T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# *Staphylococcus aureus*'A KARŞI FAJ LİTİK PROTEİNİNİN ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hande HANÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# *Staphylococcus aureus*'A KARŞI FAJ LİTİK PROTEİNİNİN ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hande HANÇER tarafından hazırlanan tez çalışması 20.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "S*taphylococcus aureus*'a Karşı Faj Litik Proteininin Antibakteriyel Özelliğinin Araştırılması" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hande HANÇER

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 122Z026 numaralı projesi tarafından desteklenmiştir.

*Aileme*

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde beni destekleyen, değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyen, her koşulda yanımda olan sevgili danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans hayatımda laboratuvarı benim için daha keyifli hale getiren, bazen nedensizce hep birlikte güldüğümüz bazen çıkmayan deneylerde hep beraber üzüldüğümüz, birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim değerli arkadaşlarım; lisans ve yüksek lisans sürecimde aynı yolda ilerlediğim ve iyi ki tanımışım dediğim, bana her konuda destek olan ve sorunlara birlikte göğüs gerdiğim sevgili arkadaşım Arş. Gör. Senanur DOKUZ'a, yüksek lisans sürecine başladığımdan beri bilgilerinden ve deneyimlerinden sıkça yararlandığım, düşüncelerine her zaman değer verdiğim sevgili arkadaşım Berna ERDOĞDU'ya, çalıştığım tez projesinin fikrinden deneylerine kadar her konuda bana yardımcı olan, pratik ve değerli bilgileriyle çalışmalarımdaki sorunlarımı çözüme kavuşturan sevgili arkadaşım Semra TAŞDURMAZLI'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca aynı laboratuvarı paylaştığım gibi, deneylerde aynı sevinci ve üzüntüyü paylaştığım Pınar ÖZTEKİN'e, farklı laboratuvarda da olsak yanımda olan Şebnem GÖK ve Zekiye DEMİR'e teşekkür ederim.

Her zaman arkamda duran, beni her zaman destekleyen çok sevgili aileme, en başta Sait HANÇER'e, en büyük destekçim olan annem Bahriye HANÇER'e, ağabeyim Ercüment HANÇER'e, ablalarım Serap HANÇER ve Merve HANÇER'e her zaman yanımda olduğunuz ve bana inandığınız için teşekkür ederim.

Bu süreçte maddi desteğini benden esirgemeyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hande HANÇER

# İÇİNDEKİLER

**SİMGE LİSTESİ** ix
**KISALTMA LİSTESİ** x
**ŞEKİL LİSTESİ** xi
**TABLO LİSTESİ** xiii
**ÖZET** xiv
**ABSTRACT** xvi
**1 GİRİŞ** 1
1.1. Literatür Özeti ... 1
1.2. Tezin Amacı ... 4
1.3. Hipotez ... 5
**2 GENEL BİLGİLER** 6
2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi ... 6
2.1.1 Vektörler ... 6
2.1.2 Konak Olarak *E. coli Bl21(DE3)* Suşunun Kullanımı ... 8
2.1.3 Protein Ekspresyonu ... 8
2.1.4 IMAC ile Protein Pürifikasyonu ... 9
2.2 *Staphylococcus aureus* Bakterisinin Genel Özellikleri ... 10
2.2.1 *S. aureus* Enfeksiyonlarının Tedavi Yöntemleri ... 11
2.3 Bakteriyofaj ... 12
2.3.1 Bakteriyofajların Yapısı ... 13
2.3.2 Bakteriyofajların Sınıflandırılması ... 14
2.3.3 Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü ... 15
2.3.4 Faj Litik Proteinleri ... 18
**3 HAZIRLIKLAR** 23
3.1 Materyal ... 23
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ... 23
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları ... 24
3.1.3 Genomik ve Plazmit DNA İzolasyonları ... 24
3.1.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Elektroforez Reaktifleri ... 24
3.1.5 PZR Ürününün Saflaştırılması ... 24
3.1.6 Ultra Kompetan Hücre Hazırlanması ... 24

3.1.7 Klonlama ve Ekspresyon ..... 25
3.1.8 Koloni PZR ve Plazmit İzolasyonu ..... 25
3.1.9 Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi ve Boyama ..... 25
3.1.10 Western Blot Reaktifleri ..... 27
3.1.11 Protein Saflaştırılması ..... 27
3.1.12 Antibakteriyel Test ..... 29
3.2 Metot ..... 30
3.2.1 Çift Tabaka Agar Yöntemi ile Faj Geliştirilmesi ..... 31
3.2.2 Faj DNA İzolasyonu ..... 31
3.2.3 DNA Miktarı ve Saflığın Belirlenmesi ..... 32
3.2.4 Holin Geninin Baz Dizisinin Tespiti ..... 32
3.2.5 Gen Bölgesi için Primer Tasarımı ..... 33
3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ..... 34
3.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi ..... 35
3.2.8 PZR Ürününün Saflaştırılması ..... 36
3.2.9 Ultra Kompetan Hücre Hazırlama ..... 36
3.2.10 aLICator Kiti ile Klonlama ve Transformasyon ..... 37
3.2.11 Koloni PZR ..... 38
3.2.12 Plazmit İzolasyonu ..... 40
3.2.13 Plazmit DNA Dizi Analizi ..... 40
3.2.14 Protein Ekspreyonu ..... 41
3.2.15 Protein Saflaştırılması ..... 42
3.2.16 SDS-PAGE Elektroforezi ..... 42
3.2.17 Western Blot Analizi ..... 43
3.2.18 Antibakteriyel Analiz ..... 44
**4 SONUÇ VE ÖNERİLER 46**
4.1 Deneysel Sonuçlar ..... 46
4.1.1 *S. aureus* Fajından Genomik DNA İzolasyonu ..... 46
4.1.2 Gen Bölgesi için Primer Tasarımı ..... 46
4.1.3 PZR ..... 47
4.1.4 Jel Ekstraksiyonu ..... 48
4.1.5 Klonlama ve Transformasyon ..... 48
4.1.6 Koloni PZR ..... 49
4.1.7 Holin ve SKHol Plazmit İzolasyonu ..... 50

4.1.8 Plazmit DNA Analizi ..... 51
4.1.9 Protein Ekspresyonu, SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, Saflaştırma ve Western Blot ..... 53
4.1.10 Antibakteriyel Analiz ..... 65
4.2 Tartışma ve Öneriler ..... 70
KAYNAKÇA 77
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 84

# SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| bç | Baz çifti |
| rpm | Dakikada dönme hızı |
| °C | Derece santigrat |
| g | Gram |
| Kb | Kilobaz |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| M | Molar |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| OD | Optik yoğunluk |
| V | Volt |
| x g | Yerçekimi ivmesi ile çarpım |

# KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| Amp | Ampisilin |
| cDNA | Tamamlayıcı DNA |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | Deoksiribonükleotidtrifosfat |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| IMAC | Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi |
| IPTG | İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit |
| KOB | Koloni oluşturan birimler |
| LPS | Lipopolisakkarit |
| OMP | Dış zar proteini |
| PBS | Fosfat tamponlu salin |
| PZR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| rDNA | Rekombinant DNA |
| rHolin | Rekombinant Holin |
| RNA | Ribonükleik asit |
| rSKHol | Rekombinant SKHol |
| *S. aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| SDS-PAGE | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| TAE | Tris-Asetat-EDTA |
| UV | Ultraviyole |

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** Bakteriyofaj yapısı [72]'dan düzenlenmiştir .....13

**Şekil 2.2** Bakteriyofaj aileleri, morfolojileri, genom tipleri ve göreceli genom boyutları [73]'dan düzenlemiştir.....15

**Şekil 2.3** Bakteriyofaj nükleik asidinin bakteri hücresi içerisine girmesi. [21]'dan düzenlemiştir .....16

**Şekil 2.4** Bakteriyofajların litik ve lizojenik döngüsü.....18

**Şekil 2.5** Litik proteinlerin görevleri [27]'den düzenlenmiştir.....18

**Şekil 2.6** Gram pozitif bakterilerde holin ve endolizinlerin hücreyi lizise uğratması .....21

**Şekil 3.1** Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması .....30

**Şekil 4.1** Signal P 5.0 kullanılarak bulunan Holin geninin sinyal sekansı. İlgili program kapsamında Holin geninin sinyal sekansı, yaklaşık 40 amino asit olarak tespit edilmiştir .....47

**Şekil 4.2** Holin ve SKHol geninin PZR yöntemi ile amplifikasyonu ile elde edilen amplifiye ürünlerinin agaroz jel görüntüsü .....48

**Şekil 4.3** Transformasyon sonucunda petrilerde oluşan koloni görüntüleri. A) Holin geni, B) SKHol geni.....49

**Şekil 4.4** Koloni PZR sonucunda agaroz jel görüntüleri. A) Holin geni 770 bç B) SKHol geni 710 bç.....50

**Şekil 4.5** BLASTn. A) Holin genini içeren plazmitin dizileme sonucunda elde edilen dizinin, Holin gen dizisi ile hizalanması. B) SKHol genini içeren plazmitin dizileme sonucunda elde edilen dizinin SKHol gen dizisi ile hizalanması, Sbjct: Orijinal dizi, Query: Dizileme sonucundaki dizi .....52

**Şekil 4.6** BLASTp sonucu. A) Holin dizileme sonucunda amino asit dizisi ve orijinal amino asit dizisi hizalaması, B) SKHol dizileme sonucunda amino asit dizisi ve orijinal amino asit dizisi hizalaması, Sbjct: Orijinal dizi, Query: Dizileme sonucundaki dizi .....53

**Şekil 4.7** rHolin protein ekspresyonu denemelerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. A ve C) Holin genini içeren *E. coli Bl21 (DE3)*, B ve D) Kontrol *E. coli Bl21 (DE3)*.....54

**Şekil 4.8** rHolin proteininin 0.5 mM ve 1 mM IPTG ile indüklendikten sonra 60. dakikadaki ekspresyonunun süpernatantlarının SDS-PAGE jel görüntüsü .....55

**Şekil 4.9** rHolin proteininin 0.2 mM ve 0.5 mM IPTG ile indüklenmesinin ardından A) 4. saat, B) 6. saatte alınan örneklerin SDS-PAGE jel görüntüleri (H: rHolin, K: Kontrol) .....56

**Şekil 4.10** rHolin proteininin 0.5 mM IPTG ile 4. saat eksprese edilmesinin ardından saflaştırılmasının SDS-PAGE jel görüntüsü .....57

**Şekil 4.11** Saflaştırılmış rHolin proteininin Western-Blot görüntüsü .....57

**Şekil 4.12** rHolin proteininin farklı IPTG miktarları ile 4. ve 6. saat indüklenen örneklerin SDS-PAGE jel görüntüleri (B: Besiyeri, P: Pellet, S: Süpernatant) .....58

**Şekil 4.13** rHolin proteininin farklı IPTG miktarları ile 6. saat indüklenen örneklerin Western Blot görüntüleri (B: Besiyeri, P: Pellet, S: Süpernatant) .....59

**Şekil 4.14** Farklı IPTG konsantrasyonu ile indüklenen kültürlerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiği sonuçları .....60

**Şekil 4.15** Farklı IPTG miktarlarındaki saatlik rHolin örneklerinin petrilere ekimi. A) 0.2 mM IPTG B) 0.5 mM IPTG, C) 1 mM IPTG ve D) 1.5 mM IPTG, E) Kontrol .....61

**Şekil 4.16** Farklı konsantrasyonlardaki IPTG miktarları ile inkübe edilen kültürlerin ampisilinli LB agar petrilerine ekiminin sonuçları .....62

**Şekil 4.17** rSKHol proteini SDS-PAGE görüntüsü .....63

**Şekil 4.18** rSKHol proteininin 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmesi ile saatlik alınan örneklerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiğinin sonuçları .....64

**Şekil 4.19** rHolin ve rSKHol proteinlerinin 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmesi ile saatlik alınan örneklerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiği sonuçları .....65

**Şekil 4.20** 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rHolin ve rSKHol proteinlerinin farklı lizis koşullarında alınan pellet ve süpernatant örneklerinin agar kuyucuk diffüzyon metodu ile antibakteriyel testi. A) 1. koşul 1. pellet, B) 1. koşul 1. süpernatant, C) 2. koşul 1. pellet, D) 2. koşul 1. süpernatant, E) 2. koşul 2. pellet, F) 2. koşul 2. süpernatant .....67

**Şekil 4.21** 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rHolin ve rSKHol proteinlerinin farklı lizis koşullarında alınan pellet ve süpernatant örneklerinin agar kuyucuk diffüzyon metodu ile antibakteriyel testi. A) 1. koşul 1. pellet, B) 1. koşul 1. süpernatant, C) 2. koşul 1. pellet, D) 2. koşul 1. süpernatant, E) 2. koşul 2. pellet, F) 2. koşul 2. süpernatant .....68

**Şekil 4.22** Spot testi sonucu. A) rSKHol proteini, B) rHolin proteini, C) Kontrol....69

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 3. 1** PZR'de kullanılacak materyaller ve hacimleri.....34
**Tablo 3.2** PZR'nin aşamaları .....35
**Tablo 3.3** aLICator kiti ile kurulan klonlama reaksiyonunun içeriği .....37
**Tablo 3.4** Koloni PZR'nin kullanılan materyalleri ve hacimleri.....39
**Tablo 3.5** Koloni PZR'nin aşamaları .....39
**Tablo 4.1** *S. aureus* fajının genomik DNA izolasyonundan elde edilen DNA'nın konsantrasyonları.....46
**Tablo 4.2** Holin ve SKHol genine ait primerler.....46
**Tablo 4.3** Holin ve SKHol genlerinin amplifikasyon ürünlerinin pürifikasyon sonuçları .....48
**Tablo 4.4** Holin genini içere plazmitlerin izolasyonu sonucunda elde edilen plazmit konsantrasyonları.....50
**Tablo 4.5** SKHol geninin içeren plazmitlerin izolasyonu sonucunda elde edilen plazmit konsantrasyonları .....50
**Tablo 4.6** Agar kuyucuk diffüzyon metodunun inhibisyon zon çapı sonuçları.....66

# ÖZET

## *Staphylococcus aureus*'a Karşı Faj Litik Proteininin Antibakteriyel Özelliğinin Araştırılması

Hande HANÇER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Antimikrobiyal direnç profilinden dolayı dünyada ve ülkemizde giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebepleri arasında *Staphylococcus aureus* yer almaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla antibiyotiklere alternatif umut verici yeni yaklaşımlara veya terapötik yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla son yıllarda bakteriyofajlar ve faj türevleri, bakteriyal hastalıklarla mücadelede potansiyel adaylar olarak tekrar önemini kazanmaya başlamıştır.

Bu bilgiler ışığında sunulan tez çalışmasında, *S. aureus* fajının konakçı üzerinde litik aktiviteye sahip Holin proteininin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi ve antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle, S*. aureus* faj genomundaki Holin geni, sinyal sekansı varlığı ve yokluğunu sağlayacak primerler ile amplifiye edilerek pLATE51 vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan genlerin (Holin ve SKHol) doğruluğu koloni PZR ve sekans analizi ile

gerçekleştirildikten sonra *Escherichia coli Bl21(DE3)* ekspresyon suşuna transforme edilmiştir. rHolin ve rSKHol proteinlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması sonrası bakteriyel lizis etkinliği spektrofotometrik, turbitidimetrik ve standart petri sayımı yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İlaveten, ilgili proteinlerin antibakteriyel ajan olarak kullanım potansiyeli agar kuyucuk diffüzyon ve spot testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, her iki proteinin de *S. aureus* bakterisini lize ettiği kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak tespit edilmiştir. rHolin'in antibakteriyel etkinliğinin rSKHol'e göre daha yüksek olduğu sırasıyla 16 ve 10 mm inhibisyon zon çapları ile belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler ışığında, özellikle rHolin proteininin saflaştırılması halinde sağlık, gıda, tarım ve kozmetik gibi birçok alandan kullanım potansiyeli yüksektir.

**Anahtar Kelimeler:** *S. aureus*, bakteriyofaj, holin proteini, antibakteriyel aktivite

# ABSTRACT

## *Investigation of the Antibacterial Property of the Phage Lytic Protein Against Staphylococcus aureus*

Hande HANÇER

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Dr. Tülin ÖZBEK

Due to its antimicrobial resistance profile, *S. aureus* is among the most common causes of hospital-acquired infections, which are increasing in the world and in our country. There is a need for promising new approaches or new therapeutic agents alternative to antibiotics for the treatment of multidrug resistant *S. aureus* infections. For this purpose, in recent years, bacteriophages and phage derivatives have started to gain importance again as potential candidates in the fight against bacterial diseases.

In the light of this information, in the thesis study presented, it was aimed to produce the Holin protein, which has lytic activity on the host of *S. aureus* phage, by recombinant DNA technology and evaluate its antimicrobial activity. First, the Holin gene from the *S. aureus* phage genome was amplified with primers to provide the presence and absence of signal sequence and cloned into the pLATE51 vector. After verifying the accuracy of the cloned genes (Holin and SKHol) by colony PCR and sequence analysis, it was transformed into *E. coli Bl21(DE3)* expression strain. Bacterial lysis efficiency after expression and purification of

rHolin and rSKHol proteins was evaluated by spectrophotometric, turbitidimetric and standard petri count methods. In addition, the potential for use of the relevant proteins as antibacterial agents was evaluated by agar well diffusion and spot tests. As a result of the study, it was determined that both proteins lysed *S. aureus* bacteria in comparison with the control groups. It was determined that the antibacterial activity of rHolin was higher than that of rSKHol with inhibition zone diameters of 16 and 10 mm, respectively. In the light of this information obtained, if the rHolin protein is purified, its potential for use in many fields such as health, food, agriculture and cosmetics is high.

**Keywords:** *S. aureus*, bacteriophage, holin protein, antibacterial activity

# 1
# GİRİŞ

## 1.1. Literatür Özeti

Moleküler genetikte önemli bir devri başlatan rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi; sağlık, gıda, hayvancılık ve çevre endüstrilerinde güvenli ve düşük maliyetli atılımlar sağlamıştır [1]. Doğada var olmayan DNA moleküllerinin yapay olarak oluşturulmasını sağlayan rDNA teknolojisi, farklı biyolojik kaynaklardaki genetik bilgilerin bir araya getirilerek ilgilenilen gen bölgelerinin farklı bir konak canlıda klonlarının oluşturulmasına ve ifade edilmesine olanak sağlamaktadır [2][3].

rDNA teknolojisinin temel elemanlarından olan ilgilenilen genin organizmaya taşınmasında kullanılan vektörlerin, konak hücre kromozomundan yeterince küçük, kopya sayısının fazla, markır gen ve restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerine sahip olması gerekir [4][5]. Genel olarak kullanılan vektörler; plazmitler, virüs vektörleri, kosmid adı verilen melez moleküller ve ekspresyon vektörleri olarak sıralanmaktadır [6]. Oluşturulan vektörleri içine alan konak hücreler çeşitlilik göstermekle birlikte en yaygın olarak kullanılanı *E. coli Bl21(DE3)*'dir [7]. *E. coli*'nin iyi karakterize edilmiş bir genoma ve çok kısa bir yaşam döngüsüne sahip olması, kültürlenmesinin kolay olması ve kısa zamanda genetik olarak kolayca manipüle edilebilir olması rDNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır [8].

Stafilokoklar, *Micrococcaceae* ailesinde yer alan, Gram pozitif, aerob ya da anaerob (fakültatif) [9], sporlanmayan ve çapları 0.5-1.5 $\mu$m arasında değişen [10] koklardır.

Stafilokok türlerinin bazıları patojendir ve insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyona sebep olabilmektedir [9][10]. Toplum ve hastanelerde önemli [11] stafilokokal patojen türlerden biri olan *Staphylococcus aureus*

bakterisinin bazı suşları; döküntüye, kusmaya, ishale, yüksek ateşe, biyofilm ile bağlantılı olan birçok kronik hastalığa ve hatta ölüme neden olan toksik şok sendromuna sebep olabilirler [12][10]. Dünyada ve ülkemizde giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebepleri arasında stafilokoklar görülmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2020 UHESA (Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı) raporunda hastane enfeksiyonlarına neden olan bakterilerdeki antimikrobiyal dirençli patojen dağılımında antibiyotiğe dirençli *S. aureus* bakteri suşları ilk sıralarda görülmektedir [13].

*S. aureus* enfeksiyonu çeşitli antibiyotiklerle tedavi edilmeye çalışılmış ancak antibiyotiklerin yanlış ve fazla kullanımı bakterinin antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesine sebep olmuştur [14]. Bilim insanları tarafından antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmekte olup bu alternatif yöntemlerden birkaçı antimikrobiyal peptitler, antikorlar, probiyotikler, bağışıklık uyarıcılar, aşılar, konak savunma ve antibiyofilm peptitleri, bakteriyofajlar ve faj lizinleridir [15]. Son zamanlarda bakteriyofajlar ve faj türevleri bakteriyel enfeksiyonlarda umut verici bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir [16]. Fajların doğasında yer alan bakteriyel konakçıları özgül olarak tanıma ve enfekte etme yetenekleri, onları; gıdada (gıdaların dekontaminasyonu), tarımda (biyokoruyucu), biyoteknolojide (taşıyıcı sistemler, aşı ve ilaç tasarımları) ve tıpta (enfeksiyon tedavisi, biyolojik tanı, ilaç hedefleme, dezenfektan) patojene özgü tedavi için ideal antimikrobiyal adaylar haline getirmektedir [17] [18].

Bakteriyofajlar, bakterileri konak olarak kullanarak onları enfekte eden ve çoğalan temel nükleik asit ve protein bileşenlerinden [19] oluşan virüslerdir [20]. Dünyada kanalizyon, dışkı, toprak, derin termal sularda, doğal su kütleleri gibi [19] her nişte bol miktarda fajlar ve faj partikülleri bulunmaktadır [20]. Tüm fajların baş yapılarının boyutu ve şekli yönünden ve faj kuyruk yapılarının varlığından değişiklik göstermektedir [21].

Fajlar, öncelikle konak hücrelerinin hücre duvarındaki özgül reseptöre geri döndürülebilir bir bağlanma [22] ve sonrasında altıgen levhada bazı

düzenlenmelerin meydana gelmesiyle geri döndürülemez bir bağlama ile bağlanır [23]. Baş kısmındaki nükleik asit ATP yardımıyla [24], kuyruğa gelmesiyle birlikte kuyruk kasılır ve genetik materyal bakteri hücresine girer [21]. Bir fajın enfekte ettiği bakteride çoğalma yöntemi 4 farklı şekilde olmaktadır; litik, lizogenik, pseudolizogenik, kronik enfeksiyon. Lizogenik fajlar, konak hücrede hem dormansi hem de litik durumunu gösterebilmektedir [21]. Bu tür fajlar, genomlarını, konak hücrenin genomuna rekombinasyon ya da transpozisyon yolu ile entegre olur [23]. Faj DNA'sı bu durumda profaj halini alırken, konak hücre lizojen olarak adlandırılır. Profaj, lizojen ile lizojene ölümcül bir etkisi olmadan sürekli çoğalarak bakteri popülasyonu içerisinde korunur [20]. Lizogenik durum UV ve iyonize radyasyona maruz kalma, kuruma ve mutajenik kimyasallara maruz kalma gibi bazı stres koşullarının etkisiyle bakteri genomundan fajın ayrılmasına sebep olarak litik döngüye geçebilir ve bu duruma indüksiyon adı verilir [25]. Litik fajlar, konak hücrenin çoğalma mekanizmasına el koyarak bakteriyofaj üretilmesini sağlar [20]. Faj, bakteri hücresinin metabolik mekanizmasını kullanarak kendi genetik materyalinin çoklu kopyalarını oluşturmaktadır. DNA virüsleri kendilerini mRNA moleküllerine kopyalarken RNA virüsleri ters transkriptaz enzimi ile viral RNA'yı DNA'ya kopyalayarak mRNA üretimini gerçekleştirir [24]. mRNA'lardan baş, kuyruk gibi fajın yapısal proteinleri ayrı ayrı üretilerek birleştirilir, nükleik asit ile yüklenerek oluşturulan tam bir faj bakteri hücresinin parçalanmasıyla hücre dışına salınır [22]. Fajlar, nükleik asitlerinin hücre içerisine girişini sağlayan ve yeni üretilen fajların dışarıya salınmasına yardımcı olan litik proteinlere sahiptir [26]. Faj kuyruk kısmının penetrasyonuna ve faj DNA'sının konak hücrenin sitoplazmasına geçişine yardımcı olmak için hücre duvarı peptidoglikanı lokal olarak sindirilmesini destekleyen virion ilişkili lizin (VAL) ve konak hücrenin peptidoglikanını sindiren ve oluşturulan fajların salınmasını sağlayan endolizin ve holin olarak isimlendirilen litik proteinlerdir [27].

Çift sarmallı DNA genomuna sahip fajlar, viryonların salınımı sırasında, büyüme döngülerinin sonlandırmak ve hücreleri hızlı bir şekilde lizise

uğratmak için holin-lizin lizis sistemleri olarak bilinen bir strateji geliştirmişlerdir [28][29]. Endolisinler, peptidoglikan (PG) ağını kesmekle görevli PG hidrolazlar olarak bilinmektedir [30].

Holinler, enfeksiyon sırasında belirli bir konsantrasyona ulaşıncaya kadar bakteri hücresinin iç membranında biriken ve daha sonra konakçı hücrenin sitoplazmik membranına oligomerik olarak yerleşen hidrofobik proteinlerdir [29][31]. Genetik olarak programlanmış bir zamanda zar proton motif gücünün yıkımına neden olan deliklerin oluşumunu tetikleyerek büyümenin durmasına ve hücre ölümüne yol açar. Diğer bir görevi de sitozolde biriken ve hücre duvarının degredasyonuna neden olan endolizinlerin, oluşan bu deliklerden salınmasına izin vermektir [29].

Literatürde faj litik proteinlerin bakteri üzerinde antibakteriyel etkileri, hücre içinde rekombinant olarak eksprese edildiklerinde ve eksojen olarak uygulandığında gözlemlenmiş olup aynı zamanda holin proteinlerinin in vitro olarak ökaryotik tümör hücrelerinin canlılığını ve boyutunu azalttığı gösterilerek anti-kanser ajanı olarak kullanılabileceği de ortaya koyulmuştur [32].

## 1.2. Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında *S. aureus* patojenine karşı etkili bir ilaç olabileceği düşünülen Holin proteininin klonlanması, protein ekspresyonu ve saflaştırılması, antibakteriyel analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için belirlenen hedefler aşağıdaki gibidir:

1) *S. aureus* bakteriyofından genomik DNA izolasyonu
2) Holin gen bölgesinin amplifikasyonu
3) Holin gen bölgesinin ilgili ekspresyon vektörüne klonlanması ve ilgili prokaryotik ekspresyon sistemine transformasyonu,
4) Holin proteininin ekspresyonu, saflaştırılması ve doğrulanması
5) Holin proteininin *S. aureus* üzerindeki etkisinin antibakteriyel analizlerle değerlendirilmesi

## 1.3. Hipotez

Son yıllarda bilim insanları tarafından çok sayıda antibiyotiğe direnç kazanan ve ölüme kadar gidebilen çeşitli hastalıklara sebep olan *S. aureus* patojeninin oluşturduğu enfeksiyonlara karşı tedavilere alternatifler aranmaktadır. Bu alternatif tedavilerden biri olarak bakteriyofaj ve bakteriyofajlardan türevlenen birçok antimikrobiyal proteinler enfeksiyonlara karşı umut verici olarak görülmektedir. *S. aureus* litik fajının lizis evresinde bakteriyi parçalamada rol oynayan holin proteininin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmesi ve ardından insanlarda ve hayvanlarda *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı etkili olabileceği ve antibiyotik gibi tedavilere etkili bir alternatif olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

# 2
# GENEL BİLGİLER

## 2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi

rDNA teknolojisi, doğal olarak bir canlı organizmada bulunmayan genetik bilgilerin bir araya getirilerek canlı organizmaya aktarılması ve organizmanın gelişmiş ve istenen özelliklere sahip olması için genomuna yapılan manipülasyon tekniklerinin tamamıdır [2]. Bu teknoloji ilgili genin organizma için uygun olan vektör ile organizmaya aktarılmasını içermektedir [3]. Organizmanın genomuna uygulanan manipülasyon, yeni gen/genlerin eklenmesi ile veya genlerin birleştirilmesiyle endojen genlerin ekspresyonunu azaltarak ya da bloke ederek gerçekleştirilmektedir [33].

