

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ANOXYBACILLUS GONENSIS 05S15'TEN İZOLE EDİLEN YENİ, KÜÇÜK VE HALKASAL BİR
PLAZMİTİN (pAnox1) KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze ÇUBUKCI

HAZİRAN 2023
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***ANOXYBACILLUS GONENSIS* 05S15'TEN İZOLE EDİLEN YENİ, KÜÇÜK VE HALKASAL BİR PLAZMİTİN (pAnox1) KARAKTERİZASYONU**

Gamze ÇUBUKCI

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 / 05 / 2023

Tezin Savunma Tarihi : 12 / 06 / 2023

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER
ORCID : - - -

Trabzon 2023

ÖNSÖZ

Anoxybacillus gonensis 05S15'ten izole edilen yeni, küçük ve halkasal bir plazmitin (pAnox1) karakterizasyonu adlı bu çalışma adlı bu çalışma TÜBİTAK 120Z949 numaralı araştırma projesinden sağlanan destekle Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasının belirlenmesinde ve planlanmasında bana yol gösteren, emeklerini esirgemeyen, beni destekleyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımda laboratuvarından ve değerli bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya, benden yardımlarını esirgemeyen sevgili hocalarım Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Fulya AY ŞAL'a, sorunlarıma hemen çözüm bulan ve her zaman destekçim olan, tezimi yazmamda bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK'a, laboratuvara adım attığımdan beri sabırla ve özveri ile her zaman yardıma yetişen Arş. Gör. Esmâ CEYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda yardımcı olan değerli takım arkadaşım Hatice AYYILDIZ'a, manevi desteklerinden dolayı her zaman yanımda olan Arş. Gör. Betül ALTUN, Arş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU'na ve değerli diğer moleküler laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim. Çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan TÜBİTAK (120Z949)'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatım boyunca her stresli anımda ve adımda beni cesaretlendiren, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, onların kızı olmaktan gurur duyduğum canım aileme sonsuz teşekkürler.

Gamze ÇUBUKCI
Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anoxybacillus gonensis* 05S15'ten izole edilen yeni, küçük ve halkasal bir plazmitin (pAnox1) karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER'in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 12/06/2023

Gamze ÇUBUKCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş	1
1.2. Termofilik Mikroorganizmalar	1
1.2.1. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojide Kullanımı	3
1.2.2. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	3
1.3. Plazmitler	5
1.3.1 Plazmitlerin Genel Özellikleri	5
1.3.2. Plazmitlerin Çeşitleri ve Sınıflandırılması.....	7
1.3.3. Plazmitlerin Replikasyon Mekanizmaları	9
1.3.4. Plazmitlerin Hücrelerde Paylaşımı.....	13
1.3.5. Plazmitlerde Kopya Sayısı ve Kontrolü	13
1.3.6. Plazmitlerde Uyuşmazlık ve Konak Seçiciliği	16
1.3.7. Biyoteknolojide Plazmit Kullanımı.....	18
1.3.7.1. Ticari Vektör Olarak Kullanılan Plazmitler	19
1.3.8. <i>Anoxybacillus</i> Cinsi Plazmitler	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	22
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	23

2.1.3.	Kullanılan Enzimler ve Tamponlar	24
2.1.4.	Kullanılan Kitler.....	25
2.1.5.	Kullanılan Mikroorganizmalar ve Vektörler	25
2.1.6.	Kullanılan Besiyerleri, İçeriği ve Hazırlanışı	26
2.1.7.	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	26
2.1.8.	Kullanılan Biyoinformatik Araçlar	29
2.2.	Metot.....	30
2.2.1	İzolatın Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi İçin Plazmit DNA İzolasyonu	30
2.2.2	pAnox1'in Baz Dizisi İçin Restriksiyon Analizi	31
2.2.2.1	pAnox1 Fragmentlerinin pUC18 Vektörüne Klonlanması.....	31
2.2.3.	<i>E.coli</i> JM101'e Transformasyon.....	32
2.2.4.	Ters (invers) PCR ile pAnox1'in Tüm Dizininin Belirlenmesi ve Klonlanması	32
2.2.4.1.	PCR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması	34
2.2.4.2.	pAnox1'in Tüm Dizininin Elde Edilmesi.....	34
2.2.5.	Biyoinformatik Analizler	34
2.2.6.	Plazmit Stabilité Testi.....	35
2.2.7.	Replikasyon Modunun Belirlenmesi	35
2.2.7.1.	TEM (Transmisyon Elektron Mikroskopisi) Analizi ile Replikasyon Modunun Belirlenmesi	35
2.2.7.2.	Southern Hibridizasyon ile Replikasyon Modunun Belirlenmesi.....	37
2.2.8.	Plazmit Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi.....	41
2.2.8.1.	Total RNA İzolasyonu.....	44
2.2.8.2.	cDNA'nın Sentezi	45
2.2.9.	pAnox1'in Transkriptlerinin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi	49
2.2.9.1.	RACE Tekniği ile 5' Uç Belirleme	49
2.2.9.2.	LACE Tekniği ile 3' Uç Belirleme	53
2.2.10.	ORF'lerin Transkript Miktarlarının Belirlenmesi ve mRNA Stabilités.....	56
3.	BULGULAR.....	59
3.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> 05S15 Bakterisinin Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi	59

3.2.	pAnox1' in Restriksiyon Analizi	59
3.3.	pAnox1'in DNA Baz Dizininin Belirlenmesi.....	60
3.4.	pAnox1'in Biyoinformatik Analizi	61
3.5.	Plazmit Stabilite Testi.....	62
3.6.	Replikasyon Modunun Belirlenmesi	64
3.7.	Plazmit Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi.....	67
3.8.	pAnox1'in Transkriptlerinin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi	69
3.9.	ORF'lerin Transkript Miktarlarının Belirlenmesi ve mRNA Stabilitesi.....	70
4.	TARTIŞMA	75
5.	SONUÇLAR	82
6.	ÖNERİLER.....	84
7.	KAYNAKLAR	85
8.	EKLER	93
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ANOXYBACILLUS GONENSIS 05S15'TEN İZOLE EDİLEN YENİ, KÜÇÜK VE HALKASAL BİR PLAZMİTİN (pAnox1) KARAKTERİZASYONU

Gamze ÇUBUKCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER

2023, 93 Sayfa, 1 Ek

Bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinden izole edilen ve tanımlanan, 1592 bp uzunluğunda, kriptik, küçük genomlu, çift zincirli, % 40,01 GC içerikli yeni bir plazmit (pAnox1) karakterize edildi.

pAnox1 nükleotit dizini ile yapılan BLAST benzerlik araştırmalarına göre diğer plazmitlere önemli ölçüde benzemediği ama replikasyondan sorumlu proteinlerinde benzer bölgelere sahip olduğu bulundu. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda; plazmit genomu üzerinde muhtemel 5 ORF bölgesi belirlendi. Bu ORF'lerden üçü bir zincir, diğer ikisi ise karşı zincir üzerinde bulunmaktadır ve her iki zincirde üç palindrom ve iki iteron dizi tespit edildi. Southern hibridizasyon çalışması yapılarak plazmitin RC replikasyon moduna sahip olduğu belirlendi. Yapılan çalışma sonucunda pAnox1 plazmitinin 3 adet transkript kodladığı ve buna göre de aynı oryantasyonda bulunan ORF-1 ve ORF-3, karşı oryantasyonda bulunan ORF-5'in transkript kodladığı sonucu elde edildi. RACE ve LACE analizleri sonucunda, pAnox1 tarafından kodlanan ORF1 transkriptin 903 bp, ORF3 transkriptin 499 bp, ORF5 transkriptin 211 bp kodladığı ortaya çıkarıldı.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus gonensis* 05S15, pAnox1 plazmiti, kriptik plazmit, RC

Master Thesis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF A NOVEL SMALL AND CIRCULAR PLASMID (pAnox1) ISOLATED FROM *ANOXYBACILLUS GONENSIS* 05S15

Gamze ÇUBUKCI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program

Supervisor: Doç.Dr. Halil İbrahim GÜLER
2023, 93 Pages, 1 Appendix Pages

In this study, a small, novel, cryptic, double stranded plasmid which has 1592 bp in long and with a total G + C content of 40,01% from *Anoxybacillus gonensis* 05S15 was characterized.

According to BLAST similarity searches performed with the nucleotide sequence of pAnox1, it was found that it did not show significant similarity to other plasmids, but it had similar regions to replication proteins responsible for replication. Five ORF regions were predicted on the plasmid genome by bioinformatic analysis. Three of these ORFs are on one strand and the other two are on the opposite strand and three palindromes and two iterons were detected in both strands. The plasmid was determined to have the RC replication mode by performing a Southern hybridization study. As a result of the study, it was concluded that the pAnox1 plasmid encodes 3 transcripts and accordingly ORF-1 and ORF-3 in the same orientation and ORF-5 in the opposite orientation encodes the transcript. Based on RACE and LACE analyzes, it was revealed that the ORF1 transcript encoded by pAnox1 encoded 903 bp, the ORF3 transcript 499 bp, and the ORF5 transcript 211 bp.

Key Words: *Anoxybacillus gonensis* 05S15, plasmid pAnox1, cryptic plasmid, RC

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Plazmit DNA'sının bakteri hücresi içerisinde görünümü	5
Şekil 2. Plazmidlerin iki şekilde aktarım görünümü	6
Şekil 3. Konjugasyonel DNA transferi	7
Şekil 4. pAnox1 haritası üzerinde primerlerin bağlandığı bölgeler	43
Şekil 5. Snapgene programında çizilen pAnox1 haritasının üzerinde tüm çalışmalarda kullanılan primerlerin bağlandığı bölgelerin gösterimi	47
Şekil 6. RACE tekniğinin şematik gösterimi	50
Şekil 7. LACE tekniğinin şematik gösterimi	53
Şekil 8. <i>Anoxybacillus gonensis</i> 05S15 bakterisinden plazmit izolasyonu	59
Şekil 9. pAnox1'in RE'ler ile kesimi	60
Şekil 10. Snapgene programında çizilen pAnox1 plazmitinin haritası	62
Şekil 11. Plazmit izolasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi	63
Şekil 12. pAnox1 plazmitinin kesilmemiş formunun TEM görüntüleri	64
Şekil 13. pAnox1 plazmitinin <i>NdeI</i> restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş formunun TEM görüntüleri	65
Şekil 14. pAnox1 plazmitinin <i>HindIII</i> restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş formunun TEM görüntüsü	65
Şekil 15. Southern hibridizasyon analiz sonuçları	67
Şekil 16. pAnox1 transkriptlerin cDNA'larının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen PCR sonuçları	68
Şekil 17. pAnox1 transkriptlerinin UTR bölgeleri ile beraber gösterimi	70
Şekil 18. qPCR çalışmasında elde edilen melting curve (erime eğrisi) analizi	71
Şekil 19. pAnox1 transkriptlerine ait Ct (Threshold Cycle) değerleri	72
Şekil 20. pAnox1 transkriptlerinin zamana bağlı değişimi	72
Şekil 21. Üç transkriptte ait dinamik degradasyon eğimleri	74

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Biyoteknolojide kullanılan bazı plazmitler ve özellikleri	15
Tablo 2. Vektör sistemlerinin karşılaştırılması.....	20
Tablo 3. <i>Anoxybacillus</i> cinsi plazmitler	21
Tablo 4. Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar.....	22
Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	23
Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan enzimler ve tamponlar	24
Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan kitler.....	25
Tablo 8. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve vektörler	25
Tablo 9. Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri, içeriği ve hazırlanışı.	26
Tablo 10. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	26
Tablo 11. pUC18 vektörüne ligasyon için gerekli olan şartlar.....	31
Tablo 12. Ters (invers) PCR için tasarlanan primerler	32
Tablo 13. Ters (invers) PCR için reaksiyon şartları	33
Tablo 14. Ters (invers) PCR protokolü	33
Tablo 15. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon şartları	34
Tablo 16. S1 Nükleaz kesim işlemi protokolü	38
Tablo 17. pAnox1 plazmit genomunda ORF3 bölgesinin PCR protokolü	39
Tablo 18. pAnox1 plazmiti transkriptlerinin belirlenebilmesi için dizayn edilen primerler ve özellikleri	42
Tablo 19. pAnox1 plazmitinin transkriptlerinin belirlenebilmesi için dizayn edilen primerler ve özellikleri.....	46
Tablo 20. cDNA Sentezi Bileşenleri-1.....	47
Tablo 21. cDNA Sentezi Bileşenleri- 2.....	48
Tablo 22. PCR Bileşenleri.....	49
Tablo 23. PCR Protokolü	49
Tablo 24. RACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri	50
Tablo 25. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-1.....	51
Tablo 26. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-2.....	51

Tablo 27. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-3.....	52
Tablo 28. RACE tekniğinde cDNA'dan PCR için protokol	52
Tablo 29. LACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri.....	54
Tablo 30. LACE tekniğinde kullanılan bileşenler-1	54
Tablo 31. LACE tekniğinde kullanılacak bileşenler-2.....	55
Tablo 32. LACE tekniğinde kullanılacak bileşenler-3.....	55
Tablo 33. LACE tekniğinde kullanılan PCR bileşenleri.....	56
Tablo 34. LACE tekniğinde kullanılan PCR protokolü	56
Tablo 35. pAnox1 plazmitinin transkriptleri için kullanılan primerler ve özellikleri.....	57
Tablo 36. Jenerasyon süresinin hesaplanması	62

SEMBOLLER DİZİNİ

Amp	: Ampisilin
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovine Serum Albumin
CaCl	: Kalsiyum klorür
Ct	: Thresold Cycle
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
ddH ₂ O	: Çift distile su
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
EM	: Elektron Mikroskobu
EtBr	: Ethidium Bromide
IPTG	: Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside
kb	: Kilo baz
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz
LB	: Lüria Bertani Broth
lt	: Litre
M	: Molar
MCS	: Multi-Cloning Site
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Elçi RNA
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit

ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomol
OD	: Optical Density
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
RC	: Rolling-circle
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
SDS	: Sodyum dedosilsülfat
SSC	: Saline-sodium citrate
sn	: Saniye
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: TrisHCl-EDTA
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
U	: Unit
UTR	: Untranslated Region
UV	: Ultra Violet
qPCR	: Quantitative polymerase chain reaction
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Derece
μg	: Mikro gram
μl	: Mikro litre
μM	: Mikro molar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda termofilik bakterilerin en çok dikkat çeken araştırma konularından biri olduğu gözlenmiştir. Bu durumun en önemli sebepleri ise hem temel bilimlerin gelişmesinde katkıda bulunması hem de endüstriyel olarak termofilik bakterilerin uygulamalarında sağladığı avantajlardır (Akhmaloka vd., 2006).

Küçük, çift sarmallı DNA molekülleri olan plazmitler, birçok bakteri hücresinde bulunduğu gibi bazı ökaryotik hücrelerde de bulunan ekstrakromozomal elementlerdir (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). Plazmitler, tüm bakterilerde bulunur. Ancak termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklarda yaşayan bakteri türü olduğundan dolayı, bunlardan plazmit izole etme işlemi diğer bakteri türlerine göre daha zordur. Bu zorluk, termofilik bakterilerin plazmitlerinin diğer bakteri türlerine oranla daha az sayıda izole edilmesine sebep olmuştur.

Yapılan bu çalışmada, *Anoxybacillus* cinsi bir plazmitin tanımlanması, karakterize edilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin ortaya çıkarılması sonucu elde edilecek bilimsel verilerle literatüre kuramsal ve metodolojik olarak katkılar sağlanması amaçlanmıştır.

1.2. Termofilik Mikroorganizmalar

Sıcaklık çevredeki mikroorganizmalar için önemli değişkenlerden biridir. Çevremizdeki organizmaların sınıflandırılması onların sıcaklıkla olan ilişkilerine bağlıdır. Mikroorganizmalar, uygun büyüme sıcaklıklarına göre 3 gruba ayrılır (Gomes ve Steiner, 2004). Bunlar psikrofiller (20 °C ve altındaki sıcaklıklarda), mezofiller (20 °C- 55 °C arası normal ortam sıcaklığında) ve termofiller (55 °C ve üzeri sıcaklıklarda) dir. Termofilik mikroorganizmaların ise üç farklı sıcaklık aralığında bulundukları (termofiller 35-70 °C, ekstrem termofiller 55-85 °C, hipertermofiller 75-113 °C) bilinmektedir (Baker vd., 2001).

Termofilik bakteriler çeşitli avantajlarından dolayı son zamanlarda en çok araştırılan konulardan biri haline gelmiştir. Termofilik organizmalar, yüksek sıcaklıklarda üreyebilen ve yaşayabilen mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar genellikle termofilik bakteriler ve arkealar olabilir. Proteinlerinin ve nükleik asitlerinin denatüre olmasının beklendiği yüksek sıcaklıklarda yaşamlarını devam ettirebildiklerinden, moleküler biyoloji çalışma

alanlarında dikkat çekmişlerdir (Zeikus, 1979; Brock, 1985; Weigel ve Ljungdahl, 1986). Termofilik bakteriler, genellikle mezofilik bakterilere göre daha yüksek sıcaklıklarda üreyebilirler.

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları oldukça geniştir. Termofilik mikroorganizmalar, genellikle sıcaklığı çok yüksek olan, volkanik ve jeotermal bölgeler, sıcak su kaynakları, kömür yığınları gibi doğal ve kendiliğinden ısınmış bölgelerdeki mikroorganizmaları kapsamaktadır (Stetter, 1996; Takami vd., 1997). Termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklı ortamlarda biyoteknolojik reaksiyonları hızlandırabilir ve bu nedenle endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılabilirler.

Termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklarda (41 ila 122 °C arasında) yaşayan mikroorganizmalardır. Mezofilik organizmalarla aynı substratları metabolize ederler ve benzer temel metabolik özellikleri vardır (Jaenicke ve Sterner, 2006). Yüksek sıcaklık hücre zarlarını parçaladığından dolayı normal enzimler için sorun teşkil etmektedir (Fan ve Evans, 2015). Fakat, termofilik mikroorganizmalardan izole edilen termostabil enzimler, daha yüksek sıcaklıklarda verimli çalışırlar. Bu enzimler oldukça spesifiktir ve birçok endüstriyel uygulamada kullanılırlar. Termofilik bakteriler, çevreye son derece zararı olan kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasında görev alırlar. Bunlara örnek olarak nükleer atıklar (Bassil, 2015), organik kirleticiler (Le Borgne, 2008), petrol kirleticileri (Van Hamme vd., 2003; Fathepure, 2014), endüstriyel atıklar (Fathepure, 2014), kazılan kirli toprak ve toksik hidrokarbonlar (Perfumo vd., 2006; Xu vd., 2018) verilebilir.

Termofilik mikroorganizmalar, endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda çeşitli amaçlar için kullanılabilirler. Örneğin, termofilik bakteriler lignoselülozik biyokütleyi parçalayarak biyoyakıt üretiminde kullanılabilirler (Jiang vd., 2017). Ayrıca, termofilik mikroorganizmaların kullanımı, gıda endüstrisinde fermentasyon sürecine yardımcı olmak, çeşitli ilaçların üretiminde ve su arıtma işlemlerinde etkin bir şekilde kullanılmak gibi alanlarda da yaygındır. Ayrıca, termofilik mikroorganizmaların kullanıldığı pazar her geçen gün büyümektedir. Bu da termofilik mikroorganizmaların endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda giderek daha fazla kullanılmaya başladığı anlamına gelmektedir.

1.2.1. Termofilik Bakterilerin Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından önemli faydalar sağlamaktadır (Brock, 1986). Termofilik bakteriler, sıcak ortamlarda, yüksek sıcaklıklarda, büyüyen ve üreyebilen bakterilerdir. Bu bakterilerin biyoteknolojik olarak kullanımı, çeşitli endüstriyel proseslerde, sıcak ortamların gerektirdiği koşullarda bile üretim yapılmasını sağlar. Örneğin, termofilik bakteriler kullanılarak sıcak ortamlarda çeşitli ürünlerin fermentasyonu yapılabilir. Bu ürünler arasında peynir, yoğurt, et ve süt ürünleri, alkolik içkiler, hayvansal ve bitkisel atıkların anaerobik çürütülmesi yer alır (Akkaya ve Kıvanç, 2008). Ayrıca, termofilik bakterilerin çeşitli enzimleri bulunur ve bu enzimler yüksek sıcaklıklarda etkin bir şekilde çalışabilir. Bu nedenle, termofilik bakterilerin enzimleri de endüstriyel proseslerde kullanılabilir. Örneğin, sıcak ortamlarda biyokütle parçalama işlemlerinde ve biyogübre üretiminde kullanılabilirler (Güven, 2011).

Termofilik bakterilerin bir diğer önemli uygulaması da mikrobiyal ortamların üretilmesidir. Mikrobiyal ortam, bakteri yetiştirmek için kullanılan kültür ortamıdır. Bu da gerektiğinde sıcak ortamlarda bakterilerin büyümesi için mikrobiyal ortamların üretilmesini mümkün kılar (Güven, 2011). Özetle, termofilik bakterilerin biyoteknolojideki kullanımları çeşitlidir ve sıcak ortamlarda çeşitli ürünlerin üretilmesini sağlar. Bu, endüstriyel proseslerde verimliliği artırır ve gerektiğinde sıcak ortamlarda bakterilerin büyümesi için mikrobiyal ortam üretimine izin verir.

Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretimi gerçekleştirilebilir, fermentasyon yapabilen bu organizmalar genetik manipülasyonlar için kullanılabilir ve ayrıca termofil enzimler endüstride potansiyel olarak kullanılabilir. Termofillerin en önemli özelliği, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardakinden daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimler üretebilmeleridir. Bu enzimler ayrıca normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklı olduklarından dolayı bunlardan elde edilmiş olan ürünler diğerlerine göre daha uzun ömürlü olurlar (Brock, 1986).

1.2.2. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus, termofilik, Gram-pozitif, endospor oluşturabilen, çubuk şeklinde ve hareketli bakterilerin bir cinsidir. Bu bakteriler, termostabil gen ürünleri için sürekli artan endüstriyel ilgi ile jeotermal çevrelerde yaygın olarak bulunan ve kolayca izole edilen

bakterilerdir. Bu nedenle, bu bakteri cinsi içindeki filogenetik ilişkilerin ve çeşitliliğin araştırılması sadece taksonomik bir ilgi değil, aynı zamanda biyoteknolojik potansiyelinin tam olarak kullanılması için bir gerekliliktir (İnan vd., 2012).

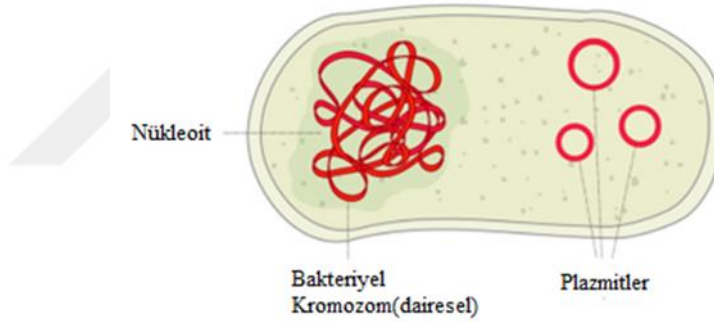
Anoxybacillus, 65 ° C'ye kadar yüksek sıcaklıklarda büyüebilir ve toprak, kaplıcalar ve jeotermal ortamlar dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda bulunur (Beldüz vd., 2015). *Anoxybacillus* yeni keşfedilmiş bir cins olduğu için spesifik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, *Anoxybacillus* cinsindeki türlerin, bakterilerin zorlu koşullarda hayatta kalmasına izin veren dirençli yapılar olan endosporlar ürettiği bilinmektedir. Ayrıca büyüme için karbonhidratlar, organik asitler ve amino asitler dahil olmak üzere çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmektedirler (Bekler, 2016). *Anoxybacillus* sp. 05S15 ve cins içindeki diğer türler, yüksek sıcaklıklarda büyüme ve çeşitli karbon kaynakları kullanma yetenekleri nedeniyle potansiyel endüstriyel uygulamalara sahiptirler. Enzimlerin ve diğer biyomoleküllerin üretimi gibi biyoteknolojik işlemlerde kullanılabilirler.

Anoxybacillus türleri tarafından kodlanan yeni gen ve proteinler hem endüstriyel uygulamalara hem de ekonomiye değer katma potansiyeline sahiptir. Bu açıdan bakıldığında, konakçı hücrenin ekonomik avantajları ortaya çıkmaktadır. Özellikle, bu termofilik bakterilerin plazmitleri hem kendi proteinlerini kodlama hem de termofilik genlerin (vektör) aşırı ekspresyonu için bir araç görevi görme yetenekleri nedeniyle özel bir öneme sahiptir (Goh vd, 2013). Endüstriyel öneme sahip birçok termostabil proteinin üretimi, bu termofilik bakterilerden plazmitlerin izolasyonu yoluyla gerçekleştirilebilir. Bu nedenle *Anoxybacillus* cinsinde tanımlanan plazmitler ve bu plazmitlerden oluşturulan mekik vektörleri (iki replikasyon orijinli vektörler) büyük önem taşımaktadır. Diğer termofilik organizmalarda kullanılan ekspresyon vektörlerinin sayısı sınırlı olduğundan; bu vektörler, izole edildikleri konakçıya özgü belirli bir *ori* bölgesine sahip olduğundan (sadece o konakçıda çoğalmalarına izin verir); diğer termofilik organizmalarda kullanılamazlar.

1.3. Plazmitler

1.3.1. Plazmitlerin Genel Özellikleri

Nadiren de olsa RNA şeklinde olabilen plazmitler, hücre içerisinde yer alan ve hücresel işlemleri kontrol eden kromozomal DNA'dan bağımsız (otonom) bir şekilde kendisini çoğaltabilen DNA parçalarıdır. Plazmitler, hücre olarak belirtilemezler ve sadece hücrenin bir parçası olarak kabul edilirler. Plazmid DNA'ları, genellikle hücre için önemli işlevlere ait genleri taşımazlar. Bu yüzden plazmidlerini kaybeden hücrelerin çoğalma kabiliyetinde herhangi bir değişiklik oluşmaz. Plazmidler, esas olarak, bakteriye ekstra fonksiyonlar sağlayarak kromozomal DNA'ya destek genetik kaynaklar olarak ifade edilmektedir. Virüslerin tersine plazmidler hücre dışı bir yapıya sahip değildir ve hücrelerin içinde yalnızca nükleik asit yapısında yer almaktadırlar (Clarck, 2010).

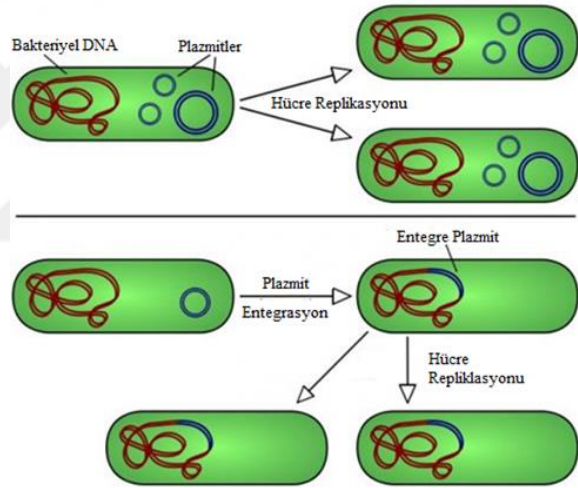


Şekil 1. Plazmit DNA'sının bakteri hücresinde görünümü (URL-1)

Plazmidler çift zincir DNA'dan meydana gelmektedirler. Büyük çoğunluğu sirküler yapıdadır, fakat lineer yapılarda da ifade edilmektedirler. Plazmidlerin, büyüklükleri 1 kb'dan 1000 kb üzerine kadar değişim göstermektedirler.

Plazmitler, hücrelerin içinde bulunan, genetik bilgi taşıyan ve protein kodlayan yapılardır. Plazmitler, hücrenin büyümesi ve bölünmesi sırasında rol oynayan kromozomlardan farklıdır, çünkü plazmitler hücreler arasında geçiş yapabilir ve bir hücrede belirli bir zaman sonra bulunmayabilirler. Plazmitler, hücrelerin içinde bulunan nükleik asit molekülleri olarak ifade edilen replikonları taşırlar ve bu nedenle kendi başlarına replike olabilirler. Replikon, bir molekülün (örneğin, DNA veya RNA) kendisini çoğaltan veya çoğaltmaya yönelik bir özelliği olan bir molekül için kullanılan bir terimdir. Kromozomlar,

plazmitler, virüs genomları ve viroidler de bu özelliği taşıdıkları için replikon olarak adlandırılırlar. Virüsler ve plazmitler, hücreyi kullanarak kendilerine ihtiyaç duydukları çoğu enzimi, hammaddeyi ve enerjiyi sağlar (Clarck, 2010). Bu, onların konak hücreyi kullanan replikonlar olarak karşımıza çıktığı anlamına gelir. Ancak, bu moleküllerin hepsi farklı şekillerde replike olur ve farklı yöntemlerle kendilerine ihtiyaç duydukları öğeleri sağlarlar. Örneğin, kromozomlar hücre içinde bulunan organeller tarafından çoğaltılır, ancak virüsler hücre dışında bulunan ve hücreleri enfekte eden mikroorganizmalardır ve kendilerine ihtiyaç duydukları öğeleri hücrelerden sağlarlar. Plazmitler ise hücreler içinde bulunan, ancak hücrelerin DNA'sı olmayan ve sadece kendilerine ait genetik materyallere sahip maddelerdir ve kendilerine ihtiyaç duydukları öğeleri hücreden sağlarlar. Viroidler ise DNA veya RNA'dan oluşan, ancak kendi kendine replike olan ve hiçbir protein üretmeyen çok küçük moleküllerdir.



