

**SORTAZ A ENZİMİNE KARŞI İNHİBİTÖR PEPTİTLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPING INHIBITOR PEPTIDES AGAINST SORTASE
A ENZYME**

MÜCAHİDE KÖKSAL

YRD. DOÇ. DR. FAHRİYE CEYDA DUDAK ŞEKER

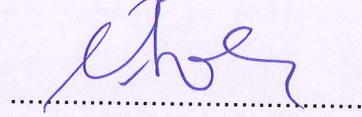
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

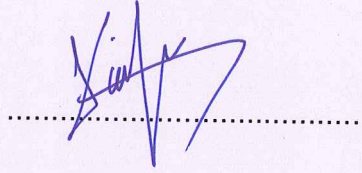
2017

MÜCAHİDE KÖKSAL'ın hazırladığı “Sortaz A Enzimine Karşı İnhibitör Peptitlerin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN
Başkan



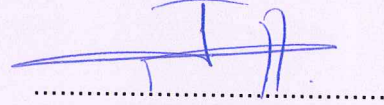
Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER
Danışman




Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI
Üye



Prof. Dr. Uğur TAMER
Üye



Doç. Dr. Ali TOPCU
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/~~raporumun~~ tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/~~Raporumun~~ 20/06/2019 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

19/06/2017


(imza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Mücahide KÖKSAL

*Ümit ve Serap
Özçer'e*

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

19/06/2017

MÜCAHİDE KÖKSAL

ÖZET

SORTAZ A ENZİMİNE KARŞI İNHİBİTÖR PEPTİTLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Mücahide KÖKSAL

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

Haziran 2017, 58 Sayfa

Antibiyotik direnci gösteren patojenik bakteri suşları insan sağlığını önemli düzeyde tehdit etmektedir. Bu önemli sorunun üstesinden gelebilmek için, bu bakterilerin gelişimlerini yavaşlatacak veya durduracak yeni antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda, mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini veya patojenitelerini etkileyecek yeni hedef moleküllerin bulunması etkin bir strateji olarak görülmektedir. Gram-pozitif bakterilerin virülanslıklarına önemli düzeyde katkı sağlayan sortaz enzimleri, antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesinde kullanılabilecek yeni bir hedef molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. Çoğu Gram-pozitif bakteri farklı sortaz izoformlarına sahipse de, bunlar arasında sortaz A (SrtA) tüm Gram-pozitif bakterilerde korunmuştur. SrtA enziminin inhibisyonunu sağlayan maddelerin, Gram-pozitif patojenlere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olma potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, SrtA'ya karşı etkili bir inhibitör geliştirilmesini popüler bir çalışma konusu haline getirmiştir.

Faj gösterim teknolojisi, herhangi bir hedef moleküle afinite gösteren peptitlerin seçilmesinde ve geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Faj gösterim peptit kütüphaneleri hedef moleküllere seçici olarak bağlanan yapay tanıyıcı

moleküllerin geliştirilmesini sağladığı gibi, protein-protein etkileşimlerinin incelenmesine ve spesifik protein bölgelerinin haritalanmasına da imkan tanımaktadır. Faj gösterim yöntemi ile peptit yapısında enzim inhibitörlerinin başarılı bir şekilde seçilebilmesi, özellikle antibiyotik direncine sahip bakteri suşlarının inhibisyonu için yeni antimikrobiyal peptitlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Çalışmada, rastgele dizilimlerden oluşan ve yüksek çeşitlilik gösteren faj peptit kütüphaneleri kullanılarak SrtA enzimini seçici ve etkin bir şekilde inhibe edecek yeni peptit inhibitörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle *Staphylococcus aureus* SrtA geni ekspresyon vektörü aracılığıyla *Escherichia coli*'ye aktarılmış ve SrtA enziminin rekombinant olarak üretilmesi ve saflaştırılması sağlanmıştır. Saflaştırılan SrtA, faj gösterim yönteminin seçim aşamasında hedef molekül olarak kullanılmıştır. SrtA'ya seçici olarak bağlanan ve inhibe eden peptiti taşıyan faj klonlarının seçimi için 7 amino asit uzunluğunda lineer ve halkalı peptit kütüphaneleri kullanılmıştır. Elüsyon aşamasında serbest SrtA enzimi ve serbest SrtA substratı kullanılmış ve 3 döngü sonunda toplamda 88 faj klonunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen faj klonlarının SrtA aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve 12 faj klonunun enzim aktivitesinde azalışa neden olduğu saptanmıştır. Seçilen faj klonları arasında en yüksek inhibitör etkiye sahip klonun SrtA aktivitesini %30 oranında azalttığı belirlenmiştir. İnhibitör etki gösteren 6 faj klonunun değişken bölge DNA sekansları belirlenmiş ve faj klonlarının taşıdıkları peptit dizimleri saptanmıştır.

Çalışmanın sonucunda, patojen bakterilerin virülanslığı üzerinde önemli bir etkisi olan SrtA enzimine karşı inhibitör özellik gösteren peptitleri taşıyan faj klonları seçilmiştir. Belirlenen peptit dizilimlerinin, potansiyel SrtA inhibitörleri olarak yeni antimikrobiyal ajanlar geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Faj gösterim teknolojisi, peptit, enzim inhibitörleri, sortaz A, antimikrobiyal madde

ABSTRACT

DEVELOPING OF INHIBITOR PEPTIDES AGAINST SORTASE A ENZYME

MÜCAHİDE KÖKSAL

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Ass. Prof. Fahriye Ceyda DUDAK SEKER

June 2017, 58 Page

The emergence of pathogenic bacterial strains resistant to antibiotics is a major human health threat. In order to overcome this critical problem, it is in urgent need of developing novel antimicrobial agents those either kill or inhibit the growth of bacteria. Accordingly, the discovery of new target molecules, that will affect vital functions or the pathogenicity of the microorganisms, has been considered as an effective strategy for the development of new antimicrobial agents. Sortase enzymes, found in Gram-positive bacteria, appear as a new target molecule which can be used in the development of antimicrobial agents. Although many Gram-positive bacteria possess different isoforms of sortase, among them, sortase A (Srt A) is conserved in all pathogenic species. It has been shown that the infectivity of bacteria decreased for those having SrtA gene mutation. Agents, inhibiting the SrtA enzyme activity, have a great potential of showing antimicrobial activity against Gram-positive pathogens. Hence, the development of effective inhibitors against SrtA has become a popular subject for researchers.

Phage display technology has been used frequently in the selection and development of peptides that show affinity to various target molecules. Phage display peptide libraries not only provide the development of artificial recognition molecules which selectively bind to target molecules, but also used in analysis of protein-protein interactions and mapping specific regions of the protein. Selection of enzyme inhibitors with the phage display method provides the development of new antimicrobial peptides for inhibition of the antibiotic resistant bacterial strains. In this study, it is aimed to develop novel peptide inhibitors that selectively and effectively inhibit the SrtA enzyme by using high diversity phage displayed peptide libraries. Accordingly, SrtA gene expression vector of *Staphylococcus aureus* was transferred into *Escherichia coli*, for the production and the purification of recombinant SrtA enzyme. Purified SrtA was used as the target molecule in the biopanning of phage display method. Linear and cyclic peptide libraries of 7 amino acids in length were used to select phage clones carrying the selectively binding and inhibiting peptide to SrtA. During the elution phase, free SrtA and free SrtA substrate were used and at the end of 3 cycles isolation of 88 phage clones was performed. The effects of the isolated phage clones on SrtA activity were analyzed and it was determined that 12 phage clones cause a decrease in enzyme activity. It was determined that the clone with the highest inhibitory effect among selected phage clones reduced the activity of SrtA by 30%. The variable region DNA sequences of 6 phage clones with inhibitory effect were determined and the peptide sequences of the phage clones were determined.

As a result of the study, phage clones carrying peptides showing inhibitory properties against the enzyme SrtA, a significant effect on the virulence of pathogenic bacteria, were selected. It is thought that the identified peptide sequences may be used as potential SrtA inhibitors in the development of novel antimicrobial agents.

Keywords: Phage display technology, peptide, enzyme inhibitors, sortase A, antimicrobial agent

TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans hayatım boyunca benden ilgisini, bilgisini, desteğini ve tecrübesini esirmeyen; eşsiz yol göstericiliği ile yaşadığım her sorunda yanımda olan, en önemlisi akademik hayata atılma sebebim olan sevgili tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda Dudak Şeker'e teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamı yürütürken takıldığım her an her konuda benden fikirlerini, önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen, işler içinden çıkılmaz haller aldığında benden moral ve motivasyonlarını esirgemeyip bana destek olan, yüksek lisans hayatımı anlamlı kılan sevgili çalışma arkadaşlarım Nurdan Ersöz, B. Zeynep Hançerlioğulları ve E. Merve Çanga'ya,

Yürüttüğüm çalışmanın ihtiyacım olduğu her aşamasında her türlü desteği ve laboratuvar imkanıyla yanımda olan sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü sayın öğretim üyeleri ve personeline,

Tez çalışmam boyunca ihtiyaç duyduğum her an bana moral, enerji, cesaret ve güven depolayan, mutsuz olduğum anlarda neşe kaynağım olan, yanımda olmasa bile varlığını hep yanımda hissettiğim çok sevdiğim Yusuf Kavrak'a,

İlkokuldan itibaren bütün eğitim hayatımla ilgilenip bana yön veren, bugün bulunduğum konumda olmamda en büyük etkiye sahip, bir ilkokul öğretmeninden çok ikinci annem olan Serap Özçer'e, fikirleri ve idealleri ile tanıdığım süre boyunca yol göstericim olan rahmetli eşi Ümit Özçer'e,

Her zaman yanımda olan ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme tüm içtenliğim ile teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması 1001-114Z947 kodlu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar.....	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Antibiyotikler.....	4
2.1.1. Antibiyotik Direnci	7
2.1.2. Yeni Antibiyotik Geliştirilmesinde Enzim İnhibitörleri	10
2.2. Faj Gösterim Yöntemi.....	10
2.2.1. Faj Gösterim Yöntemi ile Enzim İnhibitörlerinin Geliştirilmesi	13
2.3. Sortaz Enzimleri	14
2.3.1. Sortaz A Enzimi	14
2.3.2. Sortaz A İnhibitörlerinin Geliştirilmesi.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	19
3.2. Metot	20
3.2.1. SrtA Ekspresyonu İçin Vektörlerin Elde Edilmesi	20
3.2.2. SrtA Ekspresyonu	22
3.2.3. SrtA Saflaştırılması	23
3.2.4. Faj Gösterim Peptid Kütüphanelerinden Faj Klonlarının Seçilmesi.....	27
3.2.5. Seçilen Faj Klonlarının SrtA _{Δ59} Enzimi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	30
3.2.6. Fajlara Ait DNA Diziliminin Belirlenmesi.....	30
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Ekspresyon Vektörlerinin Elde Edilmesi	31
4.2. SrtA Ekspresyonu ve Saflaştırılması	33

4.3. SrtA Aktivitesi Analizi.....	37
4.4. Üretilen ve Saflaştırılan SrtA Enzimlerinin Karakterizasyonu	40
4.5. Faj Gösterim Peptid Kütüphaneleri Kullanılarak Seçilen Faj Klonlarının SrtA _{Δ59} Enzimi Üzerindeki Etkileri	43
4.6. Seçilen Faj Klonlarına Ait DNA Dizilimleri	47
5. YORUM.....	48
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLolar

Tablo 3.1. Plazmid kesimi için reaksiyon karışımı	22
Tablo 3.2. SDS-PAGE analizinde kullanılan elektroforez tamponu içeriği	24
Tablo 3.3. SDS-PAGE analizinde kullanılan örnek yükleme tamponu içeriği	24
Tablo 3.4. SDS-PAGE analizinde kullanılan seperasyon jeli içeriği.....	25
Tablo 3.5. SDS-PAGE analizinde kullanılan boya çözültisi içeriği	25
Tablo 3.6. SDS-PAGE'de kullanılan protein belirteci için yükleme tamponu içeriği	25
Tablo 4.1. SrtA aktivitesinde azalışa neden olan faj klonlarının değişken bölge peptit dizilimleri.....	47

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Sortaz A enziminin kristal yapısı	15
Şekil 2.2. SrtA'nın katalizlediği transpeptidasyon reaksiyonunun şematik gösterimi	16
Şekil 3.1. Faj gösterim peptit kütüphanelerinden fajların seçilmesi	28
Şekil 4.1. Plazmidlere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	32
Şekil 4.2. NCBI BLASTN programı kullanılarak DNA dizilim sonuçlarının karşılaştırılması	33
Şekil 4.3. SrtA _{Δ59} ve mutant-SrtA _{Δ59} enzimlerinin Ni-afinite kolonundaki elüsyon fraksiyonlarının 280 nm'deki UV-Vis spektrofotometre absorban değerleri	34
Şekil 4.4. #51138 plazmidinin transforme edildiği hücre lizatlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı.	35
Şekil 4.5. #51141 plazmidinin transforme edildiği hücre lizatlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı	36
Şekil 4.6. SrtA _{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	38
Şekil 4.7. SrtA _{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisinin fraksiyonlarının substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	38
Şekil 4.8. Mutant-SrtA _{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	39
Şekil 4.9. IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın _{mutant-SrtA_{Δ59}} Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisinin fraksiyonlarının substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	39
Şekil 4.10. Diyaliz sonrası enzim çözeltilerine ait SDS-PAGE elektroforegramı..	41
Şekil 4.11. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası SrtA _{Δ59} enziminin substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	42
Şekil 4.12. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası mutant-SrtA _{Δ59} enziminin substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim	43
Şekil 4.13. Lineer peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri	44
Şekil 4.14. Lineer peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri	45

Şekil 4.15. Halkalı peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri	46
Şekil 4.16. Halkalı peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

SrtA	:	Sortaz A
HTS	:	High throughput screening
PABA	:	Paraamino benzoik asit
PAS	:	Para-Aminosalisik asit
MRSA	:	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	:	Penisilin bağlayan protein
LB	:	Luria-Bertani
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
PEG	:	Polietilen glikol
IPTG	:	İsopropilthiogalaktosid
X-gal	:	5-bromo-4-kloro-3-indolyl-beta-D-galaktopiranosid
BSA	:	Siğır serum albümini (Bovine Serum Albumin)
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	:	Tris Asetat EDTA
TBS	:	Tris buffered saline
TCA	:	Trikloroasetik asit
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez
Tris-HCl	:	Trizma Hidroklorit
Ni-NTA	:	Nikel-Nitrilotriasetik asit

Simgeler

a/h	:	ağırlık/hacim
a.b.	:	absorbans birimi
bp	:	baz çifti (base pair)
kb	:	kilo baz

1. GİRİŞ

Günümüzde hızla artan antibiyotik direnç kazanımı insan sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir. Bakterilerin büyük çoğunluğunun var olan antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesi, bakteriyel enfeksiyonların tedavi süresini uzatmakta ve tedavi masraflarının artmasına neden olarak ekonomik zarara yol açmaktadır. Ayrıca bazı ciddi vakalarda tedaviyi imkansız hale getirdiği için birçok insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnci, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarının benzer olması, aşırı ve yanlış antibiyotik kullanımı ve bakterilerin ortam koşullarına hızlı ve kolay adapte olmaları geliştirilen antibiyotiklere kısa sürede direnç kazanılmasına yol açmaktadır. Bu problemin çözümü için antibiyotik tasarımında farklı yaklaşımların ve farklı araçların kullanılması gereklidir.

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bazı enzimler ve yüzey proteinleri, bakterinin virülanslığı üzerinde etkili olup bakteriyel enfeksiyonların oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bunlar arasında çoğu Gram-pozitif bakteride var olan sortaz enzimleri, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir hedef olmaktadır. Özellikle sortaz A (SrtA) enzimi, tüm Gram-pozitif bakterilerde korunmuş olup, *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilerin enfeksiyonlarından sorumludur. Bakterinin yüzey proteinlerinin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasına tutunmasını katalizleyen SrtA enzimi, bakterinin hücre ve dokulara yapışmasını kolaylaştırarak veya bağışıklık sistemindeki hücrelerden kaçmasını sağlayarak vücutta enfeksiyon oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle SrtA enzimine karşı inhibitör geliştirilmesi yeni antibiyotiklerin tasarlanmasında önemli bir hedef olmaktadır.

Son yıllarda SrtA enzimine karşı inhibitör geliştirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılarak SrtA enzimini inhibe eden birçok doğal ve peptidomimetik inhibitörler geliştirilmiştir. Özellikle 'yüksek çıktılı görüntüleme (highthroughput screening, HTS)' yönteminin kullanılmaya başlanmasıyla SrtA'ya karşı inhibitör geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Klasik protein mühendisliği yöntemlerine göre daha kısa sürede ve daha az maliyetle hedef moleküle özgü yüksek seçicilik ve afinitede moleküllerin seçilmesini sağlayan bu yöntem SrtA'ya karşı inhibitör geliştirilmesinde başarıyla

kullanılmıştır. Bu amaçla, çok sayıda çeşitli büyük ve küçük moleküllerden oluşan kütüphaneler taranarak SrtA'ya karşı kimyasal inhibitörler seçilmiştir. Ancak seçilen bu inhibitörlerin seçiciliklerinin ve inhibisyon özelliklerinin yeteri kadar iyi olmaması terapötik ajan olarak kullanımını sınırlandırmaktadır.

