

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus subtilis* GNTR AİLESİNE AİT LUTR TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜNÜN DOĞRUDAN KONTROLÜ ALTINDAKİ GENLERİN
CHIP VE EMSA YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Murat Kemal AVCI

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı

HAZİRAN 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus subtilis* GNTR AİLESİNE AİT LUTR TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜNÜN DOĞRUDAN KONTROLÜ ALTINDAKİ GENLERİN
CHIP VE EMSA YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Murat Kemal AVCI
(521092068)**

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

HAZİRAN 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **521092068** numaralı Doktora Öğrencisi **Murat Kemal AVCI**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Bacillus subtilis* GNTR AİLESİNE AİT **LutR** TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN DOĞRUDAN KONTROLÜ ALTINDAKİ GENLERİN CHIP VE EMSA YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Nevin GÜL KARAGÜLER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK
Gebze Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi : 08 Mayıs 2015
Savunma Tarihi : 12 Haziran 2015

*Sevgili Dedem (Rahmetli) Ahmet AVCI'ya,
Annem Medine AVCI, Babam Mürsel AVCI ve
Eşim Safiye AVCI'ya*

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın başlamasında ve tamamlanmasında maddi ve manevi desteklerinden dolayı birçok değerli şahsa ve kuruma teşekkürü bir borç bilirim. Bunların başında ilk olarak, laboratuvarına beni kabul eden, tezimin oluşmasında ve başarıyla tamamlanmasında her türlü desteği sunan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ'a en derin duygularıyla teşekkür ederim.

İlk deneylerimi beraber yaptığımız Hüseyin TAYRAN'a, DNA dizi analiz yöntemlerini öğrenmemde yardımcı olan Yeliz YÜCEL-ÖZ'e, EMSA deneyimlerini paylaşan Seval MUTLU'ya, her türlü konuda yardımını ve tecrübelerini esirgemeyen Öykü İRİGÜL-SÖNMEZ'e, laboratuvarın her türlü yükünü sırtlanarak destek olan Ebru T. KÖROĞLU'na, Değerli Büşra ÖZTÜRK'e, laboratuvarımızın hem neşe hem de motivasyon ikilisi Bilal TETİK ve Betim KARAHODA'ya, Soner TORUN, Ülkü, Ceren, Ergi TERZİOĞLU ve tez metnimin düzeltmelerinde yardımlarından dolayı Erdem TEZCAN ve Mevlüt ASLAN'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Ayrıca doktora çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Türkiye Milli Kültür VAKFI'na (TMKV), İlim Yayma Cemiyeti'ne (İYEM), Türk Eğitim Vakfı'na (TEV), Artvinliler Vakfına ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak lisans ve yüksek lisans yıllarımdan manevi bağlarımızı koparmadığımız değerli hocalarım Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e, Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN'e ve Prof. Dr. Filiz GÜREL'e de doktora sürecimde sağladıkları moral ve motivasyon için çok teşekkür ederim. Biyoinformatik analizlerdeki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Bülent BALTA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doktora sürecimi başarıyla tamamlamamı büyük bir heyecanla bekleme sabrı gösteren maddi ve manevi desteklerini bir an olsun eksik etmeyen Annem Medine AVCI ve Babam Mürsel AVCI'ya, Ablalarım, Elif ÇELİK ve Gülhan TEKİN'e, eniştelерim Turan ÇELİK ve Uğur TEKİN'e, Kayınpederim İrfan DORUK ve Kayınvalidem Hatice DORUK'a ve son değerli eşim Safiye AVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2015

Murat Kemal AVCI
Araştırma Görevlisi
Moleküler Biyolog

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxi
SUMMARY.....	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	1
1.1.1 <i>Bacillus subtilis</i> 'in genetik özellikleri	3
1.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> 168 ve <i>Bacillus subtilis</i> PY79 suşlarının genel özellikleri.....	4
1.2 <i>Bacillus subtilis</i> Genlerinin Global Regülatörlerle Düzenlenmesi: Quorum Sensing Mekanizması.....	6
1.3 GntR-Tip Regülatör Protein Ailesinin Genel Özellikleri.....	13
1.4 GntR-tipi Regülatör Protein LutR'ın Genel Özellikleri.....	21
1.5 SinR Proteininin Genel Özellikleri ve LutR Proteinini ile Regülasyon Açısından İlişkisi	25
1.6 DNA-Protein Etkileşimlerinin Önemi ve Analiz Yöntemleri	27
1.6.1 Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yönteminin genel özellikleri	28
1.6.2 EMSA yönteminin (Electrophoretic Mobility Shift Assay) genel özellikleri.....	31
1.7 Tezin Amacı	32
2. MATERYAL VE METODLAR.....	35
2.1 Materyaller.....	35
2.1.1 Bakteri türleri ve plasmidler	35
2.1.2 DNA and protein belirteçleri (Marker'lar)	36
2.1.3 Laboratuvar ekipmanları.....	36
2.1.4 Bakteri suşlarının üretimi ve muhafazası.....	36
2.1.5 pGEMT-Easy klonlama vektörü	36
2.1.6 pDRIVE klonlama vektörü	37
2.1.7 pQE60 ekspresyon vektörü.....	38
2.1.8 <i>In silico</i> analiz araçları.....	39
2.2 Metodlar	40
2.2.1 Plazmid DNA izolasyonu	40
2.2.2 Kromozomal DNA izolasyonu.....	40
2.2.3 RNA izolasyonu	41
2.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	42
2.2.5 DNA dizi analizi için PCR yöntemi.....	44
2.2.6 PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyonu	45

2.2.7 Agaroz jel elektroforezi.....	46
2.2.8 PZR saflaştırma.....	47
2.2.9 Gel ekstraksiyon yöntemi.....	47
2.2.10 PCR ürünlerinin pGEMT-Easy vektörüne ligasyonu	48
2.2.11 PCR ürünlerinin pDRIVE vektörüne ligasyonu	48
2.2.12 Restriksiyon enzim kesimi.....	49
2.2.13 Transformasyon	49
2.2.13.1 Elektrokompotent <i>E. coli</i> Top10F' hücrelerinin hazırlanışı.....	49
2.2.13.2 Elektrokompotent <i>E.coli</i> Top10F' hücrelerinin transformasyonu	50
2.2.13.3 Kimyasal (CaCl ₂) kompetent <i>E.coli</i> DH5α hücrelerinin hazırlanması	50
2.2.13.4 <i>E.coli</i> DH5α CaCl ₂ kompetent hücrelerin transformasyonu.....	51
2.2.14 Protein izolasyonu ve analizi	51
2.2.14.1 Protein izolasyonu için büyük ölçekli IPTG indüksiyonu	52
2.2.14.2 Ni-NTA-Resin protein saflaştırma sistemi	52
2.2.14.3 Kantitatif protein analizi: Bradford Assay.....	53
2.2.14.4 Kalitatif protein analizi: SDS-PAGE.....	53
2.2.15 Kromatin İmmünopresipitasyon Yöntemi [Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP)].....	54
2.2.15.1 ChIP deneylerinin optimizasyonu	54
i. DNA'nın mekanik parçalanma şartlarının belirlenmesi.....	54
ii. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	55
iii. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	55
iv. <i>In vitro</i> ChIP reaksiyon içeriğinin belirlenmesi.....	55
v. ChIP-DNA izolasyonunda kullanılacak taşıyıcı polimerin hazırlanması.....	56
2.2.15.2 ChIP analizinin uygulanması	56
2.2.16 EMSA Yöntemi (Electrophoretic Mobility Shift Assay = Elektro Hareketlilik Kayma Deneyi)	59
2.2.17 Real-Time Quantitative-PCR (RT-qPCR) analizi.....	60
2.2.17.1 Bakteri üreme eğrilerinin belirlenmesi	60
2.2.17.2 RT-qPCR yöntemi	61
2.2.18 <i>In silico</i> analiz araçları	62
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	65
3.1 Protein Örneklerinin İzolasyonu.....	65
3.2 ChIP Prosedürünün Optimizasyonu	66
3.3 ChIP Analizleri.....	68
3.4 <i>yuxO</i> geninin EMSA Analizi.....	83
3.5 <i>yuxO</i> geninin RT-qPCR analizi	86
3.6 LutR'in doğrudan kontrolü altında olabilecek <i>lrpB</i> , <i>yodT</i> , <i>rpsP</i> , <i>yutK</i> , <i>nasA</i> , <i>yvsG</i> , <i>ytsD</i> ve <i>yvnB</i> aday genlerinin EMSA analizleri	89
3.6.1 LutR ve SinR proteinlerinin <i>lrpB</i> geni üzerindeki etkisi.....	89
3.6.2 LutR ve SinR proteinlerinin <i>nasA</i> geni üzerindeki etkisi.....	93
3.6.3 LutR ve SinR proteinlerinin <i>rpsP</i> geni üzerindeki etkisi	96
3.6.4 LutR ve SinR proteinlerinin <i>yvsG</i> geni üzerindeki etkisi.....	100
3.6.5 LutR ve SinR proteinlerinin <i>ytsD</i> geni üzerindeki etkisi	103
3.6.6 LutR ve SinR proteinlerinin <i>yodT</i> geni üzerindeki etkisi.....	106
3.6.7 LutR ve SinR proteinlerinin <i>yvnB</i> geni üzerindeki etkisi.....	109
3.6.8 LutR ve SinR proteinlerinin <i>yutK</i> geni üzerindeki etkisi	111

3.7 LutR Proteinin <i>in silico</i> Analizi	116
3.7.1 Farklı bakteri türlerine ait 30 LutR proteinin <i>in silico</i> analizi	116
3.7.2 <i>Bacillus subtilis</i> 168 LutR transkripsiyon faktörünün iyi bilinen HTH-tip transkripsiyon faktörleri ile karşılaştırmalı <i>in silico</i> analizi	126
3.7.2.1 Protein genel yapısındaki anahtar residülerin analizi	129
3.7.2.2 β -zinciri-1 analizi.....	133
3.7.2.3 α -helix-2 segmentinin analizi	136
3.7.2.4 HTH motifinin “Döngü (Turn)” kısmının analizi.....	137
3.7.2.5 α -helix-3 segmentinin analizi	138
3.7.2.6 α -helix-4 ve α -helix-5 segmentlerinin analizi	141
3.7.3 LutR proteininin DNA tanıma özellikleri	142
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	147
KAYNAKLAR.....	151
EKLER.....	179
ÖZGEÇMİŞ	199

KISALTMALAR

EMSA	: Elektroforetik Mobilite Farklılık Deneyi (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
ChIP	: Kromatin immüno presipitasyon Deneyi (Chromatin immunoprecipitation Assay)
CDD	: Korunmuş Domain Veri bankası (Conserved Domain Database)
EBD	: Efektör bağlanma domaini (Effector Bindig Domain)
E-b/O	: EBD ile aynı. Efektör bağlanma domaini
DBD	: DNA bağlanma domaini (DNA Binding Domain)
RT-QPCR	: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time Quantitative-Polymerase Chain Reaction)
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
NRPS	: Ribozomal olmayan
PCP	: Tialasyon ve peptit taşıma proteini (Thiolation and Peptide Carrier Protein)
RND	: Rezistans, nodülasyon ve hücre bölünmesi
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi (Muti-cloning Site)
GSBMM	: Minimal besiyeri (Glucose Salt-Based Minimal Medium)
PCR = PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaktion)
LB-Amp	: Luria Bertani Besi yeri
İnm	: indüklenmemiş Örnek (= Uninduced Sample, UnI)
İnd	: indüklenmiş örnek (= induced Sample, Ind)
Shr	: Kırılmış DNA (Shearing DNA)
BSA	: Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumine)
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
M	: Molar
Tdn	: Toplam DNA. Herhangi bir izolasyon işlemi uygulanmamış örnek.
PATA-ChIP-DNAs	: Poli-A eklenmiş ChIP-DNA parçaları (Poly-A Added ChIP DNAs)

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	: Bakteri suşları ve genel özellikleri.....	35
Çizelge 2.2	: Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin listesi.	42
Çizelge 2.3	: Taq DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon karışımı.....	42
Çizelge 2.4	: Pfu DNA polimeraz için PCR reaksiyon karışımı.....	43
Çizelge 2.5	: PZR reaksiyon şartları.....	43
Çizelge 2.6	: Dizileme PCR reaksiyon bileşenleri.....	44
Çizelge 2.7	: Dizileme PCR reaksiyon şartları.....	44
Çizelge 2.8	: Taq DNA polimeraz ile PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyonu.....	46
Çizelge 2.9	: PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyon şartları.....	46
Çizelge 2.10	: Farklı örnekler için agaroz jel konsantrasyonları.....	46
Çizelge 2.11	: pGEM-T Easy vektörü ligasyon reaksiyon içeriği.....	48
Çizelge 2.12	: pDRIVE vektörü ligasyon reaksiyon içeriği.....	49
Çizelge 2.13	: Restriksiyon enzim kesimi reaksiyon içeriği.....	49
Çizelge 2.14	: <i>In vitro</i> ChIP reaksiyon içeriği.....	56
Çizelge 2.15	: Poli-A kuyruğu ekleme reaksiyon içeriği.....	58
Çizelge 2.16	: EMSA reaksiyon içeriği.....	60
Çizelge 3.1	: ChIP reaksiyon içeriği.....	69
Çizelge 3.2	: ChIP-DNA-Protein komplekslerinin Ni-NTA-Resin sistemiyle izole edilirken alınan örnekler.....	71
Çizelge 3.3	: PolyA kuyruğu ekleme reaksiyonu protokolü.....	74
Çizelge 3.4	: Kompetens gelişimine bağlı olarak LutR proteininin <i>yuxO</i> (<i>comB</i>) geni üzerindeki düzenleyici etkisi.....	89
Çizelge 3.5	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin erken durağan fazında, nitrojen metabolizmasıyla ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi.....	95
Çizelge 3.6	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin erken durağan fazında, protein translokasyonu ve katlanması ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi.....	98
Çizelge 3.7	: <i>B. subtilis</i> 'de sporilasyonun gecikmesi ve kanibalizm ile ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi.....	105
Çizelge 3.8	: <i>B. subtilis</i> 'de yağ asidi ve lipit metabolizması ile ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi.....	107
Çizelge 3.9	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin logaritmik fazında LutR tarafından pozitif olarak düzenlenen transkripsiyon birimleri.....	107
Çizelge 3.10	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin logaritmik fazında Basilislin tarafından pozitif olarak düzenlenen lipit metabolizması ile ilgili genler.....	108
Çizelge 3.11	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen degradatif enzim üretimiyle ilgili genler.....	110
Çizelge 3.12	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin logaritmik fazında LutR tarafından pozitif düzenlenen genlerden biri.....	110

Çizelge 3.13	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen karbonhidrat metabolizması ilgili genler.....	114
Çizelge 3.14	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen nitrojen metabolizması ilgili genler	115
Çizelge 3.15	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin logaritmik fazında LutR tarafından negatif düzenlenen nitrojen metabolizması ilgili genler.....	115
Çizelge 3.16	: <i>B. subtilis</i> 'de üremenin logaritmik fazında nitrojen metabolizması ilgili genler üzerinde Basilisinin düzenleyici etkisi.....	116
Çizelge 3.17	: Tez kapsamında NCBI veri tabanından seçilen, LutR proteinine sahip çeşitli bakteri türlerinin listesi.	117
Çizelge 3.18	: LutR dizilerinin Expasy's ProtParam araçlarıyla hesaplanan parameterleri.	120
Çizelge 3.19	: Bazı bakteri türlerindeki LutR protein dizilerinin fonksiyonel analizi (skor > 0.8).....	125
Çizelge 3.20	: En muhtemel amino asit dizi eşlemeleriyle LutR protein dizilerinde en çok gözlenen motifler.	126
Çizelge 3.21	: <i>E. coli</i> FadR, <i>B. subtilis</i> LutR ve <i>B. subtilis</i> YvoA proteinleri arasında clustalW dizi hizalama analizlerinde elde edilen benzerlik oranları.....	128
Çizelge 3.22	: FadR ve YvoA proteinlerinde α -heliks segmentleri arasındaki açılar(°)	144
Çizelge G.1	: Laboratuvar ekipmanları.....	144

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: Zeigler (2011)'e göre <i>B. subtilis</i> türüne ait 12 suşun filogenisi.....	5
Şekil 1.2	: <i>B. subtilis</i> 'te quorum sensing mekanizması ve ekstraselüler sinyal peptitlerle genlerin düzenlenme mekanizması.	8
Şekil 1.3	: <i>B. subtilis</i> 'te <i>comK</i> gen ifadesinin regülasyonu ve ComK aktivitesinin ClpC/ClpP/MecA sistemiyle kontrolü.....	10
Şekil 1.4	: <i>B. subtilis</i> 'te fosforilasyona bağlı sinyal transdüksiyon (phosphorelay) mekanizması	11
Şekil 1.5	: GntR familyasına ait alt grupları gösteren filogenetik ağaç yapısı	17
Şekil 1.6	: GntR familyasının yapısal analizine dayalı N-terminal domainlerinin dizi hizalamaları.....	18
Şekil 1.7	: <i>B. subtilis</i> genomunda <i>yvfI</i> (<i>lutR</i>) geninin pozisyonu.....	22
Şekil 1.8	: <i>lutR</i> geninde insersiyon mutasyonu analizleri ve basilisin defektif mutantların keşfi.....	23
Şekil 1.9	: <i>lutABC</i> (eski adıyla <i>yvfV-yvfW-yvbY</i>) operonunu içeren kromozomal bölge.....	23
Şekil 1.10	: Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yönteminin genel akış şeması.	30
Şekil 1.11	: EMSA yönteminin temel prensibi	31
Şekil 2.1	: pGEM-T Easy klonlama vektörünün genetik haritası.	37
Şekil 2.2	: pDrive klonlama vektörünün genetik haritası.	38
Şekil 2.3	: pQE60 gen ifade vektörünün genetik haritası ve C-terminal 6xHis kuyruk yapısı.....	39
Şekil 3.1	: <i>B. subtilis</i> PY79 kromozomal DNA'sının %1'lik agaroz jel görüntüsü.	65
Şekil 3.2	: LutR proteinine ait SDS-PAGE analizi.	66
Şekil 3.3	: SinR proteinine ait SDS-PAGE analizi	66
Şekil 3.4	: Sonikasyon optimizasyon sürecinde dinlenme aralıklarında alınan örneklerin agaroz jeldeki görüntüleri	67
Şekil 3.5	: ChIP deneylerinde kullanılması gereken başlangıç DNA konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan agaroz jel analizi	68
Şekil 3.6	: ChIP deneyinin temel basamakları.....	69
Şekil 3.7	: PY79 suşundan izole edilen kromozomal DNA'nın sonikasyon öncesi ve sonrası profillerinin agaroz jel analizi.....	70
Şekil 3.8	: 6xHis kuyruğunun yapısındaki His residüleri (imidazole halkaları) ile Ni-NTA-Resin matrisinin etkileşimi.....	71
Şekil 3.9	: ChIP-DNA-protein komplekslerinin Ni-NTA-Resin sistemiyle izolasyonundan alınan örneklerde ölçülen DNA miktarları..	71
Şekil 3.10	: Ni-NTA-Resin sistemiyle saflaştırılan ChIP-DNA örneklerinin agaroz jel analizi.....	72

Şekil 3.11 : Sağlam DNA'nın sonikasyonla parçalanması sonucu elde edilecek DNA parçalarının 3' ve 5' uçlarında görülebilecek muhtemel yapılar.	73
Şekil 3.12 : ChIP-DNA transformasyonundan seçilen kolonilerden izole edilen plasmidlerin agaroz jel analizi.	74
Şekil 3.13 : Transformasyon sonrası taramalarda belirlenen, ChIP-DNA insertleri.	75
Şekil 3.14 : pGEMT-easy klonlama vektöründe klonlama bölgesine ait dizi.	76
Şekil 3.15 : 4-5_1 kolonisine ait dizi analizinde elde edilen sonuçlarının Finch TV programında analizi.	77
Şekil 3.16 : 4-5_1 kolonisine ait belirlenen klonlanmış parça DNA dizisine, <i>comA</i> geni üzerinde karşılık gelen bölgenin <i>B. subtilis</i> genom haritası üzerinde gösterimi.	78
Şekil 3.17 : HT27 kolonisine ait belirlenen klonlanmış parça DNA dizi.	79
Şekil 3.18 : <i>comA</i> ve <i>yuxO</i> (<i>comAB</i> , <i>srfB</i>) gen dizilerinin <i>B. subtilis</i> 'e ait veri tabanında(http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/genome.cgi) incelenmesi.	80
Şekil 3.19 : Weinrauch ve ark. (1989)'nın <i>B. subtilis</i> 'te <i>comA</i> ve <i>comB</i> genlerinin açık okuma çerçevelerini (ORF) belirlemek için yaptıkları çalışmada belirtilen gen dizileri ile bu tez çalışmasında elde edilen klonlanmış ChIP-DNA parçasına ait dizinin karşılaştırılması.	81
Şekil 3.20 : İnsert DNA parçasında <i>yuxO</i> promotoru için tasarlanan primer bölgelerinin gösterimi.	84
Şekil 3.21 : <i>yuxO</i> geninde (-340.)-(+41.) nükleotitler arasındaki 351 bç'lik (351 bç) promotor bölgesine ait PZR ürününün agaroz jel görüntüsü.	85
Şekil 3.22 : Tez çalışmasında yapılan EMSA analizlerinin pozitif ve negatif kontrolleri.	85
Şekil 3.23 : LutR-SinR regülatör proteinlerinin <i>yuxO</i> geniyle EMSA analizi.	85
Şekil 3.24 : <i>sin</i> (●), <i>comA</i> (○) ve <i>comB</i> (<i>yuxO</i>) (■) mutasyonlarının <i>lacZ</i> geni ile <i>yuxO</i> (<i>comB</i>) promotor bölgesinin transkripsiyonel füzyonuyla elde edilen mutant suşta β-galaktosidaz ifadesi üzerindeki epistatik etki.	87
Şekil 3.25 : <i>B. subtilis</i> PY79 yabani tip ve TEK1 mutant suşlarının üreme eğrileri.	88
Şekil 3.26 : THF tarafından taşınan C1 ünitelerinin orjini, dönüşümü ve biyosentez metabolizmasında <i>glyA</i> geninin rolü.	91
Şekil 3.27 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>lrpB</i> promotoru ile EMSA analizi.	92
Şekil 3.28 : <i>B. subtilis</i> 'te sporilasyonun düzenlenme mekanizması.	93
Şekil 3.29 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>nasA</i> promotoru ile EMSA analizi.	95
Şekil 3.30 : <i>B. subtilis</i> genomundaki <i>rpsP</i> geninin konumu. Subtilist veri tabanından alınmıştır.	97
Şekil 3.31: LutR ve SinR proteinlerinin <i>rpsP</i> promotoru ile EMSA analizi.	97
Şekil 3.32 : <i>B. subtilis</i> 'te <i>ffh-rpsP</i> genlerinin organizasyonu. <i>rpsP</i> geni, S16 ribozomal proteinini kodlamaktadır.	98
Şekil 3.33 : <i>B. subtilis</i> genomunda <i>yvsG</i> geninin konumu.	101
Şekil 3.34 : <i>B. subtilis</i> 'e ait <i>recA</i> , <i>dinC</i> ve <i>dinR</i> genlerinin promotor bölgelerinde bulunan "LexA (DinR) kutuları"	102
Şekil 3.35 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>yvsG</i> promotoru ile EMSA analizi.	103

Şekil 3.36 : <i>B. subtilis</i> 'te hücre duvarı stres cevabının düzenlenme ağı.	104
Şekil 3.37 : <i>B. subtilis</i> 'te <i>yts</i> gen kümesinin (<i>bceRS</i> ve <i>bceAB</i>) organizasyonu	105
Şekil 3.38 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>ytsD</i> promotoru ile EMSA analizi.	106
Şekil 3.39 : <i>B. subtilis</i> genomunda <i>yodT</i> geninin konumu.	107
Şekil 3.40 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>yodT</i> promotoru ile EMSA analizi.	108
Şekil 3.41 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>yvnB</i> promotoru ile EMSA analizi.	110
Şekil 3.42 : <i>yvnB</i> (BSU35040, <i>B. subtilis</i> , 1289 aa) ve <i>bpr</i> (BSU15300, bacillopeptidase F, <i>B. subtilis</i> , 1433 aa) genleri arasında dizi hizalama analizi	111
Şekil 3.43 : LutR ve SinR proteinlerinin <i>yutK</i> promotoru ile EMSA analizi.	112
Şekil 3.44 : <i>B. subtilis</i> 'te <i>yutK</i> geniyle benzer olan diğer genler: <i>nupC</i> , <i>nupG</i> , <i>yhaU</i>	113
Şekil 3.45 : <i>B. subtilis</i> 168 suşuna ait LutR proteininin 1-70. Amino asitleri arasına karşılık gelen amino asit dizilerinin çoklu hizalamaları.	118
Şekil 3.46 : LutR protein dizilerinde 20 amino asidin bulunma yüzdeleri.	121
Şekil 3.47 : 30 LutR protein dizisine ait filogeni analizi.	124
Şekil 3.48 : 30 bakteri türüne ait LutR proteinlerinde MEME ve MAST analizleriyle elde edilen korunmuş protein motiflerinin kombine blok diyagramları.	127
Şekil 3.49 : <i>E. coli</i> FadR protein yapısının şerit diyagramı.	129
Şekil 3.50 : <i>B. subtilis</i> YvoA protein yapısının şerit gösterimi.	129
Şekil 3.51 : <i>B. subtilis</i> LutR, <i>B. subtilis</i> YvoA (PDB code: 1WV0) ve <i>E. coli</i> FadR (PDB code: 1HW2) proteinlerinin DNA bağlanma domainlerinin dizi hizalaması.	130
Şekil 3.52 : YvoA ve FadR proteinlerinin yapısal olarak hizalanmaları.	131
Şekil 3.53 : FadR ve YvoA proteinlerinin N-terminal bölgelerinde korunmuş Glisin rezidüleri.	132
Şekil 3.54 : FadR (P27-G28) ve YvoA (P30-D31) proteinlerindeki glisin-prolin komşuluklarının karşılaştırılması.	132
Şekil 3.55 : YvoA ve FadR protein dizilerindeki ilk üç rezidünün karşılaştırılması.	134
Şekil 3.56 : FadR-R24 ve YvoA-E27 rezidülerinin karşılaştırılması.	134
Şekil 3.57 : FadR proteininde P26-T29 rezidüleri ile YvoA proteininde Q29-M32 rezidülerinin karşılaştırılması.	135
Şekil 3.58 : FadR ve YvoA proteinlerinde β -zincir-1 yapılarında bulunan bazı rezidülerin proteinin iç dış kısmına doğru yönelme durumlarının karşılaştırılması.	135
Şekil 3.59 : FadR (yeşil) and YvoA (turkuaz) proteinlerinde α -helix-2 yapısındaki bazı rezidülerin karşılaştırılması.	136
Şekil 3.60 : FadR ve YvoA proteinlerinin α -helix-2 yapılarında bulunan bazı rezidülerin karşılaştırılması.	137
Şekil 3.61 : FadR ve YvoA proteinlerindeki HTH motifinde üç rezidüden oluşan "döngü (turn)" segmentinin yapısal hizalanması.	138
Şekil 3.62 : FadR ve YvoA proteinlerinde α -helix-3 segmentinin yapısal hizalaması.	139
Şekil 3.63 : FadR proteininde dimerizasyon bölgesinin şerit gösterimi ve bu bölgenin FadR ve YvoA proteinleri arasında yapısal hizalanması.	140
Şekil 3.64 : FadR proteininin iki domaini arasında geçiş bölgesinde yer alan α -heliks-5 segmenti.	141

Şekil 3.65 : FadR (A,B ve C) ve YvoA (D, E ve G) proteinlerinde α -heliks segmentleri arasındaki açılar.....	144
Şekil D.1 : Tez kapsamında kullanılan DNA belirteçleri.....	194
Şekil D.2 : Tez kapsamında kullanılan protein belirteci	194

***Bacillus subtilis*'de GNTR AİLESİNE AİT LUTR TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜNÜN DOĞRUDAN KONTROLÜ ALTINDAKİ GENLERİN CHIP
VE EMSA YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ**

ÖZET

LutR transkripsiyon faktörü GntR familyasının bir üyesi olup *B. subtilis*'te *lutR* geni tarafından kodlanan global düzenleyici bir proteindir. *lutR* geni ilk keşfedildiğinde “*yvfT*” olarak adlandırılmış fakat laktat kullanımında görevli olduğu belirlendiğinde “*lutR*” (Lactate utilisation gene) adıyla tekrar adlandırılmıştır. *B. subtilis* LutR proteini, *E. coli* FadR regulatör proteini ile homologdur. LutR protein dizisi, GntR süperfamilyasının FadR alt familyasındaki farklı türlere ait ortologlarıyla da önemli homolojiye sahiptir. Ayrıca FadR benzeri proteinler birçok metabolik yolun regülasyonunda rol alırlar.

GntR familyası DNA'ya bağlanmak için Heliks-Turn-Heliks (HTH) motifi kullanan regulator proteinlerden oluşan bir HTH-tip protein süperfamilyasıdır. Farklı çalışmalarda CDD analizlerinde, GntR familyasında oldukça yaygın olan “FadR C-terminal ligand bağlanma bölgesi”nin, LutR C-terminalinde de yer aldığı tespit edilmiştir (PFAM 07729). Buna ek olarak LutR N-terminalinde bulunan 44 amino asitlik bölge ile GntR wHTH domain arasında önemli bir benzerlik olduğu belirlenmiştir (PF00392). GntR familyasına ait üyeler N-terminalde HTH motifi içeren bir DNA bağlanma domaini (DBD) ve C-terminalinde bir efektör bağlanma veya oligomerizasyon (EBD) domaininden oluşurlar. Bu proteinler DNA'ya bağlanmak için kullandıkları heliks-turn-heliks (HTH) motifi ile karakterize edilirler. DNA-bağlanma domaininin dışındaki bölgeler çok farklılık gösterirken, küçük bir β -tabaka ile beraber 3-heliksli bir çekirdekte oluşan DNA-bağlanma bölgesi bütün GntR familyasında oldukça iyi korunmuştur.

Bacillus genusu üyeleri arasında antibiyotik üreten ana suş *B. subtilis*'tir. Yaklaşık 30 kadar antibiyotik üreten *B. subtilis*'e ait antibiyotikler oldukça farklı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bunlardan bazıları gram pozitif, bazıları gram negatif mikroorganizmalara etki ederken, bazıları daha geniş spektrumda etkilidir. *B. subtilis* genomunda yaklaşık 350 kb'lık bir bölge antibiyotikleri kodlayan genleri içermekte olup, toplam genomun %4-5'ini oluşturmaktadır. Yapısal olarak oldukça değişken olan *B. subtilis* antibiyotiklerinin en önemli özelliklerinden biri fonksiyonel açıdan sadece antimikrobiyal ajan olarak görev yapmayıp, ayrıca hücre morfolojisi ve fizyolojisinin düzenlenmesinde de etkili olmalarıdır.

Basilisin [L-alanine-(2,3-epoxycyclohexanone-4)-L-alanine] non-ribozomal yolla sentezlenen dipeptit yapıda bir antibiyotiktir. *B. subtilis*'te basilisin biyosentezinden polisistronik bir operon olan *bacABCDEF* (eski adı *ywfBCDEFG*) ve monosistronik bir gen olan *ywfH* sorumludur. Basilisin, N-terminalde L-alanin ve C-terminalde non-proteinojenik L-antikapsin rezidülerinden oluşur. Antibiyotik etkisinin görülmesi için L-antikapsin rezidüsünün serbest kalması gerekir. Bu, ancak basilisin bir peptidaz tarafından proteoliz edildiğinde gerçekleşir. Basilisin bir peptidaza

maruz kalmadan önce bir peptit permeaz tarafından sitosöle transfer edilir ve L-antikapsin burada bir peptidaz tarafından serbest bırakılır. Dipeptit antibiyotik basilisin biyosentezi; *B. subtilis*'de global düzenleyiciler olarak görev yapan ComA, SpoOA, AbrB, ScoC, ve CodY proteinlerinin kontrolü altındadır. Bu kompleks regülasyon ağına, GntR tip transkripsiyon faktörü LutR'ında katıldığı belirlenmiştir. Akabinde L-laktat kullanımından sorumlu *lutABC* (eski adı *yvfV-yvfW-yvbY*) operonunun da LutR'ın kontrolü altında olduğu bulunmuştur. Son olarak, grubumuz tarafından yürütülen çalışmalar neticesinde; LutR ın, L-laktak kullanımı ve basilisin biyosentezinin yanı sıra, karbonhidrat kullanımı ve transportu, nitrojen metabolizması, fosfat alımı, yağ asidi ve fosfolipit biyosentezi, protein sentezi ve translokasyonu, hücre duvarı metabolizması, enerji üretimi, mobil genetik element transferi, fajla ilgili genlerin indüksiyonu, sporilasyon, sporilasyonun gecikmesi ve kanibalizm ve biyofilm oluşumu gibi pek çok farklı fizyolojik ve metobolik süreçte görev yapan birbirinden bağımsız birden fazla geni/operonu kontrol eden pleiotropik bir global regülatör olduğu bulunmuştur.

N-terminalinde helix-turn-helix motifi içeren diğer bir protein SinR'dır. SinR proteini *B. subtilis*'te geç üreme sürecinde kompetans ve motilite gelişimini aktive ederken sporilasyon ve ekzoproteaz üretimini inhibe ederek çift yönlü düzenleyici rol sergilemektedir. SinR, Spo0A gibi pleiotropik bir düzenleyici anahtar gibi hareket eder ve adaptif cevapların gelişmesini sağlayarak gereksiz olan potansiyel diğer cevapları engeller. *lutABC* operonu, hem LutR hem de SinR proteininin kontrolü altındadır. LutR ve SinR proteinleri birlikte hareket ederek *lutABC* operonunu baskılamaktadırlar. Biyofilm olarak bilinen uzun hücre zincirlerini bir arada tutan ekstrasellüler matriksten sorumlu *epsA-O* ve *yqxM-sipW-tasA* operonlarına ait 18 genin de SinR tarafından baskılandığı bilinmektedir. Bu tez çalışmasının temel amacı LutR transkripsiyon faktörünün, *B. subtilis* genomunda, doğrudan bağlanarak düzenlediği genlerin belirlenmesidir. Bu amaçla *E. coli* pQE60::*lutR* suşunda heterolok olarak üretilen ve saflaştırılan LutR proteini ile *B. subtilis* PY79 suşuna ait kromozomal DNA kullanılarak, amacımıza göre modifiye ettiğimiz *in vitro* kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yöntemi uygulanmıştır. Sonrasında, LutR proteininin, uygulanan modifiye-ChIP yöntemi ile yakalanan aday genlere doğrudan bağlandığını doğrulamak için EMSA yöntemi kullanılmıştır. *In vitro* olarak doğrulanan söz konusu etkileşimlerin, gen ifadesi üzerinde pozitif veya negatif yöndeki etkisini belirlemek amacıyla da, ayrıca RT-qPCR yönteminden yararlanılmıştır. ChIP yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmada LutR proteininin doğrudan kontrol ettiği genlerden *yuxO* (*comB*, *comAB*) geni belirlenmiştir.

Bunlara ilaveten, Dr. Öykü İrigül-Sönmez'in doktora tez (2012) çalışması kapsamında *lutR* geninin aşırı ifade edildiği, PY79 (*amyE::P_{spac}::lutR* *lutR::Tn10::spc*) suşunda gerçekleştirilen mikroarray analizleri sonucunda, *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerinin, LutR'ın direk kontrolü altında olabileceği belirlenmiştir. Bu bulguların kesinlik kazanması için bu tez kapsamında uygulanan EMSA analiz sonuçları, söz konusu *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerinin, direk LutR proteini tarafından kontrol edildiğini göstermiştir.

Bunlara ek olarak, grubumuz tarafından sürdürülen daha önceki farklı araştırmaların sonuçları, SinR global regülatör proteininin, test ettiğimiz LutR'ın direk kontrolü altında bulunan tüm genlere bağlanma kapasitesinin bulunduğunu göstermiştir. Bu bilgi doğrultusunda tez kapsamında yapılan EMSA analizlerinde LutR ve SinR proteinleri birlikte kullanılarak, LutR ve SinR'ın birlikte düzenledikleri olası yeni

genlerin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan EMSA analizleri sonucunda; LutR ve SinR proteinlerinin *yuxO*, *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* gen transkripsiyon seviyelerini birlikte düzenledikleri belirlenmiştir.

Son olarak, deneysel analizlere paralel bir şekilde, karşılaştırmalı *in silico* analizler ve karakterizasyon çalışmalarıyla LutR proteinine ait biyoinformatik verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki analiz yolu takip edilmiştir. İlk analiz yolunda, çeşitli biyoinformatik araçlar yardımıyla farklı türlere ait LutR proteinlerinin fizikokimyasal, yapısal ve filogenetik özellikleri incelenmiş ve LutR'ın türler arasındaki benzerlik ve farklılıkları ortaya çıkarılmıştır. İkinci analiz yolunda ise sadece *B. subtilis* 168 suşuna ait LutR proteininin, kristallografik analizleri tamamlanmış ve yapısı iyi bilinen GntR-HTH-tip transkripsiyon faktörleri FadR ve YvoA ile PyMOL programı yardımıyla yapısal olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan ChIP yöntemi için oluşturulan prosedür, prokaryotik sistemlere yönelik olması ve antikor kullanılmaksızın uygulanması açısından metodolojik bir yenilik sunmaktadır.

DETERMINATION OF GENES UNDER THE DIRECT CONTROL OF GNTR-TYPE TRANSCRIPTIONAL FACTOR LUTR IN *Bacillus subtilis* PY79 BY ChIP AND EMSA METHODS

SUMMARY

LutR transcription factor, one of the members of GntR family, is a global regulatory protein encoded by *lutR* gene in *B. subtilis*. When *lutR* gene was first discovered, it was named as “*yvfI*”. But it was re-named as “*lutR*” (Lactate ut^lilisation gene), when *lutR* was found to be involved in lactate utilization. *B. subtilis* LutR protein is a homolog of *E. coli* FadR regulatory protein. The sequence of LutR protein has also a significant homology with orthologs of the different species in FadR subfamily of GntR superfamily. Additionally, FadR-like proteins are involved in the regulation of many metabolic pathways.

GntR family is the HTH-type protein superfamily consisting of regulatory proteins which contain a Helix-Turn-Helix (HTH) motif to bind to DNA. CDD analysis in different studies revealed that “FadR C-terminal ligand-binding region”, which is quite common in GntR family, also has been found in LutR C-terminal (PFAM 07729). Furthermore, it was determined that there is a significant similarity between the 44 amino acids at the LutR N-terminus and the GntR wHTH domain (PF00392). A member of GntR family contains a DNA-binding domain (DBD) with HTH motif at N-terminus and an effector-binding or oligomerization (EBD) domain at C-terminus. The DNA-binding region including a small β -strand and 3-helix core is highly conserved in all GntR family, while the other regions out of the DNA-binding site may be highly variable.

The main antibiotic producer member of *Bacillus* genus is *B. subtilis*. Approximately 30 different antibiotics are known to be produced by *B. subtilis* and most of them act against a wide range of bacteria. Approximately 350-kb region in *B. subtilis* genome includes antibiotic encoding genes and this region constitutes 4-5% of total genome. The most important feature of *B. subtilis* antibiotics they cannot only act as antimicrobial agent, but also effect the regulation of cell morphology and physiology.

Bacilysin [L-alanine-(2,3-epoxycyclohexanone-4)-L-alanine] is a dipeptide antibiotic produced by non-ribosomal pathway. A monocistronic gene *ywfH* and a polycistronic *bacABCDEF* (formerly *ywfHBCDEFG*) are responsible for bacilysin biosynthesis in *B. subtilis*. Bacilysin is composed of two amino acids; L-alanine at N-terminus and non-proteinogenic L-anticapsin at C-terminus. The antimicrobial activity of bacilysin depends on its proteolytic cleavage into L-alanine and L-anticapsin by a peptidase after its transport into the cells. Since L-anticapsin causes to lysis of bacterial or fungal cells by inhibiting activity of glucosamine synthase. Together with global regulators ComA, Spo0A, AbrB and CodY, LutR was found to participate to the regulation of bacilysin biosynthesis. On the other hand, a very recent study performed by our group indicated that LutR is a pleiotropic regulator that is involved in the regulation of a wide variety of cellular processes associated with the onset of

stationary phase, such as degradative enzyme production, antibiotic production and resistance, carbohydrate utilization and transport, transfer of mobile genetic elements, induction of phage related genes, sporulation, sporulation delay and cannibalism, and biofilm formation.

The other protein including helix-turn-helix at N-terminal is SinR. SinR protein exhibits dual regulatory role because it activates the competence and motility during late-growth periods in *B. subtilis*, but inhibits sporulation and exoprotease production. SinR acts as a pleiotropic regulatory key molecule such as Spo0A and prevent the other unnecessary potential responses by providing the development of adaptive responses.

lutABC operon was also found to be under the control of both LutR and SinR. These proteins repress *lutABC* operon acting together. It is known that 18 gene is also repressed by SinR. These genes are belonging to *epsA-O* and *yqxM-sipW-tasA* operons responsible for the extracellular matrix holding together the long cell chains known as biofilm.

Environmental conditions in microbial growth media change quickly and continuously. These sudden alterations threat to the survival of the cells. Therefore, it is an extremely critical necessity for each cell to be adapted to the environmental conditions in the fastest and most convenient way. *B. subtilis* cells regulate its metabolism according to the environmental conditions by genome-wide controlling the gene expression via quorum sensing mechanism. Quorum sensing is a mechanism, which microorganisms communicate each-other using some chemical signal molecules in the environment in order to create an adaptational behavior depending on the increasing cell population. Bacteria synthesize these molecules in cytoplasm, then secrete them out of cell and sense these small, signalling molecules that accumulate in the growth medium as cells grow to high density. Quorum sensing signal molecules can be N-acyl-homoserine lactones (AHLs) for Gram-negative bacteria, or small peptides for Gram-positive bacteria or furan derivatives for some gram positive and negative bacteria.

Bacillus subtilis is a model organism for scientific research because of it is one of the best-studied microorganisms, its genome sequencing is completed, its non-pathogenicity, easy handling, easy transformability, high growth rate, adaptive metabolism. *B. subtilis* cells are a rod-shaped, aerobic or facultative aerobic, endospore-forming bacteria. *Bacillus subtilis* is able to respond to the changes in its environment in order to survive. *B. subtilis* regulates its genes by quorum sensing mechanism to manage the optimal growth conditions. All phenotypes such as motility, chemotaxis, competence, degradative enzyme and antibiotic production, competition with the competitors, secretion of enzymes such as proteases and sporulation are controlled stringently by using quorum sensing.

In this thesis, the main aim is to determine the genes under the direct control of LutR in *B. subtilis*. For this purpose, we applied *in vitro* chromatin immunoprecipitation (ChIP) method modified according to our purpose. The LutR protein produced and purified as a recombinant protein in *E. coli* pQE60::*lutR* strain. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was also used to verify that LutR protein binds directly to the candidate genes determined by our modified-ChIP method. Additionally, RT-qPCR methods were used to determine the effects of LutR on the expression of those genes.

Furthermore, in the doctoral thesis of Öykü İrigül-Sönmez (2012), it was determined the *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* and *yvnB* genes could be under the direct control of LutR. These results obtained from microarray analysis applied with *B. subtilis* PY79 (*amyE::P_{spac}::lutR lutR::Tn10::spc*) strain which overexpresses *lutR* gene. In the present study, we used EMSA methods to gain certainty about which of those genes expressions (*lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* and *yvnB*) are affected directly by LutR protein.

Previous study of our group indicated that SinR is capable of interacting with the regulatory regions of all of the LutR-target genes tested. According to this data, it was aimed to highlight the possible new genes regulated by both LutR and SinR, EMSA analysis were performed in the presence of both regulators. The results of these EMSA analysis indicated that LutR and SinR proteins regulate the gene expressions of *yuxO*, *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* and *yvnB* genes together.

Finally, besides to experimental analysis, it was aimed to obtain bioinformatic data about LutR protein by comparative *in silico* analysis and characterization studies. For this purpose, we performed two different approaches: In first analysis, the physicochemical, structural, and phylogenetic features of LutR proteins belonging to different species were studied by several bioinformatic tools and determined the similarities and differentiations among various species. In the second analysis, structural comparative analysis of only one LutR protein belonging to *B. subtilis* 168 with well-known GntR HTH type transcription factors FadR and YvoA was accomplished by PyMOL.

As the last, the procedure developed for ChIP method in this thesis provides a methodological innovation because it is not only useful for procaryotic systems but also it can be applied without antibody usage.

1. GİRİŞ

1.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus türleri toprak, toz, su, bitki, hayvan ve insan vücudu gibi birbirinden çok farklı habitatlarda bulunabilmektedir (Lee ve ark., 2010). *Bacillus* üyeleri gram pozitif mikroorganizmalar olup habitat spektrumları oldukça geniştir. Çomak şekilli, oksijenli veya fakültatif-oksijenli solunum yapan, endospor oluşturan bakterilerdir (Olubajo ve Bacon, 2008). *Bacillus* türlerinin çoğu genel olarak patojen değildir. Ancak *B. cereus* ve *B. anthracis* gibi patojen türleri de mevcuttur (Lee ve ark., 2010). *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmalar bazı önemli özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde biyolojik gıda kontrol ajanı olarak kabul edilir. Bu özelliklerinin başında GRAS (Generally Recognized as Safe) etiketine sahip olmaları, toksisitelerinin düşük olması, biyo-bozunabilirliğin yüksek olması ve çevreye yararlı olmaları sıralanabilir (Cutting, 2010). Birçok *Bacillus* türünün bakteriyosinler, bakteriyosin benzeri maddeler ve antibakteriyal lipopettitler gibi antagonistik maddeler ürettiği bilinmektedir (Fickers ve ark., 2008). Son yıllarda gastrointestinal hastalıklardan korunma amacıyla prebiyotikler kullanılmaktadır. İnsan ve hayvan beslenme ürünlerinde önemli bir yer alan prebiyotiklerin üretiminde ise spor oluşturan bakteriler ve özellikle de *Bacillus* türlerinden yararlanılmaktadır. *Bacillus* türlerine ait birçok prebiyotik ürünün, günümüzde ticari olarak kullanılması da bu mikroorganizmaların önemini arttırmaktadır (Smirnov ve ark. 1994; Sorokulova ve ark., 1997; SCAN-2001). *Bacillus* üyelerinden en iyi bilineni *Bacillus subtilis*'tir.

B. subtilis gram pozitif bakteriler arasında genetik ve biyokimyasal özellikleri detaylı ölçüde en iyi incelenen türdür. Kemoorganotrof olması nedeniyle çok çeşitli organik maddeleri oksitleyebilmekte ve bu sayede yeterli miktarda oksijen, inorganik nitrojen, karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz veya diğer şekerlerin yer aldığı basit tuz besiyerlerinde üreyebilmektedir (Trun and Trempey, 2004; Harwood et al. 1990). *B. subtilis* üreme sürecinde hücrenin otolizine neden olan bir takım metabolik

özelliklere sahiptir. Otoliz olayı tetiklendiğinde hücre membran yapısını substrat olarak hedef alan peptidoglikan enzimlerinin üretimi artar. Peptidoglikan yıkımı arttığında ise hücre membranında osmotik basınç artmakta ve buna bağlı olarak otoliz gerçekleşmektedir (Trun and Trempy, 2004).

B. subtilis mesofilik bir mikroorganizma olup (Harwood ve Cutting, 1990) oksijenli solunum yapmaktadır. Ancak ortamda son elektron akseptörü olarak nitrat bulunması halinde oksijensiz şartlarda da yaşamını devam ettirebilir (Hardwood ve Archibald, 1990; Earl ve ark., 2008; Harwood ve Wipat, 1996; Glaser ve ark., 1995; Cruzramos ve ark., 1995; Stein ve ark., 2005). Üreme hızındaki değişimler, ortamın pH değeri, sıcaklığı ve oksijen değeri gibi faktörler *B. subtilis* hücreleri için yaşamsal etkilere yol açabilmektedir. İleri adaptasyon kabiliyeti sayesinde değişen çevresel şartlara karşı hızlı bir şekilde cevap verebilen *B. subtilis*, çevresel olumsuzlukların çeşidine, şiddetine ve süresine bağlı olarak hayatta kalma stratejileri geliştirir. Buna paralel olarak farklı üreme ortamları bu mikroorganizmanın morfolojisi, fizyolojisi ve fenotipi üzerinde önemli değişikliklere yol açar. Örneğin logaritmik fazın sonlarına doğru ortamda besin kıtlığı ile karşılaşması halinde hareketlilik (motility) ve kemotaksis sistemlerini geliştirerek en yakınında bulabileceği alternatif besin kaynaklarına ulaşmaya çalışır. Bununla birlikte, genetik yapısını değiştirmek amacıyla etrafındaki serbest DNA moleküllerini hücre içine almaya çalışır ve bu amaçla kompetans özelliği gelişir. Ortam şartlarındaki olumsuzlukların devam etmesi durumunda, rakipleriyle rekabet edebilmek için degradatif enzimler ve antibiyotikler üretmeye başlar. Antimetabolik, antibakteriyal ve antifungal özelliklere sahip olan bu antibiyotikler etraftaki diğer mikroorganizmaları öldürüp uzaklaştırırken, proteaz gibi bazı enzimler de alternatif kaynaklardan besin tüketimini sağlar. Olumsuz şartların daha fazla devam etmesi halinde, son strateji olarak spor oluşturmaya başlar. Bütün bu stratejiler mikroorganizmanın olumsuz yaşam ortamlarında hayatta kalmasını sağlar (Sonenshein ve ark., 1993; Hamoen ve ark., 2003).

B. subtilis araştırmalarda sıklıkla tercih edilen önemli bir model organizmadır. Genom dizisinin belirlenmiş olmasına ilaveten manüplasyonunun kolay olması, hızlı üremesi, patojen olmaması, transformasyonunun kolay olması ve metabolik adaptasyonu da araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca amilaz ve alkalın proteaz gibi çeşitli hidrolitik enzimler, insektisitler (ör. endotoksinler), polipeptit antibiyotikler (ör. basitrasin) ve çeşitli biyokimyasal

ajanlar (ör. nükleosidler) üretmesi *B. subtilis*'in araştırmalarda kullanımını daha fazla arttırmaktadır (Kunst ve ark., 1997, Harwood ve Wipat, 1996; Sonenshein ve ark.,1993; Hamoen ve ark., 2003). Bilimsel araştırmalarda model organizma olmasının yanı sıra ticari olarak kullanılan, özellikle prebiyotik üretiminde sporlarından yararlanılan *Bacillus* türleri arasında da önemli bir yeri vardır.

1.1.1 *Bacillus subtilis*'in genetik özellikleri

Bacillus türleri arasında en fazla araştırılan tür olan *B. subtilis*, GC Gram pozitif bakteriler arasında da model organizma olarak kabul edilir (Kobayashi et al., 2003). *B. subtilis* genomunda A+T bölgeleri kromozomun belirli bölgelerinde bulunurken G+C içeriği % 43 civarındadır (Kunst ve ark., 1997). *B. subtilis*'in genom dizisi Japonya ve Avrupa laboratuvarlarından oluşan bir uluslararası konsorsiyumda Kunst ve ark. tarafından 1997'de tamamlanmıştır. 4,214,810 bp'den oluşan genomda protein kodlayan yaklaşık 4106 gen yer almaktadır. Ayrıca genomda 86 tRNA geni, 30 rRNA geni ve 3 küçük kararlı RNA (small stable RNA) genlerinin yer aldığı belirtilmiştir (Kunst ve ark., 1997; Kobayashi and Ogasawara, 2002). Yapılan ilk araştırmalarda *B. subtilis* genomundaki büyük bir gen takımı haritalanmış ve bütün genlerin üçte birinin belirli bir fonksiyona spesifik olduğu belirlenmiştir. Diğer genler tarafından kodlanan proteinler ise "bilinmeyen fonksiyonlara sahip proteinler" olarak sınıflandırılmıştır.

Farklı araştırmalarda elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *B. subtilis* genomunun dörtte birinin yakıt ve biyosentetik proteinleri kodlamada görevli olduğu öngörülmüştür (Moszer, 1998; Harwood ve Cutting, 1990). Ayrıca birçok gen kümesinin çevresel streslere adaptasyonda rol aldığı ileri sürülerek *B. subtilis*'in ileri düzeyde adaptasyon yeteneğine sahip bir mikroorganizma olduğu kendi genotipi ile de desteklenmiştir (Harwood ve Wipat, 1996). *B. subtilis* üzerindeki araştırmalar, bu bakterinin çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabileceğini, bununla beraber antibiyotik ve çeşitli endüstriyel enzimler gibi sekonder metabolitleri de üretebileceğini ortaya koymaktadır.

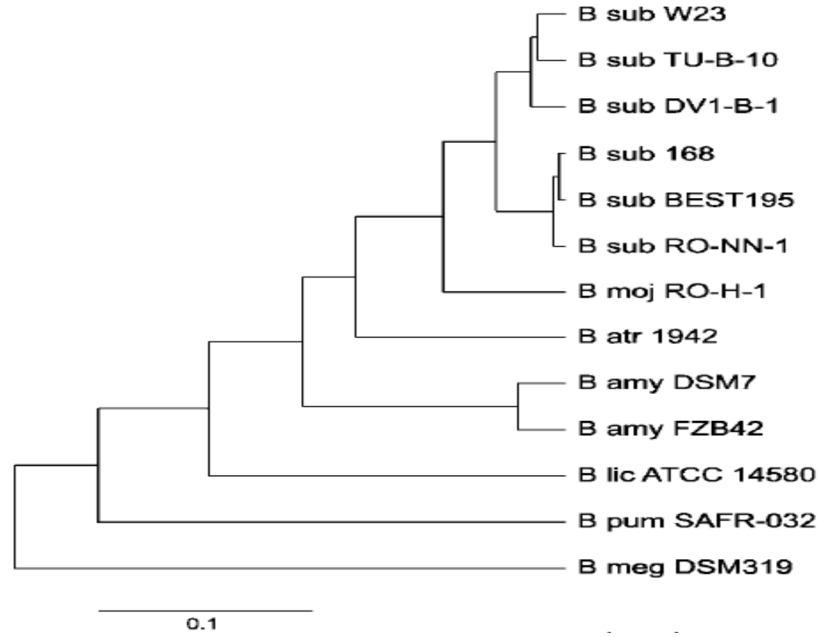
Gen duplikasyonlarının bir sonucu olarak *B. subtilis*'te geniş gen ailelerinin bulunma oranı artmaktadır. En geniş aile 77 aday üyesi ile ATP-bağlanma transport proteinleridir (Hoch and Losick, 1997). Ayrıca 10 profajın veya profaj parçasının *B. subtilis* tarafından kodlandığı belirtilmiştir. Bu özellik, bakteriyal evölüsyonda

genlerin transferi esnasında bakteriyofaj enfeksiyonuna yönelik muhtemel bir rolü işaret etmektedir. Genom dizisinin ilk yayınlandığı dönemlerde genlerin sadece % 58'i belirli bir fonksiyonla ilişkilendirilmiştir. Ancak bugünkü veri tabanında bu oran % 63'lere (2379) çıkmıştır (Kobayashi ve Ogasawara, 2002). Bununla beraber esansiyel genlerin % 4'ü fonksiyonu bilinmeyen genler olarak değerlendirilmiştir (Kobayashi ve ark., 2003). Kobayashi ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada hayatta kalabilmek için gerekli olan minimum gen setlerini tahmin etmek amacıyla, gen inaktivasyonu analizleri yapılmıştır. Daha önceki araştırmalarda elde edilen verilerle karşılaştırıldığında, optimum şartlarda hayatta kalmak için gerekli olduğu ileri sürülen 192 gene ek olarak, 79 genin de esansiyel gen olduğu ortaya konulmuştur. Böylece esansiyel genlerin sayısı 271'e ulaşmıştır.

Esansiyel genlerin yaklaşık yarısı “genetik bilginin işlenmesine yönelik fonksiyona sahip genler” olarak sınıflandırılmıştır. Diğer yarısı ise hücre zarı sentezi, morfoloji ve bölünmenin özelleşmesi, ve az bir kısmının hücre enerjisiyle ilgili olduğu rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak *B. subtilis*'in polarite özelliğinin, genlerin % 75'inin öncü zincirde (leading strand) yer almasından ve çok fazla ifade edilen genlerin replikasyon orjininin yakınında kümelenmelerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Rocha ve ark., 2000).

1.1.2 *Bacillus subtilis* 168 ve *Bacillus subtilis* PY79 suşlarının genel özellikleri

B. subtilis 168 suşu John Spizizen tarafından 1958'de üretilmiştir (Spizizen, 1958). Günümüzde endüstriyel amaçlı uygulamaların ve akademik araştırmaların hemen hemen hepsinde kullanılan *B. subtilis* suşları üreme ortamında triptofan ihtiyacı olan okzotrof *B. subtilis* 168 suşundan türevlenmiştir (Şekil 1.1; Zeigler, 2003; Zeigler, 2011). Yale Üniversitesindeki Burkholder and Giles Koleksiyonundan Dr. Charles Yanofsky tarafından temin ettiği *B. subtilis* suşları üzerinde transformasyon çalışmaları yapan Spizizen triptofan, indol, anthranilik asit ve nikotinik asit gibi çeşitli kimyasallara gereksinim duyarak üreyebilen okzotrof suşlar (168, 166, 122 vs.) elde etmiştir. Yabani tip *B. subtilis* 223'den türevlenen bu suşlardan 168 suşu üreme ortamına triptofan veya indol eklenmesi halinde üreyebilen bir okzotrof suştur (Zeigler ve ark., 2008).



Şekil 1.1 : Zeigler (2011)’e göre *B. subtilis* türüne ait 12 suşun filogenisi. Sekiz “housekeeping gen”in (*recN*, *lig*, *dnaX*, *glyA*, *cysS*, *trmE/thdF*, *uvrC* ve *ruvB*) dizileri tam olarak sıralanarak ClustalW ile hizalama analizi yapılmıştır. Suş kısaltmaları **B sub W23**, **B sub TU-B-10** ve **B sub DV1-B-1** kısaltmaları *B. subtilis subsp. spizizenii*; **B sub 168**, **BEST195** ve **RONN-1** kısaltmaları *B. subtilis subsp. subtilis*; **B moj**, *B. mojavensis*; **B atr**, *B. atrophaeus*; **B amy FZB42**, *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum*; **B amy DSM7**, *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*; **B lic**, *B. licheniformis*; **B pum**, *B. pumilus*; **B. meg DSM319**, *Bacillus megaterium* (dış grup) suşlarını temsil etmektedir.

1970’li yıllarda hemen hemen bütün dünyaya yayılan 168 suşunun yapılan çalışmalarda bir çok mutanlığı oluşturulmuştur. Ancak o yıllarda *Bacillus* genomunu temsil eden tek suş 168 değildir. Orjini tam olarak bilinmemekle birlikte W23 suşu da 168 suşu kadar araştırmalarda kullanılan bir suş haline gelmiştir. Prototrofik ve streptomisin dirençli bir suş olan W23 ilk zamanlar yabancı tip 168 suşu ile aynı kabul edilmiştir. Ancak daha sonra bakteriyofaj duyarlılıkları (Hemphill ve Whiteley, 1975; Taylor ve Thorne, 1963; Yasbin ve ark., 1976), hücre duvarının biyokimyasal yapısı (Chin ve ark. 1966), transformasyon (Hemphill ve Whiteley, 1975; Spizizen, 1958) ve profaj içeriği (Okamoto ve ark., 1968) açısından önemli farklılıkları olduğunun belirlenmesi ile birlikte genomik hibridizasyon analizlerinde % 60-70 ilişkisiz görülmeleri nedeniyle iki ayrı alttür olarak adlandırıldılar. 168 suşu “*B. subtilis subsp. subtilis*” ve W23 suşu “*B. subtilis subsp. Spizizenii*” olarak adlandırılmıştır. *trpC* gen bölgesi *B. subtilis*’in kalıtsal suşları arasında genetik farklılık oluşturan heterojen bölge olarak kabul edilmiştir. Bunun nedeni 168 suşunda

oluşturulan “*trpC2* mutasyonu”nun revert edilemeyen 3 bp’lik delesyon mutasyonu olması ve 168 suşundan türevlenen bir suшта *trp*⁺ allelin bulunmasıdır. Çünkü bu durum ancak izogenik olmayan bir gen parçasının bu lokusa aktarılması ile gerçekleşebilir (Zeigler ve ark., 2008).

PY79 suşu okzotrof 168 suşunun prototrof bir türevidir. Genom dizileri karşılaştırıldığında PY79 suşu 168 suşundan büyük farklılıklar gösterir. Örneğin *trpC* etrafındaki “W23 adaları” PY79 suşunda net olarak görülmektedir. Benzer şekilde ikinci bir heterojenite bölgesi olan *sacA* lokusunda da benzer durum söz konusudur. Bununla beraber, yapılan 4 büyük delesyon analizinde PY79 ile 168 arasında önemli değişiklikler görülmüştür. PY79 ve 168 suşları arasındaki bu büyük ölçekli farklılıklara ek olarak ayrıca 81 SNP ile de PY79 farklılık göstermektedir (Zeigler ve ark., 2008).

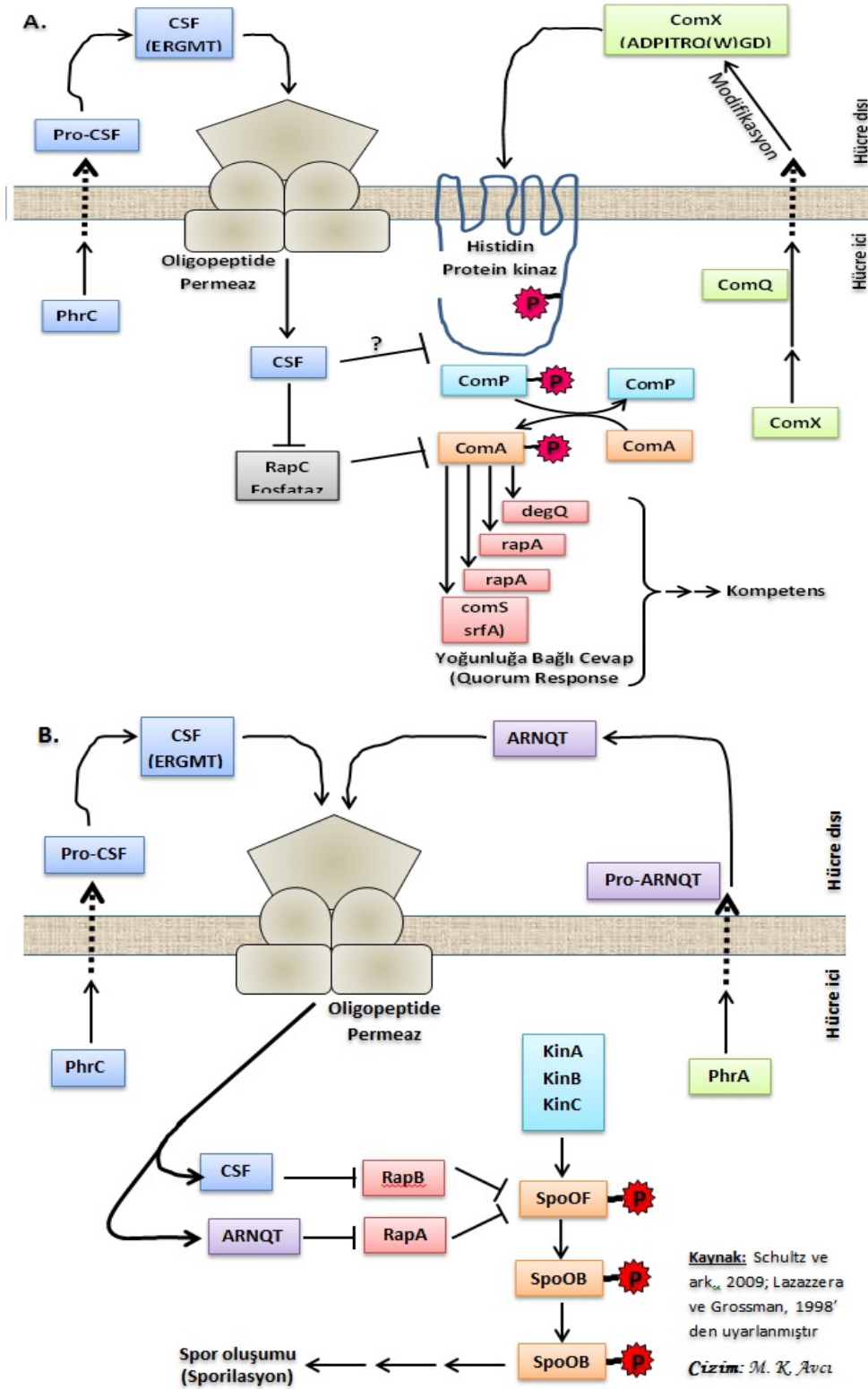
1.2 *Bacillus subtilis* Genlerinin Global Regülatörlerle Düzenlenmesi: Quorum Sensing Mekanizması

Mikroorganizmaların üreme ortamlarında çevresel şartlar hızlı ve sürekli bir şekilde değişmektedir. Bu ani değişimler hücrenin hayatta kalması açısından tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle her bir hücrenin bulunduğu ortamda çevresel şartlara en hızlı ve en uygun şekilde adapte olması son derece kritik bir zorunluluktur. *B. subtilis* hücreleri, gen ifadesini “quorum sensing mekanizması” ile genom çapında kontrol ederek çevresel şartlara göre metabolizmasını hızlı ve etkin bir şekilde düzenler. Quorum sensing, mikroorganizmaların “otoindükleyici” denilen bir takım sinyal molekülleri aracılığıyla, üreme ortamındaki hücrelerin ve ilgili sinyal moleküllerinin yoğunluğunu algılamak suretiyle hücredeki bütün genlerin koordineli bir şekilde kontrolünü sağlayan ve bu sayede ortam şartlarının gerektirdiği optimum metabolik akışı temin eden bir iletişim mekanizmasıdır (Fuqua *et al.*, 1994; Henke ve Bassler, 2004). Bu hücre-hücre sinyalizasyonu birçok hücre tipi için kullanılan temel bir aktivite olup bakterilerde bu mekanizma popülasyon yoğunluğunu ve çevresel şartların durumunu gözlemlemek için kullanılır. Bunun için de hormon benzeri küçük sinyal moleküllerinden yararlanırlar (Hardman ve ark., 1998; Reading ve Sperandio, 2005; Gobbetti ve ark., 2007; Chen ve ark., 2002).

Quorum sensing mekanizması sırasıyla “sentez”, “salgılama” ve “algılama” olmak üzere üç temel basamaktan oluşur: İlk olarak ilgili sinyal molekülleri hücre içinde üretilir, ardından üreme ortamına salgılanır ve üreme ortamında sinyal molekülü konsantrasyonu eşik değere ulaştıktan sonra bu sinyal molekülleri özel algılama sistemleri ile algılanır. Bu algılama sonucunda hücre içinde sırasıyla global regülatörlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve operonların işleyişleri birbirlerine bağlı olarak koordine edilmekte ve o andaki şartlar için en uygun metabolik rota belirlenmektedir. Sinyal molekülleri olarak açilhomoserin laktonlar, oligopeptitler veya furan türevleri kullanılmaktadır. Algılama sistemi sinyal molekülünün hücre zarından hücre içine difüzyonuyla olabileceği gibi hücre zarında yer alan iki-bileşenli sinyal algılama sistemleriyle de gerçekleşebilir (Shiner ve ark., 2005; Miller ve Bassler, 2001; Greenberg, 1997; Wood ve ark. 1997; Otto ve ark., 1998; Freeman ve Bassler, 1999; Bassler, 1999).

B. subtilis’te quorum sensing mekanizması (Şekil 1.2) hareketlilik, kemotaksis, kompetans, sporilasyon, deşedatif enzimlerin, ekzopolisakkaritlerin ve antibiyotiklerin üretimi gibi birçok özelliği kontrol etmektedir. *B. subtilis*’te ekstraselüler peptitlerle kontrol edilen bu mekanizmayla ilgili iki farklı sinyal peptit kullanılmaktadır: Birincisi feromon ComX, ikincisi CSF (competence and sporulation factor). Bu iki sinyal molekülünün quorum sensing mekanizmasındaki rolü post-eksponansiyal fazda görülen kompetans ve sporilasyon gelişimindeki rolleriyle açıklanabilir. Her iki sinyal molekülü iki farklı metabolik yol izleyerek, birçok gen ifadesinin kontrolünden sorumlu ComA transkripsiyon faktörünün aktivitesini birlikte düzenlerler (Solomon ve ark., 1995-1996; Lazazzera ve ark., 1997; Hamoen ve ark., 2003).

ComX, bir majör extrasellüler sinyal peptit olup genetik kompetansın regülasyon sürecinde sitoplazmada, inaktif halde uzun bir zincir şeklinde üretilir (Şekil 1.2-A). Daha sonra triptofan amino asidi üzerinde hidrofobik modifikasyonlar yapılarak modifiye deka-peptit halinde kesilir. *comQ* geni ComX feromonunun aktif formunun üretilmesinden sorumludur (Magnuson ve ark., 1994; Solomon ve ark., 1995). Ortamdaki hücre yoğunluğu artarken, buna paralel olarak ComX feromonu da hücre dışına salgılanır. Ortamdaki ComX konsantrasyonu eşik değere ulaştığında ComX sinyal peptidi doğrudan reseptörü olan ComP’ye bağlanır.



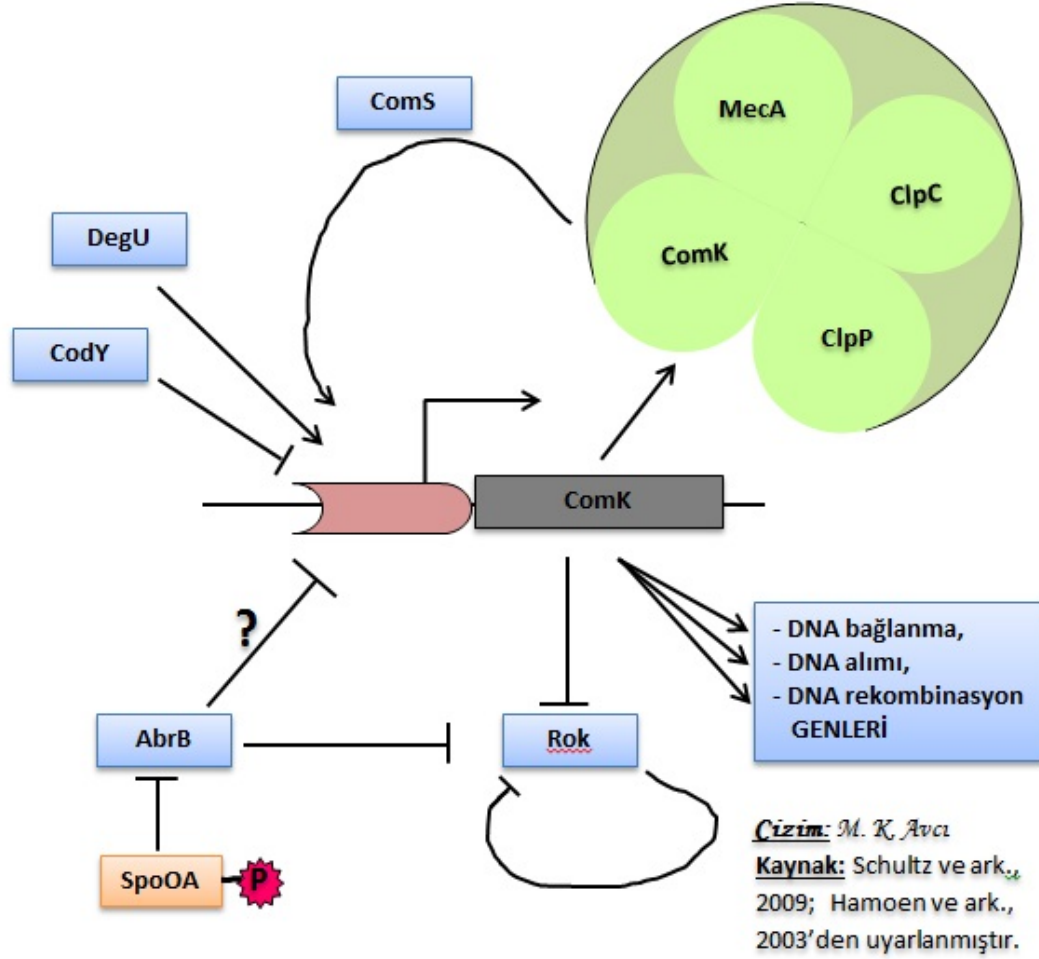
Şekil 1.2 : *B.subtilis*'te quorum sensing mekanizması ve ekstraselüler sinyal peptitlerle genlerin düzenlenme mekanizması: A) CSF ve ComX feromonlarıyla genetik kompetensin regülasyonu. B) Ekstraselüler peptitler aracılığıyla sporilasyonun regülasyonu (Schultz ve ark., 2009; Lazazzera ve Grossman, 1998).