Teknolojideki gelişmeler ile birlikte rDNA teknolojilerinde ilerlemeler kaydedilmiş olup günlük yaşamda dahi büyük etkileri görülmektedir [34]. Sağlık, gıda ve çevre ile ilgili geliştirme ve iyileştirme sağlayacak kritik proteinlerin güvenli, uygun maliyetli ve yeterli miktarda üretilmesini sağlamaktadır [1].

### 2.1.1 Vektörler

Rekombinant DNA teknolojisinde istenilen geni organizmaya atmakta kullanılan vektörler, konak hücre içerisine girdiğini saptamak için bir markıra ve DNA eklenmesini sağlamak için restriksiyon enzimleri tanıma bölgelerine sahip [5], ilgilenilen genin yüksek kopya sayısına ulaşabilmesi için replikasyon sayısının fazla olması gerekir [4]. Ayrıca izolasyonu ve kullanımlarının kolay olabilmesi için küçük olmadır çünkü bir vektörün boyutu 10 kb'nin üzerine çıktığında transformasyon etkinliği azalmaktadır [4][35]. Genel olarak kullanılan vektörler; plazmitler, virüs vektörleri, kosmid adı verilen melez moleküller ve ekspresyon vektörleri olarak sıralanabilmektedir [6].

Plazmitler, bakterilerde ve maya gibi bazı ökaryotik hücrelerinde genomlarından bağımsız, küçük, dairesel ve organizmaya farklı özellikler kazandıran DNA

moleküleridir. Organizmadan bağımsız olarak replike olabilmektedir [36]. Boyut ve kopya sayısı olarak farklılık göstermektedir. En küçük plazmitin boyutu 1 kb iken en büyük plazmit 250 kb'nin üzerindedir [35]. Kopya sayısı olarak ise tek kopya sayısından 50 veya daha fazla kopya sayısına sahip plazmitler vardır [37]. Doğal yapılarından dolayı rekombinant DNA teknolojisinde kullanıma uygun olmayan plazmitlerin DNA'sı çeşitli manipülasyonlar yapılarak geliştirilmiş ve rDNA'yı içerisine alarak konak hücre içerisine girebilecek şekilde tekrardan tasarlanmıştır [38][35].

rDNA teknolojisinde kullanılan virüs vektörleri genellikle çift iplikli olup tek iplikli DNA virüsleri de kullanılabilmektedir. Çift iplikli DNA virüsleri olarak klonlamada en çok *lambda (λ)* bakteriyofajı, tek iplikli DNA virüsleri olarak ise *M13* fajı kullanılmaktadır [38].

*λ* bakteriyofajında orta kısımda lizogenik yaşam için gerekli genlerin, sağ kolda düzenleyici ve lizis genlerinin, sol kolda ise baş ve kuyruk genlerinin bulunması fajı vektör olarak kullanılması için uygun hale getirmiştir [39]. Doğal olarak çok sayıda rekstriksiyon enzimi kesim bölgeleri bulundurmasından ve içerisine sadece 3 kb'lık bir DNA parçası alabilmesinden dolayı *λ* bakteriyofajına lizogenik bölgenin çıkarılması ve çoklu kesim bölgelerinin çıkarılması gibi çeşitli in vitro mutagenezler uygulanarak rDNA teknolojisinde özellikle genom ve cDNA kitaplıklarının oluşturulması için kullanılabilmesi sağlanmıştır [40][41]. Böylelikle *λ* bakteriyofajından insersiyon tipi vektör ve yer değiştirme vektörü olmak üzere iki tip vektör geliştirilmiştir. İnsersiyonvektörlerinde, orta kısımdaki lizogenik genlerin delesyona uğratılarak 7-8 kb DNA parçasının girebileceği uygun bir hedef bölgesi oluşturulurken, yer değiştirme vektörlerinde ise kesim bölgelerine ait iki tanıma bölgesi oluşturulup, bu bölgelerden kesilen DNA parçası yerine 9-23 kb'lık yabancı DNA parçası aktarılması sağlanmıştır. Böylece yer değiştirme vektörleri ile insersiyonvektörleri karşılaştırıldığında yer değiştirme vektörleri daha fazla yabancı DNA parçasını içeri alma kapasitesine sahip olmuştur [42]. *λ* vektörleri, plazmit vektörleri ile kıyaslandığında hücre içerisine transforme olabilme yeteneği ve DNA parçası klonlama kapasitesinin yüksek olması yönleriyle çok sayıda rekombinant hücre hattı kolaylıkla elde edilebilmektedir [38][42].

M13 fajı tek iplikli DNA virüsleridir. Hücre içerisine girdiğinde (+) ipliğin tamamlayıcı ipliği de (-) sentezlenir ve oluşan çift iplikli plazmit "RF plazmit" olarak adlandırılır. (-) iplik, virüs genlerinin ürünlerini sentezlerken; (+) iplik kılıf proteinlerinin sentezlenmesinde görevlidir [38]. M13 fajı küçük bir genoma, tek bir kesim bölgesine ve sadece 1500 bç kadar sınırlı yabancı DNA alma kapasitesine sahiptir [40]. M13 fajının vektör olarak kullanılması için çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bunlardan biri *E. coli*'nin laktoz operonundaki beta galaktozidaz geninin bir kısmı ile promotör ve operatör bölgenin bir kısmı çift iplikli M13 fajına eklenmiştir. Ayrıca lacZ geninin içerisine yabancı DNA parçası alabilmesi için bir EcoRI tanıma dizisi de eklenmiştir. Diğer bir modifikasyon restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerinin bulunduğu bir DNA parçasının fajın genomuna eklenmesidir [43].

### 2.1.2 Konak Olarak *E. coli Bl21(DE3)* Suşunun Kullanımı

Rekombinant DNA teknolojisinde protein üretimi için kullanılan birçok farklı konak hücre mevcuttur [44] ancak *E. coli* daha çok tercih edilen konak hücre olup terapötik rekombinant ürünlerin üretiminin yaklaşık üçte birinde kullanılmaktadır [7]. Terapötik üretimine ek olarak, diğer rekombinant proteinlerin ve metabolitlerin ekspreyonunda, protein mühendisliği ve yüksek verimli analiz çalışmalarında da kullanılmaktadır [45]. *E. coli*'nin rekombinant DNA teknolojisinde tercih edilmesinin sebepleri;

- İyi karakterize edilmiş bir genoma sahip olması,
- Kısa bir yaşam döngüsüne sahip olması,
- Kültürlenmesinin kolay olması,
- Kısa zamanda genetik olarak kolayca manipüle edilebilir olmasıdır [8].

### 2.1.3 Protein Ekspresyonu

Protein ekspresyonu aşamasında kullanılan kültür ortamı bileşenleri ve oluşturulan kültür koşulları önemli birer kriterdir. Yaygın olarak kullanılan kültür ortamları Luria-Bertani (LB) besiyeri, Terrific Broth (TB) besiyeri ve Super Broth (SB) besiyerleridir. LB besiyeri içerik olarak diğer besiyerlerine kıyasla düşük miktarlar içerdiğinden az miktarda protein üretimine neden olmaktadır [8].

Kültürlerin protein ekpresyonu aşamasında oluşturulan koşulların bazıları üretilen protein ile ilgili iken yüksek çalkalama hızları, yüksek miktarda oksijen oranları gibi bazı koşullar her protein üretimi için önemlidir [46]. Sıcaklık değerinin iyi belirlenmesi protein çözünürlüğünü etkilemektedir [46]. 15-25 °C gibi düşük sıcaklıklar çözünür proteinlerin üretimini artırırken, yüksek sıcaklıklar protein agregasyonuna sebep olmaktadır [47]

Vektörde bulunan T7 promotörü *E. coli* hücresinde en yaygın olarak kullanılan ve aktivitesi güçlü olan bir sistemdir [48]. İzopropil b-D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG) eklendiğinde, lac operatörüne LacI bağlanması engellenir, bu da hedef geni kopyalayan ve rekombinant protein üretimine yol açan T7 polimerazın ekspresyonuna izin verir. Rekombinant protein ekspresyonu, T7 RNA polimeraz tarafından transkripsiyonu inhibe eden T7 lizoziminin birlikte eksprese edilmesiyle kontrol edilebilir. T7 promotörü, izopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG) ajanı tarafından indüklenmektedir. IPTG laktoz permeaz (LacY) tarafından tanındığından dolayı hücre zarından aktif taşıma veya yaygın taşıma yolu ile hücre içerisine geçmektedir [49][50][51][46].

### 2.1.4 IMAC ile Protein Pürifikasyonu

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması, fonksiyonel ve yapısal çalışmalar için önemli bir koşuldur ve bu işlemleri kolaylaştırmak için yaygın olarak rekombinant proteinin N- veya C- terminaline bağlanmış bir afinite etiketi kullanılmaktadır [52]. Afinite etiketlerinden polihistidin ile etiketleme, rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan en yaygın ve çok yönlü bir stratejidir [53]. Saflaştırmada kullanılmasının avantajları arasında 0.84 kDa gibi küçük bir boyutta olması, fizyolojik pH'da yüksüz olması, çok düşük immünojenisiteye sahip olması ve toksik olmaması sayılabilmektedir [52][54].

Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC), histidin etiketli proteinlerin reçine üzerinde immobilize hale getirilmiş iki değerlikli metal iyonlarına bağlanarak saflaştırılmasına dayanan bir yöntemdir [55]. Reçineye immobilize edilen ve histidin için yüksek bir afiniteye sahip olan metaller bakır, kobalt, nikel ve çinko olarak gösterilebilmektedir [56]. IMAC yöntemi doğal veya denatüre edici koşullar altında sırasıyla bağlama, yıkama ve elüsyon

aşamalarından oluşmaktadır. Doğal ya da denatüre edici koşulların belirlenmesi; proteinin hücredeki konumuna, çözünürlüğüne ve metal iyonlarının His etiketine erişip erişememe durumuna bağlıdır [57] Örneğin; proteinlerin agregat oluşturması, denatüre edici koşullar altında IMAC yöntemi ile saflaştırma yapılmasına neden olmaktadır. Denatüre edici koşulların sağlanmasında genellikle 8M üre veya 6M guanidin hidroklorik asit kullanılmaktadır [52].

IMAC yönteminde bağlanma aşamasında his etiketli proteinler metal iyonlarına bağlanır, yıkama aşamasında, his etiketi kadar kuvvetli bir bağ yapmamış veya bağlanmamış proteinler kromatografiden ayrılır. Elüsyon aşamasında ise kullanılan solüsyondaki imidazol miktarı artırılarak his etiketli proteinlerin metal iyonlarından ayrılması sağlanır [58].

## 2.2 *Staphylococcus aureus* Bakterisinin Genel Özellikleri

Stafilokoklar, Gram pozitif, aerob ya da anaerob (fakültatif), katalaz pozitif [9], sporlanmayan ve 0.5-1.5 $\mu$m çapındaki [10] *Micrococcaceae* ailesinde yer alan koklardır [9]. Hava ve yüzeydeki toz partikülleri ile kolayca yayılabilen Stafilokoklar [10], çeşitli memeli ve kuşların deri, mukoz membranlarının, sindirim ve solunum yollarının normal florasında bulunurlar [9]. Bu yüzden kan dolaşımına veya iç dokulara girişine izin verilmediği takdirde enfeksiyona neden olmazlar [10]. Patojen sınıfında yer alan bazı Stafilokok türleri insan ve hayvanların deri, kulak ve eklem yerlerinde piyojenik enfeksiyonlar neden olurken [9], pnömoni, kalp iltihabı, menenjit ve artrit, ve osteomiyelit gibi hastalıklara da neden olabilmektedirler [10]. Toplum ve hastanelerde önemli [11] stafilokokal patojen türlerden biri olan *S. aureus* bakterisinin bazı suşları, döküntüye, kusmaya, ishale, yüksek ateşe biyofilm ile bağlantılı olan birçok kronik hastalığa ve ölüme neden olan toksik şok sendromuna sebep olabilirler [12][10]. *S. aureus* bakterisi, üzüm benzeri olarak adlandırılan kümelenme düzenine sahip, kolonileri genellikle sarı renkte olan, 18-40°C arasında büyüme sıcaklığına sahip koktur [59]. *S. aureus*; koagülaz, lökosidin ve hemolizin virülans faktörlerine sahiptir [60]. Ek olarak biyokimyasal tanımlama testlerinde diğer *Staphylococcus* türlerinden *S. aureus*'u ayıran koagülaz pozitif, novobiyosin hassaslığı, mannitol fermentasyon pozitif özellikleri mevcuttur [61]. İnsan popülasyonunun %15'inde

ön burun deliklerinde bulunmakta olup; sağlık çalışanları, diyabet hastaları ve damar içi ilaç kullananlar gibi düzenli olarak iğne kullananlar, hastane yatan hastalar ve immün sistemi baskılanmış bireyler gibi bazı popülasyonlarda kolonileşme oranı daha yüksektir [62]. Dünyada ve ülkemizde giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebepleri arasında stafilokoklar görülmektedir [63]. Nitekim, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2021 UHESA (Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı) raporunda hastane enfeksiyonlarına neden olan bakterilerdeki antimikrobiyal dirençli patojen dağılımında ilk sırada karbapenem dirençli *A. boumannii* (% 91.11) yer alırken ikinci sırada metisiline-dirençli koagülaz negatif stafilokok (% 85.99) ve yedinci sırada metisiline-dirençli *S. aureus* (MRSA) (% 48.19) yer almaktadır [13].

Veri tabanlarında *S. aureus* ile ilgili araştırmalar hala artmakta olup enfekte olmuş hastaların iyileşme oranlarının artışı, bununla birlikte küresel olarak enfeksiyon görülme sıklığının düşüşü beklenirken *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavi için kullanılan çeşitli antibiyotiklerin yanlış ve yoğun kullanımı ile oluşmuştur [10]. Dirençli suşlardan biri olan MRSA enfeksiyon insidasının hem hastane hem de toplumda arttığı gözlenmiştir [11]. MRSA suşları bakteri hücre duvarında peptidoglikan üretimini katalize eden temel bakteri hücre duvarı enzimi olan ve beta laktamlara bağlanma açısından düşük afiniteye sahip PBP-2a'yı üretir ve bu sayede antibiyotik varlığında bile hücre duvarını sentezleyerek çoğalabilirler [62].

### 2.2.1 *S. aureus* Enfeksiyonlarının Tedavi Yöntemleri

*S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde penisilinler, sefalosporinler, sülfonamidler, tetrasiklinler, glikopeptitler ve diğerleri dahil olmak üzere antistafilokokal antimikrobiyaller kullanılmış [64] ve güçlü, geniş spektrumlu bu antibiyotiklerin aşırı kullanımı, gıda/hayvancılık endüstrisinde antibiyotiklerin varlığı ve ev ürünlerine antimikrobiyallerin dahil edilmesi gibi uygunsuz antibiyotik kullanımı bakterilerin direnç geliştirmesine ve bunun da tedaviyi karmaşık hale getirmesine sebep olmuştur [14]. 1960'lı yıllarda *S. aureus* suşlarında β-laktam antibiyotiklerinden biri olan metisiline karşı direnç geliştirilmiş izolatlar diğer adı ile MRSA suşları görülmüştür. Bu dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması ile metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının neden

olduğu enfeksiyonlarına karşı sefalosporinler, oksasilin veya nafsilin gibi β-laktam antibiyotikleri kullanılırken, MRSA enfeksiyonlarına karşı diğer antimikrobiyal sınıflarındaki antibiyotikler kullanılmıştır. Özellikle vankomisin MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan en yaygın ilaçtır [64].

Tüm çok hücreli organizmaların doğuştan gelen ve spesifik olmayan immün sisteminde bulunan antimikrobiyal peptitlerin (AP) Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, zarflı virüsler, mantarlar ve parazitler gibi mikroorganizmalara karşı geniş aktivite spektrumlarına sahip olmalarından dolayı antibiyotiklere alternatif terapötik ajanlar olarak potansiyelleri incelenmiştir [65][66]. Bu peptitlerin çeşitli mikroorganizmaların doğrudan yok edilmesinde rol oynayan peptitler oldukları bilinmekte ve bakterilerin peptitlere karşı direnç oluşturma eğilimlerinin düşük olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bakterilerin AP'lerin öldürücüleri etkilerini engellemek için çeşitli önlemler geliştirdiği gözlemlenmiştir [14].

Diğer alternatif tedavi yöntemlerinde antikorlar, probiyotikler, bağışıklık uyarıcılar, aşılar, konak savunma ve antibiyofilm peptitleri, bakteriyofajlar ve lizinler en gelişmiş yaklaşımlar olarak görülmektedirler [15].

Son on yılda çoklu antibiyotik direnci geliştiren bakterilere karşı faj antimikrobiyalleri yeniden araştırılmaya başlanmıştır. Faj tedavisi dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için umut verici bir alternatiftir [16]. Ayrıca, faj genetiği ve biyolojisinin giderek artan bilgisi, tedavide fajların ve fajdan türetilmiş partiküllerin hastalıkların teşhisi, bakteri tespiti, gıda ürünlerinin korunması, hayvan yetiştiriciliği ve tarım gibi alanlarda başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlayacaktır [67].

## 2.3 Bakteriyofaj

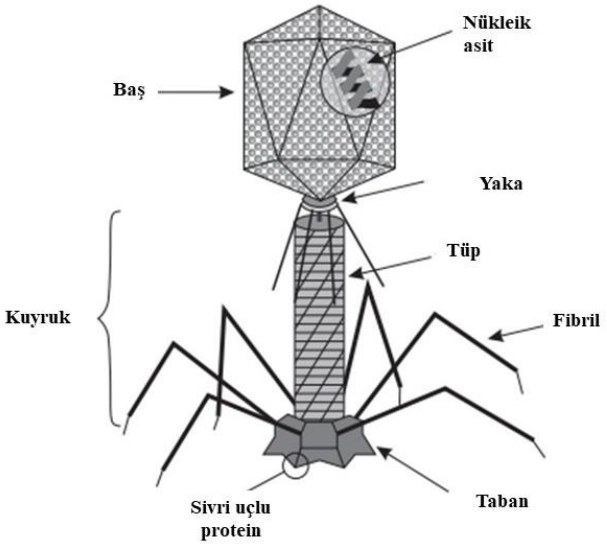
Bakteri <bacteria> ve Yunanca yemek anlamına gelen "Phagein" kelimelerinden türetilmiş [23] olan bakteriyofajlar diğer adıyla fajlar, bakterileri konak olarak kullanarak onları enfekte eden ve çoğalan temel nükleik asit ve protein bileşenlerinden [19] oluşan virüslerdir [20].

Küresel biyojeokimyasal döngülerde önemli rollere sahiptir ve hem konakçı popülasyonunu hem de ekosistem işlevlerini kontrol etmektedirler [24]. Dünyada

kanalizasyon, dışkı, toprak, derin termal sularda, doğal su kütleleri gibi [19] her nişte bol miktarda fajlar ve faj partikülleri bulunmaktadır [20] ve yaklaşık olarak $10^{31}$ olarak kabul edilmektedir [22].

### 2.3.1 Bakteriyofajların Yapısı

Fajların nükleik asitleri, genellikle faj enfeksiyonu sırasında faj nükleik asidinin konakçıdaki nükleik asit parçalayan nükleazları tarafından parçalanmasını engelleyen alışılmadık ya da modifiye bazlar içermektedir. Fajlardaki gen sayıları da farklılık göstermektedir. Basit fajlar yalnızca 3-5 gene sahip olabilirken; karmaşık fajlar olarak adlandırılan fajlar 100'ün üzerinde gene sahip olabilmektedir [68]. Bazı fajların nükleik asitleri olarak tek sarmallı DNA'ya sahip oldukları bilinmektedir. Çoğu fajın boyu 24- 200 nm arasında değişmektedir [69]. Tüm fajların baş yapıları boyut ve şekil bakımından değişiklik göstermektedir. Bazı fajlar ikosahedral olarak adlandırılan 20 kenarlı bir yapıya sahipken; bazı fajlar ipliksi yapıda olabilmektedir [70]. Baş kısmı nükleik asidi çevrelemekte ve nükleik asidi için koruyucu olarak görev almaktadır. Bazı fajlarda bulunan kuyruk kısmı ise enfeksiyon olarak tanımlanabilen konakçıya giriş esnasında nükleik asidin içinden geçtiği boş bir tüp olarak görev almaktadır [71] Altıgen levha ve kuyruk lifleri fajın bakteri hücresine bağlanmasını sağlamaktadır ancak bütün fajlarda altıgen alt levha ve kuyruk lifleri bulunmamaktadır [21] (Şekil 2.1).

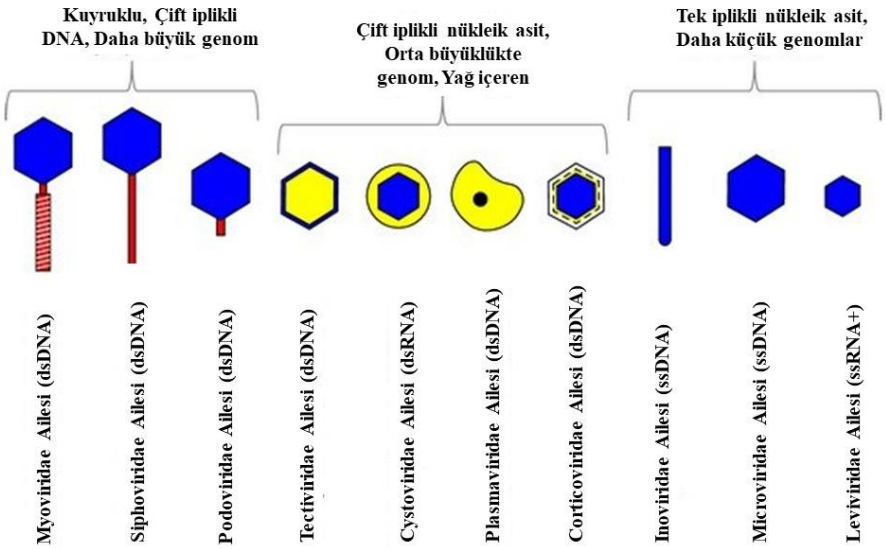



**Şekil 2.1** Bakteriyofaj yapısı [72]'dan düzenlenmiştir

### 2.3.2 Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Fajların morfolojileri, genom tip ve göreceli boyutlarına göre üç gruba ayrılabilmektedir. Genom tiplerine göre çift ya da tek sarmal DNA veya RNA içermelerine, morfolojik olarak ise; genom tip ve göreceli boyutlarına göre üç gruba ayrılabilmektedir. İlk grup kuyruğa, çift sarmallı DNA'ya ve görece büyük bir genoma sahip olan faj ailelerini kapsamaktadır [73]. Karakterize edilmiş fajların çoğunun çift sarmallı DNA genomuna ve kuyruğa sahip olduğu bildirilmiştir. Bu grup, *Myoviridae, Podoviridae* ve *Siphoviridae* ailelerinden oluşmaktadır. Bu üç aile Caudovirales takımında tanımlanmaktadır. *Myoviridae* ailesi, uzun bir kontraktil kuyruğa sahip ve kapsid boyutlarında çok fazla değişkenlik gösteren bir faj ailesidir. *Podoviridae* ailesi, kısa kontraktil olmayan bir kuyruğa sahiptir. Siphoviridae ailesi ise uzun kontraktil olmayan kuyruğa sahiptir [74].

İkinci grup, çift sarmallı nükleik aside ve orta büyüklükte bir genoma ayrıca lipid içeriğine sahip olan aileleri içine almaktadır. Bu ailede *Tectiviridae, Cystoviridae, Plasmaviridae* ve *Corticoviridae* aileleri yer almaktadır [73]. Corticoviridae ailesi, dairesel bir dsDNA genomuna ve majör kapsid proteini (MCP) ile çevrili bir iç lipidik membrandan oluşan bir kapside sahiptir [75]. *Tectiviridae* ailesi üyeleri, doğrusal bir dsDNA genomu ve iç lipidik membran içeren bir ikosahedral kapside sahiptir [76]. *Plasmaviridae* ailesine ait fajlar, bir lipidik zarfla çevrelenmiş ve kapsid içermeyen dairesel bir dsDNA genomuna sahiptir [77]. Çift sarmallı RNA'ya sahip olan *Cystoviridae*, üç yapısal katmana sahip küresel bir kapsid içinde yer ala üç parçalı bir dsRNA'ya sahiptir [74][78]. Tek sarmallı nükleik aside ve küçük genoma sahip olan üçüncü grupta [73] genomu MCP'nin binlerce kopyasından oluşan uzun bir filamanın içinde paketlenmiş dairesel bir süpercoil tek sarmallı DNA (ssDNA) molekülünden oluşan *Inoviridae*, ikosahedral kapsidlere ve küçük dairesel (ssDNA) genomlara sahip olan *Microviridae* ve tek sarmallı RNA'ya sahip olan *Leviviridae* aileleri yer almaktadır [74] (Şekil 2.2).

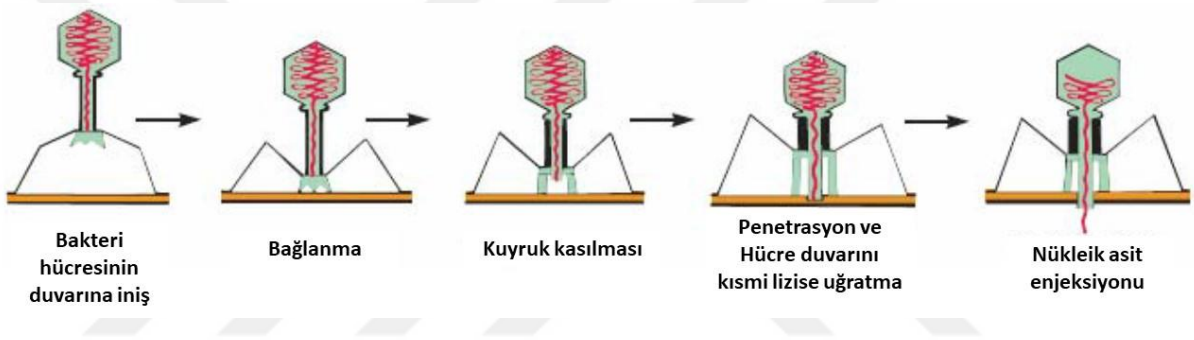



**Şekil 2.2** Bakteriyofaj aileleri, morfolojileri, genom tipleri ve göreceli genom boyutları [73]'dan düzenlemiştir

### 2.3.3 Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü

Bakteriyofajın konak hücreyi enfekte etme sürecinin ilk adımı, konak hücrenin lipopolisakkarit (LPS), dış membran proteinleri (teikoik asitler), flagella gibi hücre yüzeyindeki fajın sadece belirli konakları enfekte etmesine sebep olan özgül reseptörlere geri döndürülebilir adsorpsiyonudur [22]. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler karşılaştırıldığında; Gram negatif bakteriler LPS tabakasına ve dış zar proteinleri (OMP)'ne sahiptir. Bununla birlikte, Gram pozitif bakteriler hücre duvarında teikoik asitleri taşırlar [24]. Özgül reseptörlere ek olarak gram boyama tipi, büyüme koşulları ve virülans da fajın yüzeyine bağlanmasına etki eder [79]. Adsorpsiyon aşaması sırasında, kuyruk lifleri veya kuyruk liflerinden yoksun olan fajlarda bakteri hücre duvarındaki polisakkaritleri depolimerize edebilen enzimatik aktiviteye sahip [23] benzer yapılar bulunmaktadır [21]. Alt levhanın bir ya da birden fazla bileşeni yapısal olarak yeniden düzenlenerek faj ile bakteri arasında geri döndürülemez bir bağlanma oluşturmaktadır [23]. Bağlanma, kılıfın büzülmesine neden olarak faj kuyruk kısmının bakteri zarfı boyunca itilmesi ve ardından alt levha ile bakteri yüzeyi arasında bir tutunma gerçekleşmektedir [21][24]. Fajın genetik materyalinin konak hücre içerisine girmesi için faj kuyruk tüpünün konak hücrenin periplazmasının içerisine girmesi

gerekmektedir. Bu aşamada faj, bakteri hücre zarında bir boşluk oluşturmak için çeşitli lizinler ve karbonhidrat depolimerazlar kullanılır ve bu şekilde bir transmembran kanalı oluşur [23]. Penetrasyon süreçleri de bakteriler arasında farklılık gösterebilmektedir. Örneğin; *Myoviridae* ailesindeki fajlar, kuyruğunun şırınga benzeri hareketi ile genetik materyallerini bakteri hücresine sokarken, *Podoviridae* ailesindeki fajlar kuyruk kısmından yoksun olmaları nedeniyle kuyruk liflerinin kullanılmasıyla konak hücre zarının bir kısmını enzimatik olarak parçalayarak genetik materyalini bakteri hücresine sokar [24]. Baş kısmındaki nükleik asit ATP yardımıyla [24], kuyruğa gelmesiyle birlikte kuyruk kasılır ve genetik materyal bakteri hücresine girer. Bakteri hücre duvarına bağlanan fajın geri kalanı, bakterinin dışında "hayalet" olarak kalır [21] (Şekil 2.3).




