

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LACTOCOCCUS LACTIS'İN OKSİDATİF STRES
TOLERANSININ ARTTIRILMASI VE AEROBİK
KOŞULLARDA NİSİN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

**ZEYNEP GİRGİN ERSOY
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2021**

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LACTOCOCCUS LACTIS'İN OKSİDATİF
STRES TOLERANSININ ARTTIRILMASI
VE AEROBİK KOŞULLARDA NİSİN
ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

**ZEYNEP GİRGİN ERSOY
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK**

**GEBZE
2021**

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**IMPROVING OXIDATIVE STRESS
TOLERANCE OF LACTOCOCCUS LACTIS
AND OPTIMIZATION OF NISIN
PRODUCTION IN AEROBIC CONDITIONS**

ZEYNEP GIRGIN ERSOY
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDIK

GEBZE
2021



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/07/2020 tarih ve 2020/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/01/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep GİRGİN ERSOY'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE : Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

ÜYE : Prof. Dr. Fatma Neşe KÖK

ÜYE : Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Özge DİNÇ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Nisin, laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis*'in çeşitli suşları tarafından üretilen bir bakteriyosindir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosin olan nisin kimyasal yolla üretimi mümkün olmadığından, bu bakteriyosini üreten suşların üretim veriminin artırılması önem taşımaktadır. Bu nedenle, tezin temel amacı, nisin üretimini, *L. lactis*'in oksidatif strese olan toleransını artırarak geliştirmektir.

Bu amaç doğrultusunda, çalışmada, *Bacillus subtilis*'in H₂O₂ gideriminde görev alan başlıca enzimini kodlayan katalaz geni (*katE*) ile *L. lactis*'in oksidatif stres ile savaştığı en önemli enzimlerinden birini kodlayan süperoksit dismutaz (*sodA*) genini farklı seviyelerde ifade edebilen rekombinant suşların oluşturulmasına çalışılmıştır. Ancak gerçekleştirilen bütün denemelere rağmen, *B. subtilis*'e ait katalaz genini veya *L. lactis* süperoksit dismutaz genini içeren plazmide sahip rekombinant *L. lactis* hücresi elde edilememiştir.

Tez çalışmasının devamında, *L. lactis*'in oksidatif stresini azaltmak için antioksidan özellikleri bilinen glutatyon (GSH) ve pirüvat, *L. lactis*'in büyüme ortamına eklenmiş ve bu antioksidanların hücrelerin büyümesi, nisin üretimi ve stres cevabı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. GSH ve pirüvatın, aerobik koşullarda büyütülmüş *L. lactis* hücrelerinde nisin üretimini hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde tetiklediği gösterilmiştir. GSH ve pirüvatın varlığı, hem ilave edilmiş besiyerinden daha fazla nisin verimine neden olmuştur. Kesikli kültürde elde edilen bu sonuçların büyük hacimlerde de geçerli olduğu, yapılan fermentör çalışmaları ile doğrulanmıştır. Ayrıca, strese bağlı enzimleri kodlayan genlerin ifadesi, GSH ve pirüvat varlığında açıkça artmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında, besiyerinde hem bulunmadığında GSH ve pirüvatın *L. lactis* hücrelerinin savunma sistemine katkıda bulunduğu ve böylece nisin üretiminin artmasına neden olan daha yüksek biyokütleyle ulaşıldığı sonucuna varılabilmektedir. Antioksidan etkileri bilinen GSH ve pirüvatın, nisin üretimi üzerindeki uyarıcı etkileri ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon, *Lactococcus lactis*, Nisin üretimi, Oksidatif stres, Pirüvat.

SUMMARY

Nisin is a bacteriocin which is produced by certain strains of *Lactococcus lactis* (member of lactic acid bacteria). It is the only bacteriocin which is approved by World Health Organization (WHO) as a food additive. Since this bacteriocin cannot be produced by chemical methods, to increase the production efficiency of nisin producing strains is important. Therefore, the main purpose of the thesis is to improve the production of nisin by increasing the tolerance of *L. lactis* to oxidative stress.

For this purpose, in the study, *B. subtilis* catalase gene (*katE*), which encodes the main enzyme functioning in H₂O₂ removal, and *L. lactis* superoxide dismutase gene (*sodA*), which encodes one of the most important enzymes that fight against oxidative stress, were tried to be expressed at different levels in *L. lactis* cells. However, despite all trials, recombinant *L. lactis* cell with plasmid containing the *B. subtilis* catalase gene or *L. lactis* superoxide dismutase gene could not be obtained.

In the continuation of the thesis, glutathione (GSH) and pyruvate molecules, whose antioxidant properties have already known, were added to the growth media to reduce the oxidative stress of *L. lactis* and the effects of these antioxidants on cell growth, production of nisin and stress response have been determined. GSH and pyruvate have been shown to trigger the production of nisin at both transcriptional and translational level in *L. lactis* cells grown under aerobic condition. Presence of GSH and pyruvate caused more nisin yield than the haem supplemented medium. The fact that these results obtained in batch culture are valid in large volumes has been confirmed by fermenter studies. Moreover, the expression of genes that encode stress-related enzymes were apparently upregulated in the presence of GSH and pyruvate. It can be concluded that, in the absence of haem in the medium, GSH and pyruvate contributed to the defense system of *L. lactis* cells, thus achieving higher biomass leading to increased production of nisin. Antioxidant effect of GSH and pyruvate was known, however, their stimulating effect on nisin production was shown for the first time in this study.

Keywords: Glutathione, *Lactococcus lactis*, Nisin production, Oxidative stress, Pyruvate.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın “doktora” adı verilen en zorlu yıllarında pek çok kişi bende, doktora çalışmamda ve nihayetinde hayatımda küçük ya da büyük izler bıraktı. Bu doktora tezi, benim çabalarım ile bu kıymetli kişilerin fikirlerinin, emeklerinin ve fedakarlıklarının yoğrulması sonucu son halini aldı.

8 yıl süren bu uzun yolda beni olduğum gibi kabullenen, yapabileceklerimin farkına varmamı sağlayan, ufkumu açan, desteğini asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran sayın tez danışmanım Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gebze Teknik Üniversitesi’nde geçirdiğim 11 yıl boyunca kocaman bir aileye sahip oldum. Birlikte güldük, birlikte ağladık ve nihayetinde birlikte büyüdük... Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER, Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN, Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK, Özlem ASKER, Dr. Tuba KORKMAZ, Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Dr. İrem YALIM CAMCI, Dr. Metin ÇETİN, Dr. Hüseyin BALCI ve Görkem ODABAŞ, sizleri gönülden kucaklıyorum. Eminim her zaman yanı başımda olacaksınız.

Can dostum sevgili Özge DİNÇ, sen bu süreçte bana gönderilen bir hediye gibiydin; iyi ki geldin, iyi varsın, iyi ki olacaksın...

Laboratuvarda omuz omuza çalıştığım, kimi zaman dertlerine deva olduğum, kimi zaman derdime deva olan çalışma arkadaşlarım Dr. Zeynep DEMİR ÖKSÜZ, Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Ğarip DEMİR, Müge Didem ORHAN, Halil YILMAZ, Buse ÇINAR, Nagihan GENEL, Çiğdem BOZKURT ve Mouktar Abdi BARKAD’a teşekkür ederim.

Son olarak, bu zorlu yolculuğun yükünü paylaşıp beni hafifleten, her daim bana destek olup yapabileceklerim için beni yüreklendiren, en zor zamanlarımda elimi sınıksız tutup hiç bırakmayan sevgili eşim Tolga ERSOY’a; bu sürecin tam ortasında güneş gibi doğup içimi aydınlatan biricik kızım İpek ERSOY’a; kızları olmaktan gurur duyduğum canım ailem Gülgün GİRGIN ve Necmettin GİRGIN’e; yanında bütün dertlerimi unuttuğum, diğer yarım, kız kardeşim Ayşe GİRGIN’e ve her türlü destekleri ile yanımda olan sevgili ERSOY ailesine bütün kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLOLAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Nisinin Genel Özellikleri	4
2.1.1. Nisinin Etki Mekanizması	5
2.1.2. Nisinin Moleküler Yapısı	8
2.1.3. Nisin Biyosentezinden Sorumlu Gen Kümesi	9
2.1.4. Nisin Biyosentezi	10
2.2. Nisin Üretimini Arttırılması için Yapılan Çalışmalar	11
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
3.1. Gereçler	16
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.2. Kullanılan Enzimler	16
3.1.3. Kullanılan Kitler	17
3.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	17
3.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları	18
3.1.6. Kullanılan Besiyerleri	18
3.1.7. Kullanılan Antibiyotikler	19
3.1.8. Kullanılan Plazmitler	20
3.1.9. Kullanılan Çözeltiler	21
3.1.10. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Yöntemler	22

3.2.1.12.1. <i>sodA</i> Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve PCR	41
3.2.1.12.2. <i>sodA</i> Geninin pLEB124 Vektörüne <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	44
3.2.1.12.3. <i>sodA</i> Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	44
3.2.1.12.4. <i>sodA</i> Geninin pSK Vektörüne Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	45
3.2.1.12.5. <i>sodA</i> Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124'e Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	45
3.2.1.12.6. <i>L. lactis</i> Suşunda <i>sodA</i> Geninin Kontrollü İfadesinin Sağlanması için Çinko (Zn ⁺) ile Uyarılabilen Zirex Sistemi'nin Kullanılması	46
3.2.1.12.7. <i>sodA</i> Geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em Vektörlerine "In Fusion HD Cloning Kit" ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	46
3.2.2. Fermentasyon Çalışmaları	46
3.2.2.1. Kullanılan Bakteri Suşları ve Büyüme Koşulları	46
3.2.2.2. Büyüme Eğrilerinin Hazırlanması	47
3.2.2.3. Nisin Üretiminin Belirlenmesi	47
3.2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Tespiti	48
3.2.2.5. H ₂ O ₂ Ölçümü	48
3.2.2.6. RNA İzolasyonu ve Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi	49
3.2.2.7. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR, RT-qPCR) Kullanılarak Rölatif Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi	49
3.2.2.8. Fermentör Çalışmaları	51
3.2.2.9. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	53
4.1. Klonlama Çalışmaları	53
4.1.1. <i>katE</i> Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar	53
4.1.1.1. <i>B. subtilis</i> Katalaz (<i>katE</i>) Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve <i>katE</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	53
4.1.1.2. <i>katE</i> Geninin, pLEB124 Mekik Vektörüne <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	55

4.1.1.3. <i>katE</i> Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	56
4.1.1.4. <i>katE</i> Geninin pBluescript SK (pSK) Vektörüne Klonlanması	59
4.1.1.5. <i>katE</i> Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124 Plazmidine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	61
4.1.1.6. <i>katE</i> Geninin pLEB124 Vektörüne “In Fusion HD Cloning Kit” ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	64
4.1.1.7. <i>katE</i> Geninin Çinko (Zn ⁺) ile Uyarılabilen Bir Promotorun Altına Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar (Zirex Sistemi)	66
4.1.1.8. pILZ-Em Plazmidinin Replikasyon Orijini Bölgesinin pSK Plazmidine Aktarılmasına Yönelik Çalışmalar	70
4.1.1.9. Klonlama Çalışmalarının <i>E. coli</i> $\Delta katE$ Suşu Kullanılarak Denenmesi	72
4.1.1.10. <i>katE</i> Geninin pCZ-Cm Vektörüne PCR ile Doğrudan Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	72
4.1.2. <i>sodA</i> Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar	74
4.1.2.1. <i>L. lactis</i> Süperoksit Dismutaz (<i>sodA</i>) Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve <i>sodA</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	74
4.1.2.2. <i>sodA</i> Geninin, pLEB124 Mekik Vektörüne <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	76
4.1.2.3. <i>sodA</i> Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine <i>E. coli</i> 'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	76
4.1.2.4. <i>sodA</i> Geninin pBluescript SK (pSK) Vektörüne Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	78
4.1.2.5. <i>sodA</i> Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124 Plazmidine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	79
4.1.2.6. <i>sodA</i> Geninin Çinko (Zn ⁺) ile Uyarılabilen Bir Promotorun Altına Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar (Zirex Sistemi)	81
4.2. Fermentasyon Çalışmaları	83

4.2.1. Glutasyon ve Pirüvat Varlığında <i>L. lactis</i> Hücrelerinin Büyümesi ve Nisin Üretimi	83
4.2.2. GSH ve Pirüvat Varlığında Büyütülen <i>L. lactis</i> Hücrelerinin Oksidatif Stres Seviyesinin Değerlendirilmesi	87
4.2.2.1. H ₂ O ₂ Seviyesinin Belirlenmesi	87
4.2.2.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	88
4.2.2.3. Stres Genlerinin Transkripsiyonel Analizi	89
4.2.3. Fermentör Koşullarında Glutasyon ve Pirüvat Varlığında <i>L. lactis</i> Hücrelerinin Büyümesi ve Nisin Üretimi	94
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	97
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	112
EKLER	113

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
~	: Yaklaşık
Amp	: Ampisilin
ATP	: Adenozin trifosfat
<i>Bam</i> HI	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz I
bç	: Baz çifti
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
Chl	: Kloramfenikol
CTAB	: Setil trimetilamonyum bromide
Da	: Dalton
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: N,N,N',N'-tetrametiletilediamin
Ert	: Eritromisin
g	: Gram
GSH	: L-Glutatyon indirgenmiş
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
IPTG	: İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid
KCl	: Potasyum klorür
Kn	: Kanamisin
KOAc	: Potasyum asetat
L	: Litre
LB	: Luria Bertani broth
M	: Molar
MgCl ₂ .6H ₂ O	: Magnezyum klorür hegzahidrat
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnCl ₂ .4H ₂ O	: Mangan klorür tetrahidrat

MOPS	: 3-morfolinopropan-1-sulfonik asit
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
<i>Nco</i> I	: <i>Nocardia corallina</i> endonükleaz I
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ .6H ₂ O	: Amonyum demir sülfat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sn	: Saniye
<i>Spe</i> I	: <i>Sphaerotilus species</i> endonükleaz I
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
<i>Xho</i> I	: <i>Xanthomonas holcicola</i> endonükleaz I
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Wedge modeli.	7
2.2: Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Lipid II modeli.	8
2.3: Nisin öncülünün (a) ve olgun nisinin (b) yapılarının şematik gösterimleri.	9
2.4: Nisin biyosentezinden sorumlu olan gen kümesinin organizasyonu.	10
2.5: <i>L. lactis</i> 'te nisin biyosentezinin ve bu biyosentezin düzenlenmesinin şematik gösterimi.	12
3.1: Çalışmada kullanılan moleküler DNA belirteçleri.	17
3.2: <i>P_{czcD}</i> promotorunun nükleik asit dizisi.	38
3.3: Zirex sisteminde kullanılan pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitleri.	39
3.4: Asidik koşullar altında 2- tiyobarbitürik asit (TBA) ile malondialdehit (MDA) arasında gerçekleşen reaksiyon.	48
4.1: <i>B. subtilis</i> 168 soyunun genomik DNA'sının agaroz jeldeki görünümü.	53
4.2: "F Primer <i>katE</i> BamHI" ve "R Primer <i>katE</i> BamHI" primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> genine (2475 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	54
4.3: "F Primer <i>katE</i> " ve "R Primer <i>katE</i> XhoI" primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> (2466 bç) genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	55
4.4: pLEB124 plazmit DNA'sının agaroz jeldeki görünümü.	55
4.5: pLEB124- <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar.	56
4.6: "F Primer P ₈ XhoI" ve "R Primer P ₈ <i>katE</i> " primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P ₈ promotörü isimli PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	57
4.7: Çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P ₈ - <i>katE</i> fragmanının (2655 bç) agaroz jeldeki görünümü.	57
4.8: A. pLEB21 plazmit DNA'sı (1), pLEB579 plazmit DNA'sı (2); B. <i>XhoI</i> enzimi ile kesilmiş pLEB21 plazmit DNA'sı (3400 kb); C. <i>XhoI</i> enzimi ile kesilmiş pLEB579 plazmit DNA'sı (2900 kb).	58

4.9.	pSK– <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar (1-6).	59
4.10:	A. pSK– <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar (sırasıyla 1-5), pSK plazmit DNA’sı (2961 bç) (P); B. 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’ların <i>EcoRI</i> enzim kesimi sonuçları (1-5).	60
4.11.	Katalaz aktivitesi.	61
4.12:	“F Primer <i>katE BamHI</i> ” ve “R Primer <i>katE</i> kanamisin” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> genine (2098 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	62
4.13:	“F Primer kanamisin RBS” ve “R Primer kanamisin <i>BamHI</i> ” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen kanamisin genine özgü ürünün (1260 bp) agaroz jeldeki görünümü.	62
4.14:	Katalaz ve kanamisin genlerini birleştirmek için yapılan çakışan (overlap) PCR sonucunun agaroz jeldeki görünümü.	63
4.15:	“F Primer <i>katE124 Infusion</i> ” ve “R Primer <i>katE124 Infusion</i> ” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> genine (2509 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	65
4.16:	pLEB124– <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar.	65
4.17:	“F Primer <i>katE pCZ/pILZ</i> ” ve “R Primer <i>katE pCZ/pILZ KpnI</i> ” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> genine (2453 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	66
4.18:	pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmit DNA’larının agaroz jeldeki görünümü.	67
4.19:	F Primer <i>katE pILZ/pCZ Infusion</i> ve R Primer <i>katE pILZ/pCZ Infusion</i> primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> genine (2489 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	68
4.20:	pCZ-Cm– <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar.	69
4.21:	pCZ-Cm– <i>katE</i> rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan kit ile yapılan plazmit izolasyonu sonucu.	70

- 4.22: “F Primer pILZ ori” ve “R Primer pILZ ori” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen pCZ-Cm plazmidinin replikasyon orijinine (2213 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 71
- 4.23: A. 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar, pSK plazmit DNA’sı (2961 bç) (P);
B. 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’ların *SpeI* enzim kesim sonuçları. 71
- 4.24: “F Primer *katE* PCR” ve “R Primer *katE* PCR” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen ve *katE* (2480 bç) genine ait olduğu düşünülen PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 73
- 4.25: *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA’sının agaroz jeldeki görünümü. 74
- 4.26: “F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (753 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 75
- 4.27: “F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 75
- 4.28: pLEB124–*sodA* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar. 76
- 4.29: “F Primer P₈ *XhoI BssHII*” ve “R Primer P₈ *sodA*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P₈ promotoruna ait DNA fragmanının agaroz jeldeki görünümü. 77
- 4.30: “F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 77
- 4.31: Çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈–*sodA* fragmanının (929 bç) agaroz jeldeki görünümü. 78
- 4.32: pSK – *sodA* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar. 79
- 4.33: F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA* kanamisin primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (654 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. 79

4.34:	<i>sodA</i> – kanamisin fragmanını elde etmek için gerçekleştirilen çakışan (overlap) PCR sonucunun agaroz jeldeki görünümü.	80
4.35:	F Primer <i>sodA</i> pCZ/pILZ <i>NcoI</i> ve F Primer <i>sodA</i> pCZ/pILZ <i>KpnI</i> primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>sodA</i> genine (797 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	82
4.36:	F Primer <i>sodA</i> pILZ/pCZ Infusion ve F Primer <i>sodA</i> pILZ/pCZ Infusion primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen <i>sodA</i> genine (753 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü.	82
4.37:	GSH içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) <i>L. lactis</i> hücrelerinin büyüme eğrileri.	83
4.38:	<i>L. lactis</i> hücrelerinin GSH içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) gerçekleştirdikleri nisin üretimleri.	84
4.39:	Pirüvat içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik şartlar altında hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) <i>L. lactis</i> hücrelerinin büyüme eğrileri.	84
4.40:	<i>L. lactis</i> hücrelerinin pirüvat içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) gerçekleştirdikleri nisin üretimleri.	85
4.41:	30 °C'ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde 4, 6 ve 8 saat boyunca büyütülen <i>L. lactis</i> hücrelerinde <i>nisZ</i> geninin rölatif ekspresyonu (a) ve nisin üretimi (b).	86
4.42:	<i>L. lactis</i> hücrelerinin GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda büyütülmesi sırasında besiyerindeki pH değişimleri.	87
4.43:	30 °C'ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen <i>L. lactis</i> hücrelerinin H ₂ O ₂ seviyesi.	88
4.44:	30 °C'ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen <i>L. lactis</i> hücrelerinin H ₂ O ₂ (a) ve MDA (b) seviyeleri.	89
4.45:	30 °C'ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen <i>L. lactis</i> hücrelerinde, fermentasyonun 4., 6. ve 8. saatinde stres ile ilişkili genlerin [<i>sodA</i> (A), <i>ahpF</i> (B), <i>ahpC</i> (C), <i>gshR</i> (D), <i>trxBI</i> (E), <i>noxE</i> (F), <i>recA</i> (G) ve <i>relA</i> (H)] ve ETS bileşenlerini kodlayan genlerin [<i>cydA</i> (I) ve <i>noxB</i> (J)] rölatif ekspresyonu.	91
4.45:	Devam.	92

- 4.46: 30 °C'ta aerobik koşullar altında 6.4 mM GSH (A) veya 10 mM pirüvat (B) içeren GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, fermentasyonun 4., 6. ve 8. saatinde stres ile ilişkili genlerin [*sodA* (A), *ahpF* (B), *ahpC* (C), *gshR* (D), *trxB1* (E), *noxE* (F), *recA* (G) ve *relA* (H)] ve ETS bileşenlerini kodlayan genlerin [*cydA* (I) ve *noxB* (J)] kontrole göre normalize edilmiş ifadesi. 94
- 4.47: 30 °C'ta aerobik koşullarda GM17 besiyerinde GSH veya pirüvat varlığında ve yokluğunda (kontrol) erlen veya fermentör koşullarında *L. lactis* hücrelerinin büyüme eğrileri. 95
- 4.48: 30 °C'ta aerobik koşullarda GM17 besiyerinde GSH veya pirüvat varlığında ve yokluğunda (kontrol) erlen veya fermentör koşullarında *L. lactis* hücrelerinin nisın üretimleri. 96

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:	Sayfa
2.1: Bakteriyosinler ve özellikleri.	4
3.1: Bu çalışmada kullanılan bakteri soyları.	18
3.2: Bu çalışmada kullanılan besiyerleri.	18
3.2: Devam.	19
3.3: Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.	20
3.4: Tez çalışması kapsamında kullanılan plazmitler ve özellikleri.	20
3.5: Bu çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	21
3.5: Devam.	22
3.6: <i>B. subtilis</i> 168 soyuna ait <i>katE</i> geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	27
3.6: Devam.	28
3.6: Devam.	29
3.7: Phusion DNA Polimeraz enzimi ile hazırlanan PCR karışımı.	30
3.8: Phusion DNA Polimeraz enzimi ile gerçekleştirilen PCR koşulları.	31
3.9: <i>L. lactis</i> N8 soyuna ait P ₈ promotorunun PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	33
3.10: Kanamisin direnç geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çifti.	36
3.11: “In Fusion” klonlama reaksiyonu	37
3.12: pILZ-Em plazmidinin replikasyon orijini bölgesinin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	40
3.13: <i>L. lactis</i> N8 soyuna ait <i>sodA</i> geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	42
3.13: Devam.	43
3.14: <i>L. lactis</i> N8 soyuna ait P ₈ promotorunun PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	44
3.15: RT-qPCR analizinde kullanılan primerler.	50
3.16: RT-qPCR programı.	51
4.1: Rekombinant plazmitlerde <i>katE</i> geninin yönüne göre <i>EcoRI</i> enzim kesimi sonucunda elde edilmesi beklenen DNA uzunlukları.	60

4.2:	<i>katE</i> ve kanamisin genlerini birleştirmek için overlap (çakışan) PCR’de kullanılmak üzere yeniden tasarlanan primer çiftleri.	64
4.3:	<i>sodA</i> ile kanamisin genlerinin birleştirilmesi için overlap (çakışan) PCR’de kullanılmak üzere yeniden tasarlanan primer çiftleri.	81
4.4:	RT-qPCR analizi ile incelenen genler.	90

1. GİRİŞ

Bakteriyosinler, bazı bakteriler tarafından üreme ortamındaki yakın akraba türler ile rekabet edebilmek amacıyla sentezlenen, kısa zincirli protein yapısında doğal antimikrobiyal maddelerdir [1]. Pek çok bakteri tarafından çok çeşitli bakteriyosinler üretilmesine rağmen, hali hazırda gıdalarda koruyucu olarak kullanımı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından onaylanmış tek bakteriyosin nisindir. Günümüzde nisin, sofrata tuzununkine benzer toksisitesi [2] ve özellikle Gram pozitif bakteriler üzerindeki güçlü antimikrobiyal etkisi sebebiyle [3] E234 kodu ile süt ve süt ürünlerinde, konserve meyve ve sebzeler ile et, kanatlı ve deniz ürünlerinde, ayrıca şarap ve bira sanayinde koruyucu olarak 48'den fazla ülkede kullanılmaktadır [4, 5].

Gıdalarda koruyucu olarak nisinin kullanımını kısıtlayan temel neden, nisinin kimyasal olarak sentezlenmeyip yalnızca *Lactococcus lactis* bakterisinin belirli suşları tarafından üretiliyor olmasıdır [3]. Bu nedenle, nisin kullanımını yaygınlaştırmak için öncelikle üretici *L. lactis* suşlarının üretim veriminin artırılması gerekmektedir. Nisin üretim veriminin artırılması, bu maddenin üretim ve saflaştırma maliyetlerini azaltacağı için gıdalarda koruyucu olarak nisinin kullanımını arttıracak; böylelikle tüketicilerin kimyasal koruyucular yerine "organik gıda koruyucu" olarak nisin içeren ürünlere ulaşması kolaylaşacaktır. Bugüne kadar nisin üretim miktarının artırılması amacıyla yapılan çalışmalar, üretici suşların büyüme koşullarının (besiyeri içeriği, pH, sıcaklık, havalandırma vb.) optimize edilmesi [6] veya üretici suşlarda yapılan genetik değişiklikler ile daha yüksek miktarda nisin üretebilen rekombinant suşların eldesi [7, 8] üzerine yoğunlaşmıştır.

Nisin üretimi primer metabolit kinetiği göstermektedir ve bu nedenle belirli bir noktaya kadar büyüme ile paralel şekilde nisin üretimi de artış göstermektedir [9]. Bu nedenle, *L. lactis* hücrelerinin büyüme koşullarının iyileştirilmesinin nisin üretim miktarını artırması beklenmektedir. *L. lactis* hücrelerinde, büyümeye engel teşkil eden sebeplerin başında asit stresi ve oksidatif stres gelmektedir.

L. lactis, hücrenel reaksiyonlar sırasında açığa çıkan reaktif oksijen türlerini (ROS: O_2^- , OH^\bullet ve H_2O_2) hücre için toksik olmayan/daha az toksik olan bir forma dönüştürebilmek için bir "savunma sistemine" sahiptir. Ancak, oluşan ROS miktarı, hücrenin savunma sisteminin kapasitesini aştığında oksidatif stres meydana gelmektedir. Bu savunma sisteminin enzimlerinden biri süperoksit anyon radikalini

H₂O₂'ye dönüştüren mangan bağımlı süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir. NADH oksidaz/NADH peroksidaz enzimleri, *L. lactis*'in savunma sisteminde yer alan bir diğer enzim sistemidir. NADH oksidaz enziminin aktivitesi de SOD gibi H₂O₂ üretimine neden olmaktadır. Her ne kadar NADH peroksidaz enzimi belirli bir noktaya kadar H₂O₂ giderimi sağlasa da, NADH peroksidaz enzim aktivitesinin NADH oksidaz enzim aktivitesine oranla daha düşük olması, ek olarak SOD tarafından üretilen H₂O₂ varlığı ve *L. lactis* hücrelerinin katalaz enzimine sahip olmaması gibi nedenlerle NADH peroksidaz enzimi H₂O₂ gideriminde yetersiz kalmaktadır. Hücrede biriken H₂O₂ molekülü, demir varlığında gerçekleşen Fenton reaksiyonu sonucu daha toksik olan OH[•] molekülüne dönüşmektedir [10, 11]. Tüm bu toksik moleküllerin hücrede birikimi sonucu hücrenin savunma sisteminin kapasitesini aşması, *L. lactis* hücrelerinde oksidatif strese yol açmaktadır. Bu tez çalışması, *L. lactis* hücrelerinin oksidatif stres yükünü azaltacak girişimlerle daha iyi büyüyebileceği ve böylece daha çok nisin üretebileceği hipotezi üzerine şekillendirilmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tezin temel amacı, gıda koruyucu olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kullanımına izin verilmiş tek bakteriyosin olan nisin üretimini, *L. lactis*'in oksidatif strese toleransını artırarak geliştirmektir.

Bu amaç doğrultusunda, çalışmada, *B. subtilis* katalaz geni (*katE*) ile *L. lactis* süperoksit dismutaz geni (*sodA*), *L. lactis*'te hem düşük hem de yüksek düzeyde ifade edilerek oksijen stresinin giderilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak gerçekleştirilen bütün denemelere rağmen bu genleri ifade eden rekombinant *L. lactis* hücresi elde edilememiştir.

Tüketicilerin son yıllarda giderek artan “organik gıda katkıları” içeren ürünler kullanma isteği göz önüne alınarak, bu tez çalışmasının devamında, genetik manipülasyonlar yerine *L. lactis*'in büyüme ortamına antioksidanlar eklenerek oksidatif stresin azaltılması ve dolaylı olarak nisin üretiminin artırılması yoluna gidilmiştir. Bunun için, antioksidan özellikleri bilinen GSH ve pirüvat farklı konsantrasyonlarda besiyerine eklenmiş ve *L. lactis* hücrelerinin büyümesi, nisin üretimi ve stres cevabı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre, hem yokluğunda besiyerinde GSH ve pirüvat moleküllerinin bulunması, daha yüksek *L. lactis* biyokütlesine ulaşılmasına ve bu bakteri tarafından

Üretilen nisin miktarının artmasına sebep olmaktadır. GSH ve pirüvatın bu etkiyi *L. lactis* hücrelerinin oksidatif stres toleransını arttırarak gösterdiği, H₂O₂ miktarının ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesi ile gösterilmiştir. Aynı zamanda bu moleküllerin *L. lactis* hücrelerinin stres cevabı ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu transkripsiyonel analiz aracılığıyla tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *L. lactis*'in büyüme ortamına eklenen GSH ve pirüvatın, nisin üretimi üzerine olan olumlu etkisinin gösterildiği ilk çalışma olarak literatürde yerini almıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Nisinin Genel Özellikleri

Lactococcus lactis, gıda fermantasyonunda yüzyıllardır kullanılan laktik asit bakterilerinin bir üyesidir. Süt ürünleri için başlangıç kültürü olarak kullanılmasının yanı sıra *L. lactis* subsp. *lactis*, özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olan ve nisin adı verilen bir bakteriyosin üretmektedir [3].

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen doğal antimikrobiyal maddelerdir. Genellikle kısa zincirli protein yapısında olup, küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Hücrelerin büyüme ortamında birbirleriyle rekabet etmesi amacıyla üretildiklerinden, özellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Bu polipeptitler, gıda bozulmasına neden olan ve gıdalardan köken alan hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engellemekte ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadırlar [1]. Klaenhammer (1988), laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosinleri; moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen aminoasitlerinin olup olmayışı ve etki mekanizmaları gibi özelliklerini esas alarak 4 sınıfa ayırmıştır [12] (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Bakteriyosinler ve özellikleri.

Bakteriyosin Sınıfı	Özellikleri
Sınıf I bakteriyosinler (lantibiyotikler)	Ender bulunan aminoasitleri (lantionin ve türevleri) içeren peptidler
Sınıf II bakteriyosinler	Düşük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa), ısıya dayanıklı, lantionin içermeyen membran aktif peptidler
Sınıf III bakteriyosinler	Yüksek molekül ağırlığına sahip (>30 kDa), ısıya hassas proteinler
Sınıf IV bakteriyosinler	Proteine ilaveten zorunlu (essential) lipid veya karbonhidrat grupları içeren kompleks bakteriyosinler

Lantibiyotikler olarak adlandırılan Sınıf I bakteriyosinler grubuna ait olan nisin, gıda endüstrisinde kullanılmak üzere ticari olarak ilk kez 1953'te İngiltere'de satışa sunulmuştur [5]. Nisinin gıdalarda koruyucu olarak kullanımı, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO / WHO) tarafından 1969'da onaylanmıştır. 1983 yılında nisin, E234 numarası ile Avrupa gıda katkı maddeleri listesine eklenmiştir. Nisin, 1988'de Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS [Generally Recognized As Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilebilir Ürün)] statüsüne alınmıştır ve bu statüde yer alan tek bakteriyosindir. Bugüne kadar, nisin, gıda endüstrisinde, sofraya tuzununkine benzer toksisitesi nedeniyle [yaklaşık LD₅₀ (yavru kedi ve sıçan) 7 g/kg] [2] güvenli bir gıda koruyucu olarak kullanılmıştır.

Günümüzde nisinin gıdalarda koruyucu olarak kullanımı 48'den fazla ülkede onaylanmıştır. Nisin pek çok ülkede ilk olarak peynir üretiminde kullanıma girmiştir [13]. Nisinin kullanım alanı ilerleyen yıllarda giderek genişlemiş ve peynire ek olarak süt ve diğer süt ürünlerinde, konserve meyve ve sebzeler ile et, kanatlı ve deniz ürünlerinde ayrıca şarap ve bira sanayinde koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır [4, 5].

2.1.1. Nisinin Etki Mekanizması

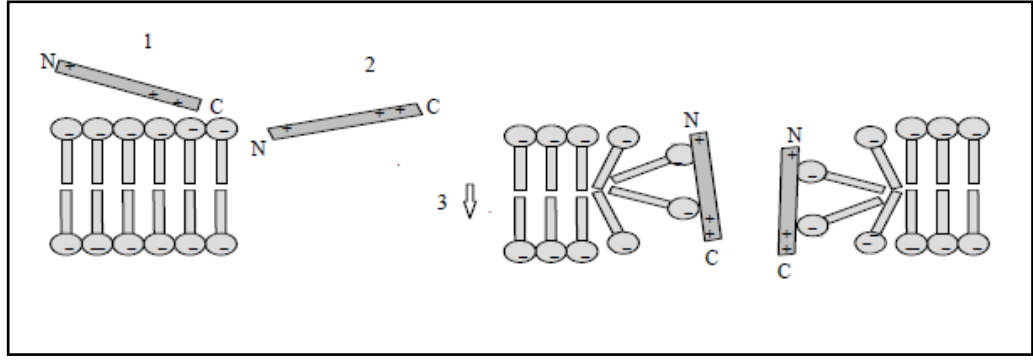
L. lactis tarafından rekabet içerisinde bulunduğu mikroorganizmalara karşı kullanılmak üzere üretildiğinden, nisin, özellikle Gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkilidir. Nisinin gıdalarda bulunan ve Gram pozitif özellik gösteren en önemli gıda patojenlerinden olan *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğu gösterilmiştir [14]. Gram negatif bakterilerin EDTA veya diğer şelatlayıcı ajanlarla muamelesi, söz konusu bakterilerin hücre duvarı geçirgenliğini arttırarak nisinin hücre zarı üzerine olan etkisini göstermesini kolaylaştırmaktadır [15].

Nisinin vejetatif hücrelerde hedef aldığı yer hücrelerin sitoplazmik zarıdır. Nisin, sitoplazmik zar üzerine olan bu etkisini 2 farklı yolla göstermektedir. Bunlardan birincisinde, nisin molekülünün pozitif yüklü N- ve C-terminal uçları ile hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin reaksiyona girmesiyle, sitoplazmik zar üzerinde, proton hareket kuvvetini ve pH dengesini bozan porlar oluşarak membran fonksiyonları bozulur. Hücre içinde yer alan aminoasitler, ATP ve monovalent katyonlar oluşan bu porlardan dışarı çıkar; hücrelerin membran potansiyeli hızlı bir şekilde azalır ve hücre lipozomlarında pH değeri düşerek sonunda

duyarlı hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durur ve bu durum hücrenin ölümü ile sonuçlanır [16]. İkincisinde ise nisin, bir peptidoglikan öncüsü olan lipid II molekülüne bağlanarak hücre duvarı biyosentezini inhibe etmektedir [4, 13].

Nisinin por oluşturma mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli modeller öne sürülmüştür. Bunlardan biri olan barrel-stave modele göre, başlangıçta nisin molekülleri lipid yüzeye bağlanırlar, sonrasında moleküller uygun membran potansiyeli varlığında membranın içerisine doğru hamle yaparlar. Membran içerisinde yerini alan nisin molekülleri, merkezi bir por çevresinde küme oluştururlar; bu şekilde por oluşumu tamamlanmış olur. Olayların oluş sırası öncelikle nisin moleküllerinin membrana girişi, daha sonrasında diğer nisin moleküllerinin por çevresinde birikmesi şeklindedir [17, 18].

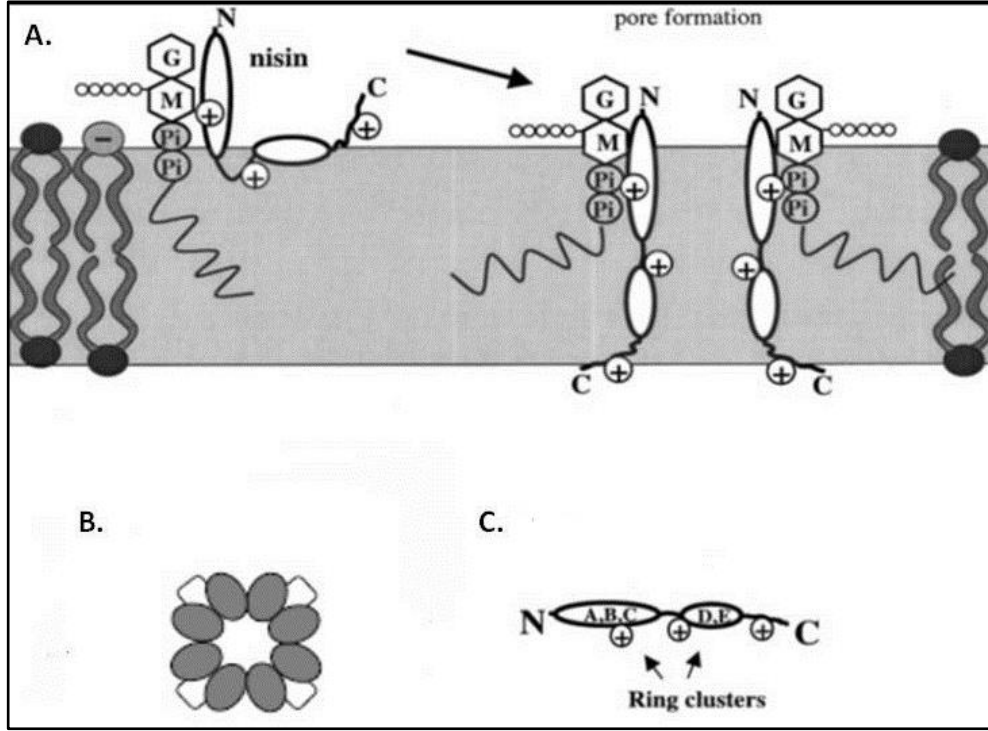
Wedge model olarak adlandırılan diğer bir modele göre ise nisin molekülleri bölgesel yüksek konsantrasyonları sayesinde membranın anyonik yüzeylerine sıkı bir şekilde bağlanırlar ve membranın lipid dinamiğini bozarlar. Öncelikle nisinin C-terminal ucundaki pozitif yükler, membranda yer alan fosfolipidlerin negatif yükleri ile elektrostatik olarak etkileşime girer (Şekil 2.1.1). Sonrasında nisin membran yüzeyine paralel bir duruma geçer; bu esnada nisinin N-terminal ucu C-terminale göre biraz daha derine girmektedir (Şekil 2.1.2). Nisinin anyonik fosfolipidlerle etkileşime girmesi sonucu lipid yüzeylerin eğilmesi ile kama (wedge) benzeri, spesifik olmayan por oluşur (Şekil 2.1.3). Oluşan porun ömrü milisaniyelerle ifade edilecek kadar kısadır. Sonrasında nisin hızlı bir şekilde membran yüzeyine paralel duruma geri döner. Bu modelin önemli bir yönü, nisin moleküllerinin, bakteri hücre membranındaki lipid katmanlarının konformasyonunu termodinamik olarak geçici şekilde bozması ve bu şekilde por oluşumunun sağlanmasıdır. Bu şekilde oluşan porlar doğaları gereği kararsızlardır çünkü lipidler katman yapılarını oluşturabilmek için tekrar düzenlenmeye çalışacaklardır [19] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Wedge modeli. 1. Nisin molekülünün membrana bağlanması. 2. Nisinin membrana girişi. 3. Por oluşumu.