İki bileşenli sinyal iletim sistemi, bir histidin proteinkinaz olan ComP ve bir cevap düzenleyici olan ComA proteinlerinden oluşur. Bu sistem ComX proteininin ComP sensörüne bağlanması ile aktifleşir. Histidin proteinkinaz ComP, membranı boydan boya geçen putatif 8 heliksten oluşur ve ComX feromonunun doğrudan bağlandığı reseptördür. ComX feromonunun fonksiyonel olması hidrofobik modifikasyonların yapılmasına bağlıdır (Lazazzera ve ark., 1998; Solomon ve ark., 1995). Bu modifikasyonlar sayesinde ComX feromonunun ComP reseptörüyle etkileşime girebileceği ve onu aktive edeceği membran bölgesinde ComX'in konsantrasyonu lokal olarak artar. Histidin proteinkinaz ComP aktifleştiği zaman otofosforilasyonla kendini fosfatlar ve sistemin ikinci bileşeni olan fosfata-bağımlı transkripsiyon faktörü ComA'yı fosforlar (Magnuson ve ark., 1994; Weinrauch ve ark., 1990; Griffith ve Grossman, 2008; Ansaldi ve ark., 2002).

Aktif ComA~P, *comS* geni de dahil olmak üzere birçok genin ifadesini aktive eder. *comS* geni *srfA* operonunda, *srfB* (*srfORF2*) geni içinde yer alır. ComS, kompetans transkripsiyon faktörü ComK'nın ClpC (Chaperon-like protein) ve MecA'nın bulunduğu proteolitik kompleksten ayrılmasını sağlayarak parçalanmasını önler. Serbest kalan ComK kendi ifadesini teşvik ederek hücre içindeki konsantrasyonunu arttırır ve ardından ilgili genlerin promoter bölgelerine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive eder (Şekil 1.3). Hücre içindeki konsantrasyonu hızla artan ComK bu otoindükleyici döngü sayesinde geç kompetans genlerini aktive ederek DNA bağlanma, DNA alımı ve DNA integrasyon mekanizmalarının oluşumunu sağlar (Hamoen ve ark., 2003-1998; Susanna ve ark., 2006; Turgay ve ark., 1997-1998)

B. subtilis'in üreme ortamına salgıladığı ikinci sinyal peptid beş amino asitten oluşan CSF (competence and sporulation factor; ERGMT)'dir. Sporilasyonun regülasyon sürecinde ComA proteininin aktivitesi, ComX feromonundan farklı olarak, CSF feromonuyla daha kompleks bir metabolik yol üzerinden kontrol edilir (Şekil 1.2-B). Bu metabolik yolda PhrC, PhrF, PhrH ve PhrK pentapeptitleri de rol alır. Üreme ortamına salgılanan pentapeptitlerin konsantrasyonları eşik değere ulaştığında oligopeptitpermeaz (Opp) sistemi aracılığıyla tekrar hücre içine alınırlar. Opp proteini ABC-tip oligopeptit transporter ailesine ait bir ATP-bağlanma transport proteinidir. Hücre içine girdiklerinde bu pentapeptitler ilgili Rap proteinleri RapC, RapF, RapH ve RapK'ya bağlanarak aktivitelerini inhibe ederler. Bu dört Rap

proteini ComA proteinine bağlanarak inaktif hale getirirler. Rap proteinlerinin inhibisyonu ComA'nın aktif kalmasını ve dolayısıyla kompetansın gelişimini sağlar (Griffith ve Grossman, 2008).

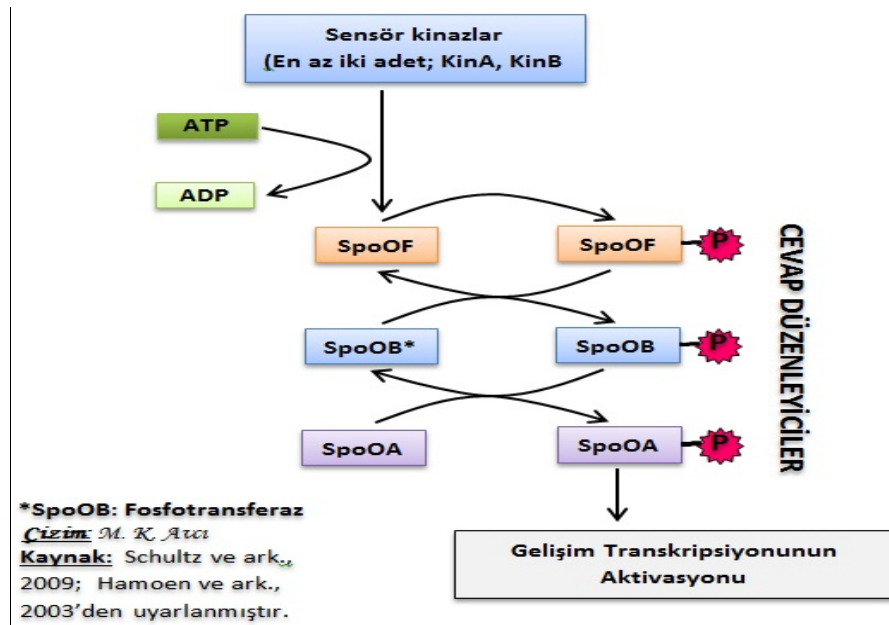


Şekil 1.3 : *B. subtilis*'te *comK* gen ifadesininin regülasyonu ve ComK aktivitesinin ClpC/ClpP/MecA sistemiyle kontrolü (Schultz ve ark., 2009; Hamoen ve ark., 2003).

Hücre yoğunluğuna bağlı olarak CSF üç farklı davranış sergilemektedir. Düşük yoğunlukta (1-5 nM) aspartilfosfat fosfataz (RapC)'ın aktivitesini baskılayarak ComA'nın aktif olmasını sağlar ve ComA'nın kontrol ettiği *com* genlerinin ifadesini artırır. Böylece kompetans gelişimi artar. Yüksek yoğunlukta (50-100 nM) ise bir yandan *com* genlerini baskılayarak diğer yandan aspartilfosfat fosfataz (RapB) proteinini baskılayarak sporilasyonu teşvik eder (Solomon ve ark., 1995; Lazazzera ve Grossman, 1998; Pottahil ve ark., 2008; Lazazzera ve ark., 1997; Perego, 1997; Solomon ve ark., 1996;). *srfA* operonunun yanısıra ComA, kompetans transkripsiyon faktörü ComK üzerindeki etkisinden bağımsız olarak, en az 89 geni ve bu genlere bağlı olarak 35 operonu kontrol eder. Bu genler arasında degradatif enzim üretiminin

bir regülatörünü kodlayan *degQ* geni ve birer regülatör protein kodlayan *rapA*, *rapC*, *rapE* ve *rapF* genleri doğrudan kontrol edilen genlerdir (Nakanno ve ark., 1991).

B. subtilis'in sporilasyon sürecinde fosforilasyona bağlı sinyal transdüksiyon (phosphorelay) mekanizması kullanılır (Şekil 1.4). Bu metabolik yolda CSF sinyal moleküllerine PhrA (ARNQT) denilen diğer bir penta peptit sinyal molekülü eşlik eder ve her ikisi de SpoOA'nın fosforlanmasını düzenler. SpoOA, sporilasyonun en önemli düzenleyici proteini olup sporilasyonun başlamasını sağlar. Diğer cevap düzenleyici proteinler fosfatı doğrudan proteinkinazlardan alırken SpoOA fosfatı doğrudan kinazlardan almayıp, kinazlardan SpoOF'e aktarılan fosfatı doğrudan SpoOF'den alır. RapB ve RapA proteinleri fosforilasyona bağlı sinyal iletimi sürecinde cevap düzenleyici SpoOF'i defosforile ederek inaktif hale getirirler. CSF ve PhrA sırasıyla RapB ve RapA'nın bu fosfataz aktivitesini baskırlarlar. KinA, KinB, KinC, KinD ve KinE tarafından fosforlanan SpoOF, üzerindeki fosfatı SpoOB'ye aktarır. SpoOB fosfotransferaz aktivitesiyle SpoOA'ı fosforilleyerek aktifleştirir. Sitoplazmada biriken SpoOA~P sporilasyonun başlamasını sağlar (Stephens, 1998; Perego ve ark., 1994).



Şekil 1.4 : *B. subtilis*'te fosforilasyona bağlı sinyal transdüksiyon (phosphorelay) mekanizması (Schultz ve ark., 2009; Hamoen ve ark., 2003).

DegU ve DegS proteinleri de kompetans gelişimde rol alır. Bir cevap düzenleyici protein olan DegU ve degradatif enzim sentezinde görev alan histidin proteinkinaz DegS kompetans gelişiminin başlamasında etkilidir. DegU~P degradatif enzim

üretimini arttırırken, defosforile DegU, *comK* geninin transkripsiyonunu sağlamak için tetikleyici protein olarak hareket eder (Şekil 1.3). ComK konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak kompetans gelişimi başlar (Hameon ve ark., 2000; Hameon ve ark., 2003; Susanna ve ark., 2006). DegU proteinine ek olarak dört farklı transkripsiyon faktörü *comK* promotor'unun transkripsiyonunun kontrolünde doğrudan etkili olur. Bu düzenleyici proteinler AbrB, CodY, Rok ve *comK* genin kendi ürünü olan ComK'dır. AbrB proteini transkripsiyon başlama bölgesine bağlanarak *comK* promotor bölgesi ile RNA polimeraz etkileşimini inhibe eder. AbrB, *comK*'nın prematüre ekspresyonunu inhibe ederek kompetans gelişimi üzerinde etki gösterir (Hameon ve ark., 2003).

Üremenin durağan fazıyla ilgili birçok geni düzenleyen CodY bir GTP-bağlanma transkripsiyon faktörü olup çeşitli *B. subtilis* genlerinin amino asite bağlı represyonunda rol alır. CodY hızlı üreme sürecinde negatif regülatör olarak davranır ve besin kıtlığına adaptasyon için gerekli genlerin ifade edilmesini sağlar (Levdikov ve ark., 2006). CodY proteininin aktivitesi GTP ve dallanmış amino asitler izoleüsin-valin (BCAAs, Branch-chain amino acids) ile kontrol edilir (Joseph ve ark., 2005). Bakteri hücreleri besin sıkıntısıyla karşılaştıklarında, GTP'nin bağlanmasıyla aktif hale gelen CodY, pozitif regülatör olarak davranır ve zamanla aktivitesi azalır. Karbon kaynağına ve amino asit limitasyonuna bağlı olarak sıkı cevap (stringent response) aktifleşir. Bu durum GTP'nin pppGppp ve ppGpp moleküllerine dönüşmesine yol açar. Buna bağlı olarak (p)ppGpp birikmesi veya intrasellüler GTP'nin azalması CodY'nin inaktifleşmesine yol açar. Bunun sonucunda CodY'nin kontrol ettiği, besin yokluğuna adaptasyonu sağlayan ürünleri kodlayan genler tekrar aktifleşir (Serror ve Sonenshein, 1996; Ratnayake-Lecamwasam ve ark., 2001; Inaoka ve ark., 2003; Molle ve ark., 2003). CodY proteini RNA polimerazın bağlanma bölgesini işgal ederek kompetans gelişimini baskılar. *ykuW* geni (yeni adıyla *rok* geni) tarafından kodlanan Rok proteini bir repressör olarak *comK*'yı inaktive ederken kendi sentezini de baskılayabilir. ComK konsantrasyonu arttığında *rok* ifadesi baskılanır (Hameon ve ark., 2003; Hoa ve ark., 2002).

CodY ve AbrB'nin yanı sıra ScoC (Hpr) proteini de basilisin biyosentezi, proteaz üretimi ve sporilasyon üzerinde negatif düzenleyici etki göstermektedir (Inaoka et al., 2009). *bacABCDE* operonunun ifadesi logaritmik fazda ScoC proteini olmadığında artmaktadır ve ScoC'nin baskılayıcı etkisi P_{bac} promotor bölgesine

doğrudan bağlanması ile gerçekleşmektedir. AbrB ve CodY proteinleri, basilisin biyosentezi üzerindeki baskılayıcı etkide ScoC proteinine eşlik etmektedir. ScoC bir DNA bağlanma proteini olup geçiş aşaması düzenleyicisi olarak rol oynar ve hücre metabolizmasında bir çok fonksiyonu düzenler (Strauch and Hoch, 1993). ScoC'nin sporilasyonun başlangıcında çok önemli bir rolü vardır. Ayrıca, *opp* ve *app* operonlarını baskılamak suretiyle oligopeptit transportunu negatif yönde kontrol eder (Koide, Perego and Hoch, 1999). *scoC* geninin transkripsiyonu AbrB proteini tarafından düzenlenir (Strauch and Hoch, 1993).

1.3 GntR-Tip Regülatör Protein Ailesinin Genel Özellikleri

GntR familyası DNA'ya bağlanmak için Heliks-Turn-Heliks (HTH) motifi kullanan regülatör proteinlerden oluşan bir HTH-tip protein süperfamilyasıdır. Mikroorganizmalar yaşam ortamlarında değişen çevresel şartlara cevap verebilmek için transkriptom profillerini değiştirebilmeli ve ortam şartlarına adapte edebilmelidir (Ramos ve ark., 2001). Bunu başarabilmeleri ancak regülatör proteinler tarafından kontrol edilen adaptif cevap serilerini oluşturmalarına bağlıdır. Regülatör proteinler düzenleyici aktivitelerini yapabilmek için hedef gen bölgelerini tanıyıp bağlanarak ilgili genin veya genlerin ifadelerini ihtiyaca göre ayarlarlar. Bununla beraber regülatör cevapların oluşması için ortam şartlarından anında ve doğru haber alınması gerekir. Bakterilerde çevresel şartları hızlı bir şekilde gözlemlemek için farklı sinyal iletim sistemleri gelişmiştir. Bu sistemler iletişimde görevli protein sayısına göre “bir bileşenli” veya “iki bileşenli” sinyal transdüksiyon sistemi olarak adlandırılır.

İki-bileşenli sinyal transdüksiyon sistemlerinde “algılayıcı (input) protein” ve “cevap (output) proteini” olmak üzere iki farklı protein görev alır. Bu iki protein arasındaki iletişim His-Asp rezidülerinin fosfat transferleri ile yani fosforilasyon serileriyle gerçekleşir (Şekil 1.4). Bir bileşenli transdüksiyon sistemlerinde ise tek bir protein görev alır ve bu proteinin yapısında “sinyal algılama (input) domaini” ve “cevap verme (output) domaini” bulunur. Prokaryotlarda genellikle bir bileşenli transdüksiyon sistemi görülür ve bu sistemler çoğunlukla küçük-molekül bağlanma domaini ve genellikle heliks-turn-helix (HTH) motifi içeren fonksiyonel cevap domaininden oluşur (Krell ve ark., 2006; Ulrich ve ark., 2005; Wang ve ark., 2005; Stock ve ark., 2000).

Genlerin düzenlenmesi, DNA-protein arasında fizikokimyasal etkileşimlere bağlıdır. Transkripsiyon faktörlerinden oluşan bu regülatör proteinleri boyutlarına, polaritelerine, şekillerine ve katlanma özelliklerine bağlı olarak kendilerine uygun DNA bölgelerini hedef alırlar. Hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler gibi kimyasal özellikler veya DNA ile proteinin yapısına göre oluşan bağlanma geometrisi gibi stereokimyasal özellikler hangi regülatör proteinin hangi geni tanıyıp bağlanacağını belirler. Ayrıca yapılan dizi analizlerinde regülatör proteinlerin hedef DNA bölgelerini tanımak ve bu bölgelere bağlanmak için “motif” adı verilen bir takım yapısal elemanları kullandıkları belirlenmiştir (Huffman ve Brennan, 2002). Bu motifler “helix–turn–helix”, “helix–loop–helix”, “zinc fingers”, “leucine zippers”, “homeodomain” ve “ β -ribbons” motifleridir (Branden & Tooze, 1991; Harrison, 1991; Pabo & Sauer, 1992). Aynı zamanda regülatör proteinler bu motiflerden hangisini kullandıkları dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır (Wintjens ve Rooman, 1996).

Bu sınıflardan günümüzde özellikleri en fazla bilinen ve en yaygın araştırılan grup Heliks-Turn-Heliks (HTH) sınıfıdır. En basit yapısıyla HTH motifi birbirine hemen hemen dik konumlanan ve GBB konformasyonunda üç amino asitlik kısa bağlantılarla (turn) birbirine bağlanan α -helikslerden oluşur. HTH yapısındaki ikinci heliks “tanıma heliksi” olarak kabul edilir ve DNA’nın büyük oluğuna denk gelecek şekilde konumlanır (Haydon ve Guest, 1991; Henikoff ve ark., 1988; Brennan ve Matthews, 1989; Weickert ve Adhya, 1992; Gallegos ve ark., 1993; Nguyen ve Saier, 1995). HTH motifleri farklı topolojilere sahip olabilir. Perez-Ruea ve ark. (2004) HTH motiflerini üç kategoriye ayırdılar: i. Klasik HTH (cHTH, Classical HTH), H1 ve H2 arasında dar bir ilmik (loop) bulunur, bunun haricinde C-terminalde farklı bir element yoktur, ör. GalR/LacI familyaları; ii. Kanatlı HTH (wHTH, Winged HTH), C-terminalde β -saç tokası yapısı bulundurur ve bazı proteinlerde H1 ve H2 arasında ekstra bir β -tabaka bulunabilir, ör. OmpR familyası; iii. Karma HTH (mHTH, Miscellaneous HTH), bilinen HTH özelliklerinden farklılık gösteren proteinlerin toplandığı gruptur, kısa heliksler içerebileceği gibi diğer süper yapılara da bağlanabilir, ör. *E coli*’de Rob proteini.

HTH proteinleri genellikle dimer yapıda aktif haldedir ve bu nedenle hedef DNA bölgelerine genellikle dimer olarak bağlanırlar. Dimerik bağlanmaları HTH proteinlerinin simetrik DNA dizilerine bağlanmalarını teşvik eder. Günümüzde

protein-DNA etkileşimlerine yönelik analizlerde uygun bir kriter olarak HTH motifleri referans alınmaktadır (Pabo ve Sauer, 1992; Wintjens ve Rooman, 1996).

Dizi benzerlikleri dikkate alınarak, özellikle DNA bağlanma efektör domainlerine göre bir bileşenli transdüksiyon sistemleri ve dolayısıyla HTH transkripsiyon regülatörleri çeşitli protein familyalarına ayrılırlar (Haydon ve Guest, 1991; Ulrich ve ark., 2005; Weickert ve Adhya, 1992; Nguyen ve Saier, 1995; Rosinski ve Atchey, 1999). Genellikle en iyi bilinen üyelerine göre sınıflandırılan bu aileler arasında LysR (Henikoff ve ark., 1988), TetR (Ramos ve ark., 2005), IclR (Nasser ve ark., 1994), GntR (Haydon ve Guest 1991), ve AraC (Gallegos ve ark., 1997) süperfamilyaları bulunur. Filogenetik, yapısal ve fonksiyonel analizlerle birlikte karşılaştırmalı dizi analizleri, her familyanın kendisine özgü tanıyabildiği belirli korunmuş dizilerin bulunmasını sağlamış ve bu diziler sayesinde benzer ailelere bakarak yeni üyeler etiketlenmiştir (Karmirantzou ve Hamodrakas, 2001). Aynı aile üyeleri arasında DNA bağlanma domaini ile oligomerizasyon domaini arasında dizi benzerlikleri çok yaygın olmadığından, hangi üyenin hangi familyaya ait olduğu belirlenirken bu bölgeler genellikle dikkate alınmaz. Bu nedenle Rigali ve ark. (2002) bakteriyal regülatörlerden HTH-GntR ailesini inceleyerek gen ifadesinin düzenlemesinde DNA bağlanma domaini ile oligomerizasyon domainleri arasında bir bağlantı olup olmadığını analiz etmiştir. Bu domainlerin regülasyon sürecinde önemli bir rolü vardır. DNA bağlanma özelliğini oluşturan HTH motiflerinin doğru bir şekilde konumlanması bu domainler arasındaki etkileşimle mümkün olur (Rigali ve ark., 2002).

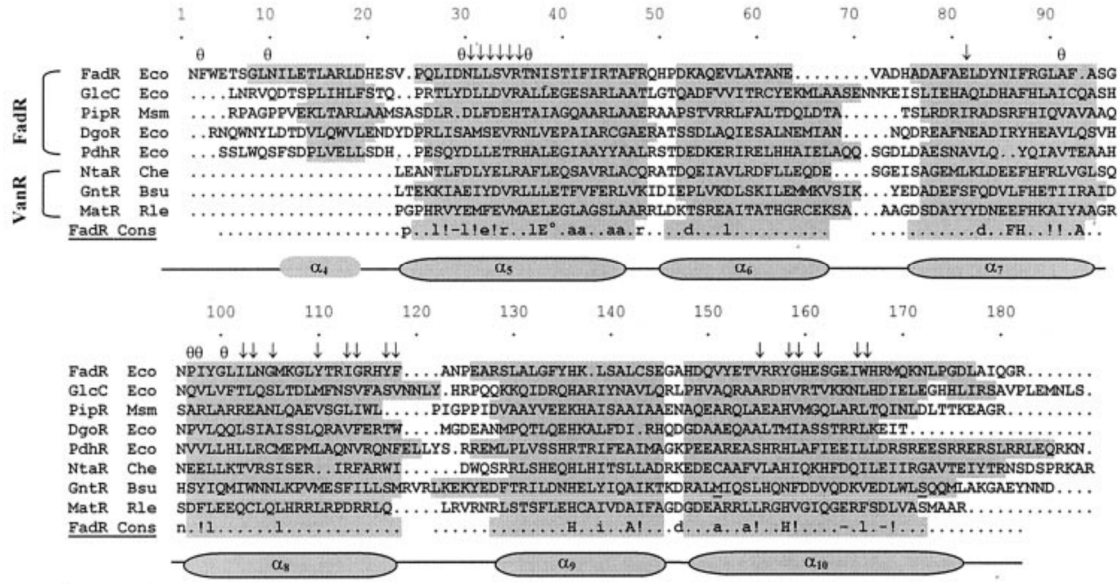
HTH süperfamilyası olarak GntR familyası N-terminalinde HTH motifi içeren bir DNA bağlanma domaini (DBD) ve C-terminalinde bir efektör bağlanma veya oligomerizasyon (EBD) domaininden oluşan birçok üyeden meydana gelir (Xu ve ark., 2001, Rigali ve ark., 2002). GntR-tip regülatör proteinler birçok bakteri grubunda oldukça yaygın olup çok çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler. Aynı zamanda DNA'ya bağlanmak için kullandıkları heliks-turn-heliks (HTH) motifi ile karakterize edilirler. Küçük bir β -tabaka ile beraber 3-heliksli bir çekirdekten oluşan DNA-bağlanma bölgesi bütün GntR familyasında oldukça iyi korunmuştur. Fakat DNA-bağlanma domaininin dışındaki bölgeler çok farklılık gösterebilmektedir (Aravind ve Anantharaman 2003; van Aalten ve ark., 2000; Rosinski ve Atchley, 1999; Lee ve ark., 2000).

İlk kez Haydon ve Guest tarafından 1991’de tanımlanan GntR süperfamilyası *B. subtilis*’te gluconat operonunun represörü olduğu için GntR olarak adlandırılmıştır (Fujita ve ark., 1986; Reizer ve ark., 1991). Bu familyanın üyeleri pleiotropik düzenleyici proteinler olup birçok farklı regülunun düzenlenmesinden sorumludur. GntR familyasındaki transkripsiyonel regülatörlerin sayısı farklı aktivite bölgelerine sahip, bakteriler ve arkealar gibi farklı organizmalarda fonksiyonel olan yaklaşık 2000 proteinden oluşur (Rigali et al., 2002).

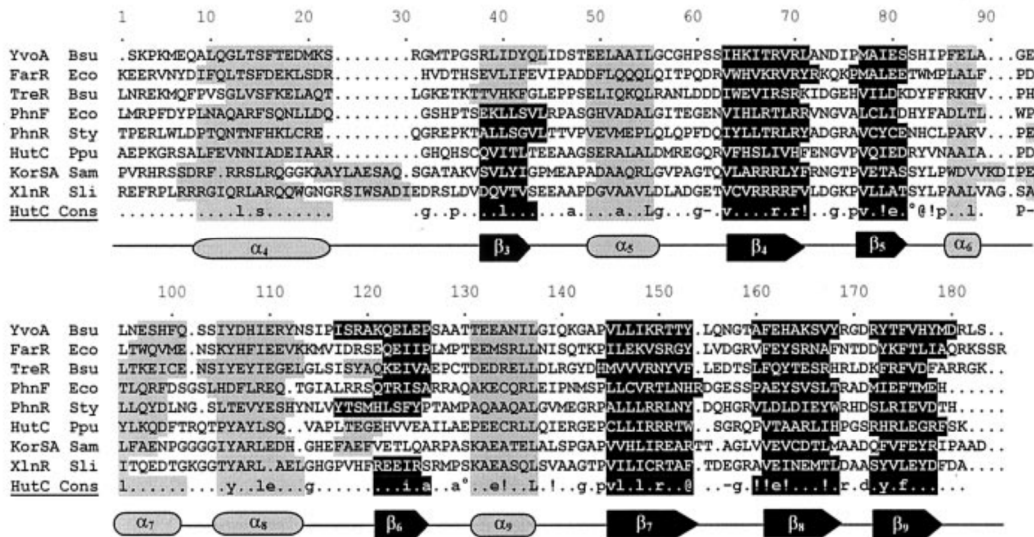
Rigali ve ark. (2002)’nın yaptıkları araştırmalarda GntR familyasına ait imzalar belirlenmiş ve bu imza verilerine göre birçok altfamilya tanımlanmıştır. Filogenetik ağaçlar GntR-benzeri üyelerin tam zincir dizilerinin çoklu hizalamaları dikkate alınarak oluşturulmuştur (Şekil 1.5). Bu sınıflandırmada C-terminaldeki heterojeniteye ve efektör bağlanma/oligomerrizasyon (E-b/O) domainlerinin tiplerine bakılarak GntR süperfamilyası dört ana sınıfa ayrılmıştır: FadR, HutC, YtrA ve MocR (Şekil 1.6). Primer ve sekonder yapı analizleri, her altfamilyada farklı olan belirli üyeleri de kapsayarak bu dört ana altgrup öngörüsünü desteklemektedir. Altgruplara ayırma kriterlerine göre belirlenen sınıflarda proteinlerin % 7’sinin uyumsuzluk gösterdiği belirlenmiş ve buna dayanarak söz konusu dört alt familyanın oldukça tutarlı bir sınıflandırma olduğu kabul edilmiştir. Bu alt familyalara ait üyelerin duplikasyon olaylarıyla meydana geldiği ileri sürülmektedir. N-terminal DNA-bağlanma (D-b) domainlerinin topolojik incelemelerinde bütün GntR ailesinin sekonder yapısal elementlerinde göreceli pozisyonların oldukça iyi korunmuş olduğu belirlenmiştir. Bu elemanların üç α -heliks ve iki (bazen üç) β -tabaka’dan oluştuğu belirlenmiş ve üç boyutlu yapıdaki konumlarının $\alpha1\alpha2\alpha3\beta1\beta2$ şeklinde olduğu önerilmiştir (Şekil 1.6).

GntR altfamilyalarından birincisi ve en büyük olanı GntR/FadR altfamilyasıdır. GntR-benzeri regülatör proteinlerin % 40’ını kapsayan FadR altfamilyasının üyeleri FadR ve VanR alt gruplarına ayrılır ve C-terminalde 6-7 α -heliksten oluşur (Şekil 1.6-a). Bu altgrup üyelerinden VanR-benzeri regülatörler, birinci α -helikse ($\alpha4$) sahip olmamaları ile FadR-benzeri proteinlerden ayırtdılır. Ortalama uzunlukları FadR ve VanR altgruplarında sırasıyla 170 ve 150 amino asittir. FadR’ın C-terminal domainine ait kristal yapısı belirlenmiş [Protein Database Code: 1EX2, 1HW1, 1HW2, 3ANP, 1H9G, AH9T] (Xu ve ark., 2001; Agari, 2011; van Aalten et al., 2000; van Aalten v ark., 2001) ve üç boyutlu yapısının bütün altfamilyada

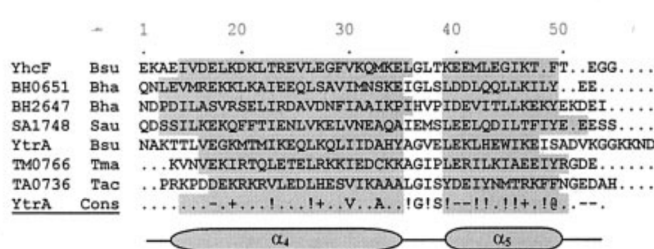
(A) FadR sub-



(B) HutC sub-



(C) YtrA sub-



Şekil 1.6 : GntR familyasının yapısal analizine dayalı N-terminal domainlerinin dizi hizalamaları. Hizalama bölgeleri farklı renklerle vurgulanmıştır.

[illegible]

Şekil 1.6 (devamı) : GntR familyasının yapısal analizine dayalı N-terminal domainlerinin dizi hizalamaları (Rigali ve ark., 2002). Hizalama bölgeleri farklı renklerle vurgulanmıştır.

19

proteinler arasında GntR-benzeri regülatörlerin %31'ini oluşturur. Bu altfamilya *Pseudomonas putida*'daki HutC regülatör proteininden sonra adlandırılmıştır. HutC proteininin histidin kullanımı (**H**istidin **u**tutilisation) ile ilgili genlerin ifade edilmesini inhibe ettiği, urokonat'ın bağlanmasıyla baskılandığı ileri sürülmüştür (Allison ve Phillips, 1990). HutC-benzeri proteinler hem α -heliks hem de β -tabaka yapılarını içerirler. Bu yapısal özellikleriyle FadR C-terminal domainlerinin bütün helikal yapısından farklılık gösterir Şekil 1.6-B). HutC altfamilyasına ait üyelerin ortalama uzunluğu 170 amino asit olup günümüzde kristal yapıları henüz belirlenmemiştir (Rigali ve ark., 2002; van Aalten ve ark., 2000).

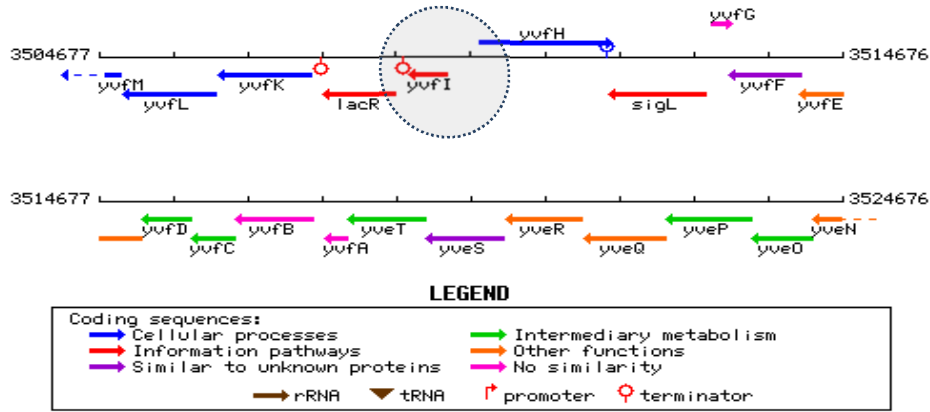
β 3, α 7 ve β 6'nın da dahil olduğu bazı pozisyonlarda yapısal elementlerin değişkenlik gösterdikleri ve fazla korunmadığı gözlenmiştir. E-b/O domaininin topolojisindeki bu değişiklikler HutC-benzeri üyeler tarafından düzenlenen biyolojik proseslerin çok fazla değişim göstermesinden ve bu değişikliklere verilen cevaplara bağlı olarak gelişen yapısal adaptasyonlardan kaynaklanabilir (Rigali ve ark., 2002). Bakteriyal transkripsiyonel regülatörlerden GntR/HutC familyasına ait YvoA proteini antibiyotik üretiminden, proliferasyona ve üremeye kadar birçok biyolojik metabolik yolu hem *B. subtilis*'te hem de *Streptomyces griseus* veya *Streptomyces coelicolor* gibi diğer birçok organizmada düzenlemektedir (Rigali ve ark., 2006; Resch ve ark., 2010; Seo ve ark., 2002). Ayrıca oligomerizasyonda görevli TraR gibi diğer birçok proteininin de GntR/HutC altfamilyasına ait represörlerden olduğu belirlenmiştir (Kataoka ve ark., 2008). *Streptomyces* türlerinde KorA, konjugatif plasmid transferinde görevli olan genlerin represörüdür (Kendall ve Cohen 1988; Hagege ve ark., 1993). Sampaio ve ark. (2004) FarR proteininin 2-O- α -mannozil-D-gliserat transportu kodlayan genleri düzenlediğini bildirmiştir. *B. subtilis*'te TreR proteini trehaloz operonunu düzenler ve trehaloz-6-fosfat tarafından inhibe edilir (Schock ve Dahl 1996). *E. coli*'de FarR proteininin sitrik asit döngüsünü regüle ettiği ve uzun yağ asitleriyle reaksiyona girdiği rapor edilmiştir (Quail ve ark., 1994).

Üçüncü alt familya YtrA, sadece 2 α -heliksten oluşan kısa C-terminal domaini ile diğer üç altfamilyadan kısmen daha küçüktür (Şekil 1.6-C). YtrA altfamilyası GntR-benzeri regülatörlerin %6'sını temsil eder ve ortalama uzunlukları 50 amino asittir. Bu proteinlerin çoğu ATP-bağlanma kaset (ABC, ATP-binding cassette) transport sisteminde görevli operonların bazılarını düzenler (Rigali ve ark., 2002).

Dördüncü altfamilya MocR'da E-b/O domaini bahsedilen ilk üç altfamilyadan farklıdır (Şekil 1.6-D). Bu farklılık C-terminal domaininin yaklaşık 350 amino asitlik ortalama uzunluğundan ve amino transferaz proteinlerin I. sınıfı ile homolojilerinden kaynaklanır (Sung ve ark., 1991). Bu alt familya *S. meliloti* MocR proteininden sonra adlandırılmıştır. MocR üyeleri transaminasyon reaksiyonunu katalizler. Transaminasyon sürecinde bir amino asit substratından amino grubu alınır ve akseptör α -keto asite geri dönüşümlü bir şekilde transfer edilir. MocR altfamilyası üyeleri aktivitelerini dimer halinde gerçekleştirir ve bu proteinlerin aktivitelerini düzenlemede piridoksal 5-fosfat (PLP) kofaktör olarak rol oynar (Ko ve ark., 1999). Bu regülatör protein örneklerinden biri *Streptomyces venezuelae*'da PdxR proteinidir (Magarvey ve ark., 2001). Diğer bir örnek olarak *Rhodobacter capsulatus*'da taurin kullanma genlerinin ifadesini aktive ettiği belirlenen GntR-benzeri regülatör TauR proteinidir (Wiethaus ve ark., 2008; Rossbach ve ark., 1994). Hedef genlerinin promoter bölgelerindeki invert tekrarlı dizilere bağlanarak düzenleyici görevlerini yapan FadR, HutC ve YtrA altfamilyalarının aksine *B. subtilis*'te MocR-benzeri protein GabR, hem bir otorepressör olarak davranır hem de tek nitrojen kaynağı olarak γ -aminobütirat (GABA) kullanımında görevli genlerin indükleyicisi olarak hareket eder (Belitsky, 2004; Belitsky ve Sonenshein, 2002).

1.4 GntR-tipi Regülatör Protein LutR'ın Genel Özellikleri

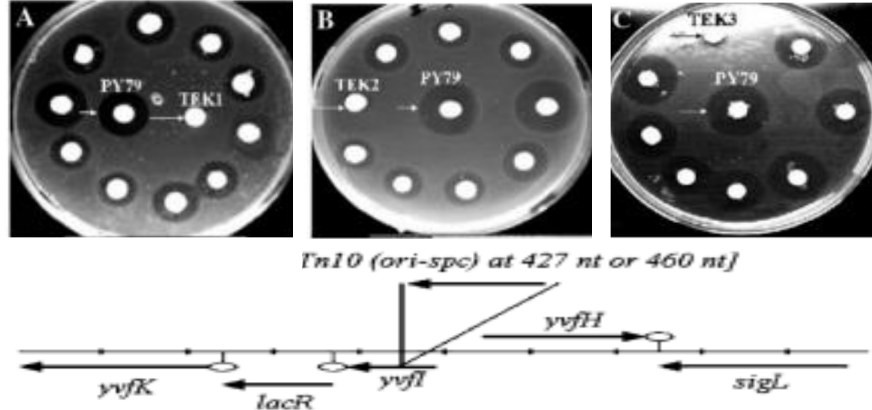
LutR transkripsiyon faktörü, GntR familyasının bir üyesi olup *lutR* geni (eski adı *yvfI*) tarafından kodlanan düzenleyici bir proteindir. Moleküler ağırlığı 19 kDa, izoelektrik noktası *pH* 4.8, gen ve protein uzunlukları sırasıyla 525 bp ve 175 amino asittir. NCBI veri tabanındaki (NCBI Gen ID: 936332) gen haritası incelendiğinde *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* genomunda 3509731-3510588 bölgesinde negatif pozisyonda konumlandığı görülmektedir (Şekil 1.7). Aşağı gen bölgesinde *lacR* geniyle yukarı gen bölgesinde ise *lutP* (eski adıyla *yvfH*) geniyle komşudur. Adını laktat kullanımında görevli olmasından almaktadır. İlk kez Kunst ve ark. (1997) tarafından keşfedilen *lutR* geni ilk önce “*yvfI*” olarak adlandırılmıştır. Fakat daha sonraki çalışmalarda Chai ve ark. (2009) tarafından laktat kullanımında da görevli olduğunun belirlenmesi üzerine “*lutR*” (Lactate utilisation gene) adıyla tekrar adlandırılmıştır.



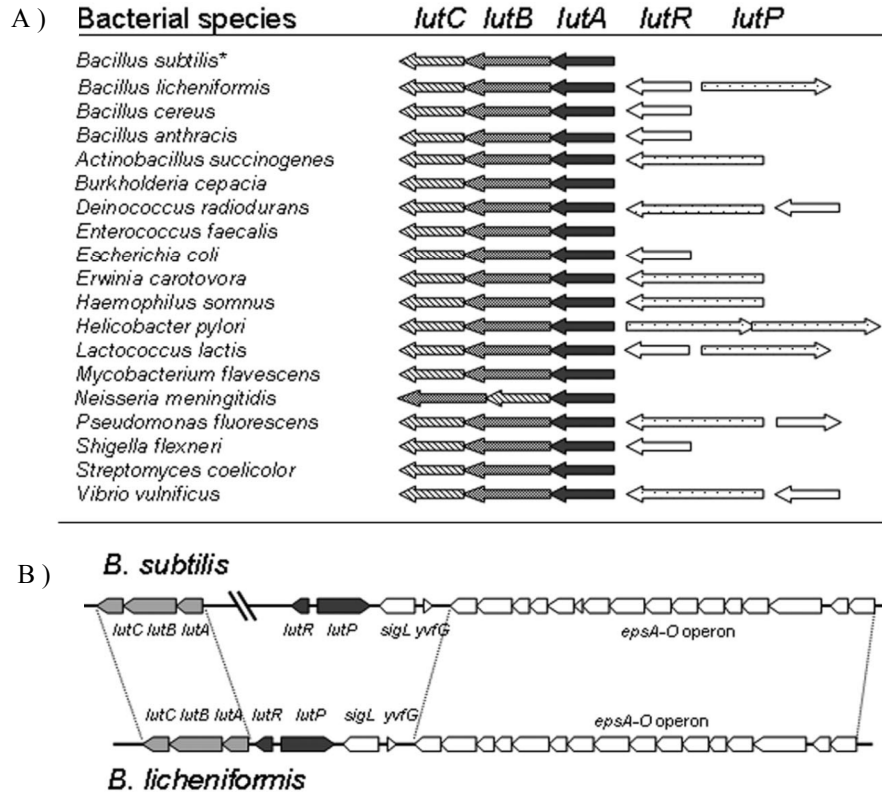
Şekil 1.7 : *B. subtilis* genomunda *yvfI* (*lutR*) geninin pozisyonu.

lutR geninin *B. subtilis*'teki ilk fonksiyonel rolü grubumuz tarafından aydınlatılmış olup dipeptit basilsin antibiyotiği biyosentezi için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Köroğlu ve ark., 2008). Bu çalışmada, transpozon mutagenез uygulaması ile, basilsin negatif fenotipe sahip TEK1, TEK2 ve TEK3 olarak adlandırılan, üç mutant suş izole edilmiştir (Şekil 1.8.A-B-C). Bu mutantlarda, yapılan southern blot analizleri, birbirinden bağımsız bu üç mutantta, Tn10 insersiyonlarının aynı lokusta bulunduğu ve aynı insersiyon mutasyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Sonraki aşamalarda Tn10 insersiyonları ve bunların uzantı bölgeleri klonlanmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlarda insersiyonun üç mutantta da *lutR* geninde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 1.8.D). Sonuç olarak, *lutR* geninde belirlenen mutasyon sonuçları, *lutR* geninin *B. subtilis*'te dipeptit basilsin antibiyotiğinin biyosentezinde esansiyel bir gen olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Chai ve ark. (2009) tarafından yürütülen çalışmada, L-laktat kullanımından sorumlu *lutABC* (eski adı *yvfV-yvfW-yvbY*) operonunun, GntR tip regülatör LutR'ın kontrolü altında olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, *lutA-lacZ* füzyonunu içeren bir suşta *lutR* delesyonu yapılmış ve buna bağlı olarak *lutA* gen aktivitesinin önemli ölçüde artması sonucunda, *lutABC* operonunun LutR tarafından baskılandığı anlaşılmıştır. Yine aynı çalışmada, farklı bakteri genomlarında homolog operonlar tanımlanarak *lutABC* operonunun L-laktat kullanımı ile ilgili geniş ölçekte korunmuş genomik organizasyonu olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.9.A).



Şekil 1.8 : *lutR* geninde insersiyon mutasyonu analizleri ve basilisin defektif mutantların keşfi. **A-B-C)** Yabani tip PY79 suşunun *mini-Tn10* insersiyon mutasyonu ile elde edilen türevleri ve basilisin üretemeyen üç mutant: TEK1, TEK2 ve TEK3. **D)** *lutR* geninin genomik organizasyonu ve TEK1-TEK2-TEK3 mutant suşlarında, *lutR* geninde oluşturulan 427 veya 460 nükleotit uzunluğundaki transpozon insersiyonu. (Köroğlu ve ark., 2008)



Şekil 1.9 : *lutABC* (eski adıyla *yvfV-yvfW-yvbY*) operonunu içeren kromozomal bölge. **A)** Farklı bakteri türlerine ait *lutABC* homologlarını içeren kromozomal bölgelerin hizalanması. Yıldız (*) *B. subtilis*'te *lutP* (eski adıyla *yvfH*) ve *lutR* genlerinin *lutABC* operonundan 15 kb uzakta olduğunu gösteriyor. **B)** *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'in *lutABC* ve *epsA-O* operonlarını içeren kromozomal bölgelerin hizalanması. *B. subtilis*'te *lutABC* operonu ve *lutR* geni (eski adıyla *yvfI*) geni 15-kb'lık dizi (paralel çizgi ile gösterilen bölge) ile ayrılır. Bu bölge *B. licheniformis*'de yoktur (Chai ve ark., 2009).

lutR geni *lutABC* operonu ile genom üzerinde birbirine yakın konumdadır. Fakat bir GntR-benzeri represör kodlayan 15 kb'lık bir segment *lutABC* operonunu *lutR*'dan ayırır. Bu segment tahmini olarak bir laktat permeaz *sigL* ve *yvfG* genlerini ve *episA-O* operonunu kodlar. Bu 15 kb'lık bölge *B. subtilis*'te bulunurken *B. licheniformis*'te görülmemektedir (Şekil 1.9.B; Chai ve ark., 2009; Veith ve ark., 2004). Bütün bu gözlemler *lutABC* operonunun genom üzerinde konumlandığı gen kümesindeki bütün genlerle olmasa bile bir veya birkaç üyesiyle fonksiyonel olarak ilişkili olduğu sonucunu doğurmuştur. Örneğin, Chai ve ark. (2009)'nın *lutABC* operonunun laktat metabolizmasında görevli olabileceği hipotezi, *lutP* geninin bir laktat permeaz kodladığı tahminine dayanarak ileri sürülmüştür.

LutR üzerinde yapılan CDD (Conserved Domain Database) analizleriyle GntR familyasında oldukça yaygın olan ve YvfI proteininin C-terminalinde yer alan FadR C-terminal ligand bağlanma (FCD) bölgesi ortaya çıkarılmıştır (PFAM 07729). Aalten ve ark. (2000) FCD taşıyan proteinleri daha önce yayınlamıştır.

Buna ek olarak Kunst ve ark. (1997) tarafından bulunan *B. subtilis* YvfI proteiniyle ilgili ikinci bir veri elde edilmiştir. N-terminalde 44 amino asitlik ekstra bir zincir öngören bu UniProt verisi (O07007; EMBL kodu CAB08003) dikkate alınarak YvfI proteini ile GntR wHTH domaini arasında bir eşleşme olup olmadığı araştırılmıştır. Bu araştırmalarda tam olmamakla birlikte önemli sayılacak derecede bir eşleşme olduğu ve YvfI dizisinin diğer bakterilerdeki ortologlarıyla büyük bir homoloji gösterdiği belirlenmiştir. YvfI dizisi üzerine yapılan incelemeler bu proteinin GntR süperfamilyasının FadR altfamilyasındaki farklı türlere ait ortologlarıyla da önemli homolojiye sahip olduğunu göstermiştir (Marchler-Bauer ve ark., 2005). FadR benzeri proteinler birçok metabolik yolun regülasyonunda fonksiyoneldir. Bununla beraber galaktonat, piruvat, aspartat ve glikolat metabolizması da dahil olmak üzere yağ asidi transportu ve yıkımı, L-laktat ve şeker kullanımı ve amino asit metabolizması gibi birçok metabolik yolda görev alırlar (Rigali ve ark., 2002; DiRusso ve ark., 1992; Black & DiRusso, 1994).

İrigül-Sönmez ve ark. (2013) LutR transkripsiyon faktörünün genom çapındaki düzenleyici rollerini belirlemek amacıyla *B. subtilis*'te *lutR* null mutasyonu oluşturup etkilerini incelemiştir. Bunun için DNA mikroarray, RT-qPCR, *lacZ* füzyon analizi ve EMSA analizlerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda *lutR*⁺ yabani tip ile karşılaştırıldığında, *lutR*⁻ mutantında erken durağan fazda gen ifade

düzeyleri değişen 23 monosistronik birim ve 42 operon olmak üzere 65 transkripsiyonel birim rapor edilmiştir. Doğrudan LutR kontrolü altında olduğu öngörülen 11 tek gen ve 25 operona ait genlerin degradatif enzim üretimi, antibiyotik üretimi ve direnci, karbonhidrat kullanımı ve transportu, nitrojen metabolizması, fosfat alımı, yağ asidi ve fosfolipit biyosentezi, protein sentezi ve translokasyonu, hücre duvarı metabolizması, enerji üretimi, mobil genetik element transferi, fajla ilgili genlerin indüksiyonu, sporilasyon, sporilasyonun gecikmesi ve kanibalizm ve biyofilm oluşumu gibi üremenin durağan fazının başlamasıyla ilgili çeşitli fizyolojik süreçlerde gerekli olduğu gösterilmiştir. Bütün bu sonuçlar göz önüne alınarak LutR transkripsiyon faktörünün, birbirinden bağımsız birden fazla geni/operonu/regülону kontrol eden pleiotropik bir global regülatör olduğu kabul edilmiştir (İrigül-Sonmez ve ark., 2013).

1.5 SinR Proteininin Genel Özellikleri ve LutR Proteini ile Regülasyon Açısından İlişkisi

Gaur ve ark. (1986) *B. subtilis* kromozomundan izole ettikleri 1 kb'lık DNA parçasının çok kopyalı bir plazmitte ifade edildiğinde, normalde sporilasyon yapabilen bir suşun sporilasyon defektif fenotipe dönüştüğünü belirlemiştir. Bu nedenle ilgili DNA parçası “Sporilasyon inhibisyon (Sin) fenotipi” olarak adlandırılmıştır Gaur ve ark. (1991). Sin (sporilasyon inhibisyon) lokusu 14 kDa'lık tetramerik DNA bağlanma proteini SinR ve SinR proteinine antagonistik aktivite gösteren 6 kDa'luk SinI proteininden oluşur (Bai ve ark., 1993; Lewis ve ark., 1993). SinR, *Basillus subtilis*'te geç üreme sürecinde kompetans ve motilite gelişimini aktive ederken sporilasyon ve ekzoproteaz üretimini inhibe ederek çift fonksiyon gösteren esansiyel bir DNA bağlanma proteindir (Sekiguchi ve ark., 1988; Gaur ve ark., 1986; Mandic-Mulec ve ark., 1992). 111 amino asitten oluşan multimerik DNA bağlanma proteini SinR'ın aktiviteleri posttranslasyonel olarak düzenlenir. SinR proteininin N-terminal bölgesi helix-turn-helix motifi içerir ve buna bağlı olarak DNA bağlanma yüzeyi oluşturur (Bai ve ark., 1993; Lewis ve ark., 1993).

SinR, Spo0A gibi pleiotropik bir proteindir (Mandic-Mulec ve ark., 1995). Bu nedenle SinR, düzenleyici bir anahtar gibi hareket eder ve adaptif cevapların gelişmesini sağlayarak gereksiz olan potansiyel diğer cevapları engeller. SinR'ın fonksiyonu dikkate alındığında kompetans ve motiliteyi nasıl düzenlediği halen bilinmezken

ekzoporeteaz ve sporilasyon üzerindeki negatif etkisi daha iyi anlaşılmış durumdadır. Mandic-Mulec ve ark. (1995) SinR'ın *spo0A* ifadesi üzerine etkisini araştırmış ve SpoOA'nın II. aşama sporilasyon genlerinin ifadesinde bir inhibitör iken, SinR'ın da, kilit rol üstlenen bu erken sporilasyon geni *spoOA*'nın represörü olarak görev yaptığını belirlemiştir. Spo0A, iki bileşenli sinyal iletim sisteminde kilit rol oynayan bir “cevap düzenleyici (response regülatör)” proteindir (Stock ve ark., 1989). Spo0A sporilasyonun baş kontrol elemanı olmakla birlikte kompetans ve ekstraselüler enzimlerin üretiminde de esansiyel bir proteindir (Hoch, 1993). SinR'ın aşırı ifade edildiği suшта, *spoOA* ifadesinde sıfır zamanında sporilasyona bağlı artış görülmezken *sinR* geni bozulan suşlarda normalden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu etki SinR'ın doğrudan *spoOA*'ya *in vitro* olarak spesifik bir şekilde bağlanması nedeniyle oluşur. Bu bağlanma E- σ^H polimeraz tarafından tanınan sporilasyon-spesifik P_s promotorunun -10 bölgesiyle çakışan bir bölgede olur. Metil interferans ve yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları sonucunda ilgili DNA bölgesinin SinR tarafından tanınmasında guanin rezidülerinin önemli olduğu bulunmuştur. Ayrıca SinR'ın doğrudan, birbirinden bağımsız bazı genler (*spo0A*, *spoIIA*, *spoIIIG* ve *spoIIIE*) üzerinde negatif etki göstererek sporilasyonu kontrol ettiği ispatlanmıştır (Mandic-Mulec ve ark., 1992). Sporilasyon sürecine girmek için SinR aktivitesinin durdurulması gerekir. Bu baskılanma SinR üzerinde inhibe edici etki gösteren SinI proteini tarafından SinI-SinR kompleksi oluşturmak suretiyle gerçekleşir (Chibazakura ve ark., 1991).

lutABC operonu hem LutR hem de SinR proteininin kontrolü altındadır (Chai ve ark., 2009). LutR ve SinR proteinleri *lutABC* operonunu baskılamakta ve represyonda eş zamanlı hareket etmektedir. SinR'ın *epsA-O* ve *yqxM-sipW-tasA* operonlarına ait 18 geni de baskıladığı bilinmektedir. Bu operonlar biyofilm olarak bilinen uzun hücre zincirlerini bir arada tutan ekstrasellüler matrikten sorumludur (Branda ve ark., 2005; O'Toole ve Kaplan, 2000; Stoodley ve ark., 2002; Sutherland, 2001; Ren ve ark., 2004; Kearns ve ark., 2005; Chu ve ark., 2006; Branda ve ark., 2006). İrigül-Sönmez ve ark. (2013) 23 adet monosistronik birim ve 42 operondan oluşan toplam 65 transkripsiyon ünitesinin gen ifadesi seviyelerinde LutR proteininin etkisine bağlı olarak farklılıklar belirlemiştir. Ayrıca bu genlerin arasından 11 tane tek genin ve 25 tane operonun LutR proteininin doğrudan kontrolü altında olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, Chu ve ark. (2006)'nın SinR'ın doğrudan kontrolü

altında olduğunu belirttiği *tapA* ve *aprE* genlerinin aynı zamanda LutR'ın da direkt kontrolü altında olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada bu iki gene ek olarak, LutR ile EMSA analizi yapılan genlerin, SinR proteini ile de etkileşim göstermesi LutR ve SinR proteinleri arasında düzenleyici protein olarak önemli bir etkileşim/ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

1.6 DNA-Protein Etkileşimlerinin Önemi ve Analiz Yöntemleri

Günümüzde temel araştırmalarda ve uygulamalı biyoteknolojik çalışmalarda en önemli konulardan biri bilimsel, endüstriyel ve ticari uygulamalara dönüştürülmek üzere yeni bilgilerin elde edilmesidir (Tosato ve Bruschi, 2004; Ogasawara, 2000; Eichenberger ve ark., 2003). Bu nedenle prokaryotik ve ökaryotik model organizmaların genom dizilerinin tam olarak bilinmesi ve bu genomlara ait transkriptom, proteom ve metabolik etkileşim ağlarının analiz edilmesi gerekmektedir. Bu tür yeni bilgilerin elde edilmesini hızlandırmak için yeni teknolojiler ve deneysel prosedürler geliştirilmektedir. Yakın tarihlerden beri *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *Synechocystis* PCC6803, *Methanococcus jannaschii*, *M. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Archaeoglobus fulgidus* ve maya *Saccharomyces cerevisiae* gibi birçok mikroorganizmanın genom dizisi yayınlanmıştır ve ayrıca en az 40 prokaryotik genom halen dizilenmektedir. Düzenli olarak güncellenen genom dizileme projelerine <http://www.mcs.anl.gov/home/gaasterl/genomes.html> (Argonne National Laboratory, Illinois,USA), <http://www.tigr.org> (TIGR, Rockville,Maryland, USA) ve <http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/genome.cgi> gibi çeşitli internet bağlantılarından ulaşılabilir.

Transkriptoma yönelik araştırmalarda, bir metabolik yol “regülön” olarak adlandırılır ve bu regülona ait genler metabolik süreçte ya indüklenirler veya baskılanırlar (Tosato ve Bruschi, 2004). Transkripsiyon profilleri ile proteom analizlerinin bir araya getirilmesi, ana metabolik yolların izlerini belirlememizi sağlar. Bu da regülönların fonksiyonları ile ilgi çok sayıda veri ve görüş elde etmemizi sağlar. Örneğin yabani tip bir hücre ile bu hücrenin mutant formları arasında transkript profillerinin belirlenip karşılaştırılması bu hücrede belirli bir fonksiyondan sorumlu metabolik yolda görev alan genlerin keşfedilmesi ve tanımlanmasını sağlayabilir. Genom projeleri sayesinde tahmini protein kodlama dizileri, promoter ve

transkripsiyon faktörlerine yönelik veri tabanı oluşturulabilir. Transkriptom analizlerinde ise bir regülona ait yeni üyelerin tanımlanması söz konusudur. Bir mikroorganizmanın yüksek tuzluluk gibi çeşitli üreme şartlarına adaptasyonunu araştırmak için transkripsiyonel profil analizleri kullanılabilir (Steil ve ark., 2003; Tosato ve Bruschi, 2004). Bunlar sadece bilimsel verilere yönelik değil belirli bir mikroorganizmadan rekombinant protein üretimi gibi sonuçta endüstriyel ve ticari ürünlerin oluşumunu sağlayan biyoteknolojik uygulamalarla da ilgili birçok örnekten birkaçıdır.

B. subtilis bu model organizmalardan biridir. Söz konusu teknolojilerin bir sonucu olarak *B. subtilis*'e ait gen dizileri, promoter bölgeleri, operonlar, regülonlar ve transkripsiyon profilleri bilinmektedir. Fakat henüz bilinmeyen çok daha fazla dizi ve etkileşim ağı bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen faydaların elde edilmesinde DNA ve proteinler arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi en önemli adımlardan biridir. DNA-protein etkileşimlerini belirlenmek amacıyla birçok yöntem kullanılır. ChIP ve EMSA yöntemleri bu amaçla kullanılan en etkili yöntemlerinden ikisidir.

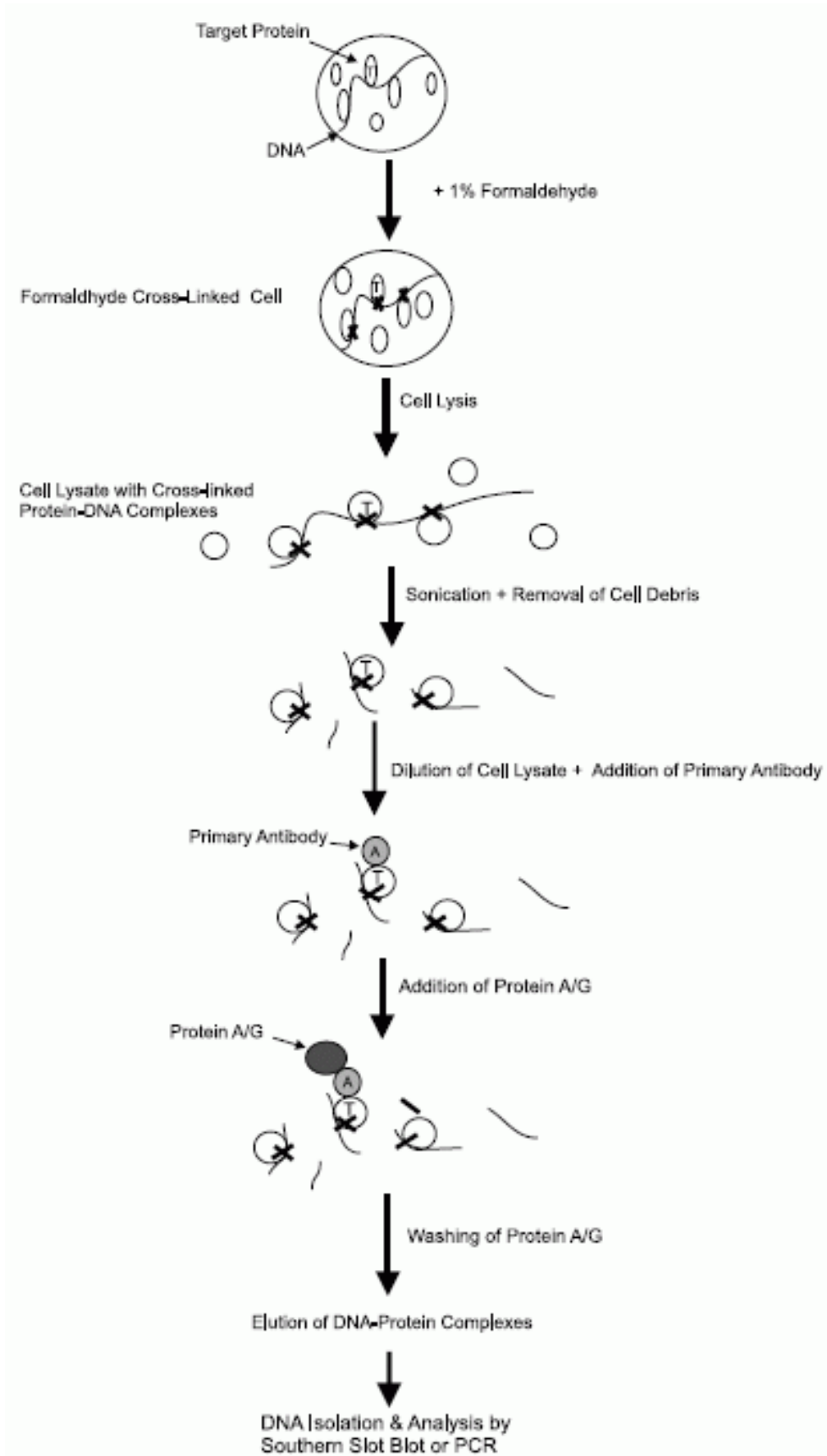
1.6.1 Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yönteminin genel özellikleri

ChIP yöntemi *in vivo* şartlarda DNA-protein etkileşimlerini araştırmak için kullanılan çok etkili bir yöntemdir (Barski ve Frenkel, 2004; Weinmann ve Farnham, 2002; Nelson ve ark., 2006). ChIP yöntemi histon proteinlerinin, DNA replikasyon proteinlerinin, DNA tamir enzimlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin genoma bağlanmasını ve DNA-protein arasındaki doğrudan etkileşimleri analiz etmek için kullanılmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda DNA'nın işlenmesini gerektiren nükleer olayların fizyolojik olarak aydınlatılmasına imkan veren bir *in situ* yöntemdir (Spencer ve ark., 2003). ChIP yöntemi uygulanırken ilk olarak hücreler formaldehitte sabitlenir (Şekil 10). Formaldehit hücre içinde meydana gelen DNA-protein etkileşimlerini kovalent bağ oluşturmak suretiyle sabitleyerek korur. Ardından hücreler parçalanarak kromatin elde edilir ve sonikasyon yöntemiyle veya enzimatik kesim yoluyla kromatin parçalara ayrılır. Kromatin parçaları belirli bir proteine veya histon modifikasyonlarına spesifik bir antikor kullanılarak immünopresipitasyona tabi tutulur. İmmünopresipite DNA'lar saflaştırılır ve bu aşamadan sonra kullanılacak çeşitli yöntemlerle genomun zenginleştirilen belirli bir bölgesi veya özel bir DNA dizisi belirlenebilir (Şekil 1.13; Kuo ve Allis, 1999; Solomon ve

Varshavsky, 1985; Thorne ve ark., 2004; Nelson ve ark., 2006; Nelson ve ark., 2009; Spencer ve ark., 2003).

Günümüzde hücre içi DNA-protein etkileşimlerinin analizinde yaygın olarak kullanılan ChIP yönteminin tamamen uygulanması için birkaç günlük zaman dilimi gerekmektedir. Ayrıca DNA izolasyonu için sürekli tüp transferleri, fenol-kloroform ve kolon kullanımını kaçınılmazdır. Bununla beraber klasik ChIP yöntemi çok örnekli çalışmalarda da zorluklara neden olmaktadır. Bu nedenle bugüne kadar ChIP protekollerinin birçok farklı versiyonu yayınlanmıştır. Weinmann ve ark (2001) E2F tarafından regüle edilen proteinleri tanımlamak için klasik ChIP yöntemini modifiye ederek *in vivo* ortamda güçlü ve zayıf E2F bağlanma bölgeleri içeren dokuz kromatin parçası klonlamıştır. Sonuçta ChIP yönteminin E2F ile düzenlenen promoterları belirlemede kullanılabileceğini göstermiştir.

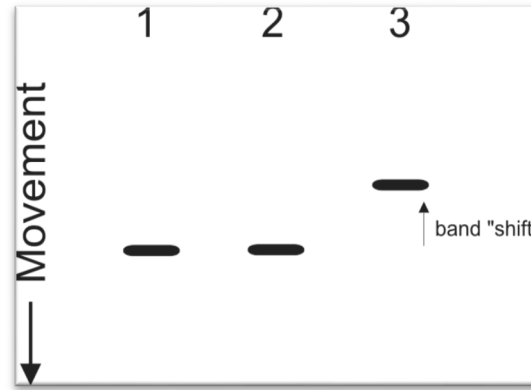
Ayrıca Nelson ve ark. (2006) Chelex-resin kullanımına dayalı yeni bir ChIP metodu geliştirmiştir. Weinmann ve Farnham (2002) DNA-transkripsiyon faktörü arasındaki ilişkiyi incelemek için standart ChIP protokolü üzerinde modifikasyonlar yaparak memeli hücrelerindeki transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerini belirlemeye çalışmıştır. Farklı bir araştırmada hem asetilenmiş histonlarla hem de transkripsiyon faktörleri ile ilişkili DNA dizilerini analiz etmek için yeni bir ChIP protokolü oluşturulmuş ve yöntemi optimize etmeye yönelik çeşitli yollar tartışılmıştır (Spencer ve ark., 2003). ChIP yöntemine yönelik günümüzde ticari olarak temin edilebilen ChromatrapTM, ChIP-ITTM Express, EZ-ChIPTM, SimpleChIP[®] ve ExactaChIPTM gibi birçok deney setleri mevcuttur. Bu tez çalışmasında ise mevcut ChIP protokollerinden yararlanarak hedef proteine özel antikor kullanmaksızın, *in vitro* uygulamaya elverişli, prokaryotik hücreler için kullanılabilen yeni bir ChIP yöntemi oluşturulmuştur.



Şekil 1.10 : Kromatin immünpresipitasyon (ChIP) yönteminin genel akış şeması (Spencer ve ark. 2003).

1.6.2 EMSA yönteminin (Electrophoretic Mobility Shift Assay) genel özellikleri

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) aynı zamanda “gel shift”, “gel retardation”, “mobility assay” veya “elektro hareket kayma analizi” olarak da bilinir. ChIP, DNaseI footprinting yöntemleri gibi EMSA yöntemi de DNA-protein etkileşimlerini incelemek amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. EMSA yönteminin prensibi, protein bağlı DNA’nın serbest DNA’ya göre jelde daha yavaş yürütmesine dayanır. DNA-protein komplekslerinin elektroforetik dağılımlarındaki bu farklılık etiketli DNA bandının yürütmesinde bir “shift (kayma)” olarak görüntülenebilir (Şekil 1.11; Garner ve Revzin, 1981; Hellman ve Fried, 2007; Fried, 1989; Lane, 1992, Gaudreault, 2009).



Şekil 1.11 : EMSA yönteminin temel prensibi. 1. Serbest DNA parçası uzunluğuna, moleküler ağırlığına ve elektrik akımının etkisine bağlı olarak jelde belirli bir mesafeye kadar ilerler. 2. DNA parçası, kendisine bağlanma özelliği olmayan bir proteinle muamele edildikten sonra yürütülürse serbest DNA ile aynı yürütme profilini gösterir. 3. DNA parçasına ilgili proteinin bağlanması sonucunda DNA-protein kompleksi oluşur ve serbest DNA’dan daha ağır bir kütle meydana gelir. Bu ağırlık farkına bağlı olarak DNA-protein kompleksi, serbest DNA’ya göre daha kısa mesafeyi katedebilir. Jel üzerinde bantlar arasındaki yürütme farkı protein ve DNA arasındaki affiniteyi gösterir.

Klasik EMSA yönteminde protein ve nükleik asit çözeltileri uygun bağlanma tamponunda bir araya getirilir ve belirli bir bağlanma süresinden sonra karışım, doğal şartlarda (denatüre etmeyen) poliakrilamid veya agaroz jelde elektroforeze tabi tutulur. Elektroforez sonunda özel boyalar yardımıyla DNA bantları görünür hale getirilir. Bu uygulamada radyoaktif ve radyoaktif olmayan prosedürlerin kullanılması mümkündür (Berger, 1993; Varshavsky, 1987). Marker olarak serbest (proteinsiz) DNA kullanılır. Genel olarak, proteinlerin bağlanması sonucu oluşan DNA-protein kompleksleri serbest DNA’dan yavaş yürütürler ve bu sayede jel üzerinde serbest

DNA'ya göre daha az yürümüş bantlar (shift = kayma) belirir. Jel üzerindeki bu kayma profillerine bakılarak incelenen DNA ve protein arasındaki etkileşimlere yönelik kalitatif ve kantitatif analizlerin yapılması mümkündür (Fried ve Crothers, 1981; Ausubel-Frederik, 1994; Fried ve Liu, 1994; Fried, 1989; Smith ve Humphries, 2009).

1.7 Tezin Amacı

Bu çalışmada ilk olarak *B. subtilis* genomunda, LutR transkripsiyon faktörünün direk kontrolü altında bulunan genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *E. coli* pQE60::*lutR* suşunda heterolok üretilen ve saflaştırılan LutR proteini ile *B. subtilis* PY79 suşuna ait kromozomal DNA kullanılarak *in vitro* kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yöntemi uygulanmıştır. ChIP yöntemi sonucunda belirlenen aday genlere LutR proteininin doğrudan bağlandığı, EMSA yöntemiyle *in vitro* olarak doğrulanırken, söz konusu etkileşimin gen ifadesinde pozitif veya negatif yöndeki etkisini belirlemek amacıyla RT-qPCR yönteminden yararlanılmıştır.

Dr. Öykü İrigül-Sönmez'in doktora tez (2012) çalışması kapsamında, *B. subtilis* genomunda direk LutR'in kontrolü altında bulunan genlerin belirlenmesi amacı ile, *lutR::Tn10* mutant fakat *amyE* lokusunda ektopik *lutR* geni içeren *amyE::Pspac::lutR* mutant *B. subtilis* PY79 suşunda, IPTG ile indüklenmesi ile *lutR* geninin aşırı ifade edilmesi sağlanmış ve bunun neticesinde transkripsiyon seviyesi etkilenen genler mikroarray analizleri ile belirlenmiştir. Bu çalışma neticesinde *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerinin transkripsiyon seviyelerinin LutR in direk kontrolü altında olabileceği anlaşılmıştır. Bu bulguların devamı olarak, bu tez kapsamında, söz konusu *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerinin gerçekten LutR'in direk kontrolü altında olup olmadıkları araştırılmıştır.

Bunların yanısıra, daha öncede bahsedildiği gibi, gerek grubumuzda yürütülen çalışmalar gerekse diğer araştırmacılar tarafından yapılan araştırmalar, pek çok genin regülasyonunda SinR global regülatör proteininin LutR ile beraber hareket ettiğini göstermiştir. Bu bilgi doğrultusunda, tez kapsamında yapılan bütün EMSA analizlerinde LutR ve SinR proteinleri birlikte kullanılarak, ilgili genler üzerindeki olası doğrudan etkileri, aynı zamanda eş zamanlı mı yoksa yarışmacı olarak mı etki gösterdiklerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Deneyisel analizlere paralel olarak, karşılaştırmalı *in silico* analizler ve karakterizasyon çalışmalarıyla LutR proteinine ait ileride deneyisel olarak kullanılabilecek biyoinformatik verilerin elde edilmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçla iki analiz yolu takip edilmiştir. İlk analiz yolunda, çeşitli biyoinformatik araçlar yardımıyla farklı türlere ait LutR proteinlerinin fizikokimyasal, yapısal ve filogenetik özellikleri incelenerek LutR'ın türler arasındaki benzerlik ve farklılıklarının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. İkinci analiz yolunda ise LutR proteininin DNA bağlanma bölgelerine yönelik tahminde bulunabilmek amacıyla, sadece *B. subtilis* 168 suşuna ait LutR proteininin, kristallografik analizleri tamamlanmış ve yapısı iyi bilinen GntR-HTH-tip transkripsiyon faktörleri FadR ve YvoA ile PyMOL programı yardımıyla yapısal olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1 Materyaller

2.1.1 Bakteri türleri ve plasmidler

Bu çalışmadaki kromozomal DNA izolasyonlarında ve gen ifade düzeylerinde yabani tip olarak *B. subtilis* 168 standart suşunun prototrofik bir türeği olan *B. subtilis* PY79 kullanılmıştır. *B. subtilis* kromozomal DNA'sının klonlanması için konak hücre olarak *E. coli* Top10F' [*lacIq* TN10 (Tetr)}, *mcrA* Δ (*mrr hsdRMS-mrcBC*), *f80lacZΔM15 ΔlacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139 Δ(ara-leu)7697*, *galU*, *galK*, *rsL*,(*strr*), *endA1*, *nupG*) suşu kullanılmıştır.

