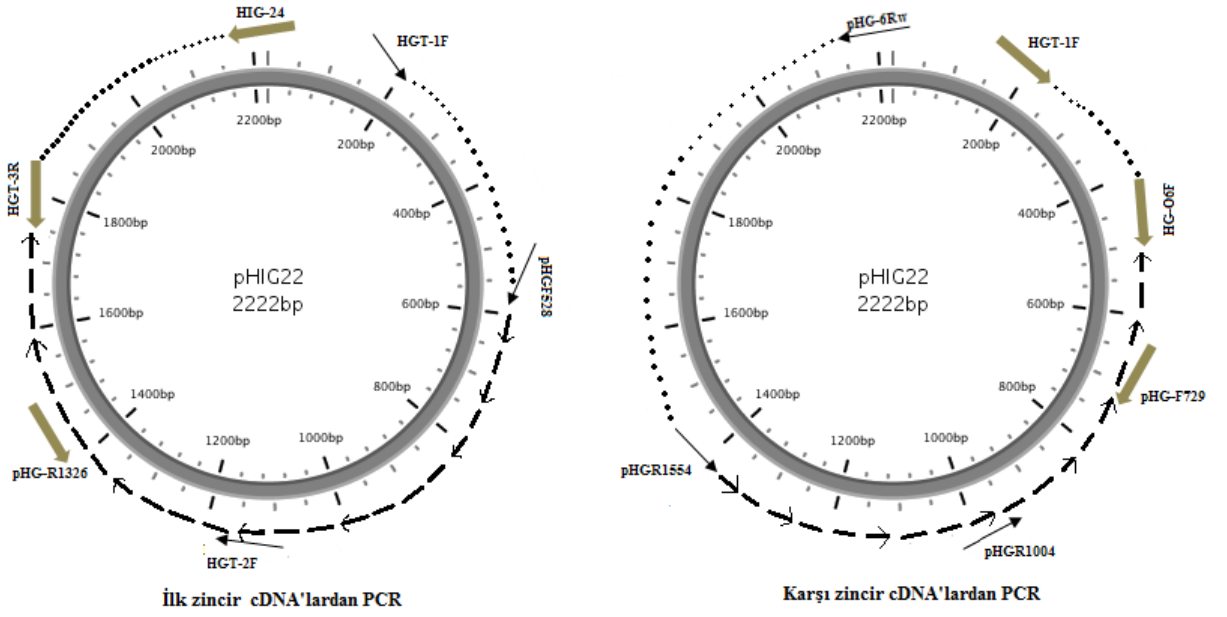


Şekil 30. K6 suşu için plazmit curing denemeleri.1) pHIG22 (Kontrol) plazmiti; 2) beşinci alt kültürden yapılan plazmit izolasyonu; 3) sekizinci alt kültürden yapılan plazmit izolasyonu sonuçlarını göstermektedir

Şekil 30'da görüldüğü üzere 8. alt kültürden itibaren plazmit yoğunlukları azalmış fakat sonraki alt kültürlerde tamamen kaybolmadığı saptanmıştır. Birçok deneme yapılmasına rağmen, K6 hücrelerinden pHIG22 plazmiti tamamen uzaklaştırılamamıştır. Sonuç olarak, kullanılan curing ajanlarının K6 suşu üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu sebepten, pHIG22 plazmitinden kodlanabilecek proteinlerin tespit edilebilmesi için başka yaklaşımlar devreye sokulmuştur.

3.5. pHIG22 Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi

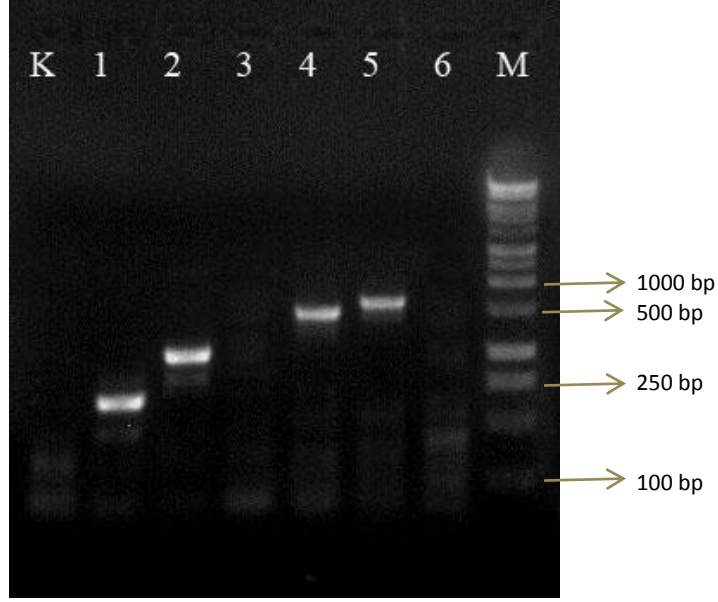
pHIG22 plazmitinden kodlanan transkriptlerin belirlenebilmesi için, *Thermus scotoductus* K6 Total RNA'sının kalıp olarak kullanılması ile plazmitin her iki zincirinde belirli aralıklarla farklı bölgelerden spesifik primerler dizayn edilerek cDNA sentezi yapılmış ve elde edilen cDNA'lar PCR ile çoğaltılarak, transkriptlerin oryantasyonu ve muhtemel büyüklükleri belirlenmiştir.



Şekil 31. cDNA'ların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen fragmentlerin gösterimi. İnce oklar ilk zincir cDNA oluşturmada kullanılan primerleri, kalın oklar PCR reaksiyonunda kullanılan geri primerleri, kesik çizgili bölge cDNA'dan PCR sonucu ürün elde edilen bölgeleri, noktali bölge transkriptlerin başlama ve bitiş bölgelerinin bulunduğu aralığı göstermektedir

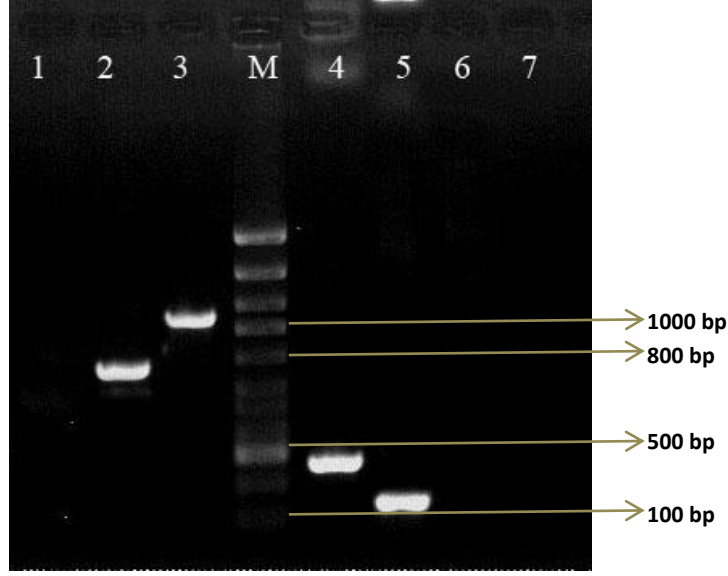
Şekil 31'de görüldüğü üzere clockwise zincir için, cDNA oluşturma da 3 farklı primer kullanılmış ve bu primerlerden pHG-F528 ve HGT-2F primerleri ile yapılan reverz transkripsiyon sonrası cDNA ürünü elde edilmiştir. HGT-1F primeri ile yapılan cDNA oluşturma reaksiyonunda ürün elde edilememesi transkriptin başlama noktasının bu primerin bağlandığı noktadan daha ileri bir bölgede olduğunu göstermiştir. Elde edilen iki cDNA'nın kalıp olarak kullanılması ile belirli aralıklarda bulunan geri primerler ile yapılan PCR'lar sonucunda HGT-3R primerinin bulunduğu bölgeye kadar PCR ürünü elde edilmiştir. Daha geri primer olan HIG-24 ile yapılan PCR sonucunda ürün elde

edilememesi sonucu, mevcut transkriptin bu iki primer bölgesinin arasında herhangi bir bölgede sonlandığını göstermiştir (Şekil 32).



Şekil 32. Clockwise zincirden üretilen cDNA'larının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri. 1) pHG-R1004/pHG-F729, 2) pHG-R1004/HG-O6F, 3) pHG-R1004/HGT-1F, 4) pHG-R1554/pHG-F729, 5) pHG-R1554/HG-O6F, 6) pHG-R1554HGT-1F primerleri ile yapılan PCR sonuçları, M) Marker, K) Negatif kontrol

Şekil 31'de görüldüğü üzere anticlockwise zincir için, cDNA oluşturmada 3 farklı primer kullanılmış ve bu primerlerden pHG-R1554 ve pHG-R1004 primerleri ile yapılan revers transkripsiyon sonrası cDNA ürünü elde edilmiştir. pHG-6RF primeri ile yapılan cDNA oluşturma reaksiyonunda ürün elde edilememesi transkriptin başlama noktasının bu primerin bağlandığı noktadan daha ileri bir bölgede olduğunu göstermiştir. Elde edilen iki cDNA'nın kalıp olarak kullanılması ile belirli aralıklarda bulunan geri primerler ile yapılan PCR'lar sonucunda HG-O6F primerinin bulunduğu bölgeye kadar PCR ürünü elde edilmiştir. Daha geri primer olan HGT-1F ile yapılan PCR sonucunda ürün elde edilememesi sonucu, mevcut transkriptin bu iki primer bölgesinin arasında herhangi bir bölgede sonlandığını göstermiştir (Şekil 33).



Şekil 33. Anticlockwise zincirinden üretilen cDNA'larının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri. 1) pHG-F528/HIG-24, 2) pHG-F528/HGT-3R, 3) pHG-F528/pHG-R1326, 4) HGT-2F/pHG-R1326, 5) HGT-2F/HGT-3R, 6) HGT-2F/HIG-24 primerleri ile yapılan PCR sonuçları, 7) Negatif kontrol, M) Marker

3.6. pHIG22 İçin RNA Analizleri, Transkriptlerin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi

pHIG22 plazmitinin ilk zincirinden kodlanan bir ve karşı zincirinde kodlanan bir olmak üzere, tahmini büyüklükleri ve oryantasyonları belirlenmiş toplam iki transkriptin 5' uçlarının belirlenmesi için RACE tekniği, 3' uçlarının belirlenmesi içinde LACE tekniği kullanılmıştır.

3.6.1. Transkript 1 ve 2'nin 5' Ucunun Belirlenmesi (RACE Tekniği)

Bu çalışmada 5'/3' RACE 2nd Generation (Version 13, Roche) kit kullanılmıştır. İlk olarak dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak ilk zincir DNA'lar oluşturulmuş, oluşturulan cDNA'lar saflaştırılmış, homopolimerik kuyruk eklenmiş ve hedef cDNA'lar PCR ile çoğaltılmıştır. Transkriptlerin çoğaltılan 5' uçları pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış ve Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizin analizine tabii tutulmuştur.

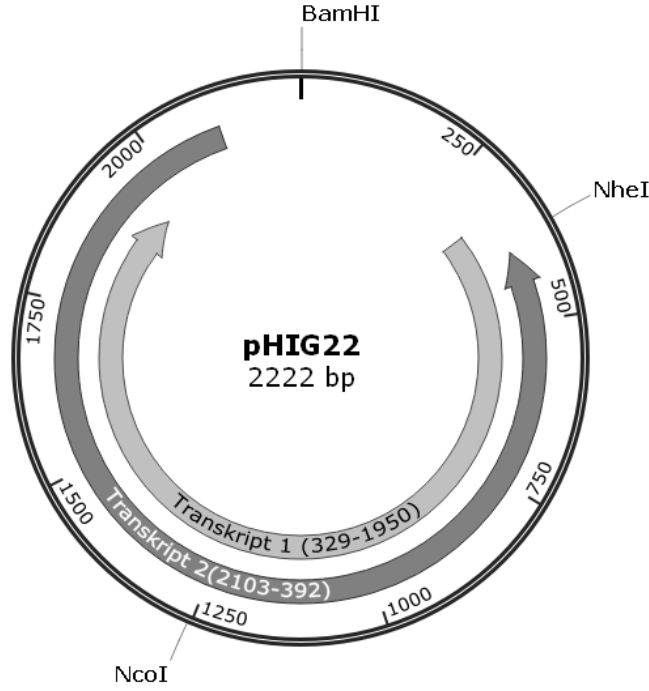
Dizin analiz sonuçları incelendiğinde Transkript 1'in 5' ucunun pHIG22 plazmitinin 329. bazı olduğu belirlenmiştir (*BamHI* kesim noktası plazmitin "0" noktası olarak kabul edilmiştir). Transkript 2 içinde yapılan aynı çalışmanın sonuçları incelendiğinde, transkriptin 5' ucunun pHIG22 plazmitinin 2103. bazı olduğu belirlenmiştir (Şekil 34).

3.6.2. Transkript 1 ve 2'nin 3' Ucunun Belirlenmesi (LACE Tekniği)

Transkriptlerin 3' uçlarının belirlenmesi için LACE tekniği kullanılmıştır. İlk olarak 5' ucu fosforillenmiş bir primer (P1) ilgili transkriptin 3' ucuna RNA ligaz ile yapıştırılmıştır. Ardından P1 primerine komplementer olan ters yönde başka bir primer (P2) kalıp olarak kullanılmış (bu primer P1 primerine bağlanmıştır) ve reverz transkripsiyon ile cDNA elde edilmiştir. Oluşturulan cDNA'lar üçüncü bir primer (P3) kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen fragmentler pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış, Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizin analizine tabii tutulmuştur.

Dizin analiz sonuçları incelendiğinde Transkript 1'in 3' ucunun pHIG22 plazmitinin 1950. bazında sonlandığı belirlenmiştir (*BamHI* kesim noktası plazmitin "0" noktası olarak kabul edilmiştir). Transkript 2 içinde yapılan aynı çalışmanın sonuçları incelendiğinde, transkriptin 3' ucunun pHIG22 plazmitinin 392. bazında sonlandığı belirlenmiştir (Şekil 34).

RACE ve LACE teknikleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 tarafından kodlanan Transkript 1'in 329. bazda başladığı, 1950. bazda sonlandığı; karşı zincirden kodlanan Transkript 2'nin de 2103. bazda başladığı ve 329. bazda sonlandığı ortaya çıkarılmıştır (*BamHI* kesim noktası plazmitin "0" noktası olarak kabul edilmiştir).



Şekil 34. Transkriptlerin başlama ve bitiş noktalarını gösteren harita

3.6.3. pHIG22 Transkriptlerinin Düzenleyici Bölgelerinin Analizi

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda da her iki bölgede promotor analizi yapılmıştır. BPRM, Promotor Predictor ve Neural Network Promoter Prediction araçları ile yapılan analizler sonucunda her iki düzenleyici bölgede promotor dizilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 35).

Promoter predictions for 1 prokaryotic sequence with score cutoff 0.20 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for pTR1-HTK :

Start	End	Score	Promoter Sequence
511	556	0.45	AC TCTCTT GCGCCG TGTG CCCAACGGGGTAAGCTACTCA C GTCAGGAAA

Promoter predictions for 1 prokaryotic sequence with score cutoff 0.20 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for pTR2-HTK :

Start	End	Score	Promoter Sequence
346	391	0.23	CCCCATTCCG TCGG TGGAGCTGGAGCCCATAGACTGGGAG G ATCCTGCTC

Şekil 35. Transkript-1 ve 2 düzenleyici bölgeleri için yapılan Promotor analiz sonuçları. Sonuçlar *Neural Network Promoter Prediction* aracı ile elde edilmiştir

Biyoinformatik analizlerin deneysel çalışmalar ile desteklenmesi için yapılan bu çalışmada pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin upstream bölgelerinde bulunan düzenleyici bölgelerinin çıkarılarak başka bir genin önüne eklenmesi ve eklenen bölgelerin promotor özelliği olup olmadığının bu genin (HTK) ekspresyonuna bakılarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

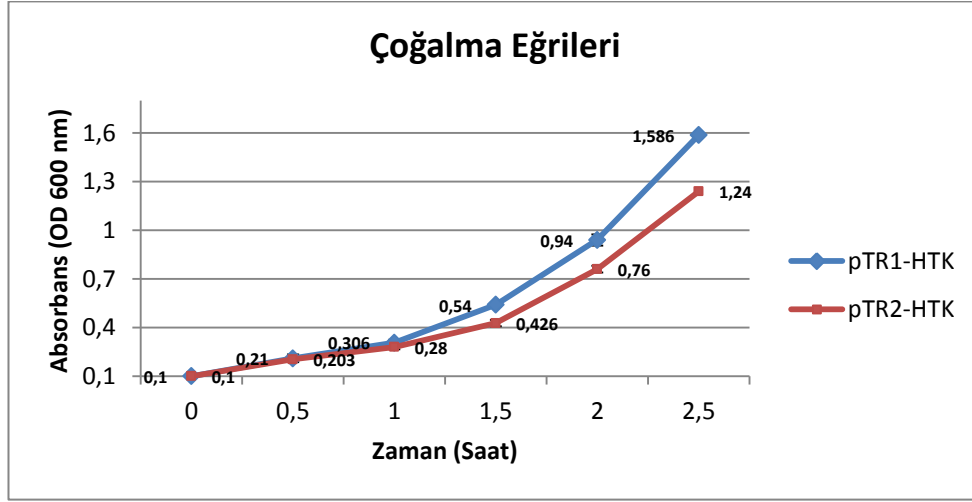
pHIG22 plazmitinden kodlanan 2 transkriptin upstream bölgesinde bulunan bölgeler (yaklaşık 500- 600 bp) önceki çalışmalarda kullanılan ve transkripsiyon başlama noktası (+1 pozisyon) bilinen HTK genine (Fernandes-Herrero vd., 1997) upstream bölgesinden birleştirilmiş ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemleri *E. coli* JM101 suşunda amfisilinli ortamda (pGEM-T Easy vektörü β -laktamaz enzimi kullanıldı) yapılmıştır. Oluşan iki klonla sırasıyla pTR1-HTK ve pTR2-HTK adları verilmiştir.

pTR1-HTK ve pTR2-HTK klonlarını barındıran *E. coli* JM101 suşları kanamisinli LB agar ($70\mu\text{g}/\mu\text{l}$) üzerine çizgi ekim yapılmış ve sonuçlar incelenmiştir. Şekil 36 'da görüldüğü üzere her iki düzenleyici bölgenin promotor taşıdığı, HTK geninin ekspres olması ile tespit edilmiştir. pTR1-HTK klonunu taşıyan JM101 suşu kanamisinli LB agar petrisinde iyi düzeyde büyümüş, ancak pTR2-HTK klonunu taşıyan JM101 suşu aynı şartlara sahip petride çok az düzeyde büyüebilmiştir. Yapılan 3 tekrarlı deneylerde aynı sonuçlar görülmüştür (Şekil 36).



Şekil 36. pTR1-HTK ve pTR2-HTK'yi barındıran JM101 suşlarının görüntüsü. 1) pTR1-HTK klonunu taşıyan JM101 hüresinin kanamisinli LB agarda ($70\mu\text{g}/\mu\text{l}$) çoğaltılması, 2) pTR2-HTK klonunu taşıyan JM101 hüresinin kanamisinli LB agarda ($70\mu\text{g}/\mu\text{l}$) çoğaltılması

Petrilerde oluşan büyüme farklılığının ne düzeyde olduğunun belirlenebilmesi için her iki klonu taşıyan JM101 hücrelerinden gecelik kültürler hazırlanarak her iki hücre için çoğalma eğrileri elde edilmiştir. Hazırlanan kültürlerden yapılan 4 tekrarlı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalaması kullanılarak çoğalma eğrisi grafiği çizilmiştir (Şekil 37) ve büyüyen kültürlerin büyüme farklılığın anlamlı olup olmadığının belirlenmesi için elde edilen verilere t-testi uygulanmıştır (Tablo 40).



Şekil 37. pTR1-HTK ve pTR2-HTK klonlarını taşıyan hücrelerin çoğalma eğrileri grafiği

Tablo 40. Çoğalma grafiği için yapılan t-testi sonuçları

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek

	pTR1-HTK	pTR2-HTK
Ortalama	1,3	1,190666667
Varyans	0,98737037	0,926510617
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,995032068	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
Df	9	
t Stat	3,378751138	
P(T<=t) tek-uçlu	0,004071547	
t Kritik tek-uçlu	1,833112933	
P(T<=t) iki-uçlu	0,008143095	
t Kritik iki-uçlu	2,262157163	

Bu teste başlamadan önce, verilerin normallik varsayımına bakılarak Kolmogorov-Smirnov (K-S) sınaması sonucunda verilerin normal dağılımdan geldiği gözlenmiştir. Bu testteki Kolmogorov-Smirnov istatistik değeri, 0,691 ve buna bağlı P değeri 0,726 olarak bulunmuştur. H_0 'da, iki örneğin eşitliği varsayıldığından ve Olasılık Değerimiz (P) 0,05 ten küçük olduğu için H_0 reddedilmiştir. Elde edilen bu sonuca göre, pTR1-HTK ve pTR2-HTK ortalamaları arasında fark olduğu belirlenmiştir.

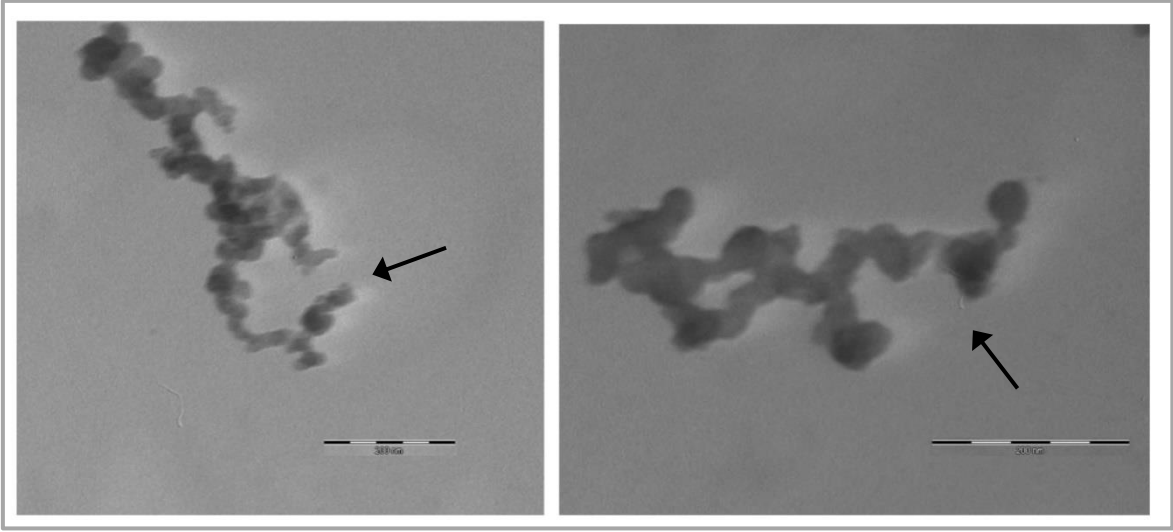
pTR1-HTK klonunu taşıyan hücrenin pTR2-HTK klonunu taşıyan hücreye göre daha hızlı çoğaldığı belirlenmiş (Şekil 37) ve elde edilen bu sonuçla, Transkript-1 düzenleyici bölgesinde bulunan promotörün Transkript-2 düzenleyici bölgesinde bulunan promotora göre daha güçlü bir promotör olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Hem biyoinformatik analiz sonuçlarının hem de deneysel sonuçların birbirini desteklemesi, her iki bölgede promotör dizilerinin olduğunu ve tespit edilen bu promotörlerin birbirlerine göre farklı düzeyde etkili olduklarını ortaya çıkarmıştır.

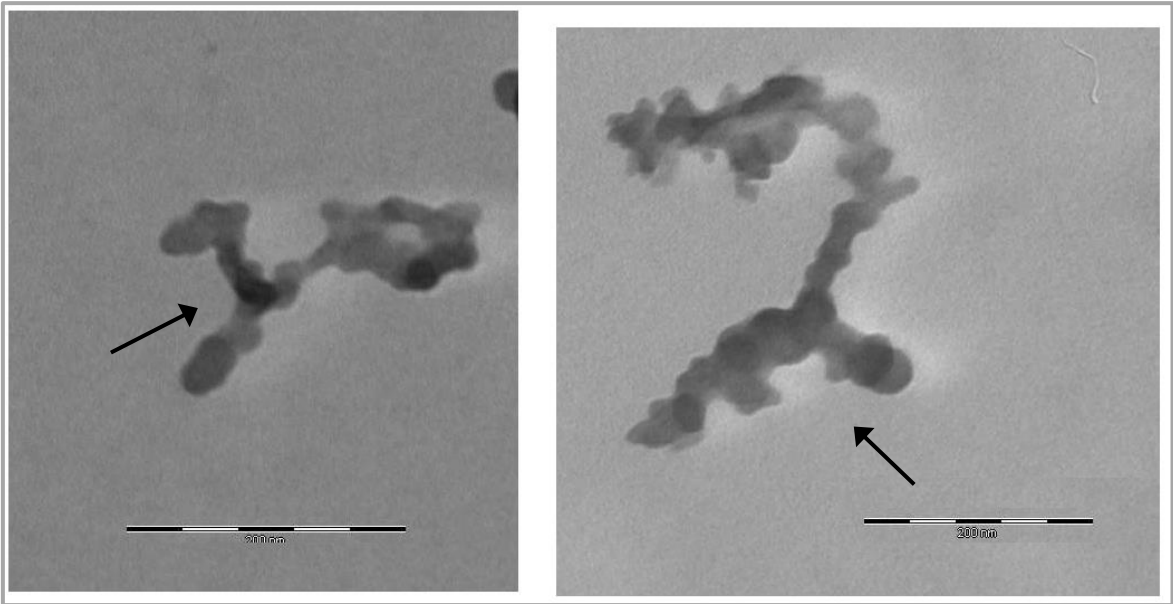
3.7. pHIG22 Replikasyon Orijini ve Modunun Belirlenmesi

pHIG22 plazmitinin replikasyon modunun ve orijininin belirlenmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) çalışması yapılmıştır.