**Şekil 2.3** Bakteriyofaj nükleik asidinin bakteri hücresi içerisine girmesi [21]'dan düzenlemiştir

Bir fajın enfekte ettiği bakteride çoğalma yöntemi 4 farklı şekilde olmaktadır; litik, lizogenik, pseudolizogenik, kronik enfeksiyon.

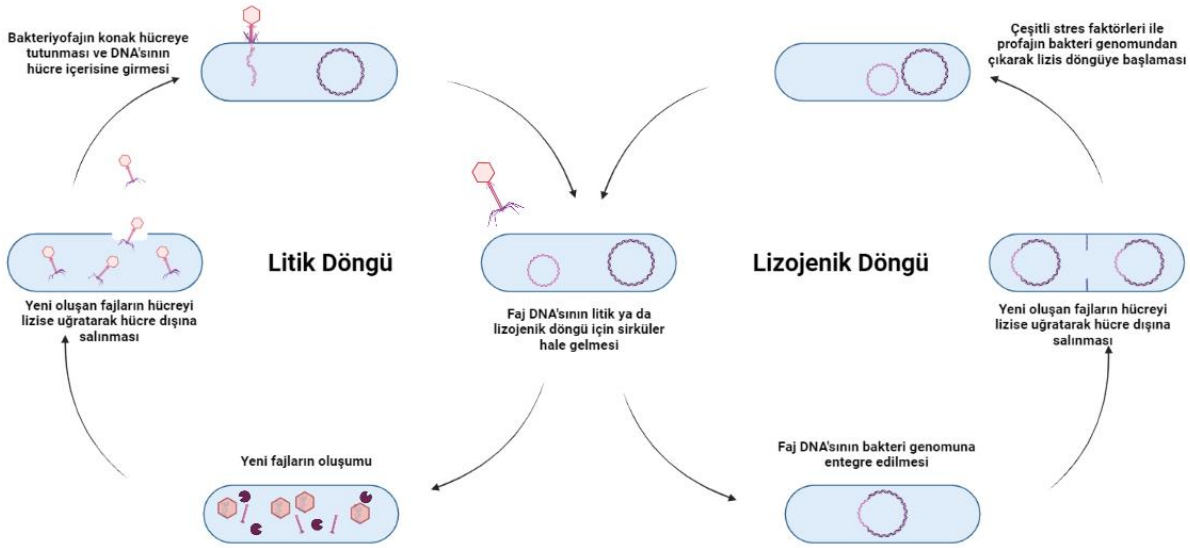
Psödolizojeni, faj genomunun bakteri hücresinin içerisine epizom adı ile adlandırılan plazmit benzeri bir yapı olarak girmesidir [80]. Bu yapı konağın açlık stresi ile ilişkili olarak hem litik hem lizogenik fajlarda görülebilir. Bakteri hücresinin içerisine giren genom, stres faktörü ortadan kalkana kadar epizom inaktif kalır ve gelişim döngüsü durdurulur [23]. Böylece konak bir faj taşıyıcısı olur ve bakteri çoğaldıkça epizom asimetrik olarak bölünerek enfekte olan ve olmayan iki farklı hücre soyunun oluşumuna yol açar [80].

Bazı filamentli fajlarda ve arke virüslerinde gözlemlenen kronik enfeksiyon durumu, faj virionlarının litik döngüdeki gibi tek bir parçalama ile hücre dışına

salınması yerine hücre yüzeyinden yavaş ve sürekli olarak salınması ile oluşan bir süreçtir [23]

Lizogenik fajlar, konak hücrede hem dormansi hem de litik durumunu gösterebilmektedir [21]. Bu tür fajlar, rekombinasyon ya da transpozisyon ile genomlarını konak hücrenin kromozomuna entegre olur [23]. Faj DNA'sı bu durumda profaj halini alırken, konak hücre lizojen olarak adlandırılır. Profaj, lizojen ile lizojene ölümcül bir etkisi olmadan sürekli çoğalarak bakteri popülasyonu içerisinde korunur [20]. Bu şekilde, enfekte bakterilerin fenotipinde patojenitisini indükleyebilen değişikliklere sebep olabilir [24]. Bununla birlikte lizogenik durum UV ve iyonize radyasyona maruz kalma, kuruma ve mutajenik kimyasallara maruz kalma gibi bazı stres koşullarının etkisiyle bakteri genomundan fajın ayrılmasına sebep olarak litik döngüye geçebilir ve bu duruma indüksiyon adı verilir. İndüksiyon durumu ile konak hücreden salınan fajlar başka bir konak hücreyi enfekte ederek lizogenik durumda kalabilir [21].

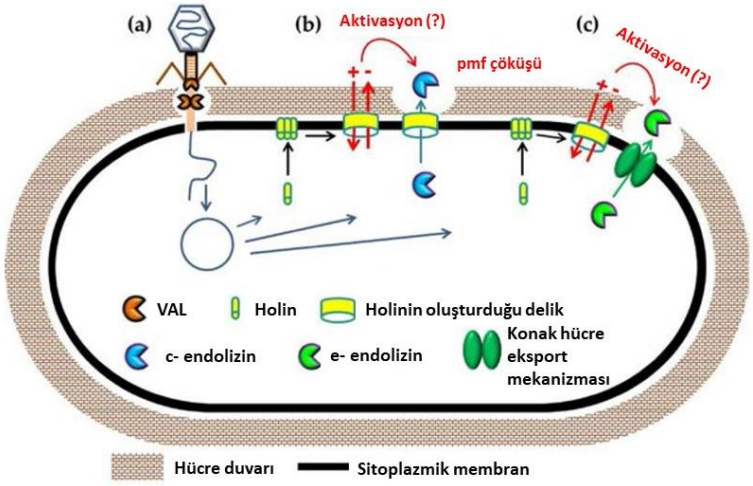
Son olarak litik fajlar diğer adıyla virülan fajlar, konak hücrenin çoğalma mekanizmasına el koyarak bakteriyofaj üretilmesini sağlar [20]. Faj nükleik asidinin bakteri hücresine girişi ve olgun fajların bakteri hücresinden salınması arasında kalan süreçleri içeren faz tutulma fazı olarak adlandırılmaktadır [21]. Faj, bakteri hücresinin metabolik mekanizmasını kullanarak kendi genetik materyalinin çoklu kopyalarını oluşturmaktadır. DNA virüsleri kendilerini mRNA moleküllerine kopyalarken RNA virüsleri ters transkriptaz enzimi ile viral RNA'yı DNA'ya kopyalayarak mRNA üretimini gerçekleştirir [24]. mRNA'lardan baş, kuyruk gibi fajın yapısal proteinleri ayrı ayrı üretilerek birleştirilir, nükleik asit ile yüklenerek oluşturulan tam bir faj bakteri hücresinin parçalanmasıyla hücre dışına salınır [22]. Lizis ve yeni üretilen fajların dış ortama salınması aşamasında yapısal proteinlerin yanı sıra bakteri hücresinin lizisine yol açmak için sentezlenen lizis proteinlerinin hücrede birikmesiyle hücre parçalanmaya başlar ve yeni oluşturulan fajlar ortama salınır [21] (Şekil 2.4).




**Şekil 2.4** Bakteriyofajların litik ve lizojenik döngüsü

### 2.3.4 Faj Litik Proteinleri

Kuyruk yapısına sahip olan fajların büyük çoğunluğu, fajın genetik materyalini konakçı hücrelere vermek ve daha sonra viryon soyunun enfekte olmuş hücrelerden salınmasına izin vermek olan enfeksiyon döngüsünün iki temel adımında hücre duvarı bariyerini aşması gerekir [81]. İki temel adımdaki proteinler; faj kuyruk kısmının penetrasyonuna ve konak hücrenin sitoplazmasına faj DNA'sının geçirilmesine yardımcı olmak için hücre duvarı peptidoglikanı lokal olarak sindirilmesini destekleyen virion ilişkili lizin (VAL) ve konak hücrenin peptidoglikanını sindiren ve oluşturulan fajların salınmasını sağlayan endolizin ve holin olarak isimlendirilen litik proteinlerdir [27] (Şekil 2.5).




**Şekil 2.5** Litik proteinlerin görevleri [27]'den düzenlenmiştir

#### 2.3.4.1 Viryon İlişkili Lizin (VAL)

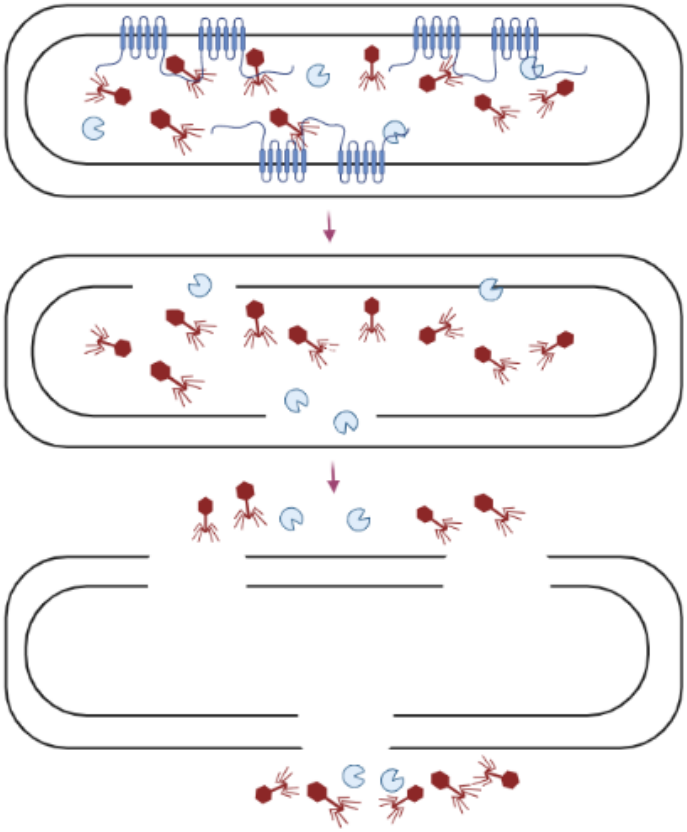
Penetrasyon sırasında hücre dışından hücre duvarı peptidoglikan omurgasının N-asetilmuramik asit ve N-asetil-D glukozamin kalıntıları arasındaki 1,4-s-bağlarını hidrolize edilmesinde etkili ve faj kuyruğunda yer alan viryon ilişkili peptidoglikan lizozim gibi fajla kodlanmış enzimler görev almaktadır [22]. Faj enfeksiyonunda konak hücre duvarı peptidoglikanı, önce faj nükleik asidinin konak hücre sitoplazmasına girişi sırasında konak hücre canlılığını tehlikeye atmaktan kaçınmak ve döngü tamamlanmadan önce lizizin meydana gelmemesi için faj litik enzimleri tarafından kontrollü bir şekilde lokal olarak kesilir [82].

#### 2.3.4.2 Bakteriyofaj Endolizin-Holin Litik Sistemi

Çift sarmallı DNA genomuna sahip fajlar, viryonların salınımı sırasında, büyüme döngülerini sonlandırmak ve hücreleri hızlı bir şekilde lizise uğratmak için holin-lizin lizis sistemleri olarak bilinen bir strateji geliştirmişlerdir [28][29]. Bu litik fajların bakterileri lizize uğratması sırasında, sitoplazmik membranın geçici olarak kontrollü bir şekilde geçirgen hale gelmesi ve ardından peptidoglikanın enzimatik olarak bozunması gerçekleşir [81]. Endolisinler, peptidoglikan (PG) ağını kesmekle görevli PG hidrolazlar olarak bilinmekte olup enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasında üretilerek hücre duvarına ulaşmaktadır [30]. Litik etkisini uygulamak için hücre membran bariyerini aşmaya ihtiyaç duymaktadır. Bu enzimler genel olarak hücre duvarına ulaşmak için kullandıkları yolaklara bağlı olarak kanonik endolizin (c- endolizin) ve “exported” endolizin (e- endolizin) olarak sınıflandırılır [27]. Bu sınıflandırma, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ile Mikoplazma bakterilerindeki farklı endolizin-holin sisteminden dolayı oluşan bir sınıflandırmadır [81]. Kanonik endolizin- holin sistemi hem Gram pozitif ve Mikoplazma bakterilerinde hem de Gram negatif bakterilerde görülen bir sistemdir. Kanonik endolizin, holin proteinine sitoplazmadan hücre duvarına geçebilmek için ihtiyaç duyar [27]. Bazı faj endolizinleri pinholin/sinyal çapa salma (SAR) endolizin sistemi ile bakterileri lizize uğratmaktadır. Fajlar, endolizinlerin hücre duvarına erişimlerinde bakterinin Sec salgı sistemini kullanmaktadır. Pinholin membranı depolarizasyona uğratana kadar iç membranda birikir böylece endolizin aktif hale geçer [31].

Holinler, büyük bir aile olmasına rağmen bugüne kadar 52 holin ailesi tanımlanmış olup iyi karakterize edilmiş holinler dışında aynı zamanda bilinmeyen işlevlere sahip uzak holin homologları da Transporter Classification Database (TCD) veritabanına girilmiştir [83][84]. Holinler, enfeksiyon sırasında belirli bir konsantrasyona ulaşıncaya kadar bakteri hücresinin iç membranında biriken ve daha sonra konakçı hücrenin sitoplazmik membranına oligomerik olarak yerleşen hidrofobik proteinlerdir [29][31]. Genetik olarak programlanmış bir zamanda zar proton motif gücünün yıkımına neden olan deliklerin oluşumunu tetikleyerek büyümenin durmasına ve hücre ölümüne yol açar. Diğer bir görevi de sitozolde biriken ve hücre duvarının degredasyonuna neden olan endolizinlerin, oluşan bu deliklerden salınmasına izin vermektir [29] (Şekil 2.6). Tanımlanmış holin dizilerinin benzerlikleri olmamasına rağmen bazı ortak özellikleri vardır: 1) Çoğu holin geni endolizin genine bitişiktir. 2) Tüm holinler en az bir hidrofobik α- sarmal transmembran alanına (TMD) ve yüklü hidrofilik bir C terminal alanına sahiptir [28][83]. Topolojik olarak holinler üç sınıfa ayrılmaktadır: İlk olarak *Bakteriyofaj I* S proteini ve *S. aureus* faj *P68* Hol15 proteinin de bulunduğu Sınıf I holinler, 95'ten fazla rezidüye sahip olup üç TMD bölgesinden oluşmaktadır. Sınıf II holinler ise Sınıf I'e göre küçük olup 65 ila 95 kadar rezidüye ve iki TMD bölgesine sahiptir. Sınıf I holinler ile karşılaştırıldığında Sınıf II holinlerin endolizin enziminin yokluğunda da bakteri lizisine neden olduğu gözlemlenmiştir [85]. Sınıf II holinlere *Lambdoid faj 21*'den *S* ve *Clostridium perfringens* bakteriyofaj *Φ3626*dan Hol3626 proteinleri örnek olarak verilebilir [28]. Sadece TMD bölgesine sahip olan Sınıf III holinler Sınıf I ve II holinlerden daha az holin ailesi içermekte olup [86], *ΦCP39O ve ΦCP26F* holin proteinlerini de bu sınıfa girmektedir [28][87].

Holin ve endolizine ek olarak Gram negatiflerin dış membranını yıkımına yol açan ve spanin adı verilen proteinler de bakteri lizisinde yer almaktadır [88]. Spaninler, iç ve dış membranın kaynaşmasını sağlayarak holin- lizin sistemine yardımcı olmaktadır [31].



**Şekil 2.6** Gram pozitif bakterilerde holin ve endolizinlerin hücreyi lizise uğratması

### 2.3.4.3 Holin Proteininin Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

Literatürde faj litik proteinlerin bakteri üzerinde antibakteriyel etkileri, hücre içinde rekombinant olarak eksprese edildiklerinde ve eksojen olarak uygulandığında gözlemlenmiştir.

*S. aureus* bakterisini enfekte eden *GH15* fajından alınarak recombinant olarak üretilen HolGH15 proteini çeşitli bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiş olup 2021 yılında Song ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gıda kaynaklı patojen olan *Listeria monocytogenes* üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada HolGH15 proteininin 3 farklı *L. monocytogenes* suşuna eksojen olarak uygulandığında bakteriyosidal etki gösterdiği ve holin proteininin gıda imalatı ve depolanmasında püskürtme veya ıslatma yoluyla kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir [83].

*Streptomyces avermitilis* bakteriyofajı olan *phiSASD1*'in holin proteini olan HolSD ekzojen olarak çeşitli suşlara verildiğinde etki gösterdiği, aynı zamanda *E. coli BL21*'de eksprese edilirken bakterileri öldürdüğü gözlemlenmiştir [89]

2012 yılında Shi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda *Streptococcus suis*' i enfekte eden *SMP* bakteriyofajından elde edilen litik enzimler rekombinant olarak üretilmiş ve bakteriye etki ettikleri görülmüştür. Aynı çalışmada holin proteininin antimikrobiyal ajan olduğu ve dışsal uygulandığında *S. aureus*' a etki ettiği gözlemlenmiştir [90].

Holin proteinlerinin bakteri hücresi üzerinde etkili antibakteriyel aktivite göstermesine ek olarak holin proteinleri in vitro olarak ökaryotik tümör hücrelerinin canlılığını ve boyutunu azalttığı gösterilerek anti-kanser ajanı olarak kullanılabileceği de ortaya koyulmuştur [32]. 2005 yılında Agu ve arkadaşlarının $\lambda$ bakteriyofajından elde edilen holin ile yaptıkları çalışmada holinin in vitro ökaryotik hücreler için sitotoksik olduğu ve kanser gen terapisinde potansiyel bir terapötik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [91].

# 3
# HAZIRLIKLAR

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı- Biorad T100™ Thermal Cycler
- Yatay elektroforez- Mini-Sub® Cell GT Systems
- Dikey elektroforez- Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems
- Güç kaynağı- Biorad Powerpac Basic
- Western Transfer Sistemi- Trans-Blot Turbo Transfer System
- Nanodrop- Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers
- Soğutmalı Santrifüj- Beckman Coulter- Allegra X-30R Centrifuge
- Çalkalayıcı- Biosan 3D Sunflower Mini-Shaker
- Hassas terazi- Shimadzu ATX224 Analitik Terazi
- Manyetik Karıştırıcı- RH basic
- pH metre- Mettler Toledo Seven Compact/Ion S220
- Mikrodalga- Arçelik
- UV görüntüleme cihazı- Vilber Lourmat UV Camera and Transilluminator
- Soğutmalı Etüv- JSR Büyük Hacimli Etüv
- Etüv- Memmert UN55
- Buzdolabı- Arçelik Altus
- Isı bloğu- Inovia Dry Bath
- Sonikatör- Bandelin SONOPULS Ultrasonic Homogenizers
- Vortex- IKA V1S000
- UV Spektrofotometre- Shimadzu UV 1800
- Kabin- ESCO Class II
- Milipore- Q Gradient Su Cihazı
- -80°C dondurucu- Thermo Scientific FORMA 702

### 3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Kültür ortamında çoğaltılmış *S. aureus faji* (ATCC® 19685-B1™) ticari olarak, *S. aureus* (ATCC 25923) ve *E. coli Bl21(DE3)* bakterileri ise Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edildi. *S.aureus*, Brain Heart Infusion (BHI) (Millipore) sıvı besiyerinde kültüre edildi. *S. aureus* fajının kültür ortamında çoğaltılması ve depolanmasında çift tabaka agar metodu kullanıldı. *E. coli Bl21(DE3)* suşu ise, LB sıvı ve LB agar besiyerlerine ve ilave olarak klonlama deneyi aşamasında Katabolit Baskılayıcı ile Süper Optimal Sıvı Besiyeri (Super Optimal broth with Catabolite repression-SOC) medyumunda kültüre edildi.

### 3.1.3 Genomik ve Plazmit DNA İzolasyonları

Phage DNA Isolation Kit (Norgen) ve Qiagen® Miniprep Kit reaktifler (Qiagen) reaktifleri kullanıldı.

### 3.1.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Elektroforez Reaktifleri

Kullanılan primerler ticari bir firmaya sentezlettirildi ve PZR cihazında (Biorad T100™ Thermal Cycler) gerçekleştirildi. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (60 U/$\mu$L) (Thermo Scientific), dNTP solüsyonu (25 mM) (Thermo Scientific), agaroz (Sigma-Aldrich), Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon (Multicell), 6X Tritrack DNA boyası (Thermo Scientific), yükleme boyası (Thermo Scientific) ve DNA markırı (Thermo Scientific 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific 100 bç DNA ladder,) PZR ve elektroforez aşamalarında kullanılan reaktiflerdir.

### 3.1.5 PZR Ürününün Saflaştırılması

PZR reaksiyonu ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi jelden QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) protokolüne göre kesilip saflaştırıldı.

### 3.1.6 Ultra Kompetan Hücre Hazırlanması

*E. coli Bl21 (DE3)* suşusunun inkübe edildiği zengin besiyeri SOB için $MgCl_2$, % 0,5 bakteriyel maya özütü (Multicell), % 2 tripton (Multicell), NaCl (Sigma), KCl (Multicell); kompetan hale getirilmesi için uygulanan $CaCl_2$ içeren TB tamponu

için pipes (Biomatik), $CaCl_2.2H_2O$ (Multicell), KCl ve $MnCl_2.4H_2O$ (Fluka) kimyasalları kullanıldı.

500 ml SOB besiyeri hazırlanışı:

% 2 Bakteriyel Tripton (10 gr), % 0.5 Bakteriyel Maya Özütü (2.5 gr), 10 mM NaCl (0.29 gr), 2.5 mM KCl (0.093 gr), 10 mM $MgCl_2$ (1.016 gr), 500 ml distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılarak otoklavlandı.

150 ml TB (İnoue) tamponu hazırlanışı:

10 mM pipes (0.45 gr), 15 mM $CaCl_2.4H_2O$ (0.3gr), 250 mM KCl (2.79 gr) 100 ml distile su ile çözdürüldü. pH'ı KOH çözeltisi ile 6.7'ye ayarlandı. 55 mM $MnCl_2.4H_2O$ (1.632 gr) eklendi, karıştırıldı ve 150 ml'ye distile su ile tamamlandı. 0.22 $\mu$m por çapına sahip filtreden geçirildi.

### 3.1.7 Klonlama ve Ekspresyon

Klonlama için pLATE51 vektörü (Thermo Scientific), transformasyon seçilimi için ampilisin antibiyotiği (Multicell), ekspresyonda bakteri kültürlerinin inkübe edildiği besiyeri olarak LB sıvı besiyeri ve ilgilenilen genin anlatımını indüklemek için isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (BiolineBIO37036) kullanıldı.

### 3.1.8 Koloni PZR ve Plazmit İzolasyonu

Koloni PZR'de kullanılan primerler aLICator pLATE51 kitindeki vektör primerleri olan LIC Forward Sequencing primer ve LIC Reverse Sequencing primer kullanıldı. Enzim olarak DreamTag Master Mix (Thermo Scientific) kullanıldı. Plazmit izolasyonunda Qiagen Miniprep Kiti kullanıldı.

### 3.1.9 Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi ve Boyama

Lizis tamponu için $Na_2HPO_4$ (Sigma Aldrich), $NaH_2PO_4$ (Sigma Aldrich), gliserol (Multicell), NaCl, KCl, Triton X-100 (Biomatik) ve imidazol (Sigma Aldrich);SDS jeli için Tris-HCl (Biomatik), SDS (Multicell), %30 Akrilamid solüsyonu (Biorad), TEMED (Sigma), Amonyumpersülfat (APS) (Biorad); yükleme tamponu için Tris-HCl, gliserol, SDS, Dithiothreitol (DTT) (GoldBIO), Bromofenol Blue (Biomatik); tank tamponu için Tris Base, glisin (Multicell), SDS; Coomasie boyama için Coomasie Brillant Blue R-250 Staining (GoldBIO), asetik asit (Sigma Aldrich),

metanol (Sigma Aldrich) ve son olarak jelden fazla boyayı arındırmak için kullanılan solüsyonun hazırlanmasında asetik asit ve metanol kimyasalları kullanıldı.

% 12'lik Alt jelin hazırlanması;

1.6 ml dH2O

1.3 ml 1.5 MTris

50 µl SDS %10

2 ml %30 Akrilamid

50 µl %10 APS

5 µl TEMED

% 5'lik üst jelin hazırlanması;

1.8 ml dH2O

0.3125 ml 0.5 M Tris

25 µl %10 SDS

335 µl %30 Akrilamid

25 µl %10 APS

2.5 µl TEMED

% 20 Alt jel hazırlanması;

0.5 ml dH2O

2 ml 1.5 MTris

80 µl %10 SDS

5.33 ml %30 Akrilamid

80 µl %10 APS

8 µl TEMED

% 6 Üst jel hazırlanması;

2.6 ml dH2O

1.25 ml 0,5 M Tris

50 µl %10 SDS

1 ml %30 Akrilamid

50 µl %10 APS

5 µl TEMED

6X SDS Loading Dye hazırlanışı;

3.75 ml 1M Tris pH: 6.8, 6 ml Gliserol, 1.2 gr SDS, 0.93 gr DTT, 3 mg Bromofenol Blue kimyasalları iyice karıştırılarak toplam 10 ml ayarlandı.

**5X tank tamponu hazırlanışı;**

15.19 gr Tris Base, 94 gr Glisin, 50 ml %10 SDS kimyasalları şişeye eklendi. Şişeye 900 ml distile su konularak kimyasalların çözünmesi sağlandı. Tamponun pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra tampon distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Ardından SDS-PAGE'de kullanılmak üzere distile su ile 1X'e seyreltildi.

### 3.1.10 Western Blot Reaktifleri

Western analizi için Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry blotlama sistemi, nitroselüloz membran (Thermo Scientific) ve fitre kağıtları (Thermo Scientific) kullanıldı. Bloklama ve yıkama çözeltileri $Na_2HPO_4$, $KH_2PO_4$ (Biomatik), KCl, NaCl, Tween 20 (SigmaAldrich) ve Bovine Serum Albumin (BSA) (Capricorn Scientific) kullanılarak hazırlandı. Primer ve sekonder antikor olarak sırasıyla Hisprobe Antibody (H-3): sc-8036 (Santa Cruz Biotechnology) ve Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Invitrogen) tercih edildi. Deteksiyon aşamasında DAB (Thermo Scientific) ve $H_2O_2$ (Sigma Aldrich) kullanıldı.