HTS tekniklerinden biri olan faj gösterim yöntemi, son yıllarda enzim inhibitörlerinin geliştirilmesinde çok kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Çok fazla çeşitlilikte protein ya da peptit kodlayan fajların oluşturduğu kütüphaneler kullanılarak, farklı enzimlere karşı inhibitörler seçilmiştir. Faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak birçok proteaz enzime karşı terapötik öneme sahip peptit inhibitörleri geliştirilmiştir. Kimyasal inhibitörlerin aksine, SrtA enzime karşı spesifik ve yüksek inhibisyon katsayısına sahip peptit inhibitörleri geliştirmek amacıyla faj gösterim peptit kütüphanelerinden yararlanılmıştır. İki halkalı rastgele peptit dizilimlerinden oluşan peptit kütüphaneleri oluşturularak SrtA'ya karşı inhibitörler seçilmiştir. Seçilen peptit inhibitörlerinin inhibisyon özellikleri incelendiğinde önceki çalışmalarla elde edilen inhibitörlere kıyasla daha iyi inhibisyon parametrelerine sahip olduğu görülmüştür. Bu noktada SrtA enzime karşı yüksek afinite gösteren, spesifik ve düşük inhibisyon konsantrasyonuna sahip inhibitör geliştirilmesinde faj gösterim peptit kütüphanelerinin kullanılmasının etkili bir araç olduğu görülmektedir.

Yürütülen tez kapsamında, SrtA enzime karşı inhibitör geliştirilmesi amacıyla faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak enzime bağlanan faj klonlarının seçilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmanın ilk kısmında inhibitör seçilmesinde kullanılacak SrtA enzimi *Escherichia coli* hücresi kullanılarak rekombinant olarak üretilerek saflaştırılmıştır. Bu amaçla tez kapsamında, *S. aureus* SrtA enziminin N terminalindeki ilk 59 amino asiti içermeyen SrtA $_{\Delta 59}$ ve SrtA $_{\Delta 59}$ enziminin kalsiyum olmayan ortamda aktivite gösterebilen mutanlığı (mutant-SrtA $_{\Delta 59}$) olmak üzere iki farklı SrtA enziminin üretimi gerçekleştirilmiştir. Histidin etiketli SrtA'nın saflaştırılması amacıyla Nikel-afinite kolonu kullanılmış ve SrtA enzimi %90'ın üzerinde saflıkta elde edilmiştir. Elde edilen enzim çözeltilerinin aktiviteleri ve konsantrasyonları tayin edildikten sonra liyofilize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, rastgele peptit dizilimlerinden oluşan faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak rekombinant olarak üretilen SrtA enzimlerine bağlanan faj klonları seçilmiştir. Bu amaçla, 7-mer lineer ve halkalı peptit

kütüphaneleri kullanılmış ve iki farklı yöntemle enzime bağlanan fajlar seçilmiştir. Bunlardan ilkinde ortama serbest enzim çözeltisi eklenirken diğerinde SrtA substratı eklenerek fajların geri kazanılması sağlanmıştır. Enzime en yüksek afinite gösteren fajların seçilmesi amacıyla seçim işlemleri 3 döngü halinde uygulanmış ve yıkama işlemlerinin zorluğu arttırılmıştır. 3 döngü sonunda iki farklı kütüphaneden elde edilen dört farklı faj çözeltisinden faj klonları izole edilmiştir. Seçilen faj klonlarının enzim üzerindeki inhibisyon özellikleri incelenmiş ve inhibisyon gösteren faj klonlarının değişken bölgesinde kodlanan peptit dizilimleri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan ilaçlardır. 1928'de Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfedilmesinin ardından kullanılmaya başlanan antibiyotikler günümüze kadar birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılmıştır [1]. Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinin yanı sıra bazı kronik hastalığa (diyabet, kanser vb.) sahip olup ilaçla tedavi gören hastalarda ya da ameliyat sonrasında enfeksiyonların önlenmesinde tedbir amacıyla da kullanılmaktadır [2]. Bunun yanı sıra antibiyotikler insanların ortalama yaşam sürelerinin uzamasına ve geliştirmekte olan ve iyi sanitasyon uygulamalarının olmadığı ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar sonucu meydana gelen ölümlerin azalmasına da yardımcı olmuştur [1, 2].

Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan binlerce çeşit antibiyotik bulunmaktadır. Bu antibiyotiklerin sınıflandırılması; hedef hücreye etkilerine göre, etki mekanizmalarına göre, etki gösterdiği mikroorganizma grubuna göre, etki spektrumuna göre veya immunmodülatör etkilerine göre farklı şekillerde yapılabilmektedir. Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre sınıflandırıldıklarında temel olarak; bakteri hücre duvarı biyosentezini, protein sentezini, nükleik asit sentezini inhibe edenler ve folik asit metabolik yolu gibi biyokimyasal prosesleri engelleyenler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır [3].

Beta-laktam antibiyotikleri dört üyeli laktam halkasına sahip oldukları için beta-laktamlar olarak adlandırılmışlardır [4]. Doğal veya yarı sentetik penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörleri olmak üzere 5 alt gruptan oluşan beta-laktamlar; peptidoglikan transpeptidazlarını inhibe ederek bakterinin hücre duvarı oluşumunu engellemektedir [4, 5]. Glikopeptitler; vankomisin, teikoplanin, ramoplanin gibi doğal ve telavansin, oritavansin gibi yarı sentetik antibiyotikleri içermekte ve Gram-pozitif bakterilerdeki hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir [5]. Fosfomisin; hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerine etkili olup bakterinin hücre duvarı sentezini ilk aşamada inhibe ederek gelişimini engellemektedir. Sitoplazmik enzim olan enolpruvat transferaz enziminin aktif merkezine kovalent olarak bağlanarak N-asetilmuramik asit oluşumunu reaksiyonun ilk aşamasında bloke etmektedir [4]. Geniş spektrumlu, düşük toksisiteli ve düşük direnç oranlarına sahip olmasına

rağmen çok kullanılan bir antibiyotik değildir [5]. Sikloserin; çoğu Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Genellikle *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [4]. Basitrasin; yalnızca Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir. Nefrotoksik etkisi olduğu için sadece ciddi stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde bölgesel olarak uygulanmaktadır [6]. Lipopeptitler; Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olan polimiksinler (B ve E) ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkili olan daptomisin antibiyotiklerini içermektedir. Lipopeptitler bakterilerin hücre zarındaki fosfolipit tabakasının yapısında değişikliğe neden olarak bakteri gelişimini inhibe etmektedir [5]. Polienler; amfoterisin B ve nistatin antibiyotiklerinden oluşmakta ve fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Fungusların hücre zarlarındaki ergosterollere bağlanarak membranda oluşturdukları porlar nedeniyle hücre geçirgenliğini değiştirmektedir. Amfoterisin B geniş spektruma sahip olup mikotik enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılırken, genelde *Candida* türleri üzerine etkili olan nistatin toksik olması sebebiyle bölgesel olarak parenteral yolla kullanılmaktadır [4]. Azoller; ketakonazol, mikonazol, itrakonazol, flukonazol gibi antibiyotiklerden oluşmaktadır. Ergosterol üretimini azaltıcı etki yaparak funguslardaki membran geçirgenliğini bozdukları için fungal enfeksiyonların tedavilerinde kullanılmaktadırlar [4].

İlk üyesi streptomisin olan Aminoglikozit grubunda; doğal aminoglikozitlerden tobramisin, kanamisin, neomisin, gentamisin ve sisomisin bulunurken, yarı sentetik olanlardan amikasin, netilmisin, isepamisin bulunmaktadır. Aminoglikozitler, 30S ribozomal altbirime bağlanarak translasyon işleminin doğru yapılamamasına neden olmakta ve böylece hücrede protein sentezini inhibe ederek mikroorganizma gelişimini engellemektedir [5]. Tetrasiklinler; doğal klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve yarı sentetik minosiklin, tigesiklin antibiyotiklerinden oluşmaktadır [5]. Genel olarak tetrasiklinler bakteriyel 30S ribozomal altbirime bağlanmakta ve aminoaçil-t-RNA'nın ribozomal A bölgesine bağlanmasına engel olmaktadır. Böylece polipeptit zincirine aminoasit eklenmesine engel oldukları için hücrede protein sentezini inhibe etmektedir [6]. Makrolidler; eritromisin ile eritromisinin yarı sentetik türevleri olan azitromisin ve klaritromisinden ve ketolidlerden oluşmaktadır [4]. Makrolidler tersinir olarak bakteriyel ribozomun 50S altbirimine bağlanarak ribozomu oyalamakta ve translasyon işlemini bloke ederek protein sentezine engel

olmaktadır [5]. Linkozamidler; linkomisin ve bunun yarı sentetik türevi olan klindamisinden oluşup makrolidlerle aynı etki mekanizmasına sahiptir. Klindamisin'in avantajı ise anaerobik bakteriler üzerine etkili olmasıdır [5]. Kloramfenikol; geniş etki spektrumuna sahip ilk antibiyotik olup güçlü bir mikrobiyal protein sentezi inhibitörüdür [6]. Kloramfenikol 50S ribozomal altbirimin 23S rRNA'sına bağlanarak bakteriyel ribozomun peptidil transferaz aktivitesini inhibe etmektedir [5]. Aerobik ve anaerobik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olan antibiyotik ayrıca riketsiyalar (Rickettsiae) üzerinde de etkili olurken klamidyalara (Chlamydiae) etki etmemektedir [4]. Fusidik asit; bakteriyostatik etki yapmakta ve sadece Gram-pozitif bakterilerde protein sentezini inhibe etmektedir. Sadece penisilinler, sefalosporinler ve fusidik asit klinik olarak kullanımda olan fungal antibiyotiklerdir [6]. Linezolidin etki mekanizması kloramfenikole benzemektedir. Gram-pozitif bakteriler üzerinde aktif olup 50S ribozomal altbirime bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir [5]. Temel olarak bakteriyostatik etkisi olan linezolid istisna olarak streptokoklar üzerinde bakteriyosidal etki yapmaktadır [4]. Streptograminler; streptogramin A ve B olmak üzere iki alt sınıftan oluşmakta ve makrolidlerle aynı etki mekanizmasını göstermektedir [5].

Kinolonlar grubunun ilk üyesi tam olarak kinolonlara ait olmayan nalidiksik asit olup, ikinci jenerasyon kinolonlar (norfloksasin, ciprofloksasin, ofloksasin vb.) nalidiksik asite florid atomu eklenmesiyle sentetik olarak geliştirilmiştir [5]. Kinolonlar, bakteriyel topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentezini bloke etmektedir. Topoizomeraz II enziminin inhibe olmasıyla hücre bölünmesi sırasında DNA'nın ikili sarmal yapısının açılması ve DNA'nın kopyalanması engellenmektedir. Topoizomeraz IV enziminin inhibe edilmesiyle de bölünme sırasında eşlenen DNA zincirlerinin ayrılması ve yeni oluşacak hücrelere bölünmesi engellenmektedir [4]. Nitroimidazoller; metronizadol, tinidazol gibi antibiyotiklerden oluşmaktadır. Çoğunluğu protozalara karşı kullanılsa da metronizadol anaerobik bakteriler üzerinde de etkili olmakta ve DNA ile interaksyonu sonucu hücre ölümüne neden olmaktadır [5]. Rifamisinler; rifamisin'in sentetik türevleri olan rifampisin, rifabutin, rifapentin ve rifaksimin antibiyotiklerini içermektedir. Çoğunlukla tüberküloz tedavisinde kullanılan rifamisinler ayrıca çoklu antibiyotik direnci olan stafilokoklar ve pnömokoklara karşı

da kullanılmaktadır [5]. Rifamisinler bakteriyel RNA polimeraz enzimini inhibe ederek RNA sentezini engellemektedir [4].

Sulfonamidler 1932'de patenti alınan ilk sentetik antibiyotiktir. Yapısal olarak p-aminobenzoik asit (PABA) analogu oldukları için sulfonamidler, dihidropteroat sentezinde yarışmalı inhibitör olarak rol almakta ve folat üretimini inhibe etmektedir [5]. Gram-pozitif ve negatif bakteriler üzerine etkili olan sulfonamidler anaerobikler üzerinde zayıf etki göstermektedir [4]. Trimetoprim; seçici olarak bakteriyel dihidrofolik asit redüktaz enzimini inhibe ederek dihidrofolik asitin tetrahidrofolik asite dönüşümüne engel olmaktadır. Folat sentezini inhibe etmek için sulfonamidlerle birlikte de kullanılmaktadır [4]. Aminosalisik asit (PAS), sulfonamidler gibi p-aminobenzoik asit yapısındadır ve folat sentezi inhibitörüdür [4]. Dapson, cüzzam hastalığının tedavisinde en çok kullanılan antibiyotik olup hücredeki folat sentezini inhibe etmektedir [4]. Tüberküloz tedavisinde en etkili ilaç olan izoniazid, mikobakterilerin hücre duvarının yapı taşı olan mikolik asit sentezini inhibe ederek bakterinin ölümüne neden olmaktadır [4].

2.1.1. Antibiyotik Direnci

Mikroorganizmanın antibiyotiklerin etkilerine karşı durabilme yeteneği antibiyotik direnci olarak tanımlanmaktadır. Penisilin bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra penisilin dirençli stafilokoklar ortaya çıkmıştır. Bu sorunun üstesinden gelmek için yeni beta-laktam antibiyotikler geliştirilse de yine aynı dönemde metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) tanımlanmasıyla ilk antibiyotik dirençli mikroorganizma literatüre geçmiştir [2]. Daha sonra bakterilerde antibiyotik direnç kazanımı hızlanarak ciddi bir sorun haline gelmiştir. Günümüzde patojenik bakterilerin %70'den fazlası antibiyotik direncine sahiptir [7]. Antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımıyla yaygınlaşan antibiyotik direnci dünya çapında insan sağlığını büyük ölçüde tehdit etmektedir. Her ülkeden, her yaşta insanın yaşamını etkileyen antibiyotik direnci, tedavi süresini uzatarak tedavi masraflarını arttırmasının yanında ölüm oranlarının da artmasına neden olmaktadır [8]. Her yıl ABD'de en az iki milyon kişi antibiyotik dirençli bakterilerle enfekte olmakta ve en az 23000 kişi bu enfeksiyonlar sonucunda hayatını kaybetmektedir [9].

Antibiyotik direnç krizinin ortaya çıkmasında; mikrobiyal etmenler, insandan kaynaklanan etmenler, klinik ve tarımsal uygulama kaynaklı etmenler gibi bir çok etmen rol oynamaktadır [10].

Bakteriler diğer çok hücreli organizmalara göre daha küçük ve basit canlılar olduklarından genomik olarak da daha az karmaşık bir yapıya sahiplerdir. Bu nedenle ortam koşullarına daha kolay adapte olurlar ve değişen ortam koşullarına olan tepkilerini birbirlerine aktarabilirler. Bu yeteneklerinin temeli küçük hacimde olmaları ve çok kısa sürede çoğalabilmelerine dayanmaktadır. 20 dakika gibi kısa sürelerde bile çoğalabilen türlerinin olması, meydana gelen genetik değişimlerin o popülasyon içinde hızlıca yayılmasını sağlamaktadır [10]. Kısa yaşam döngüsüne sahip olmaları ve ortama kolay uyum sağlama yetenekleri, patojen bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasında ve bu direncin yayılmasında etkili olmaktadır. Bu nedenle yeni antibiyotik geliştirilse de kullanıma başlandıktan yıllar hatta aylar sonra bile bakteriler bu antibiyotiğe karşı direnç kazanmaya başlamaktadır [11].

Günümüzde hızla artan dünya nüfusu, yeni bakteriyel enfeksiyonların oluşmasını ve hızla yayılmasını beraberinde getirmiştir. Bakteriyel enfeksiyon vakalarında görülen artışa paralel olarak tedavi amaçlı antibiyotik kullanımı da artmış ve insanların bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımı bakterilerin antibiyotik direnç kazanımında önemli rol oynamıştır [11].

Yeni geliştirilen antibiyotiklerin piyasaya sürülmeden önce belirli klinik testlerden ve denemelerden geçmesi gerekmektedir. Laboratuvar ortamında sürdürülen denemeler bazen haftalarca aylarca sürmektedir ve bu da fazla miktarda antibiyotik kullanımına neden olmaktadır. Klinik olarak uygulanan bu antibiyotikler de yine antibiyotik direnç oluşumuna zemin hazırlamıştır [11]. Antibiyotiklerin hayvan beslenmesinde büyümeyi arttırıcı madde olarak ve tarımsal ürünlerde verim arttırıcı olarak kullanılması bakterilerde antibiyotik direnç kazanımını arttırıcı etmen olmuştur. Tarım ve hayvancılıkta kullanılan bu antibiyotiklerin atık sularla, hayvansal veya bitkisel yan ürün ve atıklarla çevreye yayılması toprakta, su kaynaklarında yaşayan bakterilerin antibiyotik direnç kazanmasına neden olmuştur [5].