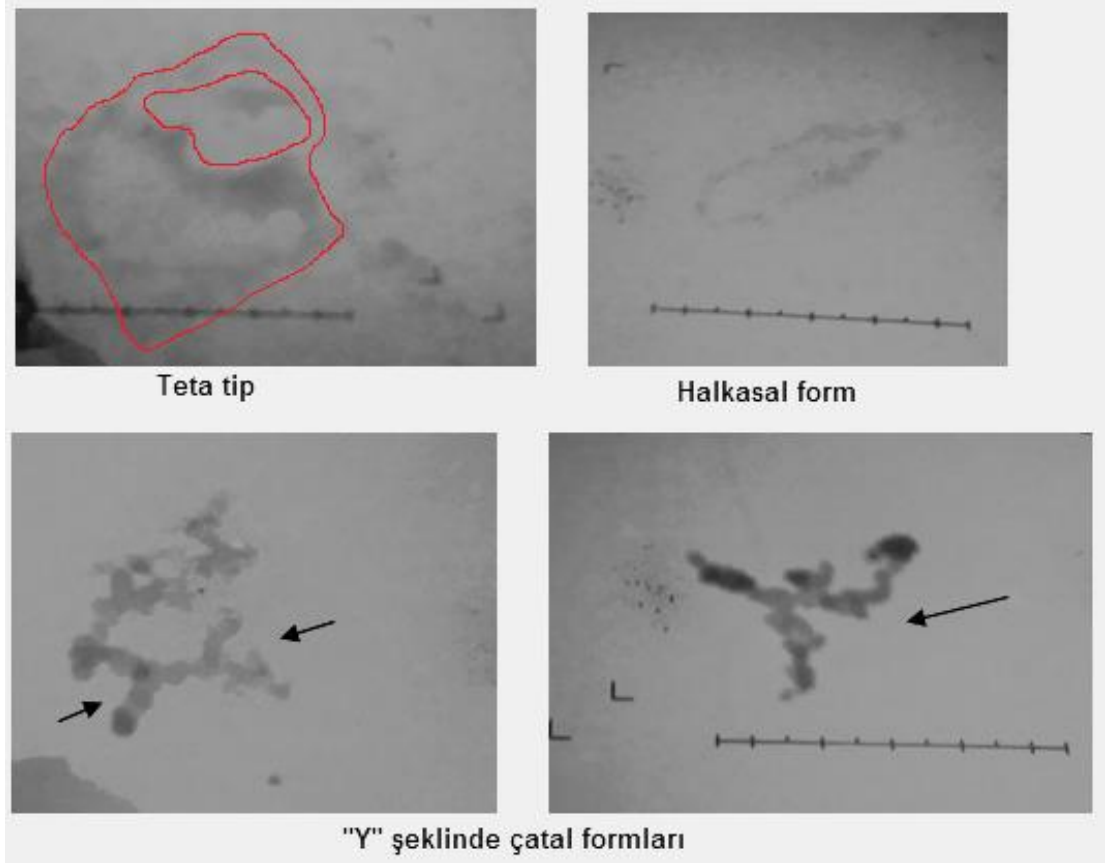
İlk olarak pHIG22 plazmitini tek noktadan kestiği bilinen *BamHI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak ve kesilmemiş pHIG22 plazmiti kullanılarak elektron mikroskop preparatları hazırlanmıştır. Kesim sonucu oluşan ara ürünlerde “Y” şeklinde çatallar, kesilmemiş plazmit örneklerinde de “Teta” şeklinde yapılar incelenmiştir. 3 tekrarlı olarak hazırlanan preparatlar TEM altında incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır (Şekil 38, 39 ve 40).



Şekil 38. pHIG22'nin *NcoI* ile kesimi sonucunun TEM görüntüleri. Ok işaretleri replikasyon çatalını göstermektedir. Barların uzunluğu 300 nm'dir



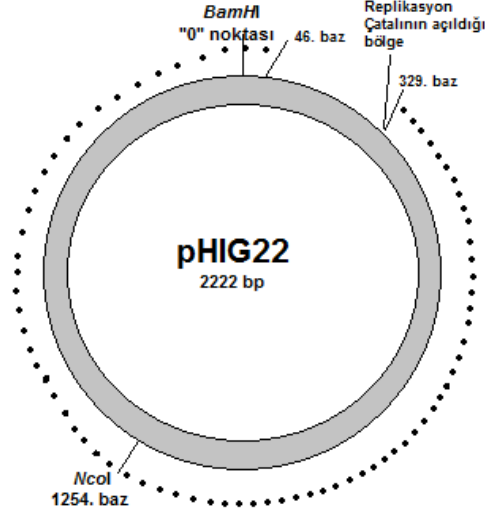
Şekil 39. pHIG22'nin *BamHI* ile kesimi sonucunun TEM görüntüleri. Ok işaretleri replikasyon çatalını göstermektedir. Soldaki barın uzunluğu 200 nm, sağdaki barın uzunluğu 300 nm'dir



Şekil 40. pHIG22 plazmitinin değişik formlarının TEM görüntüleri

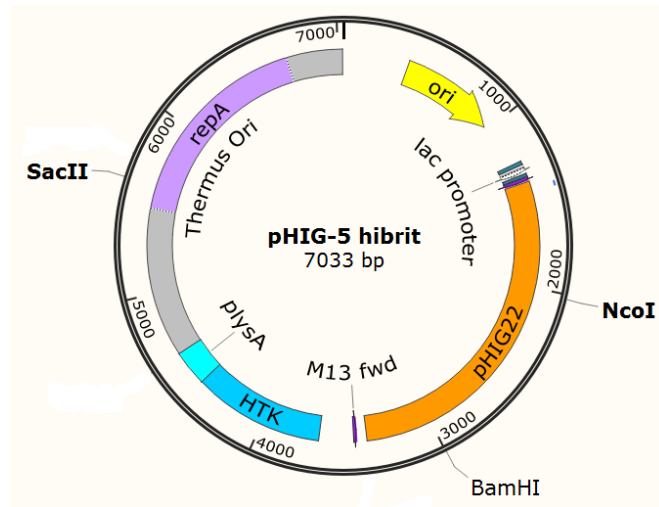
İncelemeler sonucunda kesilmemiş pHIG22 plazmiti kullanılarak hazırlanan örnekte Teta harfine benzer yapılar görülmüştür. Ayrıca *BamHI* restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş pHIG22 örneğinde de literatürde belirtildiği gibi “Y” şeklinde yapılar görülmüştür (Şekil 39). Yapılan birkaç tekrarlı çalışmada da aynı yapılar gözlenmiştir. Aynı şekilde, *NcoI* endonükleazının pHIG22 replikasyon orijinini iç bölgeden kestiği ve çatal şeklinde yapılar oluştuğu görülmüştür (Şekil 38). Böylece, plazmitin *BamHI* kesim bölgesinden 1254 bp uzakta olan *NcoI* kesim bölgesinden de kesilmiş olması replikasyon orijin bölgesininin bu iki enzim (*BamHI* ve *NcoI*) bölgelerinin her ikisini de içine aldığı göstermiştir. Elde edilen fotoğraflardan replikasyon orijininin yaklaşık uzunluğu ve sınırları belirlenmiştir. Şekil 38 ve 39’da kesilen replikasyon çatalının uzunlukları görülmektedir. Oluşan çatalların her iki kolunun uzunlukları hesaplanmış ve replikasyon orijininin başlama ve bitiş bölgeleri yaklaşık olarak belirlenmiştir. Replikasyon orijin bölgesi Transkript-1’in promotor bölgesinin upstream’inden başlayıp Transkript-2’nin promotor bölgesine de içine alan 2029 bp’lik bir bölge (46 ila 239 bazları arasında kalan bölge hariç

plazmitin tamamı) olarak belirlenmiştir. Alınan TEM analiz sonuçları replikasyon çatalının Transkript-1'in +1 pozisyonundan başladığını desteklemektedir (Şekil 41).



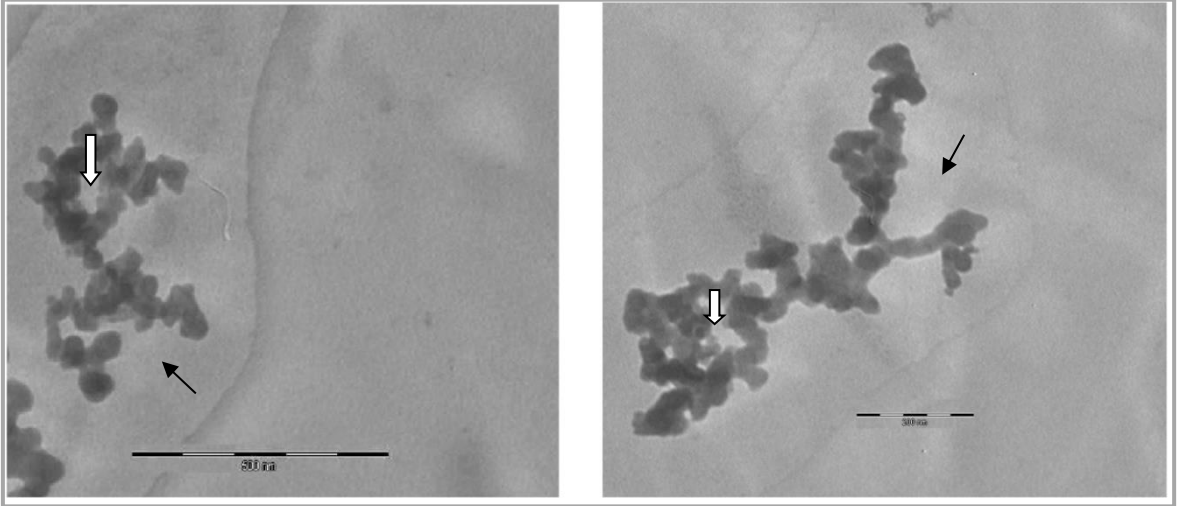
Şekil 41. pHIG22 replikasyon *ori* bölgesinin harita üzerinde gösterimi. Noktalı bölge replikasyon orijin bölgesini ifade etmektedir

İkinci olarak, pHIG-5 plazmiti (pHIG22 ve pMK18 hibriti olan bu plazmitteki pHIG22 parçası K6 suşunda replike olabilen parçadır) *SacII* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiş ve incelenmiştir. Yapılan bu çalışma ile de pHIG22'nin, pHIG-5 hibritinin replikasyonunda etkili olup olmadığı ve replikasyon çatalı oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.



Şekil 42. pHIG-5 hibritinin haritası

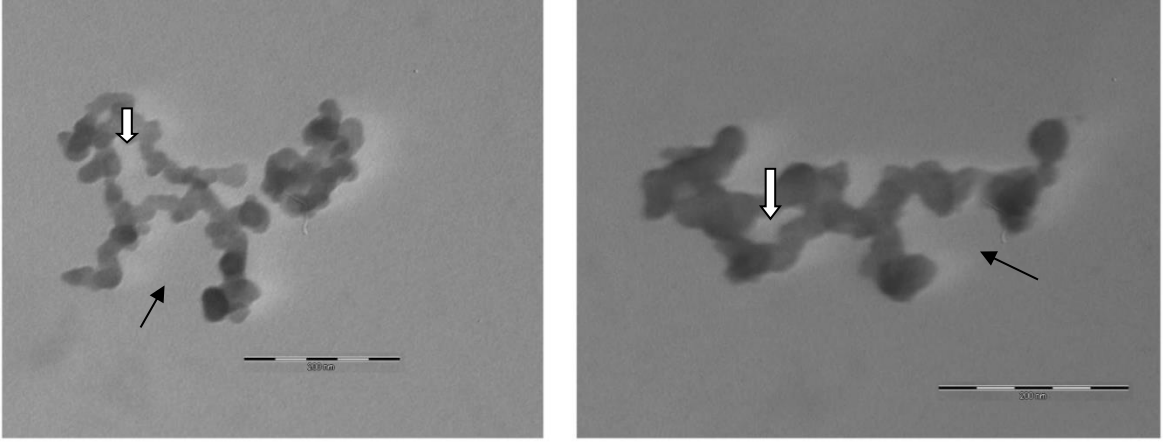
pHIG-5 plazmiti üzerinde *Thermus* replikasyon orijini bulunmakta ve *SacII* enzimi bu replikasyon orijininin iç bölgesinden kesmektedir. Bu şekilde pHIG-5 plazmitindeki *Thermus ori* bölgesinden oluşan replikasyon çatalının kesilmesi ve görüntülenmesi sağlanmıştır. Elde edilen görüntülerde, aynı pHIG-5 plazmiti üzerindeki pHIG22 bölgesinde oluşan replikasyon çatalı incelenmiştir. *SacII* enzimi ile kesim sonucu *Thermus ori* bölgesinde “Y” harfine benzer bir yapının oluştuğu, karşı bölgesindeki pHIG22 plazmit bölgesinde ise kabarcık şeklinde yapının oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 43). Bu sonuçla, replikasyonun hem pHIG-5 plazmitinin *Thermus ori* bölgesinde başladığı hem de pHIG22 *rep ori* bölgesinde başladığı ortaya çıkarılmıştır. Yani hibrit plazmitte, her iki *rep ori* de aynı anda kullanılmaktadır.



Şekil 43. pHIG-5 plazmitinin *SacII* ile kesim sonrası TEM görüntüsü. Siyah ok işaretleri kesim bölgesinde oluşan “Y” çatalını, beyaz oklar ise halka yapısını (*rep* orijini) göstermektedir. Sol resimdeki barın uzunluğu 500 nm, sağ resimdeki barın uzunluğu ise 300 nm’dir

NcoI restriksiyon enzimi pHIG-5 hibritindeki pHIG22 *ori* bölgesinin iç kısmından, kenarına yakın bölgeden kesmektedir. pHIG-5 plazmitinin *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen görüntüler TEM altında incelenmiştir. İnceleme sonucunda, replikasyon çatalının kesim yapılan bölgede oluştuğu ve kesim sonucunda çatalın kesilerek “Y” harfine benzer bir yapının oluştuğu görülmüştür. “Y” şekline benzer yapının görülmesi pHIG22’nin replikasyonu başlatmak için halka yapısı oluşturduğunu göstermektedir. Kullanılan *NcoI* enzimi sadece pHIG22 bölgesinden DNA’yı kestigi için *Thermus ori* (pMK18 replikasyon *ori* bölgesi) bölgesinde herhangi bir “Y” yapısı

görülmemiş, sadece halka yapı gözlenmiştir (Şekil 44). Bu sonuç bize, hibrit plazmit olan pHIG-5 plazmitinin replikasyonunda, pHIG22 plazmitinin replikasyon orijininin de kullanıldığını göstermektedir.



Şekil 44. pHIG-5 plazmitinin *NcoI* ile kesim sonucu TEM görüntüsü. Siyah ok işaretleri pHIG22 replikasyon orijin bölgesinde oluşan “Y” çatal yapısını, beyaz oklar ise *Thermus ori* (pMK18 replikasyon orijini) halka yapısını göstermektedir. Sol resimdeki barın uzunluğu 300 nm, sağ resimdeki barın uzunluğu ise 200 nm’dir

3.8. pHIG22’nin Transkriptlerinin Proteine Dönüşüp Dönüşmediğinin Belirlenmesi

pHIG22’nin transkriptlerinin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için aşağıda anlatılan 4 farklı yaklaşım geliştirilmiş ve her bir çalışma sonucunda ortaya çıkan sonuçlar irdelenerek diğer çalışmalar yapılmıştır. Bu yüzden yapılan 4 çalışma birbiri ile bağlantılı olup, elde edilen bulgular aynı sonucu desteklemiştir.

Yapılan bu çalışmaların ilkinde, farklı bölgelerden tamamı çoğaltılan 5 farklı pHIG22 parçasının pMK18 vektörü ile birleştirilmesi ve oluşan hibritlerin ürettiği proteinlerin karşılaştırılarak pHIG22 tarafından kodlanabilecek proteinlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. pHIG22’den kodlanabilecek proteinlerin doğru okuma çerçevesinde olmaması ya da promotor bölgelerin doğru şekilde klonlanamama ihtimali düşünülerek ikinci bir çalışma yapma ihtiyacı doğmuştur.

Yapılan ikinci çalışmada, pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin belirlenmesi sonrası, transkriptlerin başlama noktaları göz önünde bulundurularak farklı pHIG22 parçalarının promotor bölgeleri kapsayacak şekilde HisTag ilaveli olarak çoğaltılması ve bu parçaların transle olup olmadığının incelenerek olası proteinlerin tespit edilmesi

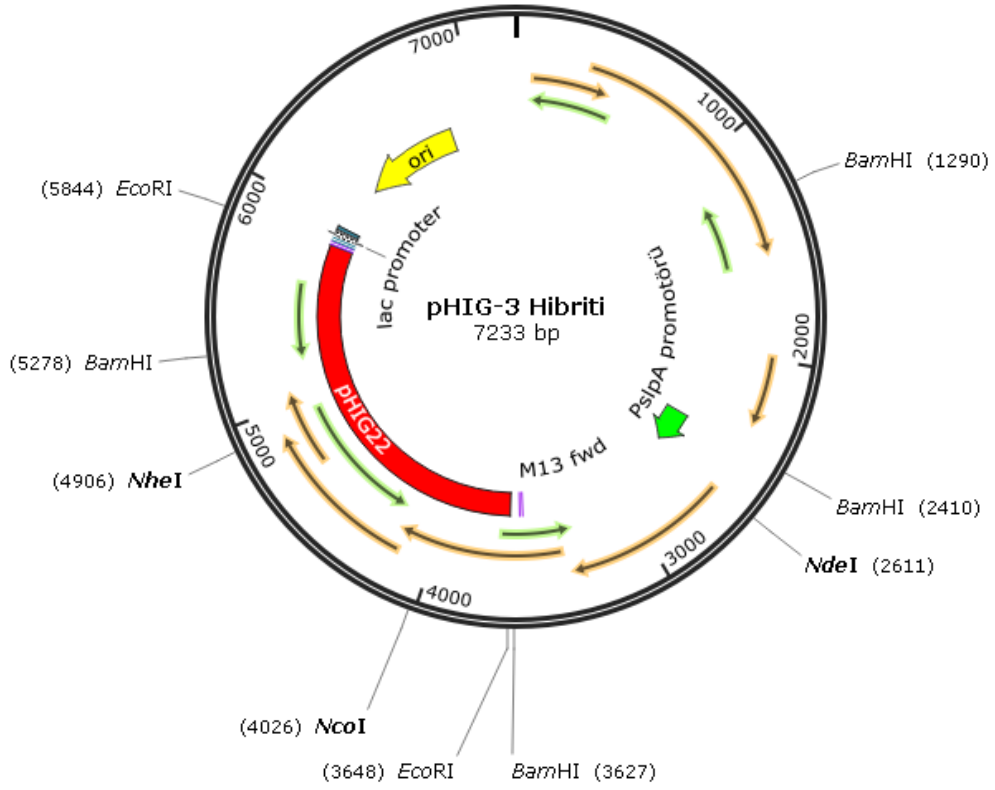
amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışmada herhangi bir proteine rastlanılmaması sonucunda, pHIG22'den herhangi bir protein kodlanmadığı sonucu desteklenmiş fakat pHIG22 parçalarından oluşabilecek proteinlerin tüm genom düşünüldüğünde çok düşük seviyede kalması veya hücrede degrede edilmiş olabileceği ihtimali de göz önünde bulundurularak bu sorunun aşılması için üçüncü bir çalışma yapılmıştır. Böylece pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin proteine dönüşmediğinden emin olabilmek için diğer yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu yaklaşımda pHIG22 plazmitinin her iki zincirinde transkript kodladığı belirlenen iki farklı bölgeye, daha önce laboratuvarımızda karakterize edilen termofilik bir enzimi kodlayan karboksilesteraz geni sokulmuş ve oluşacak proteinlerin belirlenebilmesi için; aktivitesi kolay tespit edilebilen bu genin kodladığı karboksilesteraz enzimi kullanılmıştır. pHIG22 transkriptlerinden zayıf da olsa bir ekspresyon varsa bunun tespiti için yapılan bu çalışmada; klonlama stratejisi geliştirilirken olası tüm frame'lerden protein oluşabileceği ihtimali göz önünde bulundurularak, her iki oryantasyonda ve tüm okuma çerçevelerinde toplam 12 farklı klon edilmiştir. Böylece pHIG22'den oluşabilecek olası tüm proteinlerin tespit edilmesi, tespit edilen proteinlerin oryantasyonu ve translasyon için hangi frame'inin kullanıldığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile de pHIG22 tarafından kodlanan bir protein tespit edilememesi, plazmitin replikasyonu için konak faktörlerini kullandığı fikrini güçlendirmiş ve bunun kesinleştirilmesi için dördüncü ve son bir çalışma daha yapılmıştır.

Yapılan bu son çalışma ile bir önceki çalışmada kullanılan karboksilesteraz geninin 3' ucuna HisTag kuyruğu takılmış ve üçüncü çalışmada oluşturulan tüm klonların (12 klon) HisTag ilaveli olması sağlanmıştır. Çalışmanın tüm aşamaları bir önceki çalışma ile aynı olup tek ayırım elde edilen karboksilesteraz genlerinin 3' ucuna HisTag dizisi ilave edilmesidir. HisTag ilaveli olası rep-karboksilesteraz füzyonlarının tespit edilebilmesi için Western Blot analizi yapılmış ve olası proteinlerin, çok düşük seviyede dahi olsa, tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan bu son çalışma ile de pHIG22 tarafından kodlanabilecek herhangi bir proteinin ekspresyon seviyesinin çok düşük olma ihtimali ya da doğru katlanamama ihtimali olsa dahi tespiti mümkün kılınmıştır. Yapılan 4 farklı çalışma birbiri içinde desteklenmiş ve olası tüm ihtimaller düşünülerek ardı ardına yapılmıştır.

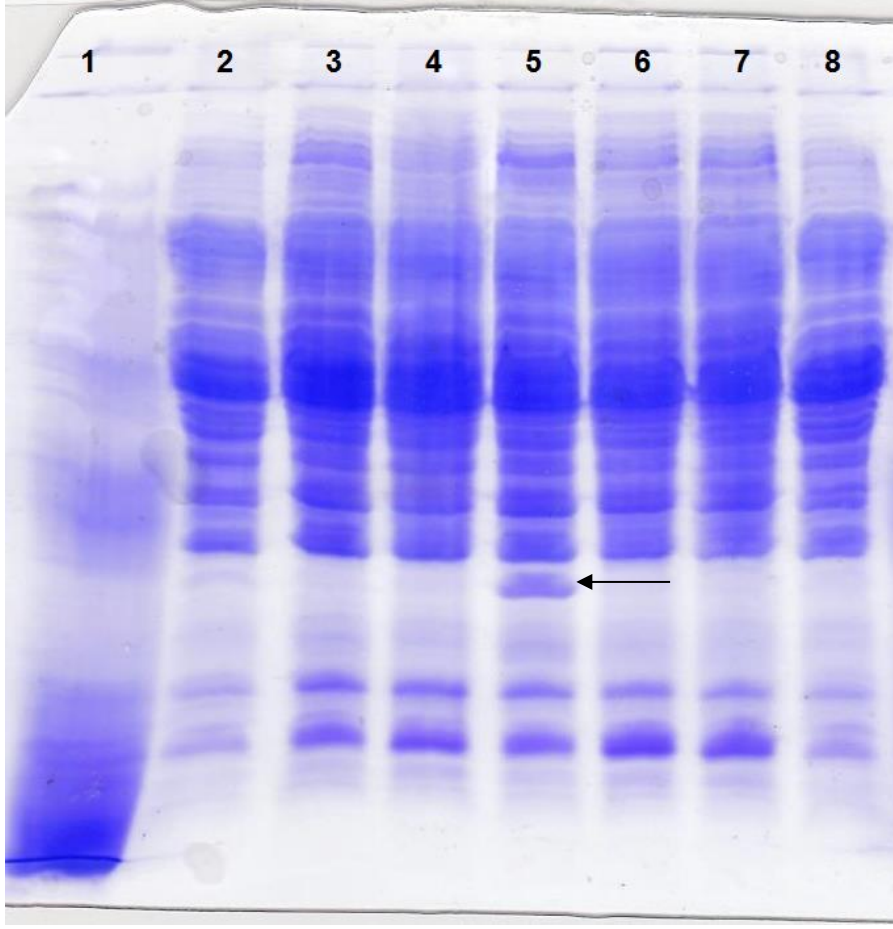
3.8.1. pHIG Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi

Yapılan bu çalışmada, PCR ile oluşturulan 5 farklı pHIG22 parçasının pMK18 vektörüyle birleştirilmesi sonucu oluşan hibrit vektörlerin (pHIG-1, pHIG-2, pHIG-3, pHIG-4 ve pHIG-5) ürettiği proteinlerin karşılaştırılarak farklı protein bantlarının (pHIG22 tarafından kodlanan) tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. 5 farklı pHIG (1, 2, 3, 4, 5) hibriti *Thermus thermophilus* HB27 suşuna transform edilmiş, hücre içi proteinleri izole edilerek SDS-PAGE analizi ile protein profilleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 45. pHIG-3 hibritinin haritası

Şekil 46'da görülen protein profilleri karşılaştırıldığında, pHIG-3 (Şekil 45) klonunun protein profilinde farklı bir bant gözlenmiştir. Bütün hibrit plazmitlerin DNA dizin analizleri yaptırılmıştır. Diziler uygun programlar ile analiz edilerek, pHIG-3'ün ürettiği bu proteinin spesifik veya spesifik olmayan *in frame* bir füzyon proteini olup olmayacağı araştırılmıştır.



Şekil 46. % 15'lik SDS-PAGE'de hibrit plazmitleri içeren *T. thermophilus* HB27 suşlarının hücre içi protein profillerinin karşılaştırılması. 1, pHIG22 plazmitini barındıran Orijinal suş (*T. scotoductus* K6); 2, Plazmit içermeyen *T. thermophilus* HB27 suşu; 3, pHIG-1 (pMK18 ile HGT1F/HGT1R primerleriyle oluşturulan PCR fragmentinin füzyonu); 4, pHIG-2 (pMK18 ile HGT2F/HGT2R primerleriyle oluşturulan PCR fragmentinin füzyonu); 5, pHIG-3 (pMK18 ile HGT3F/HGT3R primerleriyle oluşturulan PCR fragmentinin füzyonu); 6, pHIG-4 (pMK18 ile HGO4F/HGO4R primerleriyle oluşturulan PCR fragmentinin füzyonu); 7, pHIG-5 (pMK18 ile pHGT1R/pHG3F primerleriyle oluşturulan PCR fragmentinin füzyonu); 8, pMK18 içeren *T. thermophilus* HB27 suşu. Ok işareti farklı bantı göstermektedir

Şekil 46'da görülen farklı bandın tanımlanması amacıyla, bu bant jelden çıkarılarak MALDI-TOF/TOF analizine (Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Birimi, Proteomiks Laboratuvarı) tabi tutulmuştur.