LutR ve SinR proteinleri Dr. T. Ebru Köroğlu ve Dr. Öykü İrigül-Sönmez tarafından oluşturulan *E. coli* (pQE60::*lutR*) ve *E. coli* (pQE60::*sinR*) suşlarından büyük ölçekte üretilmiş ve saflaştırılmıştır. *yuxO* geninin ifade seviyelerini analiz etmek için Dr. T. Ebru Köroğlu tarafından oluşturulan TEK1 (*yvfI::Tn10::spc*) suşu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan bütün suşlar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. PCR ürünlerinin klonlanması amacıyla pGEM-T ve pDRIVE klonlama vektörleri kullanılmıştır (Şekil 2.1-Şekil 2.2). LutR proteininin üretimi için pQE60 ekspresyon vektörü kullanılmıştır (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1 : Bakteri suşları ve genel özellikleri.

Suşlar ve Plasmidler	İlgili Genotip, Fenotip ve/veya Özellikler	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	Yabani tip, BSP cured prototrophic derivative of <i>B.subtilis</i> 168'in prototrofik türeği	P.Youngman
<i>E.coli</i> Top10F'	<i>lacIq</i> TN10 (Tetr)}, <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mrcBC</i>), <i>f80lacZΔM15 ΔlacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139 Δ(ara-leu)7697</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rsL</i> ,(<i>strr</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	M.A. Marahiel
pHis6- <i>yvfI</i>	<i>E. coli</i> (pQE60:: <i>yvfI</i>)	T.E.Köroğlu,
pHis6- <i>sinR</i>	<i>E. coli</i> (pQE60:: <i>sinR</i>)	Ö. İrigül-Sönmez
<i>Bacillus subtilis</i> TEK1	<i>yvfI::Tn10::spc</i>	T.E.Köroğlu

2.1.2 DNA and protein belirteçleri (Marker'lar)

Kullanılan DNA and protein belirteçleri Ek D'de verilmiştir.

2.1.3 Laboratuvar ekipmanları

Laboratuvar ekipmanları Ek F'de listelenmiştir.

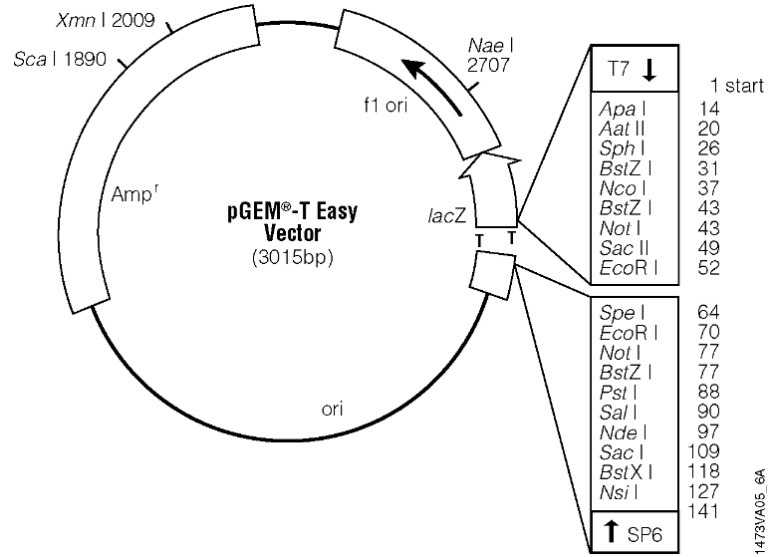
2.1.4 Bakteri suşlarının üretimi ve muhafazası

B. subtilis PY79 ve *E.coli* suşları Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde üretilmiş ve Luria-Bertani (LB) agar petrilerinde +4 °C'ta saklanmıştır. Bütün kültürler 4°C'ta saklanmış ve alt kültürler aylık olarak yenilenmiştir. pHis6-*yvfI* ve pHis6-*sinR* suşları ve diğer suşların uzun süreli muhafazası için 10% LB gliserol stokları hazırlanmış ve -80 °C'ta depolanmıştır. *E.coli* Top10F' suşu için seçici antibiyotik olarak Ampisilin (100 µg/ml Amp) ve Tetrasiklin (15 µg/ml Tet) kullanılmıştır.

2.1.5 pGEMT-Easy klonlama vektörü

Çok kopyalı pGEM®-T Easy Vector, Promega'dan temin edilmiş ve PCR ürünlerinin veya ChIP-DNA'ların klonlanması için kullanılmıştır (Şekil 2.1). pGEM®-T Easy vektörü her iki ucunda 3' terminal timidin (T) içermektedir. İnsersiyon bölgesindeki bu 3'-T uzantıları (-TTTTTT...) vektörün kendi kendine tekrar halkasal hale gelmesini engelleyerek ve ısıya dayanıklı belirli polimerazlar tarafından üretilen PCR ürünleri için uygun uzantılar sağlayarak, PCR ürünlerinin veya poli-A kuyruğu eklenmiş ChIP-DNA'ların (PATA-ChIP-DNAs) plazmide bağlanma (ligation) etkinliğini büyük ölçüde artırmaktadır (Promega 1998). Söz konusu polimerazlar çoğaltılan DNA parçalarının veya PATA-ChIP-DNA'ların 3'-uçlarına, her hangi bir kalıp kullanmaksızın, genellikle tek zincirli deoksiadenozin (dATP) eklerler.

pGEM®-T Easy vektörü, β-galaktosidaz enziminin α-peptit kodlama bölgesinde yer alan çoklu klonlama bölgesine (MCS) komşu olan T7 ve SP6 RNA Polimeraz promotorlarına sahiptir. α-peptidin insersiyonel inaktivasyonu indikatör petrilerde renk tarama yöntemiyle rekombinant klonların doğrudan tanımlanmasına imkan vermektedir.



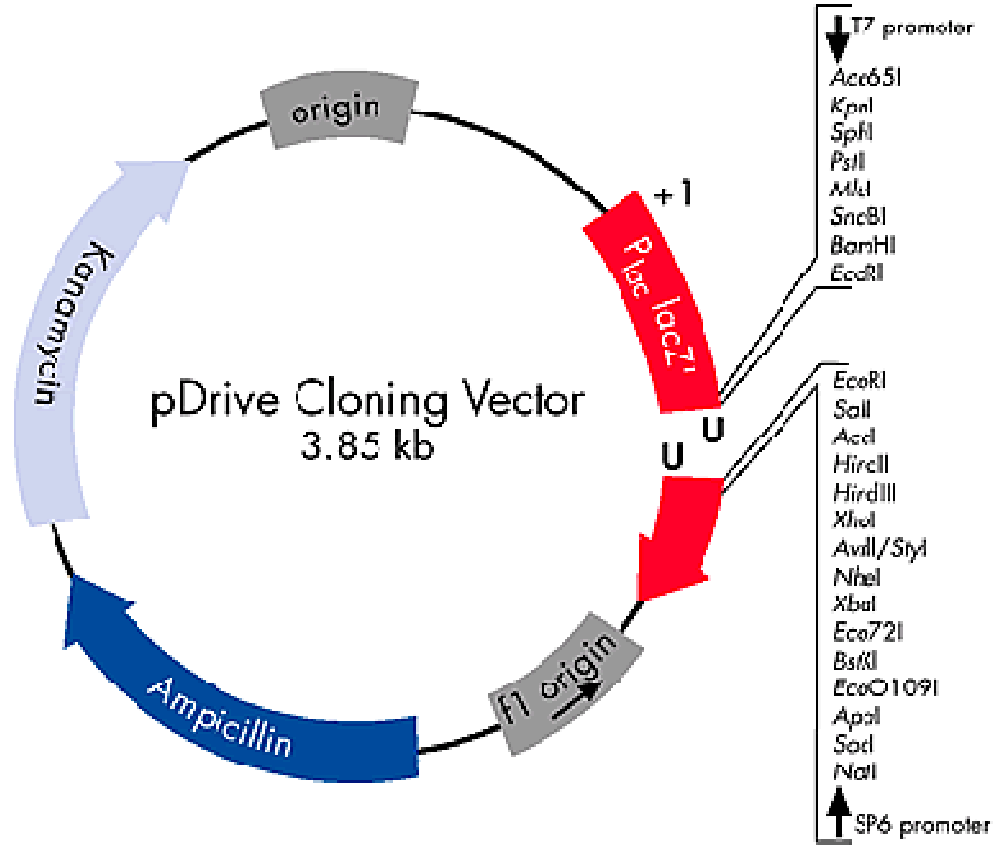
Şekil 2.1 : pGEM-T Easy klonlama vektörünün genetik haritası (Promega, 1998).

pGEM®-T Easy vektörü MCS içerisinde çoklu restriksiyon bölgeleri içermektedir (Şekil 2.1). Bu restriksiyon bölgeleri tek bir restriksiyon enzimi ile kesildiğinde insörtün serbest kalması mümkün olmaktadır. pGEM®-T Easy vektöründeki MCS bölgesi EcoRI, BstZI and NotI restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerine komşudur. Bu konumlanma üç farklı enzimle tek-enzimli kesim yapıldığında insertün plasmitten ayrılmasını sağlamaktadır. İnsörtün serbest kalması için alternatif olarak çift-kesim yapılması da mümkündür.

2.1.6 pDRIVE klonlama vektörü

pDrive Klonlama Vektörü, QIAGEN'den her iki ucunda U uzantısı bulunan lineer bir yapıda temin edilmiştir (Şekil 2.2). Bu vektör PCR ürünlerinin her iki ucunda bulunan A-uzantılarını kullanmaktadır. Aynı şekilde, Taq polimerazla veya düzeltme özelliği olmayan (non-proofreading) benzer diğer polimerazlarla üretilen poli-A eklenmiş ChIP-DNA'ların uçlarındaki A-uzantıları da bu vektörün kullanımı için uygundur. Bu nedenle PCR ürünlerinin ve ChIP-DNA'ların doğrudan ligasyonu için uygun bir vektördür (Qiagen, 2001).

pDRIVE vektörü ampicillin ve kanamisin seçilimine imkan verir. Klonlama bölgesinin civarında birkaç tane tekli restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi içerdiği için rekombinant plasmitlerin restriksiyon analizi pDRIVE vektörüyle kolaylıkla yapılabilir (Şekil 2.2). Ayrıca mavi/beyaz koloni tarama özelliğine de sahip olması sayesinde klonlama amacıyla da kullanılması mümkündür.

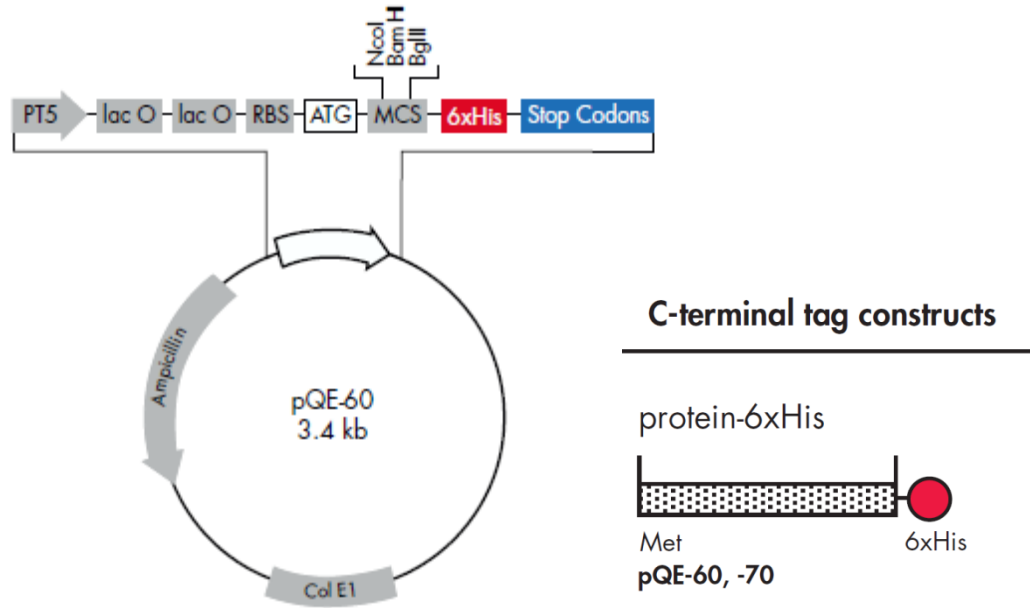


Şekil 2.2 : pDrive klonlama vektörünün genetik haritası (Qiagen, 2001).

Klonlanmış PCR ürünlerinin transkripsiyonunun gerçekleştirilmesi, bunun yanı sıra dizi analizlerinin yapılabilmesi için klonlama bölgesinin her iki tarafında bulunan T7 ve SP6 promoterlarını içermektedir. Buna ek olarak, pDRIVE Klonlama vektörü tek zincirli DNA üretmek için faj f1 orjinine sahiptir.

2.1.7 pQE60 ekspresyon vektörü

pQE vektör ailesinin bir üyesi olan pQE60 Ekspresyon Vektörü, Qiagen'den temin edilmiştir. Bu vektör hedef proteinimiz olan LutR'ın (veya herhangi bir hedef proteinin) ifade edilmesini, saflaştırılmasını ve saptanmasını sağlamaktadır. Az kopyalı (low-copy) pQE60 vektörü, *E. coli* RNA polimeraz tarafından tanınan faj T5 promoter'ından oluşan bir optimize promoter-operator elementine sahiptir (Qiagen, 2010). Ayrıca *lac* represörünün bağlanmasını arttıran ve güçlü T5 promoter'ının etkili bir şekilde represyonunu sağlayan iki adet *lac* operator dizisi taşımaktadır (Şekil 2.3). T5 promoter transkripsiyon-translasyon sisteminden dolayı, pQE60 vektörünü kullanarak 6xHis-kuyruğu ekli proteinlerin *E. coli*'de yüksek miktarlarda ifade edilmesi mümkündür. Ayrıca, sentetik ribosomal bağlanma bölgesi RBSII büyük oranlarda translasyonu sağlamaktadır.



Şekil 2.3 : pQE60 gen ifade vektörünün genetik haritası ve C-terminal 6xHis kuyruk yapısı (Novagen, 2001).

pQE60 vektörü, ekspresyon konstraktlarının uygun formlarındaki bütün okuma çerçevelerinde çoklu klonlama bölgesi, translasyonel stop kodon ve klonlama bölgesinin 3' ucunda 6xHis-kuyruğu kodlama dizisine sahiptir (Şekil 2.3). İki adet güçlü transkripsiyonel terminatör (*E. coli*'de λ fajına ait t_0 ve *rrnB* operonuna ait T1) transkripsiyonun rastgele gerçekleşmesini engeller ve ekspresyon konstraktının sağlamlığını sağlar.

pQE60 vektörü β -lactamaz (bla) geni sayesinde 100 μ g/ml ampisilline karşı bir direnç kazandırır. t_0 ve T1 arasında yer alan kloramfenikol asetil transferaz (CAT) ifade edilmez. Ek olarak pQE60 vektörü ColE1 orjiniinin replikasyonunu yapar (Şekil 2.3).

2.1.8 *In silico* analiz araçları

LutR proteinine yönelik biyoinformatik analizlerde çeşitli araçlar kullanılmıştır. Bu araçlar şunlardır: NCBI Entrez Protein Database, ClustalW2 Sequence Aligment, MEGA 5.2.2, ExPasy's Server, MEME Suit Server, UniProt Server, SubtiList Server, Protein Data Bank (PDB), PyMOL Programı.

2.2 Metodlar

2.2.1 Plazmid DNA izolasyonu

E.coli plazmid DNA izolasyonu manuel olarak veya “Qiagen Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)” deney setleriyle üretici firmanın hazırladığı kullanım kılavuzu dikkate alınarak yapılmıştır.

Manuel plazmid izolasyonunda, bakteri kültürleri bir gecelik periyotlarda üretilmiş ve oluşan hücreler 5.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 300 µl P1 tamponuyla (Ek B) resüspanse edilmiştir. Süspansiyonun üzerine 300 µl P2 tamponu (Ek B) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. 5 dakikalık beklemenin ardından 300 µl P3 tamponu (Ek B) eklenmiş ve lizat vizkoz hale gelinceye kadar tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır. Tüpler 15 dakika buzda bekletildikten sonra 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı 1,5 ml’lik yeni bir tüpe aktarılmış ve 0.7 hacim izopropanol eklenerek plazmid DNA çöktürülmüştür. 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen pelet 1 ml % 70’lik etanolle yıkanmıştır. 13000 rpm’de 5 dakika yapılan son santrifüjle üst sıvı, yani etanol atılmış ve etanol kalıntıları tüplerin 37°C’ta 30 dakika bekletilmesiyle kurutularak uzaklaştırılmıştır. Son olarak pelet 15 µl EB tamponuyla 37°C’ta 200 rpm’de çözülmüş ve -20°C’ta saklanmıştır. İzole edilen plazmid DNA’lar % 0.8’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

2.2.2 Kromozomal DNA izolasyonu

B. subtilis PY79 suşuna ait kromozomal DNA, *Bacillus* türleri için oluşturulan standart prosedürle veya alternatif olarak “Qiagen-tips 20 (Qiagen Inc., Valencia, CA)” deney seti kullanılarak izole edilmiş ve saflaştırılmıştır.

Standart prosedüre göre, *B. subtilis* PY79’a ait bir gecelik kültürden 1.8 ml alınarak 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pelet 576 µl TE tamponuyla vorteks yapılarak resüspanse edilmiştir. Üzerine 6 µl RNase (10 mg/ml), 10 µl proteinaz K (20mg/ml), 24 µl lizozim (100mg/ml) ve 30 µl 10 % SDS eklenmiş ve karışım 37 C’ta 1 saat bekletilmiştir. 100 µl 5M NaCl çözeltisi karışımın üzerine eklenmiş ve vorteks yapmadan pelet oluşumu gözleninceye kadar karıştırılmıştır. Önceden 65°C’ta ısıtılmış 80 µl CTAB/NaCl çözeltisi eklenmiş ve karışım 10 dakika 65°C’ta bekletilmiştir. Ardından örnek, yeni hazırlanmış fenol:kloroform:izoamilalkol

(25:24:1) çözeltisiyle ekstrakte edilmiş ve 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni bir 1.5 ml’lik tüpe aktarılmış ve 0.7 hacim izopropanolle karıştırıldıktan sonra 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet 1 ml %70 etanolle yıkanarak 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol atıldıktan sonra etanol kalıntıları 37 °C’ta yaklaşık 1 saat bekletilerek uzaklaştırılmış ve oluşan pelet 10 µl TE tamponunda çözülmüştür. İzole edilen kromozomal DNA’lar 37°C’ta 3 saat çalkalandıktan sonra +4° C’ta saklanmıştır. İzole DNA’lar %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Konsantrasyonlarını belirlemek için 260nm ve 280nm’deki absorbansları okunmuş ve saflıkları NanoDrop cihazında belirlenmiştir.

2.2.3 RNA izolasyonu

B.subtilis hücreleri GSBMM (Glucose Salt-Based Minimal Medium) besiyerinde (EK A) üretilmiş ve santrifüj yapılarak pelet halinde toplanmıştır. Total DNA izolasyonunda 1 mg RNA bağlama kapasitesi sahip “Qiagen RNeasy Midi Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)” deney seti kullanılmıştır. 10.000 g’de 5 dakika santrifüj yapılarak toplanan hücre peleti izolasyondan önce -80 °C’ta depolanmıştır. İzolasyon işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve RNA degradasyonunu engellemek için RNAz’sız ortam şartları sağlanmıştır. Santrifüj işlemleri, aksi söylenmediği sürece, 11000 rpm’de 15-30 saniye yapılmıştır. Guanidin hidroklorid içeren RLT Liziz tamponuna, kullanılmadan hemen önce β-merkoptoetanol (β-ME) eklenmiştir (1 ml RLT tamponu için 10 µl β-ME). Herhangi bir DNAz kontaminasyonu olmaması için, kullanılan kolonlarda “RNase free DNase Kit (Qiagen)” deney setiyle DNAz-I kesimi yapılmıştır. Peletler -80 °C’tan çıkartılıp buzda bekletilerek çözülmüş ve her bir tüpe 3 mg/ml lizozim içeren TE tamponundan 100 µl ekleyip vorteks yapılarak peletler resüspanse edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında beklettikten sonra üzerine 250 µl % 96’lik etanol eklenmiş ve santrifüj yapmadan pipetajla karıştırılmıştır. Örnekler RNeasy kolonlarına aktarıldıktan sonra santrifüj yapılmıştır. Alt sıvı atıldıktan sonra kolonlara 350 µl RW1 tamponu eklenmiş ve santrifüj yapılarak alt sıvı atılmıştır. DNA kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla membran üzerine RDD tamponu ve DNaz-I karışımından 80 µl damlatılmıştır (10 µl DNaz-I + 70 µl RDD tamponu). Oda sıcaklığında 350 µl RW1 tamponu eklendikten sonra santrifüj yapıp, alt sıvı atıldıktan sonra toplama tüpleri değiştirilmiştir. 500 µl RPE tamponu eklenerek santrifüj işleminden sonra alt sıvı atılmış ve bu basamak bir kez daha

tekrarlanmıştır. İkinci kez RPE tamponu eklendiğinde santrifüj 2 dakika süreyle yapılmış ve alt sıvı atılmıştır. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek tamamen kurumaları için kolonlar tekrar santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında kolonlar 1,5 ml'lik tüplere yerleştirildikten sonra doğrudan membran üzerine 50 µl RNaz'sız su damlatılmış ve 0.2 µl 'lik tüplere 10 µl'lik alikotlar yapılmıştır. Örnekler sıvı nitrojenle dondurulduktan sonra -80 °C'ta saklanmıştır.

2.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Hedef DNA bölgelerini çoğaltmak için Taq DNA polimeraz veya Pfu DNA polimeraz enzimleri ile birlikte genel Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polimerase Chain Reaction, PCR) metodları kullanılmıştır. Kullanılan oligonükleotit primerler Çizelge 2.2.'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2 : Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin listesi.

yuxO.QPCR.forward	5'-tca gtg gcc ctg gcg gaa-3'
yuxO.QPCR.reverse	5'-cag cct ctc ttg ctc gtc-3'
yuxO.Emsa.forward	5'-cca cgt act caa cgg aga aat-3'
yuxO.EMSA.reverse	5'-ctc aat acc aag cgc ttc aag-3'
yvnB.EMSA.forward	5'-tga ggt gat cgt gat gtt gtg-3'
yvnB.EMSA.reverse	5'-atg gcc gcc aga caa aac gga-3'
rpsP.EMSA.forward	5'-cag ccg gat att atc aat gcc 3'
rpsP.EMSA.reverse	5'-tgc tcc cat acg ttt taa acg 3'
ytsD.EMSA.forward	5'-ccg ctg gaa gag cgt tta ttc 3'
ytsD.EMSA.reverse	5'-caa att tcg cag gat gag ctg 3'
yodT.EMSA.forward	5'-ctt ggc ccg cat aaa atg tcg3'
yodT.EMSA.reverse	5'-cga gct aag ctc tgg ctt aat 3'
yvsG.EMSA.forward	5'-tgc aca gct tct tga agc gga 3'
yvsG.EMSA.reverse	5'-agc gat gcc tcc cat gat gtg 3'
yutK.EMSA.forward	5'-ccc aac ctt gat gtc ctt gaa 3'
yutK.EMSA.reverse	5'- cgc gat agc aat gat cgc aac 3'
lrpB.EMSA.forward	5'-gtt acc ttc tgt gat atg ctg 3'
lrpB. EMSA.reverse	5'-ttc ttt cca ttg tat ccg agc 3'
nasA.EMSA.forward	5'-taa ttg gga tgc ggc tcg ctt 3'
nasA. EMSA.reverse	5'- agt gag tgg atg acc gct agt 3'

Kalıp olarak *Bacillus subtilis* PY79 kromosomal DNA veya ilgili plasmid DNA kullanılmıştır. Her iki DNA polimeraz enzimi için Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'de belirtilen kendilerine özel reaksiyon karışımları kullanılmıştır. Primerlerin ve

dNTP'lerin final konsantrasyonları sırasıyla 0.5 μ M ve 0.2 μ M dır. PCR reaksiyon şartları genellikle aynı olup denatürasyon (denaturation), bağlanma (annealing) ve uzama (extention) olmak üzere 3 ana adımdan oluşmaktadır. PCR şartları sadece ileri ve geri primer çiftlerine bağlı olarak “bağlanma sıcaklığı (Tm)” açısından farklılık göstermiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.3 : Itaq DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon karışımı.

Bileşenler	20 μl	50 μl
1 10 X Itaq tamponu	2	5
2 dNTP	2	5
3 İleri Primer	0.5	1
4 Ters Primer	0.5	1
5 Kalıp DNA	1	1
6 Itaq DNA polimeraz	0.5	0.5
7 dH ₂ O	13.5	36.5

Çizelge 2.4 : Pfu DNA polimeraz için PCR reaksiyon karışımı.

Bileşenler	20 μl	50 μl
1 10 X Pfu tamponu	2	5
2 dNTP	2	5
3 İleri Primer	0.5	1
4 Ters Primer	0.5	1
5 Kalıp DNA	1	1
6 Pfu DNA polimeraz	0.5	0.5
7 dH ₂ O	13.5	36.5

Çizelge 2.5 : PZR reaksiyon şartları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Tekrar
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	1'	1 kez
Denatürasyon	94 °C	1'	30 döngü
PrimerBağlama (Annealing)	51 °C	1'	
Ekstansiyon	72 °C	1'	
Son Ekstensiyon	72 °C	15'	1 kez
Bekleme	4 °C	∞	1 kez

2.2.5 DNA dizi analizi için PCR yöntemi

ChIP deneylerine ait transformasyon taramalarında, EcoRI enzim kesimi sonucunda agaroz jelde bir bant/bantlar belirlendikten sonra, bu insertleri taşıyan kolonilere ait plasmidler, DNA Dizi PCR'ında kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Dizilemede kullanılan primerler M13-İleri veya M13-Ters primerileridir. Her bir Dizi PCR'ında bu primerlerden sadece biri kullanılmıştır. Dizi PCR'ında kullanılan bileşenler Çizelge 2.6'da verilmiştir. Dizi PCR'ında başlangıç sıcaklığı 95 °C'dır (5 dakika). Çizelge 2.7'de belirttiği gibi 30 döngü süresince denatürasyon sıcaklığı 95 °C (30 saniye), bağlanma sıcaklığı 50 °C (10 saniye) ve uzama sıcaklığı 60 °C (4 dakika)'dır.

Çizelge 2.6 : Dizileme PCR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
1 5x Reaksiyon Tamponu	2 µl
2 M13-Primer (İleri veya Ters) (10 pmol)	1 µl
3 Big Dye Terminator v3.1	2 µl
4 Kalıp DNA	1 µl
5 dH2O	4 µl
TOPLAM	10 µl

Çizelge 2.7 : Dizileme PCR reaksiyon şartları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Tekrar
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5'	1 kez
Denatürasyon	95 °C	30"	
Primer bağlama (Annealing)	50 °C	10"	30 döngü
Ekstensiyon	60 °C	4'	
Son ekstensiyon	60 °C	1'	1 kez
Bekleme	4 °C	∞	1 kez

Dizi PCR'ı tamamlandıktan sonra, reaksiyon içeriğini saflaştırmak için: 25 µl %96 etanol ve 1 µl 3 M sodyum asetat (pH:8) çözeltisi, 10 µl'lik PCR reaksiyon karışımı üzerine eklenmiş ve reaksiyon tüpü 15 dakika buzda bekletilmiştir. Karışım 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Pellet 250 µl % 70 etanolla yıkanıp 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra etanol kalıntıları 95 °C'ta 4 dakika bekletilerek kurutulmuştur. Son olarak pellet üzerine 20 µl formamid eklendikten sonra dizi analizi yapılncaya kadar karanlık bir ortamda

+4°C'ta saklanmıştır. Dizi analizi için Applied Biosystem (ABI) tarafından temin edilen çeşitli özel yapılarla birlikte Avant 3130 Genetic Analyzer (50 cm uzunluğunda kapiller dizilerle birlikte POP7 polimeri) cihazı kullanılmıştır.

2.2.6 PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyonu

ChIP-DNA'lar sonikasyonla elde edildikleri için teorik olarak farklı tipte uçlara sahiptirler. Bu nedenle normal PCR ürünlerinden farklıdır: 5'-uzantılı veya 3'-uzantılı olabilecekleri gibi kör uçlu da olabilirler; ayrıca uygun bir vektöre klonlanmak için poli-A kuyruğundan da yoksundurlar. Bu sorunu telafi etmek için, Itaq DNA polimerazın dATP ekleme özelliğinden yararlanılmıştır. Bunun için kullanılacak birkaç alternatiften biri Taq DNA polimeraz ve dATP kullanılarak ChIP-DNA'ların 3' uçlarında tek zincirli DNA (-AAAAA...) oluşturmaktır.

Taq DNA polimerazın kendine özgü ve önemli özelliklerinden biri, DNA parçaları PCR ile çoğaltılırken kalıp DNA'ya ihtiyaç duymaksızın kör uçlu çift zincirli DNA'nın 3' ucuna bir veya birden fazla dNTP eklemesidir. Reaksiyonda dört nükleotidin (A, T, G, C) karışımı varsa bu enzim dört nükleotitten herhangi birini ekleyebilir. Ancak, şuan için nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, dATP nükleotidini eklemeyi tercih etmektedir (Clark, J. M., 1988). Bu işlemin ardından poli-A ekli ChIP-DNA'lar, her iki ucunda poli-T uzantıları bulunan uygun bir vektöre T/A klonlama yöntemiyle klonlanabilir.

Yukarıda bahsedilen özellikler, tez çalışması kapsamında uygulanan ChIP deneylerine adapte edilmiş ve aşağıdaki adımlar takip edilmiştir: DNA-protein komplekslerini elde etmek için "Ni-NTA-Resin Protein Purification System" deney seti ile protein izole edildikten sonra, proteinler uzaklaştırılarak ChIP-DNA'lar DNA-protein kompleksinden saflaştırılmıştır. Bu DNA parçalarının 3' uçlarına poli-A kuyruğu eklemek için 2 µl 10x Itaq tamponu, 2 µl dATP, 8 µl ChIP-DNA, 0.5 µl Taq DNA polymerase and 7.5 µl dH₂O eklenmiştir. Toplam hacim Çizelge 2.8'de gösterildiği gibi 20 µl olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon adımları Çizelge 2.9'da belirtilmiştir. Poli-A ekli ChIP-DNA'lar (PATA-DNA) -20 C'ta saklanmış ve pGEM-T easy veya pDRIVE vektörlerine klonlamak için kullanılmıştır.

Çizelge 2.8 : Taq DNA polimeraz ile PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyonu.

	Bileşenler	Miktar
1	Taq Tamponu (10x)	2 µl
2	dATP	2 µl
3	ChIP-DNA	8 µl
4	Taq DNA polimeraz	0.5 µl
5	dH ₂ O	7.5 µl
	Toplam	20 µl

Çizelge 2.3 : PolyA-kuyruğu ekleme reaksiyon şartları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	4'
PolyA ekleme	72 °C	30'
Bekleme	4 °C	∞

2.2.7 Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez için kullanılan agaroz jelin konsantrasyonu kullanılan DNA materyalinin tipine bağlı olarak Çizelge 2.10'daki gibi seçilmiştir. Elektroforez işlemi yatay bir elektroforez tankında uygulanmıştır. DNA örneklerinin elektroforezi, final konsantrasyon olarak 1xTAE tamponu (Ek B) ve 0.2 µg/ml etidyum bromid içeren nötral agaroz gel sisteminde yapılmıştır. Örnek miktarına bağlı olarak jel yükleme boyası (6X) eklenmiştir. Elektroforez işlemi bromofenol-blue boyası örneklerin uygun uzaklığa yürütüldüğünü gösterinceye kadar 80-120 Voltta 35-50 dakika süreyle uygulanmıştır. DNA bantları kısa dalgalı UV transillüminatör (UVP) cihazıyla görüntülenmiş ve Vilber Lourmat Gel Imaging System ile fotoğraf çekilmiştir. DNA bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek için çeşitli tiplerdeki DNA belirteçleri kullanılmıştır.

Çizelge 2.10 : Farklı örnekler için agaroz jel konsantrasyonları.

Örnek	Agaroz konsantrasyonu
Kromozomal DNA	% 0.6
Plasmid DNA	% 0.8
Plasmis enzim kesim ürünleri	% 1
PCR ürünleri	% 1,5 -2

2.2.8 PZR saflaştırma

PZR saflaştırma işlemi normal PZR reaksiyonundan veya Poli-A ekleme reaksiyonundan sonra QIAquick PCR Purification Kit Protocol talimatlarına göre yapılmıştır. Bu protokole göre, 1 birim PCR örneğine 5 birim PB tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Örneğin, 100 µl PCR ürününe 500 µl PB tamponu eklenmiştir. 2 ml'lik toplama tüpüne bir QIAquick Spin kolonu yerleştirildikten sonra PCR ürünü ve PB tamponu karışımı, DNA'yı bağlamak için QIAquick Spin kolona yüklenmiş ve 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt sıvı atılıp kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 0.75 ml PE tamponuyla yıkandıktan sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt sıvıyı atıp, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilerek maksimum hızda ek bir santrifüj daha yapılmıştır. Bu santrifüjden sonra toplama tüpü de atılmış ve kolon yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiştir. Son olarak, membranın tam ortasına 20-50 µl EB tamponu (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) damlatılmış ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte toplanan ürün -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.9 Gel ekstraksiyon yöntemi

Hedef DNA parçalarını agaroz jelden tekrar geri kazanmak için "MinElute Gel Extraction (Qiagen Inc., Valencia, CA)" deney seti kullanılmıştır. Jel ekstraksiyon işlemi Qiagen'in talimatlarına göre uygulanmıştır: DNA bandını içeren jel parçası ince bir şekilde kesilerek jelden alınıp ağırlığı tartılmıştır. Kesilen jel parçasının ağırlığı 1 birim kabul edilerek 3 birim QG tamponu eklenmiştir. Örneğin 100 mg jel parçası üzerine 300 µl QG tamponu eklenmiş ve eğer renk sarı değilse, üzerine 10 µl 3M sodyum asetat (pH 5.0) eklenmiştir.

Jel parçasını içeren QG tamponu 2-3 dakikada bir kısa vorteks yapılarak 10 dakika süreyle 50°C'ta bekletilmiştir. Jel tamamen eridikten sonra, 1 birim isopropanol eklenmiş karışım MinElute kolona aktarıldıktan sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Ardından alt sıvı atılarak MinElute kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Ek bir 0.5 ml QG tamponu tekrar eklenip santrifüj adımı tekrar edilmiştir. Alt sıvı atıldıktan sonra kolonu yıkamak için 0.75 ml PE tamponu eklenmiştir. Kolon 2-5 dakika bekletildikten sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alt sıvı atıldıktan sonra boş kolon bir veya birkaç kez tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlemin sonunda kolon yeni bir 1.5 ml tüpe yerleştirilmiş ve kolonun

tam ortasına 10 µl EB tamponu damlatılmıştır. Birkaç dakika EB tamponunun tüm kolona yayılması beklendikten sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. 1.5 ml’lik tüpün dibinde plasmid DNA’yı içeren çözelti -20 °C’ta saklanmıştır. Bir miktar alikot alınarak ekstraksiyonu doğrulamak için agaroz jelde yürütülmüştür.

2.2.10 PCR ürünlerinin pGEMT-Easy vektörüne ligasyonu

Ligasyon işleminin kullanım amaçlarından biri poli-A eklenmiş ChIP-DNA’ların pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasıdır. Ligasyon karışımının toplam hacmi 20 µl olup, Çizelge 2.11’de gösterildiği gibi 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl pGEM®-T Easy Vector (50 ng/µl), 1 µl T4 DNA Ligase, 8 µl insert DNA (PATA-DNA)’dan oluşmaktadır. Reaksiyon karışımı 22 °C’ta 1 saat, 16 °C’ta bir gece (16 saat) inkübe edilmiştir. Ligasyon tamamlandıktan sonra karışım *E. coli* Top10F’ hücrelerine transformasyon için kullanılmıştır.

Çizelge 2-4 : pGEM-T Easy vektörü ligasyon reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Miktar
2X Rapid Ligation Buffer	10 µl
pGEM®-T Easy Vector (50 ng/µl)	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
insert DNA (PATA-DNA)	8 µl
TOTAL	20 µl

2.2.11 PCR ürünlerinin pDRIVE vektörüne ligasyonu

Ligasyon reaksiyonunun diğer bir kullanım amacı poli-A eklenmiş ChIP-DNA’ların pDrive vektörüne klonlanmasıdır. Bu vektör, ChIP-DNA parçalarının klonlanmasında alternatif olarak kullanılmıştır. Ligasyonun gerçekleşmesi için 10 µl 2x master mix buffer, 1 µl pDrive vector (50 ng/µl), 6 µl insert DNA (PATA-DNA) ve 3 µl dH₂O eklenerek son hacim 20 µl’ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 16 °C’ta bir gece (16 saat) bekletilmiş ve 70 °C’ta 10 dakikada inhibe edilmiştir. Ligasyon tamamlandıktan sonra karışım *E. coli* Top10F’ hücrelerine transformasyon için kullanılmıştır (Çizelge 2.12).

Çizelge 2-5 : pDRIVE vektörü ligasyon reaksiyon içeriği.

	Bileşenler	Miktar
1	2X Master Mix Buffer	10 µl
2	pDRIVE Vector (50 ng/µl)	1 µl
3	insert DNA (PATA-DNA)	6 µl
4	dH ₂ O	13 µl
	TOPLAM	20 µl

2.2.12 Restriksiyon enzim kesimi

Restriksiyon enzim kesimi ChIP-DNA'ları taşıyan transformantların taranması veya ChIP-insertlerin büyük miktarda elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Plasmidlerin çift kesimi için, klonlama bölgesinin her iki ucunda tanıma bölgesi bulunması nedeniyle EcoRI enzimi kullanılmıştır. Kullanım kılavuzu dikkate alınarak, EcoRI enzimine özgü olan 10X tampon çözeltisi toplam reaksiyon hacminin 1/10 oranında eklenmiştir. 1 µl Plasmid DNA ve 1-1.5 µl EcoRI eklendikten sonra toplam hacim Çizelge 2.13'de belirtildiği gibi dH₂O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 37 °C'ta 1,5-2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda örnekler ileri işlemler için kullanılıncaya kadar -20 °C'ta saklanmıştır. Büyük hacimlerde kesime ihtiyaç duyulduğunda kesim bileşenlerinin miktarları uygun oranlarda arttırılmıştır.

Çizelge 2-6 : Restriksiyon enzim kesimi reaksiyon içeriği.

	Bileşenler	Miktar
	EcoRI Tamponu (10x)	1 µl
	EcoRI	1 µl
	Plasmid DNA	2 µl
	dH₂O	6 µl
	TOPLAM	10 µl

2.2.13 Transformasyon

2.2.13.1 Elektrokompotent *E. coli* Top10F' hücrelerinin hazırlanışı

E. coli elektrokompotent hücreleri bazı değişikliklerle birlikte Sambrook ve ark. (1989) tarafından tarif edilen protokol dikkate alınarak hazırlanmıştır: Taze LB katı besiyerinden 250 m'lik erlendeki 10–40 ml LB sıvı besiyerine (Ek A) *E. coli* Top10F' suşu ekilmiş ve durağan faz kültürü (ön kültür) oluşması için bir gece 37 °C'ta üremeye bırakılmıştır. Elde edilen *E.coli* Top10F' ön kültürü 250 ml'lik yeni bir erlende tetrasiklin (15 µg/ml) içeren 400 ml 2xYT sıvı besiyerine 1:100 dilüsyon

oranında eklenmiştir. Kültür yoğunluğu OD₆₀₀: 0.6 değerine ulaşınca kadar 37 °C'ta 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Üreme periyodu sonunda elde edilen hücreler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak pelet halinde toplanmış ve üst sıvı atılmıştır. Pelet 40 ml soğuk distile su ile resüspanse edilip 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı atıldıktan sonra, pelet 20 ml soğuk distile su ile resüspanse edilmiş ve tekrar aynı şartlarda santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı son kez atıldıktan sonra pelet % 10 gliserol içeren 1 ml soğuk LB ile resüspanse edilmiştir. Son olarak tüplere 40 µl'lik alikotlar halinde dağıtılıp -80 °C'ta saklanmıştır.

2.2.13.2 Elektrokompotent *E.coli* Top10F' hücrelerinin transformasyonu

Transformasyon basamağı uygulanacağı zaman, daha önce hazırlanan ve -80 °C'ta saklanan elektrokompotent *E. coli* Top10F' hücreleri alınmış ve 15 dakika buzda bekletilmiştir. Poli-A eklenmiş ChIP-DNA'ları taşıyan pGMET-Easy veya pDRIVE vektörlerinden oluşan ligasyon ürünleri buzda bekletilen kompetent hücre alikotları üzerine eklenmiştir. Tüplerdeki karışım elle hafifçe çalkalanıp önceden soğutulmuş elektroporasyon tüplerine aktarılmıştır. Elektroporasyon tüpü elektroporasyon cihazına yerleştirilmiş ve 1800 volt uygulanmıştır. Elektrik şoku verildikten sonra 1 ml LB sıvı besiyeri karışımının üzerine dökülmüş ve elektroporasyon tüpündeki tüm karışım 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 200 rpm'de 37 °C'ta 1 saat üremeye bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra, 5000 rpm'de 10 dk santrifüjle hücreler toplanmış ve üst sıvı atılmıştır. Pelet 100 µl % 0.85'lik tuz (NaCl) çözeltisi (Ek B) ile resüspanse edilmiştir. Resüspanسیون mavi/beyaz koloni seçilimi için uygun miktarda antibiyotik (100µg/ml ampicillin), 40 mg/ml X-gal ve 1 mM IPTG içeren seçici LB katı besiyerine ekilmiştir.

2.2.13.3 Kimyasal (CaCl₂) kompetent *E.coli* DH5α hücrelerinin hazırlanması

Kimyasal olarak kompetent olan *E. coli* DH5α suşlarının hazırlanması için bazı değişikliklerle birlikte Sambrook ve ark. (1989)'nın tarif ettiği protokolden yararlanılmıştır: Taze *E. coli* DH5α ön kültürü 10-40 ml LB besiyerine ekilerek 37 °C'ta bir gece üremeye bırakılmıştır (Ek A). 300 µl'lik ön kültür 250 ml'lik erlenmeye bulunan 50 ml yeni LB sıvı besiyerine aktarılmış ve eksponansiyel faz elde edilinceye kadar 37 °C'ta çalkalamalı etüvde yaklaşık 2-3 saat bekletilmiştir. Elde edilen kültür ikiye bölünerek önceden soğutulmuş falkon tüplere aktarılmış ve bu

tüpler 10 dakika buzda bekletilmiştir. Soğutma işleminden sonra falkon tüpler 4000 rpm'de +4 °C'ta 10 dakika santrifüj yapıp üst sıvı atılmıştır. Her bir pelet, buzda soğutulmuş 5 ml 10 mM CaCl₂ eklenerek vorteks yardımıyla resüspanse edilmiştir. Hücreler tekrar 4000 rpm'de +4 °C'ta 10 dakika santrifüj yapılarak toplanmış ve üst sıvı atılmıştır. Son basamakta her bir pelet buzda soğutulmuş 1 ml 75 mM CaCl₂ ile dikkatli bir şekilde çözülmüştür. Kompetent hücreler 100 µl'lik hacimlerde alikotlanarak -80 °C'ta saklanmıştır.

2.2.13.4 *E.coli* DH5α CaCl₂ kompetent hücrelerin transformasyonu

E. coli DH5α hücrelerinin transformasyonu aşağıda belirtildiği gibi ısı şoku metoduyla gerçekleştirilmiştir: Önceden hazırlanan ve -80 °C'ta saklanan kompetent *E. coli* DH5α hücreleri çıkarılıp 15 dakika buzda bekletilmiştir. 100 µl kompetent hücre içeren mikrosantrifüj tüpleri 10 µl ligasyon ürünü ile karıştırılmış ve 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ligasyon ürünlerinin kompetent hücreler tarafından hücre içine alınmasını sağlamak amacıyla 42 °C'ta 90 saniye bekletilerek ısı şoku etkisi uygulanmış ve hemen ardından buza alınarak 4 dakika bekletilmiştir.

Her bir tüpün içine 900 µl 2XYT sıvı besiyeri eklenmiş ve hücreler çalkalamalı etüvde 37 °C'ta 1 saat üremeye bırakılmıştır. Ardından 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıp üst sıvı dökülmüştür. Pelet 100 µl % 0.85 NaCl ile resüspanse edilmiş ve Amp (100 µg/ml)/XGal (40 mg/ml)/IPTG (1 mM) içeren LB katı besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 37 °C'ta bir gece (16 saat) üremeye bırakıldıktan sonra mavi/beyaz koloni seçim yöntemine göre beyaz koloniler seçilmiş ve bu kolonilerden plasmid izolasyonu yapılmıştır.

2.2.14 Protein izolasyonu ve analizi

LutR proteininin hem *B. subtilis* kromozomal DNA hem de SinR proteini ile aralarındaki ilişkiyi inceleyebilmek için Ni-NTA-Resin Protein Saflaştırma Sistemi (Qiagen) kullanılarak *pQE60::lutR::spc* ve *pQE60::sinR::spc* suşlarından, LutR ve SinR proteinleri doğal şartlarda izole edilmiştir. Saflaştırma sürecinde proteinlerin degradasyonunu önlemek amacıyla hücreler, proteinler ve çözeltiler sürekli olarak +4-8 °C'ta muhafaza edilmiş ve soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

2.2.14.1 Protein izolasyonu için büyük ölçekli IPTG indüksiyonu

Protein izolasyonu için her defasında indüklenebilir plasmidleri (pQE60::yvfI veya pQE60::sinR) içeren *E. coli* mutant suşların bir gecelik yeni ön kültürü hazırlanmıştır. Bu ön kültürden 50 ml alınarak 1 lt LB-Amp (Amp son konsantrasyonu 100 µg/ml) sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 0.6'ya ulaşıncaya kadar 37 °C'ta inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ değeri 0.6'ya ulaştığında 1 ml “indüklenmemiş Örnek (İnm) = uninduced Sample (UnI)” alınmıştır. İndüklenmemiş örnek aldıktan hemen sonra besiyerine 1 M IPTG stok çözeltisinden 1 ml eklenerek indüklemeye gerçekleştirilmiştir. İndüklenmiş kültür çalkalamalı etüvde 37 °C'ta 5 saat inkübe edilmiş ve 5 saatlik üreme periyodundan sonra 1 ml “indüklenmiş örnek (İnd) = induced Sample (Ind)” alınmıştır. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak hücreler toplanmış ve üst sıvı atılmıştır. Oluşan pelet liziz tamponuyla (Ek B) resüspanse edilip protein izolasyonunun ileri aşamaları için -80 °C'ta saklanmıştır.

2.2.14.2 Ni-NTA-Resin protein saflaştırma sistemi

İndüksiyon aşamasından sonra proteinlerin izolasyonu için hücreler önce dondur-çöz yöntemiyle, ardından lizozim enzimi yardımıyla parçalanmıştır. Peletler üzerine 100 mg/ml lizozim eklendikten sonra 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından sonikasyon yöntemiyle (10 periyot; 10 saniye darbe, 30 saniye dinlenme, 50 W) hücreler daha fazla parçalanmaya maruz bırakılmıştır. Hücre lizatı +4 °C'ta 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıdan 1 ml'lik fraksiyonlar alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Bu lizatta *E. coli* hücreesindeki bütün proteinler bulunmaktadır. Her bir tüpe 1:10 oranında Ni-NTA-Resin çözeltisi eklenmiş (1 ml lizata 0.1 ml Ni-NTA-Resin çözeltisi) ve bağlanma reaksiyonu için +4 °C'ta 50 rpm'de hafif çalkalayarak 30-45 dakika bekletilmiştir (10 µl resinin bağlanma kapasitesi 50-100 µg 6xHis-etiketli protein). Bağlanma inkübasyonunun ardından, resinin pelet halinde toplanması için tüpler 1000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı tamamen alınıp “bağlanmamış örnek (Bğm)=Unbound (Unb)” olarak etiketlendikten sonra SDS-PAGE analizi için -20 °C'ta saklanmıştır. Bu örnekte resine bağlanmayan bütün proteinler yer almaktadır.

Resin peleti 1 ml 10 mM liziz tamponuyla (L10) 1 kez, 20 mM yıkama tamponuyla (Y20) 3 kez ve 50 mM yıkama tamponuyla (Y50) 1 kez yıkanmıştır (Ek B). Tüpler 1000 g'de 1 dakika santrifüj edilip ve her yıkama aşamasında üst sıvı dikkatli bir

şekilde alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Bu üst sıvı örnekleri Yıkama-1 (Y1), Yıkama-2 (Y2), Yıkama-3 (Y3) vs. şeklinde etiketlenmiştir. Yıkama işlemlerinin sonunda hedef proteinler (LutR veya SinR) 60-100 µl elüsyon tamponu (Ek B) ile 4-5 kez resinden uzaklaştırılarak toplanmıştır. Elüsyon-1 (E1), Elüsyon-2 (E2), Elüsyon-3 (E3) vs. şeklinde etiketlenen bu elüsyon örnekleri ileri aşamalarda kullanacak olan hedef proteinler LutR veya SinR'ı içermektedir.

2.2.14.3 Kantitatif protein analizi: Bradford Assay

Elüsyon örneklerindeki protein konsantrasyonları Bradford (1976)'ya göre Bradford Protein Assay kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml sığır serum albumin (BSA) standartları kullanılarak doğru bir standart eğrisi oluşturulmuştur. 96-kuyulu mikropate'e 250 µl Bradford reaktifi eklendikten sonra standart BSA çözeltilerinden ve her bir elüsyon örneğinden 5 µl alınarak kuyucuklardaki Bradford reaktifi üzerine aktarılmıştır. Ardından homojen olacak şekilde karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Protein örneklerinin konsantrasyonları "mg/ml" cinsinden belirlendikten sonra http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_04.html web sayfası kullanılarak "nM" veya "µM" cinsinden molar konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.2.14.4 Kalitatif protein analizi: SDS-PAGE

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) veya Denatüre Edici Jel Elektroforezi, Laemmli (1970)'nin protokolüne göre uygulanmıştır. Protein saflaştırma işlemlerinin kalitesini ve proteinlerin göreceli moleküler kütlelerini analiz etmek için % 15 ayırma jeli (separating gel) ve % 12 istifleme jeli (stacking gel) kullanılmıştır. Proteinlerin moleküler ağırlıkları, jeldeki bant profillerinin boyanmamış protein moleküler belirteç (Unstained protein molecular weight marker, Fermentas) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir (Ek D).

İndüksiyonun verimliliği indüklenmemiş örnek ile indüklenmiş örneğin karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Bunun için indüklenmemiş ve indüklenmiş örneklerle 50 µl 3xSDS yükleme boyası ve toz halinde lizozim enzimi eklenmiştir. Hücrelerin parçalanması için +4 °C'ta 30 dakika bekletilmiştir. Bununla beraber, proteinlerin saflıklarını kontrol etmek için, izole edilen protein örneklerinden 10 µl alınıp üzerine 5 µl 3xSDS yükleme boyası eklenmiştir. Bütün örnekler (hem lizozim ve 3xSDS ile muamele edilen indüklenmemiş ve indüklenmiş hücreler hem de

sadece 3xSDS eklenen izole edilmiş protein örnekleri) 99°C'ta 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Denatürasyonun ardından örnekler SDS-PAGE jeline yüklenip 80-120V'da yaklaşık 2 saat kadar yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından jeller çıkartılarak SDS-PAGE boyama çözeltisine (EK B) aktarılarak 37 °C'ta 1 saat boyanmıştır. Bir gece boya giderici çözeltide (Ek B) bekletildikten sonra bantlar incelenmiştir.

2.2.15 Kromatin İmmünopresipitasyon Yöntemi [Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP)]

ChIP analizlerini yapmak amacıyla Molle ve ark. (2003) ve Fawcett ve ark. (2000)'nın oluşturdukları yöntem esas alınarak yeni bir ChIP yöntemi oluşturulmuştur. Oluşturduğumuz bu yeni ChIP yönteminin en önemli farklılıklarından biri bağlanma ve fiksasyon işlemlerinin, *in vivo* değil, *in vitro* olmasıdır. Bu nedenle deney sürecinde ne kadar DNA ve protein kullanılması gerektiğini belirleme zorunluluğu oluşmaktadır. Yeni ChIP yönteminin diğer önemli ve avantajlı özelliği, hedef proteini çeşitli agaroz matrikslerle ortamdan izole etmek için kullanılan proteine özgün antikorların kullanılmamasıdır. Klasik ChIP yönteminde DNA-protein bağlandıktan ve DNA küçük parçalara parçalandıktan sonra, hedef proteinin DNA'ya bağlanmasıyla oluşan DNA-protein kompleksleri, ortama eklenen proteine özgü antikorlar ve bu antikorların bağlanabildiği özel matrikslerle izole edilir. Bu çalışmada antikor kullanımı yerine, hedef proteinlerimizin klonlama aşamasında tasarlanan ve sentezlendiklerinde yapısında mevcut bulunan 6xHis-kuyruğundan ve bu histidinlerin afinite gösterdiği NTA-Ni-Resin matriksinden yararlanılmıştır. ChIP deneylerinde başlıca aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

2.2.15.1 ChIP deneylerinin optimizasyonu

i. DNA'nın mekanik parçalanma şartlarının belirlenmesi

ChIP analizlerinde elde edilmesi hedeflenen DNA parçalarının büyüklüğü 300-1000 bp'dir. Bu nedenle *B. subtilis* kromozomal DNA'sının ideal küçüklüğe parçalanması için kullanılacak sonikasyon şartlarının optimize edilmesi gerekir. Bu amaçla 15 saniye darbe, 25 saniye dinlenme olacak şekilde 7.5 dakika süren sonikasyon

aşamasında her dinlenme adımında 10 µl örnek alınmıştır. Toplanan örnekler sırasıyla Shr¹, Shr2, Shr3 vs. şeklinde etiketlenmiştir. Toplanan örnekler parçalanmamış kromozomal DNA ile birlikte % 1'lik agaroz jelde yürütülüp hangi sonikasyon adımında 300-1000 bp aralığına ulaşıldığı belirlenmiştir.

ii. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

ChIP analizinin *in vitro* ortamda olması, deneyin başlangıç aşamasında kullanılması gereken DNA miktarını optimize etmeyi zorunlu hale getirmektedir. Bu amaçla *B. subtilis* PY79 suşundan, büyük ölçekte DNA izolasyonu yapılmıştır. Molle ve ark. (2003)'nın kullandığı 50 ml'lik hücre kültürü dikkate alınarak 5.584, 11.168, 22.336, 44.672, 55.840 µg/µl olmak üzere çeşitli konsantrasyonlardaki DNA çözeltileri oluşturulmuştur. Daha önce belirlenen optimum sonikasyon şartlarında mekanik olarak parçalanmış DNA'lara ait çözeltilerden 1 µl alınarak agaroz jelde yürütüldüğünde en iyi bant görüntüsünün alındığı DNA konsantrasyonu ChIP analizlerinde başlangıç DNA değeri olarak kabul edilmiştir.

iii. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Klasik ChIP yöntemleri *in vivo* uygulandığı için belirli bir protein konsantrasyonundan bahsedilmemektedir. *In vivo* ChIP yöntemlerinde belirli bir üreme fazında elde edilen hücrelerin doğal sitoplazmalarında mevcut bulunan proteinler üzerinden ChIP adımları uygulanmaktadır. Ancak bu çalışmada ise, *in vitro* olarak uygulanan ChIP yönteminde toplam hacmi 25 µl olan EMSA reaksiyon karışımındaki protein miktarı dikkate alınarak göreceli bir hesaplama yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 1 ml ChIP reaksiyon tüpünde 8-8.5 µM protein kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

iv. *In vitro* ChIP reaksiyon içeriğinin belirlenmesi

Yeni ChIP protokolünün doğal hücre içi şartlarda uygulanmaması nedeniyle hedef proteinin kromozomal DNA'ya bağlanmasını sağlayacak ideal reaksiyon ortamının belirlenmesinde EMSA reaksiyon şartları dikkate alınmıştır. Daha önceki çalışmalarda Hüseyin Tayran (Yüksek lisans tezi, 2008) tarafından LutR proteini için

¹ Shr, "Sheared DNA= Kırılmış DNA" nın kısaltılması.

belirlenen “5x-bağlanma tamponu” ve optimum DNA/protein konsantrasyonları kullanılarak Çizelge 2.14’deki reaksiyon içeriği belirlenmiştir.

Çizelge 2.7 : *In vitro* ChIP reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Miktar
5x bağlanma tamponu	200 µl
Protein	8-8.5 µM
DNA	280 ng/µl
dH ₂ O	1 ml ye tamamlanır
TOPLAM	1 ml

v. ChIP-DNA izolasyonunda kullanılacak taşıyıcı polimerin hazırlanması

ChIP analizlerinin belirli bir aşamasında, hedef proteinin kromozomal DNA parçalarına bağlanmaları ile oluşan DNA-protein komplekslerinden küçük DNA parçalarını saflaştırmak için “Lineer Poliakrilamid Çözeltisi (LPA)” kullanılmıştır. Gaillard ve Strauss (1990)’un önerdiği protokole göre LPA çözeltisi hazırlamak için 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-asetat, 1 mM EDTA karışımı hazırlanıp pH 7.8 değerine ayarlanmış ve içerisine % 5 Akrilamid eklenmiştir (bisakrilamid eklenmez). Ardından 1/100 oranında %10 amonyum persülfat ve 1/1000 oranında TEMED eklenerek polimerleşmesi için 30 dk bekletilmiştir. Karışım vizkoz hale geldiğinde presipitasyon için 2.5 hacim etanol eklenip santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet bir gece 20 hacim dH₂O ile çalkalanarak resüspanse edilmiştir. Elde edilen % 0.25’lik LPA çözeltisi +4 °C’ta saklanmış ve ChIP analizlerinde kullanılmıştır.

2.2.15.2 ChIP analizinin uygulanması

Yeni ChIP protokolünün ara basamakları belirlendikten ve optimize edildikten sonra, ChIP deneyinin uygulamasına geçilmiştir. Çizelge 2.14’deki değerler dikkate alınarak ChIP reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. İlk olarak deney tüpüne LutR proteini hariç sadece 5x-bağlanma tamponu, *B. subtilis* PY79 suşundan elde edilen kromozomal DNA ve dH₂O eklendikten sonra kromozomal DNA’dan 300-1000 bp’lik parçalar elde etmek amacıyla sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyon öncesinde tüpten 20 µl örnek alınarak “Total DNA (Tdn)” olarak etiketlenmiştir. Optimize edilen şartlarda mekanik parçalama yaptıktan sonra 20 µl örnek alınıp “Kırpılmış DNA (Krp)=Sheared DNA” olarak etiketlenmiştir. Total DNA ve Kırpılmış DNA

örneklerinden 10 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde boyutları kontrol edilmiş ve 300-1000 bp'lik DNA parçaları belirlendikten sonra ChIP reaksiyon tüpüne Çizelge 2.14'de belirtilen miktarda LutR proteini eklenmiştir. Ardından 37 °C'ta çalkalamalı etüvde 1 saat bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (bağlanma aşaması). Ardından DNA-protein etkileşimlerini durdurmak, elektrostatik etkileşimlerle geri dönüşümlü bağlanan DNA ve proteinleri kovalent bağ oluşturarak geri dönüşümsüz DNA-protein kompleksleri halinde sabitlemek amacıyla formaldehit (final konsantrasyon % 1) ve fosfat tamponu (final konsantrasyonu 10 mM) (EK B) eklenmiştir. Oda sıcaklığında çalkalamalı etüvde 30 dakika bekletilmiştir (fiksasyon veya cross-link oluşturma aşaması). Formaldehit etkisini, diğer bir ifadeyle çapraz bağların oluşumunu, durdurmak amacıyla glisin çözeltisi (EK B) (final konsantrasyon 125 mM) eklenip 10 dakika oda sıcaklığında karıştırılmalı etüvde bekletilmiştir (fiksasyon durdurma aşaması).

Oluşan DNA-protein komplekslerini serbest DNA ve proteinlerden izole etmek için Ni-NTA-Resin Protein saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla her bir reaksiyon tüpüne 100 µl Resin çözeltisi (Qiagen) eklenmiş ve +4 °C'ta rotatorda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittikten sonra +4 °C'ta 1000 g de 1 dakika santrifüj yapılarak resin çözeltisinin çökmesi sağlanmıştır. Serbest DNA parçalarını ve proteinleri içeren üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak "Bağlanmamış örnek (Bgm) = Unbound Sample (Unb)" olarak etiketlenmiştir. Bundan sonra bütün santrifüjler +4 °C'ta 1000 g de 1 dakika uygulanmış ve yıkama işlemleri yapılmıştır. Yıkama işlemlerinde 1 ml Yıkama-20 ve Yıkama-50 çözeltileri (EK B) kullanılmıştır. Her yıkama işleminden sonra resin peletine temas etmeden dikkatli bir şekilde üst sıvı alınıp yeni tüplere aktarılmıştır. İşlem sırasına göre alınan örnekler Yıkama-1 (Y1), Yıkama-2 (Y2), Yıkama-3 (Y3) vs. şeklinde etiketlenmiştir. Yıkama işlemleri bittikten sonra resin matrisine bağlı DNA-protein komplekslerini elde etmek için elüsyon çözeltisi kullanılmıştır. Elüsyon işleminden sonra elde edilen üst sıvı alınarak yeni bir tüpe aktarılmış ve "Elüsyon (E)" şeklinde etiketlenmiştir.

ChIP-DNA'ların elde edilmesi için elüsyon çözeltisindeki DNA-protein komplekslerinden proteinlerin uzaklaştırılıp DNA'ların saflaştırılması gerekir. Bu amaçla Bölüm 2.2.2'de bahsedilen kromozomal DNA izolasyon yönteminden yararlanılmıştır. 100 µl elüsyon örneğine 10 µl 5M NaCl eklenip bir gece (16 saat) 65 °C'ta bekletilmiştir. Ardından 10 µl proteinaz K enzimi (20 mg/ml) ve 20 µl LPA

içeren TE tamponundan 1:1 oranında eklenmiştir. Çalkalamalı etüvde 37°C'ta 2 saat inkübasyondan sonra 0.7 oranında isopropanol eklenerek DNA'nın presipitasyonu sağlanmıştır. İsoopropanol eklendikten sonra 15-20 dakika -20°C'ta bekletilmiş ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı atılmıştır. Ardından 1 ml soğuk %70 etanolle yıkanıp 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra tüpler boş halde tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. 37°C'ta etanol tamamen kurutulmuştur. Elde edilen ChIP-DNA peleti 25 µl TE'de resüspanse edilmiş ve ileri ChIP aşamaları için -20°C'ta saklanmıştır.

ChIP-DNA'lar elde edildikten sonra ileri analizler için çoğaltılmaları amacıyla uygun bir vektöre klonlanmaları gerekmektedir. Bu amaçla ilk adım olarak Taq DNA polimeraz ve sadece dATP nükleotitleri kullanılarak 3' uçlara poli-A kuyruğu eklenmiş ve böylece TA klonlamaya uygun hale getirilmiştir (Çizelge 2.15). Bu aşamada poli-A ekleme reaksiyon şartları 94°C'ta 4 dakika denatürasyon, 72°C'ta 30 dakika poli-A ekleme (Taq aktivitesi) ve ardından +4°C'ta bekletme şeklinde ayarlanmıştır.

Poli-A kuyruğu ekli ChIP-DNA'lar (PATA-ChIP-DNA) pGEMT-easy veya PDRIVE vektörlerine Bölüm 2.2.10 ve 2.2.11'de açıklanan şartlarda klonlandıktan sonra mavi/beyaz koloni seçilimiyle PATA-ChIP-DNA içeren beyaz koloniler seçilmiştir. Seçilen kolonilerden plasmidler izole edilerek EcoRI restriksiyon enzimiyle tarama yapılmış ve plasmid bandına ek olarak 300-1000 bp'lik insert içeren koloniler belirlenmiştir. PATA-ChIP-DNA içeren plasmidler M13-ileri veya M13-ters primerleriyle dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizinde elde edilen veriler NCBI-BLASTn programında incelenerek insertün *B. subtilis* kromozomal DNA'sında karşılık geldiği gen bölgesi belirlenmiştir.

Çizelge 2.8 : Poli-A kuyruğu ekleme reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Miktar
10X Taq Tamponu	2µl
dATP	2 µl
ChIP-DNA	4 µl
Itaq DNA polimeraz	0.5 µl
dH2O	11.5 µl
TOPLAM	20 µl

ChIP-DNA olarak belirlenen genlerin doğrulanması için EMSA ve RT-qPCR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak ilgili genlerin EMSA analizlerinde kullanılmak üzere 5'-promoter bölgelerine karşılık gelen ve RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere 3'-mRNA kodlama bölgelerine karşılık primerler tasarlanmıştır (Çizelge 2.2).

2.2.16 EMSA Yöntemi (Electrophoretic Mobility Shift Assay = Elektro Hareketlilik Kayma Deneyi)

Hem bu tez çalışmasına ait ChIP analizleri sonucunda hem de Dr. Öykü İrigül-Sönmez'e ait tez çalışması sonucunda LutR transkripsiyon faktörüyle ilişkili olduğu belirlenen aday genleri analiz etmek ve LutR'ın bu genlere ait promoter bölgelerine doğrudan bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla EMSA yönteminden yararlanılmıştır.

EMSA deneylerinde, LutR proteininin aday genlere ait yaklaşık 300-500 bp'lik promoter bölgelerine karşı bağlanma afinitesi incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak ilgili genlerin promoter bölgelerinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasını sağlayacak primerler (ileri-geri) tasarlanmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 2.2'de verilmiştir. PCR ürünleri Bölüm 2.2.8'deki "Qiagen PCR Purification Kit" prosedürüne göre saflaştırılmış ve saflaştırma kalitesi 1 µl örneğin 1 % agaroz jelde yürütülmesi ile kontrol edilmiştir. Saflaştırılan PCR ürünü DNA'ların konsantrasyonu Qubit® 2.0 Fluorometer veya Nanodrop 2000 Spectrophotometer cihazları ile nanogram cinsinden belirlenmiştir.

Diğer yandan *E. coli* (pQE60::*lutR*) ve *E. coli* (pQE60::*sinR*) suşları kullanılarak bölüm 2.2.14'deki prosedür takip edilerek LutR ve SinR proteinleri izole edilmiştir. Ardından kalitatif-kantitatif analizleri yapılarak EMSA analizlerinde kullanılmak üzere +4 °C'ta saklanmıştır.

DNA (ilgili genlerin promoter bölgeleri) ve proteinlerin (LutR ve SinR) saflaştırılmaları ve konsantrasyonlarının belirlenmesinden sonra, yaklaşık 45 ng DNA, sırasıyla hem tek başlarına hem de ikisi birlikte LutR ve SinR'ın artan konsantrasyonlarıyla inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol geni olarak *yqxM*, negatif kontrol geni olarak *ywbH* kullanılmıştır. Bütün bağlanma deneylerinde DNA ve protein arasındaki bağlanmanın doğrulanması amacıyla spesifik olmayan yarışmacı

DNA poly[d(I-C)] ile bağlanma özelliği olmayan sığır serum albümin (BSA, 500 mg/ml) proteini kullanılmıştır (Çizelge 2.16).

Çizelge 2.9 : EMSA reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Reaksiyon Tüpleri						
	1	2	3	4	5	6	7
	PROB	Negatif	Pozitif	Tüp-1	Tüp-2	Tüp-3	Tüp-4
5x Bağlanma tamponu	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
poli[d(I-C)]	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
BSA (1mg/ml)	0	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Protein	0	10 µM	4 µM	0.5 µM	1 µM	2 µM	4 µM
DNA	75 ng	75 ng	75 ng	75 ng	75 ng	75 ng	75 ng
dH ₂ O	X µl*	X µl	x µl	X µl	X µl	X µl	X µl
TOPLAM	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

* X µl : Toplam hacim 25 µl olacak şekilde dH₂O eklenir.

Bütün bileşenler reaksiyon tüpüne aktarıldıktan sonra reaksiyon tüpü 26°C'ta 30 dakika inkübe edilmiştir. Bağlanma inkübasyonundan sonra karışımdan 13 µl alınarak % 6'lık doğal EMSA jelinde kuyulara yüklenmiş ve 80-120 V, 500 Amp'de 30-60 dakika yürütülmüştür. Elektroforez aparatından çıkartılan jel syber green boyası (Qiagen) ile boyanmış ve UV spektrofotometre cihazında görüntülenmiştir.

2.2.17 Real-Time Quantitative-PCR (RT-qPZR) analizi

ChIP analizlerinde belirlenen ve EMSA analiziyle doğrulanan genlerin *in vivo* ortamda LutR transkripsiyon faktörüne bağlı olarak ifade seviyelerini belirlemek amacıyla RT-qPZR yönteminden yararlanılmıştır. Bu analizlerde yabani tip *B. subtilis* PY79 suşu ile mutagenез yoluyla *lutR* geni bozulmuş TEK1 (Köroğlu ve ark., 2008) mutant suşları karşılaştırılmıştır.

2.2.17.1 Bakteri üreme eğrilerinin belirlenmesi

RT-qPZR deneylerinde kullanılmak üzere örnek toplamak için öncelikli olarak uygun besi ortamlarında bakteriyal üreme eğrileri belirlenmiştir. Bunun için ChIP analizinde belirlenen genin fonksiyonuna uygun besiyeri (GSBMM) belirlenmiş ve protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır (EK A). Bir gece öncesinden hazırlanan PY79 ve TEK1 suşlarına ait ön kültürlerden 100 µl alınarak 250 ml'lik erlenlerde bulunan LB ve GSBMM besiyerlerine ekim yapılmıştır. Çalkalamalı etüvde 37°C'ta üremeye bırakılan kültürlerden her saatte bir örnek alınarak UV spektrofotometrede

OD₆₀₀ değerleri ölçölmüştür. Elde edilen değerler tabloya dönüştürölerek her iki suşun LB ve GSBMM besiyerlerindeki üreme eğrileri belirlenmiştir.

2.2.17.2 RT-qPZR yöntemi

Yabani tip ve mutant suş arasındaki gen ifadelerini karşılaştırmak için RT-qPZR Yöntemi ve “relative quantification” algoritması kullanılmıştır. RT-qPZR yönteminin bir alt uygulaması olan “relative quantification” yöntemi, bir hücrede hedeflenen bir genin farklı bir referans gene göre ifadesini veya hedeflenen bir genin farklı iki organizmadaki ifadelerini karşılaştırma imkanı vermektedir. Bu yöntemde ölçölen temel parametre, çeşitli örneklerle kıyaslanarak belirli bir örnekteki bir gene ait mRNA’nın normal seviyesindeki göreceli değişikliklerdir. Standart gen olarak, farklı hücre tiplerinde ifade düzeyi değişmeyen genler (internal kontrol) kullanılır (Pfaffl, 2004).

Toplam RNA izolasyon adımları Bölüm 2.2.3’de belirtildiği gibi “RNeasy Mini RNA Isolation Kit (Qiagen)” kullanılarak uygulanmıştır. Üreme sürecinde ilgili gen ifadesinin yabani tip ve mutant suş arasında en fazla farklılık göstermesi beklenen noktadan örnek aldıktan sonra, elde edilen toplam RNA’dan qPZR işlemlerinde kullanılmak üzere eşit miktarlarda (2 µg) alınmıştır. “Transcriptor cDNA Synthesis Kit (Roche)” kullanılarak bu deney setinde bulunan rastgele-hekzamer primerlerle (60 µM) tersine transkripsiyon yapılmıştır. Elde edilen cDNA’lar “Reverse Transcriptase Quantitative PCR” reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. PZR ürünlerinin çoğaltılması ve tespit edilmesinde “SYBR Green Master Mix Kit” (Roche) ve Light Cycler 480 (Roche) cihazı kullanılmıştır. Kullanım kılavuzu dikkate alınak, 10 pmol gene özgü primer içeren 20 µl’lik tersine transkriptaz PZR karışımı hazırlanarak bu cDNA sentez reaksiyon karışımından 2 µl kullanılmıştır. Tersine transkriptaz PZR işlemleri 52 °C annealing sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Herbir genin relatif ifade oranlarını belirlemek için özel hesaplama metodu olan “2^{-ΔΔC_t} metodu” kullanılmıştır (Pfaffl, 2004). Referans değerler olarak her iki gene ait Cp değerlerinin geometrik ortalamaları kullanılmıştır. İncelenen genlerin ifade seviyeleri yabani tip *B. subtilis* PY79 suşu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu metoda göre herbir örneğin sonuçları, mutant suştaki hedef genin miktarının, yabani tip suştaki hedef genin miktarına kıyasla “N kat değişim miktarı” olarak ifade edilmekte ve referans (internal) genlere göre normalizasyon yapılmaktadır: 2^{-ΔΔC_P},

$(2^{-[\Delta C_p^{\text{Örnek}} - \Delta C_p^{\text{kontrol}}]})$. Oranlar $(2^{-\Delta \Delta C_t})$ hesaplandıktan sonra $\log_2$ 'ye dönüştürülmüştür. Deneyler üç paralel halinde uygulanmış ve en az üç farklı deney yapılmıştır. Hem kontrol suşta hem de mutantlarda ifade seviyelerinin aynı olması nedeniyle bu çalışmada “sig” ve “veg” genleri internal kontrol olarak kullanılmıştır. Bu iki genin ifadeleri, hem PY79 suşunda ve hem de TEK1 suşunda değişmemektedir.

