

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

pAnox1 PLAZMİTİNİN REPLİKATİF ÖZELLİKLERİNİN İN SİLİKO VE
İN VİTRO DENEYLERLE ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice AYYILDIZ

EKİM 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**pAnox1 PLAZMİTİNİN REPLİKATİF ÖZELLİKLERİNİN İN SİLİKO VE
İN VİTRO DENEYLERLE ANALİZİ**

Hatice AYYILDIZ

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16 / 09 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 11 / 10 / 2024

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“pAnox1 plazmitinin replikatif özelliklerinin in siliko ve in vitro deneylerle analizi” isimli bu tez çalışması TÜBİTAK araştırma projesinden sağlanan destekle Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı’nda hazırlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken kıymetli bilgileriyle ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım danışman hocam sayın Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’ e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yapıcı eleştirileri ve önerileri ile tezime büyük katkıları bulunan ve ufkumu açan, tez çalışmam boyunca karşılaştığım tüm soruları sabır ve özveri ile yanıtlayıp, bana alternatif yollar sunan, çalışmalarımın laboratuvarından yararlandığım saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ e teşekkür ederim. Tez savunma jüriliğimi üstlenme nezâketi gösteren sayın hocam Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ’ e çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ ya ve sayın Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’ a çok teşekkür ediyorum. Sorunlarımın hemen çözüm bulan ve her zaman destekçim olan, Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’ a, ve Dr. Öğr. Üyesi Fulya AY’ a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın bana büyük destekleri olan, laboratuvar ortamında yarattıkları neşe sayesinde motivasyonumun hep yüksek olması sağlayan, tüm sorunlarımı dinleyip göğüslerinde yumuşatan, bana hem hoca hem de güzel bir arkadaş olan sevgili Arş. Gör. Esmâ Ceylan ve sevgili Arş. Gör. Aleyna NALÇAOĞLU ŞENOCAK’ a çok teşekkür ediyorum. Bir dönem takım arkadaşım olan, birlikte çalışmalar yürüttüğümüz canım arkadaşım Gamze ÇUBUKÇI’ ya çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımın zor anlarda yardımlarıyla destek olan Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hatice AYYILDIZ

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘pAnox1 plazmitinin replikatif özelliklerinin in siliko ve in vitro deneylerle analizi’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’ in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/10/2024

Hatice AYYILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Plazmitler.....	1
1.2. Plazmitlerde Replikasyon Mekanizmaları.....	3
1.2.1. Teta Tip Replikasyon	3
1.2.2. Zincir Uzaklaştırma Tip Replikasyon	4
1.2.3. Yuvarlanan Çember Replikasyonu	5
1.3. Plazmitlerde Kopya Sayısının Belirlenmesi ve Replikasyonun Kontrolü.....	7
1.4. Plazmitlerde Görevli Proteinlerin Fonksiyonları	8
1.5. Moleküler Yerleştirme (Docking)	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Materyal.....	14
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	14
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar	15
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri	16
2.1.4. Kullanılan Vektörler	16
2.1.5. Kullanılan Mikroorganizmalar.....	17
2.1.6. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	17
2.2. Metod.....	19
2.2.1. Biyoinformatik Analizler	19
2.2.2. Moleküler Docking Analizleri	21
2.2.3. pAnox1 Kopya Sayısının Belirlenmesi.....	21

2.2.4. pAnox1 Transkriptlerinin Translasyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	23
2.2.5. Plazmit Curing	23
2.2.6. İzolatların Çözülebilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması	24
2.2.7. Hücre İçi Proteinlerinin İzolasyon	25
2.2.8. Hücre Dışı Proteinlerinin İzolasyon.....	25
2.2.9. Protein Konsantrasyonunun Tayini.....	25
2.2.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	26
2.2.11. SDS-PAGE Jelinin Gümüş ile Boyanması (Silver Staining).....	27
2.2.12. pAnox1 Rep Proteininin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	28
2.2.13. <i>E.coli</i> JM101 ve <i>E. coli</i> BL21 (DE3):pLysS Hücrelerine Transformasyon	29
2.2.14. Rekombinant Rep Proteinin Overekspresyonu ve Saflaştırılması	31
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
3.1. pAnox1'in Biyoinformatik Analizi	32
3.2. pAnox1 <i>ori</i> Bölgesinin Belirlenmesi.....	36
3.3. pAnox1 Plazmitinin Kopya Sayısının Hesaplanması.....	37
3.4. pAnox1'in Translasyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	40
3.4.1. Plazmit Curing	40
3.4.2. <i>Anoxybacillus gonensis</i> 05S15 Bakterisinin Protein Profillerinin İncelenmesi	41
3.4.3. Novel Genlerin Fonksiyonlarının Belirlenmesi ve Docking Çalışmaları	43
3.4.4. pAnox1 Rep Proteininin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	48
3.4.5. Rekombinant Rep Proteinin Overekspresyonu ve Saflaştırılması	49
4. TARTIŞMA	51
5. SONUÇLAR.....	57
6. ÖNERİLER.....	58
7. KAYNAKÇA.....	59
8. EKLER.....	74
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

pAnox1 PLAZMİTİNİN REPLİKATİF ÖZELLİKLERİNİN İN SİLİKO VE İN VİTRO DENEYLERLE ANALİZİ

Hatice Ayyıldız

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER
2024, 73 Sayfa

Bu çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin barındırdığı bir plazmit olan pAnox1'in kodladığı transkriptlerin in siliko ve in vitro analizler ile replikatif özellikleri araştırılmıştır. pAnox1 plazmiti tarafından kodlandığı bilinen 3 transkript (ORF-1, ORF-3, ORF-5) için in siliko ve in vitro analizler gerçekleştirildi. Transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda; plazmit curing, SDS-PAGE ve gümüş boyama analizleri sonucunda ORF-1 transkriptin bir protein kodladığı belirlendi ancak ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin proteine dönüşüp dönüşmediği belirlenemedi. pAnox1 tarafından kodlanan ORF-1 transkriptin 903 bp, ORF-3 transkriptin 499 bp, ORF-5 transkriptin 211 bp kodladığı ortaya çıkarıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR ile pAnox1'in hücre içindeki kopya sayısı yaklaşık olarak 127 ± 2 olarak tespit edildi. pAnox1'in replikasyondan sorumlu proteini pET28a(+) vektörüne klonlandı, *E.coli*'de overekspres edildi ve saflaştırıldı. Biyoinformatik analizler ve Docking simülasyonları ile plazmitin *ori* bölgesi, düzenleyici bölgeleri, Rep proteininin bağlanma özellikleri tespit edildi. Yapılan analiz sonucunda ORF-1 tarafından kodlanan transkriptin 37,3 kDa (313 aa) büyüklüğünde, ORF-3' ün 8,16 kDa (71 aa) büyüklüğünde ve ORF-5'in 7,59 kDa (67 aa) büyüklüğünde proteinler oluşturabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus gonensis* 05S15, pAnox1, Kopya sayısı, DNA-Protein Docking

Msc. Thesis

SUMMARY

DETERMINING THE REPLICATIVE PROPERTIES OF THE PLASMID pAnox1 BY IN SILICO AND IN VITRO ANALYSES

Hatice AYYILDIZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Halil İbrahim GÜLER
2024, 73 Pages

In this study, the replicative properties of transcripts encoded by pAnox1, plasmid harbored by *Anoxybacillus gonensis* 05S15 were investigated by in silico and in vitro analyses. In silico and in vitro analyses were performed for three transcripts (ORF-1, ORF-3, ORF-5) known to be encoded by the pAnox1 plasmid. In the studies conducted to determine whether the transcripts were translated into proteins, it was found that the ORF-1 transcript encoded a protein based on plasmid curing, SDS-PAGE, and silver staining analyses, but ORF-3 and ORF-5 transcripts were not translated into proteins. It was revealed that the ORF-1 transcript encoded 903 bp, ORF-3 transcript 499 bp, and ORF-5 transcript 211 bp. Using quantitative real-time PCR, the intracellular copy number of pAnox1 was determined to be approximately 127 ± 2 . The protein responsible for the replication of pAnox1 was cloned into the pET28a(+) vector, overexpressed in *E. coli*, and purified. Bioinformatic analyses and docking simulations identified the regulatory regions of the plasmid and the binding properties of the Rep protein. As a result of the bioinformatic analysis, it was determined that the transcript encoded by ORF-1 could form proteins of 37.3 kDa (313 aa), ORF-3 of 8.16 kDa (71 aa), and ORF-5 of 7.59 kDa (67 aa).

Key Words: *Anoxybacillus gonensis* 05S15, pAnox1 plazmit, Copy number, DNA-Protein Docking

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Plazmitler, DNA'nın kendini çoğaltan molekülleridir	2
Şekil 2. Moleküler yerleştirmenin iki modeli.	10
Şekil 3. Bir DNA-Protein yerleştirmesinin Atoudock Vina ile gösterimi	12
Şekil 5. pET28a(+) vektör haritası.....	16
Şekil 6. BLAST sonuçlarının pAnox1 ORF-1 bölgesi ile MSA karşılaştırması..	32
Şekil 7. <i>E. coli</i> 'den RC tipi plazmitlerin REP proteinleriyle ORF-1 bölgesinin MSA analizi.....	33
Şekil 8. ORF-1 amino asit dizisinin pGTG5 ve pPTG4S'nin Rep proteinleriyle hizalanması ve korunan bölgelerin tanımlanması.....	34
Şekil 9. pAnox1 palindromu ile <i>P. thermoglucosidasius</i> TG4'ten pPTG4S plazmitinin ve <i>Geobacillus</i> sp. 1121'den pGTG5'in hizalanma sonuçları.....	36
Şekil 10. <i>rpoB</i> geni (a) ve pAnox1 bölgesi (b) için standart eğrilerin oluşturulması.....	38
Şekil 11. Melting curve analizi.	39
Şekil 12. İzolatların hücre içi ve hücre dışı protein profillerinin karşılaştırılması	42
Şekil 13. İzolatların Gümüş Boyama yöntemi ile protein profillerinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 14. pAnox1 Rep proteinin 3B modellemesinin farklı stillerde gösterimi.....	44
Şekil 15. Yapılan 3B DNA modellemelerinin farklı şekillerde gösterimi.....	45
Şekil 16. Protein-DNA Yerleştirme (Docking) (DNA-4/Rep) sonuçlarının Biova Discovery Studio Visualizer programı ile detaylı olarak görselleştirilmesi.....	48
Şekil 17. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim sonucunun agaroz jel elektroforezinde gösterimi.	49
Şekil 18. Saflaştırılan Anox1_Rep proteininin SDS-PAGE ile gösterimi.....	50

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Sık kullanılan bazı moleküler yerleştirme programları ve işlevlerinin kısa açıklamaları.	13
Tablo 2. Tez Çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri	14
Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları	15
Tablo 4. Luria Bertani (LB) sıvı-agar besiyeri içeriği ve oranları	16
Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve referansları	17
Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.	17
Tablo 7. pAnox1 kopya sayısının hesaplanmasında kullanılan primerler ve özellikleri.	22
Tablo 8. qPCR çalışmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	23
Tablo 9. Kullanılan curing ajanları ve konsantrasyonları.	24
Tablo 10. 2X SDS Muamele Tamponu.....	26
Tablo 11. Yükleme Jeli	27
Tablo 12. %12' lik Yürütme Jeli.....	27
Tablo 13. Kullanılan primerler ve dizileri	28
Tablo 14. PCR karışımı bileşenleri ve miktarları	28
Tablo 15. PCR şartları.....	29
Tablo 16. Ligasyon karışımı	29
Tablo 17. Standart Grafik oluşturulması için kullanılan kalıp DNA'ların özellikleri	38
Tablo 18. qPCR analiz sonuçları.....	40
Tablo 19. Kullanılan curing ajanları, konsantrasyonları ve hücre çoğalması üzerine etkileri.	41
Tablo 20. Rep proteininde tespit edilen aktif ve pasif aminoasitler.....	45
Tablo 21. 3B modellemesi yapılan pAnox1 nükleotid dizi bölgeleri	46
Tablo 22. En iyi bağlanmaya ait (DNA-4/Rep) istatistiksel bilgiler.....	47

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
∞	: Sonsuz
aa	: Aminoasit
bp	: Baz Çifti
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
ddH_2O	: Çift distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EtBr	: Etidyum Bromür
fg	: Femtogram
g	: Gram
IPTG	: Isopropyl β -1-thiogalactopyranoside
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
LB	: Lurian Bertani
M	: Molar
MgCl_2	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mM	: Milimolar
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nt	: Nükleotit
OD	: Optical Density

ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pg	: Pikogram
pH	: Power of Hydrogen
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	: Saniye
β	: Beta



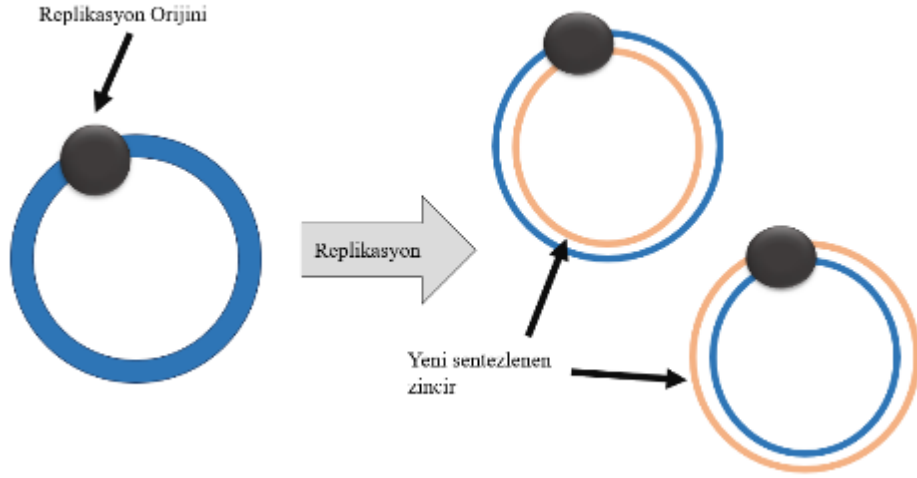
1. GENEL BİLGİLER

Plazmitler, konak içinde karakteristik kopya sayılarına sahip otonom olarak çoğalabilen ve konak hücrede tutulabilen kromozom dışı genetik elemanlardır (Wegrzyn, G., 2005). Bu replikonlar, Bacteria, Eukarya ve Archea olmak üzere 3 domainde de bulunmuştur. Plazmitler, bir organizmanın toplam genetik içeriğinin önemli bir miktarını oluşturabilir ve Archaea'nın bazı üyelerinde hücrenin genetik materyalinin %25'inden fazlasını temsil edebilirler (Holmes vd., 1995). Plazmitlerin genetik organizasyonlarının basit olması, in vitro olarak kolayca izole edilebilmeleri, manipülasyonlarının kolay olması ve hücre için vazgeçilebilir olmaları nedeniyle genetik mühendisliğinde vektör olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar (del Solar vd., 1998).

1.1. Plazmitler

Plazmitler, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin yanı sıra bazı maya ve mantarlarda da bulunabilen kendi kendini kopyalayabilen (Şekil 1) kromozom dışı DNA (bazen RNA) molekülleridir (Lederberg, 1998). Kromozom olmasalar da canlı hücrelerin içinde bulunurlar ve genetik bilgi taşırlar. İki nedenle hücrenin genomunun bir parçası olarak kabul edilmezler. Bunlardan birincisi, bir plazmit farklı türlerde bulunabilir ve konağını değiştirebilir. Bir diğer neden ise, bir plazmit bazen belirli bir konak türünün hücrelerinde yer alabilir, bazen de yer almayabilir. Bu nedenle, plazmitler genetik bilgi taşıyıcılar da hücrenin kalıcı bir parçası değildirler ve normal koşullarda hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli olmazlar (Clarck, 2010).

Replikon terimi, DNA (veya RNA) sentezinin başlatıldığı kendi replikasyon kökenine sahip olmasıyla tanımlanır. Bu nedenle kromozomlar, plazmitler, virüs genomları ve viroidler bir replikondur. Replikonlar, replikasyonları için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşımak zorunda değildirler. Enerji, ham madde ve birçok enzim aktivitesini sağlamak için konağa bağımlıdırlar. Plazmitler, bazı yönlerden hücreden hücreye hareket etme yeteneğini kaybetmiş virüslere benzerler. Replikasyon için enzimler, enerji ve ham maddeler açısından konak hücreye bağımlı olduklarından dolayı bazı viral özelliklerini korurlar (Clarck, 2010).



Şekil 1. Plazmitler, DNA'nın kendini çoğaltan molekülleridir

Genellikle kapalı halkasal ve çift sarmallı halde bulunurlar. Ancak birçok doğrusal plazmit de tanımlanmıştır. İlk doğrusal plazmit 1979 yılında *Streptomyces rochei*'de (Hayakawa, T vd., 1979) bulunmasının ardından *Agrobacterium*, *Borrelia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus* ve hatta *Escherichia* (Hinnebusch, 1993) gibi pek çok bakteri türünde de tespit edilmiştir. Plazmitler bakterilerin hayatta kalması için elzem değildirler ancak bakteriyel konakçıları olumsuz ortamlarda daha iyi hayatta kalmasına veya diğer mikroorganizmalar ile daha iyi rekabet etmelerine yardımcı olurlar. Büyüklükleri 1 kb ile 1000 kb arasında değişiklik göstermektedir ve bir bakteri birden fazla plazmit türünü barındırabilir (Tolmasky vd., 1992).

Plazmitler 30 yıl önce yaygın olarak F plazmitleri (Kline vd., 1980), kolisin üreten (Col) plazmitleri (Zverev vd., 1984) R plazmitleri (Datta, 1977) olarak sınıflandırılıyordu. Şu anda plazmitler farklı kategorilerde sınıflandırılmaktadırlar. Bunlardan biri replikasyon tipine göre sınıflandırmadır; replikasyon mekanizmasına göre plazmitler yuvarlanan çember replikasyonlu plazmitler, teta replikasyonlu plazmitler ve replikasyonun iplik yer değiştirme mekanizmasını kullanan plazmitler olarak sınıflandırılmıştır (Espinosa vd., 1995). Ancak bu tür bir sınıflandırma yalnızca çok sınırlı bilgi sağlar.

1970'lerin başında plazmit uyumsuzluğuna dayalı sınıflandırma geliştirilmiştir (Chabbert vd., 1972) ve aynı konakta iki test edilmiş plazmitin aynı anda stabil bir şekilde muhafaza edilebilme olasılığına dayanmaktadır. Bu sınıflandırma, plazmit barındıran bir suşa başka bir plazmitin aktarılmasını gerektirir. Aktarılan plazmit ortadan kaldırılırsa, bu iki plazmit uyumsuzdur ve özel uyumsuzluk grubuna atanırlar. Uyumsuzluk, plazmitleri

sınıflandırmak için ana özellik olarak kullanılmıştır (ve hala kullanılmaktadır), ancak replikasyon kontrol genlerini paylaşmayan yüksek homolojiye sahip plazmitleri hesaba katmaması dezavantajına sahiptir (Richards vd., 1979).

1.2. Plazmitlerde Replikasyon Mekanizmaları

Dairesel plazmitler için teta tip, yuvarlanan çember ve iplik yer değiştirme replikasyon olarak bilinen 3 genel replikasyon mekanizması vardır. Plazmitler üzerine yapılan araştırmalar, teta tip replikasyonun gram-negatif bakterilerde daha sık rastlandığı, bunun aksine yuvarlanan çember replikasyonu Gram-pozitif bakterilerde daha yaygın olduğunu göstermiştir (del Solar vd., 1998).

Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerde doğrusal plazmitler bulunmuştur ve yapıları iki tipte olabilir: her iki ucunda bir saç tokası olanlar ve 5' uçlarında kovalent olarak bağlanmış bir proteine sahip olanlar. Birinci grubun doğrusal plazmitleri konkatemerik ara maddeler yoluyla çoğalırken, ikinci grubunkiler bakteriyofaj f29'üne benzer bir protein hazırlama mekanizmasıyla çoğalıyor gibi görünmektedir (Chang vd., 1994).

1.2.1. Teta Tip Replikasyon

Teta tip DNA replikasyonu, ebeveyn zincirlerin ayrılmasını, bir primer RNA'nın (pRNA) sentezini ve pRNA'nın kovalent olarak uzatılmasıyla DNA sentezinin ayrılmasını içerir (Kornberg, A., and T. Baker, 1992). Replikasyon ebeveyn zincirlerin birinde (lider zincir) sürekli iken, diğer zincirde (izci zincir) kesiklidir. Teta tip replikasyonda, DNA sentezi bir veya birden fazla orjinden başlayabilir. Aynı zamanda replikasyon tek veya çift yönlü olarak ilerleyebilir. Elektron mikroskopunda (EM), replikasyon ara ürünleri Y şeklinde moleküller veya tipik θ (teta) şeklinde görüntülenebilir (Kelman, Z., ve M. O'Donnell, 1995).

Plazmit DNA replikasyonun başlaması için, bazı istisnalar dışında, spesifik bir plazmit tarafından kodlanan Rep başlatıcı proteinler gereklidir. Bu, replikasyon orijininde Rep proteininin bazı spesifik diziler ile etkileşime girmesi ile gerçekleştirilir. Teta tip replikasyon yapan bazı plazmitlerin orijininde ek özellikler tarif edilmiştir. Bunlardan biri, zincirlerin açılmasının ve konakçı başlatma faktörlerinin bir araya gelmesinin meydana geldiği, AT

bakımından zengin dizi tekrarlarını içeren bir bölge iken, diğeri bir veya daha fazla konakçı DNaA başlatıcı proteinin bağlandığı bölgedir (Bramhill, D., ve A. Kornberg., 1988).

Pol I' den bağımsız orijinlerin yapısal organizasyonun karşılaştırmalı analizi sonucu, Rep bağlanma bölgesinin kavisli bir DNA bölgesinde yer almasına rağmen, aslında AT bakımından zengin bölgelerin tekrarları içindeki DNA'nın düz olduğunu göstermiştir (Eckdahl, T. T., ve J. N. Anderson., 1990).

Bazı durumlarda replikasyon orijinleri, iteron olarak adlandırılan doğru yönlü tekrarlanan diziler içerir. İteronlar, plazmitler tarafından kodlanan ve Rep proteinlerinin bağlanma bölgeleridir (Chattoraj, D. K., ve T. D. Schneider., 1997). İteronlar replikasyon için gerekli olduğunu gibi plazmit replikasyonunun kontrolü için de gereklidir (Filutowicz, M., vd., 1986). Aynı zamanda iterolar bazen replikasyon orijini dışında da bulunabilir. Bu iteronlar replikasyonun başlatılması için gerekli değildir. Fakat başlangıç iteronlarının yaptığı gibi replikasyonun kontrolünde önemli bir rol oynarlar. Yardımcı iteronlara sahip olmayan plazmitlerde, kontrolde yer alan tek bölge orijin iteronlarıdır.

Orijin bölgesinde bulunan iteronlar, genel olarak 11 bp ve katları şeklinde, DNA çift sarmalının periyodikliğine yakın bir mesafede tandem tekrarlar olarak konumlanmaktadır. Belirli bir orijin için farklı iteronların dizileri aynı değildir ancak dizilerin temel özelliklerini tanımlayan bir fikir birliği motifine uyum sağlarlar. Örneğin, pPS10 plazmitinin dört adet 22 bp iteron aynıdır (Nieto, C., vd., 1992).

Plazmit ColE1, teta tip replikasyon ile çoğalan plazmitlere iyi bir örnektir. Plazmit ColE1, pek çok plazmitin aksine, başlatıcı bir proteine ihtiyaç duymaz. Ancak replikasyonu başlatmak için DNA Pol I' e ihtiyaç duyar (Tomizawa, J. vd., 1974).