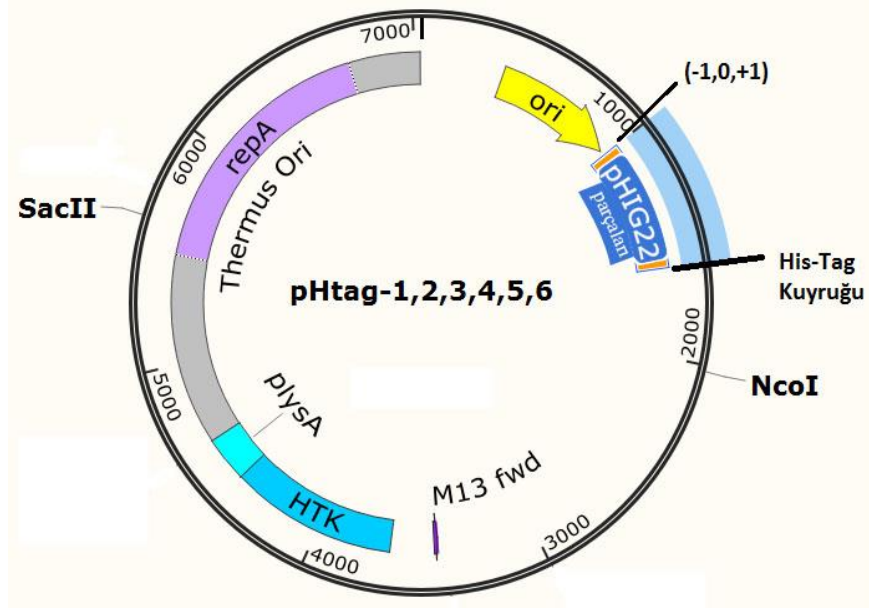
MALDI-TOF/TOF analizine göre elde edilen peptit sıraları; pMK18 plazmitinden kodlanan proteinlerin aminoasit sıraları ve pHIG22 plazmitinden kodlanması muhtemel

ORF bölgelerinin aminoasit sıraları ile ve replikasyondan sorumlu proteinlerin ortak sıraları ile ayrı ayrı olacak şekilde hizalanmıştır. Ayrıca pMK18 ve pHIG22 plazmitlerinin tüm DNA dizinlerinin 6 frame'deki amino asit sıraları, MALDI-TOF/TOF analiz sonucunda elde edilen peptit sıraları ile hizalanmış ve sonuçlar incelenmiştir. İnceleme sonucunda yüksek benzerliğe sahip herhangi bir ortak sıra belirlenmemiş ve bu yüzden pHIG22 transkriptlerinden oluşan herhangi bir protein tespit edilmemiştir. Görülen bu farklı bantın HB27 genomundan kodlanan bir genin, hücrenin maruz kaldığı farklı bir etkinin sonucunda aşırı üretilmesi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmüştür. Daha detaylı sonuçlar alınması için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.8.2. pHTag Klonlarının Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi

pHTag klonları kullanılarak, pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin transle olup olmadığı, eğer transle oluyor ise translasyon için hangi frame'in (sense frame 1-3 veya antisens frame 1-3) kullanıldığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için transkripte dönüşen bölgelerin tahmini başlangıç noktalarının upstreamlerinden başlayarak (muhtemel RBS'nin çoğaltılan bölgenin iç kısmında kalması için), yaklaşık 250 ila 350 bp arası bir bölge dizayn edilen spesifik primerler ile çoğaltılmış ve bu çoğaltılan parçaların transle olup olmadığı incelenmiştir.

Oluşturulan klonlara sırasıyla pHTag-1, pHTag-2, pHTag-3, pHTag-4, pHTag-5 ve pHTag-6 adları verilmiştir (Şekil 47). Klon olduğu belirlenen pHTag plazmitleri HB27 hücrelerine transform edilmiştir. Klonları taşıdığı tespit edilen HB27 hücreleri ekspres edilmiş ve hücre ekstraktlarından Nikel kolonları kullanılarak HisTag içeren protein ya da proteinler saflaştırılmaya çalışılmıştır. Ekspres edilen 6 farklı hücreden hangisi ya da hangilerinde ekspresyonun olduğunun belirlenmesi için SDS-PAGE analizi yapılmıştır.



Şekil 47. pHTag-(1, 2, 3, 4, 5, 6) plazmitlerinin haritası

Yapılan SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde herhangi bir protein bandına rastlanılmamıştır. SDS-PAGE analizi 3 kez tekrarlanmış fakat yine herhangi bir protein bantı tespit edilememiştir.

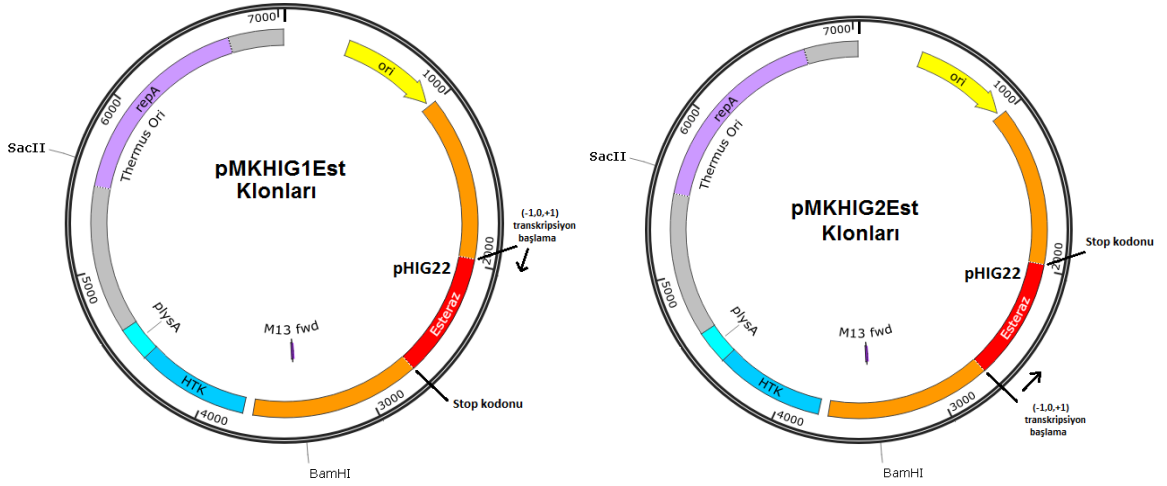
Bunun sebebi olarak, jelde görülmesi beklenen HisTag'lı proteinlerin (eğer kodlanan protein/proteinler varsa) HB27 hücrelerindeki ekspresyon seviyesinin çok düşük olma ihtimali öngörülmüştür. HB27 hücrelerine transform edilen klonların herhangi bir ajanla indüklenememesi, bu yüzden pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin ekspresyon seviyesinin tüm genom düşünüldüğünde çok düşük seviyede kalması veya hücrede degrades edilmiş olabileceği kuvvetle muhtemel olduğundan aşağıdaki çalışmalar ile bu sorunlar aşılmıştır.

3.8.3. pMKHIG(1,2)Est Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi

pHIG22 plazmitinin her iki zincirinde transkript kodladığı belirlenen bölgelere, daha önce laboratuvarımızda karakterize edilen termofilik bir enzimi kodlayan karboksilesteraz geni (741 bp, *Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesterazı) sokulmuş ve oluşacak proteinlerin belirlenebilmesi için; aktivitesi kolay tespit edilebilen bu genin kodladığı karboksilesteraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimin tercih edilme sebebi, 55 ila 80 °C arasında aktivite

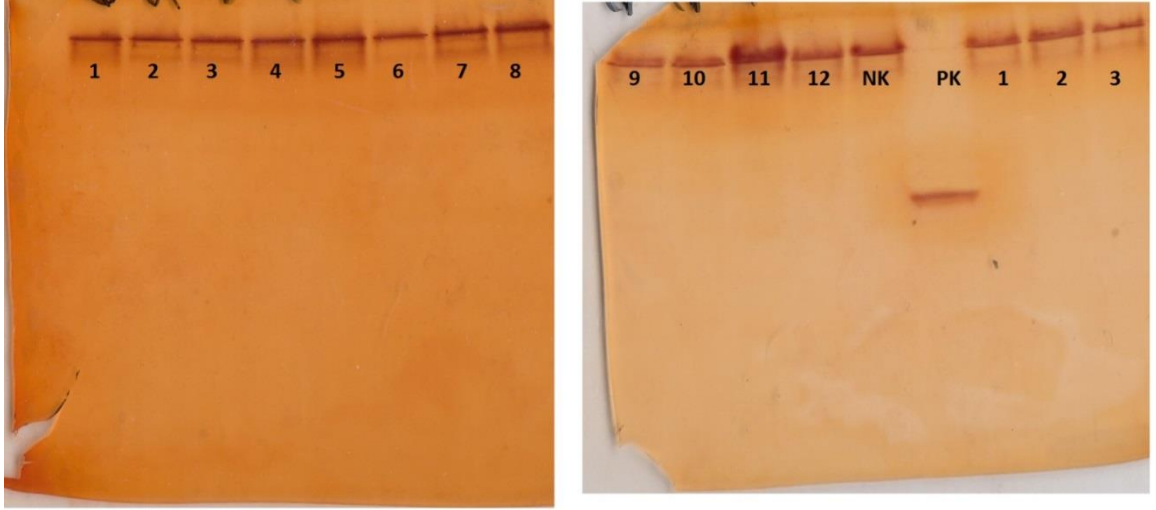
vermesi, stabilitesinin oldukça güçlü olması ve *Thermus thermophilus* HB27 bakterisinin optimum büyüme sıcaklığı olan 70 °C’de en iyi aktiviteyi vermesidir.

Klonlama aşamasında her bir bölge için üç farklı (frame) klon olmak üzere toplam altı klon elde edilmiştir. Ayrıca karboksilesteraz fragmentlerinin vektöre her iki oryantasyonda insört olabileceği ve her iki oryantasyondaki translasyonun tespit edilebilmesi için toplamda 12 farklı klon elde edilmiştir (Şekil 48).



Şekil 48. pMKHIG1Est ve pMKHIG2Est klonlarının haritası

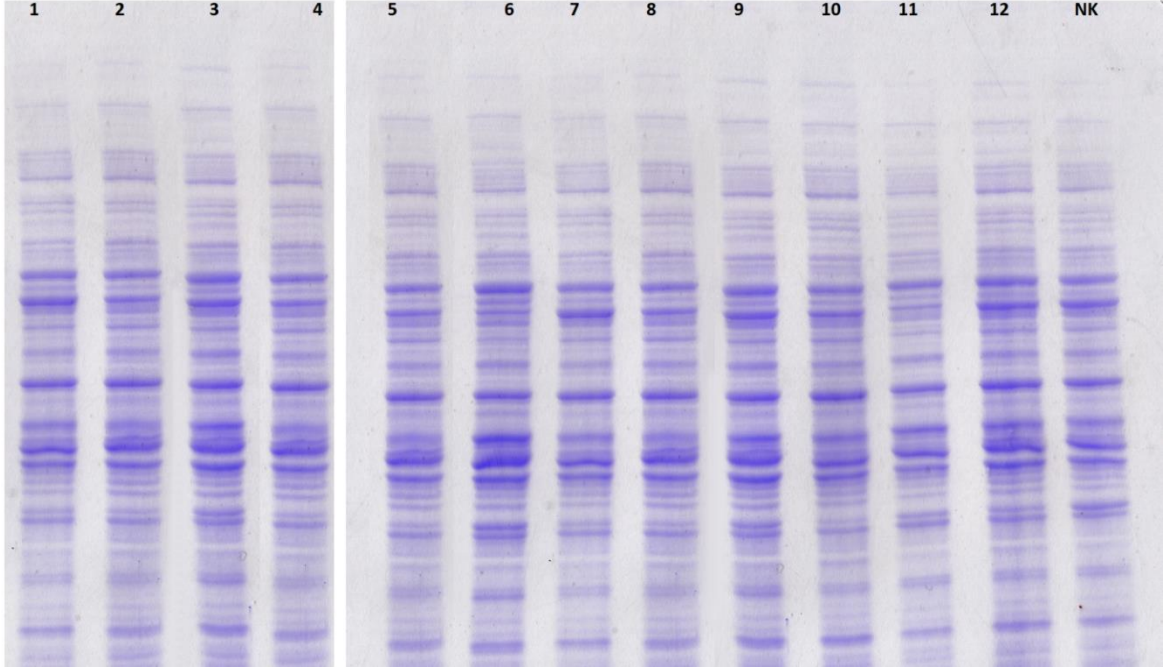
Elde edilen 12 klonu taşıyan HB27 hücresi (pMKHIGEst klonlarını taşıyan HB27 hücreleri), pozitif kontrol hücresi (karboksilesteraz aktivitesi veren *Anoxybacillus* sp. PDF1 hücresi) ve negatif kontrol hücresinin (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücresi) pelletlerinden hücre ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen hücre içi proteinlerin konsantrasyonları belirlenmiş ve Native PAGE analizi uygulanarak Jel assay yöntemi (zimogram) ile karboksilesteraz aktivite deneyi yapılmış ve Şekil 49’da verilen görüntüler elde edilmiştir.



Şekil 49. pMKHIG-Est-1 ila 12 klonları, negatif kontrol ve pozitif kontrol hücre proteinlerinin karboksilesteraz aktivitesi tayini için yapılan zimogramın görüntüsü. Tüm klonlar pMK18 vektörü üzerinde oluşturulmuş ve *Thermus thermophilus* HB27 hücresine transform edilmiştir. 1) pMKHIG1Est+0 Klonu, 2) pMKHIG1Est+1 Klonu, 3) pMKHIG1Est+2 Klonu, 4) pMKHIG2Est+0 Klonu, 5) pMKHIG2Est+1 Klonu; 6) pMKHIG2Est+2 Klonu; 7) pMKHIG2Est-0 Klonu; 8) pMKHIG1Est-1 Klonu, 9) pMKHIG1Est-2 Klonu, 10) pMKHIG2Est-0 Klonu, 11) pMKHIG2Est-1 Klonu, 12) pMKHIG2Est-2 Klonu, NK) pMK18 taşıyan HB27 PK), Pozitif Kontrol (*Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesterazı)

Yapılan çalışma sonucu oluşan bantlar incelenmiş, pozitif kontrolde bant görülmesine rağmen, 12 klon ve negatif kontrolde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Şekil 49'da görüldüğü üzere pozitif kontrol dışındaki tüm örneklerde farklı bir bant görülmektedir. Negatif kontrollerde (pMK18 taşıyan HB27 hücresi) aktif bantların gözlenmesinin nedeni, HB27 hücresinin kendi enzimlerinden kaynaklanmasıdır.

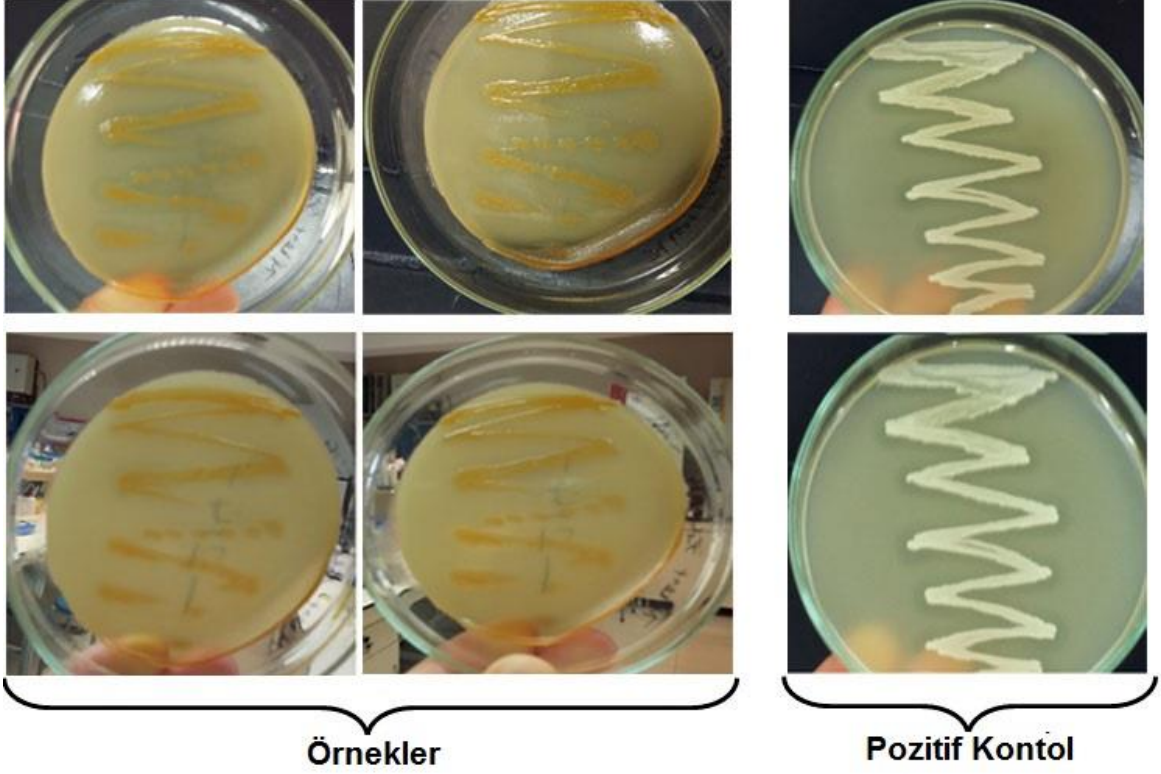
Yapılan zimogram çalışması sonucunda herhangi aktif bir bant görülmemesine rağmen, aynı hücre içi ekstraktlara SDS-PAGE analizi uygulanarak, farklı bir bant olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 50) (SDS-PAGE ve Zimogram deneyleri 3 kez tekrar edilmiştir).



Şekil 50. Elde edilen 12 klon ve negatif kontrolün, SDS-PAGE görüntüsü. Tüm klonlar pMK18 vektörü üzerinde oluşturulmuş ve *Thermus thermophilus* HB27 hücresine transform edilmiştir. 1) pMKHIG1Est+0 Klonu; 2) pMKHIG1Est+1 Klonu; 3) pMKHIG1Est+2 Klonu; 4) pMKHIG2Est+0 Klonu; 5) pMKHIG2Est+1 Klonu; 6) pMKHIG2Est+2 Klonu; 7) pMKHIG2Est-0 Klonu; 8) pMKHIG1Est-1 Klonu; 9) pMKHIG1Est-2 Klonu; 10) pMKHIG2Est-0 Klonu; 11) pMKHIG2Est-1 Klonu; 12) pMKHIG2Est-2 Klonu, NK) pMK18 taşıyan HB27

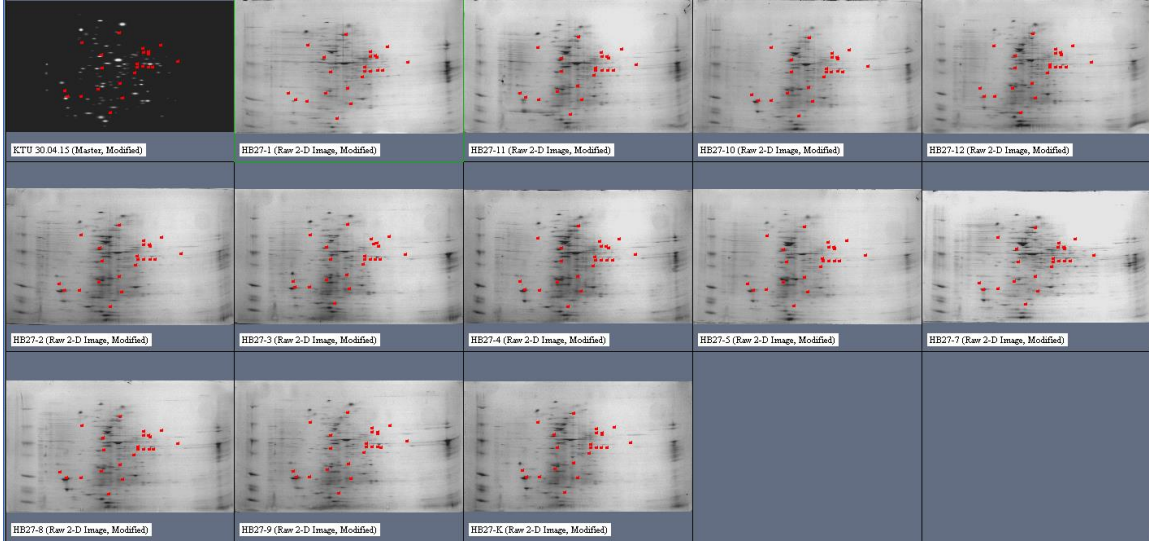
Şekil 50’de görülen protein bantları incelenmiş, 12 klonu taşıyan HB27 hücresi (pMKHIGEst klonlarını taşıyan HB27 hücreleri) ve negatif kontrol hücresi (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücresi) protein profillerinde herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Jel assay yöntemi ile hücre içi proteinlere zimogram yapıldığından oluşacak proteinlerin hücre dışı olabilme ihtimali göz önünde bulundurularak petri assay çalışması da yapılmıştır. Elde edilen 12 klonu taşıyan HB27 hücreleri, pozitif kontrol hücresi ve negatif kontrol hücresi için petri assay çalışması yapılarak petrilerde zon oluşumu gözlenmiştir. 3 gün boyunca inkübe edilen koloniler etrafında açık zon oluşumu sadece pozitif kontrolde görülmüş, diğer tüm petrilerde herhangi bir zon oluşumu görülmemiştir (Şekil 51).



Şekil 51. Petri assay çalışması ile karboksilesteraz aktivitesinin belirlenmesi. Soldaki resimler pMKHIG1Est ve pMKHIG2Est klonlarını, sağdaki resimler pozitif kontrol hücrelerini (*Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesterazı) göstermektedir. Çalışmalar 3 tekrarlı olarak yapılmış olup, seçilen sadece birkaç resim verilmiştir

Yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 tarafından kodlanan herhangi bir Rep proteini olmadığı belirlenmesine rağmen, oluşabilecek olası enzimlerin miktarının çok düşük seviyede olması, doğru katlanamayıp aktif halini alamaması, olası çok düşük karboksilesteraz aktivitelerin tespit edilememesi ya da SDS-PAGE analizinde protein bantlarının görülememesi gibi ihtimaller düşünülerek elde edilen tüm klonlar ve negatif kontrol hücrelerinin hücre içi ve hücre dışı proteinleri için 2D jel elektroforezi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Bu şekilde, elde edilen hücrelerde karboksilesteraz enziminin üretilip üretilmediğine bakılmış ve tüm örneklerde karboksilaz peptidi aranmıştır. Tüm klonlar, kontrol hücreleri ile karşılaştırılmış ve farklı olan spotlar taranmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 12 farklı klon ve kontrol hücreleri (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücreleri) için spot analizi yapılmış ve 400 spot içerisinde 26 farklı spota rastlanılmıştır (Şekil 52).



Şekil 52. 12 farklı klon ve kontrol hücresinin Spot analizi

Farklı olduğu tespit edilen bu 26 spot için MALDI-TOF/TOF analizi yapılmış ve karboksilesteraz proteini aranmıştır. Spot analizleri sonucunda karboksilesteraz belirlenmesi durumunda, pHIG22 tarafından kodlanan bir proteinin Rep-karboksilesteraz füzyonu oluşturduğu ve bu füzyonun belirlenmesi ile de, pHIG22 tarafından kodlanan proteinin tespiti, oryantasyonu, başlama ve bitiş noktalarının belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

2D analizinden elde edilen 26 spot için MALDI-TOF/TOF analizi sonuçları alınmıştır. Aşağıdaki Şekil 53'de 23 spot için en iyi skoru veren protein sonuçları verilmektedir. Bu sonuçlardan ziyade tüm spotlar için detaylı analizler yapılmış olup, sonuçlar bu veriler ışığında değerlendirilmiştir.

Spot ID	Best Protein Accession	Best Protein Mass	Best Protein Score	Best Protein Description
A1	RF1_MYCPE	40996	32	Peptide chain release factor 1 OS=Mycoplasma penetrans GN=prfA PE=3 SV=1
A2	BIKB_THET8	43335	128	8-amino-7-oxononanoate synthase/2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase OS=Thermus thermophilus (strain HB8 / ATCC 27634 / DSM 579) GN=hcd PE=1 SV=2
A3	SUCC_THETH	40578	101	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Thermus thermophilus GN=sucC PE=3 SV=1
A4	NRDI_BIFAO	15735	36	Protein nrdI OS=Bifidobacterium animalis subsp. lactis (strain AD011) GN=nrdI PE=3 SV=1
A5	IDH_THET8	54405	694	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Thermus thermophilus (strain HB8 / ATCC 27634 / DSM 579) GN=hcd PE=1 SV=2
A6	IDH_THET8	54405	544	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Thermus thermophilus (strain HB8 / ATCC 27634 / DSM 579) GN=hcd PE=1 SV=2
A7	RL5_GEOBB	19861	48	50S ribosomal protein L5 OS=Geobacter bemidjensis (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622) GN=rplE PE=3 SV=1
A8	SUCC_THETH	40578	407	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Thermus thermophilus GN=sucC PE=3 SV=1
A9	SUCC_THETH	40578	494	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Thermus thermophilus GN=sucC PE=3 SV=1
A10	SUCC_THETH	40578	291	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Thermus thermophilus GN=sucC PE=3 SV=1
A11	V296_BACSU	29013	81	Vegetative protein 296 OS=Bacillus subtilis GN=yurY PE=1 SV=3
A12	RPOA_THET2	34992	72	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039) GN=rpoA PE=3 SV=1
A13	DLDH_THESC	48475	59	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Thermus scotoeductus GN=lpd PE=1 SV=2
A14	RLS_ANOFV	20172	49	50S ribosomal protein L5 OS=Anoxybacillus flavithermus (strain DSM 21510 / VMK1) GN=rplE PE=3 SV=1
A15	LEXA_SHEAM	22718	53	LexA repressor OS=Shewanella amazonensis (strain ATCC BAA-1098 / SB2B) GN=lexA PE=3 SV=1
A16	CH60_THET2	57854	535	60 kDa chaperonin OS=Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039) GN=groL PE=1 SV=2
A17	TRAI5_ECOLX	82145	44	Protein tral OS=Escherichia coli GN=tral PE=4 SV=1
A18	CLPB_THET2	96082	774	Chaperone protein clpB OS=Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039) GN=clpB PE=3 SV=1
A19	RLS_ANOFV	20172	52	50S ribosomal protein L5 OS=Anoxybacillus flavithermus (strain DSM 21510 / VMK1) GN=rplE PE=3 SV=1
A20	SUCD_THETH	29804	234	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Thermus thermophilus GN=sucD PE=1 SV=1
A21	CPXP_BRAJA	44445	49	Cytochrome P450 BJ-1 OS=Bradyrhizobium japonicum GN=cyp112 PE=3 SV=2
A22	EFTS_THET8	22399	332	Elongation factor Ts OS=Thermus thermophilus (strain HB8 / ATCC 27634 / DSM 579) GN=tsf PE=1 SV=1
A23	RL5_GEOBB	19861	52	50S ribosomal protein L5 OS=Geobacter bemidjensis (strain Bem / ATCC BAA-1014 / DSM 16622) GN=rplE PE=3 SV=1

Şekil 53. MALDI-TOF/TOF analizi sonuçlarına göre belirlenen proteinler

Mascot Server’da analiz edilen MALDI-TOF/TOF sonuçları, 26 spot için verilen peptit dizileri üzerinden detaylı olarak ayrıca incelenmiştir. Analiz edilen 26 spot içerisinde her bir spot için en yüksek skora sahip 30 sonuç elde edilmiştir (veriler çok fazla olduğundan burada verilmemiştir). 26 spotun analizi sonucu elde edilen bu 30 eşleşmenin her birinin belirlenmesinde kullanılan kısa peptit dizileri bulunmaktadır. Ortalama 10-30 amino asit uzunluğunda olan bu kısa peptit dizileri 30 eşleşmenin her biri için ortalama 15 ila 25 parça halinde bulunmaktadır. Kısa peptit dizilerinin olası küçük benzerliklerinin bulunabilmesi için, tüm pHIG22 dizini 6 frame’de protein dizisine çevrilmiş ve server üzerinden elde edilen tüm kısa peptit sıraları ile hizalanma yapılarak, benzer bölgeler taranmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda herhangi bir karboksilesteraz ya da replikasyon proteini benzer bölgeye rastlanılmamıştır.