2.2.18 *In silico* analiz araçları

LutR proteinine yönelik biyoinformatik analizlerde çeşitli araçlar kullanılmıştır. Bu araçlar şunlardır:

i. NCBI Entrez Protein Database: *B. subtilis* 168 suşuna ve diğer türlere ait LutR proteiniyle ilgili bilgiler bu sunucudan alınmıştır. BLASTp programında “*Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168 (taxid:224308)” organizması kriter alınarak yapılan blast analizinde LutR proteinine sahip olan diğer türler belirlenmiştir.

ii. ClustalW2 Sequence Alignment: BLAST analiziyle belirlenen LutR protein dizilerinin hizalanma (alignment) işlemleri ClustalW2 programıyla online olarak yapılmıştır.

iii. MEGA 5.2.2: “The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)” yazılımı bilgisayara kurulan bir program olup bazı işlemleri online olarak gerçekleştirir. DNA ve protein dizilerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı analizine imkan veren MEGA 5.2.2 programında ayrıca dizi hizalama, filogenetik ağaç oluşturma, evölasyona yönelik hipotezlerin test edilmesi, dizi divergensinin tahmini, web tabanlı dizi verilerinin alınması ve kullanıcı tarafından seçilen bilgi ve analiz metodlarına yönelik doğal dil tanımlarını üreten eksper sistem araçları bulunmaktadır.

iv. ExPasy's Server: “The Expert Protein Analysis System Server” proteinlere ve proteomlara yönelik çeşitli verilerin ve analitik araçların sunulduğu programdır. ExPasy veritabanı BLAST, ProtParam, SWISSPROT ve TrEMBL, SWISS-2DPAGE, PROSITE, ENZYME ve SWISS-MODEL araçlarını içerir. Bu araçlarla proteomik, benzerlik analizi, pattern ve profil analizi, post-translasyonel modifikasyon tahmin analizi, primer, sekonder ve üçüncül yapı analizi ve dizi hizalama analizleri yapılabilir. Bu araçlar içerisinde ProtParam aracı protein dizilerinin amino asit kompozisyonu, izoelektrik noktası (*pI*), atom içerikleri, pozitif

(+R) ve negatif (-R) yüklü amino asit içeriği, instabilite indeksi (II), ekstinksiyon katsayısı (EC), GRAVY (Grans Avarage of Hydropathicity) değeri ve alifatik indeks (AI) gibi verilerin belirlenmesini ve hesaplanmasını sağlar.

v. MEME Suit Server : “Motif-Based Sequence Analysis Tools” DNA bağlanma bölgeleri ve protein etkileşim domainlerini belirleyen dizi motiflerinin online olarak analiz edilmesini ve belirlenmesini sağlayan bir sunucudur. Bu sunucu bünyesinde MEME (Multiple Em for Motif Elucidation), MAST (Motif Aligment&Search Tool), TOMTOM (Motif Comparison Tool), GOMO (Gen Ontology for Motifs), GLAM2 (Gapped Local Aligment of Motifs), GLAM2SCAN (Scanning with Gapped Motifs), FIMO (Find Individual Motif Occurences), MCAST (Motif Cluster Aligment and Search Tool), MEME-ChIP (Motif Analysis of Large DNA Datasets), SPAMO (Spaced Motif Analysis Tool), DREME (Discrimşnative DNA Motif Discovery), CentriMO (Central Motif Enrichment Analysis) gibi araçlar bulunmaktadır. Bu araçlardan MEME programı korunmuş protein motiflerinin ve domainlerin analizini sağlar. MEME sonuçlarında elde edilen motif dizilerine ait LOGO verileri de oluşturulabilir. MEME analizi ile elde edilen motiflerin verilen dizilerde bulunma frekansları MAST programıyla belirlenebilir.

vi. UniProt Server : “Universal Protein Resource” yüksek kaliteli, ücretsiz olarak erişim sağlanabilen ve protein dizileri ve fonksiyonları ile ilgili karşılaştırmalı veri sağlayan ve birçok bilgiyi genom dizileme projelerinden alan bir veritabanıdır. UniProt bir konsorsiyon ürünüdür. Bu konsorsiyum European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) ve Protein Information Resource (PIR) birlikteliğinden oluşur.

vii. SubtiList Server : *Bacillus subtilis* 168 suşundan elde edilen DNA ve protein dizilerine ait bütün verilerin sunulduğu kaynaktır. SubtiList’te *B. subtilis* ile ilgili gen ve protein adlarına, bunların genomdaki yerlerine, pozisyonlarına, fonksiyonlarına ve dizilerine vb. birçok bilgiye kolaylıkla erişilebilir.

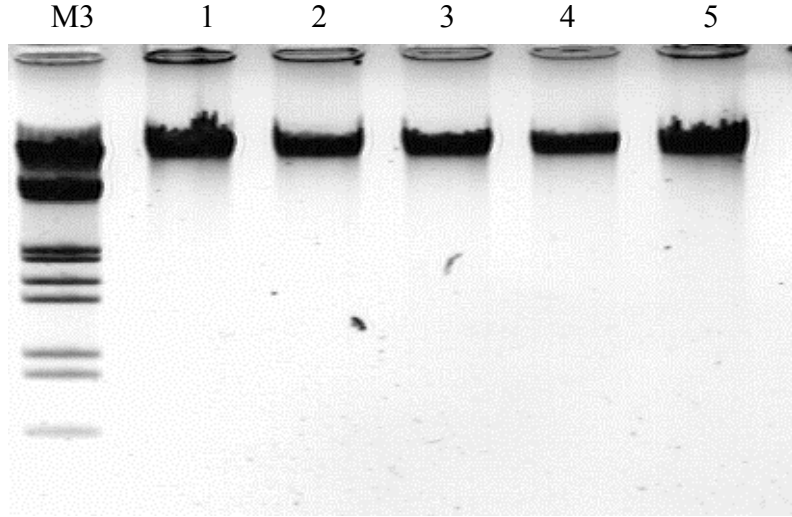
viii. Protein Data Bank (PDB): Protein ve DNA gibi büyük biyolojik moleküllerin üç boyutlu yapılarıyla ilgili bilgilerin depolandığı sunucudur. PDB verileri X-ray kristallogragi ve NMR spektroskopi analizlerine dayanır. Dünya çapında ücretsiz olarak kullanılan, ulaşımı ve kullanımı kolay bir araçtır.

ix. PyMOL Programı : Bu program üç boyutlu bir moleküler grafik sistemidir. Python programlama dilinde çalışır ve adını bu programın ilk iki harfinden (Py) alır. PyMol programı bilgisayara kurulu halde çalışır ve gerçek zamanlı üç boyutlu görüntülemeye, yüksek kaliteli moleküler grafik fotoğraflarının ve animasyonlarının hızlı bir şekilde oluşturulmasına imkan verir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 DNA Örneklerinin İzolasyonu

B. subtilis PY79 suşundan izole edilen kromozomal DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 3.1). İzole edilen kromozomal DNA agaroz jelde kalitatif olarak doğrulandıktan sonra NanoDrop (ThermoScientific) cihazıyla derişimleri ve saflıkları belirlenmiştir.

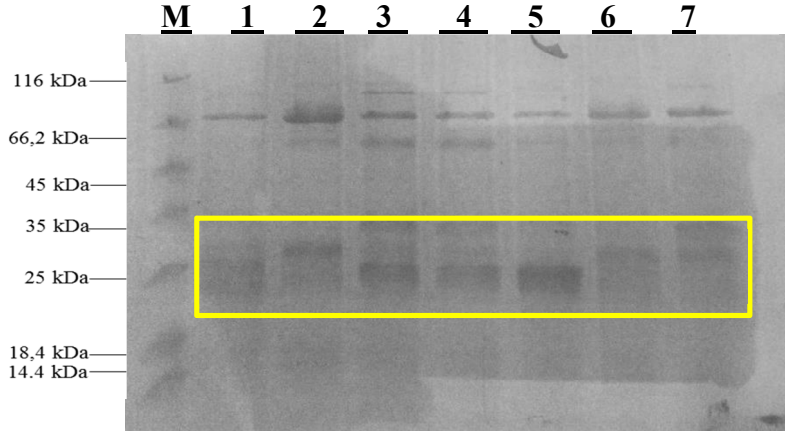


Şekil 3.1 : *B. subtilis* PY79 kromozomal DNA'sının %1'lik agaroz jel görüntüsü. **M3:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker-3, **1-2-3-4-5:** *B. subtilis* PY79 kromozomal DNA örnekleri.

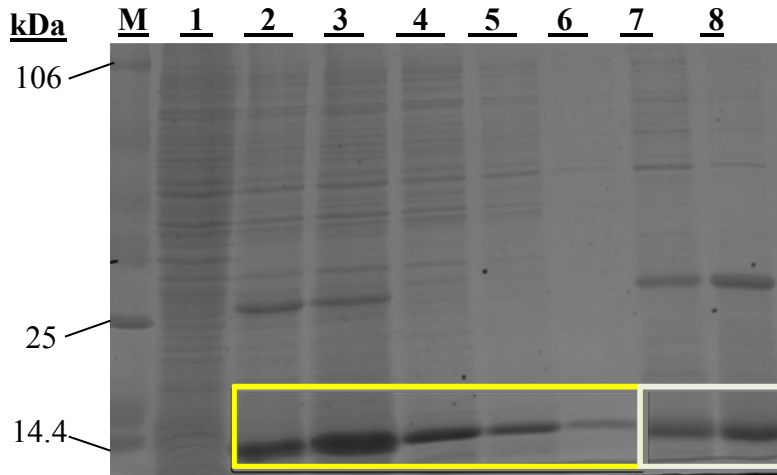
3.1 Protein Örneklerinin İzolasyonu

LutR ve SinR proteinlerinin üretilmesi için rekombinant *E. coli* suşları (pQE60::*lutR* ve pQE60::*sinR*) kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Her iki suş ampisilin (100 µg/ml) içeren LB besiyerinde üretilmiş ve 1 M IPTG ile indüklenmiştir. 5 saatlik indüksiyon periyodundan sonra santrifüjle toplanan hücre peleti sonikasyon yöntemiyle parçalanmış ve hücre lizatı önce Ni-NTA-Resin matriksiyle muamele edilmiştir. Rekombinant yapılarındaki 6xHis kuyruğu sayesinde resine bağlı LutR ve SinR proteinleri resin matriksinin sırasıyla liziz tamponu (L), yıkama tamponları (Y20,

Y50) ve elüsyon tamponu (E) ile yıkanması sonucunda saf olarak izole edilmiştir. İzole edilen LutR-His₆ ve SinR-His₆ proteinleri önce kalitatif olarak SDS-PAGE analiziyle (Şekil 3.2-3.3) incelenmiş, ardından kantitatif olarak Bradford analiziyle konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3.2 : LutR proteinine ait SDS-PAGE analizi. **M:** Marker protein (Fermentas, SM#0431), **1-7:** Farklı deneylerde elde edilen, *E. coli pQE60::lutR::spc* suşlarının IPTG ile indüklenmesine bağlı olarak aşırı ifade edilen LutR (24,317 kDa) proteinleri. Her kolon farklı zamanlarda izole edilmiş LutR örneğine aittir.

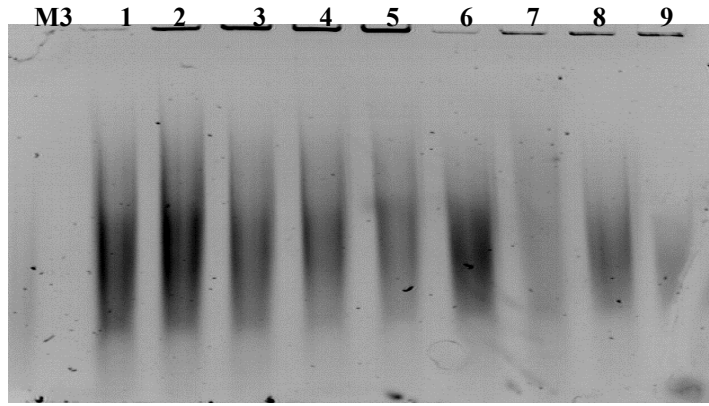


Şekil 3.3 : SinR proteinine ait SDS-PAGE analizi. **M:** Marker protein (Fermentas, SM#0431), **1:** Bağlanmamış ekstrakt, **2-6:** Yıkama ürünleri, **7-8:** SinR (12,989 kDa) elüsyon örnekleri.

3.2 ChIP Prosedürünün Optimizasyonu

ChIP analizlerine başlamadan önce Molle ve ark. (2003) ve Fawcett ve ark. (2000)'nın belirttiği protokolden yararlanılarak oluşturulan yeni ChIP prosedürünün

ara basamakları optimize edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, kromozomal DNA'dan 300-1000 bp'lık DNA parçaları elde etmek için yapılacak sonikasyon işleminin şartları belirlenmiştir. Bu aşamada darbe süresinin DNA'nın yeterli ölçüde parçalanacağı ve aşırı ısı oluşumunun engellenebileceği bir aralık olmasına dikkat edilmiştir. Dinlenme süresi belirlenirken ise darbe esnasında oluşan ısı etkisinin nötürleneceği, reaksiyon karışımının yeterli ölçüde soğuyacağı bir süre belirlenmiştir. Sonikasyon işlemi 50 Volt'da 9 dakika süre ile 10 saniye darbe, 50 saniye dinlenme olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Herbir dinlenme aralığında 10 µl örnek alınmış ve alınan örnekler %1'lik agaroz jelde incelenmiştir (Şekil 3.4). Bu şartlarda elde edilen DNA parçalarının istenilen 300-1000 bp aralığında olduğu belirlenip ChIP analizlerindeki sonikasyon işlemleri belirlenen şartlarda (50 Volt'da 9 dakika süre ile 10 saniye darbe, 50 saniye dinlenme olacak şekilde) ve tüpler buz içinde tutularak uygulanmıştır.

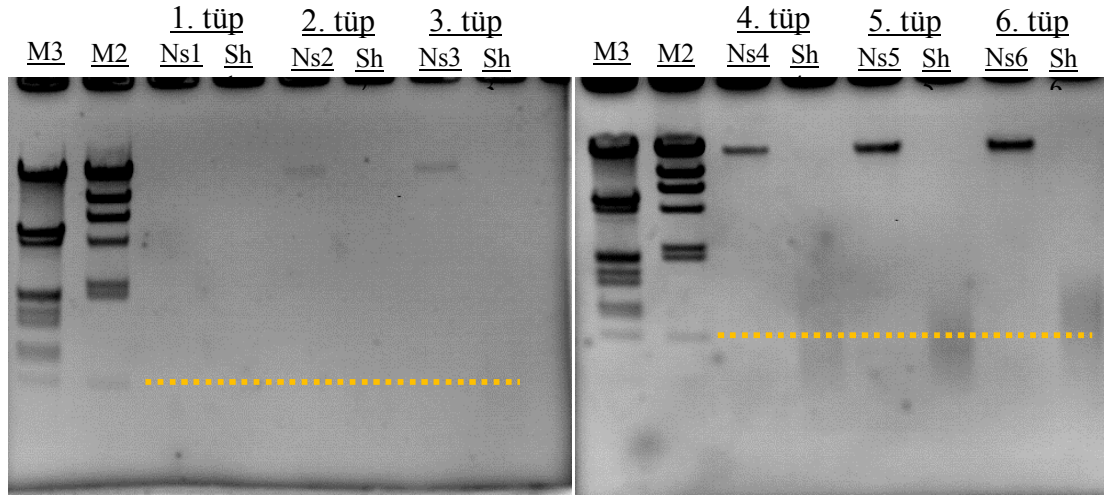


Şekil 3.4 : Sonikasyon optimizasyon sürecinde dinlenme aralıklarında alınan örneklerin agaroz jeldeki görüntüleri. 50 Volt'ta 9 dakika süren sonikasyon 10 saniye darbe 50 saniye dinlenme aralıklarıyla gerçekleştirilmiştir. **1-9:** Sonikasyonun herbir darbe-dinlenme aşamasından sonra alınan örnekler.

Sonikasyon şartları belirlendikten sonra, ChIP analizlerinde deneysel adımlar ilerledikçe DNA konsantrasyonunun azalması ve ara basamaklardaki kontrol amaçlı jel analizlerinde DNA parçalarının görüntülenememe olasılığından dolayı “başlangıç DNA konsantrasyon (ng/ml) değeri” belirlenmiştir. Bu amaçla NanoDrop cihazı kullanılarak, büyük hacimde izole edilen kromozomal DNA'nın molar konsantrasyonu 1116.8 ng/ml olarak belirlenmiştir. Bu DNA stoğundan sırasıyla 2-5-10-20-40-50 µl alınmış ve 200 µl 5x-bağlanma tamponu ile toplam hacmi 1 ml'ye tamamlayacak miktarda (µl) dH₂O eklenerek sırasıyla 2234, 5584, 11168, 22336,

44672, 55840 ng kromozomal DNA içeren 1 ml'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Herbir tüpten 10 µl örnek alınarak, yukarda belirtilen optimize şartlarda sonikasyona tabi tutulmuştur.

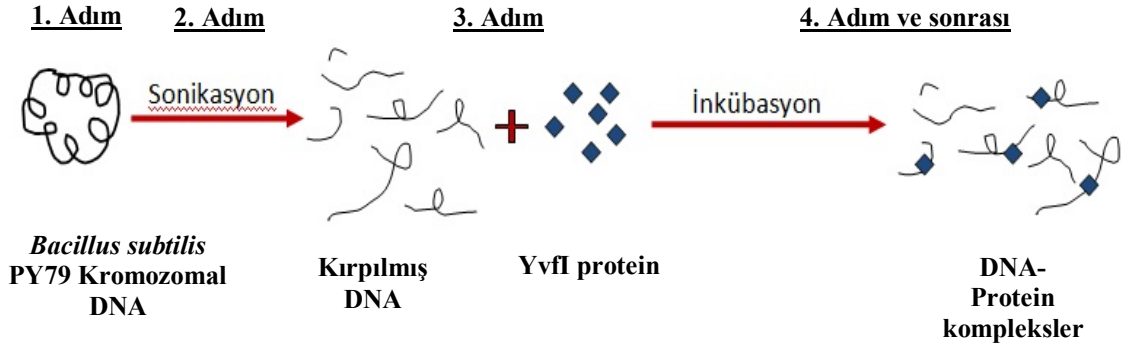
Sonikasyon sonrası herbirinden tekrar 10 µl örnek alınarak % 1'lik agaroz jelde incelenmiş ve kırılmış DNA bantlarının 4., 5. ve 6. tüplerde belirgin şekilde görülebildiği tespit edilerek başlangıç kromozomal DNA konsantrasyonunun en az 22336 ng/mL olması gerektiği belirlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 : ChIP deneylerinde kullanılması gereken başlangıç DNA konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan agaroz jel analizi. **1.tüp:** 2234 ng/mL, **2.tüp:** 5584 ng/mL, **3.tüp:** 11168 ng/mL, **4.tüp:** 22336 ng/mL, **5.tüp:** 44672 ng/mL, **6.tüp:** 55840 ng/mL kromozomal DNA. **Ns:** Kırılmamış DNA, **Sh:** Kırılmış DNA.

3.3 ChIP Analizleri

ChIP analizleri, LutR transkripsiyon faktörünün *B. subtilis* genomunda hangi genlere doğrudan bağlandığını, diğer bir ifadeyle hangi genleri doğrudan kontrol ettiğini belirlemek amacıyla yapılmıştır (Şekil 3.6). Öncelikli olarak LutR proteinini aşırı ifade edecek şekilde tasarlanan *E. coli* pQE60::lutR rekombinant suşlardan LutR üretimi, izolasyonu ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Buna paralel olarak *B. subtilis* PY79 kromozomal DNA'sı izole edilmiş ve saflaştırılmıştır.



Şekil 3.6 : ChIP deneyinin temel basamakları. **1. Adım:** Protein hariç diğer bileşenlerin reaksiyon tüpüne eklenmesi, **2. Adım:** Kromozomal DNA'nın sonikasyon yöntemiyle mekanik olarak kırılması, **3. Adım:** Proteinin eklenmesi ve kırılmış DNA ile proteinin bağlanma reaksiyonu, **4. Adım:** DNA-protein komplekslerinin izolasyonu ve sonraki aşamalar.

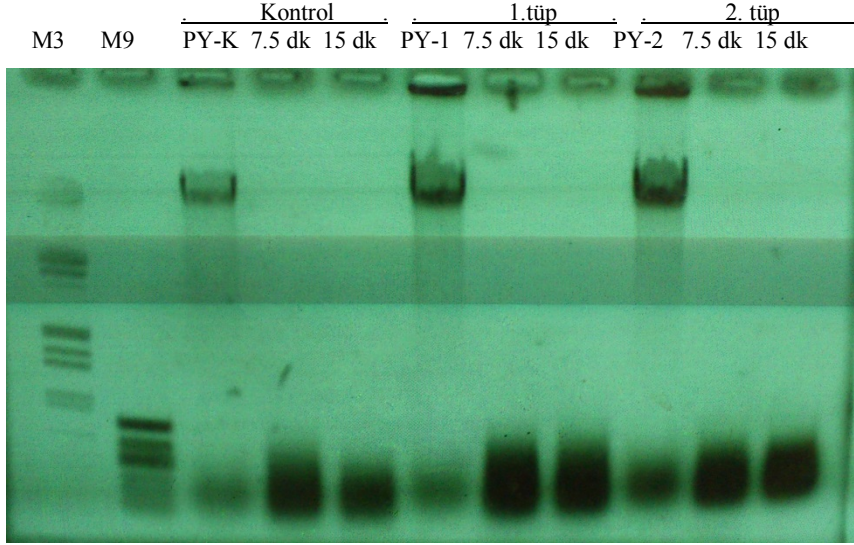
Kromozomal DNA ve LutR proteini hazırlandıktan sonra 1,5 ml'lik deney tüplerine 180 ng kromozomal DNA, 100 µl LutR bağlanma tamponu ve dH₂O eklenmiştir (Çizelge 3.1). Ancak bu aşamada protein eklenmemiştir. Her bir tüpten 10 µl örnek alınıp "Toplam DNA (Tdn)" şeklinde etiketlenmiştir. Belirlenen optimum şartlarda sonikasyon işlemi uygulandıktan sonra tüplerden tekrar 10 µl'lik örnekler alınmış ve "kırılmış DNA (Shr)" şeklinde etiketlenmiştir. Total DNA ve Kırılmış DNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 3.7). Ardından kontrol tüpü hariç diğer tüplere 8-10 µM LutR proteini eklenmiştir.

Çizelge 3.1 : ChIP reaksiyon içeriği.

Bileşenler		<u>Kontrol</u>	<u>1.tüp</u>	<u>2.tüp</u>
5x Bağlanma tamponu	µl	100	100	100
DNA	ng	180	180	180
Protein	µM	-	10	10
dH ₂ O	µl	350	280	280
TOPLAM	µl	500	500	500

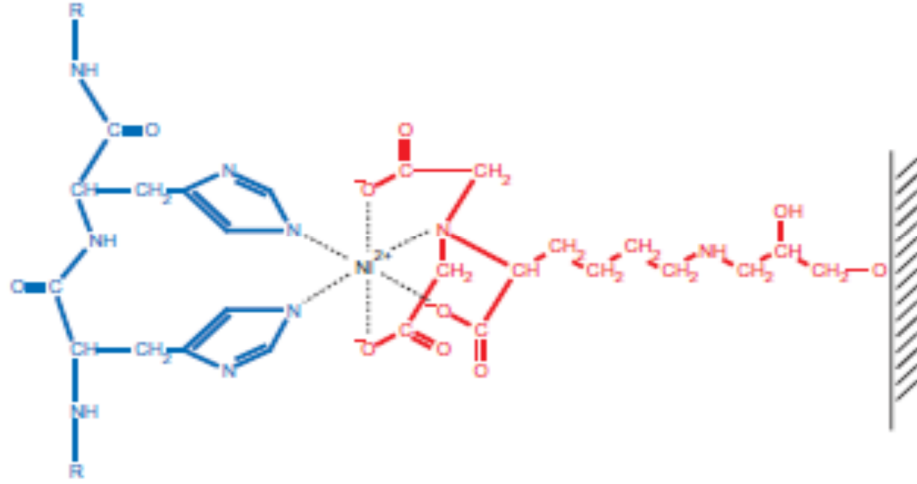
İmmünpresipitasyon aşamasında klasik yöntem olan "proteine özgü antikor kullanımı" yerine rekombinant yapıda olan LutR proteininin C-terminaline eklenen 6xHis kuyruğundan yararlanılmıştır. Bu yöntem henüz literatürde kullanılmamış olması açısından ve antikor kullanımı gibi maliyet ve işlem fazlalığına yol açan bir adımı ortadan kaldırması nedeniyle önemli ve özgündür. Çünkü bu yeni yaklaşımda,

DNA-protein komplekslerini izole etmek için Ni-NTA-Resin matriksindeki “nikel (Ni^{+2}) atomları” ile pQE60 plazmitinin özelliği nedeniyle rekombinant LutR proteinin yapısına eklenen “6xHis residüleri” arasındaki afiniteden yararlanılmaktadır (Şekil 3.8). Bu tez çalışmasında Ni-NTA-Resin Protein saflaştırma sisteminin ChIP prosedürüne uyarlanması ChIP teknikleri açısından önemli bir yenilik olmuştur.



Şekil 3.7 : PY79 suşundan izole edilen kromozomal DNA’nın sonikasyon öncesi ve sonrası profillerinin agaroz jel analizi. Örnekler üç farklı aşamada alınmıştır: **PY-K-1-2:** Sonikasyon öncesi alınan örnekler (Total DNA), **7.5 dk:** Sonikasyonda 7.5 dakikada alınan örnekler, **15 dk:** Sonikasyonda 15. dakikada alınan örnekler. **PY-K:** Kontrol.

DNA-protein komplekslerinin saflaştırılması için, Ni-NTA-Resin sistemiyle izolasyon aşamasında, elüsyon basamağına kadar yapılan yıkama örnekleri yeni tüplere aktararak toplanmıştır. Toplanan örneklerin DNA içerikleri Thermo Scientific Nanodrop™ 1000 Spectrophotometer cihazıyla ölçülmüş ve elde edilen veriler tablo ve grafik halinde düzenlenerek izolasyon sürecinin verimliliği değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.9). Ayrıca agaroz jel elektroforez yöntemiyle de DNA içerikleri analiz edilip doğrulanmıştır (Şekil 3.10).

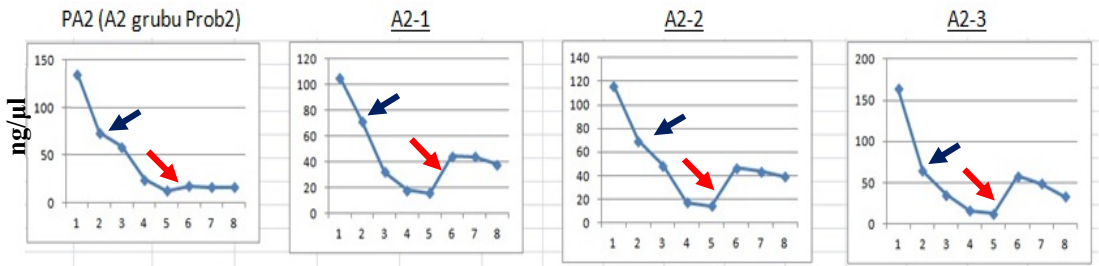


Şekil 3.8 : 6xHis kuyruğunun yapısındaki His residüleri (imidazole halkaları) ile Ni-NTA-Resin matriksinin etkileşimi.

ChIP-DNA-protein komplekslerinin izolasyon aşamalarına ait DNA konsantrasyon grafikleri Çizelge 3.2 ve Şekil 3.9’da verilmiştir.

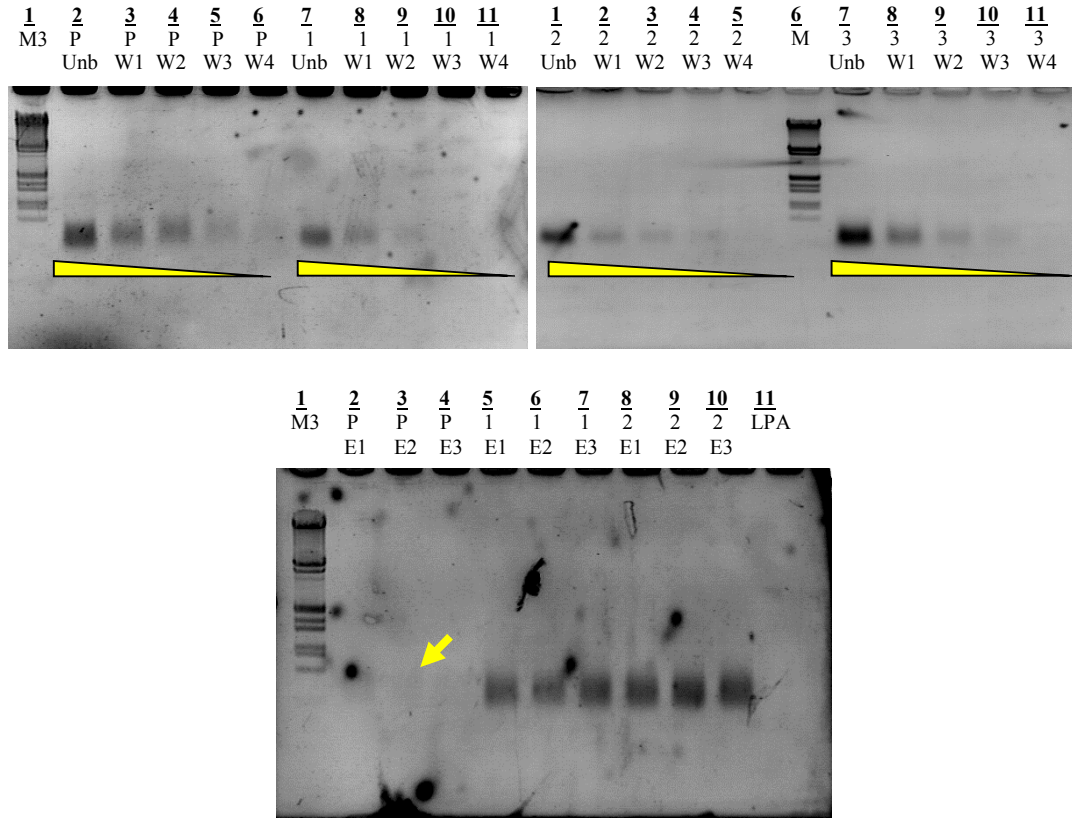
Çizelge 3.2 : ChIP-DNA-Protein komplekslerinin Ni-NTA-Resin sistemiyle izole edilirken alınan örnekler. Protein saflaştırma basamakları soldan sağa her kolonda sıra ile yazılmıştır.

SAMPLE	Supernatant After Resin	Wash-1 Lysis Buffer 10 mM	Wash-2 Wash Buffer 20 mM	Wash-3 Wash Buffer 20 mM	Wash-4 Wash Buffer 50 mM	Elution-1	Elution-2	Elution-3
PA2	135.2	73.7	59.2	24.2	12.5	17.6	16.2	16.4
A2-1	105.5	71.7	32.2	18	15.7	44.7	43.9	38.2
A2-2	116	69.7	48.5	17.3	14.1	46.6	43.6	39.2
A2-3	164.1	64.2	35.1	16.3	12.6	58	48.7	33.4



* **PA2:** Kontrol tüp, protein içermez. **A2-1, A2-2 ve A2-3:** Deney tüpleri. Grafikler, Çizelge 3.2’deki verilere göre hazırlanmıştır. **Kırmızı oklar:** Yıkama işleminden sonra elüsyon adımı DNA konsantrasyon artışını gösteriyor. **Mavi ok:** Bağlanmamış DNA örnekleri uzaklaştırıldıktan sonra ilk yıkama adımı DNA konsantrasyonunun ani düşüşünü gösteriyor. **1-8:** Çizelge 3.2’deki NTA-Ni-Resin protein saflaştırma basamaklarını ifade eder.

Şekil 3.9 : ChIP-DNA-protein komplekslerinin Ni-NTA-Resin sistemiyle izolasyonundan alınan örneklerde ölçülen DNA miktarları.

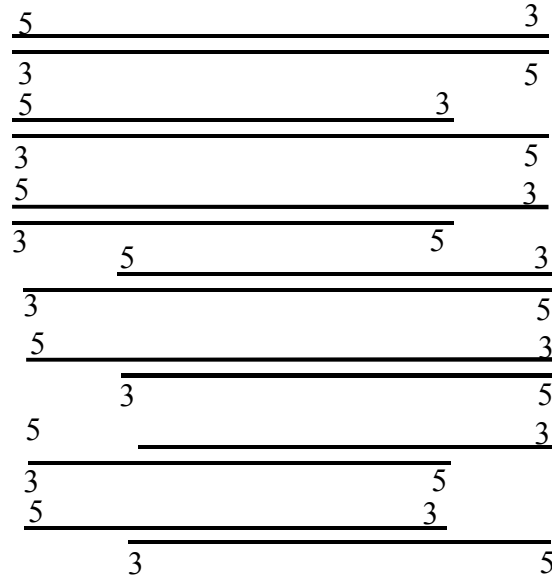


Şekil 3.10 : Ni-NTA-Resin sistemiyle saflaştırılan ChIP-DNA örneklerinin agaroz jel analizi. **M:** Marker, **P :** Prob, protein eklenmeyen tüpe ait örnekler, **1-2 ve 3:** Paralel olarak etiketlenen Tüp-1, Tüp-2 ve Tüp-3'e ait örnekler. **Unb:** Bağlanmamış örnekler, **W1-W2-W3-W4:** Yıkama örnekleri, **E:** Elüsyon örnekleri, **LPA:** Lineer Polisakkarit, **SARI OK:** Kontrol tüpüne ait elüsyon örneklerinde hiç DNA bulunmadığını göstermektedir.

Çizelge 3.2 ve Şekil 3.9 incelendiğinde, bağlanma aşamasından sonra rezinle muamele edildiğinde teorik olarak sadece 6xHis kuyruğu taşıyan proteinlerin resin matriksine bağlanması beklenir. Grafikte yatay sütunda 1 ile gösterilen örnek, resine bağlanmayan DNA parçalarını yansıtmaktadır ki beklenildiği gibi hem kontrol tüpünde hem de üç paralel tüpte en yüksek değeri göstermektedir. Grafikte 2-5 noktaları yıkama aşamalarını yansıtmaktadır. Yıkama adımları arttıkça üst sıvıda kalan DNA miktarı beklenildiği gibi azalmaktadır. Fakat elüsyon aşamasına geçildiğinde kontrol tüpü hariç diğer üç paralel tüpte DNA konsantrasyonu bariz bir şekilde artmıştır. Bu durum ChIP analizlerinde Ni-NTA-Resin Protein saflaştırma sisteminin kullanılabilir bir uygulama olduğunu doğrulamıştır. Bununla beraber kontrol tüpünde yıkama işlemleriyle 12.5 ng/µl'ye düşen DNA konsantrasyonu elüsyon aşamasında çok az bir artışla 17.6 ng/µl değerine çıkmış ve diğer elüsyon

adımlarında 16,2 ve 16,4 ng/μl değerlerini göstermiştir. Bu sonuçlar Ni-NTA-Resin sisteminin az da olsa serbest DNA moleküllerine karşı afinite gösterdiğinin bir işaretidir ve ChIP analizleri için olumsuz bir durumdur.

ChIP-DNA'ların saf olarak elde edilebilmesi için DNA-protein komplekslerinden proteinlerin ve tampon çözelti bileşiklerinin uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla "ChIP-DNA Saflaştırma" işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra -20 °C'ta saklanan saf ChIP-DNA örneklerini klonlama işlemine hazırlanmak için "poli-A kuyruğu ekleme" işlemi yapılmıştır. ChIP deneyinin başlangıcında kullanılan kromozomal DNA, sonikasyon yöntemi ile parçalandığı için, bu parçalama işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin belirli bir uç yapısına sahip olmaları beklenmez (Şekil 3.11). Bu nedenle ChIP-DNA parçalarının T/A klonlama işlemine uygun hale getirilmeleri, yani 3'-uçlarında poli-A kuyruğu içermeleri için Taq DNA polimeraz enzimi ve PZR yöntemi kullanılarak poli-A kuyruğu eklenmiştir (Çizelge 3.3).



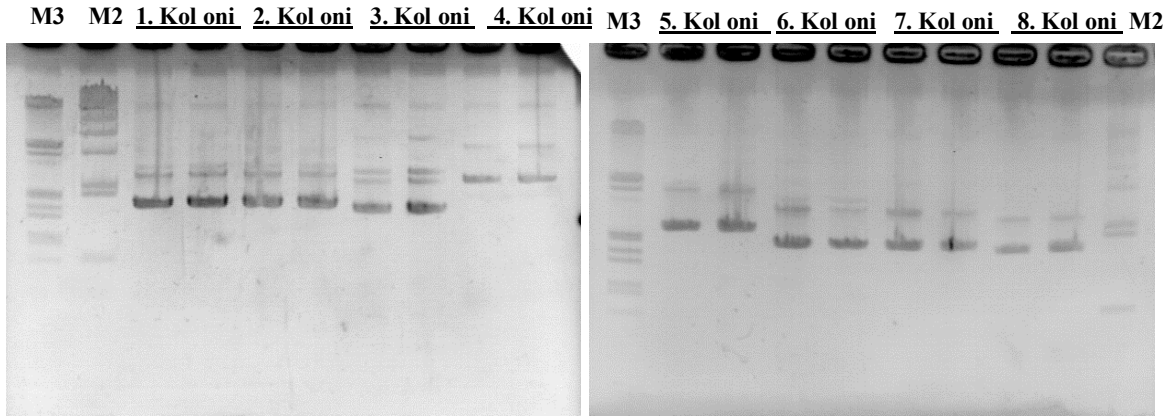
Şekil 3.11 : Sağlam DNA'nın sonikasyonla parçalanması sonucu elde edilecek DNA parçalarının 3' ve 5' uçlarında görülebilecek muhtemel yapılar.

Çizelge 3.3 : PolyA kuyruğu ekleme reaksiyonu protokolü.

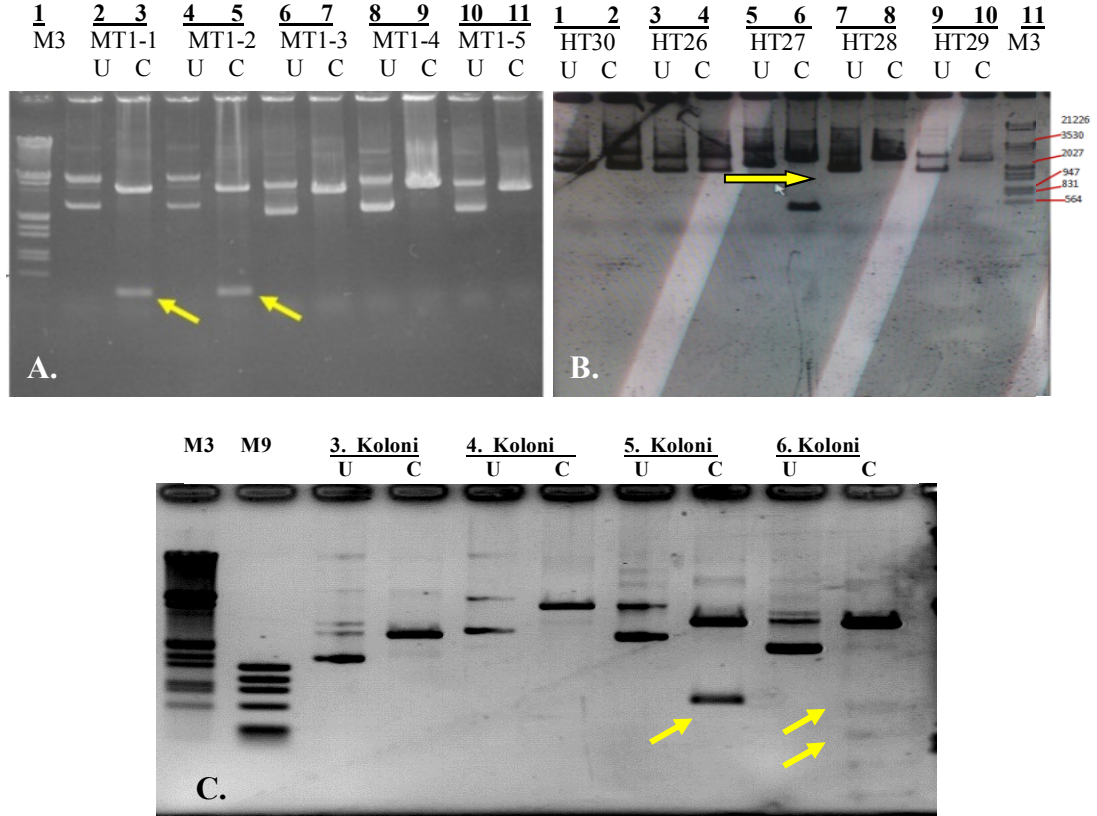
Sıcaklık	Süre
94 °C	4 min
72 °C	30 min
4 °C	∞

Daha sonra, poli-A kuyruğu eklenmiş ChIP-DNA'lar pGEM®-T Easy Vector veya pDRIVE PZR klonlama vektörüne klonlanmış ve kompetant *E. coli* hücrelerine aktarılarak, transformantlar 100 ug/mL Amp, 1mM IPTG ve 40 mg/ml X-Gal içeren LB agar besiyeri üzerinde mavi-beyaz transformant koloni seçilimi yapılmıştır. Elde edilen beyaz koloniler toplanmış ve plazmit DNA izole edilmiştir (Şekil 3.12). Beyaz kolonilerin oluşması poli-A ekleme ve ligasyon aşamalarının başarılı olduğunu göstermektedir. EcoRI restriksiyon enzimiyle yapılan taramada ChIP-DNA parçası içeren koloniler belirlenmiştir (Şekil 3.13).

Tarama sonucunda pozitif sonuç veren koloniler için DNA Dizi analizi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler FinchTV programı yardımıyla incelenerek “4-5_1” ve “HT-27” kolonilerine ait insert DNA dizilerinde sırasıyla 668 nt ve 485 nt'lik parça diziler elde edilmiştir (Şekil 3.14, 3.15 ve 3.16).

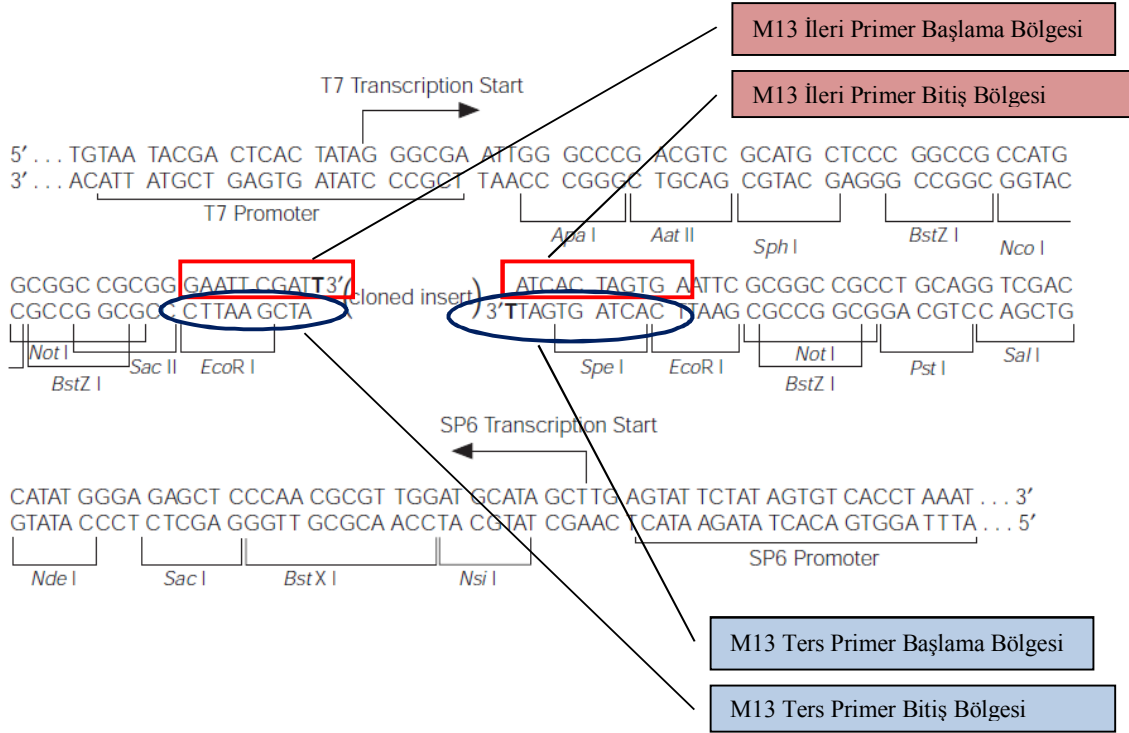


Şekil 3.12 : ChIP-DNA transformasyonundan seçilen kolonilerden izole edilen plasmidlerin agaroz jel analizi.



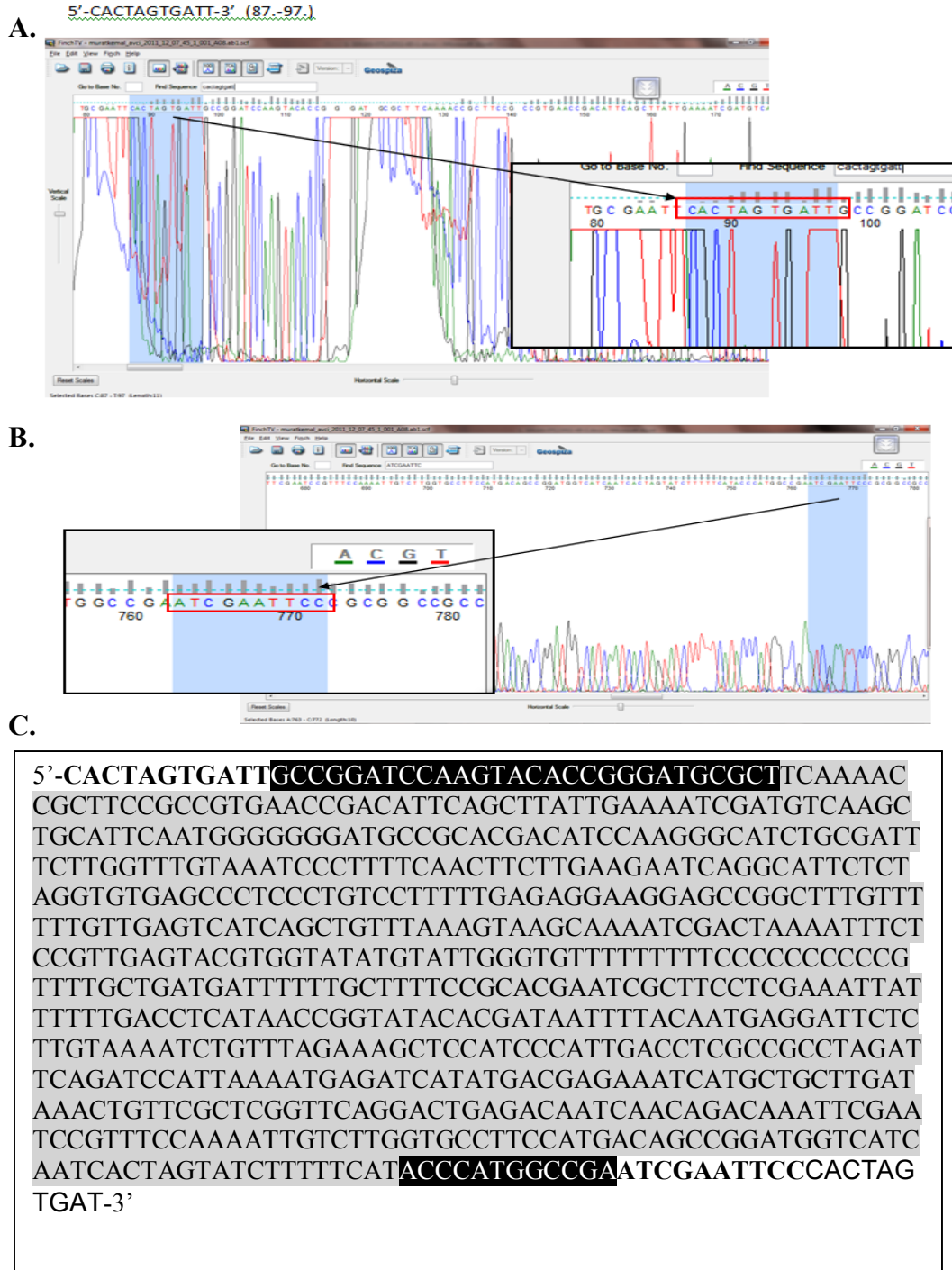
Şekil 3.13 : Transformasyon sonrası taramalarda belirlenen, ChIP-DNA insertleri. **A)** MT1 kodlu deneye ait transformasyon taramalarına ait plasmid örnekleri: MT1-1, MT1-2, MT1-3, MT1-4, MT1-5. **B)** HT kodlu deneye ait transformasyon taramalarına ait plasmid örnekleri: HT30, HT26, HT27, HT28, HT29. **C)** M4 kodlu deneye ait transformasyon taramalarına ait plasmid örnekleri: M4-3, M4-4, M4-5, M4-6. **M3:** DNA marker-3 (Fermentas), **M9:** DNA marker-9, **U:** kesilmemiş örnek (uncut), **C:** Kesilmiş örnek (cut).

Klonlanan parça-DNA'ya ait DNA dizileri NCBI veri tabanında BLAST aracı ile analiz edilmiştir. Organizma olarak “*Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* (taxid:224308)” ve “*Bacillus subtilis* (taxid:1423)” seçilmiştir. BLAST analizinde “4-5_1” kolonisine ait 665 nt’lik dizinin (Şekil 3.15.C) 29.-653. nt’ler arasındaki bölgesinin *B. subtilis* genomunda % 92 eşleşme gösterdiği belirlenmiştir. Klonlanan parça-DNA dizisiyle eşleşen bölgenin genomda hangi gen bölgesine karşılık geldiğini belirlemek amacıyla NCBI veri tabanındaki genom grafiklerinden yararlanılmış ve “*comA*” genine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.14 : pGEMT-easy klonlama vektöründe klonlama bölgesine ait dizi. **Kırmızı diktörtgenler:** M13-ileri primeri için başlangıç (5'-GAATTCGAT-3') ve bitiş (5'-ATCACTAGTG-3') bölgeleri. **Mavi daireler:** M13-ters primeri için başlangıç (5'-CACTAGTGAT-3') ve bitiş (5'-ATCGAATTCC-3') bölgeleri.

İlk bakıldığında klonlanan parça DNA (ChIP-DNA) dizisi *comA* geninin kodlama bölgesine karşılık gelmektedir. Halbuki ChIP analizlerinde, özellikle bu çalışmada, analiz edilen protein bir “transkripsiyon faktörü olduğu” için ve transkripsiyon faktörlerinin çoğunlukla bir genin transkripsiyon başlangıç +1 noktasına göreceli olarak yukarı-gen bölgesinde (5' yönünde) bir alana veya +1 bölgesinin hemen yakınındaki bir alt-gen bölgesine (3' bölgesine), kısaca bir promoter bölgesine bağlanması beklenildiğinden elde ettiğimiz sonuç ilk bakışta, tatmin edici görülmemiştir. Ancak bu durumu değerlendirmek için *comA* geninin haritası incelendiğinde *comA* geni ile *yuxO* (diğer adıyla *comB*, *comAB* veya *srfB*) geninin birbirlerine komşu oldukları ve *yuxO* geninin, *comA*'nın hemen bitişiğinde 3' aşağı gen bölgesinde aynı yönde konumlandığı görülmektedir. Bu durum dikkate alınarak, ChIP analizi sonucunda “4-5_1” kolonisine ait elde ettiğimiz, LutR'ın doğrudan bağlandığı aday genin “*yuxO*” olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.15 : 4-5_1 kolonisine ait dizi analizinde elde edilen sonuçlarının Finch TV programında analizi. M13-ters primer kullanılarak yapılan dizi analizinde, klonlanan parça DNA dizisini belirlemek için kullanılan pGEMT-easy vektörüne ait **A) Başlangıç bölgesi, B) Bitiş bölgesi, C) Başlangıç ve bitiş bölgesi arasında belirlenen insert dizisi (686 baz).** **Beyaz zeminde koyu harfli diziler:** pGEMT easy vektörünün inserte bağlanan uçları. **Siyah zeminde beyaz harfli diziler :** Insert dizisinde yer alan fakat BLAST analizinde *B. subtilis* genomunda eşleşmeyen kısımlar. **Gri zeminli dizi:** BLAST analizinde *B. subtilis* genomunda % 92 eşleşme gösteren 29.-653. nt'ler arasındaki bölgesi.

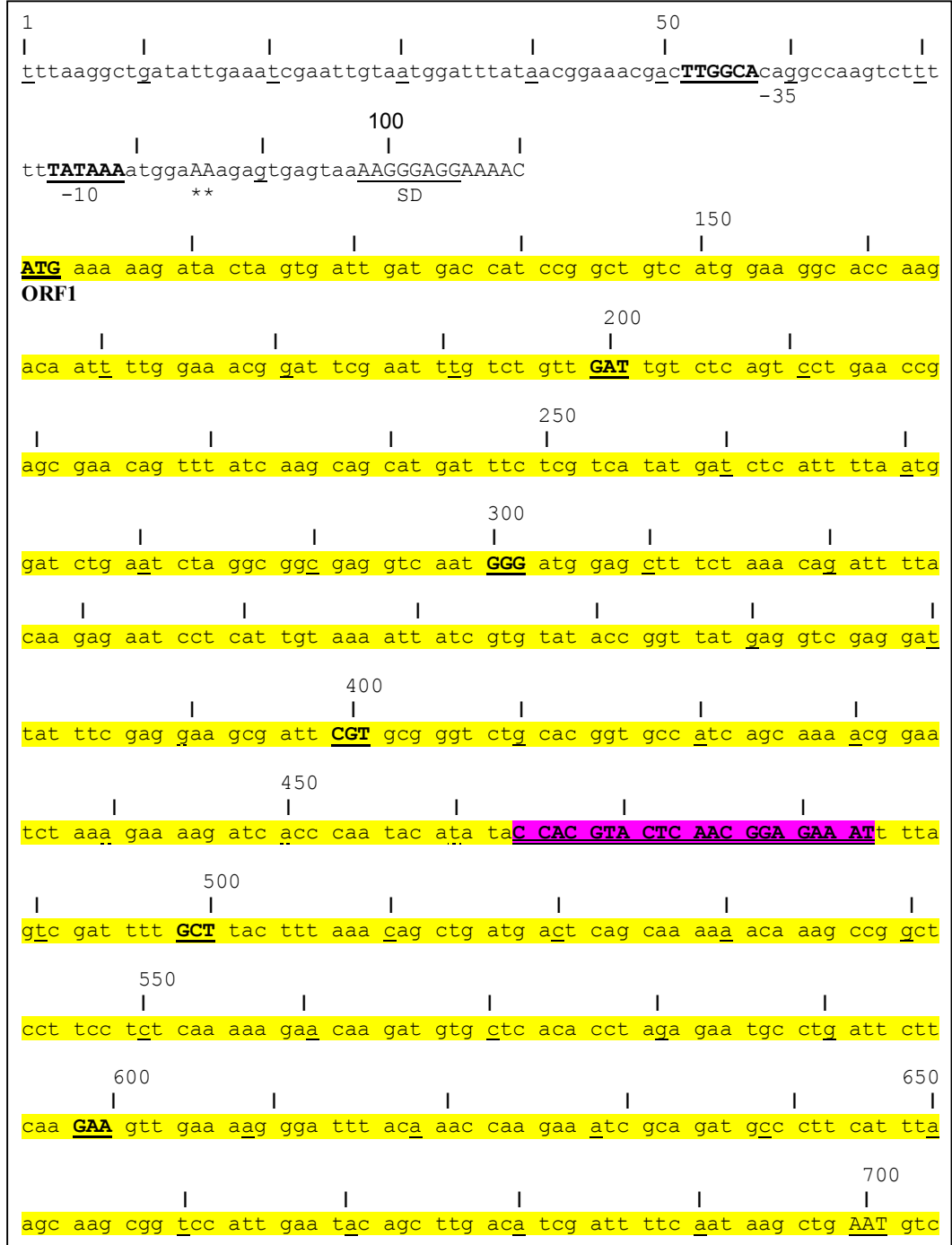
yapan bölgelerin, insertün bütünü yerine sadece küçük bir bölgesini içermesi BLAST analizi sonuçlarını olumsuzlaştırmıştır. Bir diğer kolonide ise benzer büyüklükte (>400 nt) klonlanan parça-DNA dizisinin BLAST analizinde %80'in üzerinde eşleşme belirlenmiştir. Eşleşme belirlenen bölgelerin klonlanmış parça-DNA'nın hemen hemen tamamını içermesine karşın, bu parça ile eşleşen genlerin *B. subtilis*'in haricinde *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Zea mays* gibi birçok farklı organizma genomu ile eşleşmesi nedeniyle kullanılabilir anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

```
>HT27F_002_F05.ab1      (485 bp)
5'-TGGCCGCATTTTGTGGGAGCGTAGTCAGGGGATTGACGAACGCGATGTTA
ACAGCGAACGGTTGCGAAAATCCGTCGGCGTGGAACGCACGATGGCGGAAG
ATATTCATCACTGGTCTGAATGTGAAGCGATTATCGAGCGGCTGTATCCGGA
ACTTGAACGCCGTCTGGCAAAGGTAAAACCTGATTTACTGATTGCTCGCCAG
GGGGTGAAATTAAAGTTCGACGATTTTCAGCAAACCAACCCAGGAGCACGTC
TGGCCGCGGCTGAATAAAGCTGATCTAATCGCCACCGCGCGTAAAACCTGG
GATGAACGCCGCGGCGGGCGCGGTGTGCGTCTGGTGGGGCTGCATGTGACG
TTGCTTGACCCGCAAATGGAAAGACAACCTGGTGCTGGGATTATGATGTATAC
TATTATGTATATTCTGGTGTGCATTATTATGAGGGTATCACTGTATGCATCGA
ATTCTCGCTGAAAAATCGGTCA-3
```

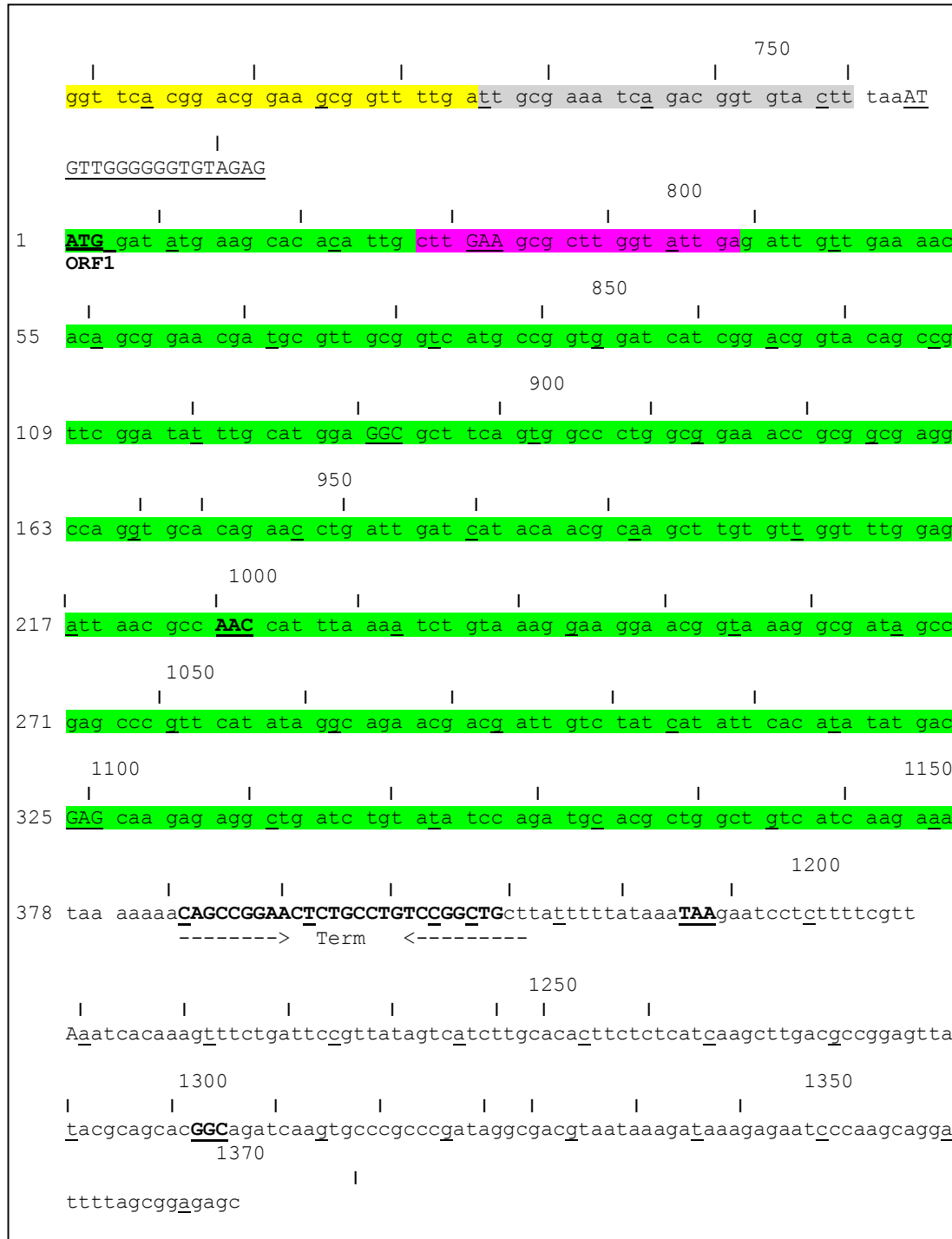
Şekil 3.17 : HT27 kolonisine ait belirlenen klonlanmış parça DNA dizi. Subtilist veri tabanında BLAST analizlerinde kayda değer bir eşleşme belirlenememiştir.

yuxO genine ilaveten yeni genlerin yakanlanması amacı ile ChIP analizleri gerek en baştan gerekse klonlama aşamasından pek çok kez tekrarlanmış fakat olumlu bir sonuç elde edilememiştir. Malesef tüm denemelerde, ChIP analizlerinde, “ChIP-klonlanan parça DNA’yı” içeren gerçek transformant sayısının çok az elde edilmesi ve aynı zamanda klonlanan ChIP-parça DNA’larının yukarıda açıklandığı şekilde hemen hemen hepsinin BLAST analizlerinde belirsiz, açıklanamayan eşleşmeler vermesi gibi olumsuzluklar aşılamamıştır.

ChIP-BLAST analizinde belirlenen aday *yuxO* geninin, LutR proteininin doğrudan bağlandığı bir hedef gen olduğunu doğrulamak amacıyla ilk olarak *B. subtilis* genomuna ait veritabanı olan <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/genome.cgi> programında *yuxO* geni kontrol edilmiş ve ChIP analizinde elde edilen DNA dizisi ile *comA* genine ait dizinin aynı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.18). Buna ek olarak elde ettiğimiz ChIP-DNA dizisi, Weinrauch ve ark. (1989)’nın *comA* ve *comB* genlerinin açık okuma çerçevelerini (ORF) belirlemek için yaptıkları çalışma ile karşılaştırılmış ve aynı dizi olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 : Weinrauch ve ark. (1989)'nın *B. subtilis*'te *comA* ve *comB* genlerinin açık okuma çerçevelerini (ORF) belirlemek için yaptıkları çalışmada belirtilen gen dizileri ile bu tez çalışmasında elde edilen klonlanmış ChIP-DNA parçasına ait dizinin karşılaştırılması. **SARI:** *comA* geni ve aynı zamanda klonlanmış DNA parçası olarak belirlenen ChIP-DNA'nın BLAST analizinde *comA* geniyle eşleşme gösteren kısmı, **GRİ:** *comA* genine ait olan fakat klonlanmış DNA parçasına ait dizide eşleşme göstermeyen kısım, **YEŞİL:** *yuxO* geni, **PEMBE:** *yuxO* promotör bölgesi için tasarlanan primer bölgeleri, **ORF:** Açık okuma pencereleri, **Term:** Sonlanma dizisi.



Şekil 3.20 (Devam): Weinrauch ve ark. (1989)'nın *B. subtilis*'te *comA* ve *comB* genlerinin açık okuma çerçevelerini (ORF) belirlemek için yaptıkları çalışmada belirtilen gen dizileri ile bu tez çalışmasında elde edilen klonlanmış CHIP-DNA parçasına ait dizinin karşılaştırılması. **SARI:** *comA* geni ve aynı zamanda klonlanmış DNA parçası olarak belirlenen CHIP-DNA'nın BLAST analizinde *comA* geniyle eşleşme gösteren kısmı, **GRI:** *comA* genine ait olan fakat klonlanmış DNA parçasına ait dizide eşleşme göstermeyen kısım, **YEŞİL:** *yuxO* geni, **PEMBE:** *yuxO* promoter bölgesi için tasarlanan primer bölgeleri, **ORF:** Açık okuma pencereleri, **Term:** Sonlanma dizisi.

Karşılaştırmalı dizi analizlerinden sonra *yuxO* geninin, LutR proteininin doğrudan kontrol ettiği genlerden biri olduğunu doğrulamak amacıyla EMSA ve Gerçek Zamanlı-qPZR analizleri yapılmıştır.

3.4 *yuxO* geninin EMSA Analizi

ChIP deneylerinde elde ettiğimiz veriler, LutR proteinin doğrudan bağlandığı genlerden birinin *yuxO* geni olduğunu göstermiştir. LutR transkripsiyon faktörünün doğrudan olan ilişkisini *in vitro* olarak kanıtlamak amacıyla EMSA yönteminde yararlanılmıştır. ChIP prosedürünün tabiatı gereği, bu deney sonucunda belirlenen genlerin, teorik olarak, ilgilenilen proteinin (bu çalışmada LutR proteininin) doğrudan bağlandığı genler olması beklenir. Transkripsiyon faktörleri ile bu proteinlere ait hedef DNA (promotor) bölgelerinin doğrudan ilişkisini incelemek amacıyla kullanılan en yaygın ve etkili yöntemlerden biri EMSA yöntemidir.

EMSA analizi için ilk olarak *yuxO* geninin transkripsiyon başlangıç +1 noktasına göreceli (-310.)-(+41.) bazları arasındaki 351 bazlık bölgeye karşılık gelen gen bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Bu amaçla önce *yuxO* geninde ilgili bölgeye uygun primerler dizayn edilmiştir (Şekil 3.20): **yuxO.Emsa.forward**, 5'-CCA CGT ACT CAA CGG AGA AAT-3'; **yuxO.EMSA.reverse**, 5'-CTC AAT ACC AAG CGC TTC AAG-3'. PZR yöntemiyle çoğaltılan *yuxO* promotor DNA %1'lik agaroz jelde incelenmiş (Şekil 3.21) ve NanoDrop cihazıyla konsantrasyon tayini yapılmıştır.

45 ng *yuxO* promotor bölgesini içeren PZR ürünü ve 1-2-4 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda LutR ve SinR proteinleri kullanılarak EMSA analizleri gerçekleştirilmiştir. Bütün bağlanma reaksiyonları aşırı miktardaki “özel olmayan yarışmacı” poli-[d(I-C)] DNA (1 µg/µl) düzelt ve negatif kontrol proteini sıgır serum albümini (BSA, 1 µg/µl) varlığında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca LutR ve SinR proteinlerinin bağlanma özellikleri pozitif ve negatif kontrollerle test edilmiştir. Negatif kontrol DNA olarak *ywbH* geni, pozitif kontrol DNA olarak *yqxM* geni kullanılmıştır (Şekil 3.22). EMSA analizlerinde LutR ve SinR proteinleri hem tek olarak hem de ikisi birlikte kullanılmıştır. Buna göre her iki proteinin tek başına kullanıldığında 1-2-4 µM şeklinde uygunlanan konsantrasyon artışına bağlı olarak *yuxO* promotor DNA'sının elektro hareket kayması da artmıştır. Benzer şekilde LutR ve SinR proteinlerinden sırasıyla sadece birini sabit konsantrasyonda (2 µM) kullanıp diğerinin konsantrasyonu arttırıldığında tek başlarına gösterdikleri kayma profiline

göre daha fazla elektro harekette kayma yaşandığı gözlenmiştir (Şekil 3.23). Bununla

```

ttaaaggctgatattgaaatcgaattgtaattggattataacggaacgacttggcacaggccaagtcttt
ttataaaatggaagagtgagtaaaaggaggaaaac
1 -ATG* aaa aag ata cta gtg att gat gac cat ccg gct gtc atg gaa ggc acc aag
55 -aca att ttg gaa acg gat tgc aat ttg tct gtt GAT tgt ctc agt cct gaa ccg
109-agc gaa cag ttt atc aag cag cat gat ttc tgc tca tat gat ctc att tta atg
163-gat ctg aat cta ggc ggc gag gtc aat GGG atg gag ctt tct aaa cag att tta
217-caa gag aat cct cat tgt aaa att atc gtg tat acc ggt tat gag gtc gag gat
271-tat ttc gag gaa gcg att CGT gcg ggt ctg cac ggt gcc atc agc aaa acg gaa

----- yuxO.Emsa.forward ----->
325-tct aaa gaa aag atc acc caa tac ata taC CAC GTA CTC AAC GGA GAA ATt tta
379-gtc gat ttt GCT tac ttt aaa cag ctg atg act cag caa aaa aca aag ccg gct
433-cct tcc tct caa aaa gaa caa gat gtg ctc aca cct aga gaa tgc ctg att ctt
487-caa GAA gtt gaa aag gga ttt aca aac caa gaa atc gca gat gcc ctt cat tta
541-agc aag cgg tcc att gaa tac agc ttg aca tgc att ttc aat aag ctg AAT gtc
595-ggt tca cgg acg gaa gcg gtt ttg att gcg aaa tca gac ggt gta CTT
taa atg ttg ggg ggt gta gag

<----- yuxO.EMSA.reverse primer
1 -ATG gat atg aag cac aca ttg ctt GAA gcg ctt ggt att gag att gtt gaa aac 55 -aca
gcg gaa cga tgc gtt gcg gtc atg ccg gtg gat cat cgg acg gta cag ccg 109-ttc gga tat
ttg cat gga GGC gct tca gtg gcc ctg gcg gaa acc gcg gcg agg 163-cca ggt gca cag
aac ctg att gat cat aca acg caa gct tgt gtt ggt ttg gag 217-att aac gcc AAC cat tta
aaa tct gta aag gaa gga acg gta aag gcg ata gcc 271-gag ccc gtt cat ata ggc aga acg
acg att gtc tat cat att cac ata tat gac 325-GAG caa gag agg ctg atc tgt ata tcc aga
tgc acg ctg gct gtc atc aag AAA

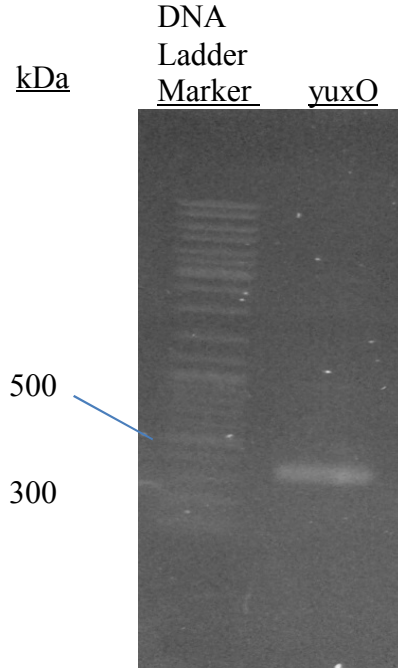
379 taaaaaacagccggaactctgcctgtccggctgcttattttataaaTAAgaatcctctttt
cgtttaatcaciaagtttctgattccgttatagtcattctgcacacttctctcatcaagcttgacgccggagtataacgcagc
acGGCagatcaagtccccgccCgataggcgacgtaataaagataaagagaatccaagcaggatttttagcgg
agagc

```

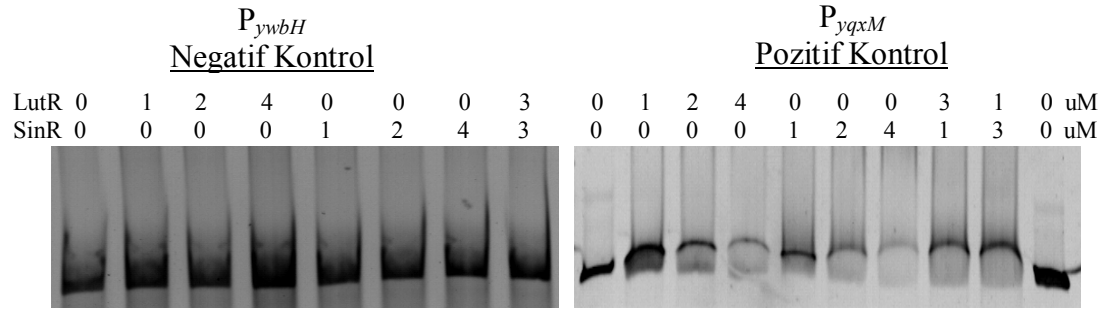
- * **YEŞİL** : *comA* ve *yuxO* genlerinde transkripsiyon “Başlama (+1) Noktası”.
- KIRMIZI** : *comA* ve *yuxO* genlerinde transkripsiyon “Sonlanma noktaları”.
- PEMBE** : “4-5_1 Kolonisi”ne TATTait klonlanmış ChIP-DNA parçasının son noktası.
- SARI** : *comA* geni
- GRİ** : *yuxO* geni

beraber negatif kontrollerde herhangi bağlanma olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.22).