### 3.1.11 Protein Saflaştırılması

Native ve denatüre koşullarda saflaştırma yaparken rezin olarak Thermo Scientific His-Pure™ Ni-NTA kullanıldı. Bağlanma, yıkama ve elüsyon çözeltileri $NaH_2PO_4$, İmidazol, NaCl, üre (Sigma Aldric), $Na_2HPO_4$ kullanılarak hazırlandı.

Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 7.4):

$NaH_2PO_4$ (M: 119.9 gr) 12 gr +100 ml distile su (1M 100 ml stok olarak)

$Na_2HPO_4$. $2H_2O$ 17.8 gr + 100 ml distile su (1M 100 ml stok olarak)

pH: 7.4 100 ml için;

$NaH_2PO_4$: 22.6 ml

$Na_2HPO_4$. $2H_2O$: 77.4 ml olacak şekilde birleştirildi.

Sodyum Klorür için;

NaCl (M:58.5) 5.8 gr + 100 ml $dH_2O$ (1M 100 ml stok olarak)

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) için;

20 mM sodyum fosfat ve 300 mM sodyum klorür birleştirildi.

2 ml stok sodyum fosfat alındı.

30 ml NaCl alınır.

100 ml'ye dH2O ile tamamlandı.

1 M İmidazol için;

17.02 gr imidazol tartıldı. 250 ml'ye $dH_2O$ ile tamamlandı.

Dengeleyici Tampon (10 mM imidazol):

99 ml PBS

1ml 1M imidazol

(pH'ı 7.4'e ayarlandı)

Yıkama Tamponu (25 mM imidazol):

97,5 ml PBS

2,5 ml 1M İmidazol

(pH :7.4)

Elüsyon Tamponu (400 mM İmidazol):

60 ml PBS

40 ml 1M İmidazol

(pH:7.4)

MES Tamponu (20 mM MES + 0.1 M NaCl):

1.67 gr MES

25 ml NaCl

250 ml distile su

(pH: 5)

Lizis tamponunun hazırlanması;

0.3 ml 1M $NaH_2PO_4$, 4.7 ml 1M $Na_2HPO_4$, 2.3 gr NaCl, 0.75 gr KCl, 10 ml Gliserol, 0.5 ml Triton X-100, 68 mg İmidazol'e 90 ml distile su eklenerek pH'sı 7.8'e ayarlandı. Ardından tampon distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Saflaştırma protokolünden önce yapılan lizis aşamasında hücrelerin üzerine lizozim (Thermo Scientific) eklendi.

### 3.1.12 Antibakteriyel Test

Antibakteriyal testte Müller Hinton Agar (MHA) (Millipore), Müller Hinton Broth (MHB) (Biolife) besiyerleri kullanıldı.

## 3.2 Metot




**Şekil 3.1** Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması

### 3.2.1 Çift Tabaka Agar Yöntemi ile Faj Geliştirilmesi

Ticari olarak alınan *S. aureus* fajının kültür ortamında alt ve üst agar Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI) sıvı besiyeri kullanılarak yapıldı. Alt agar için son konsantrasyon 15g/l olacak şekilde agar eklenerek otoklavlandı. Steril alt agar besiyeri petrilere 18-25 ml olacak şekilde dağıtıldı. Üst agar ise agar için son konsantrasyon 4-6 g/l olacak şekilde hazırlanarak otoklavlandı. Bir gece BHI sıvı besiyerinde inkübe edilen *S. aureus* bakterisinden 900 µl alınarak yapılan dilüsyon sayısı kadar steril edilmiş cam tüplere koyuldu. Birinci dilüsyon tüpünün içerisine 100 $\mu$l $10^6$ ile $10^{11}$ arası PFU titre oranına sahip olan ilgili fajdan eklendi. Birinci dilüsyon tüpü vortekslendikten sonra içerisinde 900 µl *S. aureus* bakterisi olan ikinci dilüsyon tüpüne 100 µl aktarıldı. Bu işlem on ikinci dilüsyona kadar tekrarlandı. Hazırlanan tüpler 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra steril edilmiş yeterli sıcaklıktaki üst agardan 2 ml alınarak tüplere eklendi. Tüpler vortekslenerek alt agarın koyulduğu petrilerin üzerine döküldü. Üst agar alt agarın tamamen üstünü kapatabilmesi için petriler hafifçe hareket ettirilerek üst agarın dağılması sağlandı. Üst agar donduktan sonra 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lizis gösteren plaklar seçilerek bistüri yardımı ile üst agar kazındı. Kazınan agar 3 ml BHI sıvı besiyeri içerisine ilave edildi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübe edilen yüksek titreye sahip faj çözeltisi 8.000 xg'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant 0.22 µm por çapındaki steril filtreden geçirildi. DNA izolasyonunda kullanılacak kısım ayrıldıktan sonra kalan faj çözeltisine % 50 (hacim/hacim) steril gliserol eklenerek -80°C'de depolandı.

### 3.2.2 Faj DNA İzolasyonu

Double agar yöntemi ile geliştirilen ilgili fajın genomik DNA izolasyonu Norgen Phage DNA Isolation Kit protokolüne göre yapıldı.

Lizat Hazırlama: $10^8$ PFU titre oranına sahip 1ml faj sıvı kültürü üzerine 500 µl Lizis tamponu eklenerek 10 dakika vortekslendi. Ardından 65°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşaması sırasında 2-3 kez ters yüz edildi. Sonra lizat üzerine 320 µl izopropanol eklenerek karıştırmak için vortekslendi.

Bağlanma: Toplama tüpüne kolon takılarak 650 µl lizat eklendi ve 8.000rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Kolonun altındaki toplama kabına geçen sıvı atılarak bu işlem lizat bitene kadar uygulandı.

Yıkama: Kolona 400 µl Yıkama Solüsyonu A eklendi ve 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Kolon tüpten çıkarıldı.

Elüsyon: Kolon 1.5 ml'lik Ependorf tüpüne alındı ve kolona 50 µl önceden 65°C'de bırakılmış su eklenerek 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

Pürifiye edilen DNA -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.2.3 DNA Miktarı ve Saflığın Belirlenmesi

DNA 260 nm'de absorbans vermektedir ve A260/A280 oranının 1.8-2.2 aralığında olması DNA'nın saf olduğunu gösterir. 50 µl suyun içerisinde çözünen genomik DNA miktarı Nanodrop cihazı ile ölçüldü.

### 3.2.4 Holin Geninin Baz Dizisinin Tespiti

Holin geninin ORF bölgesi aşağıdaki gibidir ve bu dizi National Center for Biotechnology Information (NCBI) sitesinden alınmıştır.

>NC_005880.2:c37016-36513 Staphylococcus phage K, complete genome

ATGGCTAATGAAACTAAACAACCTAAAGTTGTTGGAGGAATAAACCTTAGCACAA
GAACTAAGAGCAAAACATTTTGGGTAGCAATTATATCAGCAGTAGCATTATTTGC
TAACCAAATTATAGGTGCTTTCGGTTTAGACTACTCAGCTCAAATTGAGCAAGGT
GTAAATATTGTAGGTTCTATACTAACACTATTAGCAGGTTTAGGTATTATTGTTGA
TAATAATACTAAAGGTCTTAAAGATAGTGATATTGTTCAAACAGACTATCTTAAAC
CTCGTGATAGTAAAGACCCTAATGAATTCGTTCAATGGCAAGCAAATGCAAATAA
CACTAGTACTTTTGAGATAGACAGCTACGAAAACAATGCAGAACCTGACACAGAT
GATAGTGATGAAGTACCTGCTATTGAAGATGAAATTGATGGTGGTTCAGCACCTT
CTCAAGATGAAGAAGATACCGAGGAACATGGTAAAGTATTTGCAGAGGAGGAAG
TTAAGTAA

### 3.2.5 Gen Bölgesi için Primer Tasarımı

Holin geninin klonlama ve protein üretiminde kullanılmak üzere çoğaltılması için primer tasarımı yapıldı. Vektör olarak aLICator pLATE51 kullanıldığından dolayı ileri ve geri primerleri bu vektöre göre tasarlandı. İleri ve geri primerlerin önüne 18 bazdan oluşan ve vektöre bağlanması için gereken bir yapışkan uç koyuldu.

pLATE51 vektörü insert geninin 5' ucunda 6X Histag etiketine ait gen dizisi ve protein purifikasyonundan sonra bu proteini uzaklaştırmak için kullanılacak enterokinaz gen bölgesi dizisini içermektedir. Primer tasarımı yapılırken 5' ve 3' uçlarında bulunan tag proteinine ait gen dizilerinin çerçeve içinde olmasına dikkat edilir. Bu sebeple primerler insert genin başlangıç ve stop kodonlarını kapsamayacak şekilde tasarlanır.

**İleri Primer :**

5'-GGTGATGATGATGACAAG- gene spesifik-3'

5'-GGTGATGATGATGACAAGGCTAATGAAACTAAA-3'

Gene spesifik primerin Tm derecesi: 65°C

**Geri Primer :**

5'-GGAGATGGGAAGTCATTA- gene spesifik -3'

5'-GGAGATGGGAAGTCATTACTTAACTTCCT-3'

Gene spesifik primerin Tm derecesi: 64°C

Holin geninin yanı sıra Holin geninde bulunan sinyal dizisi, oluşan proteinin transmembrana transferini sağlayarak membranda por oluşumunu indükleyeceğinden diziden çıkarılarak farklı rekombinant holinin (rSKHol) eldesi planlanmıştır. Holin geninin olası sinyal sekansı SignalP 4.0 ve SignalP 5.0 programları kullanılarak tespit edilmiştir.

Sinyal sekansı kesilmiş gen aşağıdaki gibidir.

AAGAGCAAAACATTTTGGGTAGCAATTATATCAGCAGTAGCATTATTTGCTAACC
AAATTATAGGTGCTTTCGGTTTAGACTACTCAGCTCAAATTGAGCAAGGTGTAAA
TATTGTAGGTTCTATACTAACACTATTAGCAGGTTTAGGTATTATTGTTGATAATA
ATACTAAAGGTCTTAAAGATAGTGATATTGTTCAAACAGACTATCTTAAACCTCGT

GATAGTAAAGACCCTAATGAATTCGTTCAATGGCAAGCAAATGCAAATAACACTA
GTACTTTTGAGATAGACAGCTACGAAAACAATGCAGAACCTGACACAGATGATAG
TGATGAAGTACCTGCTATTGAAGATGAAATTGATGGTGGTTCAGCACCTTCTCAA
GATGAAGAAGATACCGAGGAACATGGTAAAGTATTTGCAGAGGAGGAAGTTAAG
TAA

**İleri Primer :**

5'-GGTGATGATGATGACAAG- gene spesifik-3'

5'- GGTGATGATGATGACAAGACATTTTGGGTA -3'

Gene spesifik primerin Tm derecesi: 68.1°C

**Geri Primer :**

5'-GGAGATGGGAAGTCATTA- gene spesifik -3'

5'-GGAGATGGGAAGTCATTACTTAACTTCCT-3'

Gene spesifik primerin Tm derecesi: 64°C

Tasarımı gerçekleştirilen primerler, ticari olarak sentezlettirilmiştir. Primerler -20°C'de saklandı.

### 3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ve enzim kiti içerisindeki reaktifler kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Tablo 3.1'deki bileşenler sırası ile eklendi. Reaktifler ve reaksiyon karışımı buz üzerinde tutuldu.

**Tablo 3.1** PZR'de kullanılacak materyaller ve hacimleri

| İçerik | Kullanılacak Hacim ($\mu$l) |
|---|---|
| 5X HF Buffer | 10 $\mu$l |
| dNTP Karışımı (25 mM) | 0.5 $\mu$l |
| İleri Primer (10 $\mu$M) | 2.5 $\mu$l |
| Geri Primer (10 $\mu$M) | 2.5 $\mu$l |

**Tablo 3.1** PZR'de kullanılacak materyaller ve hacimleri (devamı)

| | |
|---|---|
| Phusion Taq Polimeraz (60 U/µl) | 1 $\mu$l |
| Steril Su | 28 $\mu$l |
| Kalıp DNA | 5 $\mu$l |
| Toplam Hacim | 50 $\mu$l |

**Tablo 3.2** PZR'nin aşamaları

| Aşama | Sıcaklık | Zaman | Döngü |
|---|---|---|---|
| Başlangıç Denatürasyonu | 98°C | 2 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 98 °C | 10 saniye | 35 |
| Bağlanma | 61 °C | 30 saniye | 35 |
| Uzama | 72 °C | 1 dakika | 35 |
| Son Uzama | 72 °C | 10 dakika | 1 |
| Soğutma | 4°C | ∞ | 1 |

### 3.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Amplikon ürünün istenilen uzunlukta ve tek bant şeklinde olması %1'lik hazırlanan agaroz jel elektroforezi sisteminde yürütülerek kontrol edildi. Özetle; 40 ml TAE tamponu içerisine 0.4 g agaroz eklendikten sonra mikrodalga fırında kaynayana kadar ısıtıldı. Soğutulduktan sonra çözeltiye 2 $\mu$l 20,000X Sybr Safe

DNA boyası eklendi. Jel tepsisi ve tarak hazırlandıktan sonra agaroz jel tepsi içerisine döküldü. Jel donduktan sonra 2 $\mu$l Thermo Scientific 1 kb DNA markır ilk kuyuya yüklendi. 1 $\mu$l Thermo Scientific 6X Tritrax yükleme boyası ile 5 $\mu$l örnek karıştırılıp kuyuya yüklendi. 90 V'da 40 dakika jel yürütüldü. Yürütüldükten sonra DNA bantları UV ışık altında görüntülendi.

### 3.2.8 PZR Ürününün Saflaştırılması

UV ışığı altında DNA bantları görüntülendikten sonra SKHol geni için jelden, Holin geni için ise tüpten PZR ürününün pürifikasyonu gerçekleştirildi. Pürifikasyon Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit protokolüne göre yapıldı.

- Jelden pürifikasyon için jelden bant kesilerek kesilen jelin ağırlığı hesaplandı.
- Tüpten pürifikasyon için tüpteki amplifikasyon ürünü miktarı hesaplandı.
- Hesaplanan miktarın 3 katı kadar QG tamponu eklenerek vortekslendi.
- Hesaplanan miktar kadar izopropanol eklendi ve tüp ters yüz edildi.
- Tüp kolona aktarıldı ve kolon 1,5 dakika spinlendi.
- Kolonun altına yerleştirilen toplama kabında biriken sıvı atıldı.
- 500 $\mu$l QG tamponu eklenerek 1,5 dakika spinlendi. Toplama kabındaki sıvı atıldı.
- 750 $\mu$l PE tamponu eklenerek 1,5 dakika spinlendi. Toplama kabındaki sıvı atıldı.
- Kolonun altına 1,5 ml'lik Ependorf tüpü yerleştirildi
- Önceden 55 °C'ye koyulan sudan 20 $\mu$l alınarak kolona eklenerek 1.5 dakika spinlendi.
- Elüsyonun Nanodropta ölçümü yapıldı.

### 3.2.9 Ultra Kompetan Hücre Hazırlama

Vektörün hücre içerisine girebilmesi için *E. coli Bl21 (DE3)* suşu ultra kompetan hale getirildi. Ultra kompetan hücre yapımın kullanılan SOB besiyeri ve TB (İnoue) tamponu hazırlandı.

- Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarının koleksiyonunda var olan *E. coli Bl21* suşu -

80°C'deki stok tüplerinden öze yardımı ile LB agar içeren petriye üç çizgi ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra petride oluşan tek kolonilerden seçilip içerisinde 25 ml SOB besiyeri 250 ml'lik erlene ekildi. 4 saat 37°C 200 rpm'de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 250 ml SOB içeren 1 L'lik üç erlene sırasıyla 250 $\mu$l, 500 $\mu$l, 1 ml kültür ekildi ve 18-22 °C 200 rpm'de bir gece inkübe edildi.
- Kültürlerden birinin OD'si 0.5-0.6 aralığına geldiğinde erlen 10 dakika buzda bekletildi.
- Kültür iki tane 50 ml'lik falkona bölünüp 2500 xg'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi.
- Süpernatantlar döküldü ve falkonlar havlu kağıdına ters çevrilip tüm süpernatantın süzülmesi sağlandı.
- İki falkona 40'ar ml soğuk TB tamponu konularak pellet hafifçe çözüldü.
- Falkonlar 2500 xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatantlar döküldü ve havlu kağıdına ters çevrilip tüm süpernatantın süzülmesi sağlandı.
- Bir falkonun içerisine 20 ml soğuk TB koyularak pellet çözdürüldü ve diğer falkona aktarıldı.
- 1,.5 ml steril DMSO eklendi hafifçe sallandı.
- 10 dakika buzda bekletildi.
- 100 $\mu$l, 150 $\mu$l olacak şekilde alikotlandı.
- Sıvı azotta dondurulur.
- -80°C'ye stoklandı.

### 3.2.10 aLICator Kiti ile Klonlama ve Transformasyon

**Tablo 3.3** aLICator kiti ile kurulan klonlama reaksiyonunun içeriği

| İçerik | 0,02 pmol | 0,1 pmol |
|---|---|---|
| 5X LIC Buffer | 2 µl | 2 µl |
| PZR Ürünü | 0.1 µl | 0.5 µl |

**Tablo 3.3** aLICator kiti ile kurulan klonlama reaksiyonunun içeriği (devamı)

| | | |
|---|---|---|
| Su | 6.9 µl | 6.5 µl |
| T4 DNA Polimeraz | 1 µl | 1 µl |
| Toplam | 10 µl | 10 µl |

Yukarıdaki reaksiyon kurulduktan sonra 3-5 saniye spin santrfüj ve vorteks yapılarak 25 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 0,6 $\mu$l EDTA eklendi. Ardından 1 $\mu$l pLATE51 vektörü bu karışıma eklendi ve 3-5 saniye spin edildi. 25 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4 $\mu$l ve 6 $\mu$l olarak 50 $\mu$l kompetan hücrelerin bulunduğu tüplere eklendi. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 42 °C'de 1.5 dakika ısı şoku uygulandı. Ardından 2 dakika daha buzda bırakıldı. 15 ml'lik falkona alınarak 950 $\mu$l SOC besiyeri eklendi. 37 °C'de 1 saat büyütüldü. 1 saat sonra oda sıcaklığında 3000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın 800 $\mu$l'lik kısmı atıldı. Kalan 150 $\mu$l süpernatant ile pellet resüspanse edildi. 100 $\mu$l alınarak ampisilinli LB agar içeren petriye drigalski yardımıyla ekimi yapıldı. Petriler 37 °C'de 16 saat inkübe edildi.

### 3.2.11 Koloni PZR

İki ayrı petriden toplam 3 tane koloni seçilerek kolonilerin yarısını alacak şekilde 10 $\mu$l steril su koyulan PZR tüplerine öze yardımı ile eklendi. 95 °C'de 5 dakika hücreleri patlatma işlemi yapıldıktan sonra aşağıda verilen tablodaki gibi PZR kuruldu. Bu reaksiyonda kullanılan primerler aLICator pLATE51 kitinin içerisinde bulunan ve insert genin yerleştiği bölgenin 3' ve 5' uçlarında vektöre ait olan toplam 266 baz çiftlik bölgeyi de kapsamaktadır. Bu yüzden PZR sonucunda oluşan ürünün baz çifti, spesifik genin baz çifti ve 266 baz çiftinin toplamından oluşmaktadır.

pLATE51 vektörüne ait primerler:

İleri primer:

5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

Geri primer:

5'- GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

**Tablo 3.4** Koloni PZR'nin kullanılan materyalleri ve hacimleri

| İçerik | Kullanılan Hacim |
|---|---|
| İleri Primer | 1 $\mu$l |
| Geri Primer | 1 $\mu$l |
| PCR ürünü | 5 $\mu$l |
| DreamTag Master Mix | 12.5 $\mu$l |
| Su | 5.5 $\mu$l |

**Tablo 3.5** Koloni PZR'nin aşamaları

| Aşama | Sıcaklık | Zaman | Döngü |
|---|---|---|---|
| Başlangıç Denatürasyonu | 95°C | 3 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 30 saniye | 25 |
| Bağlanma | 58 °C | 30 saniye | 25 |
| Uzama | 72 °C | 1 dakika | 25 |
| Soğutma | 4°C | ∞ | 1 |

### 3.2.12 Plazmit İzolasyonu

İki genin de plazmit izolasyonunun yapılması için 5 ml LB besiyerine içerisinde 100 $\mu$g/ml olacak şekilde ampisilin eklenerek koloni PZR'de sonuçları pozitif çıkan kolonilerden öze yardımı ile besiyerine inoküle edildi. Bakteriler 37°C'de ve çalkalayıcı etüvde bir gece inkübe edildi. Bakteri plazmitleri ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit protokolüne göre izole edildi.

- 37°C'de bir gece inkübe edilen bakteri kültürleri, 6800 xg'de 3 dakika santifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 500 µl R1 solüsyonundan eklenerek pelletin resüspanse hale gelmesi sağlandı. Daha sonra sıvı, Ependorf tüpe alındı.
- Çözünen pellete R2 solüsyonu eklenerek tüp 4-6 defa ters yüz edildi ve 5 dakikayı geçmemesine dikkat edilerek oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 5. dakikada üzerine N3 eklendi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kolona alındı.
- Kolon 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından kolonun altındaki toplama tüpü boşaltıldı.
- Kolona 750 µl PE solüsyonu eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra kolonun altına 1.5 ml'lik Ependorf tüpü yerleştiridi.
- Kolona 30 µl 65°C'de önceden ısıtılmış su eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elüsyonların konsantrasyonları Nanodrop'ta ölçüldü.

### 3.2.13 Plazmit DNA Dizi Analizi

İzole edilen plazmit DNA'sının dizisinin belirlenmesi için dizileme analizi yapan bir firmaya gönderildi. Ardından BLASTn'de Clustal Omega yapılarak orijinal dizi ile hizalandı.

### 3.2.14 Protein Ekspreyonu

Dizileme analizinden sonra doğrulaması yapılan genleri içeren kolonilerden öncelikle ampisilin içeren LB agar (200 ml için; 1 gr NaCl, 2 gr tripton, 1 gr maya özütü, 3 gr bakteriyel agar) besiyerine üç çizgi ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra oluşan kolonilerden bir koloni alınıp 100 $\mu$g/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı (400 ml için; 2 gr NaCl, 4 gr tripton, 2 gr maya özütü) besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de çalkalayıcı etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ayrıca kontrol olarak *E. coli Bl21* suşu da LB sıvı besiyerinde inkübe edildi. Ardından 50 ml'lik LB besiyerine (transformasyon yapılan koloniler için 50 $\mu$l ampisilin içeren, içerisinde vektör olmayan *E. coli Bl21* için ise ampisilin içermeyen besiyeri kullanıldı.) 500 $\mu$l bakteri kültürlerinden eklenerek 37°C'de çalkalayıcı etüvde kültürlerin OD'leri 0.5-0.6 aralığına gelene kadar inkübe edildi. OD 0.5-0.6 aralığına ulaştığında içerisinde vektör bulunan kültüre 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 1.5 mM 100 mM'lık IPTG eklendi. Kültürlerin hangi sıcaklıkta protein ürettiğini belirlemek için 30°C ve 37°C'de inkübe edildi. Kültürlerden 1.-2.-4.-6. ve 24. saatlerde 3 ml'lik örnekler alındı. İçerisinde vektör bulunan kültürlerden alınan örnekler SDS-PAGE eletroforezinde vektör bulunmayan kültürden alınan örnekler ile karşılaştırıldı. Görünen bantlarda hangi koşullarda protein üretimi olduğu belirlendikten sonra protein ekspresyon işlemi belirlenen koşul için tekrarlandı. İlgili kültürün saatlik bulanıklık ve OD değerleri de karşılaştırmalı olarak belirlendi.

İnkübasyon sonrası örnekler en yüksek devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant olarak adlandırılan besiyeri başka bir falkona aktarılarak içerisine 30 ml'de 14.73 gr olacak şekilde amonyum sülfat eklendi ve bir gece +4°C'de çalkalamaya bırakıldı. Ertesi gün + 4°C'de ve en yüksek devirde 30 dakika santrifüj edildi. İlk santrifüjden kalan pellete 50 ml için 2.5 ml olacak şekilde lizis tamponu eklendi. Lizis tamponuyla birlikte lizozim enzimi de eklenerek + 4°C'de 30 dakika bekletildi. Ardından % 50'lik güçte 2 dakika (10s sonikasyon, 10s bekleme) sonike edildi. Sonikasyon işleminden sonra en yüksek devirde 25 dakika santrifüj edildi (lizis işlemi 1.koşul olarak adlandırıldı.)

Holin proteininin 30°C'de 1 mM IPTG ile eksprese edildiği deneyde pellete farklı bir ikili lizis işlemi uygulandı (lizis işlemi 2. koşul olarak adlandırıldı.). Bu işlemde 50 ml'lik kültüre 25 µl 0.1 mM PMSF, 2.5 ml Lizis Buffer, lizozim eklenerek + 4°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 3'er kez 10 dakika buzda bekletilerek don-çöz işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra % 50'lik güçte 30 dakika (30s sonikasyon, 30 s bekleme) sonike edildi. En yüksek devirde 25 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant (2. koşul 1. süpernatant) toplandı. Kalan pellete 10 µl PMSF ve 1 ml Lizis Buffer eklenip 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcıda bir gece bekletildi. Ertesi gün 30.000 rpm'de 1.5 saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 2. koşul 2. süpernatant, pellet ise 2. koşul 2. pellet olarak adlandırıldı. Her iki lizis işleminin ardından yapılan santrifüjden sonra hem süpernatant hem de pellet ayrı ayrı alınarak SDS-PAGE'e yüklendi.

### 3.2.15 Protein Saflaştırılması

Örneklerin pH'sına bakılarak pH'nın 7.2- 7.6 arasında olması sağlandı. Saflaştırma işlemi öncesi ham örnekten 200 µl kadar alındı. Süpernatant ve besiyeri için örneklerin miktarı kadar dengeleyici tampon eklendi. Nikel içeren rezin kolonlarına 2 ml dengeleyici tampon ilave edilerek 700 xg'de + 4°C'de 2 dakika santrifüj edildi. Dengeleyici tampon eklenen örnekler kolona alındı. Rezin sıvının içerisinde iyice çözdürüldükten sonra 1 saat + 4°C'de sallanarak 6X Histag bağlı proteinin rezine bağlanması sağlandı. 1 saat sonra kolon 700 xg'de 2 dakika santrifüj edilerek rezine bağlanmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması sağlandı. Rezine zayıf bağlanmış proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için kolona 2 ml yıkama tamponu eklenerek 700 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Yıkama aşaması 4 defa tekrar edildikten sonra 1 ml elüsyon tamponu kolona eklendi ve 700 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Elüsyon aşaması bittikten sonra kolon sırasıyla 10 ml MES tamponu ve 10 ml su ile yıkanarak tekrar kullanım için içersine % 20 etanol koyulduktan sonra + 4°C'ye alındı. Saflaştırma sırasında her aşamadan örneklem alınarak SDS-PAGE de değerlendirilmek üzere + 4°C de saklandı.

### 3.2.16 SDS-PAGE Elektroforezi

% 12'lik jelin hazırlanmasında kullanılan $dH_2O$, 1.5M Tris, % 10 SDS, % 30 Akrilamid, % 10 APS ve TEMED belirlenen oranlarda karıştırılarak iki camın

arasına pastör pipeti yardımı ile döküldü. Belli bir seviyeye kadar eklenen jelin üzerine en üst seviyeye kadar distile su eklenerek polimerleşmesi beklendi. Ardından % 5'lik üst jel hazırlandı ve polimerleşen alt jelin üzerine pastör pipeti yardımıyla eklendi. En üst seviyeye kadar eklenen üst jele tarak konularak polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jellerin bulunduğu cam, kasete yerleştirildi ve tankın içerisine koyuldu. Tank, 1X'lik tank tamponu ile doldurulduu. Sonrasında test örnekleri, 5 µl 6X SDS Loading Dye / 45 µl örnek olacak şekilde hazırlandı. 95 °C'de 5 dakika proteinlerin denatürayonu için bekletildi. Hazırlanan jelin üzerinden tarak yavaşça çekildi ve denatüre edilen örneklerin 25 µl'si kuyucuklara koyuldu. Örnekler, alt jele geçinceye kadar 90 V yürütüldükten sonra güç kaynağı 120 V'a ayarlanarak yürütme işlemi gerçekleştirildi.