3.8.4. pMKHIG(1,2)Est-His Hibritlerinin Oluşturulması ve Translasyonun İncelenmesi

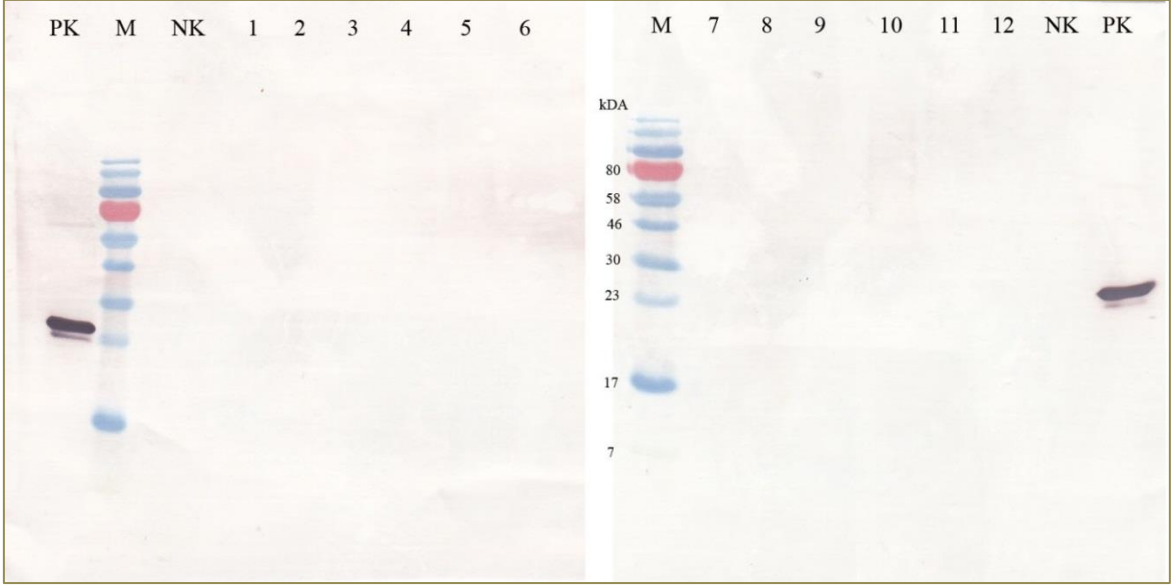
Yukarıdaki 4.8.3 başlıklı çalışmaya benzer olarak yapılan bu çalışmada, yine karboksilesteraz geni kullanılarak pHIG22 transkriptlerinden zayıf da olsa bir ekspresyon varsa bunun tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Tüm aşamaları üstteki çalışmada anlatıldığı gibi yapılan bu çalışmada farklı olarak, kullanılan karboksilesteraz geninin 3’ ucuna HisTag (8X) dizisi ilave edilmiş, transle olan proteinlerin tespitinin daha net ortaya

konulması için anti-poly Histidine antikoru (Sigma, H-1029) kullanılarak, Western blot analizi ile kesin sonuçlar alınmıştır. Çok az miktarda oluşmuş olabilecek, olası rep-karboksilesteraz füzyon proteinlerinin jelde görülememe ihtimali düşünülerek bu çalışma yapılmıştır. Karboksilesteraz enzimine uygun bir antikor olmaması nedeniyle, olası enzimin tespitinin C-terminaline eklenmiş HisTag kuyruğu ile yapılması amaçlanmıştır. Üstteki çalışmada pHIG22 tarafından herhangi bir protein kodlanmadığı belirlenmesine rağmen aynı çalışma farklı bir şekilde yapılmış ve daha kesin sonuçlar alınması hedeflenmiştir.

3' ucu spesifik primer ile değiştirilen karboksilesteraz genine 8X HisTag eklenmiş ve pMKHIGNot1 ve pMKHIGNot2 vektörlerine üç farklı frame'de olacak şekilde klonlanmıştır. Bu şekilde elde edilen 6 farklı klonun iki oryantasyonda insört olabileceği ve her iki oryantasyondaki translasyonun tespit edilebilmesi için toplamda 12 farklı klon elde edilmiştir. Bunun için her altı farklı klonlama sonrası elde edilen tüm klonlar MacroGen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizin analizine tabi tutulmuş ve klonların oryantasyonu bu şekilde belirlenmiştir.

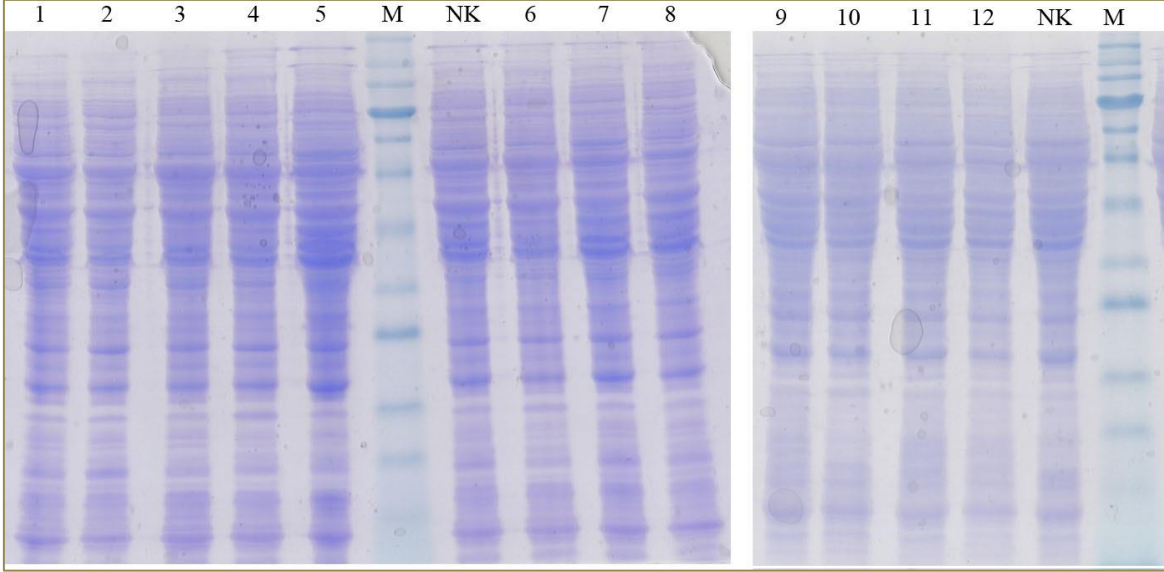
Klonlar yapıp teyit edildikten sonra *Thermus thermophilus* HB27 suşuna termofilik transformasyon metoduna göre transform edilmiştir. 12 farklı klonu taşıyan HB27 hücresi ve negatif kontrol olarak pMK18 taşıyan HB27 hücresi kültürleri yapılmış ve hücre içi proteinler izole edilmiştir. Pozitif kontrol olarak HisTag'lı LMT (litik mürein transglikozilaz) geni içeren pET28a+ taşıyan *E. coli* JM101 suşu hücre içi proteinleri kullanılmıştır. HisTag'lı karboksilesteraz proteinlerinin belirlenebilmesi amacıyla, hücre içi proteinler nitroselüloz membrana aktarılarak Western Blot analizi yapılmıştır.

Yapılan blotlama sonucunda elde edilen görüntüler (Şekil 54) incelendiğinde, pozitif kontrol hücresinde bant görülmüş, diğer 12 klonu taşıyan HB27 hücresinde ve negatif kontrol hücresinde herhangi bir bant görülmemiştir. Yapılan bu çalışma ile de pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin translasyona uğramadığı, herhangi bir peptit üretmediği belirlenmiştir.



Şekil 54. Elde edilen 12 klon, negatif kontrolün ve pozitif kontrolün, Western Blot görüntüsü. 1) pMKHIG1Est+0His Klonu; 2) pMKHIG1Est+1His Klonu, 3) pMKHIG1Est+2His Klonu, 4) pMKHIG2Est+0His Klonu, 5) pMKHIG2Est+1His Klonu, 6) pMKHIG2Est+2His Klonu, 7) pMKHIG2Est-0His Klonu, 8) pMKHIG1Est-1His Klonu, 9) pMKHIG1Est-2His Klonu, 10) pMKHIG2Est-0His Klonu, 11) pMKHIG2Est-1His Klonu, 12) pMKHIG2Est-2His Klonu, NK) pMK18 taşıyan HB27, PK) HisTag'lı LMT geni içeren pET28a+ taşıyan *E. coli* JM101, M) Protein ColorPlus Ladder (NEB, P7710S)

Ayrıca 12 klonu taşıyan HB27 hücresinin ve negatif kontrol hücresinin protein profillerinde herhangi farklı bir bant olup olmadığının da belirlenebilmesi için tüm örneklere SDS-PAGE analizi uygulanmış ve sonuçlar görüntülenmiştir (Şekil 55). Yapılan analiz sonucunda tüm hücrelerin protein profilleri incelenmiş ve herhangi farklı bir spota rastlanılmamıştır.



Şekil 55. Elde edilen 12 klon, negatif kontrolün ve pozitif kontrolün, SDS-PAGE görüntüsü. 1) pMKHIG1Est+0His Klonu, 2) pMKHIG1Est+1His Klonu, 3) pMKHIG1Est+2His Klonu, 4) pMKHIG2Est+0His Klonu, 5) pMKHIG2Est+1His Klonu, 6) pMKHIG2Est+2His Klonu, 7) pMKHIG2Est-0His Klonu, 8) pMKHIG1Est-1His Klonu, 9) pMKHIG1Est-2His Klonu, 10) pMKHIG2Est-0His Klonu, 11) pMKHIG2Est-1His Klonu, 12) pMKHIG2Est-2His Klonu, NK) pMK18 taşıyan HB27, M) Protein Ladder (NEB P7706)

Yukarıda yapılan 4 farklı çalışma ile pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediği araştırılmış ve yapılan tüm çalışmalar sonucunda pHIG22 Transkript-1'in ve Transkript-2'nin proteine dönüşmediği belirlenmiştir

3.9. QPCR Tekniği ile pHIG22 Kopya Sayısının Belirlenmesi

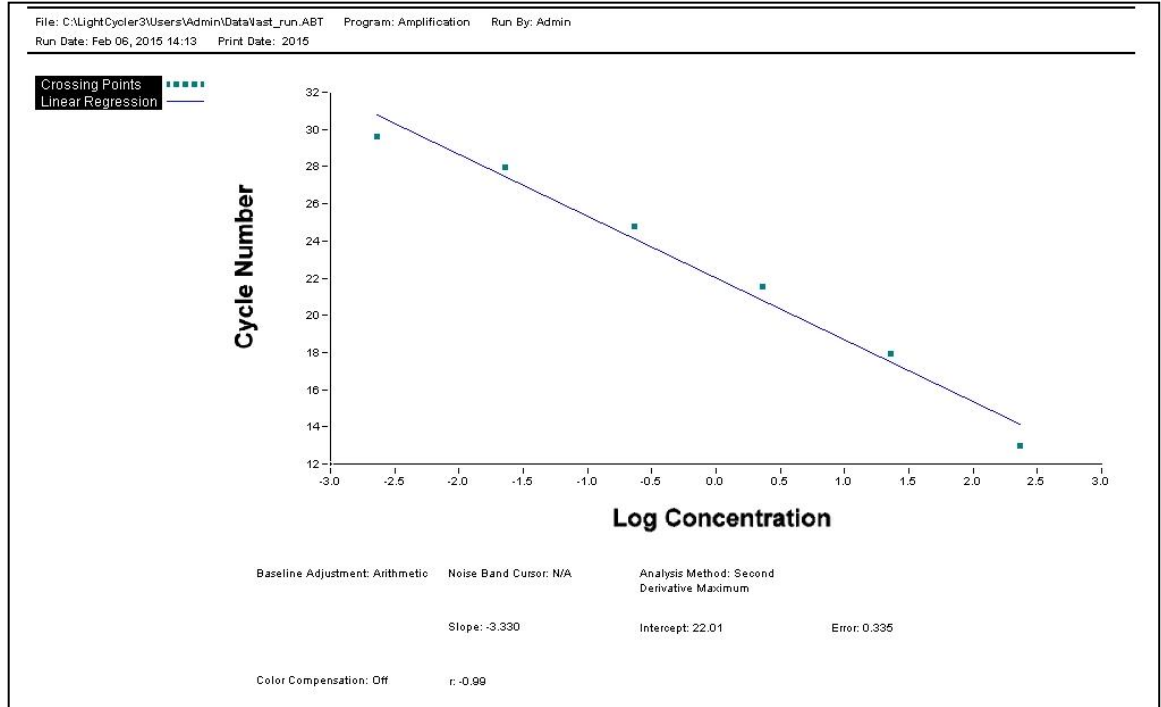
QPCR tekniği ile pHIG22'nin kopya sayısının hesaplanabilmesi için *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi barındıran orijinal suş) genomundaki tek kopyalı olduğu bilinen *rpoB* geni kullanılmıştır. Real-time qPCR tekniği ile çoğaltılan *rpoB* geni ve pHIG22 hedef bölgesinin konsantrasyonları karşılaştırılmış ve kopya sayısının belirlenmesinde kullanılan C_T değerleri hesaplanmıştır.

İlk olarak, *rpoB* geni ve pHIG22 hedef bölgesi için standart grafikler oluşturulmuştur (Şekil 56 ve 57). Hem *rpoB* geni hem de pHIG22'deki hedef bölge için, standart eğri oluşturulmasında 1×10^5 ila 1×10^9 kopya/L aralığında örnek kullanılmıştır. Oluşturulan her iki eğri için sonuçlar üç tekrarlı olarak yapılmış ve test edilmiştir ($R2 > 0.999$). Standart

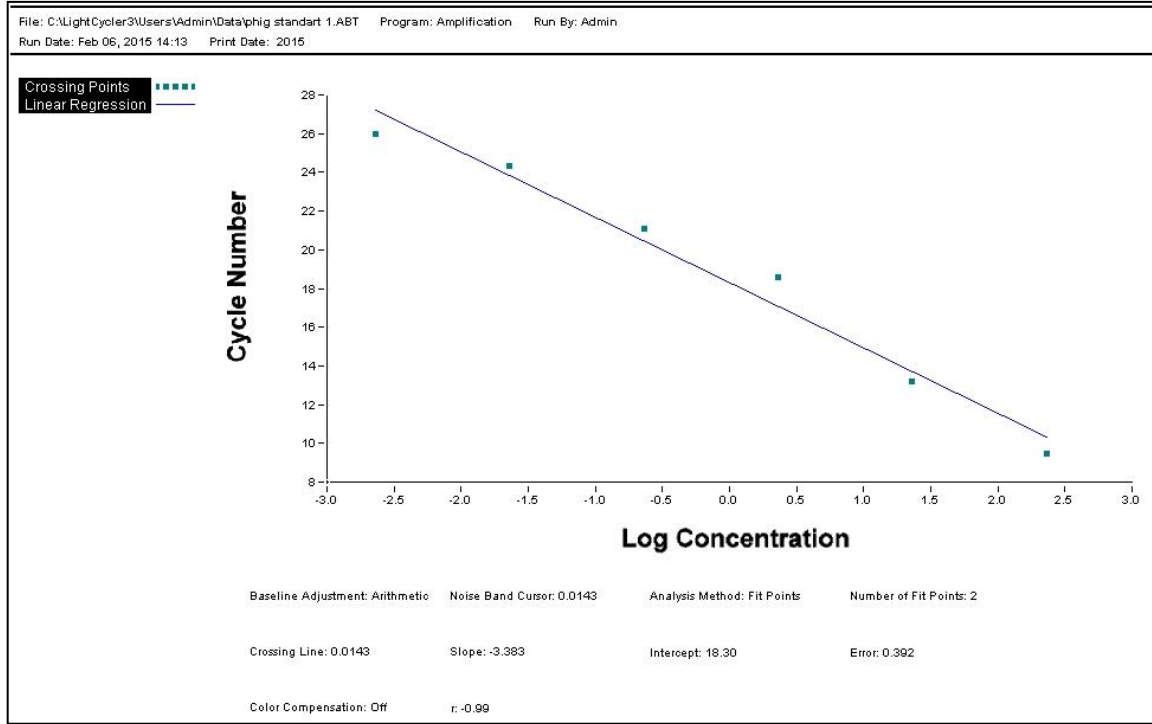
eğrilerin eğimi sırasıyla -3.33 ve -3.38 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan her iki bölge için $0,99$ gibi yüksek bir amplifikasyon verimi elde edilmiştir.

Her seyreltmedeki C_T değerleri iki tekrarlı olarak ölçülmüş ve hem *rpoB* hem de pHIG22 için standart eğriler oluşturulmuştur. C_T değerleri başlangıç kalıp DNA'ların kopya sayılarının logaritmik artışlarına göre çizilmiştir. Her bir standart eğri, çizilen noktaların lineer regresyonu ile oluşturulmuştur. PCR amplifikasyon verimi (E) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Rasmussen, 2001).

$$E = 10^{-1/\text{slope} - 1} \quad (2)$$

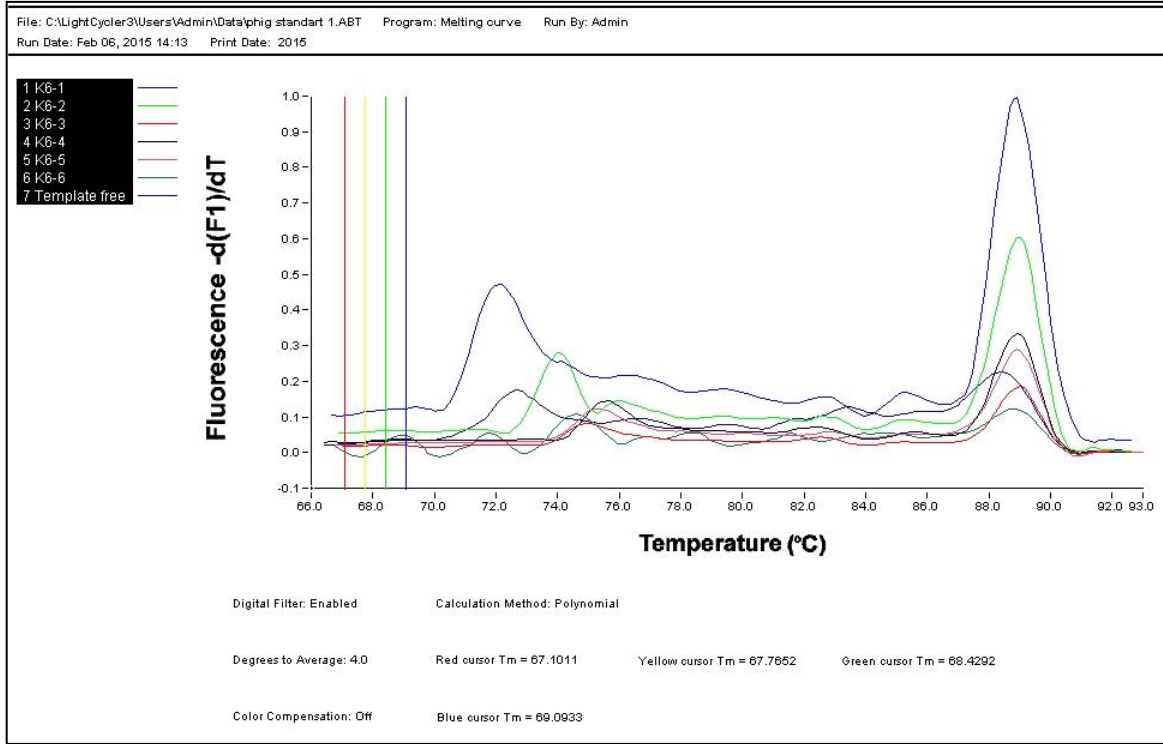


Şekil 56. *rpoB* geni için oluşturulan standart grafik



Şekil 57. pHIG22 hedef bölgesi için oluşturulan Standart Grafik

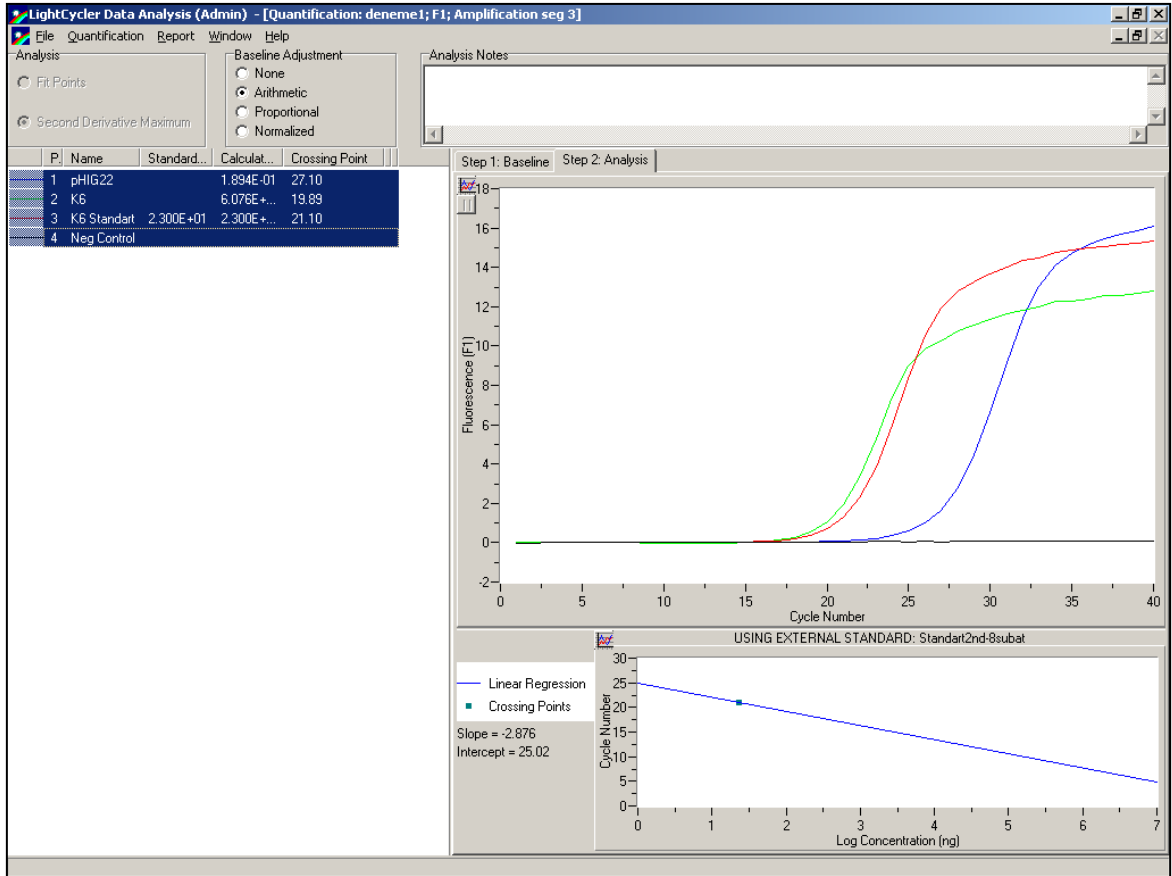
Amplifikasyonun doğruluğu hem melting curve analizi hem de jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Tüm örnekler için erime sıcaklığı pikleri belirlenmiş ve Şekil 58'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm amplifikasyonlar için tek bir erime piki görülmüş olup, non-spesifik bantların oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen bu grafikler kantifikasyon çalışması için kullanılmıştır.



Şekil 58. Standart grafik oluşturmada yapılan Melting Curve analizi

Real-time qPCR amplifikasyonu ve elde edilen verilerin analizi laboratuvarımızda mevcut bulunan LightCycler Version 1.5 (Roche Diagnostics) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Standart grafiklerin oluşturulması ve Threshold Cycle (C_T) değeri cihaz yazılımındaki “The Second Derivative Method” yöntemine göre hesaplanmıştır.

K6 Total DNA’sının kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan Real-time qPCR amplifikasyonları eş zamanlı olarak yapılmıştır. Absolute kantifikasyon çalışması, oluşturulan standart grafikler kullanılarak yapılmıştır. pHIG22 plazmitini barındıran *T. scotoductus* K6 total DNA’sı kalıp olarak kullanılmış ve standart grafik kullanılarak her iki örneğin C_T değerleri hesaplanmıştır. C_T değerlerinin elde edilmesi sonrası, pHIG22 plazmitinin kopya sayısı, *rpoB* geninin kopya sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Üç tekrarlı olarak yapılan qPCR çalışması sonucu, *rpoB* geni ve pHIG22 bölgesine ait C_T değerleri, oluşturulan standart grafiklere göre hesaplanmıştır (Şekil 59).



Şekil 59. pHIG22 ve *rpoB* geni için elde edilen C_T değerleri

Elde edilen verilere göre, pHIG22 için elde edilen C_T değeri ile *rpoB* geni için elde edilen C_T değerinin farkı alınmış ve bu fark " $2^{C_T \text{pHIG22} - C_T \text{rpoB}}$ " olarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 41'de verilmiştir.