Bakterilerin antibiyotik direnç kazanmasında bir çok farklı mekanizma etkilidir. Bu mekanizmalar genetik açıdan sınıflandırıldığında *doğal* ve *kazanılmış direnç*

mekanizması olmak üzere iki grupta incelenebilir [12, 13]. Doğal direnç mekanizması; bakteri türünün genetik yapısından dolayı belirli bir antibiyotiğe özgü gösterdiği direnç mekanizmasıdır. Bunun nedeni bakterilerin antibiyotikten etkilenmemesi ya da ilacın türüne ve bakterinin membran geçirgenliğine bağlı olarak antibiyotiğin bakteriyi inhibe edecek kadar iyi difüze olmaması olabilir [5, 12, 14]. Kazanılmış direnç mekanizması ise; bakteriye dışardan gen aktarımı (plazmid, transpozon, integron ve bakteriyofajlar aracılığıyla) sayesinde, hücresel mutasyonla veya bunların kombinasyonu ile gelişmektedir [13].

Direnç mekanizması biyokimyasal açıdan incelendiğinde literatürde farklı şekillerde sınıflandırıldığı görülmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarda klinik olarak en çok izole edilen ve en sık görülenler ele alındığında direnç mekanizmaları; enzimatik inhibisyon, penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBPs) değişimler, membran protein değişimleri, antibiyotiğin etki ettiği hedefin modifikasyonu ve antibiyotiğin çeşitli kanallarla hücreden dışarı atılması (efflux) şeklinde sınıflandırılabilir [13, 15-18].

Gelişmekte olan ülkelerde en çok kullanılan antibiyotik grubu olan beta-laktam antibiyotiklerine karşı bakterilerin direnç kazanmasında iki farklı mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan ilki bakteride bulunan ve beta-laktamların hedefi olan penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) meydana gelen modifikasyonlardır. Bakteriler genetik modifikasyonla PBP'lerinde değişime neden olarak beta-laktamların onlara bağlanmasına engel olup kendini antibiyotiğe karşı dirençli hale getirmektedir [12, 16]. Tıpta ve veterinerlikte çok kullanılan antibiyotiklerden biri olan tetrasiklinlere karşı bazı bakteriler, yeni membran taşıyıcıları geliştirerek veya hedefi değiştirerek direnç kazanmıştır. Yeni geliştirilen membran proteinlerle tetrasiklinler hücreden dışarı atılarak hücre içindeki antibiyotik konsantrasyonu düşürülmekte ve hücre antibiyotikten korunmaktadır. Diğer bir mekanizma ise tetrasiklinlerin protein sentezini inhibe etmek için bağlandığı ribozomların sentezlenen koruyucu proteinler sayesinde yapısının değiştirilmesi ve değişen konformasyon sonucu antibiyotiğin ribozoma bağlanmasının engellenmesidir [13]. Bunların dışında bazı bakterilerin membran geçirgenliğini azaltarak fusidik aside karşı direnç geliştirmesi veya fazla miktarda peptidoglikan üreterek glikopeptitlere karşı direnç kazanması diğer antibiyotik direnç mekanizmalarına örnektir [13]. Ancak bakterilerin antibiyotik direnç kazanmasında en etkili mekanizma; bakterinin

o antibiyotiğe özgü, antibiyotiği çeşitli yollarla inhibe eden enzim üretmesidir [16]. *S. aureus*'un beta-laktamaz enzimi üretme yeteneği kazanarak beta-laktam antibiyotiklerine karşı dirençli hale gelmesi yeni antibiyotikler olarak beta-laktamaz inhibitörlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır [13]. Bu açıdan enzim inhibitörleri, bakterinin patojenitesi üzerinde etkili enzimlerin inhibe edilmesinde ve yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

2.1.2.Yeni Antibiyotik Geliştirilmesinde Enzim İnhibitörleri

Enzimlerin bakteriyel enfeksiyonların oluşumundaki rolü ve antibiyotik direnç mekanizmasındaki etkisinin keşfedilmesiyle birlikte, bu enzimlere karşı inhibitör geliştirilmesi yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde popüler bir konu haline gelmiştir. Bu amaçla bir çok enzim inhibitörü keşfedilmiş ve klinik uygulamalar sonunda yeni ilaçların formülasyonlarında kullanılmaya başlanmıştır [19]. Yeni ilaçların ortaya konmasında yapılan ilk çalışmalar mekanizma bazlı veya yapısal bazlı ilaç tasarımına dayanırken, görüntüleme metodolojisindeki yeni gelişmeler sayesinde HTS metodu ilaç tasarımında en çok kullanılan yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem, ilaç benzeri büyük veya küçük yapıllı moleküllerden oluşan kütüphaneler sayesinde hedef enzime karşı inhibitör bulunmasına ve daha kısa sürede, daha az maliyetle ilaç geliştirilmesine olanak sağlamıştır [20, 21]. HTS metodlarından biri olan faj gösterim teknolojisi enzim inhibitörleri ve yeni ilaçların geliştirilmesinde son yıllarda çok kullanılan bir araç haline gelmiştir. Faj gösterim peptit kütüphanelerinin kullanılmasıyla, bakterilerin hücre duvarı sentezinde görev alan patojeniteden sorumlu enzimlere [22-24] ve bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında etkili olan enzimlere [25] karşı inhibitörler seçilerek yeni antibiyotik maddelerin geliştirilmesi sağlanmıştır.

2.2. Faj Gösterim Yöntemi

İlk kez G. Smith tarafından 1985 yılında tanımlanan faj gösterimi, çok sayıda çeşitli peptit ve protein üretmek ve belirli fonksiyonları yerine getiren molekülleri izole etmek için çok etkili bir tekniktir. Protein-ligand interaksyonlarını, reseptör-antikor bağlanma bölgelerini incelemek ve proteinlerin substratlarına olan afinitelerini modifiye etmek veya geliştirmek amacıyla kullanılan faj gösterim yöntemi; çok sayıda protein ya da peptitlerin faj yüzeyinde ekspresyonu ile oluşmaktadır [26]. Faj yüzeyinde ekspres edilecek DNA fragmenti virüsün genomuna yerleştirilmektedir [27]. Filamentöz fajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek tek

zincirli genomlarını çift zincirli kopyalanabilen forma dönüştürmekte ve böylece hem kılıf proteinlerinin oluşmasını hem de nesillerini devam ettirecek DNA'ların çoğalmasını sağlamaktadır [27]. Faj gösterim tekniği kullanılan protein mühendisliği çalışmalarının neredeyse tamamında filamentöz faj kullanılmaktadır [28]. Çünkü diğer fajların aksine (T4, T7 vb.), filamentöz fajlar (M13, fd vb.), konakçı hücreyi parçalamadan çoğalmakta [29] ve bunun yanında fajların yapısı sayesinde kolaylıkla modifiye edilebilmektedir [28]. Geniş pH ve sıcaklık aralıklarında stabil olan filamentöz fajlar litik olmadıkları için bakteri hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda çoğaltılabilmektedir [30].

Faj gösterim yönteminde genellikle, Ff ailesine ait M13 filamentöz fajı kullanılmaktadır. Yaklaşık 6 nm çapında ve 1 µm uzunluğundaki silindir şeklindeki M13 fajının kapsidi 5 farklı proteinden oluşmaktadır [31]. Fajın uzunluğu boyunca kılıf proteinlerinin çoğunluğunu oluşturan ve binlerce kopyadan oluşan pVIII kılıf proteini yer alırken; bir ucunda 5 kopyadan oluşan pIII ve pVI, diğer ucunda ise 3-5 kopyadan oluşan pVII ve pIX minör kılıf proteinleri bulunmaktadır [27]. Faj gösterim yönteminde peptitlerin faj yüzeyinde ekspresyonu için çoğunlukla pIII ve pVIII kılıf proteinleri kullanılmaktadır [32]. Her iki kılıf proteini de fajın konakçı hücreye yönelmesini sağlayan N-terminal sinyal sekansına sahiptir [27]. Majör kılıf proteini olan pVIII proteini, 50 amino asit uzunluğunda olup faj yüzeyi boyunca yaklaşık 2800 kopyası bulunmaktadır. 406 amino asit uzunluğundaki pIII kılıf proteini, konakçı-faj bağlanması için gerekli olup fajın konakçı hücreyi infekte etmesinden sorumludur [33]. Filamentöz faj enfeksiyonu, tanımlama ve translokasyon olmak üzere 2 basamaklı işlemde oluşmaktadır. Filamentöz fajlar türlerine göre (M13, Ike vb.) bakteri hücre duvarında bulunan farklı piluslara (F, N, P pilusları) spesifiklik göstermektedir [33]. Ff ailesine ait M13 filamentöz fajı F pilusa sahip *Escherichia coli*'yi tanıma ve infekte edebilme yeteneğine sahiptir [26]. Enfeksiyon, pIII kılıf proteinin N-terminal bölgesinden F pilusun ucuna bağlanmasıyla başlamakta ve kılıf proteinlerinin çözünmesi sonucu faj DNA'sının *E. coli* hücresinin sitoplazmasına girmesiyle devam etmektedir [31]. *E. coli* hücrelerinde kopyalanan faj DNA'sı, plazmid benzeri kopyalanabilir forma dönüşerek pIII ve pVIII proteinlerini ekspres edebilmek için kalıp/şablon görevi görmektedir. Fajların tek zincirli DNA'ları, konakçı hücreden çıkışları sırasında tekrardan viral kılıf proteinleriyle sarılmaktadır [26].

Faj gösterim kütüphaneleri, pIII veya pVIII kılıf proteinleri üzerinde farklı dizilimdeki peptitleri taşıyan farklı faj klonlarının birleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. En yaygın olarak kullanılan faj gösterim kütüphaneleri, rastgele peptit kütüphaneleridir [34]. Rastgele oligonükleotidler, pIII kılıf proteininin sinyal peptidi ile N-terminalini kodlayan DNA sekansı arasına yerleştirilmektedir. 6 ile 43 amino asit arasında değişen uzunluğa sahip lineer rastgele peptitler N-terminal pIII füzyonu olarak başarılı şekilde ekspres edilmiştir [27]. Bu şekilde 10^{10} 'dan daha fazla peptit çeşitliliğine sahip faj gösterim peptit kütüphaneleri oluşturulabilmektedir [29]. Yüksek orandaki bu çeşitlilik, peptitlerin hedef moleküle olan ilişkisinin klasik protein mühendisliği yöntemleriyle kısa sürede incelenmesini ve karakterizasyonunu imkansız kılmaktadır. Moleküler biyoloji teknikleriyle geliştirilen faj gösterim peptit kütüphaneleri, çok kısa sürelerde milyonlarca peptit arasından hedef moleküle özgü peptitin seçilmesine ve saflaştırılmasına olanak sağlayan pratik bir yöntemdir [28]. Faj gösterim peptit kütüphaneleriyle hedef moleküle özgü peptitin seçilmesi birkaç basamaktan oluşmaktadır. Öncelikle, hedef molekül katı bir destek yüzeyine immobilize edilmekte ve ardından peptit kütüphanesiyle inkübasyona bırakılmaktadır. Inkübasyonun sonunda bağlanmayan fajların uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılmaktadır. Bağlanan fajların geri kazanımı için ortama farklı pH'da elüsyon tamponu, serbest hedef molekül veya serbest ligand gönderilmektedir [32]. Bağlanan fajlar bir sonraki döngülerde kullanılmak üzere *E. coli* kültürüyle çoğaltılmaktadır. Hedef moleküle en iyi bağlanan fajların seçimi için yıkama işleminin zorluğu arttırılmakta ve bu işlemler ardarda 2-3 döngü şeklinde uygulanmaktadır. Döngüler sonunda seçilen fajlara ait peptit dizilimleri, değişken bölge DNA sekans analizi ile saptanmaktadır [31].

Herhangi bir hedef proteine yüksek spesifiklik ve afiniteye bağlanan peptitlerin izole edilmesini sağlayan faj gösterim peptit kütüphanelerinin bir çok farklı kullanım alanı bulunmaktadır [35]. Protein-protein ilişkilerini inceleyen çok sayıda çalışmada faj gösterim yöntemi kullanılmıştır [36-38]. Örneğin; faj gösterim yöntemiyle bakteriyel membran taşıma proteinleri TonB ve BtuF arasındaki etkileşim incelenmiş ve her protein üzerindeki potansiyel bağlanma bölgeleri belirlenmiştir [38]. Antikor fragmentleri faj gösterimi yönteminde kullanılarak, proteomik, spesifik ilaç taşınımı ve hücre içi süreçlerin analizi dahil olmak üzere birçok uygulamada yararlı olabilen hedefe özel antikorların üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır [39-

41]. Faj gösteriminin en başarılı uygulamalardan biri, büyük faj antikor kütüphanelerini kullanarak monoklonal antikorların ve bunların fragmentlerinin izolasyonu olmuştur [39]. Teşhis, immünoterapi ve aşı geliştirmede önemli olan ve antikor ile spesifik etkileşimde bulunan antijen epitoplarının haritalanması faj gösterim yöntemi ile ucuz ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir [42, 43]. Aynı zamanda faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak düşük immünojenik profile sahip karbonhidrat ve lipid antijenlerinin epitop taklidleri (mimotoplar) de tanımlanabilmektedir [44]. Faj gösterim yöntemi reseptörlerin agonist ve antagonistlerinin seçilmesi ve tanımlanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [40].

2.2.1. Faj Gösterim Yöntemi ile Enzim İnhibitörlerinin Geliştirilmesi

Faj gösterimi, enzim biliminde substrat özgüllüğünü belirlemek ve enzimin aktif ve alosterik bölgelerinin modülatörlerini geliştirmek amacıyla kullanılan etkili bir yöntemdir [39, 45, 46]. Faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak; alkol dehidrogenaz, heksokinaz, glikojen fosforilaz, β -glukozidaz gibi birçok enzime karşı peptit inhibitörler geliştirilmiştir [47]. Filamentöz fajların geniş aralıktaki proteaz enzimlerine karşı dayanıklı olması faj gösterim yöntemiyle proteazlara karşı peptit inhibitörlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır [27]. Faj gösterim yöntemi ile; serin proteaz faktörü FVIIa enzimine [48], proteinaz-K enzimine ve Katepsin-S sistein proteinazına [49] karşı peptit inhibitörleri seçilmiştir. Doğal inhibitörlerin çoğu, aynı proteaz ailesindeki diğer proteaz enzimlerini de inhibe edebildiği için düşük spesifikliğe sahiptir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için doğal inhibitörlerin farklı tekniklerden yararlanılarak modifiye edilmeleri gerekmektedir [50]. Faj gösterim yöntemi kullanılarak plazminojen aktivatörü [51], plazma kallikerin [52], tripsin [53], trombin [54] gibi birçok enzime inhibitör geliştirilmesinde doğal proteaz inhibitörlerinin mutantlarından oluşturulmuş kütüphaneler kullanılmıştır.

Proteazlar, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kilit rol almaktadır [55]. Birçok proteaz kanser, osteoporoz, iltihaplı ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu gibi aynı zamanda parazitik, bakteriyel veya viral hastalıklarla da ilişkilidir [50]. Bu nedenle bu proteazlara karşı inhibitör geliştirilmesi terapötik açıdan da önemli olmaktadır [55]. Özellikle bakteriyel enzimler hedef alınarak faj gösterim yöntemiyle inhibitör peptitlerin seçilmesi yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde

önemli bir araç haline gelmiştir [22, 23, 25]. Örneğin, bakterinin beta-laktam antibiyotiklerine direnç kazanmasına neden olan penisilinaz enzimine karşı faj gösterimi yöntemiyle başarılı bir şekilde inhibitör peptitler seçilerek yeni beta-laktam antibiyotiklerinin geliştirilmesine katkı sağlanmıştır [56]. Ancak giderek artan antibiyotik direnç sorunu, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde farklı yaklaşımları zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla, yeni hedef moleküllerin belirlenmesi ve yeni hedefe özgü inhibitör geliştirilmesi antibiyotik direnç sorununun çözümü için potansiyel oluşturmaktadır [57]. Bu noktada çoğu Gram-pozitif bakterinin hücre duvarında bulunan ve virülanslıkları üzerinde etkili olan sortaz enzimleri, yeni antibiyotiklerin tasarlanmasında kullanılabilecek potansiyel bir hedef haline gelmiştir [58].

