

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

EKZOPOLİFOSFATAZ (*ppx*) VE
POLİFOSFAT KİNAZ (*ppk*) GENLERİNDEN
YOKSUN BACILLUS THURINGIENSIS
SUBSP. ISRAELENSIS SUŞUNDA
ENDOTOKSİN BİYOSENTEZİ

Aybike YEDEKÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

EKZOPOLİFOSFATAZ (*ppx*) VE
POLİFOSFATKİNAZ (*ppk*) GENLERİNDEN
YOKSUN BACILLUS THURINGIENSIS
SUBSP. ISRAELENSIS SUŞUNDA
ENDOTOKSİN BİYOSENTEZİ

Aybike YEDEKÇİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31.05.2012 tarih ve 2012/20... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08.06.2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Aybika YEDEKÇİ'nin tez çalışması Mikrobiyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Sedat TUNCA GEDİK

ÜYE

: Doç. Dr. Yelda ÖZDEN GİFTÇİ

ÜYE

: Doç. Dr. Melik ÖZKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: EKZOPOLİFOSFATAZ (*ppx*) VE POLİFOSFATKİNAZ (*ppk*) GENLERİNDEN YOKSUN *BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENIS* SUŞUNDA ENDOTOKSİN BİYOSENTEZİ.

YAZAR ADI: AYBİKE YEDEKÇİ

Bütün canlılarda bulunan Polifosfat (poliP), yüzlerce fosfat molekülünün yüksek enerjili anhidrid bağlarıyla birleşmesinden meydana gelen bir polimerdir. “PoliP kinaz” enzimi (PPK) tarafından sentezlenen ve “ekzopolifosfataz” enzimi (PPX) tarafından yıkılan PoliP, önemli bir enerji deposu olup bazı kinazlar tarafından ATP yerine kullanılabilmekte ve adenilat kinazlar yardımıyla da NTP’lerin yapımında kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu polimer, hücrelerin fiziksel ve kimyasal streslere karşı direnç göstermesinde de rol oynamaktadır.

Endüstriyel öneme sahip önemli bir biyolojik böcek kontrol ajanı olan *B. thuringiensis*, tarımda, ormancılıkta ve sivrisinek kontrolünde sentetik kimyasal pestisidlere alternatif olarak kullanılan biyolojik pestisittir. *B. thuringiensis*’in toksin protein üretiminde, çevresel faktörlerin kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bazı mineral elementlerin özellikle inorganik fosfatın *B. thuringiensis* toksin biyosentezinde çok önemli bir etkiye sahip olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Banerjee-Bhatnagar, 1999; Ozkan et al., 2003; Kurt ve ark., 2005). Bu çalışmaların hepsinde, inorganik fosfat, besiyeri ortamına değişik konsantrasyonlarda eklenmiş ve fosfatın endotoksin üretimi üzerindeki tetikleyici etkisi gözlenmiştir.

Çalışılan mikroorganizmalarda çok önemli fonksiyonları olmasına rağmen, literatürde polifosfat polimerinin *Bacillus*’daki rolüyle ilgili mevcut bilgimize göre tek bir çalışma bulunmaktadır. 2004 yılında yayımlanan bu çalışmada Shi ve ark., poliP’nin, *B. cereus*’un hareketliliği, biyofilm oluşturması ve sporulasyonu için vazgeçilmez olduğunu göstermişlerdir. Laboratuvarımızda yürüttüğümüz araştırmalar, poliP metabolizmasında oluşan herhangi bir değişikliğin biyoinsektisit biyosentezini etkilediğini göstermiştir. Ancak Poli P’nin endotoksin üretimine

etkisini netleştirmek, Poli P üretemeyen kalıcı mutant suşların oluşturularak karakterize edilmesiyle mümkündür. PoliP metabolizması ve biyoinsektisit üretimi arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacıyla, bu çalışmada, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis ppk* ve *ppx* genlerinin büyük bir bölümü klasik kaset mutasyonu yöntemiyle kromozomdan silinmiş ve bu mutasyonun üretici suşta endotoksin üretimini arttırdığı gözlenmiştir.

SUMMARY

THESIS TITLE: ENDOTOXIN BIOSYNTHESIS IN *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS* STRAIN DEFICIENT IN EXOPOLYPHOSPHATASE (*ppx*) AND POLYPHOSPHATE KINASE (*ppk*) GENES .

AUTHOR: AYBIKE YEDEKÇİ

Polyphosphate (polyP), which is found in every living cell, is a linear polymer consisting of tens to hundreds of phosphate molecules joined together by high-energy anhydride bonds. Polyphosphate, which is synthesized by the enzyme “polyP kinase” and degraded by the enzyme “exopolyphosphatase”, is not only an important energy store but also used as ATP substitutes and it serves as phosphate donor to regenerate NTP in association with the adenylate kinases. Moreover, this polymer has been shown to have a crucial role in the regulation of adaptive responses of cells to physical and chemical stresses.

Bacillus thuringiensis, which is an important industrial agent used for biological control of insects, is a useful biological pesticide alternative to synthetic chemical pesticide in commercial agriculture, forest management and mosquito control. Environmental factors play a critical role in toxin protein synthesis by *B. thuringiensis*. Some mineral elements especially phosphate has been shown to play very important role in toxin production by *B. thuringiensis* (Banerjee-Bhatnagar, 1999; Ozkan et al., 2003; Kurt et.al., 2005). In all of these studies inorganic phosphate has been added into the culture media in different concentrations and the stimulatory effect of phosphate on endotoksin production has been evaluated.

Although polyphosphate polymer has very important functions in the microorganisms studied, to our knowledge there is only one study about the role of this polymer in *Bacillus*. In 2004 Shi et.al. deleted the genes (*ppk*; polyphosphate kinase, *ppx*; exopolyphosphatase, *pap*; phosphotransferase) responsible for the

polyP metabolism and show that polyP is necessary for the motility, biofilm formation and sporulation in *Bacillus cereus*.

The research ongoing in our laboratory showed that any change in PolyP metabolism affect bioinsecticide biosynthesis in the producer strain. But the effect of PolyP on endotoxin production can be clarified by obtaining and characterizing mutant strains which can not produce PolyP. In order to find the relation between PolyP metabolism and bioinsecticide production, classic cassette mutagenesis method was used to delete nearly entire *ppk* and *ppx* gene of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* and it was shown that this mutation caused an increase in endotoxin biosynthesis by the producer strain.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle önüme çıkan tüm zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımız boyunca bize her yönden destek veren değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Engin tecrübelerinden faydalandığım yakın zamanda kaybettiğimiz değerli hocam merhum Prof. Dr. Fusun GÜMÜŞEL'i saygıyla anıyorum.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız hocam Yrd. Doç. Dr. İnci ÖZDEMİR'e imkanlarından yararlanmama izin verdiği ve güleryüzünü esirgemediği için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında bize kapılarını açan, yardımcı olan Yeditepe ve Sabancı Üniversitesi Biyoloji Bölümü görevlileri ile Üniversite yetkililerine teşekkür ederim.

Bu tezin gerçekleşmesinde her türlü katkıları bulunan, emeğinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim değerli hocam Arş. Gör. Tuğrul DORUK'a minnettarlıklarımı sunarım.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve tez çalışmam boyunca bir çok konuda yardımcı olan değerli arkadaşlarım, Ceyda KETENCİ, Tuba KORKMAZ, Şerif YILMAZ, Zeynep DEMİR, Arş.Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY ve Zişan ASAL KILIÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Arş.Gör. Metin ÇETİN, Uzm. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Mine GÜL ŞEKER, Uzm. Biyolog Pelin BALÇIK ERÇİN, Teknisyen Özlem ASKER, Esra KAYA, Elif SİRMA, Veysel SÜZERER ve Hale HEBİP'e teşekkür ederim.

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimimin her döneminde destekleyen sevgili babam Fırat Yavuz YEDEKÇİ'ye, annem Selmin YEDEKÇİ'ye ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana maddi ve manevi desteği sağlayan saygıdeğer anneannem Emine NURTEKİN'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	VI
TEŞEKKÜR	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
TABLolar DİZİNİ	XVII
1.GİRİŞ	1
1.1. Polifosfat	1
1.1.1. Polifosfat Kinaz (PPK1; EC 2.7.4.1)	2
1.1.2. Ekzopolifosfataz (PPX; EC 3.6.1.11)	3
1.1.3. Endopolifosfataz (PPN; EC 3.6.1.10)	4
1.1.4. PoliP: AMP fosfotransferaz (PAP; EC. 2.7.4.3)	5
1.2. Polifosfat Polimerinin İşlevi	5
1.3. <i>Bacillus</i>	8
1.3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.5. Bti'da Cry Protein Üretimi ve Polifosfat Metabolizması Arasındaki İlişki	10
1.6. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI	11
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	12
2.1. Gereçler	12
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	12
2.1.2. Kullanılan Enzimler	12
2.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri	13
2.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları ve Plazmitler	14
2.1.7. Kullanılan çözeltiler	17
2.1.8. Kullanılan Besiyerleri	24

2.1.9. Kullanılan Antibiyotikler	26
2.1.10. Kullanılan Cihazlar	26
2.2. YÖNTEMLER	27
2.2.1. <i>E. coli</i> 'den Plazmit İzolasyonu	27
2.2.2. <i>B. thuringiensis subsp. israelensis</i> 'den Kromozomal DNA İzolasyonu	27
2.2.3. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri	28
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.5. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması	28
2.2.6. Mutasyon Kasetinin PCR ile Hazırlanması	28
2.2.7. <i>E. coli</i> kompetan hücrelerinin hazırlanması ve transformasyonu	30
2.2.8. Ligasyon	31
2.2.9. Klasik Kaset Mutasyonu	32
2.2.10. Plazmidlerin Bti'a Konjugasyon ile aktarılması	33
2.2.11. Δ pSK6500Ert Plazmidinin Bti 'a Elektroporasyonla Aktarılması	34
2.2.12. Southern Blot	35
2.2.12.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon	35
2.2.12.2. Prop DNA'larının Hazırlanması	36
2.2.13. Bti'dan Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE	37
3. BULGULAR	39
3.1. Mutasyon Kasetinin PCR ile Hazırlanması	39
3.2. Klasik Kaset Mutasyonu	42
3.3. <i>ppx</i> ve <i>ppk</i> genlerinden yoksun Bti mutant suşun elde edilmesi ve mutasyonun hem PCR ile hem de Southern ile ispatlanması	47
3.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR DİZİNİ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
AckA	Asetat Kinaz
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
Amp	Ampisilin
Akr	Akrilamid
Apr	Amonyum per sülfat
Apr	Apramisin
ATP	Adenozin trifosfat
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
BCA	Bikinkoninik Asit
BglII	<i>Bacillus globigii</i> Restriksiyon Endonükleaz
Bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
Chl	Kloramfenikol
Cry	Kristal
CTAB	Setil trimetilamonyum bromid
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz V
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
EtBr	Etidyum Bromid
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
GPP	Guanozin pentafosfat fosforilaz
HCl	Hidroklorik asit
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
H₂O₂	Hidrojen peroksit
K	Potasyum
kDA	Kilodalton
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
K₂HPO₄	Potasyum fosfat dibazik

kJ	Kilojoule
Kn	Kanamisin
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria-Bertani Broth
M	Molar
<i>MfeI</i>	<i>Mycoplasma fermentas</i> endonükleaz I
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Na₂OAc	Sodium Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis</i> endonükleaz I
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pi	İnorganik fosfat
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethanesülfonik asit)
PoliP	Polifosfat
ppGpp	Guanozin tetrafosfat
PPK	Polifosfat kinaz
PPN	Endopolifosfataz
PPX	Ekzopolifosfataz
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i> endonükleaz I
RecA	Rekombinaz A
<i>rpoS</i>	RNA polimeraz sigma faktör (38)
Rpm	Dakika başına dönüş
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
<i>SpeI</i>	<i>Sphaerotilus species</i> endonükleaz I
TEMED	Tetrametilendiamin

<i>Xba</i>I	<i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
<i>Xho</i>I	<i>Xanthomonas_vasicola</i> _endonükleaz I
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ⁷⁰	Sigma 70
σ³⁸	Sigma 38
Δ	Gen delesyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. İnorganik polifosfat	1
1.2. Polifosfatkinaz tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyon	2
1.3. <i>E. coli</i> polifosfat kinaz enziminin kristal yapısı	2
1.4. Ekzopolifosfataz tarafından katalizlenen reaksiyon	3
1.5. Ekzopolifosfataz enziminin kristal yapısı	4
1.6. Endopolifosfataz enziminin katalizlediği reaksiyon	4
1.7. PoliP:AMP fosfotransferazın katalizlediği reaksiyon	5
1.8. <i>B. thuringiensis</i> endosporu ve insektisidal kristal proteinleri	9
2.1. Çalışmada kullanılan belirteçler	13
2.2. pIJ773 plazmiti	15
2.3. λ Red rekombinasyon plazmidi pIJ790	16
2.4. pHT315 plazmidi	16
2.5. pBluescript SK (-) plazmidi	17
2.6. (A). Δ pSK6500 plazmiti ; (B). Δ pSK6500Ert plazmiti	33
2.7. Agaroz jelden saflaştırılan 1500 bç'lik <i>ppx-ppk</i> genini içeren MfeI DNA fragmenti.	36
2.8. <i>ppx-ppk</i> probunun kontrol DNA'sı (standart) ile karşılaştırılması.	37
2.9. BSA ile oluşturulan standart eğri grafiği.	39
3.1. 1382 bç'lik apramisin direnç geninin elde edilmesi.	40
3.2. PCR ile elde edilen mutasyon kaseti	40
3.4. pSK6500 plazmidinin MfeI kesim sonucu	43
3.5. Δ pSK6500 plazmidini oluşturacak DNA fragmanları.	44
3.7. Eritromisin genini çoğaltmak için yapılan PCR sonucu	45
3.8. Eritromisin direnç geninin Δ pSK6500 plazmidinin NotI-SpeI enzim kesim bölgesine klonlanması için kullanılan DNA fragmanları.	46

3.9. Olası Δ pSK6500Ert plazmidinin PCR ile doğrulanması	46
3.10. Mutasyonun PCR ile doğrulanması	48
3.11. Southern blot deneyi için mutant ve yaban suş DNA'larının <i>EcoRV</i> kesim sonuçları..	49
3.12. <i>ppx-ppk</i> (A) ve apramisin (B) proplarıyla elde edilen hibridizasyon sonucu.	49
3.13. Bti ve Bti Δ <i>ppx-ppk</i> suşlarının LB sıvı besiyerinde oluşturulan büyüme eğrileri.	50
3.14. Bti ve Bti Δ <i>ppx-ppk</i> suşlarının LB sıvı besiyerinde oluşturulan canlı hücre sayısı grafikleri.	51
3.15. Bti ve Bti Δ <i>ppx-ppk</i> suşlarının δ endotoksin üretimlerinin karşılaştırılması.	51

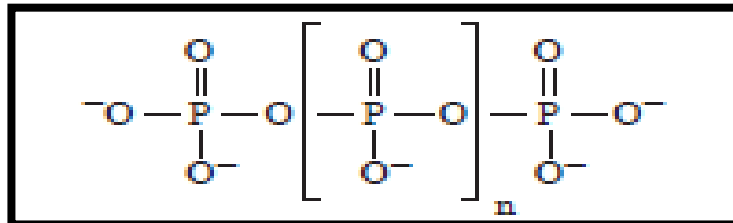
TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmada kullanılan bakteri soyları	14
2.2. Çalışmada kullanılan plazmidler	14
2.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler	26
2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler.	29
3.1. pSK6500 ve pSK6500 Δ <i>ppx</i> plazmidlerinin <i>Xba</i> I kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanları	41
3.2. <i>Mfe</i> I enzim kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanlarının büyüklükleri	42
3.3. pSK6500 ve Δ pSK6500 plazmidlerinin <i>Pst</i> I kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanları.	44

1.GİRİŞ

1.1. Polifosfat

İnorganik polifosfat (poliP), yüzlerce P_i rezidüsünün yüksek enerjili fosfoanhidrit bağlarıyla birleşmesinden oluşan düz yapılı bir polimerdir (Şekil 1.1). Bu polimer, tüm bakteri, mantar, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur (Shi ve ark., 2004).



Şekil 1.1. İnorganik polifosfat (Kornberg ve ark.,1999).

PoliP, bakteriyel hücrelerin sitoplazmasında, hücre yüzeyinde, periplazmasında ve plazma membranında bulunmaktadır. Bir çok bakteride polifosfatlar granüller halinde sitoplazmada yer almaktadırlar. Bu polimer, enerji ve fosfat kaynağı olmasının yanında biyofilm oluşumu, hareketlilik, bakterilerin ve küflerin gelişimsel süreçlerinin desteklenmesi, virülans oluşumu ve farklı stres koşullarında yaşamın devamlılığını sağlamak gibi önemli fizyolojik roller de üstlenir (Kornberg ve ark., 1999).

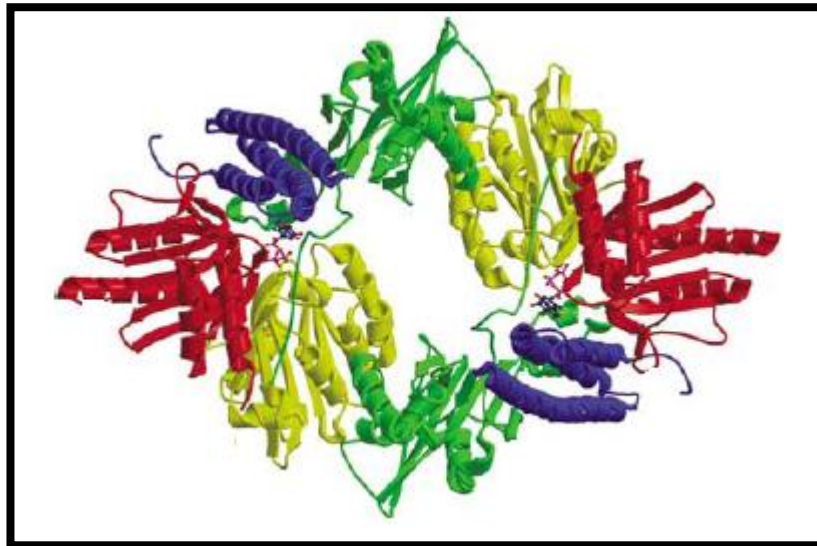
Polifosfat metabolizmasında görevli dört temel enzim bulunmaktadır: Ekzopolifosfataz (PPX), polifosfat kinaz 1 (PPK1), endopolifosfataz (PPN) ve polifosfat:AMP fosfotransferaz (PAP). Bunların yanında PPK1 homologu olan polifosfat kinaz 2 (PPK2) (Brown ve Kornberg, 2008) ve polifosfat kinaz 3 (PPK3) de bu metabolizmada görev yapan enzimlerdendir (Nahalka ve Patoprsty, 2009).