Nisinin bir diğer por oluşturma mekanizması ise lipozomal membranların fosfolipid kompozisyonuna bağlıdır. Son çalışmalar ışığında nisinin, fosfolipid bileşenlerinden, hücre duvarı sentezinde öncül bir molekül olan lipid II molekülüne bağlanarak etkisini gösterdiği belirlenmiştir. İlk olarak nisin molekülünün N-terminal ucu, Şekil 2.2’de görüldüğü gibi lipid II molekülünün membranın hücre dışına yakın kısmında yer alan karbonhidrat içerikli kısmına bağlanmaktadır. Daha sonra nisinin C-terminal ucu, membranın karşı tarafına ulaşmaya kadar ilerler; böylece nisin-lipid II kompleksi poru oluşturur. Porun kararlılığı milisaniyelerden birkaç dakikaya kadar değişebilir. Daha sonra nisinin C-terminal ucu, membranın karşı tarafına ulaşmaya kadar ilerler. Böylece nisin-lipid II kompleksi poru oluşturur. Porun kararlılığı milisaniyelerden birkaç dakikaya kadar değişebilir [20].

Nisin ayrıca, Gram pozitif türler olan *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı etkilidir [21]. Nisin, diğer gıda koruyucularından farklı olarak, sporların çimlenmesi aşamasında etkili olmaktadır. Nisinin yapısında bulunan dehidroalanin ve dehidrobütirin aminoasitleri, çimlenen sporların membranlarında bulunan sülfidril gruplarına bağlanarak bakteriyostatik etki göstermektedir [22].

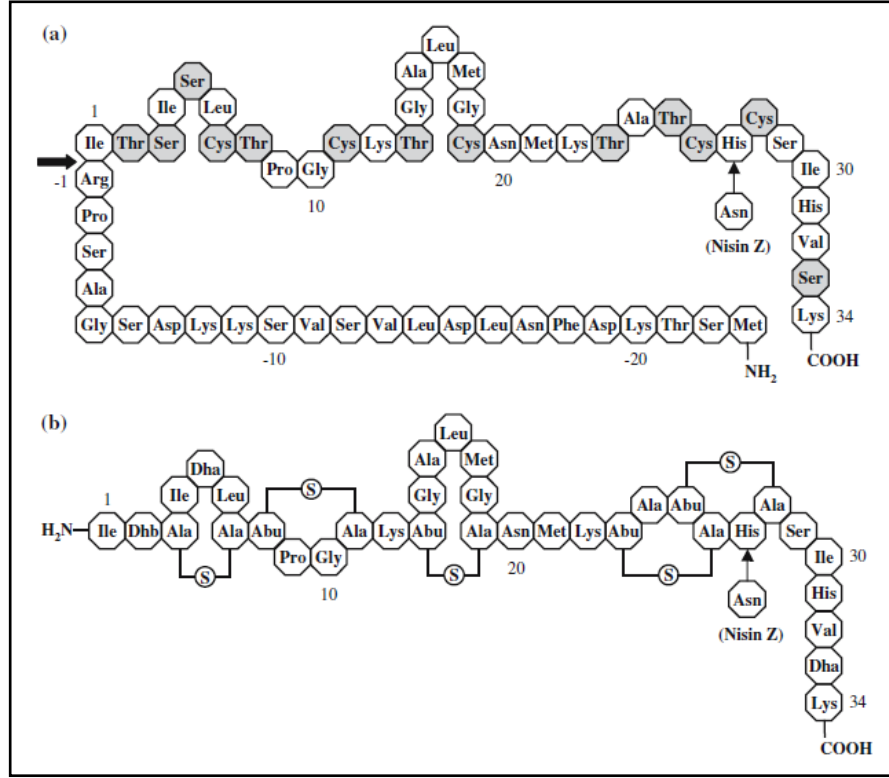


Şekil 2.2: Nisin molekülü tarafından por oluşumu için önerilen Lipid II modeli. A. Nisinin Lipid II molekülü üzerinden por oluşturma mekanizması. B. Nisin-lipid II kompleksinin üstten görünümü. C. Nisinin fonksiyonel açıdan önemli kısımları: N- uç köprüleri ABC, C- uç köprüleri DE ve aralarında bulunan esnek menteşe bölgesi. G: N-asetilglukozamin, M: N-asetilmuramik asit.

2.1.2. Nisinin Moleküler Yapısı

3354.25 Da moleküler ağırlığa sahip olan olgun nisin molekülü, dehidroalanin, dehidrobütirin gibi ender bulunan aminoasitleri içeren 34 aminoasitten meydana gelmiştir (Şekil 2.3). Nisinin yapısında bir lantionin ve dört β -metil lantionin halkası mevcuttur. Nisinin de dahil olduğu Sınıf I bakteriyosinlerin “lantibiyotikler” olarak isimlendirilmelerinin sebebi içerdikleri bu halkalardır [9].

Doğada en fazla bulunan nisin türevleri, Nisin A ve Nisin Z olarak tanımlanmıştır [23]. Bu iki nisin türevi benzer yapıya ve antimikrobiyal spektruma sahiptir ancak 27. pozisyondaki tek bir aminoasit rezidüleri farklıdır. Nisin A’da bu aminoasit histidin iken, Nisin Z’de ise asparajindir (Şekil 2.3). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda nisin molekülünün Nisin Q [24], Nisin U [25] ve Nisin F [26] gibi farklı türevleri de tanımlanmıştır.



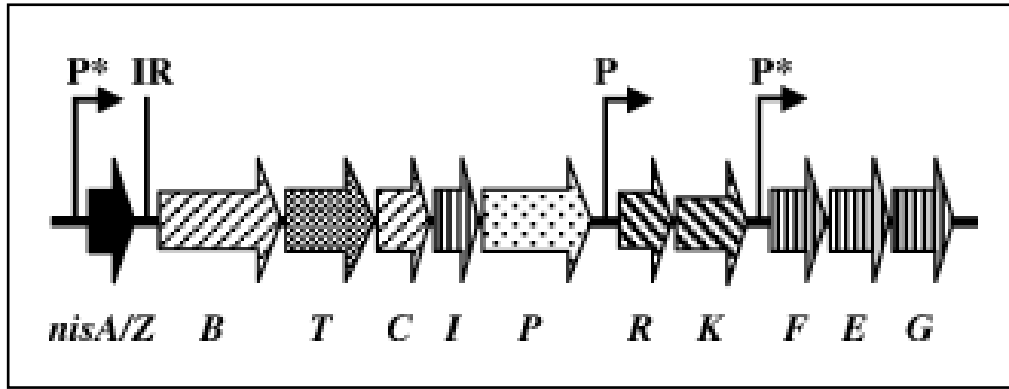
Şekil 2.3: Nisin öncülünün (a) ve olgun nisinin (b) yapılarının şematik gösterimleri. NisB ve NisC tarafından modifiye edilecek rezidüler gri olarak gösterilmiştir. Siyah ok, NisP tarafından lider peptidin çıkartılmasını işaret etmektedir. Şekilde görülen yapı Nisin A'ya aittir; ancak, 27. pozisyonadaki histidin rezidüsünün yerinde asparajin olduğunda Nisin Z oluşmaktadır. Dha dehidroalanini, Dhb dehidrobütirini, Ala-S-Ala lantionini ve Abu-S-Ala β -metil-lantionini ifade etmektedir.

2.1.3. Nisin Biyosentezinden Sorumlu Gen Kümesi

L. lactis'in belirli suşları tarafından gerçekleştirilen nisin biyosentezinden, 11 genden oluşan bir gen kümesi sorumludur (Şekil 2.4). Bu regülonda, nisin ile uyarılan bir promotora sahip *nisA(Z)BTCIPRK* ve *nisFEG* operonları ile sürekli çalışan bir promotora sahip *nisRK* operonu yer almaktadır (Şekil 2.4). Bu gen kümesinde yer alan genler, konjugatif nisin-sükroz transpozonunda yer alırlar [27]. *nisA(Z)* geni, 57 aminoasit rezidüsünden oluşan *nisA(Z)* öncül peptidini kodlar. Bu aminoasitlerden 23 tanesi, nisin öncülünün modifikasyonunda rol oynayan N-terminal lider peptidi oluştururlar [28].

nisB ve *nisC* genleri ise hücre içi post-translasyonel modifikasyonda görev alan membran ile ilişkili proteinleri kodlarlar. Post-translasyonel modifikasyonda serin ve treonin rezidüleri dehidroalanin ve dehidrobütirin oluşturmak üzere dehidrasyona uğrarlar. Daha sonra, dehidrasyona uğramış rezidüler üst taraflarında bulunan

sisteinlerle eşleşirler ve bu yolla karakteristik (β -metil) lantiyonin halkalarını meydana getiren tiyoeter bağlarını oluştururlar [27]. *nisT* geni, ABC taşıyıcı ailesine ait olduğu düşünülen pütatif bir taşıyıcı protein kodlamaktadır. Bu protein, modifiye olmuş nisin öncülünün sitoplazmik membran boyunca taşınmasında görev alır [29]. *nisP* geni ise, hücre dışı proteolitik aktivasyondan sorumlu olan bir proteaz kodlar. Nisin öncülünün membran boyunca taşınması esnasında veya taşınmanın hemen sonrasında lider peptid, hücre dışı olgun nisin peptidini oluşturmak için NisP proteaz tarafından çıkartılır [30].



Şekil 2.4: Nisin biyosentezinden sorumlu olan gen kümesinin organizasyonu. Şekilde verilen genlerin kodladığı ürünlerin fonksiyonları şöyle sıralanabilir: *nisA/Z*, nisin öncül peptidi; *nisB* and *nisC*, post-translasyonel modifikasyon; *nisT*, translokasyon; *nisP*, proteaz; *nisR* and *nisK*, nisin biyosentezinin düzenlenmesi; *nisI* ve *nisFEG*, bağışıklık. Düzenlenebilir promotorlar P* ile, konstitütif promotorlar ise P ile gösterilmiştir. IR ise geniş bir ters tekrar dizisini ifade etmektedir.

Nisin üretici hücrelerin nisine karşı bağışıklığının sağlanmasında *nisI* ve *nisFEG* genleri birlikte rol oynarlar. *nisI* geni nisin üretici bakterinin nisine karşı kendisini korumasında görev alan bir lipoprotein kodlarken [27], *nisFEG* genleri ise üretilen nisin hücre dışına atılmasından sorumlu olan pütatif bir ABC taşıyıcı protein kodlarlar [31]. *nisR* ve *nisK* genleri, iki bileşenli düzenleyici sistemler sınıfına ait olan sırasıyla bir cevap düzenleyici [30] ve bir sensör kinaz [31] kodlarlar.

2.1.4. Nisin Biyosentezi

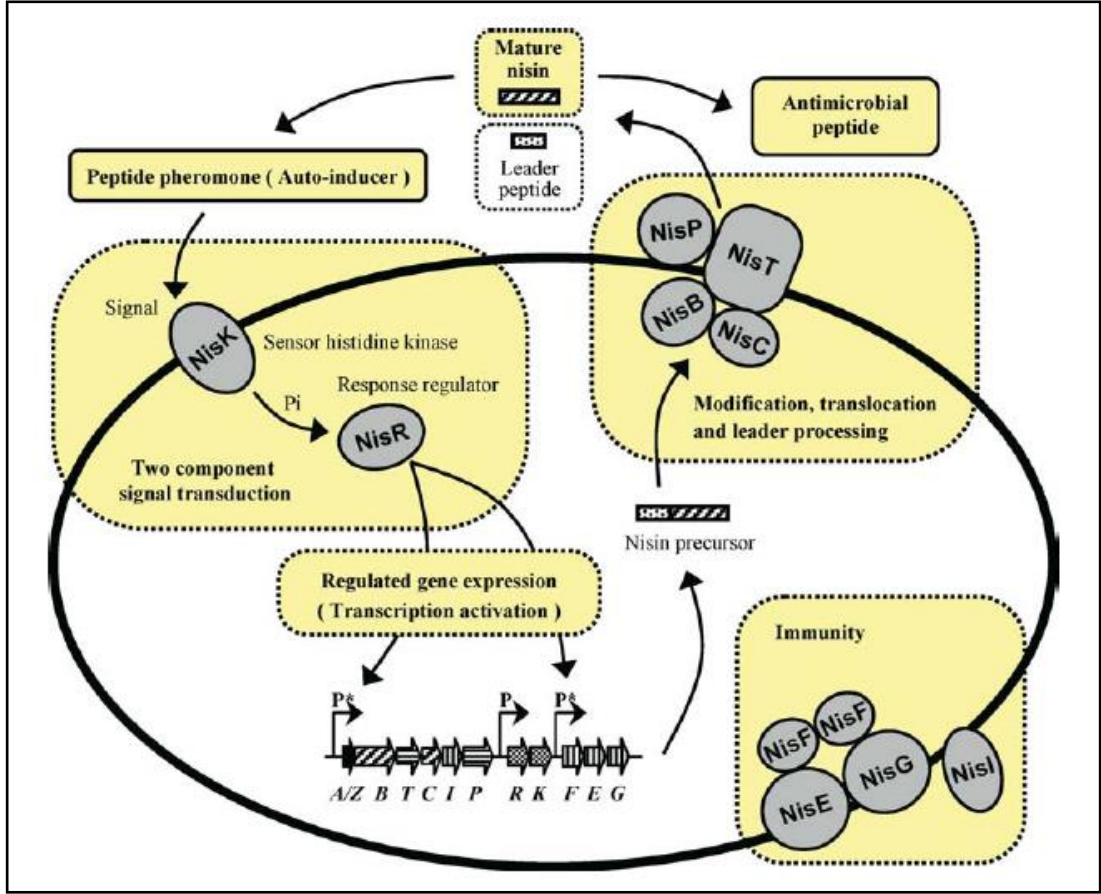
Nisin biyosentezinde ribozomlarda sentezlenen inaktif öncü peptid, iki ana yapıyı içermektedir. Bunlardan birincisi, sentezlenen molekülü inaktif halde tutan lider peptit (23 aminoasit) ve ikincisi de biyolojik aktif nisin öncüsü olan propeptiddir (34

aminoasit). Translasyon sonrasında lider peptid, üretilen molekülün sitoplazmik membranda bulunan modifikasyon mekanizmasına yönlendirilmesini sağlamaktadır. Öncelikle NisB proteini, serin ve treonini; sırasıyla dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) aminoasitlerine dönüştürmek için dehidre eder. Sonrasında, NisC vasıtasıyla komşu sistein kalıntılarının tiyol grupları ve dehidro-aminoasitlerin çift bağları reaksiyona girerek tiyoeter köprülerini oluştururlar. Nisin molekülü, ABC taşıma proteini NisT vasıtasıyla hücre dışına taşınır. Nisin molekülünden lider peptidin proteolitik olarak ayrılması serin proteaz NisP tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.7) [9, 28].

Nisin üretimi, yeterli sayı algılama (quorum sensing) sistemi ile düzenlenmektedir. Sistemde bir indükleyici peptid feromon (nisin) ve iki elemanlı (NisRK) regülatörler görev almaktadır. Bu sistemin işleyişinde öncelikle hücre dışındaki olgun nisin, NisK'ya (histidin kinaz) bağlanır. Nisin ve NisK'nın etkileşimi sonucunda oluşan hücre dışı sinyale yanıt olarak, NisK hücre içinde bulunan bir histidin kalıntısını otofosforilize eder. Sonrasında bu fosforil grup, transkripsiyonel aktivatör olan hücre içi NisR'nin bir aspartik asit kalıntısına aktarılır. Bu durum yanıt regülatöründe (NisR) konformasyonel bir değişikliği uyarır. Aktive edilen yanıt regülatörü NisR, nisA(Z) ve nisF indüklenebilen promotorlarının alt akış yönünde bulunan genlerin transkripsiyonunu yönetir (Şekil 2.5) [9, 28].

2.2. Nisin Üretiminin Arttırılması için Yapılan Çalışmalar

Kimyasal olarak sentezlenemediğinden, *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının nisin üretim verimini arttırmanın farklı yollarını bulmak önem taşımaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalar, *L. lactis* hücrelerinin büyüme koşullarının (besiyeri içeriği, pH, sıcaklık, havalandırma vb.) optimize edilmesi veya yaban tipe göre daha yüksek düzeyde nisin üretebilen rekombinant hücrelerin eldesi üzerinde yoğunlaşmıştır.



Şekil 2.5: *L. lactis*'te nisin biyosentezinin ve bu biyosentezin düzenlenmesinin şematik gösterimi.

Nisin üretiminin doğrudan büyümeyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [6] ve bu nedenle, biyokütleyi artırma girişimlerinin nisin üretiminin artmasına neden olacağı beklenmektedir. Oksidatif stres ve asit stresi, *L. lactis* hücrelerinin büyümesini olumsuz etkileyen ana faktörlerdir. Hücresel işlemler sırasında, yüksek oksitleyici potansiyeli olan reaktif oksijen türleri (ROS: O_2^- , OH^\bullet ve H_2O_2) oluşur ve bu moleküller hücre içinde, lipitler, proteinler, RNA ve DNA ile reaksiyona girerek ölümcül hasarlara neden olabilirler [32]. Oksidatif stres hücrenin savunma sistemini aştığında toksisite oluşmaktadır [33]. Oksidatif stresle baş edebilmek için *L. lactis* hücrelerinin birkaç enzimi mevcuttur. Bunlardan biri, süperoksit anyon radikalini H_2O_2 'ye dönüştüren mangan bağımlı süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir [34]. Anaerobik şartlar altında da temel seviyede çalışan bu enzimin, besiyerinde artan O_2 konsantrasyonları ile birlikte aktivitesinin arttığı bulunmuştur [35].

Hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında NADH oksidaz/NADH peroksidaz sistemi de etkilidir. SOD gibi, NADH oksidaz enziminin aktivitesi de başka

bir toksik molekül olan H_2O_2 'nin üretilmesine neden olur. NADH peroksidazın H_2O_2 gideriminde yetersiz kalması ve katalaz enziminin yokluğu, hücrede H_2O_2 birikimine neden olur. Biriken toksik H_2O_2 , özellikle demir varlığında gerçekleşen Fenton reaksiyonu sonucunda daha toksik bir molekül olan OH^* 'ın oluşumuna sebep olmaktadır [10, 11]. Tüm bu toksik moleküllerin hücrede birikimi, *L. lactis* hücrelerinde oksidatif strese yol açmaktadır.

Rochat ve arkadaşları (2005), *Bacillus subtilis* katalaz enzimi KatE'yi, bu enzimden yoksun *L. lactis*'te üreterek, bu organizmanın oksidatif strese direncini test etmişlerdir. KatE'nin *L. lactis* MG1363'te üretilmesiyle, 1 saat boyunca 4 mM hidrojen peroksite maruz kalmış hücrelerin canlılığında 800 kat artış sağlanmıştır. Aynı şekilde, KatE sayesinde, respirasyon yeteneğinden yoksun *cydA* mutant suşunun uzun süreli (3 gün) oksijenli kültürlerinin canlılığında 160 kat artış görülmüştür. Aynı grup, DNA tamir mekanizmasından yoksun *cydA/recA* mutant suşunda KatE'nin DNA'yı oksidatif strese karşı koruduğu ve uzun süreli oksijenli ortamlarda DNA degradasyonunu azalttığını göstermiştir. Özetle, bu çalışmayla, *L. lactis*'in aktif olarak üretebildiği katalazın, bu hücrelerin oksijene olan hassasiyetini büyük oranda giderdiği bulunmuştur [36].

Büyüme ortamında antioksidan özellik gösteren bir molekül olan glutatyon (GSH) varlığının, H_2O_2 muamelesinin ardından, farklı *L. lactis* suşlarının hayatta kalma oranlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Söz konusu çalışma, hücrelerin bir kısmının hücre içi GSH biriktirdiğini ve bunun, H_2O_2 'nin bir GSH/GSH redüktaz sistemi tarafından enzimatik olarak yok edilmesine neden olduğunu ortaya koymuştur [37].

Başka bir çalışmada, GSH üretiminden sorumlu olan *Escherichia coli* genlerinin (g-glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz) heterolog ekspresyonu, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 hücrelerinin oksidatif strese karşı dirençli bir fenotip sergilemesine neden olmuştur. GSH üreten bu rekombinant hücreler, H_2O_2 (150 mM) ve bir süperoksit üretici molekül olan menadion (30 μ M) maddesine maruz kaldıktan sonra sağkalım artmıştır [38].

Papagianni ve Avramidis (2012), *L. lactis*'te *Aspergillus niger*'in alternatif oksidaz genini (*aox1*) eksprese ederek oksidatif strese daha iyi yanıt veren bir tür elde etmişlerdir. Bu rekombinant suşta laktat oluşumunun baskılandığı ve test edilen koşullarda daha yüksek bir biyokütle ve nisin verimine ulaştığı bulunmuştur [39].

L. lactis'in büyümesi, fermantasyon sırasında üretilen yüksek laktik asit konsantrasyonları ile de inhibe edilmektedir. Transkripsiyonel regülatör olan *ythA* geninin yüksek düzeyde ifade edilmesinin, *L. lactis* F44'ün asit direncini arttırdığı bulunmuştur ve rekombinant suşun hayatta kalma oranının ve nisin üretim veriminin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir [8]. Miao ve arkadaşları (2018), küçük kodlayıcı olmayan RNA *anti41*'in hücrede yüksek düzeyde ifade edilmesinin, asit stresi altındaki hücrelerin hayatta kalma oranını arttırdığını ve sonrasında nisin üretiminin artmasına neden olan hücre büyümesini teşvik ettiğini göstermişlerdir [7]. Başka bir çalışmada, küçük kodlayıcı olmayan RNA *s015*'in, *L. lactis*'in asit toleransını yükselttiği ve düşük pH'da nisin verimini arttırdığı gösterilmiştir [40]. Zhang ve arkadaşları (2016), farklı asit stres genlerinin tek tek veya kombinasyon halinde eksprese edilmesinin, nisin üretiminin artışına yol açtığını bulmuşlardır [41]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, asit stresi nedeniyle hücrelerin biyokütlesindeki azalmanın, hücre çeperi ve hücre zarı biyosentezinde yer alan genlerin ekspresyonundaki azalmadan kaynaklandığı bulunmuştur [42].

Gelişme ortamına hem ilavesiyle, laktik asit bakterilerinin daha yüksek biyokütleyle ulaştığı birçok çalışmada rapor edilmiştir [43-49]. Hem molekülü, porfirin halka sistemi ile sarılmış demir atomu içeren metalloporfirin grubu üyesidir [44]. Bu bileşiğin varlığında laktik asit bakterileri aerobik solunum yolunu kullanarak daha yüksek biyokütleyle ulaşmaktadır. *L. lactis*'in membranı, solunum için gerekli olan tüm elektron transfer zinciri (ETS) bileşenleriyle donatılmıştır; ancak, yine de solunumu gerçekleştirememektedir. Çünkü bu familya üyeleri, sitokrom oksidaz sistemi için kofaktör olan hem molekülünü sentezleyebilecek metabolik iz yola sahip değildir [43]. *L. lactis* IL1403 suşunun genom çalışmalarında, sitokrom oksidaz enzimine ait genler tespit edilebilirken, hemin biyosentezi ile ilgili genler bulunamamıştır [44]. Fakat bu familya üyeleri için gerekli olan hem ilavesi yapıldığında solunum için gerekli eksiklik tamamlanmaktadır. Aerobik koşullarda, oksijen stresine yanıt olarak, hücrelerdeki metabolik yol heterolaktik fermentasyona çevrilmektedir. Böylece hücrede 3 farklı etki ortaya çıkmaktadır: 1) Hücresel enerji seviyesi yükselmektedir. Çünkü solunumda her bir NADH'ın okside edilmesiyle 1 mol ATP üretilmektedir. 2) Daha düşük oranda yan ürün çıkışı olmaktadır. Bu da hücre biyokütlesinin artmasını sağlamaktadır. 3) Geri inhibisyon engellenmektedir. Nitekim metabolik yolun sonunda laktik asit yerine aseton, diasetil, etanol ve asetik asit gibi çeşitli ürünler üretilmektedir [43, 44, 49].

Hem varlığında *L. lactis*'te uzun süreli hayatta kalmanın sağlanması ve daha yüksek biyokütle eldesi, hem ROS'un daha etkin bir şekilde ortadan kaldırılması yoluyla oksidatif stresin azaltılmasıyla hem de karışık asit fermantasyonundan dolayı büyüme ortamında daha yüksek pH değerinin korunması yoluyla asit stresinin azaltılmasıyla başarılmıştır [43, 44, 50]. Solunuma izin verilen koşullarda, *L. lactis* biyokütlesindeki artışın, nisin üretiminde bir artışa neden olduğu da gösterilmiştir [6].

İlginç bir şekilde, GSH gibi, pirüvatın da antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir, çünkü H₂O ve asetat üretmek için enzimatik olmayan bir işlemle H₂O₂ ile etkileşime girer ve böylece hücrenin oksidatif stres direncine katkıda bulunur [51]. H₂O₂ gideriminin yanı sıra, pirüvatın, biyolojik ortamlar için etkili bir tampon olarak önerilmesi sebebiyle, büyüme ortamının pH'sının düşmesini önlemek için uygun bir aday olabileceği düşünülmektedir [52].

Bu tez çalışmasında, oksijen stresinin giderilmesi yoluyla nisin üretimini arttırmak için *B. subtilis* katalaz geninin (*katE*) ve *L. lactis* süperoksit dismutaz (*sodA*) geninin, *L. lactis*'te hem düşük hem de yüksek düzeyde ifade edilmesi amaçlanmıştır. Ancak bütün denemelere rağmen rekombinant *L. lactis* suşları elde edilememiştir. Tüketicilerin son yıllarda "organik gıda katkısı" içeren ürünler kullanma isteği göz önüne alınarak, bu tez çalışmasının devamında, genetik manipülasyonlar yerine büyüme ortamının içeriğini değiştirilerek nisin üretimini artırma yoluna gidilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada, GSH ve pirüvatın büyüme, nisin üretimi ve *L. lactis* hücrelerinin strese tepkisi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında; CaCl₂ (Merck, Almanya), Tris (Merck, Almanya), SDS (Merck, Almanya), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Almanya), EDTA (Merck, Almanya), Kazein pepton (Tripton) (Merck, Almanya), MgCl₂.6H₂O (Merck, Almanya), Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya), Agar (Merck, Almanya), NaOH (Merck, Almanya), Sükkroz (Merck, Almanya), %87 Gliserol (Riedel de Haen, Almanya), D-(+)-Glukoz (Merck, Almanya), NaCl (Sigma-Aldrich, Almanya), Fenol (Riedel de Haen, Almanya), Kloroform (Riedel de Haen, Almanya), İzöamil alkol (Merck, Almanya), 2-propanol (Merck, Almanya), Asetik asit (Riedel de Haen, Almanya), %99.5 Etanol (Riedel de Haen, Almanya), HCl (Riedel de Haen, Almanya), CTAB (Merck, Almanya), KOAc (Merck, Almanya), MnCl₂.4H₂O (Merck, Almanya), KCl (Riedel de Haen, Almanya), MOPS (Sigma-Aldrich, Almanya), Maya Özütü (Alfa Aesar, ABD), Et Özütü (Merck, Almanya), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, Almanya), Tween 20 (Merck, Almanya), Glisin (Merck, Almanya), Nisaplin (Sigma-Aldrich, Almanya), RedSafe (Intron Biotechnology, Güney Kore), (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O (Sigma-Aldrich, Almanya), H₂SO₄ (Merck, Almanya), Sorbitol (Merck, Almanya), ksilenol turuncu (Sigma-Aldrich, Almanya), H₂O₂ (Merck, Almanya), TBA (Sigma-Aldrich, Almanya), TCA (Sigma-Aldrich, Almanya), IPTG (Thermo Fisher Scientific, ABD), X-gal (Sigma-Aldrich, Almanya), L-Glutatyon indirgenmiş (Sigma-Aldrich, Almanya), Sodyum pirüvat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve M17 broth (Biolife, İtalya) kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Enzimler

Bu tez çalışmasında kullanılan enzimler; Phusion DNA Polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD), T4 DNA Ligaz (Jena Bioscience, Almanya), *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Fisher Scientific, ABD), *Xho*I Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Fisher Scientific, ABD), *Nco*I Restriksiyon Endonükleaz

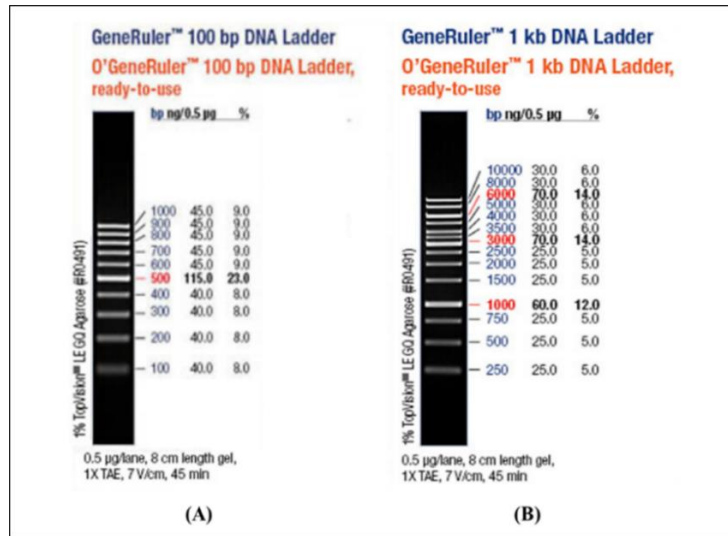
(Thermo Fisher Scientific, ABD), *SpeI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Fisher Scientific, ABD), *BssHII* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Fisher Scientific, ABD), *KpnI* (Thermo Fisher Scientific, ABD), Ribonükleaz A (Thermo Fisher Scientific, ABD), Termosensitif Alkalın Fosfataz (Alkaline Phosphatase Calf Intestinal, NEB Biolabs, ABD), Lizozim (Sigma-Aldrich, Almanya) ve Deoksiribonükleaz I (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimleridir.

3.1.3. Kullanılan Kitler

Bu çalışmada; innuSPEED Bakteriler/Mantarlar RNA Kiti (Analytic Jena, Almanya), iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, ABD), iScript cDNA Sentez Kiti (Bio-Rad, ABD), Jel Ekstraksiyon ve PCR Pürifikasyon Kiti (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel, Almanya), Plazmid DNA İzolasyon Kiti (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel, Almanya) ve Klonlama Kiti (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech, ABD) kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Bu tez çalışmasında DNA bant boyutlarının belirlenmesi ve RNA bütünlüğünün tespit edilmesi için kullanılan moleküler DNA belirteçleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan moleküler DNA belirteçleri. (A) 100 bç Moleküler DNA Belirteci (SM0311, Thermo Fisher Scientific, ABD); (B) 1 kb Moleküler DNA Belirteci (SM0241, Thermo Fisher Scientific, ABD).

3.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu çalışmada kullanılan bakteri soyları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Bu çalışmada kullanılan bakteri soyları.

Bakteri türleri	Özellik	Referans
<i>E. coli</i> TG1	$\Delta(lac-pro) supE thi hsd5/F' traD36$ $proA^+B^+lacI^q \Delta(lacZ)$ M15	[53]
<i>L. lactis</i> N8	Nisin Z üreticisi	[54]
<i>M. luteus</i> NCIMB 8166	Nisin üretiminin tespitinde indikatör suş	[29]
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	[55]
<i>E. coli</i> $\Delta katE$	$F- \Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787(::rrnB-3) \lambda \Delta katE731::kan rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568 hsdR514$	[56]

3.1.6. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanışları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Bu çalışmada kullanılan besiyerleri.

Besiyeri	İçeriği ve Hazırlanışı
Luria Bertani (LB) broth	10 g NaCl, 10 g tripton ve 5 g maya özütü, dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlandıktan sonra 121°C’ta 20 dk boyunca otoklavlanarak steril edilir.
LB agar	10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 15 g agar, dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlandıktan sonra 121°C’ta 20 dk boyunca otoklavlanarak steril edilir.
BLB (Beef LB) agar	10 g pepton, 1 g maya özütü, 5 g et özütü ve 5 g NaCl üzerine 950 ml dH ₂ O eklenir. pH 7.2’ye ayarlandıktan sonra 15 g agar eklenir ve son hacim dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlanarak 121°C’ta 20 dk boyunca steril edilir.

Tablo 3.2: Devam.

S1 agar	8 g tripton, 5 g maya özütü, 5 g NaCl, 2 g Na ₂ HPO ₄ , 15 ml Tween 20 ve 16 g agar, dH ₂ O ile 990 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'ta 20 dk boyunca otoklavlanarak steril edilir. Otoklavın ardından besiyeri 50 °C'a soğutulduktan sonra, steril 10 ml %50 glukoz (5 g) eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.
GM17 broth	42.2 g besiyeri dH ₂ O ile 990 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'ta 20 dk boyunca otoklavlanarak steril edilir. Otoklavın ardından besiyeri 50 °C'a soğutulduktan sonra, steril 10 ml %50 glukoz (5 g) eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.
GM17 agar	42.2 g besiyeri ve 15 g agar dH ₂ O ile 990 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'ta 20 dk boyunca otoklavlanarak steril edilir. Otoklavın ardından besiyeri 50 °C'a soğutulduktan sonra, steril 10 ml %50 glukoz (5 g) eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.
SGM17 broth	500 ml steril 2X M17 besiyerine; 10 ml %50 glukoz, 334 ml 1.5 M sükröz ve 156 ml dH ₂ O eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.
SGM17+2 mM CaCl ₂ +20 mM MgCl ₂ broth	500 ml steril 2X M17 besiyerine; 10 ml %50 glukoz, 334 ml 1.5 M sükröz, 2 ml 1 M CaCl ₂ , 20 ml 1 M MgCl ₂ , 134 ml dH ₂ O eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır.

3.1.7. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları (* Çözücü: %100 Etanol).

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E. coli</i> 'de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)	<i>L. lactis</i> 'te kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Eritromisin* (Ert)	25	400	5
Kanamisin (Kn)	50	25	-
Kloramfenikol* (Chl)	50	50	5-25

3.1.8. Kullanılan Plazmitler

katE geninin klonlanması amacıyla tez çalışması kapsamında kullanılan plazmitler, Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Tez çalışması kapsamında kullanılan plazmitler ve özellikleri. *pLEB21 ve pLEB579 plazmitleri promotor bölgesi içermediğinden, istenilen güçteki herhangi bir promotor kullanılabilir. Tez çalışması kapsamında bu amaçla güçlü bir promotor olan P₈ promotoru seçilmiştir.

Plazmitin adı	Kopya sayısı	Konakçı	İçerdiği promotor	Promotor çeşidi	İçerdiği antibiyotik direnci
pLEB124	Yüksek	Gram +/-	P45	Konstitütif	Eritromisin
pLEB21	Yüksek	Gram -	P ₈ *	Konstitütif	Ampisilin
	Genoma entegrasyon	Gram +			Eritromisin
pLEB579	Yüksek	Gram +/-	P ₈ *	Konstitütif	Eritromisin
pCZ-Cm	Yüksek	Gram +/- (tercihen Gram +)	P _{czcD}	Uyarılabilen	Kloramfenikol
pILZ-Em	Düşük	Gram +	P _{czcD}	Uyarılabilen	Eritromisin
pSK	Yüksek	Gram -	P _{T7}	Uyarılabilen	Ampisilin

3.1.9. Kullanılan Çözeltiler

Tablo 3.5: Bu çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti	İçeriği
İzotonik NaCl Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none">▪ %0.9 NaCl
Tris-EDTA (TE) Tamponu	<ul style="list-style-type: none">▪ 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)▪ 1mM EDTA (pH 8.0)
Solüsyon I	<ul style="list-style-type: none">▪ 25 mM Tris (pH 8.0)▪ 10 mM EDTA (pH 8.0)▪ 50 mM Glukoz
Solüsyon II	<ul style="list-style-type: none">▪ 0.2 N NaOH▪ %1 SDS
Solüsyon III	<ul style="list-style-type: none">▪ %60 5 M KOAc▪ %11.5 Glasiyal asetik asit
Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X)	<ul style="list-style-type: none">▪ 242 g Tris Baz▪ 57.1 ml Glasiyal Asetik Asit▪ 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
STET Tamponu	<ul style="list-style-type: none">▪ %8 Sükroz▪ %5 Triton X-100▪ 50 mM Tris-HCl pH 8.0▪ 50 mM EDTA pH 8.0
TfbI	<ul style="list-style-type: none">▪ 30 mM KOAc▪ 50 mM MnCl₂▪ 100 mM KCl▪ 10 mM CaCl₂▪ %15 gliserol
TfbII	<ul style="list-style-type: none">▪ 10 mM Na-MOPS (pH 7.0)▪ 75 mM CaCl₂▪ 10 mM KCl▪ %15 gliserol
Elektroporasyon Tamponu	<ul style="list-style-type: none">▪ 0.5 M Sükroz▪ %15 Gliserol

Tablo 3.5: Devam.

24:1 Kloroform/İzoamilalkol Karışımı (1 L, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 960 ml Kloroform ▪ 40 ml İzoamilalkol
25:24:1 Fenol/Kloroform/İzoamilalkol Karışımı (1 L, v/v/v)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 500 ml Fenol ▪ 480 ml Kloroform ▪ 20 ml İzoamilalkol
CTAB/NaCl Solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> ▪ %10 CTAB ▪ 0.7 M NaCl

3.1.10. 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 Elektroferez Sistemi (Bio-Rad), Güç Kaynağı (Bio-Rad, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 22R), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (Binder, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Heraus), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (Techne, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystems), Mikrodalga Fırın (Samsung), UV-1900 UV-VIS Spektrofotometresi (Shimadzu, Kyoto, Japonya), PCR Cihazı (Applied Biosystems), StepOnePlus™ Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems), 'NanoDrop Lite' Spektrofotometre Cihazı (Thermo Scientific), BioFlo® 120 fermentör (Eppendorf).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Klonlama Çalışmaları

3.2.1.1. Agaroz Jel Elektrofrez

Elektroferez yöntemi ile, nükleik asitlerin agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmaları sağlanmıştır. %0.8 veya %1'lik agaroz jeli, 1X TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu %0.005 olacak şekilde RedSafe

(Intron) ilave edilmiştir. DNA yükleme tamponu ilave edilen örnekler agaroz jelle yüklenerek, içinde yürütme tamponu olarak 1X TAE bulunan elektroforez tankında 80-120 Volt' ta yürütülmüşlerdir.