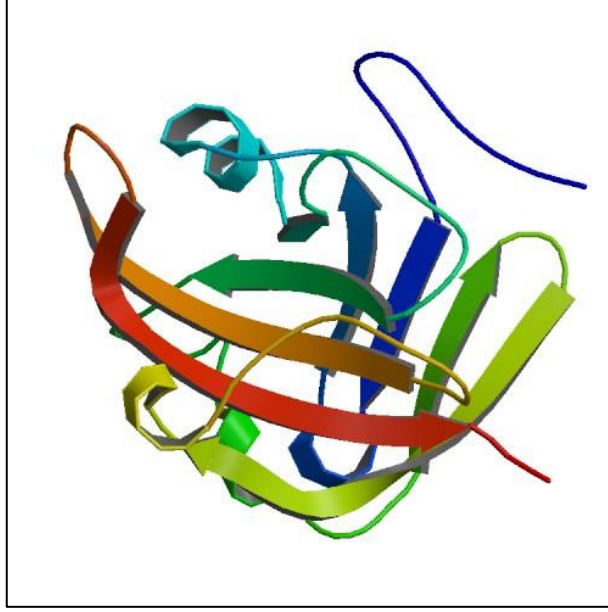
2.3. Sortaz Enzimleri

Sortaz enzimleri çoğu Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında yer alan bir transpeptidaz ailesidir. Bakteriyel yüzey proteinlerinin bakterinin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanmasından sorumlu sortaz ailesi, sortaz A, B, C ve D olmak üzere 4 sınıftan oluşmaktadır [59]. Farklı bakteri türleri farklı sayıda ve farklı çeşitte sortaz enzimlerine sahiptir. Örneğin *S. aureus* sortaz A ve sortaz B enzimlerine [60] sahipken *S. pneumoniae* 4 farklı sortaz enzimine [61] sahiptir. *S. aureus* ve diğer birçok Gram-pozitif patojenin virülanslığında hücre dışında yer alan virülans proteinleri ve tutunmayla ilgili proteinler ve enzimlerin birinci derecede katkısı bulunmaktadır. Bunlar arasında sortaz A (SrtA) tüm Gram-pozitif bakterilerde bulunmakta ve patojenitede önemli rol oynayan LPXTG motifi içeren proteinlerin hücre duvarına bağlanmalarını sağlamaktadır [62].

2.3.1. Sortaz A Enzimi

206 amino asit uzunluğunda olan SrtA, N-terminalinde transmembran bölge bulunan bir sistein transpeptidazdır [63]. NMR ve X-ray kristallografisi analiz sonuçlarına göre SrtA, birkaç kısa heliks ve döngü içeren 8 beta-pilili tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Enzimin aktif bölgesi $\beta 6$ ve $\beta 7$ pilili tabakalarından oluşan hidrofobik kısımda yer almaktadır [64]. Aktif bölgede, enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olan sistein (C184), histidin (H120) ve arjinin (R197) amino asitleri bulunmaktadır [62]. Histidin aminoasidinin imidazol halkası, sisteini aktive etmekte ve transpeptidasyon reaksiyonu sırasında sistein amino asidinin nüleofilik atakla reaksiyonu katalizlemesini sağlamaktadır. Ayrıca NMR sonuçlarına göre

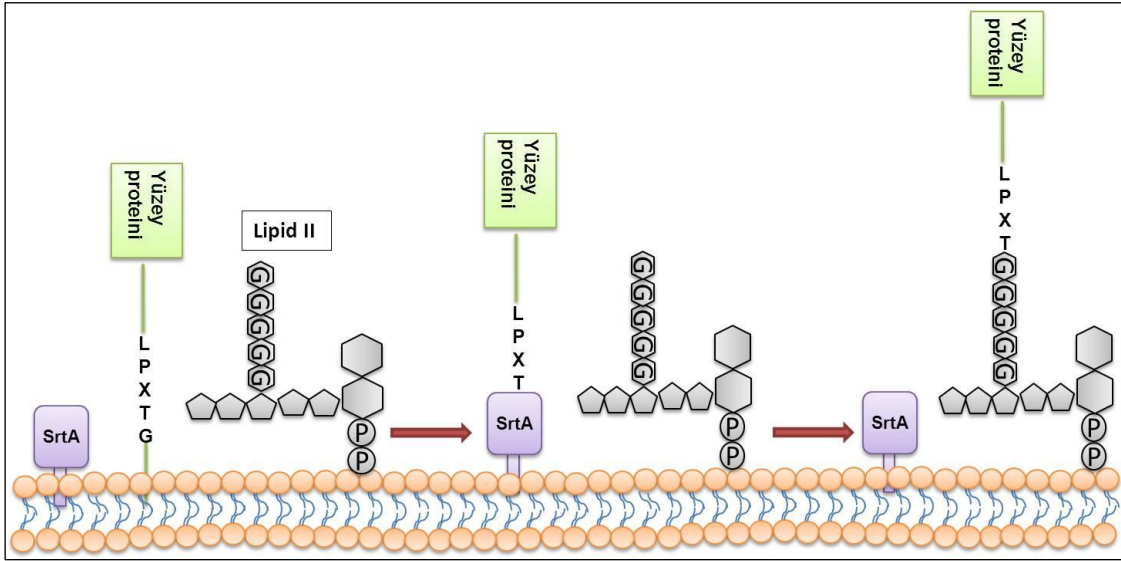
ortamda bulunan Ca^{+2} iyonunun, iyon bağlayıcı bölgedeki konformasyonu değiştirerek enzimin katalitik aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir [65].



Şekil 2.1. Sortaz A enziminin kristal yapısı [66]

SrtA transpeptidasyon reaksiyonunu katalizleyerek yüzey proteinlerinin bakterilerdeki peptidoglikana tutunmasını sağlamaktadır (Şekil 2.2) [63]. Yüzey proteinlerinden en çok çalışılanı, *S. aureus*'un virülanslığında etkili olan ve LPXTG motifine sahip stafilokokal protein A'dır [67]. Protein A'nın 35 amino asit uzunluğundaki C-terminal ucunda LPXTG motifi, hidrofobik bölge ve pozitif yüklü kuyruk kısmı bulunmaktadır [68]. Hem hidrofobik bölge hem yüklü kuyruk kısım, SrtA transpeptidasyon reaksiyonu öncesinde yüzey proteinin korunmasına yardımcı olmaktadır [69]. *S. aureus* SrtA reaksiyonu sonucunda, hücre membranında yer alan yüzey proteininin LPXTG motifindeki treonin (T) ve glisin (G) arasındaki bağ kırılmakta, karboksil terminalindeki treonin ile stafilokokal hücre duvarında yer alan pentaglisin çapraz köprüsünün serbest amino terminali arasında kovalent bağ oluşmaktadır [70]. Böylece yüzey proteinleri, bakterinin konakçı canlının hücre ve dokularına tutunabilmesini, enfeksiyona neden olmasını, bağışıklık sisteminden kaçabilmesini ve biyofilm oluşturabilmesini mümkün kılmaktadır. Yapılan hayvan denemeleri sonucu; sortaz enzimlerine ait genlerin eksikliği proteinlerin tutunma yeteneğini ve *S. aureus*'un virülanslığını azalttığı görülmüştür [71]. Ayrıca diğer enfeksiyon tiplerinde yapılan çalışmalarda da SrtA mutantlarının daha düşük virülanslık gösterdikleri görülmüştür [64]. Çoğu Gram-

pozitif bakterinin var olan antibiyotiklere dirençli hale gelmesi, antibiyotik geliştirilmesinde yeni hedef ve stratejilerin kullanılmasını zorunlu kılmıştır [72]. Bu nedenle, sortaz enzimlerinin inhibisyonu Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ve yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde önemli bir hedef haline gelmiştir [73].



Şekil 2.2. SrtA'nın katalizlediği transpeptidasyon reaksiyonunun şematik gösterimi

2.3.2. Sortaz A İnhibitörlerinin Geliştirilmesi

Son yıllarda SrtA inhibitörleri geliştirilmesi için büyük çaba harcanmıştır [71]. Sistein nükleofilinin enzimin katalitik aktivitesindeki rolünün keşfedilmesi ve SrtA'nın tiol grubu inaktivatörleriyle inhibisyonu, rasyonel yöntemlerle yeni SrtA inhibitörlerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır [62]. SrtA inhibitörü tasarımı için uygulanan stratejilerden birisi, SrtA'nın tanımladığı LPXTG motifine sahip peptitleri taklit etmektir. LPXTG sekansına sahip peptit taklitlerinin karboksil terminaline tiol reaktif ajanlar eklenmiştir. Böylece SrtA'nın LPXTG motifini tanıyarak peptit taklidini tersinmez olarak enzimin aktif bölgesine bağlaması ve tiol reaktiflerinin enzimi tersinmez olarak inhibe etmesi amaçlanmıştır [72]. Bu amaçla yürütülen çalışmalar sonucu peptidil-klorometan, peptidil-diazometan, peptidil-siyanoalkan gibi SrtA inhibitörleri rapor edilmiştir [62]. İnhibisyon aktiviteleri incelenerek inhibitör sabitleri belirlendiğinde peptidil-klorometan'ın peptidil-diazometan'a kıyasla iki kat daha fazla inhibitör potansiyeli olduğu görülmüştür [74]. Yapılan bir çalışmada SrtA'ya karşı vinil sülfon ile substrat mimetikleri sentezlenmiş ve SrtA

enziminin tersinmez inhibisyonu sağlanmıştır. Ancak inhibitör konsantrasyonları incelendiğinde peptidil-vinil sülfon mimetiklerinin ($K_i=9 \mu\text{M}$) peptidil-klorometan ($K_i=0,21 \mu\text{M}$) kadar yüksek inhibitör potansiyeline sahip olmadığı görülmektedir [75]. SrtA'nın inaktivasyonu için LPXTG motifinin hidrolize olmayan fosfinik peptit taklitleri de geliştirilmiştir. Geliştirilen bu peptit taklitleri enzimi yarışmalı olarak inhibe etmesine rağmen inhibitör aktiviteleri ($IC_{50}= 10 \text{ mM}$) düşük bulunmuştur [76].

Ayrıca bazı doğal ürünler de SrtA inhibitörleri açısından zengin kaynaklardır. İlk olarak 80 medikal bitki ekstraktlarının SrtA üzerindeki etkisi incelenmiş ve bunlardan 4 tanesinin (*Cocculus trilobus*, *Fritillaria verticillata*, *Rhus verniciflua* ve *Liriope platyphylla*) yüksek inhibisyon aktivitesi olduğu saptanmıştır [77]. Daha sonra *F. verticillata* tomurcuklarından glukozilsterol b-sitosterol-3-O-glukopiranozid izole edilerek SrtA enzimi üzerine etkisi incelenmiş ve SrtA inhibitörü olarak tanımlanan ilk doğal bileşen olmuştur [78]. Bunların yanı sıra flavonoller, flavonoidler, alkaloidler gibi doğal bileşenlerin de SrtA inhibitör potansiyelleri incelenmiş ve mikromolar düzeyde inhibitör konsantrasyonlarına sahip inhibitörler saptanmıştır [72]. Ancak doğal bileşenlerin ve peptidomimetiklerin SrtA üzerindeki inhibitör potansiyellerinin incelenmesini oldukça zaman alıcı bir yöntemdir. Bu nedenle, HTS tekniğinden yararlanılarak SrtA inhibitörlerinin geliştirilmesinde küçük molekül kütüphaneleri etkili bir araç olmuştur [72]. Çok sayıda küçük molekül içeren kütüphanelerin taranmasıyla inhibitör konsantrasyonu mikromolar düzeyinde olan birçok SrtA inhibitörü tanımlanmıştır. Bunlar arasında aril- β -amino(etil) keton'un birçok sortaz izoformlarına karşı en etkili inhibitör olduğu belirlenmiştir [58]. Ancak tanımlanan bu inhibitörlerin seçicilikleri düşük ve inhibisyon sabitleri yeterli düzeyde değildir. Bu çalışmalardan farklı olarak makrosiklik peptit kütüphaneleri oluşturularak SrtA'ya karşı halkalı yapıda peptit inhibitörlerinin seçimi gerçekleştirilmiştir. Seçilen iki halkalı peptitlerin inhibitör sabitleri yaklaşık $1\mu\text{M}$ olarak belirlenirken $IC_{50}= 167 \mu\text{M}$ olarak saptanmıştır [71]. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, geliştirilen peptit inhibitörlerinin inhibisyon özelliklerinin önceki çalışmalar sonucu elde edilen diğer SrtA inhibitörlerinden daha iyi olduğu görülmektedir. Bu noktada faj gösterim yönteminin SrtA enzimine karşı spesifik ve yüksek afiniteye sahip yeni inhibitörlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek etkili bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada, SrtA enzimine karşı inhibitör peptitlerin geliştirilmesi için farklı faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılarak enzime bağlanan ve enzimi inhibe eden fajların seçilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla önceki çalışmadan farklı olarak, 7 amino asit uzunluğundaki lineer ve halkalı peptitlerden oluşan 2 farklı rastgele peptit kütüphanesi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında SrtA'ya en iyi bağlanan faj klonları seçilerek enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yüksek inhibisyon gösteren faj klonlarının değişken bölge DNA diziliminden kodladıkları peptit dizilimleri saptanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Çalışmada ekspresyon vektörleri olarak Hidde Ploegh tarafından hediye edilen, *E. coli* DH5 α hücrelerinde katı besiyerinde temin edilen pET28a-SrtA Δ 59 plazmidi ve mutant-SrtA Δ 59 plazmidi kullanılmıştır. Ekspresyon vektörlerinin elde edilmesi amacıyla, Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından alınan LB sıvı besiyeri, agar ve sığır serum albümini (BSA), Life Technologies Co. (Kaliforniya, A.B.D.) firmasından alınan kanamisin sülfat, Macherey-Nagel (Düren, Almanya) firmasından alınan plazmid saflaştırma kiti, New England Biolabs Inc. (Ipswich, A.B.D.) firmasından sağlanan BamHI, NdeI, XhoI enzimleri ve CutSmart tampon çözeltisi kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez sisteminde Bionline Inc. (Randolph, A.B.D.) firmasından alınan agaroz, HyperLadder 1kb DNA belirteci ve 5X örnek yükleme tamponu, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Teksas, A.B.D.) firmasından sağlanan Tris bazı, Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından sağlanan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), Merck-Millipore (MA, ABD) firmasından sağlanan asetik asit, Bio-Rad Laboratories Inc. (Kaliforniya, A.B.D.) firmasından sağlanan SYBR Safe DNA jel boyası kullanılmıştır. SrtA ekspresyonu için New England Biolabs Inc. (Ipswich, A.B.D.) firmasından sağlanan kompetent *E. coli* BL21(D3), Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından alınan isopropilthiogalaktosid (IPTG), trizma hidroklorit (Tris-HCl), NaCl, lizozim ve imidazol, Merck-Millipore (MA, ABD) firmasından sağlanan MgCl₂, CaCl₂, fosforik asit (%85), Honeywell Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmasından sağlanan etanol ve Qiagen (Hilden, Almanya) firmasından sağlanan Ni-NTA reçinesi kullanılmıştır. SDS-PAGE analizi için, Panreac AppliChem ITW (Darmstadt, Almanya) firmasından alınan akrilamid ve bisakrilamid, Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından alınan glisin, trikloroasetik asit (TCA) ve merkaptotanol, Bio-Rad Laboratories Inc. (Kaliforniya, A.B.D.) firmasından sağlanan bromfenol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), tetrametiletilediamine (TEMED), coomassie brilliant blue, amonyum persülfat ve Merck-Millipore (MA, ABD) firmasından sağlanan KOH kullanılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılan florojenik özellikteki Abz-LPETG-K(Dnp)-NH₂ substratı ve LPETG SrtA substratı GenScript (Ipswich, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir.

Çalışmada faj gösterimi için, New England Biolabs Inc. (Ipswich, A.B.D.) firmasından sağlanan, M13 7-mer lineer ve C7C halkalı faj gösterim kütüphaneleri ve konakçı organizma, *Escherichia coli* ER2738, kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Tween 20, polietilen glikol-8000 (PEG-8000), 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-beta-D-galaktopiranosid (X-gal) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından ve NaHCO₃ Merck-Millipore (MA, A.B.D.) firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. UV-VIS Spektrofotometresi

Rekombinant olarak üretilen ve saflaştırılan SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzim çözeltilerinin protein miktarları Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, A.B.D.) firmasından sağlanan UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Ölçümler Agilent Technologies firmasından sağlanan quartz mikro küvette (50 µL) 280 nm'de gerçekleştirilirken Bradford yöntemi ile 595 nm'de alınan ölçümler LP Italiana SPA (Milano, İtalya) firmasından sağlanan polistren küvetlerde (1 mL) gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Floresans Spektrofotometresi

Yapılan çalışmada SrtA aktivitesi ölçümleri için kullanılan Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, A.B.D.) firmasından ve quartz mikro küvet (50 µL) Hellma Analytix (Müllheim, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Ölçümler esnasından sıcaklık kontrolü Agilent Technologies, Inc. firmasından temin edilen Cary Eclipse yazılımı ve peltier sistemle sağlanmıştır (-10 - 100°C). Ölçümler esnasında PMT voltajı 600 volt olarak ayarlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. SrtA Ekspresyonu İçin Vektörlerin Elde Edilmesi

Çalışma kapsamında iki farklı SrtA enziminin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki, *S. aureus* SrtA enziminin N terminalindeki ilk 59 amino asiti içermeyen SrtA_{Δ59} enzimi olup, pET28a-SrtA_{Δ59} plazmidi (#51138) tarafından kodlanmaktadır. Kanamisin rezistansı ve T7 promotera sahip plazmid, enzimin amino terminalinde hekza-histidin etiketini bulundurmaktadır. İkincisi ise *S. aureus* SrtA enziminin, kalsiyum olmayan ortamda aktivite gösterebilen ve katalitik aktivitesi artırılmış mutant-SrtA_{Δ59} enzimi olup, pet30b-7M SrtA plazmidi (#51141) tarafından kodlanmaktadır. Plazmid benzer şekilde kanamisin rezistansı ve T7 promotera sahiptir ve enzimin karboksil terminalinde hekza-histidin etiketini bulundurmaktadır.