1.1.1. Polifosfat Kinaz (PPK1; EC 2.7.4.1)

Polifosfat kinaz enzimi (PPK1) geri dönüşümlü biçimde ATP'nin terminal fosfatını polifosfat yapısına aktarmaktadır (Şekil 1.2). Kornberg ve arkadaşları tarafından 1956 yılında ilk kez *E. coli*'de bulunan bu enzim, homotetramer yapıda bir protein olup hücre zarına bağlıdır (Kornberg ve ark., 1956; Kornberg, 1957; Ahn ve Kornberg, 1990; Akiyama ve ark, 1992). *Propionibacterium shermanii*'den kısmen saflaştırılmış olan polifosfat kinazın 83 kDa moleküler ağırlığında monomerik bir enzim olduğu bulunmuştur (Robinson ve ark, 1987). PPK1'in kristal yapısı Şekil 1.3'de görülmektedir (Zhu ve ark., 2005). Çok fonksiyonlu bir enzim olan PPK, kofaktör olarak Mg^{+2} a ihtiyaç duymaktadır (Ahn ve Kornberg, 1990).



Şekil 1.2. Polifosfatkinaz tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyon (Zhu ve ark., 2005).



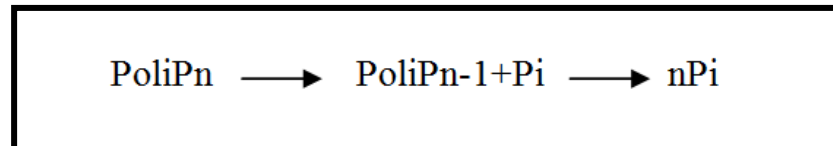
Şekil 1.3. *E. coli* polifosfat kinaz enziminin kristal yapısı (Zhu ve ark., 2005).

Bu enzim, geri dönüşümlü olarak poliP'dan ATP sentez reaksiyonunu katalizlediği gibi (Ahn ve Kornberg, 1990; Kuroda ve Kornberg, 1997) poliP'ı fosfat donörü olarak kullanarak GDP ve diğer nükleotid difosfatların nükleotid trifosfatlara dönüştürülmesinde de görev alır (Kuroda ve Kornberg, 1997). Polifosfat kinaz'ın substrat özgüllüğü, $ADP \succ GDP \succ UDP$, CDP şeklindedir.

Polifosfat metabolizmasında görev yapan bir diğer enzim de “Polifosfat kinaz 2” (PPK2)'dir. PPK1 homologu olan bu enzim, ATP bağımlı polifosfat sentezleme reaksiyonuna ek olarak polifosfat üzerinden GDP'nin GTP'ye dönüşümünü katalizlemektedir (Brown ve Kornberg, 2008). *ppk2*, 40.8 kDa moleküler ağırlığında 357 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır. PPK2, GTP ve ATP'yi poliP sentezinde eşit olarak kullanırken, PPK1 poliP sentezinde ATP'yi tercih etmektedir. Polifosfat kinazların her ikisi de durağan fazda yaşamsal öneme sahip olup hücre büyümesini düzenleyen deoksiribonükleozit trifosfatlar ile ribonükleozid trifosfatların hücre içi seviyesini düzenlemektedir (Ishige ve ark., 2002). PPK3 enzimi ise inorganik polifosfatı kullanarak CDP'nin CTP'ye dönüşümünü katalizlemektedir. Polifosfat kinaz 3'ün substrat özgüllüğü, $CDP \succ UDP \succ GDP \succ ADP$ şeklindedir (Nahalka ve Patoprsty, 2009).

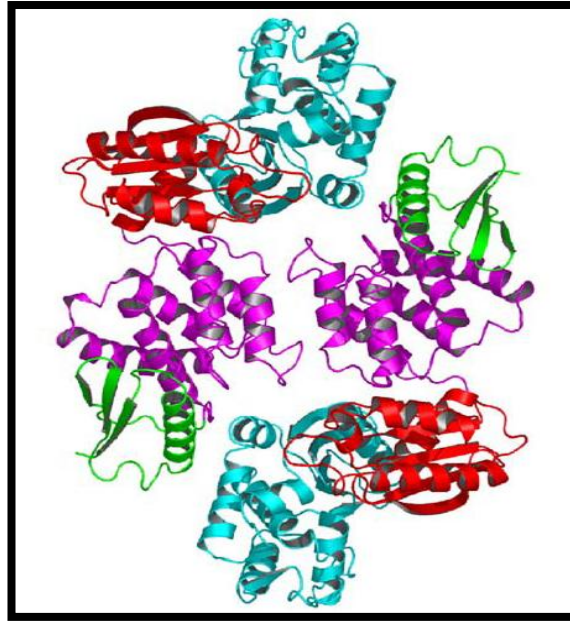
1.1.2. Ekzopolifosfataz (PPX; EC 3.6.1.11)

Polifosfat yıkımında görev alan enzimlerden biri olan ekzopolifosfataz (PPX) uzun polifosfat zincirinin uç kısmından P_i koparmaktadır (Şekil 1.4). *E. coli*'de, mayalarda, süngerlerde ve memelilerde PPX'in karakteristik özellikleri araştırılmıştır (Rangarajan ve ark., 2006).



Şekil 1.4. Ekzopolifosfataz tarafından katalizlenen reaksiyon (Brown ve Kornberg, 2008)

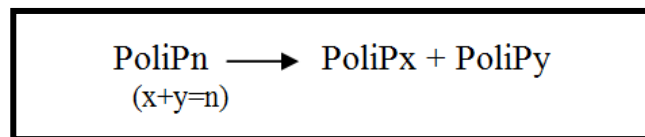
Ekzopolifosfataz enzimi, asetat ve karbonhidrat kinaz/Hsp70/aktin ailesinin bir üyesidir. *E. coli* PPX enzimi 513 aminoasit rezidüsünden meydana gelmektedir. 58 kDa büyüklüğündeki bu enzim, her biri üç domainden meydana gelmiş iki alt birimden oluşmuştur (Şekil 1.5). İlk iki domain hidrolizden sorumlu iken üçüncü domain polifosfata bağlanma bölgesidir. Bu enzim yüksek molekül ağırlıklı polifosfata daha fazla ilgi gösterir ve aktivitesi için katyonlara ihtiyaç duymaktadır (Rangarajan ve ark., 2006).



Şekil 1.5. Ekzopolifosfataz enziminin kristal yapısı (Rangarajan ve ark., 2006)

1.1.3. Endopolifosfataz (PPN; EC 3.6.1.10)

Endopolifosfataz, uzun zincirli polifosfat moleküllerini iç kısımlarından keserek daha kısa zincirli polifosfat moleküllerinin oluşumunu katalizler (Şekil 1.6).

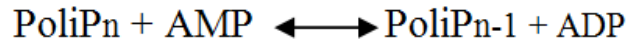


Şekil 1.6. Endopolifosfataz enziminin katalizlediği reaksiyon (Brown ve Kornberg, 2008).

PPN1 memeli hücrelerinde tanımlanmış ve ilk kez *Saccharomyces cerevisiae*'dan saflaştırılmıştır (Sethuraman ve ark., 2001). Mayadan saflaştırılan PPN1, vakuolar orijinli 35 kDa moleküler ağırlığında bir homotetramerdir ve *PHM5* geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, enzimin, 78 kDa moleküler ağırlığında bir öncü polipeptid (prePpn1) halinde sentezlendiğini ve daha sonra bir proteaz ile kesilerek 35 kDa moleküler ağırlığında aktif bir proteine dönüştürüldüğünü göstermiştir (Shi ve Kornberg 2005). Endopolifosfataz aktivitesi yalnızca ökaryotik hücrelerde gözlenmiştir (Sethuraman ve ark., 2001).

1.1.4. PoliP: AMP fosfotransferaz (PAP; EC. 2.7.4.3)

Moleküler ağırlığı 55 kDa olan bu enzim, polifosfattan aldığı fosfatı AMP'ye aktararak ADP oluşumunu katalizlemektedir (Şekil 1.7). İlk kez kısmi olarak *Acinetobacter johnsoii* 210A suşundan saflaştırılmıştır (Kulaev ve ark., 2004).



Şekil 1.7. PoliP:AMP fosfotransferazın katalizlediği reaksiyon (Brown ve Kornberg, 2008).

1.2. Polifosfat Polimerinin İşlevi

Hücresel polifosfatın birçok biyolojik fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Polifosfat öncelikle hücre içerisinde fosfat deposu ve enerji kaynağı olarak görev yapar. Özellikle fosfat kıtlığı durumlarında poliP vazgeçilmez tek fosfat kaynağını oluşturmaktadır. Bu polimer bazı protein kinazların da fosfat kaynağı olup enzimlerin fosforilasyonunda kullanılmaktadır. Polimerik fosfat molekülünün hücre içinde birikmesinin hücre içi ozmotik basınca etkisinin çok az olmasından ve hücrenin biyolojik işlevleri için gerekli olan ATP ve serbest Pi'nin hücre içi seviyesinin sabit kalmasına verdiği katkıdan dolayı, polifosfat, hücre içinde biriktirilebilecek uygun polimerlerden biridir (Kornberg, 1995).

Bu polimerin yapısında bulunan fosfoanhidrid bağları yüksek enerjiye sahiptir ve pH 5'te bir anhidrid bağının hidrolizi ile açığa çıkan serbest enerji miktarının 38 kJ olduğu bilinmektedir (Kortstee ve ark., 2000). Bu polimerden koparılan Pi'ların ATP üretiminde kullanılması, ekzopolifosfataz, endopolifosfataz, AMP fosfotransferaz hidrolitik enzimleri ve polifosfat kinazın geri reaksiyon aktivitesi ile mümkündür (Kuroda ve Kornberg, 1997).

Bu polimer aynı zamanda divalent kationları şelatlayabilen, transkripsiyonu düzenleyen ve DNA'nın hücreye girişini sağlayan önemli bir yapıdır (Crooke ve ark., 1993). PoliP'nin bir çok prokaryotta değişik kationlarla (Mg^{2+} , Ca^{2+} ve K^{+}) kompleks halinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu polimerin ağır metallerin depolanmasında ve metallere olan dirençliliğin artmasında da çok önemli roller oynadığı bilinmektedir (Keasling ve ark., 1998). Ağır metallerin detoksifikasyonunda, poliP ağır metallere bağlanarak bunları hücre içinde biriktirir, daha sonra ekzopolifosfataz enzimi devreye girerek ağır metallerin metal-fosfat kompleksleri halinde hücre dışına taşınmasında görev alır (Keasling, 1997; Keasling ve ark., 1996).

PoliP, mikroorganizmanın, çevresel şartlarda (besin miktarı, pH, sıcaklık vb.) meydana gelen değişikliklere karşı hücrenin adaptasyonunda görev almaktadır. Stres altında olan mikroorganizmalar hücre içinde çok miktarda poliP biriktirmektedirler. Örneğin, *E. coli*'de, besin kısıtlılığı (düşük fosfat ya da amino asit seviyesi) durumunda *relA* geni tarafından kodlanan (p)ppGpp sentetaz I (PSI) enzimi aracılığıyla sentezlenen alarmonlar [guanozin penta fosfat (pppGpp) ve guanozin tetra fosfat (ppGpp)] poliP'nin ekzopolifosfataz ile hidrolizini inhibe ederek poliP birikimini sağlamaktadır. Biriken bu polifosfatlar, Lon proteaz ile kompleks oluşturularak, serbest halde bulunan ribozomal alt ünitelerin parçalanmasına yol açar ve oluşan amino asitler kıtlık durumunda gerekli olan yeni proteinlerin sentezinde kullanılırlar (Kuroda ve ark., 1999, Kuroda ve ark., 2001, Kuroda, 2006).

Polifosfattan yoksun *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae* ve *Helicobacter pylori* mutantlarının virülanslarında ve çevresel streslere cevap oluşturmalarında kusurların olduğu

farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Lindner ve ark., 2009). PoliP, hücre zarı, bakteriyel virülans, yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumu için önemli bir role sahiptir (Kornberg ve ark., 1999).

Neisseria ile yapılmış bir çalışmada polifosfat kinaz enzimi olmayan mutantların patojenitelerinin normal hücrelerden oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, *ppk* geninden yoksun mutantlarda hücre zarının yapısına katılan poliP sentezlenmediğinden bakterinin konak canlıının savunma sistemine olan direncinin azaldığı ileri sürülmüştür (Tinsley ve ark., 1993).

Başka bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın *ppk1* geni silinmiş ve oluşturulan mutantların hareketlilik, korum sensing (quorum sensing), biyofilm oluşturma ve virülans özelliklerinde hasarlar meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bakterinin ekzopolimer oluşturma, β -laktam antibiyotiklerine karşı direnç ve kurumaya karşı dayanıklılık özelliklerini de yitirdiği gözlenmiştir (Harunur ve ark., 2000).

Yapılan birçok çalışmada, polifosfatın, enzim aktivitelerini düzenleyerek ve çok sayıda geni kontrol ederek bakterilerin aktif büyüme fazından durağan faza geçişinde olduğu kadar durağan fazda ve stres koşullarında yaşamlarını devam ettirebilmeleri açısından önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Kornberg ve ark., 1999). Örneğin, polifosfat'ın, *E. coli* hücrelerinde RNA polimeraz ile etkileşime girdiği bildirilen bir çalışmada, poliP'in, transkripsiyon üzerindeki etkisi, logaritmik büyüme evresi (σ^{70}) ve durağan evre (σ^{38}) sigma faktörlerinin bağlanabildiği iki RNA polimeraz formunu ayrı ayrı bulunduran iki farklı suşta incelenmiştir. Düşük tuz konsantrasyonunda, polifosfat, her iki enzimi de engelleyerek transkripsiyonu durdurmuştur. Yüksek tuz konsantrasyonunda ise polifosfat varlığında σ^{38} 'in bağlanabildiği RNA polimeraz aktif iken σ^{70} 'in bağlanabildiği RNA polimeraz aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre, durağan fazda ve yüksek ozmotik basınç altında polifosfatın, promotor seçimine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır (Kulaev ve Kulakovskaya, 2000).

E. coli ile yapılan başka bir çalışmada, polifosfatın, RNA polimerazın durağan faza spesifik sigma faktörünü (σ^s) kodlayan *rpoS*'nin ekspresyonunu

indüklediği gösterilmiştir (Miyake ve ark., 1999). Tsutsumi ve arkadaşları (2000), ekzopolifosfatazın yüksek miktarda üretildiği suşlarda polifosfat seviyesindeki azalmanın, *rpoS* geninin düşük miktarda ifade edilmesine sebep olduğunu göstermişlerdir. RpoS sigma faktörünün (σ^S) mikroorganizmanın stres koşullarına adaptasyonu ve durağan fazda canlılığını devam ettirebilmesinden sorumlu yaklaşık 50 genin ifade edilmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Hücre içi polifosfat konsantrasyonu düşük olan *ppk* mutant suşlarının stres koşullarına hassas olduğu ve bu hassasiyetin, bakterilerin *ppk* veya *rpoS* genleri ile komplementasyonu sayesinde giderildiği görülmüştür. Aynı şekilde yüksek seviyede maya ekzopolifosfataz enzimi (scPPX1) üreten *E. coli* suşunda H_2O_2 'e karşı hassasiyet gözlenmiştir. Ekstra *rpoS* geni aktarılan mutant suşun H_2O_2 hassasiyeti ortadan kalkmıştır (Shiba ve ark., 1999).

Polifosfatın, mikroorganizmaların sporlanmaları üzerine etkisini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde, *Bacillus cereus*'un *ppk1* ve *ppx* genleri delesyona uğratılmış ve elde edilen mutantların hareketlilik, biyofilm oluşturma ve sporulasyon etkinlikleri incelenmiştir. Mutantların hepsinde hareketlilik ve biyofilm oluşturma kapasitelerinde düşüş gözlenmiş, sadece *ppx* mutantlarında sporulasyon etkinliğinin azaldığı bulunmuştur (Shi ve ark., 2004). *Myxococcus xanthus*'la yapılan başka bir çalışmada da *ppk1* mutant suşların sporulasyonunda azalma ve sporların germinasyonunda gecikme gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2005).

1.3. *Bacillus*

Bacillus, 1835 yılında Christian Gottfried Ehrenberg tarafından bulunmuş, toprakta saprofit olarak yaşayan, aerob ya da fakültatif anaerob gram pozitif bakterilerdir. Genellikle hareketlidirler ve hücre içinde kolayca görülebilen endosporlar oluştururlar. Sporların kuru ağırlığının %15'i kalsiyum dipikolinattır. Yüksek hücre yoğunluğu ya da besin eksikliği sporlanmayı tetikler. *Bacillus* türlerinin önemli bir kısmı endüstriyel enzimlerin, biyokimyasalların, antibiyotiklerin ve insektisitlerin kaynağı olarak kullanılırlar.

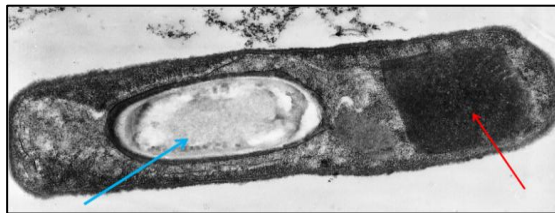
B. subtilis, bir model organizma olup moleküler ve hücre biyolojisi en iyi anlaşılmış prokaryotlardan bir tanesidir. *B. thuringiensis* ise önemli bir böcek patojeni olup biyolojik pestisit olarak kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2005).

1.3.1. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) aerobik, hareketli, çubuk şeklinde, gram ve katalaz pozitif, endospor oluşturan, fermentatif, mikroaerofilik ve anaerobik koşullarda üreme yeteneğine sahip bir mikroorganizmadır. Hücreler 1µm genişliğinde 5µm boyundadır. Taksonomik olarak *Bacillus cereus* ile yakından ilgilidir. Ancak *B. thuringiensis* serotipleri *Bacillus cereus*'tan farklı olarak spor oluşum aşamasında hücre içinde delta toksin veya parasporal kristalin varlığı ile karakterize edilmektedir (Schnepf ve ark., 1998). İlk olarak 1901 yılında Japonya'da ipek böceklerinden izole edilmiş olan Bt'nin ürettiği delta endotoksinler hücre içinde kristaller şeklinde birikir (Şekil 1.8).

1989 yılında Höfte ve Whiteley delta endotoksinleri 4 büyük sınıfa (Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV) ayırmışlardır. Daha sonra, endotoksinlerin ait olduğu her bir grup, kodlandıkları genlerin DNA sekanslarına göre alt sınıflara (A, B, C, ... ve a, b, c...) ayrılmışlardır. Delta endotoksinler “cry” genleri tarafından kodlanırlar.

Genel olarak, bu proteinler, lepidoptera (Cry I), hem lepidoptera hem diptera (Cry II), coleoptera (Cry III) ve diptera (Cry IV) grupları üzerinde etkilidir. Bakterinin sporulasyonuyla beraber pro-toksin olarak sentezlenen kristal proteinler, böcek larvalarının sindirim sisteminde aktif toksine dönüştürülerek mide çeperini oluşturan hücreleri tahrip eder (Agaisse ve Lereclus , 1995).



Şekil 1.8. *B. thuringiensis* endosporu (mavi ok ile gösterilmiştir) ve insektisidal kristal proteinleri (kırmızı ok ile gösterilmiştir).

1.5. Bti'da Cry Protein Üretimi ve Polifosfat Metabolizması Arasındaki İlişki

İnsektisidal proteinler durağan faz boyunca sentezlenirler ve sporlanmış hücre kuru ağırlığının % 25'ini oluştururlar. Fizyolojik değişimlere bağlı olarak sporulasyon ve endotoksin üretimi paraleldir (Agaisse ve Lereclus , 1995).

cry genleri çoğunlukla plazmidler üzerinde bulunurken bazıları kromozomal DNA üzerinde yer almaktadır. Bu genlerin ifadesi sporulasyonun 2. evresinde RNA pol- σ^E ile başlamakta ve ardından sporulasyonun geç evrelerinde RNA pol- σ^K ile devam ettirilmektedir (Aronson, 2002). Bu ikili sigma kontrol sistemi, hücre içinde protoksin miktarının artmasına sebep olmaktadır. Bunların yanında transkripsiyonları, geç vejetatif fazda RNA pol- σ^H tarafından başlatılan en az iki *cry* geni de bilinmektedir.