İşlem sonrasında jel Coomasie Brillant Blue içeren çözeltiye koyuldu ve bir gece oda sıcaklığında çalkalandı. Ertesi gün, boyanan jel "Destaining" olarak adlandırılan jeldeki fazla boya giderimi işlemine tabi tutuldu. İşlem sonrasında jel distile su ile yıkandıktan sonra proteinler gözlemlendi.

### 3.2.17 Western Blot Analizi

Saflaştırılan proteinin doğrulanması için Western Blot tekniği kullanıldı.

Membrana aktarılmadan önce SDS PAGE yapılmak üzere daha önce verilen koşul ve oranlarda % 12'lik yürütme ve % 5'lik yükleme jelleri hazırlandı ve jele örnekler yüklenerek yürütüldü.

1. Membran, filtre kağıtları ve jel ıslatılmak üzere transfer tamponu hazırlandı.

Transfer Tamponu (Bjerrum Schafer- Nielsen SDS'li Buffer) 500 ml

a) 39 mM Glisin 1.46 g
b) 48 mM Tris 2.90 g
c) 1.3 mM SDS 0.20 g
d) % 20 Metanol 100 ml

2. Jele uygun biçimde kesilen nitroselüloz membran ve filtre kağıtları 30'ar dakika, jel de 15 dakika transfer tamponunda bekletildi.
3. İki filtre kağıdı arasında akımın geçtiği yöne doğru sırasıyla jel ve membran olacak şekilde sandviç hazırlandı. Whatman kağıtlarındaki fazla

transfer tampon silindir spiralle üzerinden geçirilerek alındı ve Blot tepsisine alındı. Blot tepsisinde aynı işlem tekrar uygulandıktan sonra kağıdın yanlarından tepsiye dökülen tampon peçete ile alındı. Alttan üste doğru sıralandığında; Whatman kağıdı › Membran › Jel › Whatman kağıdı şeklinde yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.

4. Transfer-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak 25 V'da 30 dakika aktarım gerçekleştirildi. Blotlamanın etkin bir şekilde gerçekleştiğinin tespit edilmesi için jel Coomasie boya çözeltisi ile boyandı.
5. Membran PBS-Tween 20 (2 ml Tween 20 / 1 L PBS) ile 5 dakika yıkandı.
6. %5'lik bloklama çözeltisi (5 g süt tozu / 100 ml PBS-Tween 20) ile 1,5 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.
7. Membran PBS-Tween 20 ile 5 dakika yıkandı.
8. Daha sonra membran primer His-probe Antibody (H-3): sc-8036 içeren (1:250) %5'lik BSA çözeltisinde +4°C'de, çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
9. Ertesi gün PBS-Tween 20 ile 5 dakika yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
10. Membran, Goat anti- Mouse IgG (H+L) sekonder antikor içeren (1:5000) %5'lik süt tozu çözeltisinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. PBS-Tween 20 kullanılarak 5'er dakika 2 yıkama yapıldı.
12. PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı.
13. Saf su ile son kez 5 dakika yıkama yapılarak deteksiyona geçildi.
14. Deteksiyon için 30 mg DAB, 50 ml PBS ve 50 µl içeren çözelti hazırlandı.
15. Membran bir pens yardımıyla hazırlanan çözelti içerisine batırıldı ve bantlar oluşana kadar beklendi.

### 3.2.18 Antibakteriyel Analiz

Üretilen proteinin bakteriler üzerindeki etkisini incelemek için agar kuyucuk diffüzyon yöntemi kullanıldı. Bir gece 37°C'de inkübe edilen MHB besiyerindeki *S. aureus* bakterisinin OD'si 0.1-0.2 ($10^8$ KOB/ml)'ye ayarlandıktan sonra bakteri eküvyon yardımı ile MHA içeren petride boşluk kalmayacak şekilde yayıldı. Ardından petriye belli sayılarda kuyucuk açıldı. Kuyucuğa yüklenecek proteinler sadece lizis işlemine tabi tutuldu. Pellet ve süpernatant olarak ayrılan proteinler

kuyucuklara eklendi. rSKHol ve rHolin proteinleri 30 ve 37°C'lerde 40. dakika ve 4. saatte alınan örnekler lizise uğratılarak agar kuyucuk diffüzyon çalışmasında kullanıldı. Kullanılan örnekler lizis edilme protokolleri açısından 2 farklı koşulda değerlendirildi. Bunlar sırasıyla;

Koşul 1: Sadece Lizis Buffer ve Lizozim uygulanarak yapılan lizis işlemi uygulanmış örnekler

Koşul 2: İkili lizis işlemi uygulanmış örneklerdir. (2. koşul 1. örnekler ilk lizis işleminden sonra elde edilen örnekler olup, 2. koşul 2. örnekler ise ikinci lizis işleminden sonra elde edilen örneklerdir.)

Kuyucuklara yüklenen örnekler bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklar etrafından gözlenen inhibiyon zonları ölçülerek sonuçlar değerlendirildi.

Ek olarak agar kuyucuk diffüzyon analizinde antibakteriyel aktivite gözlemlenen proteinlere spot testi yapıldı. Bir gece inkübe edilen ve $10^7$ KOB/ml'ye ayarlanan 100 µl *S. aureus* bakterisi MHA katı besiyeri içeren petrilere eküvyon yardımıyla boşluk kalmayacak şekilde ekildi. Ekim yapılan petrilere agar kuyucuk diffüzyonda zon çapı açısından iyi sonuç gözlemlenen; rSKHol için 30°C'de 1 mM IPTG 40. dakika 2. koşul 2. süpernatant koşulu, rHolin için 37°C'de 1 mM IPTG 40. dakika 2. koşul 2. süpernatant koşulu ve kontrol için 37°C'de 1 mM IPTG 40. dakika 2. koşul 2. süpernatant koşulundan 100 µl damlatılarak petriler bir gece 37°C'de inkübe edildi.

# 4
# SONUÇ VE ÖNERİLER

## 4.1 4.1 Deneysel Sonuçlar

### 4.1.1 *S. aureus* Fajından Genomik DNA İzolasyonu

*S. aureus* fajından elde edilen genomik DNA izolasyonunun Nanodrop'taki ölçüm sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1** *S. aureus* fajının genomik DNA izolasyonundan elde edilen DNA'nın konsantrasyonları

| | ng/µl | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---|---|---|
| Elüsyon 1 | 64.4 | 1.87 | 1.83 |
| Elüsyon 2 | 32.7 | 1.90 | 1.90 |

### 4.1.2 Gen Bölgesi için Primer Tasarımı

Holin geni ve SKHolin geni için tasarlanan primerler Tablo 4.2' de sunulmuş olup, Şekil 4.1'de Signal P 5.0 kullanılarak gerçekleştirilen sinyal sekansı tespit analizi gösterilmiştir.

**Tablo 4.2** Holin ve SKHol genine ait primerler

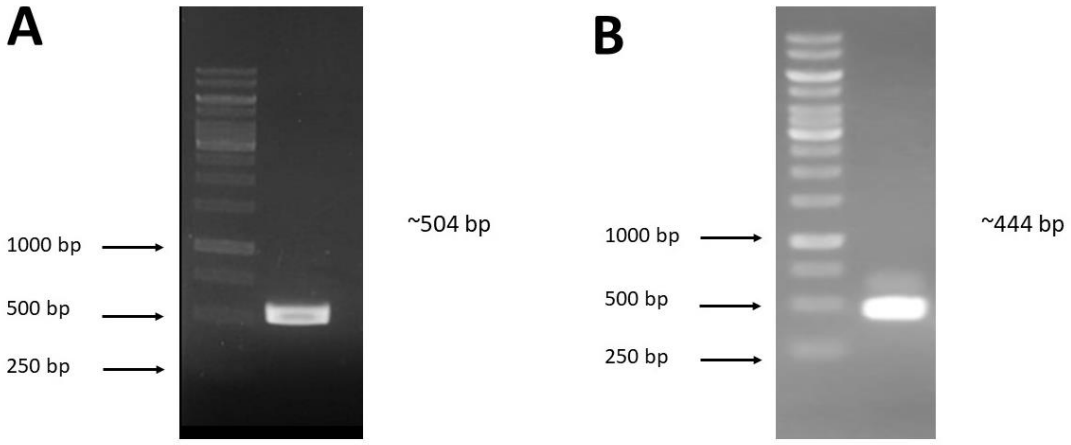
| Primer Adı | Primer Dizisi |
|---|---|
| HolF | 5'-GGTGATGATGATGACAAGGCTAATGAAACTAAA-3' |
| HolR | 5'-GGAGATGGGAAGTCATTACTTAACTTCCT-3' |
| SKHolF | 5'- GGTGATGATGATGACAAGACATTTTGGGTA -3' |
| SKHolR | 5'-GGAGATGGGAAGTCATTACTTAACTTCCT-3' |




**Şekil 4.1** Signal P 5.0 kullanılarak bulunan Holin geninin sinyal sekansı. İlgili program kapsamında Holin geninin sinyal sekansı, yaklaşık 40 amino asit olarak tespit edilmiştir

### 4.1.3 PZR

İzole edilen genomik DNA, sentezlettirilen primerler ile Phusion High Fidelity enzimi kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. PZR reaksiyonunun sonucu agaroz jel elektroforezi ile gösterildi. Amplikon ürünlerinin boyutu ticari markır kullanılarak gözlenmiştir. Amplikon ürünlerinin boyutunun beklenen boyutlarda olduğu jel görüntülerinde tespit edildi.




**Şekil 4.2** Holin ve SKHol geninin PZR yöntemi ile amplifikasyonu ile elde edilen amplifiye ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

### 4.1.4 Jel Ekstraksiyonu

Hem Holin hem de SK Holin geni pürifikasyon sonuçları Tablo 4.3 verilmiştir.

**Tablo 4.3** Holin ve SKHol genlerinin amplifikasyon ürünlerinin pürifikasyon sonuçları

| Gen ürünü | ng/$\mu$l | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---|---|---|
| Holin Elüsyon 1 | 169.3 | 1.88 | 0.17 |
| Holin Elüsyon 2 | 69.5 | 1.90 | 0.11 |
| SKHolin Elüsyon 1 | 135 | 1.87 | 0.23 |
| SKHolin Elüsyon 2 | 15 | 2.41 | 0.03 |

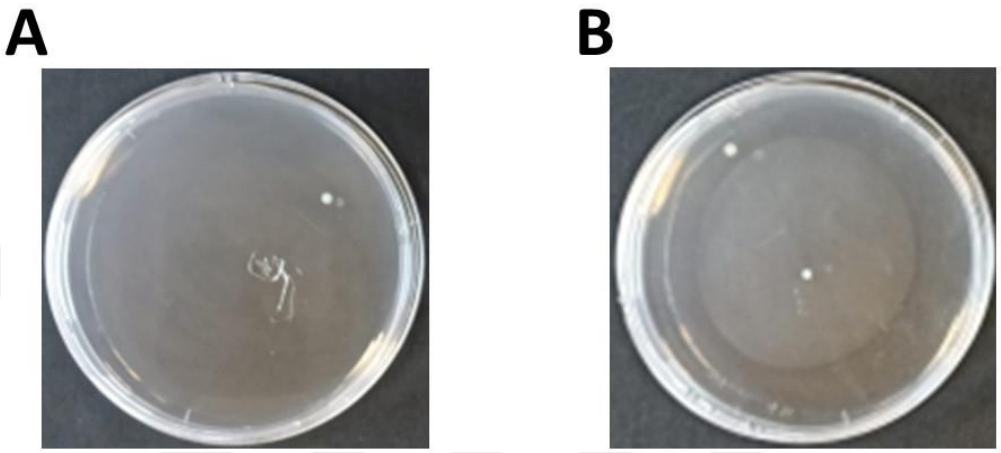
### 4.1.5 Klonlama ve Transformasyon

aLICator pLATE51 kitinin içerisinde bulunan klonlamada kullanılacak DNA miktarı aşağıdaki hesaplama formülü kullanılarak tespit edildi;

Formül: Baz çifti sayısı x 0.65= ng/pmol

Holin geni için; 0.1 pmol için 32.76 ng ve 0.02 pmol için 6.552 ng olarak hesaplandı.

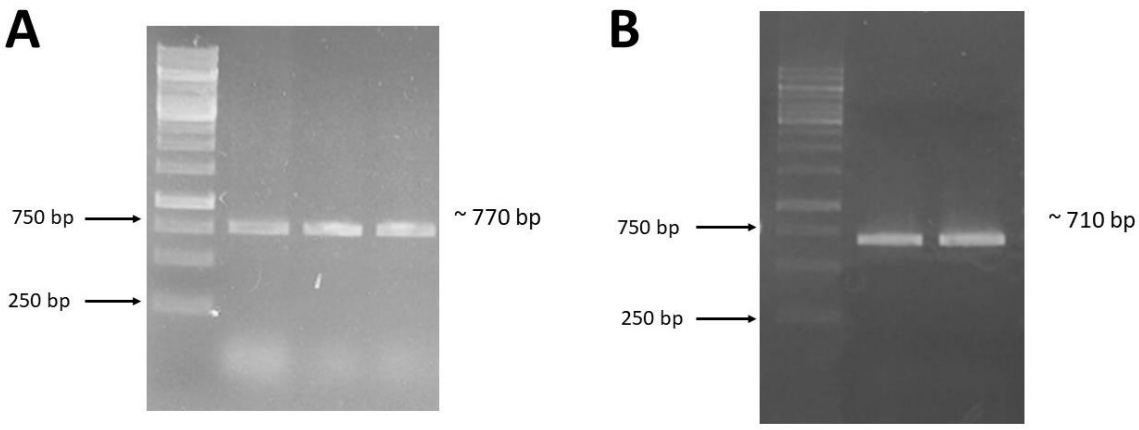
SKHol geni için: 0.1 pmol için 28.86 ng ve 0.02 pmol için 5.772 ng olarak hesaplandı. Holin ve SKHol genleri pLATE51 vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli Bl21* ultra kompetan hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyon sonucu elde edilen petri görüntüleri Şekil 4.3'te sunulmuştur.




**Şekil 4.3** Transformasyon sonucunda petrilerde oluşan koloni görüntüleri. A) Holin geni, B) SKHol geni

### 4.1.6 Koloni PZR

Holin ve SKHol transformasyon petrilerindeki koloniler, pLATE51 vektör kitinin içerisindeki primerler ile Dreamtag enzimi kullanılarak koloni PZR işlemine tabi tutuldu. PZR sonunda oluşan amplikon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Her iki gen için oluşan kolonilerin tümünün ilgili genleri içeren pozitif koloniler olduğu agaroz jelde gözlendi (Şekil 4.5).




**Şekil 4.4** Koloni PZR sonucunda agaroz jel görüntüleri. A) Holin geni 770 bç B) SKHol geni 710 bç

### 4.1.7 Holin ve SKHol Plazmit İzolasyonu

Holin ve SKHol transformasyon petrilerindeki pozitif kolonilerden sadece biri seçilerek 100 $\mu$g/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 18 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra Miniprep Kiti ile plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmit konsantrasyonu Nanodrop cihazında ölçüldü. Konsantrasyon sonuçları Tablo 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4** Holin genini içere plazmitlerin izolasyonu sonucunda elde edilen plazmit konsantrasyonları

| Holin | ng/$\mu$l | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---|---|---|
| Elüsyon 1 | 140.5 | 1.98 | 1.56 |
| Elüsyon 2 | 66.2 | 1.75 | 1.75 |

**Tablo 4.5** SKHol geninin içeren plazmitlerin izolasyonu sonucunda elde edilen plazmit konsantrasyonları

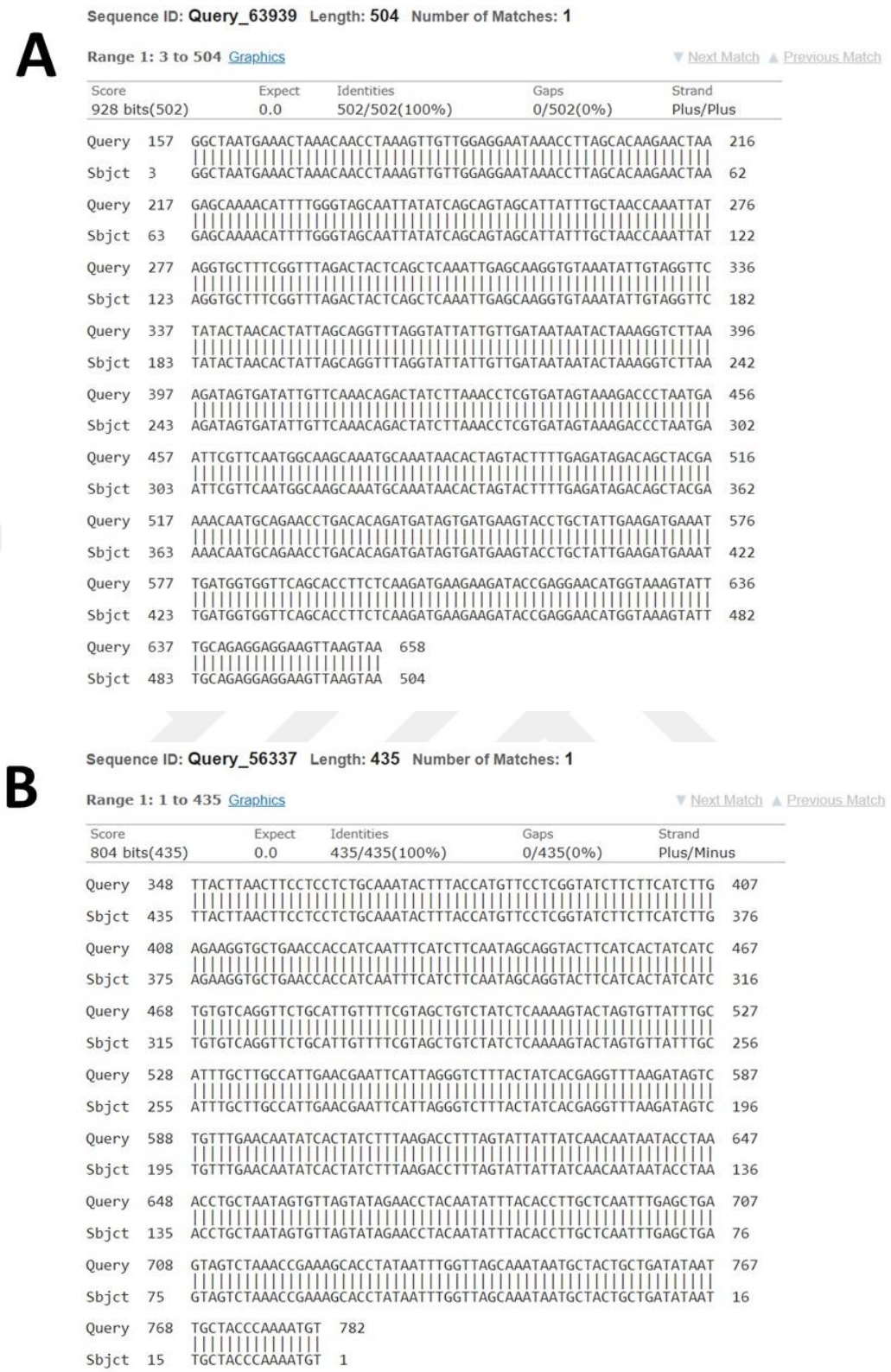
| SKHol | ng/$\mu$l | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---|---|---|
| Elüsyon 1 | 232.9 ng/$\mu$l | 1.89 | 2.24 |

**Tablo 4.5** SKHol geninin içeren plazmitlerin izolasyonu sonucunda elde edilen plazmit konsantrasyonları (devamı)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Elüsyon 2 | 45.3 ng/$\mu$l | 1.91 | 2.28 |

### 4.1.8 Plazmit DNA Analizi

Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmit DNA'sı dizilenmesi için firmaya gönderildi. Dizileme sonucu, orijinal dizi ile BLASTn programında hizalandı ve hizalama sonucunda % 100 benzerlik oranı görüldü (Şekil 4.6). BLASTp programı kullanılarak referans genin aminoasit dizisi ile dizileme sonucunda elde edilen genin amino asit dizisi karşılaştırıldığında % 100 benzerlik oranı görüldü (Şekil 4.7)



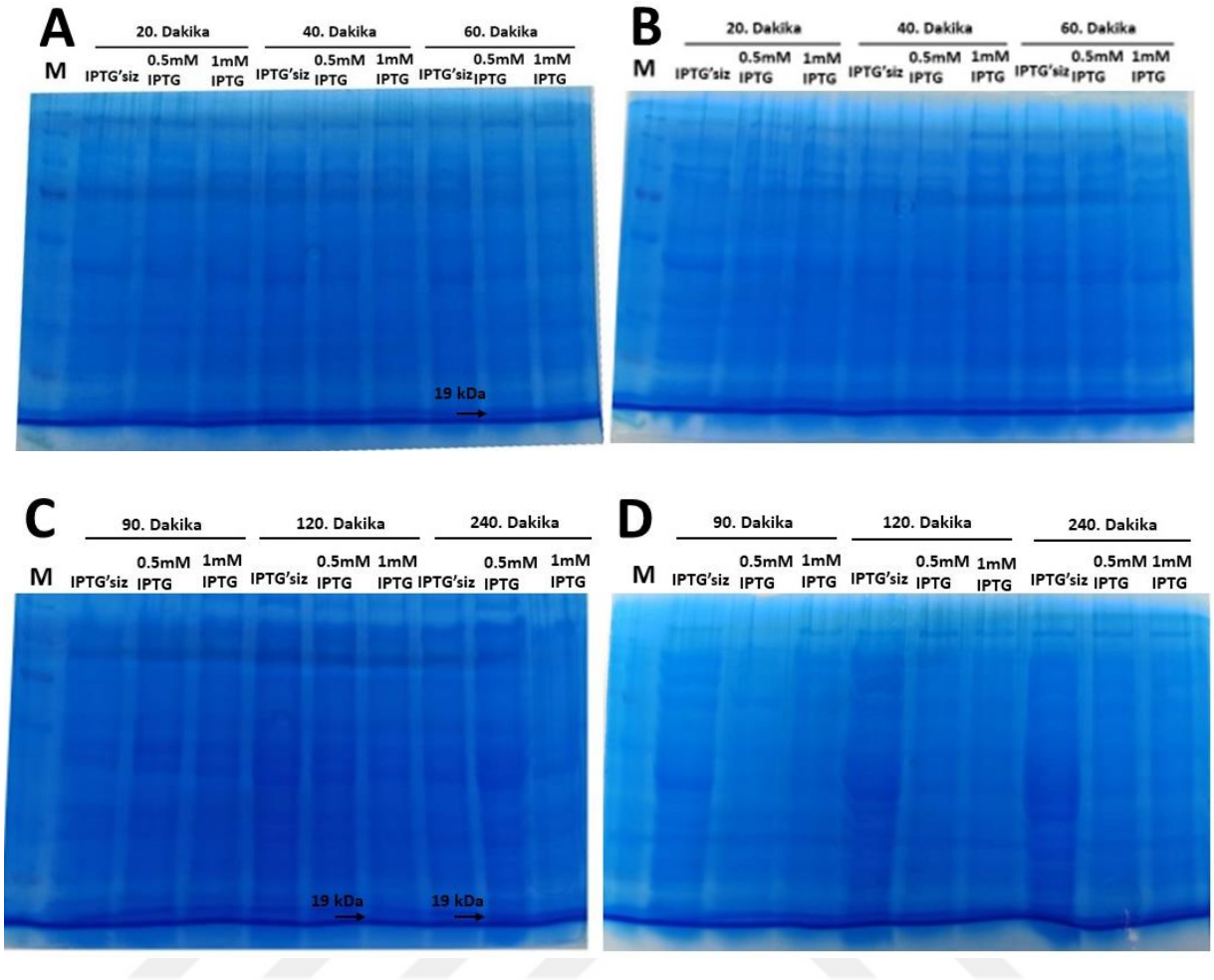

**Şekil 4.5** BLASTn. A) Holin genini içeren plazmitin dizileme sonucunda elde edilen dizinin, Holin gen dizisi ile hizalanması. B) SKHol genini içeren plazmitin dizileme sonucunda elde edilen dizinin SKHol gen dizisi ile hizalanması, Sbjct: Orijinal dizi, Query: Dizileme sonucundaki dizi




**Şekil 4.6** BLASTp sonucu. A) Holin dizileme sonucunda amino asit dizisi ve orijinal amino asit dizisi hizalaması, B) SKHol dizileme sonucunda amino asit dizisi ve orijinal amino asit dizisi hizalaması, Sbjct: Orijinal dizi, Query: Dizileme sonucundaki dizi

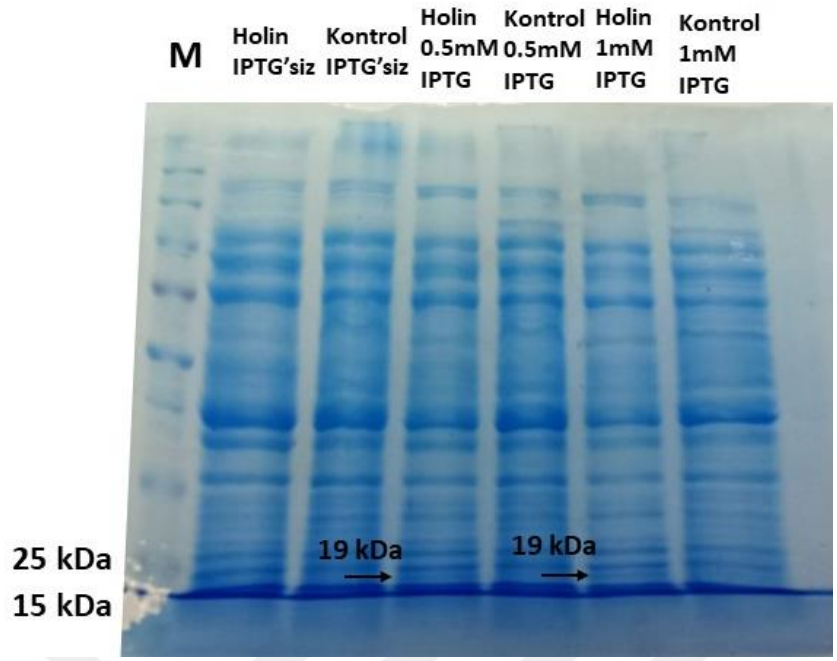
### 4.1.9 Protein Ekspresyonu, SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, Saflaştırma ve Western Blot

Literatürde, Holin proteinin 30°C'de eksprese edildiği belirtildiğinden ilk ekspresyon denemesi 30°C'de 0.5 ve 1 mM IPTG uygulanarak yapıldı (IPTG'siz kontrol grubu da çalışmaya ilave edilmiştir) ve 20.-40.-60.- 90. dakikalar ve 2.-4. saatlerde örnekler alındı. Alınan örneklerin süpernatantı, SDS-PAGE elektroforezinde yürütülerek değerlendirildi. Şekil 4.7'deki görsellerde rHolin protein ekspresyonu ve kontrol ekspresyonunun süpernatantının SDS-PAGE jel sonuçları sunulmuştur.