E. coli DH5 α hücrelerinde katı besiyerinde temin edilen plazmidler, kanamisinli (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB sıvı besiyerinde zenginleştirilmiş ve kanamisin içeren (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB agar katı besiyerine ekilmiştir. Plazmid taşıyan hücreler inkübasyon sonunda kanamisin içeren LB katı besiyerinde koloni oluşturmuş ve oluşan tek koloniler besiyerinden izole edilmiştir. İzole edilen koloniler yine kanamisinli LB sıvı besiyerinde zenginleştirilerek hücre stokları oluşturulmuştur.

Plazmidlerdeki enzimi kodlayan gen segmentlerinin varlığının ortaya konması amacıyla plazmid saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan saflaştırma kitine ait prosedür takip edilmiştir. İzolasyon işlemi sonunda elde edilen #51138 ve #51141 plazmid DNA çözeltilerinin, UV-Vis spektrofotometre ve quartz mikro küvet (50 μL) kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerinden DNA konsantrasyonları ve saflık oranları saptanmıştır.

İzole edilerek DNA miktarı ve saflık değerleri belirlenen plazmidler, enzimi kodlayan gen segmentlerinin başlangıç ve bitiş bölgelerini tanıyan ve plazmidi bu noktalardan keserek hedef DNA fragmentinin elde edilmesini sağlayan restriksiyon enzimleri ile kesilerek analiz edilmiştir. Bu amaçla, #51138 plazmidi için NdeI ve BamHI enzimleri kullanılırken #51141 plazmidi için ise NdeI ve XhoI enzimleri kullanılmıştır. Plazmid DNA'nın kesimi için kullanılan çözeltiler Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Kesim için CutSmart tampon çözeltisi kullanılarak reaksiyon ortamında enzimlerin aktif olduğu pH değeri korunmuştur. Her iki plazmid için, kesim enzimlerini içermeyen, enzimlerden sadece birini içeren (NdeI) ve iki kesim enzimini de içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler 37°C'de 5 saat süreyle karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Kesim fragmentlerinin büyüklükleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle tris bazı (121g), asetik asit (28.55 mL) ve EDTA (50 mL, 0.5 M, pH=8.0) kullanılarak TAE tamponu (50X, 500 mL) hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan tampon sistemde kullanılmak üzere 1X oranına saf su ile seyretilmiştir. %1'lik agaroz jel, 1X TAE tamponu (pH 8.0) ve 10000X SYBR Safe DNA jel boyası içeren çözelti içinde hazırlanmış ve mikrodalgada eritilmiştir. Hazırlanan jel, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra tarak yerleştirilmiş yatay jel kasedine dökülmüştür. Jel donduktan sonra kesimi yapılan DNA çözeltisinden 20 μL

alınarak 5 µL 5X örnek yükleme tamponu ile karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Jel üzerindeki bir kuyuya ise 10 µL HyperLadder 1kb DNA belirteci yüklenmiştir. Agaroz jele 1X TAE tamponu içerisinde yaklaşık 150 V voltaj uygulanmıştır. Yaklaşık 1 saat sonunda jel sistemden çıkarılarak mavi led transillüminatör ile görüntülenmiştir.

Tablo 3.1. Plazmid kesimi için reaksiyon karışımı

	Hacim	Konsantrasyon	Çözelti içindeki miktar
Plazmid	20 µL	25-30 ng/µL	500-600 ng
Tampon	2.5 µL	10X	1X
BSA	1 µL	10 mg/mL	10 µg
Restriksiyon enzimi	1 µL	20 U/µL	20 U

Ayrıca, #51138 plazmidi için enzimi kodlayan gen segmentinin DNA dizilimi belirlenmiş ve *S. aureus* SrtA_{Δ59} geni ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla izole edilen plazmidin enzimi kodlayan bölgesinin dizilimi GenScript firması (Piscataway, NJ, A.B.D.) tarafından belirlenmiştir. Elde edilen dizilim SrtA_{Δ59} geninin esas dizilimi ile [79] NCBI BLASTN programı kullanılarak karşılaştırılmıştır [80].

3.2.2. SrtA Ekspresyonu

Bir önceki aşamada saflaştırılan ve enzimi kodlayan gen bölgeleri incelenen plazmidler protein ekspresyonu için *E.coli* BL21 kompetent hücrelerine aktarılmıştır. Bu amaçla, kompetent hücre stoğundan alınan 50 µL'ye 10 µL plazmid çözeltisi (~10 ng/µL) eklenerek karıştırılmış ve buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında çözeltiliye 42°C'de 10 saniye ısı şoku uygulanmış ve tekrar buz içerisinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Çözeltinin üzerine 950 µL LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C'de karıştırılmalı inkübatörde 60 dakika bekletilmiştir. Elde edilen kültürden dilüsyonlar hazırlanarak kanamisinli LB katı besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Besiyerinden tek koloni izolasyonu gerçekleştirilmiş ve seçilen koloniler kanamisinli LB sıvı besiyerinde çoğaltılarak hücre stokları hazırlanmıştır.

Hücre stoklarından antibiyotikli LB sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu kültürden 500 µL alınarak 50 mL antibiyotikli LB sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de karıştırılmalı ortamda yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan kültürün optik yoğunluğu (OD) yaklaşık 0.5'e ulaştığında 50

μ L IPTG çözeltisi (0.5 M) besiyerine eklenmiş ve inkübasyona 4 saat daha devam edilmiştir. Kontrol için hazırlanan kültüre ise IPTG ilave edilmeden inkübasyon sürdürülmüştür. İnkübasyon sonucunda kültürler santrifüj tüplerine alınarak 6000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılarak pelet -20°C 'de 1 gece muhafaza edilmiştir. Sonrasında pelet lizozim içeren (10 mg/mL) 1 mL TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) çözdürülmüştür. Çözelti 60 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edildikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında karıştırmalı ortamda bekletilmiştir. Çözelti 4°C 'de 18500g'de 45 dakika santrifüj edilmiş ve enzimi içeren supernatant alınmıştır.

3.2.3. SrtA Saflaştırılması

Histidin etiketli enzimler çözelti içerisinde Ni-afinite kolon yardımıyla saflaştırılmıştır. Bunun için öncelikle plastik kolonlar (Thermo Fisher Scientific Inc., A.B.D.) 1 mL yatak hacminde Ni-NTA reçinesi ile doldurulmuş ve TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) tamponuyla yıkanmıştır. Enzimi içeren supernatant kolona ilave edilerek karıştırmalı ortamda 30 dakika bekletilerek reçine ile etkileşimi sağlanmıştır. Daha sonra bağlanmayan bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla kolon TBS tamponuyla (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) yıkanarak 1 mL'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra kolona elüsyon tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM imidazol, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) eklenerek 15 dakika bekletilmiş ve bağlanan proteinleri içeren 500 μ L hacminde fraksiyonlar alınmıştır.

Alınan elüsyon fraksiyonlarında protein miktarının belirlenebilmesi için UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 280 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Ölçümler quartz mikro küvette (60 μ L) gerçekleştirilmiştir. Yüksek absorbans görülen fraksiyonlar sonraki aşamalarda kullanılmak üzere birleştirilmiştir.

Plazmidlerin transforme edildiği hücrelerin SrtA enzimini üreten üretilmediklerinin belirlenebilmesi için IPTG ile indüklenen ve IPTG indüksiyonu yapılmayan kontrol hücrelerine ait lizat, yıkama ve elüsyon çözeltileri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Karışım halindeki proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrılmasını sağlayan SDS-PAGE işlemi dikey elektroforez sisteminde (VWR, Radnor, PA, A.B.D.) yapılmıştır. Elektroforez işlemi Laemmli metoduna [81] göre hazırlanan %15'lik akrilamid/bisakrilamid separasyon jelinde gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan çözeltiler aşağıda verilen tablolarda gösterilmiştir.

Seperasyon jel çözeltisi Tablo 3.4'te gösterilen bileşenlerin karıştırılmasıyla hazırlanmış ve 10x10 cm boyutundaki dikey jel kasedine dökülmüştür. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkarılarak jel saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklar, saf su ile 1X oranına seyreltilmiş elektroforez yürütme tamponu (Tablo 3.2) ile doldurulmuştur. Örnek çözeltilerinden alınan 40 µL, Tablo 3.3'te gösterilen 10 µL örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 94°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Çözeltilerdeki proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla 14.4-97.4 kDa aralığındaki standart protein belirteci kullanılmıştır. Tablo 3.6'da gösterildiği gibi hazırlanan yükleme tamponundan 20 µL alınarak 2 µL protein belirteci ile karıştırılmış ve 94°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen örneklerden 25 µL, protein belirtecinden ise 20 µL çözelti alınarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve jel kasedi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı 1X elektroforez yürütme tamponu ile doldurulmuş ve bromfenol mavisi boyası jelin tabanına ulaşana kadar 250 V sabit voltajda elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra saf su ile iyice yıkanan jeller boyama çözeltisi (Tablo 3.5) ile yaklaşık 1.5-2 saat boyanmıştır. Boyama işleminin ardından jeller saf su ile yıkanarak görüntüleri alınmış ve Agfa Foto Look programı (Agfa-Geavert N.V., Belçika) ile jellerin görüntüleri işlenmiştir.

Tablo 3.2. SDS-PAGE analizinde kullanılan elektroforez tamponu içeriği

Elektroforez Tamponu (5X)	1000 mL
Glisin	94 g
Tris Bazı	15.1 g
SDS(%10)	50 mL

Tablo 3.3. SDS-PAGE analizinde kullanılan örnek yükleme tamponu içeriği

Örnek Yükleme Tamponu (5X)	10 mL
1 M Tris-Cl (pH=6.8)	2.5 mL
Gliserol	4.5 mL
SDS	1 g
Bromfenol Mavisi	20 mg
Merkaptoetanol	0.5 mL
Deiyonize su	2.5 mL

Tablo 3.4. SDS-PAGE analizinde kullanılan seperasyon jeli içeriği

%15'lik Seperasyon Jeli	40 mL
%40'lık Akrilamid	14.49 mL
%2'lik Bisakrilamid	9.9 mL
1.5 M Tris-Cl (pH=8.6)	10 mL
%10'luk SDS	400 µL
Deiyonize su	5.012 mL
%10'luk Amonyum Persülfat	300 µL
TEMED	27 µL

Tablo 3.5. SDS-PAGE analizinde kullanılan boya çözeltisi içeriği

Boya Çözeltisi	100 mL
TCA (%100)	13 mL
%0.25'lik Coomasie Brilliant Blue	78 mL
10 N KOH	9 mL

Tablo 3.6. SDS-PAGE'de kullanılan protein belirteci için yükleme tamponu içeriği

Protein Belirteci Yükleme Tamponu	10 mL
1 M Tris-Cl (pH=6.8)	1.2 mL
Gliserol	1 mL
%10'luk SDS	2 mL
%0.1'lik Bromfenol Mavisı	0.5 mL
Deiyonize su	4.8 mL
Merkaptoetanol	0.5 mL

Elde edilen çözeltilerde SrtA_{Δ59} enziminin varlığının teyit edilmesi için Floresans Spektrofotometre kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla florojenik özellikteki Abz-LPETG-K(Dnp)-NH₂ substratından yararlanılmıştır. Ölçümler esnasında uyarma dalgaboyu 320 nm, emisyon dalga boyu 420 nm ve slit açıklığı 5 nm olarak ayarlanmıştır. Aktivite ölçümleri için, TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) hazırlanmış substrat çözeltisinden (50 µM) 40 µL alınarak, 40 µL protein çözeltisi ile karıştırılmış ve quartz mikro küvete alınmıştır. 2 dakika zaman aralığında 15 saniyede bir alınan ölçümlerde çözeltideki floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Birim zamanda ölçülen floresans şiddetindeki artıştan enzim aktivite değerleri reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak hesaplanmıştır.

Elde edilen çözeltilerde mutant-SrtA_{Δ59} enziminin varlığının teyit edilmesi için aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler esnasında uyarma dalgaboyu 320 nm, emisyon dalga boyu 420 nm ve slit açıklığı 5 nm olarak ayarlanmıştır. Aktivite ölçümleri için, TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) hazırlanmış Abz-LPETG-K(Dnp)-NH₂ substrat çözeltisinden (50 µM) 40 µL alınarak, 40 µL protein çözeltisi ile karıştırılmış ve quartz mikro küvete alınmıştır. Çözeltideki floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Ölçümler 16 dakika zaman aralığında 2 dakikada bir alınmıştır. Birim zamanda ölçülen floresans şiddetindeki artıştan enzim aktivite değerleri reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak hesaplanmıştır.

SDS-PAGE'de görüntülenen ve enzim aktivitesi ölçümleriyle de SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzim varlığı doğrulanan elüsyon çözeltilerindeki imidazolün uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 14 kDa cut-off değerine sahip selüloz membran (Sigma-Aldrich Co., St Louis, A.B.D.) içine konan protein çözeltileri TBS tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) kullanılarak 4°C'de 1 gece karıştırılmalı olarak diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminin ardından enzim çözeltilerinde aktivite kaybı olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimlerinin aktivite ölçümleri bir önceki aşamada anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrası enzim çözeltilerinin saflığı SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir. SDS-PAGE analizi önceki aşamalarda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntülerinde, GelQuant.NET programı [82] kullanılarak SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimlerine ait bantların intensiteleri diğer bant intensiteleri ile karşılaştırılmış ve saflık değerleri belirlenmiştir.

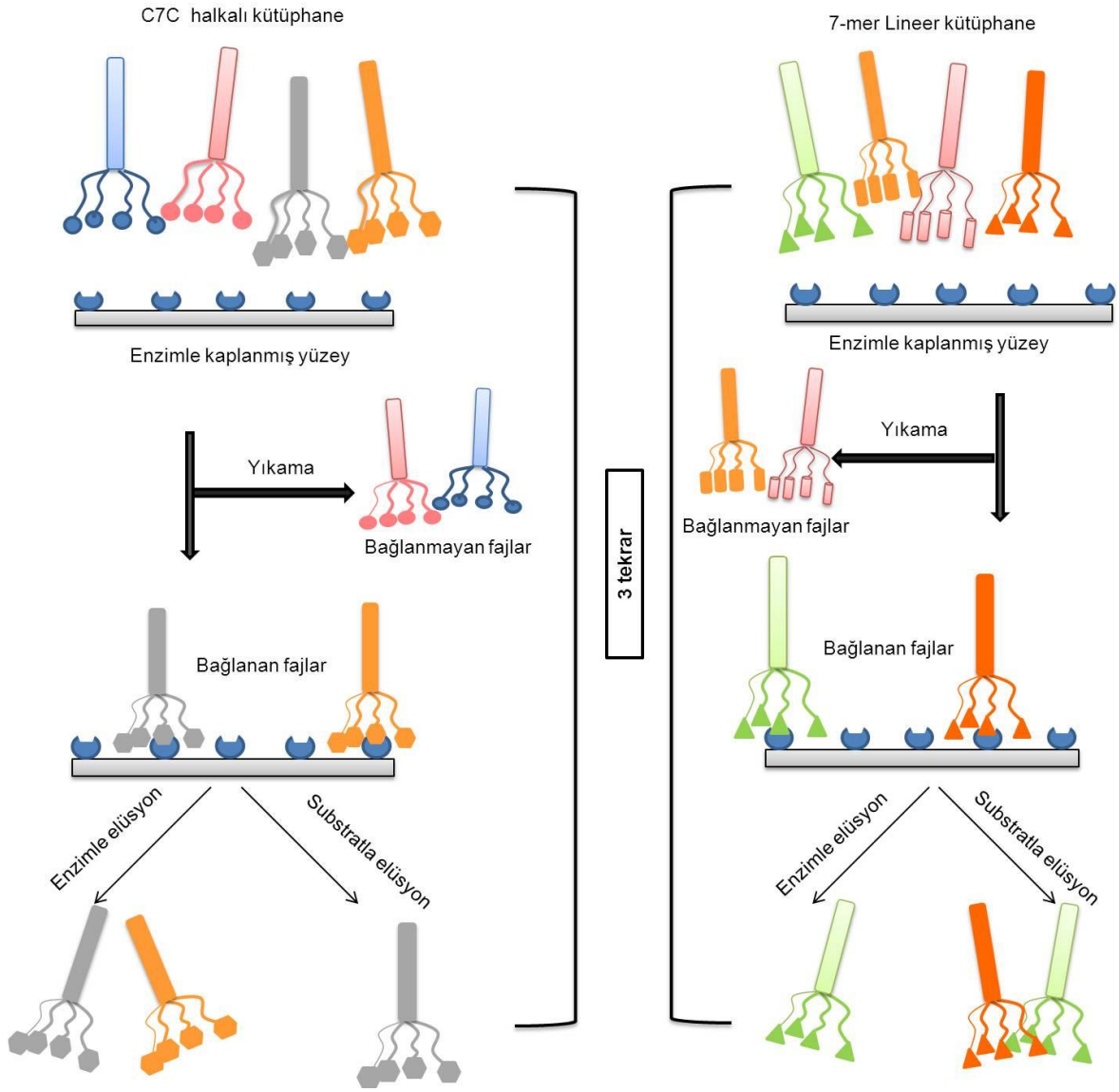
Saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir [83]. Bu amaçla TBS tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) içinde 0.5-2.0 mg/mL konsantrasyon aralığında BSA standart çözeltileri hazırlanmıştır. Polistren küvet içindeki 1 mL Bradford çözeltilerine 20 µL standart ve enzim çözeltileri eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 595 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart çözeltilerine ait absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe aktarılmış ve standart konsantrasyon eğrisi

oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak enzim çözeltilerindeki protein miktarları belirlenmiştir.