1.2.2. Zincir Uzaklaştırma Tip Replikasyon

Zincir uzaklaştırma metodu ile kopyalanan plazmitlere bilinen en iyi örneklerinden biri, prototipi RSF1010 olan IncQ ailesinin karışık plazmiti verilebilir. DNA replikasyonun başlatılması için plazmit tarafından kodlanan üç başlatıcı protein gerekmektedir. Bu proteinler, orijinden DNA replikasyonunun başlatılmasını teşvik eder ve ardından replikasyon zincir uzaklaştırma mekanizmasıyla iki yönlü ilerler (Scherzinger, E., vd., 1991).

Zincir uzaklaştırma tipi replikasyona sahip RSF1010 plazmiti üzerinde yapılan birçok çalışma sayesinde, bu mekanizma hakkında bilinenlerin büyük çoğunluğu bu plazmit

üzerinden yapıldı. RSF1010 plazmitinde, DNA'nın replikasyonu, konak tarafından kodlanan DnaA, DnaB, DnaC ve DnaG proteinlerine ihtiyaç duymaz. RSF1010 plazmitinde bu proteinlerinin fonksiyonlarını RepA, RepB ve RepC proteinleri üstlenir. RepA, RepB ve RepC proteinlerini fonksiyonları sırasıyla şöyledir: 5'→3' helikaz, primaz ve başlatma aktivitesidir (Haring, V., ve E. Scherzinger, 1989).

RSF1010 plazmitinin replikasyon orijini, RepA, RepB ve RepC proteinleri ikinci bir plazmit tarafından sağlandığında çift yönlü replikasyonu sağlayacak minimum bölge olarak belirlenmiştir. Replikasyon orijinini de içeren bu minimal *ori* bölgesi 20 bp'lik 3 özdeş iterona ek olarak GC ve AT bakımından zengin bölgelere sahiptir. Aynı zamanda orijin bölgesinde zıt zincirlere yerleşik bulunan *ssiA* ve *ssiB* olarak adlandırılan iki palindromik dizi içerir. İteronlar RepC bağlanma bölgeleridir (Haring, V. vd, 1985). *ssiA* ve *ssiB* dizileri RepC tarafından tanınır ve bu bölgelerden sürekli replikasyon başlatılır (Honda, Y., vd. 1991). RepA proteinini helikaz aktivitesi, reklikasyonun uzaması sırasında gereklidir.

RSF1010 plazmitinin RepA helikazı, 5'→3' yönünde çalışır ve bu da onun yer değiştirmiş zincire bağlı iken çalıştığını gösterir. Zincir uzaklaştırma metoduyla replike olan plazmitlerde son aşama tek zincirli daireler ve çift zincirli süper sarmal dairelerdir. ssDNA molekülleri her iki DNA zincirine de karşılık gelebilir ve dolayısıyla *ssiA* veya *ssiB* dizilerini içerebilir. Bu diziler, ssDNA şablonlarını çift sarmallı süper sarmal dairelere dönüştüren tamamlayıcı ipliğin sentezini başlatmak için kullanılır. Bu nedenle, bu replikasyon modunda çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülleri, yeri değiştirilmiş tek sarmallı dairesel moleküller ve kısmi çift sarmallı daireler oluşturulabilir.

1.2.3. Yuvarlanan Çember Replikasyonu

Yuvarlanan çember (RC) mekanizmasında replikasyon tek yönlüdür. Öncü ipliğin sentezi ve geride kalan ipliğin sentezi birbirinde ayrıştırılır. RC replikasyonunun en ilgili özelliklerinden biri, yeni sentezlenen öncü artı ipliğin aynı ebeveyn artı ipliğine kovalent olarak bağlı kalmasıdır. Yuvarlanan çember replikasyonu, genellikle ssDNA kolifajları ve Gram-pozitif bakterilerin barındırdığı küçük çok kopyalı plazmitlerde görüldüğü gibi, Gram-negatif bakterilerde, siyanobakterilerde ve bazı arkea türlerinde de görülmektedir (Erauso, G., vd., 1996).

Yuvarlanan çember replikasyonu ile replike olan plazmitlerin pek çoğunun 10 kb'den daha küçük olduğu bilinmektedir. Ancak bu durum tüm küçük plazmitler için geçerli

değildir. Gram-pozitif bakterilerden izole edilen pRJF1 (2,6 kb) ve pWV02 (3,8 kb) gibi küçük plazmitlerde teta teplikasyon modu görülür (Kiewiet, R. vd., 1993).

Replikasyon, artı zincir üzerinde bölgeye özgü bir çentik oluşturan Rep proteinini (plazmit tarafından kodlanan) tarafından, çift sarmallı orijin (*dso*) olarak adlandırılan bir bölgede başlatılır. Kırık, lider zincirin sentezi için primer olarak görev alacak serbest 3'-OH ucu bırakır. 3'-OH ucundan itibaren uzama, ebeveyn artı zincirin yer değiştirmesiyle birlikte, replizom yeniden yapılandırılmış *dso*'ya ulaşana kadar devam eder. Burada ön zincir replikasyonunu sonlandırmak için bir DNA zincir transfer reaksiyonu meydana gelir (Gruss, A. D., ve S. D. Ehrlich., 1989). Dolayısıyla, öncü zinciri replikasyonunun son ürünleri, ebeveyn eksi zincir ve yeni sentezlenen artı zincir tarafından oluşturulan bir dsDNA molekülü ve ebeveyn artı zincire karşılık gelen bir ssDNA ara ürünüdür. Son olarak ebeveyn artı zincir, fiziksel olarak *dso*'dan uzak olan tek iplikli kökünde (*sso*) başlayan konakçı proteinler tarafından dsDNA formlarına dönüştürülür ve replikasyon ürünleri konakçı DNA giraz tarafından aşırı sarmallaştırılır. İplik yer değiştirme mekanizmasıyla replikasyonun aksine, RC replikasyon modu tarafından üretilen ssDNA ara ürünleri, plazmit DNA iplikçiklerinden yalnızca birine karşılık gelir (te Riele H. vd., 1986).

RC kopyalanan plazmitlerde değiştirilebilir gen modülleri bulunmaktadır (Projan, S. J., ve R. P. Novick., 1988). Ancak tek bir temel modül vardır. *dso*, *rep* geni ve plazmit elemanlarını içeren bu modül, öncü zincir başlatma ve kontrol (LIC) bölgesi olarak adlandırılır (del Solar G. vd., 1993). Ek olarak plazmitler bir antibiyotik direnç belirleyicisi, konjugatif mobilizasyonda (*mob*) yer alan bir gen ve bir veya iki *sso* bölgesi içermektedir.

dso içinde iki lokus tanımlanmıştır. Bunlar; bağlanma ve *nic* bölgeleridir (del Solar G 1993). İlk lokus, Rep proteininin plazmit DNA'ya bağlanması için gerekli olan dizileri içerir. İkincisi ise, Rep proteininin ilk çentiği yerleştirdiği bölgeyi içerir. İki lokus bitişik olabilir (pT181 ailesi) veya yaklaşık 100 bp'ye kadar (pMV158 ailesi) ayrılabilir. Bağlanma bölgelerindeki DNA dizileri çentik bölgesine bitişik ters tekrarlı diziden oluşabilir. Veya çentik bölgesinden araya giren diziler ile ayrılmış iki veya üç doğrudan tekrarlı dizilerden oluşabilir.

Yuvarlanan çember replikasyonu ile kopyalanan plazmitlerin Rep proteinleri, DNA zincir transferaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite sayesinde DNA'yı, tip I topoizomera benzeri bir şekilde parçalayabilir veya birleştirebilir. Plazmit pT181'in RepC proteinini saflaştırıldı ve plazmit *dso* (Koepsel R. R. vd., 1985) üzerinde çentikleme aktivitesine sahip olduğu gösterildi. Bu bulgu, hücre içi plazmit ssDNA'nın varlığı ve öncü zincir sentezi için

bir primer RNA'ya ihtiyaç duyulmaması ile birlikte, plazmit replikasyonu için RC mekanizmasının ilk göstergelerini sağladı (e Riele H. vd., 1986).

1.3. Plazmitlerde Kopya Sayısının Belirlenmesi ve Replikasyonun Kontrolü

Plazmitlerin kopya sayısı farklı bakterilerde ve belirli üreme koşullarında değişebilir, ancak her plazmitin ayırt edici bir kopya sayısı vardır. Bu bazı kontrol elemanları ile sağlanır. Kontrol sistemleri, ortalama kopya sayısından sapmaları düzelterek plazmit kopya sayısını ve replikasyon oranını sabit tutar. Plazmitler, kopya sayısını korumak için negatif düzenleyici devreler kullanır (Pritchard, R. H., 1978).

Negatif efektörlerle modüle edilen bir replikasyon kontrol modeli Pritchard ve diğerleri tarafından önerilmiştir (Pritchard, R. H., vd, 1969). Pritchard göre, bir plazmit yeni bir konakçıya yerleştiğinde, negatif düzenleyicilerin konsantrasyonu göz ardı edilebilir miktarda olmalıdır. Plazmit yeni bir konakçıya yerleştikten sonra, yeterli kopya sayısına ulaştığında ortamdaki kopya sayısını koruması gerekir. Kontrol sistemleri bunu replikasyon oranını arttırarak veya azaltarak yapar (Abeles, A. L., vd., 1993).

Çeşitli sistemlerde replikasyonu kontrol eden mekanizmalar incelenmiştir ve antisens RNA, başlatıcı proteinlerin bağlandığı DNA bölgeleri (iteronlar) ve hem bir antisens RNA hem de bir protein ile düzenleme gibi birçok inhibitör belirlenmiştir (Thomas, C. M., 1988).

Plazmit kopya sayısını kontrol eden antisens RNA'lar, hedef transkriptin 5' ucunun tamamlayıcısıdır ve 'komplementer transkribe edilmiş RNA'lar (ctRNA'lar) olarak bilinir. Bazı durumlarda inhibisyon ctRNA'lar tarafından sağlanır. Diğer durumlarda ise inhibitör-hedef dubleksinin oluşumu, transkripte yapısal bir değişikliğe neden olur ve inaktif olmasını sağlar. Bu duruma en iyi örnek ColE1 plazmiti verilebilir. ColE1 plazmit replikasyonu, RNaze H tarafından işlenen 550 nt uzunluğunda bir transkript olan RNA II tarafından başlatılır ve DNA replikasyonu için gerekli olan bir primerdir. RNA II serbest 3'-OH ucunu oluşturur. Bu serbest 3'-OH ucu replikasyon için hız sınırlayıcıdır ve RNA II'nin 5' ucuna tamamlayıcı olan 108 nt uzunluğunda bir RNA, antisene RNA I tarafından düzenlenir. Antisens RNA ve RNA II arasındaki hibrit oluşumu, primer RNA'nın ikincil yapısını değiştirerek, primerin DNA ile hibridize olmasını engeller. DNA-RNA hibridi oluşmadığında RNA II, RNaze H tarafından işlenemez ve böylece replikasyonun başlatılması engellenmiş olur (Som, T., ve J. Tomizawa., 1983).

Teta replikasyonlu iteron içeren plazitlerin Rep proteinleri ya otoregülasyonludur ya da transkripsiyonel kontrol altındadır. İteronlar, kopya sayısının kontrolünde görev alırlar (Chattoraj, D. K., 1997). F plazmiti için, *oriS*'nin iteronları uyumlu bir plazmite klonlandığında, *oriS* bağımlı replikasyonun iteronlar tarafından engellendiğini gösteren ilk çalışma olmuştur (Tolun, A., ve D. R. Helinski., 1981). Benzer şekilde P1 ve R1162/RSF1010 gibi bazı itoren içeren plazmitler de keşfedilmiştir. P1 plazmitinde inhibisyon derecesi iteron sayısı ile orantılıdır. Ancak R1162 plazmitinde inhibisyon hızı Rep proteininin aşırı üretimi ile sağlanır (Kim, K., vd., 1985).

1.4. Plazmitlerde Görevli Proteinlerin Fonksiyonları

Proteinler, yaşamın temel yapı taşlarını oluşturur ve hücrelerin yanı sıra dokuların yapısını destekleyen, enzimlerden hormonlara kadar birçok kritik işlevi olan organik moleküllerdir. Canlı organizmalar, bu proteinleri amino asitlerden sentezler ve bu moleküller, metabolizmanın düzgün işleyişi için elzemdir. Proteinler, metabolizma süreçlerini hızlandırma, DNA'nın kopyalanmasını sağlama, çevresel uyarılara yanıt verme, hücrelere ve organizmalara yapısal destek sağlama ve molekülleri taşıma gibi çeşitli işlevleri yerine getirir (A. L. Demain ve P. Vaishnav, 2009).

Plazmitler, bakterilere çeşitli avantajlar sağlayan genleri taşır ve bu genlerin kodladığı proteinler, bakterilerin çevresel zorluklara karşı direnç kazanmasını, hayatta kalmasını ve bazen patojenik hale gelmesini sağlar. Bu proteinler bakterilere antibiyotik direnci kazandırabilir, toksin üretmelerini sağlayabilir veya genetik materyali diğer bakterilere aktarabilir.

Plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik direnç genleri, bakterilere antibiyotiklerin öldürücü etkisine karşı direnç kazandırır. β -laktamaz enzimleri, antibiyotik direnci sağlayan en yaygın plazmit kodlu proteinler arasında yer alır. β -laktam antibiyotikleri, bakterilerin hücre duvarı sentezinde kritik olan peptidoglikan zincirlerini çapraz bağlayan enzimleri inhibe eder. Bu da bakterinin hücre duvarının zayıflamasına ve hücrenin ölmesine neden olur. β -laktamaz enzimleri, bu antibiyotiklerin β -laktam halkasını kırarak yapısal olarak bozar ve antibiyotikleri etkisiz hale getirir. Bu durumda, antibiyotikler bakterinin hücre duvarına zarar veremez ve bakteri hayatta kalmaya devam eder (Gülay, Z., 2002).

Dünya genelinde yapılan araştırmalarda, *Enterobacteriaceae* ailesinden birçok bakteride plazmit üzerinde kodlanan ve amino asit sayısı 214 ile 221 arasında değişen QnrA,

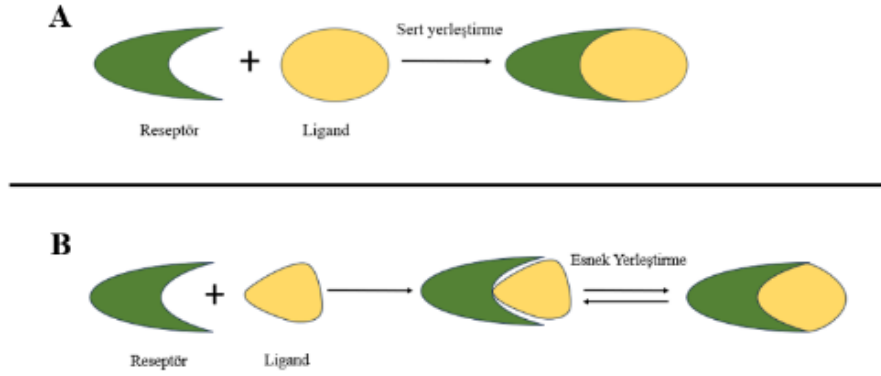
QnrB, QnrC, QnrD, QnrE, QnrS ve QnrVC olmak üzere yedi farklı protein grubu tanımlanmıştır. Kinolonlar, DNA replikasyonunu hedef alan ve bakterilerin DNA giraz (topoisomeraaz IV) enzimlerini inhibe eden bir antibiyotik sınıfıdır. Qnr proteinlerinin, kinolonların hedef enzimi olan DNA giraz ve topoisomeraaz IV'e bağlanarak kinolon-enzim-DNA kompleksinin oluşumunu engelleyerek bu enzimleri kinolon inhibisyonuna karşı dirençli hale getirirler (Cattoir, V. vd., 2008).

Plazmitler, üzerinde bulunan ve *tra* gen kümesi olarak bilinen bir dizi gen kodlarlar. Bu genler, hem plazmitin transferini hem de hücreler arası bağlantıyı sağlayan proteinleri üretirler. A geni, F pilusunun oluşumunda kritik bir rol oynayan proteini kodlar. Bu protein hücre yüzeyinde F pilusunun yapımından sorumludur. Bu yapı, bakterinin alıcı hücreyle fiziksel temas kurmasını sağlar. F pilusu olmadan, bakteriler birbirlerine plazmit transferi gerçekleştiremez. Bu nedenle TraA proteini, konjugasyon sürecinin başlaması için esastır.

Rep proteinleri, plazmitlerin kendi kendini çoğaltma kapasitesini yöneten ve replikasyon sürecini başlatan proteinlerdir. Bu proteinler, plazmitlerin hücre döngüsü sırasında doğru bir şekilde replikasyonunu sağlar ve plazmitin hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere düzgün bir şekilde dağıtılmasını temin eder. Plazmitler, hücre DNA'dan bağımsız olarak replikasyona girebildikleri için, çoğalma sürecini kontrol eden kendi iç mekanizmalarına ihtiyaç duyarlar. Bu noktada Rep proteinleri, plazmitin kendine özgü replikasyon orijini (*ori*) bölgesine bağlanarak replikasyonun başlamasını sağlarlar (Ingmer, H. ve Cohen, S. N., 1993). Replikasyon orijini, plazmitin çoğalmasının başladığı spesifik bir DNA dizisidir. Bu bölgeye Rep proteininin bağlanmasıyla birlikte replikasyonun başlaması için gerekli diğer enzimlerin toplanması sağlanır. ColE1 tipi plazmitler gibi bazı plazmitlerde, Rep proteini RNA primerlerine bağlanarak replikasyonu başlatır. Bu plazmitler düşük kopya sayısına sahiptir ve Rep proteini, replikasyon sürecini sıkı bir şekilde düzenler. Plazmitlerin özelliklerine bağlı olarak farklı Rep proteinleri bulunur. pSC101 plazmiti, düşük kopya sayısına sahip bir plazmittir ve RepA proteini bu plazmitin yalnızca birkaç kopya halinde çoğalmasını sağlar. RepC, rolling circle (yuvarlanan daire) replikasyonunu başlatan bir protein türüdür. Bu protein, plazmitin DNA'sının bir zincirini kırar ve yeni DNA zinciri sentezini başlatır. pT181 gibi plazmitler bu tür replikasyon mekanizmasını kullanır ve RepC proteini plazmitin replikasyonunu başlatır (Ingmer, H. ve Cohen, S. N., 1993).

1.5. Moleküler Yerleştirme (Docking)

Moleküler yerleştirme, küçük bir molekül (ligand) ile bir protein (reseptör) arasındaki etkileşimi atomik düzeyde hesaplamalı olarak modellemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu da hedef proteinlerin bağlanma bölgesindeki küçük moleküllerin davranışlarını karakterize edilmesini ve temel biyolojik süreçlerin açıklanmasını sağlar (McConkey vd., 2002). Yerleştirme çalışmalarının amacı, istenen üç boyutlu yapıları tahmin etmektir. Bu olasılıklar, doğada bulunma olasılığı en yüksek olan yapıları belirlemek için puanlama işlevleri kullanılarak sıralanır (Morris vd., 2008). Puanlama işlevleri, iki bileşik arasındaki bağlantının veya bağlanma afinitesinin gücünü, tercih edilen yönelimlerine göre tahmin eder. Sinyal iletimi, proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar ve lipitler gibi fizyolojik olarak önemli maddelerin etkileşimlerine bağlıdır (Shoichet vd., 2002).



Şekil 2. Moleküler yerleştirmenin iki modeli. (A) Anahtar-kilit modeli. (B) İndüklenmiş uyum modeli

Moleküler yerleştirmenin iki farklı biçimi vardır. Bunlardan ilki ‘anahtar ve kilit modeli’ olarak bilinir ve ‘kilidi’ açmak üzere ‘anahtarın’ doğru yönünü bulmak için reseptör ve ligandın sert (rijit) kenetlenmesini ifade eder (Şekil 2-A). Bu model, geometrik tamamlayıcılığın önemine dikkat çekmektedir (Morrison vd., 2006). Ancak kenetlenme süreci aslında daha esnektir (Şekil 2-B). Reseptör ve ligandların, birbirlerine uyum sağlamak amacıyla konformasyonel değişikliğe uğramaları gerekir. Bu nedenle ikinci model olarak “indüklenmiş uyum modeli” tarif edilmiştir (Koshland, 1995). Bu modelde geometrik tamamlayıcıların yanında, enerji tamamlayıcılığı ve serbest enerjiyi en aza indirerek en kararlı yapının elde edilmesi sağlanır (Audie vd., 2007).

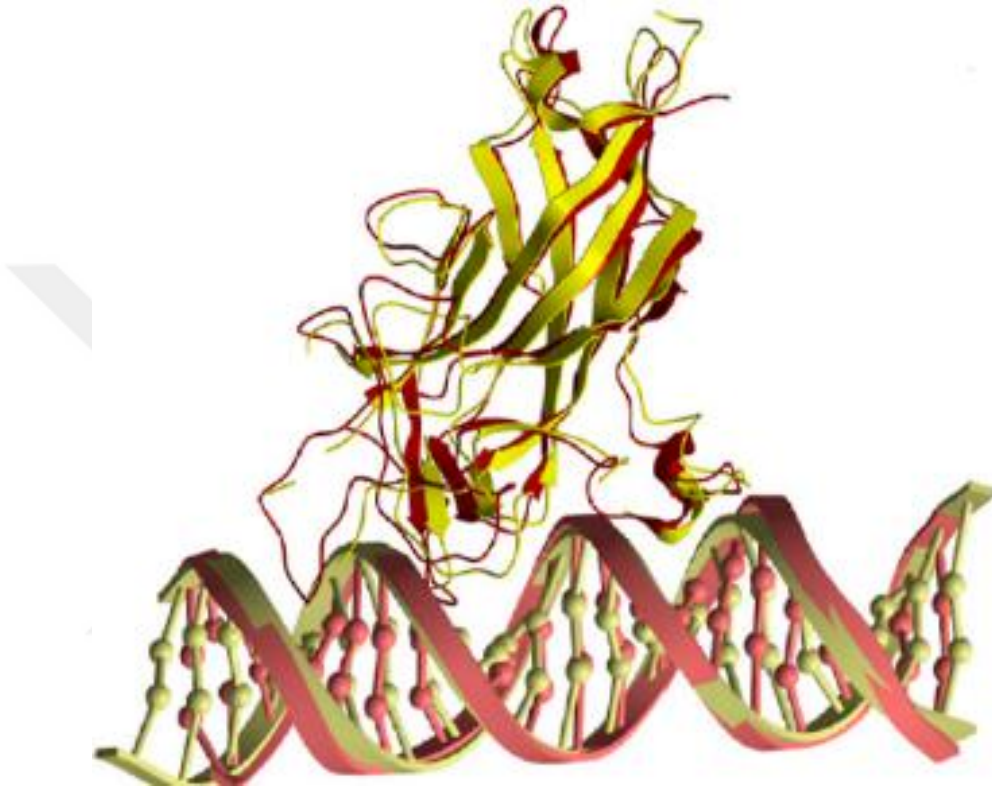
Proteinler ve nükleik asitler hücredeki en önemli iki biyolojik makromolekül türüdür. Etkileşimleri, sinyal iletimi, hücre düzenlemesi, protein sentezi, DNA replikasyonu ve onarımı, RNA transkripsiyonu vb. gibi birçok biyolojik süreç için çok önemlidir. Bu nedenle, karmaşık yapılarının belirlenmesi, biyolojik süreci atomik düzeyde anlamak ve böylece bu etkileşimleri hedef alan terapötik müdahaleler veya ilaçlar geliştirmek için değerlidir (Wodak and Janin, 1978). Deneysel yöntemlerdeki yüksek maliyet ve teknik zorluklar göz önüne alındığında, karmaşık yapıların tek tek yapılardan hesaplamalı olarak tahmin edildiği moleküler yerleştirme, karmaşık yapıların belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Huang, 2014).