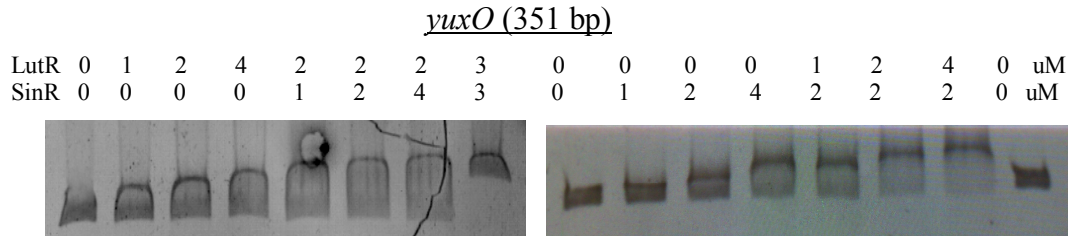
Şekil 3.21 : İnsert DNA parçasında *yuxO* promotoru için tasarlanan primer bölgelerinin gösterimi.



Şekil 3.22 : *yuxO* geninde (-340.)-(+41.) nükleotitler arasındaki 351 bç'lik (351 bç) promotor bölgesine ait PZR ürününün agaroz jel görüntüsü.



Şekil 3.23 : Tez çalışmasında yapılan EMSA analizlerinin pozitif ve negatif kontrolleri. LutR ve SinR proteinleri için pozitif kontrol olarak *yqxM* geni, negatif kontrol olarak *ywbH* geni kullanılmıştır.



Şekil 3.24 : LutR-SinR regülatör proteinlerinin *yuxO* geniyle EMSA analizi.

LutR ve SinR proteinleri ile *yuxO* geninin promotor DNA'sı arasında yapılan EMSA analizleri, LutR proteininin *yuxO* genine doğrudan bağlandığını doğrulamıştır.

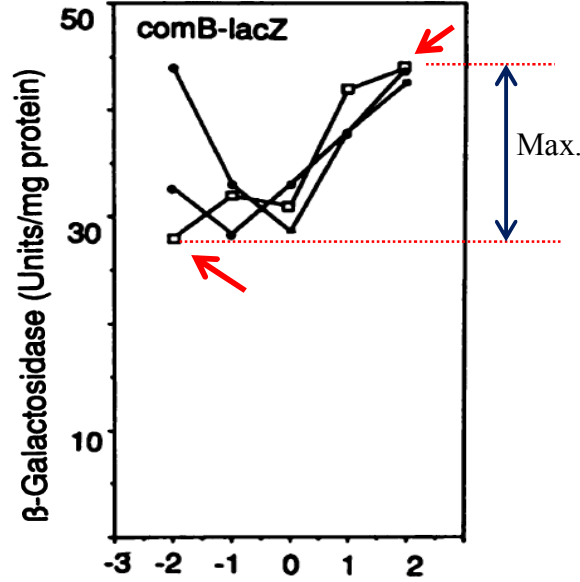
Çünkü LutR proteini hem tek başına 1-2-4 μ M artan konsantrasyon değerlerinde, hem de kendisi sabit (2 μ M) konsantrasyondayken, SinR'ın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak elektro harekette kayma giderek artmıştır. Bu durum, LutR'ın *yuxO* promotor bölgesine doğrudan bağlandığını gösterdiği gibi SinR tarafından da herhangi bir engellenme yaşanmadığını, bilakis elektro harekette kaymanın arttığını göstermiştir. SinR proteininin *yuxO* geni ile ilişkisi LutR proteiniyle benzerdir. Çünkü SinR proteini de 1-2-4 μ M artan konsantrasyon değerlerinde *yuxO* promotor bölgesine giderek daha fazla bağlanma göstermiştir. Ayrıca sabit konsantrasyondaki SinR'ın (2 μ M) artan konsantrasyonlardaki LutR varlığında, elektro harekette kaymanın daha da arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak LutR ve SinR proteinlerinin *yuxO* promotor bölgesine tek başlarına doğrudan bağlanabildikleri gibi, ikisi birlikte yarışmacı (kompetatif) olarak değil eş zamanlı (simültane) bağlanabildiği belirlenmiştir.

3.5 *yuxO* geninin RT-qPCR analizi

ChIP deneylerinde DNA dizileme analizleri sonucunda belirlenen *yuxO* aday geninin LutR proteini ile doğrudan etkileşimini doğrulamak amacıyla, *yuxO* gen ifadesinin LutR aktivitesine olan bağımlılığı RT-qPCR analizi ile incelenmiştir. Bu analizlerde yabancı tip *B. subtilis* PY79 suşu ve LutR üretme özelliği bozulan *B. subtilis* TEK1 mutant suşu (*lutR::Tn10::spc*) kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, Guillen ve ark. (1989)'nın çalışmaları referans alınarak, RNA örneklerinin, üreme periyodunun (Şekil 3.24) hangi aşamalarında alınması gerektiği belirlenmiştir.

Guillen ve ark. (1989)'na göre *comA* ve *comB* (*yuxO*) genleri üreme sürecinin başından sonuna kadar sürekli ifade edilen “erken genler” grubunda yer almaktadır. Guillen ve ark. (1989) *com* genlerinin birbirine olan bağımlılığını araştırmak amacıyla beta-galaktozidaz analizleri yapmışlardır (Şekil 3.24). Bu analize göre *yuxO* (*comB*) geni hem logaritmik fazda hem de durağan fazda, farklı seviyelerde olmakla birlikte, göreceli olarak fazla miktarda ifade edilmektedir. Ancak bu iki faz arasında, logaritmik fazdan durağan faza “geçiş noktasında (T_0)” *yuxO* ifadesinin aniden arttığı ve ifade seviyesindeki farklılığın geçiş noktasından (T_0 'dan) 1-2 saat önceki (T_{-2}, T_{-1}) ve sonraki (T_{+1}, T_{+2}) noktalarda en fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle ChIP-Gen adayı *yuxO*'nun LutR proteinine bağlı gen ifadesini belirlemek amacıyla yapılan RT-qPCR analizi için örnek toplanırken Guillen ve ark. (1989)'nın

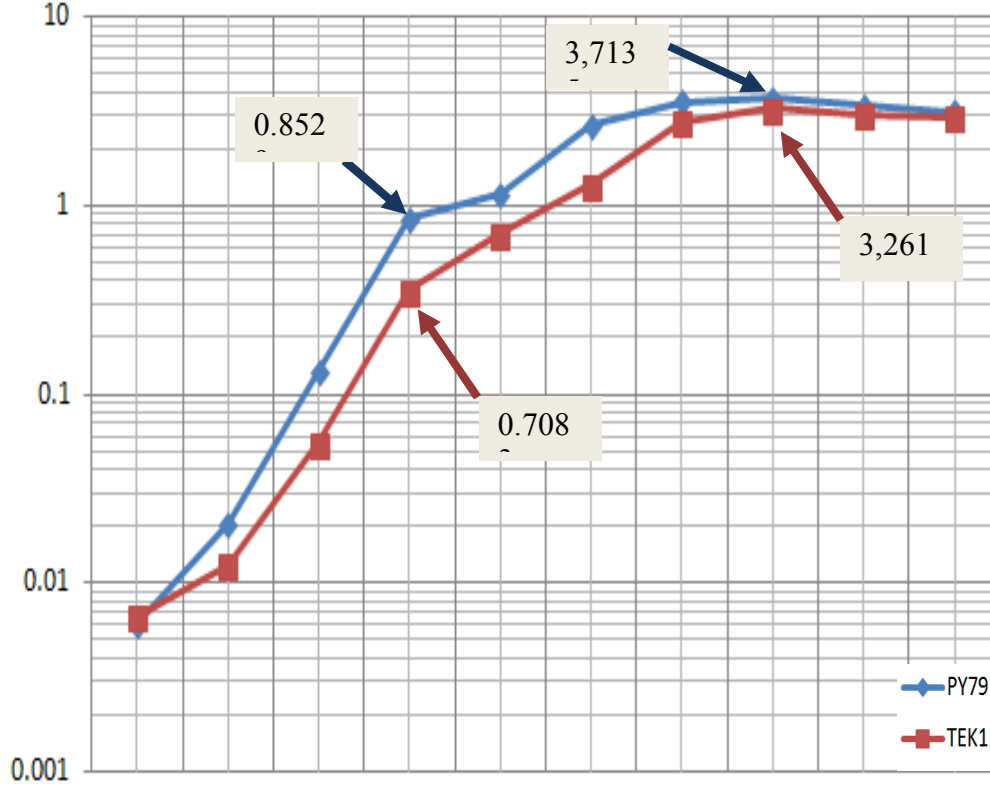
bu sonuçları dikkate alınmıştır. RNA izolasyonu için geçiş noktası (T_0)'nın 1-2 saat öncesinden (T_{-1} , T_{-2}) ve sonrasında (T_{+1} , T_{+2}) örnekler alınmış (Şekil 3.25), ardından GSBMM besiyerinden alınan bu örneklerden RNA izole edilmiştir. RT-qPCR uygulaması Roche-LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master Kit prosedürüne göre yapılmıştır.



Şekil 3.25 : *sin* (●), *comA* (○) ve *comB* (*yuxO*) (■) mutasyonlarının *lacZ* geni ile *yuxO* (*comB*) promotor bölgesinin transkripsiyonel füzyonuyla elde edilen mutant suşta β-galaktosidaz ifadesi üzerindeki epistatik etki. Yabani tip yapıdaki füzyonun B-galaktosidaz aktivitesi (□) ile gösterilmiştir (Guillen ve ark. (1989)'dan alınmıştır). Yatay doğrultudaki sıfır (0) noktası logaritmik faz ile durağan faz arasındaki geçiş noktasını, negatif işaretli sayılar bu noktadan önce alınan örnekleri, pozitif sayılar ise bu noktadan sonra alınan örnekleri ifade etmektedir.

GSBMM besiyeri kompetans özelliğinin gelişimini tetikleyen minimal bir besiyeridir (Albano ve Dabnou, 1989). Bu nedenle hem yabani tip PY79 suşunda hem de mutant TEK1 suşunda kompetans oluşumunu sağlayan genlerin GSBMM besiyerinde büyüyen suşlarda aktif olması beklenir. Bu deneyin amacı *lutR* geni bozulmuş olan mutant suş TEK1 (*lutR::Tn10::spc*) ile *lutR* geni sağlam olan PY79 suşu (*lutR*⁺) arasında, *yuxO* (*comB*) geninin ifade düzeyi açısından bir değişiklik olup olmadığını belirlemektir. Bu amaçla yabani tip PY79 suşu ile *lutR* geni bozulmuş mutant TEK1 suşu GSBMM besiyerinde üretilerek, belirlenen inkübasyon aralıklarından (Şekil 3.25) örnekler toplanmış ve bu hücrelerden toplam RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA stoğundan 2 µg alınarak rastgele altı birimli primerler varlığında, Transcriptör

High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak, cDNA sentezlenmiş ve qPCR reaksiyonlarında bu cDNA kalıp olarak kullanılmıştır. qPCR reaksiyonunda, toplam 15 µl olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımına 2 µg cDNA, LightCycler® 480 SYBR Green Master seti (Roche) ve *yuxO* genine özgü primerler (**yuxO.QPCR.forward:** 5'-TCAGTGGCCCTGGCGGAA-3', **yuxO.QPCR. reverse:** 5'-CAG CCT CTC TTG CTC GTC-3') (20 µM) eklenmiştir.



Şekil 3.26 : *B. subtilis* PY79 yabani tip ve TEK1 mutant suşlarının üreme eğrileri.
Oklar: Her iki suştan RNA izolasyonu için örnek alınan noktaları göstermektedir.

Üreme sürecinin T_{+2} noktasında PY79 ve TEK1 suşları *yuxO* gen ifade düzeyi açısından karşılaştırıldığında mutant suşta 0.95 kat azalma görülmüştür (Çizelge 3.4). Yani *lutR* geninin inaktif durumda olması nedeniyle LutR proteini üretilmemekte ve buna bağlı olarak *yuxO* geninin ifadesinde azalma görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, *lutR* geni *yuxO* geninin pozitif düzenlenmesinden (up-regülasyonundan) sorumlu olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.4 : Kompetens gelişimine bağlı olarak LutR proteininin *yuxO* (*comB*) geni üzerindeki düzenleyici etkisi.

GEN	qPCR ¹	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ²
<i>yuxO</i> (<i>comB</i>)	0,95	Kompetans gelişimi	

¹ Sayılar ifade oranına dönüştürülmüş log2 değerini ifade ediyor.

² <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/> sunucusundan alınan transkripsiyonel organizasyon, “#” transkripsiyon sonlanma bölgesini işaret eder.

3.6 LutR’ın doğrudan kontrolü altında olabilecek *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* aday genlerinin EMSA analizleri

Dr. Öykü İrigül Sönmez’in doktora tezi (2012) kapsamında, gen ifadeleri LutR proteini tarafından doğrudan etkilenen genleri belirlemek amacıyla IPTG ile indüklenebilen bir LutR üretici “*B. subtilis* PY79 *amyE*::Pspac::*yvfI*, *yvfI*::*Tn10*” mutant suşu oluşturulmuş ve bu suş kullanılarak IPTG ile indüklenmiş (*lutR* geninin aşırı ifade edildiği) ve IPTG ile indüklenmemiş (*lutR* geninin ifade edilmediği) durumlarda karşılaştırmalı transkriptom analizleri yapılmıştır. Bunun için *B. subtilis amyE*::Pspac::*lutR* mutant suşu LB besi yerinde OD₆₀₀ değeri 0,5 oluncaya kadar üretilmiştir. Bu değere ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenen hücrelerden 30. ve 60. dakikalarda örnekler alınmıştır. İlgili transkriptom analizleri sonucunda, LutR’ın ifade edilmesine karşılık olarak transkripsiyon seviyelerinin değiştiği, dolayısı ile LutR ın direk kontrolü altında olabileceği düşünülen *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* aday genleri belirlenmiştir. Bu olasılığın araştırılması için gerçekleştirilen EMSA analizleri bu tez kapsamında yapılmıştır. Negatif kontrol geni olarak *ywbH* ve pozitif kontrol geni olarak *yqxM* kullanılmıştır (Şekil 3.22).

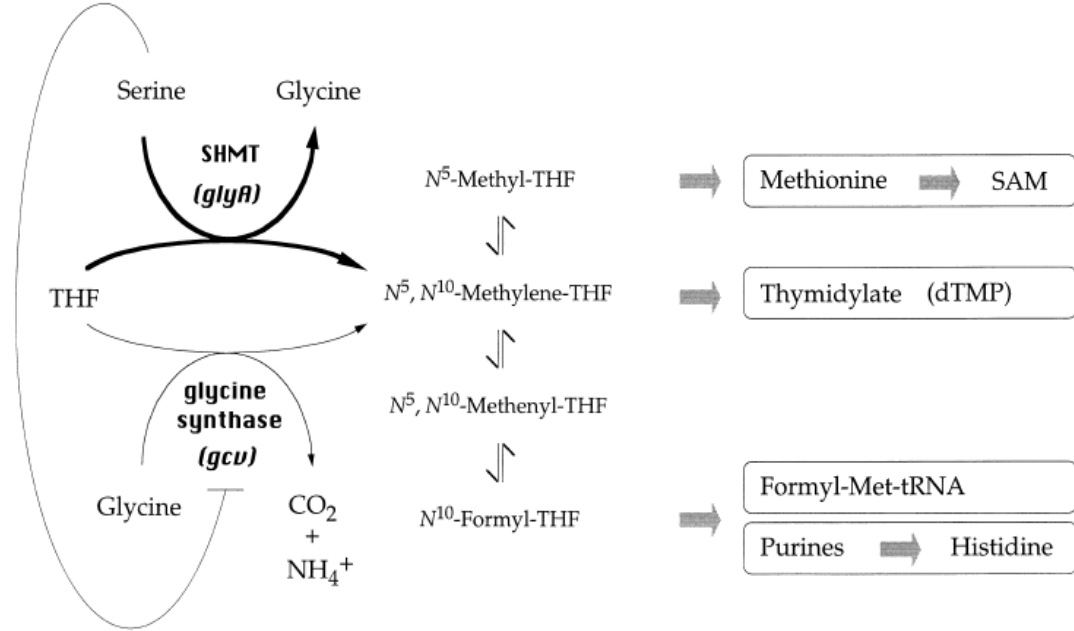
3.6.1 LutR ve SinR proteinlerinin *lrpB* geni üzerindeki etkisi

Lrp ailesinin üyeleri yaklaşık 15 kDa moleküler ağırlığa sahip olan küçük DNA-bağlanma proteinleridir. *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pyrococcus furiosus* gibi farklı organizmalara ait Lrp homologlarının multimerik yapılarında dimer, tetramer, oktamer ve hekzamer formlar görülmektedir. Bunlardan en iyi araştırılmış olanı *E. coli* Lrp proteinidir. Lösin-cevap Düzenleyici

Protein (Lrp, Leucine-responsive Regulatory Protein), *E. coli* hücrelerinde birçok genin ve operonun ifadesini etkileyen global düzenleyici bir proteindir. Lrp proteini *E. coli* genlerinin yaklaşık % 10 kadarını etkilemektedir ve bu genlerin çoğu durağan faza girerken ifade edilen genlerdir. *E. coli*'deki Lrp regülunu ağırlıklı olarak amino asit metabolizmasında görev alan genleri içermekle birlikte, daha az sayıda pili sentezinde görevli olan genleri içerir (Calvo and Matthews, 1994; Newman, 1995). Lrp proteini bu genlerin bazılarının transkripsiyonunu aktive ederken bazıları üzerinde baskılayıcı etki gösterir. Lrp'nin kontrolü altındaki operonlardan bir kısmı için bu düzenleyici etki lösün amino asidine bağlı olarak gerçekleşirken bazı operonlar için lösünden bağımsızdır. Lösün amino asidi diğer amino asitlere kıyasla protein yapısında daha fazla oranda bulunmaktadır (yaklaşık % 9.1). Lösün, alanin, valin, izolösün, asparajin, lizin ve prolin gibi çeşitli amino asitlerin özel efektör olarak rol aldıkları bilinmektedir (Brinkman ve ark., 2003).

B. subtilis'e ait genom analizinde çok sayıda Lrp homologunun bulunduğu belirlenmiştir. EcoLrp proteini ile benzerlik dereceleri %25-34 arasında değişen bu proteinler arasında esansiyel olmayan LrpA, LrpC, AzlB, YezC, YwrC ve YugG proteinleri ile birlikte LrpB proteini de yer almaktadır. *B. subtilis*'e ait bu proteinlerin fonksiyonları ile ilgili veriler oldukça azdır (Lopez-Terrejon ve ark., 2006). Lrp/AsnC ailesine üye proteinler global veya özel düzenleyici proteinlerdir. Bunlardan en iyi bilineni olan *E. coli* Lrp proteini, genellikle lösün amino asidinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak aktifleşen veya baskılanan yaklaşık 75 transkripsiyon biriminden oluşan bir regülunu kontrol eder. Lrp kontrolündeki bu genler, başlıca, amino asitlerin transportu, degradasyonu ve biyosentezinde görev almaktadır (Leonard ve ark., 2001; Dartois ve ark. 1997). *E. coli*'de Lrp proteininin çalışma şekline bakıldığında sıklıkla CRP (cAMP reseptör protein), IHF (integration host factor), Histon-like protein H-NS gibi diğer global düzenleyicilerle birlikte hareket ettiği görülür (Levinthal *et al.*, 1994; Mathew *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2001; Weyand *et al.*, 2001). Bunun aksine deoksiadenozin metilaz (Dam) enzimine karşı belirli bir promotor üzerindeki aynı bağlanma bölgesi üzerinde yarışmalı olarak etki göstermektedir (Dartois ve ark., 1997). Buna göre *B. subtilis* *lrpA* ve *lrpB* genlerinin biyosentetik *glyA* geniyle birlikte KinB sensör kinazı aktive eden genel sinyalizasyon yolağında etkili olduğu ileri sürülmüştür. *glyA* gen ürünü olan serin hidroksimetil

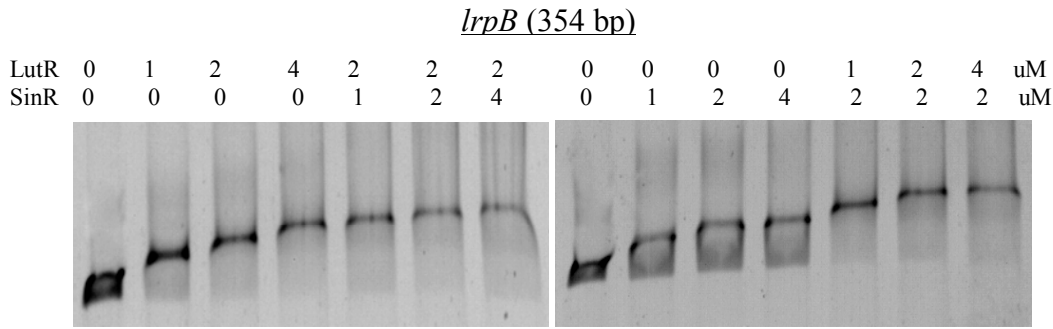
transferaz enzimi, serin ve glisin amino asitlerinin birbirine dönüşümünü katalizler (Şekil 3.26).



Şekil 3.27 : THF tarafından taşınan C1 ünitelerinin orjini, dönüşümü ve biyosentez metabolizmasında *glyA* geninin rolü. C1 ünitelerinin THF havuzuna girişi, *glyA* geninin kodladığı serin hidroksimetil transferaz'ın serini glisine dönüştürmesi ve glisin bir glisin sentaz tarafından kesilmesi esnasında N^5, N^{10} -metilen-THF olarak gerçekleşmektedir. (Dartois ve ark., 1997).

Bu reaksiyonu katalizlerken her bir mol serinin glisine dönüşümüne karşılık 1 mol metilen tetrahidrofolat (5, 10-mTHF) üretir. Bu reaksiyon, hücrenin tek glisin kaynağı ve tetrahidrofolata bağlı C1 ünitelerinin ana kaynağı olarak düşünülebilir. Tetrahidrofolat türevleri sırasıyla histidin, pürinler, timidilat, metionin ve N-formil-metionil-tRNA biyosentezinde kullanılan tek karbonlu birimlerin (one-carbon units) donörü olarak görev yapar. *B. subtilis*'in sporilasyon metabolizması ile ilgili transkripsiyonlar, SpoOA transkripsiyon faktörünün fosforlanmış formuna bağlı olarak başlar (Şekil 3.27). SpoOA'nın fosforilasyonu KinA ve KinB olmak üzere, iki kinaz enzimini içeren fosforilasyona bağlı sinyal iletiminin bir sonucudur. KinA ve KinB kinazları, cevap düzenleyici SpoOF ve fosfotransferaz SpoOB proteinlerini fosforlar (Şekil 1.4). SpoOB enzimi SpoOF~P'teki fosfatı alıp SpoOA'ya aktarır (Burbulys ve ark., 1991).

Bütün bu veriler ışığında, LutR proteininin *lrpB* promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı EMSA yöntemiyle test edilmiştir (Şekil 3.27). Bunun için *lrpB* geninin transkripsiyon başlangıç +1 bölgesine göre (-282)-(+72) bazları arasındaki 354 bazlık DNA bölgesi ile farklı konsantrasyonlarda LutR-His₆ ve SinR-His₆ proteinleri kullanarak EMSA yöntemi uygulanmıştır. Bütün bağlanma reaksiyonları aşırı miktardaki “özel olmayan yarışmacı” poli-[d(I-C)] DNA (1µg/µl) ve negatif kontrol proteini sıgır serum albümini (BSA, 1µg/µl) varlığında gerçekleştirilmiştir.

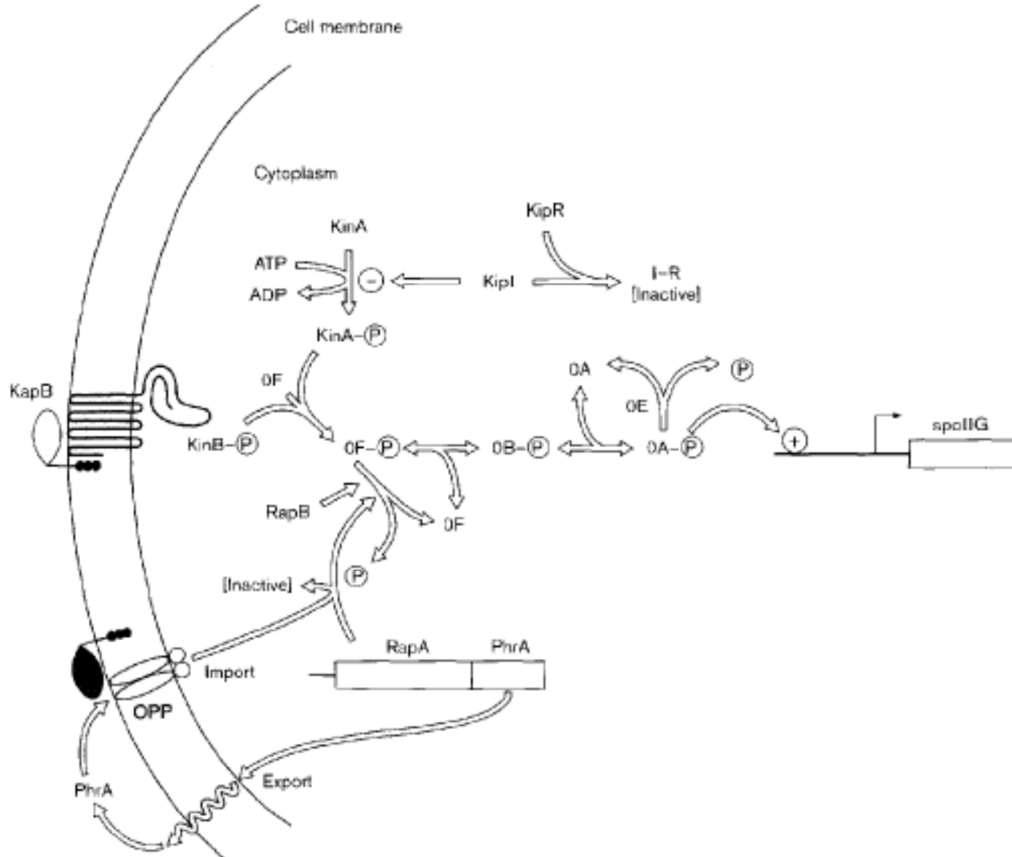


Şekil 3.28 : LutR ve SinR proteinlerinin *lrpB* promotörü ile EMSA analizi.

Şekil 3.27’de görüldüğü gibi tek başına LutR ve SinR proteinlerinin konsantrasyonları arttığında *lrpB* promotor bölgesinin elektro harekette kayma farklılığı da artmaktadır. Bu durum hem LutR hem de SinR proteinlerinin *lrpB* promotor bölgesine bağlanabildiklerini dolayısı ile *lrpB* geninin doğrudan LutR ve SinR düzenleyici proteinlerinin kontrolü altında olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak LutR ve SinR transkripsiyon faktörlerinin *lrpB* promotoruna eş zamanlı olarak mı yoksa yarışmacı olarak mı bağlandığını belirlemek amacıyla *lrpB* promotörü her iki proteinle beraber inkübe edilmiştir. Bu reaksiyonda sırasıyla proteinlerden birinin konsantrasyonu sabit tutulurken diğerinin konsantrasyonu belirli miktarlarda arttırılmıştır. Her iki durumda da, yani hem LutR’ın konsantrasyonu sabit tutulup SinR’ın konsantrasyonu arttırıldığında, hem de SinR’ın konsantrasyonu sabit tutulup LutR’ın konsantrasyonu arttırıldığında ekstra bir elektro harekette kayma farklılığı gözlenmiştir. LutR ve SinR’ın birlikte sağladıkları elektro harekette kayma farklılığının tek başlarına sağladıklarından fazla olması bu iki proteinin *lrpB* promotoruna yarışmacı olarak değil, eş zamanlı olarak bağlandığını göstermiştir.

Tez kapsamında elde ettiğimiz en önemli sonuçlardan biri LutR ve SinR transkripsiyon faktörlerinin yukarıda değinildiği gibi, *lrpB* promotoruna doğrudan bağlandığının belirlenmesidir. *B. subtilis* bir besin sıkıntısıyla karşılaştığında,

ortamdaki besin kıtlığı, sporlanma metabolizmasını uyarır ve SpoOA'nın fosforilasyonu ile spor oluşumu başlar (Şekil 3.28; Losick and Stragier, 1992). Bu bilgiler ve *lrpB* geninin ardışık şekilde GlyA-KinB-SpoOF-SpoOB proteinlerini ve son olarak SpoOA proteinini etkilediğini de göz önünde bulundurarak LutR ve SinR'in öncelikle amino asit metabolizmasını ve dolayısıyla sporilasyonu *lrpB* üzerinden düzenleyici etki gösterebileceği söylenebilir.



Şekil 3.29 : *B. subtilis*'te sporilasyonun düzenlenme mekanizması. SpoOA~P birçok geni kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. SpoOA~P'nin fosforilasyon derecesi ve aktivitesi SpoOE tarafından defosforilasyonuna ve SpoOF~P'i defosforile eden RapA ve RapB'ye bağlıdır. RapA fosfataz aktivitesi, *phrA* lokusunun hücre dışına atıldıktan sonra işlenen bir peptit ürünü tarafından düzenlenir. KinA tarafından fosfat girdisi, bir antikinaz olan KipI ve anti-antikinaz olan KipR'a bağlıdır. KinB hücre mebranda konumlanır ve KapB tarafından kontrol edilir.

3.6.2 LutR ve SinR proteinlerinin *nasA* geni üzerindeki etkisi

B. subtilis oldukça değişken içerik ve konsantrasyonlardaki çok çeşitli nitrojen kaynaklarının bulunduğu doğal yaşam alanlarında üremektedir. Basillus hücreleri, bu nitrojen kaynaklarını optimal düzeyde kullanmak ve üreme şartlarını optimal

değerlerde tutmak için etraftaki nitrojen kaynaklarının varlığına ve yokluğuna karşı gerekli cevapları verebilen çeşitli düzenleyici sistemler geliştirmiştir. Bu düzenleyici sistemler, hücre içindeki nitrojen metabolizmasını optimize etmek için global gen ifadelerini kontrol altında tutmaktadır. *B. subtilis*'te nitrojene bağlı düzenlenen genleri kontrol eden global regülasyon mekanizmasında en az üç transkripsiyon faktörü (CodY, GlnR ve TnrA) görev almaktadır (Yoshida, ve ark., 2003). Bunlara ek olarak LutR proteininin de nitrojen metabolizmasında global düzenleyici olarak rol oynadığı belirlenmiştir (İrigül-Sönmez ve ark., 2013). Ayrıca LutR proteininin kontrolünde sentezlenen basilisin antibiyotiğinin *B. subtilis*'in genomunda gen ifadelerine etkisini belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmada, nitrojen metabolizmasının basilisin tarafından da kontrol edildiği belirlenmiştir (T. Ebru Koroğlu, Doktora tezi, 2013).

CodY proteini hücredeki mevcut besin durumuna göre cevap oluşturmada ve nitrojen kullanımının yanı sıra karbon metabolizması, motilite, kompetens ve sporlanma gibi fenotipleri de düzenlemektedir (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001; Molle *et al.*, 2003). GlnR, bazı genler üzerinde baskılayıcı etki oluşturmada ve en önemli görev olarak glutamin sentaz (GlnA) enziminin sentezini kontrol etmektedir (Brown and Sonenshein, 1996). TnrA ise nitrojen kıtlığında üremeyi devam ettirmek için gerekli genlerin düzenlenmesinden sorumludur (Wray *et al.*, 1996). *tnrA* mutasyonu taşıyan *B. subtilis* suşlarında pleiotropik fenotip görülmektedir (Wray *et al.*, 1996). Çünkü TnrA çok sayıda genin transkripsiyonunda hem aktifleştirici hem de baskılayıcı rol oynamaktadır (Wray *et al.*, 2001). Nitrojen kaynağı fazla olduğunda, hücre içi glutaminin ve diğer metabolitlerin konsantrasyonu, GlnA'nın geri beslemeli baskılanması için yeterince fazla olacaktır. Geri beslemeli baskılanan GlnR, TnrA proteinini yakalayarak bir protein-protein kompleksi oluşturur ve TnrA'nın DNA'ya bağlanma özelliğini bozar. Bunun aksine ortamda nitrojen kaynağı azaldığında, TnrA proteini GlnR-TnrA kompleksinden serbest bırakılır ve ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenlemek için DNA üzerindeki özel bölgelere (TnrA kutularına) bağlanır (Wray *et al.*, 2001).

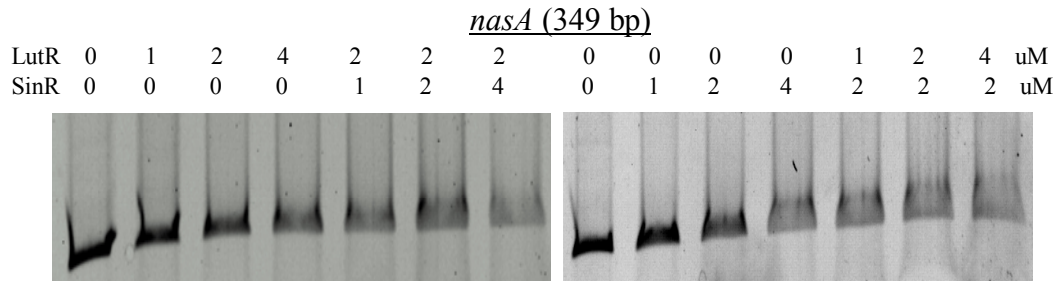
Öykü İrigül Sönmez'in doktora tez (2012) çalışmasında elde edilen verilere göre, LutR proteininin *gltAB* ve *glnRA* operonları üzerinde düzenleyici role sahip olduğu ve bu sayede karbon ve nitrojen metabolizmasını kontrol edebileceği söylenmektedir. (Çizelge 3.5). Ayrıca LutR'ın kontrolü altında sentezlenen basilisinin de nitrojen ve

enerji metabolizması ile ilgili genlerin, özellikle *nas* ve *nar* genlerinin kontrolünden sorumlu olduğu belirlenmiştir (T. Ebru Koroğlu, Doktora tezi, 2013).

Çizelge 3.5 : *B. subtilis*'de üremenin erken durağan fazında, nitrojen metabolizmasıyla ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi. (İrigül-Sönmez, 2012)

GEN	Katlanma Farkı ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>glnR</i>	-1,31	-0.73 (±0.10)	Transkripsiyon düzenleyici (nitrojen metabolizması)	→ → → → → <i>spoVG</i> ≠ <i>ynbA</i> <i>ynbB</i> <i>glnR</i> <i>glnA</i> ≠
<i>glnA</i>	-1,19		Glutamin Sentaz	
<i>gltA</i>	-1,31	-2.04 (±0)	Glutamin Sentaz (Büyük alt ünite)	← → ← → ← ≠ <i>yofA</i> <i>yogA</i> ≠ <i>gltB</i> <i>gltA</i> <i>gltC</i> ≠
<i>gltB</i>	-1,45		Glutamin Sentaz (Küçük alt ünite)	← ← <i>proJ</i> <i>proH</i>

Bu çalışmada LutR ve SinR transkripsiyon faktörlerinin *nasA* geni üzerinde, yukarıda bahsedilen dolaylı kontrol süreçlerinin haricinde, doğrudan bir etki gösterip göstermediği incelenmiştir. Bunun için *nasA* geninin transkripsiyon başlangıç +1 bölgesine göre (-307)-(+42) nükleotitleri arasındaki 349 bazlık bölge ile farklı konsantrasyonlarda LutR-His₆ ve SinR-His₆ proteinleri kullanarak EMSA analizi yapılmıştır (Şekil 3.29).



Şekil 3.30 : LutR ve SinR proteinlerinin *nasA* promotoru ile EMSA analizi.

Bütün bağlanma reaksiyonları aşırı konsantrasyondaki “özel olmayan yarışmacı” poli-[d(I-C)] DNA (1 ug/1ul) ve negatif kontrol proteini sıgır serum albümini (BSA, 1 ug/ul) varlığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EMSA sonuçları LutR ve SinR proteinlerinin hem tek başlarına hem de birlikte *nasA* promotor bölgesine bağlandıklarını ortaya koymaktadır (Şekil 3.29). Her iki proteinin artan konsantrasyonlarında elektro harekette kayma farklılığı artmıştır. *nasA* promotor bölgesine bağlanmada eş zamanlı mı yoksa yarışmacı mı bağlandıklarını belirlemek için her iki protein *nasA* promotor DNA'sı ile beraber inkübe edilmiştir. Bunun için sırasıyla proteinlerden birinin konsantrasyonu sabit tutulurken diğerinin

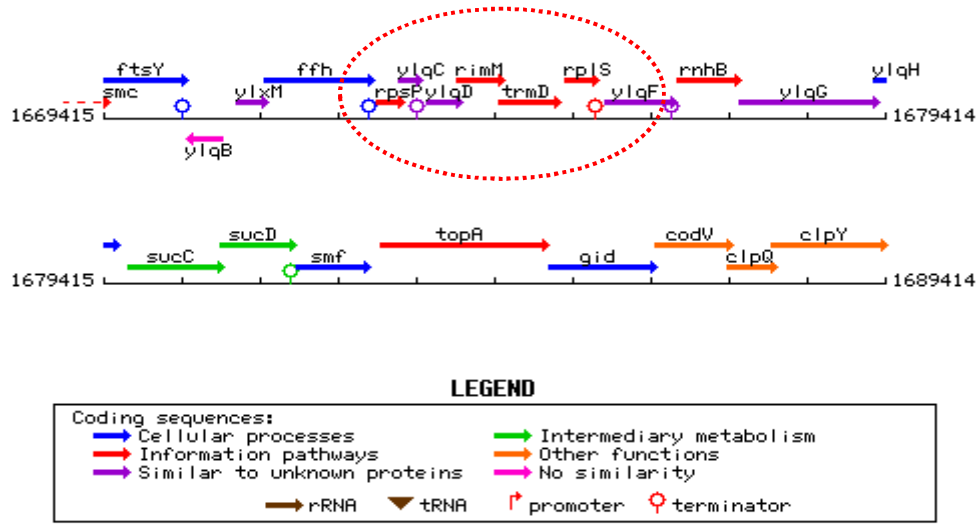
konsantrasyonu belirli miktarlarda arttırılmıştır. Her iki durumda da, yani hem LutR'ın konsantrasyonu sabit tutulup SinR'ın konsantrasyonu arttırıldığında, hem de SinR'ın konsantrasyonu sabit tutulup LutR'ın konsantrasyonu arttırıldığında ekstra bir elektro harekette kayma farklılığı gözlenmiştir. LutR ve SinR'ın birlikte sağladıkları hareket farklılığının tek başlarına sağladıklarından fazla olması bu iki proteinin *nasA* promotor bölgesine yarışmacı olarak değil, eş zamanlı olarak bağlandığını göstermektedir.

TnrA proteini, *asnZ* (*yccC*, L-asparajinaz), *gabP* (g-aminobütilat transportu), *nasA* ve *nasB* operonları (nitrat asimilasyonu), *nasDEF* (nitrit asimilasyonu), *nrgAB* (amonyum transportu), *ureABC* (ureaz), *puc* genleri (pürin katabolizm), *yknA* (guanin deaminaz), *kipI*, *ykzB-ykoL* genlerinin ve kendi geni *tnrA*'nın aktifleşmesinde görev alırken *glnRA* (glutamin sentetaz) ve *gltAB* (glutamat sentetaz) genlerinin baskılanmasında rol oynamaktadır (Fisher and Wray, 2002; Fersonet *al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1998; Wray *et al.*, 1994; Wray *et al.*, 1997; Schultz *et al.*, 2001; Nygaard *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1997; Robichon *et al.*, 2000; Fisher, 1999; Robichon *et al.*, 2000; Wray *et al.*, 1996; Belitsky *et al.*, 2000). Öykü İrigül-Sönmez (Doktora, 2012) de tez çalışmasında LutR'ın *glnRA* ve *gltAB* üzerindeki etkisini TnrA ile paralel bir şekilde yani negatif düzenleme olduğunu belirlemiştir (Çizelge 3.5). Tüm bu sonuçlar LutR'ın *B. subtilis*'de nitrojen metabolizması kontrol ağına doğrudan katkıda bulunduğuna işaret etmektedir.

3.6.3 LutR ve SinR proteinlerinin *rpsP* geni üzerindeki etkisi

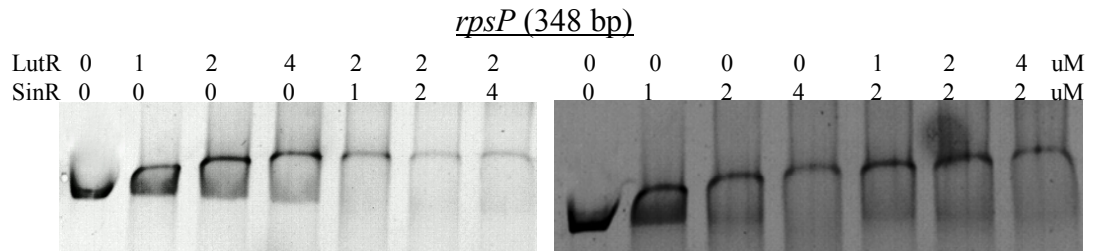
Ribozom organeli çeşitli rRNA ve r-proteinlerden oluşmaktadır. r-proteinler, RNA'nın yapısını oluşturmanın yanı sıra hücre metabolizmasının kontrolünde de önemli rol oynamaktadır. Hızlı büyüyen hücrelerde rRNA ve tRNA oranı, yavaş üreyenlere göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Bu tür büyüme oranına bağlı regülasyonlar bütün ribozomal proteinleri, uzama faktörleri ve birçok aminoasit-tRNA ligazlar için de geçerlidir. *rpsP* geni *trmD* operonu içerisinde promotor bölgesine en yakın ilk gen olarak yer alan ve ribozomal protein S16'yı (RpsP) kodlayan bir gendir (Şekil 3.30). *trmD* operonunda ayrıca sırasıyla *rimM*, *trmD* (tRNA-(m¹G)metiltransferaz), *rplS* (ribozomal protein L19) genleri kodlanmaktadır. Bu çalışmada yapılan EMSA analizlerinde elde edilen en önemli sonuçlardan biri, LutR ve SinR proteinlerinin *rpsP* promotor bölgesine doğrudan bağlandığının

belirlenmesidir (Şekil 3.31). Her iki proteinin reaksiyona eklenen konsantrasyonları arttıkça jel görüntüsündeki elektro hareket kayması da artmaktadır. Buna paralel olarak, LutR ve SinR proteinleri *rpsP* promotoruyla ikisi beraber inkübe edildiklerinde elektro hareket farklılığı daha fazla artmaktadır. Sırasıyla LutR konsantrasyonu sabit tutulurken SinR konsantrasyonunun artırılması veya SinR konsantrasyonu sabit tutulurken LutR konsantrasyonunun artırılması durumunda bantlardaki elektro hareket kayma farklılığının giderek daha fazla artması LutR ve SinR proteinlerinin *rpsP* promotoruna eş zamanlı olarak bağlandığını göstermektedir.



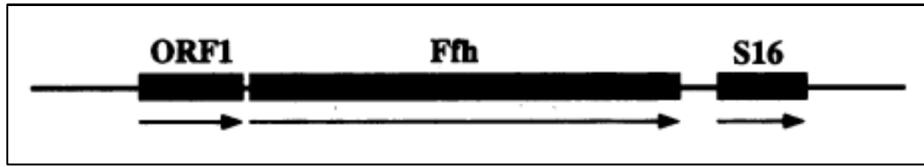
Şekil 3.31 : *B. subtilis* genomundaki *rpsP* geninin konumu. Subtilist veri tabanından alınmıştır.

Öykü İrigül-Sönmez (Doktora tezi, 2012) *rnc* ve *ffh* transkripsiyonlarının LutR'ın pozitif kontrolü altında olduğunu ve bu nedenle LutR'ın *B. subtilis* protein salgılama mekanizmasının önemli bir elemanı olan SRP'nin sentezi üzerinden etkili olabileceğini belirtmiştir (Çizelge 3.6). *B. subtilis* *ffh* geni, kromozom üzerinde *rpsP* ve *pyr* gen kümelerinin yakınında haritalanmış ve orfl içeren bir operonda organize olmaktadır (Şekil 3.30-3.32).



Şekil 3.32: LutR ve SinR proteinlerinin *rpsP* promotoru ile EMSA analizi.

B. subtilis'teki *ffh-rpsP* gen organizasyonu, *E. coli*'deki organizasyonla aynıdır. *E. coli*'de *ffh* geni tarafından kodlanan bir protein (48 kDa), ökaryotik SRP54 ile, *E. coli* FtsY ise SRP reseptörünün α -alt birimi ile homolog olarak tanımlanmıştır (Bernstein ve ark., 1989; Römisch ve ark., 1989; Honda ve ark., 1993). *E. coli* Ffh proteininin 4.5S RNA ile birlikte hayatta kalma (viabilite) ve etkin protein translokasyonunda gerekli olduğu bildirilmiştir (Luirik ve ark., 1992; Phillips ve Silhavy, 1992). Ffh proteini, *B. subtilis*'te hücre büyümesi, morfolojisi ve ekstraselüler enzimlerin translokasyonunda etkilidir. SRP reseptör-benzer proteinleri FtsY ve Ffh, yaygın olarak korunmuş olan SRP-GTPaz ailesinde yer alırlar (Eichler and Moll, 2001).



Şekil 3.33 : *B. subtilis*'te *ffh-rpsP* genlerinin organizasyonu. *rpsP* geni, S16 ribozomal proteinini kodlamaktadır.

Protein salgılama sistemi, hücrede üretilen proteinlerin metabolik görev yerlerinde doğru noktalarda konumlanmalarını sağlayan bir sistemdir. Hem ökaryotlarda hem de prokaryotik hücrelerde görülen bu sistemde, proteinler genellikle bir öncül-peptit olarak sentezlenirler ve N-terminal bölgelerinde bir “sinyal dizisi” içerirler. Ökaryotik sistemlerde protein salgılama metabolizmasında, salgı proteinlerinin endoplazmik retikuluma hedeflenmesi “sinyal tanıma partikülü (SRP, signal recognition particle)” tarafından gerçekleştirilir.

Çizelge 3.6 : *B. subtilis*'de üremenin erken durağan fazında, protein translokasyonu ve katlanması ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	Katlanma Farkı ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>ffh</i>	1,51	2,91 (±0.04)	Sinyal Algılama Partikülü benzeri (SRP) GTPaz	
<i>rnc</i>	2,41	1,64 (±0.03)	Ribonükleaz III her iki 5' sitoplazmik RNA öncülünü keser	$\xrightarrow{acpA} \neq \xrightarrow{rnc} \neq \xrightarrow{smc} \neq \xrightarrow{ftsY} \neq \xrightarrow{ylqB}$
<i>ftsY</i>	1,08		Sinyal Algılama Partikülü	

Bir adet RNA (SRP 7S RNA) ile SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 ve SRP72 olmak üzere 6 tane polipeptitten (sırasıyla 9, 14, 19, 54, 68 ve 72 kDa) oluşan SRP, sentezlenmek üzere olan polipeptit zincirindeki sinyal dizisiye bağlanarak translasyonu durdurur (Walter ve Blobel, 1982; Walter ve ark., 1981). SRP ile birlikte Ribozom organeli ve yeni üretilmekte olan polipeptitten oluşan üçlü kompleks, ER membranına bağlanır. Bunun sonucunda SRP kompleksten ayrılır ve GTP katalizörlüğünde translasyon tekrar başlar (Meyer ve ark., 1981-1982). Ardından, tekrar başlayan translasyonda sentezlenen protein, ER membranını geçer ve SRP molekülü bir GTP hidrolizi ile birlikte SRP reseptöründen ayrılır. Sinyal dizileri ribozomdan çıkar çıkmaz, SRP'nin SRP54 alt birimi bu sinyal dizilerine bağlanır. Hem SRP54'de hem de SRP reseptöründe korunmuş GTP bağlanma motifleri bulunmaktadır. Bu nedenle SRP54 alt birimi, SRP'ye bağlı protein salgılama sisteminde anahtar rol oynamaktadır.

B. subtilis'teki protein salgılama sistemi, *E. coli*'de olduğu gibi SecA ve SecY proteinleri tarafından kontrol edilir ve ökaryotlardan farklı olarak SRP'ye bağımlı değildir. *B. subtilis* SRP kompleksi Ffh (Fifty-four homolog) proteini, scRNA (küçük sitoplazmik RNA) ve HBSu (histon-benzeri protein) proteinlerinden oluşmaktadır (Honda et al., 1993; Nakamura et al., 1994; Nakamura et al., 1992; Nakamura et al., 1999). scRNA (271 nt) yapısal olarak 7S RNA (300 nt) ile ilişkilidir. İlk kez *E. coli*'nin 4.5S RNA'sına karşılık olarak tanımlanan scRNA dört domainden oluşmaktadır: Domain IV, SRP54'ün bağlanma bölgesine karşılık gelmektedir. Aynı zamanda ökaryotların SRP 7S-benzeri RNA'ları ve *E. coli* 4.5S RNA'sı arasında ileri derecede korunmuştur. *B. subtilis* scRNA üç domainden oluşmaktadır (domain I, II ve IV). *B. subtilis* scRNA'nın domain IV nükleotit dizisi SRP 7S RNA'ların ve *E. coli* 4.5S RNA'nın domain IV alt birimi ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. *B. subtilis* scRNA'nın diğer domainleri ile SRP 7S RNA arasında ise önemli bir benzerlik bulunmamaktadır. Ribozomal proteinler, diğer proteinler gibi hücre içinde bol miktarda üretilir ve kararlı RNA'lar gibi şartların olumlu veya olumsuzluğu gözlemlenerek düzenlenir. tRNA biyosentezinde görevli bazı tRNA modifiye enzimleri de kararlı RNA ve ribozomal proteinler gibi düzenlenir. Ancak bir tRNA biyosentez enzimi olan tRNA(m¹G)metiltransferaz(TrmD)'in düzenlenmesi farklıdır. İki ribozomal protein geni arasında konumlanmış (Şekil 3.30) *trmD* geninden kodlanan TrmD'nin aktivitesi büyüme hızı arttıkça artmaktadır. Ayrıca bu enzimin

amino asit eksikliğine bağlı olarak düzenlenmesi rRNA ve ribozomal proteinlerinkinden farklıdır.

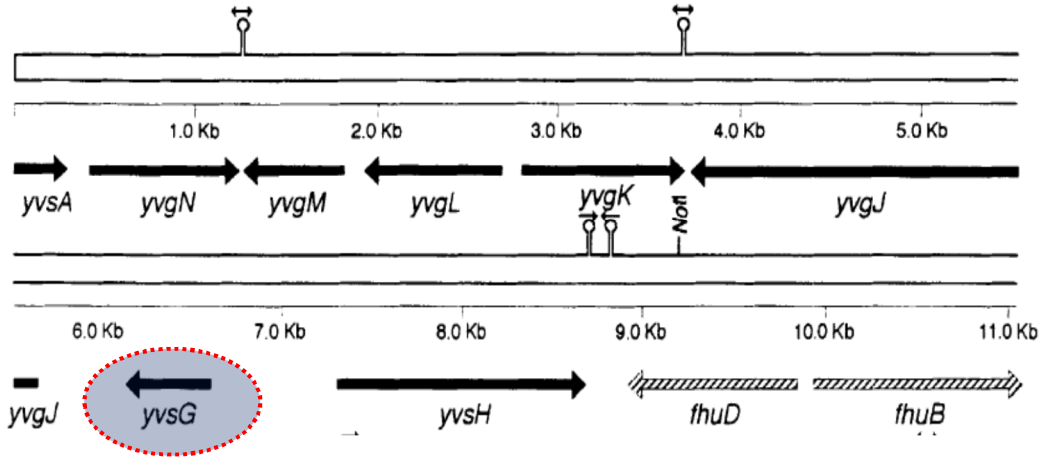
Bunlara ek olarak, *B. subtilis*'in çok sayıda küçük polipeptit ürettiği bilinmektedir. Bu küçük polipeptitlerden bazıları antimikrobiyal aktivite gösterirken, bazıları feromon veya hücre için sinyal iletim sistemini etkileyen ekstraselüler faktörler olarak görev yapmaktadır. *B. subtilis* genomunda 345 adet küçük polipeptit açık-okuma penceresi (orf) belirlenmiştir ve bunların %81'inin fonksiyonu bilinmemektedir. Bunların büyük bir bölümü, profaj genomlarında veya faj-benzeri elementlerde bulunmakta ve bu sayede büyük operonların içinde organize olabilmektedir. Şekil 3.30'da *ylqC* ve *ylqD* genleri gibi. *B. subtilis* genomunda bulunanların çoğunun, bu şekilde, diğer orf'lar içinde tamamen veya kısmen "gizlenmiş" oldukları veya olağanın dışında bir translasyon başlama sinyaline sahip oldukları ve bu sayede tespit edilmeden kalabildikleri rapor edilmiştir (Zuber, 2003). YlqC proteini, *B. subtilis*'in küçük polipeptitleri arasında ComS, DegQ ve SinR'ın da bulunduğu, hücre metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu düzenleyici proteinler grubunda yer almaktadır. *ylqC* geni *trmD* operonunda, *rpsP* geninin 3'-aşağı bölgesinde konumlanmaktadır ve bu özelliği ile *srf* operonunda yer alan *comS* geniyle benzer durumdadır. RNA bağlanma motifi içeren YlqC peptidi, spor-spesifik fotolizaz kodlayan *spkB* geninin düzenlenmesinden sorumlu SplA proteiniyle dizi benzerliği göstermektedir. Bu verilerin ışığında ve tez kapsamında elde ettiğimiz EMSA sonuçlarını da değerlendirdiğimizde, LutR proteini *rpsP* promotoruna doğrudan bağlanarak translasyon, protein katlanması, protein translokasyonu, hücre büyümesi ve spor oluşumu metabolizmasında düzenleyici rol oynadığı söylenebilir. Ayrıca, SinR proteini de benzer şekilde düzenleyici etki göstermekte ve her iki protein bu düzenleme görevini eş zamanlı olarak yerine getirmektedir.

3.6.4 LutR ve SinR proteinlerinin *yvsG* geni üzerindeki etkisi

Bu tez çalışmasında yapılan EMSA analizlerinde LutR ve SinR proteinlerinin doğrudan bağlandığı belirlenen genlerden biri de *yvsG* genidir. Wipat ve ark. (1998) *B. subtilis* kromozomunda *yvsA-yvsQ* (293°-289°) bölgesi üzerinde yaptıkları analizde, bu bölgede tanımlanan ORF'lerin sigma faktörleri, metal iyon transportu, iki bileşenli sinyal transdüksiyonu ve ATP-bağlanma-kaset-tipi transport proteinleri ile homoloji gösterdiklerini belirlemiştir (Şekil 3.33). Bu bölgede fonksiyonu

bilinmeyen genlerin sayısı oldukça fazladır ve deneysel olarak sadece 43 tahmini genden 8 tanesinin fonksiyonu belirlenmiştir. Bu genlerden *yvsG* geninin bir membran hidrolaz enzimi olabileceği ileri sürülmüştür. Biyolojik önemlerine rağmen membran proteinlerinin çok azının yapısal ve işlevsel özellikleri belirlenebilmiştir. Bunun başlıca nedeni membran proteinleriyle çalışmanın ekspresyonları, deterjan çözünürlükleri, saflaştırılmaları ve kristal hale getirilmelerinin diğer çözünür proteinlere göre çok daha zor olmasından kaynaklanmaktadır (White 2004). Çözünür proteinlerle karşılaştırıldıklarında, membran proteinleri, hücre içinde etkin bir şekilde yüksek miktarda ifade edildiklerinde sitotoksik etki gösterebilmekte veya çözünür olmayan küçük intraselüler moleküllere bağlanabilmektedir.

ydjM ve *ybcI* genleri *E. coli*'ye ait hipotetik integral membran proteinleri olup LexA represör proteini tarafından kontrol edilmektedir. Fonksiyonu tam olarak belirlenmemiş olmasına rağmen *E. coli* hipotetik membran proteini *ydjM*, BLAST analizlerinde *Clostridium perfiringens*, *Archaeoglobus fulgidus* ve *B. subtilis* (*yvsG* geni)'te benzer hipotetik proteinlerle önemli derecede homoloji göstermektedir (Henestrosa ve ark., 2000). *yvsG* geni, *ydjM* geninin yanısıra ayrıca *E. coli ybcI* geni ile de ortologdur.



Şekil 3.34 : *B. subtilis* genomunda *yvsG* geninin konumu (Wipat ve ark., 1998) .

Hücrede bir DNA hasarı olduğunda veya hücre olumsuz bir durumla karşılaşıldığında pleiotropik bir tepki olarak “SOS cevabı” oluşturulur. Bu durumda DNA replikasyonu, DNA tamiri ve hücre bölünmesi kontrolü ile ilgili bir çok proteinin geni uyarılır. SOS-cevap sisteminin, yaygın etki olarak bütün hasara-bağlı-indüklenen genleri (damage-inducible genes, din) uyarmasına karşın, bu sistem RecA ve LexA proteinleri tarafından zıt yönde kontrol edilerek dengelenir. RecA proteini, SOS sistemini aktive ederken, LexA proteini baskılayarak negatif yönde kontrol

E. coli SOS transkripsiyon represörü LexA'nın *B. subtilis*'teki homoloğu DinR proteindir (Raymond-Denise ve Guillen, 1991-1992). LexA'nın kontrol ettiği birçok genin promotor bölgesinde LexA'nın bağlandığı bir dizi bulunur. Bu dizi “LexA kutusu” olarak adlandırılır (Şekil 3.34).

DinR box
-35
-10
-95 AAAAAATCCGAATATGCGTTCGCTTTTTTC**TTGGCA**AATCCCTTCAAACAGGG**TATAGT**

ATATGTAGTGGTAACATAAAGGAGGAAAAAATAGAATGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTA +24
M S D R Q A A L

DinR box
-35
DinR box
-10

-105 TTCAAACAGAACAAAGTGTTCGTTTTTCTATTTGAATACCGAACGTATGTTTGCTTTTAATG

TAATTAGTTGCTTATGGCAGCAAATAATAATAGAGGTGGTAAATTTATGAGAAAAAAGAA +12

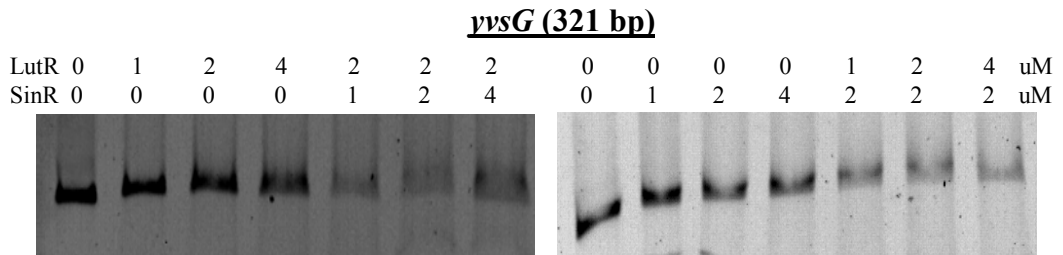
M R K K E

DinR box
 -159 TTACTCATTGATCATAACCTCCAACAGGAATGTTTGTTCGCATTTTTATAATTTTCAGTATAT
 DinR box
 DinR box -35
ACGAACAAACGTTTCTGTCAATTGTTTTTCGAACCTATGTTTGTACTGTGAAGGAAAATCAT
 -10
 GCTATAATCTTCTTAAATCGACGTTTGTAGGTCCGAAAAATGACGAAGCTATCAAAAAGG +21
 M T K L S K S

102

yvsG geninin promotor bölgesinde LexA'nın bağlanma bölgeleri bulunmaz ancak bir SOS-kutusu (CaAACATAcaTTCT) yer almaktadır. *B. subtilis yvsG* geni, *E.coli*'deki homologları *ydjM* ve *ybcI* genleri gibi LexA (DinR) transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Ancak, promotor bölgesinde SOS-kutusunun bulunmasına karşın LexA-dizisinin görülmemesi, *yvsG*'nin DinR tarafından kontrolünün dolaylı yönden olabileceğini düşündürmektedir. Buna ilaveten, bu tez çalışmasının en önemli sonuçlardan biri olarak, LutR ve SinR global düzenleyici proteinlerinin *yvsG* promotoruna hem tek başlarına doğrudan bağlandıkları hem de beraber eş zamanlı olarak düzenleyici etki gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 3.35).

yvsG geninin transkripsiyon başlangıç +1 bölgesine göre (-285)-(+36) nükleotitleri arasındaki 321 bp'lik bölge ile yapılan EMSA analizlerinde, reaksiyon tüplerine ayrı ayrı LutR ve SinR proteinlerinden artan konsantrasyonlarda eklendiğinde, protein konsantrasyonundaki artışa paralel olarak *yvsG* promotor DNA'sının elektro hareket kayması da artmıştır. Reaksiyon tüpüne *yvsG* geni ile birlikte her iki protein beraber eklendiğinde ise bu elektro hareket daha fazla artmıştır (Şekil 3.35). Yani LutR konsantrasyonu sabit tutulup SinR konsantrasyonu artırıldığında elektro hareket kayması arttığı gibi, SinR konsantrasyonu sabit tutulup LutR konsantrasyonu artırıldığında da benzer durum görülmüştür. Bu sonuçlar LutR ve SinR proteinlerinin lipid metabolizmasında, hücre büyümesinde ve DNA hasarına bağlı SOS-cevabı sisteminde düzenleyici role sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

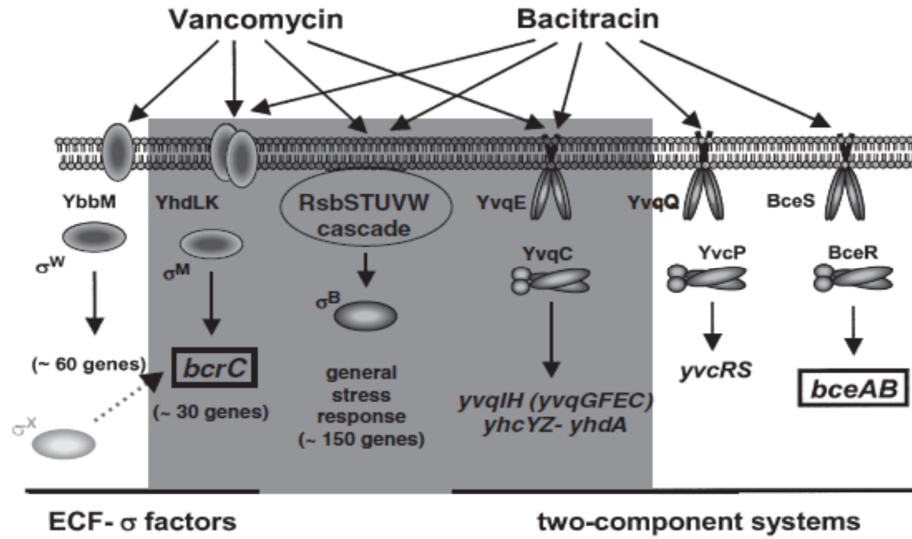


Şekil 3.36 : LutR ve SinR proteinlerinin *yvsG* promotoru ile EMSA analizi.

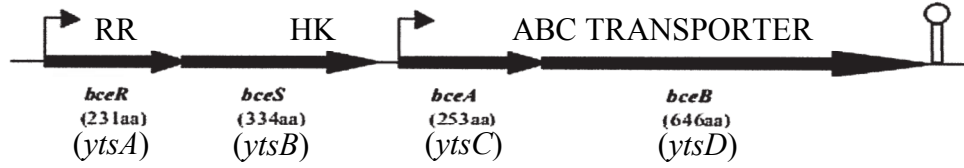
3.6.5 LutR ve SinR proteinlerinin *ytsD* geni üzerindeki etkisi

Bakteri hücre duvarı çevresel etkilere karşı koruyucu ilk ve en dayanıklı savunma yapısıdır (Mascher ve ark. 2003). Bu nedenle üreme ortamında rakip hücrelerin üremesini engellemek için bir çok bakteri tarafından hedeflenen bir yapıdır. Bu amaçla kullanılan basitrasın, ampilisin, vankomisin gibi antibiyotiklerin subletal konsantrasyonlarına cevap vermek için, bakterilerde antibiyotik direncini sağlayan

bir takım adaptif cevap sistemleri oluşmuştur (Şekil 3.36). *B. subtilis*'te basitrasine cevap oluşturan *yts* gen kümesi (*bceRS* ve *bceAB*) bulunmaktadır (Ohki ve ark., 2003; Şekil 3.37). İki-bileşenli sinyal iletim sistemini oluşturan *bceRS* genlerinden *bcrS* (*ytsB*) geni bir histidin kinaz kodlarken, *bceR* (*ytsA*) geni bir cevap düzenleyici protein kodlamaktadır. Basitrasine karşı asıl direnci oluşturan *bceA* (*ytsC*) ve *bceB* (*ytsD*) genleri ise bir ATP-bağlanma transporter proteininin sırasıyla “nükleotit bağlanma domaini (NBD)” ve “membran-geçiş domaini”ni (MSD, membrane-spanning domain) kodlarlar ve basitrasinin hücre dışına atılmasını sağlarlar (Şekil 3.36). *bceAB* genlerinin bozulması hücrede aşırı bir basitrasin hassasiyeti oluşturmaktadır (Ohki ve ark., 2003). Bir sensör kinaz olan BceS, ekstraselüler basitrasine karşı hem doğrudan hem de dolaylı olarak cevap verebilmektedir. Ortamdaki basitrasinin algılanmasına bağlı olarak aktifleşen BceS bu sinyali hücre içi cevap düzenleyici protein BceR'ye aktarır. Aktifleşen düzenleyici transkripsiyon faktörü BceR, hedef genleri *bceAB*'nin promoter bölgesine bağlanarak bu genlerin ifadesini pozitif yönde kontrol eder (Şekil 3.36).



Şekil 3.37 : *B. subtilis*'te hücre duvarı stres cevabının düzenlenme ağı. **Oklar:** Düzenleyici metabolik yollar; **Noktalı oklar ve Gri düzenleme işaretleri:** hücre duvarı stress cevabı ile ilgili olmayan regülasyonlar, **Açık Gri Zemin:** Her iki düzenleyici yol arasında paylaşılan regülasyonlar, **Çerçeve:** Tanımlanmış basitrasin direç determinantları (Mascher ve ark. 2003).



Şekil 3.38 : *B. subtilis*'te *yts* gen kümesinin (*bceRS* ve *bceAB*) organizasyonu. **Kalın oklar:** *bceR*, *bceS*, *bceA* ve *bceB* genlerinin açık okuma çerçeveleri (ORF). **İnce oklar:** Promoter bölgeleri, **Halkasal yapı:** Transkripsiyon sonlanma sinyali.

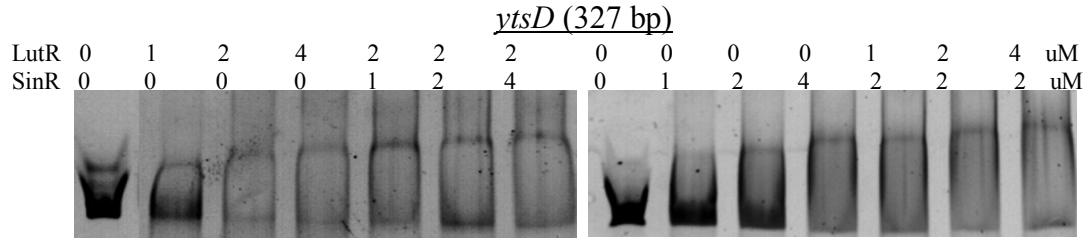
Basitrasın dallanmış halkasal dodesilpeptit yapıda bir antibiyotik olup *B. subtilis*'te bir çok genin transkripsiyonu aktive etmektedir. Dar spektrumlu bir antibiyotik olan basitrasın öncelikli olarak Gram pozitif koklara ve basillere karşı kullanılmaktadır. Öykü İriğül-Sönmez (Doktora tezi, 2012) yaptığı analizlerde, *bceA* ve *bceB* genlerinin durağan fazda LutR tarafından negatif kontrol edildiğini ve LutR mutantında *bceAB* gen ifadesinin arttığını belirlemiştir (Çizelge 3.7). Logaritmik fazda ise LutR'ın *bceAB* genleri üzerinde pozitif yönde düzenleyici etki gösterdiği ve basitrasın direncini arttırdığını belirlemiştir. Bernard ve ark. (2003) basitrasın direncinin kazanılmasında bütün *bce* (*yts*) genlerinin eşit derecede önemli olduğunu ve BceR'nin bu sistemin master düzenleyici proteini olduğunu belirlemiştir.

Çizelge 3.7 : *B. subtilis*'de sporilasyonun gecikmesi ve kanibalizm ile ilgili genler üzerinde LutR'ın düzenleyici etkisi (İRİGÜL-SÖNMEZ, 2012).

GEN	Katlanma Farkı ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>ytsC</i> (<i>bceA</i>)	ND	-2,68 (±0.32)	Basitrasın ABC dışı atım transport ATP-bağlanma proteini	← → ← ← ← ≠ <i>yttB</i> <i>yttA</i> ≠ <i>ytsD</i> <i>ytsC</i> <i>ytsB</i>
<i>ytsD</i> (<i>bceB</i>)	ND	-3,77 (±0.06)	Basitrasın dışı atımı permeaz proteini	← ← <i>ytsA</i> ≠ <i>ytrF</i>

Yukarıdaki verilere paralel olarak, bu tez çalışmasındaki EMSA analizlerinde elde edilen en önemli verilerden biri LutR ve SinR transkripsiyon faktörlerinin *ytsD* (*bceB*) promoter bölgesinde translasyon başlangıç +1 noktasına göreceli -294. ve +33. nt'ler arasındaki 327 nt'lik diziye doğrudan bağlandığının tespit edilmesidir (Şekil 3.38). LutR ve SinR proteinlerinin konsantrasyonları arttıkça elektro hareket kayması oranının arttığı gözlenmiştir. *ytsD* promotorunun LutR ve SinR proteinlerinin her ikisiyle birden inkübe edildiğinde ise, sabit LutR konsantrasyonunda SinR konsantrasyonu arttıkça, sabit SinR konsantrasyonunda ise LutR konsantrasyonu arttıkça hareket farklılığı giderek daha fazla artmaktadır. Bu

sonuçlar LutR ve SinR proteinlerinin *ytsD* (*bceB*) genini hem tek başlarına doğrudan bağlanarak, hem de ikisi birlikte eş zamanlı olarak kontrol ettiklerini göstermektedir.



Şekil 3.39 : LutR ve SinR proteinlerinin *ytsD* promotörü ile EMSA analizi.