Son olarak üretilen, protein miktarları, saflık değerleri ve aktiviteleri incelenen SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimleri bir sonraki aşamada kullanılmak üzere liyofilize edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Faj Gösterim Peptid Kütüphanelerinden Faj Klonlarının Seçilmesi

SrtA_{Δ59} enzimine bağlanan faj klonlarının seçilmesi amacıyla 10⁹'dan fazla transformant bulunan ve 10¹³ pob/mL faj içeren M13 faj gösterim kütüphaneleri kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu amaçla, 7 amino asit uzunluğunda lineer ve halkalı faj gösterim kütüphanelerinden yararlanılmıştır. SrtA_{Δ59} enzim çözeltisi, derişimi 200 µg/mL olacak şekilde, 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 150 µL mikrotiter kuyucuklara eklenmiş ve 4°C'de bir gece boyunca inkübe edilerek enzimin kuyucukların yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Enzim çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklar tamamen bloklama tamponu (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/mL BSA) ile doldurulmuş ve 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bloklama çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar altı defa hacimce % 0.1 Tween 20 içeren TBS tamponuyla (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) yıkanmıştır. Faj kütüphanelerinden alınan 10 µL çözelti TBS tamponuyla 100 µL'ye tamamlanarak kuyucuklara eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca düşük hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Bağlanmayan fajlar kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 10 defa Tween 20 içeren TBS tamponuyla yıkanmıştır. SrtA_{Δ59} enzimine bağlanan fajların geri kazanılması amacıyla 2 farklı yöntem uygulanmıştır. Bunlardan ilkinde, kuyucuklara 150 µL SrtA_{Δ59} enzim çözeltisi (200 µg/mL) eklenmiş ve kuyucuklar 1 saat boyunca düşük hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Böylece SrtA_{Δ59} enzimine afinite gösteren fajların yarışmalı olarak serbest SrtA_{Δ59} enzimine bağlanması hedeflenmiştir. İnkübasyon sonunda çözelti kuyucuklardan alınmıştır. İkinci yöntemde ise kuyucuklara 150 µL SrtA_{Δ59} substrat çözeltisi (1.5 mg/mL) eklenmiş ve kuyucuklar 30 dakika boyunca düşük hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Bu şekilde enzimin aktif merkezine afinite gösteren fajların geri kazanılması hedeflenmiştir. İnkübasyon sonunda çözelti kuyucuklardan alınmıştır.



Şekil 3.1. Faj gösterim peptit kütüphanelerinden fajların seçilmesi

Kuyucuklardan alınan fajların titreleri *E. coli* kültürü kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 200 μ L *E. coli* kültürü 5 mL LB sıvı besiyerine ekilmiş ve optik yoğunluğu 0.5'e ulaşana kadar 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 200 μ L *E. coli* kültürü alınmış ve 10 μ L seri dilüsyonları hazırlanmış faj çözeltileriyle karıştırılarak 5 dakika inkübe edilmiştir. Karışım, eritilerek 45°C'de bekletilen 3 mL LB katı besiyerine eklenerek karıştırılmış ve petrideki IPTG ve X-gal içeren LB katı besiyerlerine dökülmüştür. Besiyerleri 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmış ve petrielerde oluşan mavi plaklar sayılmıştır.

İlk döngüde seçilen fajlar bir sonraki döngüde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır. Bu amaçla, 200 μ L *E. coli* kültürü ve faj çözeltileri karıştırılarak birkaç dakika inkübe

edilmiştir. Daha sonra karışım 20 mL LB sıvı besiyerlerine eklenmiş ve 37°C'de 5 saat karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler santrifüj tüplerine alınmış ve 12000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda supernatant temiz bir santrifüj tüpüne alınarak tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemlerinin ardından supernatant alınmış ve içerisine 3.3 mL % 20'lik (a/h) PEG-8000 ve 2.5 M NaCl içeren çözelti eklenerek 4°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Sonrasında çözeltiler 12000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Santrifüj tüpünde kalan peletler 1 mL TBS tamponunda çözdürülmüş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra supernatant alınarak içerisine 180 µL PEG çözeltisi eklenmiş ve 0°C'de 1 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda çözeltiler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant atılmıştır. Elde edilen peletler 200 µL TBS tamponuyla çözdürülmüş ve bir önceki aşamada anlatıldığı gibi faj titreleri belirlenmiştir.

Birinci döngüden seçilen ve çoğaltılan fajlar sonraki seçim döngüsünde kullanılmıştır. Diğer seçim döngülerinde de ilk döngüdeki işlemler uygulanmıştır. İlkinden farklı olarak, diğer seçim döngülerinde enzime en yüksek afinite gösteren fajların seçilmesi amacıyla yıkama çözeltisindeki Tween 20 miktarı % 0.1'den 0.5'e çıkarılmıştır. Seçim işlemi üç döngü halinde uygulanmış ve seçim aşamasında iki farklı kütüphane ve iki farklı elüsyon yöntemi kullanılmasıyla dört farklı faj çözeltisi elde edilmiştir.

Seçim işlemlerinin ardından üçüncü döngü sonunda elde edilen faj çözeltilerinden faj klonları izole edilmiştir. Bu amaçla, son döngüden elde edilen faj çözeltilerinin dilüsyonları hazırlanarak 200 µL *E. coli* kültürü ile karıştırılmış ve 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri ve faj karışımları, 45°C'de bekletilen 3 mL LB katı besiyerine eklenmiş ve IPTG ve X-gal içeren LB katı besiyerlerine dökülmüştür. Petriler 37°C'de 1 gece inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda petrilerde oluşan mavi plaklardan rastgele plak seçimi yapılmıştır. Seçilen plaklar 500 µL LB sıvı besiyerlerine alınmış ve faj klonlarının besiyerine geçmesi amacıyla 15 µL *E. coli* kültürü eklenerek 37°C'de 4.5 saat karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözeltiler santrifüj edilerek fajları içeren supernatant alınmıştır. Herbir faj klonuna ait faj çözeltileri, titrelerinin arttırılması amacıyla önceki aşamalarda anlatıldığı gibi *E. coli* kültürü ile çoğaltılmış ve titreleri belirlenmiştir.

3.2.5. Seçilen Faj Klonlarının SrtA_{Δ59} Enzimi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Faj kütüphanelerinden seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Floresans Spektrofotometre kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler esnasında PMT voltajı 600 volt, uyarma dalgaboyu 320 nm, emisyon dalga boyu 420 nm ve slit açıklıkları uyarma için 10 nm ve emisyon için 20 nm olarak ayarlanmıştır. Aktivite ölçümleri için, TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) hazırlanmış 360 µg/mL SrtA_{Δ59} enzim çözeltisinden 15 µL alınarak titresini yaklaşık 10¹³ pob/mL olan 10 µL faj çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında düşük karıştırma hızında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışımdan 20 µL alınarak 60 µL TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) hazırlanmış 83.33 µM substrat çözeltisi ile karıştırılmış ve quartz mikro küvete alınmıştır. Ölçümler 4 dakika zaman aralığında 0.2 dakikada bir alınmış ve çözeltideki floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir.

3.2.6. Fajlara Ait DNA Diziliminin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi ölçümleri sonucunda SrtA_{Δ59} enzim aktivitesinde azalmaya neden olan faj klonlarının değişken bölge DNA dizilimleri belirlenmiştir. İnhibitör etki gösteren faj klonlarının DNA dizilimleri Genscript (Ipswich, A.B.D.) firması tarafından belirlenmiştir. Bu amaçla New England Biolabs Inc. firmasından (Ipswich, A.B.D.) sağlanan -96 gIII primer (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') kullanılmıştır. Belirlenen DNA dizilimlerinden kodladıkları peptit dizilimleri saptanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

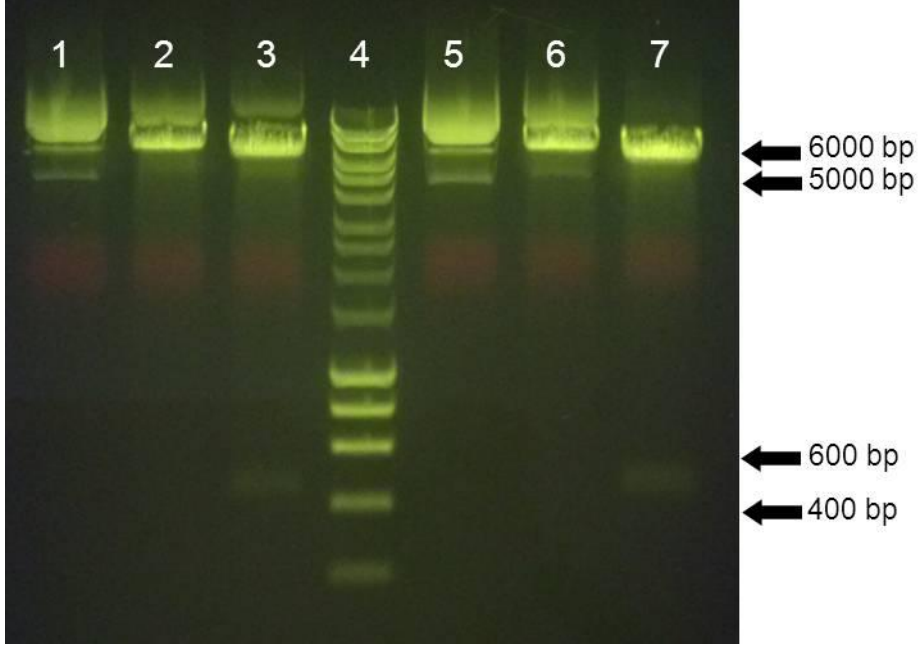
4.1. Ekspresyon Vektörlerinin Elde Edilmesi

Çalışmada ekspresyon vektörü olarak SrtA_{Δ59} genini kodlayan #51138 plazmidi ve mutant-SrtA_{Δ59} genini kodlayan #51141 plazmidi kullanılmıştır. Her iki plazmid de kanamisin rezistansı ve T7 promotera sahip olup hekza-histidin etiketini bulundurmaktadır. Plazmidlerdeki enzimi kodlayan gen segmentlerinin varlığının ortaya konması amacıyla izole edilen ve zenginleştirilen tek kolonilerden plazmidler izole edilmiştir. İzolasyon işlemi sonunda elde edilen plazmid DNA çözeltilerinin UV-Vis spektrofotometre ve quartz mikro küvet kullanılarak 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. 260 nm'deki absorbans değerlerinden çözeltilerin DNA konsantrasyonları, absorbans değerlerinin oranından (A_{260}/A_{280}) ise çözeltilerin saflık değerleri saptanmıştır. Ölçümler sonucunda #51138 ve #51141 plazmidlerine ait DNA konsantrasyonu sırasıyla 25-30 µg/mL olarak belirlenmiştir. Plazmid DNA'lara ait A_{260}/A_{280} değerleri ise #51138 için 1.4 ve #51141 için 1.7 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ileriki aşamalarda kullanılabilir saflıkta ve miktarda DNA izolasyonu yapıldığı görülmüştür.

Elde edilen plazmidler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek analiz edilmiştir. Bu amaçla, #51138 plazmidi için NdeI ve BamHI enzimleri, #51141 plazmidi için NdeI ve XhoI enzimleri kullanılmıştır. Reaksiyon sonucunda her iki plazmide ait DNA fragmentlerini içeren çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen çözeltilerdeki kesim fragmentlerinin büyüklükleri agaroz jel elektroforez sistemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Jelde sıralanan DNA fragmentlerinin boyutları, standart DNA belirteci ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Jel görüntüsü incelendiğinde; hem #51138 hem de #51141 plazmidine ait tek restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen çözeltide yaklaşık 5900 bp büyüklüğünde moleküler ağırlığa sahip DNA fragmentleri görülmüştür. #51138 plazmidinin toplam vektör büyüklüğü 5933 bp [84], #51141 plazmidi için ise vektör büyüklüğü 5892 bp [85] olarak verilmiştir. Çift restriksiyon enzimi ile etkileştirildiğinde vektörlere ait bantların moleküler ağırlığının azaldığı ve 400-600 bp aralığında enzimi kodlayan gen segmentlerine ait bantların oluştuğu gözlenmiştir. #51138 plazmidindeki enzimi kodlayan gen segmentinin büyüklüğü 564 bp [84], #51141 plazmidi için ise bu değer 471 bp olarak verilmiştir [85]. DNA

fragmentlerine ait bantlar incelendiğinde, jel elektroforez analizi sonucunda vektörlere ait DNA fragmentinin ve enzimi kodlayan gen segmentinin büyüklüklerinin verilen değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Plazmidlere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) #51138 plazmidi, 2) NdeI enzimi ile etkileştirilen #51138 plazmidi, 3) NdeI ve BamHI enzimleri ile etkileştirilen #51138 plazmidi, 4) DNA belirteci, 5) #51141 plazmidi, 6) NdeI enzimi ile etkileştirilen #51141 plazmidi, 7) NdeI ve XhoI enzimleri ile etkileştirilen #51141 plazmidi.