3.2.1.2. DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri elde edilmesi protokolü, Jel Ekstraksiyon ve PCR Pürifikasyon Kiti (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.2.1.3. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

İzole edilen plazmit DNA'ların restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, enzimlerin üretici firmalarının belirttiği konsantrasyonlar ve koşullarda, önerilen tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. *Bacillus subtilis* ve *L. lactis*'ten Kromozomal DNA İzolasyonu

B. subtilis 168 ile *L. lactis* N8'in genomik DNA'sı, Ausubel ve arkadaşlarının (2003) yöntemine göre izole edilmiştir [57]. 100 ml LB'de 1 gece boyunca inkübe edilen hücreler, 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpünde +4 °C'ta 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve pelletler 1.7 ml TE tamponunda çözülerek karışıma 3.4 mg lizozim eklenmiştir. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra, 37 °C'ta 15 dk inkübe edilmiştir. Bu karışım 4 ependorf tüpüne bölündükten sonra, her bir ependorf tüpüne 75 µl 5 M NaCl ve 60 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir.

Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24 hacim Kloroform + 1 hacim İzamilalkol) eklendikten sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınıp eşit hacimde Fenol/CIA (25 hacim Fenol + 24 hacim Kloroform + 1 hacim İzamilalkol) ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra yeni bir ependorf tüpüne alınan üst faz üzerine 0.6 hacim izoproponal eklenerek oda sıcaklığında 13000 rpm'de

15 dk santrifüjlenmiştir. Pelet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve dH₂O'da çözülerek saklanmak üzere -20 °C'a kaldırılmıştır.

3.2.1.5. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonlarında bulunması gereken vektör ve insört DNA konsantrasyonları, aşağıda verilen eşitlik (3.1) yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\text{ng (insört)} = \frac{\text{ng (vektör)} \times \text{kb (insört)}}{\text{kb (vektör)}} \quad (3.1)$$

Genel olarak reaksiyonlarda vektör:insört oranı, 1:3, 1:5 ve 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1X T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Ligasyon için hazırlanan karışım, 16 °C'ta 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.1.6. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli TG1 kompetan hücreleri, Sanders'in (2011) yöntemine göre hazırlanmıştır [58]. Hücreler gece boyunca antibiyotiksiz LB besiyerinde üretilmişlerdir. Ertesi sabah, üreyen hücrelerden bir koloni seçilip 5 ml antibiyotiksiz sıvı LB besiyerine ekim yapılmıştır. Hücreler 300 rpm'de 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmişlerdir. 2 saat sonrasında hücreler 100 ml antibiyotiksiz LB besiyerine aktarılmış, 200 rpm'de 37 °C'ta OD₅₅₀ 0.4 olana kadar çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmışlardır. Üreyen hücreler 50 ml'lik falkona aktarılıp 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Üst faz atılarak, hücre peleti 40 ml soğuk TfbI solüsyonunda çözülmüş ve 10 dk buzda bekletilmiştir. Karışım 3000 rpm'de 8 dk +4 °C'ta santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp hücre peleti soğuk TfbII solüsyonunda çözülerek soğuk ependorf tüplerine 100'er µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'a kaldırılmışlardır.

3.2.1.7. Transformasyon

Ligasyon ürünleri, 100 µl kompetan *E. coli* TG1 hücreleriyle karıştırıldıktan sonra, hücreler buz içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Ligasyon ürünlerinin hücrelere girişini sağlamak amacıyla hücrelere 42 °C'ta 45 sn ısı şoku uygulanmıştır. Işı sokunun ardından hücre membranında oluşan porların kapanması için hücreler bu kez 2 dk buz içerisinde bekletilmiştir. Ardından, üzerlerine 900 µl LB eklenen hücreler 37 °C'ta 1 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası örnekler, uygun konsantrasyonlarda antibiyotik içeren LB agar besiyerine 100'er µl yayılarak 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmişlerdir.

3.2.1.8. *E. coli*' den Plazmit İzolasyonu

E. coli' den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [59]. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB' de 37 °C' ta 220 rpm'de 12-16 saat büyütülmüş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra pelet üzerine her 5 ml kültür için 200 µl Solüsyon I eklenmiş, vortekslenmiş ve bu karışım 200'er µl olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra, üzerlerine 400'er µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dkda bir karıştırılarak 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 5 dk buzda bekletildikten sonra her birine 300'er µl Solüsyon III eklenip, her 2 dkda bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatantlar temiz birer ependorf tüpüne alınarak, üzerlerine 0.6 hacim izopropanol eklenip karıştırılmıştır. En az 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, karışımlar oda sıcaklığında 11000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar atılıp, her bir ependorf tüpündeki pelet 25 µl dH₂O'da çözülmüştür. Üzerlerine her 100 µl örnek için 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklendikten sonra 30 dk 37 °C' ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, Jel Ekstraksiyon ve PCR Pürifikasyon Kiti (Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmit DNA, -20 °C'ta saklanmıştır.

E. coli hücrelerinin plazmitlerle transformasyonu sonucu elde edilen tek kolonilerden doğrulama amacı ile plazmit izolasyonu yapmak için ise aşağıda anlatılan

yöntem kullanılmıştır. Koloniler steril kürdan ile uygun antibiyotik içeren 1'er ml LB besiyerine ekildikten sonra, 37 °C'ta 12-16 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası hücreler, oda sıcaklığında 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Peletler, 2 mg/ml lizozim içeren 250'şer µl STET tamponunda vortekslenerek çözülmüşler ve hemen kaynayan su içine alınarak 45 sn bekletilmişlerdir. Daha sonra örnekler, oda sıcaklığında 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmişlerdir. Tüplerin dibinde oluşan peletler steril kürdan ile uzaklaştırılmış ve üst sıvılar üzerine 250'şer µl izopropanol eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Ardından örnekler oda sıcaklığında 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra peletler kurutularak, yoğunluklarına göre 20-30 µl dH₂O'da çözülmüşlerdir. Elde edilen DNA örnekleri hemen %1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edilmişlerdir.

3.2.1.9. *L. lactis* Elektrokompentanlarının Hazırlanması

L. lactis N8 elektrokompentan hücrelerinin hazırlanması için, ilk gün *L. lactis* hücrelerinin -80 °C stoğundan 3 ml GM17 besiyerine ekim yapılarak 30 °C'ta 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün bu kültür, 1/100 oranında, 50 ml %0.3 glisin içeren SGM17 besiyerine aktarılmış ve kültürün optik yoğunluğu OD₆₀₀ 0.45–0.6 olana dek hücreler 4-6 saat boyunca 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu aralığa ulaşan kültür, buz üzerine alınarak soğutulmuş (5 dk) ve hücreler 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilerek toplanmışlardır. Üst sıvı dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 10 ml elektroporasyon tamponunda (+4 °C) çözülmüşlerdir. Elde edilen süspansiyon, 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilerek tekrar hücre çökeltisi elde edilmiştir. Hücreler yeniden 10 ml elektroporasyon tamponunda çözülerek yıkama aşaması tekrarlanmıştır. Son olarak hücrelerin 4500 rpm'de +4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre peleti, 1 ml elektroporasyon tamponunda çözülerek 100'er µl olacak şekilde buzda soğutulmuş ependorf tüplerine bölünerek, kullanılıncaya kadar -80 °C'ta muhafaza edilmişlerdir.

3.2.1.10. Elektroporasyon

100 µl *L. lactis* N8 elektrokompentan hücresi üzerine, yoğunluğuna göre en fazla 10 µl plazmid DNA eklenerek karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışım, 0.2 cm'lik

elektroporasyon kuvetine konularak elektroporasyon için hazır hale getirilmiştir. Elektroporasyon 2.5 kV'ta, 25 µF'ta ve 400 ohm (Ω)'da gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon sonrasında hücrelere 900 µl SGM17+2 mM CaCl₂+20 mM MgCl₂ besiyeri eklenmiş ve 30 °C'ta 1 ila 2 saat boyunca çalkalama olmadan inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler, 200'er µl olacak şekilde uygun antibiyotik içeren LB agara yayılarak ekim yapılmıştır. 30 °C'ta 1-5 gün inkübasyon süresinin ardından agarda üreyen hücreler plazmit varlığı açısından taranmıştır.

3.2.1.11. *katE* Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar

3.2.1.11.1. *katE* Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve PCR

Kullanılacak olan primer çiftleri, *B. subtilis* 168 soyunun genomuna birebir uyumlu olacak şekilde tasarlanmıştır. Bakterinin *katE* genine ait nükleotid dizilimine GENBANK'ta “NZ_CP010052.1” erişim numarası ile ulaşılabilmektedir. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/749168884?from=4008155&to=4010215&sat=4&sat_key=146523004&report=gbwithparts). *B. subtilis* 168 soyunun *katE* genine ait DNA dizisinin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: *B. subtilis* 168 soyuna ait *katE* geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri. Altı çizili bölgeler, enzim kesimlerinin etkin bir biçimde gerçekleşmesi için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. “Infusion” primerlerindeki altı çizili bölge, doğrusal hale getirilmiş plazmitlerden alınan nükleotit dizilerini, kalın olarak gösterilen diziler ise *katE* geninden alınan dizileri ifade etmektedir. F ve R *katE* PCR primerlerdeki altı çizili bölgeler pCZ-Cm plazmidinden alınan nükleotit dizilerini, kalın olarak gösterilen diziler ise *katE* geninden alınan dizileri göstermektedir. F Primer *katE* PCR primerinde bulunan “gg” nükleotitleri, çerçeve kayması mutasyonunu engellemek üzere eklenmiştir.

<i>katE</i> geninin pSK ve pLEB124'e klonlanması için kullanılan primer çifti	
[TAA: bitiş kodonu, AAGGA: <i>L. lactis fluR</i> genine ait ribozom bağlanma bölgesi (RBS), ATG: başlangıç kodonu, GGATCC: BamHI kesim bölgesi.]	
F Primer <i>katE</i> BamHI	5' <u>CGGGATCCCGCC</u> TAA AAGG AGCAGAC ATG AGTGA TGACC 3' (39 nt)
R Primer <i>katE</i> BamHI	5' <u>CGGGATCCCGGTTTCTAGGTCTAACAGCAT</u> 3' (30 nt)

Tablo 3.6: Devam.

<i>katE</i> geninin pLEB21 ve pLEB 579'a klonlanması için kullanılan primer çifti [ATG: başlangıç kodonu, CTCGAG: <i>XhoI</i> kesim bölgesi.]	
F Primer <i>katE</i>	5' ATGAGTGATGACCAAACAAACGTGTA 3' (27nt)
R Primer <i>katE</i> <i>XhoI</i>	5' <u>CCGCTCGAGCGGGTTTCTAGGTCTAACAGCAT</u> 3' (32 nt)
<i>katE</i> geninin kanamisin direnç geni ile birleştirilmesi ve ardından pLEB124'e klonlanması için kullanılan primer çifti [TAA: bitiş kodonu, AAGGA: <i>L. lactis fluR</i> genine ait ribozom bağlanma bölgesi (RBS), ATG: başlangıç kodonu, GGATCC: <i>BamHI</i> kesim bölgesi.]	
F Primer <i>katE</i> <i>BamHI</i>	5' <u>CGGGATCCCGCCTAAAGGAGCAGACATGAGTGA</u> TGACC 3' (39 nt)
R Primer <i>katE</i> kanamisin	5'AATCATGCGAAACGATCCTCTCAAATTCGTCT ATCCCAAT 3' (40 nt)
<i>katE</i> geninin "Infusion" kit kullanılarak pLEB124'e klonlanması için kullanılan primer çifti [TAA: bitiş kodonu, AAGGA: <i>L. lactis fluR</i> genine ait ribozom bağlanma bölgesi (RBS), ATG: başlangıç kodonu, GGATCC: <i>BamHI</i> kesim bölgesi.]	
F Primer <i>katE124</i> "Infusion"	5' <u>GACGTCATATGGATCCCTAAAGGAGCAGACATG</u> AGTGATGACC 3' (44 nt)
R Primer <i>katE124</i> "Infusion"	5' <u>CCCTATATATGGATCCGTTTCTAGGTCTAACAGCA</u> T 3' (36 nt)
<i>katE</i> geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için kullanılan primer çifti [GGTACC: <i>KpnI</i> kesim bölgesi.]	
F Primer <i>katE</i> pCZ/pILZ	5' AGTGATGACCAAACAAACGTGTA 3' (24 nt)
R Primer <i>katE</i> pCZ/pILZ <i>KpnI</i>	5' <u>GGGGTACCCCGTTTCTAGGTCTAACAGCAT</u> 3' (30 nt)

Tablo 3.6: Devam.

<p><i>katE</i> geninin “Infusion” kit kullanılarak pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için kullanılan primer çifti</p> <p>[CCATG(G): <i>NcoI</i> kesim bölgesi (<i>NcoI</i> kesim bölgesindeki G nükleotidi, klonlama sonucu çerçeve kayması mutasyonu yaratacağı gerekçesiyle <i>katE</i> pILZ/pCZ Infusion F Primer’den çıkartılmıştır), ACTAGT: <i>SpeI</i> kesim bölgesi.]</p>	
<p>F Primer <i>katE</i> pILZ/pCZ Infusion</p>	<p>5’ <u>GGAATGAGACCATGGAGTGATGACCAAAACAAAC</u> GT 3’ (36 nt)</p>
<p>R Primer <i>katE</i> pILZ/pCZ Infusion</p>	<p>5’ <u>GCTCTCTAGAACTAGTGTTTCTAGGTCTAACAGCA</u> T 3’ (36 nt)</p>
<p><i>katE</i> geninin pCZ-Cm vektörüne PCR ile doğrudan klonlanması için kullanılan primer çifti</p> <p>[AGGAATG: pCZ-Cm plazmidinde bulunan RBS, CCATGG: <i>NcoI</i> kesim bölgesi (<i>NcoI</i> kesim bölgesindeki G nükleotidi, klonlama sonucu çerçeve kayması mutasyonu yaratacağı gerekçesiyle <i>katE</i> pILZ/pCZ Infusion F Primer’den çıkartılmıştır), ACTAGT: <i>SpeI</i> kesim bölgesi.]</p>	
<p>F Primer <i>katE</i> PCR</p>	<p>5’ <u>ACAAAGGAATGAGACCATGGggATGAGTGATGA</u> CCAAAACAAACGT 3’ (47 nt)</p>
<p>R Primer <i>katE</i> PCR</p>	<p>5’ <u>AGCTTGAGCTCTCTAGAACTAGTAGACTGATTA</u> TCGAAAGAAGTT 3’ (47 nt)</p>

F Primer *katE BamHI* ve R Primer *katE BamHI* primer çifti, *katE* geninin pLEB124 ve pSK plazmitlerine, F Primer *katE* ve R Primer *katE XhoI* primer çifti pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerine klonlanması için dizayn edilmiştir.

F Primer *katE BamHI* ve R Primer *katE* kanamisin primer çifti, *katE* geninin çakışan (overlap) PCR aracılığıyla kanamisin direnç geni ile birleştirilerek pLEB124 plazmidine klonlanması için tasarlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan R Primer *katE* kanamisin, *katE* geninin sonundan 20 nükleotidin yanı sıra kanamisin direnç geninin başından 20 nükleotit içermektedir. Bu sayede, bu primer çifti ile gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen üründe, *katE* geninin ardından kanamisin direnç geninin başlangıç kısmına ait diziler (20 nt) yer almaktadır. Bu primer çifti kullanılarak elde edilen PCR ürünü, çakışan (overlap) PCR için kalıp olarak kullanılmıştır.

katE geninin “Infusion” kit aracılığıyla pLEB124 plazmidine klonlanması için F Primer *katE*124 “Infusion” ve R Primer *katE*124 “Infusion” primer çifti, pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için ise F Primer *katE* pILZ/pCZ “Infusion” ile R Primer *katE* pILZ/pCZ “Infusion” primer çifti kullanılmıştır. Aynı zamanda *katE* geninin ligasyon aracılığıyla pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için F Primer *katE* pCZ/pILZ ile R Primer *katE* pCZ/pILZ *KpnI* primerleri kullanılmıştır.

katE geninin pCZ-Cm vektörüne PCR ile doğrudan klonlanması için kullanılan primer çifti F Primer *katE* PCR ve R Primer *katE* PCR olarak adlandırılmıştır.

katE geninin PCR ile çoğaltılması için Phusion DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır. PCR karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.7 ve Tablo 3.8’de gösterilmiştir. Kalıp DNA olarak *B. subtilis* 168 soyunun genomik DNA’sı kullanılmıştır. Her primer çifti için farklı primer bağlanma sıcaklıkları denenerek, en uygun sıcaklık tespit edilmiştir. Beklenen PCR fragmanının boyutu yaklaşık 2000-2500 bp olduğundan, uzama süresi 1 dk 30 sn olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.7: Phusion DNA Polimeraz enzimi ile hazırlanan PCR karışımı.

Reaksiyon Karışımı	50 μ l reaksiyon	Son konsantrasyon
5X Phusion HF Tamponu	10 μ l	1x
10 mM dNTP	1 μ l	200 μ M
10 μ M F Primer	2.5 μ l	0.5 μ M
10 μ M R Primer	2.5 μ l	0.5 μ M
Kalıp DNA	1.5 μ l	250 ng
Phusion DNA Polimeraz	0.5 μ l	0.02 U/ μ l
dH ₂ O	32 μ l	50 μ l’ye tamamlanır.

Tablo 3.8: Phusion DNA Polimeraz enzimi ile gerçekleştirilen PCR koşulları.
*Uzama süresi, çoğaltılacak olan DNA fragmanın uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Phusion DNA Polimeraz enzimi, 1 kb uzunluğundaki DNA fragmanını 15 ila 30 sn'de tamamlayabilmektedir.

Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	98 °C	30 sn	1
Denatürasyon	98 °C	10 sn	30
Bağlanma	gradient	30 sn	
Uzama	72 °C	*	
Son Uzama	72 °C	3 dk	1

3.2.1.11.2. *katE* Geninin pLEB124 Vektörüne *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında kullanılan pLEB124 plazmidinde, P₄₅ promotöründen sonra bir ribozom bağlanma bölgesi (RBS) bulunmaktadır. Ribozom bağlanma bölgesinin ardından çoklu klonlama bölgesine (MCS) kadar olan DNA dizisi ifade edildiğinde, 9 aminoaside karşılık gelmektedir. Bu aminoasitlerin konformasyonu, ribozomun RBS'ye etkin bir biçimde bağlanmasına zemin hazırlamaktadır. Ancak *katE* geninin ifadesinin kendine ait başlangıç kodonundan (ATG) başlayabilmesi için süregelen translasyonun durdurulması gerekmektedir. Bu nedenle, F Primer *katE* BamHI'a çerçeve içerisinde (in frame) olacak şekilde bir bitiş kodonu (TAA) yerleştirilmiştir. Bitiş kodonunun hemen ardına ise *L. lactis fhuR* genine ait ribozom bağlanma bölgesi (AAGGA) eklenmiştir. Bu sayede ribozom, ilk translasyonun bitişinin ardından ivedilikle *katE* geninin translasyonuna başlayabilecektir. Böylece *L. lactis* ribozomlarının *B. subtilis katE* genine ait ribozom bağlanma bölgesini tanıyamaması sorununun engellenmesi amaçlanmıştır (Tablo 3.6). pLEB124 plazmidinde bulunan P₄₅ promotörü konstitütif bir promotördür. Klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleşmesi halinde, *L. lactis*'te *katE* geninin sürekli biçimde ifadesi sağlanmış olacaktır.

pLEB124 plazmidinin çoklu klonlama bölgesinde bulunan BamHI enzim kesim bölgesine klonlama yapmak amacıyla tasarlanan primerlerin uç kısımlarına (F Primer *katE* BamHI ve R Primer *katE* BamHI primer çifti) BamHI kesim bölgeleri eklenmiştir. Hem pLEB124 plazmidi hem de söz konusu DNA fragmanı BamHI enzimi ile kesilerek gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından ligasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ancak klonlamanın tek bir enzim kesimiyle gerçekleştirilecek olması, ligasyon sırasında, restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan plazmidin kendi kendine birleşerek arka plan kirliliği oluşturmasına sebep olabilmektedir. Bu nedenle, ligasyon işleminden önce, *Bam*HI enzimi ile kesilmiş olan pLEB124 plazmidi, defosforilasyon enzimi ile de muamele edilmiştir. Böylelikle plazmidin ligasyon işlemi sırasında kendi kendine kapanması sorununa çözüm getirilmeye çalışılmıştır. Bazı durumlarda defosforilasyonun ligasyona engel olabileceği bilindiğinden, defosforilasyon işlemi yapılmadan da ligasyon denenmiştir. Bölüm 3.2.1.7’de anlatıldığı şekilde, *E. coli* TG1 hücreleri ligasyon ürünleri ile transforme edilmiştir.

3.2.1.11.3. *katE* Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine *E. coli*’de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

pLEB21 plazmidi, *E. coli* hücrelerinde replike olabilen ancak *L. lactis* hücrelerinde replike olmayan bir plazmittir. Bu durum, söz konusu plazmitin *L. lactis* hücrelerine transformasyonu sonucu kromozomal DNA’ya entegre olması ile sonuçlanmaktadır. pLEB579 plazmidi ise hem *E. coli*’de hem de *L. lactis*’te replike olabilen mekik bir plazmittir.

pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerinde promotor bölgesi bulunmamaktadır. Bu sayede, istenilen güçteki promotor bu plazmitlere eklenerek herhangi bir genin istenilen seviyede ifadesi sağlanabilmektedir. Bu amaçla, *katE* geninin *L. lactis* N8 suşunun sahip olduğu oldukça güçlü bir promotor olan P₈ [60] eşliğinde söz konusu plazmitlere klonlanması planlanmıştır.

Güçlü bir konstitütif promotor olan P₈ promotorunun dizisi, Zhu ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında belirlenmiştir [60]. Adı geçen çalışmada, P₈ promotorunun aşağı bölgesinde (downstream) yer alan olası ribozom bağlanma bölgesi (RBS) de gösterilmektedir. *L. lactis* P₈ promotoruna özgü primer çifti, *L. lactis* N8 soyunun genom dizisine birebir uyumlu olacak şekilde dizayn edilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: *L. lactis* N8 soyuna ait P₈ promotorunun PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri. Altı çizili bölgeler, enzim kesimlerinin etkin bir biçimde gerçekleşmesi için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. Kalın olarak gösterilen diziler, *katE* geninden alınan dizileri ifade etmektedir. **CTCGAG**: *XhoI* kesim bölgesi, **GCGCGC**: *BssHIII* kesim bölgesi.

F Primer P₈XhoI BssHIII	5' <u>CCGCTCGAGCGGTTGGCGCGCCAAAGGACAA</u> TTATTTCTCATA 3' (43 nt)
R Primer P₈ katE	5' TTGTTTTGGTCATCACTCATTATATCTCTCCA TTTCTGC 3' (39 nt)

F Primer *katE* ve R Primer *katE XhoI* kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen *katE* geni, başlangıç kodonundan (ATG) itibaren transkripsiyonel terminatör bölgesini de içine alacak şekilde çoğaltılmıştır. P₈ promotorunun bu gene eklenmesi için, çakışan (overlap) PCR yöntemi kullanılmıştır.

P₈ promotorunun (RBS dahil) PCR ile çoğaltılması amacıyla F Primer P₈ *XhoI BssHIII* ve R Primer P₈ *katE* primer çifti kullanılmıştır. Kalıp DNA olarak *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA'sı kullanılmıştır. Primer bağlanma sıcaklıkları 58 °C, 60 °C ve 62 °C olarak seçilmiştir. Çoğaltılacak olan DNA fragmanının uzunluğu 189 bp olduğundan, uzama süresi 10 sn olarak belirlenmiştir.

P₈ promotörü (RBS dahil) ile *katE* geninin birleştirilmesi amacıyla bu DNA fragmanlarının kalıp olarak bir arada kullanıldığı çakışan (overlap) PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7 ve 3.8). PCR reaksiyonunda F Primer P₈ *XhoI BssHIII* ve R Primer *katE XhoI* primerleri kullanılmış; primer bağlanma sıcaklığı olarak 60 °C, 62 °C ve 64 °C seçilmiştir.

Çakışan PCR için kalıp olarak kullanılan fragmanlardan biri olan P₈ promotörü fragmanı, P₈ promotorunun (RBS dahil) yanı sıra *katE* geninin ilk 20 nükleotitini de içermektedir. Bu 20 nükleotitlik DNA dizisi, kalıp olarak kullanılan diğer fragman olan *katE* fragmanının başlangıcı ile birebir örtüştüğünden, sözü geçen bu iki fragmanın bu 20 nükleotitlik bölgede birbirlerine tutunmalarına zemin oluşturmaktadır. Bu tutunma gerçekleştikten sonra Phusion DNA polimeraz enzimi, F Primer P₈ *XhoI BssHIII* ile ve R Primer *katE XhoI* primer çifti aracılığıyla P₈ promotörünü ve *katE* fragmanlarını birleştirerek P₈-*katE* fragmanını (2655 bp) oluşturmaktadır.

pLEB579 ve pLEB21 plazmitlerinin her ikisine de çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈-*katE* fragmanı klonlanmaya çalışılmıştır. Kullanılan primerler sayesinde, PCR sonrası adı geçen fragmanın 5' ucunda *XhoI* ve *BssHII* enzim kesim bölgeleri, 3' ucunda ise yalnızca *XhoI* enzim kesim bölgesi yer almaktadır. *BssHII* enzimi *katE* genini kestiğinden, yönlü klonlama yapabilmek için kullanılamamıştır. Bu nedenle, P₈-*katE* fragmanının pLEB579 ve pLEB21 plazmitlerine klonlaması amacıyla *XhoI* enzim kesim bölgesi kullanılmıştır. Söz konusu DNA fragmanı ile pLEB579 ve pLEB21 plazmitleri *XhoI* enzimi ile kesildikten sonra gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından ligasyon gerçekleştirilebilmiştir. Olası arka plan kirliliğinin önüne geçmek amacıyla, restriksiyon enzim kesiminin ardından plazmitler, defosforilasyon enzimi ile muamele edilmiştir. Defosforilasyon işlemi yapılmadan da ligasyon denenmiştir.

pLEB21 ve pLEB579 plazmitleri ile P₈-*katE* fragmanının ligasyonu sonrasında transformasyon işlemi Bölüm 3.2.1.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.11.4. *katE* Geninin pBlueScript SK Vektörüne Klonlanması

katE geninin pBlueScript SK (pSK) vektörüne klonlanması amacıyla vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *BamHI* enzim kesim bölgesinin kullanılması kararlaştırılmıştır. Bu amaçla, F Primer *katE BamHI* ve R Primer *katE BamHI* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan ve her iki ucunda da *BamHI* kesim bölgeleri bulunan DNA fragmanı kullanılmıştır. Hem pSK plazmidini hem de söz konusu DNA fragmanı, *BamHI* enzimi ile kesilerek gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından ligasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ligasyon reaksiyonunun 5 µl'si, katalaz enzimini üretemeyen *E. coli*'ye ($\Delta katE$) Bölüm 3.2.1.7'de anlatıldığı şekilde aktarılmış ve transformasyon sonrası hücreler, IPTG (20 µg/ml), X-gal (40 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml) içeren LB agar besiyerlerine ekilmiştir. Katalaz enzimini üretemeyen *E. coli* hücreleri, Yale Üniversitesi'ne bağlı olarak çalışan CGSC'den (Coli Genetic Stock Center) temin edilmiştir.

pSK plazmidinde bulunan *lacZ* geninin ifade edilmesi sonucu laktozun parçalanmasında görev alan β -galaktozidaz enzimi üretilmektedir. Boş vektörü içeren *E. coli* hücrelerinin besi ortamına renksiz bir madde olan laktoz analogu X-gal eklendiğinde, β -galaktozidaz enzimi aracılığıyla X-gal parçalanarak mavi renkli bir yan ürün oluşturur ve bu durum kolonilerin agar yüzeyinde mavi renkte görünmesine

sebepler olur. Klonlama çalışmaları esnasında plazmitteki *lacZ* geninin içerisinde yer alan çoklu klonlama bölgesine (MCS) sokulan insört DNA, *lacZ* geninin bozulmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla insört almış vektörü içeren hücreler X-gal parçalanmadığından beyaz koloniler oluştururken, insört almamış (boş) vektörü içeren hücreler mavi koloniler oluşturmaktadır.

Bu sebeple transformasyon sonrasında, IPTG, X-gal ve Amp içeren LB agar Petriplerindeki beyaz koloniler seçilerek mini prep yöntemiyle plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitler, restriksiyon enzim kesimi yapılarak doğrulanmıştır.

3.2.1.11.5. *katE* Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124'e Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

katE geninin çakışan (overlap) PCR aracılığıyla kanamisin direnç geni ile birleştirilerek pLEB124 plazmidine klonlanması için plazmidin çoklu klonlama bölgesinde yer alan *Bam*HI enzim kesim bölgesi seçilmiştir. Bu yöntemde, ligasyon sonrası gerçekleştirilen transformasyon işleminde olası transformantlar kanamisin içeren LB agar besiyerlerine ekilecek; böylece hücreler insört (*katE* geni ile kanamisin direnç geni) içeren rekombinant plazmiti almaya zorlanacaktır. İnsört taşımayan plazmit sadece eritromisin direnç genine sahip olduğundan, kanamisinli besiyerinde yalnızca insörte sahip olan plazmit taşıyan hücreler yaşayabilecektir.

Kanamisin direnç geninin çoğaltılması için kullanılan primer çifti, bu genin dizisine birebir uyumlu olacak şekilde tasarlanmıştır. Kanamisin direnç genine (RBS dahil) ait DNA dizisinin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çifti Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonun karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Kalıp DNA olarak kanamisin direnç genini taşıyan plazmit DNA'sı kullanılmıştır. Primer bağlanma sıcaklıkları 55 °C, 57.5 °C, 60 °C, 62.5 °C ve 65 °C olarak seçilmiştir. Çoğaltılacak olan kanamisin geninin uzunluğu 1260 bp olduğundan, uzama süresi 1 dk olarak belirlenmiştir.

Kanamisin direnç geninin başından diziler içeren (20 nt) *katE* fragmanının PCR ile elde edilmesi için (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8) F Primer *katE Bam*HI ve R Primer *katE* kanamisin primerleri kullanılmış ve primer bağlanma sıcaklıkları olarak 55 °C, 57.5

°C, 60 °C, 62.5 °C ve 65 °C seçilmiştir. PCR reaksiyonunda kalıp olarak *L. lactis* N8 genomik DNA'sı kullanılmıştır. Çoğaltılacak DNA fragmanının uzunluğu 2098 bp olduğundan, uzama süresi 1 dk 30 sn olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.10: Kanamisin direnç geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çifti. Altı çizili bölgeler, enzim kesimlerinin etkin bir biçimde gerçekleşmesi için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. **GAGGA**: kanamisin direnç geninin ribozom bağlanma bölgesi (RBS), **ATG**: kanamisin direnç geninin başlangıç kodonu, **GGATCC**: *Bam*HI kesim bölgesi.

F Primer kanamisin RBS	5' GAGGATCGTTTCGCATGATTGAAC 3' (24 nt)
R Primer kanamisin BamHI	5' <u>CGGGATCCGAGCGGGGCAGGATAGGTGA</u> AGTAG 3' (34 nt)

katE fragmanı ile kanamisin fragmanının bir arada kalıp DNA olarak kullanılması ile çakışan (overlap) PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7 ve 3.8). Primer bağlanma sıcaklığı olarak 55 °C, 57.5 °C, 60 °C, 62.5 °C ve 65 °C seçilmiştir.

Çakışan PCR için kalıp olarak kullanılan fragmanlardan biri olan *katE* fragmanı, *katE* geninin yanı sıra kanamisin geninin ilk 20 nükleotitini de içermektedir. Bu 20 nükleotitlik DNA dizisi, kalıp olarak kullanılan diğer fragman olan kanamisin fragmanının başlangıcı ile birebir örtüştüğünden, sözü geçen iki fragman 20 nükleotitlik bölgede birbirlerine tutunacaklardır. Bu tutunma gerçekleştikten sonra Phusion DNA polimeraz enziminin, F Primer *katE Bam*HI ve R Primer kanamisin *Bam*HI primer çifti aracılığıyla *katE* ve kanamisin fragmanlarını birleştirerek *katE*-kanamisin fragmanını (3358 bp) oluşturması beklenmektedir.

3.2.1.11.6. *katE* Geninin pLEB124 Vektörüne “In Fusion HD Cloning Kit” ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

katE geninin pLEB124 vektörüne klonlanması ticari olarak satılan “In-Fusion HD Cloning Kit”i de denenmiştir. Bu kit ile gerçekleştirilen klonlama işleminde T4 DNA ligaz enzimi yerine “In-Fusion” enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim, PCR ile elde edilen DNA fragmanı ve belirlenen restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal (linear) hale getirilen vektörün birleştirilmesinden sorumludur. Bu işlemi, söz konusu DNA fragmanlarının (PCR ürünü ile vektör) uç kısımlarındaki 15'er nükleotitlik çakışan

(overlap) DNA dizilerini tanıyarak gerçekleştirir. Bu dizilerin söz konusu PCR ürününe eklenmesi için primerler tasarlanırken, doğrusal hale getirilmiş vektörün uç kısımlarındaki 15'er nükleotitik DNA dizileri üreticinin belirlediği şekilde primer dizilerine eklenir. Bu çakışan DNA dizileri sayesinde, yönlü klonlama kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca ortama T4 DNA ligaz enzimi eklenmediğinden, doğrusal hale getirilmiş vektörün kendi üzerine kapanarak PCR ürünü taşımayan vektörlerin oluşması engellenmiş olmaktadır.

pLEB124 vektörüne “In Fusion HD Cloning Kit” aracılığıyla *katE* geninin klonlanması için, vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan enzimlerden biri olan ve *katE* genini kesmeyen *Bam*HI enziminin kullanılması kararlaştırılmıştır.

Öncelikle pLEB124 plazmidi, *Bam*HI enzimi ile kesilmiş ve jelden izole edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pLEB124 plazmidi ve F Primer *katE* pILZ/pCZ “Infusion” ile R Primer *katE* pILZ/pCZ “Infusion” primer çiftinin kullanıldığı PCR sonucu elde edilen *katE* fragmanı agaroz jele yüklenerek, ng/ μ l cinsinden miktar tayini yapılmıştır. Kite önerildiği üzere, her iki örnek de 100 ng olacak şekilde reaksiyona eklenmiş (Tablo 3.11) ve 50 °C’ta 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler buza alınarak Bölüm 3.2.1.7’de anlatıldığı üzere *E. coli* TG1 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyona girilen DNA miktarının transformasyon etkinliği üzerinde etkili olduğu bilindiğinden, inkübasyon sonrası reaksiyon karışımının 2.5 ve 5 μ l’si ayrı ayrı transforme edilerek farklı denemeler gerçekleştirilmiştir.

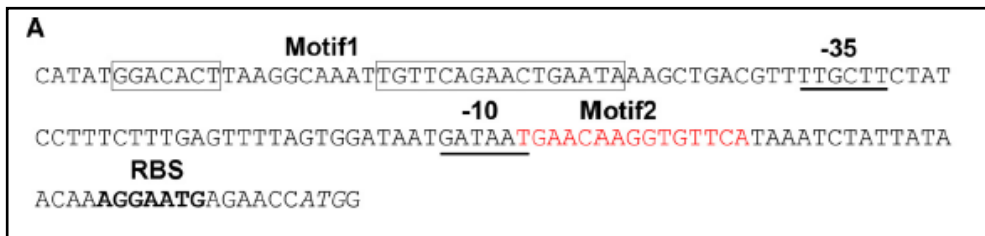
Tablo 3.11: “In Fusion” klonlama reaksiyonu

Reaksiyon karışımı	10 μ l için
5X “In Fusion” enzimi ön karışımı	2 μ l
<i>Bam</i> HI enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş pLEB124 plazmidi (jelden saflaştırılmış, 1/4 oranında sulandırılmış)	2 μ l (yaklaşık 100 ng)
PCR sonucu elde edilen <i>katE</i> geni (jelden saflaştırılmış)	1.5 μ l (yaklaşık 100 ng)
dH ₂ O	4.5 μ l

3.2.1.11.7. *L. lactis* Suşunda *katE* Geninin Kontrollü İfadesinin Sağlanması için Çinko (Zn⁺) ile Uyarılabilen Zirex Sistemi'nin Kullanılmasına Yönelik Çalışmalar

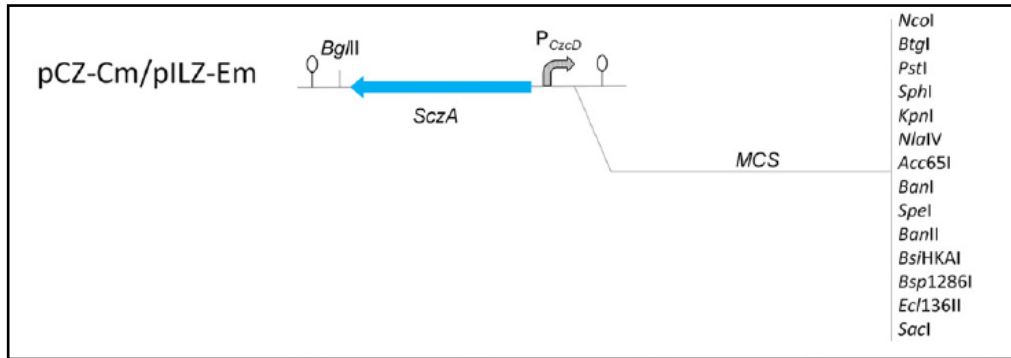
Tez çalışmasının bir sonraki aşamasında, nisin üreticisi *L. lactis* suşunda, *katE* geninin konstitütif (sürekli çalışan) olarak ifade edilmesi yerine kontrollü olarak ifade edilebilmesi için çinko (Zn⁺) ile uyarılabilen Zirex Sistemi'nin kullanılması yoluna gidilmiştir. Bunun sebebi, söz konusu genlerin konstitütif ifadesinin hücre üzerinde toksik etki yaratabileceğinin düşünülmesidir.

Mu ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *L. lactis*'te gen ifadesinin kontrollü bir biçimde sağlanması için çinko (Zn⁺) ile uyarılabilir bir sistem geliştirerek bu sisteme "Zirex Sistemi" ismini vermişlerdir [61]. Zirex Sistemi'nde pILZ-Em ve pCZ-Cm olmak üzere iki farklı plazmit kullanılabilir. Her iki plazmitte, *Streptococcus pneumoniae* bakterisine ait çinko (Zn⁺) ile uyarılabilir bir promotor olan P_{czcD} yer almaktadır. *S. pneumoniae*'de yer alan *czcD* geninin promotoru olan P_{czcD}, SczA tarafından kontrol edilmektedir. Ortamda çinko (Zn⁺) bulunmadığında SczA, P_{czcD} promotorunun alt kısmında (downstream) bulunan Motif2 dizisine bağlanarak *czcD* geninin transkripsiyonunu engeller. Ortama çinko (Zn⁺) eklendiğinde ise SczA, Motif1'e hareket eder ve transkripsiyonun önündeki engel ortadan kalktığından *czcD* geni ifade edilir (Şekil 3.2). pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmitlerinde, *czcD* geninin yerine ilgilenilen genin klonlaması ile çinko (Zn⁺) aracılığıyla bu genin kontrollü bir biçimde ifade edilmesini sağlamak mümkün olabilmektedir. Zirex Sistemi'nde yer alan pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmitleri, bu çalışma için Prof. Dr. Oscar Kuipers'ten (Groningen Üniversitesi, Hollanda) temin edilmiştir.