Tablo 41. Absolute kantifikasyon ile hesaplanan pHIG22 plazmitinin kopya sayısı

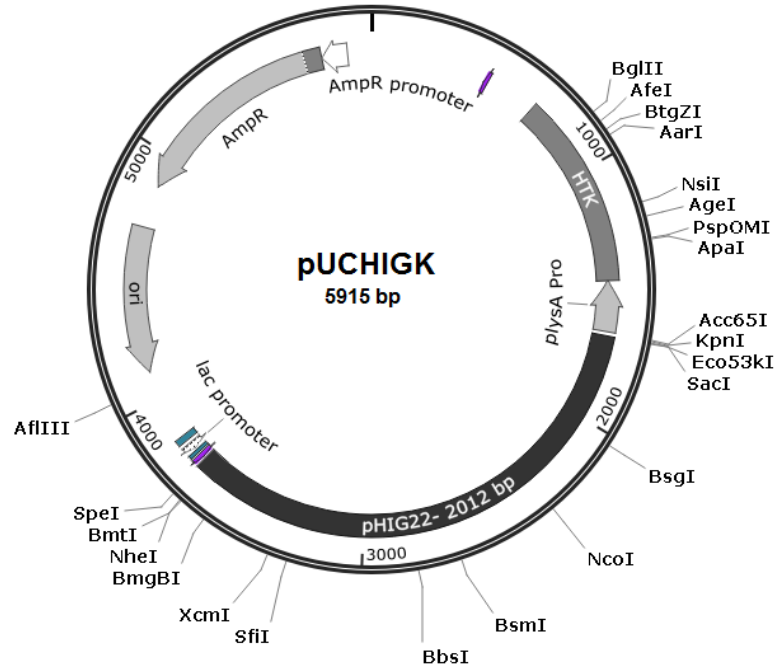
Çalışma Adı	C_T Değeri		Kopya sayısı/hücre		
	<i>rpoB</i>	pHIG22	<i>rpoB</i>	pHIG22	Ortalama
Sonuç 1	19,89	27,10	1	$2^{7,21}=148,05$	148,44
Sonuç 2	18,76	26,02	1	$2^{7,26}=153,27$	
Sonuç 3	20,13	27,3	1	$2^{7,17}=144,00$	

Bu veriler ışığında üç tekrarlı olarak yapılan çalışma sonucu, pHIG22 plazmiti *Thermus scotoductus* K6 bakterisinde 148 kopyalı olarak bulunmuştur.

3.10. pUCHIGK Klonlama Vektörünün Tasarlanması

pHIG22'nin minimal replikonunun belirlenmesi ile pMK18 plazmiti ve pUC18 plazmiti kullanılarak pHIG22 tabanlı klonlama vektörü oluşturulmuştur. İlk olarak pMK18 plazmitinden HTK kaseti (PslpA promotörü ile birlikte) pUC18 plazmiti ile birleştirilmiş ve iki direnç genine (kanamisin ve amfisilin) sahip pUCHTK plazmiti elde edilmiştir.

İkinci olarak, pHIG22'nin minimal replikonu PCR ile çoğaltılmış ve pUCHTK vektörüyle birleştirilerek pUCHIGK hibrit vektörü elde edilmiştir. Elde edilen hibrit vektörü; HTK (*Thermus* cinsinde aktif olan gen, yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimi kodlayan bölge) kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve pHIG *ori* bölgesini içerecek şekilde oluşturulmuştur (Şekil 60).



Şekil 60. pUCHIGK vektörünün haritası

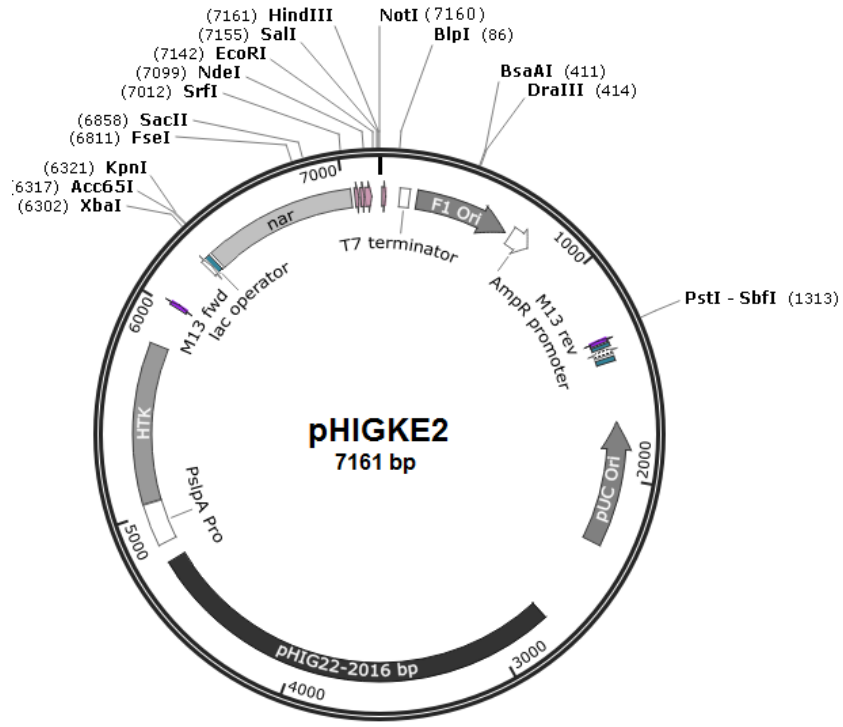
3.11. pHIGKE2 Ekspresyon Vektörünün Tasarlanması

pHIG22 plazmitinin *Thermus* cinsinde replike olabilme özelliği kullanılarak, termofilik proteinlerin ekspres edilmesinde kullanılacak pHIG22 tabanlı pHIGE2 ekspresyon vektörü dizayn edilmiştir.

İlk olarak *E. coli-Thermus* suşlarında replike olabilen, HTK (*Thermus* cinsinde aktif olan gen, yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimi kodlayan bölge) kaseti, MCS bölgesi ve P_{nar} promotor bölgesi içeren hibrit pMKE2 vektörü iki parça halinde PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen bu fragmentler kendi üzerlerine yapıştırılmıştır. Böylece pMKE2'nin *Thermus* cinsinde replike olabilme özelliğini sağlayan bölgesinin yeni dizayn edilen plazmitte olmaması sağlanmıştır.

İkinci olarak (pMKE27 replikonunun yerini alacak olan) pHIG22 plazmitinin minimal replikonu PCR ile çoğaltılmış, bir önceki aşamada 2 fragmentin birleştirilmesiyle elde edilen vektörle birleştirilerek pHIGKE2 vektörü elde edilmiştir.

Elde edilen hibrit vektör pHIGKE2; kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotoru, P_{nar} bölgesi ve pHIG22 *ori* bölgesini içermektedir (Şekil 61). Yeni inşa edilen bu plazmit, *Thermus*'da pHIG22 rep orijinini kullanarak replike olmaktadır. Üzerindeki *E. Coli* rep orijini, shuttle vektör olması ve *E. coli*'de kullanılabilmesi amacı ile bulunmaktadır. pHIGKE2 plazmitinde ekspresyon sistemi P_{nar} promotoru ile kontrol edilmektedir. KNO₃ ile aktive edilecek P_{nar} promotoru altında termofilik proteinler kontrollü olarak ekspres edilebilecektir.



Şekil 61. pHIGKE2 vektörünün haritası

4. TARTIŞMA

Plazmitler, konaklarında kendilerine has kopya sayıları olan ekstrakromozomal DNA elementleridir (Woese vd., 1990). Plazmitleri en iyi tanımlayan özellik bağımsız, kendi kontrollerinde replike olabilmeleridir. Plazmit replikasyonunun analizi ve kontrolü, moleküler biyolojide yeni mekanizmaların bulunmasını sağlamıştır. Buna en iyi örnek antisens RNA'nın varlığıdır ve bu da DNA replikasyonunun mekanizmasını, makromoleküler etkileşimleri ve gen ekspresyonunun kontrolünü anlamamızı sağlamıştır. Bunların dışında, konak mekanizması-replikasyon bileşenleri arasındaki ilişkiler, kromozom replikasyonunu anlamayı kolaylaştırıcı veriler gibi, moleküler biyolojide birçok yeni veri ve mekanizmanın ortaya çıkarılması da plazmitlerin fonksiyonel analizi ile sağlanmıştır. Plazmitler kendi başlarına replike olmalarına rağmen, çoğunlukla konak replikasyon mekanizmalarını kullanırlar ve bu yüzden plazmit replikasyon çalışmaları, kromozom replikasyon çalışmalarını da kapsayan mekanizmaların aydınlatılmasını da kolaylaştırır (del Solar vd., 1998).

Thermus scotoductus K6 bakterisinden izole edilen ve tanımlanan pHIG22 plazmiti 2222 bp uzunluğunda, kriptik, küçük, çok kopyalı, çift zincir, % 62,78 GC içerikli yeni bir plazmittir. Yapılan bu çalışmada, pHIG22 plazmitinin replikasyon modu, replikasyon orijin bölgesi, kodladığı transkriptler, transkriptlerin düzenleyici bölgelerinin özellikleri, promotor dizileri ve K6 suşu içindeki kopya sayısı belirlenmiştir. Farklı *E. coli* suşlarında replikasyonu araştırılmış ve kodladığı transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediği ortaya çıkarılmıştır.

Thermus cinsine ait kriptik plazmitlerde yapılan BLAST analizi sonuçlarında plazmitlerin baz dizimlerinin diğer plazmitlere benzerliğinin çok az olduğu görülmüştür (Hideo vd., 2005). pHIG22 baz dizini için Blastn (NCBI) analizi yapılmış, pHIG22 DNA dizisinin bilinen DNA dizilerine % 2'den fazla ve anlamlı olabilecek hiçbir homoloji göstermediği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Thermus* sp. TK10 bakterisinden izole edilen pNKH101 ve pKMH052 plazmitlerinin de BLAST analizleri sonucu herhangi bir plazmite benzer sıralara sahip olmadığı görülmüştür (Hideo vd., 2005). Farklı *Thermus* türlerinden tanımlanan diğer plazmitlerin de birbirlerine anlamlı bir homoloji göstermediği görülmektedir. Bu da bize *Thermus* cinsinde tanımlanan plazmit sayısının çok az olduğunu ve tanımlananların da diğer plazmitlere baz dizini yönünden benzemediğini

göstermektedir. Termofilik bakterilerden izole edilen plazmitler genelde büyük genomlara sahiptir ve tüm genomun aydınlatılması zahmetlidir (Makarova vd., 2002). Büyük genomun dezavantajları düşünüldüğünde, pHIG22 plazmitinin 2222 bp'lik küçük bir genoma sahip olması ve kopya sayısının yüksek olması yapılacak çalışmalar açısından büyük avantaj olarak görülmüştür. Ayrıca düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin de minimum seviyede olmasını sağlayacaktır (Primrose ve Twyman, 2006).

Thermus cinsine ait plazmitler, yüksek GC oranına sahip olup pHIG22 plazmiti ile benzerlikler göstermektedir. *Thermus* sp. TK10 bakterisinden izole edilen pNHK101 plazmitinin GC oranı % 66,8 (Kobayashi vd., 2005), *Thermus thermophilus* HB8 bakterisinden izole edilen pTT8 plazmitinin GC oranı % 69 (Takayama vd., 2004), *Thermus* sp. 4C bakterisinden izole edilen pS4C ve pL4C plazmitlerinin GC oranları ise, sırasıyla % 58,25 ve 68,60 olarak belirtilmiş (Ruan ve Xu, 2007) ve % 62,78 GC oranına sahip olan pHIG22 ile benzerlik göstermiştir.

pHIG22 plazmitinin replikasyondan sorumlu minimal bölgesinin belirlenmesi için birkaç farklı çalışma yapılmıştır. Yapılan tüm çalışmalarda antibiyotikle seçim için HTK (highly thermostable kanamycin) kaseti kullanılmıştır. *Thermus* cinsinin optimum büyüme sıcaklığı olan 70 °C'de normal kanamisin nükleotidil transferaz veya bir başka antibiyotik direnç enzimi etkili değildir. HTK ise daha yüksek sıcaklıklara dirençli kanamisin nükleotidil transferaz enzimi kodlamaktadır ve bu yüzden termofilik plazmitlerin karakterizasyon çalışmalarının çoğunda bu kaset kullanılmıştır (Grado vd., 1999; Takayama vd., 2004; Kobayashi, vd., 2005). Özellikle son zamanlarda, termofilik replikonların aydınlatılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Wayne vd., 1997; de Grado vd., 1998). Bu bağlamda yaptığımız ilk çalışmada, HTK kaseti ile doğrudan birleştirilen pHIG22 fragmentlerinin *T. thermophilus* HB27 bakterisinde replikasyonu sağlanamamıştır veya bu hücrelerde klonlar oluşmamıştır. Bu hücrelere ligasyon ürünlerinin doğrudan transformasyonu ile ilgili bir çalışma ve metot mevcut değildir. Yayınlanan bütün çalışmalardaki bütün klonlar, önce *E. coli*'de oluşturulduktan sonra, *T. thermophilus* HB27'ye aktarılmıştır. Amaçlanan klonların elde edilememesi sebebi ligasyon ürünlerinin transformasyon şartlarının optimize edilmemiş olması veya *T. thermophilus* HB27'nin restriksiyon endonükleaz sistemi olduğu düşünülmüştür. Aynı sorunlar, *T. scotoductus* K6 hücresi için de geçerli olduğundan, *T. scotoductus* K6 hücrelerine bu ligasyon ürünlerinin aktarılması denenmemiştir. Bu yüzden klonların ilk önce *E. coli*

suşlarında oluşturulması ve ardından *T. thermophilus* HB27 ve *T. scotoductus* K6 suşlarına transformasyonu denenmiştir. Bunun için, pHIG22 parçaları ilk olarak pUCHTK (pUC18+HTK kaseti) vektörü ile birleştirilerek *E. coli* JM101 suşunda klonlar elde edilmiştir. de Grado ve ark. yaptığı çalışmada da pMK18 plazmitinin oluşturulmasında pUC18 ve pMY1 plazmitleri kullanılmış ve tüm klonlar ilk olarak *E. coli* suşunda oluşturulmuştur. Benzer şekilde elde edilen 5 farklı klonun HB27 ve K6 suşlarına transformasyonu sonucu 5 numaralı pUCHTK-5 klonunun bu hücrelerde replike olduğu görülmüştür. pUC18 iskeletini kullanan pUCHTK-5 plazmitinin 5 numaralı pHIG22 parçasını kullanarak HB27 ve K6 suşlarında replike olması, 2012 bp büyüklüğünde olan bu pHIG22 parçasının plazmitin replikasyonu için gerekli olan elemanları ve minimal *ori* bölgesini taşıdığını göstermiştir. Böylece, bu bölgenin pHIG22 plazmitinin minimal replikonu olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonraki yapılan çalışmalar bu minimal replikon bölgesi üzerinden devam ettirilmiştir.

pHIG22'nin minimal replikonunun belirlenmesi ile replike olabilen bu parçanın ve farklı bölgelerden oluşturulan pHIG22 parçalarının *E. coli* suşlarında replikasyonu araştırılmıştır. Önceki çalışmalarda *Thermus* cinsinden izole edilen plazmitlerin *E. coli* suşlarında replikasyonu araştırılmış ve replike olamadığı belirlenmiştir (Vasquez vd., 1984). *Thermus* cinsi plazmitlerin *E. coli* restriksiyon sistemlerine karşı dirençli olmadığı ve replikasyonu için gerekli olan konak elemanlarını kullanamadığı düşünülmektedir (Vasquez vd., 1984). Bu yüzden aktarılan plazmitler *E. coli* hücreleri içerisinde muhafaza olamamaktadır. pHIG22'nin replike olabilen 5 numaralı parçası ve farklı bölgelerden oluşturulan 4 farklı parçası, pET28a+ iskeleti kullanılarak ilk önce *E. coli* hücrelerinde klon haline getirilmiş ve böylece ligasyon ürünlerinin konak endonükleazlarından etkilenmesi önlenmiştir. pET28a+ vektöründe oluşturulan klonların pBR322 tabanlı *ori* bölgesi (pET28a+ iskeletindeki) silinerek *E. coli* hücrelerinde replike olabilme yeteneği yok edilmiştir. Bu şekilde pET28a+ replikasyon orijini silinerek oluşturulan rekombinant plazmitlerde, pHIG22 replikasyon orijininin kullanımı sağlanarak *E. coli* suşlarında replike olup olmadığı belirlenmiştir. Aktarılan rekombinantlar *E. coli* JM101 ve BL21 suşlarında replike olmamıştır. Diğer *E. coli* suşları denenmemiştir, çünkü farklı *E. coli* suşlarının genotipleri benzer olup sadece birkaç mutasyonla birbirinden farklılık göstermektedir. pHIG22'nin fonksiyonel analizi için yaptığımız çalışmaların çoğunda yeni klonlar ve hibrit vektörler oluşturulmuş ve birçok çalışmada kullanılmıştır. Yapılan bu klonların oluşturulma aşamaları *E. coli* hücrelerinde yapıldığından, her ne kadar literatürde *Thermus*

cinsi plazmitlerin *E. coli* hücrelerinde replike olmadığı bilinmekte olsa da, pHIG22'nin yeni bir plazmit olması hasebiyle, bu çalışma yapılmış ve replikasyonun olmadığı tekrar teyit edilmiştir.

pHIG22 plazmitinden kodlanan rep ya da benzeri bir proteinin olup olmadığının belirlenmesi için pHIG22 plazmitinin konağından (*Thermus scotoductus* K6) uzaklaştırılması ve bu sayede plazmit barındıran ve barındırmayan K6 hücrelerinin protein profillerinin karşılaştırılarak farklı olan bantların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için K6 bakterisine farklı kimyasal ajanlar uygulanarak plazmit curing denenmiştir. Bakterilerin bazı özelliklerinin belirlenmesinde, bu özelliklerin bakterinin sahip olduğu plazmitten mi kaynaklandığı yoksa bakterinin genomik özelliklerinin fenotipik sonucu olarak mı ortaya çıktığını anlamak için "Curing Ajanları" dediğimiz etmenlerden faydalanırız. Curing ajanları kimyasal maddeler veya fiziksel uygulamalar olabilir. Bakteri içerisinde bulunan plazmit ya da plazmitleri bakteriden uzaklaştırmak için kullanılan Plasmid Curing uygulaması literatürde bir çok bakteri türünde denenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir (Grinsted vd., 1988).

Çoğu durumda Curing' e neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Şu ana kadar herkes tarafından kabul görmüş tüm plazmitlerde Curing'e neden olan bir etmen bulunamamıştır. Bu yüzden bütün ajanlar deneme yanılma sonucu ve kullanma şartlarının değiştirilmesiyle ortaya çıkmaktadır (Vasquez vd., 1983; Grinsted vd., 1988). Plazmit curing çalışmalarının, bakterilerde zor gerçekleşmesi, plazmit curing çalışmalarında kullanılan evrensel bir ajanın olmaması, her suş için ancak deneme yanılma yöntemiyle uygun ajanın tespit edilebilmesi ve hücrenin plazmitini bırakmasının yavaş ve uzun bir sürede olması aşılması gereken bir engeldir (Grinsted vd., 1988; Kulkarni ve Kanekar, 1997).

Curing ajanlarının bazıları DNA'da mutasyona neden olurlar. Özellikle plazmitin replikasyonuna müdahale ederler. Bazıları ise bakteri hücresinin yapısal bileşiklerini ve enzimlerini etkilerler. Kullanılan bu ajanlar çeşitli bakterilerin plazmitini kaybetmesine neden olurken, aslında bu tepki o plazmitin maruz kalınan ajana karşı verdiği bir cevaptır. Her plazmit için farklı maddeler farklı etki gösterebilirler. Çoğu durumda Curing'e neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Grinsted vd., 1988).

F ori bölgesine sahip olan plazmitlerde Etidyum Bromür ve Akridin Oranj'ın replikasyonu engellediği literatürde belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Bazı *E. coli* hücrelerindeki plazmitler yüksek voltaj kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Heeryt vd., 1989).

Başka bir çalışmada plazmitlerin uyumsuzluk grupları kullanılarak curing yapılmıştır. *Bacillus anthracis* A16'dan tanımlanan pXO2 plazmiti aynı uyumsuzluk grubunda bulunan pKSV7 plazmiti kullanılarak hücreden uzaklaştırılmıştır (Wang vd., 2011). Etidyum bromürün, Etil Viyole ve Rifambin'den daha etkili bir curing ajanı olduğu ve yapılan çalışmalarda *Staphylococcus aureus* suşlarındaki plazmitler üzerinde etkili olduğu literatürden bilindiğinden (Rubin vd., 1971) K6'da curing etmeni olarak Etidyum Bromür kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda Etidyum Bromürün K6 suşu üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden literatürde belirtilen farklı ajanlar denenmiştir.

Coumarine antibiyotiklerinin (Coumermycin, Novobiocin ve Clorobiocin), DNA Girazın B alt ünitesini inhibe ederek, plazmitin giraz bağımlı süpersarmallığını etkilemesine ve replikasyonu inhibe ettiğine neden olduğu düşünülmektedir. Akridin, Sodyum Dodesil Sülfat ve Üre kullanılarak plazmit taşımayan hücrelerin ortamda dominant hale gelmesi ve onların çoğalmasının teşvik edilmesi sağlanabilir (Grinsted vd., 1988). DNA interkalasyonuna neden olan Etidyum Bromür ve Akridin Oranj birçok farklı plazmitte etkili olan ve en çok kullanılan ajanların başında gelmektedir. Daha çok *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Rhizobium*'a ait plazmitlerde etkili olmaktadır. Literatürde *Thermus* cinsi bakterilerde curing ajanı olarak en fazla SDS, Etidyum Bromür ve Akridin Oranj kullanıldığı bilinmektedir (Vasquez vd., 1983; Kulkarni ve Kanekar, 1997). Bu yüzden SDS, Akridin Oranj ve ikisinin birlikte farklı kombinasyonları K6 suşu için denenmiştir. SDS ile Akridin Oranj'ın birlikte uygulanmasıyla elde edilen ilk birkaç alt kültürden yapılan plazmit izolasyonları sonucu hücrelerden elde edilen plazmit DNA'larının yoğunluklarında kademeli olarak bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Plazmit yoğunluğunun en fazla azaldığı örneklerin 1 ppm SDS ve 30 ppm Akridin Oranj'ın birlikte kullanıldığı örneklerde olduğu tespit edilmiştir. 30 ppm Akridin Oranj'ın K6 suşunun MIC (The Minimal Inhibitory Concentration) değeri olduğu tespit edildiğinden bu konsantrasyonların artırıldığı durumlarda K6 hücresinin büyümesinin engellendiği saptanmıştır ve daha yüksek konsantrasyonlar denenmemiştir. Yapılan alt kültürler sonucunda 8. alt kültürden itibaren plazmit yoğunlukları azalmış fakat sonraki alt kültürlerde tamamen kaybolmadığı saptanmıştır. Birçok deneme yapılmasına rağmen, K6 hücresinden pHIG22 plazmiti tamamen uzaklaştırılamamıştır. Bunun sonucu olarak, kullanılan curing ajanlarının K6 suşu üzerinde etkili olmadığı ya da kısmen etkili olduğu ve plazmitin tamamen hücreden uzaklaşmadığı tespit edilmiştir. Bunun iki nedeni olabilir. İlki, pHIG22 plazmitinin

uzaklaştırılması için kullanılan curing ajanları bakteriye etki etmemektedir veya kısmen etki etmektedir, ya da ikinci olarak, pHIG22 plazmiti K6 suşu için vazgeçilmeyecek önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu ve benzeri sebeplerden ötürü, pHIG22 plazmitinden kodlanabilecek proteinlerin tespit edilebilmesi için başka yaklaşımlar devreye sokulmuştur.

Bu yaklaşımların ilkinde, PCR ile oluşturulan 5 farklı pHIG22 parçasının pMK18 vektörüyle birleştirilmesi sonucu oluşan hibrit vektörlerin (pHIG-1, pHIG-2, pHIG-3, pHIG-4 ve pHIG-5) ürettiği proteinlerin karşılaştırılarak farklı protein bantlarının (pHIG22 tarafından kodlanan) tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. 5 farklı pHIG (1, 2, 3, 4, 5) hibriti *Thermus thermophilus* HB27 suşuna transform edilmiş, hücre içi proteinleri izole edilerek SDS-PAGE analizi ile protein profilleri karşılaştırılmış ve pHIG-3 (Şekil 44) klonunun protein profilinde farklı bir bant gözlenmiştir. pHIG-3'ün ürettiği bu proteinin spesifik veya spesifik olmayan *in frame* bir füzyon proteini olup olmayacağı belirlenmesi için bu bant jelden çıkarılarak MALDI-TOF/TOF analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonuçları, pMK18 plazmitinden kodlanan proteinlerin aminoasit sıraları ve pHIG22 plazmitinden kodlanması muhtemel ORF bölgelerinin aminoasit sıraları ile ve replikasyondan sorumlu proteinlerinin ortak sıraları ile ayrı ayrı olacak şekilde hizalanmış ve herhangi bir ortak sıra belirlenememiştir. Ayrıca olası küçük bir benzerliğin yakalanabilmesi için, pMK18 ve pHIG22 plazmitlerinin tüm DNA dizilerinin 6 frame'deki amino asit sıraları ile de hizalanmış ve yüksek benzerliğe sahip herhangi bir ortak sıra belirlenememiştir. Görülen bu farklı bantın HB27 genomundan kodlanan bir genin, hücrenin maruz kaldığı farklı bir etkinin sonucunda aşırı üretilmesi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmüştür.

Literatürden bilindiği üzere, şu ana kadar çoğu bakteriden düzinelerce plazmit izole edilmiş fakat onların çok azının temel replikonları ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sadece nükleotit dizi seviyesinde karakterize edilmiştir. Bu sebeple dizi karşılaştırmalarına dayalı bir kriter çok daha pratik olabilir (del Solar vd., 1998). Yapılan birçok plazmit karakterizasyon çalışmasında dizilerin karşılaştırılması sonucu Rep ya da benzeri proteinler tespit edilmiş ve sonraki çalışmalar bu veriler üzerinden devam ettirilmiştir. pHIG22 plazmitinin herhangi bir plazmit ya da DNA dizinine homoloji göstermemesi başka yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmıştır.