**Şekil 4.7** rHolin protein ekspresyonu denemelerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. A ve C) Holin genini içeren *E. coli Bl21 (DE3)*, B ve D) Kontrol *E. coli Bl21 (DE3)*

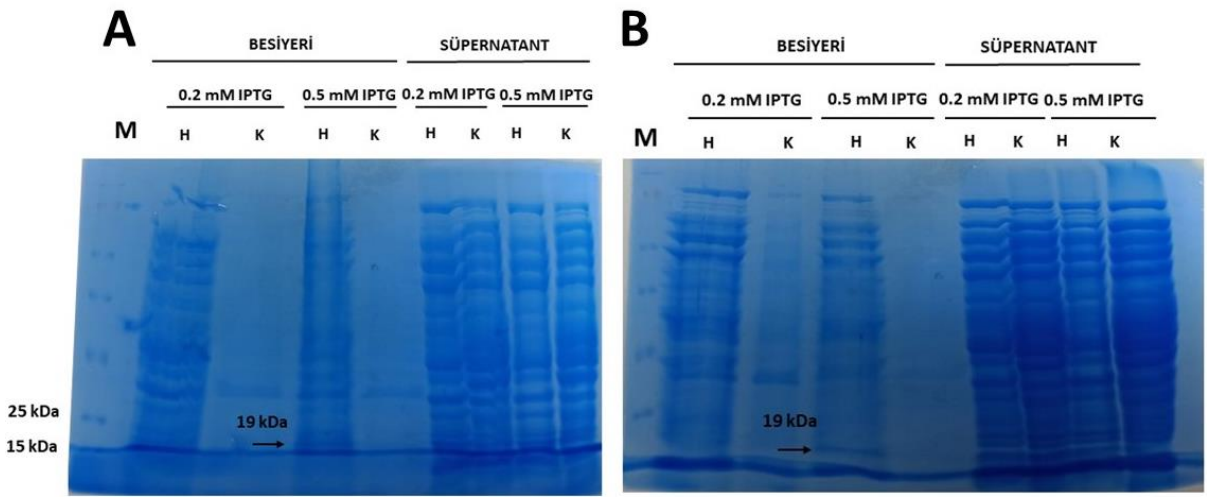
Kontrol ile karşılaştırıldığında 120. ve 240. dakikalarda 0.5 mM IPTG ile indüklenmiş kültürlerin süpernatantlarında, rHolinin beklenen bant büyüklüğü olan yaklaşık 19 kDa'lık bantlar görüldü. Şekil 4.8'de ilgili bantlar daha belirgin bir şekilde gösterilmiştir.




**Şekil 4.8** rHolin proteininin 0.5 mM ve 1 mM IPTG ile indüklendikten sonra 60. dakikadaki ekspresyonunun süpernatantlarının SDS-PAGE jel görüntüsü

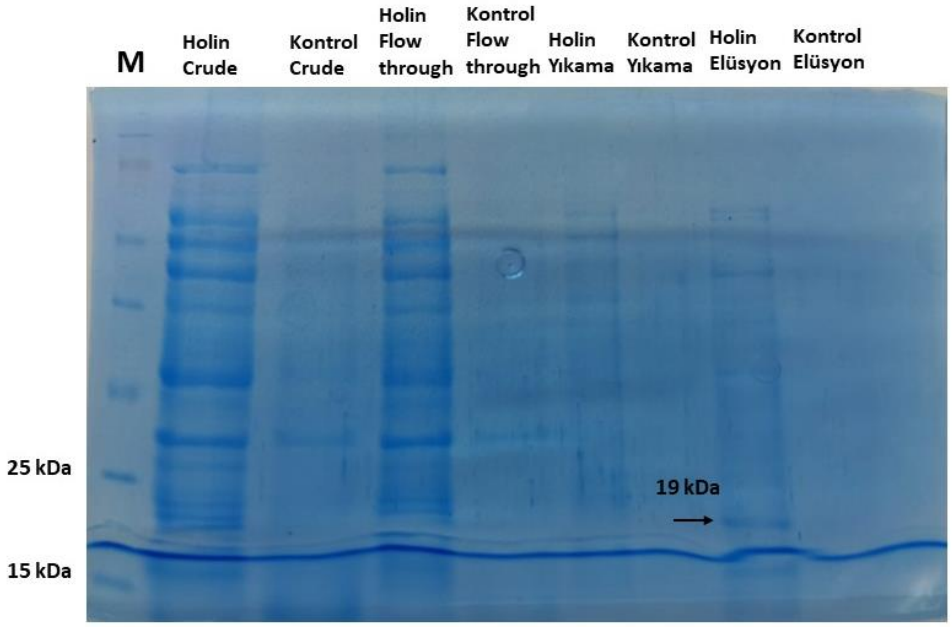
SDS sonucuna göre 0.5 mM ve 1 mM IPTG ile indüklenmiş ve 60. dakikada alınmış örneklerde beklenildiği gibi 19 kDa'lık bantlar görüldü.

Ardından, IPTG miktarı azaltılarak daha uzun sürede protein üretimi ile miktar artırılabileceği fikrinden yola çıkılarak 0.2 mM ve 0.5 mM IPTG ile indükleme yapıldı. Kültürlerin 2.-4.-6. ve 24. saatlerinde örnekler alınarak SDS-PAGE elektroforezde yürütüldü (Şekil 4.9). İlgili çalışma da eş zamanlı olarak rHolinin, lize olmuş bakterilerden besiyerine diffuze olabileceği düşüncesiyle kültür ortamında da rHolin varlığı değerlendirilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, 0.5 mM IPTG ile indüklenmiş kültürlerin besiyerinde 4. ve 6. saatlerinde 19 kDA'lık bantlar açıkça görülürken süpernatantta protein miktarı yoğunluğundan dolayı net olarak gözlenememiştir.

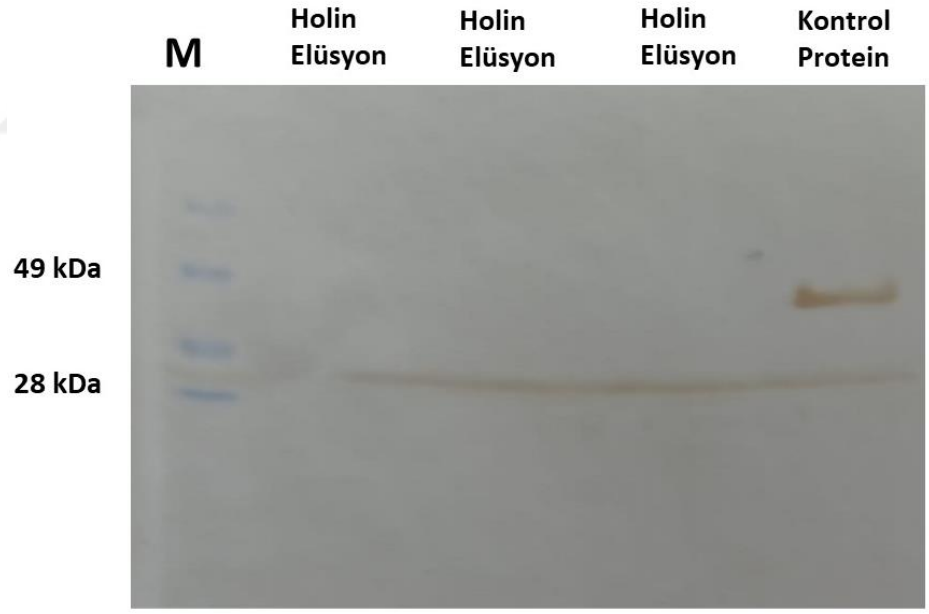



**Şekil 4.9** rHolin proteininin 0.2 mM ve 0.5 mM IPTG ile indüklenmesinin ardından A) 4. saat, B) 6. saatte alınan örneklerin SDS-PAGE jel görüntüleri (H: rHolin, K: Kontrol)

Kültür ortamında görülen bantlar görece daha kalın olduğundan dolayı ekspresyon koşullarının 30°C'de 0.5 mM IPTG eklenmesi ile 4 saat inkübe edilmesine ve proteinlerin besiyerinden alınmasına karar verilerek üretilen proteinlere saflaştırma protokolü uygulandı. Saflaştırma prosesinin her aşamasında alınan örnekler SDS-PAGE elektroforezinde yürütülmüştür. Şekil 4.10'da gösterdildiği gibi, 19 kDa büyüklüğündeki rHolin saf bir şekilde elüsyonda elde edilmiştir. Saflaştırma işleminin ardından Western Blot analizi yapıldı ancak üretilen proteinin çok düşük konsantrasyonda olması nedeniyle doğrulama sağlanamadı (Şekil 4.11).



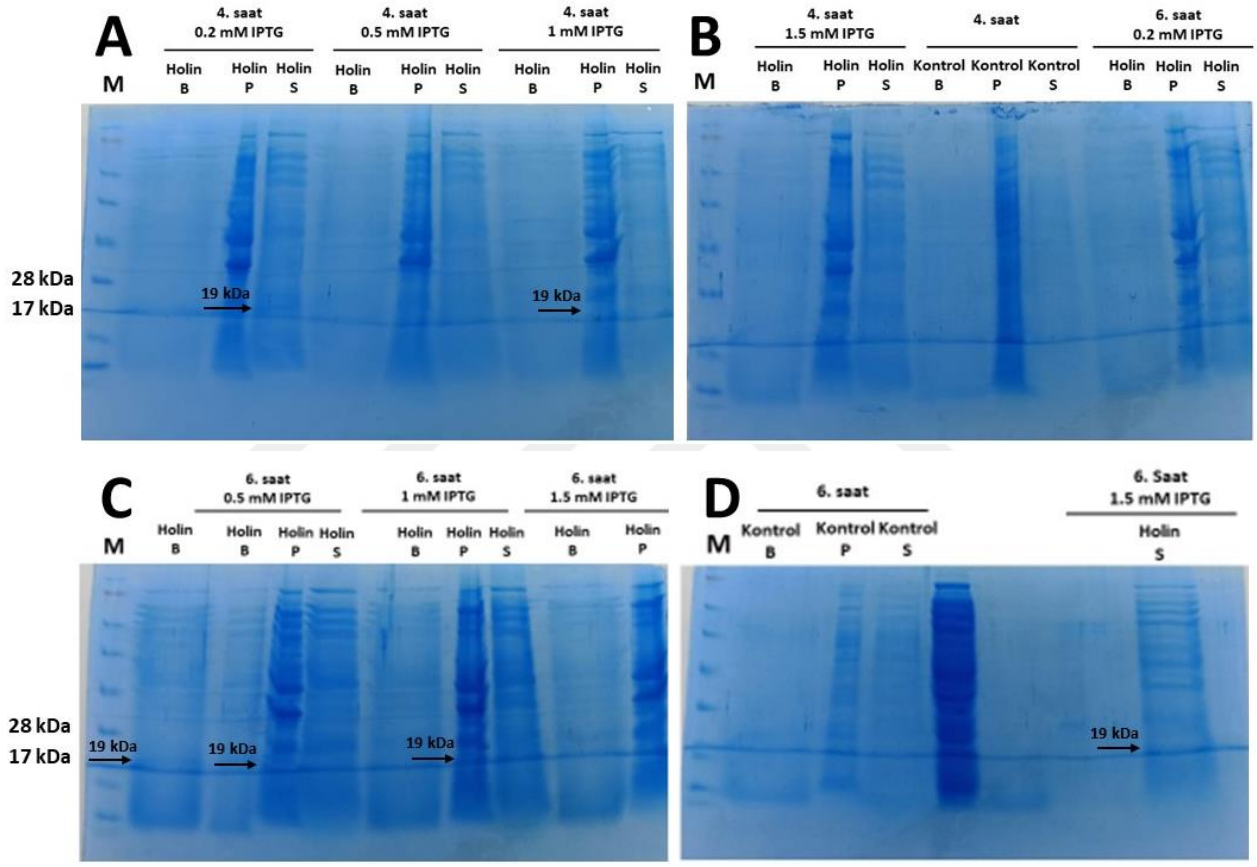

**Şekil 4.10** rHolin proteininin 0.5 mM IPTG ile 4. saat eksprese edilmesinin ardından saflaştırılmasının SDS-PAGE jel görüntüsü



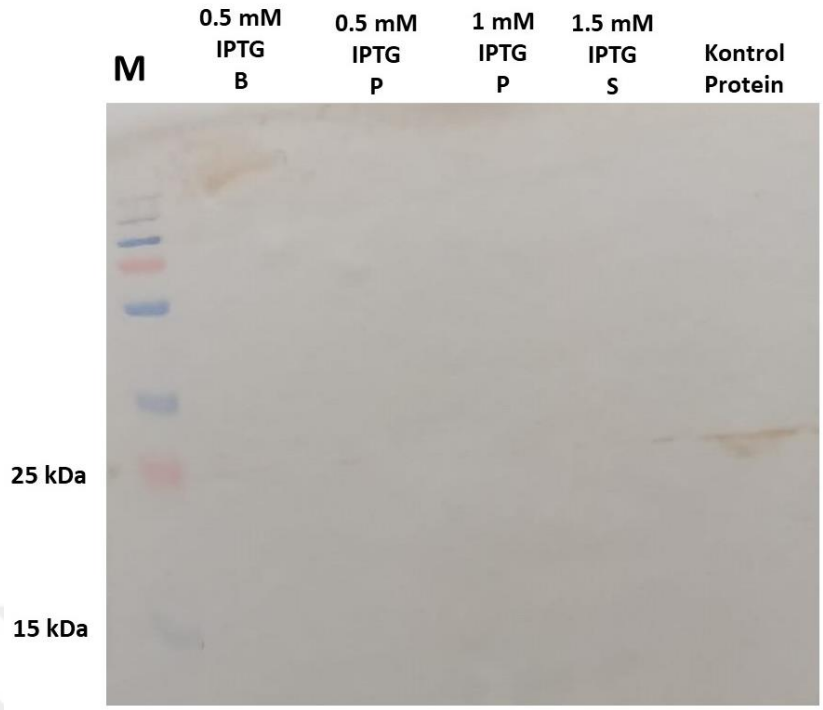

**Şekil 4.11** Saflaştırılmış rHolin proteininin Western-Blot görüntüsü

Western-Blot sonucunda istenilen bant profilinin gözlenmemesi nedeniyle rHolin'in üretiminin gerçekleştiğinin tespiti amacıyla, litik etkisi gözönüne alınarak 30°C'de 0.2-0.5-1 ve 1.5 mM IPTG ile eksprese edilen kültürlerde spektrofotometrik, turbidimetrik ve standart petri sayımı yöntemleri ile değerlendirme yapıldı. İlaveten besiyeri, süpernatant ve pelletlerden örnekler

alınarak SDS-PAGE işlemine tabi tutulup bant profilleri karşılaştırıldı (Şekil 4.12). Sonuç olarak 0.2 mM IPTG 4. saat süpernatant, 1 mM IPTG 4. saat pellet, 0.5 mM IPTG 6. saat besiyeri, 0.5 mM IPTG 6. saat pellet, 1mM pellet 6. saat, 1.5 mM süpernatant 6. saat örneklerinde beklenilen büyüklükte protein bantları yine görece ince bantlar şeklinde gözlemlendi. Ancak 6. saat örnekleri ile gerçekleştirilen Western Blot analizinde, istenilen bant büyüklüğüne sahip rHolin proteini yine tespit edilemedi (Şekil 4.13).




**Şekil 4.12** rHolin proteininin farklı IPTG miktarları ile 4. ve 6. saat indüklenen örneklerin SDS-PAGE jel görüntüleri (B: Besiyeri, P: Pellet, S: Süpernatant)



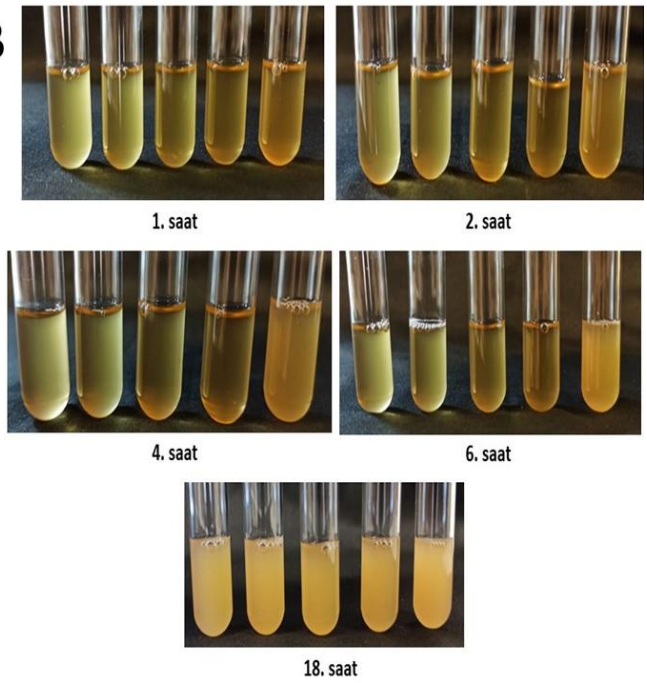

**Şekil 4.13** rHolin proteininin farklı IPTG miktarları ile 6. saat indüklenen örneklerin Western Blot görüntüleri (B: Besiyeri, P: Pellet, S: Süpernatant)

İlgili kültürlerdeki spektrotofotmetrik ve turbidimetrik sonuçlar değerlendirildiğinde; Holin geni içeren plazmiti taşıyan *E. coli Bl21* hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla ilk 6 saatte belirgin bir inhibisyonun varlığı tespit edilmiştir. Özellikle 0.2 mM ve 0.5 mM IPTG ile indüklenen kültürlerin 2-4. saat aralığında hem logaritmik azalmanın hem de bakteriyal büyüme inhibisyonunun diğer koşullara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Farklı IPTG ile indüklenen kültürlerden yapılan standart petri sayım sonuçları spektrofotometrik ve turbidimetrik gözlenen inhibisyon, bu görüntülerle de net bir şekilde doğrulanmıştır (Şekil 4.15).

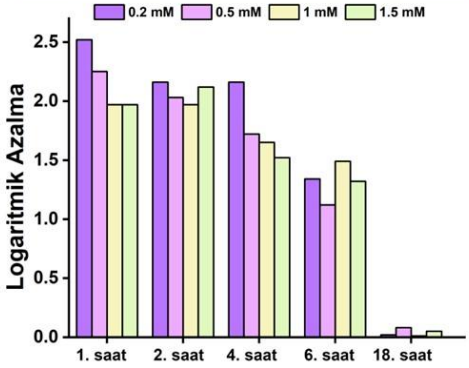
A

| | 0.Saat | 1.Saat | 2.Saat | 4.Saat | 6.Saat | 18.Saat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.2mM IPTG | 0.458 | 0.666 | 0.612 | 0.554 | 0.608 | 2.842 |
| 0.5mM IPTG | 0.532 | 0.666 | 0.580 | 0.520 | 0.592 | 2.914 |
| 1mM IPTG | 0.484 | 0.696 | 0.626 | 0.584 | 0.644 | 2.678 |
| 1.5 mM IPTG | 0.496 | 0.660 | 0.524 | 0.564 | 0.618 | 2.622 |
| Kontrol | 0.424 | 0.836 | 0.986 | 1.424 | 2.180 | 3.128 |

B

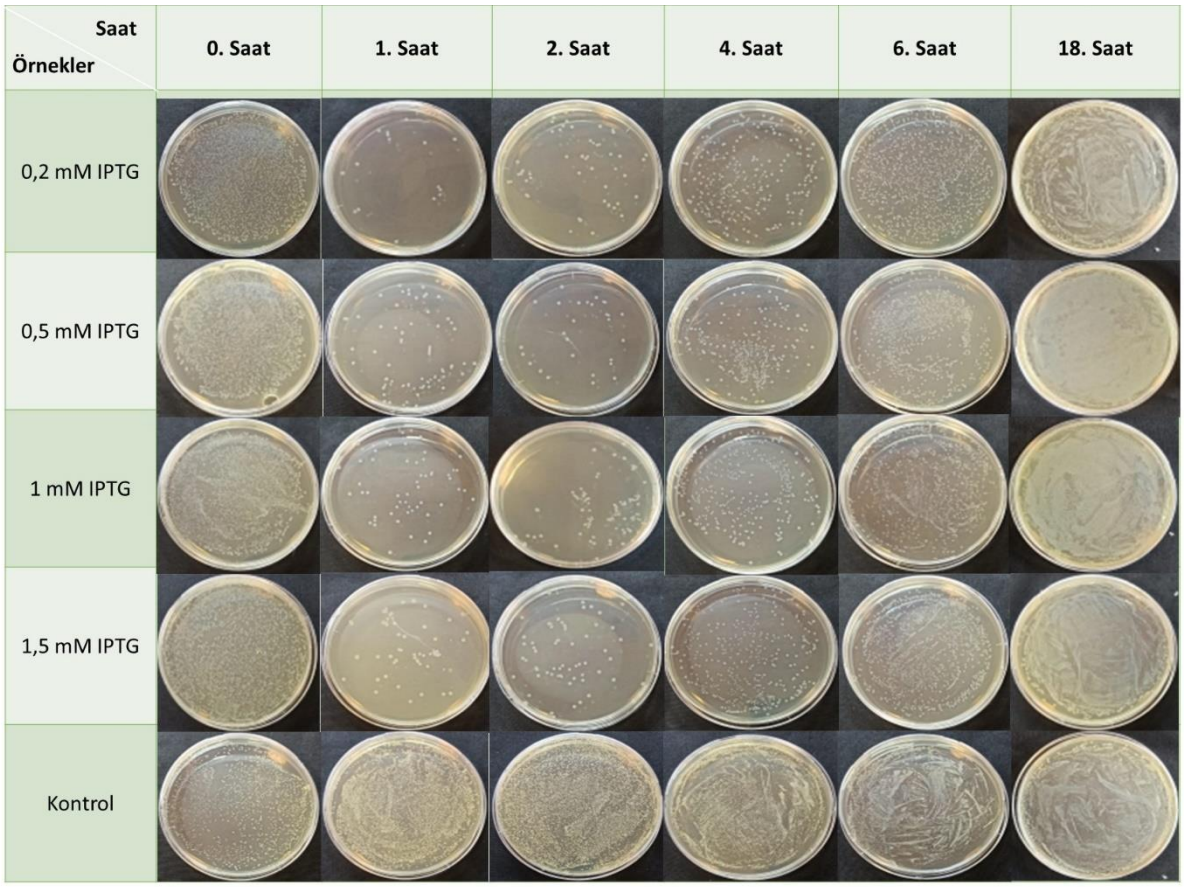



C



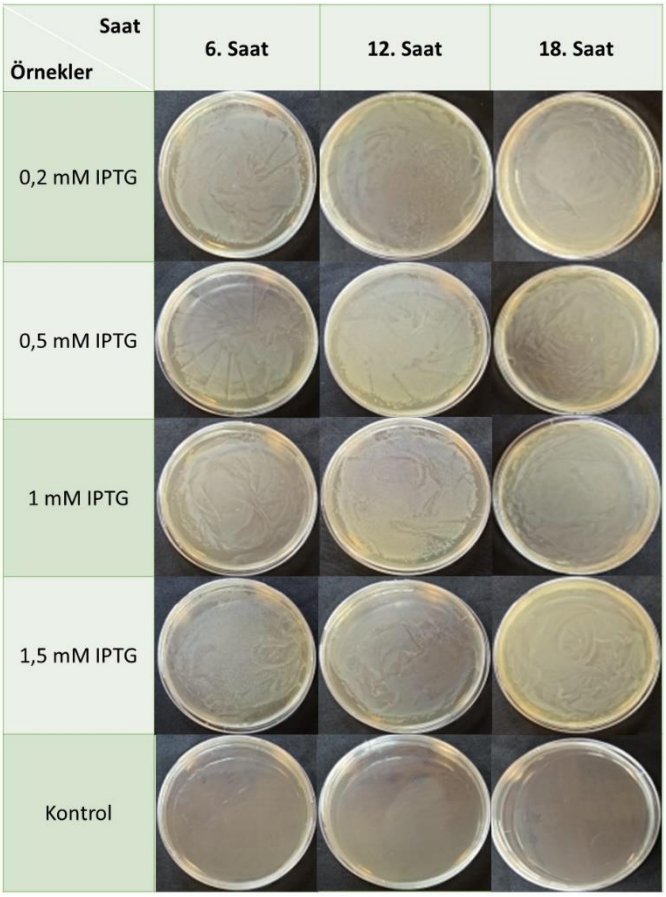

**Şekil 4.14** Farklı IPTG konsantrasyonu ile indüklenen kültürlerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiği sonuçları

6. saatten sonra kültürlerdeki inhibisyonun ortadan kalktığı ve büyümenin çok hızlı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. İnhibisyon etkisinin kaybolmasında plazmit mevcudiyetinin rolünü araştırmak için, farklı IPTG konsantrasyonlarındaki 6.-12. ve 18. saatlik kültürlerden ampisilin içeren LB agarlara ekim yapılmıştır. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, plazmit içermeyen kontrol grupta ampisilinli LB agarda üremenin olmadığı ancak IPTG konsantrasyonundan bağımsız olarak plazmit içeren *E. coli Bl21* hücre hattında üremenin varlığı tespit edilmiştir.



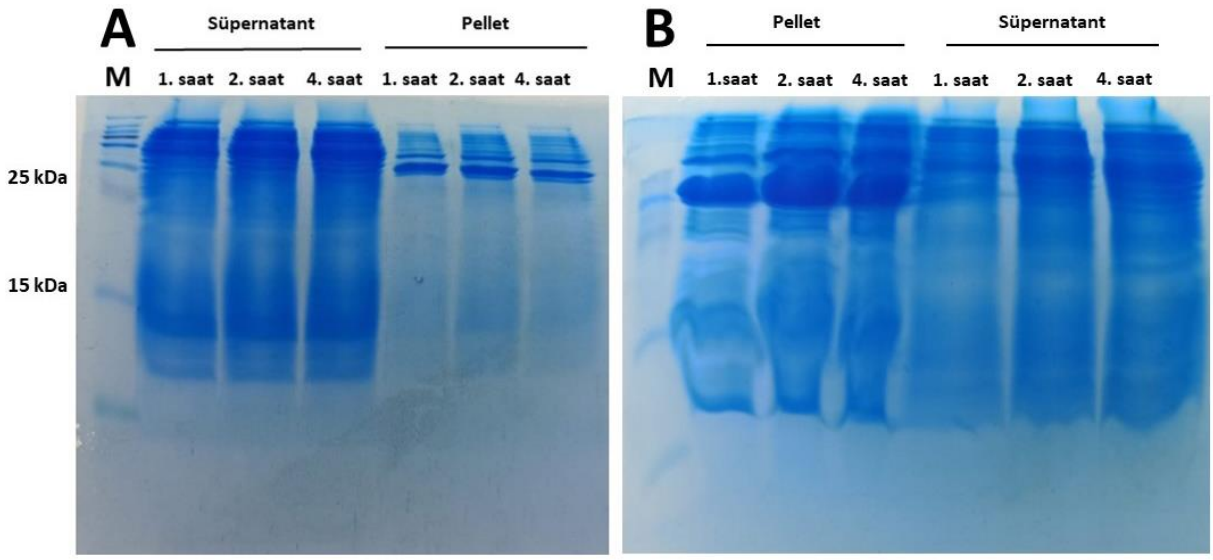

**Şekil 4.15** Farklı IPTG miktarlarındaki saatlik rHolin örneklerinin petrilere ekimi. A) 0.2 mM IPTG B) 0.5 mM IPTG, C) 1 mM IPTG ve D) 1.5 mM IPTG, E) Kontrol

-




**Şekil 4.16** Farklı konsantrasyonlardaki IPTG miktarları ile inkübe edilen kültürlerin ampisilinli LB agar petrilerine ekiminin sonuçları

rHolin üretiminde elde edilen sonuçlar temel alınarak rSKHol proteini için; 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklemesi yapılarak 1.-2.-4. ve 6. saatlerde örnekler alınarak SDS-PAGE jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Bu çalışma ile, sinyal sekansı çıkarılmış Holin proteinin sitoplazma da doğru katlanma morfolojisi sergileyemeyeceğinden inklüzyon cisimciği oluşturacağı öngörüsüyle IPTG miktarı artırılarak üretimin belirgin hale gelmesi amaçlanmıştır. Ancak Şekil 4.18'de görüldüğü gibi yaklaşık 17 kDa büyüklüğündeki rSKHol proteinin varlığı SDS-PAGE'te tespit edilememiştir.