Ayrıca, #51138 plazmidi için enzimi kodlayan gen segmentinin DNA diziliminin belirlenmesi amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. GenScript firması tarafından T7 primeri kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda izole edilen plazmidin enzimi kodlayan bölgesinin dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen dizilim *S. aureus* SrtA_{Δ59} gen dizilimi [79] ile karşılaştırılmıştır. NCBI BLASTN programı kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucunda iki dizilimin %100 benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.2).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
942 bits(510)	0.0	510/510(100%)	0/510(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAGAGGCAGCAGC	catcatcatcatcatca	CAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGC	60
Sbjct 56	ATGAGAGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGC			115
Query 61	CATATGCAAGCTAAACCTCAAATTCGAAAGATAAAATCGAAAGTGGCAGGCTATATTGAA			120
Sbjct 116	CATATGCAAGCTAAACCTCAAATTCGAAAGATAAAATCGAAAGTGGCAGGCTATATTGAA			175
Query 121	ATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTA			180
Sbjct 176	ATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTA			235
Query 181	AATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATCACTAGATGATCAAATATTTCAATT			240
Sbjct 236	AATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATGAATCACTAGATGATCAAATATTTCAATT			295
Query 241	GCAGGACACACTTTTCATTGACCGTCCGAACATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAA			300
Sbjct 296	GCAGGACACACTTTTCATTGACCGTCCGAACATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAA			355
Query 301	AAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAGTTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGT			360
Sbjct 356	AAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAGTTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGT			415
Query 361	ATAAGAGATGTTAAGCCTACAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAGATAAA			420
Sbjct 416	ATAAGAGATGTTAAGCCTACAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAGATAAA			475
Query 421	CAATTAACATTAATTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTGGGAAAAACGT			480
Sbjct 476	CAATTAACATTAATTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTGGGAAAAACGT			535
Query 481	AAAACTTTGTAGCTACAGAAGTCAAATAA		510	
Sbjct 536	AAAACTTTGTAGCTACAGAAGTCAAATAA		565	

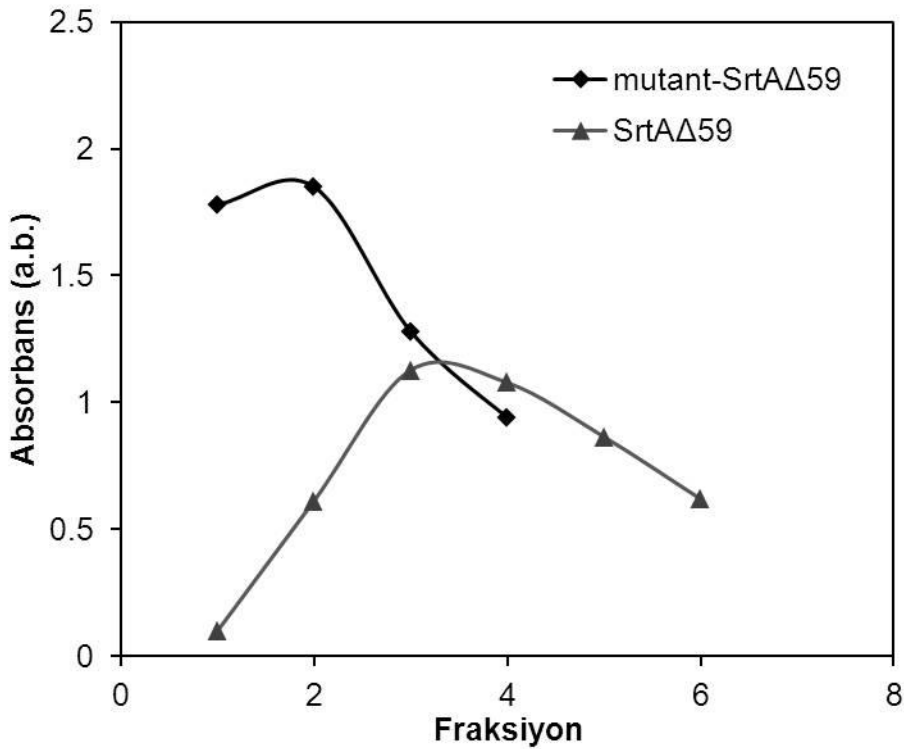
Şekil 4.2. NCBI BLASTN programı kullanılarak DNA dizilim sonuçlarının karşılaştırılması

4.2. SrtA Ekspresyonu ve Saflaştırılması

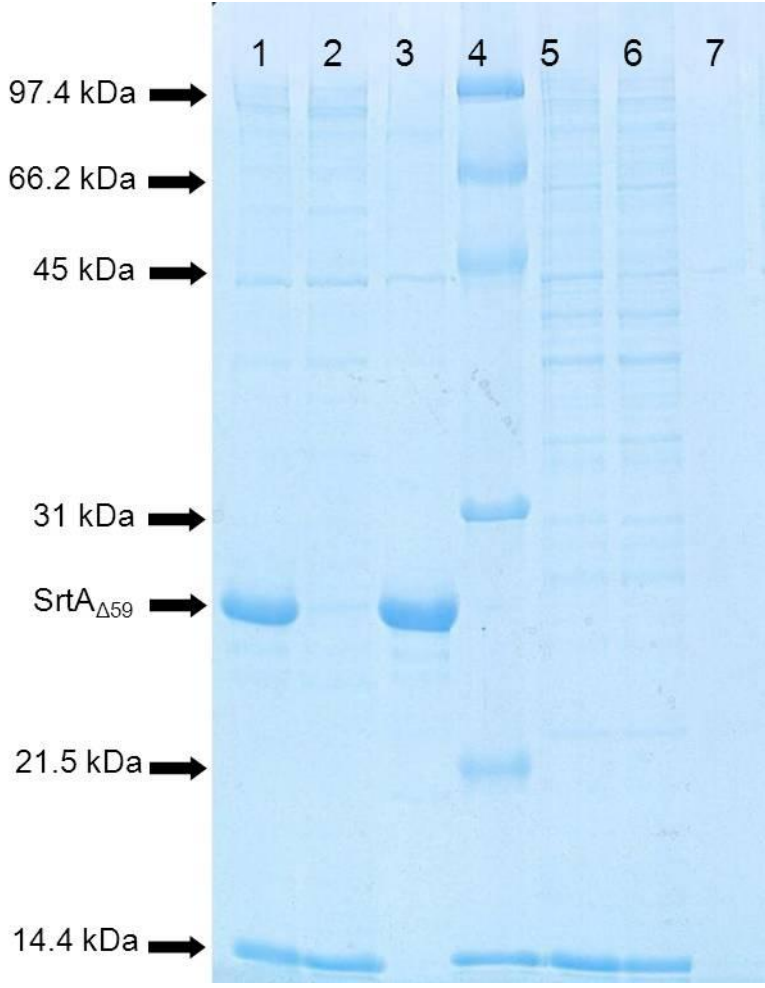
Çalışmada SrtA ekspresyonu için *E.coli* BL21 protein ekspresyon konakçısı kullanılmıştır. Önceki aşamalarda saflaştırılan ve enzimi kodlayan gen bölgelerini içeren plazmidler, kompetent halde sağlanmış *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon işleminden sonra elde edilen kültürden kanamisin içeren LB katı besiyerlerine ekim yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. T7 promotera sahip plazmidleri taşıyan hücrelerin, besiyerine IPTG eklenmesiyle SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimlerini yüksek oranda sentezlemesi sağlanmıştır. Kontrol olarak ayrılan kültüre ise IPTG ilavesi yapılmadan aynı şartlarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda kültürler santrifüj edilmiş ve çoğaltılan hücreleri içeren pelet elde edilmiştir. Sonrasında pelet lizozim içeren tamponla çözüldürülmüş ve santrifüj edilmiştir. Böylece hücreler parçalanmış ve enzimi içeren hücre lizati elde edilmiştir.

Hekza-histidin etiketine sahip SrtA Δ 59 ve mutant-SrtA Δ 59 enzimlerinin saflaştırılması Ni-afinite kolon yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimi içeren hücre lizatı kolona ilave edilmiş ve bir süre bekletilerek histidin içeren enzimlerin kolona bağlanması sağlanmıştır. İnkübasyondan sonunda yıkama tamponuyla kolona bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmış ve 1 mL hacminde yıkama fraksiyonları toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 280 nm'de absorban değerleri ölçülmüş ve 10. fraksiyonda kolondan artık protein ayrıldığı belirlenerek yıkama işlemi sonlandırılmıştır.

Daha sonra kolona bağlanan enzimler, histidin analogu olan imidazol içeren elüsyon tamponu kullanılarak kolondan ayrılmıştır. Bu aşamada 500 μ L hacminde elüsyon fraksiyonları toplanmış ve UV-Vis spektrofotometre ile 280 nm'deki absorban değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.3). Ölçümler sonunda SrtA Δ 59 enzimi için 2. ve 5. fraksiyonlar arasında yüksek absorban değeri görülmüştür. Çalışmanın bir sonraki aşamasında kullanılmak üzere bu fraksiyonlar birleştirilmiştir. Mutant-SrtA Δ 59 enzimi için ise ilk 3 fraksiyonda yüksek absorban görülmüş ve bu fraksiyonların birleştirilmiştir.



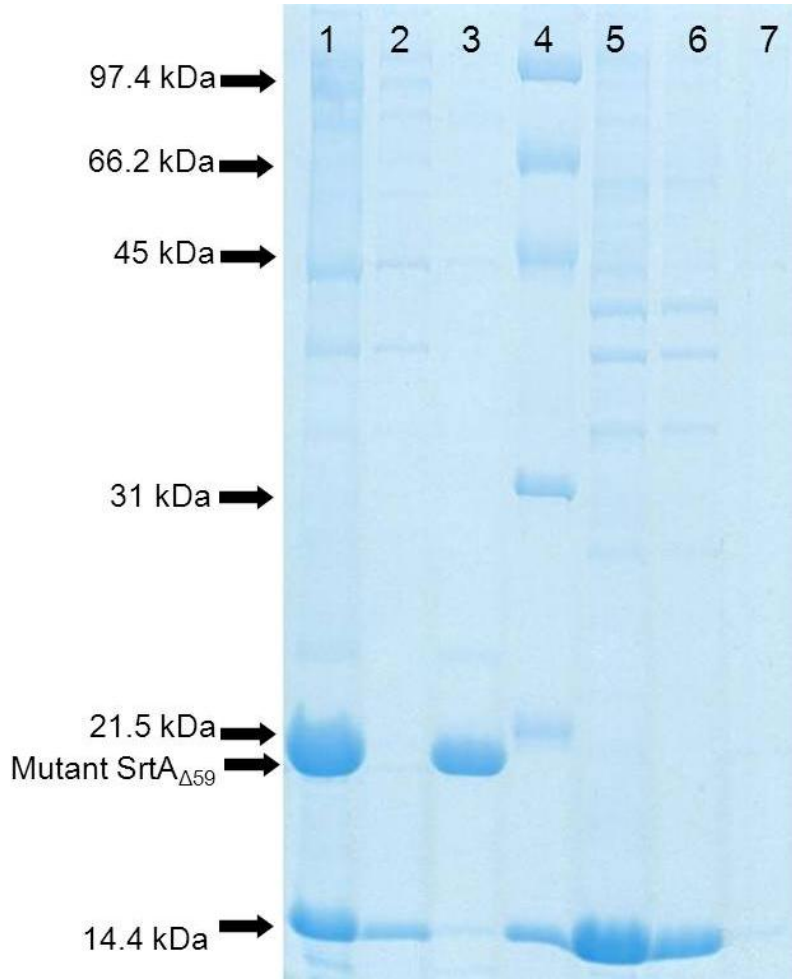
Şekil 4.3. SrtA Δ 59 ve mutant-SrtA Δ 59 enzimlerinin Ni-afinite kolonundaki elüsyon fraksiyonlarının 280 nm'deki UV-Vis spektrofotometre absorban değerleri



Şekil 4.4. #51138 plazmidinin transforme edildiği hücre lizatlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı. 1) IPTG ile indüklenen lizat, 2) IPTG ile indüklenen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında yıkama çözeltisi, 3) IPTG ile indüklenen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisi, 4) Protein belirteci, 5) Kontrol lizat, 6) Kontrol lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında yıkama çözeltisi, 7) Kontrol lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisi.

Elde edilen lizat, yıkama ve elüsyon çözeltilerinde SrtA enzimlerinin kontrolü için dikey jel elektroforez sisteminde SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. SrtA Δ 59 enzimini üreten #51138 plazmidini taşıyan IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen hücre lizatlarına ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.4'te görülmektedir. IPTG ile indüklenen lizatta yaklaşık 27 kDa ağırlığında kalın bir bant görülmüştür. Kontrol hücresine ait lizatta ise tüm diğer bantlar sabit kalırken 27 kDa bölgesindeki bandın kaybolması, bu bandın SrtA Δ 59 enzimine ait olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar SrtA Δ 59 enziminin teorik moleküler ağırlığı 17.4 kDa olsa da, SDS-PAGE analizinde 27 kDa civarında bant vermektedir. Bu durumun, denatürasyon

sırasında enzimin tam olarak primer yapıya dönmeyip değişik katlanmalar sonucu daha büyük molekül ağırlığına sahipmiş gibi jelde yavaş hareket etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, Ni-afinite saflaştırması sonrasında yıkama çözeltilisinde bu bant kaybolurken, elüsyon çözeltilisinde ise yoğun bir şekilde elde edilmesi bu bandın SrtA Δ 59 enzimine ait olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.5. #51141 plazmidinin transforme edildiği hücre lizatlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı. 1) IPTG ile indüklenen lizat, 2) IPTG ile indüklenen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında yıkama çözeltilisi, 3) IPTG ile indüklenen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltilisi, 4) Protein belirteci, 5) Kontrol lizat, 6) Kontrol lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında yıkama, 7) Kontrol lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltilisi.

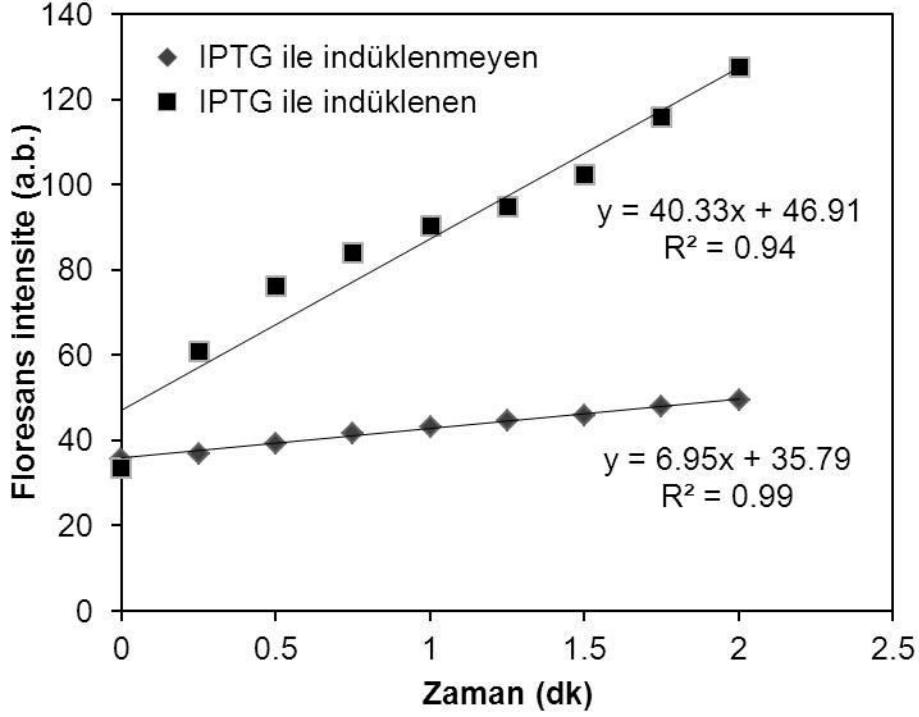
SrtA Δ 59 enziminin mutantına ait #51141 plazmidini taşıyan hücre lizatlarına ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.5'te görülmektedir. IPTG ile indüklenen lizatta yaklaşık 21 kDa ağırlığında kalın bir bant görülmüştür. Kontrol hücrelerine ait lizatta ise tüm diğer bantlar sabit kalırken 21 kDa bölgesindeki bandın kaybolması, bu

bandın mutant-SrtA_{Δ59} enzimine ait olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar SrtA_{Δ59} enzimine ait bant 27 kDa civarında görülmüş olsa da, enzim üzerinde gerçekleştirilen mutasyonlar sonucunda 21 kDa'da bant vermektedir. Bu durumun enzimdeki 7 amino asit üzerinde yapılan mutasyon sonucu proteinin farklı katlanmalar göstermesinden ve jelde hızlı ilerlediği için daha düşük molekül ağırlığında bant oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Ni-afinite saflaştırılması sırasında elde edilen yıkama çözeltilerinin SDS-PAGE jel görüntüsünde bu bant kaybolurken, elüsyon çözeltilerinde ise yoğun bir şekilde görülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde 21 kDa'da görülen bandın mutant-SrtA_{Δ59} enzimine ait olduğu doğrulanmaktadır.

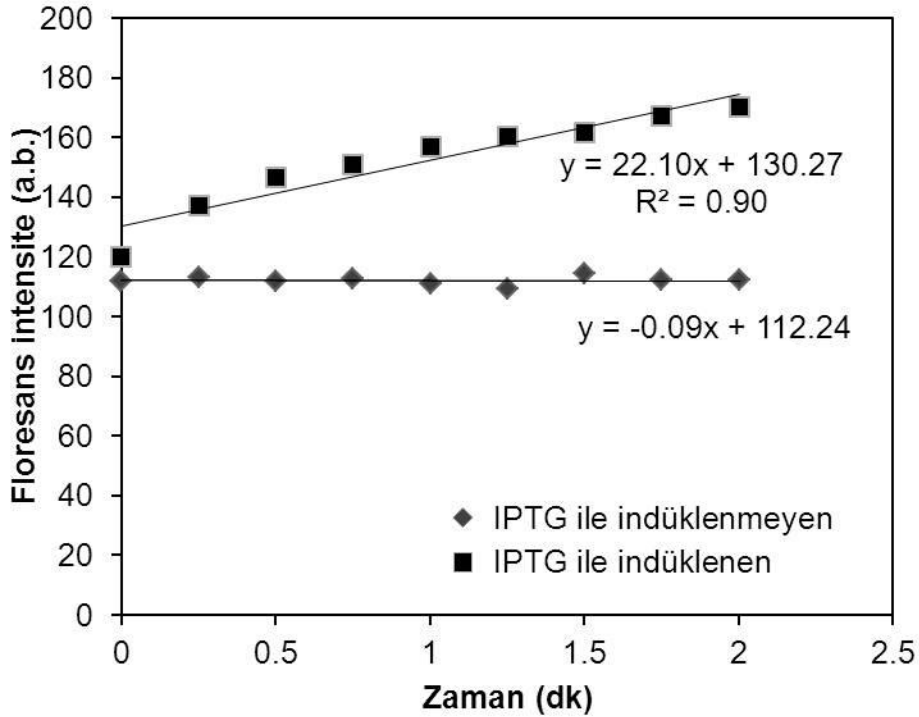
4.3. SrtA Aktivitesi Analizi

Elde edilen çözeltilerde SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimlerinin varlığının teyit edilmesi için Floresans Spektrofotometre kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SrtA enziminin florojenik özellikteki Abz-LPETG-K(Dnp)-NH₂ substratından yararlanılarak 320 nm uyarma dalgaboyu ve 420 nm emisyon dalga boyunda analiz yapılmıştır. Substrat ve protein çözeltileri quartz mikro küvette karıştırılarak reaksiyon başlatılmış ve zamana bağlı floresans şiddetindeki artış kaydedilmiştir. Birim zamanda ölçülen floresans şiddetindeki artıştan enzim aktivite değerleri hesaplanmıştır.