Şekil 3.2. P_{czcD} promotorunun nükleik asit dizisi. Motif1 (kutu içerisine alınmış olan diziler) ve Motif2 (kırmızı ile gösterilen dizi), SczA'nın bağlandığı bölgeleri işaret etmektedir.

Zirex Sistemi'nde kullanılan plazmitlerden biri olan pILZ-Em plazmidi, yalnızca Gram pozitif bakterilerde replike olabilen, eritromisin (Em) direncine sahip, orta kopya sayılı (medium copy number) bir plazmittir. Bu sistemde kullanılan bir diğer plazmit olan pCZ-Cm plazmidi ise hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde replike olabilen mekik (shuttle) bir plazmittir. Yüksek kopya sayısına (high copy number) sahip olan bu plazmit, kloramfenikol (Cm) direncine sahiptir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Zirex sisteminde kullanılan pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitleri. Plazmitlerde; düzenleyici olarak görev yapan SczA'nın ifade edilmesi için *sczA* geni, çinko (Zn^{+}) ile uyarılabilir P_{czcD} promotoru ve bu promotorun altında (downstream) çoklu klonlama bölgesi (multiple cloning site, MCS) yer almaktadır.

pILZ-Em ve pCZ-Cm vektörlerine ilgilenilen genin klonlanması için, plazmitlerde bulunan ribozom bağlanma bölgesinden (RBS) sonraki ilk restriksiyon enzim kesim bölgesi olan *NcoI* kesim bölgesi kullanılmaktadır. Bunun nedeni, *NcoI* kesim bölgesinin içerdiği "ATG" nükleotitlerinin RBS'den 6 nükleotit sonra yer almasından dolayı ribozom tarafından başlangıç kodonu olarak algılanmasıdır. Ancak, *NcoI* enzimi *katE* genini kestiğinden, söz konusu genin ilgili plazmitlere klonlanması için kullanılması mümkün olmamıştır. Bu sebeple, pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmitlerinin *NcoI* ve *KpnI* enzimleri ile kesilmesinin ardından, *NcoI* kesim bölgesinin Klenow enzimi ile doldurulması planlanmıştır. *NcoI* kesim bölgesi Klenow ile doldurulduğunda, başlangıç kodonu "ATG" uç kısımda oluşmaktadır. Bu nedenle F Primer *katE* pCZ/pILZ, *katE* geninin ikinci kodonundan başlayacak şekilde tasarlanmıştır (Tablo 3.6). F Primer *katE* pCZ/pILZ ve R primer *katE* pCZ/pILZ *KpnI* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* fragmanı, kullanılan Phusion DNA polimeraz enziminin özelliği sebebiyle küt uçlu olmaktadır. Söz konusu fragman *KpnI* enzimi ile kesildiğinde, 5' ucu küt uçlu ve 3' ucu yapışkan

uçlu (*KpnI*) bir fragman elde edilebilecek, böylece yönlü klonlama yapılabilecektir. Ligasyon reaksiyonunun ardından elde edilen ürünler, Bölüm 3.2.1.7’de anlatıldığı şekilde *E. coli* TG1 hücrelerine transforme edilmiştir.

3.2.1.11.8. *katE* Geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em Vektörlerine “In Fusion HD Cloning Kit” ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

pILZ-Em ve pCZ-Cm vektörlerine “In Fusion HD Cloning Kit” aracılığıyla *katE* geninin klonlanması için, her iki vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *NcoI* ve *SpeI* enzimlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan primerler Tablo 3.6’da gösterilmiştir. “In Fusion” klonlama reaksiyonu, Bölüm 3.2.1.11.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.11.9. pILZ-Em Plazmidinin Replikasyon Orijini Bölgesinin pSK Plazmidine Aktarılmasına Yönelik Çalışmalar

pSK plazmidi yalnızca *E. coli* hücrelerine ait replikasyon orijinine sahip olduğundan, *L. lactis* hücrelerinde replike olamamaktadır. pSK plazmidine klonlanmış *katE* geninin ifadesi *E. coli* $\Delta katE$ suşunda [56] başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinden, söz konusu plazmide yalnızca Gram pozitif hücrelerde replike olabilen bir plazmit olan pILZ-Em plazmidinin “replikasyon orijin bölgesi” klonlanarak *L. lactis* hücrelerinde de replike olabilmesi için ilk olarak primerler hazırlanmıştır (Tablo 3.12). Bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan küt uçlu fragman (2213 bç) ile *EcoRV* enzimi ile kesilmiş pSK plazmidinin (küt uçlu) birbirlerine bağlanması için Bölüm 3.2.1.5’te anlatıldığı şekilde ligasyon işlemi gerçekleştirmiştir. *E. coli* $\Delta katE$ suşu, ligasyon ürünleri ile transforme edilmiştir.

Tablo 3.12: pILZ-Em plazmidinin replikasyon orijini bölgesinin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.

F Primer pILZ ori	5’ TAACTTTGTTTGAAGACGGT 3’
R Primer pILZ ori	5’ ATGAGAATTCTATTTAATCA 3’

3.2.1.11.10. *katE* Geninin pCZ-Cm Vektörüne PCR ile Doğrudan Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

katE geninin ligaz enzimi kullanılmadan PCR ile pCZ-Cm plazmidine klonlanması; Bryksin ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışma modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [62]. Buna göre, 5' uçlarında pCZ-Cm plazmidinin çoklu klonlama bölgesine yakın bir bölgeye tutunabilecek kuyruklar olan ileri ve geri primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.6). pCZ-Cm plazmidinin lineer hale getirilmesi için *NcoI* ve *SpeI* enzimleri seçilmiş ve tasarlanan primerlere bu enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. Klonlamanın gerçekleştirilebilmesi için öncelikle, bu primerlerin kullanıldığı PCR ile *katE* geni, uçlarında pCZ-Cm vektörüne tutunma bölgeleri olacak şekilde *B. subtilis* 168 soyunun genomundan çoğaltılmıştır. Böylelikle uçlarında pCZ-Cm plazmidini ile uyumlu kısımlar bulunan *katE* fragmanı elde edilmiştir.

Elde edilen *katE* fragmanının pCZ-Cm plazmidine klonlanması için PCR gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonda kalıp olarak, 250 ng vektör (*NcoI* ve *SpeI* enzimleri ile kesilmiş pCZ-Cm plazmidini) ile molar düzeyde vektörün 3, 5 veya 10 katı kadar *katE* fragmanı bir arada kullanılmıştır. Phusion DNA polimeraz ile gerçekleştirilen reaksiyonda (Tablo 3.7 ve 3.8) elde edilen ürünler, *L. lactis* N8 hücrelerine elektroporasyon aracılığıyla aktarılmaya çalışılmıştır. Hücrelere aktarım oranını arttırmak adına PCR ürünlerinin farklı hacimlerde (1, 5 veya 10 µl) kullanılması veya olası rekombinant plazmidini yoğunlaştırmak adına etanol çöktürmesinin ardından hücrelere aktarılması denenmiştir.

3.2.1.12. *sodA* Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar

3.2.1.12.1. *sodA* Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve PCR

L. lactis N8 soyunun *sodA* genine ait nükleotid dizisi Prof. Dr. Per Saris'ten (Helsinki, Finlandiya) temin edilmiştir. *sodA* geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için kullanılacak olan primer çiftleri, *L. lactis* N8 soyunun genomuna birebir uyumlu olacak şekilde tasarlanmıştır (Tablo 3.13).

Tablo 3.13: *L. lactis* N8 soyuna ait *sodA* geninin PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri. Altı çizili bölgeler, enzim kesimlerinin etkin bir biçimde gerçekleşmesi için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. Primerlerde kalın olarak gösterilen diziler ise *sodA* geninden alınan dizileri göstermektedir. “Infusion” primerlerindeki altı çizili bölge, doğrusal hale getirilmiş plazmitlerden (pLEB124 ile pCZ-Cm/pILZ-Em) alınan nükleotit dizilerini, kalın olarak gösterilen diziler ise *sodA* geninden alınan dizileri ifade etmektedir.

<p><i>sodA</i> geninin pSK ve pLEB124’e klonlanması için kullanılan primer çifti</p> <p>[TAA: bitiş kodonu, ATG: başlangıç kodonu, AGGAGA: <i>L. lactis sodA</i> genine ait ribozom bağlanma bölgesi (RBS), GGATCC: <i>Bam</i>HI kesim bölgesi.]</p>	
F Primer <i>sodA Bam</i>HI	<p>5’</p> <p><u>CGGGATCCCGCCTAAAGGAGAAATTACTATG</u></p> <p>GCA 3’ (34 nt)</p>
R Primer <i>sodA Bam</i>HI	<p>5’</p> <p><u>CGGGATCCCGCTCCTTAAAACATCTTTT</u>G 3’</p> <p>(30 nt)</p>
<p><i>sodA</i> geninin pLEB21 ve pLEB 579’a klonlanması için kullanılan primer çifti</p> <p>[ATG: başlangıç kodonu, CTCGAG: <i>Xho</i>I kesim bölgesi.]</p>	
F Primer <i>sodA</i>	<p>5’ ATGGCATTTACATTACCTGAACTTC 3’</p> <p>(25nt)</p>
R Primer <i>sodA Xho</i>I	<p>5’</p> <p><u>CCGCTCGAGCGGCTCCTTAAAACATCTTTT</u></p> <p>G 3’ (32 nt)</p>
<p><i>sodA</i> geninin kanamisin direnç geni ile birleştirilmesi ve ardından pLEB124’e klonlanması için kullanılan primer çifti</p> <p>[TAA: bitiş kodonu, ATG: başlangıç kodonu, GGATCC: <i>Bam</i>HI kesim bölgesi.]</p>	
F Primer <i>sodA Bam</i>HI	<p>5’</p> <p><u>CGGGATCCCGCCTAAAGGAGAAATTACTATG</u></p> <p>GCA 3’ (34 nt)</p>
R Primer <i>sodA kanamisin</i>	<p>5’AATCATGCGAAACGATCCTCTTATTTG</p> <p>CTTTAGCATAAA 3’ (40 nt)</p>

Tablo 3.13: Devam.

<i>sodA</i> geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için kullanılan primer çifti			
[CCATGG: <i>NcoI</i> kesim bölgesi, GGTACC: <i>KpnI</i> kesim bölgesi.]			
F Primer	<i>sodA</i>	5'	<u>CATGCCATGGCATTACATTACCTGAACTTC</u> CA 3' (33nt)
R Primer	<i>sodA</i>	5'	<u>GGGGTACCCCCTCCTTAAACATCTTTT</u> 3' (30 nt)
<i>katE</i> geninin “Infusion” kit kullanılarak pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için kullanılan primer çifti			
[CCATGG: <i>NcoI</i> kesim bölgesi, ACTAGT: <i>SpeI</i> kesim bölgesi.]			
F Primer	<i>sodA</i>	5'	<u>GGAATGAGAA</u> CCATGGCATTACATTACCTG AACTTCCA 3' (39 nt)
R Primer	<i>sodA</i>	5'	<u>GCTCTCTAGA</u> ACTAGTCTCCTTAAACATCT TTTTG 3' (36 nt)

F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA BamHI* primer çifti, *sodA* geninin pLEB124 plazmidine, F Primer *sodA* ve R Primer *sodA XhoI* primer çifti ise pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerine klonlanması için tasarlanmıştır. *sodA* geninin kanamisin direnç geni ile birleştirilmesi ve ardından pLEB124'e klonlanması için kullanılan primer çifti ise F Primer *sodA BamHI* ile R Primer *sodA* kanamisin'dir.

sodA geninin ligasyon aracılığıyla pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için F Primer *sodA pCZ/pILZ* ile R Primer *sodA pCZ/pILZ KpnI* primerleri kullanılırken, “Infusion” kit aracılığıyla söz konusu plazmitlere klonlanması için F Primer *sodA pILZ/pCZ* “Infusion” ile R Primer *sodA pILZ/pCZ* “Infusion” primer çifti kullanılmıştır.

sodA geninin PCR ile çoğaltılması için Phusion DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır. PCR karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Kalıp DNA olarak *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA'sı kullanılmıştır. Her primer çifti için farklı primer bağlanma sıcaklıkları denenerek, en uygun sıcaklık

tespit edilmiştir. Beklenen PCR fragmanının boyutu yaklaşık 750 bp olduğundan, uzama süresi 30 sn olarak belirlenmiştir.

3.2.1.12.2. *sodA* Geninin pLEB124 Vektörüne *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA BamHI* primer çiftinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* fragmanının pLEB124 plazmidine klonlanması için yapılan çalışmalar, Bölüm 3.2.1.11.2'de *katE* geni için anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.12.3. *sodA* Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

L. lactis'e ait *sodA* geninin promotor içermeyen pLEB579 ve pLEB21 plazmitlerine, *katE* geninde olduğu gibi, *L. lactis* N8 suşunun sahip olduğu oldukça güçlü bir promotor olan P₈ promoturu [60] eşliğinde klonlanması amaçlanmıştır.

F primer *sodA* ve R primer *sodA XhoI* primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen *sodA* fragmanı, başlangıç kodonundan (ATG) itibaren transkripsiyonel terminatör bölgesini de içine alacak şekilde çoğaltılmıştır.

P₈ promoturu ise, aşağı bölgesinde (downstream) yer alan ribozom bağlanma bölgesini (RBS) de içerecek şekilde F Primer P₈ *XhoI BssHII* ve R Primer P₈ *sodA* primer çiftinin kullanılmasıyla (Tablo 3.14) PCR aracılığıyla çoğaltılmıştır.

Tablo 3.14: *L. lactis* N8 soyuna ait P₈ promotörünün PCR aracılığı ile çoğaltılması için seçilen primer çiftleri. Altı çizili bölgeler, enzim kesimlerinin etkin bir biçimde gerçekleşmesi için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. Kalın olarak gösterilen diziler, *sodA* geninden alınan dizileri ifade etmektedir. **CTCGAG**: *XhoI* kesim bölgesi, **GCGCGC**: *BssHII* kesim bölgesi.

F Primer P₈XhoI BssHII	5' <u>CCGCTCGAGCGGTTGGCGCGCCAAAGGACAA</u> TTATTCTCATA 3' (43 nt)
R Primer P₈ sodA	5' TCAGGTAATGTAAATGCCATTATATCTCTCC ATTTCTGC 3' (39 nt)

P₈ promotörü (RBS dahil) ile *sodA* geninin birleştirilmesi amacıyla çakışan (overlap) PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7 ve 3.8). Çakışan PCR'da, Bölüm 3.2.1.11.3'te anlatıldığı şekilde, F Primer P₈ *XhoI BssHII* ile ve R Primer *sodA XhoI* primer çifti kullanılmış ve böylelikle P₈-*sodA* fragmanının (790 bç) oluşturulması mümkün olmuştur.

pLEB579 ve pLEB21 plazmitlerinin her ikisine de çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈-*sodA* fragmanı klonlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, pLEB579 plazmidinde bulunan *XhoI* ve *BssHII* enzim kesim bölgesi ile pLEB21 plazmidinde bulunan *XhoI* enzim kesim bölgesi seçilmiş ve Bölüm 3.2.1.11.3'te anlatıldığı şekilde ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.12.4. *sodA* Geninin pSK Vektörüne Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA BamHI* primer çiftinin kullanıldığı PCR ile elde edilen *sodA* fragmanının pSK (pBlueScript SK) vektörüne klonlanması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar, *katE* geni ile aynı şekilde Bölüm 3.2.1.11.4'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.1.12.5. *sodA* Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124'e Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA* kanamisin primer çifti kullanılarak elde edilen DNA fragmanı (*sodA*) ile F Primer kanamisin RBS ve R Primer kanamisin *BamHI* primer çifti kullanılarak elde edilen DNA fragmanının (kanamisin) bir arada kalıp DNA olarak kullanılması ile Bölüm 3.2.1.11.5'te anlatıldığı şekilde çakışan (overlap) PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7 ve 3.8). Çakışan PCR yoluyla *sodA* ve kanamisin fragmanlarının birleştirilmesi ile *sodA*-kanamisin fragmanının (1910 bç) oluşturulması hedeflenmiştir.

3.2.1.12.6. *L. lactis* Suşunda *sodA* Geninin Kontrollü İfadesinin Sağlanması için Çinko (Zn⁺) ile Uyarılabilen Zirex Sistemi'nin Kullanılması

sodA geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em vektörlerine klonlanması için, söz konusu plazmitlerin çoklu klonlama bölgesinde (MCS) bulunan *NcoI* ve *KpnI* enzimleri seçilmiştir. *katE* geninden farklı olarak, *NcoI* enzimi *sodA* genini kesmediğinden, bu genin söz konusu plazmitlere klonlanması amacıyla kullanılabilmiştir. Hem pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitleri hem de F Primer *sodA* pCZ/pILZ *NcoI* ve R Primer *sodA* pCZ/pILZ *KpnI* primer çifti (Tablo 3.13) kullanılarak elde edilen *sodA* fragmanı *NcoI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildikten sonra gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından ligasyona tabi tutulmuşlardır. Ardından *E. coli* TG1 suşu, ligasyon ürünleri ile transforme edilmiştir.

3.2.1.12.7. *sodA* Geninin pCZ-Cm ve pILZ-Em Vektörlerine “In Fusion HD Cloning Kit” ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

F Primer *sodA* pILZ/pCZ “Infusion” ve F Primer *sodA* pILZ/pCZ “Infusion” primer çiftinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* fragmanının pILZ-Em ve pCZ-Cm vektörlerine “In Fusion HD Cloning Kit” aracılığıyla klonlanması için, her iki vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *NcoI* ve *SpeI* enzimlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır. “In Fusion” klonlama reaksiyonu, Bölüm 3.2.1.11.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Fermentasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Kullanılan Bakteri Suşları ve Büyüme Koşulları

Nisin üreticisi olarak *Lactococcus lactis* N8 ve nisin üretiminin tespitinde indikatör suş olarak *Micrococcus luteus* NCIMB 8166 [National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Ulusal Endüstriyel ve Denizel Bakteriler Koleksiyonu)] kullanılmıştır. Her iki suş, Helsinki Üniversitesi’nden Prof. Dr. Per Saris’ten temin edilmiştir. *L. lactis*, GM17 besiyerinde 30 °C’ta 180 rpm çalkalama ile büyütülmüştür. Kültür hacmi, 500 ml’lik çentikli erlenlerde 100 ml olarak ayanlanmıştır. *M. luteus* ise 37 °C’ta 20 saat boyunca BLB agarda büyütülmüştür.

3.2.2.2. Büyüme Eğrilerinin Hazırlanması

GM17 agar üzerindeki tek bir *L. lactis* kolonisi, gecelik kültür hazırlamak için 10 ml GM17 besiyeri içerisine inoküle edilmiştir. GSH veya pirüvat ilave edilmiş 100'er ml GM17 broth farklı çentikli erlenlerde hazırlanmıştır. Herhangi bir ek madde içermeyen GM17 broth, deneyde kontrol olarak kullanılmıştır. Gecelik kültürden eşit sayıda hücre (~1 ml) her bir çentikli erlene aktarılmış ve aerobik koşullar altında 30 °C'ta 180 rpm çalkalama ile 10 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her tekrarda GM17 broth besiyerine aynı sayıda hücreyi eklemek için inokulumun büyüklüğü (~1 ml), gecelik kültürün optik yoğunluğunun (OD) 600 nm'de (UV-1900 UV-VIS Spektrofotometresi, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçülmesiyle ayarlanmıştır. Büyüme eğrilerinin oluşturulması için, her iki saatte bir örneklerin OD₆₀₀ değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Sonuçlar, üç biyolojik tekrarın ortalaması olarak verilmiştir. *L. lactis* hücrelerinin büyütülmesi sırasında besiyerindeki pH değişimi, bir pH metre (Hanna, Rhode Island, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

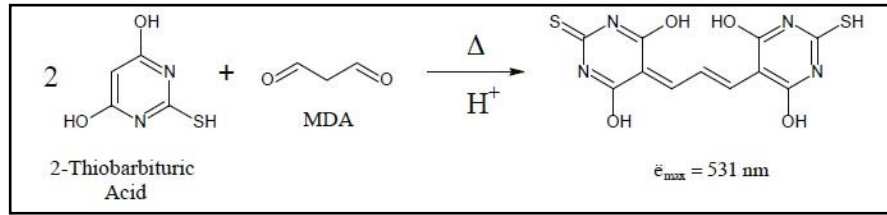
3.2.2.3. Nisin Üretiminin Belirlenmesi

L. lactis kültürlerinin supernatantlarındaki nisin konsantrasyonu, agar difüzyon metodu ile ölçülmüştür [63]. 37 °C'ta 20 saat boyunca BLB agar üzerinde büyütülen *M. luteus* suşundan bir öze dolusu alınarak, 6 ml steril izotonik NaCl çözeltisi (%0.9) içerisinde süspanse edilmiştir. *M. luteus* çözeltisi, sıcaklığı 50 °C'a ayarlanan 20 ml S1 agar ile karıştırılmış ve steril bir Petri kabına dökülmüştür. *L. lactis* hücrelerinin supernatantları, kalan canlı hücreleri inaktive etmek için 10 dk boyunca 70 °C'ta tutulmuştur. Isıyla inaktivasyondan sonra, her supernatanttan 80 µl alınarak S1 agar üzerindeki kuyulara eklenmiş ve Petriler 20-24 saat boyunca 30 °C'ta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda *M. luteus*'a karşı oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri, Cheigh ve arkadaşlarının (2002) yöntemine göre hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki nisin çözeltilerinin (0 ila 80 IU ml⁻¹) kullanılmasıyla oluşturulan standart eğriye (R²=0.99) göre belirlenmiştir [64].

3.2.2.4. Lipid Peroksidasyonunun Tespiti

Reaktif oksijen türevleri (ROS), organizmalarda lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Malondialdehit (MDA), hücrelerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden bir tanesidir. Hücre içerisindeki reaktif oksijen türevlerindeki artış, MDA bileşiğinin olması gerekenden fazla miktarda üretilmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple hücre içi MDA seviyesi, oksidatif stresin belirteci olarak kabul edilmektedir.

MDA miktarının belirlenmesinde tiyobarbitürik asit (TBA) kullanılmıştır. MDA ile TBA etkileşime girerek pembe renkli MDA-TBA bileşiğini oluşturmaktadırlar (Şekil 3.4). *L. lactis* hücrelerindeki MDA miktarının tespiti için 0.25 ml örnek, 0.5 ml %0.1 trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırılmış ve 11.000 rpm'de 4 °C'ta 15 dk santrifüjlenmiştir. Ardından, 0.25 ml 0.1 M Tris/HCl (pH 7.6) ve 0.5 ml indikatör çözelti (%15 TCA, %0.375 TBA ve 0.25 M HCl) 0.25 ml supernatanta ilave edilerek 95 °C'ta 45 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, örnekler soğumaları için buza aktarılmış ve sonrasında 11.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Supernatantların absorbansı 532 ve 600 nm'de ölçülmüştür. Hücrelerdeki lipid peroksidasyonu, mg (kuru ağırlık) başına nmol ml⁻¹ MDA olarak ifade edilmiştir [65].



Şekil 3.4: Asidik koşullar altında 2- tiyobarbitürik asit (TBA) ile malondialdehit (MDA) arasında gerçekleşen reaksiyon.

3.2.2.5. H₂O₂ Ölçümü

H₂O₂ konsantrasyonunun tespitinde, FOX [ferrous oxidation-xylenol orange (demir oksidasyon-ksilenol turuncu)] metodu kullanılmıştır. Bu yöntemin temeli, H₂O₂'nin demir iyonu (Fe⁺²) ile reaksiyona girdiği Fenton reaksiyonuna (Fe⁺² + H₂O₂ → Fe⁺³ + OH[•] + OH⁻) dayanmaktadır. Ferrik iyon (Fe⁺³) ve ksilenol turuncu arasındaki

reaksiyon, 560 nm'de en yüksek absorbansa sahip bir kompleksin oluşumu ile sonuçlanmaktadır.

Örneklerin santrifüjlenmesi ile elde edilen supernatantların 950 µl'si, amonyum demir sülfat (5 mM), H₂SO₄ (500 mM), sorbitol (2 M) ve ksilenol turuncu (2 mM) içeren 50 µl 20X FOX solüsyonu ile karıştırılmış ve karanlıkta 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, örneklerin 560 nm'deki absorbans değeri ölçülmüştür [66]. Örneklerdeki H₂O₂ miktarı, 0 ila 4 µM arasında değişen H₂O₂ kullanılarak oluşturulan standart eğriye (R²=0.99) göre hesaplanmıştır.

3.2.2.6. RNA İzolasyonu ve Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonu için, yaklaşık 10⁸ adet *L. lactis* hücresi, 13.000 rpm'de 5 dk süreyle +4 °C'ta santrifüjlenerek toplanmış ve daha sonra iki kez Tris-EDTA (TE) tamponu (pH 8.0) ile yıkanmıştır. 37 °C'ta 30 dk boyunca 10 mg ml⁻¹ lizozim çözeltisi içinde inkübe edilen hücrelerin total RNA içeriği, üreticinin talimatlarına göre homojenizasyon işlemi yoluyla innuSPEED Bakteriler/Mantarlar RNA Kiti (Analytic Jena, Almanya) ile izole edilmiştir.

İzolasyondan sonra, RNA örneklerinin bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Örneklerdeki RNA konsantrasyonu (ng/µl), NanoDrop Lite Spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak 260 nm'de (A₂₆₀) absorbans ölçümü ile tespit edilmiştir. Örneklerin A₂₆₀ ila A₂₈₀ ölçümleri arasındaki oran 1.8 ila 2 arasında olduğunda, numuneler cDNA sentezi için yeterince saf olarak kabul edilmiştir. Örneklerdeki muhtemel genomik DNA kontaminasyonu, RNaz içermeyen DNaz I (RNase free DNase I, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak elimine edilmiş ve her RNA örneğinde DNA kontaminasyonun giderimi PCR ile doğrulanmıştır. DNaz işleminden sonra elde edilen RNA örnekleri, iScript cDNA Sentez Kiti (Bio-Rad, ABD) ile üreticinin talimatlarına göre cDNA sentezlemek için kullanılmıştır.

3.2.2.7. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR, RT-qPCR) Kullanılarak Rölatif Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

RT-qPCR için kullanılan primerler, PRIMER3 yazılımı [67, 68] ile tasarlanmış ve Tablo 3.15'te sıralanmıştır. Primerler, olası self-dimer, heterodimer oluşumu ve

ikincil yapılar için IDT OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., ABD) kullanılarak taranmıştır.

Tablo 3.15: RT-qPCR analizinde kullanılan primerler.

Gen	Primer		Ürün boyutu (bp)
	Yön	Dizi (5'→3')	
<i>nisZ</i>	İleri	AGATTCAGGTGCATCACCAC	75
	Geri	CCCATCAGAGCTCCTGTTTT	
<i>sodA</i>	İleri	CCAAACACTGACGGTTCTGA	128
	Geri	CCTGAACCAAAACGACCTGT	
<i>recA</i>	İleri	TGACTCAGTTGCAGCTTTGG	80
	Geri	TACGAGCTTGAAGCCCAACT	
<i>ahpF</i>	İleri	GGCGGTCAACCACTAGAAAC	85
	Geri	CAAGCTGACGACCAAGTTGA	
<i>ahpC</i>	İleri	TATTGACCCAGACGGTGTGA	128
	Geri	GACAACTTCCCCTGGATGA	
<i>noxE</i>	İleri	ATCGATATCCAGGCCATGAG	87
	Geri	TTCCGACCCAAATAGCTGTC	
<i>noxB</i>	İleri	GTGGACATCGTCTTCAAGCA	190
	Geri	CCACCATTGATGTCTGCAAG	
<i>trxB1</i>	İleri	GGTGTTCCTGGTGGTCAAAT	164
	Geri	TCCCCATGGTCTTCAATAGC	
<i>relA</i>	İleri	TTATGCCCCTCTTGCTCATC	189
	Geri	CCAGCTTTTTTCGACTCGTTC	
<i>cydA</i>	İleri	TCCCACCAGTAACGGTTCTC	187
	Geri	CCTGAGGTAATCGCAAGGAA	
<i>gshR</i>	İleri	AAATGGGGAGGAACTTGTCC	100
	Geri	CCTGCCCTTTTAACTGTTCG	
<i>tuf</i>	İleri	CGTCACCTGGGAAGTCGTAT	180
	Geri	CTGCAACTGATGGACCAATG	

RT-qPCR, ABI 7500 StepOnePlus™ cihazında (Applied Biosystems, ABD) iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, ABD) kullanılarak üreticinin protokolüne göre yapılmıştır. Kullanılan RT-qPCR programı Tablo 3.16'da belirtilmiştir. Ürünlerin özgüllüğünü ve homojenliğini kontrol etmek için erime eğrisi

analizi yapılmıştır. Rölatif gen ekspresyonu, referans gen olarak uzama faktörü Tu'yu kodlayan *tuf* geni kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü [69] ile hesaplanmıştır. Tüm deneyler kopya halinde en az üç kez yapılmıştır.

Tablo 3.16: RT-qPCR programı.

Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40
Bağlanma	60 °C	30 sn	
Uzama	60 °C	30 sn	
Erime eğrisi	55-95 °C	Her 0.1°C sıcaklık değişiminde ölçüm	1

3.2.2.8. Fermentör Çalışmaları

GM17 agar üzerindeki tek bir *L. lactis* kolonisi, gecelik kültür hazırlamak için 30 ml GM17 besiyeri içerisine inoküle edilerek 30 °C'ta inkübe edilmiştir. GSH (6.4 mM) veya pirüvat (10 mM) ilave edilmiş 2 L GM17 broth fermentörde (BioFlo® 120 Fermentör, Eppendorf, Hamburg, Almanya) hazırlanmıştır. Herhangi bir ek madde içermeyen GM17 broth, deneyde kontrol olarak kullanılmıştır. Gecelik kültürden, fermentör içerisindeki GM17 broth'a %1 oranında ekim yapılmış ve aerobik koşullar altında 30 °C'ta yaklaşık %30 çözülmüş oksijen varlığında 180 rpm çalkalama ile 10 saat boyunca inkübe edilmiştir. Büyüme eğrilerinin oluşturulması için, 4., 6., 8. ve 10. saatlerde fermentörden örnek alınarak OD₆₀₀ değeri (UV-1900 UV-VIS Spektrofotometresi, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçülmüştür. Örneklerin nisin üretimlerinin belirlenmesi, Bölüm 3.2.2.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.9. İstatistiksel Analiz

GSH veya pirüvat ilave edilmiş GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri ile herhangi bir madde eklenmemiş GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri

(kontrol örneği) arasındaki farkları incelemek için iki yönlü ANOVA analizleri yapılmıştır. RT-qPCR sonuçları, anlamlı farkları belirlemek için GraphPad Prism istatistik programı (GraphPad Software Inc., ABD) kullanılarak Mann-Whitney testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir ($P < 0.05$).

4. BULGULAR

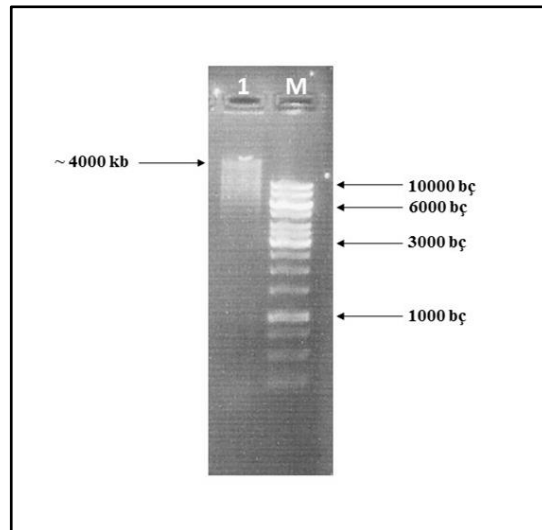
4.1. Klonlama Çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen klonlama çalışmaları, *B. subtilis*'e ait katalaz (*katE*) geni ile *L. lactis*'e ait süperoksit dismutaz (*sodA*) geninin *L. lactis*'te farklı seviyelerde ifade edilmesi amacıyla yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

4.1.1. *katE* Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar

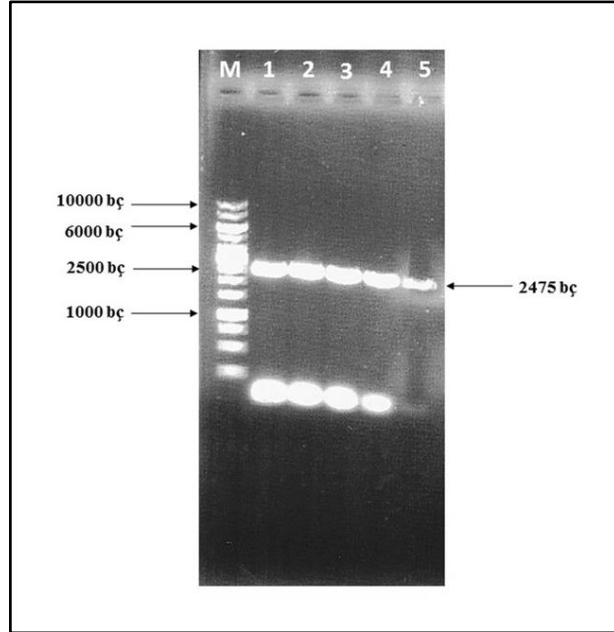
4.1.1.1. *B. subtilis* Katalaz (*katE*) Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve *katE* Geninin PCR ile Çoğaltılması

B. subtilis katalaz (*katE*) genine özgü primerlerin hazırlanışı ile ilgili detaylar Bölüm 3.2.1.11.1'de verilmiştir. "F Primer *katE* BamHI" ve "R Primer *katE* BamHI" primer çifti, *katE* geninin pLEB124 ve pSK plazmitlerine, "F Primer *katE*" ve "R Primer *katE* XhoI" primer çifti pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerine klonlanması için tasarlanmıştır. Bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında kalıp olarak *B. subtilis* 168 soyunun genomik DNA'sı kullanılmıştır (Şekil 4.1).



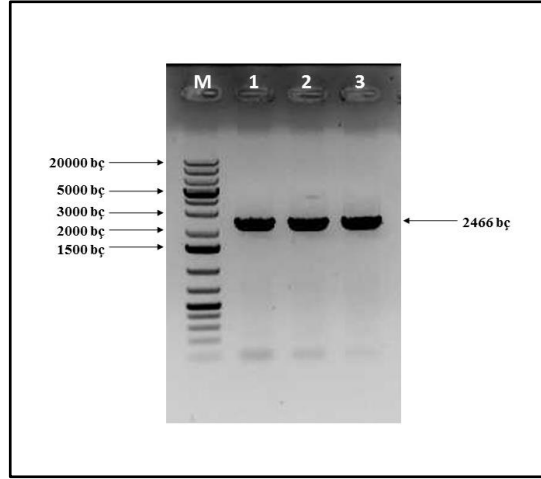
Şekil 4.1: *B. subtilis* 168 soyunun genomik DNA'sının agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *B. subtilis* 168 soyunun genomik DNA'sı (~ 4000 kb).

“F Primer *katE BamHI*” ve “R Primer *katE BamHI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen DNA fragmanlarının agaroz jeldeki görünüşleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen 2475 bç’lik fragmanın *katE* genine ait olduğu yapılan DNA sekansı ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.2: “F Primer *katE BamHI*” ve “R Primer *katE BamHI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2475 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünüşü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

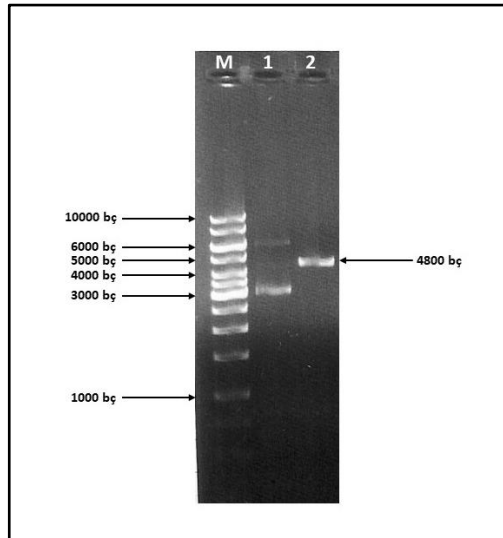
“F Primer *katE*” ve “R Primer *katE XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* (2466 bç) genine ait olduğu düşünülen PCR ürününün agaroz jeldeki görünüşü Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3: “F Primer *katE*” ve “R Primer *katE XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* (2466 bç) genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 63 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 67 °C).

4.1.1.2. *katE* Geninin, pLEB124 Mekik Vektörüne *E. coli*’de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

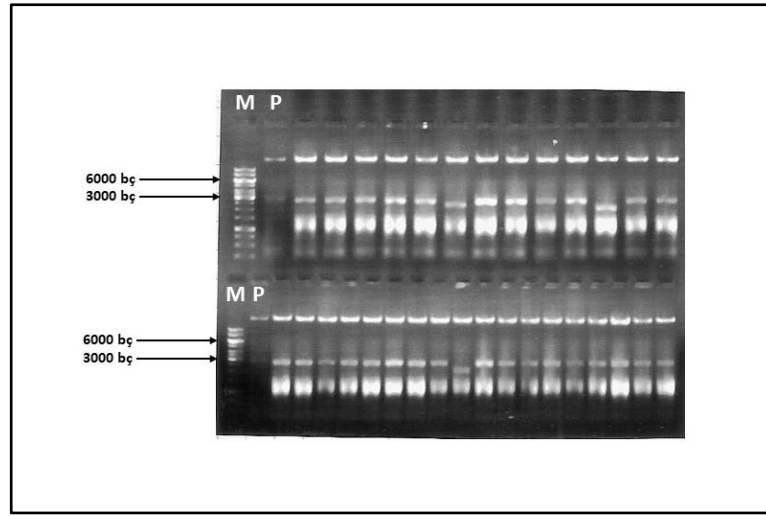
pLEB124 plazmidine klonlama yapmak amacıyla çoklu klonlama bölgesinde yer alan *Bam*HI enzim kesim bölgesi seçilmiştir. Bu nedenle hem pLEB124 plazmidini (Şekil 4.4) hem de söz konusu *katE* fragmanı *Bam*HI enzimi ile kesilmiştir.



Şekil 4.4: pLEB124 plazmit DNA’sının agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. Herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilmemiş pLEB124 plazmit DNA’sı; 2. *Bam*HI enzimi ile kesilmiş pLEB124 plazmit DNA’sı (4800 bç).

Ligasyon sonrası gerçekleştirilen transformasyon işlemi sonucunda elde edilen transformantlar, mini prep plazmit izolasyonu yöntemiyle taranarak kontrol plazmit (pLEB124) ile birlikte agaroz jelde yürütülmüşlerdir. Ancak kontrol plazmitten daha büyük boyutta, insörtü almış olma ihtimali bulunan herhangi bir plazmit DNA'ya rastlanmamıştır (Şekil 4.5). Yapılan bütün denemelerde, agaroz jelde kontrol plazmit ile aynı boyutta veya daha küçük olduğu düşünülen plazmit DNA'lar gözlenmiştir.