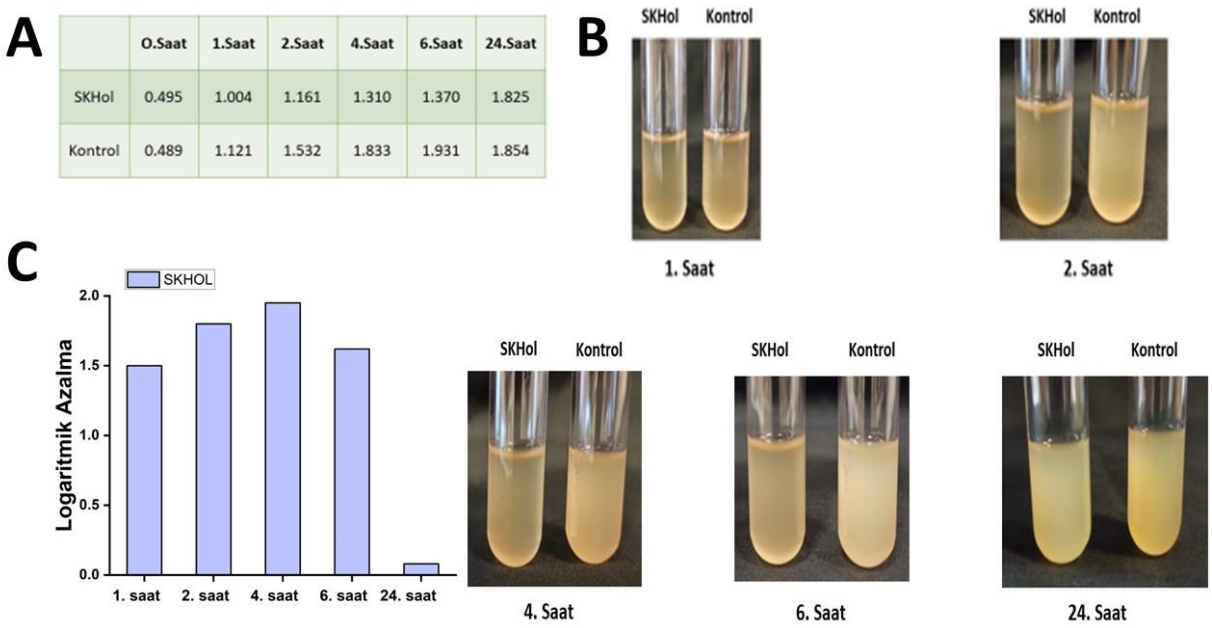

**Şekil 4.17** rSKHol proteini SDS-PAGE görüntüsü

Ardından rSKHol proteininin rHolin gibi inhibisyon etkisinin varlığı, 30°C'de 1 mM IPTG ile eksprese edilen kültürlerde spektrofotometrik ve turbidimetrik yöntemler ile değerlendirilmiştir. Bakteriyal büyümenin 2. ve 4. saatte kontrol grupla kıyaslandığında inhibe olduğu net bir şekilde gözlenmekte olup etkinin

rHolin seviyesinde olmadığı gözlenmektedir. Logaritmik azalmanın 2-4. saat aralığından yüksek olduğu ilgili grafiktede net bir şekilde görülmektedir.

A

| | O.Saat | 1.Saat | 2.Saat | 4.Saat | 6.Saat | 24.Saat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SKHol | 0.495 | 1.004 | 1.161 | 1.310 | 1.370 | 1.825 |
| Kontrol | 0.489 | 1.121 | 1.532 | 1.833 | 1.931 | 1.854 |

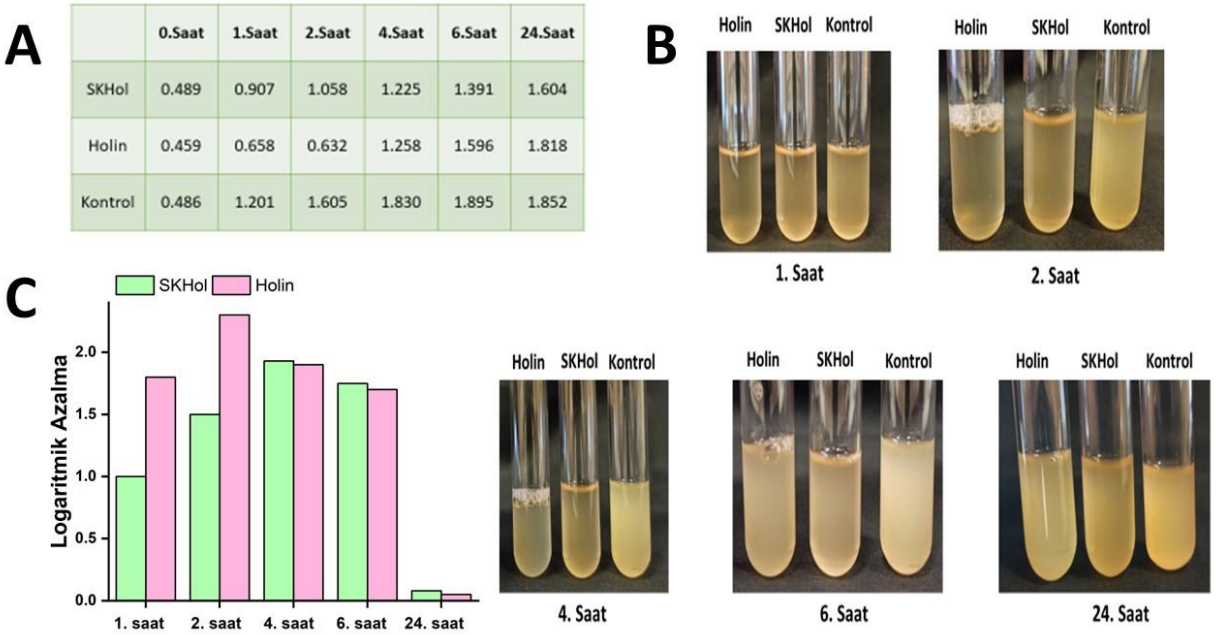



**Şekil 4.18** rSKHol proteininin 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmesi ile saatlik alınan örneklerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiğinin sonuçları

rSKHol ve rHolin proteinlerinin inhibisyon etkisinin daha net gözlenmesi amacıyla ilgili genleri ihtiva eden plazmitleri taşıyan hücre hatları 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenerek 1.-2.-4.-6. ve 24. saatte örnekler alınmış spektrofotometrik ve turbidimetrik değerlendirilmiştir. Spektrofotometrik sonuçlar, rHolinin rSKHol'e göre bakteri büyümesi üzerinde daha belirgin bir inhibiyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir. Logaritmik azalma kontrolle karşılaştırıldığında 1-2-4. saatlerde daha yüksekken, iki protein arasında 1. ve 2. Saatte belirgin bir farklılık bulunmaktadır.

A

| | 0.Saat | 1.Saat | 2.Saat | 4.Saat | 6.Saat | 24.Saat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SKHol | 0.489 | 0.907 | 1.058 | 1.225 | 1.391 | 1.604 |
| Holin | 0.459 | 0.658 | 0.632 | 1.258 | 1.596 | 1.818 |
| Kontrol | 0.486 | 1.201 | 1.605 | 1.830 | 1.895 | 1.852 |




**Şekil 4.19** rHolin ve rSKHol proteinlerinin 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmesi ile saatlik alınan örneklerin A) spektrofotometrik, B) turbidimetrik, C) logaritmik azalma grafiği sonuçları

### 4.1.10 Antibakteriyel Analiz

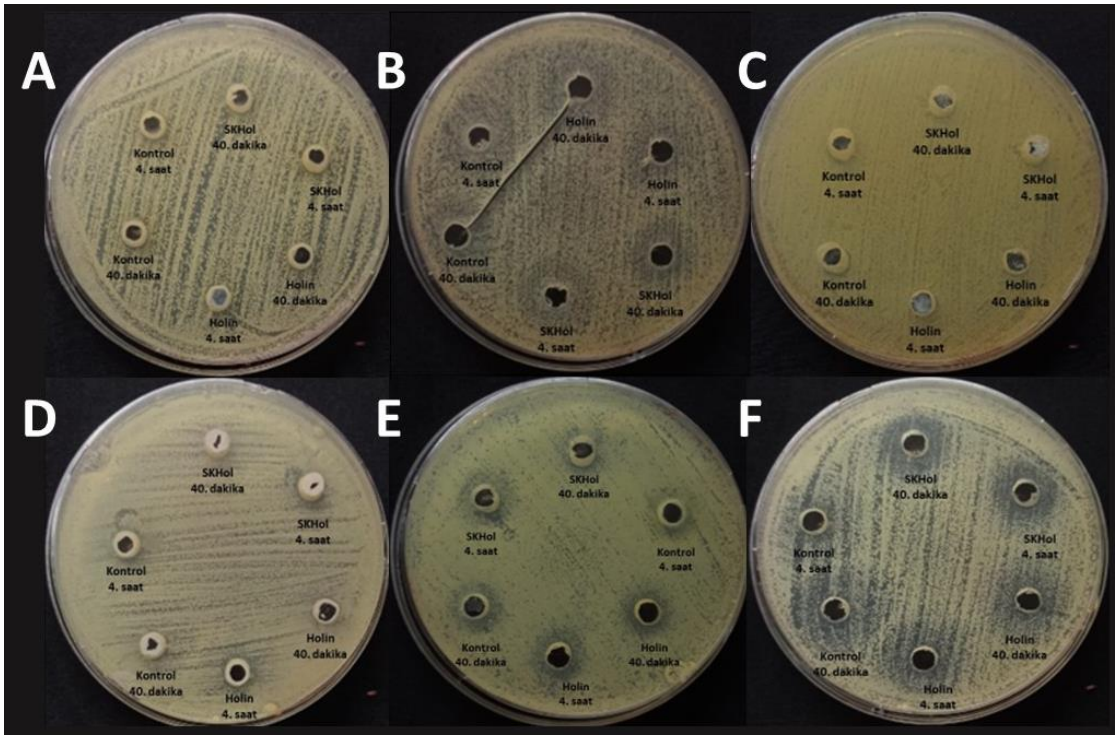
Sunulan tez kapsamında rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen rHolin ve rSKHol proteinlerinin bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisi antibakteriyel aktivite açısından agar kuyucuk diffüzyon metodu ve spot testi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçların inhibisyon zon çapı değerleri Tablo 4. 6' da ve petri görüntüleri de Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de sunulmuştur. Sonuçlar, rHolin proteininin antibakteriyel özelliğinin rSKHol'e göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuç hem sprektrofotmetrik hem de turbidimetreik sonuçları doğrular niteliktedir.

**Tablo 4.6** Agar kuyucuk diffüzyon metodunun inhibisyon zon çapı sonuçları

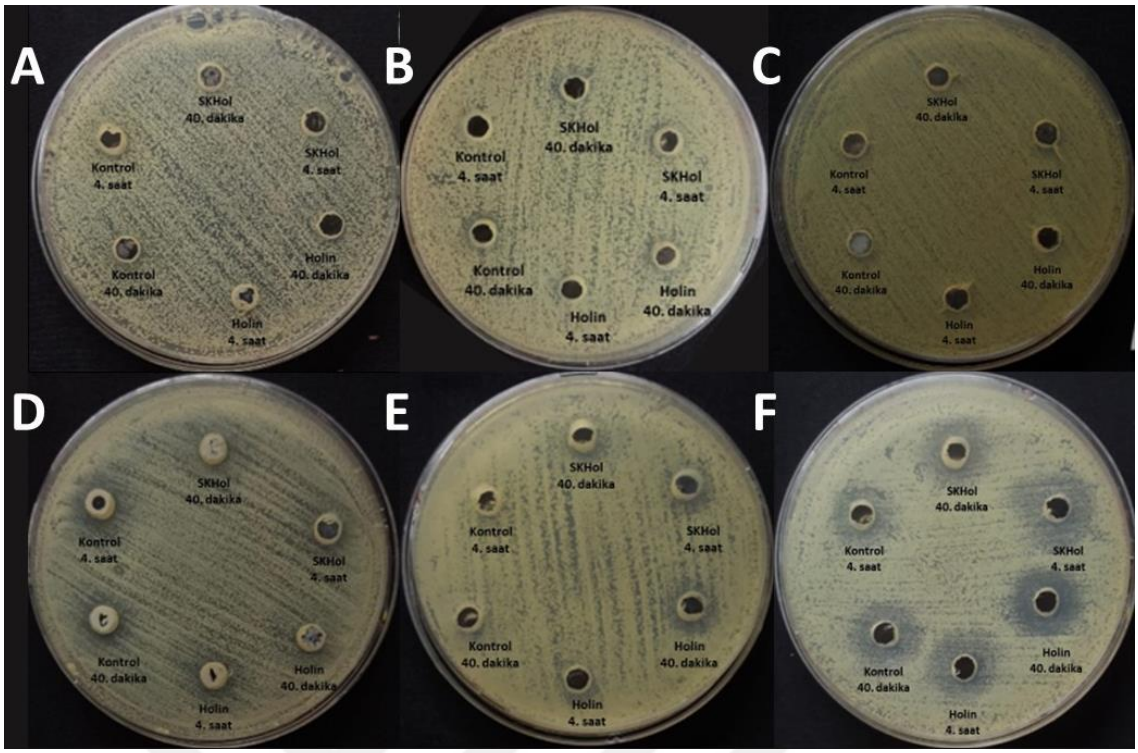
| Sıcaklık | Örnek Adı | İnhibisyon Zon Çapı (mm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Lizis Koşulu** | | | | |
| | | **1. Koşul** | **2. Koşul 1. Örnek** | | **2. Koşul 2. Örnek** | |
| 37°C | rHolin 40.dakika Süpernatant | - | - | 16 | | |
| | rHolin 40. dakika Pellet | - | - | 8 | | |
| | rHolin 4.saat Süpernatatant | - | 7 | 7 | | |
| | rHolin 4. saat P ellet | - | - | - | | |
| | rSKHol 40.dakika Süpernatant | - | - | 8 | | |
| | rSKHol 40. dakika Pellet | - | - | - | | |
| | rSKHol 4.saat Süpernatant | - | 7 | - | | |
| | rSKHol 4. saat Pellet | - | - | 7 | | |
| | Kontrol 40.dakika Süperatant | - | 8 | 7 | | |
| | Kontrol 40. dakika Pellet | - | - | - | | |
| | Kontrol 4. saat Süpernatant | - | 9 | - | | |
| | Kontrol 4. saat Pellet | - | - | - | | |
| 30°C | rHolin 40.dakika Süpernatant | - | 6 | 8 | | |
| | rHolin 40. dakika Pellet | - | - | - | | |
| | rHolin 4.saat Süpernatant | - | 7 | 7 | | |
| | rHolin 4. saat Pellet | - | - | - | | |
| | rSKHol 40.dakika Süpernatant | - | - | 10 | | |
| | rSKHol 40. dakika Pellet | - | - | - | | |
| | rSKHol 4.saat Süpernatant | - | 7 | 9 | | |
| | rSKHol 4. saat Pellet | - | - | - | | |
| | Kontrol 40.dakika Süpernatant | - | - | - | | |
| | Kontrol 40. dakika Pellet | - | - | - | | |
| | Kontrol 4. saat Süpernatant | - | 6 | - | | |
| | Kontrol 4. saat Pellet | - | - | - | | |

Tüm test örnekleri için, 1.koşul (lizis tamponu, lizozim ve sonikasyon metodu ile sadece bir defa lizis işlemi uygulanması) lizis prokolü ile lize edilerek hazırlanan lizatların peletinde hiçbir aktivite gözlenmezken, süpernatanlarında inhibisyon etkinin inkübasyon ilk saatlerinde gerçekleştirdiği ancak sonrasında aktivitenin kaybolarak zon alanının yeniden bakteriyal üreme ile kaplandığı görüldüğünden etki bakteriyostatik olarak değerlendirilmiştir. Eurocast standardında antibakteriyel aktivite için *S. aureus*'da belirgin inhibisyon zon çapının (bakterisidal etkinin) değerlendirilmesi gerekliliği vurgulandığından sonradan gerçekleşen üremenin varlığı bakteriyostatik etki olarak değerlendirilmiş ve inhibisyon zon çapı olarak hesaplamaya dahil edilmemiştir [92]. İlaveten, 37 °C'

de üretilen rekombinant proteinlerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu, özellikle rHolinin 40.dk süpernatantında yüksek bakterisidal aktiviteye ulaşıldığı gözlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunu oluşturan plazmit içermeyen *E. coli Bl21* hücre kültürü lizatının da ihtiva ettiği toksinlerden dolayı inhibisyon zonu oluşturduğu ancak rHolin ve rSKHol proteinlerine göre etkinin zon alanlarında bakteriyal üreme varlığı nedeniyle daha düşük olduğu yani bakteriyostatik nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

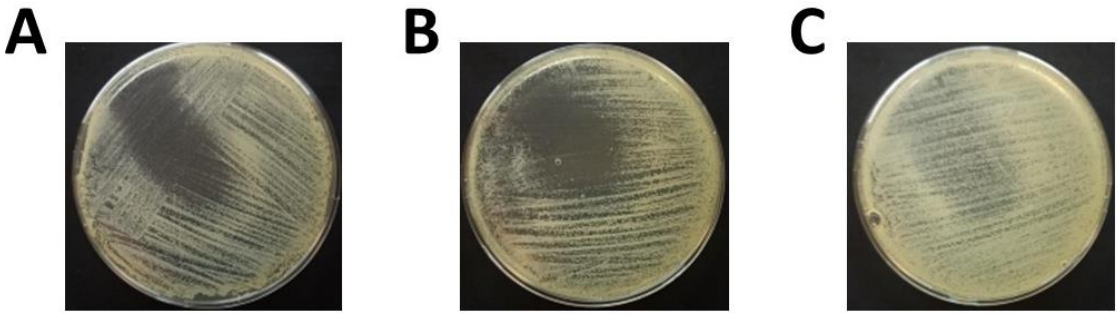



**Şekil 4.20** 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rHolin ve rSKHol proteinlerinin farklı lizis koşullarında alınan pellet ve süpernatant örneklerinin agar kuyucuk diffüzyon metodu ile antibakteriyel testi. A) 1. koşul 1. pellet, B) 1. koşul 1. süpernatant, C) 2. koşul 1. pellet, D) 2. koşul 1. süpernatant, E) 2. koşul 2. pellet, F) 2. koşul 2. süpernatant




**Şekil 4.21** 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenen rHolin ve rSKHol proteinlerinin farklı lizis koşullarında alınan pellet ve süpernatant örneklerinin agar kuyucuk diffüzyon metodu ile antibakteriyel testi. A) 1. koşul 1. pellet, B) 1. koşul 1. süpernatant, C) 2. koşul 1. pellet, D) 2. koşul 1. süpernatant, E) 2. koşul 2. pellet, F) 2. koşul 2. süpernatant

Agar kuyucuk diffüzyon testinde her iki örneğin en yüksek aktiviteye sahip olduğu test örnekleri (16 mm ve 10 mm zon çapındaki örnekler) kontrol grubu ile birlikte spot testi ile antibakteriyel aktivite açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.22). Kontrol grubunu oluşturan plazmit içermeyen *E. coli Bl21* hücre kültürü lizatının toksinlerden dolayı inhibisyon etkisi gösterdiği ancak etkinin zon alanlarında bakteriyal üreme varlığı nedeniyle daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç agar kuyucuk diffüzyon testini doğrular niteliktedir. rHolin ve rSKHol proteinlerinde ise, inhibisyon alanlarının büyüklüğünün benzer olduğu ancak rSKHol inhibisyon alanındaki bakteriyal üremenin rHolin'e göre daha fazla olduğu görülmektedir.




**Şekil 4.22** Spot testi sonucu. A) rSKHol proteini, B) rHolin proteini, C) Kontrol

## 4.2 Tartışma ve Öneriler

Dünyada ve ülkemizde giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebeplerinden biri olan *S. aureus* çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır [93]. Normal mikrobiyota da görülmesine rağmen kan dolaşımına veya iç dokulara girebilmesi halinde ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. *S. aureus* ile ilgili araştırmalar halen devam ederken bu bakteri ile enfekte olmuş hastaların iyileşme oranlarında bir artış ve *S. aureus* enfeksiyonlarında aynı oranda bir azalış beklenmektedir. Ancak şimdiye kadar *S. aureus* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmış antibiyotiklerin, yanlış ve yoğun miktarda kullanılması bu beklentinin tam tersi durumda olunmasına yol açmıştır [10]. Özellikle antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarından kaynaklı enfeksiyonların artması bilim insanlarını alternatif tedavi bulmaya yöneltmiştir. Bu alternatif tedavi yöntemleri arasında bakteriyofaj ve bakteriyofaj türevli antimikrobiyaller, son on yılda dirençli bakterilere karşı yeniden araştırılmaya başlanmış ve umut verici bir alternatif olarak görülmektedir.

Bakteriyofajlar; bakteri ve arke gibi mikroorganizmaları enfekte ederek gelişen dünyada en bol bulunan biyolojik varlıklardır. Küresel biyojeokimyasal döngülerde önemli rolleri bulunmaktadır. Sıcak su kaynakları gibi aşırı sıcak ortamlardan kutup iç suları gibi aşırı soğuk ortamlara kadar geniş bir ekosistemde varlıklarını sürdürdükleri düşünülmektedir. Denizlerde, orman ve tarım arazilerindeki topraklarda milyonlarca faj bulunmaktadır [24]. Bakteriyofajlar 4 farklı yaşam döngüsünde ilerleyebilmektedir. Bunlardan biri litik döngüdür ve litik döngüde bakteri hücresi içerisinde yeni oluşan viriyonların dış ortama salınmasını sağlayan çeşitli litik proteinler üretilmektedir. Bu litik proteinler holin-endolizin sistemi olarak adlandırılarak genellikle çift sarmallı DNA genomuna sahip olan fajlarda görülmektedir. Bu litik fajların bakterileri lizize uğratması sırasında, sitoplazmik membranın geçici olarak kontrollü bir şekilde geçirgen hale gelir ve ardından peptidoglikanın enzimatik bozunması gerçekleşir [81].

Holinler, enfeksiyon sırasında belirli bir konsantrasyona ulaşıncaya kadar bakteri hücresinin iç membranında biriken ve daha sonra konakçı hücrenin sitoplazmik membranına oligomerik olarak yerleşen hidrofobik proteinlerdir [29][31].

Genetik olarak programlanmış bir zamanda zar proton motif gücünün yıkımına neden olan deliklerin oluşumunu tetikleyerek büyümenin durmasına ve hücre ölümüne yol açarlar. Diğer bir görevi de sitozolde biriken ve hücre duvarının degredasyonuna neden olan endolizinlerin, oluşan bu deliklerden salınmasına izin vermektir [29].

Literatürde faj litik proteinlerin bakteri üzerinde antibakteriyel etkileri, hücre içinde rekombinant olarak eksprese edildiklerinde ve eksojen olarak uygulandığında gözlemlenmiştir. Ayrıca, Holin proteinlerinin bakteri hücresi üzerinde etkili antibakteriyel aktivite göstermesine ek olarak Holin proteinleri in vitro olarak ökaryotik tümör hücrelerinin canlılığını ve boyutunu azalttığı gösterilerek anti-kanser ajanı olarak kullanılabileceği de ortaya koyulmuştur [32][91].

Sunulan bu tez çalışmasında ilk olarak ticari olarak temin edilen *S. aureus* fajından genomik DNA izole edilerek Holin gen bölgesine ve klonlama yapılacak vektöre uygun şekilde tasarlanmış primerler kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. PZR reaksiyou ile Holin gen bölgesi başarılı bir şekilde amplifiye edildi. Elde edilen Holin amplikonu diğer PZR ürünlerinden saflaştırılarak pLATE51 vektörüne aLICator kiti ile klonlandı. Holin geninin klonlandığı ekspresyon vektörü kompetan hale getirilen *E. coli Bl21(DE3)* suşuna transforme edildi. Ampisilinli LB agarda çoğalan koloniler koloni PZR ile kontrol edildikten sonra kolonilerden plazmit izole edildi. İzole edilen plazmitlerin dizileme analizleri bir firma tarafından yapıldı. Alınan dizileme sonucu BLASTn ve BLASTp programları ile orijinal Holin geninin baz ve amino asit dizileri hizalandı ve sonuçta iki dizi arasında %100 benzerlik görüldü.

Transforme olmuş ve dizileme sonucunda Holin geni ile aynı gen dizisini içeren koloniler sıvı kültür ortamına alındı. Kültür OD 0.5-0.6 aralığına ulaştığında literatür verileri esas alınarak belirli oranda IPTG ile indüklenerek Holin geninin ekspresyonu sağlandı. 3 kDA'lık 6XHistag etiketi ile birlikte yaklaşık 19 kDa büyüklüğünde beklenilen rHolin proteini SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Saflaştıma sonrası düşük miktarda ve saf olarak üretildiği SDS-PAGE'de gösterilmesine rağmen rHolin proteinin düşük miktarda üretilmesi nedeniyle western blot

yöntemi ile üretimi doğrulanamamıştır. Transmembran domainlere sahip Holin gibi membran proteinlerinin saflaştırılmaları aşamasında N terminalinde bulunan 6xHis-Tag etiketinin protein ile birlikte katlanması nedeniyle rezine bağlanamadığı ve dolayısıyla saflaştırılamadığı bilinmektedir [94]. Nitekim literatürde, Y. Shi ve arkadaşlarının 1mM IPTG ile indükleyerek 30ºC'de 150 rpm hızındaki çalkalayıcı etüvde 40 dakika inkübasyon sonrası Holin proteini ürettiği ve Western Blot analizi ile doğruladığı görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan IPTG miktarı, sıcaklık, çalkalama zamanı ve süre özelliklerinin benzer olduğu ancak rHolin eldesinde farklı lizis protokollerinin uygulandığı ve kullanılan vektörün 6X Histag etiketinin C-terminalinde olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak rHolin protein eldesinde ikili lizis işlemi tezin metodolojisinde uygulanmış ancak SDS-PAGE jeli de dahil olmak üzere saflaştırma ve Western Blot analizlerinde rHolin varlığı yine tespit edilememiştir. Nitekim Sınıf II Holin proteinlerinin C terminalinde hücre sitoplazmasına doğru uzanan lineer zincirin varlığı 6X Histag etiketinin C terminalinde olması durumunda katlanmaya bağlı yaşanılan zorlukların aşılabileceğini göstermektedir. Bu yüzden rHolin ve rSKHol proteininin üretimi ileriki çalışmalarda C-terminalinde 6X Histag etiketine sahip vektörler ile gerçekleştirilecektir.

Literatürde farklı bakteriler üzerinde litik etkiye sahip farklı fajların Holin proteininin rekombinant DNA tekonolojisi ile üretimine yönelik sadece az sayıda araştırma makalesi yer almaktadır [95][90][84][96][83][97][98][85][32][28][99][100][101][86][89]. Bunlar incelendiğinde proteinin az miktarda üretildiği ve litik etkisinin kültür lizatları ile tespit edildiği görülmektedir. Sunulan tez çalışmasında rHolin ve rSKHol proteinleri ile ilgili elde edilen sonuçlar ilgili araştırma sonuçları ile örtüşmektedir.