DNA-protein docking (yerleştirme), bir proteinin belirli bir DNA dizisi ile etkileşim kurma mekanizmasını incelemek için kullanılan hesaplama yöntemidir. Bu yöntem, özellikle hücre içindeki biyolojik süreçleri anlamada büyük öneme sahiptir, çünkü birçok biyolojik süreç (gen düzenlenmesi, DNA tamiri, transkripsiyon vb.) DNA-protein etkileşimleri ile yönetilir. DNA-protein etkileşimleri, belirli bir proteinin DNA üzerindeki spesifik bağlanma bölgelerini tanıma ve bu bölgeye bağlanarak işlevini yerine getirme sürecini içerir. DNA-protein docking'in amacı, bir proteinin DNA'ya nasıl bağlandığını tahmin etmektir. Bu tahminler genellikle moleküler modelleme ve simülasyon teknikleriyle yapılır ve deneysel sonuçlarla doğrulanır. Hesaplama tabanlı yaklaşımlar, deneysel yöntemlere göre daha hızlı ve düşük maliyetlidir, ancak sonuçların güvenilirliği deneysel verilerle desteklenmelidir (van Dijk, M., ve Bonvin, A. M., 2008).

DNA-protein docking sürecindeki temel adımlar:

1. Hazırlık aşaması: DNA ve proteinin yapılarının hazırlanması gerekir. Protein yapısı genellikle X-ışını kristalografisi, NMR veya Cryo-EM gibi deneysel yöntemlerle belirlenir. DNA yapısı ise, çift sarmallı bir model olarak kullanılır.
2. Docking aşaması: DNA ile proteinin farklı bağlanma pozisyonları denir. Bu aşamada, proteinin DNA üzerindeki olası bağlanma bölgeleri aranır ve protein ile DNA arasında en uygun bağlanma konformasyonu belirlenmeye çalışılır.
3. Skorlama aşaması: Farklı bağlanma pozisyonları enerji fonksiyonları ile değerlendirilir. En düşük serbest enerjiye sahip konformasyon, en olası bağlanma modeli olarak kabul edilir.

4. Sonuçların analizi: Bağlanma pozisyonları analiz edilerek, proteinin hangi DNA dizisine ve hangi bölgelerle etkileşim kurduğu belirlenir (van Dijk, M., ve Bonvin, A. M., 2010).



Şekil 3. Bir DNA-Protein yerleştirmesinin Atoudock Vina ile gösterimi (Rodríguez-Lumbreras LA vd., 2022)

Tablo 1. Sık kullanılan bazı moleküler yerleştirme programları ve işlevlerinin kısa açıklamaları.

Yerleştirme Programı	Açıklama
HEX	Küresel polar Fourier korelasyon yöntemine dayalı moleküler yerleştirme algoritması (http://hexserver.loria.fr/).
ZDOCK	Uzaysal serbestlik derecelerinin üç boyutlu ızgara aramasını kullanan Hızlı Fourier Dönüşümü yöntemlerine dayalı katı cisim yerleştirme algoritması (https://zdock.umassmed.edu).
HADDOCK	Hem katı cisim yerleştirmeyi hem de yarı esnek rafinasyonu gerçekleştiren biyokimyasal ve biyofiziksel bilgi odaklı yerleştirme yaklaşımına dayalı Yüksek Belirsizlik Odaklı Yerleştirme (http://haddock.chem.uu.nl/Haddock).
PATCHDOCK	Şekil tamamlayıcılık prensiplerini ve yerel özellik eşleştirmesini kullanan geometri tabanlı moleküler yerleştirme algoritması (http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock).
NPDOCK	İstatistiksel potansiyellere dayalı moleküler yerleştirme algoritması (http://genesilico.pl/NPDock).
AUTODOCKTOOLS	Grid tabanlı yerleştirme algoritması (http://mgltools.scripps.edu).

Protein-nükleik asit etkileşimlerini incelemeye belirli teknik zorluklar vardır. Bunun başlıca nedeni, DNA ve RNA'nın yüksek derecede yüklü olması ve proteinlere göre daha esnek olmalarıdır. Proteinlerle etkileşime giren bağlanma kaynaklı konformasyonel değişiklikler genellikle yan zincirlerde lokalize olurken, DNA'da bu değişiklikler tüm heliksin bükülmesi ve çözülmesi gibi kapsamlı konformasyonel değişikliklere yol açabilir (Michael vd., 1998)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 2. Tez Çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri

Kullanılan Cihazlar	Modeli
Buz Dolabı (+4)	Profilo
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik
Isıtıcı Bloklar	Biosan
Etüv	Nüve EN500
İnkübatör	Thermo Scienfitic
Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
Elektroforez Tankı	Bio-Rad Mini Protean
SDS-PAGE Jel Elektroforez Tankı	C.B.S. Scientific Co/MGV 402
Kabin	Nordicsafe/Esko Biyogüvenlik
Mikrodalga Fırın	Awox
Otoklav	Hırayama Hiclave Autoclave
Santrifüj	Sigma
Nanodrop	Thermo Scientific/Multiskan
Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Ph Metre	GMBH
Saf Su Cihazı	Mp MINI pure DestUp
Spektrometre	Jenway
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 220R
Uv Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Sonikatör	Scientz
Konsantratör	Merck
Vortex	Diehl

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları

Kullanılan Kimyasallar	Markası
Agar	Canda Lab
Actinomicyn D	BioShop
Akridin Oranj	Applichem
Amonyum Asetat	Isolab
Amonyum Persülfat	Merck
Ampisilin	Applichem
Asetik Asit	Riedel-dan Haen
CaCl ₂	Sigma
DNA Ladder	NEB
dNTP	Promega
EDTA	Merck
Glikoz	Merck
Gliserol	Merck
IPTG	Applichem
Kanamisin	Applichem
Lizozim	Sigma
Metanol	Merck
MgCl ₂	Sigma Aldrich
NaCl	Merck
NaOH	Isolab
Protein Ladder	Promega
Trypton	Merck
Trisma Base	Sigma
X-Gal	Applichem
Yeast Extrakt	Merck

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

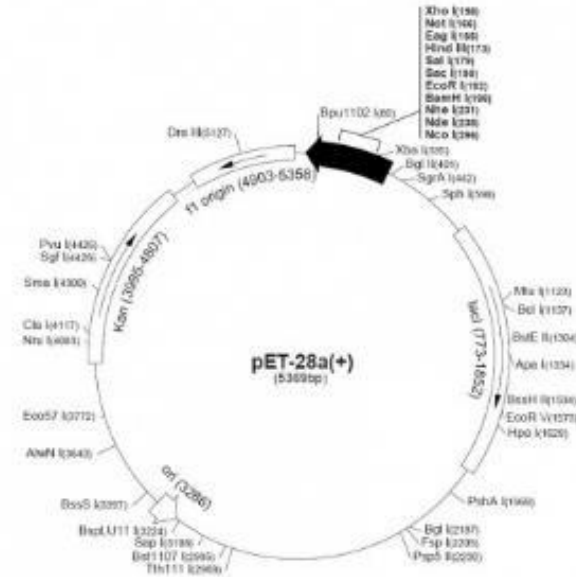
Tablo 4. Luria Bertani (LB) sıvı-agar besiyeri içeriği ve oranları

Bileşenin Adı	Miktarı
Trypton	10 gr
Yeast Ekstract	5 gr
NaCl	5 gr
ddH ₂ O	1000 mL

Yukarıda belirtilen bileşenler istenilen oranda karıştırıldıktan sonra pH değeri 7,0'a ayarlanır. Ardından besiyeri 121 °C'de 15 dk. süre ile sterilize edilir. Besiyerine % 1,2 agar ilave edilerek LB agar yapılabilir (Luria, S., 1984)

2.1.4. Kullanılan Vektörler

Bu tez kapsamında N-terminal bölgesinde His-Tag®/thrombin/T7-Tag® ve C-terminal bölgesinde de His-Tag dizisi taşıyan pET28a(+) vektörü (Novagen Inc.) kullanılmıştır.



Şekil 4. pET28a(+) vektör haritası

2.1.5. Kullanılan Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar tablo 5’ de verilmiştir.

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve referansları

Mikroorganizmalar	Referanslar	Özellikleri
<i>Anoxybacillus gonensis</i> 05S15	KTÜ Moleküler Biyoloji ve Araştırma Laboratuvarı	Gram (+), termofilik
<i>E. coli</i> BL21 (D3)	Novagen	<i>F'</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> , (<i>rB</i> - <i>mB</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (D3), <i>pLysS</i> , <i>CamR</i>

2.1.6. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışlar tablo 6’ te verilmiştir.

Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.,

Çözeltiler	Hazırlanışı
10X TBE	108 g Trisma Base, 55 g Boric Acid, 8,3 g EDTA (20 mM) tartılarak 500 ml distile suda çözdürülerek son hacim 1 L’ye tamamlanır.
SDS Yıkama Tamponu I	50 mL Metanol, 10 mL Asetik asit ve 40 mL ddH ₂ O ile hazırlanır.
SDS Yıkama Tamponu II	7.5 mL Metanol, 10,5 mL Asetik asit ve 132 mL ddH ₂ O ile hazırlanır.
SDS Tamponu	7,6 gr Glisin, 1,5 gr Tris-Base ve 5 ml %10 SDS ile karışım hazırlanarak distile su ile 500 ml’ ye tamamlanır.

Tablo 6'nın devamı.

IPTG	0,5 M IPTG için 4,6 gr IPTG (toz) tartılır ve 40 ml distile su içerisinde çözündürülür. Daha sonra 0,22 µm'luk filtreden geçirilerek sterilize edilir.
% 10' luk SDS	1 g SDS tartılarak 9 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.
Kanamisin	50 mg/ml Kanamisin için, 50 mg kanamisin tartılır ve 50 ml distile su içerisinde çözündürülür. Ardından uygun filtreden geçirilerek sterilize edilir.
1 M Glukoz	18,016 g glukoz tartılarak 100 ml distile su içerisine hazırlanır ve ardından 121 °C'de 1 atm basınçta otoklav edilir.
0,5 M EDTA	14,612 g EDTA tartılarak 100 ml su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanır.
1 M Tris-HCl	12,114 g Tris Base 85 ml distile su içerisinde çözündürülür. Daha sonra 1 M HCl eklenerek çözeltinin pH 'sı 8,0 olması sağlanır. Son hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.
50X TAE	40 ml EDTA (0,5 M), 96, 8 g tris base tartılır ve 22,84 ml asetik asit ilave edilir. Son hacim, distile su 400 ml'

Tablo 6'nın devamı.

%10APS	1 ml distile su içerisinde 0,1 gr amonyum persülfat tartılarak vortex yardımı ile homojen hale getirilir.
200 mM NaOH	399,97 mg naoh hassas terazi ile tartılı ve 50 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözelti hazırlanır.
Etidyum Bromür	10 mg/ml için, 10 mg etidyum bromür hassas terazide ölçülür 10 ml TAE tampon içerisinde çözündürülür.
X-Gal	100 mM stok solüsyon için, 400 mg X-Gal hassas terazide tartılır, 10 ml N-N dimetil format içerisinde çözülür.

2.2. Metod

TÜBİTAK 120Z949 numaralı araştırma projesi tarafından sağlanan destekle, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin 1592 bp uzunluğunda, kriptik, küçük genomlu, çift zincirli, % 40,01 GC içerikli yeni bir plazmit (pAnox1) tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile pAnox1 plazmitinde 5 muhtemel ORF bölgesinin olduğu ve bunlardan üçünün transkript ürettiği belirlenmiştir (Cubukci, G., 2024), ancak fonksiyonları aydınlatılmamıştır.

Bu tez çalışması, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin barındırdığı pAnox1 plazmiti tarafından kodlanan muhtemel ORF' lerin in siliko ve in vitro deneylerle fonksiyonel analizini kapsamaktadır.

2.2.1. Biyoinformatik Analizler

pAnox1 plazmitinin tüm baz dizini elde edildikten sonra mevcut ticari programların yanı sıra birçok ücretsiz biyoinformatik yazılım ve araç kullanılarak analizler yapıldı.

BLAST aramaları, hedef DNA dizisi için dizilim benzerliklerini ve veri tabanı eşleşmelerini belirlemek amacıyla NCBI-GenBank kullanılarak gerçekleştirildi. Plazmitin olası protein-kodlama bölgeleri, ilgili plazmitlerdeki replikasyon başlatıcı proteinlerle benzerlikleri tanımlamak için HHpred (Homology Detection and Structure Prediction by HMM-HMM Comparison) sunucusu (URL-1) kullanılarak analiz edildi. HHpred, profil gizli Markov modelleri (HMM'ler) kullanarak protein homolojisi tespiti ve yapı tahmini için hızlı bir sunucu olarak hizmet vermektedir. Bu sunucu, çeşitli veri tabanlarını tarar ve sonuçları PSI-BLAST benzeri bir formatta sunar. Ayrıca hizalama seçenekleri sunar ve MODELLER kullanarak 3D modeller oluşturur (Söding, J., vd., 2005). Bu analiz, korunmuş bölgelerin, spesifik motiflerin ve diğer ilgili özelliklerin tanımlanmasını içermektedir (Zimmermann, I., vd., 2018). Uzak homoloji tespiti için HHpred kullanıldı (Gabler, F., vd., 2020). HHpred, tekil dizileri veya çoklu dizi hizalamalarını (MSA'lar) bir sorgu HMM'sine dönüştürür. Bu HMM, Uniclust veri tabanında arama yapmak için kullanılır ve sorgu MSA'sına önemli ölçüde benzer diziler eklenir, böylece sonraki arama iterasyonlarına katkıda bulunur. Bu yöntem, uzak homolog dizileri tespit etmede oldukça etkili olur. Ancak, kullanıcı kılavuzunda belirtildiği gibi, "arama iterasyonlarının sayısı arttıkça, MSA'ya homolog olmayan dizilerin veya segmentlerin dâhil edilme riski artar ve bu, sonraki iterasyonlarda aynı türden diğer dizileri çekebilir." Bu endişeyi gidermek amacıyla, "MSA oluşturma iterasyonları" parametresi sıfıra ayarlanarak iterasyon sayısı "0" olarak belirlendi. Diğer tüm parametreler varsayılan ayarlarında bırakıldı.

pANox1 plazmitindeki restriksiyon enzim bölgelerinin kapsamlı analizi için SnapGene Viewer 2.2.2 yazılımı kullanıldı. DNA dizi analizi, plazmit haritası oluşturma, primer tasarımı, dizi sonuç analizi, ORF'lerin tanımlanması ve iteronların, ters ve doğrudan tekrarların, ayrıca palindromik dizilerin araştırılması için Gentle V 1.9.4, BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, T.A., 1999), SnapGene Viewer 2.2.2 ve FastPCR 6.1.53.beta 3, Lasergene 9.1. (DNASTAR Inc.) yazılımı, Plasmapper, Online Analysis Tools, Repeats, Secondary Structure & Melting Temperature Tools, Radar (NCBI), Clustal Omega (URL-2), Blast, Genbank (URL-3), NEBcutter (URL-4) gibi yazılım programlarından yararlanıldı. Plazmit DNA dizilerinin 3 boyutlu pdb dosyalarının oluşturulması için BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2018 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016) ve Avogadro 1.2.0 (Hanwell, M.D., vd., 2012) programları kullanıldı. Tespit edilen Rep proteininin 3B modellemesi için ALphaFold (URL-5) aracı kullanıldı. pdb formatında oluşturulan DNA ve protein dosyalarının DOCKING analizleri için HADDOCK 2.4 (URL-6) aracı kullanıldı. Docking

analizlerine başlamadan önce Rep proteinin aktif ve pasif aminoasitlerinin belirlenmesi için HADDOCK server'ı içindeki CPORT (URL-7) aracı kullanıldı. Elde edilen verilerin incelenmesi ve bağlanma modellerinin görsel olarak hazırlanması için Discovery Studio Visualizer programı kullanıldı.

2.2.2. Moleküler Docking Analizleri

pAnox1 genomundan kodlanan ve transle olduğu tespit edilen Rep proteinin fonksiyonun tahmin edilebilmesi için ilk olarak DOCKING çalışmaları yapıldı. Bu kapsamda pAnox1 ORF-1 bölgesinin 3B modellemesi yapıldı ve plazmit genomuna bağlanabileceği bölgelerin belirlenebilmesi için DNA-protein DOCKING çalışmaları yapıldı. Bu sayede DNA sarmal yapısı üzerine Rep proteininin bağlanma modelleri oluşturuldu ve bağlanma skorları elde edildi. Plazmit DNA dizilerinin 3 boyutlu pdb dosyalarının oluşturulması için BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2018 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016) ve Avogadro 1.2.0 (Hanwell, 2012) programı kullanıldı. Tespit edilen Rep proteininin 3B modellemesi için ALphaFold aracı kullanıldı. Yapılan modellemeler sonucunda pdb formatında oluşturulan DNA ve protein dosyalarının DOCKING analizleri için HADDOCK 2.4 aracı kullanıldı. Yapılan analizler sonucunda Rep proteinin, pAnox1 plazmiti üzerinde hangi bölgelere bağlandığı ve bağlanma enerjileri elde edildi. Elde edilen veriler Discovery Studio Visualizer programı ile incelendi, bağlanma modelleri çizilerek görsel olarak düzenlendi. Bu kapsamda DNA-protein etkileşim bölgeleri ve bağlanma skorları elde edilerek Rep proteinin pAnox1 genomuna hangi bölge/bölgelerden bağlandığı tespit edildi.

2.2.3. pAnox1 Kopya Sayısının Belirlenmesi

Real-Time qPCR tekniği ile konak hücre içerisinde stabil olan plazmitlerin kopya sayısı kantitatif olarak hesaplanabildiği bilinmektedir (Fujimura vd., 1996). qPCR tekniği ile kopya sayısının hesaplanabilmesi için genomda kopya sayısı önceden bilinen bir standart gen kullanılmalıdır. Bu çalışma için *Anoxybacillus gonensis* 05S15'den (pAnox1'yi barındıran orijinal suş) genomundaki tek kopyalı olduğu bilinen *rpoB* geni kullanıldı. İlk olarak, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 genomundaki *rpoB* geni ve pAnox1 plazmitinin replikasyon orijin bölgesinin iç kısımlarından seçilen bir bölge için spesifik olan iki primer seti dizayn edildi (Tablo 2). Bu primer setleri, doğru karşılaştırma ve hesaplama

yapılabilmesi için, her iki bölgeden de eşit uzunlukta (ortalama 150 bp) bir bölgenin çoğaltılabilmesine olanak sağlayacak şekilde dizayn edildi. Yapılan qPCR çalışmasının spesifitesini arttırmak için dizayn edilen primerlerin Tm derecelerinin ve % GC içeriklerinin birbirine yakın olmasına dikkat edildi.

Tablo 7. pAnox1 kopya sayısının hesaplanmasında kullanılan primerler ve özellikleri

Çoğaltılacak bölge	Primer adı	Primer sırası (5'-3')	Tm	Ürün (bp)
pAnox1 /ORF-1	ORF-5F	GTTCAAACCTCTTTTACTTCGCCAG	55,2 °C	128
	p1074-F	GGTCACAAAAATGAAGCACATTGT AG	55,8 °C	
<i>Anoxybacillus</i> sp. 05S15 genomu / <i>rpoB</i>	rpoB-F	CGGTGCATGGCTTGAATACG	57,7 °C	128
	rpoB-R	CGACAATCTCTTGGTCCGAG	55,9 °C	

pAnox1 plazmitini barındıran *Anoxybacillus gonensis* 05S15'den süşunun gecelik kültürü yapıldı ve bu kültürden aşılardan yeni kültürden eksponansiyel büyüme fazında hücreler çöktürülerek Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.) kiti aracılığıyla üretici firmanın öngördüğü talimatlar doğrultusunda total DNA izolasyonu yapıldı. Plazmitlerde kopya sayısının hesaplanabilmesi için, plazmitin lineer hale getirilmesi gerektiğinden, ilk olarak bakteri total DNA'sı *NdeI* restriksiyon endonükleazı ile kesildi ve elde edilen kalıp DNA saflaştırıldı ve sonrasında TE solüsyonu ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda olacak şekilde numuneler hazırlandı. Hazırlanan DNA'ların yoğunluğu hesaplandı ve konsantrasyonları NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotometresi ile ölçüldü.

qPCR amplifikasyonu, CFX Opus 96 Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Biorad) ve iTaq Universal SYBR Green Supermix kit (Biorad, 1725124) kullanılarak gerçekleştirildi ve veri analizi ilgili cihazın yazılımı kullanılarak yapıldı. Standart grafikler ve Eşik Döngü (CT) değerleri Bio-Rad CFX Maestro yazılımı kullanılarak hesaplandı.

Gerçek zamanlı qPCR için toplam 20 µl hacmindeki reaksiyon karışımı (Tablo 3), 95 °C'de 5 saniye, ardından sırasıyla 3 saniye 95 °C ve 20 saniye 60 °C olmak üzere 40 döngü boyunca devam ettirildi. Amplifikasyon sonrasında erime eğrisi (Melting curve) analizi

yapıldı ve örnekler 40 °C' de 30 saniye süreyle soğutuldu. Böylece amplifikasyonun doğruluğunu kanıtlandı.

Tablo 8. qPCR çalışmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)
iTaq™ Universal SYBR® Green supermix (2x)	10
İleri primer (500 nM)	1
Geri primer (500 nM)	1
kalıp DNA	1
ddH ₂ O	7

2.2.4. pAnox1 Transkriptlerinin Translasyon Özelliklerinin İncelenmesi

Daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda pAnox1 plazmiti tarafından kodlan 3 muhtemel transkript (ORF-1, ORF-3, ORF-5) tespit edilmiş idi. Ardından pAnox1 plazmiti tarafından kodlandığı belirlenen ORF'lerin transle olup olmadığını belirlenmesi için plazmit curing çalışması yapıldı. Plazmit curing ile konak hücreden plazmitin elimine edilmesi ya da kopya sayısının azaltılması ve bu sayede plazmit içeren ve içermeyen konak hücre proteinlerinin (hücre içi ve hücre dışı) karşılaştırılarak istenilen büyüklükteki (her bir transkriptin oluşturabileceği proteinin moleküler ağırlığı hesaplanarak protein/proteinlerin tespit edilmesi amaçlandı.

2.2.5. Plazmit Curing

Anoxybacillus gonensis 05S15 izolatu, Luria Bertani (LB) Broth besiyeri içerisinde yaklaşık 2×10^9 hücre/mL olacak şekilde 55°C'de bir gece inkübe edildi. Ardından farklı konsantrasyonlarda curing ajanı ile 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde seyreltildi. İnkübasyon işlemi karanlıkta gerçekleştirildi. Ertesi gün petriye yayma işlemi yapıldı ve oluşan kolonilerden tekrar LB besiyerine inoküle edildi. Büyüyen tüm kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı ve plazmiti kaybolmuş hücreler belirlendi. Plazmit curing ajanı olarak SDS, Akridin Oranj ve EtBr kullanıldı. Akridin Oranj $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, Etidyum Bromür $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, SDS $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ miktarlarda kullanımı birçok bakteri için curing etkili olarak literatürde bulunmaktadır (Wang, H. vd., 2011). Bu çalışmada 1 -1000 g/mL olacak şekilde farklı

konsantrasyonlarda curing ajanları kullanıldı (Tablo 4). En düşük konsantrasyondan başlanarak yüksek konsantrasyonlara doğru konsantrasyon arttırıldı. Hücrenin büyümesinin engellendiği aralığa kadar konsantrasyon arttırıma devam edildi ve her bir curing ajanı için optimum konsantrasyon belirlendi. Her bir ajanın optimum konsantrasyonda kullanılmasıyla çoğaltılan kültürlerin plazmit içerikleri incelendi ve en etkili olan üzerinden çalışmalar devam ettirildi.