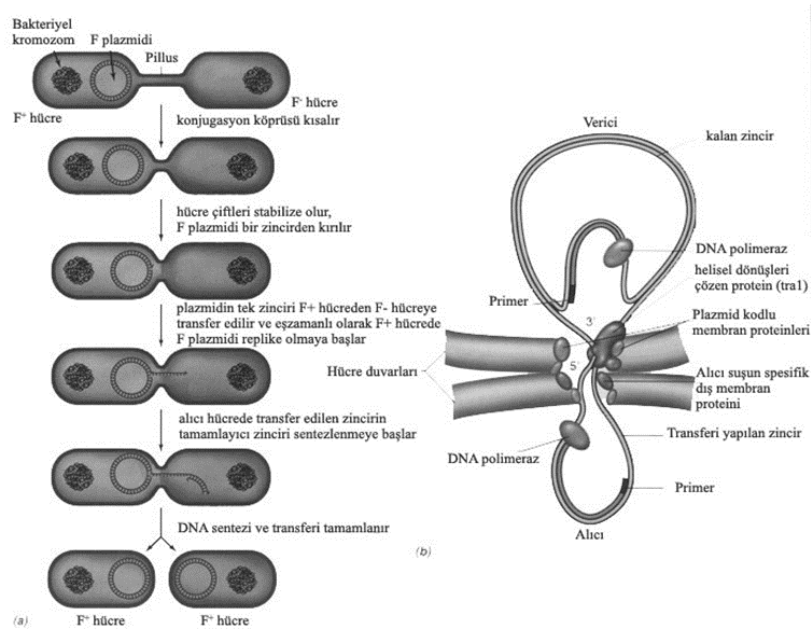
Şekil 2. Plazmidlerin iki şekilde aktarım görünümü (URL-2)

Plazmitlerin replike olmaları, konak hücreyle aynı zamanda gerçekleşir. Konak hücre bölündüğünde plazmit de bölünürerek yavru hücrelere plazmitin bir kopyası alınır. Bu nedenle, plazmitler genellikle hücrelerine zarar vermezler ve hücrelerinin bölünme sırasında yavru hücrelerine aynı şekilde aktarılırlar. Virüsler ise, genellikle hücrelerine girdikten sonra replike olurlar ve hücreyi yok ederler. Virüsler, hücrelerinin çoğalma sırasında birlikte çoğalmayıp hücrelerinin enzimlerini kullanırlar ve hücrelerinin bölünme sırasında yavru hücrelere aynı şekilde aktarılmazlar. Virüsler, replike oldukları hücreyi yok ederek yeni kurbanlar bulmak için hücreden ayrılırlar ve yeni hücrelere girerek replike olmaya devam ederler (Primrose vd., 1984).

1.3.2. Plazmit Çeşitleri ve Sınıflandırılması

Plazmit sınıflandırılmasında önceki dönemlerde daha temel özellikleri kullanılmaktaydı; Bunlar; Fertilite-(F) plazmidleri, Rezistans-(R) plazmidleri, Col-plazmidleri, Yıkıcı plazmidler, Virülans plazmidleridir (Couturier vd., 1988). Son zamanlarda moleküler biyoloji alanındaki araştırmalar gün geçtikçe ilerlemiş ve plazmitler konusu üzerine araştırmalar yoğunlaştırılmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda da plazmitlerle ilgili farklı özelliklerin daha çok ön plana çıktığı yeni sınıflandırma sistemleri oluşturulmuştur. Sınıflandırma sistemi, plazmin replikasyon mekanizmasına, kopya sayısına, fenotipine ve yapısal özelliklerine bağlı olarak değişim göstermektedir (Wang vd., 2009).

Plazmidler farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Plazmit sınıflandırmanın bir şekli, herhangi bir başka bakteriye kendini transfer edebilme yeteneğine göre ele alınır. Konjüгатif plazmidler tra-genleri taşırlar ki bunlar bir plazmin başka bir bakteriye transferi olan konjügasyon olayının gerçekleşmesini sağlar. Aksine nonkonjüгатif plazmitler yani mobilize edilebilir plazmitler konjügasyonu başlatamazlar, fakat konjüгатif plazmitlerin yardımıyla, ‘kazara’ transfer edilebilir. Bunlar aktarım için olması gereken genlerin bir kısmına sahip oldukları için konjüгатif plazmitlerin paraziti gibi davranış sergiler, fakat konjüгатif plazmitlerin varlığında transfer olabilirler (Francia vd., 2004).



Şekil 3. Konjügasyonel DNA transferi (URL-3)

Bakteriler, çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlerini, direnç genleri taşıyan farklı plazmitlerle veya farklı direnç genlerini taşıyan tek bir plazmitle kazanırlar. Mega plazmitler olarak adlandırılan plazmitlerin birçoğu antibiyotik için direnç geni taşır ve tıp alanında çalışma yapanlar daha çok önem arzederler. Ökaryotik hücrelerin içinde bulunan plazmitler, yapıları itibariyle düzensizdir ve bazen fenotiplerine bakılarak sınıflandırılması zordur. Bunun nedeni, plazmitlerin taşınabilir elementleri içermesi ve bu elementlerin plazmitler arasında rekombinasyon yapma eğiliminde olmalarıdır. Bu nedenle, ökaryotik plazmitlerin birçoğu fenotip göstermeyebilir ve plazmitlerin fenotipi, DNA ile kodlanmış fonksiyonlarından daha çok plazmit davranışlarından kaynaklanabilir (Twyman, 1998).

Plazmitler zincir sayısına göre de sınıflandırılır. Bir konakçı hücrede sirküler (otonom) replikasyon yapabilen çift sarmallı, dairesel DNA molekülü olarak tanımlanmıştır (Carattoli vd., 2005). Fakat bütün plazmitler çift zincirli yapıda değildir. Birçok sayıda tek zincirli dairesel DNA plazmitleri, *Streptomyces* ve *Clostridium* cinsinde tanımlanmıştır (Schrempf vd., 1975).

Lineer çift zincirli DNA plazmitleri pek çok kaynakta bulunmaktadır. Buna örnek olarak Lipothrixviridae ve Bacilloviridae virüs türleri verilebilir (Zillig vd., 1996). Lineer plazmit bulunduran ökaryotik hücrelerde, devamlı bir şekilde transkript olan genlerin kromozoma veya plazmite ait olduğunu belirlemek çoğu zaman zor olabilir. Örneğin, yapay maya ve memeli Y-kromozumunda genler plazmitlerde bulunur ve esansiyel değildir. Ancak, bu genler hücrenin belirli işlevlerini yerine getirebilir ve hücrelerin güçlü ve sağlıklı olması için önemli olabilirler. Bu nedenle, bu genler plazmit olarak tanımlanmaz, ancak kromozomlarda da bulunmayabilirler (Twyman, 1998).

Bir diğer plazmit çeşidi ise RNA plazmiti olarak bilinen viroidlerdir. Viroidler bulaşıcıdır, protein kodlamazlar ve küçük, dairesel, tek zincirli RNA plazmitleri olarak tanımlanırlar. Viroidler, otonom olarak çoğalabilirler ve daha çok bitkilerde hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir (Flores vd., 2008). Mayalarda bulunan RNA elementleri iki parçalı, lineer ve çift zincirlidir. Bu RNA elementleri, öldürücü faktörler olarak bilinirler. Bunun sebebi konakçı hücrede öldürücü fenotip göstermelerinden dolayıdır. (Primrose ve Twyman, 2006).

Bakteriler arasında plazmit aktarımı 3 şekilde gerçekleşir. Bunlar transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyondur (Davison, 1999). Plazmit aktarım yöntemlerinden ilk ikisi plazmite bağlı olarak gerçekleşmez iken, konjugasyon ise plazmit bilgisi kapsamındadır. Ayrıca birçok plazmit bu metot ile farklı hücrelere kendi transferlerini sağlayacak genleri

taşırlar (Twyman, 1998). Transformasyon, bir bakterinin serbest kalan DNA'sının başka bir bakteri tarafından alınması ve onun genomuna entegre edilmesi sürecidir. Bu işlem, bakterilerin çevre koşullarına uyum sağlamasında önemli rol oynar ve hücrelerin adaptasyonu ve evrimi için önemlidir. Konjugasyon, DNA'nın verici hücreden ve alıcı hücreye direkt teması veya seks pilusları aracılığı ile transfer edilmesidir. Transdüksiyon ise bakteriyofaj aracılığı ile DNA segmentlerinin aktarılması sürecidir. Bu işlem, fajların bakteriler arasında DNA parçalarını taşıması sonucu gerçekleşir ve hücrelerin genomlarında değişiklikler yaratabilir. Bu üç süreç, bakteriler arasında genetik materyal değiş tokuşunun önemli yollarıdır ve hücrelerin adaptasyonu ve evrimi açısından önemlidir. Plazmitler ayrıca çok kopyalı ve az kopyalı plazmitler olarak da ele alınabilirler.

1.3.3. Plazmitlerin Replikasyon Mekanizmaları

Plazmitler üç tip replikasyon mekanizması içermektedir. Bunlar, teta modeli replikasyon, zincir uzaklaştırma replikasyon modeli ve yuvarlanan çember (rolling circle-RC) replikasyon modelleridir.

Teta modeli DNA replikasyonu, ebeveyn DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılmasını, bu ayrılma sırasında bir primer RNA'nın sentezini ve bu primer RNA'nın kovalent olarak uzatılarak DNA sentezinin başlatılmasını içerir (Kornberg vd., 1992). Bu süreçte, lider zincir sürekli olarak sentezlenirken, izci zincir kesikli olarak sentezlenir (Zavitz vd., 1991; Kelman vd., 1995). Ayrıca, Teta modeli DNA sentezi birden fazla orijinden başlayabilir ve replikasyon işlemi bir veya iki yönde de ilerleyebilir. İlk durumda (tek yönlü), tek bir çoğaltma çatallı, başlangıç noktasına dönene kadar dairenin etrafında hareket eder ve sonra iki kardeş DNA ayrılır. Diğer durumda (çift yönlü replikasyon), iki replikasyon çatallı *ori*'de başlar ve molekülün diğer tarafında bir noktada buluşana kadar zıt yönde hareket eder. Elektron mikroskobu (EM) altında gözlemlendiğinde, replikasyon ara ürünleri, replikasyon bölgesi içerisinde parçalanmış enzimlerle sindirildiğinde Y-şekilli çatallar üreten teta (Θ) şeklindeki yapılar olarak görünür. Yapılan analizler sonucunda, replikasyon ara ürünleri, replikasyonun yönü, replikasyon orijinin ve terminusun konumu, lider ve izci zincir sentezi arasındaki bağlantı derecesi ile ilgili bilgilere ulaşılır (Del Solar vd., 1998).

Teta tipi mekanizmalı plazmitlerin replikasyon orijinleri şu 3 bölgeyi içermektedir: plazmitin otonom replikasyonuna destek sağlayan minimal cis-aktin bölgesi, replikasyon sürecinin başlatılabilmesi için DNA sarmalının birbirlerinden ayrıldığı bölge ve öncü zincir

sentezinin başladığı baz(lar)ı. Teta tipi replikasyonu yapan plazmitlerin birçoğu, replikasyon orijinlerinde ilave özellikler gösterir. Bu özelliklerden birisi, A-T dizi tekrarlarını bulunduran ve iplikçiklerin açıldığı ve konak başlatıcı faktörlerin bir arada bulunduğu bir bölgedir. Diğerisi ise, konak DnaA başlatıcı proteininin bağlandığı bir veya birçok bölgesi olan "dnaA kutuları"dır (Kornberg vd., 1992; Bramhill vd., 1998). Çoklu Dam metilasyon dizileri, *Escherichia coli* kromozomunun replikasyon orijininde (oriC) bulunur ve aynı zamanda P1 ve pSC101 benzeri plazmitlerin replikasyon orijinlerinde de mevcut olabilir (Bramhill vd., 1988; Brendler vd., 1991). Bu diziler, replikasyon sürecinde önemli bir rol oynamaz ve asıl işlevleri posttrans replikasyonda görülür. Bu metilasyon dizileri, sadece belirli plazmitlerin replikasyon orijinlerinde bulunur ve diğer plazmitlerde görülmez (Abeles vd., 1993).

Pol I'e bağlı olmayan replikasyon orijinlerinin yapısal organizasyonu, Rep proteinlerinin bağlanma bölgeleriyle kıyaslandığında, daha az kıvrımlı bir DNA yapısı gösterir. Replikasyon bağlanma bölgesi, genelde DNA'da kıvrımlı bir bölgeye yerleşirken, A-T tekrarları açısından zengin olan DNA bölgesinin esasında düz olduğu öngörülmüş (Eckdahl vd., 1990). Ancak, Rep proteinlerinin bağlanma bölgelerinde, DNA daha fazla kıvrılır ve bu, replikasyon orijin bölgesinin indüklenmesine yardımcı olur.

Konak hücresinde üretilen (kodlanan) proteinlerin replikasyonu, farklı orijin bölgeleri arasında ya da aynı plazmitler üzerinde bulunan farklı orijinler arasında topolojik benzerlik göstermesi gerekir. Replikasyon orijinleri, plazmit DNA bölgeleridir ve bu bölgeler, işlevsel replizom oluşturmak için gereklidir (Stenzel vd., 1991). Bu, replikasyon orijinlerinde bulunan yapısal unsurların DNA bölgelerine bağlanmasını gerektirir ve bu durum, oriC adı verilen bir bölgede bulunan duruma benzerlik gösterir (Wowlker vd., 1993).

Asimetrik bir işlem olarak kabul edilen yuvarlanan çember (RC) mekanizmasının replikasyonu sadece bir yönlüdür. Bunun sebebi, lider zincir ve izci zincir sentezi bitişik olmadığındandır. Yuvarlanan çember mekanizmasının en bilinen özelliği, yeni sentezlenmiş olan lider pozitif (+) zincirin, aynı ebeveyn pozitif (+) zincirine kovalent olarak bağlı olmasıdır (Del Solar vd., 1993; Espinosa vd., 1995). RC plazmitleri, farklı Gram-pozitif bakterilerde çok sayıda bulunurken birçok Gram-negatif organizmada ve arkede de bulunduğu raporlanmıştır (Gielow vd., 1991; Kleanthous vd., 1991; Yasukawa vd., 1991; Zillig vd., 1993; Holmes vd., 1995; Erauso vd., 1996). RC mekanizmasıyla replike olan plazmitlerin boyutları 10 kb'dan azdır. Fakat 10 kb'dan az olup da teta moduyla replike olan plazmitler de vardır. Buna Gram pozitif bakteriden izole edilen örnek olarak pRJF1 (2,6 kb)

ve pWV02 (3,8 kb) verilebilir (Hefford vd., 1993; Kiewiet vd., 1993). Literatür incelendiğinde, RC replikasyonunun mekanizmalarını araştıran çalışmaların çoğunlukla stafilokokal ve streptokokal plazmitler kullanılarak yapıldığı görülmektedir. Stafilokokal plazmitler pT181 (Novick, 1989), pC221 (Thomas vd., 1990), pUB110, pC194 (Gruss vd., 1989) ve streptokokal plazmitler pNV158, ayrıca onun Δ mob türevi pLS1 plazmiti ile yapıldı (Del Solar vd., 1993).

Yuvarlanan Çember (RC) replikasyonu, DNA molekülünün kendini çoğaltma süreci olarak tanımlanabilir. Bu süreç, Rep proteini tarafından çift zincirli orijin olarak adlandırılan bir bölgede başlatılır. Rep proteini, (+) zincirde bir kırık oluşturur ve serbest 3'-OH ucu primer olarak görev alır ve bu sentez aşamasında, büyük çoğunluk ile konak replikasyon proteinleri (en azından DNA pol III, SSB ve bir helikaz) kullanılır. Bu 3'-OH ucu, ebeveyn (+) zincirin uzaklaştırılmasıyla uzar. Replizom, yeniden oluşturulan bir orijine (dso) ulaştıktan sonra, lider zincirin replikasyonu sonlandırılır ve DNA zincir transfer reaksiyonları gerçekleşir. Son ürünler, çift zincirli dsDNA, yeni sentezlenmiş (-) zincir ve ebeveyn (+) zincire karşılık gelen tek zincirli ssDNA ara ürünleridir. RC replikasyonu, plazmit DNA replikasyonunun önemli özelliği olarak bilinen tek zincirli ssDNA ara ürünlerini üretir. Erlich'in laboratuvarında yapılan çalışmalarda, ssDNA'nın üretiminin, RC mekanizmasında plazmit replikasyonunun en önemli özelliği olduğu belirtilmiştir (Te Riele vd., 1986; Gruss vd., 1989). Ebeveyn (+) zinciri sonradan, konakçı proteinler tarafından başlatılan sentezle dsDNA yapısına dönüştürülür ve konak DNA girazlarıyla replikasyon ürünleri süpersarmallaştırılır.

Yuvarlanan çember replikasyon plazmitleri, genetik modüllerden oluşan, birbirleriyle yer değiştirilebilir moleküllerdir (Projan vd., 1988). Bu modüller, plazmit replikasyonunu gerçekleştiren fonksiyonları taşımaktadır ve bir tane temel modül içerir. Bu modül, replikasyonu başlatan ve kontrol eden çift zincirli orijin (dso), *rep* geni ve replikasyon kontrolünde görev alan plazmit elementlerini içerir ve "lider zincir başlangıcı ve kontrol bölgesi" (LIC) olarak isimlendirilir. Replikasyon plazmitlerin Rep proteinleri, DNA zincir transferaz enzimatik aktivitesine sahiptir. Tip-I topoizomeraz benzeri gibi bir şekilde plazmitleri kesip birleştirebilirler (Koepsel vd., 1985).

Zincir uzaklaştırma yöntemi, hücre içi parazitik DNA molekülleri olan plazmitlerin replikasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, replikasyon sırasında DNA molekülünün zincir uzaklaştırılmasını ve bu şekilde iki kopya halinde çoğalmasını sağlar.

IncQ ailesinden prototip RSF1010, zincir uzaklaştırma yöntemiyle replike olan plazmitlerden en bilinendir ve replikasyonun başlatılması için plazmit tarafından kodlanan üç ana proteine gerek duyar. Bu proteinler, replikasyonun başlamasını teşvik ederek bundan sonraki kısımda replikasyon herhangi bir yönde olacak şekilde zincir uzaklaştırma mekanizmasıyla işleme devam eder (Scherzinger vd., 1991; Sakai vd., 1996). Bu mekanizma sayesinde, plazmitler replikasyon sırasında hücrenin DNA replikasyon sistemini kullanmayarak çoğalabilirler ve hücrenin bölünmesi sırasında yavru hücrelere aynı şekilde aktarılabilirler ve bu nedenle, plazmitler hücrelerine zarar vermezler.

Genellikle bu modele sahip olan RSF1010 plazmitinin üzerine birçok çalışma yapıldı. Minimal bölge olarak betimlenen RSF1010 plazmitinin replikasyon orijini, çift yönlü replikasyonu destekler niteliktedir. RepA, RepB ve RepC, RSF1010'un replikasyon proteinleridir ve ikinci bir plazmit aracılığıyla trans olarak ortama eklendiği zaman çift yönlü replikasyon bölgede başlayabilir durumdadır (Scherzinger vd., 1991). Minimal bölge, replikasyon orijinini de içerir. Orijin *in vivo* ve *in vitro*'da elde edilmiş olan replikasyon ara ürünlerine uygulanan EM analizi yardımıyla bulunur. Bu minimal bölge, RepC tarafından tanınan üç özdeş iteron ve GC ve AT bakımından zengin segmentleri içeren 174 baz çiftlik bir bölge içerir. İteronlar, RepC bağlanma bölgeleridir (Haring vd., 1985; Haring vd., 1989). Orijin bölgesi ayrıca iki küçük palindromik dizi (ssiA-ssiB) içerir ve ssi bölgelerindeki ters tekrarlar, saç tokası oluşumunu sağlar. Saç tokası yapılarında, gövdenin üst kısmındaki baz eşleşmesi replikasyon için temel esastır, gövdenin alt kısmındaki dizi özgünlüğü ve baz komplementerliği ise primer sentezi için gerekli olan temel esastır (Miao vd., 1993). Plazmitin kodladığı RepB primaz tarafından ssiA-ssiB dizileri spesifik olarak tanınır ve RepB primaz bu ssiA-ssiB dizilerden “sürekli replikasyonu” başlatır (Haring vd., 1989; Honda vd., 1991). Genetik çalışmalar, tek bir ssi bölgesinin tek yönde replikasyonu başlatabildiğini ve RSF1010 replikasyonu için iteronlar, ssiA ve ssiB bölgelerinin gerekli olduğunu göstermiştir. Bu bölgeler, dubleks açılma ve primerleşme bölgelerini oluşturur. (Sakai vd., 1996).

RSF1010 plazmiti, replikasyonun başlatılması için RepA, RepB ve RepC gibi plazmit tarafından kodlanan proteinlerine gerek duyar. RepA, 5'→3' helikaz aktivitesi gösterirken RepB, primaz aktivitesi ve RepC ise başlatma aktivitesi gösterir (Haring vd., 1989; Sakai vd., 1996). Replikasyon, bakteri hücrelerinin DNA replikasyonu sırasında kullanılan DnaA, DnaB, DnaC ve DnaG proteinlerinden bağımsız olarak gerçekleşir ve süpersarmal plazmit

DNA'sı kalıp olarak kullanılır. Plazmitlerin DNA'sı genellikle daha kısa ve daha az kompleks olduğu için replikasyon hızlıdır (Scherzinger vd., 1991).

1.3.4. Plazmitlerin Hücrelerde Paylaşımı

Bakteriyel plazmitler, konakçı popülasyon ortamında yaşamını sürdürebilmek için gerek duydukları fonksiyonların ifadesini kontrol edebilmek amacıyla çeşitli düzenleyici mekanizmalar kullanır. Plazmitler konak hücrelere eşit dağılamadıklarından plazmit kaybı yaşamaktadırlar, bu da bölünmeyle ilişkili kararsızlık olarak isimlendirilmektedir. Konak hücreye aktarılmamış plazmitler kararlılıklarını sürdürebilirler. Çünkü doğal plazmitler, her hücre bölünmesi durumunda hücrede hayatta kalabilmesine olanak sağlayan bir par bölgesi bulundurlar. Par bölgesi, düşük kopya sayılı plazmitlerin kararlı olması için gereklidir (Bingle ve Thomas, 2001).

ColE1, çok kopyalı plazmit sınıfının prototipidir ve ColE1'de par bölgesi bulundurur. Çok kopyalı plazmit ColE1 birçok büyüme şartlarında kararlı bir şekilde korunmuş olsa da bunun ile alakalı plazmit klonlama vektörleri oldukça kararsızdır ve hücre başına 10^{-2} - 10^{-5} frekanslarında kaybolmaktadırlar. Çalışmalar, ColE1 ve ilgili plazmitlerin hücre bölünmesinde gelişigüzel bölündüğünü ve plazmit kararlılığının, plazmit multimerizasyonu ile ters orantılı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda multimerizasyonu azaltan şartlar kararlılığı artırır. Plazmit multimerleri içeren hücreler, plazmit bulundurmayan hücreleri atar, çünkü multimerler, monomerlerden daha az kopya sayılarında tutulurlar. ColE1 stabildir, çünkü bir multimeri verimli bir şekilde monomerlere dönüştüren recA-, recF- ve recE'den farklı olarak genetik çeşitlenme olayları için gerekli olan bir determinantı (cer) kodlar (Summers ve Sherratt, 1984).

1.3.5. Plazmitlerde Kopya Sayısı ve Kontrolü

Bir hücrede bulunan bir plazmitin kopya sayısı, spesifik plazmite ve hücrenin büyüdüğü koşullara bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Bazı durumlarda, bir hücre bir plazmitin yalnızca tek bir kopyasını içerebilirken, diğerlerinde çok sayıda kopya içerebilir. Kopya sayısı, plazmitin stabilitesi, seçici basıncın varlığı (örneğin, plazmitin direnç kazandırdığı bir antibiyotik varlığı) ve hücrenin genel büyüme hızı gibi çeşitli faktörlerden

etkilenebilir. Plazmitin kendine has bir kopya sayısı mevcuttur ve bu kopya sayısı, replikasyonun başlangıç aşamasının düzenlenmesinde rol alan, plazmit tarafından kodlanan kontrol elementleriyle gerçekleştirilmektedir.

Plazmitin üreteceği kopya sayısı çok önemlidir. Bunun sebebi ifade edilmesi istenen genin seviyesinin belirleyicisi kopya sayısıdır. Plazmidler ayrıca taşıdıkları genlerin ekspresyonunu düzenleyen promotörler ve sonlandırıcılar gibi kontrol elemanları da taşıyabilirler. Bu kontrol elemanları, farklı koşullar altında veya farklı hücre tiplerinde genlerin ekspresyonunu modüle etmek için kullanılabilirler. Örneğin, belirli bir kimyasal sinyale yanıt olarak gen ifadesini açmak için bir promotör kullanılabilirken, belirli bir yolun sonunda gen ifadesini kapatmak için bir sonlandırıcı kullanılabilir. Genel olarak, bir hücrede bulunan bir plazmitin kopya sayısı ve taşıdığı kontrol elemanları, plazmitin hücre ve onun genel fenotipi üzerindeki etkisinin belirlenmesinde önemli roller oynayabilir.

Birçok plazmit, yüksek kopya sayısı üretebilmektedir (Friebs, 2004). Genel olarak kullanılan plazmitler, replikasyon orijinleri ve üretebildikleri kopya sayıları Tablo 1’de verilmektedir.

Tablo 1. Biyoteknolojide kullanılan bazı plazmitler ve özellikleri

Plazmit Adı	Replikasyon Orijini	Kopya Sayısı
pUC	pMB1	500-700
pBR322	pMB1	15-20
pACYC	p15A	10-12
pTZ	pMB1	>1000
pSC101	pSC101	Yaklaşık 5
pWE15	ColE1	10-20

Plazmitlerde negatif regülatör devreleri, kopya sayısını belirlemek ve replikasyon oranını koruyabilmek için kullanılır (Pritchard vd., 1978). Plazmitlerde replikasyonu kontrol eden sistemler incelenmiş ve birden fazla inhibitör tipi bulunmuştur (Thomas vd., 1988). Bunlar ise; antisens RNA ile düzenleme, başlatıcı proteinlerin bağlandığı DNA bölgeleriyle düzenleme ve hem antisens RNA hem de bir protein ile düzenlemedir.

Antisens RNA ile düzenlemede ColE1 plazmitleri, klonlama vektörlerinde kullanılan yaygın bir tür plazmittir ve DNA replikasyonunu kontrol etmek için antisens RNA kullanır (Del Solar vd., 1998). Bu plazmitlerde, DNA replikasyonu için gerekli olan primer RNA II adı verilen bir ribonükleotittir. Ancak, RNA II, RNaz H enzimi tarafından kesilerek serbest 3' OH grubu bırakılana kadar primer olarak çalışamaz. Ayrıca, replikasyonun kontrolünde RNA I adı verilen 108 bazlık bir küçük RNA molekülü de rol oynar. RNA I ve RNA II, aynı bölgeden kodlanır ve birbirlerinin tamamlayıcısıdır. Ayrıca çift zincirli RNA oluşturmak için hibridize olabilirler. Bu hibrid yapı, RNA II'nin RNaz H tarafından parçalanmasını önler ve bu durumda replikasyon gerçekleşemez. RNA I, plazmitin kopya sayısının fazla olması durumunda fazla sayıda sentezlenir ve böylece konakçı hücre büyürken ve bölünürken RNA I (Tomizawa ve Itoh, 1981). Replikasyonun kopya sayısını koruma işleminde, plazmit tarafından kodlanan Rop proteininin dimer formu da yardımcı olur. Bu protein, RNA I ve RNA II'nin eşleşmesini artırır ve böylece RNA II, düşük konsantrasyonlarda bile inhibe edilebilir. Rop geninin delesyonu veya RNA I'deki mutasyonlar, kopya sayısında artışa neden olabilir (Twigg ve Sherratt, 1980).

Plazmitlerin replikasyonu, Rep proteinlerinin kontrolü altındadır. Bu proteinler, plazmit DNA'sının kopyalanmasını sağlarlar, ayrıca bu proteinler otoregüle edilirler veya transkripsiyonel kontrol altında olabilirler, yani kendi üretimlerini kontrol ederler veya

başka genler tarafından kontrol edilirler (Kittell vd., 1992; Chatteraj vd., 1997). İteronlar, plazmitlerin kopya sayısının kontrolünde önemli bir role sahiptirler. İteronlar, DNA dizileridir ve plazmitin replikasyonunu başlatan özgül proteinlere bağlanırlar. Bu sayede, plazmitlerin doğru şekilde kopyalanması sağlanır. F plazmitlerinde, uyumlu bir plazmite klonlama yapıldığında, oriS iteronlarının inhibe edici etkisi gözlenmiştir. Benzer şekilde, P1 veya R1162/RSF1010 gibi iteron içeren diğer plazmitlerde de benzer durumlar gözlenmiştir (Kim vd., 1985).

pSC101 plazmitinde ve geniş konak spektrumuna sahip diğer plazmitlerde ori bölgesinin iteron sıraları içerir ve bu iteronlar 3 ile 7 kopyaya sahiptirler. Ori bölgesi, plazmitlerde replikasyonun başlangıç noktası olarak düşünülmektedir ve ori bölgesine yakın bir alanda, replikasyon için gerekli olan RepA proteinini kodlayan *repA* geni bulunur. RepA proteini, iteronlara bağlanarak DNA sentezini başlatır. Bu protein, sadece plazmitler tarafından kodlanır ve replikasyon için gereklidir.

Escherichia coli bakterilerinde replikasyon (DNA çoğaltımı) sırasında hücre içindeki plazmit DNA moleküllerinin sayısının kontrol edilmesi bu iki ilave mekanizma ile gerçekleştirilir. İlk mekanizma, RepA proteininin sentezinin baskılanmasına dayanır (Ingmer ve Cohen, 1993). RepA proteini, kendi promotor bölgesine bağlanarak kendi transkripsiyonunu engeller ve sentezini baskılar. Eğer hücrede plazmit DNA moleküllerinin sayısı (kopya sayısı) yüksekse, RepA proteininin sentezi baskılanacaktır. Bu, replikasyonu durduracak ve hücre bölünmesi sonrasında kopya sayısı ve RepA proteininin konsantrasyonu düşecek, böylece replikasyon tekrar başlatılacaktır. Ancak, RepA proteininde mutasyonlar olabilir ve bu mutasyonlar kopya sayısının artmasına sebebiyet verebilir. Diğer mekanizma ise RepA proteininin iki plazmit DNA molekülünün iteron bölgelerine bağlanarak bu iki plazmiti birbirine bağlamaya dayanır. Bu mekanizma, "handcuffing" (kelepçeleme) olarak bilinir ve bu sayede iteron plazmitlerinin replikasyonu RepA proteininin konsantrasyonuna ve plazmitlerin kendi konsantrasyonlarına bağlı olacaktır. Bu mekanizma sayesinde, hücre içindeki plazmit DNA moleküllerinin sayısı kontrol edilebilir (Ingmer ve Cohen, 1993).