Cry proteinlerinin biyosentezi üzerinde çeşitli metallerin ve minerallerin etkileri olduğu bilinmektedir (Aronson, 2002). Bt ile yapılan bir çalışmada (İçgen ve ark., 2003), besiyeri içeriğine eklenen çeşitli konsantrasyonlardaki mineral elementlerin ve farklı başlangıç pH'larının kristal protein üretimi ve sporulasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda Mg^{+2} ve Cu^{+2} 'in toksin üretimini tetiklediği, Zn^{+2} ve Ca^{+2} 'un toksin üretimine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Genellikle sekonder metabolit üretiminin inorganik fosfat konsantrasyonunun 10 mM ve üzeri değerlerde inhibe olduğu bilinse de söz konusu çalışmada inorganik fosfat konsantrasyonunun ancak 150 mM ve üzeri değerleri toksin proteinlerinin üretimini azaltmıştır (İçgen ve ark., 2003).

İnorganik fosfatın Bti'in (*B. thuringiensis subsp. israelensis*) Cry4a proteini üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 10 mM, 50 mM ve 100 mM inorganik fosfat içeren besiyerlerinde büyütülen bakterilerin Cry proteini üretimleri kontrol grubu (inorganik fosfat içermeyen besiyerinde üretilen bakteri) bakterininkiyle karşılaştırıldığında, en fazla toksin üretiminin 100 mM inorganik fosfat varlığında gerçekleştiği bulunmuştur (Banerjee-Bhatnagar, 1999).

Kristal protein üretiminde inorganik fosfatın önemini vurgulayan başka bir çalışmada, Bt izolatının Cry3Aa üretimi, besiyerine 5-200 mmol.l⁻¹ aralığında inorganik fosfat eklenerek araştırılmıştır (Kurt ve ark., 2003). Besiyerinde 200 mmol.l⁻¹ inorganik fosfatın bulunması büyüme ve spor oluşumunda herhangi bir farklılığa sebep olmazken, Cry3Aa üretimini 5 kata kadar arttırmıştır.

Bilindiği gibi poliP, hücre içinde en önemli fosfat rezervuarlarından bir tanesidir. Literatürde, bilğimiz dahilinde *B. cereus* dışında diğer *Bacillus* türlerinin polifosfat mekanizmasıyla ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. 2004 yılında Shi ve arkadaşları tarafından yayınlanmış çalışmada, *B. cereus*'un polifosfat metabolizmasında görevli olan *ppk*, *ppx* ve *pap* genlerinden yoksun mutant suşları oluşturulmuş ve polifosfatın bu bakterinin hareketliliği, biyofilm oluşturması ve sporulasyonu için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir. Bilğimiz dahilinde, laboratuvarımızda yürüttüğümüz araştırmalar dışında bugüne kadar polifosfat ile endotoksin üretimi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.6. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) önemli bir kristal protein (endotoksin) üreticisidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, toksin üretiminde inorganik fosfatın önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, Bti'nin polifosfat metabolizmasında görevli *ppx* ve *ppk* genlerinin kromozomdan silinmesi ve elde edilecek olan mutant suşta endotoksin üretiminin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda polifosfat metabolizmasının kilit enzimlerini kodlayan bu genlerin endotoksin üretimine etkisi belirlenecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

NaHCO₃ (Merck), CaCl₂ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), K₂SO₄(Merck), Tris (Merck), Dodesilsülfat (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), L-arabinoz (Merck), EDTA (Merck), Maleik asit (Merck), Pepton (Merck), MgCl₂6H₂O (Merck), Agaroz (Sigma Aldrich), Etidyum bromid (Sigma Aldrich), L-prolin (Applichem), Agar (Merck), Brain Heart Infusion Broth (Merck), NaOH (Merck), Süktroz (Merck), KOH (Merck), %87 Gliserol (Riedel de Haen), D (+) Glukoz (Merck), KH₂PO₄(Merck), KCl (Riedel de Haen), PIPES (Fluka), NaCl (Sigma-Aldrich), PEG6000 (Applichem), Magnezyum sülfat heptahidrat (Fluka), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzamil alkol (Merck), 2-propanol (Merck), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Hidroklorik asit(Riedel de Haen), Metanol (Riedel de Haen), CTAB (Merck).

2.1.2. Kullanılan Enzimler

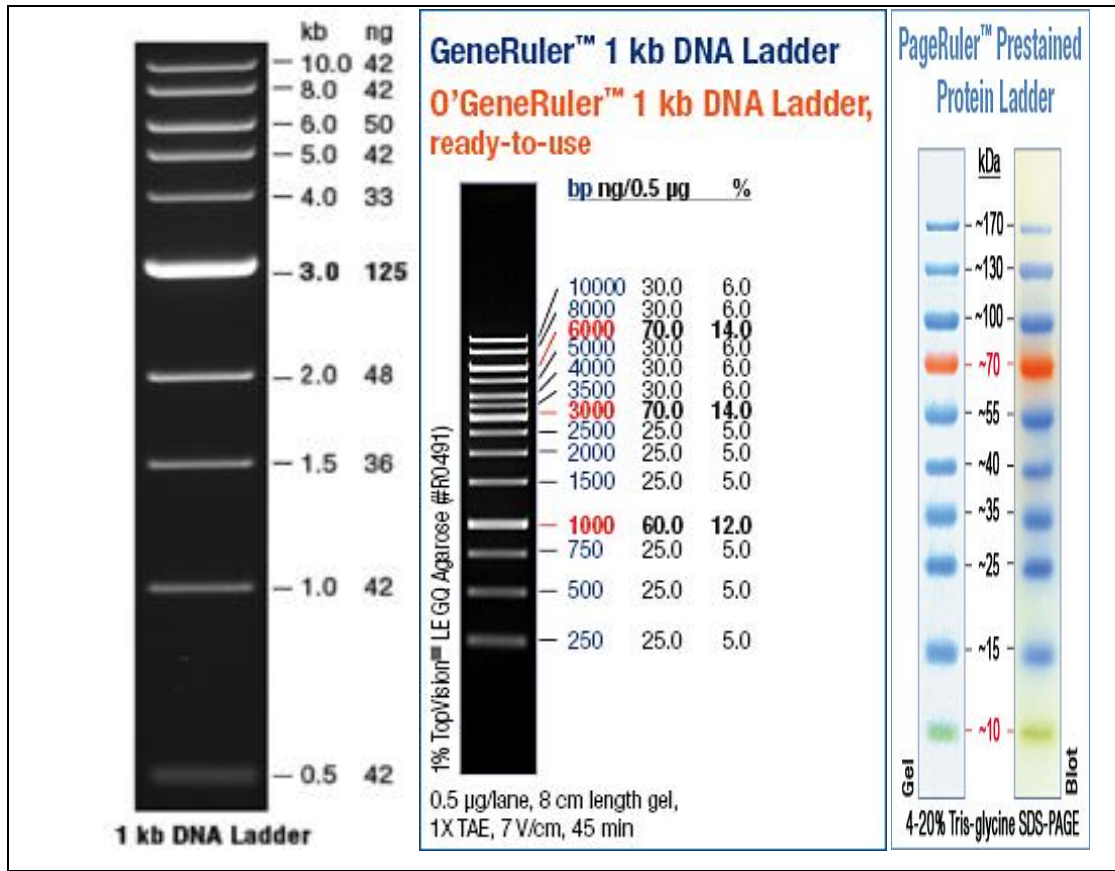
Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), *Taq* DNA polimeraz (Fermantas), *Pfx*® *Platinum* DNA Polimeraz (Invitrogen), *EcoRV* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XhoI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *NotI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *SpeI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *PstI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *MfeI* Restriksiyon Endonükleaz (Biolabs), *XbaI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *BamHI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), DNA ligaz (Jena Bioscience), Klenow Fragment (Calbiochem), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma).

Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarda gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri

Hem kimyasal yöntemle izole edilen plazmitlerin temizlenmesinde hem de DNA'nın jelden saflaştırılması işlemlerinde Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılmıştır. Ayrıca SDS-PAGE yönteminde kullanılan markör Şekil 2.1.C'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada Şekil 2.1'de gösterilen moleküler belirteçler kullanılmıştır.



A.

B.

C.

Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan belirteçler. A. 1kb DNA belirteci (Biolabs) B. 1 kb DNA belirteci (Fermentas, SM1334) C. Protein belirteci (Fermentas)

2.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları ve Plazmitler

Kullanılan bakteri soyları ve plazmitler sırasıyla Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

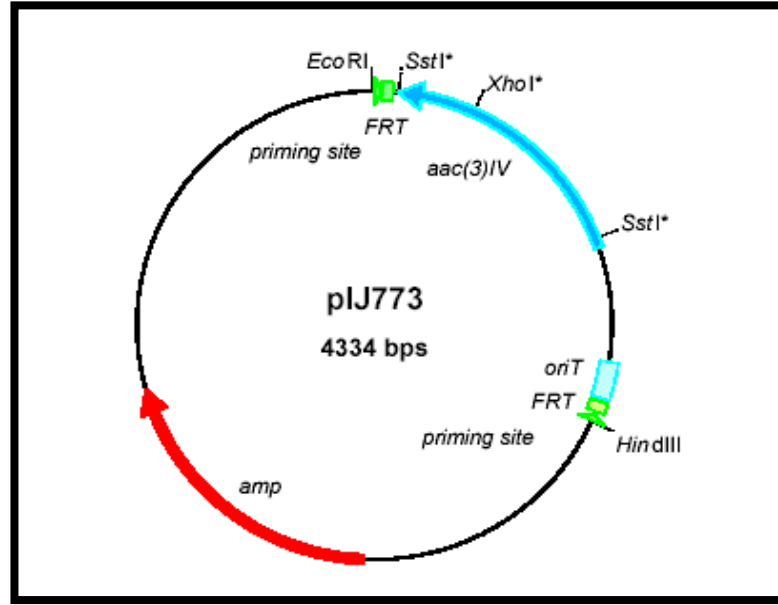
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan bakteri soyları

Bakteri türleri	Genotip	Kaynaklar
<i>E. coli</i> BW25113	<i>K12 derivative: ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i>	Datsenko ve Wanner, 2000
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	MacNeil ve ark., 1992
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Yaban tip	ATCC
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F⁺ recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), sup44, relA1λ, (σ80dLacZAM15), D(lacZYA-argF)U169</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet/ tra, neo, RP4</i>	Gust ve ark., 2002
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> <i>AppkΔppx</i> (BtiΔppx-ppk)	<i>ppk ppx</i> geninden yoksun suş	Bu çalışma

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan plazmidler

Plazmidler	Dirençlilik geni	Dirençlilik	oriT	Büyükölük	Kaynaklar
pIJ773	<i>aac(3)IV</i>	Apramisin	+	1382 bç	Gust ve ark., 2002
pIJ790	<i>cat, bla</i>	Kloramfenikol, Ampisilin	-	6084 bç	Gust ve ark., 2002
pUZ8002	<i>tra, neo, RP4</i>	Kanamisin	+	70 bç	Wang ve ark., 2001
pBluescript II SK (-)	<i>amp</i>	Ampisilin	-	3000 bç	Stratagene
pHT315	<i>erm</i>	Eritromisin	-	6500 bç	Arantes ve Lereclus.,1991
pSK6500	<i>amp, ppx, ppk</i>	Ampisilin	-	9525 bç	Doruk, 2012
ΔpSK6500	<i>amp, aac(3)IV</i>	Ampisilin, Apramisin	-	8845 bç	Bu çalışma
ΔpSK6500Ert	<i>amp, aac(3)IV, erm</i>	Ampisilin, Apramisin, Eritromisin	-	10043 bç	Bu çalışma

pIJ773 plazmiti (Şekil 2.2) üzerinde, iki FLP rekombinaz hedef bölgesinin (FRT) arasında yer alan apramisin direnç geni (*aac(3)IV*) ve RP4 plazmidinin *oriT* bölgesi bulunmaktadır.



Şekil 2.2. pIJ773 plazmiti

Lambda RED (*gam*, *bet*, *exo*) rekombinasyon plazmiti olan pIJ790 (Şekil 2.3), başka plazmit varlığında hücre içinde varlığını koruyabilmektedir. Lambda RED, hücre içine gönderilen doğrusal DNA'nın homolog bölgelerle rekombinasyonunda görev alır. pIJ790 üzerinde bulunan genler ve görevleri aşağıda listelenmiştir:

araC: arabinoz aktivatörünü kodlar.

bet: tek zincirli DNA'ya bağlanan proteini kodlar.

cat: kloramfenikol direnç geni.

exo: *bet* geni ile birlikte rekombinasyonu başlatan ekzonükleaz geni.

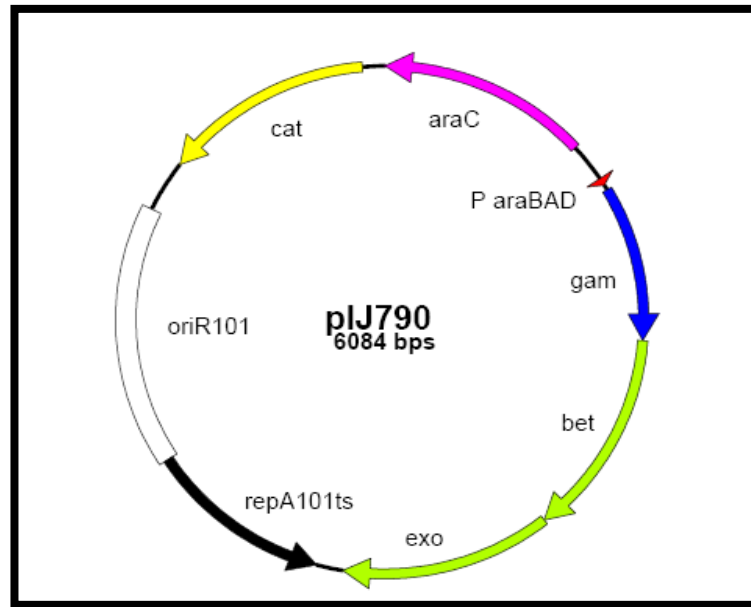
gam: konakçı ekzonükleaz V'i inhibe eden ürünü kodlar.

P araBAD: L-arabinoz ile indüklenebilen promotor.

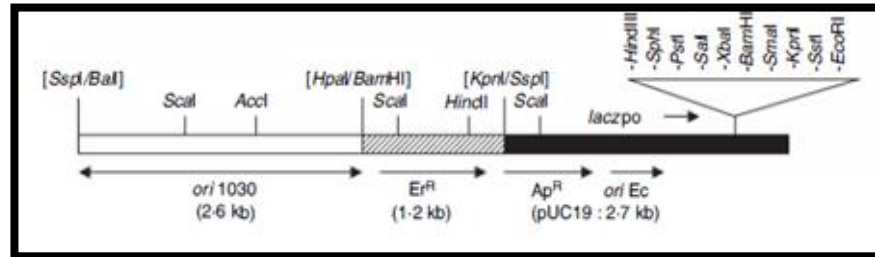
OriR 101: replikasyon orijini

repA 101ts: sıcaklık duyarlı replikasyon

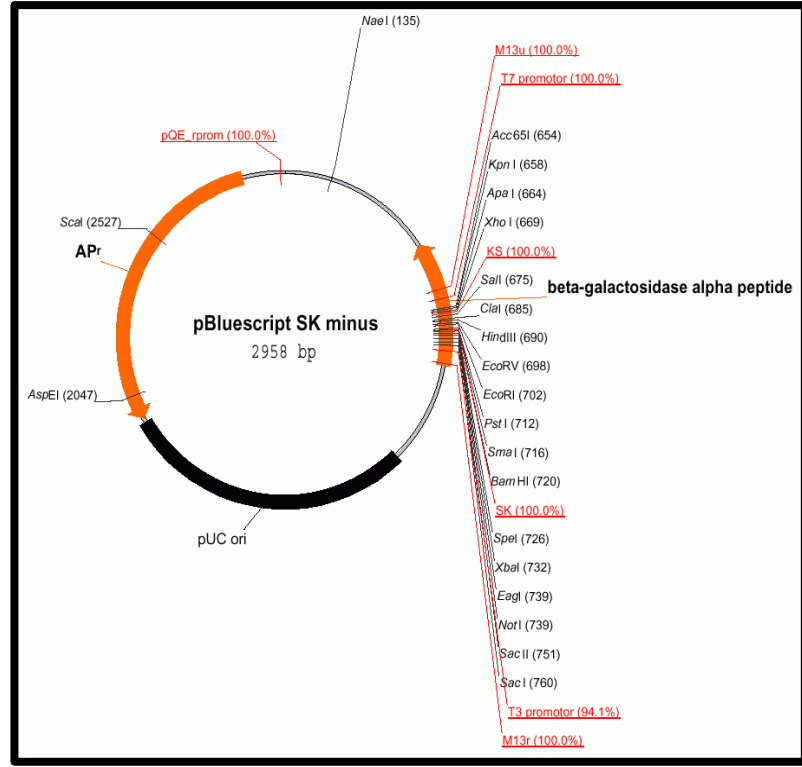
Bu çalışmada kullanılan diğer önemli plazmitler ise bir *E. coli/Bacillus* mekik vektörü olan pHT315 (Şekli 2.4) ve genel klonlama vektörü olarak kullanılan pBluescript SK (Şekil 2.5) plazmitleridir.



Şekil 2.3. λ Red rekombinasyon plazmidi pIJ790.