Bu yüzden pHIG22 transkriptlerinden oluşan herhangi bir protein olmadığı öngörüsünün desteklenmesi için yapılan ikinci çalışmada, pHTag klonları kullanılarak benzer bir çalışma yapılmıştır. Bunun için pHIG22'den kodlanan transkript bölgelerinin başlangıç noktalarının upstreamlerinden başlayarak (olası RBS'nin çoğaltılan bölgenin iç

kısımında kalması için), yaklaşık 250 ila 350 bp arası bir bölge (uçlarında HisTag eklenmiş) dizayn edilen spesifik primerler ile çoğaltılmış ve pMK18 plazmitine klonlanarak, klonlanan parçaların transle olup olmadığı incelenmiştir. Oluşturulan 6 farklı klon HB27 suşuna transform edilmiş, bu hücrede ekspres edilmiş ve hücre ekstraktlarından Nikel kolonları kullanılarak HisTag içeren protein ya da proteinler saflaştırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde herhangi bir protein bantına rastlanılmamıştır. Bunun sebebi olarak, pHIG22 tarafından kodlanan herhangi bir protein olmadığı, ya da eğer varsa jelde görülmesi beklenen HisTag'lı proteinlerin (eğer kodlanan protein/proteinler varsa) HB27 hücrelerindeki ekspresyon seviyesinin çok düşük olma ihtimali öngörülmüştür. HB27 hücrelerine transform edilen klonların herhangi bir ajanla indüklenememesi, bu yüzden pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin ekspresyon seviyesinin tüm genom düşünüldüğünde çok düşük seviyede kalması veya hücrede degrades edilmiş olabileceği ihtimalleri de göz önünde bulundurularak, farklı bir çalışma yapılmış ve bu sorunlar aşılmıştır.

RepA ve benzeri başlatıcı proteinlerinin amino asit dizi karşılaştırmalarının literatürde bir kriter olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Çünkü bunlar, plazmitlerin çoğu tarafından kodlanmaktadır ve ortak fonksiyonları vardır. Rep proteinleri, replikasyon orijiniindeki spesifik dizileri tanırlar ve bu özellikleri, bakteriyal kromozomun replikasyonundaki DnaA başlatıcı proteinine benzer özelliklere sahip olduklarını gösterir (Bramhill vd., 1988). Teta replikasyonu yapan bir çok plazmitin Rep proteinlerinin amino asit dizi hizalanmasına dayanılarak elde edilen veriler incelendiğinde Rep proteinlerinin N-terminaline yakın bölgelerinde Lysin Zipper motiflere rastlanılmıştır. Bu LZ motifler, Rep proteinlerin dimerizasyonunda ve DNA'ya bağlanmasında görev alırlar (Garcia de Viedma vd., 1995). pHIG22 plazmiti üzerinde yapılan motif analizi sonucunda da, 1637. ila 1702. nükleotitler arasında kalan bölgenin (pHIG22'nin *BamHI* noktası "0" noktası olarak kabul edilmiştir) protein dizisine dönüştürülmesiyle elde edilen sıranın LZ motifi içerdiği belirlenmiştir. Bu bölgenin pHIG22 tarafından kodlanabilecek olası bir rep proteininin N-terminal bölgesi olma ihtimali düşünülmüş, bunun belirlenmesi de aynı çalışma içerisinde yapılmıştır.

Yapılan çalışmada pMKHIGEst(1,2) klonları kullanılmıştır. pHIG22 plazmitinin her iki zincirinde transkript kodladığı belirlenen iki farklı bölgeye (bu bölgelerden biri LZ motifininin bulunduğu sıraya göre belirlenmiş ve oluşabilecek proteinlerin LZ motifine *in frame* olması hususu göz önünde bulundurulmuştur), daha önce laboratuvarımızda

karakterize edilen termofilik bir enzimi kodlayan karboksilesteraz geni (*Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesteraz, 741 bp, 28,2 kDA, pI değeri: 5,97) sokulmuş ve oluşacak proteinlerin belirlenebilmesi için; aktivitesi kolay tespit edilebilen bu genin kodladığı karboksilesteraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimin tercih edilme sebebi, 55 ila 80 °C arasında aktivite vermesi, stabilitesinin oldukça güçlü olması ve *Thermus thermophilus* HB27 bakterisinin optimum büyüme sıcaklığı olan 70 °C’de en iyi aktiviteyi vermesidir. Klonlama aşamasında her bir bölge için üç farklı (frame) klon olmak üzere toplam altı klon ve her iki oryantasyondaki translasyonun tespit edilebilmesi için toplamda 12 farklı klon elde edilmiştir. Elde edilen 12 klonu taşıyan HB27 hücresi (pMKHIGEst klonlarını taşıyan HB27 hücreleri), pozitif kontrol hücresi (karboksilesteraz aktivitesi veren *Anoxybacillus* sp. PDF1 hücresi) ve negatif kontrol hücresinin (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücresi) ekstraktları elde edilerek Jel assay yöntemi (zimogram) ile karboksilesteraz aktivite deneyi yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucu, pozitif kontrolde bant görülmesine rağmen, 12 klon ve negatif kontrolde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Pozitif kontrol dışındaki tüm örneklerde iki farklı bant daha görülmektedir. Negatif kontrollerde (pMK18 taşıyan HB27 hücresi) aktif bantların gözlenmesinin nedeni, HB27 hücresinin kendi enzimlerinden kaynaklanması olarak yorumlanmıştır.

Yapılan zimogram çalışması sonucunda herhangi aktif bir bant görülmemesine rağmen, aynı hücre içi ekstraktlara SDS-PAGE analizinde uygulanarak, farklı bir bant olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır fakat protein profillerinde herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca oluşacak proteinlerin hücre dışı olabilme ihtimali göz önünde bulundurularak petri assay çalışması da yapılmış, petrilerde zon oluşumu incelenmiş ve pozitif kontrolde zon görülmesine rağmen diğer petrilerde herhangi bir zon oluşumu görülmemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 tarafından kodlanan herhangi bir Rep proteini olmadığı belirlenmesine rağmen, elde edilen tüm klonlar ve negatif kontrol hücresinin hücre içi ve hücre dışı proteinleri için 2D jel elektroforezi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Tüm klonlar, kontrol hücresi ile karşılaştırılmış ve farklı olan spotlar aranmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 12 farklı klon ve kontrol hücresi (pMK18 plazmitini taşıyan HB27 hücresi) için spot analizi yapılmış, 400 spot içerisinde 26 farklı spotta rastlanılmış ve bu spotlarda karboksilesteraz proteini aranmıştır. Spot analizleri sonucunda karboksilesteraz belirlenmesi durumunda, pHIG22 tarafından kodlanan bir proteinin Rep-karboksilesteraz füzyonu oluşturduğu ve bu füzyonun belirlenmesi ile de, pHIG22 tarafından kodlanan proteinin tespiti, oryantasyonu, başlama ve bitiş noktalarının

belirlenebilmesi amaçlanmıştır. pHIG22 plazmitinden bir protein, özellikle Rep proteini üretiliyorsa, aktivitesi kolaylıkla tespit edilebilecek bir genin (ısıl kararlı karboksilesteraz), kodon kaydırmayan, açık okuma frame'ini bozmayacak şekilde, bu proteinin geninin içine klonlanması, Rep-karboksilesteraz füzyonu üretecektir. Bu amaçla +1/0/-1 okuma düzeninde pHIG22'de iki farklı noktaya sens ve antisens oryantasyonunda toplam 12 klon yapılmıştır. Mascot Server'da analiz edilen MALDI-TOF/TOF sonuçları, 26 spot için verilen peptit dizileri üzerinden detaylı olarak ayrıca incelenmiş ve en yüksek skora sahip 30 sonuç elde edilmiştir (veriler çok fazla olduğundan burada verilmemiştir). 26 spotun analizi sonucu elde edilen bu 30 eşleşmenin her birinin belirlenmesinde kullanılan kısa peptit dizileri bulunmaktadır. Ortalama 10-30 amino asit uzunluğunda olan bu kısa peptit dizileri 30 eşleşmenin her biri için ortalama 15 ila 25 parça halinde bulunmaktadır. Kısa peptit dizilerinin olası küçük benzerliklerinin bulunabilmesi için, tüm pHIG22 dizini 6 frame'de protein dizisine çevrilmiş ve server üzerinden elde edilen tüm kısa peptit sıraları ile hizalanma yapılarak, benzer bölgeler taranmış ve karboksilesteraz ya da replikasyon proteini benzer bölgeye rastlanılmamıştır. Çalışmada kullanılan karboksilesterazın daha kolay tespit edilebilmesi için Western Blot düşünülmüş fakat piyasada çok sayıda antikör bulunmasına rağmen (human, rat vs.) bakteriyel karboksilesteraz için uygun bir antikör bulunmamıştır. Bu yüzden yukarıda anlatılan çalışmaya benzer olarak, kullanılan karboksilesteraz geninin 3' ucuna HisTag (8X) dizisi ilave edilerek, transle olan proteinlerin tespitinin anti-poly Histidine antikoru (Sigma, H-1029) kullanılarak, Western blot analizi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Çok az miktarda oluşmuş olabilecek olası rep-karboksilesteraz füzyon proteinlerinin jelde görülememe ihtimali düşünülerek bu çalışma yapılmıştır. Önceki çalışmadaki gibi elde edilen 12 farklı klonu taşıyan HB27 hücresi ve negatif kontrol olarak pMK18 taşıyan HB27 hücresi kültürleri yapılmış ve HisTag'lı karboksilesteraz proteinlerinin belirlenebilmesi amacıyla, hücre içi proteinler nitroselüloz membrana aktarılarak Western Blot analizi yapılmıştır (Şekil 54). Yapılan blotlama sonucunda, pozitif kontrol hücresinde bant görülmüş, diğer 12 klonu taşıyan HB27 hücresinde ve negatif kontrol hücresinde herhangi bir bant görülmemiştir. Ayrıca aynı örnekler SDS-PAGE analizi de uygulanarak farklı olabilecek spotlar taranmış ve herhangi farklı bir protein bantına rastlanılmamıştır (Şekil 55).

Yapılan bu 4 farklı çalışma sonucunda elde edilen klonlardan pHIG22 plazmitinin kodladığı bir proteininin üretilip üretilmediğinin belirlenebilmesi için; klonlardan elde edilen tüm hücre içi, hücre dışı, çözülebilen ve çözülmeyen proteinlere Native-PAGE

(esteraz aktivitesi deneyi), Tribütirin deneyi, SDS-PAGE analizi uygulanmış ve yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 plazmiti tarafından herhangi bir protein kodlanmadığına, pHIG22'nin replikasyonunu başlatabilmek ve tamamlamak için konak tarafından kodlanan proteinleri kullandığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde belirtildiği üzere, Teta tip replikasyon mekanizmasını kullanan plazmitler, plazmit tarafından kodlanan bir Rep başlangıç proteinine ihtiyaç duymalarına rağmen, bu kurala uymayan bazı istisnaları da vardır. Bazı replikonlar lider zincir sentezinin erken safhalarında konak DNA pol I'ine ihtiyaç duyabilirler (del Solar, vd., 1998). Bu yüzden özellikle Teta tip replikasyon modunu kullanan plazmitlerde transkripsiyon olsa bile, her zaman ürüne/proteine dönüşmeyebilir. Oluşan transkriptler, replikasyonun başlamasında görev alabilirler ya da replikasyonun kontrolünde görev yapabilirler (Antisense RNA örneğinde olduğu gibi). Literatürden bilindiği üzere CoLE1 plazmiti de kendi replikasyon proteine sahip olmayıp konak başlatıcı faktörlerini kullanmaktadır (Tomizawa, 1975), ayrıca *Bacillus subtilis*'ten izole edilen ve tanımlanan plazmit pLS20'de teta mekanizmasıyla replike olur ve replikasyonu için DNA pol I ve replikasyon başlangıç proteinine bağımlı değildir. Muhtemel *dnaA* kutusunun etrafında birçok palindrom vardır ve replikasyonu için konak faktörlerini kullanır (Meijer vd., 1995). Yukarıda da belirtildiği gibi, plazmit tarafından üretilen sense ve antisense RNA'ların 5' RACE ve LACE teknikleri ile başlangıç ve bitiş noktaları belirlenmiş fakat bu RNA'lardan protein kodlanmadığı ve plazmitin replikasyonu için konak faktörlerini kullandığı ortaya çıkarılmıştır.

pHIG22 plazmitinden kodlanan transkriptlerin belirlenebilmesi için, *Thermus scotoductus* K6 Total RNA'sının kalıp olarak kullanılması ile plazmitin her iki zincirinde belirli aralıklarla farklı bölgelerden spesifik primerler dizayn edilerek cDNA sentezi yapılmış ve elde edilen cDNA'lar PCR ile çoğaltılarak, transkriptlerin oryantasyonu ve muhtemel büyüklükleri belirlenmiştir. Muhtemel büyüklükleri belirlenen pHIG22 plazmitinin ilk zincirinden kodlanan bir ve karşı zincirinde kodlanan bir olmak üzere toplam iki transkriptin 5' uçlarının belirlenmesi için RACE tekniği, 3' uçlarının belirlenmesi içinde LACE tekniği kullanılmıştır. RACE ve LACE teknikleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 plazmitinin ilk zincirinden kodlanan Transkript 1'in 329. bazda başladığı, 1950. bazda sonlandığı; karşı zincirden kodlanan Transkript 2'inde 2103. bazda başladığı ve 329. bazda sonlandığı ortaya çıkarılmıştır (*BamHI* kesim noktası plazmitin "0" noktası olarak kabul edilmiştir).

Başlama ve bitiş noktaları belirlenen transkriptlerin birbirine büyük oranda komplementer olduğu; 1622 bp uzunlukta olan Transkript 1'in, 1712 bp uzunlukta olan Transkript 2 ile 1559 bp'lik bir bölgesinin çakıştığı görülmektedir. RNA'lar arasındaki etkileşimlerin replikasyon için gerekli olan pRNA'lar ile ayarlanabildiği literatürden bilinmektedir. Plazmit kopya sayısını kontrol eden antisens RNA'lar hedef transkriptin (replikasyon için gerekli preprimer RNA veya Rep mRNA'sı) 5' ucundaki bir bölgesine komplementerdir. Bunlar "Zıt transkript RNA'lar" (ctRNA) olarak ifade edilirler. Bazı durumlarda, ctRNA'lar tarafından inhibisyon, hedef RNA'larla eşleşme bölgesinde gerçekleştirilir (del Solar vd., 1998). pHIG22 plazmitinden tanımlanan transkriptlerinde birbirine zıt olması ve Transkript 2'nin 3' ucunun Transkript 1'in 5' ucuna komplementer olması, bu iki transkriptin plazmit kopya sayısının kontrolünde ve replikasyonun başlamasında etkili olduğu düşüncesini güçlendirmektedir. Replikasyonun antisens RNA ile kontrol edildiği başka örnekler de vardır. Örneğin IncI α ve IncI β gruplarındaki plazmitlerde replikasyonun kontrolü kısa bir ctRNA tarafından ayarlanır (Wagner vd., 1994). R6K plazmiti de iteron içeren teta replikasyonlu bir plazmittir. Bu plazmit de antisens RNA replikasyonunun regülasyonunda rol oynar. Plazmit ColE2'de lider *rep* mRNA'ya komplementer *rep* RNA-ctRNA-mRNA hibrit oluşturarak post-translasyonel seviyede replikasyon kontrolünde görev alır. Bu ctRNA-mRNA hibriti SD bölgesinden başka Rep sentezi için gerekli bir diziyi engeller (Takechi vd., 1994).

Ayrıca yapılan biyoinformatik analizleri sonucunda her iki transkriptinde 5' ucunun upstream bölgesinde palindrom dizilere rastlanılmıştır (Şekil 3). Çoğu plazmitte özellikle teta tip replikasyona sahip olanlarında, replikasyonun kontrolünde ve düzenlenmesinde iteron ve palindrom diziler etkilidir (del Solar vd., 1998). pHIG22 plazmitinin transkriptlerinin başlama noktalarının upstream bölgesinde palindrom diziler bulunması, bu transkriptlerin replikasyonda ve kopya sayısının kontrolünde rolleri olduğu sonucunu desteklemektedir.

Belirlenen pHIG22 transkriptlerinin düzenleyici bölgelerinin promotor özellikte olup olmadığının ve eğer promotor özelliği varsa ne düzeyde etkili olduğunun belirlenmesi için HTK kaseti kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada, pHIG22 tarafından kodlanan transkriptlerin upstream bölgelerinde bulunan düzenleyici bölgelerinin PCR ile ayrı ayrı çoğaltılarak HTK geninin +1 pozisyonunun önüne eklenmesi ve HTK'nın ekspresyon seviyesine bakılarak bu bölgelerin incelenmesi sağlanmıştır. Fernandes-Herrero ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada HTK geninin transkripsiyon başlama noktası

belirlenmiştir ve bu çalışmada HTK geninin kullanılabilmesi için kendi promotörü olan PslpA bölgesi çıkarılmıştır. PCR ile ayrı ayrı çoğaltılan Transkript-1 ve Transkript-2'nin upstream bölgeleri HTK geninin +1 pozisyonundan birleştirilmiş ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemleri *E. coli* JM101 suşunda amfisilinli ortamda (pGEM-T Easy vektörü β -lactamaz enzimi kullanılmıştır) yapılmıştır. Elde edilen pTR1-HTK ve pTR2-HTK klonlarını barındıran *E. coli* JM101 suşları kanamisinli LB agar (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) üzerine çizgi ekim yapılmış ve Şekil 36 'da görüldüğü üzere pTR1-HTK klonunu taşıyan JM101 suşunun kanamisinli LB agar petrisinde iyi düzeyde büyüdüğü belirlenmiştir, ancak pTR2-HTK klonunu taşıyan JM101 suşunun aynı şartlara sahip petride çok az düzeyde büyüebildiği görülmüştür. Bu sonuç, Transkript-1 düzenleyici bölgesinin HTK geninin ekspres olabilmesini sağlayacak promotor bölgesini taşıdığını göstermektedir. Bu promotor, *E. coli* RNA polimerazlarınca tanınmaktadır ve ekspresyonu teşvik eden güçlü bir promotor özelliğindedir çünkü HTK geni iyi derecede ekspres olmuştur. Transkript-2 düzenleyici bölgesinin de HTK geninin ekspres olabilmesini sağlayacak promotor bölgesini içerdiği fakat diğeri kadar güçlü bir promotor olmadığı sonucuna varılmıştır. Çünkü bu promotor bölgesinin kullanıldığı klonları taşıyan JM101 suşu kanamisinli petride çok az büyüebilmiştir. Her iki klonu taşıyan hücrenin büyüme farklılıklarının daha net ortaya çıkarılması için, hücrelerden gecelik kültürler yapılmış ve çoğalma eğrileri çıkarılmıştır. Her iki hücrenin çoğalma eğrilerinde farklılıklar görülmüş, pTR1-HTK klonunu taşıyan hücrenin, pTR2-HTK klonunu taşıyan hücreden daha hızlı çoğaldığı sonucu görülmüştür (Şekil 37 ve Tablo 40). Elde edilen sonuçlara t-testi uygulanmış ve her iki hücrenin çoğalma eğrilerinde anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkarılmıştır. Her iki transkriptin düzenleyici bölgelerinin promotor özellikte olduğu, fakat Transkript-1 düzenleyici bölgesinin daha güçlü bir promotor özelliğinde olduğu görülmüştür. Çünkü Transkript-1 düzenleyici bölgesinin bulunduğu pTR1-HTK klonunu taşıyan hücre, pTR2-HTK klonunu taşıyan hücreden çok daha hızlı bir şekilde çoğalmıştır. Transkript -1 düzenleyici bölgesinde bulunan promotörün, HTK kasetinin transkripsiyon seviyesini 2. bölgede bulunan promotora göre daha fazla artırdığı sonucu, 1. bölgedeki promotörün daha güçlü olduğu sonucuna bizi götürmektedir. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda da her iki bölgenin promotor bölgesi içerdiği sonucu desteklenmiştir. Neural Network Promoter Prediction aracı ile yapılan promotor analizleri sonucunda Transkript-1 düzenleyici bölgesindeki 511 ila 556 nükleotitleri (pHIG22 plazmitinin 239 ila 288 nükleotitleri arası) arasındaki bölge ile Transkript-2 düzenleyici bölgesindeki 346

ila 395 nükleotitleri (karşı zincirde, pHIG22 plazmitinin 2246 ila 2219 nükleotitleri arası) arasındaki bölgenin promotor dizileri taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 35). pHIG22 promotor bölgelerinin *E. coli* RNA polimerazlarınca tanınması pUCHTK-5 (*Thermus* cinsinde replike olabilen pHIG22 parçasını taşıyan hibrit plazmit) plazmitinin *E. coli* hücrelerinde replike olabilmesi gerektiğini düşündürülebilir. Fakat pHIG22 plazmitinin kendi replikasyon proteinine sahip olmayan teta modunda bir plazmit olması ve konak (*Thermus* türleri) dnaA ya da farklı başlatıcı proteinleri kullanarak replikasyonunu başlatması hasebiyle *E. coli*'de replike olmaması normaldir. Her ne kadar pHIG22 promotorları *E. coli* RNA polimerazlarınca tanınsa da, pHIG22 replikasyonunun başlayabilmesi için gerekli olan elemanlar (dnaA, SSBP, helikaz vb.) ve başka faktörler *E. coli* hücrelerinde mevcut değildir ancak *Thermus* cinsi hücrelerden sağlanabilmektedir.

Bu sonuç, pHIG22 plazmitinin kendi replikasyonundan sorumlu proteinini kodlamadığını ve konak başlatıcı faktörlerini kullanarak replikasyonunu başlattığı sonucunu da desteklemektedir.

pHIG22 plazmitinin replikasyon modunun ve orijininin belirlenmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) çalışması yapılmıştır. Literatürde belirtildiği üzere, Teta tipi DNA sentezi bir veya daha fazla orijinden başlayabilir. Replikasyon tek veya çift yönlü olabilir. Elektron mikroskobu (EM) altında replikasyon ara ürünleri tipik teta (θ) harfinde görülebilir. Replikasyon bölgesini kesen enzimler tarafından bu ara ürünler kesildiğinde 'Y' şeklinde moleküller (çatallar) üretirler (del Solar vd., 1998). pHIG22 plazmitini tek noktadan kestiği bilinen *BamHI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak ve kesilmemiş pHIG22 plazmiti kullanılarak hazırlanan elektron mikroskop preparatları incelenmiş ve kesilen örneklerde "Y" şeklinde çatallar, kesilmemiş plazmit örneklerinde de "Teta" şeklinde yapılar görülmüştür (Şekil 38, 39 ve 40).

Kesim sonucu oluşan ürünlerin incelenmesiyle replikasyon modunun tespiti, yönü, tek ya da çift yönlü olup olmadığı belirlenebilmektedir. Oluşan çatalların uzunluklarını ölçülmesiyle de replikasyon orijininin sınırları çizilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, elektron mikroskobuyla ColE1'in replikasyon ara ürünlerinin incelenmesi tek bir replikasyon orijininin varlığını ve replikasyonun tek yönlü olduğunu göstermiştir. Erken bir safhada lider zincir sentezi izci zincir sentezi olmadan başlamaktadır (Tomizawa vd., 1975). TEM altındaki incelemeler sonucunda Teta harfine benzer yapıların görülmesi pHIG22 plazmitinin Teta modunda replike olduğunu göstermiştir. Ayrıca *BamHI*

restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş pHIG22 örneğinde de literatürde belirtildiği gibi "Y" şeklinde yapılar görülmüştür (Şekil 39). Aynı şekilde, ikinci bir endonükleazın (*NcoI*) pHIG22 replikasyon orijinini iç bölgeden kestiği ve çatal şeklinde yapılar oluştuğu görülmüştür (Şekil 38).

Böylece, plazmitin *BamHI* kesim bölgesinden 1254 bp uzakta olan *NcoI* kesim bölgesinden de kesilmiş olması replikasyon orijin bölgesininin bu iki enzim (*BamHI* ve *NcoI*) bölgelerinin her ikisini de içine aldığını göstermiştir. Oluşan çatalların her iki kolunun uzunlukları hesaplanmış ve replikasyon orijinin başlama ve bitiş bölgeleri yaklaşık olarak belirlenmiştir. pHIG22 için yapılan TEM analiz sonuçlarında oluşan çatalların uzunlukları hesaplandığında replikasyonun başladığı noktanın Transkript-1'in +1 pozisyonuna denk geldiği görülmüştür. Literatürde belirtildiği üzere, pHIG22'ye benzer olarak Teta tip replikasyon moduna sahip olan ve replikasyonun başlaması için konak proteinlerini kullanan CoLE1 plazmitinde replikasyon orijini, RNA II primeri ve DNA pol I tarafından sentezlenen DNA arasında geçiş noktası olarak tanımlanır ve transkriptler ile promotor dizileri kapsar. Replikasyon ise, RNA II başlangıç noktasının 555 baz çifti aşağısında başlar (Tomizawa, 1975). pHIG22 plazmitinde de replikasyon orijin bölgesinin plazmitin kodladığı her iki transkript bölgesini, promotorlarını ve Transkript-1'in upstream bölgesinde bulunan palindrom diziyi kapsadığı görülmüştür. Replikasyonun başladığı nokta, Transkript-2'ye göre daha güçlü promotora sahip olduğu belirlenen Transkript 1'in +1 pozisyonu olarak öngörülmüştür (Şekil 41) ve replikasyon çatalının bu bölgeden açıldığı TEM verileri ile desteklenmiştir.