1.3.6. Plazmitlerde Uyuşmazlık ve Konak Seçiciliği

Belirli plazmitler aynı bakteriyel konakçı hücrede birlikte stabil bir şekilde var olamazlar (Datta, 1979). Bunun nedeni, bu plazmitlerin, replikasyon kontrolü veya bölünme

sistemleri gibi, hücre içinde plazmitleri korumaktan sorumlu olan belirli genetik elementleri paylaşmalarıdır (Novick, 1987). Bu paylaşılan öğeler, iki plazmid arasında uyumsuzluklara neden olarak, konakçı hücre içindeki kalıtlımlarında kararsızlığa yol açabilir. Bu davranışı sergileyen plazmitler, aynı "uyumsuzluk" grubu içinde sınıflandırılır ve bu sınıflandırma, genetik olarak ilişkili plazmitleri tanımlamak ve konakçı hücreler içindeki davranışlarını anlamak için faydalıdır.

Bir plazmitin kararlı bir kopya sayısını sürdürme yeteneği, belirli bir orijin sekansından replikasyonun başlatılmasını düzenleme kabiliyetine bağlıdır. Farklı plazmitler, bu kararlılığı elde etmek için farklı stratejiler kullanır. Bu mekanizmalar, hücre bölünmesi sırasında meydana gelen kopya sayısındaki dalgalanmaların düzeltilmesini ve hücre bölünmesinden sonra her yavru hücrenin plazmitin en az bir kopyasını almasını sağlayan bir bölünme mekanizmasının belirlenmesini içerebilir. Bununla birlikte, ikinci bir plazmit başka bir plazmitin replikasyon kontrolüne veya bölünme mekanizmasına müdahale ederse, uyumsuzluğa neden olabilir ve bakteri popülasyonunun büyümesi sırasında plazmitlerden birinin veya her ikisinin kaybına yol açabilir (Nordstrom vd., 1989; Austin vd., 1990). *E. coli*'de 30'dan fazla, *S. aureus* plazmitlerinde ise 13 adet uyumsuzluk grubu bulunmuştur. Plazmitlerin RNAI/RNAII bölgelerindeki dizilerin değişimiyle, uyumsuzluk grupları da değişebilir. Bunun yanı sıra, plazmitler aynı par bölgesini paylaşıyorsa da uyumsuz olabilirler (Austin ve Nordstrom, 1990). Bu uyumsuzluklar, plazmitlerin birbirleriyle etkileşimlerini ve bakterinin fenotipini etkileyebilir. Örneğin, plazmitler arasında uyumsuzluk olması durumunda, bakterinin hücre içinde bulunan plazmitler arasında bir dengenin korunması sağlanabilir, bu da bakterinin fenotipine yansiyabilir.

Plazmitler, replikasyon için gerekli olan birkaç replikasyon proteinini veya hatta sadece birini bile kodlayabilirler. Ancak, diğer tüm proteinler (örneğin, DNA polimeraz, DNA ligaz ve helikazlar) konak hücre tarafından sağlanmaktadır. Plazmitlerin replikasyon proteinleri, replikasyonun orijin bölgesi olarak bilinen alana yerleşmiştir ve bu alan replikasyon için şarttır. Plazmitlerin diğer bölgelerinin çıkarılabilmesi ve farklı yabancı dizilerin plazmite eklenebilmesi, replikasyon gerçekleşebilmesine engel değildir. Bu özellik, plazmitlerin klonlama vektörleri olarak kullanılmasını kolaylaştırmıştır (Twyman, 1998).

ori bölgesi, plazmitlerin replikasyonunun başlangıç noktasıdır ve plazmitlerin konak seçiciliğini belirler. Konak seçiciliği, plazmitlerin hangi bakterilerde replike olabileceğini belirler. Örneğin, bazı plazmitler sadece *E. coli* gibi belirli türlerde replike olabilirken, diğer seçici olmayan (promiscuous) plazmitler daha geniş bir konak seçiciliğine sahip olabilirler

ve çeşitli bakteri türlerinde replike olabilirler. Buna örnek olarak *Staphylococcus aureus* verilebilir. *Staphylococcus aureus*'tan izole edilen plazmitlerin birçoğu geniş bir konak seçiciliğine sahiptirler (Stiffler vd., 1974). Kodladıkları replikasyon proteinleri tarafından plazmitlerin konak seçiciliği belirlenebilir.

1.3.7. Biyoteknolojide Plazmit Kullanımı

Plazmitler, bakterilerde ve diğer mikroorganizmalarda bulunan küçük, dairesel DNA parçalarıdır. Genellikle biyoteknolojide kullanılırlar çünkü kolayca manipüle edilebilirler ve proteinleri çoğaltabilecekleri ve ifade edebilecekleri hücrelere sokulabilirler. Bu, onları gen terapisi, protein üretimi ve farmasötik üretimi dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için yararlı araçlar haline getirir.

Plazmidler, laboratuvarında belirli genlerin eklenmesi, silinmesi veya DNA dizisinin değiştirilmesi yoluyla manipüle edilebilir. Daha sonra, transformasyon (kimyasal veya fiziksel bir işlem kullanılarak plazmid DNA'nın hücreye dahil edilmesi) veya transfeksiyon (bir virüs veya başka bir vektör kullanılarak plazmit DNA'nın sokulması) gibi çeşitli teknikler kullanılarak hücrelere dahil edilebilirler. Hücrenin içine girdikten sonra, plazmit DNA, hücrenin kendi DNA'sı ile birlikte kopyalanabilir. Bu, tanımlanan gen veya genlerin hücrede ifade edilebileceği ve istenen proteinin veya diğer ürünün üretimine yol açabileceği anlamına gelir. Plazmitler, biyoteknolojide, araştırma ve tıpta kullanılmak üzere protein üretimi, genetik hastalıkların tedavisi için gen terapilerinin geliştirilmesi ve farmasötik üretimi dahil olmak üzere çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca aşıların ve diğer tıbbi tedavilerin geliştirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Plazmitler alanda köklü bir araçtır ve araştırmacılar tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmektedir.

1.3.7.1. Ticari Vektör Olarak Kullanılan Plazmitler

Gen klonlaması, bir genin kopyalanması ve çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir ve bu yöntemde birçok aracı molekül (vektör) kullanılmaktadır. Bu vektörlerin seçimi ve kullanımı, yapılacak olan çalışmaya uygun bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Özellikle, restriksiyon haritaları, baz sıraları, gen fonksiyonları, hücre içi replikasyon mekanizmaları ve spesifik markerler gibi özelliklerin iyi bilinmesi ve tanınması, gen klonlaması işleminin başarısı için önemlidir. Bu özellikler, klonlama işleminin verimliliğini ve doğruluğunu artıracaktır. İlk nesil klonlama vektörleri 1970'lerin başında tasarlanmıştır ve günden güne dizaynı artmıştır (Primrose ve Twyman, 2006).

Birçok vektör bakteri tabanlıdır ancak ökaryotik vektörler de geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Çoğunlukla ökaryotik vektörler, memeli ve kanatlı hücreleri gibi ökaryotik hücrelere yabancı genlerin aktarılması ve ekspresyonu için tasarlandıklarından, yabancı genle birleştirilmiş olan plazmite, kuvvetli viral promotor ve regülatör (terminasyon) sekansları da eklenerek COS hücrelerine aktarılabilirler. Ayrıca, yabancı gen taşıyan plazmit bir bakteri hücresine aktararak da genin fazlaca üretimi sağlanabilmektedir. Bir vektör, bir hücrenin kromozomundan bağımsız olarak kendini çoğaltabilen ve diğer hücreler arasından seçilebilen bir molekül olmalıdır. Bu molekül, bir replikasyon orijini bulundurarak kendi kendini çoğaltabilir ve bir gen taşıyarak diğer hücreler arasından seçilebilir. Örneğin, vektörde bulunan bir gen, antibiyotiğe direnç veya metale direnç gibi özellikler kazandırabilir. Bir vektör ayrıca bir restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurmalıdır, bu bölge sayesinde vektörün belirli bir noktada kesilerek hücrenin kromozomuna entegre edilebilmesi sağlanır. Bu özellikler sayesinde vektörler, genlerin hücreler arasında taşınmasında veya hücrelerde modifiye edilmesinde kullanılır. (Clark, 2010).

Tablo 2. Vektör sistemlerinin karşılaştırılması

Vektör Adı	Vektör çeşidi	Vektör Büyüklüğü	Konak	Avantajları
PBR322	I.Nesil Plazmid vektör	4.3 kb	<i>E.coli</i> (transform.)	Yüksek Plazmit kopya sayısı, kararlılık
PUC19	II.Nesil Plazmid vektör	2.68 kb	<i>E.coli</i> (transform.)	Polilinker Bölgesi, Yüksek Kopya Sayısı, X-gal operatör gen
PJB8	Kozmidler	54 kb	<i>E.coli</i> (transdüks.)	A cos + plazmit(hibrit=melez vektör). Genomik kütüphaneler için klon sayısını azaltır.
Charon 4a	^ faj vektörü	45.4 kb	<i>E.coli</i> (transdüks.)	Yer değiştirmeli vektör
Charon 16	^ faj vektörü	41.7 kb	<i>E.coli</i> (transdüks.)	Eklenmeli vektör
M13mp18	M13 Viral vektör		<i>E.coli</i> (transdüks.)	Dizileme ve klonlama kolaylığı, sonsuz klon kaynağı
pAdeno-X	Adenoviral vektör	32.6 kb	<i>E.coli</i> / Memeli H.	Gen terapi= Yüzey reseptörleri değiştirilmiş viral kılıfın hedef dokulara yönelmesi ve birkaç haftalık gen ekspresyonu
pFastBAC	Baculoviral vektör	5.327 kb	<i>E.coli</i> (transform.)/ Böcek H. (transfeks.)	Gen terapi= Baculoviral vektöre karşı memeli hücrelerinde doğal bağışıklık gelişmediğinden insan kanser tedavisinde önem kazandı
MILV ve SAX	Retroviral Vektör		Memeli H.	Gen terapi= Kromozomal genoma daimi entegrasyon. Ancak rastgele entegrasyonla gen işlevi kaybı ve onkogen oluşumu
pBAC108L	BAC	6.7 kb	<i>E.coli</i> / Memeli H.	Klon-klon yöntemiyle genom dizilemesi= Büyük DNA parçaları taşıyabildiğinden, genomik DNA kütüphanesi oluşturulurken klon sayısının azalması sağlanır.
pYAC3	YAC	106 bp	<i>S. cerevisiae</i>	Büyük miktardaki insert DNA' maya hücresine klonlanması
pShuttle-CMV-GFP	Mekik vektörler		<i>E.coli</i> / Maya Memeli h.	İnsert DNA'nın <i>E.coli</i> ve memeli hücreleri arasında taşınabilmesi
pET	Ekspresyon vektörü	5.4 kb	<i>E.coli</i>	Hem prokaryotik hem de ökaryotik konakta istenilen genin ifadesi ve ekspresyonunun kontrolü, istenilen genin çok miktarda sentezi

1.3.8. *Anoxybacillus* Cinsi Plazmitler

Anoxybacillus, termofilik, Gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde, hareketli bakterilerin bir cinsidir. Bu bakteriler, termostabil gen ürünleri için sürekli artan endüstriyel ilgi ile jeotermal çevrelerde yaygın olarak bulunan ve kolayca izole edilen bakterilerdir. Bu nedenle, bu bakteri cinsi içindeki filogenetik ilişkilerin ve çeşitliliğin araştırılması sadece taksonomik bir ilgi değil, aynı zamanda biyoteknolojik potansiyelinin tam olarak kullanılması için bir gerekliliktir (İnan vd., 2012). Bu bağlamda *Anoxybacillus* türleri tarafından kodlanan yeni gen ve proteinler hem endüstriyel uygulamalara hem de ekonomiye değer katma potansiyeline sahiptir. Bu açıdan bakıldığında, konakçı hücrenin ekonomik avantajları ortaya çıkmaktadır. Özellikle, bu termofilik bakterilerin plazmitleri hem kendi proteinlerini kodlama hem de termofilik genlerin (vektör) aşırı ekspresyonu için bir araç görevi görme yetenekleri nedeniyle özel bir öneme sahiptir (Goh vd., 2013). Endüstriyel öneme sahip birçok termostabil proteinin üretimi, bu termofilik bakterilerden plazmitlerin izolasyonu yoluyla gerçekleştirilebilir. Bu nedenle *Anoxybacillus* cinsinde tanımlanan plazmitler ve bu plazmitlerden oluşturulan mekik vektörleri (iki replikasyon orijinli vektörler) büyük önem taşımaktadır.

Anoxybacillus cinsi, bakterilerden oluşan bir cins olup, son yıllarda yapılan genom çalışmaları sonucunda 23 farklı *Anoxybacillus* türü ve 2 farklı *Anoxybacillus* alt türü için tüm genom analizi tanımlanmıştır (URL-9).

Tablo 3. *Anoxybacillus* cinsi plazmitler

Plazmit Adı	Büyükülüğü	Konak	RefSeq
Unknown plazmit	54976 bp	<i>Anoxybacillus</i> B7M1 suşu	AN: NZ_CP015437.1
Unknown plazmit	24836 bp	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> 52-1A	AN: NZ_CP021839.1
pBstUI51	51094 bp	<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i> U458 suşu	AN: NZ_CP064061.1
pDSM15939_1	258230 bp	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> DSM	AN: NZ_CP015439.1
pDSM15939_2	65295 bp	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> DSM	AN: NZ_CP015440.1

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması sürecinde kullanılan cihazlar Tablo 4’te verilmektedir.

Tablo 4. Tez çalışması sürecinde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Modeli
Buz Dolabı (+4)	Profilo
Bio-Rad CFX96 qPCR cihazı	Bio-Rad
Çeker Ocak	WCS Space Series Fume Cupboard
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik
Elektroforez Tankı (dikey)	Bio-Rad Mini Protean
Etüv	Nüve EN500
Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
Isıtıcı Bloklar	Biosan
İnkübatör	Thermo Scientific
Buz Makinesi	Scotsman
Kabin	Nordicsafe/Esko Biyogüvenlik
Mikrodalga Fırın	Beko
Mini Santrifüj	Sigma
Magnetik Santrifüj	Heidolph MR Hei-Standart
Nanodrop	Thermo Scientific/Multiskan GO
Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Otoklav	Hırayama Hiclave Autoclave
PCR Cihazı	SensQuest Labcycler
pH Metre	GMBH
Saf Su Cihazı	Mp MINI pure DestUp
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 220R
Spektrofotometre	Jenway
Santrifüj	Hermle
Santrifüj	Thermal Cyclers-Bio Rad
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell cihazı	Bio-Rad
UV Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Vorteks	Boeco
Zamanlayıcı	Diehl

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması sürecinde kullanılan kimyasallar Tablo 5’de verilmektedir.

Tablo 5. Tez çalışması sürecinde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
Asetik asit	Riedel-dan Haen
Ampisilin	Applichem
Amonyum Asetat	İsolab
Agar	Canda Lab
BSA	NEB
CaCl ₂	Aktar Kimya
dNTP	Promega
DTT	Applichem
DNA Ladder	NEB
DEPC	Sigma
Etil Alkol	Applichem
EDTA	Merck
Gliserol	Merck
IPTG	Applichem
Kanamisin	Applichem
Lizozim	Sigma
MgCl ₂	Sigma Aldrich
Metanol	Riedel-dan Haen
NaCl	Merck
NaOH	İsolab
N-Propanol	Merck
N-laurilsarkozin	Sigma
Sodium citrate tribasic dihydrate	Sigma
Trypton	Merck
Trisma Base	Sigma
Trizol	Ambion
X-Gal	Applichem
Yeast ekstrat	Merck

2.1.3. Kullanılan Enzimler ve Tamponlar

Tez çalışması sürecinde kullanılan enzimler ve tamponlar Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. Tez çalışması sürecinde kullanılan enzimler ve tamponlar

Enzim ve Tamponlar	Marka
<i>EcoRI</i>	NEB
<i>NcoI</i>	NEB
<i>BamHI</i>	Promega
Go Taq DNA Polimeraz	Thermoscientific
Go Taq DNA Polimeraz Tamponu	Thermoscientific
Superscript RT Enzim	NEB
RNA Ligaz	NEB
T ₄ DNA Ligaz	Thermoscientific
T ₄ DNA Ligaz Tampon	Thermoscientific
Terminal Transferaz Enzimi	ROCHE
Transkriptor Reverz Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 10x Conc.	ROCHE
Cut Smart Buffer	NEB

2.1.4. Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan kitler

Kit Adı	Markası
Jel Saflaştırma Kiti	Eco-Tech
PCR Temizleme Kiti	NucleoSpin
Plazmit İzolasyon Kiti	Eco-Tech
Genomik DNA İzolasyon Kiti	Eco-Tech
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermoscientific
TRIzol® Maksimum™ Bakteriyel RNA İzolasyon Kiti	Ambion
DNaz I	Sigma Aldrich
5'/3' RACE Kiti, 2nd Generation	ROCHE
LACE (ligation based amplification of cDNA ends) Kiti	NEB
DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit	ROCHE
iTaq Univer SYBR Green Supermix	Bio-Rad

2.1.5. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Vektörler

Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve vektörler Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve vektörler

Bakteriler, Vektörler	Referanslar	Özellikleri
<i>Anoxybacillus</i> sp. 05S15	KTÜ Moleküler Biyoloji ve Araştırma Laboratuvarı	
<i>E. coli</i> JM101	NEB	F' traD36 proA ⁺ , B ⁺ lacIq, Δ, (lacZ), M15/ Δ (lac-proAB), glnV, thi ⁺
<i>E. coli</i> BL21 (D3)	Novagen	F', ompT, hsdS _B , (r _B -m _B), gal, dcm (D3), pLysS, Cam ^R
pUC18 Klonlama Vektörü	Thermo Scientific	Yüksek kopya sayılı, <i>E.coli</i> plazmiti, LacZ geni, MCS (çoklu klonlama bölgesi) bölgesi ve Amp ^R
pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü	Promega	Yüksek kopya sayılı, T ₇ ve SP6 DNA polimeraz promotorları, MCS (çoklu klonlama bölgesi) bölgesi, LacZ geni, 3'-T ucu ve Amp ^R

2.1.6. Kullanılan Besiyerleri, İçeriği ve Hazırlanışı

Tez çalışmasında kullanılan besiyerlerin içeriği ve hazırlanışı Tablo 9’da verilmektedir.

Tablo 9. Tez çalışmasında kullanılan besiyerlerin içeriği ve hazırlanışı

Besiyeri	İçeriği/Hazırlanışı
Luria Bertani Broth	2 g Tripton, 1 g Yeast Extract. 1 g NaCl hassas terazide tartıldıktan sonra 150 ml saf suda çözülür. pH 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim saf suyla 200 ml’ye tamamlanır. Otoklav edilir.
Luria Bertani Agar	2 g Tripton, 1 g Yeast Extract, 1 g NaCl hassas terazide tartıldıktan sonra 150 ml saf suda çözülür. pH 7,2-7,4 olacak biçimde ayarlandıktan sonra içerisine 3,2 g agar eklenir ve son hacim saf suyla 200 ml’ye tamamlanır. Otoklav edilir.

2.1.7. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı Tablo 10’da verilmektedir.

Tablo 10. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Çözeltiler	Hazırlanışı
Plazmit İzolasyon Solüsyonu (A)	Solüsyonun içerisinde 50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl ve 0,1 mM EDTA olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır. Son olarak üzerine lizozim (1 ml solüsyon için 4 mg) eklenir ve çözünmesi için vortekslenir.
Plazmit İzolasyon Solüsyonu (B)	Solüsyonun içerisinde 200 mM NaOH ve 200 mM SDS olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile tamamlanır.

Tablo 10'un devamı

Sükroz liziz solüsyonu	900 mg glukoz, 350 mg EDTA, 300 mg Trizma Base ve 25 gram sükroz tartılır 80 ml H ₂ O ile çözülür pH:8 'e ayarlanmasının ardından son hacim 100 ml olacak biçimde tamamlanır. Otoklav edilir.
SDS solüsyonu	800 mg NaOH ve 1000 mg SDS tartılır ve 100 ml otoklavlanlanmış ddH ₂ O ile çözülür.
Taze hazırlanmış Kurşun Sitrat boyası	Bir miktar su konularak üzerine 1,33 g Kurşun Sitrat ilave edildi. Hafif çözüldükten sonra üzerine 1,76 g Sodyum Sitrat ilave edildi. Bulamaç haline gelene kadar karıştırıldı, daha sonra üzerine 8 mL 1 N NaOH ilave edildi ve 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
10X TBE	108 g Trisma Base, 55 g Boric Acid, 8,3 g EDTA (20 mM) tartılarak 500 ml distile suda çözüldü. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.
20X SSC	70,12 g NaCl, 40,18 g Sodyum Sitrat (2H ₂ O) eklenerek 250 mL distile suda çözüldü. Son hacim 400 mL'e tamamlandı.
IPTG	0,5 M stok solüsyon için 4,6 g IPTG (toz) hassas terazide ölçülür ve 40 ml distile suda çözdürülür. Daha sonra kabin içerisinde 0,22 µm'luk filreden geçirilir ve -20 derecede muhafaza edilir.
% 10'luk SDS	% 10'luk SDS; 9 ml saf su içerisinde hassas terazide ölçülen 1 g SDS çözülerek hazırlanır.
Ampisilin	50 mg/ml Ampisilin için: 50 mg Ampisilin hassas terazide ölçülür, daha sonra 50 ml distile su içerisinde çözdürülür. Sonrasında

Tablo 10'un devamı

	uygun filtreden geçirilir ve -20 °C'de muhafaza edilir.
Kanamisin	50 mg/ml Kanamisin için:50 mg kanamisin hassas terazide ölçülür, daha sonra 50 ml distile su içerisinde çözündürülür. Sonrasında uygun filtreden geçirilir ve -20 °C'de muhafaza edilir.
1 M Glukoz	100 ml distile su içerisine 18,016 g glukoz eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır ve 121 °C'de 1 atm basınçta otoklav edilir.
0,5 M EDTA	100 ml su içerisine 14,612 g EDTA eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	Uygun bir beher içerisine 12,114 g Tris Base eklenir. Daha sonra üzerine 85 ml distile su eklenir ve manyetik karıştırıcı ile iyice çözünmesini beklenir. Çözeltinin pH 'sı 8,0 oluncaya kadar 1 M HCl eklenir. Son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
200 mM NaOH	50 ml distile su içerisine 399,97 mg NaOH eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti hazırlanır.
50X TAE	40 ml EDTA (0.5 M), 22,84 ml asetik asit ve 96, 8 g Tris base alınır, son hacim 400 ml olacak şekilde distile su ilave edilir.
Etidyum Bromür	10 mg/ml için: 10 mg etidyum bromür hassas terazide ölçülür (çeker ocak içerisinde ve eldiven ile) 10 ml TAE tampon içerisinde çözündürülür.

Tablo 10'un devamı

X-Gal	100 mM stok solüsyon için: 400 mg X-Gal (katı) hassas terazide tartılır ve 10 ml N-N dimetil format içerisinde çözülür. -20 derecede muhafaza edilir. Bu işlemler kabin içerisinde gerçekleştirilir.
-------	--

2.1.8. Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Lasergene 9.1. (DNASTAR Inc.) yazılımı, Plasmapper (Dong vd., 2004), BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999), Gentle V 1.9. 4, FastPCR 6.1.53.beta 3 (Kalendar vd., 2009), OriFinder (Gao ve Zhang, 2008), Gene Finding Programs (URL-4), REPFIND (URL-5), Online Analysis Tools (URL-6), Repeats, Secondary Structure & Melting Temperature Tools (URL-7), Radar (NCBI) (URL-8), Snapgene Viewer 2.2.2. (URL-11), Clustal (URL-12), Blast (URL-13), NEBcutter (URL-14).

2.2. Metot

2.2.1. İzolatın Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi İçin Plazmit DNA İzolasyonu

Anoxybacillus gonensis 05S15 izolatının barındırdığı plazmitin izolasyonu için Voskuil ve Chambliss'ın (Voskuil ve Chambliss, 1993) geliştirdiği metot kullanıldı. *Anoxybacillus* bakterisinden 30 ml gece kültürü (16 saat) LB besiyerine atılarak 55 °C'de çoğaltıldı. Çoğaltılan bakteri 50 ml LB içerisinde 600 nm'deki OD değeri 0,1 olacak biçimde hesaplanarak inoküle edildi ve OD₆₀₀ değeri 0,90- 0,95'e gelene kadar çoğaltıldı. 5.970 g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Ardından 1 ml TE solüsyonu ile pellet çözülerek vorteks yapıldı. Maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine bir ependorfun içerisine 200 µl sükröz liziz solüsyonu ve üzerine 6 µl lizozim eklenen karışım ilave edildi. 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 400 µl SDS solüsyonu eklenilerek ependorf alt-üst edildi. Ardından 20-25 °C'de 7 dk bekletildi. 3 M sodyum asetat (pH: 5,2) (-20 °C) 300 µl eklenilerek tekrar alt-üst edilip 15 dk maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorfa aktarılıp üzerine 650 µl izopropanol eklendi. Tekrar alt-üst edildikten sonra 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından aşağıdaki 3 solüsyon tek tek ilave edildi.

- 320 µl otoklavlanmış distile su (çalkalama),
 - 200 µl 7,5 M amonyum asetat + 10 µl Etidyum Bromür.
- Karışım hazırlanarak homojen hale getirildi.
- 320 µl Fenol/Kloroform (1:1) solüsyonu eklendi.

İlave edildikten sonra alt üst edildi ve 5 dk maksimum hızda santrifüj uygulandı. Süpernatant uzaklaştırılarak pelletin üzerine 1 ml % 96' lık etanol (-20 °C) eklendi. Tekrar alt-üst edildikten sonra 15 dk maksimum hızda tekrar santrifüj edildi. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından pelletin üzerine 500 µl %70' lik etanol eklendi ve 3 dk maksimum hızda santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp plazmit DNA'ların kuruması için 37 °C 20 dk bekletildi. Daha sonrasında 40 µl RNase+H₂O ile çözüldü. Plazmit DNA'ların izole edilip edilmediğinin belirlenmesi için 2,8 µl EtBr içeren %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA örneği, 1 µl 10X yürütme boyası ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa yüklenilmiştir ve 120 voltluk elektrik

alanında yürütüldü. Yürütme sonucunda, tespit edilen plazmit DNA'larının moleküler ağırlıkları belirlendi.

2.2.2. pAnox1'in DNA Baz Dizisi İçin Restriksiyon Analizi

Anoxybacillus gonensis 05S15'ten izole edilen plazmitin restriksiyon analizinin yapılabilmesi için saflaştırılan plazmit bir seri restriksiyon endonükleaz ile kesim reaksiyonuna tabii tutuldu. Kesim reaksiyonları için Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda mevcut olan ve rutin kullanılan endonükleazlar (*Bam*HI, *Nde*I, *Eco*RI, *Nhe*I, *Nco*I, *Bsr*I, *Xho*I, *Hind*III, *Sau*3A, *Sma*I, *Pst*I) seçildi ve her bir kesim 2 kez tekrarlandı.

Yapılan kesim reaksiyonları neticesinde, plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleazlar ile kesilip kesilmediğinin belirlenmesi için, 0,5 µg/ml EtBr içeren %1,5' lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA örneği, 1 µl 10X yürütme boyası ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa yüklenerek 120 voltluk elektrik alanında yürütüldü. Yürütme sonucunda, kesim sonuçları ve oluşan fragmentlerin moleküler ağırlıkları tespit edildi ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntülendi.

2.2.2.1. pAnox1 Fragmentlerinin pUC18 Vektörüne Klonlanması

Elde edilen fragmentler pUC18 klonlama vektörüne T4 DNA ligaz (Promega) enzimi kullanılarak, uygun görülen konsantrasyonlarda ve şartlarda gerçekleştirilerek klonlandı (Tablo 11). 16 °C'de bir gece süresince bekletildi.

Tablo 11. pUC18 vektörüne ligasyon için gerekli olan şartlar

Ligasyon için reaksiyon bileşenleri	Miktar (µl)
10X T ₄ DNA ligaz tampon	1
T ₄ DNA ligaz (1U)	1
pUC18 vektörü (20 ng/µl)	1
Kalıp DNA (9 ng/ µl)	3
ddH ₂ O	4

2.2.3. *E. coli* JM101'e Transformasyon

E. coli JM101 suşu Luria Bertani (LB) Broth besiyerine inoküle edildi ve 37 °C'de 16 saat süresince çoğaltılmaya bırakıldı. Gece kültüründen LB Broth besiyerine 1:100 oranında seyreltilerek OD₆₀₀ nm dalga boyunda konsantrasyonları 0,45–0,55 olana kadar inoküle edildi. OD'si bu aralığa geldiğinde hücreler 4.500×rpm de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı ve sonrasında pelletin üzerine 10 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek pellet çözüldü. Daha sonra hücreler yarım saat buz üzerinde bekletildi ve ardından 4.500×rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 2 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ eklenip ve çözüldü. Elde edilen kompetent hücreler +4 °C'de en az iki saat sonra kullanıma hazır hale geldi. Transformasyonda, Sambrok vd., (1990) tanımlandığı yöntem kullanılarak yapıldı. Kompetent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine 200 µl olacak şekilde eklendi ve üzerlerine 10 µl ligasyon ürünü eklendi. Karışım 30 dakika buz üzerinde inoküle edildi. Süre sonunda 2 dk 42 °C sıcaklık şokuna maruz bırakıldı ve tüpler tekrar buz üzerine alındı. Sonrasında ependorf tüplerine 200 µl LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 120 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda hücreler, petri kaplarında bulunan 50 mg/ml LB-Agar besiyeri üzerine cam baget yardımıyla yayıldı. Petriler 37 °C'de 16 saat süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlardan plazmit izole edildi ve sekansı MacroGen (Hollanda) firmasına analizi için gönderildi.

2.2.4. Ters (invers) PCR ile pAnox1'in Tüm Dizininin Belirlenmesi ve Klonlanması

pAnox1'in tüm baz diziliminin belirlenmesi için ters PCR (inverse PCR) reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen fragment parçalarına ait baz dizilimleri kullanılarak uç kısımlara yakın bölgelerden dış taraflara doğru olacak biçimde, 2 adet primer tasarlandı (Tablo 12).

Tablo 12. Ters PCR için tasarlanan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
ORF1R	5'-CATTCCAggCggATACATATg-3'
ORF4R	5'-AATCgAAAaggTATTgAATATCCAg-3'

Tasarlanan primerler kullanılarak yapılan PCR çalışması, 50 μL 'lik son hacimde (Tablo 13), Bio RAD marka Mj Mini model Personal Thermal Cyclers cihazı kullanılarak aşağıdaki protokol (Tablo 14) uygulanarak gerçekleştirildi.