3.6.6 LutR ve SinR proteinlerinin *yodT* geni üzerindeki etkisi

B. subtilis LutR proteini, *E. coli*'deki homologu olan FadR proteini gibi yağ asitlerinin ve lipidlerin sentez ve yıkım metabolizmasında düzenleyici rol oynamaktadır (DiRusso ve ark., 1999). Öykü İrigül-Sönmez (Doktora tezi, 2012), LutR proteininin ekstraselüler lipaz ve biyotin biyosentez operonunu (*bioWAFDB*) içeren *lip* genlerini ve yağ asidi biyosentetik genlerini pozitif yönde düzenlediğini belirlemiştir (Çizelge 3.8). *lip* genlerinden *bioA* geni, *yodT* geni gibi bir adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase enzimidir. Ghim ve ark. (1998) *B. subtilis* 168 kromozomunda *sppC-adhA* genleri arasındaki 184°-180° bölgesinin dizi analizi üzerine yaptıkları çalışmada, *B. subtilis* YodT proteininin *Rhizobium* sp. türünde biyotin sentez proteini BioA'nın homologu olduğunu bildirmiştir.

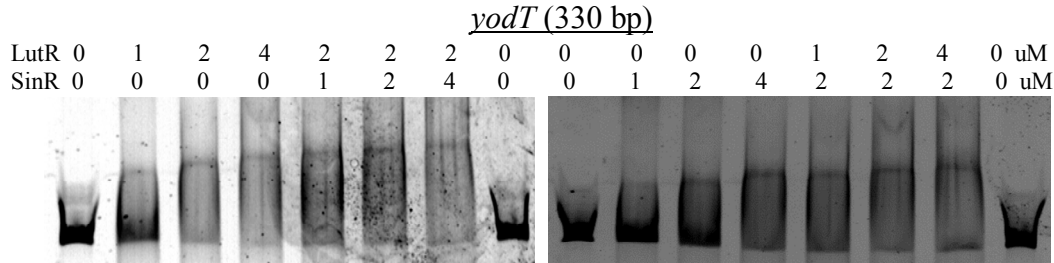
YodT proteini, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase benzeri görev yapmakta ve *yodT* geni *yodTSRQP-kamA-yozE* operonunda yer almaktadır (Şekil 3.39; Feucht ve ark., 2003; Chen ve ark., 2000). Daha önce yapılan RT-qPCR analizlerinde elde edilen veriler LutR proteininin logaritmik faz sürecinde butyrate-acetoasetate CoA transferase (*yodR*) ve 3-oxoadipate CoA transferase (*yodS*) genlerinin ifade edilme düzeylerini arttırdığını ortaya koymuş ve buna bağlı olarak lipid metabolizmasının logaritmik fazda LutR proteinine bağlı olarak arttığı belirtilmiştir (Çizelge 3.9; İrigül-Sönmez, 2013).

Öykü İrigül-Sönmez'in (Doktora tezi, 2012) qPZR sonuçlarına paralel olarak, basilisin dipeptidinin logaritmik faz sürecinde, lipid metabolizmasında görevli bütirat-asetoasetat CoA transferaz (*yodR*) ve 3-oxodipad CoA transferaz (*yodS*) genlerini pozitif yönde kontrol ettiği belirlenmiştir (Çizelge 3.10). Bütün bu veriler ışığında, LutR ve SinR transkripsiyon faktörlerinin *yodT*'nin ilk genini oluşturduğu *yod* genleri kümesinde promotor bölgesiyle doğrudan bir ilişkisi olması kuvvetle olası görünmektedir.

Çizelge 3.10 : *B. subtilis*'de üremenin logaritmik fazında Basilisin tarafından pozitif olarak düzenlenen lipid metabolizması ile ilgili genler (Köroğlu, 2013).

GEN	Katlanma Farkı ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>yodS</i>	1,40	1,16 (±0.08)	Muhtemel koenzim A transferaz alt birimi alfa	$\xrightarrow{\neq yodT} \xrightarrow{yodS} \xrightarrow{yodR} \xrightarrow{yodQ} \xrightarrow{yodP}$ $\xrightarrow{kamA} \xrightarrow{yozE} \neq$
<i>yodR</i>	1,28		Muhtemel koenzim A transferaz alt birimi beta	
<i>yodP</i>	1,28		Tanımlanmamış N-asetiltransferaz	

Bu tez çalışmasında elde edilen en önemli EMSA sonuçlarından biri hem LutR hem de SinR proteininin, *yodT* geninde transkripsiyon başlağıç +1 noktasına göreceli (-294)-(+36) nt'ler arasındaki 330 bp'lik P_{yodT} bölgesine doğrudan bağlanmasıdır (Şekil 3.40). EMSA analizlerinde ayrıca LutR ve SinR proteinlerinin *yodT* promotor bölgesine tek başlarına bağlandıkları gibi eş zamanlı olarak birlikte bağlandıkları da tespit edilmiştir. Bu veriler göstermektedir ki LutR ve SinR transkripsiyon faktörleri, lipid metabolizmasında hem tek başlarına hem de eş zamanlı olarak *yodT* geni üzerinden doğrudan düzenleyici bir etki göstermektedir.



Şekil 3.41 : LutR ve SinR proteinlerinin *yodT* promotoru ile EMSA analizi.

3.6.7 LutR ve SinR proteinlerinin *yvnB* geni üzerindeki etkisi

Spor oluşturan, gram pozitif bir bakteri olan *B. subtilis* logaritmik üreme fazının sonunda besin eksikliği durumunda alternatif besin kaynaklarına ulaşmak için α -amilaz, ksilinaz, β -gluconaz gibi çeşitli degradatif enzimleri salgılamaktadır. Bu enzim çeşitlerine ek olarak proteaz grubundan en az sekiz ekstraselüler proteazı da üreme ortamına salgılar (Priest, 1977). En önemli iki ekstraselüler proteaz olan alkalın serin proteaz subtilisin (AprE) ve nötral proteaz (NprE) sporilasyon başlarken üretilmektedir (Millet, 1970; Wong, 1984; Yang, 1984). Vpr, Epr, metalloproteaz (Mpr), nötral proteaz B (NprB), hücre duvarı ile ilişkili ekstraselüler proteaz (WprA) ve bacillopeptidaz F (Bpr) ise ikincil proteazlardır (Sloma ve ark., 1991; Bruckner, 1990; Sloma, 1988; Okamoto ve ark., 1997; Rufo ve ark., 1990; Sloma ve ark., 1990; Tran ve ark., 1991; Margot ve Karamata, 1996; Sloma ve ark., 1990; Wu ve ark., 1990). Bu proteolitik enzimlerin ifade edilmeleri sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Strauch ve Hoch, 1993) ve başlıca fonksiyonları üreme ortamında bulunan ekstraselüler proteinleri parçalayarak üreme için amino asit temin etmektir. Bunun yanı sıra farklı fizyolojik görevleri de üstlenebilirler. Örneğin, WprA membran translokasyonunda yanlış katlanan proteinlerin proteolizinde rol almaktadır (Stephanson ve Harwood, 1988).

Degradatif enzimlerden lipaz kodlayan *lip* geninin ve tahmini endonükleaz kodlayan *yhfEF* operonunun LutR tarafından durağan faz sürecinde pozitif kontrol edildiği belirlenmiştir (Çizelge 3.13). Öykü İrigül-Sönmez (Doktora tezi, 2012) *B. subtilis* LutR proteininin üremenin durağan fazında intraselüler serin proteaz kodlayan *aprX* genini pozitif kontrol ederken, ekstraselüler alkalın serin proteaz (subtilisin E) kodlayan *aprE* ve majör intraselüler serin proteaz kodlayan *ispA* genlerini negatif kontrol ettiğini belirlemiştir (Çizelge 3.11). Logaritmik faz sürecinde de *aprX* geni LutR tarafından pozitif düzenlenmektedir (Çizelge 3.12). LutR proteini ile birlikte, DegS-DegU, AbrB, ScoC ve SinR gibi global transkripsiyon düzenleyicilerinin de bu degradatif enzim genleri üzerinde etkili olduğu ve proteolitik aktivitenin sıkı bir şekilde düzenlendiği bilinmektedir.

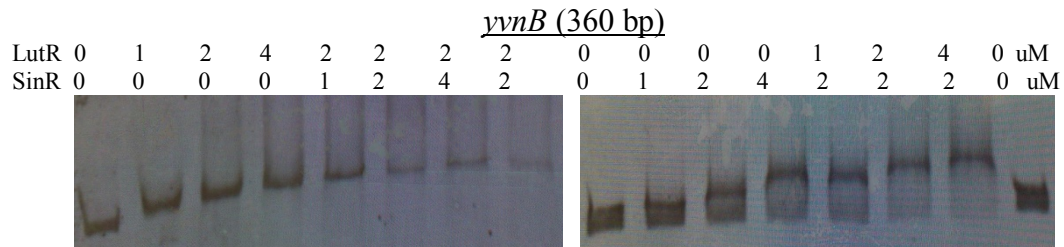
Çizelge 3.11 : *B. subtilis*'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen degredatif enzim üretimiyle ilgili genler (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	KATLANMA FARKI ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>aprX</i>	1,57	2.98 (±0.17)	Serin proteaz	← → → ← ≠ <i>aprX</i> <i>ymaC</i> <i>ymaD</i> ≠ <i>ebrB</i>
<i>yhfE</i>	1,63	3.65 (±0.04)	Tahmini Endoglukanaz	← → → ← ≠ <i>fabHB</i> <i>yhfc</i> ≠ <i>yhfd</i> <i>yhfe</i> <i>yhff</i> ≠
<i>yhfF</i>	1,4	2.18 (±0.09)	Hipotetik Protein	
<i>aprE</i>	-2,35	-3.07 (±0.91)	Ekstraselüler Alkalın Serin Proteaz (Subtilisin E)	← → → ← ≠ <i>yhfm</i> <i>yhn</i> ≠ <i>aprE</i> <i>yhfO</i> <i>yhfP</i> ≠
<i>ispA</i>	-2,01	-1.68 (±0.22)	İntraselüler Serin Proteaz	← → → ← ≠ <i>metE</i> ≠ <i>ispA</i> <i>ykoB</i> ≠ <i>ykoC</i> <i>ykoD</i>

Çizelge 3.12 : *B. subtilis*'de üremenin logaritmik fazında LutR tarafından pozitif düzenlenen genlerden biri (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	İFADE ORANI ^a	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^b
<i>aprX</i>	1,72	İntraselüler Alkalın Serin Proteaz	← → → ≠ <i>yodT</i> <i>yodS</i> <i>yodR</i> ≠

Bu tez çalışmasında EMSA analizlerinde elde edilen en önemli sonuçlardan biri LutR ve SinR proteinlerinin *yvnB* geninin translasyon başlangıç +1 noktasına göreceli (-294.)-(+66.) nt'leri arasındaki 360 bp'lik bölgeye doğrudan bağlanmasıdır. Ayrıca *yvnB* promotor DNA segmenti her iki proteinle birlikte inkübe edildiğinde elde edilen elektro hareket kayma farklılığı, proteinlerin tek başlarına gösterdikleri elektro hareket kayma farklılığına göre daha fazla artmıştır (Şekil 3.41). Bu sonuca bağlı olarak, diğer degredatif enzimlerin düzenlenmesinde olduğu gibi *yvnB* üzerinde de LutR ve SinR proteinlerinin eş zamanlı görev yaptığını söyleyebiliriz.



Şekil 3.42 : LutR ve SinR proteinlerinin *yvnB* promotoru ile EMSA analizi.

yvnB geninin fonksiyonu hala tam olarak bilinmemekle birlikte, metallofosfotaz (MPP) süperfamilyasına ait olan YvnB (BSU35040) proteininin metallofosfotaz domainine sahip olduğu ve tahmini ekstraselüler fosfohidrolaz (1289 aa) aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Herzner ve ark., 2011). Ayrıca YvnB protein dizisi, *B.*

subtilis'te ikincil proteazlardan olan ve yukarıda bahsi geçen Bpr proteini ile benzerlik göstermektedir (Şekil 3.42). MPP ailesi fonksiyonel olarak birbirlerinden farklı üyelerden oluşmaktadır. Fakat bu gruptaki proteinler, iki metal iyonu (genellikle manganez, demir veya çinko) içeren bir aktif bölgenin bulunduğu, korunmuş bir domanine sahiptir. Bu domain histidin, aspartat ve asparajin residülerinin kafes yapısından oluşan bir oktahedral geometri ile koordine edilir. MPP süperfamilyasında Mre11/SbcD-benzeri ekzonükleazlar, Dbr1-benzeri RNA kement dallanmayı bozucu enzimler, YfcE-benzeri fosfodiesterazlar, mor asit fosfotazlar (PAPs), YbbF-benzeri UDP-2,3-diaçilglukozamin hidrolazlar ve asit sfingomiyelinazlar (ASMaz'lar) yer almaktadır.

Bütün bu verileri dikkate aldığımızda, LutR ve SinR'ın proteolitik enzim genlerinin ifadelerini düzenlemeleriyle ilgili daha önce elde edilen sonuçlara paralel olarak, bu çalışmada LutR ve SinR proteinlerinin bir tahmini ekstraselüler fosfohidrolaz kodlayan *yvnB* genini hem tek başlarına hem de eş zamanlı olarak doğrudan kontrol ettikleri belirlenmiştir.

yvnB	611	DGLFTSQLEWDTSKLSEGAHHIQASDGKENVS-----LVVRVDNSGP
		DG F + ++ L++G + + A+ +N + + V +D P
bpr	1202	DGTFHAGII-----LNKGENELTATASTDNGTTDASSPITVTLDQEK
yvnB	654	HIEPNITE--GQTYKGNLILQADMYDKWSRIEEAEASLDGESITLPYHT
		+ + + G+T K L ++ + D + ++G+ T+ +
bpr	1245	ELTLDNPKDGGKTNETLTVKGAVSDD----NLKDVKVNGKKATVADGS
yvnB	701	SSSDLL--PGKHSLKVTATDLAGNKTVIERIFKTEREHPDQPEVIDSEA
		S+ +L G++ +KV ATDLAGNKT + + + P +I E
bpr	1290	YSARILLENGRNEIKVIATDLAGNKTTKKTVIDVNFDPVISGLIPGED
yvnB	748	DTHKAKLSVRVKDPTNDAMDVG
		KA SV++ + + +D F
bpr	1339	KNLKAGESVKIAFSSAEDLDATF

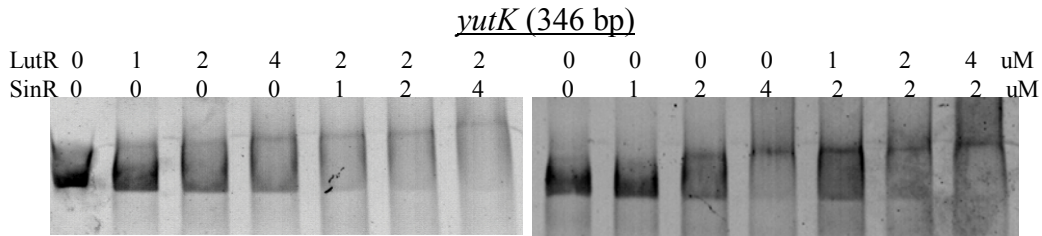
Şekil 3.43 : *yvnB* (BSU35040, *B. subtilis*, 1289 aa) ve *bpr* (BSU15300, bacillopeptidase F, *B. subtilis*, 1433 aa) genleri arasında dizi hizalama analizi. Skor 52.4 bit.

3.6.8 LutR ve SinR proteinlerinin *yutK* geni üzerindeki etkisi

B. subtilis'in aktif üreme sürecinde sessiz olan birçok gen, logaritmik fazdan durağan faza geçişi esnasında ve sporilasyonun başlangıcında ifade edilmeye başlar (Strauch 1995). Bu genlerin çoğu SpoOA, AbrB, ComA ve SinR gibi global regülatörler tarafından kontrol edilir (Strauch 1995). Üreme ortamındaki şartlar, gen ifadelerinin

bu kontrol mekanizmaları tarafından nasıl düzenleneceğini de belirler. Örneğin katabolik represyon mekanizması, *B. subtilis*'in üreme ortamındaki karbonhidrat kaynaklarının uygun miktarda olup olmamasına cevap olarak gen ifadesini düzenlemek için kullanılan global regülatör mekanizmalardan biridir (Zeng ve ark., 2000). Temel prensip olarak, ortamdaki bir karbon kaynağı hızlı bir şekilde tüketiliyorsa, diğer karbon kaynaklarının kullanımı ile ilgili enzimlerin sentezi baskılanır. Nükleozitler, özellikle guanozin, zayıf nitrojen ve karbon kaynağıdır (Schuch ve ark., 1999; Switzer ve ark. 2002). Bu nedenle, diğer besinlerin bol olduğu üreme ortamlarında bu bileşiklerin kullanılmasını sağlayan fizyolojik sinyal sistemleri, tercih edilen nitrojen ve karbon kaynakları tüketilinceye kadar CodY tarafından baskılanır (Belitsky ve Sonenshein, 2011).

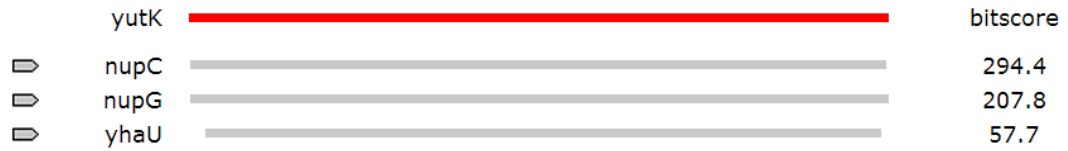
Bu tez çalışmasında EMSA analizlerinde elde edilen en önemli verilerden biri LutR ve SinR proteinlerinin Na⁺/nükleozid kotransport proteini olan *yutK* geninin transkripsiyon başlangıç +1 noktasına göreceli (-295.)-(+51.) nt'ler arasındaki 346 bp'lik bölgeye doğrudan bağlanmalarıdır. EMSA analizlerinde elde edilen veriler, LutR ve SinR proteinlerinin *yutK* promotoruna hem tek başlarına hem de beraber eş zamanlı olarak bağlandıklarını göstermektedir (Şekil 3.43).



Şekil 3.44 : LutR ve SinR proteinlerinin *yutK* promotoru ile EMSA analizi.

B. subtilis'te tahmini Na⁺(H⁺)/nükleozid kotransport proteini (404 aa) olan *yutK* geni *nupC*, *nupG* ve *yhaU* genleri ile benzerdir (Şekil 3.44; STRING 9.1 bit skor sırasıyla 294.4, 207,8 ve 57.7). *nupNOPQ* operonu guanosin ve diğer nükleotitlerin alınması ile ilgili proteinleri kodlar. Detaylı olarak bilinmemekle birlikte NupG, NupC ve YutK proteinleri de benzer görevleri üstlenir (Johansen ve ark., 2003; Salixd ve ark., 1996; Martinussen ve ark., 2003). NupG minimal besiyerinde büyüyen hücrelerde major adenozin ve guanozin permeazıdır (Johansen ve ark., 2003). Bununla beraber, üreme ortamında guanin ve hipoksantin varlığında *nupG*'nin ifade seviyesi düşüktür ve *nupG* gen ifadesi guanin ribo-anahtara bağlı kontrol mekanizması ile kontrol

edilmektedir (Mandal ve ark., 2003). Bu nedenle, guanin ve guanozin, hipoksantin, inozin gibi benzer bileşiklerin varlığındaki hücre büyümesinde, *nupNOPQ* transporter genlerinin pürin nükleozitlerinin alımındaki rolü daha fazla önemli olmaktadır. Elde ettiğimiz veriler NupNOPQ proteinlerinin pirimidin nükleozitlerinin düşük afiniteli transporterleri olabileceğini de göstermektedir. NupC ise *B. subtilis*'te primidin nükleozitlerinin majör transportu olarak görev alır (Salixd ve ark., 1996). NupNOPQ, bu nükleotitlerin daha önce tanımlanmamış ikincil transporterleri olabilir. Diğer bakterilerdeki NupNOPQ benzeri transporterler hem pürin hem de pirimidin nükleozitlerin alınımında görevlidir (Deka ve ark., 2006; Martinussen ve ark., 2010; Webb ve Hosie, 2006).



Şekil 3.45 : *B. subtilis*'te *yutK* geniyle benzer olan diğer genler: *nupC*, *nupG*, *yhaU*.

Bakterilerde asetoin, bir karbon depolama materyali olarak kullanılır ve üremenin logaritmik fazında hücre dışına salgılanır. *B. subtilis* asetoini sporilasyon sürecinde karbon ve enerji ham maddesi olarak kullanabildiği için durağan fazda daha fazla asetoin tüketir. Öykü İrigül-Sönmez (Doktora tezi, 2012), asetoin kullanımında görevli asetoin dehidrogenaz kompleksinin sentezinden sorumlu olan *acoABCL* operonunun durağan faz sürecinde LutR tarafından baskılandığını belirlemiştir (Çizelge 3.13). Gen ifadesi analizlerinde elde ettiği bu veriler, logaritmik fazda da benzer şekilde sonuçlanmış yani LutR proteini *acoABCL* operonunu logaritmik fazda da baskılamıştır. Bu operonun ifadesi, glukoz tarafından karbon katabolik represyonunun bir global regülatörü olan CcpA aracılığıyla katabolik represyonla düzenlenir (Ali ve ark., 2001). *acoABCL* operonu, ayrıca LutR proteini tarafından da negatif olarak kontrol edilir (Öykü İrigül-Sönmez, Doktora tezi, 2012).

Çizelge 3.13 : *B. subtilis*'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen karbonhidrat metabolizması ilgili genler (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	KATLANMA FARKI ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>acoA</i>	-1,57	-3.07 (±0.22)	Aseton Dehidrogenaz E1 bileşeni (TPP bağımlı alfa alt birimi)	
<i>acoB</i>	-1,54		Aseton Dehidrogenaz E1 bileşeni (TPP bağımlı beta alt birimi)	
<i>acoC</i>	-1,56		Dallanmış zincir alfa-keto asit dehidrogenaz alt birimi E2	
<i>acoL</i>	-1,36		Dihidrolipoamid dehidrogenaz	

B. subtilis'te nitrojen metabolizması hücrede başlıca nitrojen kaynağı olan glutamin ve glutamatın hücre içindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak düzenlenir. Glutamat sentaz enzimini kodlayan *gltA* (glutamat sentaz büyük alt birimi kodlar) ve *gltB* (glutamat sentaz küçük alt birimi kodlar) genlerinin transkripsiyonları üremenin durağan fazında LutR'ın etkisiyle baskılanmaktadır (Öykü İrigül-Sönmez, Doktora tezi, 2012). Bunun aksine, *pyr* operonunda (*pyrB-pyrC-pyrAA-pyrAB-pyrK-pyrD-pyrF-pyrE*) organize olan ve pirimidin nükleotitlerinin sentezinden sorumlu enzimleri kodlayan genler durağan fazda ve sporilasyonun başlangıcında LutR tarafından pozitif kontrol edilirler (Çizelge 3.14). Ancak primidin nükleotit biyosentetik operonu *pyr*'nin üremenin logaritmik fazında LutR tarafından baskılandığı belirlenmiştir (Çizelge 3.15).

Yukarıda bahsedildiği gibi daha önce yapılan çalışmalarda hem karbonhidrat metabolizması ile ilgili hem de nitrojen metabolizması ile ilgili genlerin çeşitli regülatör proteinlerle pozitif veya negatif olarak düzenlendiği belirlenmiştir. Örneğin *pyr* genleri pirimidin sentezinde görevliyen, *nupG*, *nupC* ve *yutK* geni üreme ortamında karbon kaynakları azaldığında alternatif olarak nükleozit bileşiklerinden karbon elde etmeyi sağlamaktadır. *pyr* genleri yukarıda bahsedildiği gibi LutR proteininin kontrolü altındadır.

Ayrıca Ebru Köroğlu (Doktora tezi, 2013) basilisin antibiyotiği ile ilgili çalışmasında, LutR tarafından kontrol edilen basilisin antibiyotiğinin üremenin logaritmik fazında pirimidin nükleotit sentez operonunu pozitif yönde kontrol ettiğini belirlemiştir (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.14 : *B. subtilis*'de üremenin durağan fazında LutR tarafından düzenlenen nitrojen metabolizması ilgili genler (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	KATLANMA FARKI ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>pyrR</i>	1,52	2.79 (±0.32)	Bifonksiyonel Primidin Regülatör Protein PyrR urasil Fosforiboziltransferaz	
<i>pyrP*</i>	NR	3.48 (±0.18)	Urasil permeaz	
<i>pyrB</i>	1,37	4.34 (±0.01)	Aspartat Karbamoiltransferaz Katalitik alt birimi	
<i>pyrC</i>	1,89		Dihidroorotaz	
<i>pyrAA</i>	2,31	5.85 (±0.20)	Karbamoil-fosfat sentetaz (glutaminaz alt birimi)	
<i>pyrAB</i>	2,00		Karbamoil-fosfat sentetaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrK</i>	ND		Dihidroorotaz dehidrogenaz	
<i>pyrD</i>	1,32		Dihidroorotaz dehidrogenaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrF</i>	1,21		Orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz	
<i>pyrE</i>	1,08		Orotat fosforibozil transferaz	

Bu tez çalışmasında ise EMSA analizi ile *yutK* geninin hem SinR hem de LutR proteinlerinin doğrudan kontrolü altında olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, her iki proteinin *yutK* geni üzerinde eş zamanlı bir düzenleyici etki gösterdikleri belirlenmiştir. Çünkü LutR proteinin konsantrasyonu sabit tutulup SinR proteininin konsantrasyonu arttırıldığında veya SinR proteininin konsantrasyonu sabit tutulup LutR proteininin konsantrasyonu arttırıldığında *yutK* geninin elektro hareket kayma miktarının arttığı görülmektedir. Bu durum her iki proteinin *yutK* genini düzenlerken eş zamanlı hareket ettiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.15 : *B. subtilis*'de üremenin logaritmik fazında LutR tarafından negatif düzenlenen nitrojen metabolizması ilgili genler (İrigül-Sönmez, 2012).

GEN	İFADE ORANI ^a	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^b
<i>pyrC</i>	-1,75	Dihidroorotaz	
<i>pyrB</i>	-1,74	Aspartat Karbamoiltransferaz	
<i>pyrAA</i>	-1,67	Karbamoil-fosfat sentetaz (glutaminaz alt birimi)	
<i>pyrAB</i>	-1,58	Karbamoil-fosfat sentetaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrD</i>	-1,44	Dihidroorotaz dehidrogenaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrK</i>	-0,93	Dihidroorotaz dehidrogenaz (Elektron transfer alt birimi)	
<i>pyrF</i>	-0,89	Orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz	
<i>pyrE</i>	-0,81	Orotat fosforibozil transferaz	

Çizelge 3.16 : *B. subtilis*'de üremenin logaritmik fazında nitrojen metabolizması ilgili genler üzerinde Basilisinin düzenleyici etkisi (Köroğlu, 2013).

GEN	KATLANMA FARKI ^a	qPCR ^b	FONKSİYON	TRANSKRİPSİYON ORGANİZASYONU ^c
<i>pyrR</i>	1,49	1.00 (±0.06)	Bifonksiyonel Primidin Regülatör Protein PyrR urasil Fosforiboziltransferaz	
<i>pyrP</i>	1,08		Urasil permeaz	
<i>pyrB</i>	0,6		Aspartat Karbamoiltransferaz Katalitik alt birimi	
<i>pyrC</i>	ND		Dihidroorotaz	
<i>pyrAA</i>	0.39		Karbamoil-fosfat sentetaz (glutaminaz alt birimi)	
<i>pyrAB</i>	0.38		Karbamoil-fosfat sentetaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrK</i>	0.42		Dihidroorotaz dehidrogenaz	
<i>pyrD</i>	0,26		Dihidroorotaz dehidrogenaz (katalitik alt birimi)	
<i>pyrF</i>	0.44		Orotidin 5'-fosfat dekarboksilaz	
<i>pyrE</i>	0.55		Orotat fosforibozil transferaz	

3.7 LutR Proteinin *in silico* Analizi

Bir proteinin belirli özelliklerini keşfetmek veya tahmin etmek için protein veri bankasındaki (PDB) bilgilerden yararlanılabilir ve elde edilen bu veriler deneysel araştırmalarda kullanılabilir (Lubec et al. 2005, Zhang et al. 2007). Bu tez kapsamında *B. subtilis* 168 suşuna ait LutR transkripsiyon faktörünün *in silico* analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde iki farklı strateji izlenilmiştir. Birinci stratejide, *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 (NCBI ref: NP_391298.2) suşuna ait LutR protein dizisi “referans dizi” olarak kullanılmış ve farklı bakteri türlerine ait 30 adet LutR proteini biyoinformatik araçlarla analiz edilmiştir (Çizelge 3.17). İkinci stratejide, aynı LutR protein dizisi (NCBI ID: NP_391298.2) referans alınarak protein veri bankasında bulunan diğer HTH-tipi transkripsiyon faktörlerinden *E. coli* suşuna ait FadR (PDB kodu: 1E2X, 1HW1, 1HW2, 1HT9) ve *B. subtilis* suşuna ait YvoA (PDB kodu: 2WV0) proteinlerinin primer ve sekonder yapıları PyMOL programında üç boyutlu olarak karşılaştırmalı analiz edilmiştir.

3.7.1 Farklı bakteri türlerine ait 30 LutR proteinin *in silico* analizi

NCBI veri tabanından FASTA formatında toplanan 30 LutR protein dizisi MEGA 5.2.2 programında ClustalW aracıyla hizalanmıştır (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) (Şekil 3.45). HTH-tipi protein ailelerinin N-terminal bölgelerinde önemli derecede

benzerlik göstermeleri nedeniyle (Rigali ve ark., 2004), Şekil 3.45’de dizi hizalama işlemlerinde, proteinlerin N-terminal bölgesine karşılık gelen 1. ve 100. rezidüler arası gösterilmiştir.

Çizelge 3.17 : Tez kapsamında NCBI veri tabanından seçilen, LutR proteinine sahip çeşitli bakteri türlerinin listesi.

Türler			NCBI Erişim Numarası
1	<i>Anoxybacillus</i>	<i>flavithermus</i>	WP_004891491.1
2		<i>subtilis</i>	NP_391298.2
3		<i>amyloliquefaciens</i>	YP_007444053.1
4		<i>bataviensis</i>	WP_007087687.1
5	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	YP_082794.1
6		<i>cereus</i>	WP_002020704.1
7		<i>coagulans</i>	WP_019722151.1
8		<i>thuringiensis</i>	YP_894026.1
9	<i>Burkholderia</i>	<i>cenocepacia</i>	YP_620568.1
10		<i>lata</i>	YP_368517.1
11	<i>Clostridiaceae</i>	<i>bacterium</i>	WP_006307823.1
12		<i>arbusti</i>	WP_010238111.1
13	<i>Clostridium</i>	<i>botulinum</i>	YP_002803457.1
14		<i>sporogenes</i>	WP_003491133.1
15	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>hafniense</i>	WP_018211281.1
16		<i>dehalogenans</i>	YP_006430944.1
17	<i>Desulfurispora</i>	<i>thermophila</i>	WP_018086379.1
18	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>orientis</i>	YP_004969297.1
19		<i>youngiae</i>	WP_007780183.1
20	<i>Geobacillus</i>	<i>caldoxylosilyticus</i>	WP_017436109.1
21		<i>thermodenitrificans</i>	WP_011886747.1
22	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	WP_017451601.1
23	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	WP_016984324.1
24		<i>gallicum</i>	WP_018448517.1
25	<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	WP_020052633.1
26		<i>leguminosarum</i>	WP_017957978.1
27		<i>mesoamericanum</i>	WP_007537697.1
28		<i>saprophyticus</i>	YP_300828.1
29	<i>Staphylococcus</i>	<i>simulans</i>	WP_002481826.1
30		<i>equorum</i>	WP_021339799.1

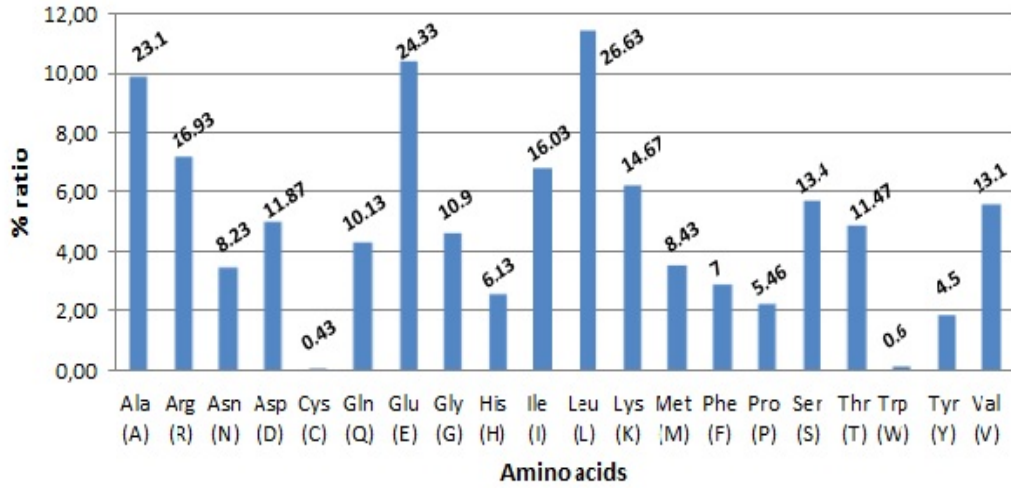
Hizalama analizlerinde G10, L13, R31, E32, A33, G41, G48, G50, R84 ve E88 (*B. subtilis* 168 LutR sıralamasına göre) rezidülerinin 30 LutR dizisinde korunmuş olduğunu belirlenmiştir. Bunun yanısıra aynı dizi sırasına göre D11, V25, R27, E44 ve E82 gibi bazı rezidüler 30 LutR proteininin hepsinde olmasa da %90 oranında

Proteinlerin izoelektrik noktaları (pI), net yükün sıfır olduğu pH değeridir ve bu yüksüz durumun bir sonucu olarak, izoelektrik noktalarındaki elektrik alanda proteinler hiç bir yöne göç edemezler. 30 LutR proteini arasında en asidik ve en bazik protein dizilerinin sırasıyla *Clostridium sporogenes* [WP_003491133.1, pI = 5,1 (min)] ve *Bacillus cereus* [WP_002020704.1, pI = 9,72 (max)] olduğu belirlenmiştir. Hesaplanan pI değeri 7'den küçük olan ($pI < 7$) proteinler “asidik”, 7'den büyük olanlar ($pI > 7$) ise “bazik” karakterli kabul edilir (Sivakumar et al. 2007). 30 LutR proteininden sadece üçü pH 7.0 değerinin üstünde olmasına rağmen, diğer bütün proteinlerin pI değerleri pH 7'nin altında bulunmuştur. Bu nedenle söz konusu üç protein bazik karakterli, diğer 27 protein ise asidik veya nötral karakterli değerlendirilmiştir (Çizelge 3.18). Proteinlere yönelik çalışmalarda en önemli adımlardan biri proteinlerin yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek saflıkta izolasyonu ve saflaştırılmasıdır. Bu nedenle, çalışılan proteinle ilgili örneğin DNA bağlanma tamponu hazırlama gibi işlemlerde pI değerlerinin bilinmesi önemlidir. pI değerleri EMSA ve ChIP yöntemleri gibi çeşitli analizlerde de önemli bir rol oynamaktadır.

30 LutR proteininin yapısında en fazla bulunan residülerin Ala, Glu ve Leu (sırasıyla 23.1, 24.33 ve 26.63% oranlarında) olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, alifatik amino asitlerden Ile, Val ve pozitif yüklü amino asitlerden Lys, Arg residüleri en sık rastlanılan amino asitler olarak tanımlanmıştır (Şekil 3.46). HTH-tip proteinlerin yapısı α -heliks, β -tabaka, döngü (turn) ve ilmek (loop) yapılarından oluşmaktadır. C-terminal domainlerinin tamamen α -helix veya β -tabaka yapısından oluşabilmesine rağmen, N-terminal domain genellikle her iki yapının bir kombinasyonundan oluşmaktadır. α -helix yapısında, amino asit çeşitlerinin pozisyonları ile hidropatik özellikleri arasında önemli derecede bir ilişki vardır (Idicula-Thomas and Balaji 2005). Bununla beraber, HTH-tip transkripsiyon faktörleri hedef DNA dizilerini tanımak ve bu dizilere bağlanmak için pozitif veya negative yüklü amino asitleri kullanır (Jones et al. 1999). Bu nedenle Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Try, and Trp hidrofobik amino asitlerin proteinlerin iç bölgelerinde yer alması beklenirken Arg, His, Lys, Asp, ve Glu gibi yüklü amino asitlerin proteinlerin DNA bağlanma yüzeylerinde konumlanmaları beklenir. Dolayısıyla, burada en fazla oranda bulunduğu belirlenen amino asitlerle, bu amino asitlerin LutR proteinlerindeki beklenen görevleri arasında bir uyum söz konusudur.

Çizelge 3.18: LutR dizilerinin Expasy's ProtParam araçlarıyla hesaplanan parametreleri.

	Organizma ve protein Adı	Kod	Uzunluk	M.wt	pI	-R	+R	EC	II	AI	GRAVY
1	Transc. Reg. of <i>lut</i> operon, GntR family noxybacillus flavithermus]	WP_004891491.1	239	27040.3	5,28	37	28	11460	35.98	98.87	-0.183
2	GntR family transc.regulator [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	NP_391298.2	219	24316.8	5,11	36	26	11460	18.37	99.00	-0.262
3	Fatty acid metabolism reg. protein [Bacillus amyloliquefaciens IT-45]	YP_007444053.1	239	26919.8	5,25	43	33	14440	26.60	91.51	-0.384
4	GntR family transcriptional regulator [Bacillus bataviensis]	WP_007087687.1	238	26836.7	6,02	35	32	10430	44.5	104.92	-0.298
5	GntR family transcriptional regulator [Bacillus cereus E33L]	YP_082794.1	218	24459.0	5,78	32	26	9970	39.20	98.90	-0.345
6	GntR family transcriptional regulator [Bacillus cereus]	WP_002020704.1	101	11080.9	9,72	10	16	2980	34.01	94.55	-0.314
7	GntR family transcriptional regulator [Bacillus coagulans]	WP_019722151.1	236	26247.2	5,45	37	32	7450	32.11	96.86	-0.256
8	GntR family transc. regulator [Bacillus thuringiensis str. Al Hakam]	YP_894026.1	218	24459.0	5,78	32	26	9970	41.22	98.90	-0.339
9	GntR family transc. regulator [Burkholderia cenocepacia AU 1054]	YP_620568.1	249	27123.5	6,40	33	31	4470	43.23	89.52	-0.332
10	GntR family transcriptional regulator [Burkholderia lata]	YP_368517.1	253	27656.0	6,40	34	33	4470	40.37	89.25	-0.364
11	Lactate-res. Reg. LldR, [Clostridiaceae bacterium L21-TH-D2]	WP_006307823.1	231	26952.4	8,57	37	39	5960	41.44	105.11	-0.343
12	GntR family transcriptional regulator [Clostridium arbusti]	WP_010238111.1	236	27091.3	5,49	37	30	4595	40.32	111.48	-0.162
13	GntR family transc. regulator [Clostridium botulinum A2 str. Kyoto]	YP_002803457.1	230	26726.1	6,87	37	37	9065	33.08	10939	-0.306
14	GntR family transcriptional regulator [Clostridium sporogenes]	WP_003491133.1	236	27113.3	5,10	43	33	4470	3932	108.31	-0.260
15	GntR family transcriptional regulator [Desulfitobacterium hafniense]	WP_018211281.1	245	27993.4	5,88	42	38	17420	39.33	101.14	-0.318
16	Htranscriptional reg. [Desulfitobacterium dehalogenans ATCC 51507]	YP_006430944.1	245	27807.1	5,96	42	39	14440	35.31	99.18	-0.360
17	Hypothetical protein [Desulfurispora thermophila]	WP_018086379.1	241	27450.4	5,63	39	32	15930	38.61	107.76	-0.329
18	Transcriptional regulator [Desulfosporosinus orientis DSM 765]	YP_004969297.1	239	27643.7	5,72	39	31	18910	27.45	99.62	-0.372
19	GntR family transcriptional regulator [Desulfosporosinus youngiae]	WP_007780183.1	239	27435.5	5,69	40	31	14440	30.74	101.26	-0.372
20	GntR family transcriptional regulator [Geobacillus caldoxylosilyticus]	WP_017436109.1	268	30809.6	6,11	39	35	16960	33.86	89.59	-0.334
21	GntR family transc. regulator [Geobacillus thermodenitrificans]	WP_011886747.1	220	24886.7	6,14	30	28	15470	20.84	89.68	-0.280
22	GntR family transcriptional regulator [Herbaspirillum seropedicae]	WP_017451601.1	255	28163.6	6,11	35	32	2980	45.17	87.73	-0.470
23	GntR family transcriptional regulator [Pseudomonas fluorescens]	WP_016984324.1	248	27487.0	6,37	34	31	4470	48.15	93.79	-0.357
24	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium gallicum]	WP_018448517.1	243	27746.7	6,10	40	36	9970	56.20	87.57	-0.391
25	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium leguminosarum]	WP_020052633.1	240	27400.3	6,47	39	37	9970	54.61	88.29	-0.382
26	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium leguminosarum]	WP_017957978.1	240	27344.5	7,94	37	38	9970	53.43	92.38	-0.340
27	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium mesoamericanum]	WP_007537697.1	240	27533.5	6,27	38	35	15595	56.26	88.29	-0.425
28	T. Reg. [Staphy. saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305]	YP_300828.1	232	26183.0	5,17	35	26	8940	32.50	100.95	-0.214
29	Hypothetical protein [Staphylococcus simulans]	WP_002481826.1	232	26338.1	5,42	38	32	10430	43.11	98.84	-0.367
30	Transcriptional regulator [Staphylococcus equorum]	WP_021339799.1	232	26061.8	5,11	36	26	8940	27.57	103.45	-0.227



Şekil 3.47 : LutR protein dizilerinde 20 amino asidin bulunma yüzdeleri. (*) Çubukların üzerindeki numaralar ilgili amino asidin 30 LutR dizisindeki ortalamayı göstermektedir. Yüzde değerleri bu ortalamalar dikkate alınarak belirlenmiştir.

Protein merkezli araştırmalarda bir protein örneğinin konsantrasyonunun tayin edilmesi hem protein fraksiyonlarının tanımlanmasında hem de saflaştırılmasında oldukça önemlidir. Beer-Lambert kanunu yardımıyla bir çözeltideki proteinlerin konsantrasyonu, absorbands değerleri kullanılarak belirlenebilir (Gill and von Hippel 1989). Proteinlerin 280 nm'deki sönümlenme kat sayısı (extinction coefficient) hemen hemen tamamen aromatic residülerden kaynaklanır ve bu değer bir proteinin amino asit dizisinden tahmin edilebilir (Adeloye and Ajibade 2011). LutR proteinlerinin 280 nm'deki sönümlenme kat sayıları $2980-18910 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ arasında değişmektedir. LutR proteinlerinin (YP_007444053.1, WP_007780183.1, WP_011886747.1, WP_007537697.1, WP_018086379.1, WP_017436109.1, YP_004969297.1) sönümlenme kat sayılarının yüksek olması, yapılarındaki Phe, Trp ve Tyr residülerinin göreceli olarak yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.18).

Protein analizlerinde, proteinlerin *in vitro* kararlılıkları, *in vivo* kararlılıkları kadar önemlidir. Bir proteinin test tüpünde kararlı olup olmadığını belirlemek için “kararsızlık indeksi (instability index)” parametresi kullanılabilir. LutR proteinlerinin kararsızlık indeksi değerlerinin 21.90 ile 47.14 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre WP_007087687.1, YP_894026.1, YP_620568.1, YP_368517.1, WP_006307823.1, WP_010238111.1, WP_017451601.1, WP_016984324.1, WP_018448517.1, WP_020052633.1, WP_017957978.1, WP_007537697.1, WP_002481826.1 proteinleri “kararsız proteinler” olarak

tanımlanmıştır (Çizelge 3.18). Teorik olarak kararsızlık indeks değeri, incelenen proteinin test tüpündeki kararlılığını ifade eder. Eğer kararsızlık değeri 40'dan küçükse o protein “kararlı” olarak değerlendirilir. Eğer bu değer 40'dan büyük ise “kararsız” olarak değerlendirilir (Guruprasad et al. 1990, Sivakumar et al. 2007). 30 LutR proteininin yaklaşık yarısının (% 43.3) *in vitro* ortamda kararsız olduğu belirlenmiştir.

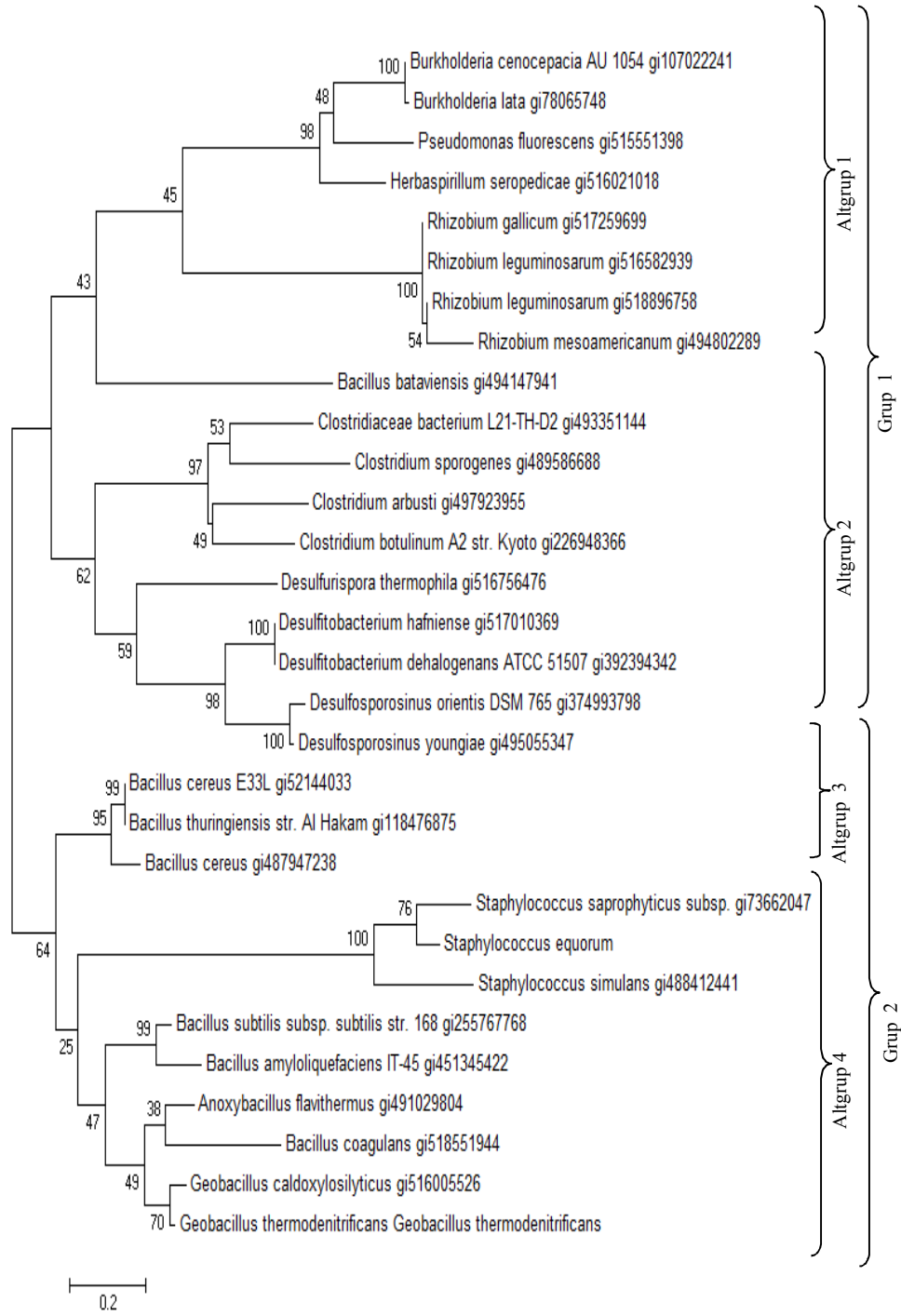
30 LutR proteininin alifatik indeks (AI) değerleri 87.57 ile 111.48 arasında değişim göstermektedir. WP_018448517.1, WP_017451601.1, WP_020052633.1 ve WP_007537697.1 proteinlerinin düşük termal kararlılıkları diğer LutR proteinleri ile karşılaştırıldığında, diğerlerine göre daha fazla esnek yapıda oldukları söylenebilir (Çizelge 3.18). Diğer LutR proteinlerinin çok yüksek değerlerde alifatik indekse sahip olmaları bu proteinlerin daha geniş bir sıcaklık aralığında kararlı olduğunu gösterir. Bir proteinin alifatik indeksi, yapısında alifatik yan zincir bulunduran alifatik amino asitlerin (Ala, Val, Ile ve Leu) protein yapısını oluşturan diğer amino asitlere oranı olarak tanımlanır. Ala (9.90 %, av. 23.1) ve Leu (11.41%, av. 26.63) yüzdelerinin göreceli olarak yüksek olduğu görülürken, Ile (6.87%, av. 16.03) ve Val (5.61%, av.13.1) yüzdelerinin orta düzeyde olduğu belirlenmiştir. Alifatik indeks, globular proteinlerin termal kararlılığının artışı için bir pozitif faktör olarak değerlendirilir. İstatiksel bir analizde termofilik bakterilere ait bir proteinin alifatik indeksinin diğer normal proteinlere göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Ikai 1980).

Protein çözünürlüğü yapısal ve fizyolojik analizlerde önemli bir özelliktir. Çözünürlük, proteinler için karakteristik bir özellik olup, belirli deney koşullarında proteinlerin amino asit dizilerine göre belirlenir. Proteinlerin GRAVY değerleri, bütün amino asitlerin hidropati değerlerinin toplamının protein dizisindeki residü sayısına bölünmesi ile hesaplanır (Gasteiger et al. 2005, Smialowski et al. 2007). GRAVY (Grand Average of Hydropathy) değerini hesaplamak için, 20 amino asidin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine dayanan bir hidropati skalası kullanılır. Sıfırın üzerindeki GRAVY indeksi hidrofobik proteinlere özgü olup, bir proteinin yapısının bütün olarak hidrofobik olduğunu gösterir (Kyte and Doolittle 1982). 30 LutR proteininin GRAVY değerleri -0.47 ile -0.162 arasında değişmektedir. WP_017451601.1, WP_007537697.1, WP_018448517.1 ve YP_007444053.1 proteinlerinin göreceli olarak düşük GRAVY değerleri, bu proteinlerin suda daha iyi etkileşim göstereceklerinin bir işareti olabilir (Çizelge 3.18). Çeşitli deneysel

analizlerde proteinlerin yüksek konsantrasyonlarda elde edilmesi açısından “çözünürlük özelliği” sınırlayıcı bir faktördür. Bu nedenle büyük ölçekli protein analizlerinde protein dizilerini dikkate alarak ilgili proteinlerin çözünürlük özelliğine yönelik doğru teorik tahminlerin yapılması önemli bir adımdır.

Filogenetik ağaçları oluşturmak için, MEGA 5.2.2 programında “Neighbor-Joining (NJ)” metodu yerine “maximum likelihood phylogenetic tree” aracı kullanılmıştır ve “bootstrapping” metodu 100 tekrarlı uygulanmıştır (Şekil 3.47). “Bootstrapping” metodu yaygın olarak kullanılmakta olup eldeki veriyi birçok kez benzetme yaparak daha gerçekçi ağaçların eldesine imkan vermektedir (Soltis and Soltis 2003, Larkin et al. 2007, Kumar et al. 2008, Tamura et al. 2011).

Burada yapılan analizde, 30 LutR protein dizisi filogenetik ağaçta iki ana gruba, toplam dört alt gruba ayrılmıştır. LutR proteinlerinin fonksiyonları, amino asit dizilerinin Prosite server programına sunularak analiz edilmiştir. PROSITE veritabanı en yaygın kullanılan ve karşılaştırmalı patern ve profil veri tabanıdır (Sigrist 2002, Hulo et al. 2006). Protein fonksiyonlarını belirlemek için protein dizilerindeki “patern” ve “profil”lerin kullanılması dizi analizlerindeki temel araçlardan biridir (Hofmann et al. 1999). Genel bir fonksiyona sahip çeşitli proteinlere ait amino asit dizilerinde “patern”, “imza” veya “parmak izi” denilen bazı residü tiplerinden oluşan belirli kümeler sıklıkla gözlemlenir. Protein dizilerinin, genellikle 10-20 amino asitten oluşan, bu karakteristik yapısal özellikleri, özellikle tanımlanmamış bir proteinin fonksiyonu primer yapıdan tahmin etmeye çalışıldığında oldukça önemli olmaktadır. Bu sonuçlar enzim katalitik bölgeleri, DNA bağlanma bölgeleri, prostetik grup bağlanma bölgelerinin, metal iyonların bağlanmasında veya disülfid bağ oluşumunda gerekli olan amino asitler gibi çeşitli bazı fonksiyonların göstergesi olabilir (Lakshmi and Subhashini 2010).



Şekil 3.48 : 30 LutR protein dizisine ait filogeni analizi. Filogenetik ağaç, MEGA 5.2.2 programında “maximum likelihood phylogenetic tree” metodu kullanılarak hazırlanmıştır. 100 tekrarlı “Bootstrapping” uygulanmıştır.

Bu çalışmada yapılan PROSITE analizleri 30 LutR proteinine ait profil ve paternlerin sırasıyla “HTH GntR tip DNA bağlanma Domaini” ve “GntR tip HTH Domain” olduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 3.19). Profil sonuçları HTH GntR tip DNA bağlanma domainlerinin yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.19: Bazı bakteri türlerindeki LutR protein dizilerinin fonksiyonel analizi (skor > 0.8).

	<u>Protein name</u>	<u>Accession No.</u>	<u>Pattern</u>	<u>Profile</u>
1	Transcriptional regulator of lactate utilization operon, GntR family Anoxybacillus flavithermus]	WP_004891491.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
2	GntR family transcriptional regulator [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	NP_391298.2	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
3	Fatty acid metabolism regulator protein [Bacillus amyloliquefaciens IT-45]	YP_007444053.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
4	GntR family transcriptional regulator [Bacillus bataviensis]	WP_007087687.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
5	GntR family transcriptional regulator [Bacillus cereus E33L]	YP_082794.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
6	GntR family transcriptional regulator [Bacillus cereus]	WP_002020704.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
7	GntR family transcriptional regulator [Bacillus coagulans]	WP_019722151.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
8	GntR family transcriptional regulator [Bacillus thuringiensis str. Al Hakam]	YP_894026.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
9	GntR family transcriptional regulator [Burkholderia cenocepacia AU 1054]	YP_620568.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
10	GntR family transcriptional regulator [Burkholderia lata]	YP_368517.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
11	Lactate-responsive regulator LldR, GntR family [Clostridiaceae bacterium L21-TH-D2]	WP_006307823.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
12	GntR family transcriptional regulator [Clostridium arbusti]	WP_010238111.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
13	GntR family transcriptional regulator [Clostridium botulinum A2 str. Kyoto]	YP_002803457.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
14	GntR family transcriptional regulator [Clostridium sporogenes]	WP_003491133.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
15	GntR family transcriptional regulator [Desulfitobacterium hafniense]	WP_018211281.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
16	Htranscriptional regulator [Desulfitobacterium dehalogenans ATCC 51507]	YP_006430944.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
17	Hypothetical protein [Desulfurispora thermophila]	WP_018086379.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
18	Transcriptional regulator [Desulfosporosinus orientis DSM 765]	YP_004969297.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
19	GntR family transcriptional regulator [Desulfosporosinus youngiae]	WP_007780183.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
20	GntR family transcriptional regulator [Geobacillus caldxylosilyticus]	WP_017436109.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
21	GntR family transcriptional regulator [Geobacillus thermodenitrificans]	WP_011886747.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
22	GntR family transcriptional regulator [Herbaspirillum seropedicae]	WP_017451601.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
23	GntR family transcriptional regulator [Pseudomonas fluorescens]	WP_016984324.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
24	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium gallicum]	WP_018448517.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
25	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium leguminosarum]	WP_020052633.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
26	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium leguminosarum]	WP_017957978.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
27	GntR family transcriptional regulator [Rhizobium mesoamericanum]	WP_007537697.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
28	Transcriptional regulator [Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305]	YP_300828.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
29	Hypothetical protein [Staphylococcus simulans]	WP_002481826.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain
30	Transcriptional regulator [Staphylococcus equorum]	WP_021339799.1	GntR-type HTH domain	HTH gntR-type DNA binding Domain

Çizelge 3.20 : En muhtemel amino asit dizi eşlemeleriyle LutR protein dizilerinde en çok gözlenen motifler.

Motif Numarası	Dizi Genişliği	Motif Dizi	LutR dizilerinde görülme sıklığı
1	34	QVSRSSVREALSALQAMGLIECKQGEGTYVRKFD	30
2	29	GEPADFQFHYAIAADCTHNPYFVQLMNHCS	28
3	41	KPIKNKKIYEQVVDQIKDMMKNGQLKPGDKLP SER ELMEQF	25

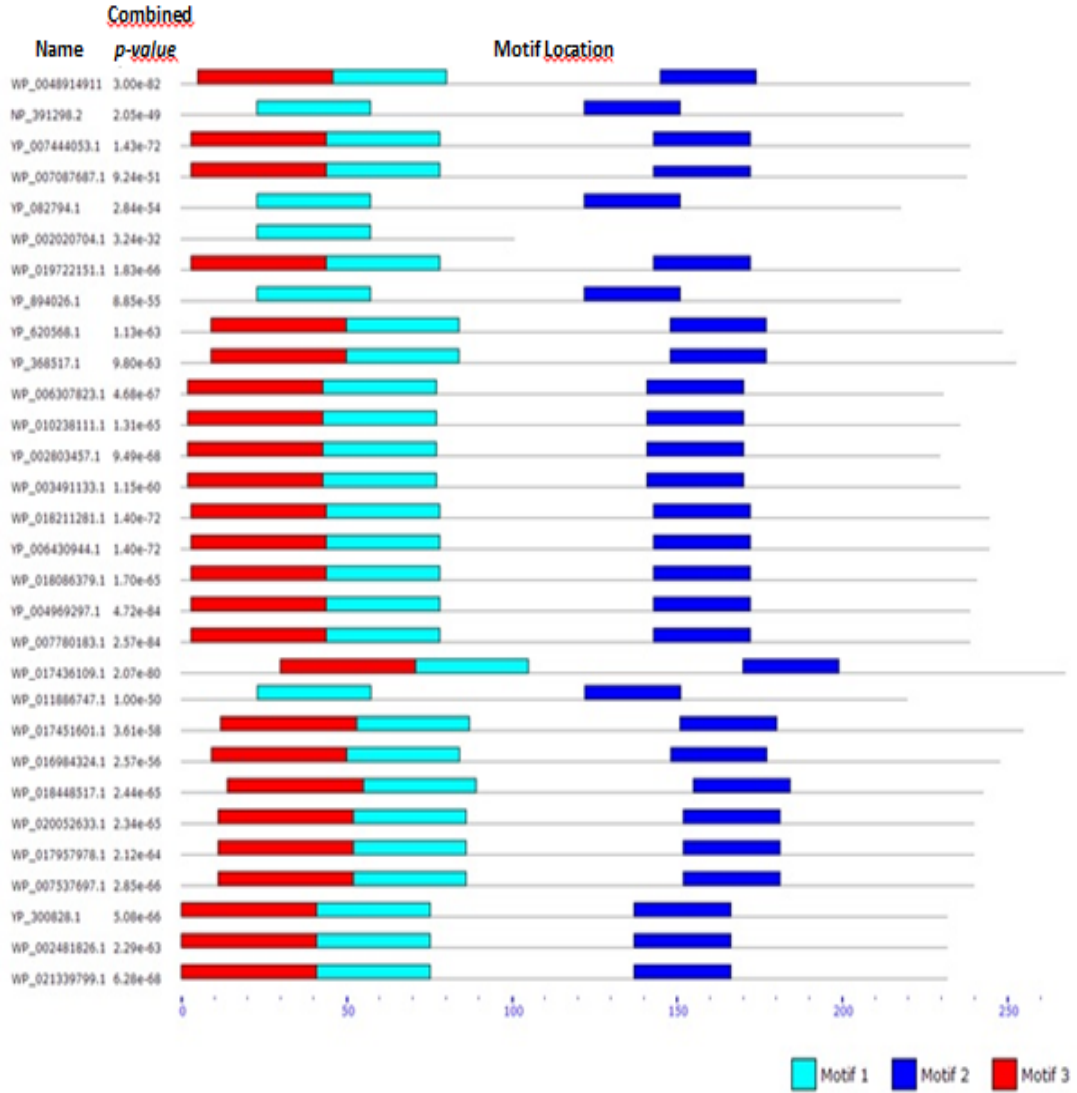
30 LutR proteininde domain ve korunmuş protein motiflerinin analizi Multiple em for Motif Elucidation Server (MEME) kullanılarak uygulanmıştır. Bu yazılım, DNA veya protein dizileri ile ilgili motiflerin bulunması ve karşılaştırılmaları amacıyla kullanılabilir (Bailey et al. 2009, Wan 2004, Levine et al. 2012, Brand et al. 2013). 30 amino asit dizisinde toplam üç motif tespit edilmiş ve bu dizilerde en geniş ve en yüksek eşleşme potansiyeline sahip bu üç motif Çizelge 3.20’da gösterilmiştir. LutR proteinlerinin kombine blok diyagramlarına dayanarak yapılan incelemede 30 proteinin motif-I, motif-II ve motif-III yapılarının üçüne veya en azından bazılarına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu motiflerin DNA bağlanma süreçlerinde fonksiyonel olduğu ve proteinlerin stabiliteelerini yansıttıkları söylenebilir (Şekil 3.48).

3.7.2 *Bacillus subtilis* 168 LutR transkripsiyon faktörünün iyi bilinen HTH-tip transkripsiyon faktörleri ile karşılaştırmalı *in silico* analizi

LutR transkripsiyon faktörünün farklı DNA dizilerini nasıl tanıdığı ve bu dizilere nasıl bağlandığı hala bilinmemektedir. LutR proteininin mekanizmasını moleküler düzeyde anlamak için, protein veri bankasındaki (PDB) kristalloğrafi ve NMR verileri ile karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. LutR protein ile yapısı iyi bilinen diğer HTH tip transkripsiyon faktörleri arasındaki yapısal homolojilerin belirlenmesi, LutR proteininin bağlanmak için hangi dizileri tercih ettiği ve protein yapısında bulunan hangi residülerin bu tanıma ve bağlanmada fonksiyonel olduğuyla ilgili önemli ip uçları sağlar.

Benzer bir yaklaşımla Xu ve ark. (2001), FadR transkripsiyon faktörü ile Tet repressörü/BmrR transkripsiyon faktörü/CAP proteini arasındaki benzerliklerden yararlanarak, FadR’ın C-terminal domainine bir ligand molekül bağlanmasının N-terminal domaininde DNA bağlanma özelliğini nasıl etkilediğini aydınlatmıştır. Bu çalışmalarında Xu ve ark. (2001), FadR proteininin N-terminal kanatlı-heliks

motifinin bilinen klasik şekilde DNA'ya bağlanmadığı, bilakis DNA ile etkileşimde α -helix-3 yapısını kullandığını ileri sürmüştür.



Şekil 3.49 : 30 bakteri türüne ait LutR proteinlerinde MEME ve MAST analizleriyle elde edilen korunmuş protein motiflerinin kombine blok diyagramları.

Resch ve ark. (2010) ise YvoA proteininin “GlcNac degradasyon ve biyosentez enzimlerini kodlayan genlerin kontrolünde görev alan bir repressor protein olduğunu ileri sürmüştür. Bu önerileri, YvoA’nın antibiyotik üretici toprak bakterisi *Streptomyces coelicolor* suşuna ait iyi bilinen DasR regülatör proteini ile % 38 benzerlik gösterdiğini ortaya koyan *in silico* analizlere dayanmaktadır. Bu araştırmacılar aynı zamanda PhnF (PDB code: 2FA1) (Gorelik et al. 2006), TreR (PDB code: 2OGG) (Rezacova et al. 2007), YurK (*B. subtilis* , PDB code: 2IKK), YydK (PDB code: 3BWG) ve FadR (PDB code: 1HW2) gibi GntR/HutC familyası

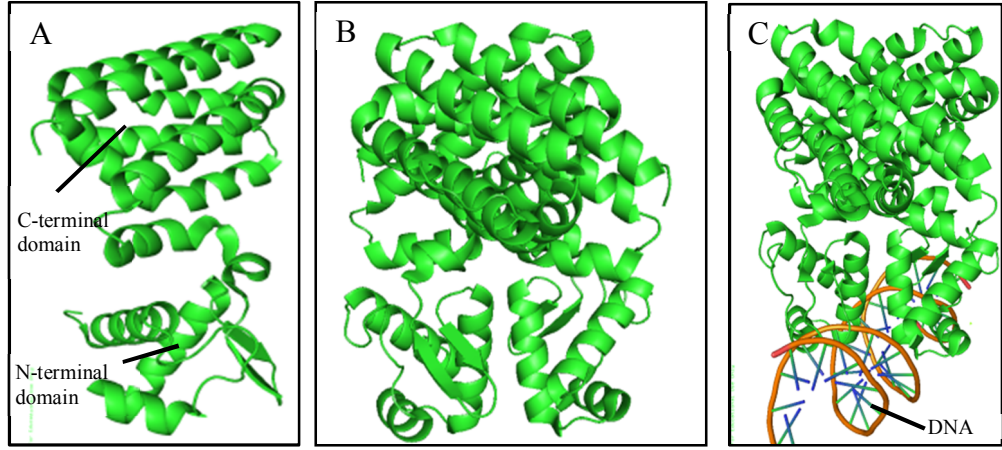
üyeleri ile karşılaştırarak C-terminal efektör bağlanma bölgelerini ve N-terminal DNA bağlanma domainlerini de analiz etmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, farklı proteinler arasındaki yapısal benzerliklerin yeni bir proteininin bilinmeyen bir fonksiyonunu bulmak için önemli bir dayanak sağladığını göstermiştir.

FadR, bakteriyel represör olarak hareket eden bir transkripsiyon faktörüdür ve *E. coli*'de yağ asidi metabolik genlerini kontrol etmektedir (Xu et al. 2001). YvoA ise GntR/HutC grubuna ait bir transkripsiyon faktörü olup *B. subtilis*'te N-asetilglukozamin molekülünün yıkım metabolizmasındaki genlerin regülasyonunda rol alır (Resch et al. 2010). Her ikisinin kristal yapılarında iki domainli dimerik bir molekül yapısına sahip oldukları ve bu domainlerden N-terminal domaininin DNA'ya bağlandığı, C-terminal domainin ise proteinlerin ligantlarına bağlandığı belirlenmiştir. Bu çalışmada FadR, YvoA ve LutR proteinlerine ait ilk 100 amino asit arasında ClustalW aracıyla yapılan dizi benzerliği analizlerinde, wHTH domainlerindeki dizi benzerliklerinin LutR-FadR, LutR-YvoA ve FadR-YvoA arasında sırasıyla % 22, % 28 ve % 21 oranında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.21).

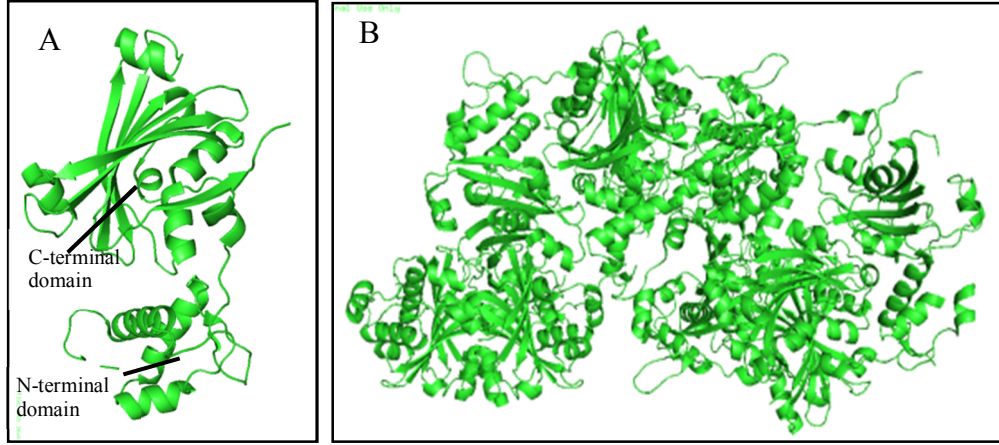
Çizelge 3.21 : *E. coli* FadR, *B. subtilis* LutR ve *B. subtilis* YvoA proteinleri arasında clustalW dizi hizalama analizlerinde elde edilen benzerlik oranları. Hizalamalarda, proteinlerin N-terminal domainlerine karşılık gelen ilk 100 amino asit dikkate alınmıştır.

Proteinler		% Benzerlik	Uzunluk
LutR	FadR	22	100
LutR	YvoA	28	100
YvoA	FadR	21	100

Xu ve ark. (2001) FadR monomerinin üç bölgeden oluştuğunu rapor etmiştir: α/β N-terminal domaini ($\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\beta 3$), α -helikal C-terminal domaini ($\alpha 6-\alpha 7-\alpha 8-\alpha 9-\alpha 10-\alpha 11-\alpha 12$), ve iki kısa α -heliksten oluşan α -bağlantı bölgesi ($\alpha 4-\alpha 5$) (Şekil 3.49). YvoA proteininin N-terminal bölgesinde de (1-76 residülerini içeren bölgede) benzer bir yapı görülür ve bu bölgede $\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\beta 3$ topolojisindeki karakteristik wHTH DNA bağlanma domaini bulunur. YvoA'nın N-terminal bölgesi ile C-terminal bölgesi 21 residü uzunluğundaki (77-97 residülerini içeren bölge) bağlantı bölgesi ile birbirlerine bağlanırlar (Şekil 3.50; Resch et al. 2010).



Şekil 3.50 : *E. coli* FadR protein yapısının şerit diyagramı. A) Monomer yapısı (PDB kodu: 1E2X), B) Dimer yapısı (PDB kodu: 1HW1), C) FadR'ın DNA bağlı modelinin şerit gösterimi (PDB code: 1HW2, 1HT9).



Şekil 3.51 : *B. subtilis* YvoA protein yapısının şerit gösterimi. A) Monomer yapı (PDB kodu: 2WV0'den sadeleştirilmiştir, B) 10 monomerlik yapı (PDB kodu: 2WV0).

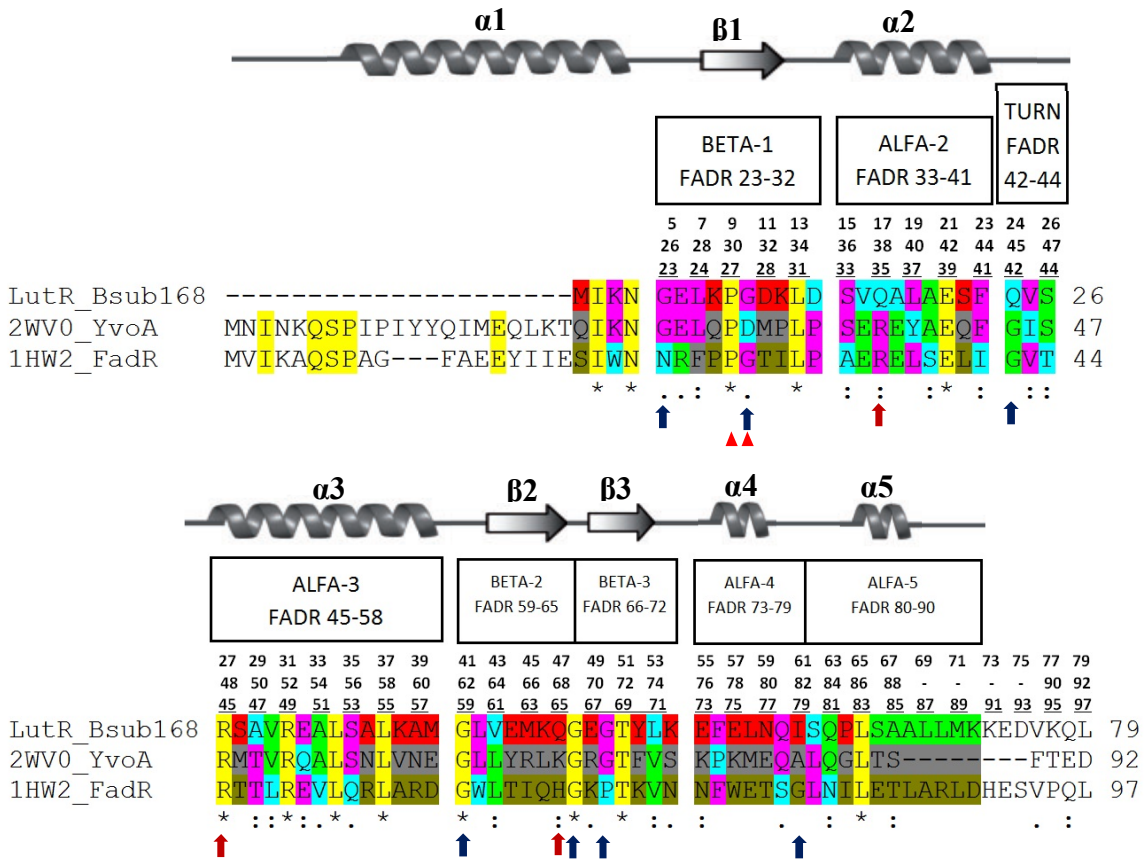
LutR proteininin FadR ve YvoA proteinlerinden başlıca farkı ilk α -helix yapısına sahip olmamasıdır (Şekil 3.51). Bu tarzdaki benzer bir farklılık VanR-benzeri ve FadR-benzeri proteinler arasında da görülmektedir. Çünkü VanR-benzeri regülatörler FadR-benzeri proteinlerden türevlenirler, fakat sadece α -helix yapısını kaybederler (Rigali et al. 2002).