Tablo 9. Kullanılan curing ajanları ve konsantrasyonları.

Curing ajanı	Konsantrasyon
SDS	0,01 µg /mL
	0,1 µg /mL
	1 µg /mL
	8 µg /mL
	10 µg /mL
EtBr	1 µg /mL
	10 µg /mL
	100 µg /mL
	500 µg /mL
	1000 µg /mL
Akridin Oranj	1 µg /mL
	10 µg /mL
	100 µg /mL
	500 µg /mL
	1000 µg /mL

2.2.6. İzolatların Çözülebilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması

pAnox1 plazmitinden kodlandığı tespit edilen 3 transkriptin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için ilk olarak olası proteinlerin büyüklükleri hesaplandı. Buna göre ORF-1 tarafından kodlanan transkriptin 37,3 kDa büyüklüğünde (313 aa), ORF-3'ün 8,16 kDa büyüklüğünde (71 aa) ve ORF-5'in de 7,59 kDa büyüklüğünde (67 aa) proteinler oluşturması beklenmektedir. Önceden yapılan biyoinformatik analizler ve BLAST

sonuçlarına göre de en olası protein kodlayan transkriptin ORF-1 olduğu tespit edilmiş idi, olası proteinlerin moleküler ağırlıkları da dikkate alındığında ORF-1'in proteine dönüşme olasılığının yüksek olduğu öngörülmektedir. Yapılan SDS-PAGE analizlerinde bu bilgiler kullanılarak farklı protein bantları tespit edilmeye çalışıldı. Bu kapsamda curing uygulanmış ve uygulanmamış *Anoxybacillus* sp. 05S15 izolatının hem hücre içi hem de hücre dışı protein profillerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE analizleri yapıldı.

2.2.7. Hücre İçi Proteinlerinin İzolasyon

Anoxybacillus gonensis 05S15 ve curing uygulanmış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatlarının içerdiği hücre içi proteinlerin profilini çıkarmak için, öncelikle elde edilen izolatlardan 10 ml LB besiyeri içerisinde 55 °C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) çözüldü ve 5 dakika Scientz marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 0,6 döngü aralığında patlatılarak 14.800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet kısımları atılarak süpernatant kısımları saflaştırma aşaması için kullanılmak üzere uygun şartlarda muhafaza edildi.

2.2.8. Hücre Dışı Proteinlerinin İzolasyon

Anoxybacillus gonensis 05S15 ve curing uygulanmış izolatlarının içerdiği hücre dışı proteinlerin profilini çıkarmak için, öncelikle elde edilen izolatlardan 10 ml LB besiyeri içerisinde 55 °C'de bir gece inkübe edildi. Hücreler 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek pellet kısmı süpernatant kısımdan ayrıldı. Süpernatant kısmı 5.000 MWCO Consantrator (Sartorius) ile 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek konsantre edildi. Protein özütlerini içeren filtreden geçemeyen kısım, steril tüplere alınarak uygun şartlarda muhafaza edildi.

2.2.9. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonunun tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Coomassie® Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave

edildi ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler, 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 3 ml Coomassie® Brilliant Blue G–250 boya çözeltisi eklendi. Örnekler için BSA yerine 10 µl her bir izolatdan izole edilen protein özütü kullanılarak aynı işlem gerçekleştirildi ve vortexlenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından Agilent Cary60 UV-Vis Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve her bir izolatın protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

İzolatlardan elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonları hesaplandıktan sonra, her bir kuyuya eşit miktarda yükleyebilmek için hesaplama yapıldı ve bu özütlere 5 ul 2X muamele tamponu (Tablo 5) ilave edildi, sonrasında 95°C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie® Brilliant Blue (%0,125 Coomassie® Brilliant Blue R–250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2–4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı. Alınan görüntüler incelenerek farklı protein bantları tespit edildi.

Tablo 10. 2X SDS Muamele Tamponu

Bileşiğin Adı	Miktarı (µl)
%10 SDS	400
%80 Gliserol	250
Tris pH (6,8)	150
% 1 Coomassie® Brilliant Blue G-250 Boyası (CBB G250)	140
Betamerkaptoetanol	60

Tablo 11. Yükleme Jeli

Bileşimin Adı	Miktarı (mL)
%30 Akrilamid Mix	0,33
1.5 M Tris pH (8,8)	0,25
%10 SDS	0,2
%10 APS	0,02
TEMED	0,002
ddH ₂ O	1.4

Tablo 12. %12' lik Yürütme Jeli

Bileşimin Adı	Miktarı (mL)
%30 Akrilamid Karışımı	2
1.5 M Tris pH(6,8)	1,3
%10 SDS	0,05
%10 APS	0,05
TEMED	0,002
ddH ₂ O	1,6

2.2.11. SDS-PAGE Jelinin Gümüş ile Boyanması (Silver Staining)

Yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanan SDS-PAGE jelinde proteinlerin ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel % 50'lik metanolde 1 ila 3 saat düşük hızda sallandı. Daha sonra 100 ml gümüş nitrat solüsyonu (0,8 gr gümüş nitrat, 21 ml % 36'lık NaOH, 1,4 ml Amonyak ve 77 ml ddH₂O) içerisine aktarıldı ve 15 dk. bekletildi. 5 dk. ddH₂O ile yıkandıktan sonra Solüsyon I'e (2,5 ml %1'lik sitrik asit, 0,25 ml %37'lik formaldehit ve 497 ml ddH₂O) aktarıldı ve 10 dk. bekletildi. Ardından Solüsyon II'ye (200 ml %50'lik metanol, 48 ml %12'lik asetik asit ve 400 ml ddH₂O) alınan jel bir bilgisayar tarayıcısı ile görüntülendi.

2.2.12. pAnox1 Rep Proteininin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Anoxybacillus gonensis 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen rep geni (ORF-1), dizayn edilen spesifik primerler (Tablo 8) ile PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Dizayn edilen primerlerin 5' uçlarına *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon tanıma dizileri eklendi. Aşağıda belirtilen şartlarda (Tablo 8 ve Tablo 9) amplifiye edilen PCR ürünü aşağıda, pET28a(+) vektörüne klonlandı (pET28a_Anox1_rep).

Tablo 13. Kullanılan primerler ve dizileri

Primerin adı	Primerin dizisi (5'-3')
ORF-1/ <i>NcoI</i>	GGCCATGGTGACGCACTATATTAAGTTG
ORF-1/ <i>BamHisTag</i>	CCGGATCCTAACATCATCACCATCACCACCATGTGTGTACGTT TCAAG

Tablo 14. PCR karışımı bileşenleri ve miktarları

Bileşen Adı	Miktar (μl)
10X PCR Tamponu	5
MgCl ₂ (0,025 M)	3
dNTP (0,001 M)	16
İleri primer (10 μM)	1
Geri primer (10 μM)	1
Taq DNA polimeraz enzimi	0,25
Kalıp DNA	1
ddH ₂ O	21,75

Tablo 15. PCR şartları

Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)
94	120
94	50
55	60
72	120
72	240
4	∞

Ardından ligasyon karışımı aşağıda belirtilen şartlarda, *E. coli* JM101 kompetant hücrelerine transforme edildi (Tablo 11).

Tablo 16. Ligasyon karışımı

Bileşenin adı	Bileşenin miktarı (μl)
Ligaz Buffer (10X)	1
T4 DNA Ligaz	1
DNA (Plazmit)	3
Vektör (pET28a(+))	1
ddH ₂ O	4
Toplam	10

2.2.13. *E.coli* JM101 ve *E. coli* BL21 (DE3):pLysS Hücrelerine Transformasyon

Kompetent hücre hazırlamak için *E.coli* JM101 ya da *E.coli* BL21 (DE3):pLysS hücreleri Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekildi ve 37 °C’de gece boyunca (16 saat) inkübe edildi. Bir gecelik kültürden taze LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler, 37 °C’de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,4–0,5 olana kadar inkübe edildi. Ardından hücreler 4 °C’de 4.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve pellet üzerine 10 mL 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek elle çözümleri sağlandı. Hücreler 30 dk. buz üzerinde bekletildi ve tekrar 4 °C’de 4.000 rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine

2 ml 100 mM soğuk CaCl_2 ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Elde edilen kompetent hücreler $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 gün içinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

Transformasyon Sambrook vd., (1990) tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Hazırlanan kompetent *E. coli* hücresi her bir örnek için 200 μl olacak şekilde ependorf tüplere alındı ve üzerine 10 μl ligasyon karışımı (Tablo 11) eklendi. Karışım 30 dk bu üzerinde bekletildi ve ardından $42\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 dk bekletildi. Süre sonunda karışım hızlıca tekrar buz üzerine alındı. Daha sonra hazırlanan karışımın üzerine 200 μl LB besi yeri eklendi ve hücrelerin büyüebilmesi için $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 120 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamisin içeren LB-Agar besiyeri üzerine cam bagetle yayma işlemi gerçekleştirildi. Petriler $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 gece inkübasyona bırakılarak antibiyotikli LB agar besiyerinde seçildi. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek istenilen parçaları taşıyan rekombinant plazmitler belirlendi.

pET28a_Anox1_rep rekombinant plazmitinin izolasyonunda Voskuil ve Chambliss'in (Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., 1993) geliştirdiği metot kullanıldı. Petrilerde oluşan koloniler kürdan yardımı ile tek tek LB Broth besiyerine inoküle edildi. $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda büyüyen hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınıp 13.000 rpm'de 3 dk çöktürüldü. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her bir örneğe 200 μl Solüsyon A (50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA, 4 mg lizozim) eklendi. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 400 μl Solüsyon B (200 mM NaOH, 200 mM SDS) eklendi. Ardından 5 dk buz üzerinde bekletildi ve 300 μl Amonyum Asetat ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant başka bir ependorf tüpe alınıp pellet kısımlarından ayrıldı. Toplanan süpernatantın üstüne 600 μl izopropanol eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda örnekler tekrar 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 μl soğuk etanol ilave edilip 13.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Ardından örneklerde kalan etanolün uzaklaştırılması için tüpler ependorf rakına ters bir şekilde yerleştirilerek $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika inkübe edildi. Tüplerdeki etanolün uzaklaştığından emin olduktan sonra örnekler RNaz (10 mg/ml) içeren distile su içerisinde çözüldü.

Klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini görmek için rekombinant plazmitler klonlandığı enzim kesim bölgelerinden (*Bam*HI ve *Nco*I restriksiyon endonükleazlar) kesime tabi tutuldu ve sonuçlar EtBr içeren %1'lik agoroz jelde kontrol edildi ve aynı zamanda elde edilen pET28a_Anox1_rep plazmiti, sekans analizine gönderilerek klonlama teyit edildi.

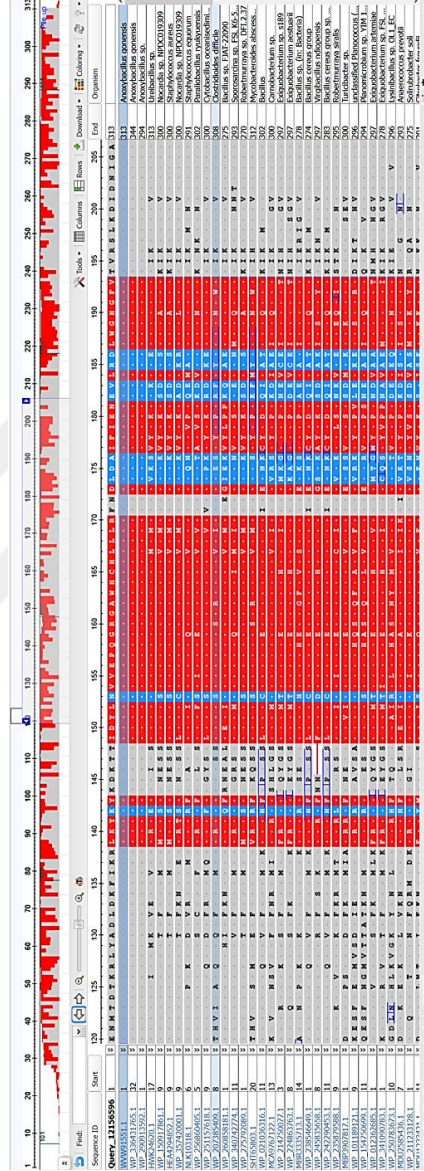
2.2.14. Rekombinant Rep Proteinin Overekspresyonu ve Saflaştırılması

Rekombinant plazmiti içeren *E. coli* BL21 (DE3):pLysS gece kültüründen LB besiyerine OD600'si 0,1 olacak şekilde ekim yapıldı. Bu kültürlerin OD600'leri 0,6-0,9 oluncaya kadar inkübe edilerek 1 mM IPTG ile indüklendi ve ardından üç buçuk-dört saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) vorteksenerek çözüldü ve 5 dk Scientz marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 0,6 döngü aralığında patlatılarak 14.800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet kısımları atılarak süpernatant kısımları saflaştırma aşaması için kullanıldı.

Rekombinant Rep proteininin saflaştırılması için, C-terminaline ilave edilen HisTag kuyruğundan yararlanıldı. HisTag kuyruğuna spesifik nikel içeren HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) kiti kullanıldı. Saflaştırma için önce kolondan 5 ml Ni bağlama tamponu (Ni-Binding Buffer-20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptoetanol) geçirildi ve kolona nikelin bağlanması sağlandı. Ardından Ni yıkama tamponu (Ni-Washing Buffer-20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptoetanol, 20 mM imidazol) ve enzim solüsyonu (10 ml tampon ve 5 ml enzim) 2 kez kolondan geçirildi. Bu basamakta HisTag kuyruğuna sahip olan Rep proteini nikel afinitesi ile kolona bağlanması sağlandı. HisTag kuyruğu olmayan ve kolona bağlanmayan proteinler Ni yıkama tamponu ile (15 ml) uzaklaştırıldı. Son olarak 2 ml Ni elüsyon tamponu (Ni Elution Buffer-20 mM Tris-HCl pH:7,5, 200 mM NaCl, 5mM β-merkaptoetanol, 500 mM imidazol) kolondan geçirildi ve her birinde 500 µl olacak şekilde ayrı ayrı ependorf tüplere toplandı. Ni elüsyon tamponunda bulunan imidazol ile HisTag kuyruğuna sahip olan protein nikelden ayrıldı ve kolondan alındı. Tüplerdeki proteinlerin miktarları Bradford yöntemine göre hesaplandı ve ayrı ayrı SDS-PAGE analizine tabii tutuldu.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. pAnox1'in Biyoinformatik Analizi

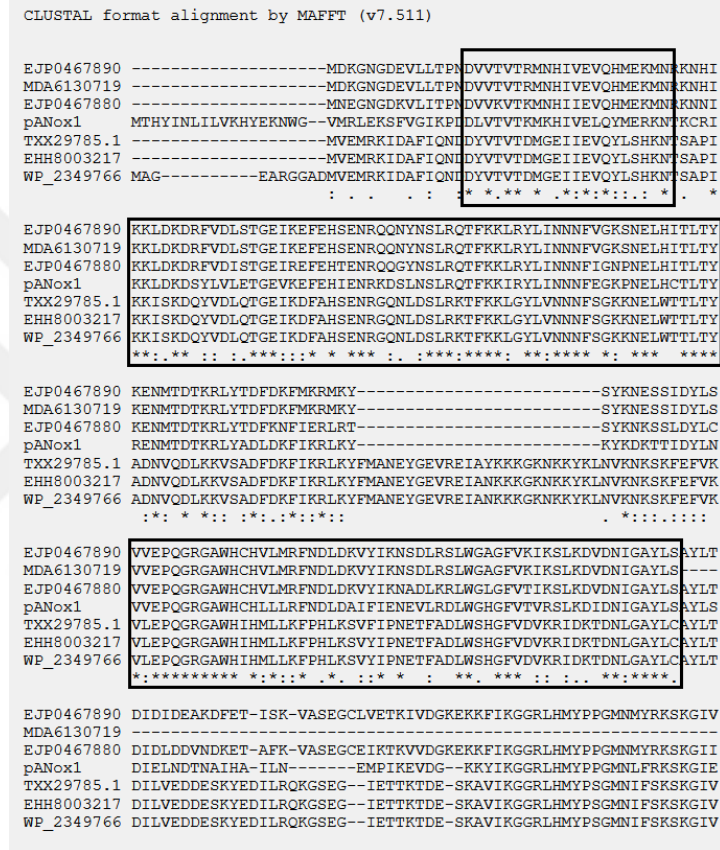


Şekil 5. BLAST sonuçlarının pAnox1 ORF-1bölgesi ile MSA karşılaştırması. BLASTP analizine göre, ORF-1bölgesinde bulunan pAnox1'in 782 ve 946 nükleotidleri arasındaki bölge, birden fazla proteinle önemli bir homoloji göstermektedir. En yüksek benzerlik derecesini gösteren proteinler sırasıyla şunlardır: *Anoxybacillus gonensis*'ten hipotetik protein (WP_336431765.1), *Anoxybacillus* sp.'den hipotetik protein (WP_290913592.1) ve *Ureibacillus* sp.'den hipotetik protein VNS08_16515 (HWK24620.1)

SnapGene Viewer, pAnox1 plazmit genomunda üçü bir zincirde ve ikisi diğer zincirde olmak üzere beş Açık Okuma Çerçevesi (ORF) tespit etti. Bu ORF'ler, çeşitli Gram-negatif

ve Gram-pozitif bakterilerden izole edilen replikasyonla ilişkili proteinlerle güçlü benzerlikler gösterdi ve bu benzerlikler BLAST analizleri ile doğrulandı. BLAST sonuçlarının çoklu dizilim analizi (MSA), ORF-1bölgesinde 138 ile 193 amino asitleri arasında korunan bölgeler olduğunu ortaya koydu (Şekil 4).

Ayrıca GenBank'dan indirilen *E. coli* proteinlerinde % 80'den fazla benzerliğe sahip yüksek benzerlikte proteinler tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 6. *E. coli*'den RC tipi plazmitlerin Rep proteinleriyle ORF-1bölgesinin MSA analizi. Kutular korunan bölgeleri göstermektedir. *E. coli* proteinlerinin erişim numaraları şunlardır: EJP0467890: hipotetik protein NVA59_005362, MDA6130719: hipotetik protein OSK38_25380, EJP0467880: hipotetik protein NVA59_005351, TXX29785.1: hipotetik protein D4M43_23245, EHH8003217: hipotetik protein J4165_005036, WP_2349766: YrhK ailesi proteini

BLASTP analizleri, ORF-1amino asit dizisi ile replikasyonla ilişkili proteinler arasında güçlü benzerlikler olduğunu gösterdi. Buna göre, ORF-1amino asit dizisi, *Planomicrobium* sp. YIM 101495'ten replikatif protein (A0A6L6H1U4) ile %58,5 benzerlik, *Exiguobacterium sibiricum* suşu DSM 17290'dan Rep protein (B1YMS4) ile %58,7 benzerlik ve *Enterococcus dispar* ATCC 51266'dan replikasyon başlatma proteini

(S0K0W09) ile %47,9 benzerlik gösterdi. Ayrıca, Gram-pozitif bakterilerde tanımlanan iki farklı plazmitle (pGTG5: NC_022994.1 ve pPTG4S: AP019364.1) yüksek derecede benzerlik gösterdi; ancak, *E. coli*'de tanımlanan plazmitlerde korunan bölge bulunamadı. ORF-1 amino asit dizisinin bu plazmitlerin Rep proteinleriyle hizalanması korunan bölgelerin tanımlanmasını kolaylaştırdı (Şekil 6).

replikasyon proteinlerinin karakteristik spesifik alanlarını ortaya çıkardı. Özellikle, ORF1'deki 110 ila 172. amino asitleri kapsayan bölgenin, Buğday Cüce Virüsü Rep alanındaki (PDB: 7KIK) HUG etiketleri ve HUG motiflerine benzer HUG etiketleri ve motifleri içerdiği bulundu (Şekil 11). HUH endonükleazları (Reps), yuvarlanan daire replikasyonu (RCR) sırasında tek zincirli DNA'yı (ssDNA) kesen ve yeniden birleştiren diziye özgü nükleazlardır (Smiley ve diğerleri, 2023). Benzer şekilde, Helitron transpozaz (PDB: 7LCC) ile HHpred analizi, ORF1'in 86 ila 146. amino asitleri içinde benzer motifler tanımladı. Tüm hizalamalar incelendiğinde, pAnox1 ORF-1 amino asit dizisinde 110 ve 147 pozisyonları arasında yüksek benzerlik gözlemlendi.

FastPCR yazılımı, plazmit genomu içindeki iteronları, ters ve doğrudan tekrarları ve palindromik dizileri analiz etmek için kullanıldı. Palindromik diziler dört ayrı bölgede tanımlandı: Palindrom 1,317-327 bazları, Palindrom 2,379-388 bazları, Palindrom 3,857-867 bazları ve Palindrom 4 992-1043 bazları kapsamaktadır. Tanımlanan palindromların diğer pAnox1 benzeri plazmitler arasında korunup korunmadığını araştırmak için yürütülen hizalamalar, *Parageobacillus thermoglucosidasius* TG4'ten (NZ_AP019364.1) pPTG4S plazmitinde ve *Geobacillus* sp. 1121'den (NC_022994.1) pGTG5 plazmitinde yüksek derecede korunmuş bölgeler olduğunu ortaya koydu. Detaylar Şekil 15'de gösterilmektedir.

PL-1, PL-2 ve PL-4, pGTG5'in hipotetik proteininde oldukça korunmuşken, bu palindromik diziler pPTG4S plazmitinin Rep proteininde de mevcuttu. Buna karşılık, PL-3 her iki plazmitin kodlamayan bölgelerinde yer alıyordu. Özellikle, Palindrom 4'ün pPTG4S Rep proteininin 3' ucuna yakın bir yerde bulunduğu bulundu. Benzer şekilde, pAnox1 ORF-1 amino asit dizisinde, Palindrom 4, ORF-1 ekspresyonu için gerekli DNA bölgelerini içeren kodlama dizisinin 5' ucuna yakın bir yerde yer almaktadır.

karşılık gelmektedir. Hem biyoinformatik analiz sonuçları hem de docking sonuçları birlikte değerlendirildiğinde pAnox1 plazmitin replikasyon orijin bölgesinin plazmitin 1097 ila 1236 bp arasında konumlandığı önerilmektedir. Literatüre göre birçok plazmitte replikasyon orijinlerinin sınırları kesin olarak çizilmemekte ve konum olarak belirtilmektedir (del Solar, 1998). Bu kapsamda bu bölgenin olduğu alanın pAnox1 *ori* bölgesi olduğu kuvvetle muhtemeldir.

3.3. pAnox1 Plazmitinin Kopya Sayısının Hesaplanması

pAnox1'in kopya sayısının belirlenebilmesi için ilk olarak standart grafik oluşturuldu. Bunun için önce bakterinin kaç genom kopya sayısına sahip olduğunu hesaplamak gerekir. Aşağıdaki formül kullanılarak 1 ng saflaştırılan DNA'daki bakteri genom kopya sayısı hesaplandı.

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

Anoxybacillus gonensis 05S15'in genom büyüklüğü 2.803.668 bp uzunluktadır. Veriler yukarıdaki formüle uygulandığında, ölçülen DNA konsantrasyonuna göre (200 ng/uL) aşağıdaki sonuç çıkmaktadır.