Tablo 13. Ters PCR için reaksiyon bileşenleri

Bileşen Adı	Miktar (μL)
10X PCR Tamponu	5
MgCl_2 (0,025 M)	4
dNTP (0,001 M)	16
İleri primer (10 μM)	1
Geri primer (10 μM)	1
ddH ₂ O	21,75
<i>Taq</i> DNA polimeraz enzimi	0,25
Kalıp DNA	1

Tablo 14. Ters PCR protokolü

Döngü	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Zaman (sn)
1	94	120
	94	50
36	55	60
	72	120
1	72	240
	4	∞

Sonuçlar % 1,5' lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

2.2.4.1. PCR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

Elde edilmiş olan DNA fragmentleri, baz dizilimleri belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın belirlediği şartlar altında ligaz enzimi yardımıyla yapıştırıldı (Tablo 15). Ardından transformasyon ile *E. coli* JM101 hücrelerine aktarıldı.

Tablo 15. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon şartları

Tepkime bileşenleri	Miktar (μl)
10X T4 DNA ligaz tampon	1
Kalıp DNA	3
pGEM-T Easy klonlama vektörü	1 (1:1)*
T4 DNA ligaz enzimi (1 U)	1
ddH ₂ O	4

* 1:1 oranında sulandırılmış

2.2.4.2. pAnox1'in Tüm Dizininin Elde Edilmesi

DNA fragmentinin pGEM-T vektörüne klonlanmasının ardından pAnox1 plazmitinin 1592 bp olan tüm baz dizisi ortaya çıkarılmış oldu.

2.2.5. Biyoinformatik Analizler

pAnox1 plazmitinin tüm baz dizini elde edildikten sonra mevcut ticari programların yanı sıra birçok ücretsiz biyoinformatik yazılım ve araç kullanılarak analizler yapıldı. SnapGene Viewer (URL-11), FastPCR 6.1.53.beta 3 (Kalendar vd, 2009), Gentle V 1.9.4, BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999) DNA dizin analizlerinde, plazmit haritalarının oluşturulmasında, çalışmalarda kullanılan primerlerin dizayn edilmesinde kullanıldı. Clustal (URL-12), Blast (URL-13) programları dizi hizalamalarında kullanıldı. NEBcutter (URL-14) plazmitin restriksiyon enzim analizi için kullanıldı. OriFinder (Gao ve Zhang, 2008) programı ile pAnox1 genomundaki muhtemel ORF bölgeleri belirlendi. Gene Finding Programs (URL-4), REPFIND (URL-5), Online Analysis Tools (URL-6), Repeats, Secondary Structure & Melting Temperature Tools (URL-7), Radar (NCBI) (URL-8)

araçları ile iteronlar, ters ve doğru tekrarlar, palindromlar, transkripsiyon terminatörleri araştırıldı.

2.2.6. Plazmit Stabilité Testi

pAnox1 plazmitinin hücre içi stabilité testi bazı modifikasyonlar ile Ashiuchi ve arkadaşlarının (1999) önerdiği protokole göre yapıldı. İlk olarak pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatından 50 mL'lik LB besiyeri içerisinde tek gecelik kültür inokule edildi. Kültür, *Anoxybacillus* sp. 05S15 izolatının optimum büyüme sıcaklığı olan 55 °C'de 16 saat boyunca geç ekspanensiyal faza ulaşana kadar inkübe edildi. Büyüyen kültürün OD'si 600 nm'de UV-Vis spektrofotometre (Varian Cary 100) aracılığıyla ölçüldü. Ardından kültür 100 kat seyreltilerek tekrar LB besiyerine aynı şartlarda inokule edildi. Jenerasyonların sayısı Zaleski vd. (2006) önerdiği aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$g = (\log (Nt * dil.) - \log No) / \log 2$$

Burada; No: birinci gün büyütülen kültürün OD₆₀₀'de ölçülen başlangıç konsantrasyonunu, Nt: büyütülen kültürün bir sonraki gün OD₆₀₀'de ölçülen konsantrasyonunu, dil.: ise seyreltme oranını ifade etmektedir.

2.2.7. Replikasyon Modunun Belirlenmesi

pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenebilmesi için iki farklı çalışma yapıldı. Yapılan ön çalışmalardan elde edilen biyoinformatik veriler değerlendirildiğinde pAnox1 plazmitinin Teta modeli ve RC replikasyon modellerinden birisine sahip olduğu öngörülmekte idi. Bu durumda, plazmitin replikasyon modunun belirlenebilmesi için transmisyon elektron mikroskopi çalışması ve Southern hibridizasyon deneyleri yapıldı.

2.2.7.1. TEM (Transmisyon Elektron mikroskobisi) Analizi ile Replikasyon Modunun Belirlenmesi

Numunelerin hazırlanmasında, Burkardth vd. geliştirdiği (1978) metot değiştirilerek kullanıldı.

pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenmesi için, plazmiti tek noktadan kestiği bilinen *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazları ve kesilmemiş pAnox1 plazmiti kullanıldı. Kesim sonucunda oluşan ara ürünlerin çatalar üretilip üretilmediği, kesilmemiş olan plazmitin de “Teta” benzer yapılar oluşturup oluşturmadığını analiz etmek için elektron mikroskop preparatları hazırlandı.

Kullanılan malzemeler:

- Amonyum Asetat: 0,25 M (pH 7,5)
- Sitokrom C: 1 mg/mL
- Formwar kaplı Grid (100-200 mesh)
- ddH₂O’da hazırlanmış % 4’lük Uranil Asetat Solüsyonu
- Taze hazırlanmış Kurşun Sitrata boyası: Bir miktar su konulur, 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

Her bir preparatın oluşturulması için ilk olarak bir adet ependorf tüpüne konulan 40 µl 250 mM Amonyum Asetat (pH 7,5) üzerine 10 µl plazmit DNA (0,5 ila 5 µg/mL) eklenmiş ve sonrasında 60 saniye bekletildi. Üzerine 1 µl Sitokrom C (1 mg/mL) eklenmesinin ardından birkaç kez alt üst edildi. Bir adet petrinin içine bir parça parafilm konulmuş olup daha sonra hazırlanan karışım parafilm üzerine damlatıldı, ardından petri kapatılarak 60 saniye bekletildi. Gridin formwar kaplı taraf ince pens kullanılarak damlaya değdirildikten sonra 60 saniye bekletildi. Bu işlemleri takiben zaman geçirilmeden alınmış olup, ddH₂O’da hazırlanmış olan Uranil Asetat içerisine gridin formwar tarafı daldırıldı. 60 saniye bekletilmesinin ardından çıkarıldı ve sonrasında kurutma kâğıdı yardımıyla Gridin kenarından fazla boyası alındı. Grid’teki kalan boyanın yıkanması için 5-10 saniye steril ddH₂O içerisine daldırılıp çıkartıldıktan sonra fazla sıvı kurutma kâğıdı yardımıyla alındı. Bu işlem 5 kere tekrar edildi ve grid iyice temizlendi. İçine parafilm konuldu ve önceden NaOH kullanımı ile nemi çekilmiş olan petriye 50-200 µl Kurşun Sitrata damlatıldı ve sonrasında gridin formwar tarafı gelecek şekilde damla tanesine değdirilerek 30 dakika süresince boyanması sağlandı. Boyama aşaması ışık almayan bir yerde gerçekleştirildi. Sonrasında grid 0,1 N NaOH yıkama çözeltisinden hızlı bir şekilde geçirildi. Bu işlemlerden sonra ddH₂O ile yıkama işlemine geçilmiş olup, aynı işlem beş kere tekrarlandı ve filtre

kağıdı yardımı ile fazla su alındı. Bu işlemlerden sonra kurutma adımına geçildi. Kurutma daha önce içine 1 veya 2 adet NaOH tanesi konulmuş olan ve ışık geçirmeyen bir petride yapıldı. Petri içine alınan gridlerdeki fazla nem NaOH tanecikleri aracılığı ile tutularak kurutuldu. Bu çalışmada preparatlar her numune için üç tekrarlı olarak hazırlandı. Örnekler ertesi gün Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında TEM altında görüntülendi.

2.2.7.2. Southern Hibridizasyon ile Replikasyon Modunun Belirlenmesi

pAnox1 plazmitinin RC (Rolling circle) tip replikasyona sahip olup olmadığının belirlenebilmesi için Huang ve arkadaşlarının önerdiği yöntem (Huang vd., 2007) göre Southern Blot analizi yapıldı. Bu analize göre eğer plazmit RC tipte replike oluyorsa spesifik ssDNA ara ürünleri oluşturacaktır ve bu ürünler Southern Blot ile tespit edilebilecektir. Bu kapsamda rifampisinli veya rifampisinsiz ortamda büyütülen bakteri kültüründen (pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatı) total DNA izole edildi, izole edilen DNA'lar iki kısma ayrıldı. İlk kısım 37 °C'de 30 dakika S1 Nükleaz ile muamele edilerek ssDNA ara ürünlerinin kesilmesi sağlandı. S1 nükleazla muamele edilen ve edilmeyen örnekler %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak ve denatüre edilmeden naylon membrana aktarıldı. Daha önce biyoinformatik analizler ve deneysel yaklaşımlarla belirlenen ORF3 bölgesinden bir çift primer tasarlandı. Tasarlanan spesifik primerler ile çoğaltılan DNA, firmanın öngördüğü şartlar altında DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche Inc., Mannheim, Germany) kullanılarak işaretlendi ve prob olarak kullanıldı. Ardından hibridizasyon yapılarak sonuçlar elde edildi. Yapılan çalışmanın detayları şu şekildedir:

Anoxybacillus gonensis 05S15 bakterisi, rifampisin içeren ve içermeyen LB besiyerinde çoğaltıldı. Bakterilerin rifampisinli ortamda çoğaltılması için, ilk olarak LB besiyerinde tek gecelik kültür hazırlandı, ertesi gün büyüyen kültürden 600 nm'deki OD değeri 0,1 olacak biçimde taze besiyerine inokülasyon işlemi yapıldı. Kültür 600 nm'deki OD değeri 0,8- 0,9 aralığına ulaşıncaya, kültür iki kısma ayrıldı. İlk kısım aynı şekilde inkübe edilmeye devam edilirken diğer kısma son konsantrasyon 50 mg/L olacak biçimde rifampisin eklendi ve daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyon devam ettirildi. Süre sonunda hücre kültürleri çöktürüldü ve elde edilen pelletlerden Hoflack ve arkadaşlarının

(Hoflack vd, 1997) belirttiği yönteme göre total DNA izolasyonu yapıldı. Kısaca bu yöntem şu şekildedir:

1,5 mL gece kültürü 12000 rpm hızda 3 dakika çöktürüldü, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 300 ml TE tamponu [0,01 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,001 mM EDTA] içerisinde yeniden süspanse edildi. Hücreler, 37 °C'de 1 saat boyunca 100 mg lizozim (Sigma) ile ve ardından 1 saat boyunca 37 °C'de 100 ml N-laurilsarkozin (%5 solution; Sigma) ve 250 mg pronaz ile inkübe edildi. Daha sonra 65 °C'de 10 dakika inkübe edilerek, DNazlar etkisiz hale getirildi. Proteinler, fenol ekstraksiyonu ve ardından kloroform-izoamil alkol ekstraksiyonu ile uzaklaştırıldı. DNA, izopropanol-NaClO₄.H₂O ile çöktürüldü ve %70 etanol ile yıkandı (Hoflack vd., 1997). İzole edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. S1 nükleaz ile kesim yapılmak üzere muhafaza edildi.

S1 nükleaz enzimi tek zincir DNA'ları kesen bir enzimdir. Bu çalışmada saflaştırılan DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçüldü. Ölçüm sonucuna göre rifampisinli ortamda büyütülen DNA'nın konsantrasyonu 1285 ng/μl, rifampisinsiz ortamda büyütülen DNA'nın konsantrasyonu ise 1877 ng/μl olarak belirlendi. İzole edilen her iki DNA'dan bir miktar alınarak S1 nükleaz (Invitrogen, 18001016) aşağıdaki Tablo 16'da belirtildiği oranlarda firmanın öngördüğü şartlar altında 37 °C'de 10 dakika olacak şekilde kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 16. S1 Nükleaz kesim işlemi protokolü

Bileşen Adı	Rif (+) DNA'ya uygulanan S1 nükleaz kesim bileşenleri	Rif (-) DNA'ya uygulanan S1 nükleaz kesim bileşenleri
Kalıp DNA	14,6 μl	10 μl
Tampon	3 μl	3 μl
S1 nükleaz	5,8 μl	4 μl
NaCl (50 mM)	3,3 μl	3,3 μl
ddH ₂ O	3,3 μl	9,7 μl
Toplam	30 μl	30 μl

Kesim reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler sonraki aşamada kullanılmak üzere muhafaza edildi.

pAnox1 plazmit genomunda ORF3 bölgesinden 587 ila 802 bp arasındaki bölge (Tm sıcaklığı 62 °C) prob olarak kullanılmak üzere ORF-3F ve ORF-3R primerleri (Tablo 18) kullanılarak aşağıda belirtilen reaksiyon şartları altında PCR ile çoğaltıldı (Tablo 17).

Tablo 17. pAnox1 plazmit genomunda ORF3 bölgesinin PCR şartları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (° C)	Zaman (sn)
1	94	120
	94	15
36	55	20
	72	30
1	72	420
	4	∞

PCR sonrası, agaroz jel elektroforezi ile 202 bp'lik prob olarak belirlenen bölgenin amplifiye edildiği teyit edildi. Elde edilen PCR ürünü, GeneJET PCR pürifikasyon kiti (Thermo Scientific, K0701) ile firmanın öngördüğü koşullar altında temizlendi ve NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile konsantrasyonu belirlendi.

Prob DNA'nın Digoxigenin-11-dUTP ile işaretlenmesi için DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, 11585614910) kiti kullanıldı. İlk olarak 1 µg kalıp DNA (16 µl) vidalı ependorflara aktarıldı ve kaynayan suda 10 dakika bekletilerek denatüre edildi, ardından soğuması için hızlı bir şekilde buz/su banyosunun içerisine alındı. Denatüre edilmiş DNA üzerine 4 µl DIG-High Prime ilave edildi, vortekslendi ve ardından kısa bir santrifüj yapıldı. Daha sonra 1 gece (yaklaşık 16 saat) 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 65 °C'de 10 dk bekletilerek reaksiyon durduruldu. İşaretlenen prob, kullanıma kadar -20 °C'de saklandı.

DNA blotlama işlemi, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) cihazı ile gerçekleştirildi. DNA blotlama için, rifampisinli ortamda çoğaltılan bakteriden izole edilen DNA'nın, S1 nukleaz ile kesim yapılmamış (1) ve kesim yapılmış hali (2); rifampisin içermeyen ortamda çoğaltılan bakteriden izole edilen DNA'nın, S1 nukleaz ile kesim yapılmış (3) ve kesim yapılmamış hali (4) kullanıldı. Bu dört DNA ürünü, 6 mm kalınlığında olacak şekilde hazırlanan %0,7'lik agaroz jele yüklendi, 0,5X TBE tamponunda yaklaşık 30

dakika 120 voltta koşturuldu. Blotlama işlemi yapılana kadar 0,5X TBE tamponunda muhafaza edildi.

Blotlamanın yapılacağı transfer membran (Zeta-Probe GT membrane, Bio-Rad) ve Ekstra Kalın Blotlama Kâğıtları (2 adet), agaroz jel boyutuna göre kesildi, transfer membranı ve blotlama kağıtları 30 dakika 0,5X TBE tamponunda bekletildi.

Transfer sandviç modelini oluşturmak için, blotlama kâğıtlarından biri tampondan çıkarıldı, fazla tampon akıtıldıktan sonra blotlama cihazının platinyum anodu üzerine yerleştirildi. Temiz bir cam pipet blotlama kâğıdının üzerinde yukardan aşağı, sağıdan sola doğıru çevrilerek, blotlama kağıdının altında kalan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağılandı. Blotlama kâğıdının üzerine transfer membranı yerleştirildi ve cam pipet ile yine hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Transfer membranının üzerine agaroz jel (kuyuların olduğı taraf yukarıda olacak şekilde) yerleştirildi ve hava kabarcıkları yine uzaklaştırıldı. Agaroz jel üzerine tamponla ıslatılan diğıer blotlama kâğıdı yerleştirildi ve hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Hazırlanan transfer sandviçinin üzerine 15 ml 0,5X TBE tamponu dökölerek transfer sandviçi tampon ile doyuruldu. Platinyum anot üzerindeki aşırı tampon uzaklaştırıldı ve transfer sandviçin üzerine blotlama cihazının üst çerçevesi yerleştirildi. 10 dakika 142 mA'de (agaroz jelin 1 cm²'si için 3,55 mA uygulanacak şekilde) blotlama işleme yapıldı.

Fiksasyon ve hibridizasyon işlemleri DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, 11585614910) kullanılarak gerçekteştirildi. Blotlama sonrası transfer sandviçindeki transfer membranı 2X SSC içerisine daldırılıp kısaca yıkandıktan sonra 80 ° C'de vakum altında fırınılandı. Aşağıdaki formöl kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda hibridizasyon sıcaklığıının 42 °C olacağı belirlendi.

$$Tm = 49,82 + 0,41 (\% G + C) - \left(\frac{600}{l} \right) \quad [l = \text{baz çiftlerinde hibrit uzunluğı}]$$

$$Topt. = Tm - 20 \text{ to } 25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Uygun hacimde DIG Easy Hyb tamponu (10 ml/100 cm² filtre) hibridizasyon sıcaklığıında (42 °C) önceden ısıtıldı. Transfer membranı ısıtılmış DIG Easy Hyb tamponu ile 30 dakika ön-hibridizasyonu yapıldı (uygun bir kapta çalkalayarak). DIG etiketli DNA probu (yaklaşık 25 ng/ml) 5 dakika kaynatıldı ve buz/su içinde hızla soğıtarak denatüre edildi. Önceden ısıtılmış DIG Easy Hyb tamponuna (3,5 ml/100 cm² membran) denatüre DIG etiketli DNA probu eklendi ve iyice karıştırıldı. DIG Easy Hyb tamponu ile ön-hibridizasyonu yapılan transfer membranının içerisinde bulunduğı ön hibridizasyon

solüsyonu boşaltıldı ve membrana prob/DIG Easy Hyb tampon karışımı eklendi. Hibridizasyon fırınında 42 °C'de 14 saat inkübe edildi. Hibridizasyon sonrası 25 °C'de 2X SSC, %0,1 SDS'de sabit çalkalama altında iki kez 5 dakika yıkandı. 0,5X SSC, %0,1 SDS'de (yıkama sıcaklığına önceden ısıtılmış) sabit çalkalama altında 65- 68 °C'de iki kez 5 dakika yıkandı.

İmmünolojik tespit işleminde şu tamponlar kullanıldı:

- Yıkama tamponu: 100 mM Maleik asit, 150 mM NaCl; pH 7,5 (20 °C); %0,3 (v/v) Tween 20.
- Maleik asit tamponu: 100 mM Maleik asit, 150 mM NaCl; NaOH (katı) ile pH 7,5'e (20 °C) ayarlandı.
- Antikor solüsyonu: Anti-Digoxigenin-AP (Kitte mevcut), Bloklama solüsyonunda 1:5.000 (150 mU/ml) oranında seyreltilerek hazırlandı.
- Tespit tamponu: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5 (20 °C)
- Renkli-substrat çözeltisi: 10 ml tespit tamponuna 200 l NBT/BCIP stok solüsyonu (Kitte mevcut) eklenerek oluşturuldu.
- 10X Bloklama solüsyonunu (Kitte mevcut) 1:10 Maleik asit tamponu ile seyrelterek 1X çalışma solüsyonu hazırlandı.

İmmünolojik tespit işlemi DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, 11585614910) kullanılarak gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve yıkamanın ardından, transfer membranı Yıkama tamponunda kısa bir süre (1-5 dakika) durulandı. Yıkama sonrası transfer membranı 100 ml Bloklama solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra transfer membranı, 20 ml Antikor solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transfer membranı 100 ml Yıkama tamponunda 2 x 15 dakika yıkandı. Yıkama sonrası transfer membran, 20 ml Tespit tamponunda 2-5 dakika dengelendi. Ardından transfer membranı karanlıkta uygun bir kaptaki 10 ml taze hazırlanmış renkli-substrat çözeltisi içinde inkübe edildi ve renk gelişimi beklendi. İstenilen bant yoğunluklarına ulaşıldığında, transfer membranı 5 dakika boyunca 50 ml su ile yıkayarak reaksiyon durduruldu.

2.2.8. Plazmit Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi

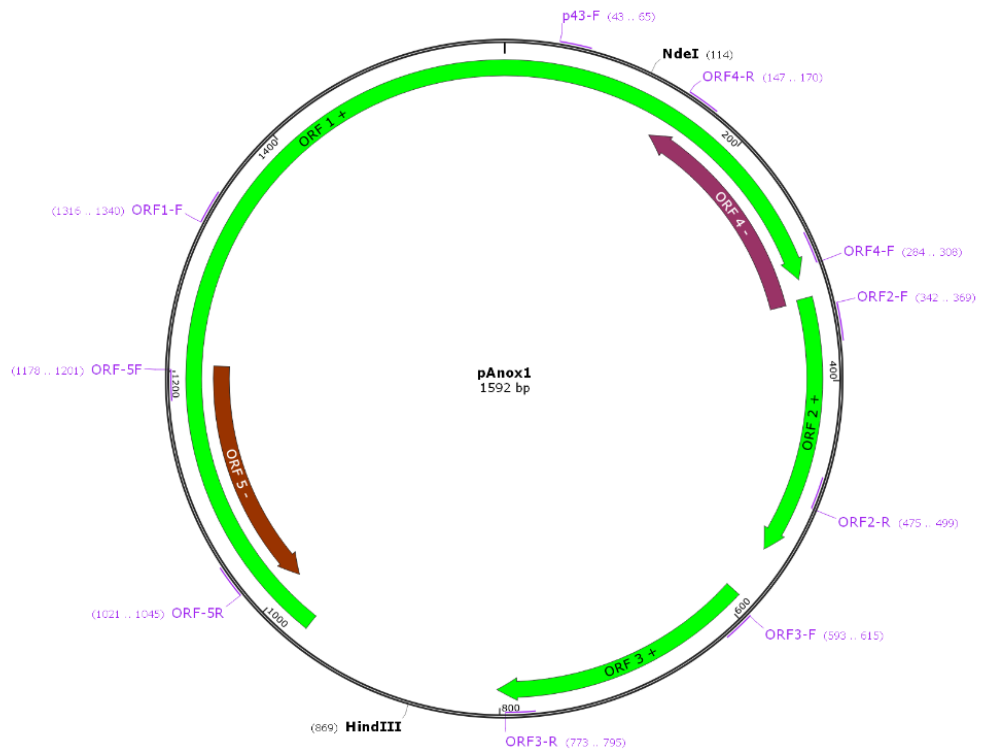
pAnox1 plazmitinden transkript kodlanıp kodlanmadığı, kodlanıyor ise kaç adet transkript olduğunun belirlenebilmesi için ilk olarak biyoinformatik analizler sonucu tespit

edilen beş farklı muhtemel ORF bölgesi (3 adet bir zincirde iken 2 adet karşı zincirde) dikkate alınarak spesifik primerler dizayn edildi (Tablo 18). Primerler dizayn edilirken çakışık ORF'ler ve zıt zincirlerdeki ORF'ler dikkate alınarak bir primerin birden fazla çalışma için kullanılması sağlandı. Bu kapsamda dizayn edilen bir primer herhangi bir ORF'nin ilk zincir cDNA'sını oluşturmak için kullanılabilirken diğer bir ORF için karşı zincir primeri olarak kullanılabilirdi.

Tablo 18. pAnox1 plazmiti transkriptlerinin belirlenebilmesi için dizayn edilen primerler ve özellikleri

ORF adı	Primer ismi	Primer dizisi (5'-3')	Kullanılacağı yer
ORF-1	ORF4-F	gTgTACgTTTCAAgTTATACTgTTC	İlk zincir cDNA oluşturma
	p43-F	CCATgCTATTTTgAACgAAATgC	PCR
	ORF-5R	gTgATgAggTTggAAAAgTCATTTg	PCR
	ORF1-F	CCTATCgTgAgAATATgACAgACAC	PCR
ORF-2	ORF2-R	gTCATCATTATTACgCAAAAAACAC	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF2-F	CACgTATATACgAAAATATATTCgTCAg	PCR
ORF-3	ORF3-R	TTgTTTTCCATTTgCCCCgAAAg	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF3-F	gAACAAATgggCATgACgATCTC	PCR
ORF-4	ORF4-R	AATCgAAAaggTATTgAATATCCA	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF4-F	gTgTACgTTTCAAgTTATACTgTTC	PCR
ORF-5	ORF-5R	gTgATgAggTTggAAAAgTCATTTg	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF-5F	gTTCAAACCTCTTTACTTCgCCA	PCR

Primerler dizayn edilirken her bir muhtemel ORF'nin 3' ucuna yakın birer primer (ilk zincir cDNA'ların oluşturulması için) ve bu primere zıt yönde revers primerler (cDNA'ların PCR ile amplifikasyonu için) dizayn edildi. Şekil 4'te primerlerin plazmit üzerinde bağlandığı bölgeler ve yönleri gösterilmektedir.



Şekil 4. pAnox1 haritası üzerinde primerlerin bağlandığı bölgeler

Dizayn edilen primerlerin çalışıp çalışmadığının kontrol edilmesi için ilk olarak izole edilen pAnox1 DNA'sı kalıp olarak kullanıldı ve PCR yapıldı. Tüm primerlerin çalıştığı teyit edildikten sonra cDNA sentez çalışmasına geçildi. İlk aşamada pAnox1 plazmitinin transkript kodlayan bölgelerinin belirlenebilmesi için total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus gonensis* 05S15 suşu 3 mL LB besiyeri içerisinde 55 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Bir sonraki gün 1:100 oranında 10 mL LB besiyerine ekim yapılarak kültür çoğaltıldı. Logaritmik artış fazında ve durağan fazda olmak üzere bu iki fazda 1,5 mL hücre kültürü 12.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp pelletler saklandı. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pelletinden RNA izolasyonu, TRIzol® Maksimum™ Bacterial RNA Isolation Kiti (Ambion) kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında gerçekleştirildi ve izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçüldü. İstenilen saflıkta ve konsantrasyonda elde edilen örnekler cDNA sentezinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi. Bakteriden izole edilen total RNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla plazmitin her iki zincirinde belirli aralıklarla farklı bölgelerden (her bir ORF bölgesinin 3' uçlarına yakın bölgelerden transkript başlama

bölgeleri olarak) tasarlanılan spesifik primerler kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Primerlerin tasarlanması aşamasında biyoinformatik analizler kullanılarak tespit edilmiş olan beş farklı muhtemel ORF bölgesi dikkate alındı. pAnox1 tarafından kodlanan transkriptlerin 5' uçlarının belirlenmesi için cDNA uçlarının hızlı çoğaltılması (Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)) ve transkriptlerin 3' bölge (3'UTR) dizilerinin belirlenebilmesi için ise, LACE (ligation based amplification of cDNA ends) tekniği kullanıldı.

2.2.8.1. Total RNA İzolasyonu

pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus gonensis* 05S15 suşu 3 mL LB besiyeri içerisinde 55 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Bir sonraki gün 1:100 oranında 10 mL LB besiyerine inoküle edildi, kültür çoğaltıldı. İki farklı fazda (Logaritmik artış fazı ve Durağan faz) 2 mL hücre kültürü 12.000 rpm'de 180 saniye santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant dikkatli bir biçimde uzaklaştırılıp pelletler saklandı. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pelletinden total RNA izolasyonu, TRIzol® Maksimum™ Bacterial RNA Isolation Kiti (Ambion) kullanılarak yapıldı.

1,5 mL bakteri kültürü (1×10^8 hücre) mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpündeki bakteriler 4 °C'de 5 dk boyunca 6.000 xg'de santrifüj edilme sırasında Maksimum Bacterial Enhancement Reagent'da 95 °C'de ısıtıldı. Santrifüjlemenin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti önceden ısıtılmış Maksimum Bacterial Enhancement Reagent'tan 200 µL eklenilip çözüldü ve mikrosantrifüj tüpü 94 °C'de 4 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından lizatın üzerine 1 mL TRIzol® Reaktifi eklenilip iyice homojenize olması sağlandı ve mikrosantrifüj tüpü oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Faz ayrımı kısmına geçildi. İlk olarak 0,2 mL soğuk kloroform eklenilerek 15 sn boyunca vorteks yapıldı ve ardından oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. Ardından örnekler 4 °C'de 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Renksiz olan üst fazdan 400 µL alınarak yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine RNA'nın çökmesi için 0,5 mL soğuk izopropanol eklendi ve karışması sağlandı. Tüp oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitmesinin ardından mikrosantrifüj tüpleri 4 °C'de 15.000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant RNA pelleti bozulmadan dikkatlice uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 mL % 75'lik Etanol eklendi ve 4 °C'de 7500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. RNA pelleti 37 °C'de 20 dk boyunca kurumaya

bırakıldı ve 50 µL RNaz içermeyen (DEPC'li) suda çözöldü. Son olarak 60 °C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından 0,5 µg/ml EtBr içeren %1,5'lik agaroz jel hazırlanıldı. Total RNA'ya DNaz I Kiti (Sigma) uygulandı. 8 µl RNA (1 µg)'ya 1 µl Reaksiyon tamponu ve 1 µl DNaz enzimi eklendi ve 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından 1 µl Stop tamponu eklendi ve 70 °C'de 10 dk inaktivasyona bırakıldı. 5 µl RNA örneği, 1 µl 10X yürütme boyası ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa yüklenerek 120 voltluk elektrik alanında yürütöldü. Total RNA agaroz jelde elektroforezinde göröntöüldü. RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçöldü. İstenilen saflıkta ve konsantrasyonda elde edilen örnekler cDNA sentezinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.8.2. cDNA'nın Sentezi

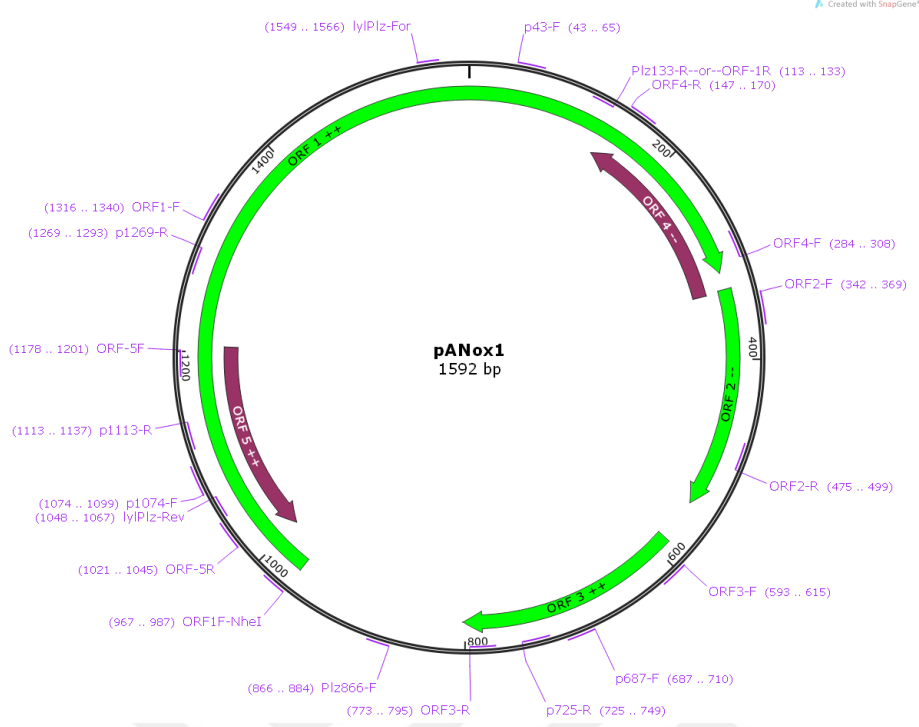
pAnox1 plazmitinden transkript kodlanıp kodlanmadığı, kodlanıyor ise kaç adet transkript olduğunun belirlenebilmesi için ilk olarak biyoinformatik analizler sonucu tespit edilen beş farklı muhtemel ORF bölgesi (3 adet bir zincirde iken 2 adet karşı zincirde) dikkate alınarak spesifik primerler dizayn edildi (Tablo 19).