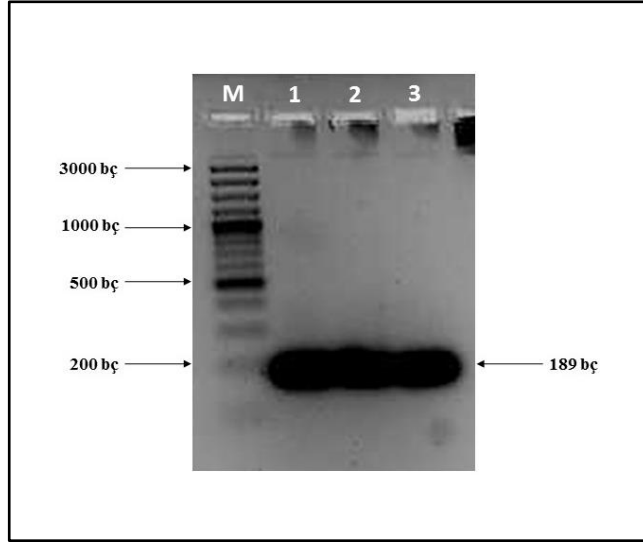
katE geninin pLEB124'e klonlanma çalışmalarından negatif sonuç elde edilince, farklı vektörlerin (pLEB579 ve pLEB21) denenmesine karar verilmiştir.



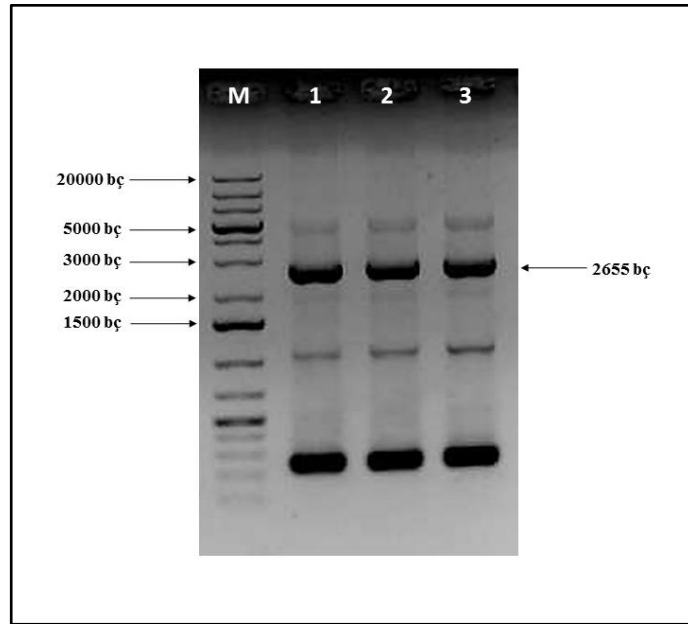
Şekil 4.5: pLEB124-*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pLEB124 plazmit DNA'sı (4800 bç).

4.1.1.3. *katE* Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerinde promotor bölgesi bulunmamaktadır. Bu sayede, istenilen güçteki promotor bu plazmilere eklenerek söz konusu genin istenilen seviyede ifadesi sağlanabilmektedir. *katE* genini güçlü bir promotor altında ifade edebilmek için *L. lactis* P₈ promotoru seçilmiştir. “F Primer P₈ *Xho*I” ve “R Primer P₈ *katE*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P₈ promotoruna ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Ayrıntıları Bölüm 3.2.1.11.3'te verilen çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈-*katE* fragmanının (2655 bç) agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

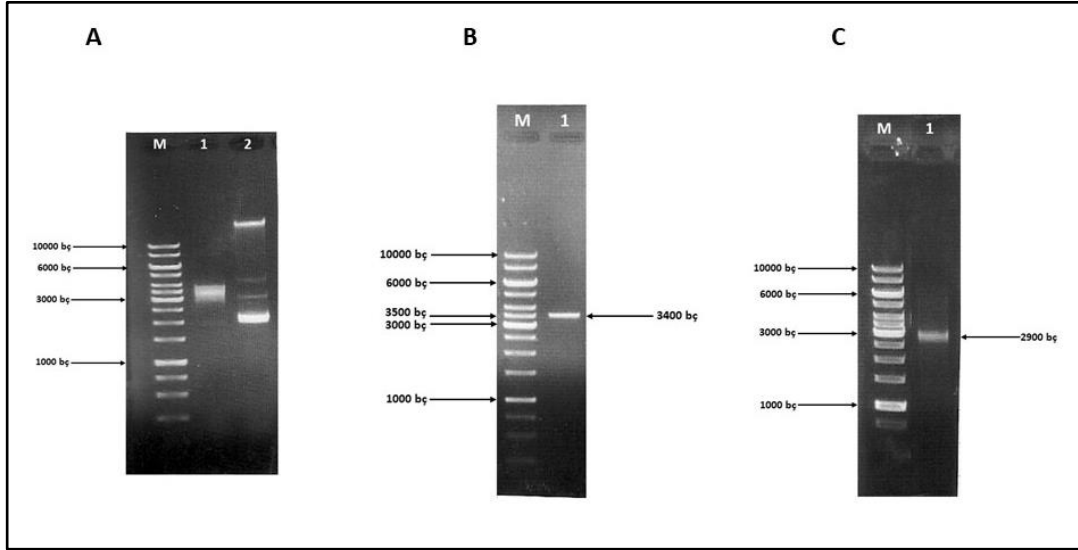


Şekil 4.6: “F Primer P_8 *XhoI*” ve “R Primer P_8 *katE*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P_8 promotörü isimli PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 100 bç’lik moleküler DNA belirteci (Thermo 100 bp Plus DNA ladder); 1. P_8 promotörü (Primer bağlanma sıcaklığı 58 °C); 2. P_8 promotörü (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 3. P_8 promotörü (Primer bağlanma sıcaklığı 62 °C).



Şekil 4.7: Çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P_8 -*katE* fragmanının (2655 bç) agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. P_8 -*katE* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 2. P_8 -*katE* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 3. P_8 -*katE* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Kullanılan primerler sayesinde P₈-*katE* fragmanının her iki ucunda *Xho*I enzim kesim bölgeleri yer almaktadır. Bu nedenle, bu fragmanın pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerine klonlanması amacıyla, plazmitlerin çoklu klonlama bölgesinde yer alan *Xho*I restriksiyon enzim kesim bölgesi kullanılmıştır. Hem adı geçen DNA fragmanı hem de pLEB21 ve pLEB579 plazmitleri, *Xho*I enzimi ile kesilerek (Şekil 4.8) gerekli yapışkan uçlar elde edildikten sonra ligasyon işlemine tabi tutulmuşlardır.



Şekil 4.8: A. pLEB21 plazmit DNA'sı (1), pLEB579 plazmit DNA'sı (2), 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder) (M); B. *Xho*I enzimi ile kesilmiş pLEB21 plazmit DNA'sı (3400 kb) (1); C. *Xho*I enzimi ile kesilmiş pLEB579 plazmit DNA'sı (2900 kb).

Ligasyon sonrası gerçekleştirilen transformasyon işlemi sonucunda elde edilen transformantlardan mini prep plazmit izolasyonu yöntemiyle elde edilen olası rekombinant plazmidler, kontrol plazmitler ile birlikte agaroz jelde yürütülmüşlerdir. Ancak kontrol plazmitten daha büyük boyutta, insörtü almış olma ihtimali bulunan herhangi bir plazmit DNA'ya rastlanmamıştır. Söz konusu genlerin pLEB21 ve pLEB579 plazmitleri ile ligasyonu sonrası gerçekleştirilen transformasyon işlemi sonucunda da Şekil 4.5 ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

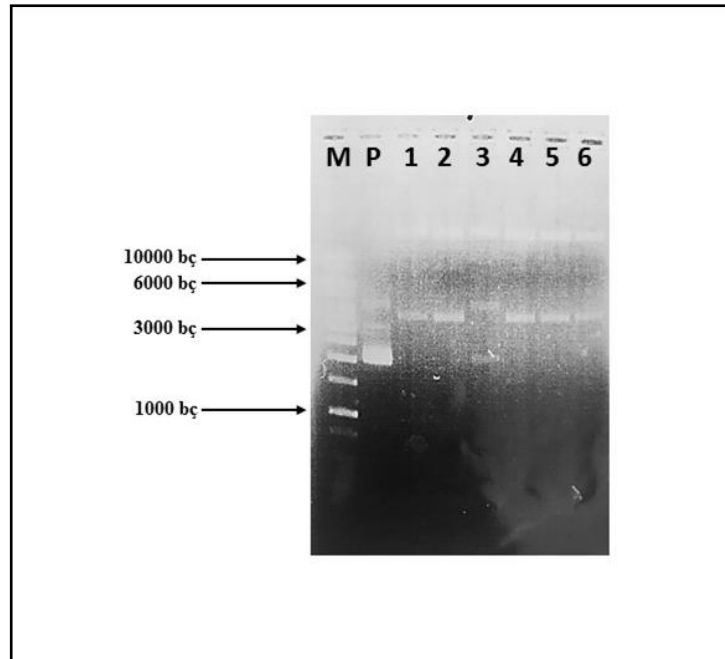
Tez çalışması kapsamında, *katE* geninin pLEB579, pLEB21 ve pLEB124 vektörlerine *E. coli*'de klonlanması planlandığı şekilde gerçekleştirilememiştir. Ligasyon sonrası gerçekleştirilen transformasyon işlemleri sonucunda, kontrol plazmitten daha küçük boyutta plazmit DNA'lar elde edilmesi, katalaz geninin

rekombinant vektörün stabilitesini olumsuz yönde etkilediğini, bu sebeple *katE* ile beraber plazmit DNA'dan da bazı fragmanların elimine edildiğini düşündürmüştür.

4.1.1.4. *katE* Geninin pBluescript SK (pSK) Vektörüne Klonlanması

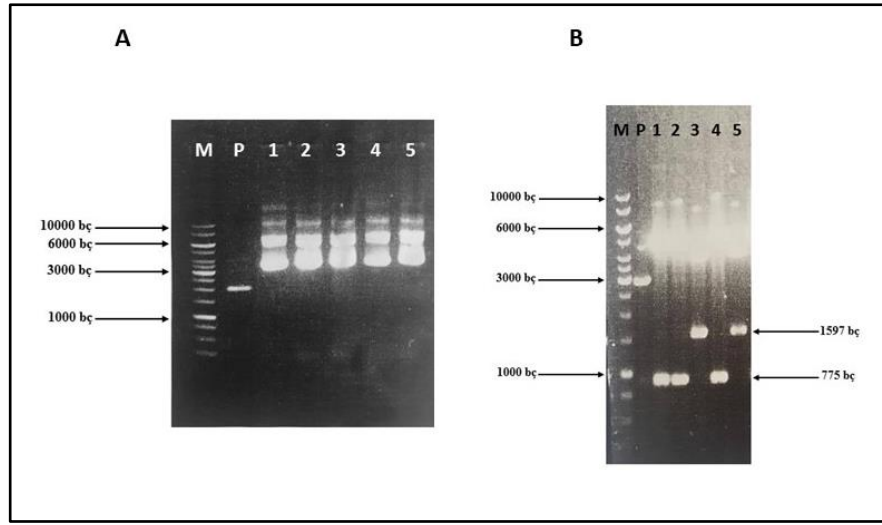
B. subtilis'e ait *katE* geninin *E. coli*'de ifade edilip edilmediğinin belirlenmesi için, söz konusu genin oldukça kararlı bir vektör olan pSK vektörüne klonlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *Bam*HI enzim kesim bölgesi kullanılmıştır.

katE geninin pSK vektörüne klonlanması amacıyla hem pSK plazmidini hem de "F Primer *katE Bam*HI" ve "R Primer *katE Bam*HI" primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* fragmanı (Şekil 4.2) *Bam*HI enzimi ile kesilmiş, gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından ligasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Transformasyonun ardından IPTG, X-gal ve Amp içeren LB agar besiyerlerinde oluşan 6 adet beyaz koloni seçilerek bu hücrelerden mini prep yöntemiyle plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9). Şekilde görüldüğü üzere 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı transformantların taşıdıkları plazmitlerin, pSK plazmidinden büyük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. pSK-*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar (1-6). M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pSK plazmit DNA'sı (2961 bç).

Restriksiyon enzim kesimi ile doğrulamanın gerçekleştirilebilmesi için 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı transformantlardan plazmitler izole edilmiş ve hem *katE* genini hem de pSK plazmidini kesen *EcoRI* enzimi ile kesilmişlerdir (Şekil 4.10). *EcoRI* enzim kesimi sonucunda *katE* geninin ifade yönünde ve ifadenin tersi yönünde yerleşmesi sonucu elde edilmesi beklenen DNA uzunlukları Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre Şekil 4.10’da 3 ve 5 numaralı transformantların taşıdığı plazmitte *katE* geni lac promotorunun altına doğru yönlü yerleşmişken, 1, 2 ve 4 numaralı transformantların taşıdığı plazmitte *katE* geni ters yönlü yerleşmiştir.

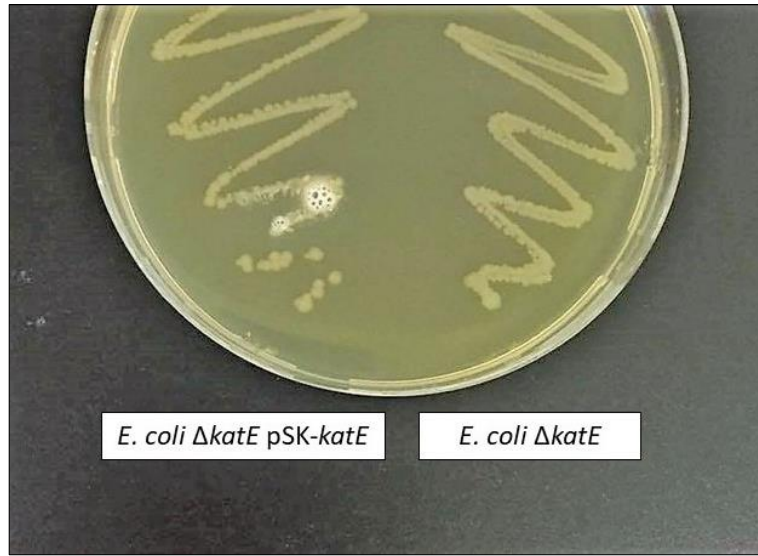


Şekil 4.10: A. pSK-*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar (sırasıyla 1-5), 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder) (M), pSK plazmit DNA'sı (2961 bç) (P); B. 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'ların *EcoRI* enzim kesimi sonuçları (1-5).

Tablo 4.1: Rekombinant plazmitlerde *katE* geninin yönüne göre *EcoRI* enzim kesimi sonucunda elde edilmesi beklenen DNA uzunlukları.

	<i>katE</i> geninin ifade yönünde yerleşmesi durumunda	<i>katE</i> geninin ifadenin tersi yönünde yerleşmesi durumunda
Birinci bandın uzunluğu	3852 bç	4674 bç
İkinci bandın uzunluğu	1597 bç	775 bç

Elde edilen transformantların katalaz aktivitelerinin belirlenebilmesi için LB agar besiyerinde büyütülen kolonilerin üzerine %37'lik H₂O₂ damlatılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan $\Delta katE$ suşunda baloncuk oluşmazken, olası rekombinant plazmitleri içeren $\Delta katE$ suşunda katalaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan O₂ sebebiyle oldukça fazla miktarda baloncuk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.11). DNA dizi analizi ile rekombinant plazmitteki varlığı gösterilen *katE* geninin ifade edildiği de bu şekilde gösterilmiştir.



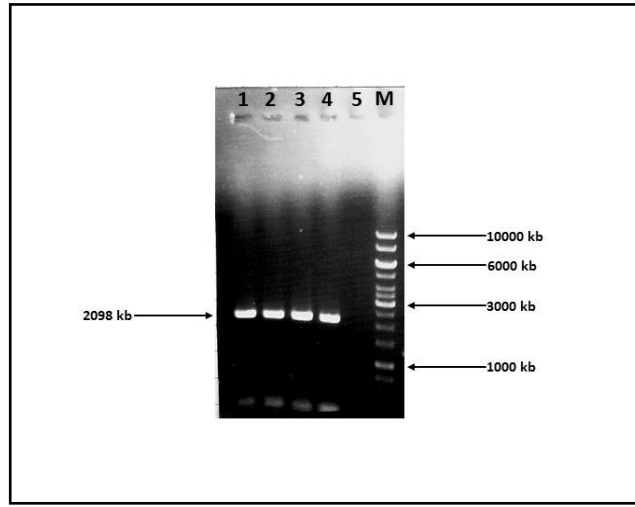
Şekil 4.11. Katalaz aktivitesi.

Ancak pSK plazmidi *L. lactis* hücrelerinde replike olamadığından, *katE* geninin *L. lactis* hücrelerinde ifade edilebilmesi için alternatif bir yöntem arayışına girilmiştir. İlk olarak, *katE* geninin çakışan (overlap) PCR yoluyla kanamisin direnç geni ile birleştirildikten sonra pLEB124 plazmidine klonlanması düşünülmüş ve aşağıdaki deneyler gerçekleştirilmiştir.

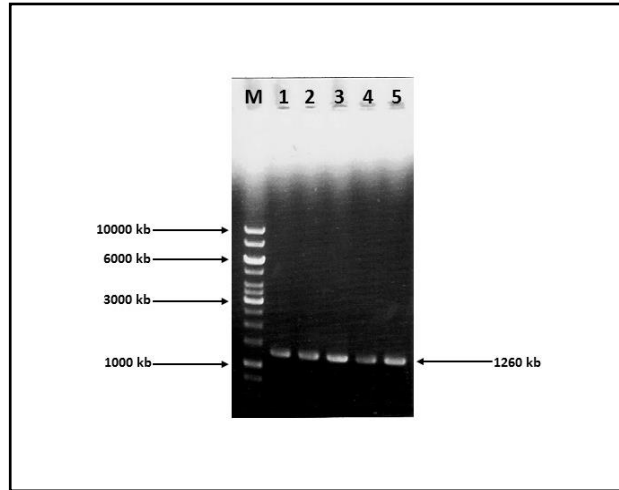
4.1.1.5. *katE* Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124 Plazmidine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

“F Primer *katE* BamHI” ve “R Primer *katE* kanamisin” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu, *katE* genine (2098 bp) ait DNA fragmanı çalışılan her sıcaklıkta elde edilmiştir (Şekil 4.12). Kanamisin genini çoğaltmak için ise “F Primer

kanamisin RBS” ve “R Primer kanamisin *Bam*HI” primer çifti kullanılmış ve 1260 kb’lık DNA fragmanı çalışılan her sıcaklıkta elde edilmiştir (Şekil 4.13).

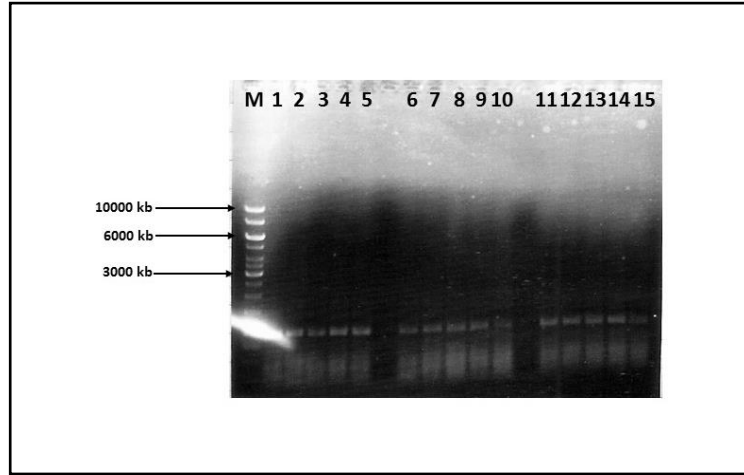


Şekil 4.12: “F Primer *katE Bam*HI” ve “R Primer *katE* kanamisin” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2098 bp) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).



Şekil 4.13: “F Primer kanamisin RBS” ve “R Primer kanamisin *Bam*HI” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen kanamisin genine özgü ürünün (1260 bp) agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. Kanamisin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. Kanamisin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. Kanamisin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. Kanamisin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. Kanamisin direnç geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Yapılan bütün denemelerde katalaz ve kanamisin genleri çakışan (overlap) PCR yöntemiyle birleştirilememiştir (Şekil 4.14). *katE*–kanamisin fragmanını (3358 bp) elde etmek için, farklı primer bağlanma sıcaklıkları ile reaksiyona farklı konsantrasyonlarda *katE* ve kanamisin fragmanlarının eklenmesi sonucu değiştirmemiştir.



Şekil 4.14: Katalaz ve kanamisin genlerini birleştirmek için yapılan çakışan (overlap) PCR sonucunun agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1, 6, 11. *katE*–kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2, 7, 12. *katE*–kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3, 8, 13. *katE*–kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4, 9, 14. *katE*–kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5, 10, 15. *katE*–kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C). PCR hazırlanırken kalıp DNA olarak; 1 – 5. 1:1 oranında *katE* ve kanamisin fragmanları, 5 – 10. 1:2 oranında *katE* ve kanamisin fragmanları ve 10 – 15. 2:1 oranında *katE* ve kanamisin fragmanları denenmiştir.

Bunun üzerine çakışan (overlap) PCR'de kullanılan primerlerin yeniden tasarlanarak tekrar sentezlettilmesi yoluna gidilmiştir. Bu sayede, *katE* geni ile kanamisin direnç geni arasındaki homolog olan (çakışan) bölgenin nükleotit sayısının artırılması amaçlanmıştır. İlk sentezlettilen primerler kullanıldığında homolog olan bölge 20 nükleotitten oluştuktayken, yeni sentezlettilen primerlerle bu bölge 40 nükleotide çıkartılmıştır. Bunun için F ve R Primer'lere Tablo 4.2'de belirtildiği üzere 10'ar nükleotit eklenmiştir. Ancak yeni tasarlanan primerlerle de beklenen ürünler elde edilememiştir. PCR'de farklı primer bağlanma sıcaklıkları ile farklı konsantrasyonlarda *katE* ve kanamisin fragmanlarının kullanılması, sonucu değiştirmemiştir.

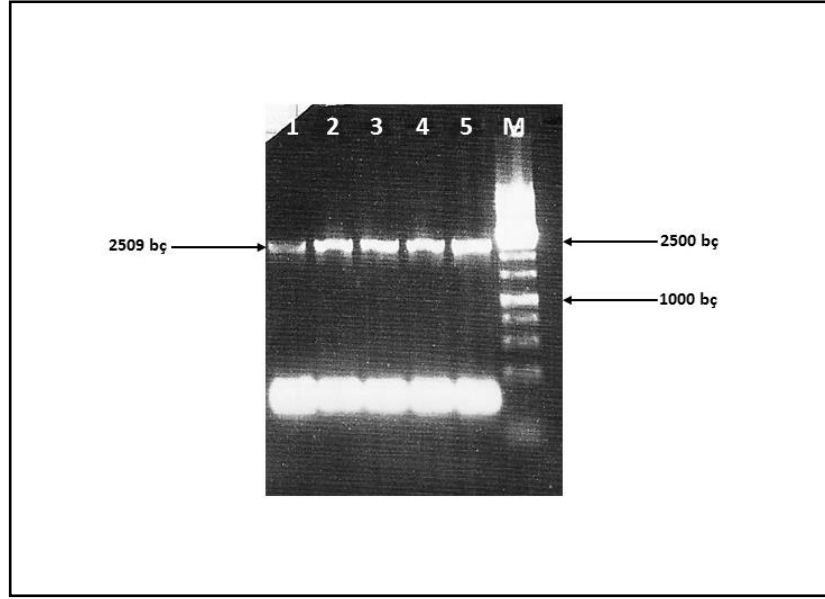
Tablo 4.2: *katE* ve kanamisin genlerini birleştirmek için overlap (çakışan) PCR’de kullanılmak üzere yeniden tasarlanan primer çiftleri. Küçük harflerle koyu olarak gösterilen diziler, *katE* geni ile kanamisin direnç geni arasındaki homolog olan (çakışan) bölgenin nükleotit sayısının arttırılması için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. **GAGGA**: kanamisin direnç geninin ribozom bağlanma bölgesi (RBS), **ATG**: kanamisin direnç geninin başlangıç kodonu.

R Primer <i>katE</i> kanamisin yeni	5’ catcttggttcAATCATGCGAAACGATCCTCTCAA ATTCGTCTATCCCAAT 3’ (50 nt)
F Primer <i>katE</i> kanamisin RBS yeni	5’ acgaatttgaGAGGATCGTTTCGCATGATTGAAC 3’ (34 nt)

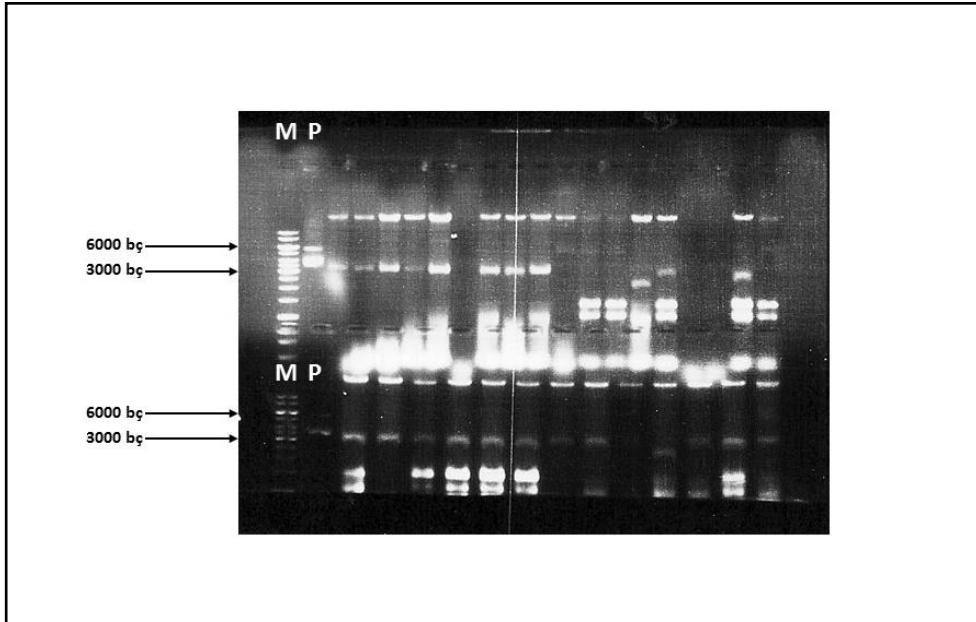
Bunun üzerine katalaz (*katE*) genini klonlayabilmek için “In Fusion HD Cloning Kit” temin edilmiş ve aşağıdaki deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.6. *katE* Geninin pLEB124 Vektörüne “In Fusion HD Cloning Kit” ile Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

katE geninin “In Fusion HD Cloning Kit” ile klonlanabilmesi için “F Primer *katE*124 Infusion” ve “R Primer *katE*124 Infusion” primer çifti tasarlanmıştır. Bu yeni primer çifti ile gerçekleştirilen PCR sonucu *katE* genine (2509 bp) ait DNA fragmanı elde edilmiştir (Şekil 4.15). pLEB124 vektörü, *katE* genini kesmeyen *Bam*HI enzimi ile kesilerek jelden saflaştırılmış ve yine jelden saflaştırılmış *katE* ile üreticilerin önerdiği konsantrasyonlarda birleştirilmiştir. Transformantlardan mini prep yöntemiyle plazmitler izole edilmiş, ancak kontrol plazmitten daha büyük boyutta, insörtü almış olma ihtimali bulunan herhangi bir plazmit DNA’ya rastlanmamıştır (Şekil 4.16). Bunun yerine agaroz jelde kontrol plazmit ile aynı boyutta veya daha küçük olduğu düşünülen plazmit DNA’lar gözlenmiştir.



Şekil 4.15: “F Primer *katE*124 Infusion” ve “R Primer *katE*124 Infusion” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2509 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 45 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 50 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 4. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 5. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

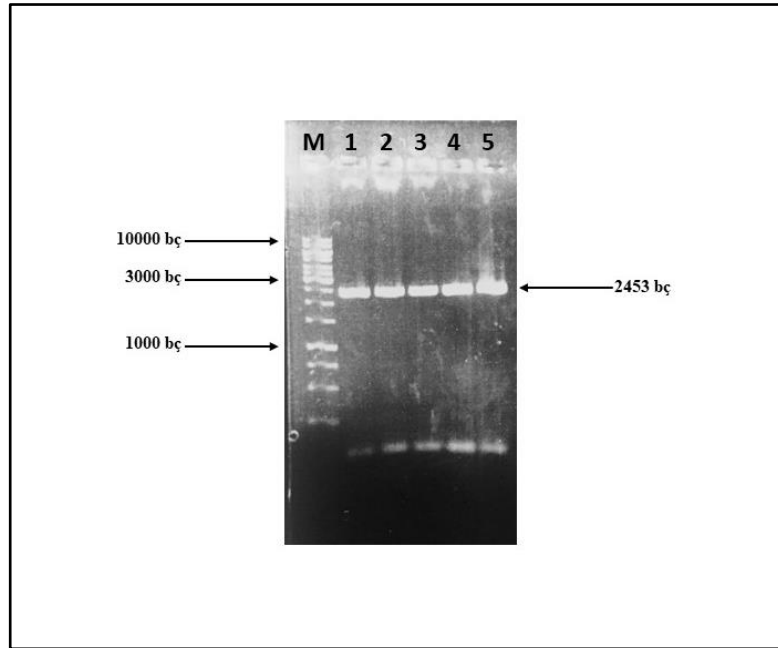


Şekil 4.16: pLEB124–*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pLEB124 plazmit DNA’sı (4800 bç).

4.1.1.7. *katE* Geninin Çinko (Zn⁺) ile Uyarılabilen Bir Promotorun Altına Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar (Zirex Sistemi)

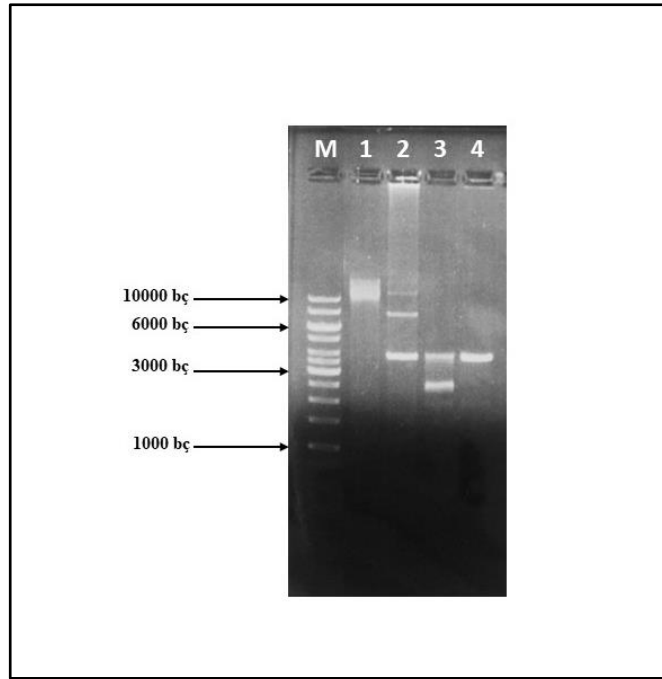
Tez çalışması kapsamında *katE* geni konstitütif (sürekli çalışan) promotorların altına klonlanmaya çalışılmıştır. Küçük bir ihtimal de olsa *katE* geninin *E. coli*'de yüksek seviyede ifade edilerek hücre üzerinde toksik etki yaratmış olabileceğinden yola çıkılarak, söz konusu genin konstitütif bir promotor yerine çinko (Zn⁺) ile uyarılabilen bir promotor kontrolünde ifade edilmesi düşünülmüş ve bu amaçla Zirex Sistemi'nin kullanılması kararlaştırılmıştır. Zirex Sistemi'nde yer alan pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmitleri, Prof. Dr. Oscar Kuipers'ten (Groningen Üniversitesi, Hollanda) temin edilmiştir.

katE geninin ligasyon yöntemiyle pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitlerine klonlanması amacıyla hazırlanan "F Primer *katE* pCZ/pILZ" ve "R Primer *katE* pCZ/pILZ *KpnI*" primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2453 bç) ait fragman Şekil 4.17'de görülmektedir.



Şekil 4.17: "F Primer *katE* pCZ/pILZ" ve "R Primer *katE* pCZ/pILZ *KpnI*" primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2453 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Bu fragmanın pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitlerine klonlanması için öncelikle söz konusu plazmitler *KpnI* enzimi ile kesilmiştir. *KpnI* enzim kesim bölgesi, restriksiyon haritalarına göre bu plazmitlerin yalnızca çoklu klonlama bölgesinde (MCS) bulunduğundan, enzim kesimi sonucunda plazmitlerin boyutu büyüklüğünde tek bir bant beklenmekteydi. Ancak, pILZ-Em plazmitinin *KpnI* enzim kesimi sonucu farklı boyutta bantlar elde edildiğinden (Şekil 4.18), bu plazmitlere klonlama yapılması için bu yöntem terk edilip “In Fusion HD Cloning Kit”ten faydalanılması kararlaştırılmıştır.

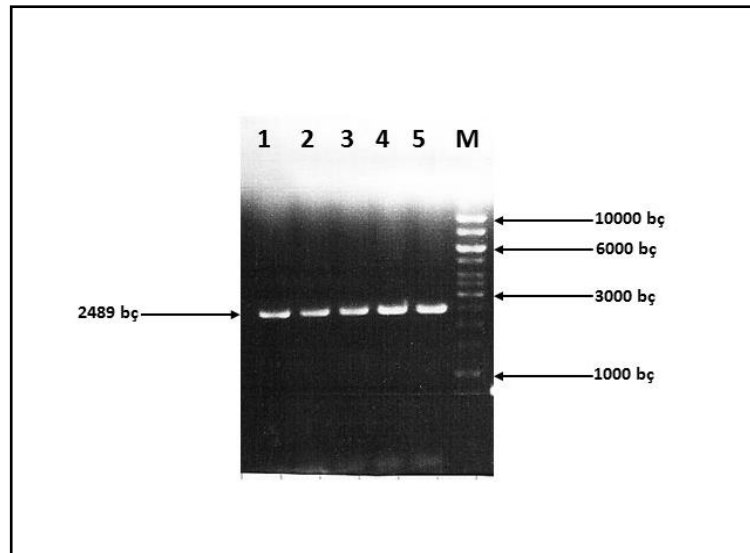


Şekil 4.18: pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmit DNA'larının agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. Herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilmemiş pILZ-Em plazmit DNA'sı; 2. *KpnI* enzimi ile kesilmiş pILZ-Em plazmit DNA'sı (5238 bç); 3. Herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilmemiş pCZ-Cm plazmit DNA'sı; 4. *KpnI* enzimi ile kesilmiş pCZ-Cm plazmit DNA'sı (3853 bç).

Bu amaçla hazırlanan “F Primer *katE* pILZ/pCZ Infusion” ve “R Primer *katE* pILZ/pCZ Infusion” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu *katE* genine (2489 bç) ait DNA fragmanı çalışılan her sıcaklıkta elde edilmiştir (Şekil 4.19).

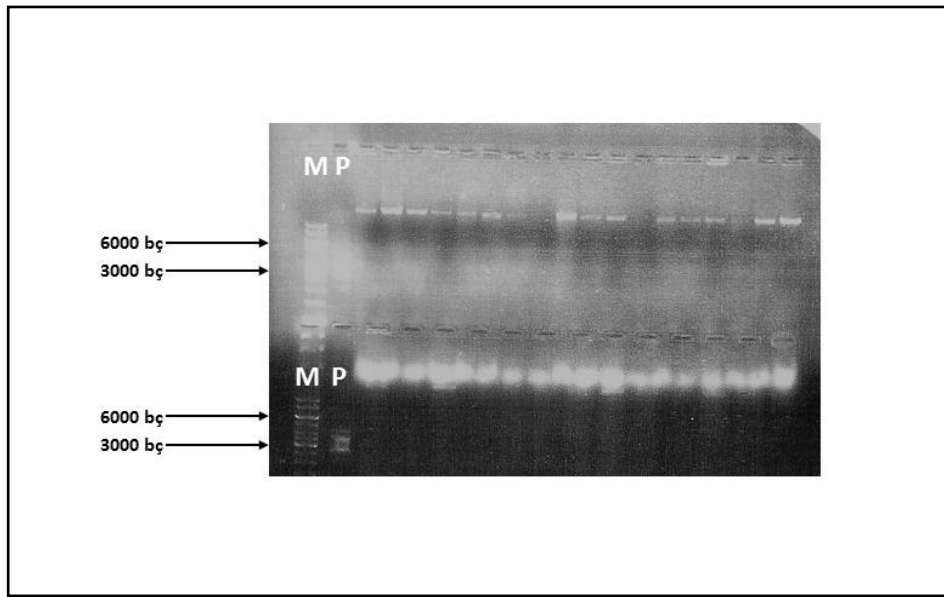
pILZ-Em ve pCZ-Cm vektörlerine “In Fusion HD Cloning Kit” aracılığıyla *katE* geninin klonlanması için, her iki vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan *NcoI* ve *SpeI* enzimleri kullanılmıştır. Vektör ve insörtün jelden saflaştırma ve

seyreltme işlemlerinin ardından “In Fusion” klonlama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işlemi sonrasında, 25 µg/ml kloramfenikol (literatürde belirtilen konsantrasyon) içeren LB agar besiyerlerinde pozitif kontrol de dahil herhangi bir koloniye rastlanmamıştır. Bu durum, pCZ-Cm plazmidinde bulunan kloramfenikol direnç geninin bu konsantrasyondaki antibiyotiğe direnç sağlanması için yeterli olmadığını düşündürmüştür. Bu sebeple, pCZ-Cm plazmidinde bulunan kloramfenikol direncinin olası transformantların seçiminde kullanılabilmesi için uygun antibiyotik konsantrasyonunun belirlenmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla 5, 10, 15 ve 20 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerlerine pCZ-Cm plazmidi ile transforme edilmiş *E. coli* TG1 hücreleri ekilmiştir. 15 ve 20 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerlerinde, 25 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde olduğu gibi herhangi bir üreme gözlenmemiştir. 5 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde yaban tip *E. coli* TG1 hücrelerinin (negatif kontrol) de üreyor olması, antibiyotiğin seçicilik durumuna engel olmuştur. 10 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde negatif kontrolde de birkaç adet koloni bulunmasına rağmen, bu konsantrasyonun transformantların seçilmesi amacıyla kullanılabileceği düşünülmüştür.