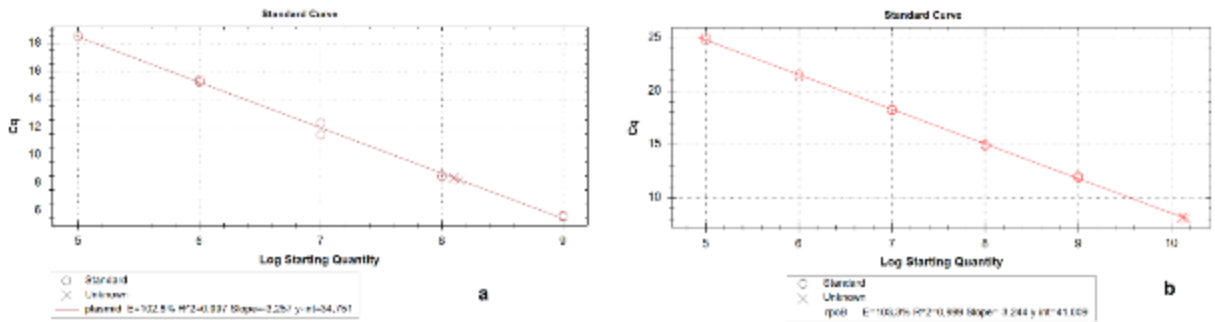
$$\text{DNA (kopya)} = \frac{6.02 \times 10^{23} \left(\frac{\text{kopya}}{\text{mol}} \right) \times 0.000002 \text{ (g)}}{2803668 \text{ (dp)} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} \quad [2]$$

Değerler formülde yerine konulunca 1 ng DNA' da 325.439 kopya olduğu belirlendi. Bu hesaba göre 1.000.000 fg DNA'da 325.439 kopya vardır. Yani 3,07277 fg DNA'da 1 kopya genom vardır. Bu sonuç kullanılarak, 10 ve katları genom içerecek şekilde kalıp DNA'lar hazırlandı (Tablo 12).

Tablo 17. Standart Grafik oluşturulması için kullanılan kalıp DNA'ların özellikleri

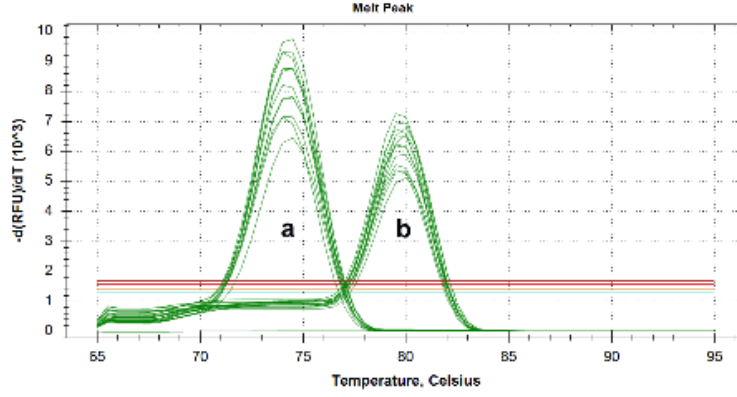
Örnek Adı	Konsantrasyon (DNA)	Kopya sayısı / μ l	Örnek Adı	Seyreltme Değeri
Kalıp 1	30,7277 fg	10	Kalıp 1	10^1
Kalıp 2	0,307277 pg	100	Kalıp 2	10^2
Kalıp 3	3,07277 pg	1000	Kalıp 3	10^3
Kalıp 4	30,7277 pg	10000	Kalıp 4	10^4
Kalıp 5	0,307277 ng	100000	Kalıp 5	10^5
Kalıp 6	3,07277 ng	1000000	Kalıp 6	10^6
Kalıp 7	30,7277 ng	10000000	Kalıp 7	10^7
Kalıp 8	0,307277 μ g	100000000	Kalıp 8	10^8
Kalıp 9	3,07277 μ g	1000000000	Kalıp 9	10^9
Kalıp 10	30,7277 μ g	10000000000	Kalıp 10	10^{10}

Hem *rpoB* geni hem de pAnox1/ORF-1 hedef bölgesi için, standart eğri oluşturulmasında 1×10^5 ila 1×10^9 kopya/L aralığında örnek kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda her iki hedef bölge için standart eğriler elde edildi (Şekil 8).

Şekil 9. *rpoB* geni (a) ve pAnox1 bölgesi (b) için standart eğrilerin oluşturulması

Standart eğriler, 1×10^5 ila 1×10^9 kopya/ μ l aralığında değişen seri 10 kat seyreltmeleri kullanarak oluşturuldu. Her gen için CT değerleri belirlendi ve her bir seyreltmenin logaritması karşısında çizildi. Bu noktalara dayalı olarak lineer regresyon kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu.

Teorik olarak, bir kalıp DNA'nın 10 kat seyreltilmesi durumunda standart eğri değerinin eğimi 3,322 olmalıdır (Lee et al., 2006). Standart eğrinin doğruluğu, $r^2 \geq 0,99$ koşullarında altı farklı seyreltme altında değerlendirildi. Bu çalışmada, *rpoB* ve pAnox1 bölgeleri için standart eğriler sırasıyla 3.244 ve 3.257 olarak elde edildi ve teorik değerle yakından uydu.



Şekil 10. Melting curve analizi. a: *rpoB* gen, b: pAnox1 bölgesi

Tüm bu veriler ile yukarıda anlatıldığı gibi qPCR çalışması gerçekleştirildi. Çalışmanın sonunda amplifikasyonun doğruluğunu kanıtlamak için erime eğrisi analizi yapıldı. Sonuçlar, *rpoB* ve pAnox1 bölgeleri için kullanılan primer setlerinin kendi hedeflerine özgü olduğunu, tek ürün elde ettiğini ve non-spesifik bant oluşmadığını doğruladı (Şekil5).

Yapılan analizler sonrasında pAnox1 plazmitinin kopya sayısı, $PCN = (1 + E)^{-\Delta CT}$ (Lee et al., 2006) formülü kullanılarak belirlendi, burada E PCR amplifikasyon verimliliğini, ve ΔCT ise belirtilen bölgelerin (*rpoB* ve pAnox1) eşik döngü sayıları arasındaki farkı temsil etmektedir. Elde edilen Ct değerleri ve detaylar Tablo 13’de verilmektedir.

Plazmit kopya sayısı kromozom başına *rpoB* geninin kopya sayısının oranı olarak hesaplandı. Cihaz yazılımı ile yapılan hesaplamalarda her iki bölge için oluşturulan standart grafikler kullanıldı. Bu deneysel prosedür üç kez tekrarlandı. Yukarıda verilen formülizasyon kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda, pAnox1 plazmitinin kromozom eşdeğerindeki göreceli kopya sayısının her hücrede yaklaşık olarak 127 ± 2 kopya olduğu belirlendi.

Tablo 18. qPCR analiz sonuçları.

	A	B	C	D	E	F	H	I	J	K	L	M	N
1		Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting	SQ Mean	SQ Std. Dev
2	A01	SYBR	pAnox1 region	Std-01	pAnox1 genome		19,44	18,89	0,774	100000,00000	5,000	100000,00000	0,00000
3	A02	SYBR	pAnox1 region	Std-05	pAnox1 genome		5,28	5,32	0,054	1000000000,00000	9,000	1000000000,00000	0,00000
4	A03	SYBR	rpoB	Std-09	anoxybacillus genome		15,01	14,95	0,086	100000000,00000	8,000	100000000,00000	0,00000
5	A04	SYBR	rpoB	Unkn-12	anoxybacillus genome		15,15	15,13	0,063	9558234,44098	6,980	9656013,61979	423163,14872
6	B01	SYBR	pAnox1 region	Std-01	pAnox1 genome		18,34	18,89	0,774	100000,00000	5,000	100000,00000	0,00000
7	B02	SYBR	pAnox1 region	Std-05	pAnox1 genome		5,36	5,32	0,054	1000000000,00000	9,000	1000000000,00000	0,00000
8	B03	SYBR	rpoB	Std-09	anoxybacillus genome		14,89	14,95	0,086	100000000,00000	8,000	100000000,00000	0,00000
9	B04	SYBR	rpoB	Unkn-12	anoxybacillus genome		15,19	15,13	0,063	9290299,21190	6,968	9656013,61979	423163,14872
10	C01	SYBR	pAnox1 region	Std-02	pAnox1 genome		15,20	15,13	0,105	1000000,00000	6,000	1000000,00000	0,00000
11	C02	SYBR	rpoB	Std-06	anoxybacillus genome		25,11	24,93	0,267	100000,00000	5,000	100000,00000	0,00000
12	C03	SYBR	rpoB	Std-10	anoxybacillus genome		12,04	11,96	0,116	1000000000,00000	9,000	1000000000,00000	0,00000
13	D01	SYBR	pAnox1 region	Std-02	pAnox1 genome		15,05	15,13	0,105	1000000,00000	6,000	1000000,00000	0,00000
14	D02	SYBR	rpoB	Std-06	anoxybacillus genome		24,74	24,93	0,267	100000,00000	5,000	100000,00000	0,00000
15	D03	SYBR	rpoB	Std-10	anoxybacillus genome		11,88	11,96	0,116	1000000000,00000	9,000	1000000000,00000	0,00000
16	E01	SYBR	pAnox1 region	Std-03	pAnox1 genome		12,08	11,66	0,591	100000000,00000	7,000	100000000,00000	0,00000
17	E02	SYBR	rpoB	Std-07	anoxybacillus genome		21,35	21,45	0,144	1000000,00000	6,000	1000000,00000	0,00000
18	E03	SYBR	pAnox1 region	Unkn-11	anoxybacillus genome		8,10	8,14	0,077	1203412092,07177	9,080	1227842312,92250	65959495,35872
19	F01	SYBR	pAnox1 region	Std-03	pAnox1 genome		11,25	11,66	0,591	100000000,00000	7,000	100000000,00000	0,00000
20	F02	SYBR	rpoB	Std-07	anoxybacillus genome		21,55	21,45	0,144	1000000,00000	6,000	1000000,00000	0,00000
21	F03	SYBR	pAnox1 region	Unkn-11	anoxybacillus genome		8,14	8,14	0,077	1302531644,11023	9,115	1227842312,92250	65959495,35872
22	G01	SYBR	pAnox1 region	Std-04	pAnox1 genome		8,28	8,28	0,009	100000000,00000	8,000	100000000,00000	0,00000
23	G02	SYBR	rpoB	Std-08	anoxybacillus genome		18,21	18,24	0,046	100000000,00000	7,000	100000000,00000	0,00000
24	G03	SYBR	pAnox1 region	Unkn-11	anoxybacillus genome		8,19	8,14	0,077	1177583202,58550	9,071	1227842312,92250	65959495,35872
25	G04	SYBR	NK	NTC	pAnox1 genome	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		0,00000	0,00000
26	H01	SYBR	pAnox1 region	Std-04	pAnox1 genome		8,27	8,28	0,009	100000000,00000	8,000	100000000,00000	0,00000
27	H02	SYBR	rpoB	Std-08	anoxybacillus genome		18,27	18,24	0,046	100000000,00000	7,000	100000000,00000	0,00000
28	H03	SYBR	rpoB	Unkn-12	anoxybacillus genome		15,06	15,13	0,063	10119507,20649	7,005	9656013,61979	423163,14872
29	H04	SYBR	NK	NTC	anoxybacillus genome	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		0,00000	0,00000

	A	C	D	E	F	K	L	AI	AK
1		Target	Sample	Control	Relative Quantity	Relative Quantity SEM	Corrected Relative Quantity SEM	Mean Cq	Cq SEM
2	pAnox1 region	anoxybacillus genome			1,00000	1,08870	1,08870	8,14	1,60682
3	rpoB	anoxybacillus genome			1,00000	1,08608	1,08608	15,13	1,52999

3.4. pAnox1'in Translasyon Özelliklerinin İncelenmesi

3.4.1. Plazmit Curing

Tablo 14'da gösterilen curing ajanları ve konsantrasyonları yapılan denemeler sonucunda *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının SDS için <0%1, etidyum bromür için <100 µg/ml ve Akridin oranj için <700 µg/ml değerlerinde LB besiyerinde çoğalabildiği görüldü. Her bir curing ajanının üst sınırları kullanılarak hazırlanan besiyerinde büyütülen kültürlerin plazmit içerikleri incelendi ve en etkili ajanın Akridin oranj olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalar, belirlenen ajan ve konsantrasyon üzerinden devam ettirildi.

Tablo 19. Kullanılan curing ajanları, konsantrasyonları ve hücre çoğalması üzerine etkileri.

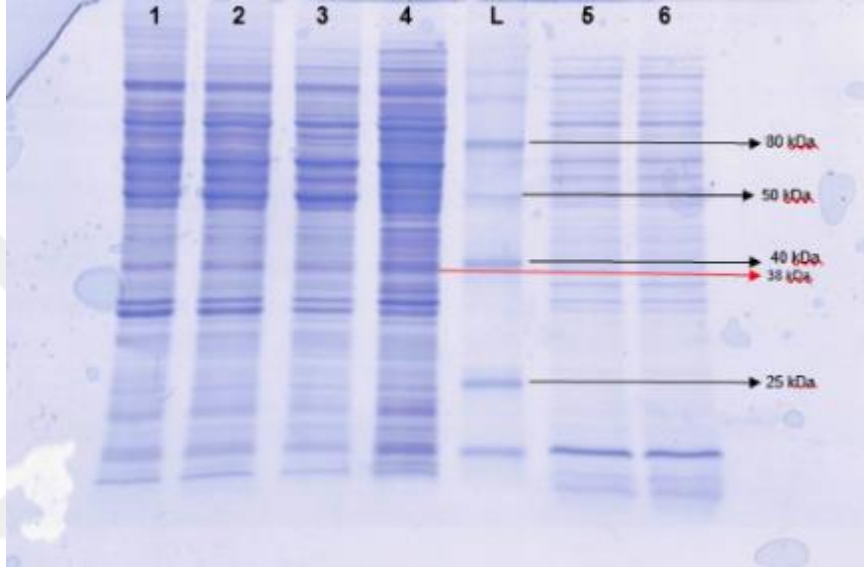
Curing ajanı	Konsantrasyon	Hücre çoğalması
SDS	0,01 µg /mL	+
	0,1 µg /mL	+
	1 µg /mL	-
	8 µg /mL	-
	10 µg /mL	-
EtBr	1 µg /mL	+
	10 µg /mL	+
	100 µg /mL	-
	500 µg /mL	-
	1000 µg /mL	-
Akridin Oranj	1 µg /mL	+
	10 µg /mL	+
	100 µg /mL	+
	500 µg /mL	+
	1000 µg /mL	-

3.4.2. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 Bakterisinin Protein Profillerinin İncelenmesi

Curing uygulanmış ve uygulanmamış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hem hücre içi hem de hücre dışı protein profillerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE analizleri yapıldı.

SDS-PAGE analizi yapılan protein profilleri incelendiğinde curing uygulanmış ve uygulanmamış izolatların hücre içi protein profilinde farklılık olduğu görüldü. ORF-1 tarafından kodlandığı muhtemel olan Rep proteininin olası büyüklüğü 37,3 kDa olarak belirlenmiş idi. Bu kapsamda 4 numaralı numunede istenilen aralıkta bir protein olduğu tespit edildi. Curing uygulanan hücrelerde plazmit bulunmadığı ya da kopya sayısının azaldığı düşünüldüğünde, 4 numaralı örneğin protein profilinde yaklaşık 38 kDa'lık bir protein bant varlığı ORF-1 transkriptinin proteine dönüştüğü sonucuna bizi götürmektedir. Yine hücre dışı protein profilleri de karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık görülmemektedir. Literatürden bilindiği üzere plazmit kaynaklı proteinler replikasyondan

sorumlu proteinler oldukları için intraselüler olmakta ve hücre dışına gönderilmemektedir. ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin olası muhtemel proteinlerinin büyüklüğü göz önüne alınarak yapılan incelemelerde hem hücre içi hem de hücre dışı herhangi bir protein profil farklılığı olmadığı görüldü. Hem biyoinformatik analizler hem de diğer çalışmalar ile birlikte sadece ORF-1 transkriptinden protein kodlandığı, diğer transkriptlerin ise proteine dönüşmediğini belirlenmiş oldu.

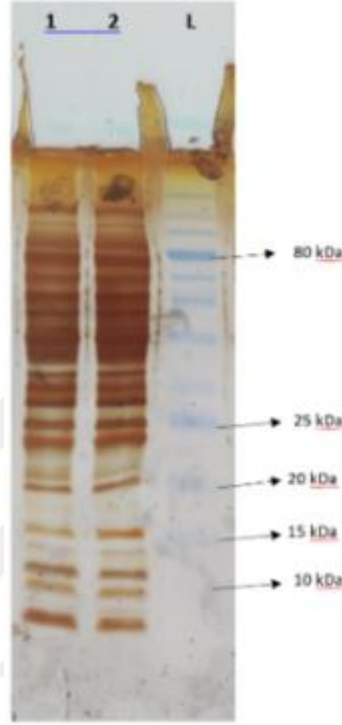


Şekil 11. İzolatların hücre içi ve hücre dışı protein profillerinin karşılaştırılması. 1: Curing uygulanmamış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hücre içi protein profili, 2: Curing uygulanmış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hücre içi protein profili (30. alt kültür), L: Ladder

ORF-3 ve ORF-5 tarafından kodlanan proteinlerin büyüklüğü sırasıyla 8,16 kDa (71 aa) ve 7,59 kDa (67 aa) olduğu önceki çalışmalarda belirlenmiş idi. Küçük boyutlarından dolayı yapılan SDS-PAGE analizinde bu proteinler açık bir şekilde görülememiştir. Bu nedenle proteinlerin görüntülenmesinde daha detaylı inceleme fırsatı sunan gümüş boyama yöntemi kullanıldı.

Bunun için yukarıda açıklandığı gibi SDS-PAGE jeli hazırlandı. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel % 50'lik metanolde 1 ila 3 saat düşük hızda sallandı. Sonra 100 ml gümüş nitrat solüsyonu (0,8 gr gümüş nitrat, 21 ml % 36'lık NaOH, 1,4 ml Amonyak ve 77 ml ddH₂O) içerisine aktarıldı ve 15 dk. bekletildi. 5 dk. ddH₂O ile yıkandıktan sonra Solüsyon I'e (2,5 ml %1'lik sitrik asit, 0,25 ml %37'lik formaldehit ve 497 ml ddH₂O) aktarıldı ve 10 dk. bekletildi. Daha sonra Solüsyon II'ye (200 ml %50'lik metanol, 48 ml

%12'lik asetik asit ve 400 ml ddH₂O) alınan jel bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı (Chevallet, M. vd., 2006). Yapılan çalışma çok tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çok sayıda %10'luk, %12'lik ve %15'lik SDS-PAGE analizleri yapılarak gümüş ile boyandı. Sonuçlar Sonuçlar Şekil 11'de verilmiş.



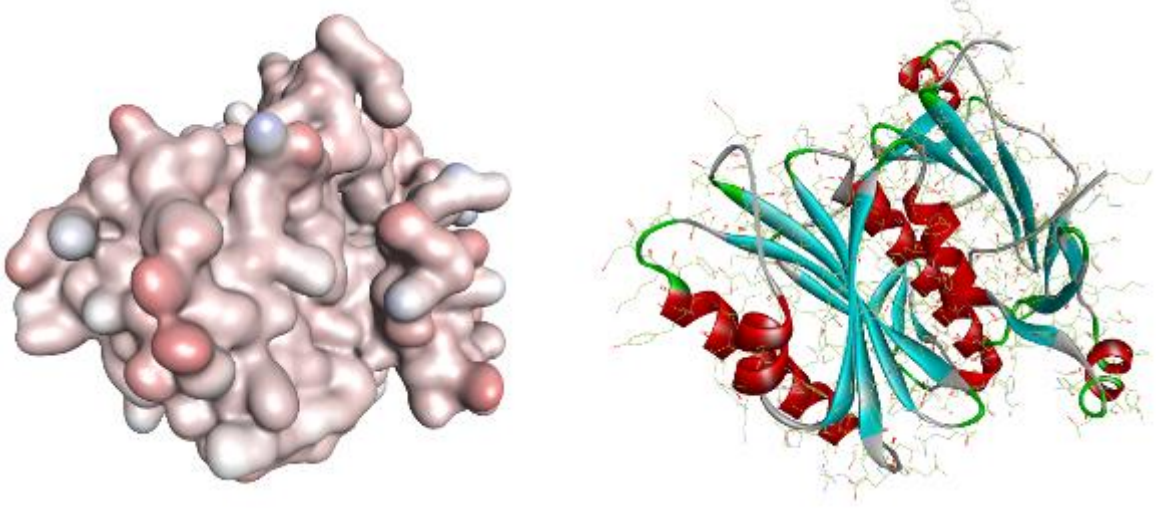
Şekil 12. İzolatların Gümüş Boyama yöntemi ile protein profillerinin karşılaştırılması. 1: Curing uygulanmamış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hücre içi protein profili, 2: Curing uygulanmış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hücre içi protein profili (30. alt kültür), L: Ladder

Şekil 11'de 10 kDa altındaki protein profilleri incelendiğinde curing uygulanmış ve uygulanmamış izolatların hücre içi protein profilinde farklılık olmadığı görüldü. Önceden yapılan biyoinformatik analizlerde sadece ORF-1 transkriptinden protein kodlandığı, diğer transkriptlerin ise proteine dönüşmediğini desteklemekte idi. Bu kapsamda yapılan bu çalışma da önceki sonuçları desteklemektedir.

3.4.3. Novel Genlerin Fonksiyonlarının Belirlenmesi ve Docking Çalışmaları

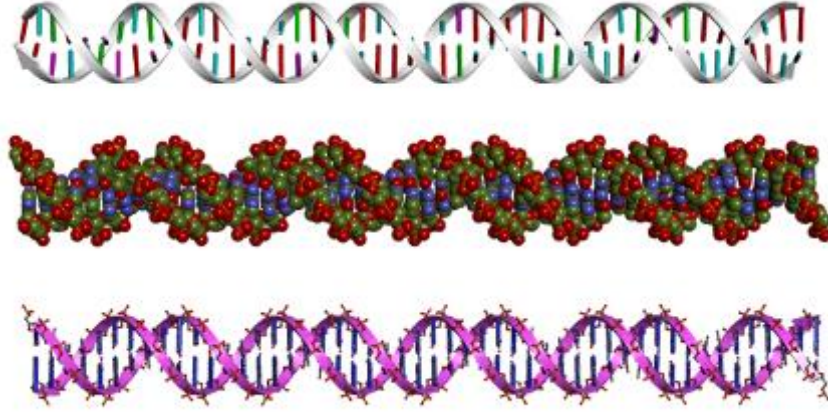
pAnox1 genomundan kodlanan ve transle olduğu tespit edilen Rep proteinin fonksiyonun tahmin edilebilmesi için ilk olarak protein-DOCKING çalışmaları yapıldı. Bu

kapsamda önce pAnox1 genomunda kodlanan ORF-1'in aminoasit sırası kullanılarak ALphaFold modelleme aracı ile Rep proteinin 3B yapısı elde edildi (Şekil 12).



Şekil 13. pAnox1 Rep proteinin 3B modellemesinin farklı stillerde gösterimi

Ardından pAnox1 genomunun ORF-1 bölgesi kullanılarak parçalar halinde 3B DNA yapıları Avogadro 1.2.0 programı aracılığıyla oluşturuldu. HADDOCK uygulaması azami 75 bp'lik dizilerden üretilen 3B yapılarını docking hesaplamalarında kabul ettiğinden, 3B DNA yapıları elde edilirken plazmit genomundan 75 bp'lik nükleotit dizileri kullanarak modellemeler elde edildi. 1562 bp uzunlukta olan pAnox1 plazmit genomu için aşağıdaki Tablo 5'te görüldüğü şekilde 3B modellemeler yapıldı. 3B modellemesi yapılan nükleotit dizilerinin sınırları belirlenirken, 3B DNA yapılarının uç bölgelerinden olabilecek etkili bağlanmaların göz ardı edilmemesi için modelleme sayısı artırıldı ve bu kapsamda modellemesi yapılan her bölgenin başlangıç ve bitiş noktalarını iç kısımda bırakacak şekilde ek modellemeler (50 bp'lik nükleotit bölgeleri kullanarak) yapıldı (Tablo 17). Bu şekilde her bir bölgenin Rep proteine bağlanma affinitesi detaylı şekilde incelendi.