Primerler dizayn edilirken çakışık ORF'ler ve zıt zincirlerdeki ORF'ler dikkate alınarak bir primerin birden fazla çalışma için kullanılması sağlandı. Bu kapsamda dizayn edilen bir primer herhangi bir ORF'nin ilk zincir cDNA'sını oluşturmak için kullanılabilirken diğer bir ORF için karşı zincir primeri olarak kullanılabilirdi.

Tablo 19. pAnox1 plazmitinin transkriptlerinin belirlenebilmesi için dizayn edilen primerler ve özellikleri

ORF adı	Primer ismi	Primer dizisi (5'-3')	Kullanılacağı yer
ORF-1	ORF4-F	gTgTACgTTTCAAgTTATACTgTTC	İlk zincir cDNA oluşturma
	p43-F	CCATgCTATTTTgAACgAAATgC	PCR
	ORF-5R	gTgATgAggTTggAAAAgTCATTTg	PCR
	ORF1-F	CCTATCgTgAgAATATgACAgACAC	PCR
ORF-2	ORF2-R	gTCATCATTATTACgCAAAAAACAC	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF2-F	CACgTATATACgAAAATATATTCgTCAg	PCR
ORF-3	ORF3-R	TTgTTTTCCATTTgCCCCgAAAag	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF3-F	gAACAAATgggCATgACgATCTC	PCR
ORF-4	ORF4-R	AATCgAAAaggTATTgAATATCCAag	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF4-F	gTgTACgTTTCAAgTTATACTgTTC	PCR
ORF-5	ORF-5R	gTgATgAggTTggAAAAgTCATTTg	İlk zincir cDNA oluşturma
	ORF-5F	gTTCAAACtCTTTTACTTCgCCAag	PCR
	p1113-R	CCTACATTTAgTgTTCTTCCTTTCC	PCR

Primerler dizayn edilirken her bir muhtemel ORF'nin 3' ucuna yakın birer primer (ilk zincir cDNA'ların oluşturulması için) ve bu primere zıt yönde revers primerler (cDNA'ların PCR ile amplifikasyonu için) dizayn edildi. Şekil 5'te primerlerin plazmit üzerinde bağlandığı bölgeler ve yönleri gösterilmektedir.



Şekil 5. Snapgene programında çizilen pANox1 haritasının üzerinde tüm çalışmalarda kullanılan primerlerin bağlandığı bölgelerin gösterimi (URL-11)

İki oryantasyonda beş farklı primer kullanılarak yapılan ilk zincir cDNA sentez protokolünde, hangi primerler kullanılarak ürün elde edildiğinin tespiti ve elde edilen bu ürünlerin olası uzunluklarının tespit edilebilmesi için farklı spesifik primerler tasarlanarak PCR çalışması gerçekleştirildi. PCR çalışmasında kullanılan primerler, ilk zincir cDNA oluşturmak için kullanılan primerlerin zıttı yönünde olacak biçimde, cDNA'ların uzunluklarının tespit edilebilmesi için belirli aralıklarla tasarlandı.

İlk olarak belirlenen her bir ORF bölgesi için ilk zincir cDNA oluşturma primerleri (Tablo 19) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Beş farklı ORF bölgesi için beş farklı primer kullanılarak reaksiyon bileşenleri hazırlandı (Tablo 20).

Tablo 20. cDNA Sentezi Bileşenleri-1

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Total RNA	2	1 µg
Spesifik primer	1	10 µM
DEPC'li ddH ₂ O	9	
Toplam	12	

Buz üzerinde hazırlanan karışım 65 °C de 10 dakika boyunca inkübasyon edildi ve sonrasında buz üzerine alınarak aşağıdaki belirtilen bileşenler karışıma ilave edildi (Tablo 21).

Tablo 21. cDNA Sentezi Bileşenleri- 2

Bileşenler	Miktar(µl)
Önceki bileşen	12
Transkriptor Reverz Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 10x Conc.	4
Protektor Rnaz İnhibitörü (40 U/µl)	1
dNTP Karışımı (10 mM)	2
Transkriptor Reverz Transkriptaz (200 U/µl)	1
Son hacim	20

Ardından hazırlanan karışım hızlı santrifüj işlemi yapılarak bir araya toplandı ve Thermal cycler (Bio-Rad T100) cihazında 55 °C de 30 dakika, sonrasında 85 °C de 5 dakika süresince inkübasyona bırakıldı. Reaksiyondaki bütün aşamalar tamamlandıktan sonra oluşturulan cDNA'lar buz üzerine alındı ve PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere saklandı.

İki oryantasyonda beş farklı primer kullanılarak yapılan ilk zincir cDNA sentez protokolünde, hangi primerler kullanılarak ürün oluşturulduğunun tespiti için tasarlanan spesifik primerler ile (Tablo 20) PCR reaksiyonu kuruldu. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler, ilk zincir cDNA oluşturmada kullanılan primerlerin zıt yönünde olacak biçimde, ilgili bölgelerden transkript kodlanıp kodlanmadığının belirlenebilmesi için belirli aralıklarla tasarlanmıştı. Elde edilen beş farklı cDNA için Tablo 19'da belirtilen primerler kullanılarak PCR çalışması yapıldı. Reaksiyon detayları aşağıdaki gibidir (Tablo 22).

Tablo 22. PCR Bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
5X Taq DNA Polimeraz Tamponu	10
MgCl ₂	3
dNTP Karışım (10 mM)	1
İleri primer (10 µM)	1
Geri primer (10 µM)	1
Kalıp cDNA	2
Taq DNA Polimeraz Enzimi	0,25
ddH ₂ O	31,75
Son hacim	50

Tablo 23. PCR Protokolü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)
1	94	120
36	94	30
	55	40
	72	60
1	72	420
	4	∞

Son olarak yapılan PCR sonucu elde edilen fragmentlerin görüntülenmesi için %1,5'lik agaroz jel kullanıldı. Etidyum bromür ilave edilen jel, 120 Volt'ta yaklaşık 20 dakika yürütüldü ve DNA fragmentleri UV ışığı altında görüntülendi.

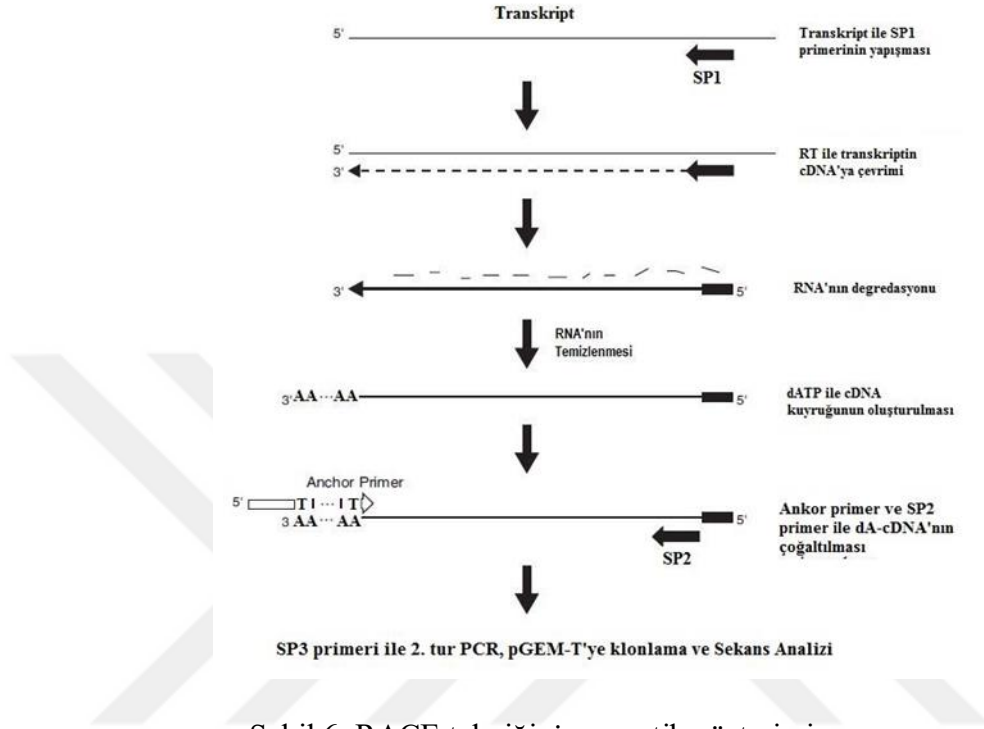
2.2.9. pAnox1'in Transkriptlerinin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi

pAnox1 tarafından kodlandığı belirlenen transkriptlerin 5' ve 3' UTR bölgelerinin belirlenebilmesi için aşağıdaki yöntemler uygulandı.

2.2.9.1. RACE Tekniği ile 5' Uç Belirleme

Önceki çalışmada tespit edilen 3 adet transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 5' uçlarının belirlenebilmesi için RACE tekniği uygulandı. Bu yöntem cDNA uçlarının hızlı çoğaltılmasında, bir transkriptin bilinen internal kısmından bilinmeyen 3' veya 5' uçları

arasındaki nükleik asit dizisinin çoğaltılmasına dayanır. Transkriptin 5' ucunu çoğaltmak için Invitrogen tarafından hazırlanan 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Version 13, Roche) kullanıldı. Bu mekanizma Şekil 6'da özetlenmektedir.



Şekil 6. RACE tekniğinin şematik gösterimi

Transkriptlerin 5' uçlarının belirlenebilmesi için kullanılan SP1, SP2 primerleri (Tablo 24, Şekil 6) tasarlandı. Tasarlanan primerlerden SP1 primerleri pAnox1'in iki zincirinden kodlanan iki transkriptte spesifik olarak bağlanan ve ilk zincir cDNA'ları oluşturmada; SP2 primeri de transkriptlerin internal bölgesine bağlanarak PCR ile 5' uçların çoğaltılmasında kullanıldı.

Tablo 24. RACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri

		Primer Adı	Dizisi (5'-3')	Bağlandığı Bölge
ORF-1	SP1	ORF-1R	CATTCCAggCggATACATATg	133. bp
	SP2	p1269-R	CggTTTACCTTCAAAgTTGTTATTg	1293. bp
ORF-3	SP1	ORF-3R	TTgTTTTCCATTTgCCCCgAAAag	795. bp
	SP2	p725R	CAAgTTTgTTCggCATgTCATCAGC	749. bp
ORF-5	SP1	ORF-5R	gTTCAAACCTCTTTTACTTCgCCAg	1021. bp
	SP2	p1074-F	ggTCACAAAAATgAAgCACATTgTAg	1074. bp

İlk olarak pAnox1 tarafından kodlanan farklı iki zincirdeki transkriptlere SP1 primerleri yapıştırıldı ve ilk zincir cDNA'lar oluşturuldu. Bunun için gerçekleştirilen reaksiyon karışımı (Tablo 25) gösterilmektedir.

Tablo 25. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon bileşenleri-1

Bileşenler	Miktar (µl)
cDNA Sentez Tamponu (5x)	4
dNTP karışımı (10 mM)	2
cDNA Sentez Primeri (SP1-12,5 µM)	1
Total RNA (0,5 µg)	5
Transkriptor Revers Transkriptaz (25 U/ µl)	1
DEPC'li ddH ₂ O	7
Son hacim	20

Hazırlanan karışımdan sonra ependorf tüplerine kısa bir süre santrifüj yapıldı ve Thermal Cycler (Bio-Rad, T100) cihazına yerleştirildi. İlk olarak 55 °C'de 60 dk ve sonrasında enzim inaktivasyonu için 85 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon tamamlandığında elde edilen cDNA'lar PCR Temzileme Kiti (NucleoSpin) ile firmanın belirlediği şartlar altında temizlendi. Temizlenmiş olan ilk zincir cDNA'lara, homopolimerik A kuyruğu ilavesi için Terminal Transferaz enzimi ve dATP bileşenleri eklendi. Uygulaması yapılan protokolün ilk aşaması Tablo 26'da gösterilmektedir.

Tablo 26. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon malzemeleri-2

Bileşenler	Miktar (µl)
Temizlenilen cDNA	19
Reaksiyon tamponu	2,5
2 mM dATP Karışımı	2,5
Terminal Transferaz Enzimi	1
Son hacim	25

Hazırlanılan karışımın ardından ependorf tüplerine hızlı santrifüj yapıldı ve karışım çöktürüldü. Ardından 94 °C’de 3 dk inkübasyon yapıldı ve hemen ardından buz üzerine alındı. Karışım üzerine 1 µl Terminal Transferaz enzimi eklenilip 37 °C’de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Son olarak reaksiyon bittiğinde enzim inaktivasyonu için 70 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı ve ürünler PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere buz üzerine alındı. Poly A kuyruğu eklenmiş olan cDNA parçalarının çoğaltılması için SP2 primeri ve oligo dT-Ankor primeri kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 27’de gösterilmektedir.

Tablo 27. RACE tekniğinde cDNA oluşturma reaksiyon malzemeleri-3

Bileşenler	Miktar (µl)
dA Kuyruğu Eklenilen cDNA	5
Oligo dT-Ankor Primer	1
SP2 Primeri	1
dNTP Karışımı (10 mM)	1
MgCl ₂	3
Taq DNA Polimeraz Tamponu (5X)	10
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,25
ddH ₂ O	28,75
Son hacim	50

Hazırlanan reaksiyon bileşeni kullanılarak Tablo 28’de verilen protokol uygulanarak PCR gerçekleştirildi.

Tablo 28. RACE tekniğinde cDNA’dan PCR için protokol

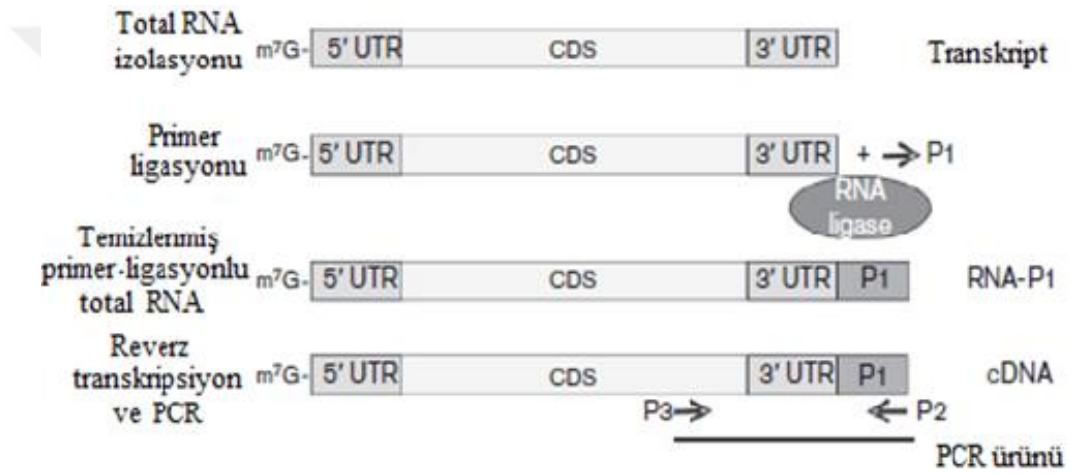
Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)
1	94	120
	94	15
36	55	30
	72	40
1	72	420
	4	∞

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler Etidyum bromür ilaveli %1,5’lik agaroz jel kullanılarak yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Varlığı teyit edilen DNA fragmentleri pGEM-T Easy vektörüne klonlama kitindeki belirtilen prosedür uygulanarak klonlandı. Sekans analizi MacroGen (Hollanda) firması tarafından

yapıldı. Sekans analiz sonuçları Snapgene Viewer (Version 2.2.2.) ve Gentle (Version 1.9.4) programları ile incelendi ve her bir transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 5' uçları belirlendi.

2.2.9.2. LACE Tekniği ile 3' Uç Belirleme

Önceki çalışmalarda tespit edilen üç adet transkriptin 3' uçlarının belirlenebilmesi için LACE (ligation based amplification of cDNA ends) tekniği uygulandı (Frohman vd., 1988; Ince vd., 2013). Şekil 7'de LACE tekniği görsel olarak anlatılmaktadır.



Şekil 7. LACE tekniği şematik gösterimi (Ince vd., 2013)

Yapılan bu çalışmada kullanılan primerlerin bazıları önceki çalışmalarda kullanılan primerlerden seçildi, bazıları ise yeni dizayn edildi. Her bir transkript için ikişer adet P3 primeri kullanıldı. Bu primerlerin her ikisi de ayrı ayrı denendi, daha iyi sonuç alınan ürünler üzerinden klonlama çalışmaları devam ettirildi. Primerlerin detayları Tablo 29'da verilmektedir.

Tablo 29. LACE tekniğinde kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Tipi	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Amacı
(P1)	P1HG	[Phos]gACCACgCgTATCgATgTCgAC(T)15VN	5'ucu fosforillenmiş, bir kısmı P2-HG primerine ters yönde, transkriptin 3'ucuna RNA ligaz yardımıyla birleştirildi. Ayrıca cDNA sentezlemede kalıp olarak kullanıldı.
(P2)	P2HG	ATCgATACgCgTggTC	Ankor primer olarak kullanılan P2HG, primeri, P1HG primerine kısmen komplementerdir. cDNA sentezi P2HG primerinin bağlandığı bölgeden başlar.
(P3)	lylPlz-F p43-F	AAgTCATCgggTTTTATACC CCATgCTATTTTgAACGAAATgC	ORF-1 transkriptinin 3' uçlarının belirlenmesinde kullanıldı.
(P3)	ORF-3F 687-F	gAACAAATgggCATgACgATCTC TgATTATgCCAgCTgTgAATgAgC	ORF-3 transkriptinin 3' uçlarının belirlenmesinde kullanıldı.
(P3)	ORF-5F p1113-3R	gTTCAAACCTCTTTTACTTCgCCAg CCTACATTTAgTgTTCTTCCTTTCC	ORF-5 transkriptinin uçlarının belirlenmesinde kullanıldı

Yukarıda anlatıldığı gibi yapılan metotta, ilk olarak aşağıdaki reaksiyon bileşenleri hazırlandı (Tablo 30).

Tablo 30. LACE tekniğinde kullanılan malzemeler-1

Bileşenler	Miktar (µl)
Total RNA (2 µg/µl)	10
BSA (0,1 mg/mL)	5
RNA Ligaz (10x)	5
ATP (1 mM)	5
P1 Primeri (100 µM)	2
RNA Ligaz (10 U/µl)	6
DEPC içeren ddH ₂ O	7
Son Hacim	40

Karışım hazırlandıktan sonra 16 saat süresince 4-8 °C arasında inkübasyona bırakılarak transkriptlerin 3' uçlarına fosforillenmiş primerler takıldı. Ürünün tamamı alınarak Tablo 31'deki bileşenler karışıma eklendi.

Tablo 31. LACE tekniğinde kullanılan malzemeler-2

Bileşenler	Miktar (µl)
Önceki Toplam Bileşen	40
P2 Primeri (5 µM)	10
dNTP Karışım (2 mM)	20
Son hacim	70

Karışımı hazırladıktan sonra 65 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Buradaki amaç ise, RNA'daki sekonder yapıların açılması sağlandı ve sonrasında hemen buz üzerine alınarak soğutuldu ve elde edilen ürünün tamamı alınarak üzerine Tablo 32' deki bileşenler eklendi.

Tablo 32. LACE tekniğinde kullanılan malzemeler-3

Bileşenler	Miktar (µl)
Önceki toplam bileşen	70
First-strand Tamponu (5X)	20
DTT	5
Rnasin (Promega) (2 U/µl)	1
Superscript RT Enzim (10 U/µl)	4
Son hacim	100

Hazırlanan karışım 55 °C'de 60 dk inkübe edilerek cDNA sentezi yapıldı ve sonrasında enzim inaktivasyonu için 72 °C'de 15 dk bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Oluşan ürünler hemen buz üzerine alınarak sonraki adım olan PCR reaksiyonuna geçildi. Her 3 transkript için elde edilen cDNA'ların 3' uçlarının çoğaltılması için uygulanan PCR bileşenleri ve protokolü sırasıyla Tablo 33 ve 34'te verilmektedir.

Tablo 33. LACE tekniğinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
5X Taq DNA Polimeraz Tamponu	10
MgCl ₂	3
dNTP Karışım (10 mM)	1
P2 primer (10 pmol/ µl)	1
P3 primer (10 pmol/ µl)	1
Kalıp DNA	2
Taq DNA Polimeraz	0,25
ddH ₂ O	31,75
Son hacim	50

Tablo 34. LACE tekniğinde kullanılan PCR protokolü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)
1	94	120
36	94	15
	58	30
	72	45
1	72	420
	4	∞

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler Etidyum bromür ilaveli %1,5'lik agaroz jel kullanılarak yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Varlığı teyit edilen DNA fragmentleri pGEM-T Easy vektörüne klonlama kitindeki belirtilen prosedür uygulanarak klonlandı. Sekans analizi MacroGen (Hollanda) firması tarafından yapıldı. Sekans analizi sonuçları Snapgene Viewer (Version 2.2.2.) ve Gentle (Version 1.9.4) programları ile incelendi ve her bir transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 3' uçları belirlendi.

2.2.10. ORF'lerin Transkript Miktarlarının Belirlenmesi ve mRNA Stabilitesi

Önceki çalışmalarda pAnox1 plazmitinden kodlanan 3 adet transkript (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) olduğu belirlendi ve bu aşamada Bini vd. (2002) önerdiği yöntemle göre 3 transkriptin miktarı ve stabiliteleri belirlendi.

İlk olarak kullanılacak Actinomycin D konsantrasyonu için optimizasyon yapıldı. Literatürde (Bini vd., 2002) çoğu bakteri türleri için 5 µg/mL ve üzeri konsantrasyonda

transkripsiyonun inhibe edildiği bilinmekle beraber, mevcut çalışmada 1 ile 50 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlar kullanılarak denemeler yapıldı. Bu kapsamda 10 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda *Anoxybacillus gonensis* 05S15 suşunun transkripsiyonunun inhibe edildiği belirlendi. Yapılan çalışmalarda optimum konsantrasyon olarak 10 µg/mL Actinomycin D kullanıldı. pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus gonensis* 05S15 suşu 2 mL LB besiyeri içerisinde 55 °C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 1:100 oranında 10 mL LB besiyerine ekim yapılarak, kültür çoğaltıldı. Logaritmik artış fazında 10 µg/mL Actinomycin D kültüre eklenerek inhibisyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol olarak Actinomycin D uygulanmamış kültürler kullanıldı. İnhibisyon işlemi başlatıldıktan sonra 0, 15, 25 ve 30’uncu dakikalarda 2 mL hücre kültürü 12.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek, hücre pelletleri toplandı. Benzer şekilde kontrol hücreleri içinde aynı işlem gerçekleştirildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak, pelletler saklandı. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pelletlerinden RNA izolasyonu TRIzol® Maksimum™ Bacterial RNA Isolation Kiti (Ambion) ile üretici firmanın belirlediği şartlarda gerçekleştirildi. cDNA sentez çalışması yapılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi. cDNA sentezi aşamasında ve sonrasında yapılan qPCR çalışmasında kullanılan primerler ve özellikleri Tablo 35’de verilmektedir.

Tablo 35. pAnox1 plazmitinin transkriptleri için kullanılan primerler ve özellikleri

ORF adı	Primer adı	Primer sırası (5’-3’)	Kullanılacağı yer	Oluşacak ürün
ORF-1	ORF4-F	gTgTACgTTTCAAgTTATACTgTTC	İlk zincir cDNA oluşturma	266 bp
	p43-F	CCATgCTATTTTgAACgAAATgC	PCR	
ORF-3	ORF3-R	TTgTTTTCCATTTgCCCCgAAAag	İlk zincir cDNA oluşturma	210 bp
	ORF3-F	gAACAAATgggCATgACgATCTC	PCR	
ORF-5	ORF-5R	gTgATgAggTTggAAAAgTCATTTg	İlk zincir cDNA oluşturma	181 bp
	ORF-5F	gTTCAAACCTCTTTTACTTCgCCAg	PCR	

4 farklı safhada alınan pelletlerden elde edilen her bir RNA’dan eşit miktarlarda alınarak (1 µg) 3 transkript için toplamda 12 farklı cDNA sentezi RevertAid First Strand

cDNA Synthesis Kit (Thermo K1622) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Aynı işlemler kontrol hücreleri için de gerçekleştirildi.

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak qPCR çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışma iTaq Univer SYBR Green Supermix (Bio-Rad) kiti kullanılarak Bio-Rad CFX96 cihazında üç tekrar olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar cihaz yazılımı ile görselleştirildi ve grafikler hazırlandı.

qPCR çalışmasının son aşamasında melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirildi. Böylece spesifik olmayan bağlanmalar olup olmadığı kontrol edildi.

Üç farklı transkript için dört farklı zamanda alınan örnekler ile yapılan qPCR çalışması sonucu her bir örnek için cihaz yazılımı (Bio Rad CFX Maestro) tarafından C_t değerleri oluşturuldu. C_t değerleri oluşturulurken pozitif kontrol olarak da Actinomycin D uygulanmamış kültürlerden elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Deney gerçekleştirilirken 2 farklı negatif kontrol de çalışmaya dahil edildi (NTC: non-template control ve NG: negatif kontrol).

mRNA'ların yarı ömürlerinin karşılaştırılması için kantitatif PCR kullanılarak Wang ve ark.'larının önerdiği yöntemle göre hesaplama yapıldı. İlk olarak, $N_t = 2^{(C_{t0}-C_{tt})}$ denkleminde göre C_t değerlerinden bağıl kalıp konsantrasyonu (N_t) hesaplandı (t , numune eklendikten sonra t 'nci inkübasyon süresini temsil eder; C_{t0} örneğin eklendiği 0. dakikayı temsil eder; C_{tt} numunenin belirli bir süre yerleştirildikten sonraki C_t değerini temsil eder). K ise konsantrasyonların (N_t) doğal logaritması ile inkübasyon süresi arasındaki doğrusal regresyon denkleminde elde edilen eğimdir.

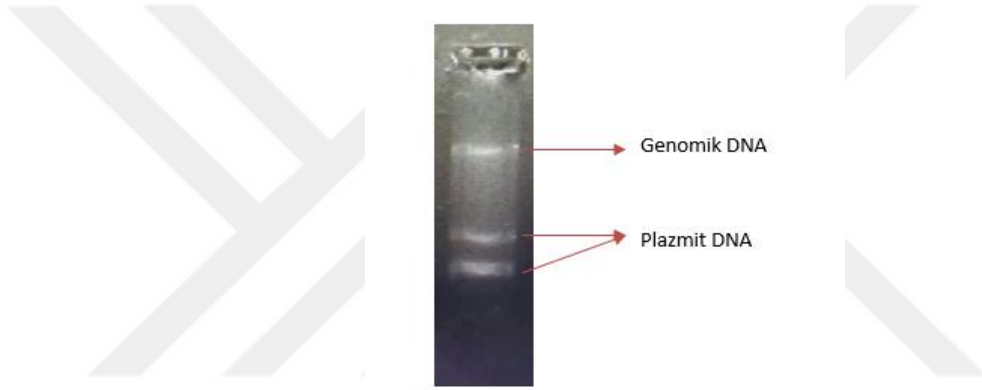
Buna göre transkriptlerin yarılanma ömrü ($T_{1/2}$), Şekil 18'de belirtilen C_t değerleri kullanılarak aşağıdaki denklem eşitliğinde elde edildi (Wang vd., 2002).

$$\frac{T1}{2} = \ln 2 / |k|$$

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 Bakterisinin Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi

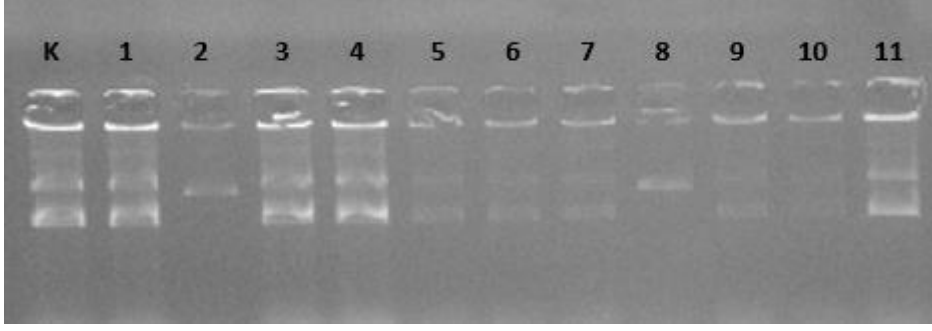
Anoxybacillus gonensis 05S15 izolatının barındırdığı plazmitin izolasyonu için Voskuil ve Chambliss'ın (Voskuil ve Chambliss, 1993) geliştirdiği metot kullanıldı. Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, izolatın 1 adet plazmit içerdiği belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinden plazmit izolasyonu

3.2. pAnox1' in Restriksiyon Analizi

İzole edilen plazmitin restriksiyon analizinin yapılabilmesi için saflaştırılan plazmit bir seri restriksiyon endonükleaz ile kesim reaksiyonuna tabii tutuldu. Kesim reaksiyonları için laboratuvarımızda mevcut olan ve rutin kullanılan endonükleazlar (*Bam*HI, *Nde*I, *Eco*RI, *Nhe*I, *Nco*I, *Bsr*I, *Xho*I, *Hind*III, *Sau*3A, *Sma*I, *Pst*I) seçildi. 2 kez tekrarlanan kesim sonuçlarına göre pAnox1 plazmitini *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon endonükleazlarının tek noktadan kestiği belirlendi (Şekil 9). Yaklaşık 1500 bp civarındaki DNA fragmenti DNA Jel Ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden çıkarıldı.