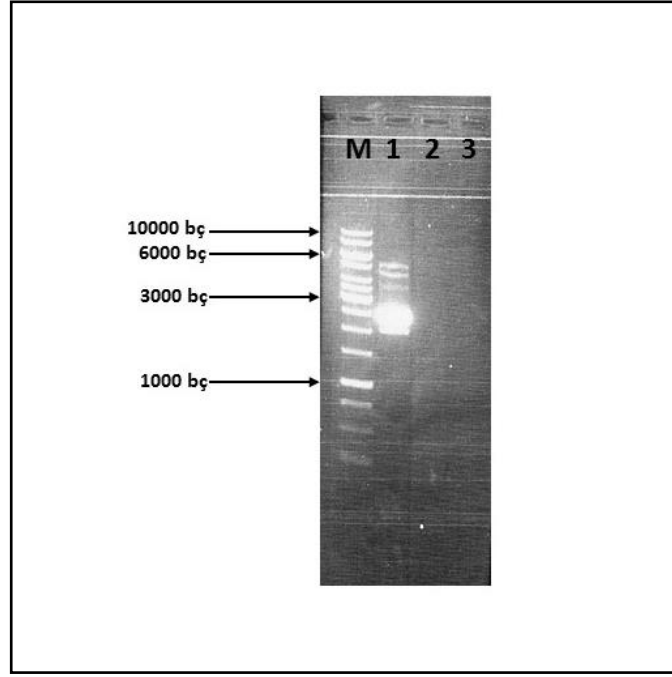
Şekil 4.19: F Primer *katE* pILZ/pCZ Infusion ve R Primer *katE* pILZ/pCZ Infusion primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *katE* genine (2489 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Klonlama deneyleri “In Fusion” kiti ile tekrarlanmış ve 10 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde elde edilen transformantlar, mini prep yöntemiyle taranmıştır. Ancak agaroz jelde kontrol plazmit hariç herhangi bir plazmidde rastlanmamıştır (Şekil 4.20). Bunun üzerine belli transformantlar seçilerek kit ile plazmit izolasyonu yoluna gidilmiş ancak sonuç değişmemiştir (Şekil 4.21). 10 µg/ml kloramfenikol içeren LB besiyerinin rekombinant *E. coli* TG1 hücrelerini seçmek için uygun konsantrasyon olmadığı sonucuna varılmıştır. 12.5 µg/ml kloramfenikol içeren LB besiyerinin kullanıldığı deneyler sonucunda da benzer sonuçlar elde edildiğinden, bu yöntem ile *katE* geninin pCZ-Cm vektörüne klonlanması gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.20: pCZ-Cm-*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pCZ-Cm plazmit DNA'sı (3853 bç).

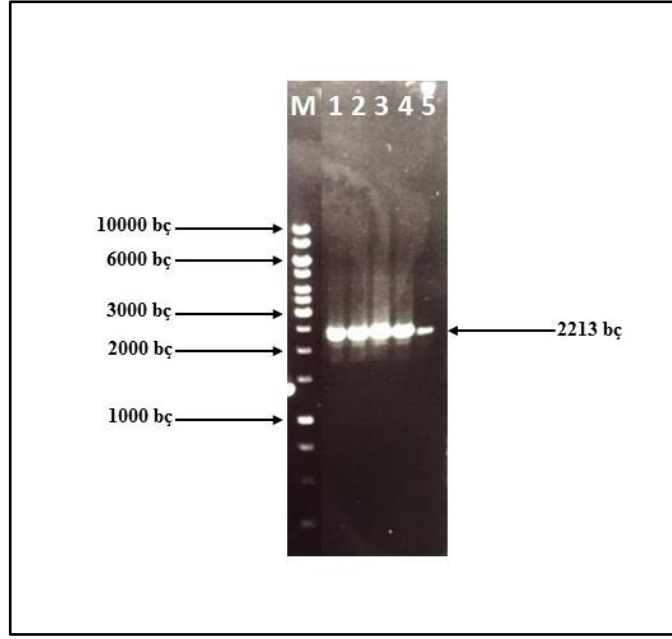
pILZ-Em plazmidini ise yalnızca Gram pozitif bakterilerde replike olabilen bir plazmidir. Bu nedenle, pILZ-Em plazmidini ile *katE* geninin birleştirilmesi amacıyla, pCZ-Cm plazmidini ile aynı şekilde gerçekleştirilen “In Fusion” reaksiyonunun ardından elde edilen ürünler, elektroporasyon yoluyla *L. lactis* N8 elektrokompaktan hücrelerine aktarılmıştır. Ancak gerçekleştirilen bütün denemelere rağmen, eritromisin içeren seçici GM17 besiyerlerinde herhangi bir olası rekombinant hücre büyümemiştir.



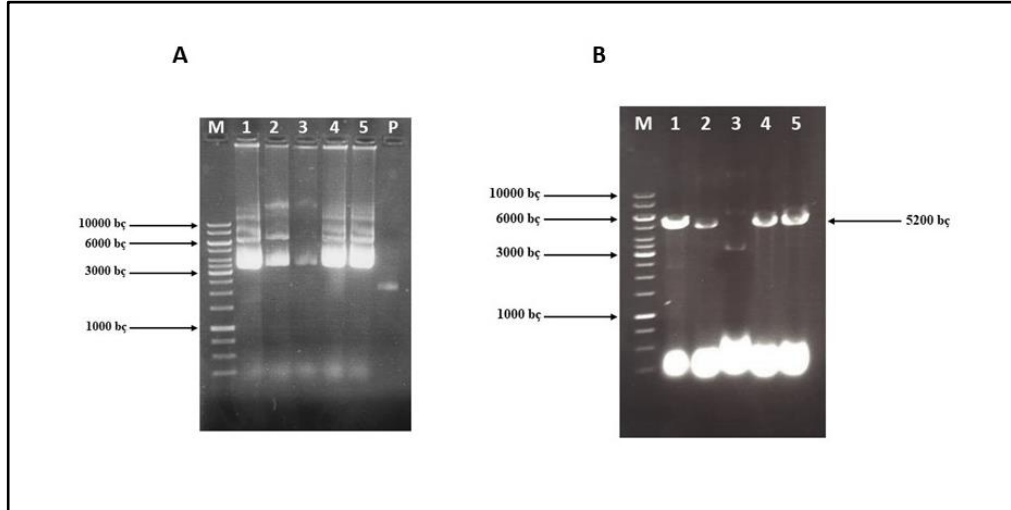
Şekil 4.21: pCZ-Cm-*katE* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan kit ile yapılan plazmit izolasyonu sonucu. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. pCZ-Cm plazmit DNA'sı (3853 bç). 2, 3. Olası transformantların izolasyon sonuçları.

4.1.1.8. pILZ-Em Plazmidinin Replikasyon Orijini Bölgesinin pSK Plazmidine Aktarılmasına Yönelik Çalışmalar

“F Primer pILZ ori” ve “R Primer pILZ ori” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen DNA fragmanlarının agaroz jeldeki görünüşleri Şekil 4.22’de gösterilmiştir. DNA dizi analizi ile doğrulanan 2213 bç’lik küt uçlu fragman *EcoRV* enzimi ile kesilmiş pSK plazmidi ile birbirine bağlanmıştır (ligasyon). *E. coli* $\Delta katE$ suşuna aktarılan ligasyon ürünleri sonucunda elde edilen transformantlardan 60 tanesi hızlı plazmit izolasyonu ile taranmıştır. pSK plazmidi ile karşılaştırıldığında transformantların çoğunun boyutunun pSK plazmidinden büyük olduğu gösterilmiştir. Bunun üzerine bu hücrelerden 5 tanesi rastgele seçilerek plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant plazmitler *SpeI* enzimi ile kesilmiştir (Şekil 4.23) *SpeI* enziminin rekombinant plazmidi tek bir noktadan keserek 5200 bç civarında bir bant oluşturması beklenmektedir. Şekil 4.23’te görüldüğü üzere 1, 2, 4 ve 5 nolu plazmitler *SpeI* enzim kesimi sonucu 5200 bç civarında bant vermişlerdir.



Şekil 4.22: “F Primer pILZ ori” ve “R Primer pILZ ori” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen pCZ-Cm plazmidinin replikasyon orijinine (2213 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. replikasyon orijini (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. replikasyon orijini (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. replikasyon orijini (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. replikasyon orijini (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. replikasyon orijini (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).



Şekil 4.23: A. 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar, 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder) (M), pSK plazmit DNA’sı (2961 bç) (P); B. 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’ların *SpeI* enzim kesim sonuçları.

Olası rekombinant plazmitler *L. lactis* N8 elektrokompentan hücrelerine elektroporasyon aracılığıyla aktarılmaya çalışılmıştır. pSK plazmidinde bulunan Ampisilin direnç geninin, *L. lactis* hücrelerindeki seçici konsantrasyon değeri bilinmediğinden, transformantların seçimi için farklı Ampisilin konsantrasyonları kullanılmış ancak yapılan bütün denemelerden sonuç alınamamış, hiç bir canlı hücre elde edilememiştir. *katE* genini taşıyan pSK plazmidine klonlanan pILZ-Em'ye ait replikasyon orijini bölgesinin, rekombinant plazmidin *L. lactis*'te replike olmasını sağlayamadığı sonucuna varılmıştır.

4.1.1.9. Klonlama Çalışmalarının *E. coli* $\Delta katE$ Suşu Kullanılarak Denenmesi

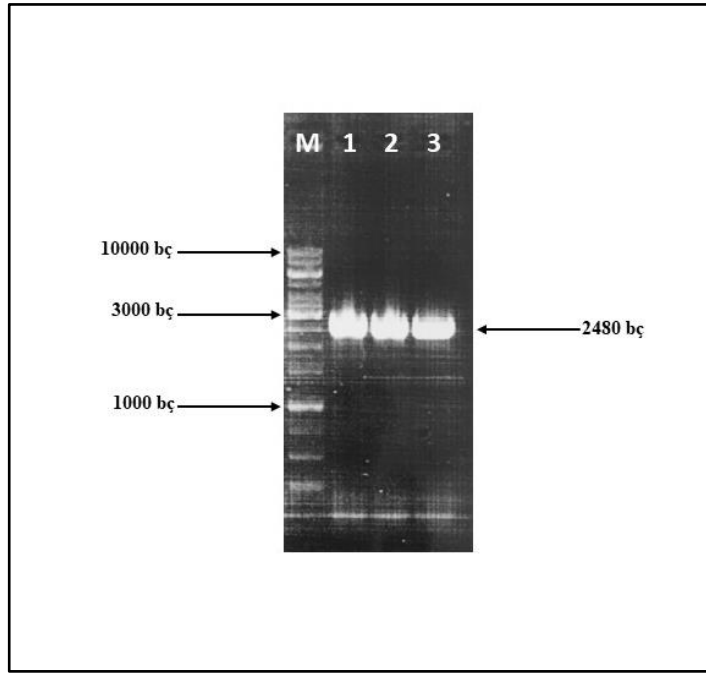
Ürünleri hücre için toksik etki oluşturan bazı genlerin vektörlere klonlanmasında sorunlar yaşandığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da *katE* geninin, ancak katalaz üretemeyen *E. coli* $\Delta katE$ suşunda klonlanabilmesi ve ifadesi mümkün olmuştur. Bu bilgi ışığında Prof. Dr. Oscar Kuipers'ten (Groningen Üniversitesi, Hollanda) temin edilen *Lactococcus* vektörleri olan pILZ-Em ve pCZ-Cm ile Bölüm 3.2.1.11.8'de anlatılan ligasyon reaksiyonları tekrarlanmış ve ürünler $\Delta katE$ suşunda taranmıştır. Yapılan bütün denemeler sonucunda doğru plazmide ulaşılamamıştır.

4.1.1.10. *katE* Geninin pCZ-Cm Vektörüne PCR ile Doğrudan Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

“F Primer *katE* PCR” ve “R Primer *katE* PCR” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen olası *katE* (2480 bp) fragmanının agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Kullanılan primerlerin 5' uçlarında, pCZ-Cm plazmidinin çoklu klonlama bölgesine yakın bir bölgeye tutunabilecek diziler yer aldığından, elde edilen *katE* fragmanının uç kısımlarında pCZ-Cm plazmidini ile uyumlu diziler bulunmaktadır.

pCZ-Cm plazmidinin lineer hale getirilmesi için *NcoI* ve *SpeI* enzimleri seçilmiştir. Elde edilen *katE* fragmanının pCZ-Cm plazmidine klonlanması için PCR gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda kalıp olarak *NcoI* ve *SpeI* enzimleri ile kesilen pCZ-Cm plazmidini ile uçlarında pCZ-Cm plazmidini ile uyumlu diziler bulunan *katE* fragmanı bir arada kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda, ligaz enzimine gerek kalmadan, *katE* fragmanında bulunan pCZ-Cm plazmidini ile uyumlu diziler sayesinde bu iki

fragmanın polimeraz enzimi aracılığıyla birleştirilmesi dolayısıyla klonlamanın gerçekleştirilmesi beklenmektedir.



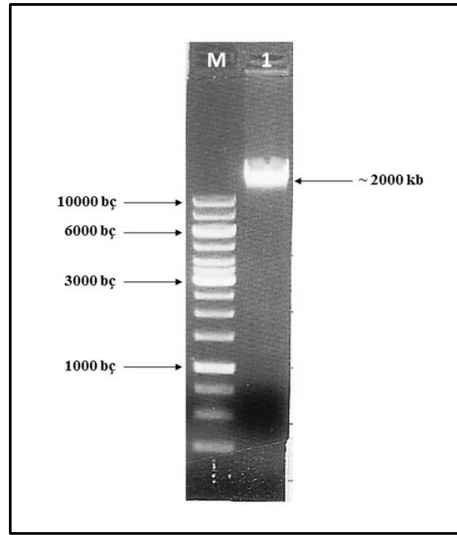
Şekil 4.24: “F Primer *katE* PCR” ve “R Primer *katE* PCR” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen ve *katE* (2480 bç) genine ait olduğu düşünülen PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 3. *katE* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Elde edilen PCR ürünü, elektroporasyon aracılığıyla *L. lactis* N8 hücrelerine aktarılmıştır. Yapılan denemeler sonuç vermeyince, PCR’da farklı oranlarda insört kullanılması ya da *L. lactis* N8 hücrelerine farklı hacimlerde PCR ürününün elektroporasyonla aktarılması denenmiş, fakat hiçbir koşulda kloramfenikol içeren (farklı konsantrasyonlarda) GM17 besiyerlerinde olası rekombinant hücreler gözlenmemiştir.

4.1.2. *sodA* Geninin Klonlanması için Yapılan Çalışmalar

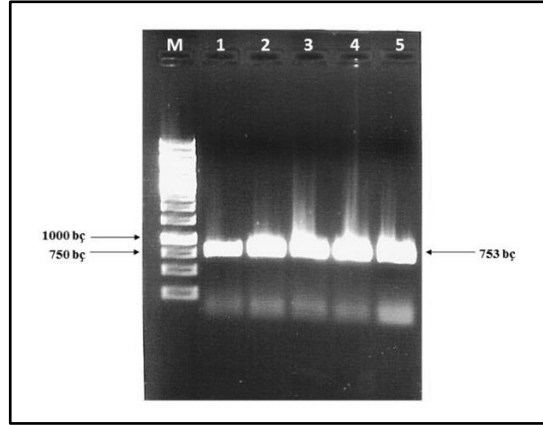
4.1.2.1. *L. lactis* Süperoksit Dismutaz (*sodA*) Genine Özgü Primerlerin Sentezi ve *sodA* Geninin PCR ile Çoğaltılması

sodA geni, farklı primer çiftleri aracılığıyla (Tablo 3.13) *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA'sının (Şekil 4.25) kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu çoğaltılmıştır. “F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamHI*” primer çifti, *sodA* geninin pLEB124 ve pSK plazmitlerine, “F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti pLEB21 ve pLEB579 plazmitlerine klonlanması için kullanılmıştır.



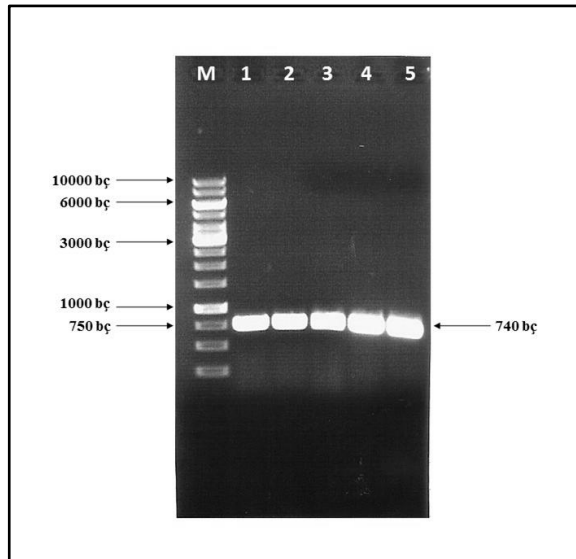
Şekil 4.25: *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA'sının agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *L. lactis* N8 soyunun genomik DNA'sı (~ 2000 kb).

“F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamHI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen olası *sodA* genine ait DNA fragmanının (753 bç) agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26: “F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (753 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 50 °C); 2. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 52.5 °C); 3. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 4. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 5. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C).

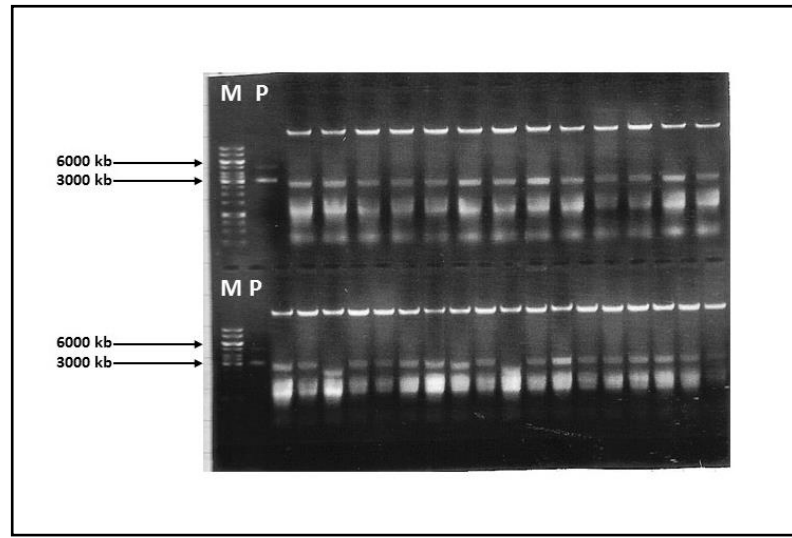
“F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait olduğu düşünülen PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27: “F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

4.1.2.2. *sodA* Geninin, pLEB124 Mekik Vektörüne *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

“F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamHI*” primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen *sodA* fragmanının pLEB124 mekik vektörüne klonlanması amacıyla *BamHI* enzim kesim bölgesinin kullanılması planlanmıştır. Ancak bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalar, Bölüm 4.1.1.2’de *katE* geninin klonlanmasında olduğu gibi kontrol plazmit ile aynı boyutta veya daha küçük boyutta plazmitlerin eldesi ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.28).

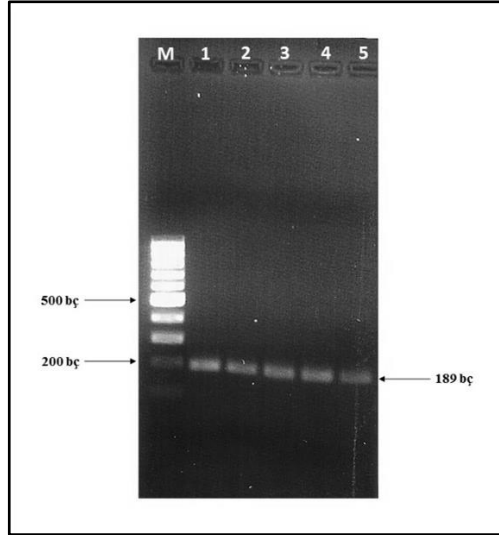


Şekil 4.28: pLEB124–*sodA* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA’lar. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pLEB124 plazmit DNA’sı (4800 bç).

4.1.2.3. *sodA* Geninin pLEB579 ve pLEB21 Vektörlerine *E. coli*'de Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

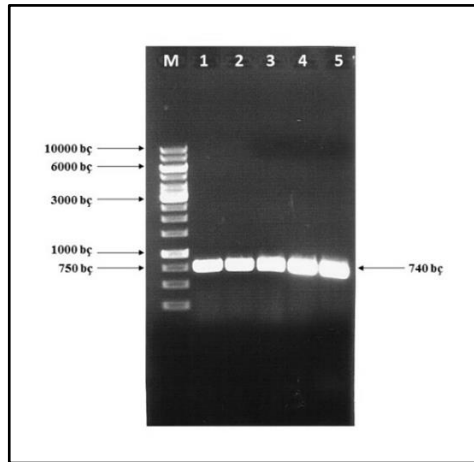
sodA geninin, promotor bölgesi içermeyen pLEB579 ve pLEB21 plazmitlerine, *katE* geni için de planlandığı gibi oldukça güçlü bir promotor olan P₈ promotoru eşliğinde klonlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, PCR ile P₈ promotoru ve *sodA* geni fragmanları ayrı ayrı elde edilmiş ve çakışan (overlap) PCR aracılığıyla bu iki fragman birleştirilmiştir.

“F Primer P₈ *XhoI BssHII*” ve “R Primer P₈ *sodA*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P₈ promotoruna ait DNA fragmanı Şekil 4.29’da gösterilmiştir.



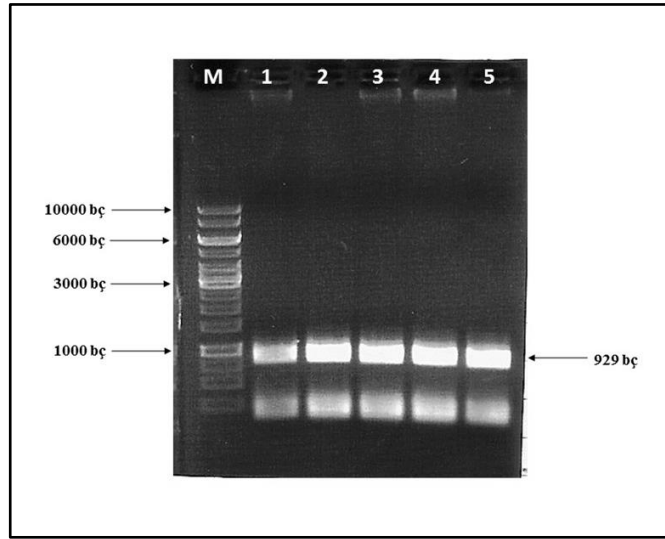
Şekil 4.29: “F Primer P₈ *XhoI BssHII*” ve “R Primer P₈ *sodA*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen P₈ promotoruna ait DNA fragmanının agaroz jeldeki görünümü. M. 100 bç’lik moleküler DNA belirteci (Thermo 100 bp DNA ladder); 1. P₈—(Primer bağlanma sıcaklığı 49 °C); 2. P₈ (Primer bağlanma sıcaklığı 51.5 °C); 3. P₈ (Primer bağlanma sıcaklığı 54 °C); 4. P₈ (Primer bağlanma sıcaklığı 56.5 °C); 5. P₈ (Primer bağlanma sıcaklığı 59 °C).

“F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait olduğu düşünülen PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



Şekil 4.30: “F Primer *sodA*” ve “R Primer *sodA XhoI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (740 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

Çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈-*sodA* fragmanının (929 bç) agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.31’de gösterilmiştir.

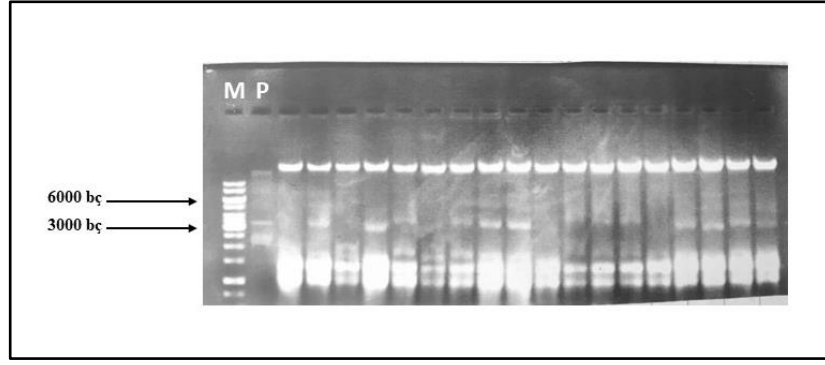


Şekil 4.31: Çakışan (overlap) PCR sonucu elde edilen P₈-*sodA* fragmanının (929 bç) agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. P₈-*sodA* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 53 °C); 2. P₈-*sodA* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 3. P₈-*sodA* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 57 °C); 4. P₈-*sodA* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 59 °C); 5. P₈-*sodA* fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 61 °C).

P₈-*sodA* fragmanının pLEB21 ve pLEB579 plazmidlerine klonlanması için gerçekleştirilen bütün denemelerde, Bölüm 4.1.1.3’te *katE* geni için anlatıldığı şekilde kontrol plazmit ile aynı boyutta veya daha küçük boyutta plazmitler elde edilmiştir.

4.1.2.4. *sodA* Geninin pBluescript SK (pSK) Vektörüne Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

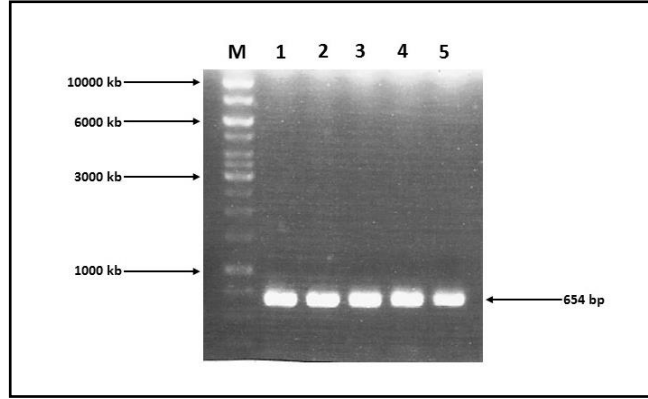
sodA geninin pSK plazmidine klonlanması için, “F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA BamHI*” primer çiftinin kullanıldığı PCR ile çoğaltılan *sodA* fragmanı kullanılmıştır. Hem pSK hem de *sodA* fragmanı *BamHI* enzimi ile kesilerek gerekli saflaştırma işlemlerinin ardından bu iki fragman ligasyona tabi tutulmuştur. *E. coli* TG1 hücrelerinin ligasyon ürünleri ile transformasyonunun ardından elde edilen beyaz kolonilerden gerçekleştirilen plazmit izolasyonu (Şekil 4.32) ve olası rekombinant plazmitlerin restriksiyon enzim kesimleri sonucunda, *sodA* genini taşıyan doğru plazmite rastlanmamıştır.



Şekil 4.32: pSK – *sodA* rekombinant plazmidini taşıdığı düşünülen olası transformantlardan elde edilen plazmit DNA'lar. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); P. pSK plazmit DNA'sı (2958 bç).

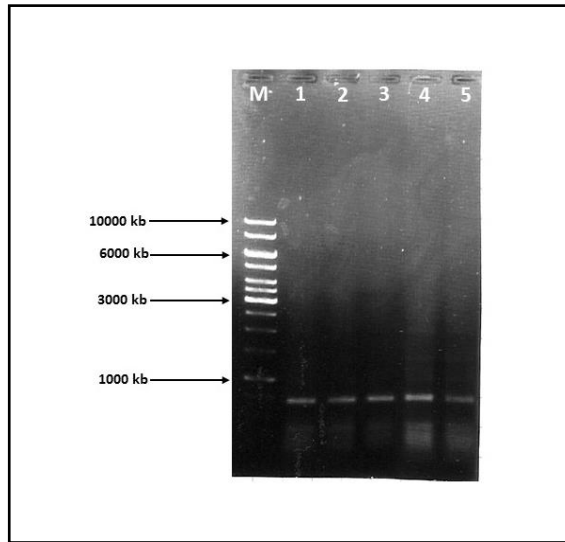
4.1.2.5. *sodA* Geninin Çakışan (Overlap) PCR Aracılığıyla Kanamisin Direnç Geni ile Birleştirilmesi ve pLEB124 Plazmidine Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar

sodA geninin çakışan (overlap) PCR aracılığıyla kanamisin direnç geni ile birleştirilmesi için öncelikle “F Primer *sodA BamHI*” ve “R Primer *sodA kanamisin*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile kanamisin genine ait nükleotidlerin bir kısmını barındıran *sodA* geni çoğaltılmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: F Primer *sodA BamHI* ve R Primer *sodA kanamisin* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (654 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 56 °C); 2. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 58.5 °C); 3. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 61 °C); 4. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 63.5 °C); 5. *sodA* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 66 °C).

Ardından “F Primer kanamisin RBS” ve “R Primer kanamisin *Bam*HI” primer çiftinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen PCR ile kanamisin fragmanı elde edilmiştir (Şekil 4.13). *sodA* ve kanamisin fragmanlarının birleştirilmesi için bu iki fragmanın aynı anda kalıp DNA olarak kullanıldığı çakışan (overlap) PCR gerçekleştirilmiş ve *sodA*–kanamisin fragmanının (1910 bç) elde edilmesi hedeflenmiştir. Ancak farklı primer bağlanma sıcaklıkları denenmesine, reaksiyona farklı konsantrasyonlarda *sodA* ve kanamisin fragmanlarının eklenmesine rağmen *sodA* ve kanamisin genleri çakışan (overlap) PCR yöntemiyle birleştirilememiştir (Şekil 4.34). Bunun üzerine çakışan (overlap) PCR’de kullanılan primerler yeniden tasarlanarak *sodA* geni ile kanamisin direnç geni arasındaki homolog olan (çakışan) bölgenin nükleotit sayısı 20’den 40’a yükseltilmiş (Tablo 4.3) ancak bütün denemelere rağmen yine de *sodA*–kanamisin fragmanı elde edilememiştir.



Şekil 4.34: *sodA* – kanamisin fragmanını elde etmek için gerçekleştirilen çakışan (overlap) PCR sonucunun agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb’lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. PCR sonucu (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. PCR sonucu (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. PCR sonucu (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 3. *sodA* – kanamisin fragmanı (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. PCR sonucu (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. PCR sonucu (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

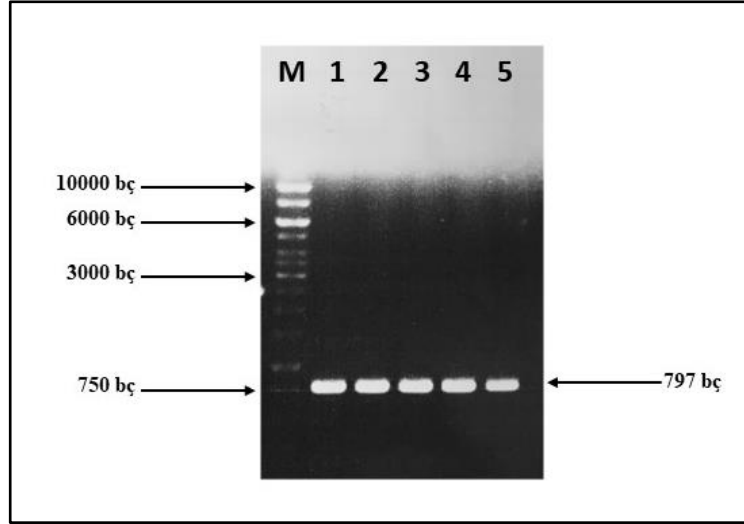
Tablo 4.3: *sodA* ile kanamisin genlerinin birleştirilmesi için overlap (çakışan) PCR’de kullanılmak üzere yeniden tasarlanan primer çiftleri. Küçük harflerle koyu olarak gösterilen diziler, *sodA* geni ile kanamisin direnç geni arasındaki homolog olan (çakışan) bölgenin nükleotit sayısının arttırılması için eklenen ilave nükleotit dizilerini işaret etmektedir. **GAGGA**: kanamisin direnç geninin ribozom bağlanma bölgesi (RBS), **ATG**: kanamisin direnç geninin başlangıç kodunu.

F Primer <i>sodA</i> kanamisin RBS yeni	5’ agcaaaataaGAGGATCGTTTCGCATGATTGAAC 3’ (34 nt)
R Primer <i>sodA</i> kanamisin yeni	5’catettgttcAATCATGCGAAACGATCCTCTTAT TTTGCTTTAGCATAAA 3’ (50 nt)

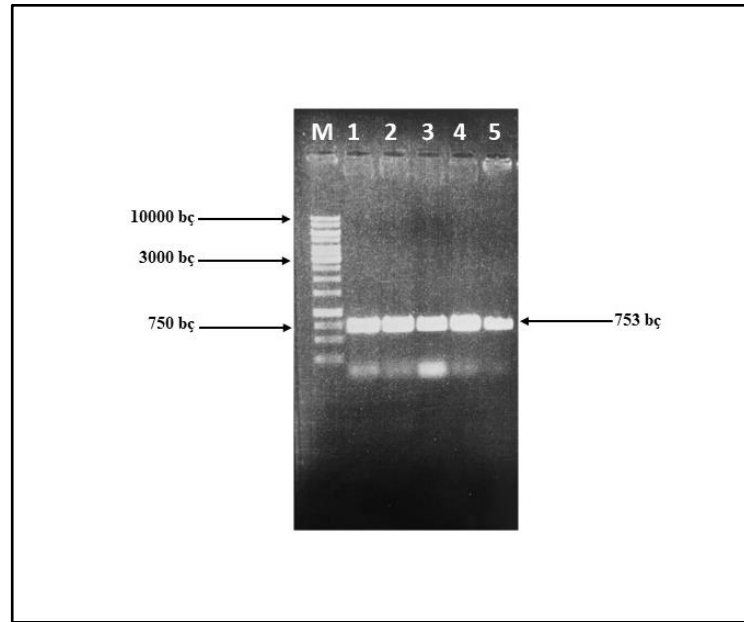
4.1.2.6. *sodA* Geninin Çinko (Zn⁺) ile Uyarılabilen Bir Promotorun Altına Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar (Zirex Sistemi)

“F Primer *sodA* pCZ/pILZ *NcoI*” ve “F Primer *sodA* pCZ/pILZ *KpnI*” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (797 bç) ait fragmanın (Şekil 4.35) pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitlerine klonlanması için söz konusu plazmitlerin çoklu klonlama bölgesinde (MCS) yer alan *NcoI* ve *KpnI* enzimleri seçilmiştir. Fakat Bölüm 4.1.1.7’de anlatıldığı üzere, pILZ-Em plazmitinin *KpnI* enzim kesimi sonucu plazmit boyutunda tek bir bant gözlenmesi beklenirken ilginç bir biçimde farklı boyutta bantlar elde edildiğinden (Şekil 4.18), *sodA* geninin bu plazmitlere klonlanması için bu yöntem terk edilerek “In Fusion HD Cloning Kit” kullanılması kararlaştırılmıştır.

Bu amaçla hazırlanan “F Primer *sodA* pILZ/pCZ Infusion” ve “R Primer *sodA* pILZ/pCZ Infusion” primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *sodA* genine (753 bç) ait PCR ürünü Şekil 4.36’da görülmektedir. 4.1.1.7’de *katE* geni için anlatıldığı gibi, pCZ-Cm plazmidinin kloramfenikol direncinde yaşanan sorunlar, pILZ-Em plazmidinin yalnızca Gram pozitif bakterilerde replike olması nedeniyle *E. coli*’ye aktarılmaması ve ligasyon ürünlerinin direkt olarak *L. lactis*’e aktarılması ile olası rekombinant plazmitleri taşıyan transformantların elde edilememesi yüzünden *sodA* geninin bu vektörlere klonlanması mümkün olmamıştır.



Şekil 4.35: F Primer *soda* pCZ/pILZ *Nco*I ve F Primer *soda* pCZ/pILZ *Kpn*I primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *soda* genine (797 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).



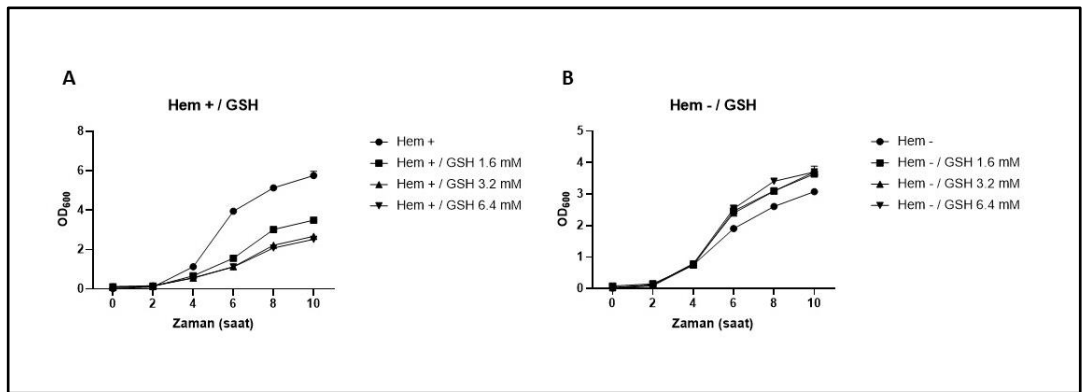
Şekil 4.36: F Primer *soda* pILZ/pCZ Infusion ve F Primer *soda* pILZ/pCZ Infusion primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen *soda* genine (753 bç) ait PCR ürününün agaroz jeldeki görünümü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C); 2. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 57.5 °C); 3. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 60 °C); 4. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 62.5 °C); 5. *soda* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 65 °C).

4.2. Fermentasyon Çalışmaları

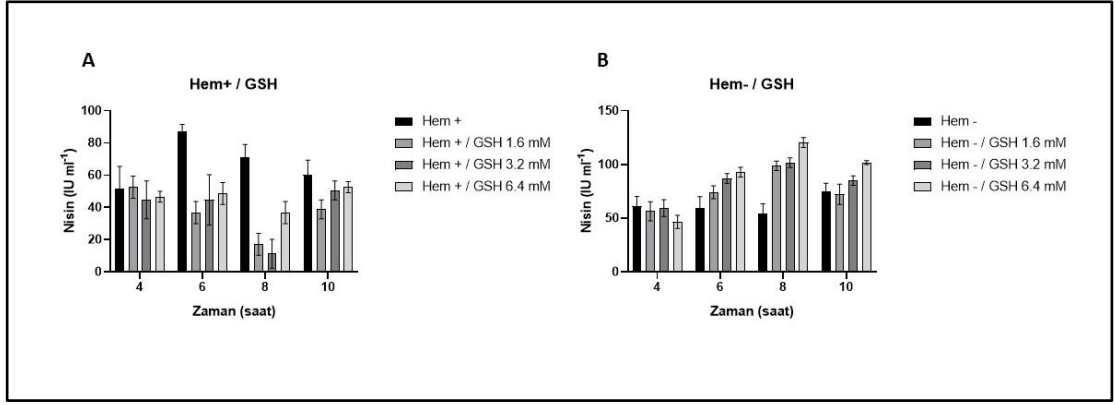
Fermentasyon çalışmaları kapsamında, büyüme ortamına antioksidan olarak ilave edilen glutatyon (GSH) ve pirüvatın, *L. lactis*'in oksidatif stres toleransı ve nisin üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Glutatyon ve Pirüvat Varlığında *L. lactis* Hücrelerinin Büyümesi ve Nisin Üretimi

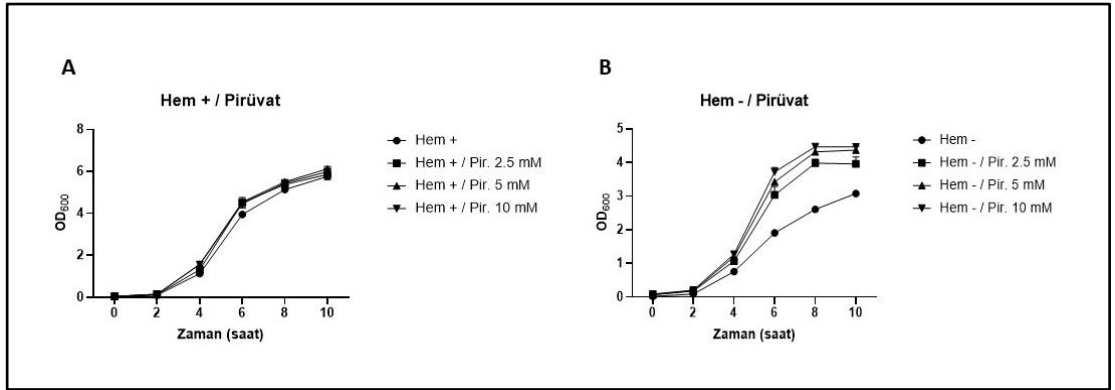
L. lactis hücreleri, hem varlığında ve yokluğunda (2.5 µg/ml) farklı konsantrasyonlarda GSH (1.6, 3.2 ve 6.4 mM) veya pirüvat (2.5, 5 ve 10 mM) içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda büyütülmüşlerdir. Hem varlığında, GSH'nin büyümeye ve nisin üretimine negatif etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 4.37 ve Şekil 4.38). Hem yokluğunda ise artan GSH konsantrasyonuyla beraber büyümenin ve nisin üretiminin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.37 ve 4.38). 6.4 mM GSH varlığında, hem ilaveli besiyerindekinden daha fazla nisin üretimine ulaşılmıştır. Farklı pirüvat konsantrasyonlarının, hem varlığında büyümeyi çok fazla etkilemediği, hem yokluğunda ise büyümenin, artan pirüvat konsantrasyonuna paralel olarak olumlu etkilendiği bulunmuştur (Şekil 4.39). 10 mM pirüvat ilavesiyle hem içeren besiyerinde hem içermeyen besiyeri ile kıyaslanınca daha yüksek nisin üretimine erişilmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.37: GSH içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) *L. lactis* hücrelerinin büyüme eğrileri. Besiyerine son konsantrasyonu 2.5 µg ml⁻¹ olacak şekilde hem eklenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hata çubukları standart sapma değerlerine göre eklenmiştir.