Şekil 2.4. pHT315 plazmidi



Şekil 2.5. pBluescript SK (-) plazmidi

2.1.7. Kullanılan çözeltiler

Tüm sterilizasyon işlemleri yüksek basınç altında 121 °C'ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X)

- 242 g Tris Baz
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

Tris-EDTA (TE) Tamponu

- 10 mM Tris-HCl (pH 8)
- 1mM EDTA (pH 8)

Solüsyon I

- 25mM Tris (pH 8)
- 10 mM EDTA (pH 8)
- 50 mM Glukoz

Solüsyon II

- 0.2 N NaOH
- % 1 SDS

Solüsyon III

- % 60 5M Potasyum asetat
- % 11.5 Glasiyal asetik asit

CaCl₂ Solüsyonu

- 60 mM CaCl₂
- % 15 Gliserol
- 10 mM PIPES

CTAB/NaCl Solüsyonu

- % 10 CTAB
- 0.7 M NaCl

TfbI

- 30 mM KOAc
- 50 mM MnCl₂
- 100 mM KCl
- 10 mM CaCl₂
- 15% (w\ v) gliserol

Tfb II

- 10 mM Na-MOPS, pH 7.0
- 75 mM CaCl₂
- 10 mM KCl
- 15% gliserol

EB

- 0.65 M sükroz
- 1 mM MgCl₂

20x SSC (pH 7)

- 3 M NaCl
- 0.3 M Sodyum sitrat

Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)

- 0.1M Maleik asit,
- 5 M NaCl

Depürinizasyon Solüsyonu

- 0.25 M HCl

Denötralizasyon Solüsyonu

- 1.5 M NaCl
- 0.5 M NaOH

Nötralizasyon Solüsyonu

- 1.5 M NaCl
- 0.05 M Tris-HCl pH 7.2
- 1 mM EDTA

Pre-Hibridizasyon Solüsyonu

- 5X SSC
- % 1 Bloklama solüsyonu
- % 0.1 Sarkosil
- % 0.02 SDS

Hibridizasyon Solüsyonu

- Prehibridizasyon solüsyonu + prop

Yıkama Tamponu I

- 2XSSC
- % 0.1 SDS

Yıkama Tamponu II

- % 0.1 SSC
- % 0.1 SDS

Belirleme (detection) Tamponu (pH 9.5)

- 0.1 M Tris-HCl
- 0.1 M NaCl

Yıkama Tamponu

- 30 ml Maleik asit Tampon
- 90 µl Tween 20

Bloklama Solüsyonu

- 0.5 g bloklama solüsyonu/ 50 ml maleik asit tamponu

Antikor Solüsyonu

- Bloklama solüsyonu kullanılarak 5000 defa seyreltilen Anti-Digoksigenin-AP

Renk Oluşturan Substrat

- Deteksiyon tamponu içinde seyreltilen NBT/BCIP solüsyonu

Commassie Blue

- % 50 Metanol
- % 0.05 Commassie
- % 10 Asetik asit
- % 40 distile su

Destaining Solüsyonu

- % 50 Metanol
- % 10 Asetik asit
- % 40 distile su

Reagent A

- 1 gr BCA
- 2 gr Sodyum karbonat
- 0.16 gr Sodyum tartarat
- 0.95 gr Sodyum bikarbonat
- 0.4 gr Sodyum hidroksit

pH 11.25, 100 ml'e dH₂O ile tamamlanır.

Reagent B

- 0.4 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

10 ml dH_2O ile tamamlanır.

(% 12) SDS jel yapımı;**1- Yükleme jeli (4 ml) için**

- 1.28 ml distile su
- 1.6 ml %30 Akrilamid
- 1.04 ml 1.5 M Tris
- 40 μl %10 SDS
- 40 μl %10 Amonyum per sülfat
- 5 μl TEMED

2- Ayırma jeli (1.5 ml) için

- 1.28 ml distile su
- 1.6 ml %30 Akrilamid
- 1.04 ml 1.5 M Tris
- 40 μl %10 SDS
- 40 μl %10 Amonyum per sülfat
- 5 μl TEMED

1X Running Buffer

- 28.8 gr Glisin
- 6.04 gr Tris
- 2 gr SDS
- 1.8 L dH₂O

4XSDS Yükleme Tamponu

- 1ml 0.5 M Tris.HCl, pH6.8
- 4ml distile su
- 1.6 ml %10 SDS
- 0.8 ml Gliserol
- 0.4 ml BME
- 0.2 ml BFB

2.1.8. Kullanılan Besiyerleri**Luria Bertani Besiyeri (LB)**

- 10 g NaCl
- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika steril edilir (Gust ve ark., 2002).

SOB Besiyeri

- 20 g Pepton
- 5 g Maya özütü
- 0.5 g NaCl
- 10 ml 250mM KCl

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır. 5N NaOH ile pH 7.0'e ayarlanır.

Otoklavlandıktan sonra 2M MgCl₂'den 5 ml eklenir (Sambrook ve ark., 1989).

BHI (Brain Heart Infusion) Besiyeri (Macaluso ve Mettus, 1991).

- 37 g BHI

dH₂O ile 1 lt'e tamamlanır ve 121 °C'de 20 dakika steril edilir.

BHIG Besiyeri

- Brain Heart Infusion besiyeri hazırlanır, üzerine % 0.5 Gliserol eklenir.

DSM Besiyeri

- 10 ml %50 glukoz
- 1 ml CaNO₃.4H₂O
- 1 ml MgSO₄.7H₂O
- 1 ml FeSO₄.7H₂O
- 1 ml MnCl₂.2H₂O
- 4 gr Nutrient broth
- 4.35 gr K₂HPO₄
- 3.40 gr KH₂PO₄

dH₂O ile 1 lt'e tamamlanır ve 121°C'de 20 dakika steril edilir.

2.1.9. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E. coli</i>’de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)	<i>Bacillus</i>’ta kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)
Apramisin (Apr)	50	50	50
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Kloramfenikol ¹ (Chl)	50	50	-
Kanamisin (Kn)	50	25	-
Eritromisin ¹ (Ert)	25	300	25

¹Çözücü: %100 Etanol

2.1.10. Kullanılan Cihazlar

4°C Buzdolabı (Ariston), -20°C derin dondurucu (Ariston), -80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektrophorez Sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 22R), Otoklav (Hırayama, Hıclave HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (Binder, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Spektrofotometre (BIO-RAD), PCR (Applied Biosystems), Blotlama sistemi (Amersham), Hibridizasyon fırını (Amersham).

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

E. coli'den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile yapılmıştır. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB'de 37 °C'ta 12-16 saat üretilmiş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pelet üzerine 200 µl solüsyon I (TEG) eklenmiş, vortekslenmiş ve ependorf tüpüne alınmıştır. 5 dk sonunda üzerine 400 µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dk'da bir karıştırılarak 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 5 dk buzda bekletildikten sonra 300 µl Solüsyon III eklenip, her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka bir tüpe alınarak, üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenip, karıştırılmıştır. En az 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 11.000 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, pelet dH₂O'da çözülmüştür. Solüsyon üzerine 7-10 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra 1 saat 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, Jel Bant Pürifikasyon Kitinden (GE healthcare) geçirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.2. *B. thuringiensis subsp. israelensis*'den Kromozomal DNA İzolasyonu

Bti genomik DNA'sı Ausubel ve arkadaşları'nın (2003) yöntemine göre izole edilmiştir. 100 ml LB'ye ekilen hücreler 1 gece boyunca üretilmiş, ertesi gün 50 ml'lik santrifüj tüpünde +4 °C'ta 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve pelet 1.7 ml lizozim (2 mg/ml) içeren TE tamponunda çözülmüştür. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl (10 mg/ml) RNaz eklendikten sonra, 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 300 µl 5 M NaCl ve 240 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (CIA, 23:1) solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında 11.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz fenol:CIA (24:23:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 0.6 hacim izopropanol

eklenerek 14.000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Pelet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve H₂O'da çözülmüştür.

2.2.3. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

İzole edilen plazmit ve kromozomal DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, üretici firmalarının önerdiği tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmit kesimleri yaklaşık 2-5 saat süre ile kesilirken, kromozomal DNA'ların kesimleri gece boyunca devam etmiştir.

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Nükleik asitlerin, elektroforez yöntemi ile agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmaları sağlanmıştır. %0.8 veya %1'lik agaroz jeli, 1xTAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr ilave edilmiştir. DNA yükleme boyası ilave edilen örnekler, agaroz jele yüklenerek, içinde yürütme tamponu olarak 1xTAE bulunan elektroforez tankında 80-120 Volt'ta yürütülmüşlerdir.

2.2.5. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri elde edilmesi, Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapılmıştır.

2.2.6. Mutasyon Kasetinin PCR ile Hazırlanması

ppx geninin blokasyonu için PCR temelli bir yöntem kullanılmıştır (Gust ve ark., 2003). Bu yöntemde, seçilen bir antibiyotik direnç geni Bti *ppx* geninin yerini almaktadır. Bu çalışmada, apramisin direnç geni belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak üzere, apramisin direnç geni (*aac*(3)IV) ve konjugasyon sırasında plazmitin mobilizasyonunu sağlayan *oriT* bölgesinin bulunduğu kaset, pIJ773 plazmidinin *EcoRI* ve *HindIII*

restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesiyle elde edilmiştir. 1382 bp uzunluğundaki bu kaset jelden izole edilerek PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır.

Ekzopolifosfataz enzimini kodlayan *ppx* geninin delesyonu için HPLC ile saflaştırılmış uzun (59 ve 58 bp) primerler (Tablo 2.4) kullanılmıştır. Primerlerin 39 nükleotidlik kısmı, Bti genom dizisine birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. İleri primerin (forward) 39 bazlık kısmı *ppx* geninin ön kısmındaki bölgeye uyumlu olup ATG başlangıç kodonuyla bitirilmiş 3' kısmı (20 bp'lik) ise apramisin genini taşıyan kasetin 5' ucuyla uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir. Yine aynı şekilde geri primerin (reverse) 39 bazlık 5' kısmı *ppx* geninin alt kısmındaki bölgeyle uyumlu olacak şekilde ve CTA bitiş kodonuyla bitirilmiştir. İleri primerin 3' kısmı (19 bp'lik) ise mutasyon kasetinin 3' ucuna uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir.

Tablo 2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler. Apramisin kasetiyle uyumlu diziler kalın harflerle, *ppx* geninin başlangıç kodonunun önündeki ve bitiş kodonunun arkasındaki diziler ise ince harflerle gösterilmiştir.

İleri primer	5' ACA AAA AAC AAC TAT TTT GTA TAA TAG TAA TAG AAT ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC 3'
Geri primer	5' CAA AGT GTA AAT TTT TCG AGA CAT CCG TAC GAC CTA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3'

Kalıp olarak pIJ773'ten elde edilen içinde apramisin direnç geni bulunan kaset ve uzun primerler kullanılarak *Pfx* DNA polimeraz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. 100 µl'lik PCR reaksiyonu, 1 X *Pfx* Amplifikasyon tamponunda, 1 mM MgSO₄, 10 mM dNTP karışımı, ileri ve geri primerlerin her birinden 50 pmol, 80 ng kalıp DNA ve 2.5 U *Pfx* DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir. Toplam 35 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü,

- denatürasyon 94 °C'ta 2 dk,
- primer bağlanması 54 °C'ta 45 sn ve
- polimerizasyon 68 °C'ta 90 sn olacak şekilde kurulmuştur.

Reaksiyon, 94 °C'ta 2 dakikalık bir denatürasyon işlemi ile başlamış ve 68 °C'ta 5 dk'lık ek bir polimerizasyon aşaması ile tamamlanmıştır.

2.2.7. *E. coli* kompetan hücrelerinin hazırlanması ve transformasyonu

E. coli BW25113/pIJ790 [pIJ790 plazmiti kloramfenikol dirençlilik geni (*cat*) taşımaktadır] kompetan hücreleri CaCl₂ yöntemiyle hazırlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Hücreler, kloramfenikol içeren 10 ml LB besiyerine ekilerek 30 °C'ta gece boyunca üretilmiştir. Kloramfenikol içeren 100 ml LB besiyerine bu ön kültürden 1/100 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda absorbans değeri 0.4-0.6'ya ulaşana kadar 30 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. 2 santrifüj tüpüne eşit bir şekilde bölünen kültür, 5 dk buzda bekletildikten sonra 4 °C'ta 3000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Peletler 10'ar ml soğuk 60 mM CaCl₂ solüsyonunda çözülmüş ve ardından 4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 defa tekrar edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra peletler 1 ml soğuk 60 mM CaCl₂ solüsyonunda çözülmüş ve soğuk ependorf tüplere dağıtılmıştır. Hücreler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'ye kaldırılmışlardır.

Yapılan denemelerde üstte anlatılan yöntemin verimliliği düşük bulunmuş bu yüzden, *E. coli* DH5 α , *E. coli* ET12567 ve *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerinden farklı bir yöntemle (Sanders Lab Protocols, 2011) kompetan hücre hazırlanmıştır: Hücreler gece boyunca katı besiyerinde üretilmişlerdir. *E. coli* DH5 α antibiyotiksiz LB'de üretilirken, *E. coli* ET12567 hücreleri Chl (25 μ g/ml) içeren LB besiyerinde, *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri ise Kn (50 μ g/ml) ve Chl (25 μ g/ml) içeren LB katı besiyerinde üretilmişlerdir. Ertesi gün, üreyen hücrelerden bir koloni seçilip 5 ml antibiyotiksiz/antibiyotikli LB besiyerine ekim yapılmıştır. Hücreler, 300 rpm'de 37 °C'de 2 saat inkübe edilmişlerdir. 2 saat

sonrasında hücreler 100 ml antibiyotiksiz/antibiyotikli LB besiyerine aktarılmış, 200 rpm'de 37 °C'de O.D₅₅₀ 0.4 olana kadar çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmışlardır. Üreyen hücreler 50 ml'lik falkona aktarılıp 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak hücre peleti 40 ml soğuk TfbI solüsyonunda çözülmüş ve 10 dk buzda bekletilmiştir. Karışım 3000 rpm'de 8 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp hücre peleti soğuk TfbII solüsyonunda çözülerek soğuk ependorf tüplerine 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'ye kaldırılmışlardır.

Plazmitler kompetan hücrelere rutin kimyasal transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). DNA'lar 50-80 ng arasında olacak şekilde kompetan hücrelerle birleştirilerek, karışım 30 dk buzda bekletilmiştir. Karışım, 42 °C'ta 45 sn ısı şokuna maruz bırakılmış ve ardından 2 dk buzda bekletilmiştir. Steril koşullarda üzerine 800 µl LB eklenen hücreler, 30-37 °C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler, seçici LB katı besiyerlerine ekilerek 30/37 °C'ta gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.8. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonlarında bulunması gereken vektör ve insört DNA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{ng (insört)} = (\text{ng (vektör)} \times \text{insört bç}) / (\text{vektör bç})$$

Genel olarak reaksiyonlarda vektör:insört oranı, 1:3, 1:5, 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ligasyon için hazırlanan karışım, 16 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

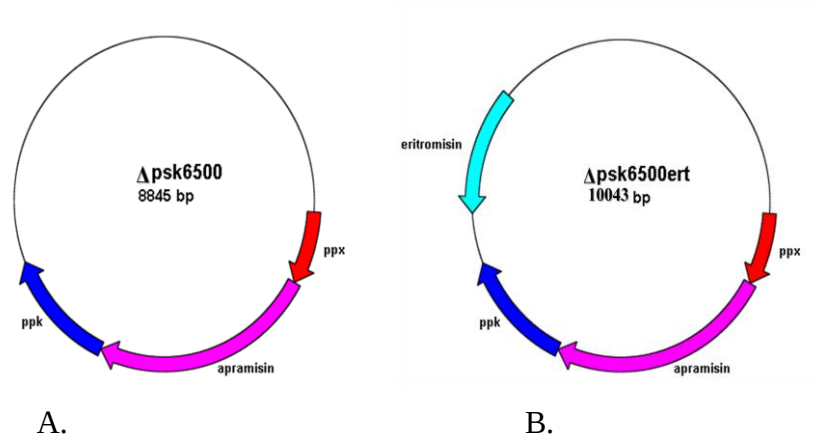
2.2.9. Klasik Kaset Mutasyonu

E. coli BW25113/pIJ790 hücreleri içerisinde, PCR ile hazırlanan mutasyon kaseti ile pSK6500 plazmidi (hem *ppx* hem de *ppk* genlerini bulunduran plazmit) arasında gerçekleşmesi gereken rekombinasyon işleminin bir çok farklı denemeden sonra başarılı sonuç vermemesi sebebiyle *ppx* geni içermeyen mutant plazmit elde edilememiştir. Bunun üzerine mutant plazmidin klasik kaset mutasyonu yöntemiyle hazırlanması amaçlanmıştır.

Restriksiyon enzim kesim haritası incelenen pSK6500 plazmidinde sadece *ppx* genini çıkarmaya yönelik uygun enzimler bulunamamıştır. Bu yüzden pSK6500 plazmidi üzerinde bulunan *ppk* (2118 bç) ve *ppx* (1575 bç) genlerinin büyük bir bölümünü çıkarabilen *MfeI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır. *ppk* ve *ppx* genlerinin bir bölümünün çıkarıldığı plazmit jelden saflaştırılmış ve her iki uçta bulunan *MfeI* kesim bölgeleri Klenow enzimiyle doldurulmuştur. pSK6500 plazmidinden çıkarılan *ppk* (1156 bç) ve *ppx* (917 bç) genlerinin bir bölümüne ait DNA fragmanı yerine, pIJ773 plazmidinden *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle çıkarılıp yapışkan uçları Klenow enzimiyle doldurulan Apramisin direnç geni klonlanmıştır. Bu çalışmada oluşturulan yeni plazmide ΔpSK6500 adı verilmiştir (Şekil 2.6.A).

Mutant plazmit (ΔpSK6500) ile Bti kromozomu arasında gerçekleşecek olan çift rekombinasyon olayı sonucu oluşan mutant hücreleri, tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutantlardan ayırtetmek amacıyla ΔpSK6500'ün *NotI-SpeI* kesim bölgelerine eritromisin direnç geni klonlanmıştır (Şekil 2.6.B).

Eritromisin direnç geni, *NotI* kesim bölgesi yerleştirilen ileri primer ve *SpeI* kesim bölgesi yerleştirilen geri primer kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ile elde edilen DNA fragmanı *NotI-SpeI* enzimleri ile kesilerek aynı enzimlerle kesilmiş ΔpSK6500'e klonlanmıştır. Bu çalışmada eritromisin direnç geni klonlanmış ΔpSK6500 plazmidine ΔpSK6500Ert adı verilmiştir.



Şekil 2.6. (A). $\Delta psk6500$ plazmiti ; (B). $\Delta psk6500ert$ plazmiti

Enzim kesimlerinden sonra gerektiğinde yapışkan uçlar Klenow enzimiyle doldurulmuştur. DNA'nın yapışkan ucunun 5' çıkıntısını dNTP'ler ile dolduran Klenow enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyon, son hacim 15 μ l olacak şekilde, 1.5 μ l ligasyon tamponu, 0.5 μ l Klenow enzimi, 2.25 μ l 2 mM dNTP ve 10.75 μ l DNA ile gerçekleştirilmiştir. Karışım, 37 °C'de 20 dk bekletilmiş ve ardından enzim 10 dk 75 °C'de inaktive edilmiştir.

2.2.10. Plazmidlerin Bti'a Konjugasyon ile aktarılması

ppx ve *ppk* genlerinin bir bölümünün yerine apramisin direnç geninin klonlandığı mutant plazmit, $\Delta psk6500ert$, *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyon ile aktarılmıştır. *E. coli* hücreleri, Ert (300 μ g/ml) Kn (50 μ g/ml), Chl (25 μ g/ml), Apr (50 μ g/ml) ve Amp (100 μ g/ml) içeren 10 ml LB besiyerinde, Bti hücreleri ise 10 ml LB besiyerinde 30°C'de 200 rpm'de gece boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. *E. coli* ve *Bacillus* gecelik kültürleri 1/10 oranında olacak şekilde 100 ml LB'ye (gerekli antibiyotikler aynı oranda eklenerek) ekilerek 30 °C'de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. $OD_{600} \cong 0.4$ olduğu zaman hücreler 50 ml'lik falkonlara alınarak 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri antibiyotiksiz LB'de yıkanarak tekrar 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. *E. coli* ET12567/pUZ8002 ve Bti hücreleri LB'de çözülerek, farklı oranlarda karıştırılıp LB agara ekilmişlerdir. 72. saatte peletlerden hücreler kazınarak 1 ml LB'de çözülmüş ve 80 °C'de 15 dk bekletilmiştir. Karışım Apr (25 μ g/ml) ve Ert (5 μ g/ml) içeren iki ayrı besiyerine ekilerek 30 °C'de inkübe

edilmiştir. Uygulanan sıcaklık işlemi sonucunda *E. coli* hücrelerinin çoğunluğu ölmüş ve sporlanmış olan Bti hücreleri arasından mutant hücreler taranmıştır. Tekrarlanan bir çok konjugasyon işlemi sonucunda ne çift rekombinasyon işleminin gerçekleşmiş olduğu hücreler (apramisine dirençli, eritromisine hassas) ne de tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği hücreler (hem apramisine hem de eritromisine dirençli) elde edilememiştir.