Şekil 9. pAnox1'in RE'ler ile kesimi. K) Kontrol olarak pAnox1, 1) pAnox1'in *Bam*HI kesim sonucu, 2) pAnox1'in *Nde*I kesim sonucu, 3) pAnox1'in *Eco*RI kesim sonucu, 4) pAnox1'in *Nhe*I kesim sonucu, 5) pAnox1'in *Nco*I kesim sonucu, 6) pAnox1'in *Bsr*I kesim sonucu, 7) pAnox1'in *Xho*I kesim sonucu, 8) pAnox1'in *Hind*III kesim sonucu, 9) pAnox1'in *Sau*3A kesim sonucu, 10) pAnox1'in *Sma*I kesim sonucu, 11) pAnox1'in *Pst*I kesim sonucu

3.3. pAnox1'in DNA Baz Dizininin Belirlenmesi

Yaklaşık 1500 bp civarındaki fragment jelden çıkarıldı ve T4 DNA ligaz (Promega) enzimi kullanılarak pUC18 vektörünün *Nde*I kesim bölgesinden klonlandı. Bir sonraki gün alınan ligasyon ürünleri hazırlanan kompetant *E.coli* JM101 hücresine aktarıldı. Transformasyon işlemi sonucunda oluşan kolonilerden seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen rekombinant plazmit sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi. Elde edilen sekans analizi sonuçları kullanılarak bir çift primer (ORF-1R ve ORF-4R) dizayn edildi (Şekil 4'te primerlerin bağlandığı bölgeler gösterilmektedir). Dizayn edilen primerler kullanılarak plazmitin tamamının invers PCR ile elde edilmesi sağlandı, böylece restriksiyon endonükleaz kesimleri sonucunda genoma ait herhangi bir parçanın kesilmiş ve kaybolmuş olma ihtimali ortadan kaldırılmış oldu. Dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan invers PCR sonucunda elde edilen ürün tekrar sekans analizine gönderilerek tüm genomun baz dizini ortaya çıkarılarak önceki sekans sonuçları ile karşılaştırıldı ve teyit edilmiş oldu. Yapılan dizin analizi sonucunda pAnox1 plazmitinin tüm baz dizini 1592 bp uzunlukta olacak şekilde belirlendi (Ek 1).

3.4. pAnox1'in Biyoinformatik Analizi

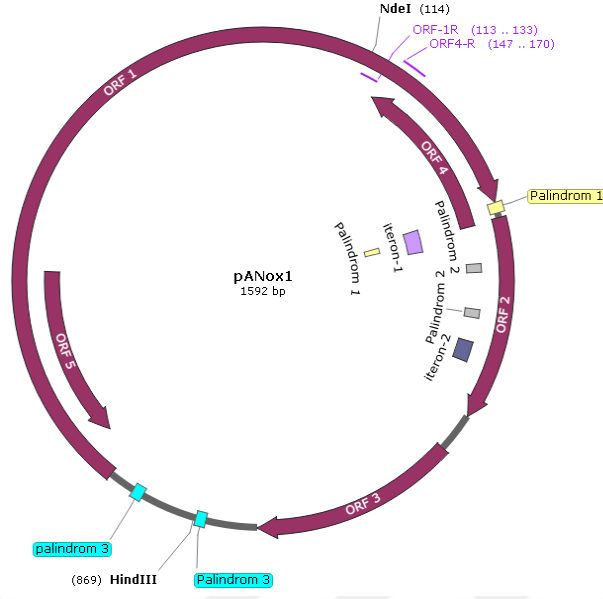
pAnox1 plazmitinin tüm baz dizini elde edildikten sonra çeşitli programlarla yapılan biyoinformatik analizler ile elde edilen sonuçlar Şekil 10'da gösterilmektedir.

SnapGene Viewer 2.2.2. (GSL Biotech. LLC, USA), Gentle V 1.9. 4, BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999), FastPCR 6.1.53.beta 3 (Kalendar vd, 2009) DNA dizin analizlerinde ve plazmit haritalarının oluşturulmasında, çalışmalarda kullanılan primerlerin dizayn edilmesinde ve sekans sonuçlarının analizinde kullanıldı.

NEBcutter (URL-14) programı pAnox1 plazmitinin restriksiyon enzim analizi için kullanıldı. Genom üzerinde tek noktadan kesen 2 farklı restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi (*NdeI* ve *HindIII*) belirlendi (Şekil 10).

OriFinder (Gao ve Zhang, 2008) programı ile pAnox1 plazmit genomunda beş farklı ORF tespit edildi Bunlardan üçü bir zincirde bulunurken diğer ikisi karşı zincirde bulunmaktadır.

Gene Finding Programs (URL-4), REPFIND (URL-5), ONLINE ANALYSIS TOOLS (URL-6), Repeats, Secondary Structure & Melting Temperature Tools (URL-7), Radar (NCBI) (URL-8) araçları ile iteronlar, ters ve doğru tekrarlar, palindrom dizilerine bakıldı ve bunların sonucunda üç farklı bölgede palindrom diziler tespit edildi. Palindrom 1 317-327 bp arası dizileri, Palindrom 2 379-388 bp arası dizileri, Palindrom 3 857-867 bp arası dizileri oluşturmaktadır. Yine 2 farklı bölgede iteron diziler belirlendi. İteron 1 319-353 bp arası dizileri, İteron 2 470-493 bp arası dizileri içermektedir. Bu iteronlar ve palindromik diziler bazı ORF'lerin upstream bölgelerinde bulunmaktadır. Bu tip diziler gibi düzenleyici bölgelerin ORF'lerin upstream bölgelerinde bulunması, bu ORF'lerin replikasyondan sorumlu fonksiyonel proteinler olabilme ihtimalini güçlendirmektedir.



Şekil 10. Snapgene programında çizilen pAnox1 plazmitinin haritası (URL-11)

3.5. Plazmit Stabilite Testi

Anoxybacillus gonensis 05S15 bakterisinin pAnox1 plazmitinin hücre içi stabilite testi Ashiuchi vd. (1999) önerdiği protokole göre yapıldı ve plazmit stabilitesinin belirlenmesinde jenerasyonların sayısı Zaleski vd. (2006) önerdiği aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

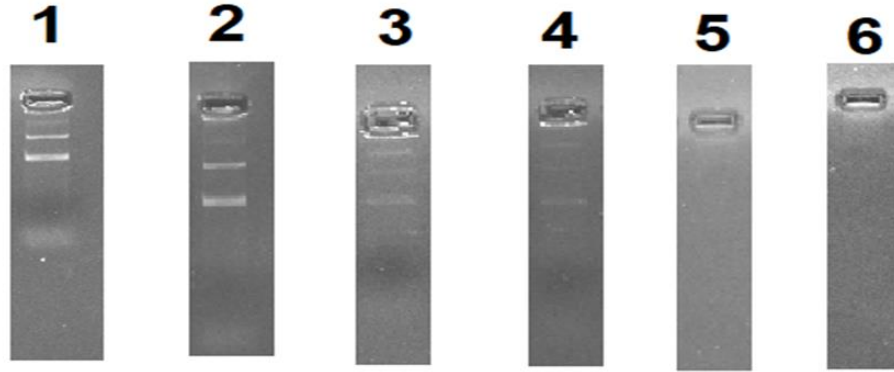
$$g = (\log (N_t * \text{dil.}) - \log N_0) / \log 2$$

Üç tekrarlı olarak yapılan çalışma sonucunda elde edilen spektrofotometrik OD değerleri, yukarıda belirtilen formüle uygulandığında, izolatın jenerasyon süresi pasaj başına yaklaşık 13 olarak bulundu (Tablo 36).

Tablo 36. Jenerasyon süresinin hesaplanması

	N_0	N_t	G
1. Kültür	0,043	2,530	12,52
2. Kültür	0,028	2,343	13,03
3. Kültür	0,034	2,459	12,82
Ortalama			12,79

Bu şekilde alt kültürleri yapılan hücrelerin sırasıyla 26, 52, 78, 104 ve 130. jenerasyonlarından LB besiyerine yayma ekim yapıldı. Yani her iki pasajda bir olmak üzere toplamda beş farklı ekim yapıldı. Ardından kolonileri içeren her bir petriden gecelik kültür yapıldı ve çoğalan hücreler 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen her bir hücre pelleti için Voskuil ve Chambliss'ın (1993) geliştirdiği metota göre plazmit izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonucunda elde edilen ürünler %1,5’ lik agaroz kullanılarak hazırlanan jel elektroforezinde görüntülendi. Etidyum bromür eklenilen jel, 120 Voltta yarım saat yürütüldü ve elde edilen DNA fragmentleri UV ışığı altında sonuçları görüntülendi. Yapılan çalışmanın izolasyon sonuçlarına göre izolatın 26, 52, 78 ve 104. jenerasyonlarında yani izolatın 8. pasajında plazmit içerdiği belirlendi ve bu yüzden pasajlamaya devam edildi. 130 ve 156. jenerasyonlar içinde aynı çalışma devam ettirildi ve 130. jenerasyondan itibaren plazmitin stabilitesini kaybettiği ve yapılan plazmit izolasyonu sonuçlarında agaroz jelde artık görülmediği tespit edildi (Şekil 11).



Şekil 11. Plazmit izolasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi. 1: 26. jenerasyondan elde edilen plazmit DNA, 2: 52. jenerasyondan elde edilen plazmit DNA, 3: 78. jenerasyondan elde edilen plazmit DNA, 4: 104. jenerasyondan elde edilen plazmit DNA, 5, 6: 130. ve 156. jenerasyondan elde edilen plazmit DNA izolasyon sonucu

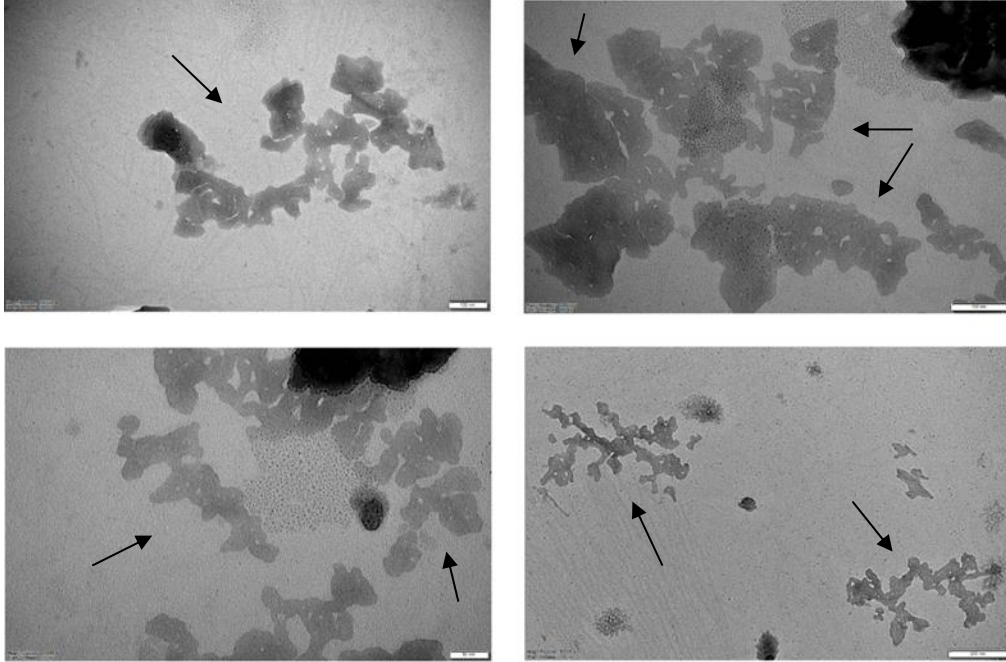
Ayrıca plazmitin tamamen elimine olup olmadığından emin olabilmek adına agaroz jel elektroforezine ek olarak, yapılan plazmit izolasyonlarından spesifik bölgeler için dizayn edilen primerler (Tablo 20) kullanılarak PCR yapıldı. Yapılan PCR çalışması sonucunda da izolatın 130. jenerasyonundan sonra yapılan plazmit izolasyonlarından herhangi bir PCR ürünü elde edilmedi. PCR sonuçları stabilite testi sonuçlarını destekledi.

3.6. Replikasyon Modunun Belirlenmesi

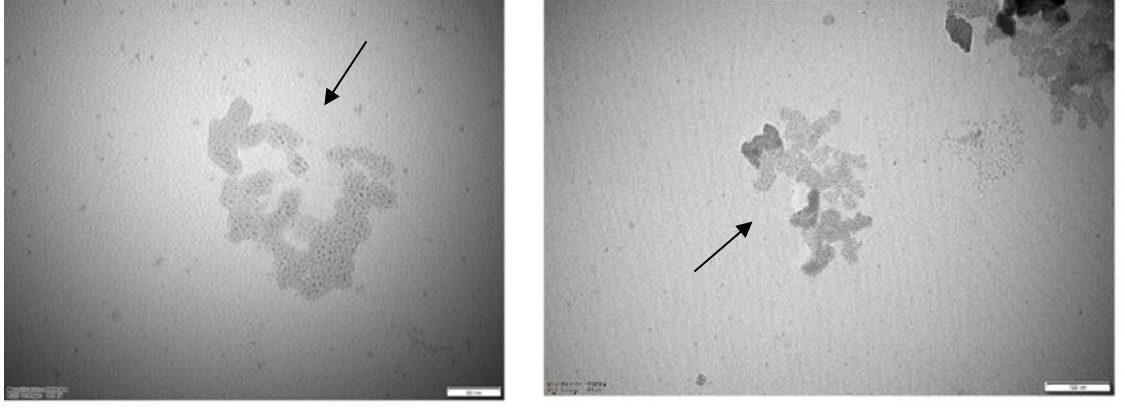
pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenebilmesi için transmisyon elektron mikroskopi çalışması ve Southern hibridizasyon çalışması yapıldı.

Numunelerin hazırlanmasında, Burkardth vd. geliştirdiği (1978) metod değiştirilerek kullanıldı.

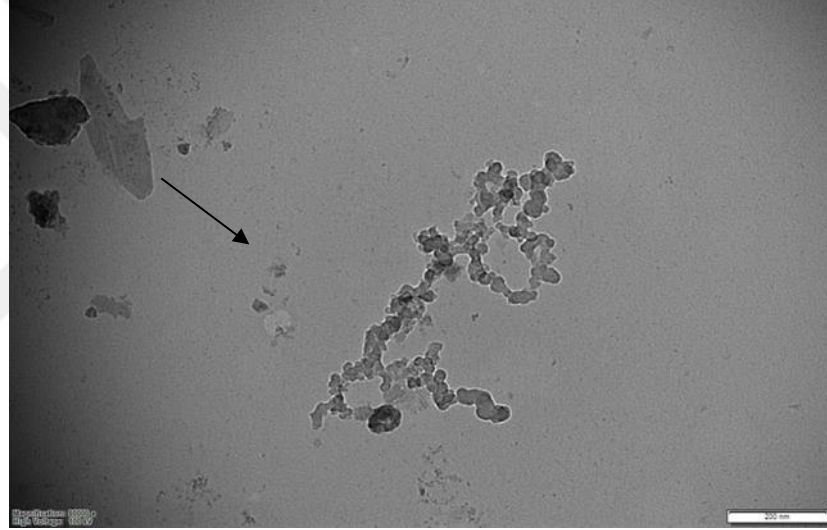
pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenmesi için, plazmiti tek noktadan kestiği bilinen *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazları ve kesilmemiş pAnox1 plazmiti kullanıldı. Kesim sonucunda oluşan ara ürünlerin çatallar üretip üretmediği, kesilmemiş olan plazmitin de “Teta” benzer yapılar oluşturup oluşturmadığını analiz etmek için elektron mikroskop preparatları hazırlandı. Bu çalışmada preparatlar her numune için üç tekrarlı olarak hazırlandı. Örnekler ertesi gün Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında TEM altında görüntülendi. Yapılan kesim reaksiyonu neticesinde oluşan ara ürünlerin çatallar üretmediği, kesilmemiş olan plazmitin de “Teta” benzer yapılar oluşturmadığı sonucu gözlemlendi. Her bir numuneden birden fazla olmak üzere toplam 33 görüntü elde edildi. Bu kapsamda elde edilen görüntülerden bazıları seçilerek Şekil 12, 13, 14’ de verilmektedir.



Şekil 12. pAnox1 plazmitinin kesilmemiş formunun TEM görüntüleri



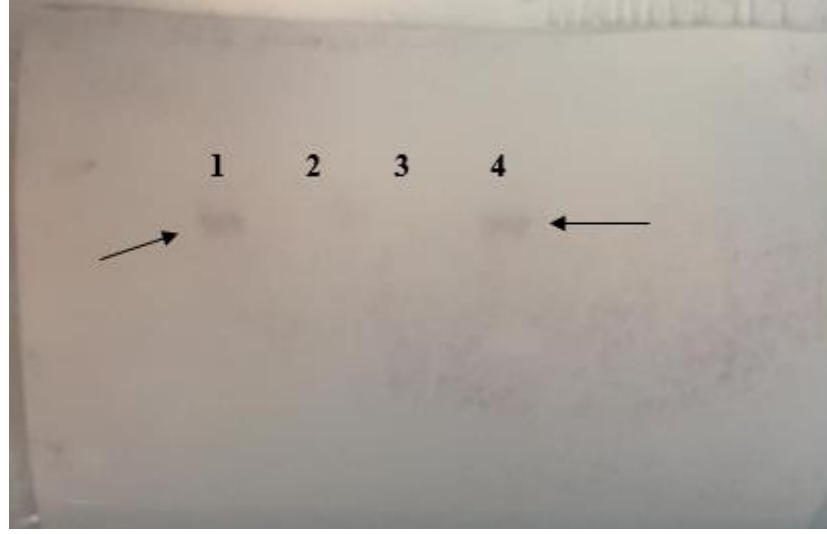
Şekil 13. pAnox1 plazmitinin *NdeI* restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş formunun TEM görüntüleri



Şekil 14. pAnox1 plazmitinin *HindIII* restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş formunun TEM görüntüsü

İncelemeler neticesinde kesilmemiş pAnox1 plazmiti kullanılarak hazırlanan örnekte Teta harfine benzer yapılar olmadığı görüldü (Şekil 12). Ayrıca *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazlarıyla kesilmiş pAnox1 örneğinde de literatürde bahsedilene benzer “Y” şeklinde yapılar görülmediği belirlendi (Şekil 13 ve 14). Her bir örnek için hazırlanan üç grid’den de benzer görüntüler elde edildi. Yapılan incelemeler hep birlikte değerlendirildiğinde plazmitin teta formuna sahip olmadığı, plazmit üzerindeki katlanmalar ve kıvrımlar da dikkate alındığında RC tipe daha yakın olduğu sonucuna varıldı. Ancak RC tipte olup olmadığının kesin olarak belirlenebilmesi için Southern hibridizasyon yöntemi gerçekleştirildi.

pAnox1 plazmitinin RC tip replikasyona sahip olup olmadığının belirlenebilmesi için Huang ve arkadaşlarının önerdiği yönteme (Huang vd., 2007) göre Southern Blot analizi yapıldı. Yapılan Southern Blot analizinde DNA'lar denatüre edilmeden kullanılarak sadece oluşan tek zincir DNA'ların tespit edilebilmesi sağlandı. Çünkü RC tip replikasyon mekanizmasında replikasyon ara ürünleri (tek zincir DNA'lar) oluşur (Del Solar, 1998) ve uygun bir prob ile hibridize olur. Bu kapsamda, hem rifampisinli ortamda hem de rifampisinsiz ortamda çoğaltılan bakterilerden izole edilen DNA'lara S1 nükleaz uygulanarak plazmit replikasyonu sürecinde RC replikasyon ara ürünleri olarak oluşan ssDNA'lar varsa bunların degrade edilmesi sağlandı. ssDNA'ları degrade edilen DNA'ların hazırlanan proba hibridize olmadığı ve jel üzerinde herhangi bir sinyal alınmadığı belirlendi. Diğer yandan S1 nükleaz uygulanmayan ve ssDNA'ları içeren DNA örneklerinin proba hibridize olduğu ve güçlü bantlar oluşturduğu (Şekil 15), bunun sonucunda da pAnox1 plazmitinin RC mekanizmasında oluşan replikasyon ara ürünlerini (ssDNA) ihtiva ettiği belirlenmiş oldu. pAnox1 plazmitinin replikasyon sürecinde ssDNA ara ürünleri oluşturması ve bu ürünlerin hazırlanan tek zincirli proba hibridize olarak sinyal vermesi sonucunda plazmitin RC replikasyon moduna sahip olduğu belirlenmiş oldu. Ayrıca bakteri, rifampisin uygulaması ile besiyerinde büyütüldüğünde, pozitif sinyalin daha yoğun olduğu görüldü. Bu sonuç, pAnox1 plazmitinin ssDNA ara ürünlerinin rifampisin varlığında biriktiğini gösterdi. Genellikle bu antibiyotiğin RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği ve ssDNA'dan dsDNA'ya dönüşümü engellediği bilinmektedir (Leenhouts vd., 1991). Bu nedenle, konak tarafından kodlanan RNA polimerazın, plazmit replikasyonu sırasında ssDNA'nın dsDNA'ya dönüştürülmesinde rol oynadığı sonucuna da varıldı. Sonuçlar ıslak transfer membranının taraması yapılarak belgelendi (Şekil 15).

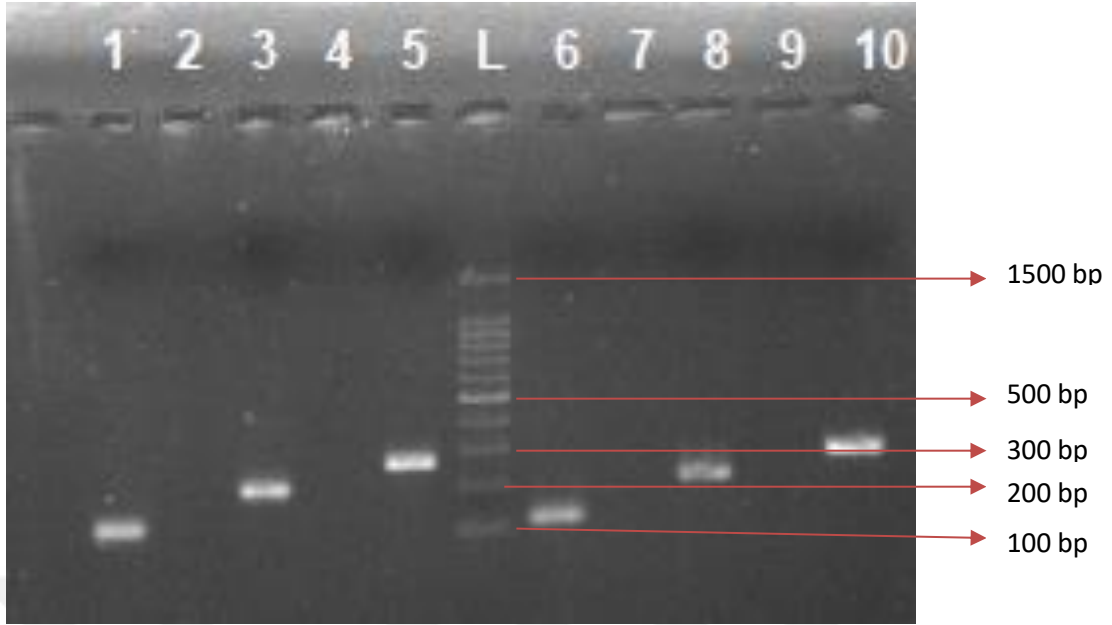


Şekil 15. Southern hibridizasyon analiz sonuçları. 1: S1 nukleaz ile kesim yapılmayan rifampisin (+) DNA, 2: S1 nukleaz ile kesim yapılan rifampisin (+) DNA, 3: S1 nukleaz ile kesim yapılan rifampisin (-) DNA, 4: S1 nukleaz ile kesim yapılmayan rifampisin (-) DNA

3.7. Plazmit Tarafından Kodlanan Transkriptlerin Belirlenmesi

pAnox1 plazmitinden kodlanan transkriptlerin belirlenebilmesi için, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 total RNA'ları izole edilmiş idi. Bu kapsamda konak total RNA'sı, hücrelerin iki farklı fazındaki transkript içerikleri bakımından karşılaştırılabilmesi için hem log fazında (12. saat) hem de durağan fazda (18. saat) izole edildi. Bakteri total RNA'sının kalıp olarak kullanılması ile plazmitin her iki zincirinde belirli aralıklarla farklı bölgelerden (her bir ORF bölgesinin 3' uçlarına yakın bölgelerden transkript başlama bölgeleri olarak) tasarlanan spesifik primerler ile cDNA sentezi yapıldı.

İki oryantasyonda beş farklı primer kullanılarak yapılan ilk zincir cDNA sentez prosedüründe, hangi primerlerle ürün oluşturulduğunun tespiti için dizayn edilen spesifik primerler ile (Tablo 19) PCR çalışması gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar %1,5'lik agaroz jelde elektroforoze tabi tutuldu ve Şekil 16'da verilen sonuçlar elde görüntülendi.



Şekil 16. pAnox1 transkriptlerin cDNA'larının PCR ile çoğaltılması neticesinde elde edilen PCR sonuçları. Log fazı: 1) ORF5 için ORF5-R/p1113-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 2) ORF4 için ORF4-F/ORF4-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 3) ORF 3 için ORF3-R/ORF3-F primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 4) ORF2 için ORF2F/ORF2-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 5) ORF1 için p43-F/ORF4-F primerleri ile elde edilen PCR ürünü; Durağan faz: 6) ORF5 için ORF5-R/p1113-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 7) ORF4 için ORF4-F/ORF4-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 8) ORF 3 için ORF3-R/ORF3-F primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 9) ORF2 için ORF2F/ORF2-R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, 10) ORF1 için p43-F/ORF4-F primerleri ile elde edilen PCR ürünü; 100 bp DNA Ladder (TransGen Biotech)

Yapılan çalışma sonucunda pAnox1 plazmitinin 3 adet transkript kodladığı belirlendi, elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri pAnox1 haritası üzerinde belirlenen primer bağlanma noktaları kullanılarak hesaplandı ve teyit edildi. Transkriptlerin ortalama büyüklükleri ORF1 için 265 bp büyüklüğünde bant, ORF3 için 202 bp büyüklüğünde ve ORF5 için ise 116 bp büyüklüğünde bant elde edildi. Hem durağan fazda hem de logaritmik artış fazında plazmit tarafından kodlanan transkriptlerin aynı olduğu belirlendi. Buna göre aynı oryantasyonda bulunan ORF-1 ve ORF-3, karşı oryantasyonda bulunan ORF-5'in transkript kodladığı sonucu elde edildi. Sonraki çalışmalar tespit edilen bu üç transkript bölgesi üzerinden devam ettirildi.

3.8. pAnox1'in Transkriptlerinin 5' ve 3' Uçlarının Belirlenmesi

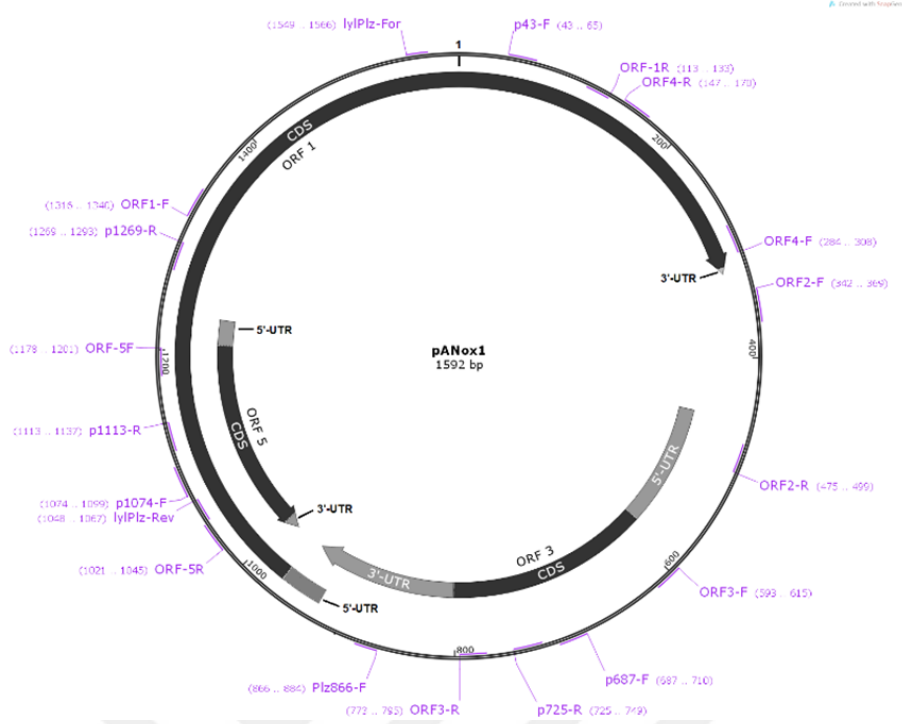
pAnox1 tarafından kodlanan transkriptlerin 5' uçlarının belirlenmesi için RACE tekniği, 3' uçlarının belirlenmesi içinde LACE tekniği kullanıldı.

Önceki çalışmada tespit edilen 3 adet transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 5' uçlarının belirlenebilmesi için RACE tekniği uygulandı. 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 tekrardan ilk zincir cDNA'lar oluşturuldu, ardından oluşturulan cDNA'lar saflaştırıldı, sonrasında homopolimerik kuyruk eklendi ve hedef cDNA'lar PCR ile çoğaltıldı ve PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler, Etidyum bromür ilaveli % 1,5' lik agaroz jel kullanılarak yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Varlığı teyit edilen DNA fragmentleri pGEM-T Easy vektörüne klonlama kitindeki belirtilen prosedür uygulanarak klonlandı. Sekans analizi MacroGen (Hollanda) firması tarafından yapıldı.