Sunulan tezde, Western blot yöntemiyle doğrulanamaması nedeniyle rHolinin kültür ortamındaki varlığı bakteriyal inhibisyon etkisi üzerinden tespit edilmiştir. Bu amaçla, Holin genini ihtiva eden vektörü içeren ve içermeyen *E.coli Bl21* kültürleri farklı sıcaklık ve IPTG konsantrasyonlarına tabi tutularak karşılaştırılmalı olarak turbidimetrik, spektrofotometrik ve standart petri sayımı ile değerlendirilmiştir. 30°C'de dört farklı IPTG konsantrasyonu (0.2-0.5-1 ve 1.5 mM) ile indüklenen kültürlerin spektrofotometrik sonuçlarında; 0. saatte 0.5 $_{(OD600)}$

olan absorbans değerinin 1. saatte benzer oranda bir büyüme sergilediği (0.6 $_{(OD600)}$) ancak 0.2 mM'lık kültürde 2-4. saat aralığında azaldığı 6. saatin sonunda ise tekrar arttığı tespit edilmiştir (sırasıyla, 0.666- 0.612- 0.554). Plazmit içeremeyen *E.coli Bl21* kültürün de ise, 0.4 $_{(OD600)}$ olan başlangıç absorbans değerinin sırasıyla 0.8, 0.9, 1.4 ve 2.1$_{(OD600)}$ olarak sürekli arttığı özellikle 4. saatte 0.2 mM IPTG ile indüklenen kültür ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 katlık bir fark olduğu görülmektedir. Standart petri sonuçları logaritmik azalma grafiği ile karşılaştırıldığında, ilk 4 saat için logaritmik azalma değerleri en yüksek 0.2 mM IPTG'de 2.5-2 aralığında gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak düşük IPTG konsantrasyonlarında rHolin proteininin daha fazla üretildiği ve böylelikle *E. coli* üzerinde daha fazla öldürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde;

- *Haemophilus influenzae* bakterisi *HP1* fajının holin proteininin, 37 ºC'de 0.5 mM IPTG ile indüklenen kültürde 150. dakikadan itibaren logaritmik bir düşüşe neden olduğu [95],
- *Streptococcus suis* bakterisi SMP fajının holin proteininin 30 ºC'de 1mM IPTG ile indüklenen kültüründe 40-60. dakikalar arasında logaritmik bir düşüşün gerçekleştiği [90], Western Blot analizinde 24-40. dakika arasında protein seviyesinde artışın olduğu 40. dakika sonrasında bir azalmanın varlığı [28],
- *Vibrio alginolyticus* bakterisinin *HH109* fajının holin proteini, *E. coli Bl21 (DE3)* hücre hattında ilk dört saatte absorbans değerinde azalmaya sebep olurken sonrasında ise plazmit içermeyen kontrol hücre hattının absorbans değerine yaklaştığı, [101].

bilgileri yer almaktadır. Sunulan tez çalışmasında da rHolin protein üretiminde benzer bir etkinin varlığı tespit edilmiş olup rHolin proteinin bakteri büyüme inhibisyonu üzerindeki etkisinin yalnızca kültürün erken aşamalarında var olduğu açıkça görülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında spektrofotometrik, turbidimetrik ve standart petri sayım sonuçları, 6. saatten sonra kültürlerde inhibisyonun ortadan kalktığını ve büyümenin çok hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. İnhibisyon

etkisinin kaybolmasında plazmit mevcudiyetinin rolünü araştırmak için, farklı IPTG konsantrasyonlarındaki 6., 12. ve 18. saatlik kültürlerden ampisilin içeren LB agarlara ekim yapılmıştır. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, plazmit içermeyen kontrol grupta ampisilinli LB agarda üremenin olmadığı ancak IPTG konsantrasyonundan bağımsız olarak plazmit içeren *E.coli Bl21* hücre hattında üremenin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, 6. saatten sonra rHolin proteininin hücreleri lizise uğratmadığını gösterdiğinden orgaizmanın; antimikrobiyal direnç mekanizmalarından herhangi biri ile litik etkiyi ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Özellikle rHolin proteinin membran üzerindeki çıpa etkisini bertaraf edecek anti-Holin sisteminin varlığı düşünülmektedir. Guo ve ark. 2018 yılında Lactobacillus fermentum fajı ϕPYB5'nın Holin proteininin (Hyb5) lizisiyle yaptıkları araştırmada Holin geninin 157-465. bazları arasındaki bölgede anti-Holin sisteminin çalışmasını sağlayan bir proteinin ($rHyb5_{157\text{-}465}$) üretildiği tespit edilmiştir. İlgili çalışmada, $rHyb5_{157\text{-}465}$ proteininin translasyon başlama bölgesinin ortadan kaldırıldığı durumda konak hücre lizizinin hızlandığının tespit edilmesi $rHyb5_{157\text{-}465}$ proteininin rHyb5 üzerinde inhibisyon etkisi yarattığını ve hücre lizisini engellediğini göstermiştir. Ayrıca, rHyb5'in C terminalindeki 45 amino asit kalıntısının silinmesinden sonra $rHyb5_{157\text{-}465}$ varlığında bile erken hücre lizisinin gerçekleştiği tespit edildiğinden her iki protein arasındaki etkileşimin Holinin C terminalindeki rezidüler üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir [86]. Ancak, sunulan tez çalışmasındaki *S. aureus* fajının Holin gen bölgesi incelendiğinde; sadece başlangıç bölgesinde Metiyonin amino asidi bulunduğu, genin içinde başka Metiyonin amino asidi yer almadığı için tek bir açık okuma çerçevesine sahip olduğu görüldüğünden ilgili fajdaki anti-Holin sisteminin farklı bir mekanizma ile çalıştığı düşünülmektedir.

Üç tip holin sınıfında da sinyal sekansının bulunmadığı bildirilmesine rağmen [95] yaptığımız çalışmada *S. aureus* fajının Holin proteinin bir sinyal sekansına sahip olduğu, iki transmembran bölge içerdiği ve genomda endolizin gen bölgesinin bitişiğinde olduğu görülmektedir [102][28]. Sunulan tez çalışmasında, rHolinin transmembrana taşınmasını sağlayan sinyal sekansı çıkarılarak yüksek IPTG ve sıcaklık ile inklüzyon cisimciği şeklinde sitoplazma içerisinde yüksek miktarda üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla rHolin proteinin sinyal sekansı çıkarılarak elde

edilen SKHol geni pLATE51 vektörüne klonlanmış ve *E. coli BL21(DE3)* suşuna transforme edilmiştir. rSKHol proteini 6X Histag ile birlikte yaklaşık olarak 17 kDa büyüklüğünde olup ekspresyonun ardından SDS-PAGE elektroforezinde tespit edilememiştir. Protein büyüklüğünün düşük olması ve tıpkı rHolin gibi ilk 6 saatlik ekspresyon süresinde ekspresyonun çok az miktarda gerçekleşmesinin bunda etkili olduğu düşünüldüğünden daha yüksek çökme hızına sahip santrifügasyon yöntemiyle elde edilebileceği düşünülmektedir. Çünkü ekspresyon aşamasında rSKHol proteininin de rHolin proteini gibi kültürdeki bakteriyal üreme üzerinde inhibisyon etkisinin varlığı spektrofotemetrik ve turbidimetrik olarak tespit edilmiştir. rSKHol geni taşyan vektörü içeren ve içermeyen *E.coli Bl21*'in 0.4 absorbans değerine sahip başlangıç kültürünün 2. ve 4. saati arasında belirgin bir farklılık gözlenmiştir; sırasıyla 1.16, 1.53 ve 1.31, 1.83. Dolayısıyla rSKHol'in ekspresyonuyla bakteriyal büyümenin inhibe edildiği net olarak gözlenmiştir. Ancak var olan inhibisyon etkinin rHolin kadar olmadığı görülmektedir. rHolin ve rSKHol geni taşıyan vektörleri içeren *E.coli Bl21* hücre kültürleri, 37 °C'de 1 mM IPTG ile indüklendiğinde absorbans değerleri arasında ikinci saatte yaklaşık iki katlık bir fark olduğu görülmüştür; sırasıyla, 0.63 ve 1.05. Nitekim farklı fajlardan üretilen holinler ile yapılan çalışmalarda da turbidimetrik azalma gözlenmesine rağmen SDS-PAGE jellerinde bant görülmemiş olması az miktardaki holin proteinin bile membran hasarına sebep olduğunu işaret etmektedir[89].

Sunulan tezde üretilen rHolin ve rSKHol proteinlerinin antibakteriyal ajan olarak kullanım potansiyeli açısından değerlendirmek amacıyla agar kuyucuk diffüzyon ve spot testi yöntemleri uygulanmıştır. Agar kuyucuk diffüzyon testinde; 30°C 1mM IPTG ile indüklenerek 40 dakika inkübe edilmiş kültürlerden elde edilen rHol ve rSKHol proteinlerini içeren süpernatanların (ikili lizis protokolü) yaklaşık 8 ve 10 mm çapındaki inhibisyon zonları oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, ilgili proteinlerin üretildiği ve antibakteriyal aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Aynı şekilde, 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmiş kültürlerden 40. dakika ikili lizis protokolü ile elde edilen rHolin süpernatantında 16 mm zon çapı ile oldukça yüksek antibakteriyal etkinlik tespit edilmiştir. Böylece bu kültürlerde rHolin ve rSKHol proteinlerinin üretildiği aynı zamanda da bu proteinlerin *S. aureus* üzerinde antibakteriyel bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca

rHolin ve rSKHol genini taşıyan vektörleri içermeyen *E. coli Bl21* hücre kültürlerinde de (kontrol grup) bakterinin kendi ürettiği toksinlerinden kaynaklanan bir inhibisyonun oluştuğu gözlenmekle birlikte rHolin ve rSKHol proteinlerindeki etkinlik çok daha yüksektir. İlaveten spot testi de, agar kuyucuk diffüzyon testi sonuçlarını doğrular nitelikte olup rHolinin antibakteriyal aktivitesinin rSKHol'den daha yüksek olduğu görülmektedir. Bütün bunların yanısıra her iki antibakteriyal yöntemde de test örneği olarak hem rHolin hem de rSKHol lizatları kullanıldığından (saflaştırma sonrası proteinin büyük bir kısmının kaybı nedeniyle) içerisinde ilgili proteinlerin ne kadar olduğu bilinmemektedir. Dolayısıyla inkübasyonun ilk saatlerinde gerçekleşen inhibisyon etkinin sonradan kaybolarak zon alanlarında yeniden bakteriyal üremenin gerçekleşmemesi için, mutlaka hem örnek saf hem de artan konsantrasyonlarda kuyucuklara konularak çalışma gerçekleştirilmelidir. Bu yüzden elde edilen lizatlardan mutlaka saflaştırması yapılmalıdır. Ayrıca SDS-PAGE jellerinde görülen bantların görece ince olması nedeniyle rHolin proteininin az üretildiği, dolayısıyla saflaştırma ve Western Blot aşamalarında tespit edilemeği gözlendiğinden yüksek miktarda üretim için yeni stratejilerin geliştirilmesinin zorunlu olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen bu bilgiler ışığında rHolin ve rSKHol proteinlerinin saflaştırılması ile rHolin ve rSKHol proteinlerinin birçok alanda güvenli, çevre dostu, kimyasal içermeyen alternatif ürünler olarak kullanılabileceği ön görülmektedir. Özellikle sağlık alanında dirençli *S. aureus* bağlantılı nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde hem tek olarak hem de antibiyotik veya diğer litik proteinler ile kombine halde kullanılabilecek umut verici ilaçlar olarak gösterilmekle birlikte Holin proteininin sadece prokaryotlarla sınırlı olmayan sitotoksik özelliklerinden dolayı kansere karşı kullanılabilecek bir ürün olarak da kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Sağlık alanındaki bu kullanımının yanı sıra gıda ürünlerinin işlenmesi ve korunması, hayvan ıslahı, tarım ve kozmetikte de kullanılabilecek adaylar olarak gösterilmektedir.

# KAYNAKÇA


[1] D. J. Murphy, “Recent scientific developments in genetic technologies: Implications for future regulation of GMOs in developing countries,” in *Genetically Modified Organisms in Developing Countries: Risk Analysis and Governance*, 2017.

[2] U. Nagaich, “Recombinant DNA technology: A revolutionizing outlook,” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. 2015, doi: 10.4103/2231-4040.166456.

[3] L. Pray, “Recombinant DNA Technology and Transgenic Animals,” *Nature Education*. 2008.

[4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Isolating, Cloning, and Sequencing DNA,” *Mol. Biol. Cell*, 2002.

[5] D. S. T. Nicholl, “An Introduction to Genetic Engineering,” in *An Introduction to Genetic Engineering*, 2012.

[6] Ş. Firidin, “Rekombinant DNA Teknolojisi,” *Yunus Araştırma Bülteni*, vol. 3, pp. 16–18, 2010.

[7] V. M. Cardoso *et al.*, “Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using Escherichia coli BL21(DE3),” *Biotechnol. Reports*, 2020, doi: 10.1016/j.btre.2020.e00441.

[8] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. APR. 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.

[9] H. GÖÇMEN, H. ŞÜKÜR, H. TAMAKAN, and Ö. M. ESENDAL, “Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’nde Hayvanlardan İzole Edilen Stafilokok Türlerinin Metisilin Dirençliliği Üzerine Retrospektif Bir Çalışma,” *Etlik Vet. Mikrobiyoloji Derg.*, 2018, doi: 10.35864/evmd.513430.

[10] Brock, “Book Review: Brock Biology of Microorganisms – 14th edition,” *Sci. Prog.*, 2016, doi: 10.3184/003685016x14721564318450c.

[11] J. P. Rasigade and F. Vandenesch, “Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues,” *Infect. Genet. Evol.*, 2014, doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.018.

[12] D. Raafat, M. Otto, K. Reppschläger, J. Iqbal, and S. Holtfreter, “Fighting Staphylococcus aureus Biofilms with Monoclonal Antibodies,” *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 4. 2019, doi: 10.1016/j.tim.2018.12.009.

[13] C. H. Hekimoğlu, E. Batır, E. Y. Gözel, and D. Altun, “Ulusal Sağlık Hïzmet Ïlïşkïlï Enfeksïyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Özet Raporu 2021,” 2022.

[14] S. A. Baltzer and M. H. Brown, “Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics,” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2011, doi: 10.1159/000331009.

[15] L. Czaplewski *et al.*, “Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review,” *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, doi: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1.

[16] A. Álvarez, L. Fernández, D. Gutiérrez, B. Iglesias, A. Rodríguez, and P. García, “Methicillin-resistant staphylococcus aureus in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages,” *J. Clin. Microbiol.*, 2019, doi: 10.1128/JCM.01006-19.

[17] L. K. Harada *et al.*, “Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art,” *Microbiological Research*, vol. 212–213. 2018, doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

[18] L. Fernández, D. Gutiérrez, P. García, and A. Rodríguez, “The perfect bacteriophage for therapeutic applications—A quick guide,” *Antibiotics*, vol. 8, no. 3. 2019, doi: 10.3390/antibiotics8030126.

[19] M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms, 10th edn*. 2003.

[20] E. V. Davies, C. Winstanley, J. L. Fothergill, and C. E. James, “The role of temperate bacteriophages in bacterial infection,” *FEMS Microbiology Letters*. 2016, doi: 10.1093/femsle/fnw015.

[21] S. R. P.N, “Bacteriophage,” no. 2006, 2006.

[22] T. Olszak, A. Latka, B. Roszniowski, M. A. Valvano, and Z. Drulis-Kawa, “Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 24, no. 36, 2017, doi: 10.2174/0929867324666170413100136.

[23] N. Giri, “Bacteriophage Structure, Classification, Assembly and Phage Therapy,” *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 2021, doi: 10.13005/bbra/2911.

[24] S. Sharma *et al.*, “Bacteriophages and its applications: an overview,” *Folia Microbiologica*. 2017, doi: 10.1007/s12223-016-0471-x.

[25] C. Howard-Varona, K. R. Hargreaves, S. T. Abedon, and M. B. Sullivan, “Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages,” *ISME Journal*, vol. 11, no. 7. 2017, doi: 10.1038/ismej.2017.16.

[26] L. Rodríguez-Rubio, D. Gutiérrez, D. M. Donovan, B. Martínez, A. Rodríguez, and P. García, “Phage lytic proteins: Biotechnological applications beyond clinical antimicrobials,” *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, doi: 10.3109/07388551.2014.993587.

[27] C. São-José, “Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials,” *Antibiotics*. 2018, doi: 10.3390/antibiotics7020029.

[28] Y. Shi *et al.*, “Characterization and determination of holin protein of Streptococcus suis bacteriophage SMP in heterologous host,” *Virol. J.*, vol. 9, no. 1, p. 70, 2012, doi: 10.1186/1743-422X-9-70.

[29] S. Fernandes and C. São-José, “More than a hole: the holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins,” *Mol. Microbiol.*, 2016, doi: 10.1111/mmi.13448.

[30] H. Gerstmans, L. Rodríguez-Rubio, R. Lavigne, and Y. Briers, “From endolysins to Artilysin®s: Novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria,” *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, doi: 10.1042/BST20150192.

[31] G. A. F.L. and B. J.J., “Phage therapy in the postantibiotic era,” *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019.

[32] V. R. Bavda, A. Yadav, and V. Jain, “Decoding the Molecular Properties of Mycobacteriophage D29 Holin Provides Insights into Holin Engineering,” *J. Virol.*, vol. 95, no. 10, 2021, doi: 10.1128/jvi.02173-20.

[33] S. Khan *et al.*, “Role of recombinant DNA technology to improve life,” *International Journal of Genomics*. 2016, doi: 10.1155/2016/2405954.

[34] V. Gupta, M. Sengupta, J. Prakash, and B. C. Tripathy, “Fundamentals of Recombinant DNA Technology,” in *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 2017.

[35] T. A. Brown, *Gene cloning and DNA analysis An introduction*. 2010.

[36] M. Shintani, Z. K. Sanchez, and K. Kimbara, “Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy,” *Frontiers in Microbiology*. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00242.

[37] D. P. Clark, N. J. Pazdernik, and M. R. McGehee, “Chapter 23 - Plasmids,” in *Molecular Biology (Third Edition)*, 2019.

[38] G. Temizkan and N. Arda, *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri-Genomik ve Proteomik Analizler*. 2021.

[39] S. R. Casjens and R. W. Hendrix, “Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant,” *Virology*. 2015, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.010.

[40] B. Bajpai, “High capacity vectors,” in *Advances in Biotechnology*, 2014.

[41] Y. Wang, Z. Cao, D. Hood, and J. G. Townsel, “Construction of genomic libraries in lambda-vectors.,” *Methods Mol. Biol.*, 2003.

[42] D. A. Julin, “Bacteriophage and Viral Cloning Vectors,” in *Molecular Life Sciences*, 2018.

[43] P. Kowalczyk, “M13MP18 phage model as a tools of research mutagenic and cytotoxic biological and environmental compounds,” *New Med.*, 2012.

[44] G. J. Gopal and A. Kumar, “Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli,” *Protein J.*, 2013, doi: 10.1007/s10930-013-9502-5.

[45] R. Chen, “Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond,” *Biotechnol. Adv.*, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.

[46] J. Baolei and C. Ok Jeon, “High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives,” *Open Biol.*, 2016.

[47] T. San-Miguel, P. Pérez-Bermúdez, and I. Gavidia, “Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in E. coli is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature,” *Springerplus*, 2013, doi: 10.1186/2193-1801-2-89.

[48] F. W. Studier, “T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in E. coli,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2018, doi: 10.1002/cpmb.63.

[49] L. Marschall, P. Sagmeister, and C. Herwig, “Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, doi: 10.1007/s00253-016-8045-z.

[50] A. Marbach and K. Bettenbrock, “Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA,” *J. Biotechnol.*, 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.009.

[51] L. Marschall, P. Sagmeister, and C. Herwig, “Tunable recombinant protein expression in E. coli: enabler for continuous processing?,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7550-4.

[52] A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, and B. Maertens, “Purification of His-Tagged Proteins,” in *Methods in Enzymology*, 2015.

[53] S. T. Loughran, R. T. Bree, and D. Walls, “Purification of polyhistidine-tagged proteins,” in *Methods in Molecular Biology*, 2017.

[54] B. Owczarek, A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka, “A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals,” *BioMed Research International*. 2019, doi: 10.1155/2019/4216060.

[55] R. R. Burgess *et al.*, “Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC),” in *Methods in Enzymology*, 2009.

[56] J. . Bornhorst, J.A., Falke, “Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags,” *Methods Enzym.*, 2010.

[57] C. L. Kielkopf, W. Bauer, and I. L. Urbatsch, “Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2020, doi: 10.1101/pdb.prot102194.

[58] Thermo Fisher Scientific, “HisPur ™ Ni-NTA Resin: Instructions,” vol. 88221, no. 88221, pp. 1–4, 2012.

[59] D. M. Missiakas and O. Schneewind, “Growth and laboratory maintenance of Staphylococcus aureus,” *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2013, doi: 10.1002/9780471729259.mc09c01s28.

[60] Y. Oogai, M. Matsuo, M. Hashimoto, F. Kato, M. Sugai, and H. Komatsuzawa, “Expression of virulence factors by Staphylococcus aureus grown in Serum,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, doi: 10.1128/AEM.05316-11.

[61] A. Karmakar, P. Dua, and C. Ghosh, “Biochemical and Molecular Analysis

of Staphylococcus aureus Clinical Isolates from Hospitalized Patients," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 2016, doi: 10.1155/2016/9041636.

[62] C. G. U. Tracey A. Taylor, "Staphylococcus Aureus, StatPearls," *Published Online*. 2019.

[63] R. B. McFee, "Nosocomial or Hospital-acquired Infections: An Overview," *Disease-a-Month*. 2009, doi: 10.1016/j.disamonth.2009.03.014.

[64] M. Z. David and R. S. Daum, "Treatment of Staphylococcus aureus infections," in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017.

[65] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, and C. Björn, "Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016, doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

[66] M. S. Zharkova *et al.*, "Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-a novel way to combat antibiotic resistance?," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00128.

[67] Z. Drulis-Kawa, G. Majkowska-Skrobek, and B. Maciejewska, "Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches," *Curr. Med. Chem.*, 2015, doi: 10.2174/0929867322666150209152851.

[68] M. R. J. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, and S. Heaphy, "Phages in nature," *Bacteriophage*, 2011, doi: 10.4161/bact.1.1.14942.

[69] G. F. Hatfull, "Bacteriophage genomics," *Current Opinion in Microbiology*. 2008, doi: 10.1016/j.mib.2008.09.004.

[70] M. Jamal *et al.*, "Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields," *Journal of Basic Microbiology*. 2019, doi: 10.1002/jobm.201800412.

[71] L. M. Kasman and L. D. Porter, *Bacteriophages*. 2021.

[72] B. Tokarz-Deptuła, J. Śliwa-Dominiak, M. Adamiak, T. Deptuła, M. Nowak, and W. Deptuła, "Application of bacteriophages - Selected data," *Central-European Journal of Immunology*. 2011.

[73] P. Hyman and S. T. Abedon, "Smaller Fleas: Viruses of Microorganisms," *Scientifica (Cairo).*, 2012, doi: 10.6064/2012/734023.

[74] M. B. Dion, F. Oechslin, and S. Moineau, "Phage diversity, genomics and phylogeny," *Nature Reviews Microbiology*. 2020, doi: 10.1038/s41579-019-0311-5.

[75] H. M. Oksanen, "ICTV virus taxonomy profile: Corticoviridae," *J. Gen. Virol.*, 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000795.

[76] S. M. Caruso *et al.*, "A novel genus of actinobacterial tectiviridae," *Viruses*, 2019, doi: 10.3390/v11121133.

[77] J. Louten, "Virus Structure and Classification," in *Essential Human Virology*, 2016.

[78] H. W. Ackermann, “Bacteriophage Electron Microscopy,” in *Advances in Virus Research*, 2012.

[79] E. Stone, K. Campbell, I. Grant, and O. McAuliffe, “Understanding and exploiting phage–host interactions,” *Viruses*, vol. 11, no. 6. 2019, doi: 10.3390/v11060567.

[80] B. Maciejewska, T. Olszak, and Z. Drulis-Kawa, “Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8811-1.

[81] J. Cahill and R. Young, “Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers,” in *Advances in Virus Research*, 2019.

[82] S. Fernandes and C. São-José, “Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers,” *Viruses*. 2018, doi: 10.3390/v10080396.

[83] J. Song *et al.*, “The Phage Holin HolGH15 Exhibits Potential As an Antibacterial Agent to Control Listeria monocytogenes,” *Foodborne Pathog. Dis.*, 2021, doi: 10.1089/fpd.2020.2833.

[84] J. Song *et al.*, “Identification and characterization of HolGH15: The Holin of Staphylococcus Aureus bacteriophage GH15,” *J. Gen. Virol.*, 2016, doi: 10.1099/jgv.0.000428.

[85] S. Kamilla and V. Jain, “Mycobacteriophage D29 holin C-terminal region functionally assists in holin aggregation and bacterial cell death,” *FEBS J.*, vol. 283, no. 1, 2016, doi: 10.1111/febs.13565.

[86] T. Guo, Y. Xin, C. Zhang, and J. Kong, “A cytoplasmic antiholin is embedded in frame with the holin in a Lactobacillus fermentum bacteriophage,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, doi: 10.1128/AEM.02518-17.

[87] G. Žiedaite, R. Daugelavičius, J. K. H. Bamford, and D. H. Bamford, “The holin protein of bacteriophage PRD1 forms a pore for small-molecule and endolysin translocation,” *J. Bacteriol.*, 2005, doi: 10.1128/JB.187.15.5397-5405.2005.

[88] D. Gutiérrez, L. Fernández, A. Rodríguez, and P. García, “Are phage lytic proteins the secret weapon to kill staphylococcus aureus?,” *mBio*. 2018, doi: 10.1128/mBio.01923-17.

[89] N. Lu *et al.*, “Cloning and characterization of endolysin and holin from Streptomyces avermitilis bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 147, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.065.

[90] Y. Shi *et al.*, “Combined Antibacterial activity of phage lytic proteins holin and lysin from streptococcus suis bacteriophage SMP,” *Curr. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, 2012, doi: 10.1007/s00284-012-0119-2.

[91] C. A. Agu *et al.*, “The cytotoxic activity of the bacteriophage λ-holin protein reduces tumour growth rates in mammary cancer cell xenograft

models," *J. Gene Med.*, vol. 8, no. 2, 2006, doi: 10.1002/jgm.833.

[92] "EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing Reading guide," 2022.

[93] C. H. Hekimoğlu, E. Batır, E. Y. Gözel, and D. Altun, "Ulusal Sağlık Hïzmet Ïlïşkïlï Enfeksïyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Özet Raporu 2020," 2020.

[94] S. M. Smith, "Strategies for the purification of membrane proteins," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1485, 2017.

[95] M. Adamczyk-Popławska, Z. Tracz-Gaszewska, P. Lasota, A. Kwiatek, and A. Piekarowicz, "Haemophilus influenzae hp1 bacteriophage encodes a lytic cassette with a pinholin and a signal-arrest-release endolysin," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 11, 2020, doi: 10.3390/ijms21114013.

[96] T. A. T. Tran, D. K. Struck, and R. Young, "Periplasmic domains define holin-antiholin interactions in T4 lysis inhibition," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 19, 2005, doi: 10.1128/JB.187.19.6631-6640.2005.

[97] V. R. Bavda and V. Jain, "Deciphering the Role of Holin in Mycobacteriophage D29 Physiology," *Front. Microbiol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00883.

[98] S. Fernandes and C. São-José, "Probing the function of the two holin-like proteins of bacteriophage SPP1," *Virology*, vol. 500, 2017, doi: 10.1016/j.virol.2016.10.030.

[99] R. White *et al.*, "Holin triggering in real time," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 2, 2011, doi: 10.1073/pnas.1011921108.

[100] T. Pang, T. C. Fleming, K. Pogliano, and R. Young, "Visualization of pinholin lesions in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 22, 2013, doi: 10.1073/pnas.1222283110.

[101] X. Li, C. Zhang, F. Wei, F. Yu, and Z. Zhao, "Bactericidal activity of a holin-endolysin system derived from Vibrio alginolyticus phage HH109," *Microb. Pathog.*, vol. 159, 2021, doi: 10.1016/j.micpath.2021.105135.

[102] R. Young, "Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome," *Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 3. 2014, doi: 10.1007/s12275-014-4087-z.

# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

## Konferans Bildirileri

Hançer H., Eren G. B., Özbek T., (2022), “Cloning of Bacteriophage Lytic Protein”, 4th International Conference on Natural Sciences and Technologies, 24-26 Ağustos 2022, Antalya.