Bütün denemelere rağmen üstteki yöntem ile bir sonuç alınamayınca ikinci bir konjugasyon yöntemi kullanılmıştır (Janes ve ark., 2006). *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri, Ert (300 µg/ml) Kn (50 µg/ml), Chl (25 µg/ml), Apr (50 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml) içeren 50 ml LB besiyerinde, Bti hücreleri ise 50 ml LB besiyerinde 30 °C’de 200 rpm’de gece boyunca inkübe edilmiştir. *E. coli* ET12567/pUZ8002 ΔpSK6500Ert plazmit içeren hücrelerden 300-700 µl arasında ependorflara alınarak 14.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiş ve peletler antibiyotiksiz LB ile yıkanmıştır. Her bir ependorfa son hacim 1000 µl olacak şekilde Bti hücreleri eklenmiştir. Karışım, 14.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Hücre peletleri 200 µl LB içerisinde çözülerek BHI agara ekilmiş 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petrilere bakteriler kazınarak 300 µl LB’de çözülüş, 150 µl’si Ert (25 µg/ml) ve polymyxin B (500 µg/ml) BHI agara, 150 µl’si ise Apr (25 µg/ml) ve polymyxin B (500 µg/ml) BHI agara yayılmıştır. Bakteriler 48 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve çift ya da tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği hücreler taranmıştır.

2.2.11. ΔpSK6500Ert Plazmidinin Bti’ya Elektroporasyonla Aktarılması

ΔpSK6500Ert plazmitinin Bti hücrelerine aktarılması konjugasyonla gerçekleşemeyince elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. Elektrokompentan hücreler Macalusa ve Mettus (1991)’un yöntemine göre hazırlanmıştır: 10 ml BHIG besiyerine ekilen Bti hücreleri 30 °C’de 200 rpm’de gece boyunca üretilmiştir. Ertesi gün 95 ml BHIG besiyerine, 5 ml gece boyunca üretilen kültürden ekim yapılarak 30 °C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hücreler 50 ml’lik falkona alınarak 4000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Hücre peleti 20 ml soğuk

EB'de çözülmüş ve 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 2 ml soğuk EB içinde çözülerek, her bir ependorf tüpüne 300'er µl olacak şekilde dağıtılmış ve -80 °C'de saklanmıştır. 300 µl hücreyle 1 µg ΔpSK6500Ert karıştırılarak 0.2 cm'lik elektroporasyon küvetine konulmuştur. Elektroporatör 2.5 kV, 200 Ω, 25 µF şeklinde ayarlanmıştır. Küvet güvenli hazneye yerleştirilerek bir kez akım uygulanmıştır. Elektroporasyon sonrasında hücrelere 600 µl BHI besiyeri eklenmiş ve 37 °C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Bu periyod sonrasında hücreler Ert (25 µg/ml) içeren LB agar ve Apr (25 µg/ml) içeren LB agara yayılarak çift ya da tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği hücreler taranmıştır.

2.2.12. Southern Blot

Southern blot yöntemi Sambrook ve arkadaşları'na (1989) göre yapılmıştır. Öncelikle kromozomal DNA örnekleri *EcoRV* restriksiyon endonükleaz ile gece boyunca kesilerek, %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA fragmanlarının jelden membrana aktarımı blotlama sistemi (Amersham) ile sağlanmıştır. 2xSSC solüsyonu ile yıkanan membranın üzerinde bulunan agaroz jelden DNA'ların aktarımı 40-50 mbar ile vakum altında gerçekleşmiştir. Agaroz jelin yüzeyi, sırası ile 30'ar dk süreyle depürinizasyon solüsyonu, denötralizasyon solüsyonu, nötralizasyon solüsyonu ile kaplanmış ve son olarak 90 dk süreyle 20xSSC solüsyonu ile kaplanmıştır. Membrana transfer edilmiş DNA fragmanları UV ışığı ile (4 dk) membrana sabitlenmişlerdir. Membran 2xSSC ile yıkanarak adi filtre kağıdı arasında 4°C'ta saklanmıştır.

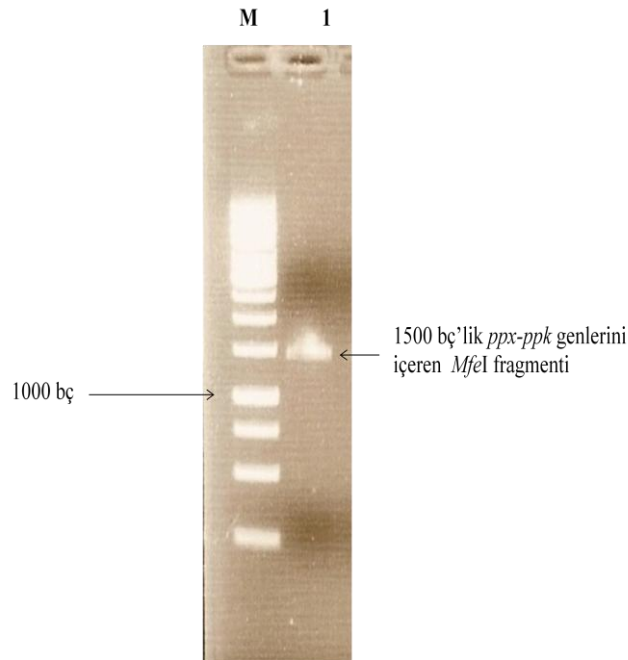
2.2.12.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

EcoRV ile kesilmiş kromozomal DNA örneklerini taşıyan membranlar prehibridizasyon solüsyonu içinde hibridizasyon fırınında 42 °C'ta 5 saat inkübe edilmiştir. Kromozomal DNA örneklerini taşıyan membranlardan biri *ppx-ppk* probu ile diğeri ise *apramisin* probu ile gece boyunca 42 °C'ta hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir. İçinde prop bulunan hibridizasyon solüsyonları daha sonraki kullanıma kadar -20 °C'ta saklanmışlardır. Hibridizasyondan sonra membran, yıkama tamponu I ile oda sıcaklığında 2 defa 15'er dk çalkalanarak ve yıkama tamponu II ile 42 °C'ta 2 defa 25'er dk çalkalanarak yıkanmıştır.

Yıkamalardan sonra membran, maleik asit yıkama tamponunda 5 dk durulanıp, 100 ml bloklama solüsyonunda 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk blotlama solüsyonuyla inkübasyonun ardından, en az 2 saat süreyle 20 ml antikor solüsyonunda inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 ml maleik asit yıkama tamponunda 2 defa 15'er dk yıkanan membran, 20 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Membran, taze hazırlanmış 10 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta bekletilmiştir. Renk reaksiyonu membranın dH₂O ile yıkanmasıyla durdurulmuştur.

2.2.12.2. Prop DNA'larının Hazırlanması

Prop olarak kullanılacak olan *ppx-ppk* geni, pSK6500 plazmidinin *MfeI* endonükleaz enzim kesimi ile elde edilmiştir. *ppx-ppk* genlerinin büyük bir kısmını içeren 1500 bç'lik DNA parçası agaroz jelden Jel Bant purifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 2.7).

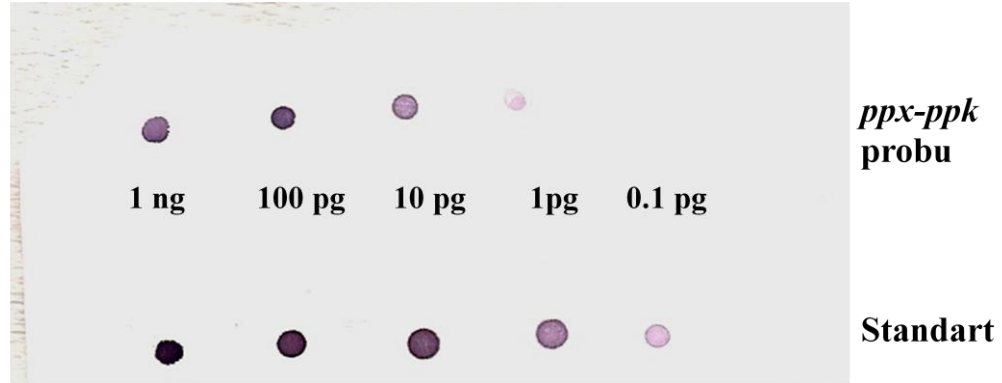


Şekil 2.7. Agaroz jelden saflaştırılan 1500 bç'lik *ppx-ppk* genini içeren *MfeI* DNA fragmenti. **M:** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); **Kuyu 1:** 1500 bç'lik *ppx-ppk* genlerini içeren *MfeI* DNA fragmenti.

Digoksisijenin (Roche) ile üreticilerin önerdiği şekilde işaretlenen *ppx-ppk* probunun seri dilüsyonları hazırlanarak (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg ve 0.1 pg) 1'er µl'si pozitif yüklü naylon membrana sırasıyla emdirilmiş ve UV ışığı altında membrana sabitlenmiştir. Membran, öncelikle 20 ml maleik asit tamponunda 15-25 °C'ta çalkalanarak 2 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, sırası ile 10 ml bloklama solüsyonunda ve 10 ml antikör solüsyonunda 30'ar dk bekletilmiştir. Membran, 10 ml yıkama tamponunda 2 kez 15'er dk yıkandıktan sonra, 10 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Bütün inkübasyonlar düşük rpm'de gerçekleştirilmiştir.

5 dk inkübasyondan sonra membran, taze hazırlanmış 2 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için membran 1 dk steril dH₂O ile yıkanmıştır.

Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında, prop olarak kullanılacak olan *ppx-ppk* genleri digoksisijenin ile başarılı bir şekilde işaretlenmiştir.



Şekil 2.8. *ppx-ppk* probunun kontrol DNA'sı (standart) ile karşılaştırılması.

2.2.13. Bti'dan Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE

Bti'dan protein izolasyonu Donovan'ın (1988) yöntemine göre yapılmıştır. Hücreler bir gün önceden LB'ye ekilip gece boyunca üremeye bırakılmıştır. Ertesi

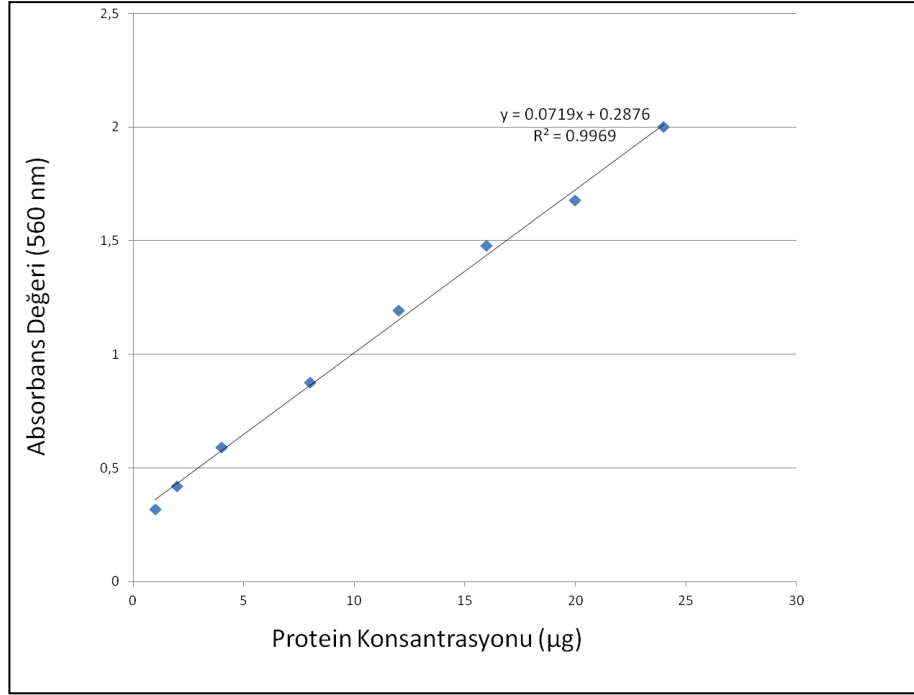
gün hücrelerin 600 nm’de optikal yoğunlukları ölçülerek 100 ml DSM besiyerine eşit hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 72 saat boyunca 30 °C’de 250 rpm’de üretilen hücreler çöktürölüp, pelet 500 µl 1 M NaCl ile bir kez , 500 µl deiyonize su ile iki kez yıkanmıştır.

Pelet ağırlığı tartılıp 100 mg/ml ıslak ağırlık olacak şekilde sulandırılmıştır. Bu karışımın 50 µl’si 50 µl lizozim içeren TE tamponuyla (100mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mg/ml lizozim pH 7.4) karıştırılmış ve 37 °C’ta 30 dk bekletilmiştir. Üzerine % 2 SDS’den 10 µl eklenip 30 sn vorteks yapıldıktan sonra 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 50 µl % 0.2 SDS’te çözölmüştür.

Bu örneğin 4 µl’si (400 µg ıslak hücre ağırlığına denk gelen miktar) 36 µl jel yükleme tamponu (0.13 M Tris pH 6.8, % 2 SDS, % 5 β-merkaptoetanol, % 0.05 bromofenol mavisi, % 10 gliserol) ile karıştırılmış ve 90 °C’ta 7 dk bekletilmiştir. Örneklerden 10’ar µl (100 µg ıslak hücre ağırlığına denk gelen miktar) alınıp jele yüklenmiştir.

Protein izolasyonundan sonra BCA yöntemiyle (Smith ve ark.,1985) protein miktarına bakılmıştır. Kontrol olarak BSA kullanılmış ve mikrolaka kuyucuklarına 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 µg koyularak standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 2.9). İzole edilen proteinlerden mikrolaka kuyucuklarına 1’er µl koyularak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Protein örneklerinin üzerlerine 5 ml solüsyon A ve 100 µl solüsyon B’den oluşan karışımdan 200 µl eklenerek 37 °C’ta 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 560 nm’de ölçölmüştür. Her bir örnekten 50 µg protein olacak şekilde SDS jellerine yükleme yapılmıştır. Yükleme yapılmadan önce 4XSDS yükleme boyası ve protein örneği karışımı 5 dk 90 °C’ta bekletilmiştir. Örnekler 80 Volt’ta yürütme tamponu içinde yürütölmüşlerdir.



Şekil 2.9. BSA ile oluşturulan standart eğri grafiği.

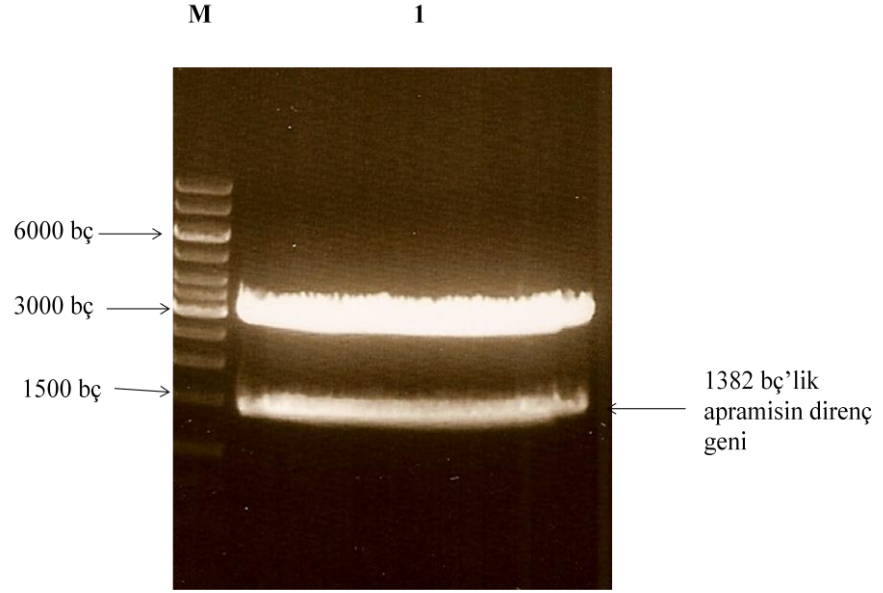
3. BULGULAR

3.1. Mutasyon Kasetinin PCR ile Hazırlanması

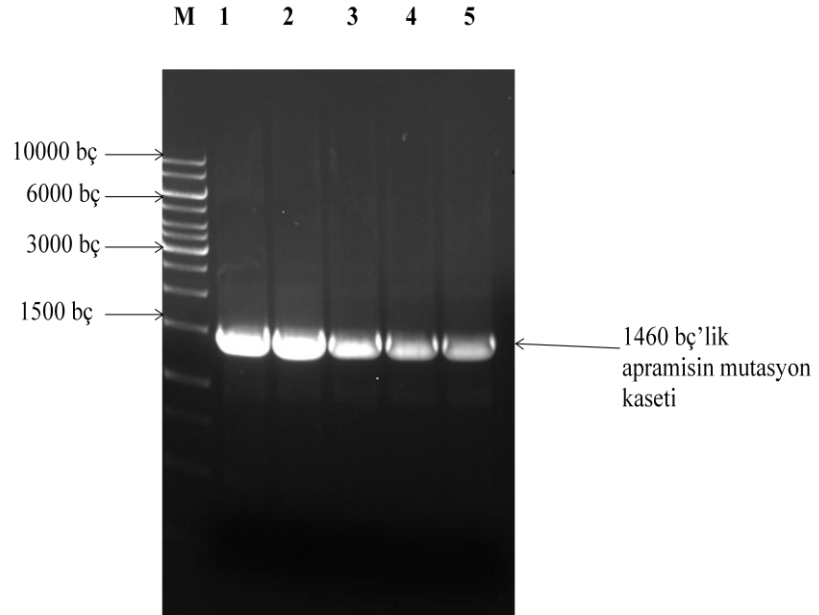
ppx geninin delesyonu için son yıllarda *Streptomyces*'de başarıyla uygulanan PCR temelli bir yöntem kullanılmıştır (Gust ve ark., 2003). Bu yöntemde, seçilen bir antibiyotik direnç geni Bti *ppx* geninin yerini almaktadır. Bu çalışmada, apramisin direnç geni belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. Apramisin direnç geni taşıyan pIJ773 plazmidi *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle kesilerek 2952 bp ve 1382 bp'lik DNA fragmanları elde edilmiştir (Şekil 3.1). Kesim sonrasında apramisin direnç genini bulunduran 1382 bp'lik DNA fragmanı jelden saflaştırılmıştır.

Apramisin direnç geninin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1460 bp'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 3.2). Mutasyon kasetini PCR ile çoğaltmak için bölüm 2.2.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan uzun primerler kullanılmıştır. Mutasyon kasetinde, apramisin geninin sağında ve solunda

sırasıyla, *ppx* geninin başlangıç kodonunun üst bölgesiyle ve *ppx* geninin sonlanma kodonunun alt bölgesiyle uyumlu diziler bulunmaktadır.



Şekil 3.1. 1382 bp'lik apramisin direnç geninin elde edilmesi. **M:** DNA belirteci; **Kuyu1:** pIJ773 plazmidinin *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle kesim sonucu.