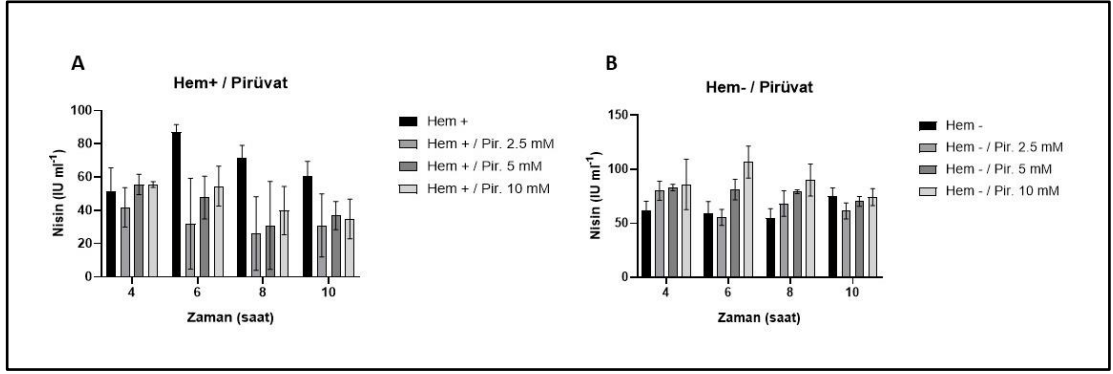


Şekil 4.38: *L. lactis* hücrelerinin GSH içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) gerçekleştirdikleri nisin üretimleri. Besiyerine son konsantrasyonu 2.5 µg ml⁻¹ olacak şekilde hem eklenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hata çubukları standart sapma değerlerine göre eklenmiştir.



Şekil 4.39: Pirüvat içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik şartlar altında hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) *L. lactis* hücrelerinin büyüme eğrileri. Besiyerine son konsantrasyonu 2.5 µg ml⁻¹ olacak şekilde hem eklenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hata çubukları standart sapma değerlerine göre eklenmiştir.

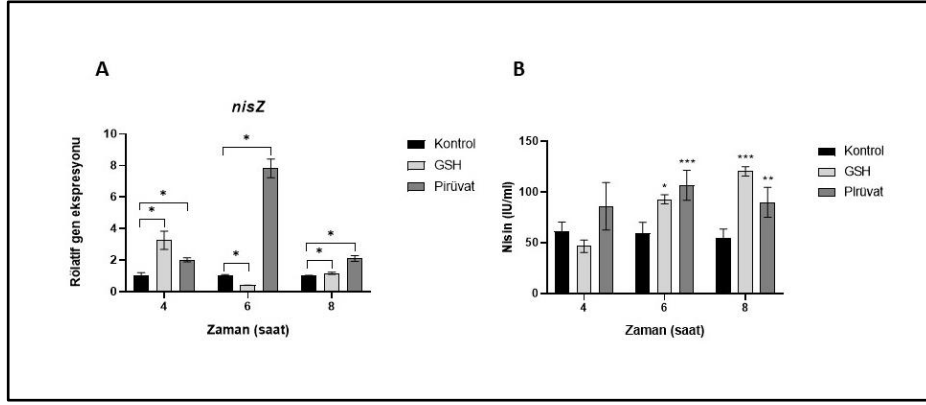
Bu çalışmada, GSH ve pirüvatın kullanılan en yüksek konsantrasyonlarında (sırasıyla 6.4 mM ve 10 mM) en yüksek nisin üretimine ulaşılmıştır. Hem yokluğunda, GSH ve pirüvatın artan konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde artan nisin üretimi bulgusu önemli olup, daha yüksek antioksidan konsantrasyonlarında nisin üretiminin nasıl etkileneceği merak konusudur. Çalışmanın geri kalanına, en yüksek biyokütle ve nisin üretimine ulaşılan 6.4 mM GSH ve 10 mM pirüvat ile devam edilmiş ve deneyler hem yokluğunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.40: *L. lactis* hücrelerinin pirüvat içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda hem varlığında (A) ve yokluğunda (B) gerçekleştirdikleri nisin üretimleri. Besiyerine son konsantrasyonu 2.5 µg ml⁻¹ olacak şekilde hem eklenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hata çubukları standart sapma değerlerine göre eklenmiştir.

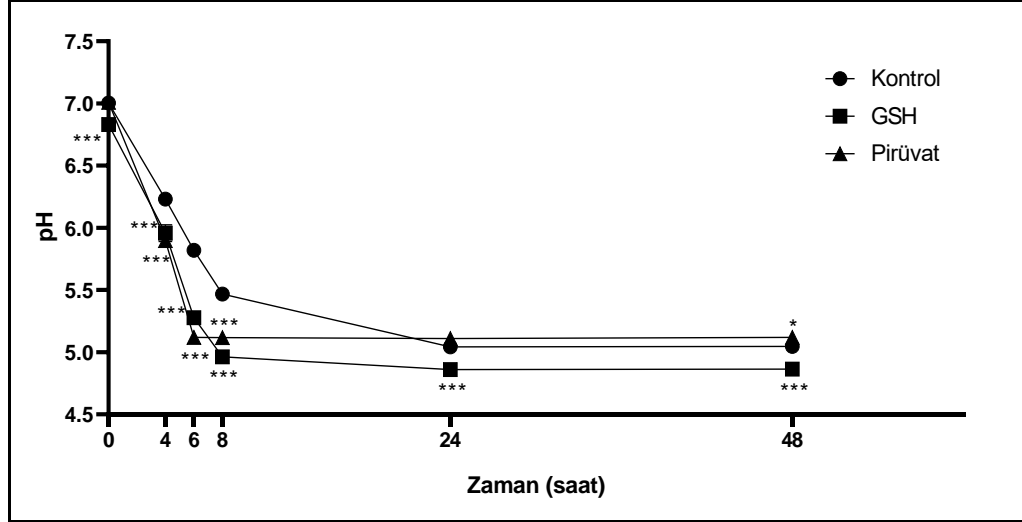
6.4 mM GSH ve 10 mM pirüvat varlığında büyütülen *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimi, transkripsiyonel seviyede ve protein seviyesinde ölçülmüştür. Transkripsiyonel analiz için, nisin biyosentetik gen kümesinde nisin öncül peptidini kodlayan gen olan *nisZ* kullanılmıştır. *nisZ*'nin ekspresyonu, pirüvat içeren ortamda büyütülen *L. lactis* hücrelerinde önemli ölçüde artmıştır (Şekil 4.41A). Pirüvat varlığında büyümenin 6. saatindeki *nisZ* ifadesi, kontrol örneğinden 7.8 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir. GSH ilave edilmiş besiyerinde büyüyen *L. lactis* hücrelerinde de *nisZ* ekspresyonunun, 4. ve 8. saatlerde kontrole kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

L. lactis kültürlerinin süpernatantlarındaki nisin konsantrasyonu, indikatör organizma olarak *M. luteus* hücrelerinin kullanılmasıyla ölçülmüştür (Şekil 4.41B). GSH veya pirüvat ilave edilmiş GM17 besiyerinde büyütülen hücrelerin nisin üretimlerindeki artışın 6. ve 8. saatlerde kontrol numunesine kıyasla istatistiksel olarak dikkat çekici olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.41: 30 °C’ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde 4, 6 ve 8 saat boyunca büyütülen *L. lactis* hücrelerinde *nisZ* geninin rölatif ekspresyonu (a) ve nisin üretimi (b). “GSH” 6.4 mM GSH içeren GM17 besiyerini tanımlarken, “Pirüvat” 10 mM pirüvat içeren GM17 besiyerini tanımlamaktadır. İstatistiksel analizler Mann-Whitney testi (* $P < 0.05$) (a) ve iki-yönlü ANOVA (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$) (b) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSH veya pirüvat varlığında *L. lactis* hücrelerinin büyümeleri boyunca besiyerindeki pH değişimleri de izlenmiştir. Büyümenin ilk 8 saati boyunca, *L. lactis* hücrelerinin büyümesi besiyerinin pH değerini hızlı bir biçimde düşürmüştür. Pirüvat içeren besiyerinin pH değeri 8 saat büyümenin ardından sabit bir durum gösterirken, kontrolün ve GSH içeren besiyerinin pH değeri büyümenin 24. saatine kadar kademeli bir biçimde azalmaya devam etmiştir (Şekil 4.42). Besiyerinin pH değerindeki bu düşüşün laktik asit üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü ortamda oksijen bulursa dahi büyüme ortamına hem ilave edilmeden, *L. lactis* hücreleri metabolizmalarını karışık asit fermantasyonuna kaydırmamakta, dolayısıyla laktik asit üretimi devam etmektedir. Bu çalışmada, kontrol grubuna kıyasla GSH ve pirüvat ilave edilmiş besiyerlerinin pH değerindeki azalma anlamlı derecede daha fazla olmuştur. Pirüvat ile desteklenmiş besiyerinde daha yüksek *L. lactis* biyokütlesine ulaşılmasının (Şekil 4.39), söz konusu besiyerinde daha fazla laktik asit birikimine neden olarak pH’daki bu düşüşten sorumlu olduğu düşünülmektedir. *L. lactis* hücrelerinin kontrol ve GSH içeren besiyerlerindeki büyüme profilleri benzer olmasına rağmen, GSH içeren besiyerindeki pH düşüşünün kontrol grubundan anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sebebi, muhtemelen, GSH molekülünün yapısı gereği besiyerini daha asidik duruma getirmesidir.

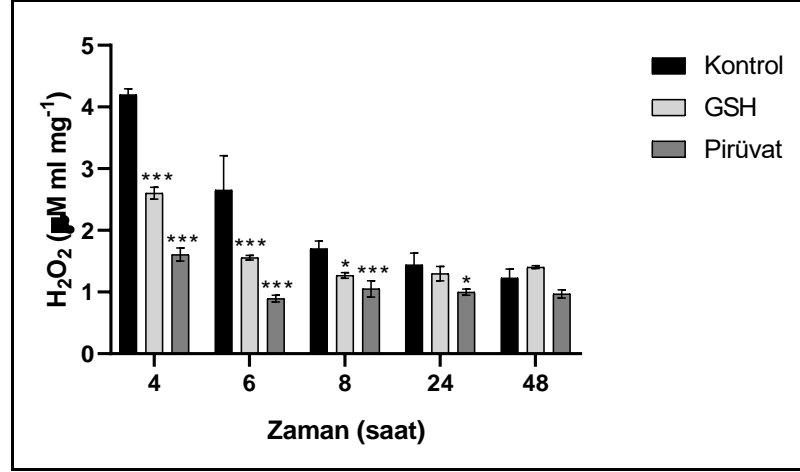


Şekil 4.42: *L. lactis* hücrelerinin GM17 besiyerinde 30 °C’ta aerobik koşullarda büyütülmesi sırasında besiyerindeki pH değişimleri. “GSH” 6.4 mM GSH içeren GM17 besiyerini tanımlarken, “Pirüvat” 10 mM pirüvat içeren GM17 besiyerini tanımlamaktadır. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve hata çubukları standart sapma değerlerine göre eklenmiştir. İstatistiksel analizler iki-yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

4.2.2. GSH ve Pirüvat Varlığında Büyütülen *L. lactis* Hücrelerinin Oksidatif Stres Seviyesinin Değerlendirilmesi

4.2.2.1. H₂O₂ Seviyesinin Belirlenmesi

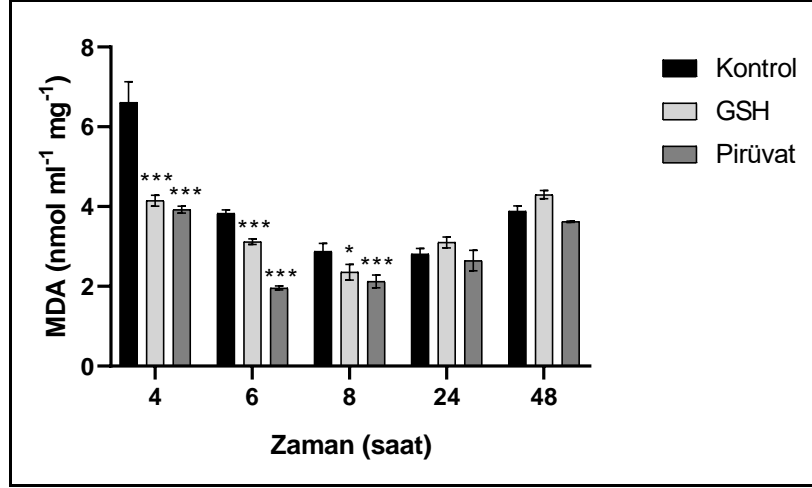
H₂O₂ birikimi, aerobik koşullar altında büyütülen hücrelerin oksidatif stres seviyesini belirlemek için bir gösterge olarak ölçülmüştür. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu, büyümenin 8 saati boyunca kademeli olarak azalmıştır; sonrasında ise sabit bir durum göstermiştir (Şekil 4.43). GSH ve pirüvatın besiyerindeki varlığı, H₂O₂’nin uzaklaştırılmasında kontrol besiyerine kıyasla anlamlı şekilde etkili olmuştur (Şekil 4.43). H₂O₂ konsantrasyonundaki düşüşün, kontrole kıyasla GSH içeren ortamda 8 saat büyümeye ve pirüvat içeren ortamda 24 saat büyümeye kadar istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Pirüvatın uzun süren etkisi özellikle dikkat çekmiştir.



Şekil 4.43: 30 °C’ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinin H₂O₂ seviyesi. “GSH” 6.4 mM GSH içeren GM17 besiyerini tanımlarken, “Pirüvat” 10 mM pirüvat içeren GM17 besiyerini tanımlamaktadır. Deneysel üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve hata çubukları standart sapmaları işaret etmektedir. İstatistiksel analizler iki-yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

4.2.2.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Hücrelerin stres seviyesini belirlemek için başka bir yöntem, lipid peroksidasyonunun saptanmasıdır. Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonu sırasında üretilir. ROS'un hücre membranına verdiği zarar yağ asidi peroksidasyonuna ve sonuçta MDA konsantrasyonunda artışa neden olur. *L. lactis* hücrelerinin MDA seviyeleri ölçüldüğünde, GSH ve pirüvat içeren besiyerindeki MDA miktarının, 8 saatlik bir büyümeye kadar kontrol numunesininkinden önemli ölçüde düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.44). Bu sonuçlar, H₂O₂ ölçümlerinin sonuçlarıyla uyumlu bir biçimde GSH ve pirüvatın *L. lactis* hücrelerinin oksidatif stresle başa çıkmalarına yardımcı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.44: 30 °C’ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinin H₂O₂ (a) ve MDA (b) seviyeleri. “GSH” 6.4 mM GSH içeren GM17 besiyerini tanımlarken, “Pirüvat” 10 mM pirüvat içeren GM17 besiyerini tanımlamaktadır. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve hata çubukları standart sapmaları işaret etmektedir. İstatistiksel analizler iki-yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

4.2.2.3. Stres Genlerinin Transkripsiyonel Analizi

Stres ile ilişkili olan enzimleri kodlayan genler, GSH ve pirüvatın *L. lactis* hücrelerinin savunma sistemine olan etkisini açıklamak için transkripsiyonel olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.45). Çalışmanın bu kısmı için seçilen genler, literatürde *L. lactis* hücrelerinin stres cevabı ile ilişkili olduğu daha önceden gösterilmiş olan; *sodA* (süperoksit dismutaz), *ahpF* (H₂O₂ oluşturan NADH oksidaz), *ahpC* (NADH peroksidaz), *gshR* (glutatyon redüktaz), *trxBI* (tiyoredoksin redüktaz), *noxE* (H₂O oluşturan NADH oksidaz), *recA* (rekombinaz) ve *relA* (pppGpp sentetaz) genleridir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: RT-qPCR analizi ile incelenen genler.

Fonksiyon	Gen	Ürün	Referanslar
Stres cevabı ile ilişkili olanlar	<i>sodA</i>	Süperoksit dismutaz	[51]
	<i>ahpF</i>	H ₂ O ₂ oluşturan NADH oksidaz	[70, 71]
	<i>noxE</i>	H ₂ O oluşturan NADH oksidaz	[51, 70, 71]
	<i>ahpC</i>	NADH peroksidaz	[70]
	<i>recA</i>	Rekombinaz	[72]
	<i>relA</i>	(p)ppGpp sentetaz	[73]
	<i>gshR</i>	Glutatyon redüktaz	[37]
	<i>trxBI</i>	Tiyoredoksin redüktaz	[74]
ETS bileşenleri	<i>cydA</i>	Sitokrom d oksidaz	[43]
	<i>noxB</i>	Membran NADH dehidrogenaz	[71]

sodA (süperoksit dismutaz) geninin ekspresyonunun GSH ilave edilmiş besiyerinde 4. ve 6. saatlerde arttığı bulunmuştur. Pirüvat içeren besiyerinde *sodA* ekspresyonunun, büyümenin 6. saatinde çarpıcı şekilde arttığı (kontrol numunesinin 7.5 katından daha fazla) görülmüştür. Büyümenin 8. saatinde ise, kontrol numunesine kıyasla her iki besiyerinde büyütülen hücrelerde *sodA* ifadesi azalmıştır (Şekil 4.45A).

ahpF (H₂O₂ oluşturan NADH oksidaz) gen ekspresyonundaki artış, GSH içeren besiyerinde büyümenin 4. saatinde ve pirüvat içeren besiyerinde büyümenin 6. saatinde istatistiksel olarak önemliyken, büyümenin 8. saatinde her iki besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında, *ahpF* geninin ekspresyon seviyesi, büyümenin 8. saatinde GSH veya pirüvat içeren besiyerleri için sırasıyla 6.2 ve 10.1 kat olmuştur (Şekil 4.45B).

L. lactis hücrelerinde *ahpC* (NADH peroksidaz) geninin ekspresyon seviyesinin, GSH içeren besiyerinde 4 saatlik büyümeden sonra artmasının ve pirüvat içeren besiyerinde 8 saatlik büyümenin ardından azalmasının, istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.45C).

gshR geni tarafından kodlanan glutatyon redüktaz enzimi, glutatyon disülfidin (GSSG) GSH'ye indirgendiği reaksiyonu katalizler. Glutatyon peroksidaz enzimi tarafından gerçekleştirilen ters yöndeki reaksiyon ise, H₂O₂'nin ortadan kaldırılmasına yol açar. Büyümenin 4. saatinde, besiyerinde GSH varlığı *gshR* geninin ekspresyonunun kontrolden 2.6 kat fazla olmasına neden olurken; pirüvat varlığı ise aynı genin ekspresyonunda kontrole göre 0.6 kat azalmaya yol açmıştır. Her iki

besiyerinde büyütülen hücrelerde *gshR* geninin transkripsiyon seviyesinin, büyümenin 8. saatinde kontrol numunesinden daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.45D). GSH varlığında *L. lactis* hücrelerinin H₂O₂'yi etkin bir biçimde uzaklaştırmasının (Şekil 4.43), GSH / GSH redüktaz sisteminin aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

GSH / GSH redüktaz sisteminin yanı sıra, *L. lactis*'te redoks dengesinin korunmasına katkıda bulunan bir başka sistem tiyoredoksin / tiyoredoksin redüktaz sistemidir. Bu sistem de GSH / GSH redüktaz sisteminde olduğu gibi H₂O₂'nin ortadan kaldırılmasını sağlar [74]. Tiyoredoksin peroksidaz enzimini kodlayan *trxBI* geninin ekspresyonu, GSH varlığında büyümenin 4. saatinde artmış, ancak 6. ve 8. saatlerde kontrol numunesine kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır. Pirüvat içeren besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, *trxBI* geninin ekspresyonunun büyümenin 4. ve 6. saatlerinde yükselmesi ve 8. saatinde düşmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.45E).

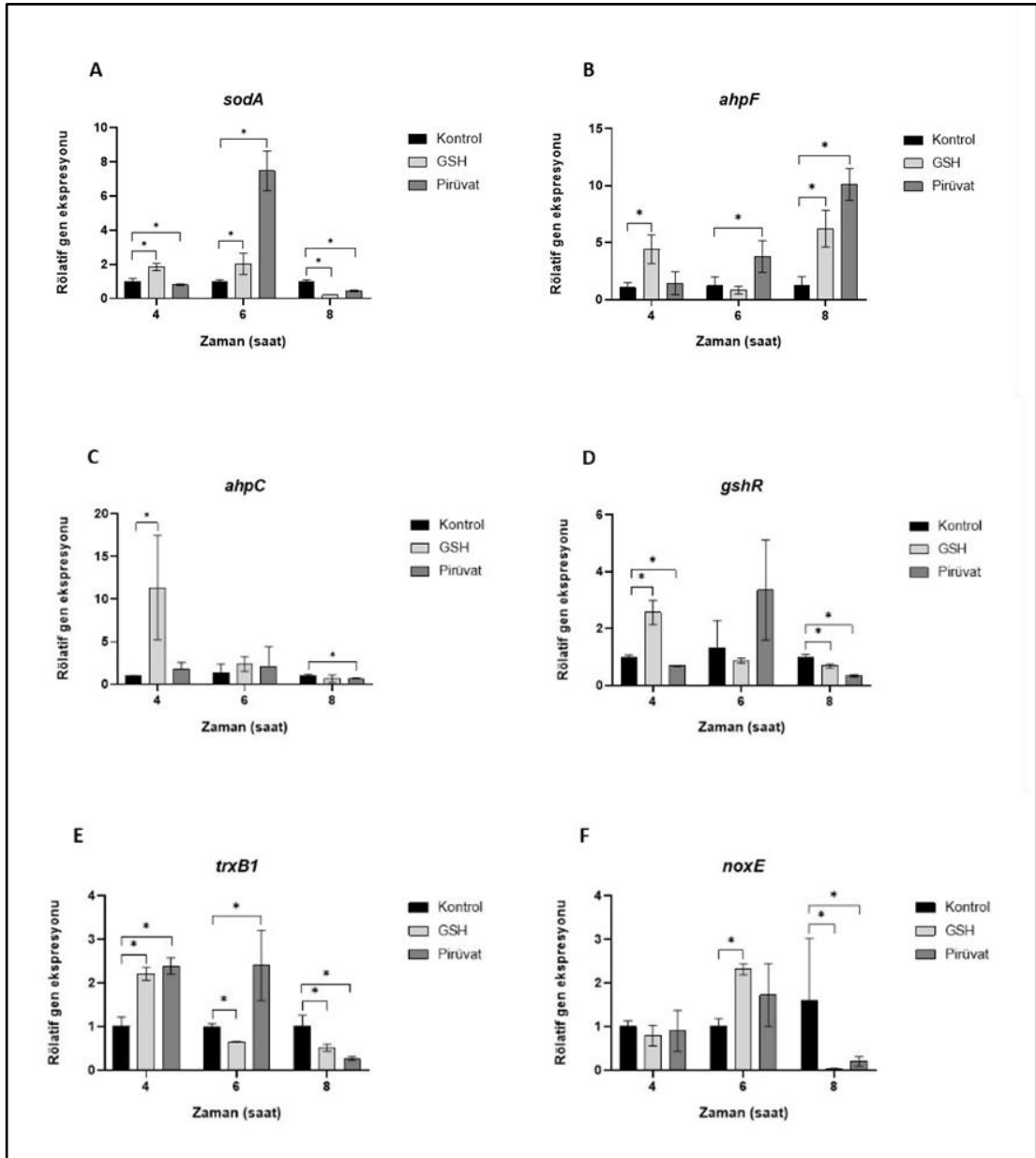
noxE geninin ekspresyonu, GSH ilave edilmiş besiyerinde büyümenin 6. saatinde artmıştır. Bununla birlikte, büyüme 8. saate ulaştığında, GSH veya pirüvat içeren her iki besiyerinde büyütülen hücrelerde *noxE* ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.45F).

Rekombinaz RecA, DNA onarımında rol oynayan ana enzimdir. RecA'nın *L. lactis*'te ısı ve oksidatif stres cevabı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [72]. Besiyerinde GSH ve pirüvat varlığı, büyümenin 8. saatinde *recA* geninin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde azaltmıştır. GSH varlığında büyümenin 4. saatinde *recA* ifadesindeki artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.45G).

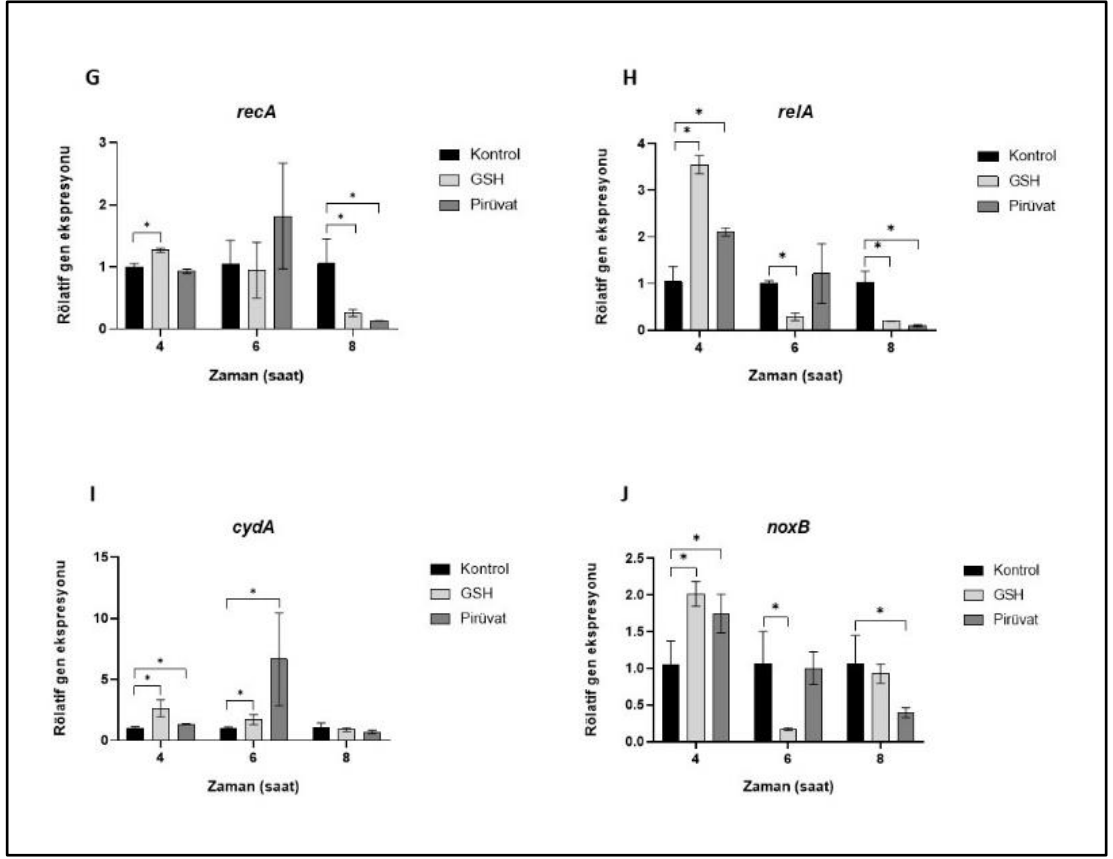
Sınırlandırılmış cevap, RelA proteini tarafından sentezlenen (p)ppGpp molekülleri aracılığıyla düzenlenir. Hücredeki (p)ppGpp seviyesinin sadece beslenme stresıyla değil aynı zamanda ısı, asit ve oksidatif streslerle de ilişkili olduğu gösterilmiştir [73]. *relA* geninin ekspresyonundaki artışın, GSH ve pirüvat ilave edilmiş besiyerinde büyütülmüş *L. lactis* hücrelerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. GSH ve pirüvat varlığı, büyümenin 8. saatinde ise *relA* ekspresyonunda önemli bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.45H).

Ek olarak tez çalışması kapsamında, ETS'de işlev gören enzimleri kodlayan *cydA* ve *noxB* genlerinin transkripsiyon seviyeleri de ölçülmüştür (Tablo 4.4). GSH ve pirüvat, büyümenin ilk aşamalarında her iki genin ekspresyonunu stimüle etmiştir. GSH veya pirüvat ile desteklenmiş GM17 besiyerinde, büyümenin 4. ve 6. saatlerinde *cydA* geninin ekspresyon seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

(Şekil 4.45I). GSH veya pirüvat varlığı, *noxB* ekspresyon seviyesini büyümenin 4. saatinde anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 4.45J).

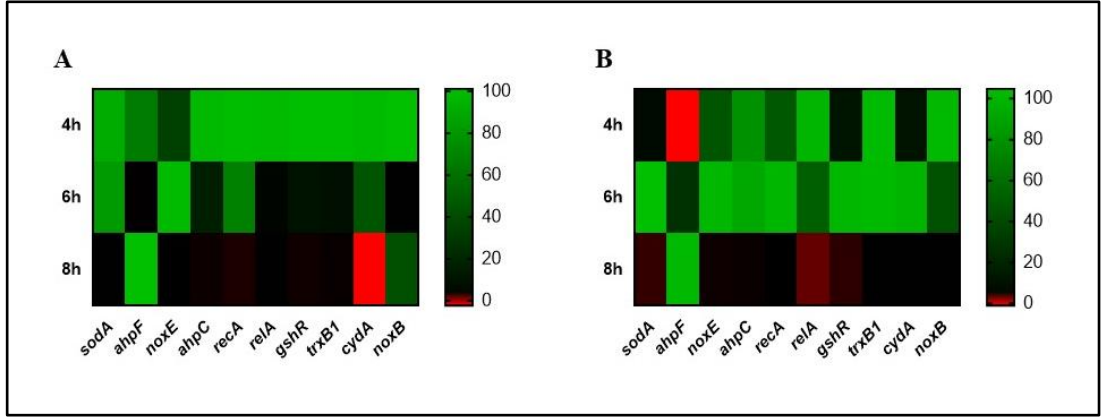


Şekil 4.45: 30 °C’ta aerobik koşullar altında GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, fermentasyonun 4., 6. ve 8. saatinde stres ile ilişkili genlerin [*sodA* (A), *ahpF* (B), *ahpC* (C), *gshR* (D), *trxB1* (E), *noxE* (F), *recA* (G) ve *relA* (H)] ve ETS bileşenlerini kodlayan genlerin [*cydA* (I) ve *noxB* (J)] rölatif ekspresyonu. “GSH” 6.4 mM GSH içeren GM17 besiyerini tanımlarken, “Pirüvat” 10 mM pirüvat içeren GM17 besiyerini tanımlamaktadır. RT-qPCR deneyleri iki tekrarlı olacak şekilde en az üç kez gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler Mann-Whitney testi (* $P < 0.05$) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.45: Devam.

Özetle, *L. lactis* hücre büyümesinin 4., 6, ve 8. saatlerinde, tez çalışması kapsamında seçilen genlerin ifadesindeki değişikliklere genel olarak bakıldığında, büyüme ortamına eklenen GSH'nın, hücrelerin stres cevabı ile ilişkili olan ve ETS'de görev alan enzimleri kodlayan genlerin ifadesini özellikle 4. saatte dikkat çekici bir biçimde uyardığı, bu uyarımın büyümenin ilerleyen saatlerinde giderek azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.46A). Besi ortamına ilave edilen pirüvat ise, GSH ile benzer biçimde, büyümenin 4. saatinde söz konusu genlerin ifadesini arttırmış, büyümenin özellikle 6. saatinde gen ifadesi üzerindeki uyarıcı etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.46B).



Şekil 4.46: 30 °C'ta aerobik koşullar altında 6.4 mM GSH (A) veya 10 mM pirüvat (B) içeren GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, fermentasyonun 4., 6. ve 8. saatinde stres ile ilişkili genlerin [*sodA* (A), *ahpF* (B), *ahpC* (C), *gshR* (D), *trxB1* (E), *noxE* (F), *recA* (G) ve *relA* (H)] ve ETS bileşenlerini kodlayan genlerin [*cydA* (I) ve *noxB* (J)] kontrole göre normalize edilmiş ifadesi.

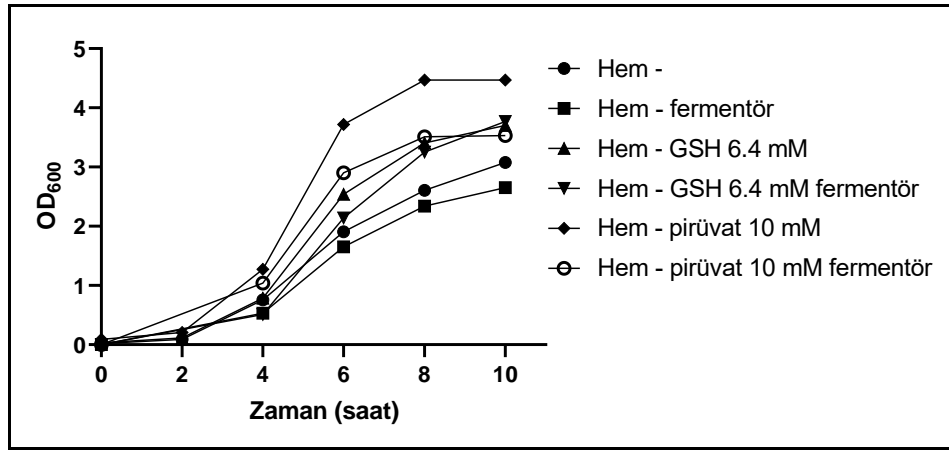
4.2.3. Fermentör Koşullarında Glutatyon ve Pirüvat Varlığında *L. lactis* Hücrelerinin Büyümesi ve Nisin Üretimi

Tez çalışması kapsamında erlen kullanılarak küçük hacimde (100 ml) gerçekleştirilen deneylerde, *L. lactis* hücrelerinin besi ortamında GSH veya pirüvatın varlığının bu hücrelerin nisin üretim miktarını arttırdığı net bir şekilde gösterilmiştir. Nisin verimindeki bu artışın büyük hacimde de benzer biçimde sürdürülüp sürdürülmeyeceğinin tespiti için, *L. lactis* hücreleri 2 L GM17 besiyeri içeren fermentörde GSH veya pirüvat varlığında ve yokluğunda (kontrol) büyütülerek hücre büyümesi ve hücrelerin nisin üretimi incelenmiştir.

Şekil 4.47'de *L. lactis* hücrelerinin büyüme eğrileri, erlende ve fermentör koşullarında karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Fermentör koşullarında hücrelerin büyüme durumları, erlendeki büyüme durumları ile benzer şekilde gözlemlenmiştir; en yüksek biyokütleyle pirüvat içeren GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri ulaşırken, onu GSH içeren GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri izlemiş, en düşük biyokütle ise GSH veya pirüvat içermeyen GM17 besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinde (kontrol) tespit edilmiştir.

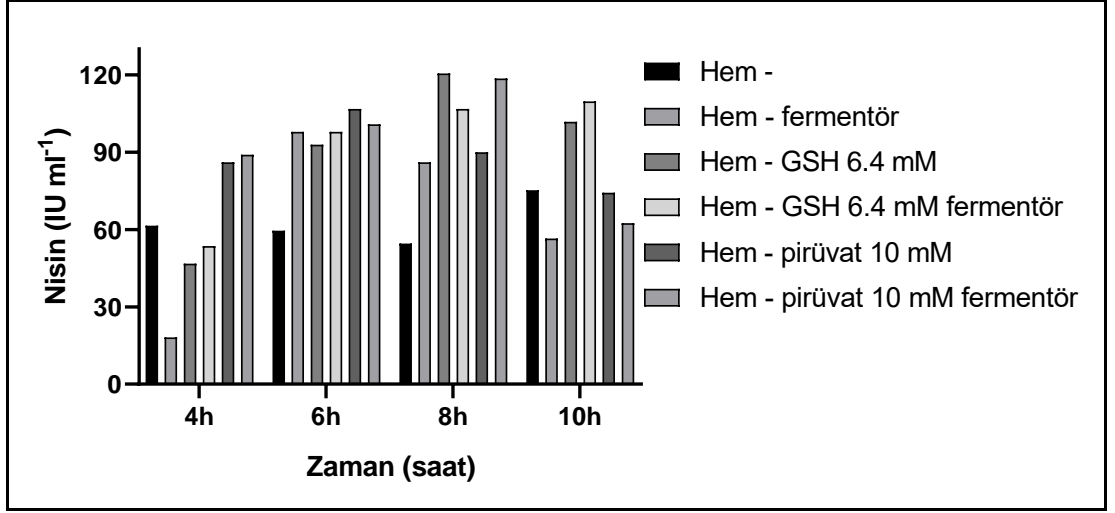
L. lactis hücrelerinin, erlende ve fermentör koşullarında GSH veya pirüvat içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerlerindeki büyüme durumları ayrı ayrı incelendiğinde, kontrolde ve besiyerinde pirüvat bulunması durumunda beklendiği üzere fermentör koşullarında daha düşük biyokütleyle ulaşıldığı görülmüştür. Besiyerine GSH

eklendiğinde ise erlende veya fermentör koşullarında büyütülmeleri, *L. lactis* hücrelerinin biyokütlesinde bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.47: 30 °C'ta aerobik koşullarda GM17 besiyerinde GSH veya pirüvat varlığında ve yokluğunda (kontrol) erlen veya fermentör koşullarında *L. lactis* hücrelerinin büyüme eğrileri.

Fermentör koşullarında *L. lactis* hücrelerinin biyokütlesindeki değişikliklerin nisin üretimi üzerindeki etkisi Şekil 4.48'de erlen verileriyle karşılaştırmalı olarak verilmiştir. GSH veya pirüvat içermeyen GM17 besiyerinde büyütülen (kontrol) *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimi, büyümenin 6. ve 8. saatlerinde erlen koşullarına nazaran fermentör koşullarında kayda değer biçimde artış göstermiştir. GSH içeren besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri, fermentör koşullarında büyümenin 4., 6. ve 10. saatlerinde bir miktar artış gösterirken, pirüvat içeren besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri ise yine fermentör koşullarında büyümenin 4. ve 8. saatlerinde daha yüksek olmuştur. Genel çerçevede bakıldığında, *L. lactis* hücrelerinin biyokütlesi fermentör koşullarında daha az olmasına rağmen, hücreler nisin üretimi bakımından erlen koşulları ile benzer düzeye ulaşmışlardır. Bu durum, besiyerine GSH veya pirüvat ilavesinin erlen koşullarında nisin üretimini arttırdığına dair elde edilen sonuçların, büyük hacimde de geçerli olması ve bu nedenle ticari üretim yapılırken bu ajanların kullanılabilceğini göstermesi bakımından oldukça kıymetlidir.