Sekans analiz sonuçları Snapgene Viewer (Version 2.2.2.) ve Gentle (Version 1.9.4) programları ile incelendi ve her bir transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 5' uçları belirlendi. Detaylı gösterim Şekil 16'da verilmektedir.

Önceki çalışmada tespit edilen 3 adet transkriptin 3' uçlarının belirlenebilmesi LACE tekniği uygulandı (Frohman vd., 1988; Ince vd., 2013). LACE tekniğinde, ilk aşamada 5' ucu fosforillenmiş bir primer (P1) ilgili transkriptin 3' ucuna RNA ligaz yardımıyla birleştirildi. Ardından P1 primerine komplementer olan ters yönde başka bir primer (P2), P1 primerine bağlanır ve reverz transkripsiyon ile cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA üçüncü bir primer (P3) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler, % 1,5'lik agaroz kullanılarak yapılan jel elektroforezi ile görüntülendi. Etidyum bromür ilave edilen jel, 120 Voltta yaklaşık 20 dk yürütüldü ve DNA fragmenti UV ışığı altında görüntülendi. Varlığı teyit edilen DNA fragmentleri pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak (Promega), pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. DNA dizisi sekansı MacroGen (Hollanda) firmasında analiz edildi.

Dizi analiz sonuçları Snapgene Viewer (Version 2.2.2.) ve Gentle (Version 1.9.4) programları ile incelendi ve her bir transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) 3' uçları belirlendi. Detaylı gösterim Şekil 17' de verilmektedir.



Şekil 17. pAnox1 transkriptlerinin UTR bölgeleri ile beraber gösterimi

Yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde, pAnox1 plazmiti üzerinde önceden biyoinformatik yöntemler ile belirlenmiş olan beş muhtemel ORF bölgesinden üçünün fonksiyonel olduğu tespit edildi. Bu ORF'ler sırasıyla aynı zincir üzerinde bulunan ORF-1 ile ORF-3 ve karşı zincirden kodlanan ORF-5'tir. Transkript ürettiği belirlenen ORF'lerin başlangıç ve bitiş noktalarının belirlenebilmesi için bu kapsamda transkriptlere RACE ve LACE teknikleri uygulandı. Yapılan bu çalışmaların sonucunda da her bir transkriptin 5' ve 3' uçlarının sınırları belirlendi. pAnox1 tarafından kodlanan ORF1 transkriptinin 1016. bazda başladığı ve 326. bazda sonlandığı, ORF3 transkriptinin 456. bazda başladığı ve 954. bazda sonlandığı, ORF5 transkriptinin ise 1232. bazda başladığı ve 1022. bazda sonlandığı ortaya çıkarıldı.

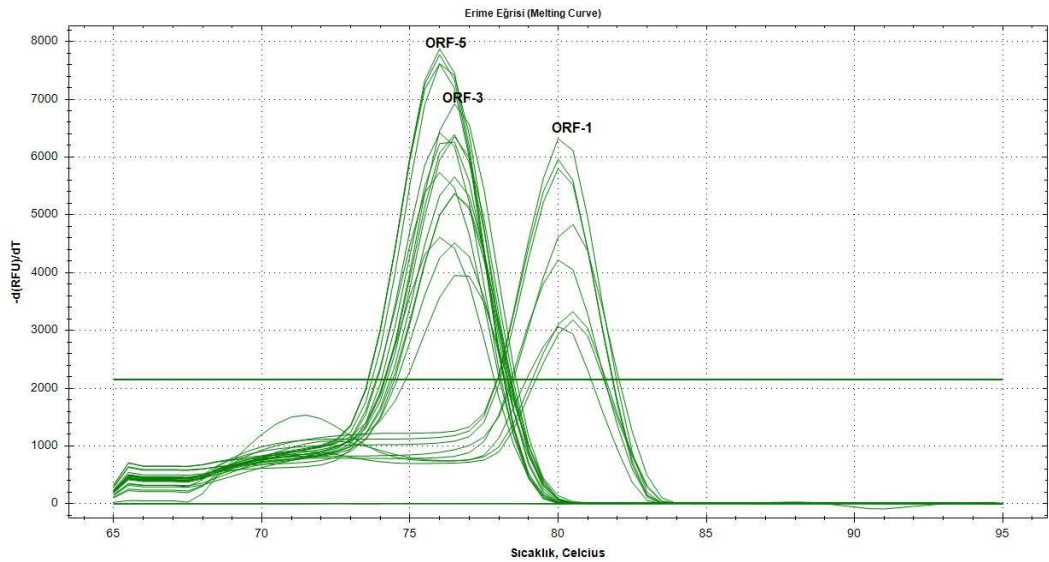
3.9. ORF'lerin Transkript Miktarlarının Belirlenmesi ve mRNA Stabilitesi

Bini ve arkadaşlarının (2002) önerdiği yönteme göre 3 transkriptin (ORF-1, ORF-3 ve ORF-5) miktarı ve stabiliteleri belirlendi.

İlk olarak Actinomycin D konsantrasyonu için optimizasyon yapıldı ve optimum konsantrasyon olarak 10 µg/mL kullanıldı. pAnox1 plazmitini içeren *Anoxybacillus*

gonensis 05S15 suşu 2 mL LB besiyeri içerisinde 55 °C’de bir gece inkübe edildi. Logaritmik artış fazında 10 µg/mL Actinomycin D kültüre eklenerek inhibisyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol olarak Actinomycin D uygulanmamış kültürler kullanıldı. İnhibisyon işlemi başlatıldıktan sonra 0, 15, 25 ve 30’uncu dakikalarda hücre pelletleri toplandı. Benzer şekilde kontrol hücreleri içinde aynı işlem gerçekleştirildi. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı. 4 farklı safhada alınan pelletlerden elde edilen her bir RNA’dan eşit miktarlarda alınarak (1 µg) üç transkript için toplamda 12 farklı cDNA sentezi gerçekleştirildi. Aynı işlemler kontrol hücreleri için de gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’lar kullanılarak qPCR çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışma, Bio-Rad CFX96 cihazında üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar cihaz yazılımı ile görselleştirildi ve grafikler hazırlandı.

qPCR çalışmasının son aşamasında melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirildi. Yapılan melting curve (erime eğrisi) analizinde elde edilen grafik (Şekil 18) incelendiğinde üç farklı pik görüldüğü ve bunlardan üç farklı transkript için erime sıcaklığı elde edildiği tespit edildi. Her bir transkript için elde edilecek qPCR ürün büyüklüğü belli olduğundan (ORF1:266 bp, ORF3:210 bp, ORF5: 181 bp) üç farklı pik görüldü ve qPCR çalışmasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği, kontaminasyon olmadığı tespit edilmiş oldu (Şekil 18).



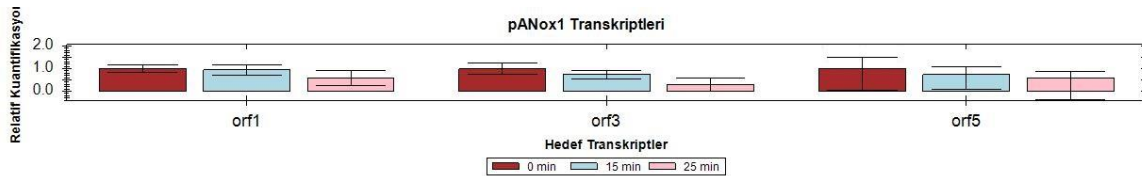
Şekil 18. qPCR çalışmasında elde edilen melting curve (erime eğrisi) analizi

Üç farklı transkript için dört farklı zamanda alınan örnekler ile yapılan qPCR çalışması sonucu her bir örnek için cihaz yazılımı (Bio Rad CFX Maestro) tarafından C_t değerleri oluşturuldu. C_t değerleri oluşturulurken pozitif kontrol olarak da Actinomycin D uygulanmamış kültürlerden elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Deney gerçekleştirilirken iki farklı negatif kontrol de çalışmaya dahil edildi (NTC: non-template control ve NG: negatif kontrol). Çalışma sonucunda transkriptlere ait elde edilen C_t değerleri Şekil 19'da verilmektedir.

Target	Sample	Control	Relative Quantity	Relative Quantity SEM	Corrected Relative Quantity SEM	Mean Cq	Cq SEM
orf1	0 min		1.00000	0.17595	0.17595	29.86	0.25384
orf1	15 min		0.94151	0.21897	0.21897	29.95	0.33554
orf1	25 min		0.58275	0.32288	0.32288	30.64	0.79934
orf1	30 min		0.00000	N/A	N/A	N/A	N/A
orf3	0 min		1.00000	0.23357	0.23357	30.97	0.33697
orf3	15 min		0.74671	0.18910	0.18910	31.39	0.36536
orf3	25 min		0.29588	0.30580	0.30580	32.73	1.49107
orf3	30 min		0.00000	N/A	N/A	N/A	N/A
orf5	0 min		1.00000	0.95266	0.95266	29.23	1.37440
orf5	15 min		0.73654	0.65960	0.65960	29.67	1.29198
orf5	25 min		0.59255	0.95307	0.95307	29.99	2.32043
orf5	30 min		0.00000	N/A	N/A	N/A	N/A

Şekil 19. pAnox1 transkriptlerine ait C_t (Threshold Cycle) değerleri

Tespit edilen C_t değerleri kullanılarak cihaz yazılımı tarafından her bir transkripte ait miktarlar ve zamana bağlı değişim grafiği elde edildi (Şekil 20). Şekil 19 incelendiğinde her bir transkript için 0, 15 ve 25. dakikalarda ürün olduğu ancak 30. dakikada herhangi bir sinyal alınmadığı tespit edildi. Bu sonuçlar kullanılarak aşağıda çizilen grafiğe göre transkriptlerin 25. dakikadan sonra degrade olduğu ve stabilitesini kaybettiği sonucu elde edildi.



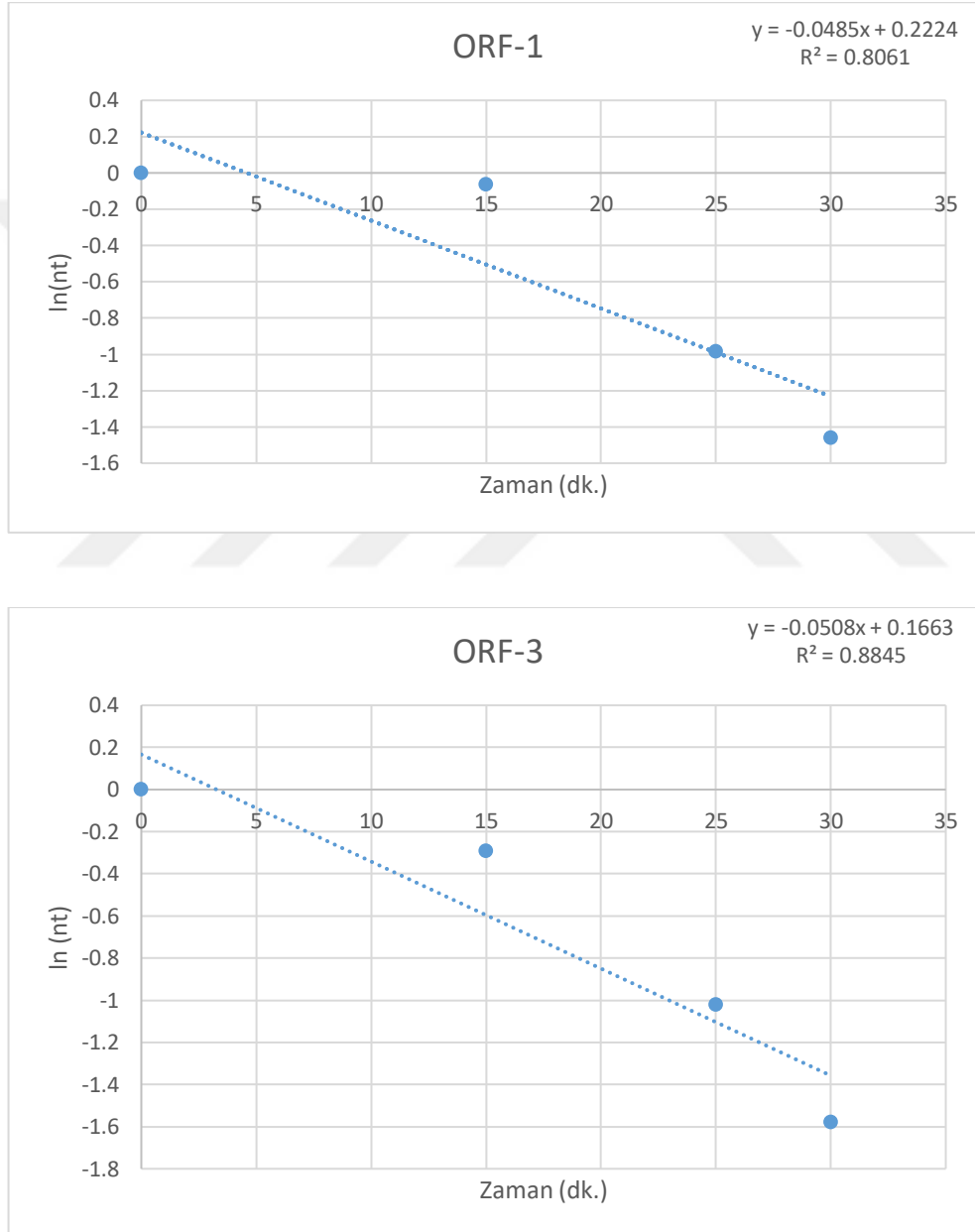
Şekil 20. pAnox1 transkriptlerinin zamana bağlı değişimi

mRNA'ların yarı ömürlerinin karşılaştırılması için kantitatif PCR kullanılarak Wang ve ark.'larının önerdiği yöntemle göre hesaplama yapıldı. Bu hesaplama göre

transkriptlerin yarılanma ömrü ($T_{1/2}$), Şekil 19’da belirtilen C_t değerleri kullanılarak aşağıdaki denklem eşitliğinde elde edildi (Wang vd., 2002).

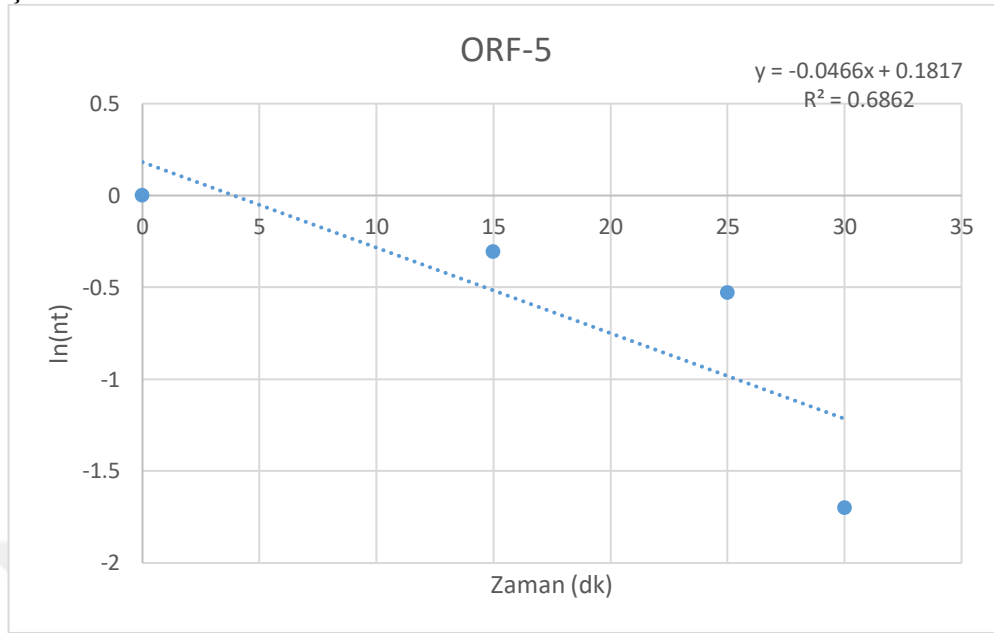
$$T_{1/2} = \ln 2 / |k|$$

İlk olarak mRNA’ların dinamik degradasyon eğrileri elde edildi (Şekil 21).



Şekil 21. Üç transkriptte ait dinamik degradasyon eğimleri

Şekil 21'in devamı



Yapılan hesaplamalar sonucunda; grafiklerde de görüldüğü üzere ORF-1 transkripti için k : -0,0485, ORF-3 için -0,0508 ve ORF-5 için -0,0466 olarak hesaplandı. Elde edilen değerler formüle ($T_{1/2} = \ln 2 / |k|$) uygulandığında ORF-1 için $T_{1/2}$: 14,29 dk ORF-3 için 13,64 dk ve ORF-5 için 14,87 dk olarak hesaplandı.

Şekil 20, Şekil 21 ve elde edilen yarılanma sürelerinin sonuçları incelendiğinde, pAnox1 plazmitinden kodlanan üç transkriptin başlangıç miktarları farklı olsa da ortalama 25. dakikadan sonra degrade olduğu görülmektedir.

4. TARTIŞMA

Bu çalışma *Anoxybacillus* türüne ait bir bakteriden daha önce tanımlanmamış bir plazmitin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılmasını kapsamaktadır.

Termofilik bakterilerin özellikle büyüme sıcaklık aralığı, diğer ortam bakterileri ile karşılaştırıldığında yüksek olması sebebiyle endüstriyel açıdan önemlidir. Çalışılan bakterinin termofilik bir kimliğe ve yeni bir plazmite sahip olması üstünde durulması gereken bir durumdur.

Literatür incelendiğinde *Anoxybacillus* cinsi, bakterilerden oluşan bir cins olup, son yıllarda yapılan genom çalışmaları sonucunda yirmi üç farklı *Anoxybacillus* türü ve iki farklı *Anoxybacillus* alt türü için tüm genom analizi tanımlanmıştır (URL-9). Ayrıca literatürde *Anoxybacillus* cinsine ait farklı bakterilere ait beş plazmit bulunmaktadır. Ancak bu plazmitlerden karakterize edilmiş ya da fonksiyonel analizi yapılmış herhangi bir plazmit mevcut değildir (URL-10).

Yapılan bu çalışma ile *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatından plazmit izolasyonu yapılarak, ilgili bakterinin bir plazmite sahip olduğu belirlendi.

Anoxybacillus gonensis 05S15 bakterisinden elden edilen bu yeni plazmit, pAnox1 olarak isimlendirildi. Yapılan dizileme sonuçlarına göre plazmitin genom büyüklüğünün 1592 bp olduğu, yine yapılan diğer analizlere göre de plazmitin kriptik özellikte, küçük bir genoma sahip, çift zincirli ve % 40,01 GC içeriğine sahip daha önce keşfedilmemiş bir plazmit olduğu belirlendi. Literatürde *Anoxybacillus* cinsinden izole edilen diğer plazmitlerin GC içeriklerine bakıldığında pAnox1 plazmiyle benzerlik gösterdikleri görülmektedir. *Anoxybacillus* sp. B7M1 suşunda isimlendirilmemiş bir plazmitin GC oranı %42,05, *Anoxybacillus flavithermus* 52-1A suşunda isimlendirilmemiş bir plazmitin GC oranı %41,7 (AN: NZ_CP021839.1), *Anoxybacillus caldiproteolyticus* U458 suşundan elden edilen pBstUI51 plazmitinin GC oranı %40,3 (NZ_CP064061.1), *Anoxybacillus amylolyticus* DSM 15939 suşundan elde edilen pDSM15939_1 plazmitinin GC oranı %43,2 (NZ_CP015439.1) ve yine aynı suştan elde edilen ikinci plazmit olan pDSM15939_2'nin GC oranı %42,4 (NZ_CP015440.1)'dür. Bunların dışındaki diğer *Anoxybacillus* plazmitlerinin GC oranlarının birbirlerine yakın olması plazmitlerin benzer yapıda olduklarına vurgu yapmaktadır.

pAnox1 için yapılan restriksiyon analizinde, *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon endonükleazlarının plazmiti tek noktadan kestiği belirlendi. Yapılan kesimde yaklaşık 1500 bp civarında DNA fragmenti elde edildi ve elde edilen fragment jelden çıkarıldı. Ardından T4 DNA ligaz (Promega) enzimi kullanılarak pUC18 vektörünün *Nde*I kesim bölgesinden klonlandı. Elde edilen rekombinant plazmitlerin dizin analizi Macrogen (Hollanda) firması tarafından yapıldı ve analiz sonuçları kullanılarak bir çift primer (ORF-1R ve ORF-4R) dizayn edildi. Dizayn edilen primerler kullanılarak plazmitin tamamının invers PCR ile elde edilmesi sağlandı, invers PCR sonucunda elde edilen ürün tekrar sekans analizine gönderilerek tüm genomun baz dizini ortaya çıkarılarak önceki sekans sonuçları ile karşılaştırıldı ve teyit edilmiş oldu. Yapılan dizin analizi sonucunda pAnox1 plazmitinin tüm baz dizininin 1592 bp uzunlukta olduğu ve termofilik bakteriler arasında oldukça küçük genoma sahip olduğu belirlendi. Genelde termofilik bakterilerden izole edilen plazmitler oldukça büyük genomlara sahiptirler ve bu yüzden tüm genomun özelliklerinin ortaya çıkartılması zordur (Makarova vd., 2002). Literatürde bu kapsamda yapılan genom analizleri sonucunda *Anoxybacillus* sp. B7M1 suşunda isimlendirilmemiş bir plazmit (AN: NZ_CP015437.1), *Anoxybacillus flavithermus* 52-1A suşunda yine isimlendirilmemiş bir plazmit (AN: NZ_CP021839.1), *Anoxybacillus caldiproteolyticus* U458 suşunda pBstUI51 (AN: NZ_CP064061.1) plazmiti, *Anoxybacillus amylolyticus* DSM 15939 suşunda ise pDSM15939_1 ve pDSM15939_2 (sırasıyla AN: NZ_CP015439.1 ve NZ_CP015440.1) adında iki farklı plazmit belirlenmiştir. Bu plazmitlere ait sadece baz dizinleri ve genom anotasyon verileri mevcuttur, genom büyüklükleri sırasıyla 54976 bp, 24836 bp, 51094 bp, 258230 bp ve 65295 bp olarak karşımıza çıkmaktadır. Tespit edilen bu beş plazmitin genomları oldukça büyük (en küçük boyutlu plazmitin büyüklüğü bile 24.836 bp) olup hem çalışılması zahmetli hem de vektör yapımında kullanışlı değildir. Bu yüzden bu plazmitlerle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Büyük genomun dezavantajları incelendiğinde, pAnox1 plazmitinin 1592 bp'lik küçük bir genoma sahip olması yapılan çalışmalar bakımından büyük avantaj olarak görülmüştür ve düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin de minimum seviyede olmasını sağlayacaktır (Primrose ve Twyman, 2006).

Plazmitlerde genomun küçük olmasının birçok avantajı vardır. Bunlardan birincisi; plazmiti bakteriden sağlam olarak izole etmek ve üzerinde manipülasyon yapmak 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 plazmitin kopya sayısına bağlı olarak düşük veya yüksek gen dozajına yol açmada etkilidir. Son olarak, düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalini minimum seviyeye indiriyor olmasıdır (Primrose ve Twyman, 2006). Bu kapsamdan bakıldığında küçük genoma sahip plazmitlerin hem klonlama hem de transformasyon kolaylığı ön plana çıkmaktadır. Bu yüzden pAnox1 plazmitinin pTX, PET ya da pUC sistemlerine karşı avantajlarının olduğu görülmektedir.

Bu avantajlar düşünüldüğünde pAnox1 plazmitinin 1592 bp büyüklükte bir genoma sahip olması onu oldukça avantajlı kılmaktadır. Bu büyüklükte genoma sahip bir plazmitin kodladığı proteinlerin ortaya çıkarılması ve fonksiyonlarının tespit edilmesi literatüre büyük katkı sağlayacak ve rekombinant DNA çalışmalarında kullanılabilme potansiyeline sahip olacaktır. Ayrıca küçük genomun manipülasyonu ve dizaynı oldukça kolay olacağından, bu plazmitten ticari klonlama ve ekspresyon vektörleri geliştirme potansiyeli de oldukça yüksektir. Buna ek olarak yine termofilik bir organizma olan *Thermus scotoductus* K6 bakterisinden küçük genomlu bir plazmit tanımlandı (pHIG22, 2222 bp) ve mevcut laboratuvarımızda fonksiyonel analizleri yapıldı (Guler vd., 2018). Küçük genomun sahip olduğu avantajlar kullanılarak ticari ekspresyon ve klonlama vektörleri dizayn çalışmaları yapıldı. pAnox1 plazmiti ise pHIG22 plazmitinden daha küçük bir genoma sahip olduğundan, bu plazmitten ticari bir vektör geliştirilme potansiyeli daha yüksektir. Şu anda uluslararası veritabanlarında *Anoxybacillus* cinsi plazmitleri için herhangi fonksiyonel bir veri bulunmamakta ve bu da yapılabilecek çalışmaların biyoinformatik analizlerini kısıtlamaktadır.

Anoxybacillus cinsindeki pAnox1 plazmiti, bu cins için tanımlanan ilk plazmittir ve ondan oluşturulan mekik vektörleri bu cinse özgü olmalıdır. Ancak bu plazmitlere ait sadece baz dizinleri ve genom anotasyon verileri mevcut olup, literatürde bu plazmitlere ait replikasyon tipleri, replikasyon orijinleri, fonksiyonel genleri, transkriptleri veya kopya sayıları gibi bilgilere rastlanılmamıştır.

pAnox1 nükleotit dizini ile yapılan BLAST araştırmaları sonucunda Genbank veri tabanındaki *Planococcus* sp. MB-3u-03'den unnamed5 plazmitine (CP025130.1) %19, *Exiguobacterium sibiricum*'dan pEXIG02 plazmitine (CP001024.1) % 13, *Geobacillus* sp.'den pGTG5 plazmitine (KC255224.1) %8, *Enterococcus casseliflavus*'dan pEGM182-1 plazmitine (CP050488.1) % 7, *Lysinibacillus* sp. CD3-6'dan unnamed plazmitine

(CP085881.1) % 16, *Anoxybacillus flavithermus* WK1 genomuna (CP000922.1) % 4 ve uncultured bacterium'dan pRGI00823 plazmitine ise %4 (HG796376.1) benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Ayrıca plazmit genomu üzerinde yapılan biyoinformatik analizler sonucunda; muhtemel 5 ORF bölgesi belirlenmiştir. Bu ORF'lerden üçü bir zincirde tespit edilirken, diğer ikisi ise karşı zincir üzerinde bulunmaktadır. Tespit edilen her bir ORF için Blastp (NCBI) araştırması yapılmış, ORF-1 ve ORF-3'ün RC tip plazmitlerin replikasyonunda görev alan Rep initiator proteinlerine önemli ölçüde benzer bölgeler içerdiği belirlenmiştir.

Plazmitler, genomik DNA dışındaki ekstrakromozomal DNA'lardır. Plazmitlerin olmazsa olmaz üç özelliği kendi kendilerini replike edebilmeleri, farklı enzimlere ait kesim bölgeleri içermeleri (MCS) ve antibiyotik direnç genleri içermeleridir. Plazmitlerde replikasyonun 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. Biyoteknolojide ve klinik mikrobiyoloji alanlarında plazmit-konak ilişkileri ile ilgili araştırmalar yaygındır. Plazmitler, genellikle konak replikasyon mekanizmasını kullanırlar ve bu plazmit replikasyon çalışmaları, kromozom replikasyon çalışmalarını da kapsayan mekanizmalara da ışık tutar (Del Solar vd., 1998).

Plazmitlerde literatürden bilindiği üzere üç tip replikasyon mekanizması vardır, bunlardan RC tipi mekanizmada replikasyon tek yönlüdür. Bunun sebebi, lider zincir ve izci zincir sentezi bitişik olmadığındandır. Yuvarlanan çember mekanizmasının önemli özelliği, yeni sentezlenmiş olan lider pozitif (+) zincirin, aynı ebeveyn pozitif (+) zincirine kovalent olarak bağlı olmasıdır (Del Solar vd., 1993; Espinosa vd., 1995). RC mekanizmasıyla replike olan plazmitlerin boyutları genelde 10 kb'dan azdır. Fakat 10 kb'dan az olup da teta moduyla replike olan plazmitler de vardır. Buna Gram pozitif bakterilerden izole edilen pRJF1 (2,6 kb) ve pWV02 (3,8 kb) gibi küçük plazmitler örnek verilebilir (Hefford vd., 1993; Kiewiet vd., 1993). RC replikasyonu, plazmit DNA replikasyonunun önemli özelliği olarak bilinen tek zincirli ssDNA ara ürünlerini üretir. Erlich'in laboratuvarında yapılan çalışmalarda, ssDNA'nın üretiminin, RC mekanizmasında plazmit replikasyonunun en önemli özelliği olduğu belirtilmiştir (Gruss vd., 1989; te Riele vd., 1986). Ebeveyn (+) zinciri sonradan, konakçı proteinler tarafından başlatılan sentezle dsDNA yapısına dönüştürülür ve konak DNA girazlarıyla replikasyon ürünleri süpersarmallaştırılır. pAnox1 plazmit boyutunun 1592 bp olması RC mekanizmasıyla replike olduğunu kanıtlar durumdadır.

pAnox1 plazmitinin RC tip replikasyona sahip olup olmadığının belirlenebilmesi için Southern Blot analizi yapıldı. Yapılan Southern Blot analizinde DNA'lar denatüre edilmeden kullanılarak sadece oluşan tek zincir DNA'ların tespit edilebilmesi sağlandı. Çünkü RC tip replikasyon mekanizmasında replikasyon ara ürünleri (tek zincir DNA'lar) oluşur (del Solar, 1998) ve uygun bir prob ile hibridize olur. Bu çalışmada rifampisin antibiyotiği kullanıldı. Genellikle bu antibiyotiğin RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği ve ssDNA'dan dsDNA'ya dönüşümü engellediği bilinmektedir (Leenhouts vd., 1991). Bu kapsamda hem rifampisinli ortamda hem de rifampisinsiz ortamda çoğaltılan bakterilerden izole edilen DNA'lara S1 nükleaz uygulanarak plazmit replikasyonu sürecinde RC replikasyon ara ürünleri olarak oluşan ssDNA'lar varsa bunların degrade edilmesi sağlandı. ssDNA'ları degrade edilen DNA'ların hazırlanan proba hibridize olmadığı ve jel üzerinde herhangi bir sinyal alınmadığı belirlendi. Diğer yandan S1 nükleaz uygulanmayan ve ssDNA'ları içeren DNA örneklerinin proba hibridize olduğu ve güçlü bantlar oluşturduğu (Şekil 15), bunun sonucunda da pAnox1 plazmitinin RC mekanizmasında oluşan replikasyon ara ürünlerini (ssDNA) içerdiği belirlenmiş oldu. pAnox1 plazmitinin replikasyon sürecinde ssDNA ara ürünleri oluşturması ve bu ürünlerin hazırlanan tek zincirli proba hibridize olarak sinyal vermesi sonucunda plazmitin RC replikasyon moduna sahip olduğu belirlenmiş oldu. Ayrıca bakteri, rifampisin uygulaması ile besiyerinde büyütüldüğünde, pozitif sinyalin daha yoğun olduğu görüldü. Bu sonuç, pAnox1 plazmitinin ssDNA ara ürünlerinin rifampisin varlığında biriktiğini gösterdi. Ayrıca rifampisin antibiyotiğinin kullanımının konak tarafından kodlanan RNA polimerazın, plazmit replikasyonu sırasında ssDNA'nın dsDNA'ya dönüştürülmesinde rol oynadığı sonucuna da varıldı.