Şekil 14. Yapılan 3B DNA modellemelerinin farklı şekillerde gösterimi

Docking analizlerine başlamadan önce Rep proteinin aktif ve pasif amino asitlerinin belirlenmesi için HADDOCK server'ın içindeki CPORT aracı kullanıldı. Yapılan analiz sonucunda Rep proteini çevreleyen ve bağlanmada etkili olabilecek amino asitler belirlendi (Tablo 15).

Tablo 20. Rep proteininde tespit edilen aktif ve pasif aminoasitler

Amino asit Tipi	Aminoasit numarası
Muhtemel rezidüler (HADDOCK'daki aktif rezidüler)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 286, 287, 291, 293, 294
Çevreleyen rezidüler (HADDOCK'daki pasif rezidüler)	9, 11, 27, 29, 30, 33, 50, 66, 77, 78, 79, 80, 82, 84, 88, 91, 92, 98, 209, 213, 231, 232, 233, 234, 235, 283, 284, 285, 295, 296, 297, 298, 305

3B yapıların pdb formatında elde edilmesi ve aktif-pasif aminoasitlerin belirlenmesinin ardından HADDOCK aracı kullanılarak her bir 3B DNA yapısı ile Rep proteini için docking analizi gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda, HADDOCK her bir hesaplamada maksimum 200 model sayısı hesapladı. Buna göre en güvenilir 10 kümenin sonuçlarını verdi ve 10 kümenin istatistikleri elde edildi. HADDOCK'a göre en güvenilir sonuç, Z-puanı en negatif olanıdır, yani en düşük bağlanma enerjisine sahip olandır, buda skor açısından ortalamanın kaç standart sapma uzağında bulunduğunu gösterir. Elde edilen

sonuçlar pdf formatında kaydedildi ve Biova Discovery programı ile incelendi ve görselleştirildi. En iyi skoru veren ve en iyi bağlanmayı sağlayan sonuca ait istatistiki (Tablo 17) ve görsel veriler (Şekil 14) aşağıda verilmektedir.

Yapılan docking analizleri sonucunda en etkili bağlanmanın DNA-4/Rep arasında gerçekleştiği belirlendi. Bağlanmada Z-skoru -2.0 olarak elde edildi. Yapılan incelemelerde ve Şekil 14'te görüldüğü üzere Rep proteine DNA'nın büyük ve küçük oluğuna bağlanmaktadır. DNA üzerinde bağlandığı bölge C106 ile A117 nükleotitleri arasındaki 11 nükleotitlik bölgedir (5-TTAAATTCATTG-3'). Bu bölge tam bir dönüşe denk gelmekte olup Rep proteinin tam bir büyük oluğu ve küçük oluğu saracak şekilde etkileşimde bulunduğunu göstermektedir. Rep proteini üzerinde etkileşime geçen aminoasitler Met1, His3, Gly18, Arg21, Leu22, Glu23, Lys24 ve Glu293 olarak görülmektedir.

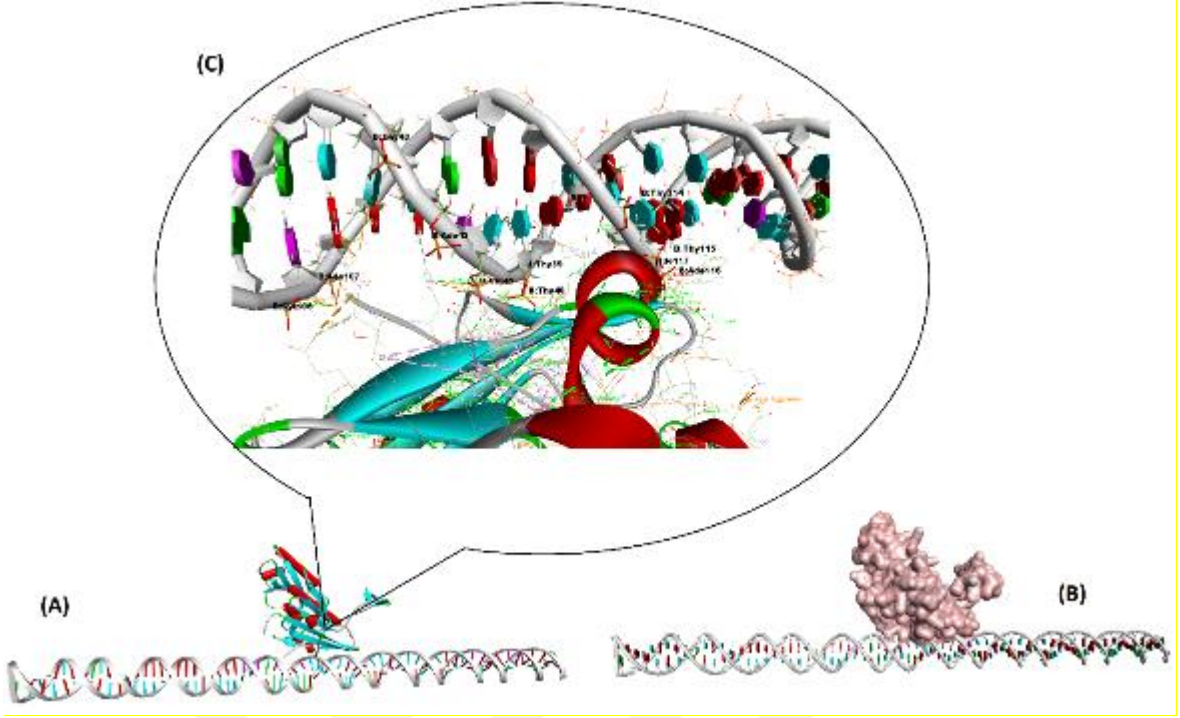
Tablo 21. 3B modellemesi yapılan pAnox1 nükleotid dizi bölgeleri

Seçilen Ana Diziler		Seçilen Ara Diziler	
pANox1/ORF-1 nükleotid dizini	Oluşturulan Model Adı	pANox1/ORF-1 nükleotid dizini	Oluşturulan Model Adı
1-75 bp	DNA-1	51-125 bp	DNA-14
76-150 bp	DNA-2	126-200 bp	DNA-15
151-225 bp	DNA-3	201-275 bp	DNA-16
226-300 bp	DNA-4	276-350 bp	DNA-17
301-375 bp	DNA-5	351-425 bp	DNA-18
376-450 bp	DNA-6	426-500 bp	DNA-19
451-525 bp	DNA-7	501-575 bp	DNA-20
526-600 bp	DNA-8	576-650 bp	DNA-21
601-675 bp	DNA-9	651-725 bp	DNA-22
676-750 bp	DNA-10	726-800 bp	DNA-23
751-825 bp	DNA-11	801-875 bp	DNA-24
826-900 bp	DNA-12	876-925 bp	DNA-25
901-942 bp	DNA-13		

Proteinin bağlandığı DNA bölgesi pAnox1 plazmiti üzerinde ORF-1 kodlama dizisi içinde 1225-1236 baz çiftleri arasına karşılık gelmektedir. Protein-DNA etkileşimleri incelendiğinde, Şekil 10'da görüldüğü üzere Rep proteini ve DNA-4 bölgesi arasında konvensiyonel hidrojen bağları, pi-sulfür bağları, pi-alkil bağları, pi-citation bağları olduğu görülmektedir. Detaylı inceleme yapacak olursak; A107 ile Met1 arasında konvensiyonel hidrojen bağı olduğu ve uzunluğunun 2,38 Å olduğu, A116 ile Gly18 arasında konvensiyonel hidrojen bağı olduğu ve uzunluğunun 2,70 Å olduğu, C41 ile His3 arasında tuz köprüsü olduğu ve uzunluğunun 1,84 Å olduğu ve birçok farklı etkileşim olduğu görülmektedir.

Tablo 22. En iyi bağlanmaya ait (DNA-4/Rep) istatistiksel bilgiler

Analiz	Sonuç değeri
HADDOCK score	396.4 +/- 23.3
Cluster size	8
RMSD from the overall lowest-energy structure	15.9 +/- 0.2
Van der Waals energy	-61.2 +/- 4.8
Electrostatic energy	-237.3 +/- 33.3
Desolvation energy	1.0 +/- 7.8
Restraints violation energy	5040.6 +/- 219.24
Buried Surface Area	1748.4 +/- 181.2
Z-Score	-2.0



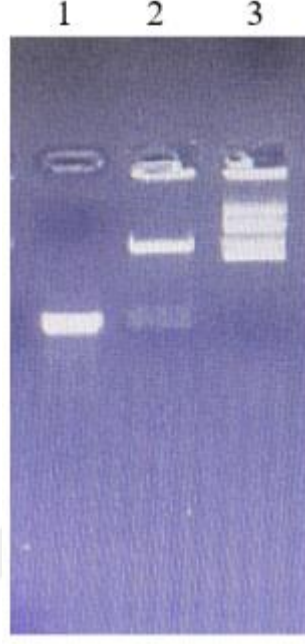
Şekil 15. Protein-DNA Yerleştirme (Docking) (DNA-4/Rep) sonuçlarının Biova Discovery Studio Visualizer programı ile detaylı olarak görselleştirilmesi

3.4.4. pAnox1 Rep Proteininin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Anoxybacillus gonensis 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen rep geni (ORF-1) dizayn edilen spesifik primerler ile yapılan PCR sonucu 313 nükleotitik bir parça elde edildi. Elde edilen PCR ürünü, BamHI ve NcoI restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinden pET28a(+) vektörüne klonlandı. Ardından pET28a_Anox1_rep rekombinant plazmiti *E. coli* B21 (DE3):pLysS hücrelerine transforme edildi. Gece boyu (16 saat) 37 °C’de inkübasyonun ardından yukarıda açıklandığı gibi plazmit izolasyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen plazmitler BamHI ve NcoI restriksiyon endonükleaz ile kesilerek, %1’lik EtBr içeren agaroz jelde kontrol edildi. Sonuçlar Agilent Cary 60 UV-Vis Spectroscopy marka spektrofotometre ile görüntülendi.

Yapılan kesim sonucu pET28a(+) vektöründen çıkarılan gen bölgesinin, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen rep geni, dizayn edilen

spesifik primerler ile yapılan PCR (ORF-1) sonucu ile aynı ve istenilen boyutta bant gözlemlendi (Şekil 15). Böylece klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği teyit edilmiş oldu.



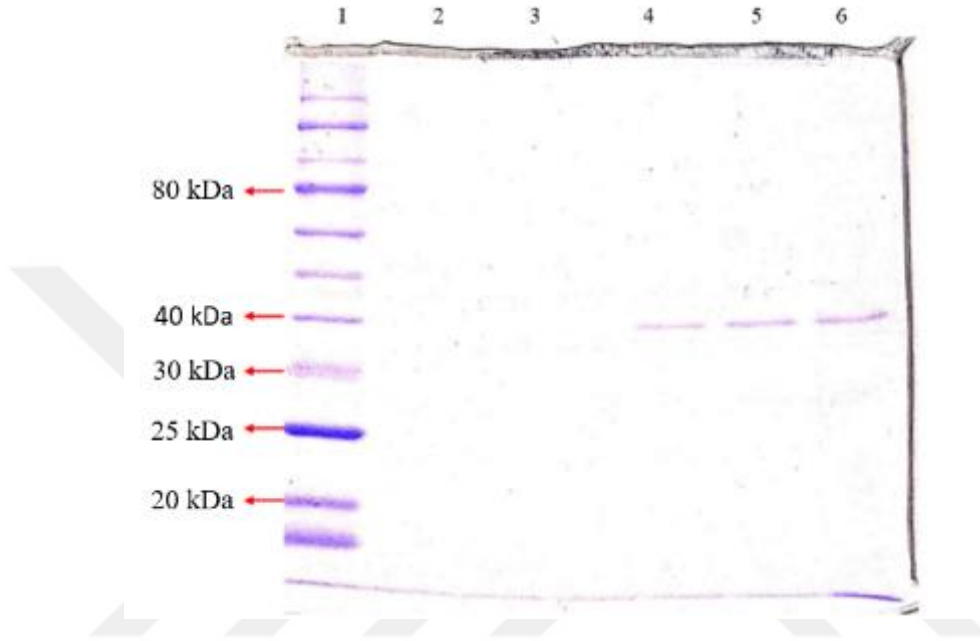
Şekil 16. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim sonucunun agaroz jel elektroforezinde gösterimi. 1. pAnox1 plazmitinde tespit edilen rep geni (ORF-1) için yapılan PCR görüntüsü, 2. *Bam*HI ve *Nco*I restriksiyon endonükleazlar kesim sonucu, 3. Kesimemiş pAnox1 plazmit DNA'sı

3.4.5. Rekombinant Rep Proteinin Overekspresyonu ve Saflaştırılması

pET28a(+) vektörüne klonlanan ve *E.coli* BL21 DE3: (pLyss) hücrelerine trasforme edilen rep geninin (ORF-1) saflaştırılması için C-terminaline ilave edilen HisTag kuyruğundan yararlanıldı. Saflaştırma için HisTag kuyruğuna spesifik nikel içeren HisLinkTm Protein Purification Resin (Promega) kiti kullanıldı. Proteinler, yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanıp %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yaklaşık 1 saat süren ayırma işleminden sonra, jel jel Coomassie® Brilliant Blue (%0,125 jel Coomassie® Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

Anoxybacillus gonensis 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen rep proteini yapılan biyoinformatik analizler ile 313 aminoasit büyüklüğünde yani 37,3 kDa olduğu belirlenmiş idi. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda jele yüklenen protein ladder dikkate alınarak istenilen büyüklükte saf protein bandı gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 17. Saflaştırılan Anox1_Rep proteininin SDS-PAGE ile gösterimi. 1. Protein ladder, 2- 3-4-5-6. HisTaq kuyruğuna sahip, HisLink™ Protein Purification Resin kiti ile saflaştırılan Rep proteininin farklı elüentleri

4. TARTIŞMA

Bu çalışma *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisine ait daha önce tanımlanmış ve karakterizasyonu yapılmış plazmitin replikatif özelliklerinin in siliko ve in vitro deneylerle analizi kapsamaktadır.

Anoxybacillus gonensis 05S15 termofilik bir bakteridir ve termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda üreme ve hayatta kalabilme özelliğinden dolayı endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Proteinlerin ve nükleik asitlerin denatüre olmasının beklendiği yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabildikleri için, moleküler biyoloji alanında büyük ilgi çekmektedirler. Aynı zamanda termofilik mikroorganizmalardan izole edilen termostabil enzimler, yüksek sıcaklıklarda oldukça verimli çalışırlar. Bu nedenle termofilik bakteriler son yıllarda yoğun ilgi duyulan araştırma odaklarından biri olmuştur (Pikuta, E. vd. 2000)

Anoxybacillus gonensis 05S15 izolatının bir plazmite sahip olduğu ve pAnox1 olarak adlandırıldığı bilinmektedir. pAnox1 üzerinde yapılan analizler ve çalışmalar, bu plazmitin 1592 bp uzunluğunda kriptik özellikte, küçük bir genoma sahip, çift zincirli ve % 40,01 GC içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise pAnox1 tarafından kodlanan 3 muhtemel ORF (ORF-1, ORF-3, ORF-5) içerdiği belirlenmiştir. Ancak fonksiyonları hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir.

Plazmitlerde genomun küçük olması, plazmiti bakteriden sağlam olarak izole etmek ve üzerinde manipülasyon yapmanın kolay olması gibi avantajlara sahiptir. Bu, plazmitleri kırılmalara karşı direçli kılar ve kolaylıkla konak hücreden izole edilebilmesine olanak sağlar. Bu avantajlarının yanı sıra, düşük moleküler ağırlıklı plazmitler konak hücrede çoklu kopyalar halinde bulunabilirler. Bu sayede küçük genoma sahip plazmitler hem klonlama hem de transformasyon kolaylığı sağlarlar (Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006). Bu nedenle pAnox1 plazmiti pET gibi sistemlere karşı oldukça avantajlıdır. Bu avantajlar düşünüldüğünde küçük genoma sahip pAnox1 plazmitinin kodladığı proteinlerin ortaya konulması ve fonksiyonlarının açıklanması literatürdeki açığı kapatmış olacaktır.

pAnox1 tarafından kodlanan transkriptlerin fonksiyonlarının incelenmesi için bu transkriptlerin protein üretilip üretilmediği araştırıldı. Bu amaç için önce biyoinformatik araçlar kullanıldı. BLAST (NCBI), (URL-3), Bioinformatic Tools (NCBI), (URL-4), Test On line (Softbery) (URL-5) programları kullanılarak transkriptlerin aminoasit dizileri ve büyüklükleri belirlendi. Yapılan analiz sonucunda ORF-1 tarafından kodlanan peptidin 37,3 kDa (313 aa) büyüklüğünde, ORF-3' ün 8,16 kDa (71 aa) büyüklüğünde ve ORF-5'in 7,59

kDa (67 aa) büyüklüğünde proteinler oluşturacağı belirlendi. Olası proteinlerin moleküler ağırlıkları da dikkate alındığında ORF-1'in proteine dönüşme olasılığının yüksek olduğu öngörüldü, diğer transkriptlerin proteine dönüşmeyeceği ancak transkript olarak Rep proteininin işlevine yardımcı olabilecek görevlerde bulunabileceği kuvvetle muhtemeldir. Literatürde Rep proteinlerin boyutları karşılaştırıldığında ORF-1'in Rep proteini olma ihtimali ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerine oranla oldukça yüksektir.

Termofilik bakterilerden pek çok plazmit izole edilmiştir. Ancak büyük genoma sahip olduklarından tüm genomun aydınlatılması oldukça güçtür. Bu açıdan pAnox1 plazmitinin küçük genoma sahip olması (1592 bp) ve yüksek kopya sayısına sahip olması (127 ± 2) yapılacak çalışmaların önemini arttırmıştır. Literatürde, *Anoxybacillus* cinsi plazmitlerin kopya sayılarıyla ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. *Anoxybacillus gonensis* 05S15'ten elde edilen plazmit pAnox1'in yüksek kopya sayısı, bu plazmitin termofilik suşlarda termofilik proteinlerin üretimi için klonlama ve ekspresyon vektörleri olarak potansiyel gelişimini desteklemektedir (Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006)

pAnox1 plazmitinin Rep ya da benzeri bir protein kodlayıp kodlamadığının araştırılması için pAnox1 plazmitinin konağından (*Anoxybacillus gonensis*) uzaklaştırılması gerekir. Böylece plazmit barındıran ve barındırmayan *Anoxybacillus gonensis* bakterisinin protein profilleri karşılaştırılarak farklı olan bantların belirlenmesi sağlanmıştır. Bunun için *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisine farklı kimyasal ajanlar denenerek curing uygulaması yapılmıştır. Plazmit curing uygulaması ile, bakterinin sahip olduğu bazı özelliklerin bakterinin genomik özelliklerinden mi yoksa bakterinin barındırdığı plazmitten mi kaynaklı olduğu ortaya konulmaktadır. Ancak çoğu durumda curing'e neden olan mekanizmalar bilinmemektedir. Bu nedenle tüm ajanlar deneme yanılma yoluyla ortaya çıkmıştır (Vasquez, C., vd., 1983)

Kullanılan curing ajanlarının bazıları DNA'yı mutasyona uğratarak plazmit uzaklaştırılır. Genellikle plazmitin replikasyon mekanizmasına müdahale ederler. Bazıları ise doğrudan bakterilerinin enzimlerini etkilerler. Bu durumlarda bakteri plazmitini uzaklaştırmayı seçer ve bu aslında bakterinin mazur kaldığı ajanlara karşı verdiği bir cevap niteliğindedir. Literatürde curing ajanı olarak pek çok madde rapor edilmiştir. Her plazmite etki eden ajanlar değişiklik gösterebilir. Bazı plazmitlerde Etidyum Bromür ve Akridin Oranj'ın replikasyonu engellediği belirtilmiştir. Bazı *E.coli* hücreleri plazmitlerini yüksek voltaj ile uzaklaştırmıştır (Heeryt, D., vd., 1989). Başka bir çalışmada, plazmitlerin uyumsuzluk gruplarına dayanarak curing işlemi gerçekleştirilmiştir. *Bacillus anthracis*

A16'dan izole edilen pXO2 plazmiti, aynı uyumsuzluk grubuna ait olan pKSV7 plazmitinin kullanımıyla hücreden çıkarılmıştır. (Wang H., vd.,2011). Etidyum bromürün, etkili bir curing ajanı olduğu ve yapılan çalışmalarda *Staphylococcus aureus* suşlarındaki plazmitler üzerinde etkili olduğu bilindiğinden (Rubin, S., J. ve Rosenblum, E., D., 1971). *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinde Curing ajanı olarak Etidyum Bromür denenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda Etidyum Bromürün *Anoxybacillus gonensis* 05S15 üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu nedenle literatürde denenilen farklı curing ajanları kullanılmıştır.