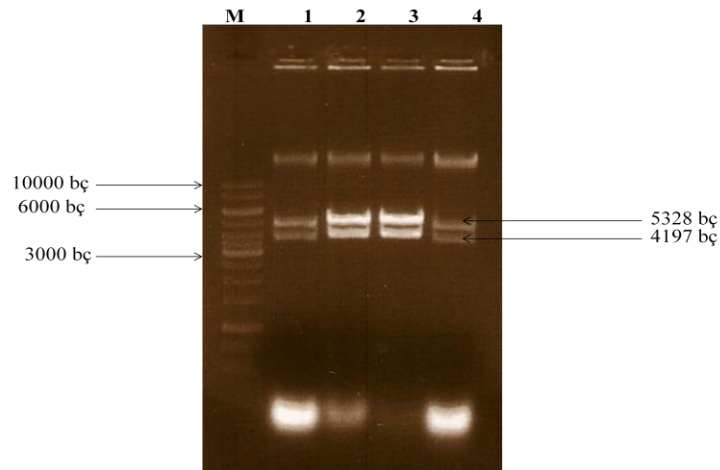
Şekil 3.2. PCR ile elde edilen mutasyon kaseti **M:** DNA belirteci; **Kuyu1-5:** 1460 bp'lik mutasyon kaseti

Mutasyon kaseti, pSK6500 plazmidinin de (*ppk* ve *ppx* genlerinin bulunduğu plazmid) içinde bulunduğu *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine transformasyonla aktarılmıştır. pIJ790 plazmidi sayesinde, pSK6500 üzerindeki *ppx* ile apramisin mutasyon kaseti arasında beklenen çift rekombinasyon olayının gerçekleştiği transformanlar taranmıştır.

Apramisin içeren LB agar üzerinde üreyen hücrelerden olası mutant plazmitler izole edilmiş ve doğrulamak için farklı enzimlerle kesilmiştir (Şekil 3.3). Olası mutant plazmidin Δ pSK6500 *Xba*I enzim kesiminden sonra beklenen DNA fragmanları Tablo 3.1’de verilmiştir. Bütün denemelere rağmen (verilerin hepsi gösterilmemiştir) mutant plazmit elde edilememiştir (Şekil 3.3).

Tablo 3.1. pSK6500 ve pSK6500 Δ *ppx* plazmidlerinin *Xba*I kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanları

pSK6500’ün <i>Xba</i> I kesimi	pSK6500 Δ <i>ppx</i> ’in <i>Xba</i> I kesimi
5328 bç	4197 bç
4197 bç	3456 bç
	1288 bç
	384 bç



Şekil 3.3. Transformanlar arasından doğru mutant plazmidi Δ pSK6500 taşıyan klonların taranması. **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1-4:** Olası mutant plazmidlerin *Xba* I kesim sonucu.

Bti *ppk* geninin delesyonu için laboratuvarımızda başarıyla uyguladığımız PCR bazlı bu yöntem (Gust ve ark., 2003), *ppx* geninin delesyonu için başarılı sonuç vermemiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında, PCR bazlı yöntem yerine, klasik kaset mutasyonu yöntemi kullanılmıştır. Aşağıda detaylı bir şekilde anlatılan bu yöntemde pSK6500 plazmidinde bulunan *ppx* ve *ppk* genlerinin bir kısmı enzim kesimi ile çıkartılıp yerine apramisin direnç geni klonlanmıştır.

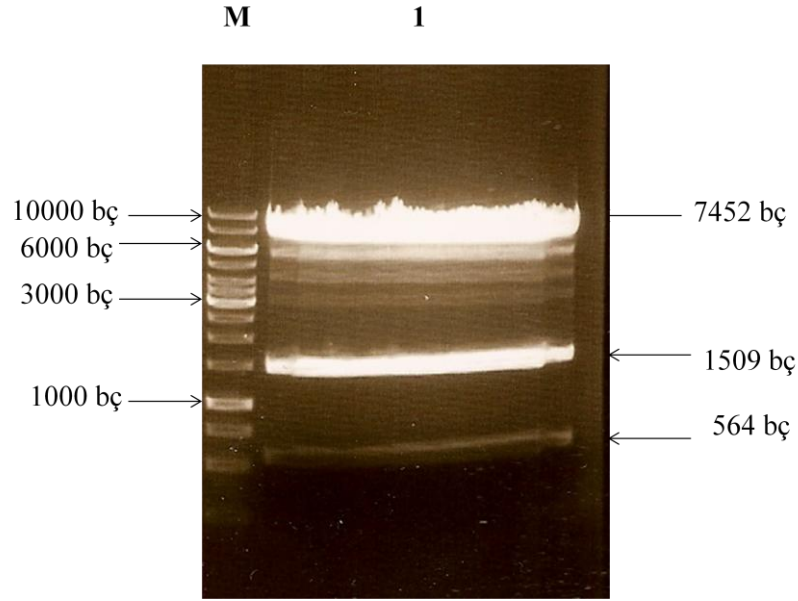
3.2. Klasik Kaset Mutasyonu

PCR bazlı yöntem ile bir çok farklı denemeden sonra *ppx* geninin yerine apramisin direnç geninin bulunduğu mutant plazmit elde edilememiştir. Bunun üzerine mutant plazmidin klasik kaset mutasyonu yöntemiyle hazırlanması amaçlanmıştır.

Restriksiyon enzim kesim haritası incelenen pSK6500 plazmidinde sadece *ppx* genini çıkarmaya yönelik uygun enzimler bulunamadığından *ppk* ve *ppx* genlerinin bir bölümünü çıkarabilen *MfeI* restriksiyon enzimi seçilmiştir. pSK6500 plazmidinin *MfeI* restriksiyon enzimiyle kesildikten sonra beklenen DNA fragmanlarının büyüklükleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Şekil 3.4’de görüldüğü gibi *MfeI* enzim kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanları elde edilmiştir.

Tablo 3.2. *MfeI* enzim kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanlarının büyüklükleri

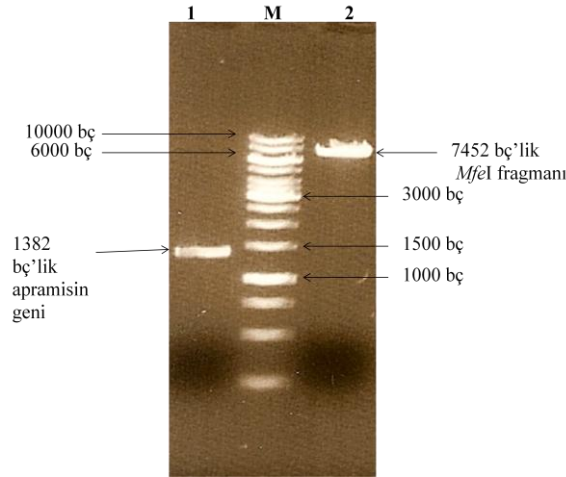
pSK6500’ün <i>MfeI</i> kesim sonucu
7452 bç
1509 bç
564 bç



Şekil 3.4. pSK6500 plazmidinin *MfeI* kesim sonucu

Plazmidin *ppx* ve *ppk* genlerinin büyük bir bölümünü içermeyen 7452 bç'lik fragmanı jelden kesilip izole edilmiş ve yapışkan uçlar Klenow enzimiyle doldurulmuştur (Şekil 3.5). pIJ773 plazmidinden *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle kesilerek (Şekil 3.1) jelden izole edilen apramisin direnç geninin yapışkan uçları Klenow enzimiyle küt uç haline çevrilmiştir (Şekil 3.5).

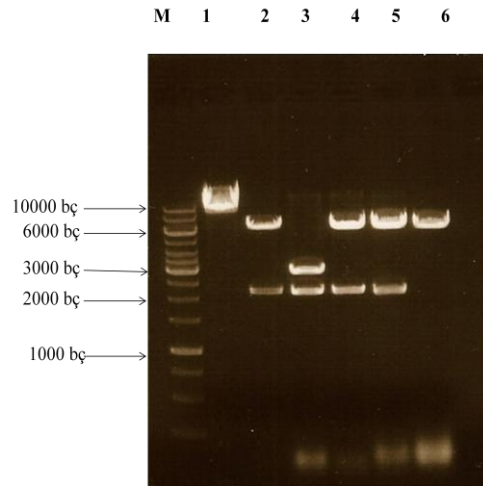
ppx ve *ppk* genlerinin bir bölümünü içermeyen plazmit (pSK6500'ün 7452 bç'lik *MfeI* fragmanı) ile apramisin direnç geni ligasyon ile birleştirilmiş ve yeni plazmide bu çalışmada Δ pSK6500 adı verilmiştir. Δ pSK6500 plazmidinin doğruluğu *PstI* enzim kesimiyle gösterilmiştir (Tablo 3.3; Şekil 3.6). Şekil 3.6'da 2-4-5. kuyularda Δ pSK6500 plazmidine ait bantların varlığı görülmektedir.



Şekil 3.5. Δ pSK6500 plazmidini oluşturacak DNA fragmanları **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1:** 1382 bç'lik klenow ile muamele edilmiş apramisin direnç geni; **Kuyu 2:** pSK6500'ün 7452 bç'lik klenow ile muamele edilmiş *MfeI* fragmanı.

Tablo 3.3. pSK6500 ve Δ pSK6500 plazmidlerinin *PstI* kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanları.

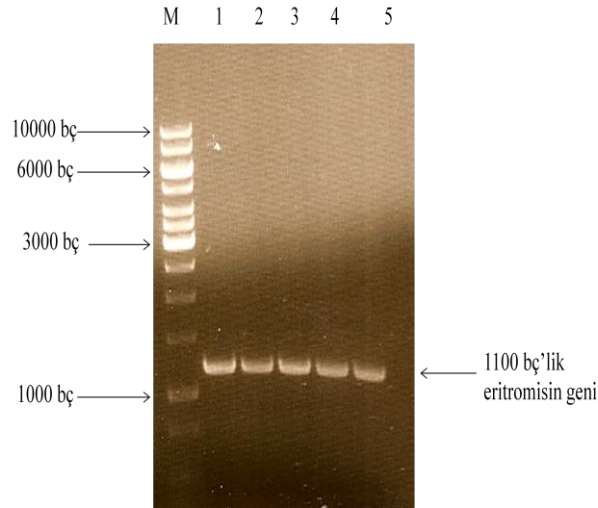
pSK6500'ün <i>PstI</i> kesimi	Δ pSK6500 <i>PstI</i> kesimi
9525 bç	6579 bç 2266 bç



Şekil 3.6. Farklı transformanlardan elde edilen olası Δ pSK6500 plazmitlerinin *PstI* enzim kesim sonucu.

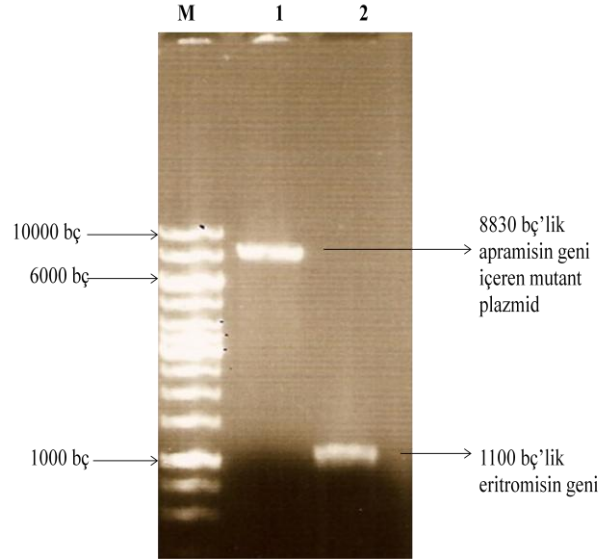
M: DNA belirteci; **Kuyu 1:** pSK6500'ün *Pst*I kesimi (Kontrol) 9525 bç; **Kuyu 2-6:** Olası pSK6500Δ*ppx* plazmitlerinin *Pst*I kesim sonucu

ppx ve *ppk* genlerinin büyük bir bölümü yerine apramisin geni klonlanmış olan ΔpSK6500 plazmidi ile Bti kromozomal DNA'sı arasında çift rekombinasyon (double cross over) olayının gerçekleştiği hücreleri tarayabilmek amacıyla ΔpSK6500 plazmidine ikinci bir antibiyotik direnç geni olarak eritromisin direnç geni (*ert*) klonlanmıştır. Eritromisin direnç geni (*ert*), pHT315'in kalıp olarak kullanıldığı ve sırasıyla *Not*I ve *Spe*I enzim kesim bölgelerine sahip ileri ve geri primerler ile PCR reaksiyonuyla çoğaltılmıştır (Şekil 3.7).

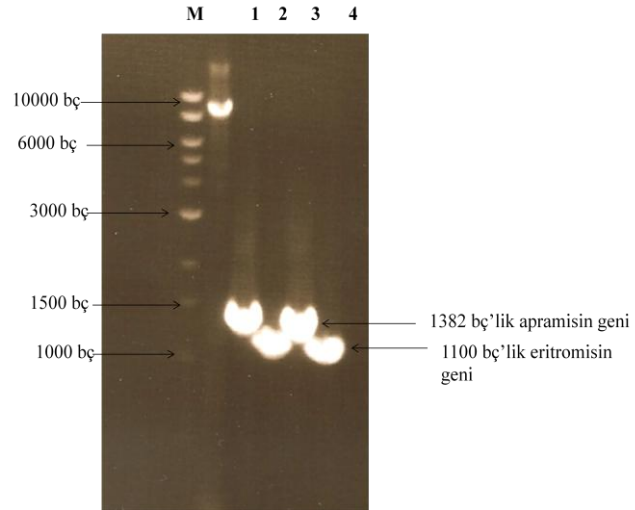


Şekil 3.7. Eritromisin genini çoğaltmak için yapılan PCR sonucu **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1-5:** 1100 bç'lik eritromisin direnç geni

*Not*I ve *Spe*I enzimleriyle kesilip jelden saflaştırılan 1100 bç'lik eritromisin PCR fragmanı (Şekil 3.8) ve yine aynı enzimlerle kesilip jelden saflaştırılan 8830 bç'lik ΔpSK6500 plazmidine (Şekil 3.8) klonlanmıştır. Bu çalışmada eritromisin geni klonlanmış ΔpSK6500 plazmidine ΔpSK6500Ert adı verilmiştir. ΔpSK6500Ert plazmidinin doğrulanması için eritromisin ve apramisin primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Eritromisin direnç geninin Δ pSK6500 plazmidinin *NotI-SpeI* enzim kesim bölgesine klonlanması için kullanılan DNA fragmanları. **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1:** Δ pSK6500 plazmidinin *NotI-SpeI* kesimi; **Kuyu 2:** Eritromisin direnç geni



Şekil 3.9. Olası Δ pSK6500Ert plazmidinin PCR ile doğrulanması **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1, 3:** 1382 bp'lik apramisin genine özgü primerlerin kullanıldığı PCR sonucu; **Kuyu 2, 4:** 1100 bp'lik eritromisin genine özgü primerlerin kullanıldığı PCR sonucu.

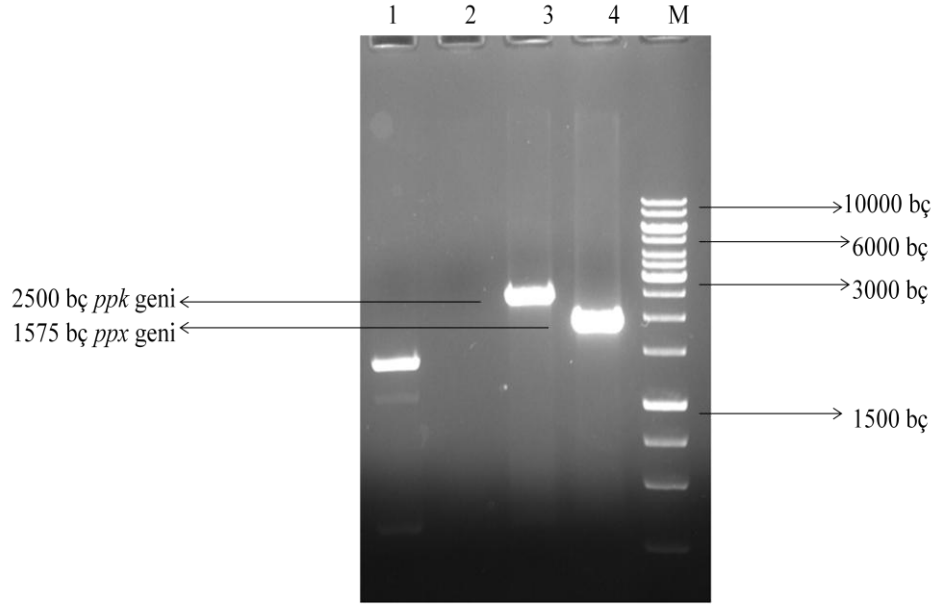
3.3. *ppx* ve *ppk* genlerinden yoksun Bti mutant suşun elde edilmesi ve mutasyonun hem PCR ile hem de Southern ile ispatlanması

Konjugasyon deneylerinde kullanılmak üzere, mutasyona sebep olacak Δ pSK6500Ert plazmidi, metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567/pUZ8002 suşuna aktarılmıştır. Farklı protokollerin kullanıldığı bütün denemelere rağmen *E. coli* ile Bti arasında gerçekleşmesi beklenen konjugasyon işlemi sonucunda tek ya da çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşlar elde edilememiştir.

Konjugasyon sonucunda başarılı bir sonuç elde edilemeyince, mutasyona sebep olacak Δ pSK6500Ert plazmidi, metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 suşundan izole edilerek Bti'a elektroporasyon ile aktarılmıştır. Elektroporasyon sonrasında hücreler Ert (25 µg/ml) içeren LB agar ve Apr (25 µg/ml) içeren LB agara yayılarak çift ya da tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği hücreler taranmıştır.

Taramalarda, apramisine dirençli eritromisine hassas çift rekombinasyonun gerçekleştiği hücreler elde edilemediğinden, eritromisinli besiyerinde üreyen tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği tek bir hücre seçilerek çift rekombinasyonun gerçekleşmesi için zorlanmıştır. Bu amaçla eritromisine dirençli bu tek hücre, seçici olmayan hem katı hem sıvı besiyerinde en az 2 hafta süreyle günlük kültürlenmiştir.

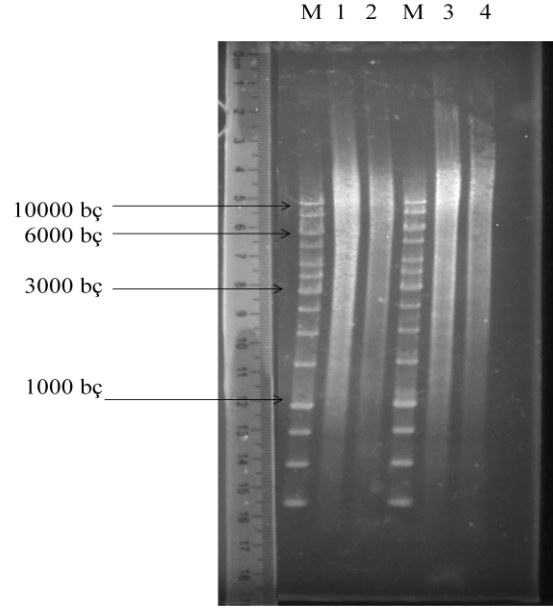
Daha sonra hücreler tek koloni düşecek şekilde seçici olmayan katı besiyerine ekilerek, üreyen her hücre eritromisin hassasiyeti için taranmıştır. Antibiyotiksiz LB agarda üreyip eritromisin içeren LB agarda üremeyen hücreler arasından bir tanesi seçilerek genomik DNA'sı izole edilmiştir. *ppx* ve *ppk* primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda yaban suşta hem *ppx* hem de *ppk* genlerinin varlığı gözlenirken, olası mutant suşta bu genlere ait bantlar gözlenmemiştir (Şekil 3.10).