3.7.2.1 Protein genel yapısındaki anahtar residülerin analizi

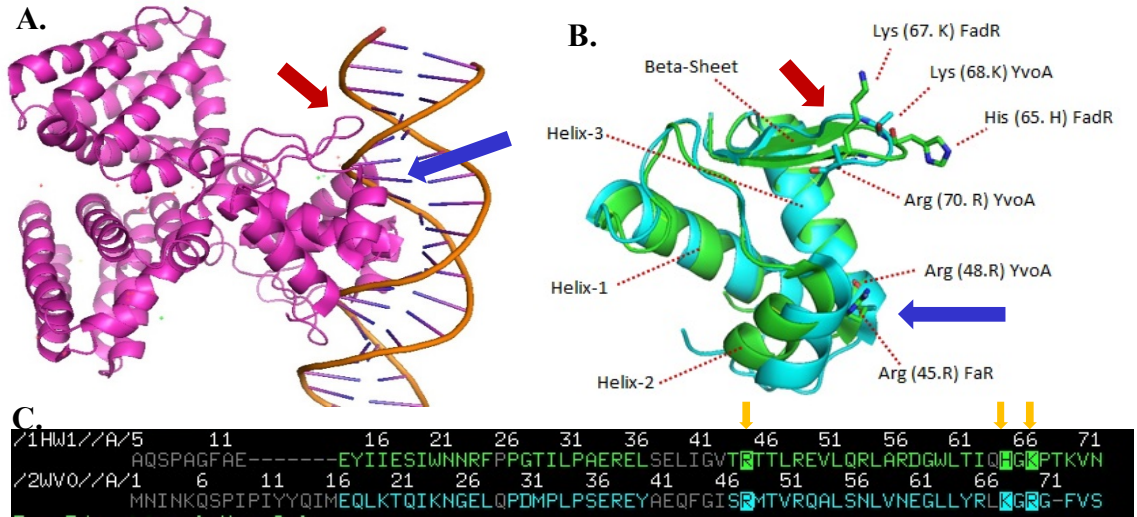
FadR proteininin, DNA üzerindeki operatör dizileri tanımda görevli olduğu belirlenen residüleri (FadR-R35-R45-H65), YvoA proteininde 2/3 oranında korunurken (YvoA-R38-R48-K65; Resch et al. 2010), LutR proteininde 1/3 oranında korunmuştur (LutR-Q17-R35-Q47; Şekil 3.51, kırmızı oklar ve Şekil 3.52). LutR

proteininde DNA bağlanma fonksiyonu için Arg, Lys ve His gibi pozitif yüklü amino asitleri tercih etmek yerine, FadR proteinindeki R35 ve H65 residülerine karşılık gelen Glu amino asitleri (LutR-Q-Q) tercih edilmiştir.

Glisin (Gly, G) yan zincirleri sadece hidrojen atomlarından oluştuğundan, kendisine bağlı olduğu komşu residüler için esneklik sağlayabilir (Najmanovich et al. 2000, Smith et al. 2005). Bu konformasyonel serbestliğe bağlı olarak, Gly residüleri proteinlerin yapısında ve fonksiyonlarında özel bir rol üstlenmektedir (Yan and Xu 1997). LutR proteininin N-terminalinde yer alan Gly residülerinin (G5, G10, G24, G41, G48, G50 ve G61) FadR ve YvoA proteinlerinde ileri derecede korunduğu belirlenmiştir (FadR-G28, G42, G59, 66G, 79G; YvoA-G26, G45, G62, G69, G71, G82) Şekil 3.51, mavi oklar ve Şekil 3.53).



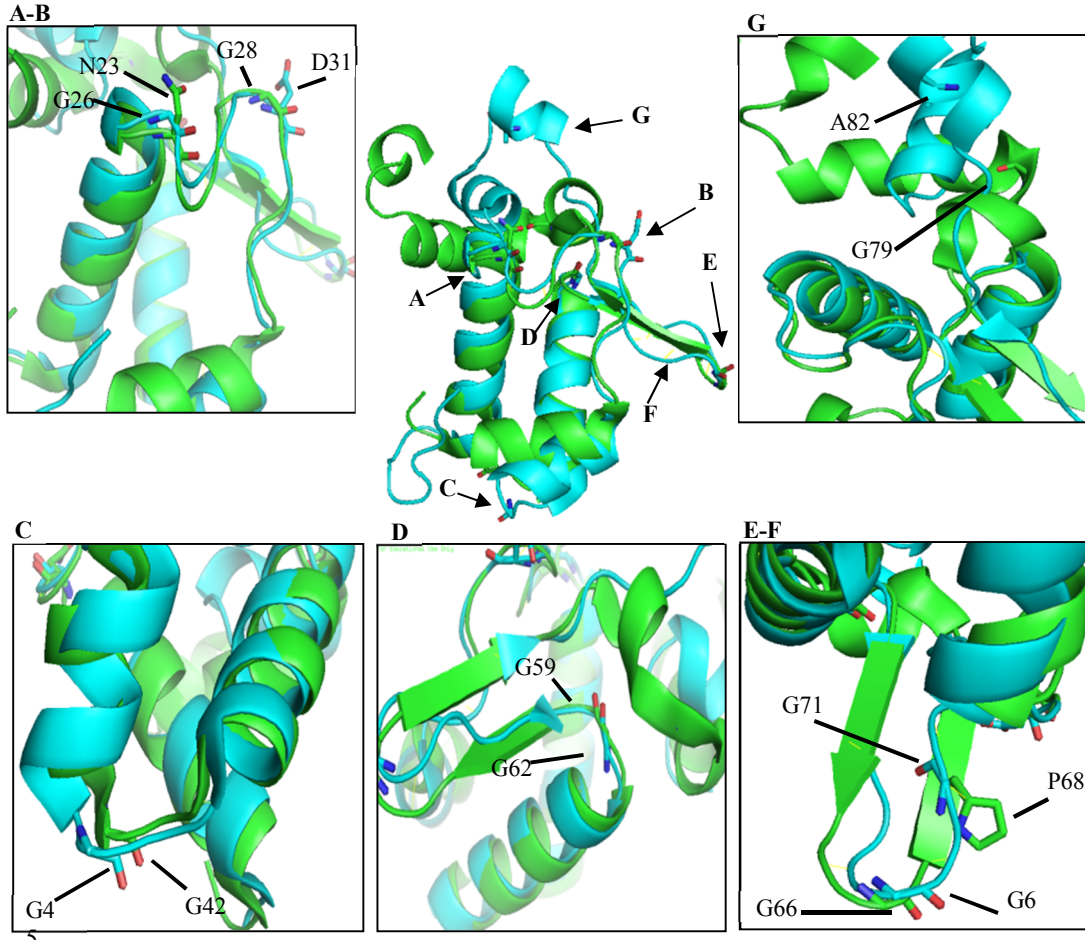
Şekil 3.52 : *B. subtilis* LutR, *B. subtilis* YvoA (PDB code: 1WV0) ve *E. coli* FadR (PDB code: 1HW2) proteinlerinin DNA bağlanma domainlerinin dizi hizalaması. Heliks ve oklarla gösterilen sekonder yapılar FadR protein yapısı referans alınarak hazırlanmıştır. LutR ile YvoA-FadR arasında korunmuş diziler farklı renk kombinasyonları ile gösterilmiştir: **Sarı**: Üç protein arasında korunmuş rezidüler, **Pembe-Turkuaz** ve **Yeşil-Turkuaz**: Sadece herhangi iki protein arasında korunmuş rezidüler, **Kırmızı-Gri-Kahverengi**: Üç proteinde de farklı olan, korunmamış rezidüler.



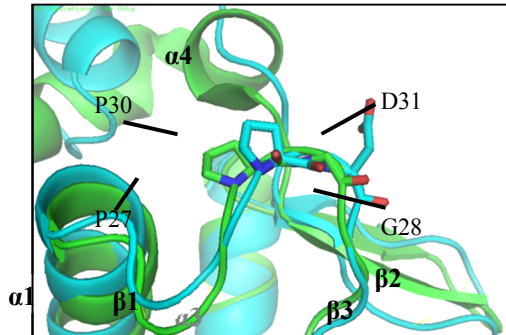
Şekil 3.53 : YvoA ve FadR proteinlerinin yapısal olarak hizalanmaları. YvoA ve FadR proteinlerinin yapısal olarak hizalanmaları. **A)** FadR-DNA kompleksinin 3D gösterimi (PDB ID: 1HW1), **B)** FadR (5-72. rezidüleri) ile YvoA (1-74. rezidüleri) arasında yapısal hizalama, **C)** Hizalamada kullanılan FadR ve YvoA protein dizileri. **Kırmızı ve Mavi Oklar:** A ve B kısımlarında birbirine karşılık gelen bölgeleri, **Sarı Oklar:** Kırmızı ve mavi oklarla gösterilen bölgelerdeki korunmuş rezidülerin protein dizisindeki konumları.

Yan ve Xu (1997) glisin amino asidinin prolin (Pro, P) residüsüne komşu olması durumunda söz konusu konformasyonel serbestliğin sınırlanacağını ve Gly-Pro ünitelerinin genellikle daha kararlı konformasyonlar oluşturacağını ileri sürmüştür. Pro ve Gly residülerinin bu tip komşulukları FadR (P27-G28) proteininin β 1-zincirinden oluşan büyük ilmeğinde görüldüğü gibi LutR (P9-G10) protein dizisinde de görülmektedir (Şekil 3.51, kırmızı üçgenler ($\blacktriangle$); Şekil 3.54). Bu Gly-Pro residüleri LutR proteininin C-terminal ve N-terminal bölgeleri arasındaki iletişimde anahtar rol oynayabilir ve bu sayede protein stabilitesini sağlayabilir. Glisin residülerinin pozisyonlarına bakıldığında protein yapısında, yapısal esneklikte üstlendikleri role uygun noktalarda bulundukları belirlenmiştir. Çünkü hem FadR hem de YvoA proteinlerindeki Gly residüleri α -heliks ve β -zincir arasındaki değişim noktalarında yer almaktadır. Örneğin, FadR proteininde G10 rezidüsü α -helix-1 içinde yer alırken; G28 rezidüsü α -heliks-1 ile α -heliks-2'nin ortasında, G42 rezidüsü α -heliks-2 ile α -heliks-3'ün arasındaki HTH motifine ait ilk H ile T arasında tam sınırdadır; G59 rezidüsü α 3 ile β 2 arasında α -heliksin bittiği, β -zincirin başladığı noktada; G66 rezidüsü hedef DNA dizisinde küçük oluğa denk gelen β 1- β 2 arasındaki dönme noktasında yer alır (Şekil 3.51, mavi oklar ve Şekil 3.53). Bu pozisyonların YvoA proteinindeki Gly residülerinde de benzer olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca Gly rezidülerine ait bu pozisyonların LutR proteininin 3D yapısında da benzer olması beklenmektedir.



Şekil 3.54 : FadR ve YvoA proteinlerinin N-terminal bölgelerinde korunmuş Glisin rezidüleri. Bütün korunmuş glisin rezidüleri FadR ve YvoA'nın yapısal hizalama sonuçlarında (ortadaki resim) gösterilmiş ve önemli noktalar ayrı ayrı büyütülerek (A-B-C-D-E-F) gösterilmiştir.

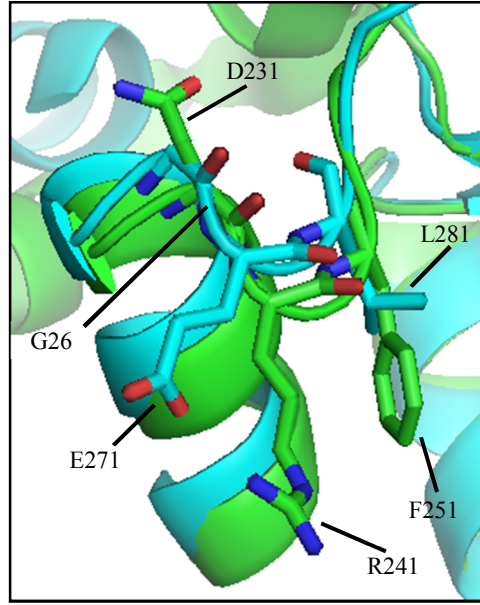


Şekil 3.55 : FadR (P27-G28) ve YvoA (P30-D31) proteinlerindeki glisin-prolin komşuluklarının karşılaştırılması. LutR proteininde de benzer komşuluk (P9-G10) görülmektedir.

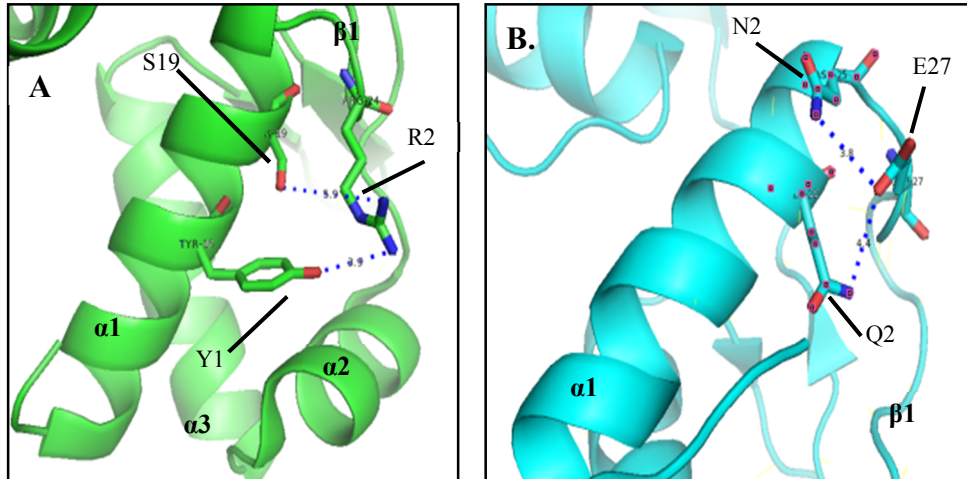
3.7.2.2 β -zinciri-1 analizi

β -zinciri-1 LutR, YvoA ve FadR olmak üzere üç proteinde de bulunmaktadır. YvoA-G26 rezidüsü, $\alpha 1$ ile $\beta 1$ arasındaki sınırda yer alır. İlk üç rezidü (YvoA-G26-E27-L28) sadece YvoA ve LutR arasında korunmuştur (Şekil 3.55). FadR proteininde aynı pozisyonlarda farklı residüler (FadR-N23-R24-F25) bulunmaktadır. Fakat bu residüler fizikokimyasal özellikleri açısından benzerdir: Glu ve Arg yüklü amino asitlerdir, fakat Glu negatif, Arg pozitif yüklüdür. FadR-R24 rezidüsünün, polar yüksüz FadR-Y15 ve FadR-S19 rezidülerinin hidroksil (-OH) gruplarına karşılık gelirken, YvoA-E27 rezidüsü polar yüksüz YvoA-N25 ve YvoA-Q22 rezidülerinin amin (-NH₂) gruplarına karşılık gelmesi önemli bir benzerliktir (Şekil 3.56). Phe, bir aromatik amino asit olmasına rağmen, Leu ve Phe amino asitleri hidrofobik yan zinciri olan apolar amino asitlerdir ve her ikisi de proteinlerin iç kısımlarına doğru konumlanmaktadır.

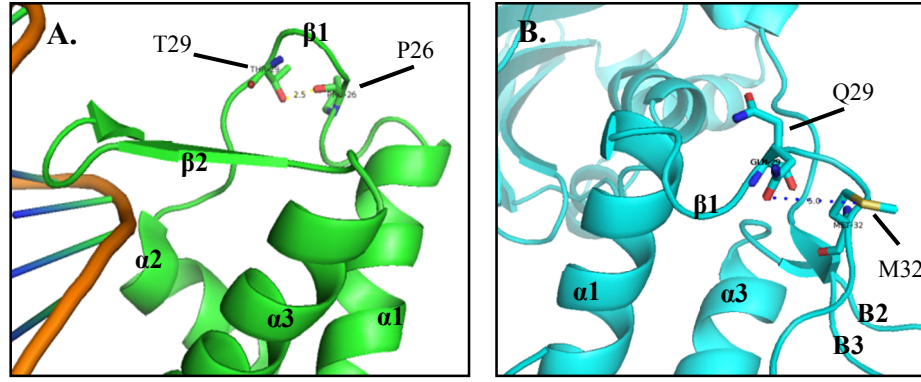
Önemli olabilecek diğer bir durum da FadR proteininin β -zincir-1 segmentinde üç Pro (P26-27-32), YvoA proteininde iki Pro (27, 32), LutR proteininde de ise bir tane Pro (P9) rezidüsünün bulunmasıdır (Şekil 3.51). FadR proteininde P26 rezidüsünün karboksi-O atomu ile T29 rezidüsünün hidroksil grubu arasında 2.5 Å'lık bir mesafe bulunmaktadır. Bu yakınlık P26 ile T29 arasında bir hidrojen bağı oluşumunu sağlayabilir ve bu etkileşim protein stabilitesini arttırabilir. YvoA proteinin yapısında benzer bir durum Q29 ile M32 arasında görülmektedir. LutR proteinde de K8 ile D11 rezidülerinin benzer bir bağlantı oluşturduklarını söylemek mantıklı görünmektedir (Şekil 3.57). Korunmuş FadR-P27 rezidüsü α -Helix-1'den α -Helix-2'ye geçiş yönünde β -zincir-1 segmentinin tam kıvrılma noktasında yer alır. FadR-P27 rezidüsü G28 tarafından takip edilir ve bu komşuluk durumu LutR proteininde de aynıdır (LutR-P9-G10). PPG motifi β -zinciri için daha rijit bir yapı sağlayabilir (Şekil 3.54).



Şekil 3.56 : YvoA ve FadR protein dizilerindeki ilk üç rezidünün karşılaştırılması. İlk üç rezidü sadece LutR (G5-E6-L7) ve YvoA (G26-E27-L28) proteinleri arasında korunmuşken FadR (N23-R24-F25) proteininde tamamen farklıdır.

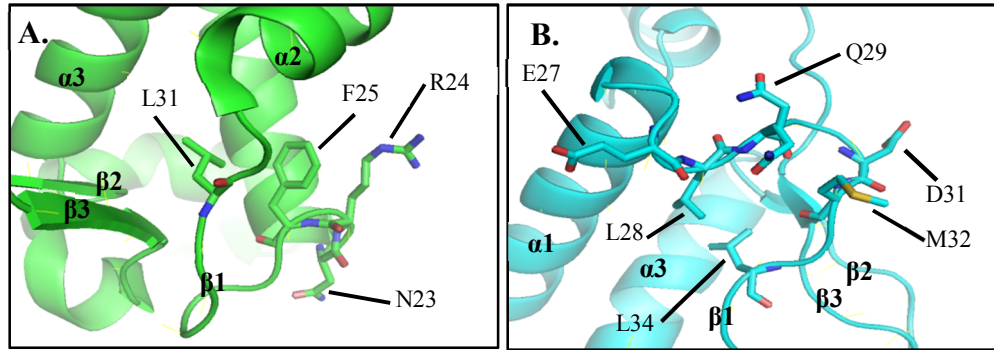


Şekil 3.57 : FadR-R24 ve YvoA-E27 rezidülerinin karşılaştırılması. A) FadR proteininde pozitif yüklü Arg (R24), α -heliks-1 yapısında yer alan ve hidroksil (OH-) grubu taşıyan serin (S19) ve tirozin (Y15) rezidülerine karşılık gelmektedir B) YvoA proteininde negatif yüklü glutamik asit (E27) rezidüsü α -heliks-1 yapısında yer alan ve amin (NH₂-) grubu taşıyan polar yüksüz asparajin (N25) ve glutamin (Q22) rezidülerine karşılık gelmektedir.



Şekil 3.58 : FadR proteininde P26-T29 rezidüleri ile YvoA proteininde Q29-M32 rezidülerinin karşılaştırılması. **A)** FadR proteininde P26 ile T29 arasındaki mesafe 2.5 Å'dur. **B)** YvoA proteininde, Q29 ve M32 rezidüleri benzer pozisyonlarda ve 5.0 Å mesafede konumlanmıştır.

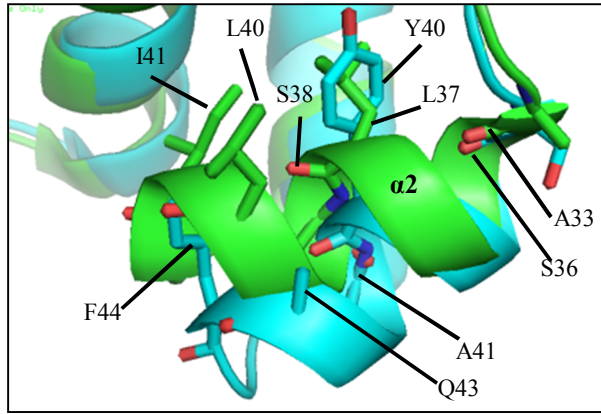
FadR-F25-L31 rezidülerinin yan zincirleri proteinin merkezine doğru yönelmiş pozisyonadadır. Fakat FadR-N23-R24 rezidüleri proteinin dış kısmına doğru yönelmiştir. Bu durum YvoA proteininde de benzerdir. Çünkü YvoA-L28-L34 apolar hidrofobik rezidüleri YvoA'nın merkezine doğru yönelirken, yüklü ve polar rezidüler YvoA-E27-Q29-D31-M32 proteinin dış kısmına doğru yönelmiştir. LutR proteinde de benzer şekilde E6, K8, D11, K12, D13 rezidülerinin protein dış yüzeyine doğru, L7 ve L3 rezidülerinin ise merkeze doğru yönelmesi ön görülmektedir (Şekil 3.58).



Şekil 3.59 : FadR ve YvoA proteinlerinde β -zincir-1 yapılarında bulunan bazı rezidülerin proteinin iç dış kısmına doğru yönelme durumlarının karşılaştırılması. **A)** FadR proteininde N23-R24-F25-P27-G28-L31 rezidüleri. **B)** YvoA proteininde Q20-E27-L28-D31-M32-L34. Altı çizgili ve koyu harfle yazılan rezidüler proteinin iç kısmına doğru yönelmektedir. Normal punto ile yazılan rezidüler proteinin dış kısmına doğru yönelmektedir.

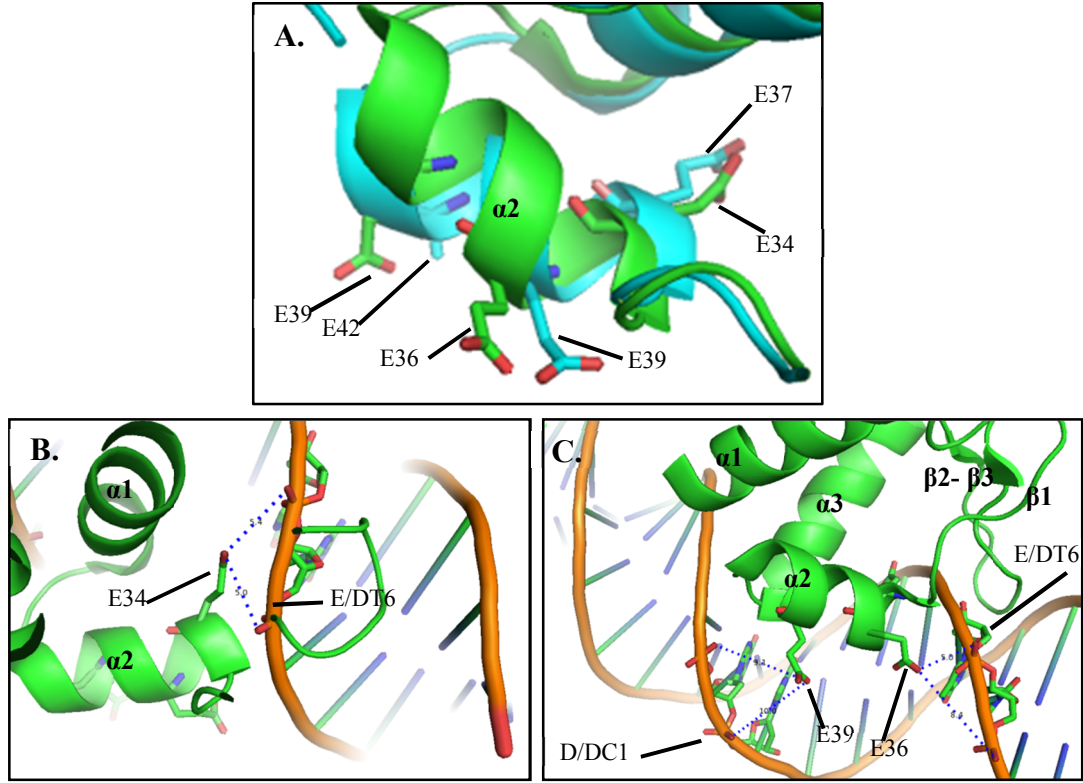
3.7.2.3 α -helix-2 segmentinin analizi

FadR proteininin α -helix-2 yapısındaki A33-L37-S38-L40-I41 apolar hidrofobik residüleri YvoA (S36-Y40-A41-Q43-F44) ve LutR (S15-L19-A20-S22-F23) proteinlerindeki residülerden farklılık göstermektedir (Şekil 3.51 ve Şekil 3.59). YvoA-S36-A41-F44 residüleri LutR proteininde korunmuştur (LutR-S15-A20-F23). FadR proteini de Ala ve Ser residülerine (FadR-A33-S38) sahiptir fakat bunların sıralanmaları YvoA proteinindeki S15-A20 residülerine göre terstir (Şekil 3.51). FadR-I41 residüsü YvoA proteinindeki F44 ve LutR proteinindeki F23 ile benzerdir, çünkü üçü de apolar hidrofobik amino asitlerdir. FadR proteinindeki R35 residüsü ise YvoA proteininde aynıdır (YvoA-R38), fakat LutR proteininde aynı değildir (LutR-Q17).



Şekil 3.60 : FadR (yeşil) and YvoA (turkuaz) proteinlerinde α -helix-2 yapısındaki bazı residülerin karşılaştırılması. Şekilde FadR proteinine ait A33-L37-S38-L40-I41 residüleri ile YvoA proteinine ait S36-Y40-A41-Q43-F44 residüleri görülmektedir.

FadR-R35 residüsü DNA'nın tanınmasında kritik residü olduğu için, bu amino asite komşu olan amino asitler de DNA bağlanma sürecinde önemli olabilir. FadR ve YvoA proteinlerinde sırasıyla R35 ve R38 residüsüne komşu olan residüler "ERE" motifi oluşturan negatif yüklü FadR-E34-E36 ve YvoA-E37-E39 iken, LutR proteinindeki kritik residü Q17'ye komşu olarak V16 ve A18 bulunmaktadır. Bu Glu (E) residüleri DNA'nın en yakın fosfat gruplarına 5.0 Å uzaklıkta bulunmaktadır ve hidrojen bağı oluşturarak protein kararlılığını arttırmaları mümkün görünmektedir. FadR-E39 residüsü üç proteinde de korunmuştur (YvoA-E42 ve LutR-E21) (Şekil 3.51). FadR-E39 residüsü ile en yakın DNA fosfat grubu arasındaki mesafe 9.1 Å olduğundan, bu residünün rolü net olarak yorumlanamamaktadır (Şekil 3.60).

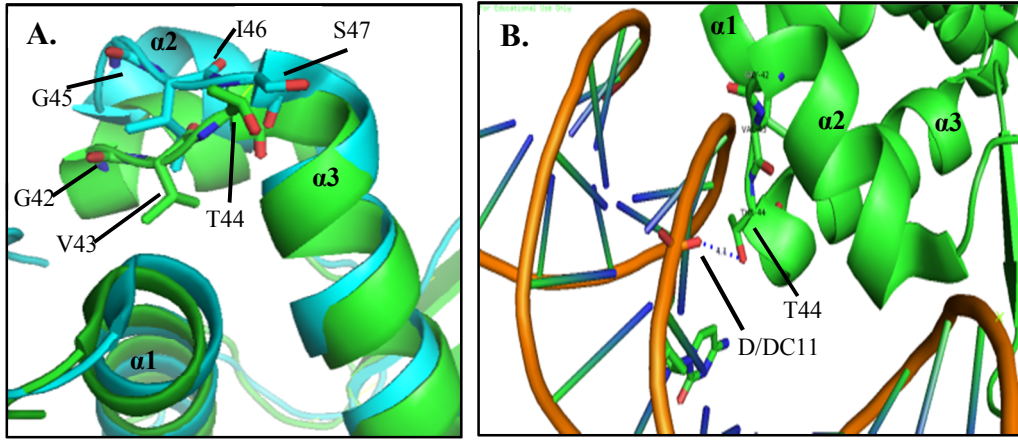


Şekil 3.61 : FadR ve YvoA proteinlerinin α -helix-2 yapılarında bulunan bazı rezidülerin karşılaştırılması. **A)** FadR proteinine ait E34-E36-E39 rezidüleri ile YvoA proteinine ait E37-E39-E42 rezidülerinin yapısal karşılaştırılması. **B)** FadR-E34 rezidüsü ile DNA'ya ait E/DT6 nükleotidi arasındaki mesafe 5.0 Å'dir. **C)** FadR proteini ile DNA arasındaki mesafe E39 ile D/DC11 arasında 9.1 Å, E36 ile E/DT6 arasında 5.0 Å'dur. "D/" ve "E/" DNA'nın tek zincirlerinden birini ifade etmektedir. DC11 veya DT6'daki "D" ise "deoksiriboz nükleotit" yapısını işaret etmektedir.

3.7.2.4 HTH motifinin "Döngü (Turn)" kısmının analizi

Üç proteindeki HTH motiflerinin "döngü (turn)" segmentleri üç rezidüden oluşmaktadır. Birinci pozisyonda FadR ve YvoA proteinlerinde Gly rezidüleri yer alırken (sırasıyla G42 ve G45), LutR proteini polar amino asit Q24 içermektedir. İkinci pozisyonda, üç protein de apolar, hidrofobik özellikte bir rezidü içermektedir: FadR-V43, LutR-V25 ve YvoA-I46. Üçüncü pozisyonda ise polar yüksüz rezidüler yer almaktadır. YvoA ve LutR proteinlerinde birer serin rezidüsü bulunurken (sırasıyla S47 ve S26), FadR proteininde bir treonin amino asidi (T44) bulunmaktadır (Şekil 3.61-A). FadR-T44 rezidüsü D/DC11 bazının fosfat grubuna 4.1 Å uzaklıktadır. Bu durumda T44 ile D/DC11 bazı arasında hidrojen bağı oluşumundan bahsetmek mümkündür (Şekil 3.61-B). Çünkü, FadR, YvoA ve LutR proteinlerinin

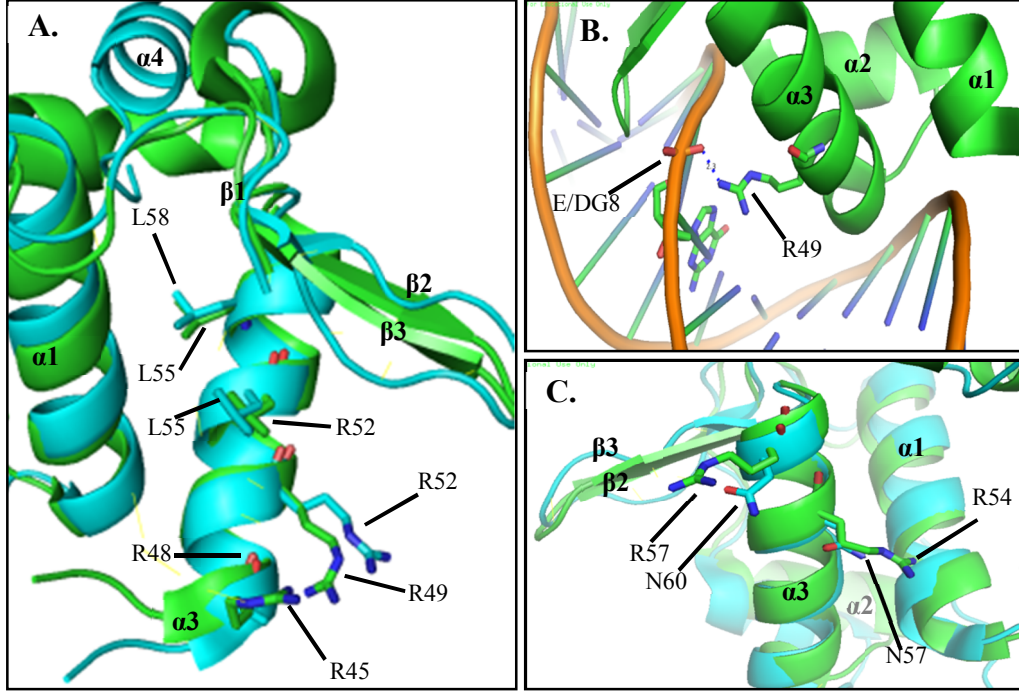
bu pozisyonlarındaki rezidüleri tamamen aynı olmasa bile, üç proteinde de hidroksil grubu (-OH) taşıyan rezidüler yer almaktadır.



Şekil 3.62 : FadR ve YvoA proteinlerindeki HTH motifinde üç rezidüden oluşan “döngü (turn)” segmentinin yapısal hizalanması. **A)** Döngünün birinci pozisyonlarının iki proteinde korunmuş olduğu (FadR-G43 ve YvoA-G45) görülmektedir. İkinci ve üçüncü pozisyonlar birbirlerinden farklılık göstermektedir. Ancak bu pozisyondaki rezidülerin önemli bir benzerlikleri de vardır: İkinci pozisyondaki rezidüler (FadR-V43 and YvoA-I46) apolar hidrofobik iken, üçüncü pozisyondaki rezidüler (FadR-T44 and YvoA-S47) polar-yüksüz ve hidroksil taşıyan rezidülerdir. **B)** FadR-T44 rezidüsü DNA’nın D/DC11 nükleotit yapısındaki fosfat grubuna 4.1 Å uzaklıktadır.

3.7.2.5 α-helix-3 segmentinin analizi

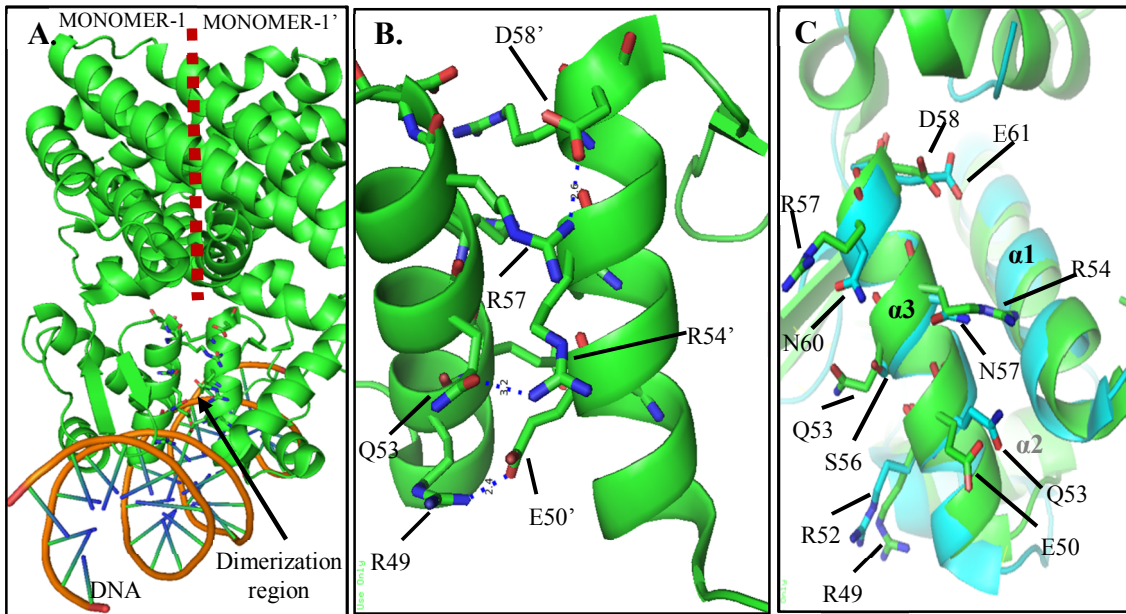
α-heliks-3 segmentinde FadR, YvoA ve LutR arasında korunmuş dört rezidü bulunmaktadır: FadR-R45-R49-L52-L55 (Şekil 3.62-A). FadR-R45 rezidüsü DNA tanıma işleminden sorumlu üç rezidüden ikincisidir ve DNA’daki büyük oluğa karşılık gelecek şekilde konumlanmaktadır. FadR-R49 rezidüsü DNA fosfat grubu ile tuz köprüsü oluşturmak için uygun bir mesafede (2.3 Å) bulunmaktadır (Şekil 3.62-B). FadR-L48 ve V51 rezidüleri YvoA (V51-A54) ve LutR (V30-A33) proteinlerindeki Val ve Ala rezidüleri ile aynı kabul edilebilir. Çünkü bu amino asitler benzer fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Şekil 3.51). FadR proteininin 50. pozisyonunda, FadR ve LutR arasında glutamik asitler korunmuşken (sırasıyla E50 ve E32), YvoA proteini glutamik asitin bir amid formu olan glutamin amino asidi (Q53) içermektedir (Şekil 3.51).



Şekil 3.63 : FadR ve YvoA proteinlerinde α -helix-3 segmentinin yapısal hizalaması. **A)** FadR (yeşil, R45-R49-L52-L55) ve YvoA (turkuaz, R48-R52-L55-L58) proteinlerinde dört rezidü korunmuştur. [Not: α -helix-3 segmentini net göstermek amacıyla α -helix-2 segmenti gizlenmiştir.], **B)** FadR-R49 rezidüsü ile DNA E/DG8 rezidüsüne ait fosfat grubu arasındaki mesafe 2.3 Å'dur, **C)** FadR proteininin 54. Ve 57. pozisyonlarında bir duplikasyon görülmektedir (R54 and R57). Bu tekrarlı pozisyonlar iki adet apolar hidrofobik rezidü içermektedir (metne bakınız). Bu pozisyonlar YvoA (N57-N60) ve LutR (A30-A33) proteinlerinde de benzerdir.

Önemli noktalardan biri de FadR proteinindeki R54 ve R57 rezidüleri ile ilgilidir. Çünkü bu ikili tekrarlı pozisyonun arasında iki apolar rezidü (FadR-L55-A56) yer almaktadır ve bu rezidüler her iki monomerde simetrik olarak α -heliks-3 segmentinin dimerizasyon bölgesine (R49-E50-Q53-R54-R57-D58) karşılık gelmektedir (Şekil 3.62-C). Bu dublikasyon, YvoA (N57-L58-A59-N60) ve LutR (A30-L31-K32-A33) proteinlerinde de benzerdir. Fakat LutR proteini negatif veya pozitif yüklü rezidüler yerine apolar Ala rezidülerini (LutR-A36-A39) içermektedir. FadR'daki Arg (R) amino asidi ile YvoA'daki Glu (N) amino asidi iki monomeri dimer olarak bir arada tutma potansiyeline sahiptir. Xu ve ark. (2001) simetri analizlerine dayanarak dimerizasyon oluşumunda etkileşime giren rezidülerin Arg49, Arg54', Arg57, Glu-50', Gln-53, ve Asp-58' (Şekil 3.63-A-B) olduğunu ileri sürmüştür. YvoA proteini de hemen hemen benzer bir amino asit kombinasyonu içermektedir (R52-Q53-S56-N57-N60-E61) (Şekil 3.63-C). LutR proteininde bu

bölgeye karşılık gelen R31-E32-S35-A36-A39-M40 rezidüleri aynı dimerizasyon işlemi için pek uygun görünmedikleri için, LutR proteininde monomerleri bir arada tutmak ve dimer oluşturmak için farklı olasılıkların ileri sürülmesi gerekmektedir. Bu fonksiyona yönelik ihtimallerden biri iki monomerin uygun mesafede yan yana gelmesi ve Ala rezidülerinin hidrofobik etkileşimler ve van der Waals etkileşimleriyle dimer oluşturması olabilir. Diğer ihtimal ise LutR proteininin iki monomerindeki S35-K38-M40 rezidülerinin yan zincirleri birbirleri ile hidrojen bağı ve iyonik bağ için uygun mesafede konumlanmasıdır. Buna bağlı olarak dimer oluşturmaları söz konusu olabilir.



Şekil 3.64 : FadR proteininde dimerizasyon bölgesinin şerit gösterimi ve bu bölgenin FadR ve YvoA proteinleri arasında yapısal hizalaması. **A)** FadR proteininin dimer formuna ait DNA bağlanma modelinde dimerizasyon bölgesi. **B)** Dimerizasyon bölgesine detaylı görünümü ve dimerizasyonu sağlayan rezidüler: R49-E50'-Q53-R54'-R57-D58'. Dimerin sadece şekilde görünen kısmındaki rezidüler etiketlenmiştir. Rezidü numaralarındaki kesme (') işareti monomerleri ayırt etmek için kullanılmıştır. **C)** YvoA (R52-Q53-S56-N57-N60-E61) dimerizasyon rezidüleri ile FadR R49-R54'-R57-E50'-Q53-D58' rezidülerinin yapısal hizalaması.

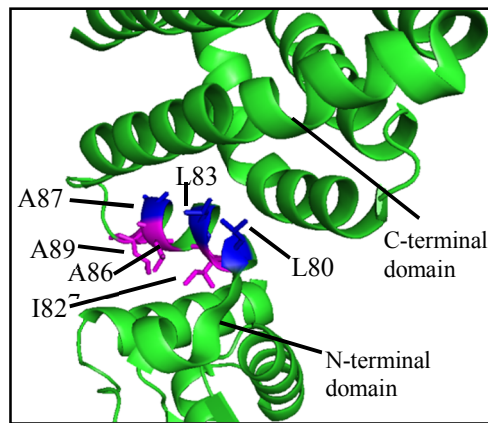
3.8.2.6 β -Zincir-2 ve β -Zincir-3 segmentlerinin analizi

FadR proteinindeki N-terminal β -tabaka (β 2- β 3) yapısında, FadR-G59-G66-T69 rezidüleri korunmuştur. FadR'ın DNA tanımda görevli üçüncü amino asidi H65, hem YvoA hem de LutR proteinlerinde korunmamıştır (YvoA-K68, LutR-Q47)

(Şekil 3.51-3.52). FadR-His65 rezidüsü DNA küçük oluşuna denk gelmektedir. FadR-G66 rezidüsü β -1 ile β -2 arasındaki sınırda dönme noktasında yerini alır ve pozitif yüklü iki rezidüye (H65 ve R67) komşudur. FadR proteinine benzer şekilde, YvoA proteininde de G69 rezidüsü iki tane pozitif yüklü rezidünün (K68 ve R70) arasında yer alır. Fakat LutR proteinindeki durum biraz farklılık göstermektedir ve LutR-G48 rezidüsü polar yüksüz bir aminoasit ile negatif yüklü ikinci bir amino asit (Q47 ve E49) arasında konumlanmıştır (Şekil 3.51-3.53). Üç protein de, FadR proteinine göre 61., 68. ve 71. pozisyonlarda benzerdir çünkü Leu ve Val amino asitleri apolar yan zincir taşır. Ayrıca LutR proteinindeki V43 ve L53 rezidülerinin FadR ve YvoA proteinlerine göre ters sıralı olması da fonksiyonel açıdan önemli bir benzerlik olabilir (FadR-L61-V71; YvoA-L64-V74) (Şekil 3.51).

3.7.2.6 α -helix-4 ve α -helix-5 segmentlerinin analizi

FadR proteininin N-terminal ve C-terminal domainleri birbirlerine iki kısa α -heliks (α -4 ve α -5) içeren bir bağlantı bölgesi ile bağlıdır (Xu et al., 2001). Xu ve ark. (2001) iki komşu domainle α -heliks-5 arasında geniş ve korunmuş hidrofobik ara yüzeylerin bulunması nedeniyle α -5 segmentinin domainler arası iletişimde anahtar rolü üstlendiğini ileri sürmüştür. Bu araştırmacılar I82-L86-L89 rezidülerinin özellikle N-terminal domainle, L80-L83-A87 rezidülerinin ise C-terminal domainiyle etkileşim halinde olduğunu göstermiştir (Şekil 3.64). FadR-L86-L89-I82 rezidüleri YvoA ve LutR proteinlerinde korunmamıştır. Fakat L83 üç proteinde korunurken, FadR-L80 sadece YvoA'da korunmuş, LutR'da (S62) korunmamıştır (Şekil 3.51).



Şekil 3.65 : FadR proteininin iki domaini arasında geçiş bölgesinde yer alan α -heliks-5 segmenti. Bu segmentin bazı rezidüleri (I82-L86-L89) N-terminal domainiyle etkileşim halindeyken, bazı rezidüleri (L80-L83-A87) içinde C-terminal domainiyle etkileşim halindedir.

3.7.3 LutR proteininin DNA tanıma özellikleri

LutR'ın sekonder yapısına yönelik analizlerde, DNA'nın tanınmasında kritik olan rezidülerin (LutR-Q17-R27-Q47) diğer iki proteinle tamamen aynı olmadığını görülmüştür (FadR-R35-R45-H65 ve YvoA-R38-R48-K68). Bu üç proteinin N-terminal primer yapıları ileri düzeyde birbirlerine benzer olmamasına rağmen (Çizelge 3.21) sekonder yapıları, amino asit pozisyonları ve tipleri açısından önemli birçok benzerliğe sahiptir. DNA-bağlanma sürecindeki rollerine bağlı olarak, protein yapısındaki amino asitler DNA bazlarıyla veya DNA'nın fosfat gruplarıyla ya da proteinin kendi yapısındaki diğer amino asitlerle etkileşim kurabilirler (Suzuki et al. 1995). Bu açıdan, DNA-protein etkileşimlerinde (tanıma/bağlanma süreçlerinde) sadece DNA'ya bağlanan rezidüler değil protein yapısındaki diğer rezidüler de dikkate alınmalıdır. FadR proteininde bir monomerdeki R49-E50-Q53-R54-R57-D58 rezidüleri diğer monomerde karşılık gelen rezidülerle etkileşir. Bu etkileşimler DNA'ya bağlanma sürecinde kritik rol üstlenen FadR-R35-R45-H65 rezidülerininki kadar önemlidir.

Her protein familyası DNA'ya bağlanmak amacıyla kimyasal ve stereokimyasal olarak kendileri için özgün olan farklı geometrileri tercih etmektedir. “HTH-tip protein” olarak adlandırılmalarına rağmen sadece “turn” kısmının uzunluğu veya anahtar rezidüle komşu olan rezidülerin çeşidi bile bağlanma olasılıkları açısından birçok seçenek doğurmaktadır. HTH-tip transkripsiyon faktörlerinde genel olarak görüldüğü gibi FadR, YvoA ve LutR proteinlerinde de üç amino asitlik bir “turn” segmenti bulunmaktadır ve FadR proteinine göre 35. pozisyonundaki rezidülerin komşuları da aynıdır: FadR-35 rezidüsünün komşuları E34-E36; YvoA-R38 rezidüsünün komşuları E37-E39.

Xu ve ark. (2001) FadR-DNA komplekslerinin kristal yapı analizlerini dikkate alarak FadR transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA bölgesi için korunmuş 5'-TGGTNNNACCA-3' dizisini önermiştir. Buna göre, FadR proteininin R35, R45 ve H65 rezidüleri DNA üzerinde sırasıyla Guanine(W)-Guanine(W)-Adenine(C) bazlarına bağlanmaktadır [Not: Xu ve ark. (2001)'na göre “Watson” isminin ilk harfi olan “W” DNA'nın bir zincirini temsil ederken, “Crick” isminin ilk harfi olan “C” ise DNA'nın diğer zincirini ifade etmektedir].

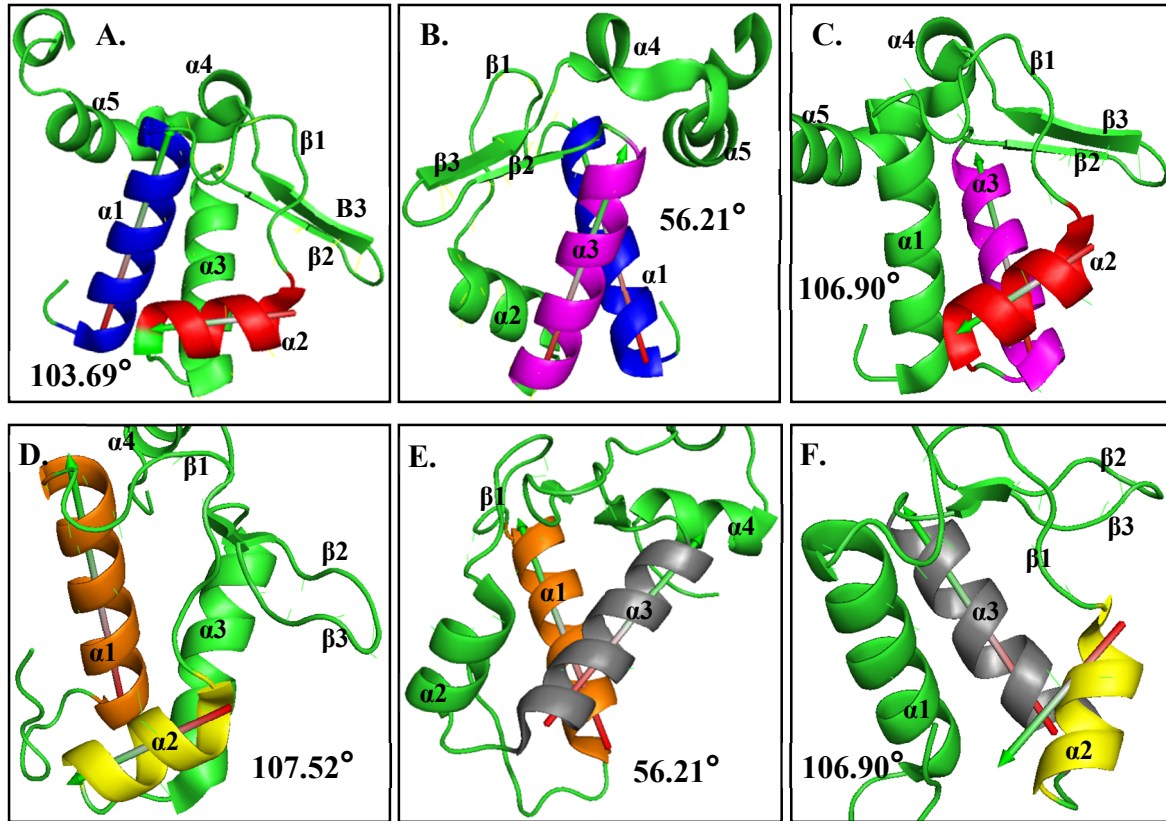
α -helix-2 “tanıma heliksi” olarak tanımlandığından, LutR proteininin ikinci heliksi (15-SVQALAESF-23) DNA’ya bağlanma açısından önemli görünmektedir. Bu dizide, DNA’yı tanımada anahtar rol oynayan üç rezidüden sadece biri (Q17) bulunmakta ve sekonder yapıda FadR-R35 ile YvoA-R38 rezidülerine karşılık gelmektedir. “Bağlanma geometrisi”ni belirleyen faktörlerden biri DNA ile protein yüzeylerinin tam olarak birbirine uyumlu olmasıdır. Bu nedenle LutR α -helix-2 segmenti FadR ve YvoA proteinlerinde olduğu gibi DNA’nın büyük oluğuna karşılık gelmelidir. DNA-protein etkileşimini belirleyen diğer faktör protein yapısındaki amino asitlerle DNA yapısındaki bazların pozisyonlarının uygun bir şekilde eşleşmesidir. Tek bir tanıma heliksi DNA’nın sadece bir tarafına erişebilir ve ardışık beş veya daha az (genellikle dört) baz çiftine bağlanabilir. α -heliks segmentleri yapısal olarak düz olduğu için kıvrılmış büyük oluk etrafındaki DNA bazlarından daha fazlasının proteinle etkileşime girmesi pek mümkün değildir (Suzuki et al. 1995). Diğer yandan, FadR proteini diğer HTH-tip transkripsiyon faktörlerinde görülen klasik DNA bağlanma tarzını kullanmamaktadır: Normal şartlarda HTH motifinin ikinci tanıma heliksi DNA’nın büyük oluğu boyunca DNA’ya bağlanırken, β -şeridi ise hemen komşu bölgedeki küçük oluğa bağlanır. Ancak FadR proteini bundan farklı bir yol izleyerek α -3 tanıma heliksinin sadece N-terminal ucu ile DNA büyük oluğuna bağlanır ve DNA üzerinde 90°’lik bir bükülme oluşturmaz (Xu et al. 2001). Ayrıca HTH-tip proteinlerin sınıflandırılmasında α/β kompozisyonu ve heliksler arasındaki açılar önemli kriterlerdir (Clubb et al. 1994). Örneğin bir HTH-tip protein sınıfı H1-B1-B2-H2-T-H3-B3-W-B4 topolojisine sahip olup gen aktivatör protein (CAP) ve ısı şoku transkripsiyon faktörlerini içerir (Harrison et al. 1994). Bu sınıfa yakın olan diğer bir sınıf H1-B1-H2-T-H3-B2-W-B3 topolojisine sahiptir ve histon H5 (Ramakrishnan et al. 1993), biotin represörü (Wilson et al. 1992) ve hepatosit nüclear faktör HNF-3/fork head protein üyelerini bünyesinde barındırır (Clark et al. 1993, Lai et al. 1993). Her iki sınıfta da HTH motifi α -H2 and α -H3 helikslerinden oluşur ve bu heliksler arasındaki açılar 90°-120° arasında değişmektedir. Ancak HTH motifinin α -H1 heliksinin ilk helikse (α -H2) göre pozisyonu iki sınıfta da korunmuştur ve α -H1 ile α -H2 arasındaki açı $\sim 45^\circ$ ’dir (Clubb et al. 1994). LutR proteini de N-terminal domaininde α -helix-1 hariç FadR ve YvoA ile benzer bir topolojiye sahiptir: $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ -T- $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$. FadR ve YvoA proteinlerinin α -helix-1, α -helix-2 ve α -helix-3 segmentleri arasındaki açılar Çizelge 3.24’de verilmiştir. Hem FadR hem de YvoA proteinlerinde $\alpha H1$ - $\alpha H3$ (56.21°) and $\alpha H2$ - $\alpha H3$

(106.90°) segmentleri arasındaki açılar aynı iken α H1- α H2 segmentleri arasındaki açılar farklılık göstermektedir (FadR 103.69°; YvoA 107.52°) (Şekil 3.65). Bu açılar arasındaki benzerlikler veya farklılıklar DNA-protein etkileşimlerini belirlemek açısından önemlidir.

Çizelge 3.19 : FadR ve YvoA proteinlerinde α -heliks segmentleri arasındaki açılar(°).

		<i>Heliksler arasındaki açı (°)</i>	
<i>Heliksler</i>		<i>FadR</i>	<i>YvoA</i>
α -heliks-1	α -heliks-2	103.69	107.52
α -heliks-1	α -heliks-3	56.21	56.21
α -heliks-2	α -heliks-3	106.90	106.90

Daha önce değinildiği gibi, benzer amino asitler benzer motifleri oluştururken, benzer motifler DNA üzerinde benzer bölgelerle etkileşim gösterir.



Şekil 3.66 : FadR (A,B ve C) ve YvoA (D, E ve G) proteinlerinde α -heliks segmentleri arasındaki açılar. **A)** FadR α 1- α 2: 103.69°, **B)** FadR α 1- α 3: 56.21° , **C)** FadR α 2- α 3: 106.90°, **D)** YvoA α 1- α 2: 107.52°, **E)** YvoA α 1- α 3: 56.21°, **F)** YvoA α 2- α 3: 106.90°. Mavi: FadR α Heliks1, Kırmızı: FadR α Heliks2, Pembe: FadR α Heliks3, Turuncu: YvoA α Heliks1, Sarı: YvoA α Heliks2, Gri: YvoA α Heliks3.

Fakat bununla beraber protein oluşturan amino asitlerin ve DNA'yı oluşturan bazların da uygun bir şekilde bir araya gelmeleri gerekmektedir ki bu etkileşimler de DNA ve proteinin uygun birer geometriye sahip olmaları ile mümkün olur. Tanıma ve baēlanmayı saēlayacak DNA'nın uygun geometrisi DNA zerindeki bazı eēilme-bklmelerle, proteinlerin uygun geometrisi ise heliksler arasındaki aēıların belirlenmesi ve FadR-YvoA proteinlerinde grldēu gibi dimerik yapıların oluşumuyla mümkün olur (Schultz et al. 1991). Zayıf dizi homolojisine raēmen (22%, 28% and 21%), LutR protein FadR ve YvoA proteinleri ile yapısal olarak yakın bir homoloji göstermektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının temel amacı, LutR transkripsiyon faktörü tarafından doğrudan kontrol edilen genlerin belirlenmesidir. LutR regülönunu belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda ilk olarak ChIP yönteminden yararlanılmıştır. ChIP deneylerinde DNA kaynağı olarak *B. subtilis* PY79 suşu kullanılırken, protein kaynağı olarak *E. coli* *pQE60::lutR::spc* ve *E. coli* *pQE60::sinR::spc* suşları kullanılmıştır. ChIP yöntemini uygulamak için ilk önce, *in vitro* olarak uygulanan mevcut ChIP yöntemlerinden bakteri hücreleri için uygun olan ve *in vitro* olarak uygulanabilen yeni bir ChIP prosedürü oluşturulmuştur. Oluşturduğumuz yeni ChIP yönteminin *in vitro* uygulanmasına ek olarak en önemli özelliği antikör kullanım ihtiyacını ortadan kaldırmasıdır. Uygulanan yeni ChIP deneylerinde, hedef proteine (LutR'a) özgü antikör kullanmak yerine, *E. coli* suşlarında pQE60 plazmidleri ile rekombinant olarak sentezlenen LutR proteinlerinin C-terminal uçlarına eklenmiş olan 6xHis-kuyruğundan yararlanılmıştır. Çünkü 6 adet histidin eklenerek oluşturulan bu ekstra yapı, Ni-NTA-Resin Saflaştırma Seti'nde bulunan rezin matriksi ile kullanılarak proteinlerin saflaştırılmasına imkan vermektedir. Tez kapsamında uygulanan ChIP analiz sonuçları, normal şartlarda protein izolasyonu için kullanılan bu sistemin bakteriyal çalışmalarda *in vitro* olarak uygulanacak ChIP analizleri için uygun bir yöntem olduğunu göstermiş ve proteine özgü antikör kullanılmadığı için klasik ChIP yöntemlerine karşı avantaj sağlamıştır.

Tez çalışmasında elde edilen bir diğer önemli veri, Lineer poliakrilamid (LPA) polimerinin yeni ChIP yöntemine adapte edilmesidir. LPA, küçük DNA moleküllerinin izolasyonunda kullanılan büyük moleküler ağırlıklı bir polimer matrikstir. Küçük DNA parçalarının izolasyonunda ayrıca, çeşitli dezavantajları olan glikojen ve tRNA gibi moleküller de kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında oluşturulan ve uygulanan antikorsuz yeni ChIP yönteminde, ChIP-DNA saflaştırma işlemlerinde LPA kullanılmıştır. ChIP yöntemlerinde ChIP-DNA izolasyonu önemli bir basamak olduğundan, LPA gibi maliyeti düşük, kullanımı kolay ve takip eden deney basamaklarında (örneğin PCR, transformasyon vs. gibi) reaksiyonu

engellemeyen bir kimyasal özelliğe sahip bir polimer matriksin kullanılması önemli bir avantaj sağlamıştır.

Tez kapsamında LutR regülönunu belirlemek amacıyla uygulanan ChIP analizlerinde, 665 nt'lik bir DNA parçası yakalanmış, DNA dizi analiz sonuçları bu DNA parçasının *B. subtilis* kromozomunda *yuxO* (*comB*, *comAB*, *srfB*) geninin promotor bölgesine karşılık geldiği belirlenmiştir. *yuxO* gen ifadesi üzerindeki LutR proteininin etkisini belirlemek amacıyla RT-qPCR ve EMSA yöntemlerinden yararlanılmıştır. RT-qPCR yöntemi kullanılarak *yuxO* gen ifadesinin LutR proteinine bağlı transkripsiyon seviye değişimi analiz edilmiştir. Bu amaçla, yabani tip *B. subtilis* PY79 (*lutR* geni sağlam olan) suşu ile *B. subtilis* TEK1 *yvfI::Tn10::spc* (*lutR* geni inaktif) mutant suşu kullanılmıştır. Uygulanan RT-qPCR analizlerinde, *yuxO* gen ifadesinin *lutR* geni bozuk olan mutant suşlarda yabani tip hücrelere göre -0.95 kat azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, LutR'ın *yuxO* gen ifadesinin pozitif yönde kontrol ettiğini göstermiştir. LutR'ın *yuxO* transkripsiyon seviyesini direk olarak etkilediğinin doğrulanması amacı ile EMSA analizi yapılmıştır. Bu Amaçla *yuxO* genin promoter bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. EMSA sonuçlarında LutR proteininin *yuxO* genine doğrudan bağlandığı belirlenmiştir.

LutR tarafından doğrudan kontrol edilen genleri belirleme adına tez kapsamında atılan diğer bir adım, Dr. Öykü İrigül-Sönmez'in doktora tezinde gerçekleştirdiği mikroarray analizlerinde, LutR'ın aşırı ifade edilmesine karşılık transkripsiyon seviyeleri değiştiği belirlenen *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerinin, LutR ile doğrudan etkileşimlerinin EMSA analizleri ile belirlenmesidir. EMSA analizlerinde LutR proteininin artan konsantrasyonlarda bu genlere ait promoter bölgelerine daha fazla bağlandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* olmak üzere 8 genin LutR proteini tarafından doğrudan kontrol edildikleri ispatlanmıştır.

Ayrıca global regülasyonda görevli olan SinR proteini de bu tez kapsamındaki EMSA analizlerinde odak noktası olmuştur. LutR ve SinR proteinlerinin gen regülasyonunda birlikte hareket ettikleri bilgisine dayanarak, bu tez çalışmasında adı geçen genlerle ilgili bütün EMSA analizlerinde LutR proteini ile birlikte SinR proteini de kullanılmıştır. Buna göre SinR proteini hem ChIP analizlerinde belirlediğimiz *yuxO* geninin, hem de Öykü İrigül-Sönmez tarafından "IPTG ile indüklenen genler" adıyla etiketlenen *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve

yvnB genlerinin promotor bölgelerine doğrudan bağlanmakta ve bu genleri doğrudan kontrol etmektedir. Buna ek olarak, LutR ve SinR proteinlerinin gen regülasyonunda birbirlerine olan etkileri de incelenmiştir. Yani söz konusu genlere yarışmacı olarak mı yoksa eş zamanlı olarak mı bağlandıkları da araştırılmıştır. Bu amaçla, ilgili genin promotor DNA segmenti varlığında, sırasıyla LutR veya SinR proteinlerinden birinin konsantrasyonu sabit tutulurken, diğerinin konsantrasyonu giderek arttırılmıştır. LutR ve SinR proteinlerinin birlikte kullanılarak yapılan bu EMSA analizlerinde her iki proteinin başta *yuxO* olmak üzere *lrpB*, *yodT*, *rpsP*, *yutK*, *nasA*, *yvsG*, *ytsD* ve *yvnB* genlerine eş zamanlı olarak bağlanabildikleri, dolayısı ile bu genlerin transkripsiyon seviyelerini birlikte düzenledikleri belirlenmiştir.

Son olarak, LutR proteini ile yapılan deneysel çalışmalara ışık tutması ve LutR'ın DNA bağlanma özelliği açısından daha iyi anlaşılması amacıyla *in silico* analizler yapılmıştır. Bu analizlerde 30 adet LutR protein dizisi seçilerek bazı biyoinformatik ve bilgisayar programları/sunucuları yardımıyla çeşitli özellikleri açısından incelenmiştir. Fizikokimyasal analizler sonucunda LutR proteinleri ile ilgili izoelektrik noktası, sönme (extinction) katsayısı, alifatik indeks, instabilite indeksi ve GRAVY değerleri gibi temel veriler elde edilmiştir. Primer dizi analizlerinde, bu çalışmadaki bütün LutR proteinlerinin değişen oranlarda korunmuş bazı rezidülere sahip oldukları ve genel itibariyle hidrofilik bir yapıda oldukları belirlenmiştir. Sekonder yapı analizinde ise çoğunun iki tane α -heliks ve bir tane β -tabaka içeren HTH-motifi içerdikleri belirlenmiştir. Filogenetik analizlerde farklı bakteri türlerine ait 30 LutR proteininin iki ana gruba ayrıldıkları ve her iki grubun da ikiye alt gruba ayrıldığı gözlenmiştir. α -helix-2 segmenti “tanıma heliksi” olarak tanımlandığından *B. subtilis* 168 LutR proteininde ikinci helikse ait 15-SVQALAESF-23 dizisi DNA-bağlanma sürecinde önemli olabilir. PyMOL programında yapılan yapısal analizler LutR-Q17-R27-Q47 rezidülerinin FadR ve YvoA proteinlerinin DNA'yı tanıma ve bağlanmasında kritik olan rezidülerle aynı pozisyonlarda konumlandıklarını ve DNA'nın küçük/büyük oluklarına karşılık geldiklerini ortaya koymaktadır. Bu nedenle LutR-Q17-R27-Q47 rezidüleri hedef DNA bölgelerini tanımada ve bu bölgelere bağlanmada kritik rezidüler olabilir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar farklı bakteri türlerine ait LutR proteinlerinin çeşitli özellikleri ve fonksiyonlarıyla ilgili benzerlik ve farklılıklarını daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu

bulguların ileride yapılacak deneysel yapı fonksiyon analizlere de büyük katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aalten, D. M. F. van, Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riize, B. W., Eijssink, V. G. H. ve Wierenga, R. K. (2000). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97, 5842-5847.
- Adeloye, A. O. ve Ajibade, P. A. (2011). A High Molar Extinction Coefficient Mono-Anthracenyl Bipyridyl Heteroleptic Ruthenium(II) Complex: Synthesis, Photophysical and Electrochemical Properties. *Molecules* 16 (6), 4615-4631.
- Agari Y., Agari K., Sakamoto K., Kuramitsu S. ve Shinkai A. (2011). TetR family transcriptional repressor *Thermus thermophilus* FadR controls fatty acid degradation. *Microbiology*, 157, 1589–1601.
- Albano, M. and Dubnau, D. A. (1989). Cloning and Characterization of a Cluster of Linked *Bacillus subtilis* Late Competence Mutations. *Journal of Bacteriology*, 171 (10), 5376-5385.
- Ali, M. S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., ve Kadota, S. (2001). Blepharocalyxins C-E, three new dimeric diarylheptanoids and related compounds from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *J. Nat. Prod.*, 64, 491-496.
- Allison, S. L. and Phillips, A. T. (1990). Nucleotide-sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 172, 5470-5476.
- Ansaldi, M., Marolt, D., Stebe, T., Mandic-Mulec, I., ve Dubnau, D., (2002). Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44 (6), 1561-1573.
- Aravind, L. ve Anantharaman, V. (2003). HutC/FarR-like bacterial transcription factors of the GntR family contain a small molecule-binding domain of the chorismate lyase fold. *FEMS Microbiology Letters*, 222, 17-23.
- Ausubel-Frederick M. (1994). *Current Protocols in molecular biology*. (Chichester Ed., Cilt 12 (2), sf. 1-11). John Wiley & Sons, New York.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I. ve Smith, I. (1993). SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev.*, 7, 139–148.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A, Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- Barski, A. ve Frenkel, B. (2004). ChIP Display: novel method for identification of genomic targets of transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, 32 (12), 104.

- Basalp, A., Ozcengiz, G. ve Alaeddinoglu, N. G.** (1992). Changes in patterns of alkaline serine protease and bacilysin formation caused by common effectors of sporulation in *Bacillus subtilis* 168. *Current Microbiology*, 24, 129-135.
- Bassler, B. L.** (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 582–587.
- Belitsky, B. R.** (2004). *Bacillus subtilis* GabR, a protein with DNA-binding and aminotransferase domains, is a PLP-dependent transcriptional regulator. *Journal of Molecular Biology*, 340, 655-664.
- Belitsky, B. R. ve Sonenshein, A. L.** (2011). CodY-mediated regulation of guanosine uptake in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 193 (22), 6276-6287.
- Belitsky, B. R., and Sonenshein, A. L.** (2002). GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of gamma-aminobutyrate in *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology* 45, 569-583.
- Belitsky, B. R., Wray, L. V., Jr, Fisher, S. H., Bohannon, D. E., ve Sonenshein, A. L.** (2000). Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J. Bacteriol.*, 182, 5939-5947.
- Berger, R., et al.** (1993). Nonradioactive gel mobility shift assay using chemiluminescent detection. *Biotechniques*, 15, 650–652.
- Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M. ve Denizot F.** (2003). YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 93-97.
- Black, P. N. ve Dirusso, C. C.** (1994). Molecular and biochemical analyses of fatty-acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1210, 123-145.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-54.
- Brand, L. H., Fischer, N. M., Harter, K., Kohlbacher, O. ve Wanke, D.** (2013). Elucidating the evolutionary conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and in vitro binding assays. *Nucleic Acids Research*, 41 (21), 9764-9778.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R. ve Kolter, R.** (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59, 1229-1238.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L. ve Kolter, R.** (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26.
- Branden, C. ve Tooze, J.** (1991). *Introduction to protein structure.*, Garland Publishing Inc., New York ve London, Cilt 1.
- Brennan, R. G., and Matthews, B. W.** (1989). The helix-turn-helix DNA-binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1903-1906.

- Brinkman, A. B., Ettema, T. J., De Vos, W. M. ve Van Der Oost, J.** (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.*, 48, 287–294.
- Brown, S. W. ve Sonenshein, A. L.** (1996). Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *ginra* operon. *J. Bacteriol.*, 178, 2450-2454.
- Bruckner, R., Shoseyov, O. ve Doi, R. H.** (1990). Multiple active forms of a novel serine protease from *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 486–490.
- Burbulys, D., Trach, K. A. ve Hoch, J. A.** (1991). The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64, 545-552.
- Calvo, J. M. ve Matthews, R. G.** (1994). The Leucine-Responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 58 (3), 466-490.
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., and Ortiz, A.** (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1611, 91-97.
- Chai, Y., Kolter, R. ve Losick, R.** (2009). A Widely Conserved Gene Cluster Required for Lactate Utilization in *Bacillus subtilis* and Its Involvement in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 191, 2423-2430.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. ve van der Donk, W. A.** (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105, 633-683.
- Chen, D., Ruzicka, F. R. ve Frey, P. A.** (2000). A novel lysine 2,3-aminomutase encoded by the *yod0* gene of *Bacillus subtilis*: characterization and the observation of organic radical intermediates. *Biochem. J.*, 348, 539-549.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., ve Hughson, F. M.,** (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415 (6871), 545-9.
- Chibazakura, T., Kawamura, F. ve Takahashi, H.** (1991). Differential regulation of *spo0A* transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.*, 173, 2625–2632.
- Chin, T., M. M. Burger, and L. Glaser.** (1966). Synthesis of teichoic acids. VI. The formation of multiple wall polymers in *Bacillus subtilis* W-23. *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 358–367.
- Chmara, H., Milewski, S., Dzieduszycka, M., Smulkowski, M., Sawlewicz, P. ve Borowski, E.** (1982). Epoxypeptides a novel group of metabolic inhibitors in procaryotic and eucaryotic organisms. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 8, 11–12.
- Chmara, H., Woynarowska, B. ve Borowski, E.** (1981). Epoxypeptide antibiotic tetaine mimics peptides in transport to bacteria. *J. Antibiot.*, 34, 1608–1612.