Şekil 4.48: 30 °C'ta aerobik koşullarda GM17 besiyerinde GSH veya pirüvat varlığında ve yokluğunda (kontrol) erlen veya fermentör koşullarında *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüketicilerin gıdalarda kullanılan katkı maddeleri hakkındaki farkındalığının artması, gün geçtikçe üreticileri güvenli gıda koruyucuları kullanmaya zorlamaktadır. Organik üretimi ve ihmal edilebilir toksik etkisi nedeniyle nisin, birçok ülke tarafından gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ancak, nisin kimyasal yolla sentezi mümkün olmadığından, *L. lactis*'in nisin üretim verimini arttırmanın farklı yollarını bulmak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması kapsamında, *L. lactis*'in oksidatif stres toleransının arttırılması yoluyla nisin üretiminin arttırılması amaçlanmıştır.

L. lactis'te oksidatif strese neden olan başlıca neden hücredeki H_2O_2 birikimidir. *L. lactis* hücrelerinde, hücrel reaksiyonlar sırasında açığa çıkan reaktif oksijen türlerini (ROS), hücre için daha az zararlı ya da zararsız hale getiren bir savunma sistemi (mangan bağımlı süperoksit dismutaz (SOD), NADH oksidaz/NADH peroksidaz) mevcuttur. Ancak, bu hücrelerde H_2O_2 gideriminden sorumlu olan NADH peroksidaz enzimin aktivitesinin çok düşük olması ve katalaz enziminin bulunmaması, hücredeki H_2O_2 birikimine neden olarak oksidatif stresin gelişmesine yol açmaktadır [75]. Bu durum, *L. lactis* hücrelerinin büyümelerini olumsuz şekilde etkilemektedir. Nisin molekülü primer metabolit kinetiği göstermektedir [9]; dolayısıyla *L. lactis* hücrelerinde biyokütlenin artışına neden olan girişimler, nisin üretiminin artışı ile sonuçlanmaktadır [6]. Tüm bu nedenlerle, tez çalışması kapsamında öncelikle aerobik bir bakteri olan *B. subtilis* hücresine ait katalaz (*katE*) geninin ve *L. lactis* hücresinin kendisine ait olan süperoksit dismutaz (*sodA*) geninin *L. lactis*'te farklı seviyelerde ifade edilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Bu sayede, oksidatif strese daha dirençli hale gelecek olan *L. lactis* hücrelerinin daha iyi büyüyecekleri ve buna paralel olarak daha fazla nisin üretecekleri düşünülmüştür.

katE geninin *L. lactis* hücrelerinde ifadesinin sağlanması için pek çok farklı plazmit ve yöntem denenmiştir. İlk aşamada kullanılan plazmitler, Prof. Dr. Per Saris'ten (Helsinki Üniversitesi, Finlandiya) temin edilen pLEB124, pLEB21 ve pLEB579 plazmitleridir. pLEB124 plazmidi, hem *L. lactis*'te hem de *E. coli*'de replike olabilen mekik bir plazmittir. İçerdiği P_{45} promotorunun konstitütif bir promotor olması sebebiyle, *katE* geni bu plazmide klonlandığı takdirde, *L. lactis*'te sürekli bir biçimde ifade edilebilecektir. pLEB579 plazmidi, pLEB124 ile aynı şekilde mekik bir plazmittir. pLEB124'ten farklı olarak, pLEB579 plazmidinde promotor bölgesi

bulunmamaktadır. Dolayısıyla, pLEB579 plazmidi kullanılarak *katE* geninin istenilen güçteki bir promotorun altına klonlanması sağlanabilecektir. Bu amaçla, *L. lactis* N8'de tanımlanan ve P₄₅'ten daha güçlü bir promotor olan P₈ promotoru seçilmiştir. pLEB21 plazmidi ise yalnızca *E. coli*'de replike olur; *L. lactis* kromozomuna entegre olmaktadır. pLEB579 plazmidi gibi bu plazmitte de promotor bölgesi bulunmamaktadır. pLEB579 plazmidinde olduğu gibi, pLEB21 plazmidinde de *katE* geninin P₈ promotorunun altına klonlanması kararlaştırılmıştır. Böylelikle, *L. lactis* hücrelerinde *katE* geninin pLEB124 ve pLEB579 plazmidi aracılığıyla farklı seviyelerde sürekli olarak ve pLEB21 plazmidi aracılığıyla genomda bir kopya halinde ifade edilmesi sağlanacaktır. Ancak yapılan bütün denemeler sonucunda *katE* genini içeren rekombinant plazmide ulaşılamamıştır; onun yerine kontrol plazmit ile aynı boyda veya daha küçük plazmitler elde edilmiştir. Kontrol plazmitten daha küçük boyda plazmit DNA'lar elde edilmesi, katalaz geninin rekombinant vektörün stabilitesini olumsuz yönde etkilediğini ve bu sebeple hücrenin *katE* genini plazmit DNA'dan elimine etmeye çalışırken bu esnada daha büyük fragmanların elimine edildiğini düşündürmüştür.

Bir sonraki aşamada, *B. subtilis*'e ait *katE* geninin *E. coli*'de ifade edilip edilmediğinin belirlenmesi ve ifade edildiği takdirde toksik etki gösterip göstermediğinin tespiti için, söz konusu genin pSK vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir. Plazmit aracılığıyla edinilen katalaz enziminin (*katE*) varlığının fenotipik olarak belirlenmesi için, ligasyon ürünleri, katalaz enzimini üretemeyen *E. coli*'ye ($\Delta katE$) aktarılmıştır. Restriksiyon enzim kesimi sonucu pSK'ya klonlandığı belirlenen katalaz enziminin *E. coli*'de ifade edildiği ise H₂O₂ damlatıldığında kolonilerde baloncuk gözlenmesi ile tespit edilmiştir.

Ancak pSK plazmidi yalnızca *E. coli*'de replike olabilmektedir; *L. lactis* hücrelerinde replike olamamaktadır. Bu nedenle, pILZ-Em plazmidinin replikasyon orijini bölgesinin pSK plazmidine klonlanması, bu sayede *katE* genini içeren pSK vektörünün *L. lactis*'te replike olabilmesinin sağlanması amaçlanmıştır. Restriksiyon enzim kesimi sonucunda beklenen bandı veren olası plazmidin *L. lactis*'e elektroporasyonu sonucu herhangi bir koloniye rastlanmaması, pILZ-Em'ye ait replikasyon orijini bölgesinin, rekombinant plazmidin *L. lactis*'te replike olmasını sağlayamadığını düşündürmüştür.

katE geninin çakışan (overlap) PCR yoluyla kanamisin direnç geni ile birleştirildikten sonra pLEB124 plazmidine klonlanması, söz konusu genin *L. lactis*

hücrelerinde ifade edilebilmesi için başvurulan bir diğer yöntemdir. Fakat bütün denemelere rağmen, katalaz (*katE*) ve kanamisin genleri çakışan PCR yöntemiyle birleştirilemediğinden, *katE* geninin *L. lactis*'te ifade edilmesi için alternatif bir yöntem arayışına girilmiştir.

katE geninin pLEB124 vektörüne klonlanması amacıyla T4 DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonu yerine alternatif bir yöntem olarak ticari olarak satılan “In-Fusion HD Cloning Kit” kullanılmıştır. Transformantlardan izole edilen plazmitlerin kontrol plazmit ile aynı boyutta veya daha küçük olması sebebiyle *katE* geninin *E. coli*'de yüksek seviyede ifade edilerek hücre üzerinde toksik etki yaratmış olabileceğinden yola çıkılarak, söz konusu genin konstitütif bir promotor yerine uyarılabilen bir promotor kontrolünde ifade edilmesi düşünülmüş ve bu amaçla *L. lactis*'te kullanılan ve çinko (Zn^{+}) ile uyarılabilen Zirex Sistemi'nin kullanılması kararlaştırılmıştır.

Zirex Sistemi'nde kullanılmış olan pILZ-Em ve pCZ-Cm plazmitleri, Prof. Dr. Oscar Kuipers'ten (Groningen Üniversitesi, Hollanda) temin edilmiştir. *katE* geninin bu plazmitlere klonlanması için öncelikle ligasyon denenmiştir. Fakat klonlama için kullanılması planlanan *KpnI* enziminin pILZ-Em plazmidini farklı noktalardan kesmesi sebebiyle bu yöntem terkedilmiştir. pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitlerine *katE* geninin klonlanması için, “In-Fusion HD Cloning Kit” kullanılması da denenmiştir. pCZ-Cm plazmidinin sahip olduğu kloramfenikol direncinde yaşanan sıkıntılar ve pILZ-Em plazmidinin yalnızca Gram pozitif bakterilerde replike olması nedeniyle *E. coli*'de çoğaltılamaması ve ligasyon ürünlerinin direkt olarak *L. lactis*'e aktarılmasının sonuç vermemesi yüzünden bu yöntem ile *katE* geninin bu vektörlere klonlanması mümkün olmamıştır.

Son olarak, pCZ-Cm plazmidine *katE* geninin klonlanması için, “In-Fusion HD Cloning Kit” ile gerçekleştirilen klonlama reaksiyonu tekrarlanmış ve ürünler $\Delta katE$ suşunda taranmıştır. Gerçekleştirilen bütün denemelere rağmen, *B. subtilis*'e ait katalaz genini içeren plazmide sahip rekombinant *L. lactis* hücresi elde edilememiştir.

Lactococcus vektörleri ticari olmadıkları için standardize edilmemiş olup, diğer ticari vektörlerle karşılaştırıldığında en basit basamakta bile sorun çıkarmaktadırlar. *katE* geninin klonlanması ile ilgili yaşanan sorunların olası sebeplerinden birinin bu olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan, konstitütif promotora sahip bütün plazmitlere (pLEB124'te P₄₅, pLEB579 ve pLEB21'de P₈) *katE* geninin klonlanması için yapılan çalışmalarda elde edilen olası rekombinant plazmitlerin kontrol

plazmitlerle aynı boyda ya da daha küçük olması, *katE* geninin yüksek seviyede ifadesinin *E. coli* hücreleri için toksik olabileceğini de düşündürmüştür.

Rochat ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *B. subtilis*'e ait *katE* genini konstitütif promotor (P₂₃) içeren pILN12 plazmidine bizim çalışmalarımızda da kullanılan *E. coli* TG1 hücrelerinde klonlamışlar fakat *L. lactis* MG1363 hücrelerinde bu genin ifadesini sağlayamamışlardır [36]. Bu sorunu çözebilmek için *katE* genini bir başka plazmitte bulunan uyarılabilen bir promotor olan P_{n_{isA}} promotorunun altına klonlayarak *L. lactis* NZ9000 hücrelerinde bu genin ifadesini uyarım sonrasında gözlemleyebilmişlerdir. Bu yöntemin tez çalışmasında kullanılmamasının nedeni, P_{n_{isA}} promotorunun uyarımının nisin molekülü ile yapılıyor olmasıdır. Çalışmamızda kullanılan *L. lactis* N8 hücreleri hali hazırda nisin üretiyor olduklarından, söz konusu promotorun bizim hücrelerimizde kullanılması kontrol edilebilir bir ifadeden çok sürekli bir ifadeye neden olacaktır. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında, *katE* geninin kontrollü ifadesi için çinko (Zn⁺) ile uyarılabilen bir promotora sahip Zirex Sistemi kullanılmıştır. Ancak *katE* geninin bu plazmitlere klonlanması için gerçekleştirilen bütün denemeler başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

L. lactis N8 hücrelerinin kendisine ait süperoksit dismutaz (*sodA*) geninin yine *L. lactis* N8 hücrelerinde farklı seviyelerde ifade edilmesi için pLEB124, pLEB21 ve pLEB579 plazmitleri kullanılmıştır. Klonlama için gereken işlemlerin ardından elde edilen transformantların içerdiği plazmit DNA'lar tarandığında *katE* geninde olduğu gibi yine kontrol plazmit ile aynı boyutta ya da daha küçük boyutta plazmit DNA'lara rastlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında *katE* geninin pSK vektörüne klonlanması başarılmışken, *sodA* geninin klonlanması mümkün olmamıştır. *sodA* geninin çakışan (overlap) PCR yoluyla kanamisin direnç geni ile birleştirildikten sonra pLEB124 plazmidine klonlanması, ilgili DNA fragmanlarının çakışan PCR yöntemiyle birleştirilememesi sebebiyle gerçekleştirilememiştir. Ligasyon yoluyla veya "Infusion HD Cloning Kit" kullanılarak *sodA* geninin çinko (Zn⁺) ile uyarılabilen Zirex Sistemi'ne ait plazmitler olan pCZ-Cm ve pILZ-Em plazmitlerine klonlanması için gerçekleştirilen denemeler de başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Tez çalışmasının amacı *L. lactis*'in oksidatif stres toleransının yükseltilmesi yoluyla nisin üretiminin artırılması olduğundan, çalışmanın devamında, nisin üretici *L. lactis* N8 suşunda genetik değişiklik yapmak yerine, bu hücrelerin büyüme ortamına

oksidatif stresi azalttığı bilinen antioksidan moleküllerin eklenmesi uygun bulunmuştur. Bu amaçla kullanılmak üzere GSH ve pirüvat molekülleri seçilmiştir.

L. lactis hücrelerinin membranlarında aerobik solunum yapabilmek için elektron transfer zinciri (ETS) bileşenleri bulunmasına rağmen yine de bu hücreler solunumu gerçekleştirememektedir. Bunun nedeni, *L. lactis*'in sitokrom oksidaz enziminin kofaktörü olan hem molekülünü sentezleyemiyor olmasıdır [75]. Ancak hücrelerin besiyeri ortamına yapılan hem ilavesi bu eksikliği gidererek *L. lactis*'in aerobik solunuma geçmesini sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin ortamda hem varlığında daha yüksek biyokütleyle ulaştığı birçok çalışmada rapor edilmiştir [43-49]. Biyokütle artışının nisin üretimini arttırdığına yönelik çalışmalar göz önüne alınarak, bu tez çalışmasında, *L. lactis* hücreleri, hem varlığında ve yokluğunda (2.5 µg/ml), farklı konsantrasyonlarda GSH (1.6, 3.2 ve 6.4 mM) ve pirüvat (2.5, 5 ve 10 mM) içeren GM17 besiyerinde 30 °C'ta aerobik koşullarda büyütülmüş ve biyokütleleri, nisin üretimleri, pH değerleri ve oksidatif stres seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, ilginç bir biçimde, biyokütle artışının nisin üretimini aynı oranda etkilemediğini göstermiştir. Nitekim GSH yokluğunda ortamda hem molekülü varken en yüksek biyokütle değerine ulaşılmasına rağmen, hem molekülüne ek olarak GSH'ın farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ile karşılaştırıldığında, en düşük nisin üretimi yalnızca hem bulunan besiyerinde büyütülen *L. lactis* hücreleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde, besiyerinde hem molekülünün tek başına veya farklı konsantrasyonlarda pirüvat ile birlikte bulunması biyokütle artışına sebep olurken, nisin üretimi yalnızca pirüvat içeren besiyerinde daha yüksek bulunmuştur. Hem yokluğunda ise besiyerinde GSH veya pirüvat bulunması hem biyokütlenin hem de üretilen nisin miktarının artmasına yol açmıştır. Çalışma kapsamında en yüksek nisin üretimine hem yokluğunda, kullanılan en yüksek konsantrasyonlar olan 6.4 mM GSH ve 10 mM pirüvat varlığında ulaşıldığından, deneylere bu konsantrasyonlar ile devam edilmiştir.

GSH veya pirüvat içeren besiyerlerinde üretilen *L. lactis* hücrelerinin büyümeleri boyunca pH değişimleri izlendiğinde, bu hücrelerin ürettiği laktik asitten ötürü bütün besiyerlerinde büyüme süresince pH'da düşüş gerçekleşmiştir. Kontrolün ve GSH içeren besiyerinin pH değeri, büyümenin 24. saatine kadar kademeli bir biçimde azalmaya devam ederken, pirüvat içeren besiyerinin pH değerinin 8 saat büyümenin ardından sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu durumun, pirüvat molekülünün biyolojik ortamlar için etkili bir tampon özelliği göstermesinden kaynaklanabileceği

düşünülmektedir [52]. GSH içeren besiyerindeki pH düşüşünün kontrol grubundan anlamlı olarak daha fazla olması ise GM17 besiyerini asitleştiren GSH molekülünün moleküler yapısı ile açıklanabilmektedir [76].

Aerobik koşullar altında GSH veya pirüvat varlığında büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, büyümenin ilk 8 saati boyunca, besiyerlerindeki H₂O₂ konsantrasyonu ve hücrelerin MDA miktarı kademeli olarak azalmıştır. Aerobik büyümenin çok erken aşamalarında yüksek H₂O₂ seviyeleri (2 saate kadar) Grufferty ve Condon tarafından *L. lactis* C10'da da gösterilmiştir [2]. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, beklenildiği biçimde, GSH ve pirüvat *L. lactis* hücrelerinin oksidatif stres toleransını arttırmıştır. *L. lactis*'te GSH birikiminin, oksidatif stres [37], asit stresi [77] ve ozmotik stres [78] gibi çeşitli streslere karşı korumada rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Pirüvatın antioksidan aktivitesi, farklı çalışmalarla da kanıtlanmıştır [51, 79].

GSH veya pirüvat içeren ortamda büyütülen *L. lactis* hücrelerinin nisin üretimi transkripsiyonel olarak incelendiğinde, besiyerindeki GSH'ın *nisZ* ekspresyonunu genel olarak pozitif yönde etkilediği, ancak *nisZ* ekspresyonu üzerinde pirüvat'ın pozitif etkisinin çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Transkripsiyonel verilerle uyumlu biçimde, *L. lactis* hücrelerinin supernatantlarında bulunan nisin miktarının, besiyerinde GSH veya pirüvat bulunduğunda kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu iki molekülün hücrelerin oksidatif stresini azalttığı bilinmesine rağmen, büyüme ortamına ilave edildiklerinde *L. lactis*'te nisin üretimini tetiklediği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, GSH ve pirüvat moleküllerinin *L. lactis* hücrelerinin büyüme ortamında bulunmasının hücrelerin oksidatif stres toleransını arttırdığı, H₂O₂ miktarının ve lipid peroksidasyonunun tespiti ile gösterilmiştir. Bu moleküllerin, *L. lactis* hücrelerinin stres cevabı ile ilişkili olduğu gösterilen genlerin (Tablo 4.4) ekspresyonu üzerindeki etkisi ise transkripsiyonel analiz aracılığıyla belirlenmiştir.

L. lactis hücrelerinde SodA'nın (süperoksit dismutaz) [51] aktivitesi, süperoksit radikallerinin uzaklaştırılmasına yol açsa da reaksiyon bir başka toksik madde olan H₂O₂ üretimine neden olmaktadır. Aynı zamanda AhpF'nin (H₂O₂ oluşturan NADH oksidaz) [70, 71] aktivitesi de hücre içinde H₂O₂ üretmektedir. H₂O₂'nin aşırı birikimi, *L. lactis*'in oksidatif stres koşullarıyla başa çıkabilmesi için en zorlayıcı problemdir. Sonuçlarımıza göre, GSH ve pirüvat *sodA* ve *ahpF* genlerinin ekspresyonunu farklı büyüme noktalarında indüklemektedir. Özellikle pirüvatın her iki genin

transkripsiyonu üzerinde olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir. *L. lactis*'te AhpC (NADH peroksidaz) [70], GshR (glutasyon redüktaz) [37] ve TrxB1 (tiyoredoksin redüktaz) [74] enzimlerinin etkisiyle, özellikle büyümenin ilk saatlerinde biriken H₂O₂'nin ortamdaki daha verimli bir şekilde uzaklaştırıldığı ve bu uzaklaştırmanın GSH ve pirüvat varlığında arttığı görülmüştür. Bu veriler, *L. lactis* hücrelerinin oksidatif stres seviyesinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilen H₂O₂ ve lipit peroksidasyonu ölçümleri ile uyum içerisindedir.

GSH veya pirüvat varlığında 8 saat büyümenin ardından *noxE* (H₂O oluşturan NADH oksidaz) [51, 70, 71] geninin ekspresyonunda gerçekleşen düşüş dikkat çekici olmuştur. Benzer şekilde, *L. lactis*'te farklı stres durumları ile ilişkilendirilen *recA* [72] ve *relA* genlerinin [73] ekspresyonlarının büyümenin 8. saatinde istatistiksel olarak önemli biçimde düşmesi, besiyerindeki antioksidan moleküllerin varlığından dolayı oksidatif stresin hafiflediğine işaret etmektedir. Bu durum, GSH ve pirüvatın hücrelerin oksidatif strese daha erken cevap vermesine yardımcı olduğunu düşündürmektedir. Büyümenin ilk saatlerinde, GSH varlığında *recA*, GSH veya pirüvat varlığında *relA* genlerinin ekspresyonunda meydana gelen artışın ise hücrelerin stres koşullarına karşı önlem almasına bağlı olduğu tahmin edilmektedir.

Çalışma kapsamında, stres ile ilişkili genlere ek olarak, GSH veya pirüvat varlığında aerobik koşullar altında büyütülen *L. lactis* hücrelerinde, ETS bileşenlerini kodlayan *cydA* (sitokrom oksidaz) ve *noxB* (NADH dehidrogenaz) genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. GSH veya pirüvat varlığında büyümenin ilk saatlerinde her iki genin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Sitokrom oksidaz enziminin hem yokluğunda işlev gösterememesi nedeniyle bu genlerin ifadesinde görülen artış beklenen bir durum değildir.

Duwat ve ark. (2001) aerobik koşullarda (hem eklenmeden) ve solunum koşullarında (hem eklenerek) büyütülen *L. lactis* hücrelerinde *cydA* geninin ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Bu genin ekspresyonunun her iki durumda da benzer olduğu bulunmuştur; sadece geç ekspanansiyel fazda (yaklaşık büyümenin 6. saatinde) *cydA* geninin ekspresyonunun, hem varlığında indüklendiği gösterilmiştir [43]. Kısaca, *L. lactis* hücrelerinde, büyümenin erken ekspanansiyel fazında besiyerinde hem molekülünün bulunup bulunmaması *cydA* ekspresyonunda bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Bu durum, GSH veya pirüvat varlığında *cydA* geninin büyümenin 4. ve 6. saatlerinde yükselişini gösteren sonuçlarımız ile uyum içerisindedir.

noxB geni tarafından kodlanan NADH dehidrogenaz enziminin ETS'deki görevinin dışında, oksijenden kaynaklanan oksitleyici bileşiklerin giderimi ile ilişkili olduğu gösterilmiş [71] ve bu genin ekspresyonunun GSH veya pirüvat varlığında büyümenin 4. saatinde artmasının diğer savunma genlerinin ekspresyon sonuçları ile paralel olarak oksidatif strese verilen tepki ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Hem varlığında fermentasyondan solunuma geçişin oksidatif stres tepkisi ile ilgili genleri uyardığı [80] ve *L. lactis*'te daha yüksek biyokütle ve nisin verimine yol açtığı bilinmektedir [6]. Sonuçlarımıza göre, GSH ve pirüvat *L. lactis*'in büyüme ortamına eklendiğinde, metabolizmayı solunuma yöneltmeden hem ile aynı şekilde strese bağlı genleri aktive edebilmekte ve nisin üretimini açıkça arttırmaktadır.

İlginç bir şekilde, GSH ve pirüvat varlığında elde edilen nisin veriminin, hem ilave edilmiş ortamdan daha iyi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, *L. lactis*'in büyüme ortamına hem yerine GSH ve pirüvat ilavesinin, kesikli kültürde nisin üretimini tetiklemede etkili olduğunu göstermiştir. GSH ve pirüvatın nisin üretimi üzerindeki olumlu etkisinin daha büyük bir kültür hacminde görülüp görülmeyeceğinin tespiti için kesikli kültürde gerçekleştirilen deneyler fermentör koşullarında tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, *L. lactis* hücrelerinin biyokütlesinin fermentör koşullarında beklendiği üzere bir miktar azalmasına karşın, bu hücrelerin nisin üretiminin kesikli kültürde elde edilen nisin verimi ile benzer seviyede olduğunu göstermiştir.

Günümüzde kullanılan diğer gıda koruyucuları ile karşılaştırıldığında, sahip olduğu yüksek etkinlik ve düşük toksisite sebebiyle, organik gıda koruyucusu nisin üstün özelliklere sahiptir. Nisin kullanımının yaygınlaşmasının önündeki en büyük engel kimyasal yolla üretiminin mümkün olmayıp yalnızca belirli *L. lactis* suşları tarafından üretiliyor olmasıdır. Bu nedenle, nisin üretim veriminin artırılması maliyeti düşürmesi nedeniyle pek çok çalışmanın hedefi haline gelmiştir. Bu tez çalışmasında, GSH ve pirüvatın besiyerindeki varlığının nisin üretimini hem kesikli kültürde küçük hacimde hem de fermentörde büyük hacimde aynı şekilde arttırdığı açıkça gösterilerek yalnızca literatüre katkı sağlamakla kalmayıp aynı zamanda ticari koşullarda nisin üretimi için kullanılabilir ön veriler elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] And H. C., Hoover D., (2003), "Bacteriocins and their food applications", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (3), 82-100.
- [2] Hurst A. (1981), "Nisin". "Advances in Applied Microbiology", Elsevier.
- [3] Paul Ross R., Morgan S., Hill C., (2002), "Preservation and fermentation: past, present and future", *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1), 3-16.
- [4] de Arauz L. J., Jozala A. F., Mazzola P. G., Penna T. C. V., (2009), "Nisin biotechnological production and application: a review", *Trends in Food Science & Technology*, 20 (3-4), 146-154.
- [5] De Vuyst L., Vandamme E. J. (1994), "Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications". "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria", Springer.
- [6] Kördikanlıoğlu B., Şimşek Ö., Saris P. E. J., (2015), "Nisin production of *Lactococcus lactis* N8 with hemin-stimulated cell respiration in fed-batch fermentation system", *Biotechnology Progress*, 31 (3), 678-685.
- [7] Miao S., Wu H., Zhao Y., Caiyin Q., Li Y., Qiao J., (2018), "Enhancing nisin yield by engineering a small noncoding RNA anti41 and inhibiting the expression of *glnR* in *Lactococcus lactis* F44", *Biotechnology Letters*, 40 (6), 941-948.
- [8] Wu H., Liu J., Miao S., Zhao Y., Zhu H., Qiao M., Saris P. E. J., Qiao J., (2018), "Contribution of *YthA*, a PspC family transcriptional regulator of *Lactococcus lactis* F44 acid tolerance and nisin yield: a transcriptomic approach", *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (6), e02483-02417.
- [9] Cheigh C.-I., Pyun Y.-R., (2005), "Nisin biosynthesis and its properties", *Biotechnology Letters*, 27 (21), 1641-1648.
- [10] Fridovich I., (1998), "Oxygen toxicity: a radical explanation", *Journal of Experimental Biology*, 201 (8), 1203-1209.
- [11] Imlay J. A., (2003), "Pathways of oxidative damage", *Annual Reviews in Microbiology*, 57 (1), 395-418.
- [12] Klaenhammer T. R., (1988), "Bacteriocins of lactic acid bacteria", *Biochimie*, 70 (3), 337-349.
- [13] Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., (2005), "Bacteriocins: developing innate immunity for food", *Nature Reviews Microbiology*, 3 (10), 777-788.

- [14] Ibarra-Sánchez L. A., El-Haddad N., Mahmoud D., Miller M. J., Karam L., (2020), “Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products”, *Journal of Dairy Science*.
- [15] Zhou L., van Heel A. J., Montalban-Lopez M., Kuipers O. P., (2016), “Potentiating the activity of nisin against *Escherichia coli*”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 7.
- [16] Breukink E., van Kraaij C., van Dalen A., Demel R. A., Siezen R. J., de Kruijff B., Kuipers O. P., (1998), “The orientation of nisin in membranes”, *Biochemistry*, 37 (22), 8153-8162.
- [17] Benz R., Jung G., Sahl H.-G., (1991), “Mechanism of channel formation by lantibiotics in black lipid membranes”, *Nisin and Novel Lantibiotics*. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands, 359-372.
- [18] Sahl H.-G., (1991), “Pore formation in bacterial membranes by cationic”, *Nisin and Novel Lantibiotics*, 347.
- [19] Driessen A. J., van den Hooven H. W., Kuiper W., Van de Camp M., Sahl H.-G., Konings R. N., Konings W. N., (1995), “Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles”, *Biochemistry*, 34 (5), 1606-1614.
- [20] Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H.-G., (2001), “Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity”, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (3), 1772-1779.
- [21] Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R. J., Hugenholtz J., (1996), “Applications of the bacteriocin, nisin”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 69 (2), 193-202.
- [22] Morris S. L., Walsh R. C., Hansen J., (1984), “Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action”, *Journal of Biological Chemistry*, 259 (21), 13590-13594.
- [23] Mulders J. W., Boerrigter I. J., Rollema H. S., Siezen R. J., de Vos W. M., (1991), “Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant”, *European Journal of Biochemistry*, 201 (3), 581-584.
- [24] Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto K., (2003), “Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (7), 1616-1619.

- [25] Wirawan R. E., Klesse N. A., Jack R. W., Tagg J. R., (2006), "Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 1148-1156.
- [26] De Kwaadsteniet M., Ten Doeschate K., Dicks L., (2008), "Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*)", *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2), 547-549.
- [27] Kuipers O. P., Beerthuyzen M. M., Siezen R. J., De Vos W. M., (1993), "Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*: Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity", *European Journal of Biochemistry*, 216 (1), 281-291.
- [28] Kleerebezem M., Quadri L. E., (2001), "Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior", *Peptides*, 22 (10), 1579-1596.
- [29] Qiao M., Saris P. E., (1996), "Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8", *FEMS Microbiology Letters*, 144 (1), 89-93.
- [30] Van der Meer J., Polman J., Beerthuyzen M. M., Siezen R. J., Kuipers O. P., De Vos W., (1993), "Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis", *Journal of Bacteriology*, 175 (9), 2578-2588.
- [31] Siegers K., Entian K., (1995), "Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3", *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), 1082-1089.
- [32] Berlett B. S., Stadtman E. R., (1997), "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress", *Journal of Biological Chemistry*, 272 (33), 20313-20316.
- [33] Farr S. B., Kogoma T., (1991), "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55 (4), 561-585.
- [34] Tan B. H., Chor Leow T., Foo H. L., Abdul Rahim R., (2014), "Molecular characterization of a recombinant manganese superoxide dismutase from *Lactococcus lactis* M4", *BioMed Research International*, 2014.
- [35] Sanders J. W., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Venema G., Kok J., (1995), "Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene", *Journal of Bacteriology*, 177 (18), 5254-5260.
- [36] Rochat T., Miyoshi A., Gratadoux J., Duwat P., Sourice S., Azevedo V., Langella P., (2005), "High-level resistance to oxidative stress in *Lactococcus*

lactis conferred by *Bacillus subtilis* catalase KatE”, *Microbiology*, 151 (9), 3011-3018.

- [37] Li Y., Hugenholtz J., Abee T., Molenaar D., (2003), “Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10), 5739-5745.
- [38] Fu R.-Y., Bongers R. S., Van Swam I. I., Chen J., Molenaar D., Kleerebezem M., Hugenholtz J., Li Y., (2006), “Introducing glutathione biosynthetic capability into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 improves the oxidative-stress resistance of the host”, *Metabolic Engineering*, 8 (6), 662-671.
- [39] Papagianni M., Avramidis N., (2012), “Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase gene (*aox1*) of *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* and its induction by oxidizing conditions”, *Enzyme and Microbial Technology*, 50 (1), 17-21.
- [40] Qi J., Caiyin Q., Wu H., Tian K., Wang B., Li Y., Qiao J., (2017), “The novel sRNA *s015* improves nisin yield by increasing acid tolerance of *Lactococcus lactis* F44”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (16), 6483-6493.
- [41] Zhang J., Caiyin Q., Feng W., Zhao X., Qiao B., Zhao G., Qiao J., (2016), “Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* F44”, *Scientific Reports*, 6, 27973.
- [42] Tian K., Li Y., Wang B., Wu H., Caiyin Q., Zhang Z., Qiao J., (2019), “The genome and transcriptome of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* F44 and G423: Insights into adaptation to the acidic environment”, *Journal of Dairy Science*, 102 (2), 1044-1058.
- [43] Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubière P., Gruss A., (2001), “Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival”, *Journal of Bacteriology*, 183 (15), 4509-4516.
- [44] Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaïki L., Lamberet G., Sourice S., Duwat P., Gruss A. (2002), “Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*”. “Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications”, Springer.
- [45] Nagayasu M., Wardani A. K., Nagahisa K., Shimizu H., Shioya S., (2007), “Analysis of hemin effect on lactate reduction in *Lactococcus lactis*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103 (6), 529-534.
- [46] Koebmann B., Blank L. M., Solem C., Petranovic D., Nielsen L. K., Jensen P. R., (2008), “Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* during energetically limited growth and respiratory conditions”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 50 (1), 25-33.

- [47] Razvi A., Zhang Z., Lan C. Q., (2008), "Effects of glucose and nitrogen source concentration on batch fermentation kinetics of *Lactococcus lactis* under heme-stimulated respirative condition", *Biotechnology Progress*, 24 (4), 852-858.
- [48] Brooijmans R., Smit B., Santos F., Van Riel J., de Vos W. M., Hugenholtz J., (2009), "Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria", *Microbial Cell Factories*, 8 (1), 28.
- [49] Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P., Gruss A., (2011), "Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria", *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2), 143-149.
- [50] Rezaïki L., Cesselin B., Yamamoto Y., Vido K., Van West E., Gaudu P., Gruss A., (2004), "Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*", *Molecular Microbiology*, 53 (5), 1331-1342.
- [51] van Niel E. W., Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B., (2002), "Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions", *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), 4350-4356.
- [52] Zhou F. Q., (2005), "Pyruvate in the correction of intracellular acidosis: a metabolic basis as a novel superior buffer", *American Journal of Nephrology*, 25 (1), 55-63.
- [53] Carter P., Bedouelle H., Winter G., (1985), "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors", *Nucleic Acids Research*, 13 (12), 4431-4443.
- [54] Graeffe T., Rintala H., Paulin L., Saris P., (1991), "A natural nisin variant, p. 260-268", *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM Science Publishers BV, Leiden, The Netherlands.
- [55] Higerd T. B., Hoch J. A., Spizizen J., (1972), "Hyperprotease-producing mutants of *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 112 (2), 1026-1028.
- [56] Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K. A., Tomita M., Wanner B. L., Mori H., (2006), "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection", *Molecular Systems Biology*, 2 (1).
- [57] Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K., (2003), "Current protocols in molecular biology, vol. 1 John Wiley & Sons", Inc., Hoboken, NJ.
- [58] Web 1, (2014), https://structbio.vanderbilt.edu/sanders/dgk_protocols.pdf, (Erişim Tarihi: 01/12/2014).

- [59] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), “Molecular cloning: a laboratory manual”, Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [60] Zhu D., Liu F., Xu H., Bai Y., Zhang X., Saris P. E. J., Qiao M., (2015), “Isolation of strong constitutive promoters from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8”, *FEMS Microbiology Letters*, 362 (16).
- [61] Mu D., Montalbán-López M., Masuda Y., Kuipers O. P., (2013), “Zirex: a novel zinc-regulated expression system for *Lactococcus lactis*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (14), 4503-4508.
- [62] Bryksin A. V., Matsumura I., (2010), “Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids”, *Biotechniques*, 48 (6), 463-465.
- [63] Wu Z., Xuanyuan Z., Li R., Jiang D., Li C., Xu H., Bai Y., Zhang X., Turakainen H., Saris P., (2009), “Mu transposition complex mutagenesis in *Lactococcus lactis*—identification of genes affecting nisin production”, *Journal of Applied Microbiology*, 106 (1), 41-48.
- [64] Cheigh C.-I., Choi H.-J., Park H., Kim S.-B., Kook M.-C., Kim T.-S., Hwang J.-K., Pyun Y.-R., (2002), “Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi”, *Journal of Biotechnology*, 95 (3), 225-235.
- [65] Heath R. L., Packer L., (1968), “Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 (1), 189-198.
- [66] Rhee S. G., Chang T.-S., Jeong W., Kang D., (2010), “Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells”, *Molecules and Cells*, 29 (6), 539-549.
- [67] Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G., (2012), “Primer3—new capabilities and interfaces”, *Nucleic Acids Research*, 40 (15), e115-e115.
- [68] Koressaar T., Remm M., (2007), “Enhancements and modifications of primer design program Primer3”, *Bioinformatics*, 23 (10), 1289-1291.
- [69] Livak K. J., Schmittgen T. D., (2001), “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method”, *Methods*, 25 (4), 402-408.
- [70] Jiang R., Riebel B. R., Bommarius A. S., (2005), “Comparison of Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpR) and Water-Forming NADH Oxidase from *Lactococcus lactis* ATCC 19435”, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 347 (7-8), 1139-1146.

- [71] Tachon S., Brandsma J. B., Yvon M., (2010), "NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk", *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (5), 1311-1319.
- [72] Duwat P., Ehrlich S. D., Gruss A., (1995), "The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress", *Molecular Microbiology*, 17 (6), 1121-1131.
- [73] Rallu F., Gruss A., Ehrlich S. D., Maguin E., (2000), "Acid-and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals", *Molecular Microbiology*, 35 (3), 517-528.
- [74] Vido K., Diemer H., Van Dorsselaer A., Leize E., Juillard V., Gruss A., Gaudu P., (2005), "Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*", *Journal of Bacteriology*, 187 (2), 601-610.
- [75] Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J.-J., Le Loir Y., Oliveira S. C., Langella P., Azevedo V., (2003), "Oxidative stress in *Lactococcus lactis*", *Genetics and Molecular Research*, 2 (4), 348-359.
- [76] Anderson M. E., (1998), "Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation", *Chemico-biological Interactions*, 111, 1-14.
- [77] Zhang J., Fu R.-Y., Hugenholtz J., Li Y., Chen J., (2007), "Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress", *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16), 5268-5275.
- [78] Zhang Y., Zhang Y., Zhu Y., Mao S., Li Y., (2010), "Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress", *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (10), 3177-3186.
- [79] Olek R. A., Antosiewicz J., Popinigis J., Gabbianelli R., Fedeli D., Falcioni G., (2005), "Pyruvate but not lactate prevents NADH-induced myoglobin oxidation", *Free Radical Biology and Medicine*, 38 (11), 1484-1490.
- [80] Pedersen M. B., Garrigues C., Tophile K., Brun C., Vido K., Bennedsen M., Møllgaard H., Gaudu P., Gruss A., (2008), "Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon", *Journal of Bacteriology*, 190 (14), 4903-4911.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Girgin Ersoy, 1986 yılında Ankara’da doğdu. Lisans eğitimini 2008 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamlayıp, 2010 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. Yüksek lisans eğitimini Prof. Dr. Yavuz SEZEN ve Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında 2013 yılında tamamladı. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında, Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında doktora eğitimine başladı. 2010-2021 yılları arasında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Girgin Ersoy Z., Kayıhan Z., Tunca S., (2020), “Higher nisin yield is reached with glutathione and pyruvate compared to haem in *Lactococcus lactis* N8”, Brazilian Journal of Microbiology, 51, 1247–1257.