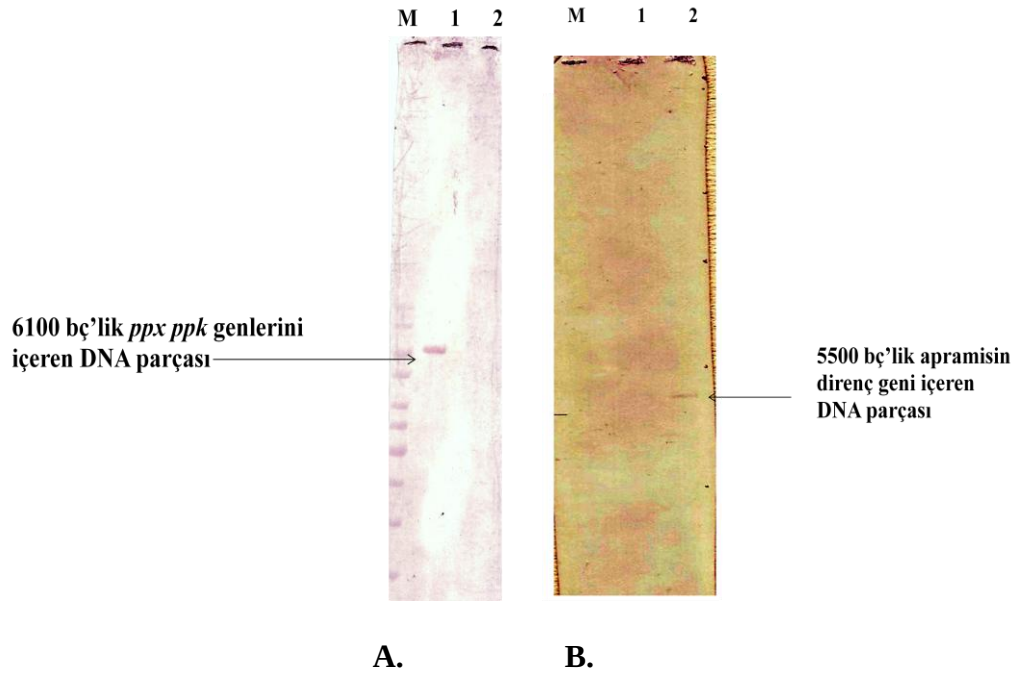
Şekil 3.10. Mutasyonun PCR ile doğrulanması. **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1:** 2500 bç'lik *ppk* genine özgü primerler ile mutant suşun DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; **Kuyu 2:** 1575 bç'lik *ppx* genine özgü primerler ile mutant suşun DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; **Kuyu 3:** 2500 bç'lik *ppk* genine özgü primerler ile yaban suş DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; **Kuyu 4:** 1575 bç'lik *ppx* genine özgü primerler ile mutant suşun DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu.

Yaban suş ve mutant suşun kromozomal DNA'larının izolasyonu yapılarak, DNA'lar gece boyunca *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. DNA'lar % 1'lik agaroz jelde yürütülmüşler (Şekil 3.11) ve membrana Southern blot yöntemiyle aktarılmışlardır. *ppx-ppk* probunun kullanıldığı hibridizasyon sonucunda yaban suşta bu genlere özgü 6100 bç'lik bant görülürken, mutant suşta aynı DNA bandı gözlenmemiştir (Şekil 3.12.A).

Apramisin probunun kullanıldığı hibridizasyon sonucunda ise mutant suşta 5500 bç'lik apramisin geninin içinde bulunduğu fragmana spesifik DNA bandı gözlenirken yaban suş DNA'sında apramisin genine özgü bir bant görülmemiştir (Şekil 3.12.B). *ppk* ve *ppx* genlerinden yoksun mutant suşa bu çalışmada *BtiΔppx-ppk* adı verilmiştir.



Şekil 3.11. Southern blot deneyi için mutant ve yaban suş DNA'larının *EcoRV* kesim sonuçları. **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1, 3:** Yaban suş kromozomal DNA'sının *EcoRV* kesimi; **Kuyu 2, 4:** Mutant suş kromozomal DNA'sının *EcoRV* kesimi.

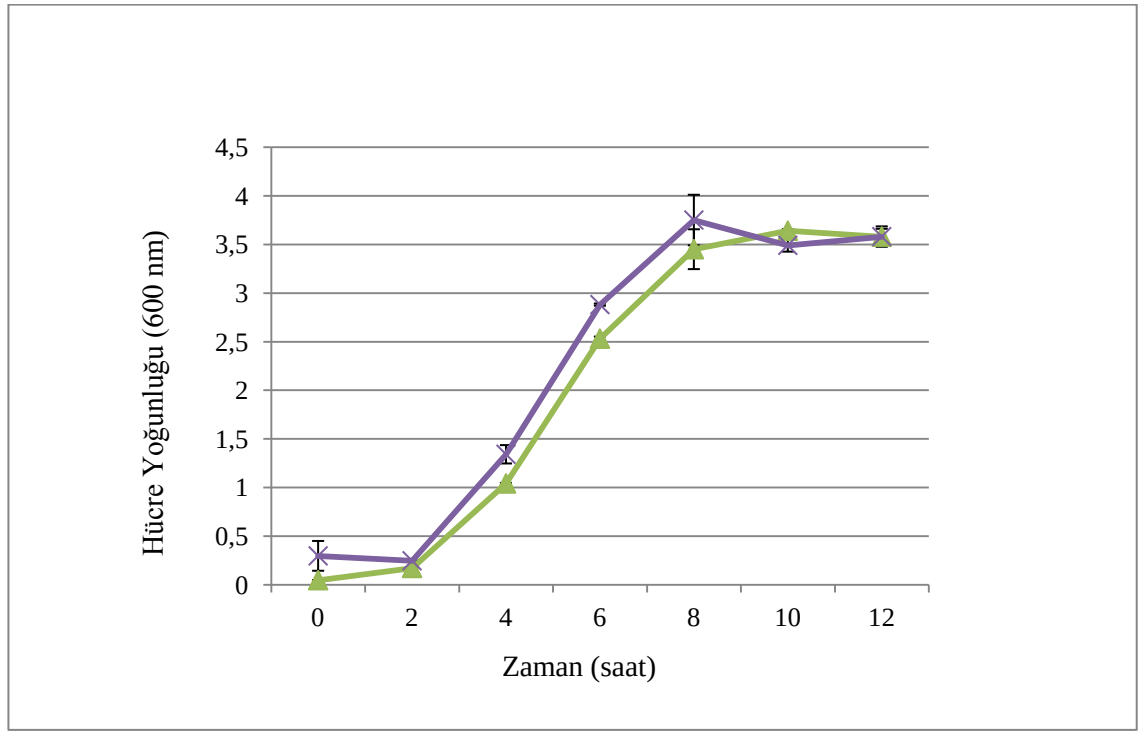


Şekil 3.12. *ppx-ppk* (A) ve apramisin (B) proplarıyla elde edilen hibridizasyon sonucu. **M:** DNA belirteci; **Kuyu 1:** *EcoRV* ile kesilmiş yaban suş DNA'sının hibridizasyon sonucu; **Kuyu 2:** *EcoRV* ile kesilmiş mutant suş DNA'sının hibridizasyon sonucu.

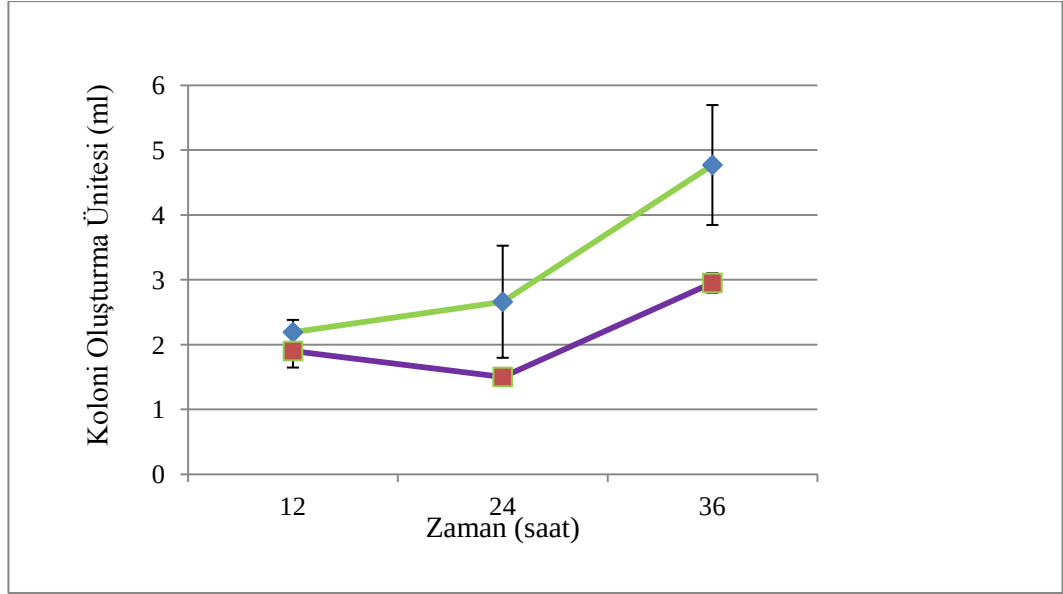
3.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE

Protein izolasyonundan önce Bti ve Bti Δ *ppx-ppk* suşlarının LB sıvı besiyerinde 30 °C’de üremeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.13). Spektrofotometrik ölçümle 600 nm’de 12 saatlik bir fermentasyon boyunca bakterilerin hücre yoğunlukları karşılaştırıldığında Bti ve Bti Δ *ppx-ppk* suşlarının LB besiyerinde üremelerinde önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.13).

Fermentasyonun 12., 24. ve 36. saatlerinde alınan örneklerle yapılan canlı hücre sayımı sonuçlarına bakıldığında ise bakterilerin üremelerinde çok büyük bir fark olmadığı, ancak Bti Δ *ppx-ppk* suşunun hücre sayısının Bti’ye göre biraz daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.14).

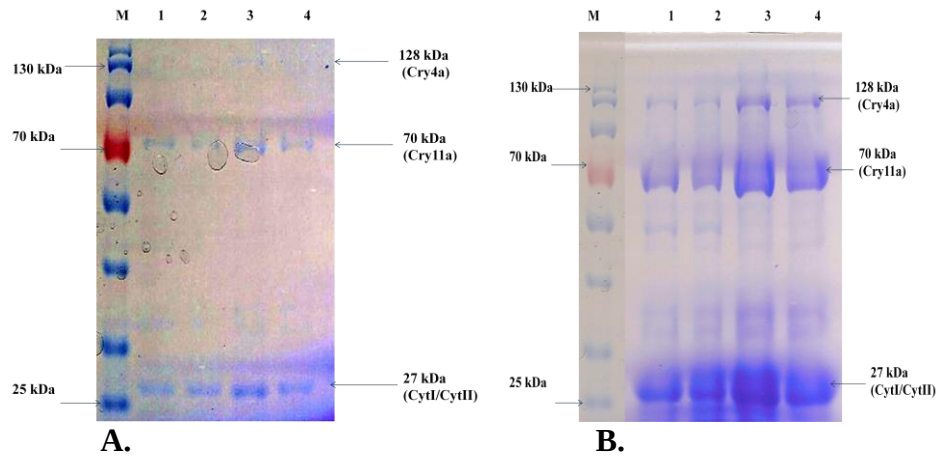


Şekil 3.13. Bti ve Bti Δ *ppx-ppk* suşlarının LB sıvı besiyerinde oluşturulan büyüme eğrileri. Yeşil grafik: Bti; Mor grafik: Bti Δ *ppx-ppk*.



Şekil 3.14. Bti ve BtiΔppx-ppk suşlarının LB sıvı besiyerinde oluşturulan canlı hücre sayısı grafikleri. Yeşil grafik: Bti; Mor grafik: BtiΔppx-ppk.

Üremelerinde hemen hemen fark olmayan Bti ve BtiΔppx-ppk suşlarından proteinler izole edilmiş ve SDS-PAGE görüntülerine göre mutant suşun yaban suşa göre daha fazla δ endotoksin ürettiği görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Bti ve BtiΔppx-ppk suşlarının δ endotoksin üretimlerinin karşılaştırılması. (A) Her bir kuyuya eşit ıslak hücre ağırlığından izole edilen proteinlerin eşit hacimde yüklendiği örnekler. **M:** Protein belirteci; **Kuyu 1:** Yaban suş; **Kuyu 2:** Yaban suş; **Kuyu 3:** Mutant suş; **Kuyu 4:** Mutant suş; (B) Her bir kuyuya eşit protein (50μg) yüklenmiş örnekler; **M:** Protein belirteci; **Kuyu 1:** Yaban suş; **Kuyu 2:** Yaban suş; **Kuyu 3:** Mutant suş; **Kuyu 4:** Mutant suş. Proteinler ikili setler halinde üretilen suşlardan izole edilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüzlerce P_i rezidüsünün yüksek enerjili fosfoanhidrit bağlarıyla birleşmesinden oluşan poliP, tüm bakteri, mantar, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. PoliP, enerji ve fosfat kaynağı olmasının yanında, biyofilm oluşumu, hareketlilik, bakterilerin ve küflerin gelişimsel süreçlerinin desteklenmesi, virülans oluşumu ve farklı stres koşullarında yaşamın devamlılığını sağlamak gibi önemli fizyolojik roller de üstlenir (Shi ve ark., 2004).

Bacillus türlerinin önemli bir kısmı endüstriyel enzimlerin, biyokimyasalların, antibiyotiklerin ve insektisitlerin kaynağı olarak kullanılırlar. Bunların içinde, *B. thuringiensis subsp. israelensis* (Bti) önemli bir böcek patojeni olup biyolojik pestisit olarak kullanılmaktadır (Madigan ve Martinko, 2005).

Bilgimiz dahilinde, *Bacillus cereus* dışında diğer *Bacillus* türlerinin polifosfat mekanizmasıyla ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu çalışmada, *B. cereus*'un poliP metabolizmasından sorumlu genleri (*ppk*; polifosfat kinaz, *ppx*; ekzopolifosfataz, *pap*; fosfotransferaz) silinmiş ve poliP'nin bu bakterinin hareketliliği, biyofilm oluşturmaya ve sporulasyonu için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *B. thuringiensis subsp. israelensis*'te (Bti) poliP metabolizması ile biyoinsektisid biyosentezi arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacıyla, polifosfat metabolizmasında görevli kilit enzimlerden olan polifosfat kinaz (PPK) ve ekzopolifosfataz (PPX) enzimlerini üretemeyen mutant bir suş oluşturulmuş ve bu mutasyonun endotoksin üretimine etkisi gösterilmiştir.

Çalışma öncelikle *ppx* geninin delesyonu üzerine yapılandırılmış, ancak kullanılan PCR bazlı yöntem ile başarılı sonuç elde edilemeyince, *ppk* ve *ppx* genlerinin büyük bir bölümü klasik kaset mutasyonu yöntemiyle Bti genomundan çıkarılmıştır.

ppx geninin delesyonu için denenen ve laboratuvarımızda başarıyla uygulanan PCR temelli yöntemde (Gust ve ark., 2003) seçilen bir antibiyotik direnç geni Bti *ppx* geninin yerini almaktadır. Bu çalışmada, apramisin direnç geni belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. *ppx* geninin üzerinde bulunduğu pSK6500 plazmidi ile *ppx* geninin üst ve alt bölgeleriyle uyumlu diziler içeren apramisin mutasyon kaseti arasında *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerinde gerçekleşmesi gereken çift rekombinasyon olayı bütün denemelere rağmen başarılı sonuç vermemiştir.

Çift rekombinasyonun gerçekleşmesini sağlayacak olan pIJ790 plazmidi üzerindeki *red* genlerinin uyarımından sorumlu olan L-arabinoz'da sorun olduğu düşünülerek stok solüsyon tekrar tekrar hazırlanmış ancak yine çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant plasmid elde edilememiştir. Kompetan hücreler farklı yöntemlerle hazırlandığı ve kullanılan antibiyotik solüsyonları yenilendiği halde yapılan her tekrar negatif sonuç vermiştir. Bu negatif sonucun en önemli nedeninin pIJ790 üzerinde bulunan ve rekombinasyondan sorumlu olan *red* genlerinin uyarılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bir çok farklı denemeden sonra pSK6500 plazmidinde bulunan *ppx* geni ile apramisin mutasyon kaseti arasında çift rekombinasyon olayı gerçekleşmeyince mutant plazmidin klasik kaset mutasyonu yöntemiyle hazırlanması amaçlanmıştır. Restriksiyon enzim kesim haritası incelenen pSK6500 plazmidinde sadece *ppx* genini çıkarmaya yönelik uygun enzimler bulunamadığından *ppk* ve *ppx* genlerinin büyük bir bölümünü çıkarabilen *MfeI* restriksiyon enzimi seçilmiştir. pSK6500 plazmidinde *ppx* ve *ppk* genlerinin büyük bir bölümünü bulunduran *MfeI* DNA fragmanı yerine apramisin direnç geni yerleştirilerek mutant ΔpSK6500 plazmidi oluşturulmuştur.

Mutant plazmidin doğruluğu farklı endonükleazlar ile kesilerek gösterilmiştir. ΔpSK6500 plazmidi ile Bti kromozomal DNA'sı arasında çift rekombinasyon (double cross over) olayının gerçekleştiği hücreleri tarayabilmek amacıyla ΔpSK6500 plazmidine ikinci bir antibiyotik direnç geni olarak eritromisin direnç geni (*ert*) klonlanmıştır. Bu çalışmada eritromisin geni klonlanmış ΔpSK6500 plazmidine ΔpSK6500Ert adı verilmiştir. Elde edilen bu yeni plazmidin doğruluğu

eritromisin ve apramisin primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonları ile gösterilmiştir.

Mutasyona sebep olacak Δ pSK6500Ert plazmidinin Bti hücrelerine konjugasyon ile aktarılması amacıyla plazmid DNA metilasyon sisteminden yoksun *E. coli* ET12567/pUZ8002 suşuna aktarılmıştır. Konjugasyon deneyleri sonucunda bütün denemelere rağmen tek ya da çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant Bti suşları elde edilememiştir. *E. coli*'den *Bacillus*'a plazmid DNA'yı transfer edecek olan pUZ8002 plazmidinin *E. coli* hücrelerinde bulunup bulunmadığını göstermek için söz konusu plazmid izole edilmiş ve konjugasyonda yaşanan sorunun pUZ8002 yokluğundan kaynaklanmadığı gösterilmiştir. *E. coli*'den *Bacillus*'a konjugasyon ile aktarılacak istenilen plazmidin oldukça büyük olmasının (10043 bp), plazmidin tamamının transferinin gerçekleşmesini engellediği düşünülmektedir.