- Chu, F., Kearns, D. B., Branda, S. S., Kolter, R. ve Losick, R.** (2006). Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 59, 1216-1228.
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., Burley, S. K.** (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412-420.
- Clubb, R. T., Omichinski, J. G., Savilahti, H., Mizuuchi, K., Gronenborn, A. M. ve Clore, G. M.** (1994). A novel class of winged helix-turn-helix protein: the DNA-binding domain of Mu transposase. *Structure*, 2 (11), 1041-1048.
- Cruzramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P.** (1995). Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis* Identification of distinct *fnr*-dependent and *fnr*-independent regulatory mechanisms. *EMBO Journal*, 14, 5984-5994.
- Cutting, S. M.** (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, 28, 214–220.
- Dartois, V., Liu, J. ve Hoch, J. A.** (1997). Alterations in the flow of one-carbon units affect KinB-dependent sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 25 (1), 39-51.
- DiRusso, C. C., Black, P. N. ve Weimar, J. D.** (1999). Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Progress in Lipid Research*, 38, 129-197.
- Dirusso, C. C., Heimert, T. L. ve Metzger, A. K.** (1992). Characterization of Fadr, a global transcriptional regulator of fatty-acid metabolism in *Escherichia coli* interaction with the *fadb* promoter is prevented by long-chain fatty acyl coenzyme-as. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 8685-8691.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W.** (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13294–13299.
- Earl, A. M., Losick, R., ve Kolter, R.** (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 269-275.
- Eichenberger, P., Jensen, S. T., Conlon, E. M., van Ooij, C., Silvaggi, J.** (2003) The sigmaE regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 327, 945–972.
- Eichler, J. ve Moll, R.** (2001). The signal recognition particle of Archaea. *Trends Microbiol.*, 9, 130-136.
- Expert, J. M. ve Digat, B.** (1995). Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 41 (8), 685-691.
- Fernandez De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H. ve Woodgate, R.** (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 35, 1560-1572.

- Ferson, A.E., Wray, L.V., Jr, and Fisher, S. H.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. *Mol. Microbiol.*, 22, 693–701.
- Feucht, A., Evans, L. ve Errington, J.** (2003). Identification of sporulation genes by genome-wide analysis of the σ^E regulon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 149, 3023-3034.
- Fickers, P., Leclere, V., Guez, J. S., Bechet, M., Coucheney, F., Joris, B. ve Jacques, P.** (2008). Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Research in Microbiology*, 159, 449–457.
- Finking, R., ve Marahiel, M.A.,** (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides, *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 453-88.
- Fisher, S. H.** (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence. *Mol. Microbiol.*, 32, 223–232.
- Fisher, S. H., ve Wray, L.V., Jr** (2002). *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding 1-asparaginase. *J. Bacteriol.*, 184, 2148–2154.
- Freeman, J. A., and Bassler, B. L.** (1999). A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 31 (2), 665-677.
- Fried, M. G.** (1989). Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis*, 10, 366-376.
- Fried, M. G. ve Liu, G.** (1994). Molecular sequestration stabilizes CAP- DNA complexes during polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 22 (23), 5054-5059.
- Fried, M. ve Crothers, D. M.** (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 9 (23), 6505–25.
- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi, J., and Aratani, Y.** (1986). Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 3744-3753.
- Fuqua, C., ve Greenberg, E.P.,** (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 183-189.
- Gaillard, C. ve Strauss, F.** (1990). Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.*, 18 (2), 378.
- Gallegos, M. T., Michan, C., and Ramos, J. L.** (1993). The Xyls/Arac family of regulators. *Nucleic Acids Research*, 21, 807-810.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., ve Ramos, J. L.** (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 393-410.
- Garner, M. M. ve Revzin, A.** (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, 9 (13), 3047–60.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. ve Bairoch, A.** (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. (In) Walker JM (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, 571-607.
- Gaudreault, M., ve ark.** (2009). *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein Interactions*. Tom Moss and Benoit Leblanc (Ed.), 543, 15-35.
- Gaur, N. K., Dubnau, E. ve Smith, I.** (1986). Characterization of a cloned *Bacillus subtilis* gene that inhibits sporulation in multiple copies. *J. Bacteriol.*, 168 (2), 860–869.
- Gaur, N. K., Oppenheim, J. ve Smith, I.** (1991). The *Bacillus subtilis* sin gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.*, 173 (2), 678–686.
- Georgi, T., Engels, V. ve Wendisch, V. F.** (2008). Regulation of L-lactate utilization by the FadR-type regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 190, 963–971.
- Ghim, S.-Y., Chot S.-K., Shin, B.-S., Jeong, Y.-M., Soronkin, A., Ehrlich, S. D. ve Park, S.-H.** (1998). Sequence Analysis of the *Bacillus subtilis* 168 Chromosome region between the sspC and odhA Loci (184°-180°). *DNA Research*, 5, 195-201.
- Gill, S.C., von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182, 319-326.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P., ve Nakano, M. M.** (1995). Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 177, 1112-1115.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F. ve Limitone, A.,** (2007). Cell-cell communication in food related bacteria. *International journal of food microbiology*, 120 (1-2), 34-45.
- Gonzalez-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., ve Losick, R.** (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301, 510-513.
- Gorelik, M., Lunin, V. V., Skarina, T., Savchenko, A.** (2006). Structural characterization of GntR/HutC family signaling domain. *Protein Science*, 15 (6), 1506-1511.
- Greenberg, E. P.** (1997). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*, 63, 371-377.
- Griffith, L. K., and Grossman, A. D.,** (2008). A Degenerate Tripartite DNA-Binding Site Required for Activation of ComA-Dependent Quorum Response Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 381, 261–275.
- Guder, A., Wiedemann, I. ve Sahl, H.G.** (2000). Posttranslationally modified bacteriocins – the lantibiotics. *Biopolymers*, 55, 62–73.
- Guruprasad, K., Reddy, B. V., Pandit, M. E.** (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for

predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4 (2), 155-161.

- Hagege, J., Pernodet, J. L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A. ve Guerineau, M.** (1993). Transfer-functions of the conjugative integrating element psam2 from *Streptomyces ambofaciens* - characterization of a kil-kor system associated with transfer. *Journal of Bacteriology*, 175, 5529-5538.
- Hamoen, L. W., Kausche, D., Marahiel, M. A, van Sinderen, D., Venema, G. ve Serror, P.,** (2003). The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of *comK*. *FEMS microbiology letters*, 218 (2), 299-304.
- Hamoen, L. W., Van Werkhoven, A. F., Bijlsma, J. J. E., Dubnau, D., ve Venema, G.,** (1998). The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T-rich sequences arranged in a unique, flexible pattern along the DNA helix. *Genes & Development*, 12 (10), 1539-1550.
- Hamoen, L. W., Van Werkhoven, A. F., Venema, G., ve Dubnau, D.,** (2000). The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (16), 9246-51.
- Hamoen, L. W., Venema, G., ve Kuipers, O. P.** (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology-Sgm*, 149, 9-17.
- Hardman, A. M., Stewart, G. S. A. B. ve Williams, P.** (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Leeuwenhock*, 74, 199-210.
- Harrison, C. J., Bohm, A. A., Nelson, H. C. M.** (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcriptional factor. *Science*, 263 (5144), 224-227.
- Harrison, S. C.** (1991). A structural taxonomy of dna-binding domains. *Nature*, 353, 715-719.
- Harwood, C. R. ve Cutting, S. M.** (1990). *Molecular biological methods for Bacillus*. Chichester; New York: Wiley-Interscience. XXXV, sf. 581.
- Harwood, C. R., ve Archibald, A. R.** (1990). C. R. Harwood and S. M. Cutting (Ed.). *Growth, maintenance and general techniques. In Molecular Biology Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester, (sf.1-26).
- Harwood, C. R., ve M., C. S.** (1990). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. A Wiley- Interscience Publication, sf. 1-3.
- Harwood, C. R., ve Wipat, A.** (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*, 389, 84-87.

- Haydon, D. J., ve Guest, J. R.** (1991). A New family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 79, 291-296.
- Hellman, L. M. ve Fried, M. G.** (2007). Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat. Protoc.* 2 (8), 1849–1861.
- Hemphill, H. E., ve Whiteley, H. R.** (1975). Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.*, 39, 257–315.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M., ve Wallace, J. C.** (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 6602-6606.
- Henke, J. M., Bassler, B. L.** (2004). Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* 14 (11), 648-656.
- Herzner, A. M., Dischinger, J., Szekat, C., Josten, M., Schmitz, S., Yakéléba, A., Bierbaum G.** (2011). Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Plos one*, 6 (7), 1-8.
- Hilton, M. D., Alaeddinoglu, N. G. ve Demain, A. L.** (1988). Synthesis of bacişlysin by *Bacillus subtilis* branches from prephenate of thearomatic amino-acid pathway. *Journal of Bacteriology*, 170, 482-484.
- Hoa, T. T., Tortosa, P., Albano, M. ve Dubnau, D.** (2002). Rok (YkuW) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*. *Molecular microbiology*, 43 (1), 15-26.
- Hoch, J. A., ve Losick, R.** (1997). Genome sequencing - Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genome, *Nature*, 390, 237-238.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., et al.** (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol. Genet. Genomics*, 272, 363–378.
- Hoffmann, K., Wollherr, A., Larsen, M., Rachinger, M., Liesegang, H., Ehrenreich, A. ve Meinhardt, F.** (2010). Facilitation of direct conditional knockout of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (15), 5046.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A.** (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Research*, 27 (1), 215-219.
- Honda, K., Nakamura, K., Nishiguchi, M. and Yamane, K.** (1993). Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *Journal of Bacteriology*, 175 (15), 4885-4894.
- Huffman, J. L. ve Brennan, R. G.** (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif, *Current Opinion in Structural Biology. Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12 (1), 98-106.

- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Sigrist, C. J. (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Research*, 34 (suppl 1), D227-D230.
- Idicula-Thomas, S. ve Balaji, P. V. (2005). Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Science*, 14, 582-592.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *Journal of Biochemistry*, 88 (6), 1895-1898.
- Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., ve Ochi, K., (2003). Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (4), 2169-76.
- Inaoka, T., Takahashi, K., Yada, H., Yoshida, M. ve Ochi, K. (2004). RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 279, 3885–3892.
- Inaoka, T., Wang, G. ve Ochi, K. (2009). ScoC regulates bacilysin production at the transcription level in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191 (23), 7367-71.
- İrigül-Sönmez, Ö. (2012). Genome-wide analysis of *yvfI* gene in *Bacillus subtilis*. (Doktora tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, TR
- İrigül-Sönmez, Ö., Köroğlu, T. E., Öztürk, B., Kovács, A. T., Kuipers, O. P. ve Yazgan-Karataş, A. (2014). In *Bacillus subtilis* LutR is part of the global complex regulatory network governing the adaptation to the transition from exponential growth to stationary phase. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 160 (Pt 2), 243-60.
- Jack, R.W., and Jung, G. (2000). Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Current Opinion in Chemsitry and Biology*, 4, 310–307.
- Johansen, L. E., Nygaard, P., Lassen, C., Agerso, Y. ve Saxild, H. H. (2003). Definition of a Second *Bacillus subtilis* *pur* Regulon Comprising the *pur* and *xpt-pbuX* Operons plus *pbuG*, *nupG* (*yxjA*), and *pbuE* (*ydhL*). *Journal of Bacteriology*, 185 (17), 5200-5209.
- Jones, S., Heyningen, P. V., Berman, H. M. ve Thornton, J. M. (1999). Protein-DNA Interactions: A Structural Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 287, 877-896.
- Joseph, P., Ratnayake-Iecamwasam, M. ve Sonenshein, A. L., (2005). A Region of *Bacillus subtilis* CodY Protein Required for Interaction with DNA. *Society*, 187 (12), 4127-4139.
- Kallow, W., Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R. ve von Döhren H. (2002). Nonribosomal peptide synthetases-evidence for a second ATP-binding site. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1601, 93– 99.

- Karmirantzou, M., and Hamodrakas, S. J.** (2001). A Web-based classification system of DNA-binding protein families. *Protein Engineering*, 14, 465-472.
- Kataoka, M., Tanaka, T., Kohno, T., ve Kajiyama, Y.** (2008). The Carboxyl-Terminal Domain of TraR, a Streptomyces HutC Family Repressor, Functions in Oligomerization. *Journal of Bacteriology*, 190, 7164-7169.
- Katz, E. ve Demain, A. L.** (1977). Peptide antibiotics of Bacillus- Chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriological Reviews*, 41, 449-474.
- Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R. ve Losick, R.** (2005). A master regulator for biofilm formation by Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, 55, 739-749.
- Kendall, K. J. ve Cohen, S. N.** (1988). Complete nucleotide-sequence of the streptomyces-lividans plasmid pij101 and correlation of the sequence with genetic properties. *Journal of Bacteriology*, 170, 4634-4651.
- Kenig, M., Vandamme, E., ve Abraham, E. P.** (1976). The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. *J. Gen. Microbiol.*, 94, 46-54.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. ve Entian, K. D.** (1992). Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 132-142.
- Kleinkauf, H. ve von Döhren, H.** (1990). Non-ribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.*, 192, 1-15.
- Ko, T. P., Wu, S. P., Yang, W. Z., Tsai, H. ve Yuan, H. S.** (1999). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the Escherichia coli tyrosine aminotransferase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 55, 1474-1477.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Ogasawara, N.** (2003). Essential Bacillus subtilis genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 4678-4683.
- Kobayashi, K., ve Ogasawara, N.** (2002). Genome biology of a model bacterium, Bacillus subtilis, In *Genome Science: Towards a New Paradigm?* Yoshikawa, H. O. N. S. N. (Ed.), sf. 15-25.
- Koide, A., Perego, M. ve Hoch, J. A.** (1999). ScoC regulates peptide transport and sporulation initiation in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, 181 (13), 4114-4117.
- Konz, D. ve Marahiel, M. A.** (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.*, 6, R39-48.
- Koroglu, T. E., Ogulur, I., Mutlu, S., Yazgan-Karatas, A. ve Ozcengiz, G.** (2011). Global Regulatory Systems Operating in Bacilysin Biosynthesis in Bacillus subtilis, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 144-155.

- Koroglu, T.E., Kurt-Gur, G., Unlu E.C., Yazgan-Karatas, A.** (2008). The novel gene *yvfl* in *Bacillus subtilis* is essential for bacilysin biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 471–479
- Krell, T., Molina-Henares A. J., Ramos J. L.** (2006). The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile. *Protein Sci.*, 15 (5), 1207–1213.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. ve Tamura, K.** (2008). MEGA: a biologistcentric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinformatics*, 9, 299-306.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Danchin, A.** (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Kuo, M. H. ve Allis, C. D.** (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein: DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, 19, 425–433.
- Kyte, J. ve Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157 (1), 105-132.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685.
- Lai, E., Clark, K. L., Burley, S. K., Darnell, J. E. Jr.** (1993). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or 'winged helix' proteins: a family of transcriptional factors of diverse biologic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (22), 10421-10423.
- Lakshmi, P. T. V. ve Subhashini, S.** (2010). In silico sequence specific analysis of ERBB2 RTK alterations responsible for euroectodermal tumors of Homo sapiens. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, 2 (6), 75-84.
- Lane, D., et al.** (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.*, 56, 509–528.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21), 2947-2948.
- Lazazzera, B. A. ve Grossman, A. D.,** (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.*, 6, 288-294.
- Lazazzera, B. A., Solomon J. M. ve Grossman A.D.,** (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell*, 89, 917-925.
- Lee, H. Y., An, J. H., ve Kim, Y. S.** (2000). Identification and characterization of a novel transcriptional regulator, MatR, for malonate metabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 7224-7229.

- Lee, N. K., Yeo I. C., Park J. W. Kang B. S. ve Hahm Y. T.** (2010). Isolation and Characterization of a novel analyte from *Bacillus subtilis* SC-8 antagonistic to *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 298–303.
- Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W. ve Rafferty, J. B.** (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J.*, 20, 990–997.
- Levdikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L., ve Wilkinson, A. J.** (2006). The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 281 (16), 11366-73.
- Levine, M. T., McCoy, C., Vermaak, D., Lee, Y. C., Hiatt, M. A., Matsen, F. A. ve Malik, H. S.** (2012). Phylogenomic analysis reveals dynamic evolutionary history of the *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) gene family. *Plos Genetics*, 8 (6), e10027-29
- Levinthal, M., Lejeune, P. ve Danchin, A.** (1994). The H-NS protein modulates the activation of the *ilvIH* operon of *Escherichia coli* K12 by Lrp, the leucine regulatory protein. *Mol. Genet.*, 242, 736–743.
- Li, J., Yang, Q., Zhao, L.-h., Zhang, S.-m., Wang, Y.-x., ve Zhao, X.-y.** (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 10, 264-272.
- Linne, U., Doekel, S. ve Marahiel, M. A.** (2001). Portability of Epimerization Domain and Role of Peptidyl Carrier Protein on Epimerization Activity in Nonribosomal Peptide Synthetases. *Biochemistry*, 40, 15824-15834.
- López-Torrejón, G., Martínez-Jiménez M. I. ve Ayora, S.** (2006). Role of LrpC from *Bacillus subtilis* in DNA transactions during DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Research*, 34 (1), 120-129.
- Losick, R., ve Stragier, P.** (1992). Crisscross regulation of cell-type-specific gene-expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 355, 601-604.
- Lubec, G., Afjehi-Sadat, L., Yang, J. W., John, J. P. P.** (2005). Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology*, 77, 90-127.
- Magarvey, N., He, J., Aidoo, K. A. ve Vining, L. C.** (2001). The *pdx* genetic marker adjacent to the chloramphenicol biosynthesis gene cluster in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: functional characterization. *Microbiology*, 147, 2103–2112.
- Magnuson, R., Solomon, J., ve Grossman, A. D.,** (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77 (2), 207-216.

- Mahlstedt, S. A. ve Walsh, C. T.** (2010). Investigation of Anticapsin Biosynthesis Reveals a Four-Enzyme Pathway to Tetrahydrotyrosine in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 49, 912-923.
- Majumdar, S. K. ve Bose, S. K.** (1960). Amino acid sequence of mycobacillin, *Biochem. J.*, 74, 596-599.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C. ve Breaker, R. R.** (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, 113 (5), 577-86.
- Mandic-Mulec, I., Doukan, L. ve Smith, I.** (1995). The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *Journal of Bacteriology*, 177, 4619–4627.
- Mandic-Mulec, I., N. Gaur, Bai, U. ve Smith. I.** (1992). Sin, a stage-specific repressor of cellular differentiation. *J. Bacteriol.*, 174, 3561–3569.
- Mannanov, R. N. ve Sattarova, R. K.** (2001). Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (2), 117 - 123.
- Marahiel, M. A.** (1997). Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chemistry & Biology*, 4, 561-567.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. ve Zuber, P.** (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.*, 7, 631–636.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWweese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., Bryant, S. H.** (2005). CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Research*, 33, D192-D196.
- Margot, P., ve Karamata, D.** (1996). The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. *Microbiology*, 142, 3437–3444.
- Martinussen, J., Sørensen, C., Jendresen, C. B. ve Kilstrup, M.** (2010). Two nucleoside transporters in *Lactococcus lactis* with different substrate specificities. *Microbiology*, 156, 3148-3157.
- Martinussen, J., Wadskov-Hansen, S. L. ve Hammer, K.** (2003). Two nucleoside uptake systems in *Lactococcus lactis*: competition between J. Martinussen and others purine nucleosides and cytidine allows for modulation of intracellular nucleotide pools. *J. Bacteriol.*, 185, 1503–1508.
- Mascher, T., Margulis, N., Wang, T., Ye, R. W. ve Helmann, J. D.** (2003). Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 50 (5), 1591-1604.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. ve Hill, C.** (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 285–308.
- Milewski, S.** (1993). Chemical modification studies of the active site of glucosamine-6 phosphate synthase from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1161, 279-284.
- Miller, M. B. ve Bassler, B. L.** (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 165-199.

- Millet, J.** (1970). Characterization of proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marburg strain during sporulation. *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 207–219.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., & Sonenshein, A. L.**, (2003). Additional Targets of the *Bacillus subtilis* Global Regulator CodY Identified by Chromatin Immunoprecipitation and Genome-Wide Transcript Analysis. *Society*, 185 (6), 1911-1922.
- Mootz, H.D. ve Marahiel M.A.** (1999). Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 341–348.
- Moszer, I.** (1998). The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Letters*, 430, 28-36.
- Moyne, A. L., Cleveland, T. E. ve Tuzun, S.** (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol. Lett.*, 234, 43–49.
- Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V. ve Edelman, M.** (2000). Side-Chain Flexibility in Proteins Upon Ligand Binding. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 39 (3), 261-268.
- Nakamura, K.I., Hasler, T., Morehead, K., Howard, R. J. ve Aikawa, M.** (1992). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte receptor(s) for CD36 and thrombospondin are restricted to knobs on the erythrocyte surface. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1419–1422.
- Nakamura, Y., Pashkin, Yu. A. ve Tsai, J. S.** (1999). Coherent control of macroscopic quantum states in a single-Cooper-pair box. *Nature*, 398, 786-788.
- Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. ve Leonard, W. J.** (1994). Heterodimerization of the IL-2 receptor α - and γ -chain cytoplasmic domains is required for signaling. *Nature*, 369, 330–333.
- Nakano, M. M., Hoffmann, T., Zhu, Y. ve Jahn, D.** (1998). Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* *nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J. Bacteriol.*, 180, 5344–5350.
- Nakano, M. M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A., D., Zuber, P.,** (1991). *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173, 1770–1778.
- Nasser, W., Reverchon, S., Condemine, G., ve Robertbaudouy, J.** (1994). Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* *kdgr* repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *Journal of Molecular Biology*, 236, 427-440.
- Nelson, J. D., Denisenko, O. ve Bomsztyk, K.** (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Protocols*, 1 (1), 179-85.
- Nelson, J. D., Denisenko, O., Sova, P. ve Bomsztyk, K.** (2006). Fast chromatin immunoprecipitation assay. *Nucleic Acids Res.*, 34 (1), e2.

- Nelson, J., Denisenko, O. ve Bomsztyk, K.** (2009). The fast chromatin immunoprecipitation method. *Methods in Molecular Biology*, 567, 45–57.
- Newman, E. B. ve Rin, L.** (1995). Leucine-responsive regulatory protein: A global regulator of gene expression in *E. coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 49, 747–75.
- Nguyen, C. C., and Saier, M. H.** (1995). Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors, *FEBS Letters*, 377, 98–102.
- Novagen**, (2001). Ni-NTA His-Bind Resins Manuel.
- Ogasawara, N.** (2000). Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.*, 151, 129–134.
- Ohki R., Giyanto, Tatenno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K. ve Ogasawara, N.** (2003). The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49 (4), 1135–1144.
- Okamoto, H., Fujiwara, T., Nakamura, E., Katoh, T., Iwamoto, H. and Tsuzuki H.** (1997). Purification and characterization of a glutamic-acid-specific endopeptidase from *Bacillus subtilis* ATCC 6051; application to the recovery of bioactive peptides from fusion proteins by sequence-specific digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 27–33.
- Okamoto, K., Mudd J. A., Mangan, J., Huang, W. M., Subbaiah, T.V. ve Marmur, J.** 1968. Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 34, 413–428.
- Olubajo, B. A. ve Bacon, C. W.** (2008). Electrotransformation of *Bacillus mojavensis* with fluorescent protein markers. *Journal of Microbiological Methods*, 74, 102–105.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. ve Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
- Otto, M., Sumuth, R., Jung, G., ve Gotz, F.** (1998). Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. *FEBS Letters*, 424, 89–94.
- Ozcengiz, G. ve Alaeddinoglu, N. G.** (1991). Bacilysin production by *Bacillus subtilis* - effects of bacilysin, pH and temperature. *Folia Microbiologica*, 36, 522–526.
- Ozcengiz, G. ve Alaeddinoglu, N. G.** (1991). Bacilysin production and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 23, 61–64.
- Ozcengiz, G., Alaeddinoglu, N. G. ve Demain, A. L.** (1990). Regulation of biosynthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 91–100.
- Pabo, C. O., ve Sauer, R. T.** (1992). Transcription factors - structural families and principles of dna recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 1053–1095.

- Patel, P.S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., et al.** (1995). Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 48, 997–1003.
- Perego, M.** (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8612–8617.
- Perego, M., Hanstein, C. G., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P., ve Hoch, J. A.,** (1994). Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell*, 79 (6), 1047–1055.
- Perez-Rueda, E. ve Collado-Vides, J.** (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 28, 1838–1847.
- Perry, D. ve Abraham, E. P.** (1979). Transport and metabolism of bacilysin and other peptides by suspensions of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 115, 213–221.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L. ve Delcambe, L.** (1980). Characterization of a new antibiotic of iturin group bacillomycin-D. *Journal of Antibiotics*, 33, 1146–1149.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. ve Wallach, J.** (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 553–563.
- Peypoux, F., Pommier, M. T., Marion, D., Ptak, M., Das, B. C. ve Michel, G.** (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Journal of Antibiotics*, 39, 636–641.
- Pfaffl, M. W.** (2004). *Quantification strategies in real-time PCR. In A–Z of Quantitative PCR.* (Ed.) Bustin, S.A. (89–113). La Jolla: International University Line.
- Phillips, G. J. ve Silhavy, T. J.** (1992). The *E. coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, 359, 744–746. doi:10.1038/359744a0.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I. B., Verneuil, B. ve Urdaci, M. C.** (2002). Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res. Microbiol.*, 153, 269–276.
- Pottathil, M., Jung, A., ve Lazazzera, B. A.,** (2008). CSF, A Species-Specific Extracellular Signaling Peptide for Communication among Strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Journal of Bacteriology*, 190 (11), 4095–4099.
- Priest, F. G.** (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, 41, 711–753.
- Promega,** (1998). pGEM-T cloning vector manuel.

- Qiagen**, (2001). PCR Cloning Handbook.
- Quail, M. A., Dempsey, C. E. ve Guest, J. R.** (1994). Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 356, 183-187.
- Rajavel, M., Mitra, A. ve Gopal, B.** (2009). Role of *Bacillus subtilis* BacB in the Synthesis of Bacilysin. *The J. Biological Chemistry*, 284 (46), 31882–31892.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. ve Sweet, R. M.** (1993). Crystal structure of the globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362, 219-223.
- Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X. D., Gallegos, M. T., Brennan, R., ve Tobes, R.** (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 326-356.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M. ve Segura, A.** (2001). Response of gram-negative bacteria to certain environmental stresses. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 166–171.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serron, P., Wong, K. W. ve Sonenshein, A. L.** (2001). *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*, 15, 1093-1103.
- Raymond-Denise, A., ve Guillen, N.** (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *dinR* and *recA* genes after DNA damage and during competence. *J. Bacteriol.*, 174, 3171–3176.
- Raymond-Denise, A., ve Guillen, N.** (1991). Identification of *dinR*, a DNA damage-inducible regulator gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173, 7084–7091.
- Reading, N. C., ve Sperandio, V.,** (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS microbiology letters*, 254 (1), 1-11.
- Reizer, A., Deutscher, J., Saier, M. H. ve Reizer, J.** (1991). Analysis of the gluconate (gnt) operon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 5, 1081-1089.
- Ren, D. C., Bedzyk, L. A., Setlow, P., Thomas, S. M., Ye, R. W. ve Wood, T. K.** (2004). Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of *yveR* for biofilm maintenance. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 344-364.
- Resch, M., Schiltz, E., Titgemeyer, F. ve Muller, Y. A.** (2010). Insight into the induction mechanism of the GntR/HutC bacterial transcription regulator YvoA. *Nucleic Acids Research*, 38 , 2485-2497.
- Rezacova, P., Krejcirikova, V., Borek, D., Moy, S. F., Joachimiak, A., Otwinowski, Z.** (2007). The crystal structure of the effector-binding domain of the trehalose repressor TreR from *Bacillus subtilis* 168 reveals a unique quaternary assembly. *Proteins*, 69 (3), 679-682.

- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J.** (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 12507-12515.
- Rigali, S., Nothhaft, H., Noens, E. E. E., Schlicht, M., Colson, S., Mueller, M., van Wezel, G. P.** (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development, *Molecular Microbiology* 61, 1237-1251.
- Rigali, S., Schlicht, M., Hoskisson, P., Nothhaft, H., Merzbacher, M., Joris, B. ve Titgemeyer, F.** (2004). Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships. *Nucleic Acids Research*, 32 (11), 3418-3426.
- Robichon, D., Arnaud, M., Gardan, R., Pragai, Z., O'Reilly, M., Rapoport, G., and Débarbouille, M.** (2000). Expression of a new operon from *Bacillus subtilis*, *yzkB-ykoL*, under the control of the TnrA and PhoP-PhoR global regulators. *J. Bacteriol.*, 182, 1226–1231.
- Rocha, E. P. C., Guerdoux-Jamet, P., Moszer, I., Viari, A., ve Danchin, A.** (2000). Implication of gene distribution in the bacterial chromosome for the bacterial cell factory. *Journal of Biotechnology*, 78, 209-219.
- Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B.** (1989). Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature*, 340 (6233), 478–482.
- Rosinski, J. A. ve Atchley, W. R.** (1999). Molecular evolution of helix-turn-helix proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 49, 301-309.
- Rossbach, S., Kulpa, D. A., Rossbach, U. ve Debruijn, F. J.** (1994). Molecular and genetic-characterization of the rhizopine catabolism (*mocabrc*) genes of *Rhizobium meliloti* 15-30. *Molecular & General Genetics*, 245, 11-24.
- Rufo, G. A., Sullivan, B. J., Sloma, A. ve Pero, J.** (1990). Isolation and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 172, 1019–1023.
- Sakajoh, M., Solomon, N. A. ve Demain, A. L.** (1987). Cell-free synthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *J. Ind. Microbiol.*, 2, 201-208.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sampaio, M. M., Chevance, F., Dippel, R., Eppler, T., Schlegel, A., Boos, W., Lu, Y. J. ve Rock, C. O.** (2004). Phosphotransferase-mediated transport of the osmolyte 2-O-alpha-mannosyl-D-glycerate in *Escherichia coli* occurs by the product of the *mngA* (*hrsA*) gene and is regulated by the *mngR* (*farR*) gene product acting as repressor. *J. Biol. Chem.*, 279, 5537–5548.

- Saxild, H. H., Andersen, L. N. ve Hammer, K.** (1996). Dra-nupC-pdp operon of *Bacillus subtilis*: Nucleotide sequence, induction by deoxyribonucleosides, and transcriptional regulation by the deoR-encoded DeoR repressor protein. *Journal of Bacteriology*, 178 (2), 424-434.
- Schnell, N., Entan, K. D., Schneider, U., Gotz, F., Zahner, H., Kellner, R., Jung, G.** (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*, 133, 276-278.
- Schock, F. ve Dahl, M. K.** (1996). Expression of the tre operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *Journal of Bacteriology*, 178, 4576-4581.
- Schock, F., ve Dahl, M. K.** (1996). Analysis of DNA flanking the treA gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme IITre and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene*, 175, 59-63.
- Schuch, R., Zong, W., Badnell, N.,** (1999). Recombination of cooled highly charged ions with low-energy electrons, *Int. J. Mass Spectrom.*, 192, 225.
- Schultz, A.C., Nygaard, P., ve Saxlid, H. H.** (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription factor. *J. Bacteriol.*, 183, 3293–3302.
- Schultz, D., Wolynes, P. G., Lacob, E. B., and Onuchic, J. N.** (2009). Deciding fate in adverse time: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 106 (50), 21027-21034
- Schultz, S. C., Shields, G. C. ve Steitz, T. A.** (1991). Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science*, 253, 1001-1007.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. ve Marahiel, M.A.** (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *PNAS*, 99 (22), 14083–14088.
- Schwarzer, D., ve Marahiel, M. A.** (2001). Multimodular biocatalysis for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88, 93-101.
- Sekiguchi, J., Ezaki, B., Kodama, K. ve Akamatsu, T.** (1988). Molecular cloning of a gene affecting the autolysin level and flagellation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1611–1621.
- Sengupta, S., Banerjee, A. B., ve Bose, S. K.** (1971). Gamma-glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. *Biochem. J.*, 121, 839-846.
- Seo, J. W., Ohnishi, Y., Hirata, A. ve Horinouchi, S.** (2002). ATP-binding cassette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 184, 91-103.

- Serror, P., & Sonenshein, a L.,** (1996). CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *Journal of bacteriology*, 178 (20), 5910-5
- Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P. ve Williams S. C.** (2005). Interkingdom signaling: Deciphering the language of acylhomoserine lactones. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 935-947.
- Shivers, R. P., ve Sonenshein, A. L.** (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Molecular Microbiology*, 53, 599-611.
- Sieber, S. A., Linne, U., Hillson, N. J., Roche, E., Walsh, C.T. ve Marahiel, M. A.** (2002). Evidence for a Monomeric Structure of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*, 9, 997-1008.
- Sieber, S.A. ve Marahiel, M. A.** (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.*, 105, 715-738.
- Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. ve Bucher, P.** (2002). PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinformatics*, 3 (3), 265-274.
- Sivakumar, K., Balaji, S. ve Gangaradhakrishnan** (2007). In silico characterization of antifreeze proteins using computational tools and servers. *Journal of Chemical Sciences*, 119 (5), 571-579.
- Sloma, A., Ally, A., Ally, D. ve Pero J.** (1988). Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 170, 5557-5563.
- Sloma, A., Rudolph, C. F., Rufo, G. A., Jr., Sullivan, B. J., Theriault, K. A., Ally, D., ve Pero, J.** (1990). Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 172, 1024-1029.
- Sloma, A., Rufo, A. G., Jr., Theriault, K. A., Dwyer, M., Wilson, S. W., ve Pero, J.** (1991). Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173, 6889-6985.
- Sloma, A., Rufo, G. A., Jr., Rudolph, C. F., Sullivan, B. J., Theriault, K. A., ve Pero, J.** (1990). Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and cloning of the gene. *J. Bacteriol.*, 172, 1470-1477.
- Smialowski, P., Martin-Galiano, A. J., Mikolajka, A., Girschick, T., Holak, T. A. ve Frishman, D.** (2007). Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. *Bioinformatics*, 23 (19), 2536-2542.
- Smirnov, V.V., Rudenko, A.V., Samgorodskaya, N.V., Sorokulova, I.B., Reznik, S.R. and Sergeichuk, T.M.** (1994). Susceptibility to antimicrobial drugs of strains of bacilli used as a basis for various probiotics. *Antibiot. Khimioter.*, 39, 23-28.
- Smith, A. J. ve Humphries, S. E.** (2009). Characterization of DNA-binding proteins using multiplexed competitor EMSA. *J. Mol. Biol.*, 385 (3), 714-719.

- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A., ve Grossman, A. D.,** (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 10, 2014-2024.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A. ve Grossman, A. D.,** (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 9 (5), 547-558.
- Solomon, M. J. ve Varshavsky, A.** (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6470–6474.
- Soltis, P. S. ve Soltis, D. E.** (2003). Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statistical Science*, 18 (2), 256-267.
- Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R.** (1993). In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Washington, DC: American Society For Microbiology.
- Sorokulova, I.B.** (1997). A comparative study of the biological properties of Biosporin and other commercial *Bacillus*-based preparations. *Mikrobiol. Zh.*, 59, 43–49.
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M. ve García, A. F.** (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 1247–1256.
- Spencer, V. A., Sun, J. M., Li, L. ve Davie, J. R.** (2003). Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*, 31 (1), 65-75.
- Spizizen, J.** 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44, 1072–1078.
- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Volker, U. ve Bremer, E.** (2003). Genomewide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.*, 185, 6358–6370.
- Stein, T.** (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845-857.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B. ve Franke, P.,** (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.*, 271, 15428–15435.
- Steinborn, G., Hajirezaei, M. R. ve Hofemeister, J.** (2005). *bac* genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains. *Archives of Microbiology*, 183, 71-79.

- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., et al.** (1999). Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem. Biol.*, 6, 31–41.
- Stephens, C.**, (1998). Bacterial sporulation: A question of commitment?. *Current Biology*, 8, 45-48.
- Stephenson, K. ve Harwood, R. C.** (1998). Influence of a cell-wall-associated protease on production of amylase by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2875–2881.
- Stock A. M., Robinson V. L. ve Goudreau P. N.** (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, (1), 183-215.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. ve Stock, A. M.** (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 53, 450–490.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. ve Costerton, J. W.** (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- Stover, A. G. ve Driks, A.** (1999). Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *Journal of Bacteriology*, 181, 1664-1672.
- Strauch, M. A.**, (1995). AbrB Modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon. *Journal of Bacteriology*, 177 (23), 6727-6731.
- Strauch, M.A.** (1993b) Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponential growth to stationary phase. *Prog. in Nucleic Acids Res. & Mol. Biol.*, 46, 121–153.
- Strauch, M.A. and Hoch, J.A.** (1993a) Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol. Microbiol.*, 7, 337-342.
- Sung, M. H., Tanizawa, K., Tanaka, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Hirotzu, K., Soda, K.** (1991). Thermostable aspartate-aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species - gene cloning, sequence determination, and preliminary- x-ray characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2567-2572.
- Susanna, K. A, Fusetti, F., Thunnissen, A. M. W. H., Hamoen, L. W., ve Kuipers, O. P.**, (2006). Functional analysis of the competence transcription factor ComK of *Bacillus subtilis* by characterization of truncation variants. *Microbiology (Reading, England)*, 152 (Pt2), 473-483.
- Sutherland, I. W.** (2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9, 222-227.
- Suzuki, M., Brenner, S. E., Gerstein, M. ve Yagi, N.** (1995). DNA recognition code of transcription factors. *Protein Engineering*, 8 (4), 319-328.

- Switzer, R. L., Zalkin, H., ve Saxild, H. H. (2002). Purine, pyrimidine, and pyridine nucleotide metabolism in: *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From *Genes to Cells*. A. L. Sonenshein. ASM Press, Washington.
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. ve Ochi, K. (2002). Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 315–320.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Taylor, M. J., ve Thorne, C. B. (1963). Transduction of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* by each of two phages. *J. Bacteriol.*, 86, 452–461.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., and Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol Lett.*, 128, 101–106.
- Thorne, A. W., Myers, F. A. ve Hebbes, T. R. (2004). Native chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.*, 287, 21–44.
- Tosato, V. ve Bruschi, C. V. (2004). Knowledge of the *Bacillus subtilis* genome: impacts on fundamental science and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 1-6.
- Tran, L., Wu, X. C. ve Wong, S. L. (1991). Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173, 6364–6372.
- Trun, N., and Trempey, J. (2004). In *Fundamental Bacterial Genetics*, Victoria: Blackwell Publishing.
- Tsuge, K., Akiyama, T. ve Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 183.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. ve Dubnau, D. (1998). Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO journal*, 17 (22), 6730-8.
- Turgay, K., Hamoen, L., W., Venema, G. ve Dubnau, D. (1997). Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 11, 119–28.
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V., and Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology*, 13, 52-56.
- van Aalten, D. M. F., DiRusso, C. C., Knudsen, J. ve Wierenga, R. K. (2000). Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. *EMBO Journal.*, 19, 5167-5177.

- van Aalten, D. M. F., Dirusso, C. C., ve Knudsen, J.** (2001). The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO Journal*, 20, 2041-2050.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. ve Jung, G.** (1986). Fengycin – a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot., (Tokyo)*, 39, 888–901.
- Varshavsky, A.** (1987). Electrophoretic assay for DNA-binding proteins. *Methods Enzymol.*, 151, 551–565.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Gottschalk, G.** (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7, 204-211.
- von Dohren, H., Dieckmann, R. ve Pavela-Vrancic, M.** (1999). The nonribosomal code. *Chemistry & Biology* 6, R273-R279.
- Walker, J. E. ve Abraham, E. P.** (1970). The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry Journal*. 84, 1148-1151.
- Walsh, C.T.,** (2004). Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity and Versatility. *Science*, 303, 1805–1810.
- Walter, P. ve Blobel, G.** (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299 (5885), 691-698.
- Walton, R., B. ve Rickes, E., L.** (1962). Reversal of the antibiotic bacillin by N-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.*, 84, 1148-1151.
- Wan, C.** (2004). *Bioinformatic identification and functional Characterization of σ_{54} Promoters in Chlamydia trachomatis*. (Doktora tezi), Queensland University of Technology, Brisbane.
- Wang Q., Suzuki A., Mariconda S., Porwollik S. ve Harshey R. M.** (2005). Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO J.*, 24, 2034–2042.
- Webb, A. J. ve Hosie, A. H.** (2006). A member of the second carbohydrate uptake subfamily of ATP-binding cassette transporters is responsible for ribonucleoside uptake in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.*, 188 (23), 8005-12.
- Weber, T., ve Marahiel, M. A.** (2001). Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, 9, R3-R9.
- Weickert, M. J., and Adhya, S.** (1992). A family of bacterial regulators homologous to gal and lac repressors, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 15869-15874.
- Weinmann, A. S. ve Farnham, P. J.** (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 26, 37–47.

- Weinmann, A. S., Bartley, S. M., Zhang, M. Q., Zhang, T. ve Farnham P. J. (2001). The use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol. Cell Biol.*, 21, 6820–6832.
- Weinrauch, Y., Guillen, N. ve Dubnau, D. A. (1989). Sequence and transcription mapping of *Bacillus subtilis* competence genes *comB* and *comA*, one of which is related to a family of bacterial regulatory determinants. *J. Bacteriol.*, 171, 5362–5375.
- Weinrauch, Y., Penchev, Y. ve Dubnau, R., (1990). A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev.*, 4, 860– 872.
- Weyand, N. J., Braaten, B. A., van der Woude, M., Tucker, J., ve Low, D. A. (2001). The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from-215. *Mol Microbiol.*, 39, 1504–1522.
- Whitney, J. G. ve Funderburk, S. S. (1970). Anticapsin, a new biologically active metabolite. IV. Mechanism of action. In: *Abstracts for the X. international congress for microbiology*, Mexico City, p. 101.
- Wiethaus, J., Schubert, B., Pfaender, Y., Narberhaus, F. Ve Masepohl, B. (2008). The GntR-like regulator TauR activates expression of taurine utilization genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 190, 487-493.
- Wilson, K. P., Shewchuk, L. M., Brennan, R. G., Otsuka, A. J., Matthews, B. W. (1992). *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9257-9261.
- Wilson, K.E., Flor, J.E., Schwartz, R.E., Joshua, H., Smith, J.L., Pelak, B.A., et al. (1987). Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 40, 1682–1691.
- Wintjens, R. ve Rooman, M. (1996). Structural Classification of HTH DNA-binding Domains and Protein–DNA Interaction Modes. *J Mol Biol.*, 262, 294.
- Wipat, A., Brignell, S.C., Guy, B.J., Rose, M., Emmerson, P.T., and Harwood, C.R. (1998). The *yvsA-yvqA* (293 degrees-289 degrees) region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing genes involved in metal ion uptake and a putative sigma factor. *Microbiology*, 144, 1593–1600.
- Wong, S. L., Price, C. W., Goldfarb, D. S. ve Doi, R. H. (1984). The *subtilisin E* gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a σ_{37} promoter in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81,1184–1188.

- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. ve Pierson, L. S.** (1997). *N*-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aereofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.*, 179, 7663-7670.
- Wray, L. V. Jr, Ferfon, A. E., Rohrer, K. Ve Fisher, S. H.** (1996). TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl acad Sci., USA* 93, 8841-8845.
- Wray, L. V., Zalieckas, J. M., ve Fisher, S. H.** (2001). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*, 107, 427-435.
- Wray, L.V. Jr., Atkinson, M. R. ve Fisher, S. H.** (1994). The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* nrgAB operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* glnB-encoded PII protein. *J. Bacteriol.*, 176, 108–114.
- Wu, X. C., Nathoo, S., Pang, A. S., Carne, T. ve Wong, S. L.** (1990). Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 265, 6845–6850.
- Xu, Y., Heath, R. J., Li, Z., Rock, C. O. ve White, S. W.** (2001). The FadR-DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 17373-17379.
- Yang, M. Y., Ferrari, E. ve Henner, D. J.** (1984). Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 160, 15–21.
- Yasbin, R. E., Maino, V. C. ve Young, F. E.** (1976). Bacteriophage resistance in *Bacillus subtilis* 168, W23, and interstrain transformants. *J. Bacteriol.* 125, 1120–1126.
- Yazgan, A., Ozcengiz, G. ve Marahiel, M. A.** (2001). Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* strains that block the biosynthesis of bacilysin, *Biochimica Et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1518, 87-94.
- Yazgan-Karatas, A., Cetin, S. ve Ozcengiz, G.** (2003). The effects of insertional mutations in comQ, comP, srfA, spo0H, spo0A and abrB genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*, *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1626, 51-56.
- Yoshida, K., Hirotake, Y., Kinehara, M., Ohki, Y., Nakaura, Y. ve Fujita, Y.** (2003). Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Molecular Microbiology*, 49 (1), 157-165.
- Zeigler, D. R.** (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1893-1900.
- Zeigler, D. R., Pra'gai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Perkins, J. B.** (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J. Bacteriol.*, 190, 6983–6995.

- Zeigler, E. F.** (2011). How Sport and Physical Activity Could Contribute to Human Survival. University of Western Ontario, 1-244.
- Zeng, X., Saxild, H. H. ve Switzer, R. L.** (2000). Purification and characterization of the DeoR Repressor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182 (7), 1916-1922.
- Zuber, M. T.** (2003). Learning to think like Martians, *Science*, 302, 1694–1695.

EKLER

EK A: Bakteri Kùltürü Besiyerleri

EK B: Tamponlar ve Çözeltiler

EK C: Enzimler ve Kimyasallar

EK D: DNA ve Protein Belirteçleri (Marker'lar)

EK E: *yvfI* DNA and YvfI Protein Dizileri

EK F: Laboratuvar Ekipmanları

EK A : Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanışı

➤ **Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri (1 L) :**

- Tryptone.....10 g/L
 - Yeast Extract..... 5 g/L
 - NaCl 5 g/L
- ✓ Distile H₂O eklenerek 1 L'ye tamamlandı and ardından 4-8 dakika otoklavlandı.

➤ **Luria Bertani (LB) Katı Besiyeri (1 L) :**

- Tryptone..... 10 g/L
 - Yeast Extract..... 5 g/L
 - NaCl 5 g/L
 - Agar15 g/L
- ✓ Distile H₂O eklenerek 1 L'ye tamamlandı and ardından 4-8 dakika otoklavlandı.

➤ **2xYT Broth (1 L) :**

- Tryptone 16 g
 - Yeast Extract 10 g
 - NaCl 5 g
- ✓ Distile H₂O eklenerek 1 L'ye tamamlandı and ardından 4-8 dakika otoklavlandı.

➤ **2xYT Agar (1 L) :**

- Tryptone 16 g
 - Yeast Extract 10 g
 - NaCl 5 g
 - Agar 15 g/L
- ✓ Distile H₂O eklenerek 1 L'ye tamamlandı and ardından 4-8 dakika otoklavlandı.

➤ **Antibiyotikli LB Sıvı ve Katı Besiyerleri :**

- Spc : 100 µg/ml (son konsantrasyon)
- Amp : 100 µg/ml (son konsantrasyon)
- ✓ Otoklavlanıp soğutulduktan Sıvı besiyerine belirtilen miktarda eklenmiştir.
- ✓ Otoklavlandıktan sonra 50 °C 'ye kadar soğutulduktan Katı besiyerine belirtilen miktarlarda eklenmiş ardından petri kablarına dökülmüştür.

EK B : Tampon ve Çözeltilerin İçerikleri ve Hazırlanması

➤ **TE Tamponu (pH 7) :**

- Tris base 10 mM
- EDTA 1 mM
- ✓ HCl ile pH 7' ye ayarlanır.

➤ **RNaz (10 mg/ml) (10 ml) :**

- 10 ml dH₂O içinde 100 mg RNaz çözülür.
- ✓ 0.22 µm filtre ile filtrelendir.
- ✓ 1 ml'lik alikotlar hazırlanarak -20°C'ta depolanır.

➤ **Proteinaz K (20 mg/ml) (10 ml) :**

- 10 ml dH₂O içinde 200 mg Proteinaz K çözülür.
- ✓ 0.22 µm filtre ile filtrelendir.
- ✓ 1 ml'lik alikotlar hazırlanarak -20°C'ta depolanır.

➤ **Lizozim (100 mg/ml) (10 ml) :**

- 10 ml dH₂O içinde 1 gr Lizozim çözülür,
- ✓ 0.22 µm filtre ile filtrelendir.
- ✓ 1 ml'lik alikotlar hazırlanarak -20°C'ta depolanır.

➤ **5M NaCl (10 ml) :**

- 50 ml dH₂O içinde 14.62 gr NaCl çözülür.
- ✓ Oda sıcaklığında saklanır.

➤ **Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) (1 L):**

- Fenol 500 ml
- Kloroform 480 ml
- İzoamilalkol..... 20 ml
- TRIS (0.5 M) 20 µl
- EDTA (0.5 M) 2.5 µl
-

➤ **CTAB/NaCl (10 % CTAB/ 0.7 M NaCl) :**

- 80 mL dH₂O içinde 4.1 g NaCl çözülür.
- Ardından 10 g CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) eklenir ve iyice çalkalayarak çözülür. Yavaş yavaş 65°C ye ısıtılır.
- dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

➤ **P1 Tamponu (pH 8) :**

- Tris-base..... 6.06 gr
- EDTA.2H₂O..... 3.72 gr
- ✓ Dissolve Tris-base ve EDTA 800 ml dH₂O içinde çözülür. HCl ile pH 8'e ayarlanır . Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır. Ardından her 1 L P1 içine 100 mg RNaz A eklenir.

➤ **P2 Tamponu :**

- NaOH 8 gr
- SDS çözeltisi (20%)..... 50 ml
- ✓ 950 ml dH₂O içinde NaOH çözülür ve üzerine 50 ml SDS çözeltisi eklenir.

➤ **P3 Buffer (pH 5.5) :**

- Potasyum asetat 294.5 gr
- ✓ 500 ml dH₂O içinde çözülür ve pH 5.5 e ayarlandı.

➤ **Protein İzolasyonu için Liziz Tamponu:**

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 10 mM imidazol
- ✓ NaOH ile pH 8.0 e ayarlandı.

➤ **Protein İzolasyonu için Yıkama Tamponu (20 mM):**

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 20 mM imidazol
- ✓ NaOH ile pH 8.0 e ayarlandı.

➤ **Protein İzolasyonu için Yıkama Tamponu (35 mM):**

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 35 mM imidazol

✓ NaOH ile pH 8.0 e ayarlandı.

➤ **Protein İzolasyonu için Yıkama Tamponu (50 mM):**

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 50 mM imidazol

✓ NaOH ile pH 8.0 e ayarlandı.

➤ **Protein İzolasyonu için Elüsyon Tamponu:**

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 250 mM imidazole

✓ NaOH ile pH 8.0 e ayarlandı.

➤ **50x TAE (1 L) :**

- Tris base (2 mol)..... 242 g
- Glasiyal asetik asit..... 57.1 ml
- EDTA100 ml (0.5 M, pH 8.0)

✓ dH₂O ile hacim 1L'ye tamamlandı ve HCl ile pH 8'e ayarlandı.

➤ **1x TAE (1 L) :**

- 50x TAE 20 ml
- Distile su.....980 ml

➤ **Yumuşak Katı Besiyeri (%1) :**

- Agaroz 1 g
- 1 x TAE tampon..... 100 ml

✓ Jel tablaya dökülmeden önce içerisine 1.5µl EtBr (son konsantrasyon: 0.5 µg/ml) eklendi.

➤ **10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu:**

- Glisin... 144 gr
- Tris base... 30.3 gr
- SDS 20 gr

✓ 1.8 L ddH₂O içerisinde Tris base ve glisin birlikte çözüldü. Üzerine SDS eklenerek karıştırıldı. dH₂O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.

➤ **3x SDS-PAGE Yükleme Boyası (Laemmli loading dye):** **(30 ml)**

- Tris base (pH 6.8)0.135 M 0.49 gr
- Gliserol..... 30% 9 ml
- SDS..... 3% 0.9 g
- DTT..... 0.15 M 4.5 ml(1M)
- Bromophenol blue 0.03 % (w/v) 3 mg

➤ **SDS-PAGE Boyama Çözeltisi:**

- Coomassie Brilliant Blue R..... 0.4 g
- Metanol (% 40) 200 ml
- Glasiyal asetik asit (% 20) 200 ml

✓ % 40 Metanol içerisinde Coomassie Brilliant Blue R çözüldü ve ardından Glasiyal asetik asit eklendi.

➤ **SDS-PAGE Boya Giderme Çözeltisi :**

- Metanol (%20) 200 ml
- Asetik asit (%10) 100 ml
- dH₂O 700 ml

✓ 700 ml ddH₂O içine 100 ml Glasiyal asetik asit eklendi.

✓ 200 ml metanol eklendi ve karıştırıldı.

✓ Oda sıcaklığında mavi kapaklı şişede saklandı.

➤ **30% Akrilamid:Bisakrilamid Çözeltisi:**

- Akrilamid..... 29.5 g
- Bisakrilamid..... 0.5 g

✓ 100 ml dH₂O çözüldü and 4°C'ta karanlık ortamda depolandı.

✓

➤ **10% Amonyum Persülfat (APS) :**

- 5 g APS dH₂O içinde çözüldü, 50 mL son hacme tamamlandı (10% w/v son konsantrasyon)
- Alikot hazırlanıp, -20°C'ta depolandı.

➤ **SDS-PAGE Ayırıcı (Separating) Jel Tamponu (15%) (5 ml) :**

- 1.5 M TRIS-HCl (pH 8.8)..... 1.3 ml
- 30% Acrylamide:Bisacrylamide..... 2.5 ml
- 10% SDS 50 µl
- 10% APS..... 50 µl
- TEMED..... 4 µl
- dH₂O 1.1 ml

➤ **SDS-PAGE PAGE Ayırıcı (Separating) Jel Tamponu (12%) (5 ml) :**

- 1.5 M TRIS-HCl (pH 8.8)..... 1.3 ml
- 30% Acrylamide:Bisacrylamide..... 2 ml
- 10% SDS 50 µl
- 10% APS..... 50 µl
- TEMED..... 4 µl
- dH₂O 1.6 ml

➤ **SDS-PAGE Stacking Jel Tamponu (4 %) :**

- 1 M TRIS-HCl (pH 6.8)..... 0.25 ml
- 30% Acrylamide:Bisacrylamide..... 0.33 ml
- 10% SDS 20 µl
- 10% APS..... 20 µl
- TEMED..... 2 µl
- dH₂O 1.4 ml

➤ **1x Hepes:Imidazol Tamponu (2 L) :**

- Hepes 16.68 gr
- Imidazol..... 5.84 gr

✓ 1 ml dH₂O içinde çözüldü. NaOH ile pH 7.4'e ayarlandı.

➤ **5x Hepes:Imidazol Tamponu (100 ml) :**

- Hepes 4.17 gr
- Imidazol. 1.46 gr

✓ Dissolve in 100 ml dH₂O. Adjust pH: 7.4 with NaOH.

➤ **6% Doğal Jel :**

- 5x Hepes:Imidazol Tamponu (pH 7.4)..... 1 ml
- 30% Acrylamide:Bisacrylamide..... 1 ml
- 10% APS..... 50 µl
- TEMED..... 4 µl
- dH₂O 2.95 ml

➤ **LutR proteini için 5x Bağlanma Tamponu :**

	<u>1x</u>	<u>5x</u>	<u>10x</u>
- KCl	50 mM	250 mM	500 mM
- MgCl ₂	5 mM	25 mM	50 mM
- EDTA	0.1 mM	0.5 mM	1mM
- DTT	1 mM	5 mM	10 mM
- Glycerol (40%)	40%	40%	40%
- TRIS	10 mM	50 mM	100 mM

➤ **0.5 M Sodyum Fosfat Tamponu (PBS) :**

- NaH₂PO₄ (0.5 M) 500 ml
- Na₂HPO₄ (0.5 M) 332.5 ml

✓ Otoklavda 15 dk. Steril edildi.

➤ **1 % Lineer Poliakrilamid (LPA) Çözeltisi (5 ml) :**

- Tris-HCl (Ph 7.8) 40 mM
- Na-Asetat (Ph 7.5) 20 mM
- EDTA 10 µl
- Akrlamid (Bis içermez) 5% w/v
- 10% APS 1 %
- TEMED 0.1 %
- dH₂O 5 ml

- **ChIP için Glisin Çözeltisi ChIP (1M) (100 ml) :**
 - 7.5 g Glisin 80 mL dH₂O içinde vorteksenerek çözüldü.
 - Son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.
- **1M IPTG Stok Çözeltisi (20 ml) :**
 - 4.766 g IPTG 10 mL dH₂O içinde vorteksenerek çözüldü.
 - Son hacim dH₂O ile 20 ml'ye tamamlandı.
- **Xgal Stok Çözeltisi:**
 - 1 gr Xgal 25 ml Dimetilformamid içinde çözüldü.
 - ✓ 0.22 µm filtre ile filtrelendi.
 - ✓ 1 mL alikot hazırlandı ve -20°C'ta depolandı.
- **Xgal-IPTG :**
 - IPGT 1.25 gr
 - Xgal 1 gr
 - Dimetilformamid25 ml
 - ✓ 0.22 µm filtre ile filtrelendi.
 - ✓ 1 mL alikot hazırlandı ve -20°C'ta depolandı.
- **Ampisilin (Amp) Stok Çözeltisi (100 mg/ml) :**
 - 5.0 g ampisilin dH₂O içinde çözüldü,
 - Son hacim 50 mL'ye tamamlandı.(100 mg/mL son konsantrasyon)
 - 0.22 µm filtre ile filtrelendi.
 - 1 mL alikot hazırlandı ve -20°C'ta depolandı.
 - ✓ Bakteri kültürleri için LB sıvı besiyerinde 100 µg/mL'ye sulandırıldı.
- **1.5 M TRIS-HCl:**
 - 18.2 g Tris base 80 ml dH₂O içinde çözüldü ve pH to 8.8 'e ayarlandı.
 - dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

➤ **1 M TRIS-HCl :**

- 12.1g Tris base 80 ml dH₂O içinde çözüldü ve pH 6.8 'e ayarlandı.
- dH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

➤ **EMSA için Maleik Asit Tamponu EMSA (1L) :**

- Maleik asit..... 0.1 M (11.607 gr)
- NaCl 0.5 M (8.766 gr)
- ✓ pH: 7.4'e ayarlandı.

➤ **EMSA için Deteksiyon Tamponu :**

- TRIS..... 0.1 M (12.14 gr)
- NaCl 0.1 M (5.844 gr)
- ✓ pH: 9.5 'e ayarlandı.

➤ **EMSA için 10 x Bloklama Tamponu:**

- Bloklama tamponu (Blocking reagent) 10% (w/v) Maleik asit tamponunda sıcak blok üzerinde (65 C) sürekli çalkalayarak veya mikrodalga fırında çözüldü.
- Çözeltilinin opak hale gelmesi sağlandı.
- Steril hali bozulmadığı sürece 2-8 C'ta 4 hafta saklanabilir.

➤ **EMSA için 1x Bloklama Tamponu:**

- Maleik Asit Tamponu..... 9 ml
- 10x Bloklama Tamponu..... 1 ml
- ✓ Her zaman taze hazırlandı.

➤ **EMSA için Yıkama Tamponu:**

- Maleik Asit Tamponu..... 200 ml
- 10x Bloklama Tamponu..... 600 µl
- ✓ Not: pH: 7.5' e ayarlanması önemlidir.

➤ **EMSA için Yükleme Tamponu :**

- 0.25x Doğal Jel Tamponu..... 60%
- Gliserol..... 40%
- Bromophenol blue 0.2% (w/v)

EK C : Enzimler ve Kimyasallar

Kimyasal ADI

FİRMA

Acrylamide	Merck
Agar	Sigma
Agarose	Prona
Ammonium persulfate	Merck
Bis-acrylamide	Merck
Bromophenol blue	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma
CTAB	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidium bromide	Sigma
DTT	Sigma
Glicial Acetic Acid	Riedel-de Haën
Glycerol	Merck
Glycine	Merck
HCl	Merck
Hepes	AppliChem
Imidazole	Merck
IPTG	AppliChem
KCl	Carlo Erba
Methanol	Riedel-de Haën
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Carlo Erba
NaCl	Merck
NaOH	Carlo Erba
NaH ₂ PO ₄	Merk
Phenol-chloroform-isoamylalcohol	Fluka
SDS	Merck
TEMED	Carlo Erba
Tris-base	Merck
X-Gal	Sigma
Yeast Extract	Acumedia

Enzimler*Bam*HI

NcoI

EcoRI

Lysozyme

Proteinase K

RNAse A

Expand High Fidelity Enzyme

Pfu DNA Polymerase

T4 DNA Ligase

Firma

Fermentas

Fermentas

Fermentas

AppliChem

Sigma

Sigma

Roche

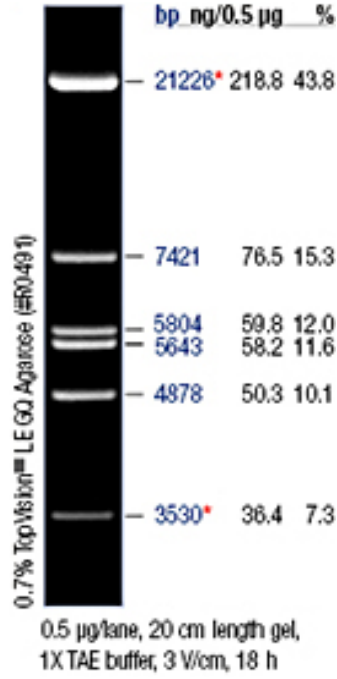
Fermentas

Roche

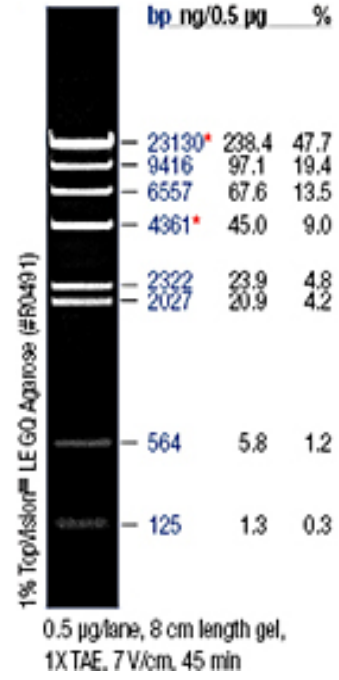
EK D : DNA and Protein Markörleri

1. DNA MARKÖRLERİ :

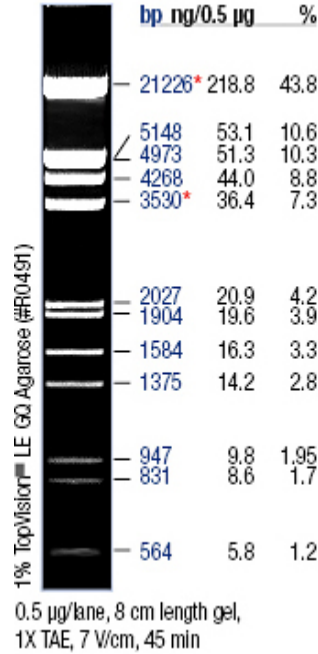
Lambda DNA/EcoRI Marker,1



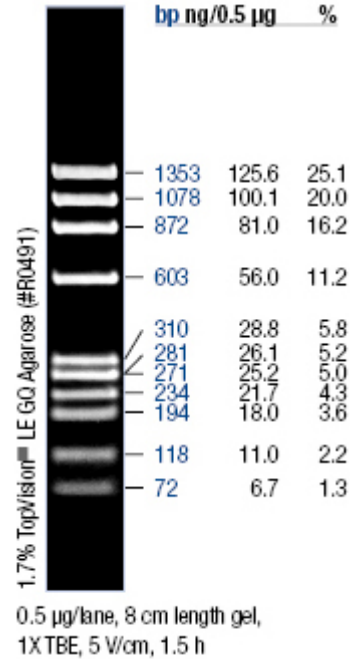
Lambda DNA/HindIII Marker, 2



Lambda DNA/EcoRI+HindIII, 3

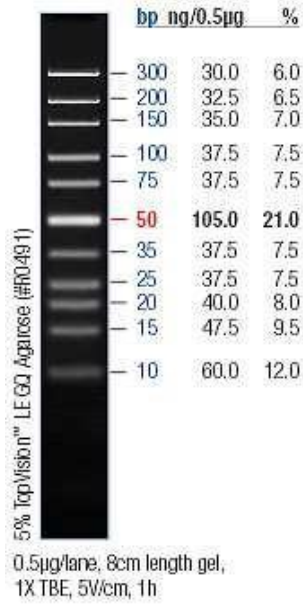


Φx174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9

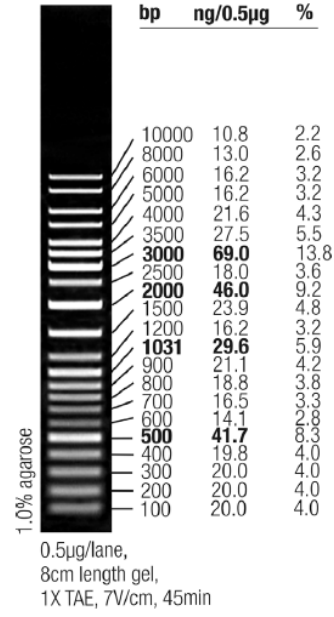


Şekil D.1 : Tez kapsamında kullanılan DNA belirteçleri.

phiX174 DNA/HinfI Marker, 10



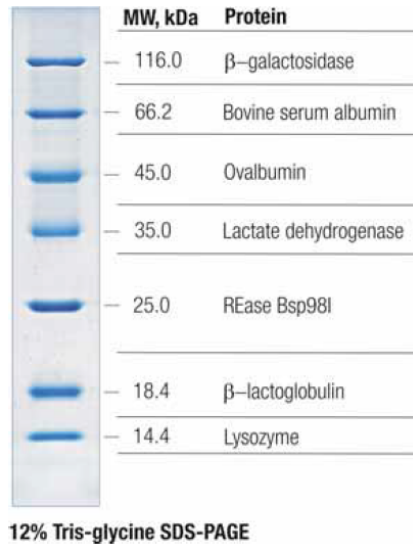
GeneRuler™ Ladder Mix



Şekil D.1 (Devam) : Tez kapsamında kullanılan DNA belirteçleri.

1. PROTEİN BELİRTEÇLERİ:

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)



Şekil D.2 : Tez kapsamında kullanılan protein belirteci.

EK E : *yvfI* DNA ve YvfI Protein Dizileri

yvfI DNA dizisi:

>B. subtilis 168|BG12434|yvfI: 525 bp -
unknown; similar to transcriptional regulator (GntR family)

```
1 - atg aaa cag gga gaa ggc acg tat ctg aag
31 - gaa ttt gag ctc aat caa att tct cag ccg
61 - ctc tca gcc gcc ctt ctg atg aaa aaa gag
91 - gac gtc aag cag ctg ctc gag gtc aga aaa
121 - ctg ctt gaa atc ggc gtg gct tca cta gcg
151 - gct gaa aaa agg aca gaa gca gat ctc gaa
181 - aga att cag gat gca cta aag gaa atg ggc
211 - agc att gaa gcg gac ggg gag ctg gga gag
241 - aaa gca gac ttt gca ttt cat ctt gcg ctt
271 - gcg gac gct tct caa aat gaa ctt ctt aaa
301 - cac ttg atg aat cac gtg tca tca ttg ctg
331 - ctg gaa aca atg agg gaa acg agg aaa atc
361 - tgg ctg ttt tcc aag aag acc tcc gtt cag
391 - cgg ctg tat gag gag cac gaa cgg att tac
421 - aat gct gtg gct gcc ggg aac ggt gca cag
451 - gcg gaa gcc gcc atg ctg gcg cat ttg acg
481 - aat gtg gaa gat gtg ctt tcg gga tat ttc
511 - gag gaa aat gtg caa
```

YvfI Protein dizisi:

>B. subtilis 168|BG12434|YvfI: 175 aa
unknown; similar to transcriptional regulator (GntR family)

```
1 - MKQGEGETYLK EFELNQISQP LSAALLMKKE DVKQLLEVRK LLEIGVASLA
51 - AEKRTEADLE RIQDALKEMG SIEADGELGE KADFAFHLAL ADASQNELLK
101 - HLMNHVSSLL LETMRETRKI WLFSKKTSVQ RLYEEHERIY NAVAAGNGAQ
151 - AEAAMLAHLT NVEDVLSGYF EENVQ
```

EK F : ChIP-DNA [yuxO (*comAB*, *srfB*)] Dizisi

1. yuxO geni :

>B. subtilis 168|BG10382|yuxO: 378 bp
unknown; similar to unknown proteins

```
1 - atg gat atg aag cac aca ttg ctt gaa gcg
31 - ctt ggt att gag att gtt gaa aac aca gcg
61 - gaa cga tgc gtt gcg gtc atg ccg gtg gat
91 - cat cgg acg gta cag ccg ttc gga tat ttg
121 - cat gga ggc gct tca gtg gcc ctg gcg gaa
151 - acc gcg gcg agg cca ggt gca cag aac ctg
181 - att gat cat aca acg caa gct tgt gtt ggt
211 - ttg gag att aac gcc aac cat tta aaa tct
241 - gta aag gaa gga acg gta aag gcg ata gcc
271 - gag ccc gtt cat ata ggc aga acg acg att
301 - gtc tat cat att cac ata tat gac gag caa
331 - gag agg ctg atc tgt ata tcc aga tgc acg
361 - ctg gct gtc atc aag aaa
```


EK G : Laboratuvar Ekipmanları**Çizelge G.1 : Laboratuvar ekipmanları.**

Otoklav	• Tuttnauer Systec Autoclave (2540 ml) • Nüve OT 4060 Steam Sterilizer
Santrifüj	• Microfuge 18, Beckman Coulter • AllegraTM25R Centrifuge, Beckman Coulter
Derin Dondurucu ve Buzdolapları	• -80°C Heto Ultrafreeze 4410 • -20°C Arçelik 209lt • +4°C Arçelik
Elektroforez Cihazları	• E – C mini cell primo EC320
Jel Dökümantasyon Sistemleri	• UVI PHotoMW Version 99.05 for Windows
Buz makinesi	• AF 10, Scotsman
İnkübatörler	• Nüve EN400 • Nüve EN500
Laminar Flow Kabini	• Biolab Faster BH-EN2003
Magnetik Karıştırıcı	• AGE 10.0164, Velp Scientifica srl. • AGE 10.0162, Velp Scientifica srl.
Microplate reader	• Model 3559 UV Microplate, Bio-Rad
Mikropipetler	• Eppendorf AG, 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 1µl, • Gilson pipetteman 10 µl, 20µl,200µl, 1000µl, • Volumate Mettler Toledo 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl
Orbital Karıştırıcılar	• Shell lab 1575R-2E
Thermo Electron Corporation	• B. Braun Biotech Internationnal GmbH
Güç Kaynağı	• Bio-Rad
pH metre	• Mettler Toledo MP220
Polyacrylamide Gel Electrophoresis Cihazı	• Bio-Rad
Güç Kaynağı	• Bio-Rad
Saf Su Sistemleri	• USF Elga UHQ-PS-MK3, Elga Labwater
SDS-PAGE Cihazı	• Bio-Rad
Spectrofotometre	• PerkinElmer Lambda25 UV/VIS Spectrometer
Thermomixer	• Eppendorf thermomixer comfort (1.5 ml)
Transillumunator	• Biorad UV transilluminator 2000
Vorteks	• Heidolph Raax top
Su banyosu	• Memmert wb-22

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Murat Kemal AVCI
Doğum Tarihi ve Yeri : 26.10.1981
E-posta : muratkemalavci@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2004, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yükseklisans** : 2008, Gebze Yüksek Teknoloji Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- **Biyoloji Öğretmeni** : 2005-2008, Tuzla-Gebze
- **Araştırma Görevlisi** : 2012-devam, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Avci M. K.**, Yamaner C., Ayvaz M., Yazgan-Karatas A. 2014. In silico characterization and comparative analysis of *Bacillus subtilis* GntR type LutR transcription factor. *Eurasia J. Biosci.* 8: 12-28.
- **Avci M. K.**, Irigul-Sonmez O., Koroglu T. E. Yazgan-Karatas, A., 2013. Identification of direct targets of GntR type transcription factor Yvfi in *Bacillus subtilis* by Chromatin immunoprecipitation and Electrophoretic Mobility Shift Assay. 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, March 21-25, 2013.
- **Avci M. K.**, Uysal H., Yamaner Ç., Ayvaz, M., Yazgan-Karatas A., 2014. Three-Dimensional Comparative In Silico Analysis of *Bacillus subtilis* LutR Transcriptional Factor with Well-Known HTH-Type Proteins. *Genom Varyasyonları: Uygulama ve Veri Analizleri Sempozyumu*. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİYOGE), 15-16 Eylül 2014.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Avci, M.K.,** Ayvaz, M., Uysal H., Sevindik, E., Orenay-Boyacioglu S., Yamaner C., 2015. Order-Wide In Silico Comperative Analysis and Identification of Growth Regulating Factor (GRF) Proteins In Malpighiales. Turkish Journal of Biology, 04/2015. (DOI: 10.3906/biy-1502-23)