İkinci olarak, pHIG-5 plazmiti (pHIG22 ve pMK18 hibriti olan bu plazmitteki pHIG22 parçası K6 suşunda replike olabilen parçadır) *SacII* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiş ve incelenmiştir. Yapılan bu çalışma ile de pHIG22'nin, pHIG-5 hibritinin replikasyonunda etkili olup olmadığı ve replikasyon çatalı oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. İki termofilik *ori* bölgesine sahip olan hibrit vektörün hangi replikasyon orijinini ya da her ikisini birlikte mi kullandığının belirlenmesi için bu çalışma yapılmıştır.

pHIG-5 plazmiti üzerinde *Thermus* replikasyon orijini bulunmakta ve *SacII* enzimi bu replikasyon orijininin iç bölgesinden kesmektedir. Yapılan kesim sonucu, pHIG-5 plazmiti üzerindeki pHIG22 bölgesinde oluşan replikasyon çatalı incelenmiş ve *SacII* enzimi ile kesim sonucu *Thermus ori* bölgesinde "Y" harfine benzer bir yapının oluştuğu, karşı bölgesindeki pHIG22 plazmit bölgesinde ise kabarcık şeklinde yapının oluştuğu

belirlenmiştir (Şekil 43). Bu sonuçla, replikasyonun hem pHIG-5 plazmitinin *Thermus ori* bölgesinde başladığı hem de pHIG22 *rep ori* bölgesinde başladığı ortaya çıkarılmıştır. Yani hibrit plazmitte, her iki *rep ori* de aynı anda kullanılmaktadır. *NcoI* restriksiyon enzimi pHIG-5 hibritindeki pHIG22 *ori* bölgesinin iç kısmından, kenarına yakın bölgesinden kesmektedir. pHIG-5 plazmitinin *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen görüntüler de incelenmiş ve replikasyon çatalının kesim yapılan bölgede olduğu ve kesim sonucunda çatalın kesilerek “Y” harfine benzer bir yapının olduğu görülmüştür. ‘Y’ şekline benzer yapının görülmesi pHIG22’nin replikasyonu başlatmak için halka yapısı oluşturduğunu göstermektedir. Kullanılan *NcoI* enzimi sadece pHIG22 bölgesinden DNA’yı kestiği için *Thermus ori* (pMK18 replikasyon *ori* bölgesi) bölgesinde herhangi bir ‘Y’ yapısı görülmemiş, sadece halka yapı gözlenmiştir (Şekil 44). Bu sonuç bize, hibrit plazmit olan pHIG-5 plazmitinin replikasyonunda pHIG22 plazmitinin replikasyon orijininin de kullanıldığını göstermektedir. Bu sonuçla, replikasyonun hem pHIG-5 plazmitinin *Thermus ori* bölgesinde başladığı hem de pHIG22 *rep ori* bölgesinde başladığı ortaya çıkarılmıştır. Yani hibrit plazmitte, her iki replikasyon orijini de aynı anda kullanılmaktadır. Yukardaki veriler de bu sonucu desteklemektedir.

Literatürde plazmitlerin replikasyon mekanizmaları üzerine yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Termofilik bakterilerde replikasyon mekanizması üzerine çalışmalar yapılan ilk plazmit pRQ7 plazmitidir. *Thermotoga* RQ7 suşundan izole edilen plazmitin yuvarlanan çember replikasyon (RCR) tipine sahip olduğu belirlenmiştir (Harriott vd., 1994; Yu vd.,1997). *Thermus* cinsinden izole edilen plazmitler arasında replikasyon modunun belirlenmesi üzerine pek çalışma yapılmamış olup; *Thermus aquaticus* NTU103’dan tanımlanan pTA103 plazmitinin RCR modunda replike olduğu (Chu vd., 2006), *Thermus* sp. ATCC 27737 suşundan izole edilen pMY1 plazmitinin de teta modunda replike olduğu elektron mikroskopi çalışması ile belirlenmiştir (de Grado vd., 1998). Bu iki plazmit dışında *Thermus* cinsi plazmitlerde replikasyon modunun belirlenmesi üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. pHIG22 plazmitinin teta modu ile replike olduğunun belirlenmesi ile literatürde *Thermus* cinsi plazmitlerde replikasyon modu belirlenen plazmit sayısı arttırılmıştır.

pHIG22 plazmitinin kopya sayısının belirlenmesi için qPCR tekniği kullanılmıştır. Real-Time qPCR tekniği ile konak hücre içerisinde stabil olan plazmitlerin kopya sayısı kantitatif olarak hesaplanabilir (Fujimura ve ark., 1996). Real-Time prensibi altında “Absolute Kantifikasyon” metodu ile çoğaltılan hedef bölgelerin hızlı ve verimli bir

şekilde miktarının ya da kopya sayısının hesaplanması yapılabilmektedir (Burgos ve ark., 2002). Nükleik asitlerin kantitatif analizinde birçok metot kullanılmasına rağmen, qPCR şu anda kullanılan en duyarlı ve hassas yöntemdir (Ferre, 1992; Klein 2002). *Thermus* cinsinden izole edilen plazmitler için yapılan kopya sayısı hesaplama çalışmalarında, daha çok CsCl-EtBr santrifügasyonu (Weisblum vd., 1979), jel elektroforezi (Projan vd., 1983) ve HPLC (Coppella vd, 1987) gibi klasik yöntemler kullanılmıştır. En güncel ve güvenilir yöntem olan qPCR ile kopya sayısının hesaplanması, *Thermus* cinsi plazmitler arasında ilk kez bu çalışmada pHIG22 plazmiti için yapılmıştır.

pHIG22'nin kopya sayısının hesaplanabilmesi için *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi barındıran orijinal suş) genomundaki tek kopyalı olduğu bilinen *rpoB* geni (GenBank, CP001962.1) standart olarak kullanılmıştır. Real-time qPCR tekniği ile çoğaltılan *rpoB* geni ve pHIG22 hedef bölgesinin konsantrasyonları karşılaştırılmış ve kopya sayısının belirlenmesinde kullanılan C_T değerleri hesaplanmıştır. Yapılan birçok çalışmada qPCR tekniği tercih edilmiştir. pSFKW33 plazmitinin kopya sayısının hesaplanmasında da absolute kantifikasyon metodu kullanılmış, standart gen olarak *gyrB* geni tercih edilmiştir (Werbowy vd., 2009). Yine *E. coli*'den izole edilen birçok plazmitte kopya sayısı hesaplamada qPCR tekniği kullanılmış, standart genler olarak *bla* ve *dxg* genleri kullanılmıştır (Lee vd., 2006).

Bu çalışmada, *rpoB* geni ve pHIG22 hedef bölgesi için standart grafikler oluşturulmuş (Şekil 52 ve 53) ve eğimleri sırasıyla -3.33 ve -3.38 olarak bulunmuştur. Her iki bölge için 0,99 gibi yüksek bir amplifikasyon verimi elde edilmiş ve $R^2 > 0,999$ olarak bulunmuştur. Real-Time PCR çalışmalarında PCR ürünlerinin doğruluğu Melting curve analizi ile yapılır. Amplifikasyonun son aşamasında yapılan melting curve analizi ile non-spesifik bantların oluşumu gözlenir ve bu şekilde PCR ürünlerinin kalitesi belirlenir (Rodríguez-Lázaro vd., 2013). Amplifikasyonun doğruluğu melting curve analizi ile kontrol edilmiş ve tüm amplifikasyonlar için tek bir erime piki görülmüş olup, non-spesifik bantların oluşumu gözlenmemiştir.

C_T değerlerinin elde edilmesi sonrası, pHIG22 plazmitinin kopya sayısı, *rpoB* geninin kopya sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Yapılan qPCR çalışması sonucu, C_T değerlerinin farkı alınmış ve bu fark " $2^{C_T^{\text{pHIG22}} - C_T^{\text{rpoB}}}$ " olarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında üç tekrarlı olarak yapılan çalışma sonucu, pHIG22 plazmiti *Thermus scotoductus* K6 bakterisinde 148 kopyalı olarak bulunmuştur.

Şuan literatürde *Thermus* cinsinden tanımlanan plazmit sayısı 19'dur. Bu plazmitlerin çoğu büyük genomlu olup sadece 5 tanesinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu plazmitlerden de sadece 4'ünde kopya sayısı klasik yöntemlerle hesaplanmıştır. *Thermus thermophilus* HB27 ve HB8'de replike olabilen pMK18'in kopya sayısı agaroz jel elektroforezi ile hesaplanmış ve öncüsü pMY1 ile benzer olarak kromozom başına 4 ila 10 kopya olarak bulunmuştur (de Grado vd., 1999). Yine *Thermus thermophilus* HB27 de replike olan pNHK101 plazmitinin kopya sayısı 80 olarak hesaplanmıştır (Kobayashi, vd., 2005). Yapılan diğer bir çalışmada *Thermus thermophilus* HB8'den izole edilen pTT8 plazmitinin kopya sayısı 8 olarak bulunmuştur (Takayama vd., 2004). pTT8 iskeleti kullanılarak geliştirilen diğer plazmitlerin de kopya sayısının değişmediği görülmüştür (Wayne et al., 1997). Yine yapılan farklı bir çalışmada HB8 suşundan izole edilen pVV8 plazmitinin kopya sayısı kromozom başına 6 ila 10 olarak belirlenmiştir (Ohtani vd., 2012). *Thermus* cinsinden izole edilen plazmitler arasında qPCR tekniği ile kopya sayısı hesaplanan ilk plazmit olan pHIG22 plazmiti, *Thermus scotoductus* bakterisinde de kopya sayısı belirlenen ilk plazmittir ve şu ana kadar *Thermus* cinsinden tanımlanan plazmitler arasında en yüksek kopya sayısına sahiptir. *Thermus* türlerinde tanımlanan diğer plazmitler ve konakları Tablo 42'de gösterilmektedir.

Tanımlanan bu 19 plazmitin 11'i genom çalışmalarından elde edilmiş ve fonksiyonel analizleri yapılmamıştır. Sadece sekans bilgileri mevcuttur. *Thermus* sp. YS45 bakterisinden elde edilen pTCCB09 plazmitinin ise sekans bilgisi olmayıp sadece restriksiyon-modifikasyon sisteminde etkili olduğu DNA dizin analizi ile belirlenebilmiştir (Genbank, NC_016634). Genel olarak bakıldığında *Thermus* cinsi bakterilerden tanımlanan plazmitlerin çoğu büyük genomlu plazmitler olup, fonksiyonel analizleri oldukça zahmetli ve zordur. Ayrıca literatürde bu alanda çok bilgi olmaması yapılacak çalışmaları da zorlaştırmıştır. Geriye kalan 8 plazmitten biri olan *Thermus* sp. TK10'dan elde edilen pNHK101 plazmitinin ise sekans bilgisi elde edilmemiş sadece kodladığı 3 ORF hakkında bilgi verilmiş (Kobayashi vd., 2005), *Thermus* sp. ATCC 27737 bakterisinden izole edilen pMY1 plazmitinin ise kısmi karakterizasyonu yapılmıştır (de Grado vd., 1998). Bu bilgiler dikkate alındığında *Thermus* cinsi bakterilerde tanımlanan sadece 5 plazmit bulunmaktadır. Bu plazmitler; *Thermus aquaticus*'dan tanımlanan pTA103 plazmiti (Chu vd. 2006), *Thermus thermophilus* HB8'den elde edilen pTT8 (Takayama vd., 2004) ve pVV8 (Ohtani vd., 2012) plazmitleri ve *Thermus* sp. 4C'den elde

edilen pS4C ve pL4C (Ruan vd., 2007) plazmitleridir. Bu üç bakteriden elde edilen plazmitler hakkında detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 42. *Thermus* cinsinde tanımlanan plazmitler ve konakları

Bakteri Adı	Taşıdığı Plazmit Adı
<i>Thermus</i> sp. TK10	pNHK101
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	pTT8 pVV8
<i>Thermus oshimai</i> JL-2	pTHEOS01 pTHEOS02
<i>Thermus</i> sp. CCB-US3	pTTCCB09
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	pTT27
<i>Thermus</i> sp. YS45	pTSP45S
<i>Thermus thermophilus</i> JL-18	pTTJL1801 pTTJL1802
<i>Thermus</i> sp. 4C	pS4C pL4C
<i>Thermus thermophilus</i> SG0.5JP17-16	pTHTHE1601
<i>Thermus thermophilus</i>	pTF62
<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	pTSC8
<i>Thermus</i> sp. WG	pWG16 pWG13
<i>Thermus aquaticus</i> NTU103	pTA103
<i>Thermus</i> sp. ATCC 27737	pMY1

Bu plazmitler arasındaki uyumsuzluk gruplarına bakıldığında ise detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Plazmit sınıflandırmanın klasik yolu, onları uyumsuzluk gruplarına yerleştirmektir. Aynı uyumsuzluk grupları üyeleri, çok benzer orijin dizileme ve replikasyon kontrol mekanizmalarına sahiptir. Yeni izole edilmiş herhangi bir replikonu deneysel olarak çok kompleks olan metotlarla bir uyumsuzluk grubuna yerleştirilmesi zordur (Ruan vd., 2007). *Thermus* cinsinden tanımlanan pS4C ve pL4C plazmitlerinin aynı hücrede replike olabildiği ve böylece farklı uyumsuzluk gruplarında olduğu, pTT8 ve pVV8 plazmitlerinin de farklı uyumsuzluk gruplarında bulunduğu ve aynı hücrede replike olabildiği sonuçları görülmüştür (Ruan vd., 2007; Ohtani vd., 2012).

Thermus türleri bir ya da daha fazla plazmit barındırırlar ve bu plazmitlerin konaklarına önemli avantajlar sağlamadıkları görülür (Munster vd., 1985). Literatüre bakıldığında, sadece birkaç tane hibrit *E. coli-T. thermophilus* vektörü geliştirilmiş ve bunlarla ilgili çok az sayıda replikasyon çalışması yapılmıştır. *E. coli-Thermus* hibrit vektörlerinin ilk grubu *Thermus thermophilus* HB8'den izole edilen ve en fazla çalışma yapılan pTT8 plazmitinden tasarlanıp geliştirilen vektörlerdir (Koyama vd., 1990). pTT8 plazmiti, 9,3 kb büyüklükte olup tetra mekanizması ile replike olur ve sekiz protein kodlar (Takayama vd., 2004). Ama pTT8'in genomunun büyük olması ve kopya sayısının da sadece 8 olması proteinlerin overekspresyonu açısından dezavantaj olarak görülmüştür. Bu yüzden *Thermus* cinsine uyumlu yeni klonlama ve ekspresyon vektörlerinin dizayn edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

En yaygın kullanılan plazmitlerden bir diğeri de, *Thermus* sp ATCC 27737'den izole edilen 16 kb büyüklükteki kriptik bir plazmitin minimal replikasyon orijin bölgesinden elde edilen pMK18'dir (de Grado vd., 1998). Kriptik plazmitten tanımlanan bu minimal replikon, 1798 bp büyüklükte olup 402 a.a büyüklüğünde replikasyondan sorumlu bir RepA proteinini kodlar. Bu RepA proteini *Thermus* sp. YS45'den izole edilen pTsp45s plazmitinin RepT proteinine (Wayne vd., 1997) ve *Thermus* sp. 4C'den tanımlanan pL4C ve pSC4 plazmitlerinin iki ORF bölgesine (Ruan vd., 2007) kısmi olarak benzemektedir. Dizayn edilen pMK18 plazmiti *E. coli* ve *Thermus* türlerinde yaygın olarak kullanılan bir klonlama vektörüdür. pHIG22'nin minimal replikonunun belirlenmesi ile de, pMK18 plazmiti ve pUC18 plazmiti kullanılarak pHIG22 tabanlı klonlama vektörü dizayn edilmiştir. İlk olarak pMK18 plazmitinden HTK kaseti (PslpA promotörü ile birlikte) pUC18 plazmiti ile birleştirilmiş ve iki direnç genine (kanamisin ve amfisilin) sahip pUCHTK plazmiti elde edilmiştir. Sonrasında, pHIG22'nin minimal replikonu PCR ile çoğaltılmış ve pUCHTK vektörüyle birleştirilerek pUCHIGK hibrit vektörü elde edilmiştir. Elde edilen hibrit vektörü; kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve pHIG *ori* bölgesini içerecek şekilde oluşturulmuştur (Şekil 60). Oluşturulan bu vektör *E. coli-Thermus* türlerinde shuttle vektör olarak kullanılabilir. pMK18'e göre kopya sayısının daha yüksek olması ticari olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır.

Şu ana kadar literatürden bilindiğine göre, *Thermus* türleri için geliştirilen klonlama vektörleri Proteobacteria'dan tanımlanan plazmitlerde olduğu gibi tetra moduyla replike olmaktadır. RC moduyla replike olan plazmitler daha çok gram-pozitif bakterilerden izole

edilen plazmitlerde görülmüştür. pHIG22 plazmitinde teta modunda replike olması literatürdeki klonlama vektörleri ile benzerlik göstermektedir.

Kobayashi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Thermus* cinsi bakterilerde ekspresyon vektörü olarak kullanılması için, *Thermus* sp. TK10 dan küçük çok kopyalı kriptik bir plazmit olan pNHK101 izole edilmiştir. 1564 bp büyüklükte olan plazmitin dizisinin herhangi bir benzerine Genbankta rastlanılmamıştır. Plazmit genomu üzerinde dört muhtemel ORF bölgesi belirlenmiş ve yapılan BLAST araştırmaları sonucunda herhangi bir plazmite ya da proteine benzerliği bulunamamıştır. Plazmit genomu üzerine kanamisin direnç kaseti eklenerek ekspresyon vektörü olarak dizayn edilmiş ve birçok proteinin overekspresyonu yapılmıştır (Kobayashi vd., 2005). Moreno ve arkadaşlarının yaptığı 2 farklı çalışmada pMK18 vektörü kullanılarak ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir. *Thermus thermophilus* genomunda *nar* operon bölgesi kullanılarak pMKE1 (Moreno vd., 2003) ve pMKE2 (Moreno vd., 2005) vektörleri geliştirilmiştir. Bu iki vektör hibrit özellikte dizayn edilmiş olup termofilik özellikteki proteinlerin *Thermus* cinsi bakterilerde over-ekspres edilmesinde ticari olarak kullanılmaktadır. Literatürde çok az sayıda *Thermus* cinsi ekspresyon vektörü olması ve pHIG22 plazmitinin *Thermus* cinsinde replike olabileme özelliği kullanılarak, termofilik proteinlerin ekspres edilmesinde kullanılabilir pHIG22 tabanlı pHIGKE2 ekspresyon vektörü dizayn edilmiştir.

İlk olarak *E. coli-Thermus* suşlarında replike olabilen, HTK (Highly thermostable kanamycine cassette) kaseti, MCS bölgesi ve P_{nar} promotor bölgesi içeren hibrit pMKE2 vektörü iki parça halinde PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen bu fragmentler kendi üzerlerine yapıştırılmıştır. Ardından, pHIG22 plazmitinin minimal replikonu PCR ile çoğaltılmış, bir önceki aşamada 2 fragmentin birleştirilmesiyle elde edilen vektörle birleştirilerek pHIGKE2 vektörü elde edilmiştir.

Elde edilen hibrit vektör pHIGKE2; kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotoru, P_{nar} promotoru ve pHIG *ori* bölgesini içermektedir (Şekil 61). pHIGKE2 hibrit vektörü *Thermus Thermophilus* HB27 ve *Thermus Scotoductus* K6 suşlarında replike olabileme özelliğinde olup termofilik proteinlerin over-ekspresyonu için kullanılabilir. pHIGKE2 plazmitinde ekspresyon sistemi P_{nar} promotoru ile kontrol edilmektedir. KNO₃ ile aktive edilecek P_{nar} promotoru altında termofilik proteinler kontrollü olarak ekspres edilebilecektir. pHIGKE2 vektörü pMKE1, pMKE2 ve pNHK101 tabanlı geliştirilen ekspresyon vektörlerine göre kopya sayısı bakımından daha avantajlıdır.

Bu özelliği klonlanan proteinlerin aşırı üretiminde büyük kolaylık sağlama potansiyeli barındırmaktadır.

5. SONUÇLAR

‘*Thermus scotoductus* K6’ dan izole edilen yeni, kriptomik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) fonksiyonel analizi’ başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Hibrit vektörlerin yapımı ve replikasyonun incelenmesi sonucu, pHIG22 plazmitinin (*Bam*HI noktası “0” kabul edildiğinde ve saat yönünde) 387. bazı ile 614. bazı arasında kalan 2122 bp’lik bölgenin replikasyondan sorumlu minimal replikonu olduğu belirlenmiştir.
2. pHIG22 plazmitinin replikasyon modunun belirlenmesi için elektron mikroskopu çalışması yapılmış ve TEM ile alınan görüntüler doğrultusunda plazmitin “Teta” tip replikasyon moduna sahip olduğu, replikasyon orijininin 46. bp ile 239. bp arasındaki (*Bam*HI noktası “0” kabul edildiğinde ve saat yönünün tersinde) bir bölge olduğu belirlenmiştir. Plazmitin replikasyonunun, pHIG22 Transkript-1’in +1 pozisyonundan başladığı, orijin bölgesinin pHIG22’den kodlanan transkriptleri, promotor bölgelerini ve Transkript-1’in upstream bölgesinde bulunan palindrom diziyi kapsadığı sonucuna varılmıştır.
3. pHIG22 plazmitinden kodlanan iki transkript olduğu belirlenmiş, RACE ve LACE teknikleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, pHIG22 tarafından kodlanan Transkript 1’in 329. bazda başladığı, 1950. bazda sonlandığı; karşı zincirden kodlanan Transkript 2’nde 2103. bazda başladığı ve 329. bazda sonlandığı ortaya çıkarılmıştır (*Bam*HI noktası “0” kabul edildiğinde ve saat yönünün tersinde).
4. pHIG22 plazmitinin kodladığı iki transkriptin düzenleyici bölgelerinin promotor özellikte olup olmadığı biyoinformatik ve deneysel çalışmalarla araştırılmış, Transkript-1 düzenleyici bölgesinde (pHIG22 plazmitinin 239 ila 288 nükleotitleri arasında) ve Transkript-2 düzenleyici bölgesinde (karşı zincirde, pHIG22 plazmitinin 2246 ila 2219 nükleotitleri arasında) promotor dizilerin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Transkript-1 bölgesinde belirlenen promotorun, 2. bölgede bulunan promotora göre daha güçlü özellikte olduğu belirlenmiştir.
5. pHIG22’nin transkriptlerinin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenebilmesi için farklı birkaç yaklaşım geliştirilmiş; SDS-PAGE, Zimogram, 2D jel analizi ve MALDI-TOF/TOF analizleri sonucunda yapılan tüm çalışmalar birbirleri ile desteklenmiş ve

pHIG22 plazmitinden herhangi bir protein kodlanmadığı, plazmitin replikasyonu için konak proteinlerini kullandığı sonucuna varılmıştır.

6. pHIG22 plazmitinin *Thermus* cinsinde replike olabilen bölgesinin *E.coli* JM101 ve BL21 suşlarında replikasyonu araştırılmış ve *E.coli* suşlarında replike olmadığı sonucu elde edilmiştir.
7. Real-time qPCR tekniği kullanılarak belirlenen pHIG22 plazmitinin kopya sayısı, *Thermus scotoductus* K6 (pHIG22'yi barındıran orjinal suş) bakterisinde 148 olarak hesaplanmıştır.
8. Kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve pHIG *ori* bölgesini içeren, *E. coli-Thermus* suşlarında replike olabilen pUCHIGK shuttle klonlama vektörü geliştirilmiştir. P_{nar} bölgesi (*Thermus* cinsinde ekspresyonu sağlayan bölge), kanamisin kaseti, amfisilin kaseti, pUC *ori* bölgesi, MCS bölgesi, *lac* promotörü ve pHIG22 *ori* bölgesini içeren *E. coli-Thermus* suşlarında replike olabilen, P_{nar} promotörü ile ekspresyonun kontrol edildiği shuttle pHIGKE2 ekspresyon vektörü geliştirilmiştir.

6. ÖNERİLER

1. pHIG22 plazmiti tabanlı geliştirilen klonlama ve ekspresyon vektörlerinde mutasyonlar yapılmak suretiyle MCS bölgesine farklı restriksiyon tanıma bölgeleri eklenebilir ve vektörlerin ticari olarak kullanılma potansiyelleri artırılabilir.
2. Dizayn edilen pUCHIGK klonlama vektörü üzerindeki *amp* geninin çıkarılması ve yeni reporter genler eklenmesi suretiyle vektör üzerinde yeni dizaynlar yapılarak, daha küçük boyutta yeni pUCHIGK türevleri geliştirilebilir.
3. pHIG22 tabanlı geliştirilen ekspresyon plazmitinin ekspresyondan sorumlu bölgesi değiştirilerek farklı mekanizmalarla ekspresyonun teşvik edilmesi suretiyle ticari vektörler geliştirilebilir.
4. pHIG22 plazmiti, *Bacillus* gibi yaygın olarak kullanılan hücrelerde shuttle vektör olarak kullanılacak şekilde dizayn edilebilir. Plazmite *Bacillus* hücrelerinde replike olabilmeyi sağlayacak DNA elemanları eklenebilir.
5. pHIG22 dizininde tespit edilen iki promotor dizinin detaylı analizi yapılarak, -10 ve -35 bölgeleri belirlenebilir ve diğer yaygın kullanılan promotorlar ile karşılaştırılarak modifiye edilip geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Abeles, A., L., Brendler, T. ve Austin, S., J., 1993. Evidence of two levels of control of P1 *oriR* and host *oriC* replication origins by DNA adenine methylation, J. Bacteriol., 175, 7801–7807.
- Akhmaloka, A., Suharto, S., Nurbaiti, I., N., Tika, F. ve Warganegara, M., 2006. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater, Proc.ITB. Eng. Science, 38, 1-10.
- Austin, S. ve Nordström, K., 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids, Cell, 60, 351-354.
- Khalil A., B., H. ve Anfoka G., H., ve Bdour S., 2003. Isolation of plasmids present in thermophilic strains from hot springs in Jordan, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19, 239–241.
- Belduz, A., O., Lee, E., J. ve Harman, J., G., 1993. Mutagenesis of the Cyclic AMP Receptor Protein of *Escherichia coli*: Targeting Positions 72 and 82 of the Cyclic Nucleotid Binding Pocket, Nuc. Acids. Res., 21, 1827-1835.
- Bradford, 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, 248-254.
- Bramhill, D. ve Kornberg, A., 1988. A model for initiation at origins of DNA replication, Cell, 54, 915–918.
- Brendler, T., G., Abeles, A., L., Reaves, L., D. ve Austin, S., J., 1991. Unique sequence requirements for the P1 plasmid replication origin, Res. Microbiol., 142, 209-216.
- Burgos, J., S., Ramirez, C., Tenorio, R., Sastre, I. ve Bullido, M., J., 2002. Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters, Mol. Cell. Probe, 16, 257–260.
- Burkardt, H., J., Mattes, R., Puhler, A. ve Heumanne, W., 1978. Electron Microscopy and Computerized Evaluation of Some Partially Denatured Group P Resistance Plasmids, Journal of General Microbiology, 105, 51-62.
- Cava, F., Hidalgo, A. ve Berenguer, J., 2009. *Thermus thermophilus* as biological model, Extremophiles, 13, 213–231.
- Chattoraj, D., K. ve Schneider, T., D., 1997. Replication control of plasmid P1 and its host chromosome: the common ground, Prog. Nucleic Acid Res., 57, 145-86.
- Clarck, D., P., 2010. Molecular Biology (Update Edition), Apcell Press, California.