Plazmitlerin replikasyon mekanizmaları üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Termofilik bakterilerde replikasyon mekanizması üzerine ilk yapılan çalışma pRQ7 plazmitidir. Bu plazmitin yuvarlanan çember replikasyon (RC) moduna sahip olduğu belirlendi (Harriott vd., 1994; Yu vd., 1997). *Anoxybacillus* türünden elde edilen plazmitlerde replikasyon modları belirlenmemiştir. Bu bağlamda pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenmesi bu cinsteki ilk çalışma olmuştur.

pAnox1 plazmitinden kodlanan transkriptlerin belirlenmesi için, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 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

belirlenmiştir. Aynı oryantasyonda bulunan ORF-1 ve ORF-3, karşı oryantasyonda bulunan ORF-5'in transkript kodladığı sonucu elde edildi. pAnox1 tarafından transkript kodladığı belirlenen ORF'lerin 5' uçlarının belirlenmesi için RACE tekniği, 3' uçlarının belirlenmesi içinde LACE tekniği kullanıldı. pAnox1 tarafından kodlanan ORF1 transkript 1016. bazda başladığı ve 326. bazda sonlandığı, ORF3 transkript 456. bazda başladığı ve 954. bazda sonlandığı, ORF5 transkript 1232. bazda başladığı ve 1022. bazda sonlandığı ortaya çıkarıldı. ORF5 transkriptinin ORF1 transkriptine komplementer olduğu belirlenmiştir.

pAnox1 plazmitinin mRNA miktarı ve stabilitesi çalışmasında yapılan hesaplamalar sonucunda yarılanma sürelerinin ORF-1 için 14,29 dk ORF-3 için 13,64 dk ve ORF-5 için 14,87 dk olarak hesaplandı. pAnox1 plazmitinden kodlanan üç transkriptin başlangıç miktarları farklı olsa da ortalama 25. dakikadan sonra degrade olduğu görülmektedir. Literatürden bilindiği üzere kriptik plazmitler genellikle az sayıda transkript ve protein oluşturmakta ve bunlar benzer süreçlerde görev almaktadır (Del Solar, 1998). Ayrıca prokaryotlarda transkript mRNA'nın yarılanma ömrü ökaryotiklere göre daha kısadır (Hambraeus vd., 2003).

Ayrıca her iki zincirde replikasyonda görev alabilecek düzenleyici bölgeler olma ihtimali olan (üç palindrom ve iki iteron) diziler tespit edildi. Literatür incelendiğinde replikasyon orijinlerinin iteron adı verilen doğru tekrarlar içerdiği belirlenmiştir (Del Solar vd., 1998). Bu dizilerin plazmit tarafından kodlanan Rep proteinleri için bağlanma bölgelerinin olduğu ve ayrıca farklı kontrol özelliklerine sahip oldukları belirlenmiştir. İteronların replikasyon için gerekli olmadıkları fakat replikasyonun kontrolü için kilit elementler oldukları düşünülmektedir (Kittell vd., 1992; Flutowicz vd., 1985; Chatteraj vd.1997). Biyoinformatik analizler kullanılarak, iteron sekanslarının belirlendiği birçok çalışmada, bu tekrar dizilerine bağlanan Rep proteinleri belirlenmiş ve replikasyon mekanizmaları aydınlatılmıştır. Ayrıca *Anoxybacillus* cinsine ait bu plazmitin (pAnox1) herhangi bir genoma ya da diğer plazmitlere önemli ölçüde benzer diziler içermemesi, bu cins ve bu cinse yakın akraba diğer cinslere ait çok az sayıda plazmitin fonksiyonel genlerinin ortaya çıkarıldığına göstergesidir. Bu da fonksiyonel genlerinin belirlenmesini zorlaştırmıştır. Bu dezavantaj, yeni termostabil proteinlerin bulunabilmesi ve karakterize edilmesi yönünden avantaj olarak görülmektedir.

Tüm yönleriyle ele alındığında bu çalışmada, yeni bir plazmit olarak tanımlanan ve *Anoxybacillus* cinsinde ilk kez karakterize edilen ve fonksiyonel analizi yapılacak olan pAnox1'in plazmit stabilitesini, replikasyon modunu, her bir muhtemel ORF'nin transkript

kodlayıp kodlamadığının belirlenmesi, belirlenen transkriptler için RACE ve LACE teknikleri uygulanarak her bir transkriptin UTR bölgeleri belirlenerek tespit edilen transkriptlerin miktarları ve stabiliteleri belirlenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak devamındaki çalışmalara ışık tutmak ve endüstriyel anlamda ticari getiri sağlayabilecek vektörler oluşturabilmek için yeterli bilgi ve materyali ortaya koyması sağlanmıştır.



5. SONUÇLAR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan *Anoxybacillus gonensis* 05S15'ten izole edilen yeni, küçük ve halkasal bir plazmitin (pAnox1) karakterizasyonu başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edildi.

1. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının plazmit içerikleri incelendi ve *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin bir plazmite sahip olduğu belirlendi.
2. pAnox1'nin restriksiyon analizi yapıldı. *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon endonükleazlarının tek noktadan kestiği belirlendi.
3. *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon endonükleazı ile yapılan kesim reaksiyonu neticesinde oluşan fragmentler pUC18 vektörüne klonlandı, ters PCR işlemi ile tüm baz dizisi ortaya çıkarıldı, dizin analizi yapıldı ve böylece pAnox1'in 1592 bp'lik bir genoma sahip olduğu belirlendi (Tablo 35).
4. DNA analiz programları kullanılarak pAnox1 plazmit genomunda beş farklı ORF tespit edildi. Bunlardan üçü bir zincirde bulunurken diğer ikisi karşı zincirde tespit edildi.
5. pAnox1 plazmiti için yapılan biyoinformatik araştırmalar sonucunda, üç farklı bölgede palindrom diziler tespit edildi. Yine iki farklı bölgede iteron diziler belirlendi. Bu iteronların ve palindromlar bazı ORF'lerin upstream bölgelerinde bulunması, regülatör olarak işlevsel olabileceği ihtimalini kuvvetlendirdi.
6. pAnox1 plazmitinin replikasyon modunun belirlenmesinde elektron mikroskobu ve southern blot çalışmaları yapıldı ve alınan görüntüler sonucunda plazmitin RC tipine sahip olduğu belirlenmiş oldu.
7. pAnox1 plazmiti üzerinde önceden biyoinformatik yöntemler ile belirlenmiş olan 5 muhtemel ORF bölgesinden üçünün fonksiyonel olduğu tespit edildi. Bu ORF'ler sırasıyla aynı zincir üzerinde bulunan ORF-1 ile ORF-3 ve karşı zincirden kodlanan ORF-5'tir.
8. pAnox1 plazmiti'nin transkript ürettiği belirlenen ORF'lerin başlangıç ve bitiş noktalarının belirlenebilmesi için bu kapsamda transkriptlere RACE ve LACE teknikleri uygulandı. Yapılan çalışmaların sonucunda da her bir transkriptin 5' ve 3' uçlarının sınırları belirlendi. pAnox1 tarafından kodlanan ORF1 transkript 1016. bazda başladığı

ve 326. bazda sonlandığı, ORF3 transkript 456. bazda başladığı ve 954. bazda sonlandığı, ORF5 transkript 1232. bazda başladığı ve 1022. bazda sonlandığı ortaya çıkarılmıştır.

9. pAnox1 plazmiti'nin mRNA miktarı ve stabilitesinin belirlenmesinde yarılanma sürelerinin sonuçları incelendiğinde, pAnox1 plazmitinden kodlanan üç transkriptin başlangıç miktarları farklı olsa da ortalama 25. dakikadan sonra degrade olduğu görülmektedir.
10. Yapılan bu çalışma sonucunda termofilik bakterilerde klonlama ve ekspresyon çalışmaları için kullanılabilecek ve geliştirilebilecek yeni bir plazmit literatüre kazandırıldı.



6. ÖNERİLER

1. *Anoxybacillus* cinsine ait olduğu belirlenen pAnox1 plazmitinin termofilik bakterilere gen aktarımında kullanılabilecek şekilde modifiye edilmesi önerilmektedir.
2. Plazmit üzerindeki ORF bölgelerinin fonksiyonlarının belirlenip, literatüre kazandırılarak diğer çalışmalara kaynak teşkil etmesi önerilmektedir.
3. pAnox1 plazmitinin klonlama vektörü olarak kullanılabilmesi için plazmit üzerine antibiyotik direnç geni ve çoklu klonlama bölgesi eklenmesi gerekmektedir.
4. Ekspresyon vektörü olarak kullanılabilmesi için plazmit üzerine ekspresyonu sağlayacak sekansların eklenmesi düşünülmektedir.
5. pAnox1 plazmitinin *E.coli* ve *Anoxybacillus* cinsi bakterilerde kullanılan klonlama ve ekspresyon vektörleri ile shuttle vektörler oluşturulması önerilmektedir. Bu sayede ekonomik yönden değerli enzimleri kodlayan genlerin klonlanmasının ve ekspresyonunun daha verimli halde yapılabileceği düşünülmektedir.
6. *Anoxybacillus gonensis* 05S15'te akridin oranj ile plazmit curing yöntemi yapılarak; plazmit içeren ve plazmit içermeyen hücrelerin proteinlerinin karşılaştırılması, farklı proteinlerin büyüklük ve MALDI-TOF analizleri yapılarak plazmitten kodlanan genlerin belirlenmesi düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abeles, A., Brendler, T. ve Austin, S., 1993. Evidence of Two levels of Control of P1 oriR and Host oriC Replication Origins by DNA Adenine Methylation, Journal of Bacteriology, 175, 24, 7801-7807.
- Akhmaloka, A., Suharto, A., Nurbaiti, S., Tika, I. N. ve Warganegara, F. M., 2006. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater, Journal of Engineering and Technological Sciences, 38, 1, 1-10.
- Akkaya, S. E. ve Kıvanç, M., 2008. Termofil Bakteriler Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8, 2, 61-70.
- Austin, S. ve Nordstrom, K., 1990, Partition-mediated Incompatibility of Bacterial Plasmids, Cell, 60, 351-354.
- Bassil, N. M., Bryan, N. ve Lloyd, J. R., 2015. Microbial Degradation of Isosaccharinic Acid at High pH, The ISME Journal, 9, 2, 310-320.
- Baker, G. C., Gaffar, S., Cowan, D. A. ve Suharto, A. R., 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. FEMS Microbiology Letters, 200(1), 103-109.
- Bekler Matpan F., 2016. Isolation and identification of a novel thermo-alkalophilic *Anoxybacillus* sp. strain KB4 from Kuşburnu hot spring in Turkey. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Beldüz A. O., Çanakçı S., Chan K.G., Kahar U. M., Chan C. S., Yaakop A. S. ve Goh K. M., 2015. Genome Sequence of *Anoxybacillus ayderensis* AB04T Isolated from Ayder Hot Spring in Turkey, Standarts in Genomic Sciences, 10.
- Bini, E., Dikshit, V., Dirksen, K, Drozda, M. ve Blum, B. 2002. Stability of mRNA in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*, RNA, 8,1129-1136.
- Bingle, L. E., ve Thomas, C. M., 2001. Regulatory circuits for plasmid survival, Curr Opin Microbiol., 4, 194–200.
- Bramhill, D. ve Kornberg, A., 1988. A Model for Initiation at Origins of DNA Replication, Cell, 54, 7, 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, Research in microbiology, 142, 209-216.
- Brock. T.D., 1985. Life at high temperatures, Science, 230, 132-138.
- Brock, T. D., 1986. Introduction: an overview of the thermophiles, Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology, 1-16.

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. ve Threlfall, E. J., 2005. Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing, Journal of Microbiological Methods, 63, 3, 219-228.
- Chattoraj, D. K. ve Schneider T. D., 1997. Replication Control Of Plasmid P1 and Its Host Chromosome: The Common Ground, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 57, 145-186.
- Clarck, D. P., 2010. Molecular Biology (Update Edition), Apcell Press, California.
- Couturier, M. A. R. T. I. N. E., Bex, F., Bergquist, P. L., ve Maas, W. K., 1988. Identification and Classification of Bacterial Plasmids, Microbiological Reviews, 52, 3, 375-395.
- Datta, N., 1979, Plasmid Classification: Incompatibility Grouping, in: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (K.N. Timmis and A. Puhler, eds.), Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 3-12.
- Davison, J., 1999. Genetic Exchange Between Bacteria in The Environment, Plasmid, 42, 2, 73-91.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M., J., Espinosa, M. Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 2, 434-464.
- Del Solar, G., Moscoso, M. ve Espinosa, M., 1993. Rolling Circle-Replicating Plasmids from Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Wall Falls, Molecular Microbiology, 8, 5, 789-796.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J., ve David, S. W., 2004. PlasMapper: A Web Server for Drawing and Auto-Annotating Plasmid Maps, Nucleic Acids Research, 32, suppl_2, W660-W664.
- Eckdahl, T. T., ve Anderson, J. N., 1990. Conserved DNA Structures in Origins of Replication, Nucleic Acids Research, 18, 1609–1612.
- Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M. F., Barbeyron, T., Zivanovic, Y. ve Forterre, P., 1996. Sequence of Plasmid pGT5 from The Archaeon *Pyrococcus Abyssii*: Evidence for Rolling-Circle Replication in A Hyperthermophile, Journal of Bacteriology, 178, 11, 3232-3237.
- 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.
- Fan, W. ve Evans, R. M., 2015. Turning Up The Heat on Membrane Fluidity. Cell, 161,5, 962-963.
- Fathepure, B. Z., 2014. Recent Studies in Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Hypersaline Environments, Frontiers in Microbiology, 5, 173.

- Filutowicz, M., Uhlenhopp E. ve Helinski D. R., 1985. Binding of Purified Wild-Type and Mutant Pi Initiation Proteins to A Replication Origin Region of Plasmid R6K, J. Mol. Biol., 187, 225-239.
- Flores, R., Daròs, J. A., Hernández, C. ve Di Serio, F., 2008. Viroids. eLS.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drinas, C. ve de la Cruz, F., 2004. A Classification Scheme for Mobilization Regions of Bacterial Plasmids, FEMS Microbiology Reviews, 28,1, 79-100.
- Friebs, K., 2004. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability, New Trends and Developments in Biochemical Engineering, 47-82.
- 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.
- Gielow, A. N. N. E. T. T. E., Diederich, L. U. D. G. E. R., ve Messer, W. A. L. T. E. R., 1991. Characterization of A Phage-Plasmid Hybrid (Phasyl) with Two Independent Origins of Replication Isolated from Escherichia Coli, Journal of Bacteriology, 173, 1, 73-79.
- Goh, K., Kahar, U. M., Chai, Y. Y., Chong, C.S., Chai K.P., Ranjani V., Chan K., 2013, Recent discoveries and applications of Anoxybacillus, Appl Microbiol Biotechnol., 97:1475-1488.
- Gruss, A., ve Ehrlich, S. D., 1989. The Family of Highly Interrelated Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid Plasmids, Microbiological Reviews, 53, 2, 231-241.
- Güven, R. G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 9, 1, 1-10.
- Guler, H. I., Ceylan, E., Canakci, S. ve Belduz, A. O., 2018. A Novel Cryptic and Theta Type Plasmid (pHIG22) from *Thermus codotuctus* sp. K6, Gene, 679, 282-290.
- Hambraeus, G., Von Wachenfeldt, C., ve Hederstedt, L., 2003. Genome-wide Survey of mRNA Half-lives in *Bacillus subtilis* Identifies Extremely Stable mRNAs, Molecular Genetics and Genomics, 269, 706-714.
- Haring, V., ve Scherzinger, E., 1989. Replication Proteins of The IncQ Plasmid RSF1010.
- Haring, V., Scholz, P., Scherzinger, E., Frey, J., Derbyshire, K., Hatfull, G. ve Bagdasarian, M., 1985. Protein RepC is Involved in Copy Number Control of The Broad Host Range Plasmid RSF1010, Proceedings of The National Academy of Sciences, 82,18, 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.
- Hall, T. A., 1999, January. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 41, No. 41, pp. 95-98. London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- 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, 1, 63-69.
- Hoflack, L., Seurinck, J., & Mahillon, J., 1997. Nucleotide sequence and characterization of the cryptic *Bacillus thuringiensis* plasmid pGI3 reveal a new family of rolling circle replicons. Journal of bacteriology, 179, 16, 5000-5008.
- Holmes, M. L., Pfeifer, F., ve Dyll-Smith, M. L., 1995. Analysis of The Halobacterial Plasmid pHK2 Minimal Replicon, Gene, 153, 1, 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, Proceedings of The National Academy of Sciences, 88, 1, 179-183.
- Huang, J., Han, D., Yu, Z., ve Sun, M., 2007. A Novel Cryptic Plasmid pBMB175 from *Bacillus Thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* YBT-1765, Archives of Microbiology, 188, 47-53.
- İnan K., Beldüz A.O. ve Çanakçı S., 2012, *Anoxybacillus kaynarcensis* sp Nov., A Moderately Thermophilic, Xylanase Producing Bacterium", Journal Of Basic Microbiology, 53(5), 410-419.
- Ince, I. A., Ozcan, K., Vlak, J. M., 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, Journal of bacteriology, 175, 24, 7834-7841.
- Jaenicke, R. A. I. N. E. R., ve Sterner, R. E. I. N. H. A. R. D., 2006. Life at High Temperatures, The prokaryotes, 167-209.
- 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, 1-14.
- Kelman, Z., ve M. O'Donnell. 1995. DNA Polymerase III Holoenzyme: Structure and Function of A Chromosomal Replicating Machine, Annual Review of Biochemistry, 64, 171 200.

- Kiewiet, R., Bron, S., De Jonge, K., Venema, G., ve Seegers, J. F., 1993. Theta Replication of The Lactococcal Plasmid pWVO2, Molecular Microbiology, 10, 2, 319-327.
- 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, Journal of Molecular Biology, 185, 755–767.
- Kittell, B., L. ve Helinski, D. R., 1992. Plasmid Incompatibility and Replication Control, Bacterial Conjugation, 223-242
- Kittell, B. L., ve Helinski, D. R., 1993. Plasmid Incompatibility and Replication Control, Bacterial conjugation, 223-242.
- Kleanthous, H., Clayton, C. L., ve Tabaqchali, S., 1991. Characterization of a Plasmid from *Helicobacter Pylori* Encoding a Replication Rrotein Common to Plasmids in Gram-Positive Bacteria, Molecular Microbiology, 5, 10, 2377-2389.
- 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.
- Kornberg, A. ve Baker, T. A., 1992. DNA Replication, Vol. 3, New York: Wh Freeman.
- Le Borgne, S., Paniagua, D., ve Vazquez-Duhalt, R., 2008. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea, Microbial Physiology, 15, 2-3, 74-92.
- Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G., ve Seegers, J. F., 1991. Nucleotide Sequence and Characterization of the Broad-Host-Range Lactococcal Plasmid pWVO1, Plasmid, 26, 1, 55-66.
- Makarova, G., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I., B. ve Koonin, E. V., 2002. A DNA Repair System Spesific for Thermophilic Archaea and Bacteria Predicted by Genomic Context Analysis, Nucleic Acids Research, 30, 2, 482-496.
- Miao, D. M., Honda, Y., Tanaka, K., Higashi, A., Nakamura, T., Taguchi, Y., 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 Research, 21, 21, 4900-4903.
- Nordstrom, K., ve Austin, S., 1989. Mechanisms that Contribute to the Stable Segregation of Plasmids, Annual Review of Genetics, 23, 1, 37-69.
- Novick, R. P., 1989. Staphylococcal Plasmids and their Replication, Annual Review of Microbiology, 43, 1, 537-563.
- Novick, R. P., 1987. Plasmid Incompatibility, Microbiological reviews, 51, 4, 381-395.

- Perfumo, A., Banat, I. M. ve Marchant, R., 2006. The Use of Thermophilic Bacteria in Accelerated Hydrocarbon Bioremediation, pp. 67-77. WIT Press: Southampton, UK.
- 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., 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. John Wiley ve Sons.
- Pritchard, R. H., 1978. Control of DNA Replication in Bacteria, DNA Synthesis: Present and Future, 1-26.
- Projan, S. J. ve Novick R. P., 1988. Comparative Analysis of Five Related Staphylococcal Plasmids, Plasmid, 19, 203–221.
- Sakai, H. ve Komano, T., 1996. DNA Replication of IncQ Broad-Host-Range Plasmids in Gram-Negative Bacteria, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60, 3, 377-382.
- 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 Research, 19, 6, 1203-1211.
- Schrempf, H. I. L. D. G. U. N. D., Bujard, H. E. R. M. A. N. N., Hopwood, D. A., ve Goebel, W. E. R. N. E. R., 1975. Isolation of Covalently Closed Circular Deoxyribonucleic Acid from Streptomyces Coelicolor A3, 2, Journal of Bacteriology, 121, 2, 416-421.
- 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 and Development, 5, 8, 1453-1463.
- Stetter, K. O., 1982. Ultrathin Mycelia-Forming Organisms from Submarine Volcanic Areas Having an Optimum Growth Temperature of 105° C. Nature, 300(5889), 258-260.
- 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.
- Summers, D. K. ve Sherratt, D. J., 1984. Multimerization of High Copy Number Plasmids Causes Instability: ColE1 Encodes a Determinant Essential for Plasmid Monomerization and Stability, Cell, 36, 4, 1097-1103.
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. ve Horikoshi, K., 1997. Microbial Flora in The Deepest Sea Mud of The Mariana Trench, FEMS Microbiology Letters, 152, 279–285.

- Te Riele, H., Michel, B., ve Ehrlich, S. D., 1986. Single-Stranded Plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 83, 8, 2541-2545.
- Thomas, C. D., Balson, D. F. ve Shaw, W. V., 1990. In Vitro Studies of the Initiation of Staphylococcal Plasmid Replication, Specificity of RepD for Its Origin (oriD) and Characterization of the Rep-Ori Tyrosyl Ester Intermediate, Journal of Biological Chemistry, 265, 10, 5519-5530.
- Thomas, C. M., 1988. Recent Studies on the Control of Plasmid Replication, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 949, 3, 253-263.
- Tomizawa, J. I. ve Itoh, T., 1981. Plasmid ColE1 Incompatibility Determined by Interaction of RNA I with Primer Transcript, Proceedings of the National Academy of Sciences, 78, 10, 6096-6100.
- Twigg, 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, <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2329-bacterial-dna>. 06 Şubat 2023.
- URL-2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>. 27 Aralık 2022.
- URL-3, <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=14505>. 20 Şubat 2023.
- URL-4, <http://genome-www.stanford.edu/>. 20 Ekim 2022.
- URL-5, <http://www.expasy.org/tools/>. 21 Şubat 2023.
- URL-6, <http://molbiol-tools.ca/>. 21 Şubat 2023.
- URL-7, http://molbiol-tools.ca/Repeats_secondary_structure_Tm.htm. 21 Şubat 2023.
- URL-8, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/>. 21 Şubat 2023.
- URL-9, <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Anoxybacillus>. 7 Mart 2023.
- URL-10, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Anoxybacillus>. 9 Mart 2023.
- URL-11, <https://www.snapgene.com/free-trial>. 27 Nisan 2023.
- URL-12, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. 29 Nisan 2023.
- URL-13, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. 29 Nisan 2023.
- URL-14, <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>. 30 Nisan 2023.

- Van Hamme, J. D., Singh, A., ve Ward, O. P., 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67, 4, 503-549.
- Voskuil, M. I. ve Chambbiss, G. H., 1993. Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 1138-1142.
- Wang, Z., Jin, L., Yuan, Z., Wegrzyn, G. ve Wegrzyn, A., 2009. Classification of Plazmit Vectors Using Replication Origin, Selection Marker and Promoter as a Criteria. Plasmid, 61, 47-51.
- Wang, C. ve Liu, H., 2022. Factors Influencing Degradation Kinetics of mRNAs and Half-lives of microRNAs, circRNAs, incRNAs in Blood In Vitro Using Quantitative PCR, Scientific Reports, 12(1), 7259.
- Wei-İgel, J. and liungdahl, L. B., 1986. The Importance of Thermophilic Bacteria in Biotechnology, CRC Critical Reviews in Biotechnology 3, 39-108.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P. ve Yu, H., 2018. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for The Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis, Frontiers in Microbiology, 9, 2885.
- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A. ve Masamune, Y., 1991. Rolling-Circle Replication of The Plasmid pKYM Isolated from A Gram-Negative Bacterium, Proceedings of The National Academy of Sciences, 88, 22, 10282-10286.
- Yoichi, H., Hiroshi, S., Tohru, K. ve Bagdasarian, M., 1989. RepB is Required in Trans for The Two Single-Strand DNA Initiation Signals in oriV of Plasmid RSF1010, Gene, 80, 1, 155-159.
- 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.
- Yüksekdağ Z. N. ve Beyatlı Y., 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi, Gıda, 34, 2, 91-98.
- Zavitz, K. H. ve K. J. Marians., 1991. Dissecting The Functional Role of PriA Protein-Catalyzed Primosome Assembly in *Escherichia coli* DNA Replication, Molecular Microbiology, 5, 12, 2869-2873.
- Zeikus, J. B., 1979. Thermophilic Bacteria: Ecology, Physiology and Technology, Enzyme and Microbial Technology 1, 243-252.
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Hain, J. ve Kristjansson, J. K., 1993. Screening for Sulfolobales, Their Plasmids and Their Viruses in Icelandic Solfataras, Systematic and Applied Microbiology, 16, 4, 609-628.

Zillig, W., Prangishvili, D., Schleper, C., Elferink, M., Holz, I., Albers, S. ve Götz, D., 1996. Viruses, Plasmids and Other Genetic Elements of Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea, FEMS Microbiology Reviews, 18, 2-3, 225-236.



8. EKLER

Ek 1. pAnox1 plazmitinin 1592 bp'lik baz dizisi

GGCTTATCTGTCAGACATTGAATTGAACGATACAAACGCGATCCATGCTATTTTGAACGAAATGCC
TATAAAGAGGTTGACGGTAAGAAGTATATAAAGGTGGTCGGTTACATATGTATCCGCCTGGAAT
GAATTTATTCAGAAAATCGAAAGGTATTGAATATCCAGAACGCAAAGATATGCGATACAAGAATGT
AAAAAAAATAGTAGGGTCGGCACAAACCCACTACGAGAAAACCTACCATATCGAAAATGAAGATTT
TCAAAACACTATTCTACTACGAACAGTATAACTTGAAACGTACACACATGTAAACGTACATGTACAT
ACATGTACGTACACGTATATACGAAAATATATTTCGTACAGACGAAAAAGGGGCATGGGTTCGTGTCTG
GGGGGCACCGCTCTCGCGGGGGGTACCGACACGTGACCCATGCCCTATATTTTCTTTGCGGAAAA
TGTTGACTTTTTGTGTTTTTTGCGTAATAATGATGACAAATAGTAAACGAGGTGATGACGATTGGC
ACGAGATGAAAGGATAATAATTAGATTGCGCGCCGACGTTAAGGAAGAGTTTCAAGACATGGCTGA
ACAAATGGGCATGACGATCTCCGCGCTTGGTTCGTACGTGATCGGGAAGTTTGTTGTTGATCACAA
AAGGAACAGGGAGTTGCAAGAAAAAATGATTATGCCAGCTGTGAATGAGCTGGTCAAAATGATTGC
TGATGACATGCCGAACAACTTGAGTTTTTGAAATTTATTGAGGAGCTTTCGGGGCAAATGGAAAA
CAAGCTGTGAACGTGAGAACAGCGCGTTAAGTGAGCGAAGCGAACGTGCCTTGATCACTGGGTGGC
TCCCTTTGGTAAGCTTTGCCGAGGTGTGCGGGAGCGTTTTTCTCCCGCACGCCTCGCCCTTTAGGG
TTTCCAAAGGGAGCAGGGCCCCAGTGTCAAGGTAGCGCGTTGATGACGCACTATATTAAGTTGATT
TTAGTTAAACATTACGAGAAAAATTGGGGGGTGATGAGGTTGGAAAAGTCATTTGTTGGTATAAAA
CCCGATGACTTGGTAACGGTCACAAAAATGAAGCACATTGTAGAATTACAGTATATGGAAAGGAAG
AACACTAAATGTAGGATTAATAAATTAGACAAAGATTCGTACTTGGTTTTAGAACTGGCGAAGTA
AAAGAGTTTGAACACATTGAAAATCGTAAAGATTCATTAAATTCATTGCGACAAACATTTAAAAAA
ATACGATATTTGATCAATAACAACCTTTGAAGGTAAACCGAACGAATTGCATTGCACTTTAACCTAT
CGTGAGAATATGACAGACACAAAGAGGTTATATGCTGACCTGGATAAGTTTTATTAAAAGATTGAAA
TACAAGTATAAGGATAAAACAACAATAGATTACTTGAATGTAGTCGAGCCACAAGGGCGTGGGGCT
TGGCATTGTCATTTACTGTTGCGGTTCAATGATTTAGATGCGATATTCATAGAAAATGAAGTTCTT
CGGGATCTATGGGGACATGGATTTGTAAGTGTGCGCTCATTGAAAGACATTGATAACATTGGTGCT
TATTTATC

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Artvin’de tamamladı. 2018 yılında Kafkas Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’nden mezun oldu. 2019 yılında Visiobit şirketinde Biyomühendis olarak görev aldı. 2020 yılında Karadeniz Teknik Üniversite’si Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı.