Konjugasyon sonucunda başarılı bir sonuç elde edilemeyince, mutasyona sebep olacak Δ pSK6500Ert plazmidi *Bti*'a elektroporasyon ile aktarılmıştır. Elektroporasyonda kullanılan Δ pSK6500Ert plazmidi metilasyon yoksunu *E. coli* ET 12567 suşundan izole edilmiştir.

Elektroporasyon sonrasında apramisine dirençli eritromisine hassas çift rekombinasyonun gerçekleştiği hücreler elde edilemediğinden, eritromisinli besiyerinde üreyen tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği hücrelerden bir tanesi seçilerek hem katı hem de sıvı besiyerinde ayrı ayrı en az 2 hafta süreyle günlük kültürlenerek çift rekombinasyona zorlanmıştır. Antibiyotiksiz LB agarda üreyip eritromisin içeren LB agarda üremeyen olası çift rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutant hücreler arasından bir tanesi seçilerek genomik DNA'sı izole edilmiştir. *ppx* ve *ppk* primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonlarında olası mutant suşta bu genlere ait DNA bantlarının olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan southern blot deneyinin sonuçları da mutant suşta *ppk* ve *ppx* genlerine ait DNA fragmanlarının bulunmadığını ve bu genlerin yerinde apramisin direnç geninin bulunduğunu göstermiştir.

Polifosfat metabolizmasının iki kilit enzimini kodlayan *ppk* ve *ppx* genlerinden yoksun mutant suşun hem PCR hem de southern blot ile ispatlanmasının ardından, ilk olarak yaban suş ve mutant suşun LB besiyerinde optik yoğunluklarına göre üreme eğrileri oluşturulmuş ve her iki suşun bu besiyerinde benzer şekilde üredikleri görülmüştür. Fermentasyonun 12., 24. ve 36. saatlerinde alınan örneklerle yapılan canlı hücre sayımı sonuçlarına bakıldığında ise bakterilerin üremelerinde çok büyük bir fark olmadığı, ancak mutant suşun hücre sayısının yaban suşa göre çok az düşük olduğu görülmüştür. Üremelerinde belirgin bir fark olmayan yaban ve mutant suşun δ -endotoksin protein üretimleri karşılaştırıldığında ise üremenin 72. saatinde DSM besiyerinde mutant suşun yaban suşa göre daha fazla δ -endotoksin üretmiş olduğu SDS-PAGE jellerinde gözlenmiştir.

Çevresel faktörlerin, *B. thuringiensis*'in toksin protein üretiminde kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bazı mineral elementlerin özellikle inorganik fosfatın *B. thuringiensis* toksin biyosentezinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Banerjee-Bhatnagar, 1999; Kurt ve ark., 2005). Bu çalışmaların hepsinde inorganik fosfat, besiyeri ortamına değişik konsantrasyonlarda eklenmiş ve fosfatın endotoksin üretimi üzerindeki tetikleyici etkisi gözlenmiştir.

Bu çalışmada *B. thuringiensis subsp. israelensis*'in fosfat metabolizması değiştirilmiş ve hücre içerisinde poliP'ı dolayısıyla serbest fosfatı daha az miktarda üreten bir sistem oluşturulmuştur.

Hipotezimiz, elde edilen mutant suşda endotoksin üretiminin yaban suşa kıyasla daha az olacağı yönünde olmasına rağmen, bu çalışmanın sonuçları bu beklentinin tam tersi yönündedir. Ancak mutant suşun karakterizasyonu henüz yapılmadığından, DSM besiyerinde yaban suşa göre daha fazla endotoksin ürettiği gözlenen mutant suşun farklı besiyerlerinde nasıl davranacağı merak konusudur. Mutant suşun farklı besiyerlerinde ve farklı çevresel koşullarda (sıcaklık, pH, asidite vb.) δ -endotoksin protein üretimindeki değişiklik farklı bir çalışmayla aydınlatılmayı beklemektedir.

B. subtilis'in genel stress düzenleyici genleri yaklaşık 200 tane olup bu genler alternatif sigma faktörü B'nin (σ^B) kontrolü altındadır. Enerji açlığının yanı sıra çoklu fiziksel stress uyarılarına cevapta σ^B 'nin aktivasyonu gerçekleşir (Reder ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda, hücre içerisinde çok önemli fizyolojik roller üstlenen poliP'nin kilit enzimlerinin (PPK ve PPX) olmayışı hücrenin strese girmiş olabileceği ihtimalini doğurmaktadır. Her ne kadar RT-PCR ya da qPCR ile ispatlanması gerekse de mutant suşta, genel strese cevaben uyarılan sigma B'yi kodlayan genin (*sigB*) aşırı derecede ifade edildiği ve bunun sonucunda endotoksin üretiminde artış olduğu varsayılabilir.

relA geni tarafından kodlanan (p)ppGpp sentetaz I enzimi aracılığıyla genel stress koşullarında sentezlenen alarmonların [guanozin penta fosfat (pppGpp) ve guanozin tetra fosfat (ppGpp)] ikincil metabolizmayı uyardığı bilinmektedir. PoliP üretemeyen suşun strese girdiği düşünüldüğünde, bu mutant suşta *relA* geninin ifadesinde de bir artış olması beklenti dahilindedir. Ancak bu hipotezin de doğrulanması için RT-PCR ya da qPCR sonuçlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma dahilinde, her ne kadar mutant suşun sporlanma özelliğine bakılmadıysa da sporlanma ve endotoksin üretimi arasında direk bir bağlantı olmadığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Pramatha, 2000). Pramatha'nın (2000) yaptığı çalışmada, aşırı δ endotoksin üretimi yapan Bti suşunda sporulasyona spesifik biyokimyasal fonksiyonlar araştırılmış ve yüksek seviyede δ endotoksin üreten suşun sporulasyona spesifik biyokimyasal belirteçlerinde herhangi bir artış görülmemiştir.

Yine aynı çalışmada, yüksek seviyede δ endotoksin üreten mutant suştan, farklı sporulasyon evrelerinde kristal proteinler izole edilerek biyoaktiviteleri incelenmiştir. Sporulasyonu tamamlayamayan hücrelerden izole edilen δ endotoksinlerin larvalar üzerindeki etkilerinde hiç bir fark görülmemiştir. Ayrıca, *B. subtilis* ve *B. cereus*'un sporlanamayan mutant suşlarında δ endotoksin protein genlerinin ifadelerinin aynen yaban suştaki gibi olduğu da iki farklı çalışmayla gösterilmiştir (Bhattacharya, 1994; Ward ve ark., 1986).

Bu çalışma sonucunda elde edilen mutant suşun yaban suşa göre neden daha fazla endotoksin ürettiğinin belirlenmesi için farklı çalışmalara ihtiyaç olduğu çok açıktır. Ancak PPK ve PPX enzimlerinden yoksun olan bu suşun endüstriyel olarak önemli bir potansiyel olduğu da aşıkardır.

Bilindiği gibi *Bacillus thuringiensis* kullanılmakta olan biyoinsektisitlerin en tanınanı ve en önemlisidir. Bu bakterinin ürettiği toksin proteinleri sadece hedeflenen organizmaya spesifik olup diğer canlılara, özellikle insana, toksik etki göstermemektedir. Dünyada pek çok araştırma merkezi *Bacillus thuringiensis*'den elde edilen endotoksin miktarını arttırmak ya da toksisitesini yükseltmek için bir çok çalışma yürütmektedir. Her ne kadar bu tez çalışmasında, mutant suşun toksisitesinin yaban suşa göre daha fazla olduğu larvalar üzerinde test edilmediyse de, SDS-PAGE jellerinde mutant suşun daha fazla endotoksin ürettiği gözlenmiştir. Bu sonuç, elde edilen mutant suşun ticari açıdan önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Özet olarak, bu tez çalışmasında, polifosfat metabolizmasının iki kilit enzimini kodlayan *ppx* ve *ppk* genlerinden yoksun *BtiΔppx-ppk* mutant suşu oluşturulmuş ve mutant suşun yaban suşa göre zengin besiyerinde daha fazla endotoksin ürettiği gözlenmiştir. Mutant suşun, farklı bir çalışmayla ayrıntılı olarak karakterizasyonunun yapılması öncelikli konular arasındadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. **Ahn, K., Kornberg, A.,** (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265:11734–39.
2. **Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A.,** (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*: isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267:22556–61.
3. **Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A.,** (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*: the enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633–39.
4. **Aronson A.,** (2002). Sporulation and delta endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*, CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 417–425.
5. **Agaisse H. and Lereclus D.,** (1995). How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein? *J. Bacter.*, p. 6027-6032.
6. **Andreeva N. A. , Kulakovskaya T. V. and Kulaev I. S.,** (2000). Two Exopolyphosphatases of Cytosol of the Yeast *S. cerevisiae*: Comparative Characteristics. *Biochem.* (Moscow), Vol. 66, pp. 147-153.
7. **Banerjee-Bhatnagar N.,** (1999). Inorganic phosphate regulates CryIVA protoxin expression in *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 262, 359–364.
8. **Bhattacharya R. P.,** (2000). Hyper –Production Insecticidal Crystal Protein by *Bacillus thuringiensis var. israelensis* Is Not Related to Sporulation-Spesific Biochemical Functions. *Cur. Microbiol.* Vol.41, pp. 187-191.
9. **Bone J., Ellar D. J.,** (1989). Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbio. Letters*, Vol.58, no: 2-3, Page 171-177.
10. **Belozersky, A.N.,** (1958). The formation and function of polyphosphates in the development processes of some lower organisms. *Int. Biochim. Congr.*, 4th, Vienna, pp. 3–12.
11. **Blum, E., Py, B., Carpousis, A. J., Higgins, C. F.,** (1997). Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.*, 26:387–98.

12. **Bravo A., Gill S. S., Soberón M.,** (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxi.*, 49(4): 423–435.
13. **Brown, M.R.W., Kornberg, A.,** (2008) . The long and short of it- polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends in Biochem.*
14. **Cardona S. T., Chavez F. P. and Jerez C. A.,** (2002). The Exopolyphosphatase Gene from *Sulfolobus solfataricus*: Characterization of the First Gene Found To Be Involved in Polyphosphate Metabolism in *Archaea*. *App. Env. Microbiol.* , p. 4812-4819.
15. **Charles R. Sanders,** (2011). Sanders Lab Protocols.
16. **Chavez F. P., Mauriaca C. and Jerez C. A.,** (2009). Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Research Notes*, 2:50.
17. **Cahan R., Friman H. and Nitzan Y.** (2008). Antibacterial activity of Cyt 1 Aa from *Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis*. *Microbiol.*, 154, 3529-3535.
18. **Crickmore N., Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean H.,** (1998). Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.*Vol.62, p.807-813.
19. **Cornelus, F. C., Bonting, G., Kortsee, J. J., Zehnder, J. B.,** (1991). Properties of Polyphosphate:AMP Phosphotransferase of *Acinetobacter* Strain 210A . *J. Bacteriol.*, 173(20): 6484-6488
20. **Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N.N., Kornberg, A.,** (1994). Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 269:6290–95.
21. **Donovan W.P., Jose M., Gonzalez Jr., Gilbert M., Dankoesik C.,** (1988). Isolation and Characterization of EG2158, a New Strain of *Bacillus thuringiensis* Toxic to Coleopteran Larvae, and Nucleotide Sequence of the Toxin Gene. *Mol. Gen. Genet.* 214:365-372.
22. **Doruk T.,** (2012). *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*'in biyoinsektisid (endotoksin) üretme kapasitesinin artırılması amacıyla fosfat metabolizmasının değiştirilmesi. Doktora Tezi (Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü).

23. **Durr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J., Nagy, M.,** (1979). Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 121:169–75.
24. **Fraley, C. D.,** (2007). A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *PNAS*, 104(9): 3526–3531.
25. **Gust B., Kieser T., Chater K. F.,** (2002). Redirect Technology: PCR-Targeting System in *Streptomyces coelicolor*. *Adv.App. Microbio.*, Vol.54.
26. **Hardoyo, K., Shinjo, H., Kato, J., Ohtake, H.,** (1994). Production and release of polyphosphate by a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3485–90.
27. **Içgen Y., İçgen B., Özcengiz G. ,** (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: Effects of mineral elements and pH. *Res.Microbiol.*, 153, 599–604.
28. **Ischige, K., Kameds, A., Noguchi, T., Shiba, T.,** (1998). The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.*, 5:157–62.
29. **Janes K. B., Stibitz S.,** (2006). Routine Markerless Gene Replacement in *Bacillus anthracis*. *Inf. Immun.*, p. 1949-1953.
30. **Kaori, T., Masanobu, M., Toshikazu, S. ,**(2000). Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1493 73-81.
31. **Kato, J., Yamada, K., Muramatsu, A., Ohtake H.,** (1993). Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from waste water. *Appl. Environ. Microbiol.* ,59:3744–49.
32. **Keasling, J. D.,** (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann N.Y. Acad.Sci.*, 829:242-9.
33. **Keasling, J. D. Hupf, G.A.,** (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 743-746.
34. **Keasling, J. D., Van Dien, S. J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K.,** (2000). Application of Polyphosphate Metabolism to Environmental and Biotechnological Problems. *Biochem. (Moscow)*, 65(3): 324-331.

35. **Keasling, J.D., Bertsch, L., Kornberg, A.,** (1993). Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:7029–3390-6295.
36. **Kornberg, A.,** (1995). Inorganic polyphosphate:toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.*, 177:491–96.
37. **Kornberg, A., Kornberg, S., Simms, E.,** (1956). Methaphosphate synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*,20:215–27.
38. **Kornberg, A., Narayana, N. R., Ault-Riché, D.,** (1999). Inorganic Polyphosphate A Molecule Of Many Functions. *Annu. Rev. Biochem.*. 68:89–125.
39. **Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Rich, D.,** (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.*68:89–125.
40. **Kortstee, G. J. J., Appeldoorn, K. J., Bonting, C. F. C., van Niel, E. W. J., van Veen, H. W.,** (2000). Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. *Biochem. (Moscow)*, 65(3): 332-34.
41. **Kowalczyk, T. H., Phillips, N. F. B.,** (2003). Structural analysis of *Escherichia coli* Exopolyphosphatase by *Alvarado, Johnjeff*, Ph.D., Purdue University, 120 pages; AAT 3122815.
42. **Kulaev, I. S.,** (1979). The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. New York: Wiley. 234 pp.
43. **Kulaev, I. S., Kulakovskaya, T.,** (2000). Polyphosphate and Phosphate Pump; *Annu. Rev. Microbiol.*, 54:709–34.
44. **Kulaev, I.S., Vagabov, V.M.,** (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv.Microb. Physiol.* 24:83–171.
45. **Kumble, K. D., Kornberg, A.,** (1996). Endopolyphosphatases for long chain polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol.Chem.* 271:27146–51.
46. **Kuroda, A., Kornberg, A.,** (1997). Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS. USA* 94:439–42.
47. **Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., Kornberg, A.,** (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:21240–43.

48. **Kurt A., Özkan M. and Özcengiz G.,** (2005). Inorganic phosphate has a crucial effect on Cry3Aa delta endotoxin production. *Let. App.Microbiol.*, 41, 303-308.
49. **Kusano, S., Ishihama, A.,** (1997). Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Gen. Cel.*, 2:433–41.
50. **Macaluso A., Mettus AM.,** (1991). Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 173(3):1353-6.
51. **Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K, Vail P.,** (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biol.Cont.*, 21, 230–248.
52. **Lindner S.N. , Knebel S., Wesseling H., Schoberth S. M. and Wendish V.F.,** (2009). Exopolyphosphatases PPX1 and PPX2 from *Corynebacterium glutamicum*. *App. Env.. Microbiol.*, 3161-3170.
53. **Miyake T., Shiba T., Kameda A., Ihara Y., Munekata M., Ishige K. And Noguchi T.,** (1999). The Gene for an Exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.*, 6, 103-108.
54. **Ogawa N., Tzeng C., Fraley C. D. And Kornberg A.,** (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: Genetic, Biochemical and Physiologic Features. *J. Bacteriol.*, p. 6687-6693.
55. **Rangarajan S.E., Nadeau G., Li Y., Wagner J., Hung M., Schrag D. J., Cygler M. and Matte A.,** (2006). The Structure of the Exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 Suggests a Binding Mode for Long Polyphosphate Chanis. *J.Mol.Biol.*, 359, 1249-1260.
56. **Rao, N.N. and Kornberg A.,** (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationaryphase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178:1394–400.
57. **Rashid, M., Rao, N. N., Kornberg, A.,** (2000) . Inorganic Polyphosphate Is Required for Motility of Bacterial Pathogens. *J. Bacteriol.* , 225-227.
58. **Reder A., Höper D., Gerth U., Hecker M.,** (2012). The contribution of individual σ B-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 00528-12.
59. **Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. ,(1998).** *Bacillus thuringiensis* And Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, Vol. 62, No. 3, P. 775–806.

60. **Scoarughi, G.L., Cimmino, C., Donini, P.,** (1999) . *Helicobacter pylori*: a eubacterium lacking the stringent response. *J. Bacteriol.* 181:552–55.
61. **Shi, X., Rao, N. N., Kornberg, A.,** (2004). Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:17061–65.
62. **Shi, X., Kornberg, A.,** (2005). Endopolyphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates. *FEBS letter.* 579(9): 2014-8.
63. **Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A.,** (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of RPOS expression. *PNAS. USA* 94:11210–15.
64. **Smith, P.K.,** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal. Biochem.*, 150 (1): 76–85.
65. **Tinsley, C. R., Manjula, B. N., Gotschlich, E. C.,** (1993). Purification and characterization of polyphosphate kinase from *Neisseria meningitides*. *Infect Immun.*, 61(9): 3703–3710.
66. **Tinsley, C.R., Gotschlich, E.C. ,** (1995). Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutant. *Infect. Immun.* ,63:1624– 30.
67. **Torriani-Gorini.,** (1994). A. *Phosphate in Microorganisms*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1–4.
68. **Tzeng, C.M., Kornberg, A.,** (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, 29:381–82.
69. **Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N. and Zehnder, A. J. B.,** (1994). Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *J. Biol. Chem.*, 269, 29509–29514.
70. **Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J. P., Jerez A. C., Chavez F. P.,** (2010). New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.*, 10:7.
71. **Wood, H.G., Clark, J.E.,** (1988). Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.*, 57:235–60.

72. **Ward E.S., Ellar D.J.,** (1986). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Nucleotide Sequence and Characterization of the Transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. *J.Mol. Bio.*, Vol.191.p.1-11.
73. **Wurst H., Shiba T. And Kornberg A.,** (1994). The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, p. 898-906.
74. **Zago A., Chugani S. And Chakrabarty A. M.,** (1999). Cloning and Characterization of Polyphosphate Kinase and Exopolyphosphatase Genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *App. Env.Microbiol.*, p. 2065- 2071.
75. **Zhang, H., Rao, N. N., Shiba, T., Kornberg, A.,** (2005). Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: Motility, development, and predation. *PNAS*. 13416–13420.
76. **Zhang, H., Gomez-Garcia, M. R., Shi, X., Rao, N. N., Kornberg, A.,** (2007). Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis. *PNAS*,104(42) :16486–16491.
77. **Zhu, Y. Huang, W., Lee, S. S., Xu, W.,** (2004). Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Rep.*, 6(7): 681–687.

ÖZGEÇMİŞ

Aybike YEDEKÇİ, 14 Nisan 1986 yılında Lüleburgaz'da doğdu. 2005 yılında GaziOsmanPaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı.Lisans eğitimini 2009 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitime başladı.