DNA interkalasyonuna neden olan Etidyum Bromür ve Akridin Oranj birçok farklı plazmitte etkili olan ve sık tercih edilen curing ajanlarından. Bu ajanların daha çok *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Rhizobium* 'a ait plazmitlerde etkili olduğu dikkat çekmektedir. Literatürde *Anoxybacillus* cinsi bakterilerde sık kullanılan curing ajanlarının SDS, Akridin Oranj ve EtBr olduğu görülmüştür (Kulkarni, R., S. ve Kanekar, P., P., 1988). Etidyum bromür ile yapılan denemeler sonucu başarıya ulaşılamayınca pAnox1 plazmitini konağından uzaklaştırmak için SDS ve Akridin Oranj farklı konsantrasyon ve miktarlar kullanılarak denemeler yapıldı. Akridin Oranj uygulaması ile birkaç alt kültürden yapılan plazmit izolasyonlarından elde edilen plazmit DNA'larının yoğunluklarında kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Ancak SDS ile yapılan curing denemeleri sonucu plazmit DNA yoğunluğunda herhangi bir azalma görülemedi. Böylece *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin barındırdığı pAnox1 plazmitinin uzaklaştırılmasında en etkili ajanın Akridin Oranj olduğu belirlenmiş oldu. Yapılan alt kültürler sonucunda 30. alt kültürden itibaren plazmit yoğunluğunun azaldığı ancak birçok deneme yapılmasına rağmen sonraki alt kültürlerde tamamen kaybolmadığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak, başta kullanılan curing ajanının pAnox1 plazmiti için uygun olmadığı veya pAnox1 plazmiti *Anoxybacillus gonensis* bakterisinin hayatta kalabilmesi için önemli fonksiyonlara sahip olduğu düşünülebilir. Bu sebeple pAnox1 tarafından kodlanan ORF'lerin proteine dönüşüp dönüşmediğinin tespitinde farklı yöntemler kullanılmıştır.

pAnox1 plazmiti tarafından kodlanan transkriptlerin proteine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin hücre içi ve hücre dışı bant profillerine bakılmıştır. Bunun için curing uygulanmış ve uygulanmamış hücreler kullanıldı. Böylece üretilen proteinin *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin genomik özelliklerinden mi yoksa bakterisinin sahip olduğu pAnox1 plazmitinden mi

kaynaklı olduğu belirlenmiş oldu. Curing uygulanmış ve uygulanmamış *Anoxybacillus gonensis* 5S15 izolatının hücre içi ve hücre dışı protein profillerinin karşılaştırılması için SDS-PAGE analizleri yapıldı. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda curing uygulanmış ve uygulanmamış izolatların hücre içi bant profilinde farklılık olduğu görüldü. Daha önce yapılan biyoinformatik analizler ile pAnox1 tarafından kodlanan ORF-1'in 37,3 kDa (313 aa) büyüklüğünde, ORF-3' ün 8,16 kDa (71 aa) büyüklüğünde ve ORF-5'in 7,59 kDa (67 aa) olduğu belirlenmiş idi. Curing uygulanan hücrelerde plazmit bulunmadığı ya da kopya sayısının azaldığı düşünüldüğünde SDS-PAGE analizi sonucu curing uygulanmış *Anoxybacillus gonensis* 05S15 bakterisinin hücre içi bant profillerinde yaklaşık 38 kDa aralığında bir protein bandı varlığı görülmüştür. Böylece ORF-1 transkriptinin proteine dönüştüğü belirlenmiş oldu. Ancak hücre dışı bant profillerinde farklı bir protein bandına rastlanmamıştır. Plazmit kaynaklı proteinler replikasyondan sorumlu proteinler oldukları için intraselüler olmakta ve hücre dışına gönderilmemektedir. ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin olası muhtemel proteinlerin büyüklükleri dikkate alındığında SDS-PAGE jelinde hem hücre içi hem hücre dışı protein profillerine bakıldığında istenilen boyutlarda bir proteine rastlanmamıştır. Literatürde küçük boyutlu proteinlerin tespiti için sadece SDS-PAGE yönteminin yeterli olmadığı bilinmektedir. SDS-PAGE yönteminin yerine, küçük boyutlu proteinlerin teşhisinde daha etkili olduğu bilenen Gümüş Boyama tekniği önerilmektedir. Bu nedenle ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin proteine dönüşüp dönüşmediğini anlaşılabilmesi için gümüş boyama yöntemi kullanıldı. Gümüş boyama yöntemi sonucunda istenilen aralıkta bir protein bandı belirlenemedi. Böylece ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin proteine dönüşüp dönüşmediği belirlenemedi.

pAnox1 genomundan kodlanan ve transle olduğu tespit edilen Rep proteinin fonksiyonun tahmin edilebilmesi için DOCKING çalışmaları yapıldı. Bu kapsamda pAnox1 Rep (ORF-1) proteinin plazmit genomuna bağlanabileceği bölgelerin belirlenebilmesi için, plazmit genomunun ORF-1 bölgesi için 3B modelleme yapılarak DNA-protein DOCKING çalışmaları yapıldı. Yapılan incelemelerde Rep proteini DNA üzerinde bağlandığı bölge C106 ile A117 nükleotidleri arasındaki 11 nükleotidlik bir bölge olduğu belirlendi. Rep proteini üzerinde etkileşime geçen aminoasitler Met1, His3, Gly18, Arg21, Leu22, Glu23, Lys24 ve Glu293 olarak görüldü. Proteinin bağlandığı DNA bölgesi pAnox1 plazmiti üzerinde ORF-1 kodlama dizisi içinde 1225-1236 baz çiftleri arasına karşılık gelmektedir. Literatürde bakteriler üzerinde yapılan DNA-Protein Docking'leri oldukça sınırlıdır veya yeterince açıklanmamıştır. Hem deneysel hem de biyoinformatik veriler birlikte değerlendirildiğinde

pANox1'den kodlanan Rep (ORF-1) proteininin DNA başlatma özelliğinde bir replikasyon başlatıcı protein olduğu ve DNA bağlanma özelliğine sahip olduğu belirlenmiş oldu.

pAnox1 plazmitinde tespit edilen ve proteine dönüştüğü belirlenen *rep* geni dizayn edilen spesifik primerler ile PCR yoluyla çoğaltıldı pET28a(+) vektörüne klonlandı. Ardından rekombinant plazmit *E. coli* B21 (DE3):pLysS hücrelerine transforme edildi (*E. coli* B21 (DE3):pLysS/pET28a_Anox1_rep). Bir gece 37 °C'de inkübasyonun ardından plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitler *Bam*HI ve *Nco*I restriksiyon endonükleaz ile kesildi. Yapılan kesim sonucu çıkarılan gen bölgesinin, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen *rep* geni ile aynı boyutta olduğu belirlendi. Böylece klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği teyit edilmiş oldu (Şekil 11). pET28a(+) vektörüne klonlanan ve *E.coli* BL21 DE3: (pLyss) hücrelerine transforme edilen *rep* geni C-terminaline ilave edilen HisTag kuyruğundan yararlanılarak saflaştırıldı ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda 37,3 kDa ağırlığında bir protein bandı tespit edildi.

Anoxybacillus cinsine ait pek çok plazmitin, replikasyon için en az bir protein kodladığı bilinmektedir. RepA olarak bilinen bu protein tanımlanan diğer plazmitlere ait replikasyon proteinlerine benzediği görülmüştür (Ruan, L. ve Xu, X., 2007). *Anoxybacillus* cinsine ait plazmitlerin replikasyon proteinlerinin detaylı bir şekilde aydınlatılmadığı için benzerlik diğer türlere oranla oldukça azdır. Yapılan bir çalışmada *Thermus scotoductus* K6 (Güler, H. İ., vd., 2018) bakterisinden küçük bir plazmit tanımlandı (pHIG22, 2222 bp) ancak pHIG22 tarafından kodlanan herhangi bir Rep proteini olmadığı bildirilmiştir. pAnox1 plazmiti, *Anoxybacillus* cinsi için tanımlanan ve replikatif özellikleri belirlenen ilk plazmittir.

Tüm yönleri ile ele alındığında bu çalışma, pAnox1 tarafından kodlanan muhtemel transkriptlerin protein kodlayıp kodlamadığının belirlenmesini, kopya sayısının belirlenmesini, Docking analizleri ile Rep proteininin DNA'nın hangi bölgesi ile etkileşime gireceğini, biyoinformatik analizler ile varlığı tahmin edilen Rep proteininin bir ekspresyon vektörüne klonlanmasını, klonlanan Rep proteininin saflaştırılarak ortaya çıkarılmasını amaçlanmıştır. pAnox1 üzerinde yapılacak genetik modifikasyonlar ile klonlama ve ekspresyon vektörü tasarlama potansiyeli taşımaktadır. Ek olarak devamındaki çalışmalara ışık tutmak ve endüstriyel anlamda ticari getiri sağlayabilecek vektörler oluşturabilmek için yeterli bilgi ve materyali ortaya koyması sağlandı.

5. SONUÇLAR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan pAnox1 plazmitinin replikatif özelliklerinin in siliko ve in vitro deneylerle analizi başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edildi.

1. Biyoinformatik analizler sonucu ORF-1 tarafından kodlanan peptidin 37,3 kDa (313 aa) büyüklüğünde, ORF-3' ten 8,16 kDa (71 aa) büyüklüğünde ve ORF-5'te 7,59 kDa (67 aa) büyüklüğünde proteinler oluşturacağı belirlendi.
2. *Anoxybacillus gonensis* 05S15 plazmit curing uygulaması sonucunda pAnox1 plazmitinin konağından uzaklaştırılmasında en etkili ajanın akridin oranı olduğu belirlendi.
3. Curing uygulanan ve uygulanmayan *Anoxybacillus gonensis* 05S15 izolatının hücre içi ve hücre dışı bant profilleri karşılaştırıldı. Bunun sonucunda hücre içi bant profillerinde 37,3 kDa ağırlığında bir protein bandı görüldü.
4. pAnox1 kopya sayısı kromozom başına *rpoB* geninin kopya sayısının oranı olarak hesaplandı. Plazmitinin kromozom eşdeğerindeki göreceli kopya sayısının her hücrede yaklaşık olarak 127 ± 2 kopya olduğu belirlendi.
5. Rep proteinin 3B modellemesi yapıldı ve DNA-protein docking çalışmaları yapılarak Rep proteinin DNA bağlanma bölgeleri ve yaptığı bağlar belirlendi.
6. pAnox1 tarafından kodlanan *rep* geni pET28a(+) vektörüne klonlandı (pET28a_Anox1_rep). BamHI ve NcoI restriksiyon endonükleazları ile kesildi. Bunun sonucunda pET28a(+) vektöründen çıkarılan gen bölgesinin, *Anoxybacillus gonensis* 05S15 pAnox1 plazmitinde tespit edilen *rep* geni ile aynı ve istenilen boyutta bant elde edildi.
7. pAnox1 tarafından kodlanan Rep proteinini C terminaline ilave edilen HisTaq kuyruğundan yararlanılarak saflaştırıldı (Anox1_H-Rep) ve SDS-PAGE'de incelendi. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda 33,7 kDa büyüklüğünde saf protein bandı elde edildi.

6. ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıda sunulan çalışmaların yapılması önerilmektedir.

1. *Anoxybacillus* cinsine ait olduğu tespit edilen pAnox1 plazmitinin, termofilik bakterilere gen aktarımı amacıyla modifiye edilmesi önerilmektedir.
2. Plazmit üzerindeki ORF-3 ve ORF-5 transkriptlerinin fonksiyonlarının belirlenip, literatüre kazandırılarak diğer çalışmalara kaynak teşkil etmesi önerilmektedir.
3. pAnox1 plazmitinin ekspresyon vektörü olarak kullanılabilmesi için plazmit üzerine regülatör bölgeler eklenmesi gerekmektedir.
4. pAnox1 plazmitinin *E.coli*, *Anoxybacillus* ve farklı cins 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.

7. KAYNAKÇA

- Filutowicz, M., vd. (1986). Filutowicz, M., M. J. MacEachern, and D. R. Helinski. 1986. Positive and negative roles of an initiator protein at an origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9645–9649.
1976. (tarih yok). Bradford, M. 1976, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- A. L. Demain ve P. Vaishnav, 2009. (tarih yok). A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms", *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 3, pp. 297-306, May-Jun 2009.).
- Abeles, A. L., vd. (1993). Abeles, A. L., T. Brendler, and S. J. Austin. 1993. Evidence of two levels of control of P1 oriR and host oriC replication origins by DNA adenine methylation. *J. Bacteriol.* 175:7801–7807.
- Abelson, R. P. (1997). A retrospective on the significance test ban of 1999 (If there were no significance tests, they would be invented). L. L. Harlow, S. A. Mulaik, & J. H. Steiger (Dü) içinde, *What if there were no significance tests?* (s. 117-141). New Jersey, Mahwah: Erlbaum.
- Altın Yavuz, A. (2021). İlerleyen Sansürlü Örneklemelere Dayalı Olarak Weibull Dağılımının Şekil Parametresinin Sağlam Tahmin Edicileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 410-418.
- Anderson, T. (1962). On the distribution of the two-sample Cramer-von Mises criterion. *The Annals of Mathematical Statistics*, 33(3), 1148-1159.
- Anderson, T., & Darling, D. (1952). Asymptotic theory of certain goodness of fit criteria based on stochastic processes. *The Annals of Mathematical Statistics*, 23(2), 193-212.
- Anderson, T., & Darling, D. (1954). A test of goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 49(268), 765-769.
- Angus, J. (1994). The probability integral transform and related results. *SIAM review*, 36(4), 652-654.
- Arizono, I., & Ohta, H. (1989). A test for normality based on Kullback—Leibler information. *The American Statistician*, 43(1), 20-22.
- Arshad, M., Rasool, M., & Ahmad, M. (2003). Anderson Darling and modified Anderson Darling tests for generalized Pareto distribution. *Pakistan Journal of Applied Sciences*, 3(2), 85-88.
- Audie vd. (2007). Audie J, Scarlata SJBC. A novel empirical free energy function that explains and predicts protein–protein binding affinities. 2007;129(2-3):198-211.

- Bain, L., & Engelhardt, M. (1987). *Introduction to probability and mathematical statistics*. Brooks/Cole.
- Balakrishnan, N., & Nevzorov, V. (2004). *A primer on statistical distributions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Balakrishnan, N., Voinov, V., & Nikulin, M. (2013). *Chi-squared goodness of fit tests with applications*. United States of America: Elsevier.
- Baringhaus, L., & Henze, N. (1988). A consistent test for multivariate normality based on the empirical characteristic function. *Metrika*, 35(1), 339-348.
- Batsidis, A., Economou, P., & Bar-Lev, S. (2022). A Comparative Study of Goodness-of-Fit Tests for the Laplace Distribution. *Austrian Journal of Statistics*, 51(2), 91-123.
- Bayoud, H. (2021). Tests of normality: new test and comparative study. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 78(1), 1-22.
- Bera, A., & Jarque, C. (1981). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals: Monte Carlo evidence. *Economics Letters*, 7(4), 313-318.
- Bonett, D., & Seier, E. (2002). A test of normality with high uniform power. *Computational Statistics & Data Analysis*, 40(3), 435-445.
- Bontemps, C., & Meddahi, N. (2005). Testing normality: a GMM approach. *Journal of Econometrics*, 124(1), 149-186.
- Bramhill, D., ve A. Kornberg. (1988). Bramhill, D., and A. Kornberg. 1988. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54:915–918.
- Brys, G., Hubert, M., & Struyf, A. (2008). Goodness-of-fit tests based on a robust measure of skewness. *Computational statistics*, 23(3), 429-442.
- Brys, G., Hubert, M., & Struyf, A. (2008). Goodness-of-fit tests based on a robust measure of skewness. *Computational Statistics*, 23(3), 429-442.
- Cabaña, A., & Cabaña, E. (2003). Tests of normality based on transformed empirical processes. *Methodology and Computing in Applied Probability*, 5(3), 309-335.
- Cattoir, V. vd., 2008. (tarih yok). Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P., 2008, *Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10), 3801-4,.
- Chabbert vd. (1972). Chabbert, Y.A., Scavizzi, M.R., Witchitz, J.L., Gerbaud, G.R., Bouanchaud, D.H., 1972. Incompatibility groups and the classification of fi resistance factors. *J. Bacteriol.* 112, 666–675.
- Chaichatschwal, R., & Budsaba, K. (2007). A power comparison of goodness-of-fit tests for normality based on the likelihood ratio and the non-likelihood ratio. *Thailand Statistician*, 5(2007), 57-68.

- Chang vd. (1994). Chang, P. C., and S. N. Cohen. 1994. Bidirectional replication from an internal origin in a linear streptomyces plasmid. *Science* 265:952–954.
- Chattoraj, D. K. (1997). Chattoraj, D. K., and T. D. Schneider. 1997. Replication control of plasmid P1 and its host chromosom.
- Chattoraj, D. K., ve T. D. Schneider. (1997). Chattoraj, D. K., ve T. D. Schneider. 1997. Replication control of plasmid P1 and its host chromosome: the common ground. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 57:145–186.
- Chen, L., & Shapiro, S. (1995). An alternative test for normality based on normalized spacings. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 53(3-4), 269-287.
- Clarck, D. P. (2010). Clarck, D. P., 2010. *Molecular Biology (Update Edition)*, Apcell Press, California.
- Cochran, W. (1952). The χ^2 test of goodness of fit. *The Annals of Mathematical Statistics*, 23(3), 315-345.
- Coin, D. (2008). A goodness-of-fit test for normality based on polynomial regression. *Computational Statistics & Data Analysis*, 52(4), 2185-2198.
- Cox, D. (1961). Tests of separate families of hypotheses. J. Neyman (Dü.), *Proceedings of the fourth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability*. içinde 1, s. 105-123. University of California Press.
- Cox, D. (1962). Further results on tests of separate families of hypotheses. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 24(2), 406-424.
- Cramér, H. (1928). On the composition of elementary errors. *Scandinavian Actuarial Journal*, 1928(1), 13-74. doi:10.1080/03461238.1928.10416862
- Crzcgorzewski, P., & Wirczorkowski, R. (1999). Entropy-based goodness-of-fit test for exponentiality. *Communications in Statistics-Theory and Methods*, 28(5), 1183-1202.
- Cubukci, G., 2024. (tarih yok). Cubukci, G., Ayyildiz, H., Inan Bektas, K., Belduz, A. O., & Güler, H. İ., (2024). *Characterization and functional insights of the novel RC-type plasmid pAnox1 from Anoxybacillus gonensis 05S15. PLASMID* , vol.131-132, 1-12.
- D'Agostino, R., & Stephens, M. (1986). *Goodness-of-Fit Techniques*. Marcel Dekker Inc., New York.
- D'Agostino, R. B. (1971). An omnibus test of normality for moderate and large size samples. *Biometrika*, 58(2), 341-348.
- D'agostino, R., & Pearson, E. (1973). Tests for departure from normality. Empirical results for the distributions of b^2 and $\sqrt{b}$. *Biometrika*, 60(3), 613-622.
- Datta. (1977). Datta, N., 1977. Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 (Suppl. C), 19–23.

- Dekking, F., Kraaikamp, C., Lopuhaä, H., & Meester, L. (2005). *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding why and how* (Cilt 488). Delft, Netherlands: Springer.
- del Barrio, E., Cuesta-Albertos, J. A., Matrán, C., & Rodríguez-Rodríguez, J. M. (1999). Tests of goodness of fit based on the L2-Wasserstein distance. *Annals of Statistics*, 27(4), 1230-1239.
- del Solar G 1993. (tarih yok). del Solar, G., M. Moscoso, and M. Espinosa. 1993. In vivo definition of the functional origin of replication (ori(1)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* 237:65–72.
- del Solar G. vd. (1993). del Solar, G., M. Moscoso, and M. Espinosa. 1993. Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* 8:789–796,.
- del Solar vd. (1998). del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun;62(2):434-64. doi: 10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998. PMID: 9618448; PMCID: PMC98921.
- del Solar vd. (1998). del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun;62(2):434-64. doi: 10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998. PMID: 9618448; PMCID: PMC98921.
- Dodge, Y. (2006). *The Oxford dictionary of statistical terms*. New York: Oxford University Press .
- Domanski, C., & Szczepocki, P. (2020). Comparison of selected tests for univariate normality based on measures of moments. *Statistics in Transition New Series*, 21(5), 151-179.
- Dong, L., & Giles, D. (2007). An empirical likelihood ratio test for normality. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(1), 197-215.
- Doornik, J., & Hansen, H. (2008). An omnibus test for univariate and multivariate normality. *Oxford Bulletin of Economics and Statistics*, 70(1), 927-939.
- Dudewicz, E. J., van der Meulen, E. C., SriRam, M. G., & Teoh, N. K. (1995). Entropy-based random number evaluation. *American Journal of Mathematical and Management Sciences*, 15(1-2), 115-153.
- e Riele H. vd., 1986. (tarih yok). e Riele, H., B. Michel, and S. D. Ehrlich. 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2541–2545.
- Eckdahl, T. T., ve J. N. Anderson. (1990). Eckdahl, T. T., and J. N. Anderson. 1990. Conserved DNA structures in origins of replication. *Nucleic Acids Res.* 18:1609–1612.

- Epps, T. (2005). Tests for location-scale families based on the empirical characteristic function. *Metrika*, 62(1), 99-114.
- Epps, T., & Pulley, L. (1983). A test for normality based on the empirical characteristic function. *Biometrika*, 70(3), 723-726.
- Epps, T., Singleton, K., & Pulley, L. (1982). A test of separate families of distributions based on the empirical moment generating function. *Biometrika*, 69(2), 391-399.
- Erauso, G., vd. (1996). Erauso, G., S. Marsin, N. Benbouzid-Rollet, M. F. Baucher, T. Barbeyron, Y. Zivanovic, D. Prieur, and P. Fonterre. 1996. Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacter.*
- Ersan, E., & Mersin, S. (2023). Kaynakça Nasıl Yazılır. *Fen Bilimleri Tez Dergisi*, 12(5), s. 123-135.
- Espinosa vd. (1995). Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F., Alonso, J.C., 1995. Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 111–120.
- Esteban, M. D., Marhuenda, Y., Morales, D., & Sanchez, A. (2007). New goodness-of-fit tests based on sample quantiles. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(3), 631-642.
- Esteban, M., Castellanos, M., Morales, D., & Vajda, I. (2001). Monte Carlo comparison of four normality tests using different entropy estimates. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 30(4), 761-785.
- Evren, A., & Tuna, E. (2012). On some properties of goodness of fit measures based on statistical entropy. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 13(1), 192-205.
- Fan, J. (1996). Test of significance based on wavelet thresholding and Neyman's truncation. *Journal of the American Statistical Association*, 91(434), 674-688.
- Fan, Y. (1997). Goodness-of-fit tests for a multivariate distribution by the empirical characteristic function. *Journal of Multivariate Analysis*, 62(1), 36-63.
- Fan, Y. (1998). Goodness-of-fit tests based on kernel density estimators with fixed smoothing parameters. *Econometric Theory*, 14(5), 604-621.
- Filliben, J. (1975). The probability plot correlation coefficient test for normality. *Technometrics*, 17(1), 111-117.
- Forbes, C., Evans, M., Hastings, N., & Peacock, B. (2011). *Statistical distributions* (Fourth Edition b.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Fortiana, J., & Grané, A. (2003). Goodness-of-fit tests based on maximum correlations and their orthogonal decompositions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 65(1), 115-126.

- Freeman, M., & Tukey, J. (1950). Transformations related to the angular and the square root. *The Annals of Mathematical Statistics*, 21(4), 607-611.
- Frosini, B. V. (1987). On the distribution and power of a goodness-of-fit statistic with parametric and nonparametric applications. P. Revesz, K. Sarkadi, & P. K. Sen (Dü) içinde, *Goodness-of-fit* (s. 133-154). Amsterdam: North Holland Publishing Company.
- Fujimura vd., 1996. (tarih yok). Fujimura, H., Sakuma, Y. ve Weimer, T., 1996. A quantitative method for the determination of plasmid copy number in recombinant yeast, *Biologicals* 24, 67–70.
- Gabler, F., vd., 2020. (tarih yok). Gabler, F., Nam, S. Z., Till, S., Mirdita, M., Steinegger, M., Söding, J., Lupas, A. N., & Alva, V. (2020). Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Current protocols in bioinformatics*, 72(1), e108. <https://doi.org/10.1002/cpbi.108>.
- Gel, Y., & Gastwirth, J. (2008). A robust modification of the Jarque-Bera test of normality. *Economics Letters*, 99(1), 30-32.
- Glen, A., Leemis, L., & Barr, D. (2001). Order statistics in goodness-of-fit testing. *IEEE Transactions on Reliability*, 50(2), 209-213.
- Gokhale, D. (1983). On entropy-based goodness-of-fit tests. *Computational Statistics & Data Analysis*, 1, 157-165.
- Grané, A. (2012). Exact goodness-of-fit tests for censored data. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics*, 64(6), 1187-1203.
- Gruss, A. D., ve S. D. Ehrlich., 1989. (tarih yok). Gruss, A. D., and S. D. Ehrlich. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* 53:231–241.
- Gülay, Z., 2002. (tarih yok). Gülay, Z. (2002). Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. *Tur Toraks Der*, 3, 75-88.
- Güler, H. İ., vd., 2018. (tarih yok). Güler, H. İ., Ceylan, E., Çanakçı, S., & Beldüz, A. O., (2018). A novel cryptic and theta type plasmid (pHIG22) from *Thermus scodotuctus* sp K6. *GENE* , vol.679, 282-290. .
- Hall, T.A., 1999. (tarih yok). Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hanwell, 2012. (tarih yok). Hanwell, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics*4, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17> (2012).
- Hanwell, M.D., vd., 2012. (tarih yok). Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4, 17 (2012). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

- Haring, V. vd. (1985). Haring, V., P. Scholz, E. Scherzinger, J. Frey, K. Derbyshire, G. Hatfull, N. S. Willetts, and M. Bagdasarian. 1985. Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6090–6094.
- Haring, V., ve E. Scherzinger. (1989). Haring, V., and E. Scherzinger. 1989. Replication proteins of the IncQ plasmids, p. 95–124. In C. M. Thomas (ed.), *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
- Hayakawa, T vd. (1979). Hayakawa, T., T. Tanaka, K. Sakaguchi, N. Otake, & H. Yonehara: A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *J Gen Appl Microbiol* 25, 255-260 (1979).
- Heeryt, D., vd., 1989. (tarih yok). Heeryt, D., M, Powell, R., Gannon, F. ve Dunican, L., K., 1989. *Curing of a plasmid from*.
- Hegazy, Y., & Green, J. (1975). Some New Goodness-Of-Fit Tests Using Order Statistics. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 24(3), 299-308.
- Heyde, C. (1975). A supplement to the strong law of large numbers. *Journal of Applied Probability*, 12(1), 173-175.
- Hinnebusch. (1993). Hinnebusch, J., & H. Tilly: Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol Microbiol* 10, 917-922 (1993).
- Holmes vd. (1995). Holmes, M. L., F. Pfeifer, and M. L. Dyll-Smith. 1995. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene* 153:117–121.
- Honda, Y., vd. 1991. (tarih yok). Honda, Y., H. Sakai, H. Hiasa, K. Tanaka, T. Komano, and M. Bagdasarian. 1991. Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad host-range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:.
- Hosking, J. (1990). L-moments: Analysis and estimation of distributions using linear combinations of order statistics. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 52(1), 105-124.
- Huang, S. (2014). Huang, S.-Y. (2014) Search strategies and evaluation in protein-protein docking: principles, advances and challenges. *Drug Discov. Today*, 19, 1081–1096.
- Hubbard, R., & Lindsay, R. (2008). Why P values are not a useful measure of evidence in statistical significance testing. *Theory & Psychology*, 18(1), 69-88.
- Ingmer, H. ve Cohen, S. N., 1993. (tarih yok). 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.
- Ingmer, H. ve Cohen, S. N., 1993. (tarih yok). 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.