- Coffin, J., M., Hughes, S., H. ve Varmus, H., E., 1997. Retroviruses, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Coppella, S., J., Acheson, C., M. ve Dhurjati, P., 1987. Isolation of highmolecular-weight nucleic acids for copy number analysis using high performance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 402, 189–199.
- de Grado, M., Casta'n, P. ve Berenguer, J., 1999. A High-Transformation-Efficiency Cloning Vector for *Thermus thermophilus*, Plasmid, 42, 241-245.
- de Grado, M., Lasa, I. ve Berenguer, J., 1998. Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile, FEMS Microbiol Lett. 165, 51-57.
- de la Campa, A., G., del Solar, G. ve Espinosa, M., 1990. Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions, J. Mol. Biol., 213, 247–262.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M., J., Espinosa, M. ve Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 434–464.
- del Solar, G., Moscoso, M. ve Espinosa, M., 1993. Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls, Mol. Microbiol., 8, 789–796.
- Dellis, S., Schatz, T., Rutlin, K., Inman, R., B. ve Filutowicz, M., 1992. Two alternative structures can be formed by IHF protein binding to the plasmid R6K gamma origin, J. Biol. Chem., 267, 24426–24432.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. ve David, S., 2004. PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. Nucleic Acids Res., 32, 660-664.
- Eckdahl, T., T. ve Anderson, J., N., 1990. Conserved DNA structures in origins of replication, Nucleic Acids Res. 18, 1609–1612.
- Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F. ve Alonso, J., C., 1995. Plasmid Rolling circle replication and its control, FEMS Microbiol. Lett., 130, 111–120.
- Ferdows, M.,S., Serwer, P., Griess, G., A., Norris, S., J. ve Barbour, A., G., 1996. Conversion of a linear to a circular plasmid in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*, J. Bacteriol., 178, 793–800.
- Fernandez-Herrero, L., A., Olabarria, G. ve Berenguer, J., 1997. Surface proteins and a novel transcription factor regulate the expression of the S-layer gene in *Thermus thermophilus* HB8, Molecular Microbiology, 24, 61-72.
- Ferre, F., 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth, PCR Meth. Appl., 2, 1–9.

- Frohman, M., A., Dush, M., K. ve Martin, G., R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 85, 8998-9002.
- Fujimura, H., Sakuma, Y. ve Weimer, T., 1996. A quantitative method for the determination of plasmid copy number in recombinant yeast, Biologicals 24, 67–70.
- Gao, F. ve Zhang, C., T., 2008. Ori-Finder: a web-based system for finding *oriCs* in unannotated bacterial genomes, BMC Bioinformatics,1, 9-79.
- García de Viedma, D., Serrano-Lopez, A. ve Diaz-Orejas, R., 1995. Specific binding of the replication protein of plasmid pPS10 to direct and inverted repeats is mediated by an HTH motif, Nucleic Acids Res, 23, 5048–5054.
- Gomes, J. ve Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol., 42, 223–235.
- Grinsted, J. ve Bennett, P., M., 1988. Methods in Microbiology, Volume 21, 2nd Edition, Academic Press Inc., San Diego.
- Gruss, A., D. ve Ehrlich, S., D., 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids, Microbiol. Rev., 53, 231–241.
- Gül-Güven, R., 2004. *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *ritmannii*'nin β -Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Haki, G., D. ve Rakshit, S., K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17–34.
- Hall, T., A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucl. Acids. Symp., 1999, 41, 95-98.
- Haring, V. ve Scherzinger, E., 1989. Replication proteins of the IncQ plasmids, p. 95–124. In C. M. Thomas (ed.), *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*, Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- Haring, V., Scholz, P., Scherzinger, E., Frey, J., Derbyshire, K., Hatfull, G., Willetts, N., S. ve Bagdasarian, M., 1985. Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 6090–6094.
- Harriott, O., T., Huber, R., Stetter, K., O., Betts, P., W. ve Noll, K., M., 1994. A cryptic miniplasmid from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga* sp. strain RQ7, J. Bacteriol. 176, 2759–2762.
- Heeryt, D., M., Powell, R., Gannon, F. ve Dunican, L., K., 1989. Curing of a plasmid from *E.coli* using high-voltage electroporation, Nucleic Acids Research. 17,10131.

- Hefford, M., A., Teather, R., M. ve Forster, R., J., 1993. The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from a rumen bacterium of the genus *Butyrivibrio*, Plasmid, 29,63–69.
- Hoeben, R., C., Louz, D. ve Koppers-Lalic, D., 2013. Biosafety of Non-Human Therapeutic Viruses in Clinical Gene Therapy. Current Gene Therapy, 13, 492-499.
- Holmes, M., L., Pfeifer, F. ve Dyall-Smith, M., L., 1995. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon, Gene, 153, 117–121.
- Honda, Y., Sakai, H., Hiasa, H., Tanaka, K., Komano, T. ve Bagdasarian, M., 1991. Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad host-range plasmid RSF1010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 179–183.
- Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S. ve Kagamiyama, H., 1999. Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*, J. Biochem., 126, 951–956.
- Hoshino, T., Fujii, R. ve Nakahara, T., 1993. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the crtB Gene of *Thermus thermophilus* HB27, an Extreme Thermophile Producing Carotenoid Pigments, Applied And Environmental Microbiology, 59, 3150-3153
- Ince, I., A., Ozcan, K., Vlak, J., M. ve van Oers, M., M. 2013. “Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus”. Journal Of General Virology, 94, 187-192.
- Ingmer, H. ve Cohen, S., N., 1993. Excess intracellular concentration of the pSC101 RepA protein interferes with both plasmid DNA replication and partitioning, J. Bacteriol., 175, 7834–7841.
- Kalendar, R., Lee, D. ve Schulman, A., H., 2009., FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search, Genes, Genomes and Genomics, 3, 1-14.
- Kelman, Z. ve O'Donnell, M., 1995. DNA polymerase III holoenzyme:structure and function of a chromosomal replicating machine, Annu. Rev. Biochem., 64, 171–200.
- Kim, K. ve Meyer, R., J., 1985. Copy number of the broad host-range plasmid R1162 is determined by the amount of essential plasmid-encoded proteins, J. Mol. Biol., 185, 755–767.
- Kittell, B., L. ve Helinski, D., R., 1992. Plasmid incompatibility and replication control, (ed.), Bacterial conjugation. Plenum Press, New York.
- Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations, Trends Mol. Med., 8, 257–260.

- Kobayashi, H., Kuwae, A., Nakamura, A. ve Hoshino, T., 2005. Isolation of a low-molecular-weight, multicopy plasmid, pNHK101, from *Thermus* sp. TK10 and its use as an expression vector for *T. thermophilus* HB27, Plasmid, 54, 70-79.
- Koepsel, R., R., Murray, R., W., Rosenblum, W., D. ve Khan, S., A., 1985. Purification of pT181-encoded RepC protein required for the initiation of plasmid replication, J. Biol. Chem., 260, 8571–8577.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, Alkaliphilic and Cellulase Free Xylanases Production by Thermoactinomyces thalophilus Subgroup C, Enzyme Microb. Technol., 28, 606–610.
- Kornberg, A. ve Baker, T., 1992. DNA replication, University Science Books Press (2nd edition), Sausalito, California.
- Koyama, Y., Arikawa, Y. ve Furukawa, K., 1990. A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, FEMS Microbiol. Lett., 60,97–101.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. ve Furukawa, K., 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp., J. Bacteriol., 166, 338–340.
- Kulkarni, R., S. ve Kanekar, P., P., 1988. Effects of some curing agents on phenotypic stability in *Pseudomonas putida* degrading e-caprolactam, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14, 255-257.
- Kumar, H., D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology (Second Revised), Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Laemli, U., K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of the Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lasa, I., de Grado, M., de Pedro, M., A. ve Berenguer, J., 1992. Development of *Thermus-Escherichia* shuttle vectors and their use for the expression in *T. thermophilus* of the *celA* gene from *C. thermocellum*, J. Bacteriol. 20,6424-6431.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S., G. ve Hwang, S., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*, Journal of Biotechnology, 123, 273–280.
- Liu, L., Q., Liu, L., Anderson, W., F., Beart, R., W., Gordon, E., M. ve Hall, F., L., 2000. Incorporation of tumor vasculature targeting motifs into moloney murine leukemia virus Env escort proteins enhances retrovirus binding and transduction of human endothelial cells, Journal Of Virology, 72, 5320-5328.
- Luria, S., 1984. A slot Machine, A Broken Test Tube Harpers Colins Publishers (1st Edition), Colophon Inc., USA.

- McDowell, N., 2003. New cancer case halts US gene therapy trials, New Scientist. Mol. Biol., 57, 145–186.
- Meijer, W., J., J., de Boer A., J., van Tongeren S., Venema G., ve Bron S. 1995. Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon, Nucleic Acids Res., 23, 3214–3223.
- Miao, D., M., Honda, Y., Tanaka, K., Higashi, A., Nakamura, T., Taguchi, Y., Sakai, H., Komano, T. ve Bagdasarian, M. 1993. A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host-range plasmid RSF1010, Nucleic Acids Res., 21, 4900–4903.
- Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A. ve Berenguer, J., 2005. High-Level Overproduction of His-Tagged Tth DNA Polymerase in *Thermus thermophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 71, 591–593.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F. ve Berenguer, J., 2003. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase, Plasmid, 49, 2-8.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based Strategies for Protein Thermostabilization, Trends Biotechnol., 11, 88–95.
- Munster, M., J., Munster, A., P. ve Sharp R., J., 1985. Incidence of Plasmids in *Thermus* spp. Isolated in Yellowstone National Park, Appl. Environ Microbiol. 50,1325–1327.
- Ohtani, N., Tomita, M. ve Itaya, M., 2012. The third plasmid pVV8 from *Thermus thermophilus* HB8: isolation, characterization, and sequence determination, Extremophiles. 16, 237-244.
- Parks, C., L., Picker, L., J. ve King, C., R., 2013. Development of replication-competent viral vectors for HIV vaccine delivery, Curr Opin. HIV AIDS, 8, 402-11.
- Primrose, S.,B., Derbyshire, P., Jones, I., M., Robinson, A. ve Ellwood, D., C., 1984. The application of continuous culture to the study of plasmid stability. In: Dea A., C., R., D., Ellwood C., Evans C., G., T., (eds.), Continuous Culture 8. Society of Chemical Industry/Ellis Horwood Limited, West Sussex, England.
- Primrose, S., B. ve Twyman, R., M., 2006. Principles of Gene Manipulations and Genomics (Seventh Edition), Blackwell Publishing, Australia.
- Pritchard, R., H., 1978. Control of DNA replication in bacteria, p. 1–22. In I. Molineux and M. Kohiyama (ed.), DNA synthesis: present and future, Plenum Press, New York.
- Projan, S., J. ve Novick R., P., 1988. Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids, Plasmid, 19, 203–221.

- Projan, S., J., Carleton, S. ve Novick, R., P., 1983. Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry, Plasmid, 9, 182– 190.
- Rasmussen, R., 2001. In: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Eds.), Quantification on the LightCycler, Springer-Verlag, Berlin.
- Reese, M., G., 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome, Comput Chem 26(1), 51-6.
- Riele, H., Michel, B. ve Ehrlich, S., D., 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2541–2545.
- Rodríguez-Lázaro, D., 2013. Real-time PCR in Food Science, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Ruan, L. ve Xu, X., 2007. Sequence analysis and characterizations of two novel plasmids isolated from *Thermus* sp. 4C, Plasmid, 58, 84–87
- Rubin, S., J. ve Rosenblum, E., D., 1971. Effects of Ethidium Bromide on Growth and on Loss of the Penicillinase Plasmid of *Staphylococcus aureus*, Journal Of Bacteriology, 108, 1200-1204.
- Sabato, D., Nucci, R., Rossi, M., Gorczynski, I., Gorczynski, Z. ve Lakowicz, J., 1999. The beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C, Biophysical Chemistry, 81, 23-31.
- Sakai, H. ve Komano, T., 1996. DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria, Biosci. Biotechnol. Biochem., 60, 377–382.
- Sambrook, J., Fritsch, E. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. ve Otto, S., 1991. Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins, Nucleic Acids Res., 19, 1203–1211.
- Schrempf, H., Bujard, H., Hopwood, D., A. ve Goebel, W., 1975. Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor* A3, J. Bacteriol., 121, 416–421.
- Sheng-Fen Chu, S., F., Shu, H., Y., Lin, L., C., Chen, M., Y., Tsay, S., S. ve Lin, G., H., 2006. Characterization of a rolling-circle replication plasmid from *Thermus aquaticus* NTU103, Plasmid, 56, 46-52.
- Somkuti, G., A. ve Steinberg, D., H., 1986. General method for plasmid DNA isolation from thermophilic lactic acid bacteria, Journal of Biotechnology, 3, 323-332

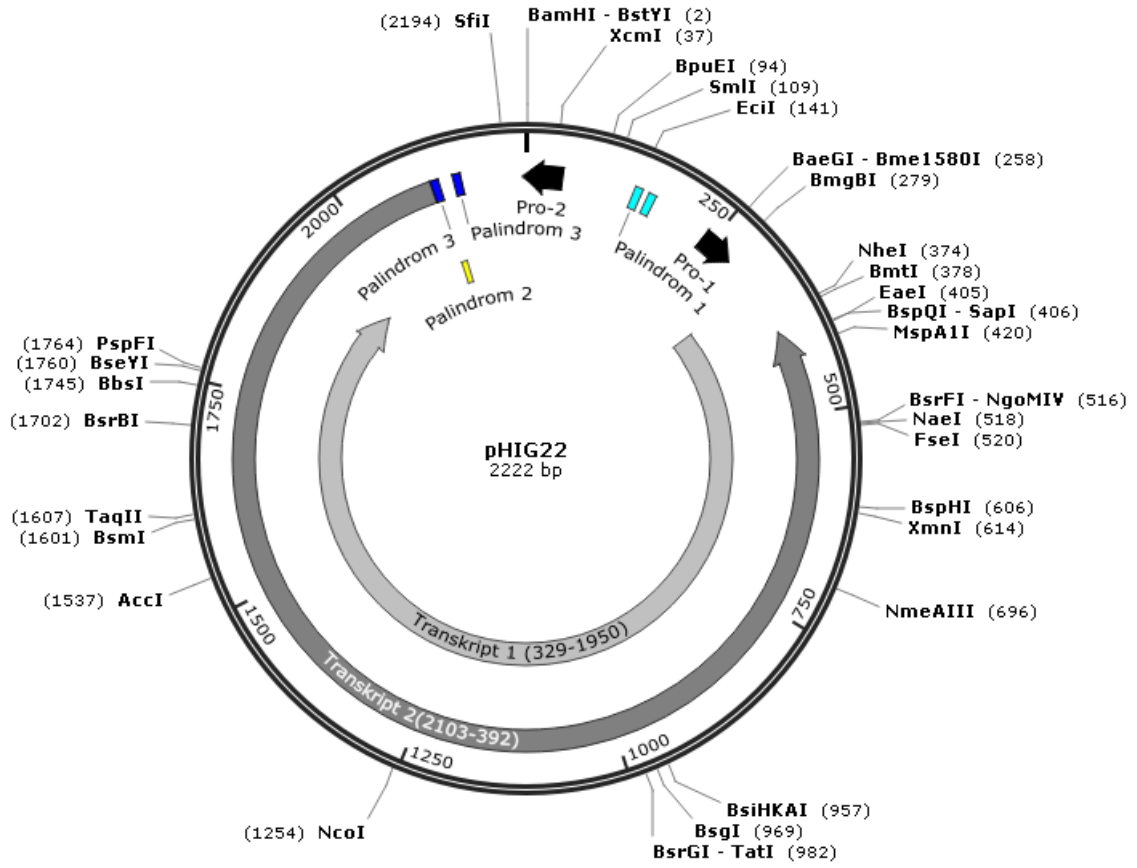
- Stenzel, T., T., MacAllister, T. ve Bastia, D., 1991. Cooperativity at a distance promoted by the combined action of two replication initiator proteins and a DNA bending protein at the replication origin of pSC101. Genes Dev., 5, 1453–1463.
- Stiffler, P., W., Sweney, H., M. ve Cohen, S., 1974. Cotransduction of plasmids mediating resistance to tetracycline and chloramphenicol in *Staphylococcus aureus*, Journal of Bacteriology, 120, 934-944.
- Takayama, G., Kosuge, T., Maseda, H., Nakamura, A. ve Hoshino, T. 2004. Nucleotide sequence of the cryptic plasmid pTT8 from *Thermus thermophilus* HB8 and isolation and characterization of its high-copy-number mutant, Plasmid, 51, 227-237.
- Takechi, S., Yasueda, H. ve Itoh, T., 1994. Control of ColE2 plasmid replication: regulation of Rep expression by a plasmid-coded antisense RNA, Mol. Gen. Genet., 244, 49–56.
- Thomas, C., M., 1988. Recent studies on the control of plasmid replication, Biochim. Biophys. Acta, 949, 253–263.
- Tomizawa, J., 1975. Two distinct mechanisms of synthesis of DNA fragments on colicin E1 plasmid DNA, Nature, 257, 253–254.
- Tomizawa, J. ve Itoh, T., 1981. Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript, Proc Natl Acad Sci USA, 78, 6096-6100.
- Tomizawa, J., Sakakibara, Y. ve Kakefuda, T., 1975. Replication of colicin E1 plasmid DNA added to cell extracts, Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 1050–1054.
- Twig, A., J. ve Sherratt, D., 1980. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1, Nature, 283, 216–218.
- Twyman, R., M., 1998. Advanced Molecular Biology (First Edition), BIOS Scientific Publishers Limited, UK.
- URL-1, www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm. 20 Ekim 2013.
- URL-2, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>. 20 Ekim 2013.
- URL-3, http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html. 12 Mayıs 2013.
- URL-4, <http://www.genome.jp/tools/motif>. 24 Mayıs 2013.
- URL-5, <http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/mcast.cgi>. 10 Kasım 2013.
- URL-6, <http://cmgm.stanford.edu/classes/genefind>. 10 Kasım 2013.
- URL-7, <http://molbiol-tools.ca>. 24 Mayıs 2014.

- URL-8, http://molbiol-tools.ca/Repeats_secondary_structure_Tm.htm. 24 Mayıs 2014.
- URL-9, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar>. 24 Mayıs 2014.
- URL-10, the web site <http://www.expasy.org/tools>. 22 Nisan 2015.
- URL-11, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. 22 Nisan 2015.
- URL-12, Beardsley, T. A tragic death clouds the future of an innovative treatment method. Scientific American, <http://www.scientificamerican.com/article/20/>, Son erişim tarihi: 15 Şubat 2015
- Vasquez, C., Gonzalez, B. ve Vicuña, R., 1984. Plasmids from thermophilic bacteria, Comp. Biochem. Physiol., 78, 507–514.
- Vasquez, C., Villanueva, J. ve Vicuña, R., 1983. Plasmid Curing in *Thermus thermophilus* and *Thermus flavus*, FEBS, 158, 339-342.
- Wagner, E., G., H. ve Simons, R., W., 1994. Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids, Annu. Rev. Microbiol., 48, 713–742.
- Wang, Z., Jin, L., Yuan, Z., Wegrzyn, G. ve Wegrzyn, A., 2009. Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as a criteria. Plasmid, 61, 47-51.
- Wang H., Liu, X., Feng, E., Zhu, L., Wang, D., Liao, X. ve Wang H., 2011. Curing the Plasmid pXO2 from *Bacillus anthracis* A16 Using Plasmid Incompatibility, Curr. Microbiol., 62,703-709.
- Warnock, J., N., Daigre, C. ve Al-Rubeai, M., 2011. Introduction to viral vectors, Methods Mol Biol., 737, 1-25.
- Wayne, J. ve Xu, S., 1997. Identification of a thermophilic plasmid origin and its cloning within a new *Thermus-E. coli* shuttle vector, Gene, 185, 321-328.
- Weisblum, B., Graham, M., Y., Gryczan, T. ve Dubnau, D., 1979. Plasmid copy number control: isolation and characterization of high-copy-number mutants of plasmid pE194, Journal of Bacteriology, 137, 635–643.
- Werbowy, K., Cieśliński, H. ve Kur, J., 2009. Characterization of a cryptic plasmid pSFKW33 from *Shewanella* sp. 33B, Plasmid, 62, 44-49.
- Williams, R., A., D., Simith, K., E., Welch, S., G., Micallef, J. ve Sharp, R., J., 1995. DNA relatednes of *Thermus* suşs, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori), International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 495-499.
- Woelker, B. ve Messer, W., 1993. The structure of the initiation complex at the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res., 21, 5025–5033.

- Woese, C., R., Kandler, O. ve Wheelis, M., L., 1990. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4576–4579.
- Yu, J., S. ve Noll, K., M., 1997. Plasmid pRQ7 from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga* species strain RQ7 replicates by the rolling-circle mechanism, J. Bacteriol., 179, 7161–7164.
- Zavitz, K., H. ve Marians, K., J., 1991. Dissecting the functional role of PriA protein-catalyzed primosome assembly in *Escherichia coli* DNA replication. Mol. Microbiol., 5, 2869–2873.
- Zerre, F., 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. PCR, Meth. Appl., 2, 1–9.
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovick, D., Hain, J., Lanzendo, M., ve Kristjansson, J., K., 1994. Screening for Sulfolobales, their plasmids and their viruses in Icelandic solfataras, Syst. Appl. Microbiol., 16, 609–628.

8. EKLER

Ek-1. pHIG22 plazmitinin haritası



Ek-2. pHIG22 plazmitinin tüm baz dizilimi

AGGATCCTCCCAGTCTATGGGCTCCAGCTCCACCGACGGAATGGGGCTAGAGCGAGCCTCTTCCCA
 GGCCCGCCTATCCCCCTCCCGTAACGCCTCCCAAAGGACACGCTCAAGCTCGCCACTCTCCAAAAA
 CACTCACCTCCTGGTGTATCCGCCAGGAGGTGGGAGCGTCCTCGGGTTAGGGCCAGCTTCTCTTCG
 TCTCTGCTTCCCCGCCCCCACGGCTAGGGGCCTCTTCTCACTCTCTTGCGCCGTGTGCCCAAACG
 GGGTAAGTACTCACGTCAGGAAAGCCCCGCCTGGAGCGCCAACTCCCGGCGGGCTTTTTCTTTGG
 GGGAATGGGACCCCCGTTAGGGGCCATGCTACTATGGTTCAGCCGCTAGCTTGCAACCACAACACCT
 AACCCAGACGGCCAGAAGAGCCAGCGGAAAGCCAGGCAGGAGCCTCATACATGGCGACCACGAAGA
 AGTTAGGCAGGCGGGAGGCCCTCCCATAGTCAAAGACCAGCCAGAACACCAAGGCCGGCCTATTAG
 CGAAGCGGATGCGGAGAGCCCGCACCCGAAGCCGCAAGGCGAAGTCAGAGCCCTCCCAACCCACCA
 ACTCCCCAACCTCATGAAGGACTTCCCTAGGAACCTCCAGGAAGGAGCAGGCTCAACCTCAGCCC
 CCAGGATAGTGCCGAGACGGCGAGCGTACCGAGCCCAGAAAAAGAGGCCCTGAGGCACCTCCCCC
 ACGCCTCTTCAACCGCCTCAGAGATGCGCCCGATAACCTGAAGCGCCAGACCCTTAGCCTCTTCCG
 CAAAGTCCATGCCTATCACCTCTCTTCTCTTCTTCTCCCTCTTCTCCACGCCAAGCCCTAGCATGAG
 AAGCCGACACCTGATGACGGGATGGAGCCCGGAGCCCGGAGCCATCCCGCCCAAGAGTGTAGGCCCT
 GGGCGGGTCCCCGCCGTCAAGGGTGCAGAGACCCCTCCGGGGCGGGCCTCTCGCATGTACAAAC
 CCCGTCTCTGTCGCTCCGGAAAACGTGCGTGATGGGATGGCCCGCCCTCCGGGGCTAACGCCCT
 TGACGGCACCCCGCCCTAGCCAAGGCCTAGGCTTGGGGATGGCTCCGGGAAAATGCTCCAGGCTCA
 TCAACCACCCCATGCCCGCTTCTGCTAACCCAGTCCAGTATTCCCAAGACTACCGGGGTGAACCTA
 GGTAGCCAGTAGAAGCGCCCCACGAGAACGCCACGCTTCAGCCAGTCCCACACCCTCACCGCCTCC
 CATGGAAGGCGGGCCACCCGATCAGGCCCAACCACAAGCGGCACGGCCTCCTCCACCGCCCCCAGG
 TCCTCCAGACTCTCCACCTCCCGGTAATCGCCAGGTACATATTGCCCCGAGCGAAGGCCATTTTG
 GCGTAGAGGAGGAGAAGCGAAGGGGTATCCAGGAGGAACCCACATTATGCCGCACTTGACGGGCA
 TACGCCCGCCAGACACCCGCCACGCCATAAGCACGCCCCAGTTTCCCGAAAAGGGCAAGTGCTTT
 TGCTCAGGCTTAGAGGCGTAGACCCTGGAATAGCGGAAGTCTCTCTCCCGCAGCGCCTCAATGCGG
 GTCTTGACCGAATGCCCCCTAACGCCCGTTGCCACGCTTCTTCTATCCAGTCAGCCCAATCACGC
 CAGGCCTCAGCATCAAGGTCCCCAATCCTAGCCAGGATATGCAAATGCGGAGCGGCAGGAGAACGA
 TTCTGTTGAAACTCTAAGAAGAAGAGATAGGCCAGTCTTCCCCCAGCGACTCAGACGCATGCGA
 AACGCATGCAGGAACCTATCCAGCGCACCCCGCCAGCGAGATAAGCGAGCCTCATCATCCGGAAGC
 TCCTCCCAAGCCTCAGGCGCAAGCGTCAGCGTGATGAGATGCGTAGGAGGAGGGGCATCAAGCTCC
 TCCAGGGTCAGCGTCAGCCTAACCAACCGCCTAATAGACCCCGCCAGCGTACACCTCTCCCTAGAC
 CCAGGCACCGGAGGAGGAGACTGAGGCTTCCCAAGGGGACTCAGGTGAGTCCCCCAAGGGTAAACC
 CTTACACGCCACCTGGGTTTGTGCGACTTATGCACCGAAAAGAGACAAGGACC GCCCCCGCGGGGGG
 GGCGGGCCTTCAGGCCCGGCCCCCCCGGTCCAGTCCCGAGCCTTCCCCTTGCGAGATACCTCAGG
 CGCAGATAGGCCCGAGAGGCCTCCTCAGCAAACCGCCGACGAGC

**Bam*HI noktası plazmitin “0” noktası olarak kabul edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

24.05.1982 tarihinde Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladı. 2008 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Şubat 2009'da K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2011 yılında '*Thermus* sp. K6' dan yeni, kriptik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu' tezi ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora programına başladı. Ocak 2009'dan itibaren Artvin Çoruh Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.