- Jarque, C., & Bera, A. (1980). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. *Economics letters*, 6(3), 255-259.
- Johnson, N. L., Kotz, S., & Balakrishnan, N. (2019). Genesis. N. Balakrishnan, & A. P. Basu (Dü) içinde, *Exponential Distribution: Theory, Methods and Applications* (s. 1-4). New York: Taylor & Francis Group.
- Johnson, N., Kotz, S., & Balakrishnan, N. (1995). *Continuous univariate distributions, volume 2* (Second Edition b., Cilt 289). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Kelman, Z., ve M. O'Donnell. (1995). Kelman, Z., and M. O'Donnell. 1995. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* 64:171–200.
- Khinchin, A. I. (1957). *Mathematical foundations of information theory*. (R. A. Silverman, & M. D. Friedman, Çev.) New York: Dover Publication Inc.
- Kiewiet, R. vd. (1993). Kiewiet, R., S. Bron, K. de Jonge, G. Venema, and J. F. M. L. Seegers. 1993. Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2. *Mol. Microbiol.* 10: 319–327.
- Kim, K., vd. (1985). Kim, K., and R. J. Meyer. 1985. Copy number of the broad host-range plasmid R1162 is determined by the amount of essential plasmid-encoded proteins. *J. Mol. Biol.* 185:755–767.
- Kline vd. (1980). Kline, B.C., Palchaudhuri, S., 1980. Genetic studies of F plasmid maintenance genes. *Plasmid* 4, 281–291.
- Kobayashi, H., Mark, B., & Turin, W. (2012). *Probability, random processes, and statistical analysis*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Koepsel R. R. vd., 1985. (tarih yok). Koepsel, R. R., R. W. Murray, W. D. Rosenblum, and S. A. Khan. 1985. Purification of pT181-encoded RepC protein required for the initiation of plasmid replication. *J. Biol. Chem.* 260:8571–8577.
- Kolmogorov, A. (1933). *Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung*. Berlin: Julius Springer.
- Kornberg, A., and T. Baker. (1992). Kornberg, A., and T. Baker. 1992. DNA replication. W. H. Freeman & Co. New York, N.Y.
- Koshland. (1995). Koshland Jr DEJACIEiE. The key–lock theory and the induced fit theory. 1995;33(23-24):23758.
- Kuiper, N. (1960). Tests concerning random points on a circle. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen: Series A*, 63, s. 38-47.

- Kulkarni, R., S. ve Kanekar, P., P., 1988. (tarih yok). Kulkarni, R., S. ve Kanekar, P., P., 1988. *Effects of some curing agents on phenotypic stability in Pseudomonas putida degrading e-caprolactam*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 255-257.
- Kullback, S., & Leibler, R. (1951). On information and sufficiency. *The Annals of Mathematical Statistics*, 22(1), 79-86.
- Laio, F. (2004). Cramer-von Mises and Anderson-Darling goodness of fit tests for extreme value distributions with unknown parameters. *Water Resources Research*, 40(9).
- Lederberg, J. (1998). Lederberg, J.: Personal perspective. *Plasmid* (1952- 1997) *Plasmid* 39, 1-9 (1998).
- Ledwina, T. (1994). Data-driven version of Neyman's smooth test of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 89(427), 1000-1005.
- Lilliefors, H. (1967). On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *Journal of the American Statistical Association*, 62(318), 399-402.
- Luria, S., 1984. (tarih yok). Luria, S., 1984. *A slot Machine, A Broken Test Tube Harpers Colins Publishers* (1st.
- Mardia, K. V. (1972). *Statistics of Directional Data*. London, England: Academic Press.
- Marques de Sá, J. (2007). *Applied statistics using SPSS, statistica, Matlab and R*. USA: Springer Company.
- Massey Jr, F. J. (1951). The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253), 68-78.
- Matsui, M., & Takemura, A. (2005). Empirical characteristic function approach to goodness-of-fit tests for the Cauchy distribution with parameters estimated by MLE or EISE. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics*, 57(1), 183-199.
- McConkey vd. (2002). McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*. 2002; 83:845–855.
- Mendes, M., & Pala, A. (2003). Type I error rate and power of three normality tests. *Pakistan Journal of Information and Technology*, 2(2), 135-139.
- Michael vd. (1998). Michael J E Sternberg*, Henry A Gabb and Richard M Jackson Predictive docking of protein-protein and protein-DNA complexes.
- Morris vd. (2008). Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol* . 2008;443:365–82. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- Morrison vd. (2006). Morrison JL, Breitling R, Higham DJ, Gilbert DRJB. A lock-and-key model for protein–protein interactions. 2006;22(16):2012-9.

- Nakas, C. (2007). Performance of the One-Sample Goodness-of-Fit P-P-Plot Length Test. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(5), 1053-1059.
- Neyman, J. (1949). Contribution to the theory of χ^2 test. J. Neyman (Dü.), *Proceedings of the First Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability* içinde (s. 239-273). University of California Press.
- Nieto, C., vd. (1992). Nieto, C., R. Giraldo, E. Ferna' ndez-Tresguerres, and R. Dı' az. 1992. Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for Pseudomonas isolated from Pseudomonas syringae pathovar savastanoi. *J. Mol. Biol.* 223:415–426.
- Noughabi, H., & Arghami, N. (2011). Monte Carlo comparison of seven normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(8), 965-972.
- Onyper, S., Thacher, P., Gilbert, J., & Gradess, S. (2012). Class start times, sleep, and academic performance in college: A path analysis. *Chronobiology International*, 29(3), 318-335.
- Owen, A. (2001). *Empirical likelihood* (1 b.). New York: Chapman and Hall/CRC.
- Park, S. (1999). A goodness-of-fit test for normality based on the sample entropy of order statistics. *Statistics & probability letters*, 44(4), 359-363.
- Pearson, K. (1900). X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 50(302), 157-175.
- Pettitt, A. (1977). Testing the normality of several independent samples using the Anderson-Darling statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 26(2), 156-161.
- Pikuta, E. vd. 2000. (tarih yok). *Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., ... & Laurinavichius, K. (2000). Anoxybacillus pushchinensis gen. nov., sp. nov., gübreden elde edilen yeni bir anaerobik, alkalifilik, orta derecede termofilik bakteri ve Anox.*
- Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006. (tarih yok). *Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. John Wiley ve Sons.*
- Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006. (tarih yok). *Primrose, S. B., ve Twyman, R., 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. John Wiley ve Sons.*
- Pritchard, R. H. (1978). Pritchard, R. H. 1978. Control of DNA replication in bacteria, p. 1–22. In I. Molineux and M. Kohiyama (ed.), *DNA synthesis: present and future*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Pritchard, R. H., vd. (1969). Pritchard, R. H., P. T. Barth, and J. Collins. 1969. Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 19:263–297.

- Projan, S. J., ve R. P. Novick., 1988. (tarih yok). Projan, S. J., and R. P. Novick. 1988. Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* 19:203–221.
- Rahman, M., & Govindarajulu, Z. (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilk for normality. *Journal of Applied Statistics*, 24(2), 219-236.
- Ramachandran, K., & Tsokos, C. (2015). *Mathematical Statistics with Applications in R* (Second Edition b.). Academic Press.
- Ramachandran, K., & Tsokos, C. (2021). *Mathematical statistics with applications in R* (Third Edition b.). Academic Press.
- Razali, N., & Yap, B. W. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.
- Reschenhofer, E., & Bomze, I. (1991). Length tests for goodness of fit. *Biometrika*, 78(1), 207-216.
- Richards vd. (1979). Richards, H., Datta, N., 1979. Reclassification of incompatibility group L (IncL) plasmids. *Plasmid* 2, 293–295.
- Rodríguez-Lumbreras LA vd., 2022. (tarih yok). *Rodríguez-Lumbreras LA, Jiménez-García B, Giménez-Santamarina S and Fernández-Recio J (2022), pyDockDNA: A new web server for energy-based protein-DNA docking and scoring. Front. Mol. Biosci. 9:988996. doi: 10.3389/fmolb.2022.988996.*
- Romao, X., Delgado, R., & Costa, A. (2010). An empirical power comparison of univariate goodness-of-fit tests for normality. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 80(5), 545-591.
- Rosenblatt, M. (1956). A central limit theorem and a strong mixing condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42(1), 43-47.
- Rosin, P., & Rammler, E. (1933). Laws governing the fineness of a powdered coal. *Journal of Institute of Fuel*, 7, 29-36.
- Ruan, L. ve Xu, X., 2007. (tarih yok). *Ruan, L. ve Xu, X., 2007. Sequence analysis and characterizations of two novel plasmids isolated from Thermus sp. 4C, Plasmid, 58, 84–87.*
- Rubin, S., J. ve Rosenblum, E., D., 1971. (tarih yok). *Rubin, S., J. ve Rosenblum, E., D., 1971. Effects of Ethidium Bromide on Growth and on Loss of the Penicillinase Plasmid of Staphylococcus aureus, Journal Of Bacteriology, 108, 1200-1204.*
- Saksena, R. S. (1980). *A Handbook of Statistics* (Cilt 1). (P. R. Krishnaiah, Dü.) Motilal Banarsidass Publishe.
- Scherzinger, E., vd. (1991). Scherzinger, E., V. Haring, R. Lurz, and S. Otto. 1991. Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res.* 19:1203–1211.

- Seier, E. (2002). Comparison of tests for univariate normality. *InterStat Statistical Journal*, 1(2002), 1-17.
- Shan, G., Vexler, A., Wilding, G., & Hutson, A. (2010). Simple and exact empirical likelihood ratio tests for normality based on moment relations. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 40(1), 129-146.
- Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423.
- Shapiro, S. S., & Francia, R. S. (1972). An approximate analysis of variance test for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 67(337), 215-216.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Shapiro, S., Wilk, M., & Chen, H. (1968). A comparative study of various tests for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63(324), 1343-1372.
- Shoichet vd. (2002). Shoichet BK, McGovern SL, Wei B, Irwin JJ. Lead discovery using molecular docking. *Curr Opin Chem Biol* . 2002;6(4):439–85. doi:10.1016/s1367-5931(02)00339-3.
- Siraj-Ud-Doula, M. (2019). A Comparison among Twenty-Seven Normality Tests. *Research & Reviews: Journal of Statistics*, 8(3), 41-59.
- Smirnov, N. (1939). Estimate of deviation between empirical distribution functions in two independent samples. *Bulletin Moscow University*, 2(2), 3-16.
- Som, T., ve J. Tomizawa., 1983. (tarih yok). Som, T., and J. Tomizawa. 1983. Regulatory regions of ColE1 that are involved in determination of plasmid copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2257–2261.
- Song, K.-S. (2002). Goodness-of-fit tests based on Kullback-Leibler discrimination information. *IEEE Transactions on Information Theory*, 48(5), 1103-1117.
- Söding, J., vd., 2005. (tarih yok). Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic acids research*, 33(Web Server issue), W244–W248. <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>.
- Stephens, M. (1974). EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, 69(347), 730-737.
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1(6), 1-25. doi:<https://doi.org/10.2307/2331554>
- Sullivan, G., & Feinn, R. (2012). Using effect size-or why the P value is not enough. *Journal of Graduate Medical Education*, 4(3), 279-282.

- te Riele H. vd. (1986). te Riele, H., B. Michel, and S. D. Ehrlich. 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2541–2545.
- Thomas, C. M. (1988). Thomas, C. M. 1988. Recent studies on the control of plasmid replication. *Biochim. Biophys. Acta* 949:253–263.
- Tolikas, K., & Heravi, S. (2008). The Anderson-Darling goodness-of-fit test statistic for the three-parameter lognormal distribution. *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 37(19), 3135-3143.
- Tolmasky vd. (1992). Tolmasky, M.E., L.A. Actis, & J.H. Crosa: Plasmids. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Ed: Lederberg J, Academic Press, San Diego, CA 431-442 (1992).
- Tolun, A., ve D. R. Helinski., 1981. (tarih yok). Tolun, A., and D. R. Helinski. 1981. Direct repeats of the plasmid *incC* region express F incompatibility. *Cell* 24:687–694.
- Tomizawa, J. vd. (1974). Tomizawa, J., Y. Sakakibara, and T. Kakefuda. 1974. Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:2260–2264.
- Torabi, H., Montazeri, N., & Grané, A. (2016). A test for normality based on the empirical distribution function. *Statistics and Operations Research Transactions*, 40(1), 55-88.
- Towhidi, M., & Salmanpour, M. (2007). A new goodness-of-fit test based on the empirical characteristic function. *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 36(15), 2777-2785.
- Uhm, T., & Yi, S. (2021). A comparison of normality testing methods by empirical power and distribution of P-values. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 1-14.
- URL-1. (2023, Şubat 12). MPI Bioinformatics Toolkit <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred> adresinden yararlanılmıştır.
- URL-2. (2023, Şubat 27). Clustal omega; <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> adresinden alınmıştır.
- URL-3. (2023, Nisan 27). NCBI BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresinden alınmıştır.
- URL-4. (2023, Haziran 7). NEB cutter: <https://nc3.neb.com/NEBcutter/> adresinden alınmıştır.
- URL-5. (2024, Mayıs 16). Alphafold: <https://alphafold.ebi.ac.uk/> adresinden alınmıştır.
- URL-6.(2024, Haziran 26). DOCKING analizleri: <https://haddock.science.uu.nl/> adresinden gerçekleştirilmiştir.
- URL-8. (2024, Haziran 29). CPORT: <https://alcazar.science.uu.nl/services/CPORT/> adresinden alınmıştır.

- Uyanto, S. (2022). An Extensive Comparisons of 50 Univariate Goodness-of-fit Tests for Normality. *Austrian Journal of Statistics*, 51(3), 45-97.
- van Dijk, M., ve Bonvin, A. M., 2008. (tarih yok). *van Dijk, M., & Bonvin, A. M. (2008). A protein-DNA docking benchmark. Nucleic acids research, 36(14), e88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn386>.*
- van Dijk, M., ve Bonvin, A. M., 2010. (tarih yok). *van Dijk, M., & Bonvin, A. M. (2010). Pushing the limits of what is achievable in protein-DNA docking: benchmarking HADDOCK's performance. Nucleic acids research, 38(17), 5634–5647. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq222>.*
- van Zyl, J. (2018). The performance of univariate goodness-of-fit tests for normality based on the empirical characteristic function in large samples. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 47(4), 1146-1156.
- Vasicek, O. (1976). A test for normality based on sample entropy. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 38(1), 54-59.
- Vasquez, C., vd., 1983. (tarih yok). *Vasquez, C., Villanueva, J. ve Vicufia, R., 1983. Plasmid Curing in Thermus thermophilus.*
- von Plato, J. (2005). AN Kolmogorov, Grundbegriffe der wahrscheinlichkeitsrechnung (1933). I. G. Guinness (Dü.) içinde, *Landmark Writings in Western Mathematics 1640-1940* (s. 960-969). Elsevier.
- Voskuil, M. I. ve Chambbiss, G. H., 1993. (tarih yok). *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 H., vd., 2011. (tarih yok). *Wang H., Liu, X., Feng, E., Zhu, L., Wang, D., Liao, X. ve Wang H., 2011. Curing the Plasmid pXO2 from Bacillus anthracis A16 Using Plasmid Incompatibility, Curr.*
- Wang, H. vd., 2011. (tarih yok). *Wang, H., Liu X., Feng, E., Zhu, L., Wang, D., Liao, X. ve Wang, H. 2011, Curing the Plasmid pXO2 from Bacillus anthracis A16 Using Plasmid Incompatibility, Curr. Microbiol., 62,703-709.*
- Wang, J. (2012). Sample distribution function based goodness-of-fit test for complex surveys. *Computational Statistics & Data Analysis*, 56(3), 664-679.
- Watson, G. (1961). Goodness-of-fit tests on a circle. *Biometrika*, 48(1/2), 109-114.
- Watson, G. (1962). Goodness-of-fit tests on a circle. II. *Biometrika*, 49(1/2), 57-63.
- Wegrzyn, G., 2005. (tarih yok). *Wegrzyn, G., 2005. What does “plasmid biology” currently mean? Summary of the Plasmid Biology 2004 Meeting. Plasmid 53, 14–22.*
- Weibull, W. (1939). A statistical theory of the strength of material. *Ingeniors Vetenskapa Acadamiens Handligar*, 151, 5-45.

- Weibull, W. (1951). A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 18, 192-297.
- Wijekularathna, D., Manage, A., & Scariano, S. (2019). Power analysis of several normality tests: A Monte Carlo simulation study. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 51(3), 757-773.
- Wilks, S. S. (1935). The likelihood test of independence in contingency tables. *The Annals of Mathematical Statistics*, 6(4), 190-196.
- Wodak and Janin. (1978). Wodak,S.J. and Janin,J. (1978) Computer analysis of protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.*, 124, 323–342.
- Yap, B., & Sim, C. (2011). Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(12), 2141-2155.
- Yazici, B., & Yolacan, S. (2007). A comparison of various tests of normality. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 77(2), 175-183.
- Yıldırım, N., & Gökpınar, F. (2012). Bazı Normallik Testlerinin 1. Tip Hataları ve Güçleri Bakımından Kıyaslanması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(1), 109-115.
- Zghoul, A. (2010). A goodness of fit test for normality based on the empirical moment generating function. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 39(6), 1292-1304.
- Zhang, J. (2002). Powerful goodness-of-fit tests based on the likelihood ratio. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64(2), 281-294.
- Zhang, J., & Wu, Y. (2005). Likelihood-ratio tests for normality. *Computational Statistics & Data Analysis*, 49(3), 709-721.
- Zhang, P. (1999). Omnibus test of normality using the Q statistic. *Journal of Applied Statistics*, 26(4), 519-528.
- Zimmermann, I., vd., 2018. (tarih yok). Zimmermann, I., Egloff, P., Hutter, C. A., Arnold, F. M., Stohler, P., Bocquet, N., Hug, M. N., Huber, S., Siegrist, M., Hetemann, L., Gera, J., Gmür, S., Spies, P., Gygax, D., Geertsma, E. R., Dawson, R. J., & Seeger, M. A. (2018). *Synthetic single domai*.
- Zverev vd. (1984). Zverev, V.V., Kuzmin, N.P., Zuyeva, L.A., Burova, E.I., Alexandrov, A.A., Khmel, I.A., 1984. Regions of homology in small colicinogenic plasmids. *Plasmid* 12, 203–205.

8. EKLER

Ek 1. pAnox1 plazmitinin 1592 bp'lik baz dizisi

GGCTTATCTGTCAGACATTGAATTGAACGATACAAACGCGATCCATGCTATTTTGAACGAA
ATGCCTATAAAAGAGGTTGACGGTAAGAAGTATATAAAAGGTGGTCGGTTACATATGTATC
CGCCTGGAATGAATTTATTTCAGAAAATCGAAAGGTATTGAATATCCAGAACGCAAAGATAT
GCGATACAAGAATGTAAAAAAATAGTAGGGTTCGGCACAACCCCACTACGAGAAAACCTAC
CATATCGAAAATGAAGATTTTCAAAACACTATTCACTACGAACAGTATAACTTGAAACGTA
CACACATGTAAACGTACATGTACATACATGTACGTACACGTATATACGAAAATATATTCGT
CAGACGAAAAAGGGGCATGGGTTCGTGTCGGGGGGCACCCTCTCGCGGGGGGTACCGACA
CGTGACCCATGCCCTATATTTTTCTTTGCGGAAAATGTTGACTTTTTGTGTTTTTTGCGTA
ATAATGATGACAAATAGTAAACGAGGTGATGACGATTGGCACGAGATGAAAGGATAATAAT
TAGATTGCGCGCCGACGTTAAGGAAGAGTTTCAAGACATGGCTGAACAAATGGGCATGACG
ATCTCCGCGCTTGGTTCGTACGTGATCGGGAAGTTTGTGTTGATCACAAAAGGAACAGGG
AGTTGCAAGAAAAAATGATTATGCCAGCTGTGAATGAGCTGGTCAAAATGATTGCTGATGA
CATGCCGAACAACTTGAGTTTTTGAATTTATTGAGGAGCTTTCGGGGCAAATGGAAAAC
AAGCTGTGAACGTCAGAACAGCGCGTTAAGTGAGCGAAGCGAACGTGCCTTGATCACTGGG
TGGCTCCCTTTGGTAAGCTTTGCCGAGGTGTGCGGGAGCGTTTTTCTCCCGCACGCCTCGC
CCTTTAGGGTTTCCAAAGGGAGCAGGGCCCCAGTGTCAAGGTAGCGCGTTGATGACGCACT
ATATTAAGTTGATTTTAGTTAAACATTACGAGAAAAATGGGGGGTGATGAGGTTGGAAAA
GTCATTTGTTGGTATAAAACCCGATGACTTGGTAAACGGTCACAAAAATGAAGCACATTGTA
GAATTACAGTATATGGAAAGGAAGAACACTAAATGTAGGATTAAAAAATTAGACAAAGATT
CGTACTTGGTTTTAGAACTGGCGAAGTAAAAGAGTTTGAACACATTGAAAATCGTAAAGA
TTCATTAAATTCATTGCGACAAACATTTAAAAAAATACGATATTTGATCAATAACAACTTT
GAAGGTAAACCGAACGAATTGCATTGCACTTTAACCTATCGTGAGAATATGACAGACACAA
AGAGGTATATGCTGACCTGGATAAGTTTATTAAAAGATTGAAATACAAGTATAAGGATAA
AACAAACATAGATTACTTGAATGTAGTCGAGCCACAAGGGCGTGGGGCTTGGCATTGTCAT
TTACTGTTGCGGTTCAATGATTTAGATGCGATATTCATAGAAAATGAAGTTCTTCGGGATC
TATGGGGACATGGATTTGTAAGTGTGCGCTCATTGAAAGACATTGATAACATTGGTGCTTA
TTTATC

ÖZGEÇMİŞ

Hatice AYYILDIZ, İlk, orta ve lise eğitimini Rize’de tamamladıktan sonra, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı. 2019 yılında bu bölümden mezun oldu. 2020 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER danışmanlığında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