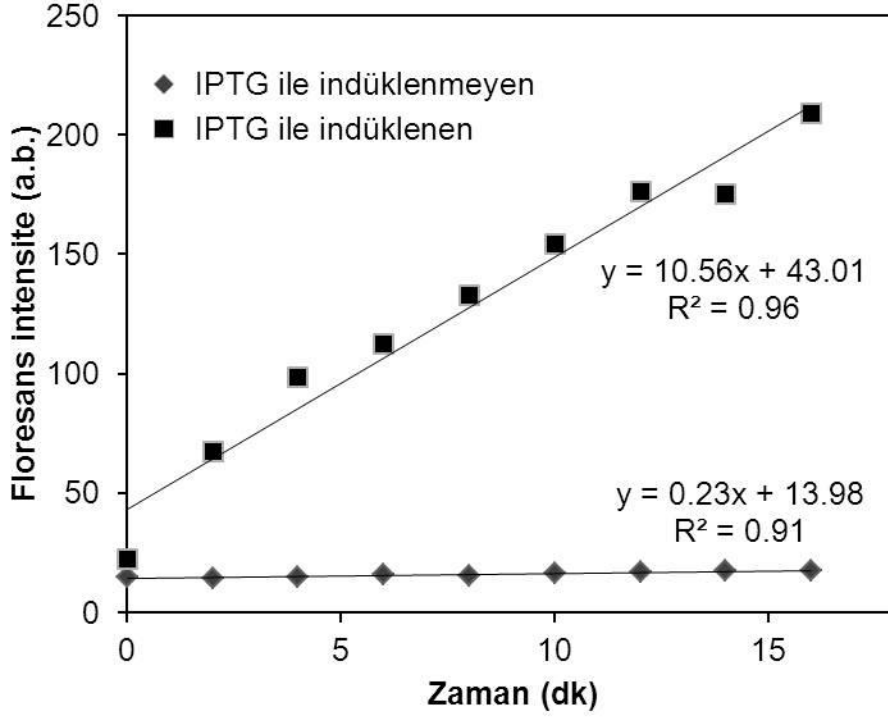
Reaksiyon hızları hesaplandığında IPTG ile indüklenen lizatta 40.33 a.b./dk ilk hız değerinde aktivite görülürken, IPTG indüksiyonu olmayan lizatta bu değer 6.95 a.b./dk olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6). Benzer şekilde, IPTG ile indüklenen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltilerinin fraksiyonunda 22.10 a.b./dk aktivite görülürken, IPTG indüksiyonu olmayan lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltilerinin fraksiyonunda aktiviteye rastlanmamıştır (Şekil 4.7). Sonuçlar değerlendirildiğinde çözeltilerdeki enzim aktivite değerlerinin SDS-PAGE analizi ile uyumlu olduğu görülmüştür.



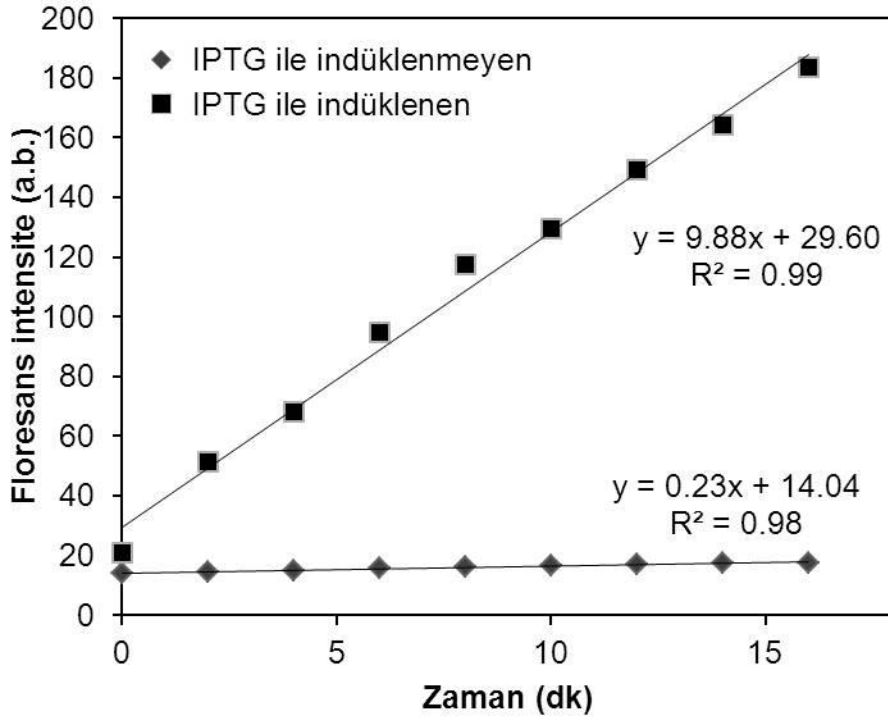
Şekil 4.6. SrtA_{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim



Şekil 4.7. SrtA_{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatın Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisinin fraksiyonlarının substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim



Şekil 4.8. Mutant-SrtA_{Δ59} enzimi için IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatin substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim



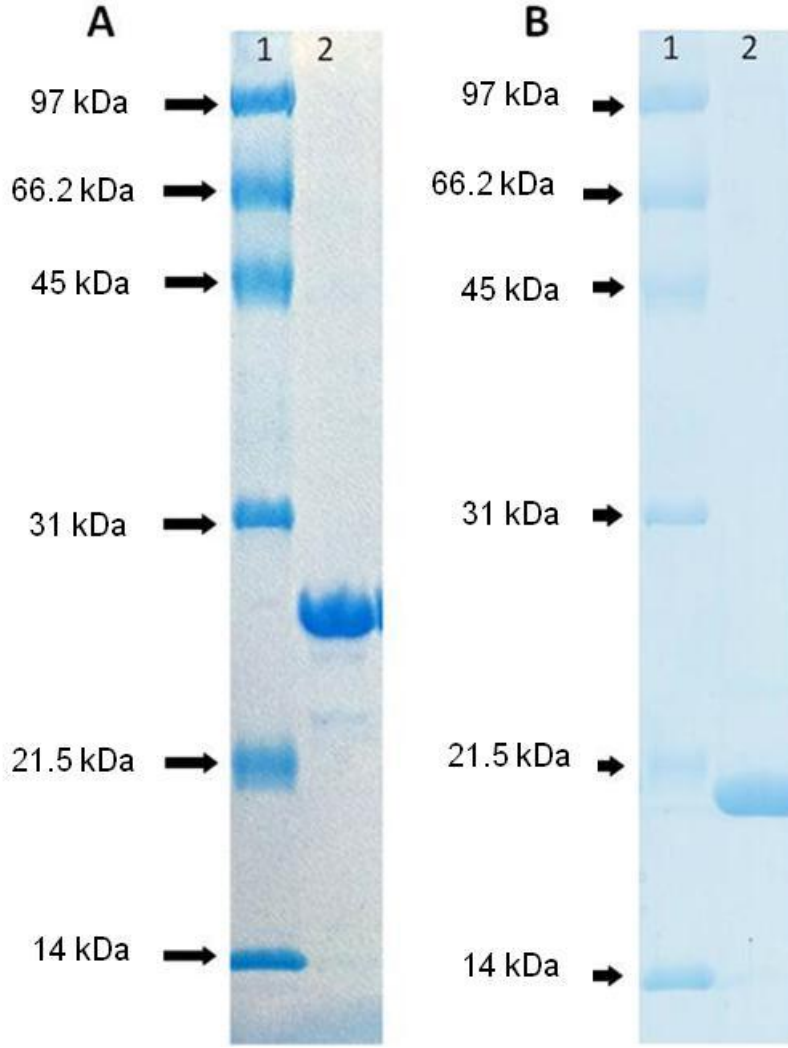
Şekil 4.9. IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen lizatin_{mutant-SrtA_{Δ59}} Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltisinin fraksiyonlarının substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim

Floresans ölçümler sonucunda mutant-SrtA Δ 59 enzimi için IPTG ile indüklenen lizatta 10.56 a.b./dk ilk hız değerinde aktivite görülürken, IPTG indüksiyonu olmayan lizatta bu değer 0.23 a.b./dk olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8). IPTG ile indüklenen ve IPTG indüksiyonu olmayan lizatların Ni-afinite saflaştırması sonrasında elüsyon çözeltilerinin fraksiyonlarında aktivite ölçümü yapıldığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.9). Elde edilen aktivite değerleri değerlendirildiğinde SDS-PAGE'de 21 kDa civarında görülen bandın mutant-SrtA Δ 59 enzimine ait olduğu doğrulanmıştır.

4.4. Üretilen ve Saflaştırılan SrtA Enzimlerinin Karakterizasyonu

SDS-PAGE ve enzim aktivitesi analizleriyle SrtA Δ 59 ve mutant-SrtA Δ 59 enzim varlığı doğrulanan elüsyon çözeltileri, içeriğindeki fazla imidazolün uzaklaştırılması amacıyla diyaliz edilmiştir. Bu amaçla çözeltiler, selüloz membran içine konarak karıştırmalı ortamda bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonunda elüsyon çözeltilerinden 14 kDa molekül ağırlığından küçük bileşenlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

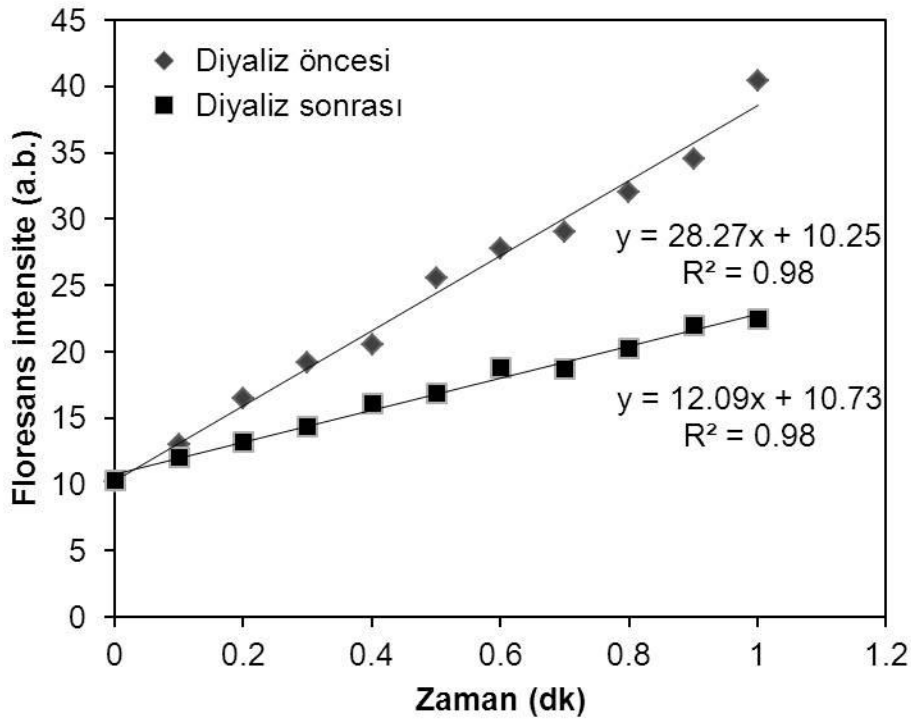
Diyaliz işlemiyle saflığı artırılan enzim çözeltileri SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve çözeltilerin saflık değerleri belirlenmiştir. Elektroforez işlemi sonunda elde edilen jel görüntüleri (Şekil 4.10), GelQuant.NET programı ile incelenmiş ve enzimlere ait bantların intensiteleri diğer bantlarla karşılaştırılarak saflık değerleri belirlenmiştir. Diyaliz işlemi sonucunda %93 saflıkta SrtA Δ 59 enzimi ve %90'nın üzerinde saflık değerine sahip mutant-SrtA Δ 59 enzimi elde edilmiştir. Üretilen enzimlerin her ikisi de yüksek oranda saflık değerine sahip olduğundan ilave bir saflaştırma işlemi gerçekleştirilmemiştir.



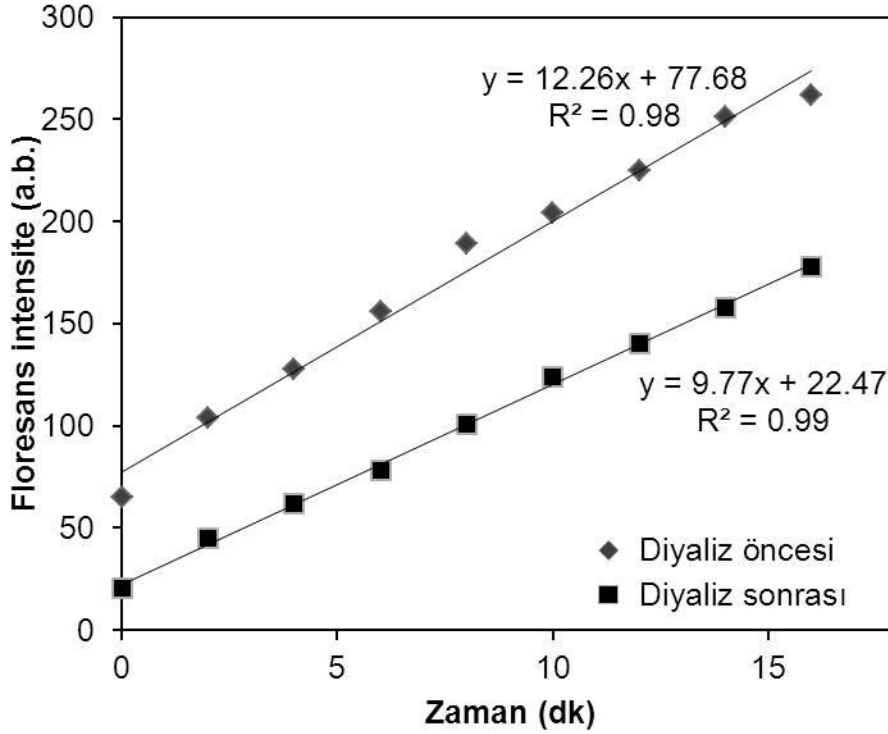
Şekil 4.10 Diyaliz sonrası enzim çözeltilerine ait SDS-PAGE elektroforegramı. A) 1; Protein belirteci, 2; Diyaliz sonrası SrtA Δ 59 enzim çözeltisi, B) 1; Protein belirteci, 2; Diyaliz sonrası mutant-SrtA Δ 59 enzim çözeltisi.

Saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla Bradford çözeltisi ve standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Standart protein çözeltileri ve saflaştırılan enzim çözeltileri Bradford çözeltisi ile karıştırılarak inkübe edilmiştir. UV-Vis spektrofotometre ile 595 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiş ve standart çözeltilere ait absorbans değerleri, konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe aktarılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak saflaştırılan enzim çözeltilerinin protein miktarları hesaplanmıştır. Ölçümler sonucunda SrtA Δ 59 enziminin protein konsantrasyonu 1.48 mg/mL olarak bulunurken, mutant-SrtA Δ 59 enziminin konsantrasyonu 2.34 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Saflaştırılan ve protein miktarları belirlenen enzim çözeltilerinin enzim aktivitesi değerlerinin belirlenmesi amacıyla Floresans Spektrofotometre ile enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Saflaştırılan enzim çözeltilerinin diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde SrtA_{Δ59} enziminin aktivitesinde diyaliz aşamasında önemli bir aktivite kaybı olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Protein miktarında önemli bir değişim olmamasına karşın aktivitede değişim görülmesi diyaliz öncesi ortamda yüksek miktarda bulunan imidazolün etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu durumun, imidazol içeren tamponların protein çözünürlüğünü arttırmasından kaynaklanabileceği gibi [86] imidazolün SrtA enziminin aktif bölgesindeki sistein (Cys) amino asitiyle etkileşime girerek [75] aktiviteyi arttırmasından da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak aynı durum mutant-SrtA_{Δ59} enzimde gözlenmemiş ve diyaliz sonrası aktivitede çok az bir azalış gözlenmiştir (Şekil 4.12). Mutant enzimin çözünürlüğünün daha yüksek olması ve aktif bölgesinde meydana gelen değişimlerden ötürü imidazol varlığından daha az etkilendiği düşünülmektedir.



Şekil 4.11. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası SrtA_{Δ59} enziminin substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim



Şekil 4.12. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası mutant-SrtA_{Δ59} enziminin substrat ile etkileşimi sonucu floresans şiddetindeki değişim

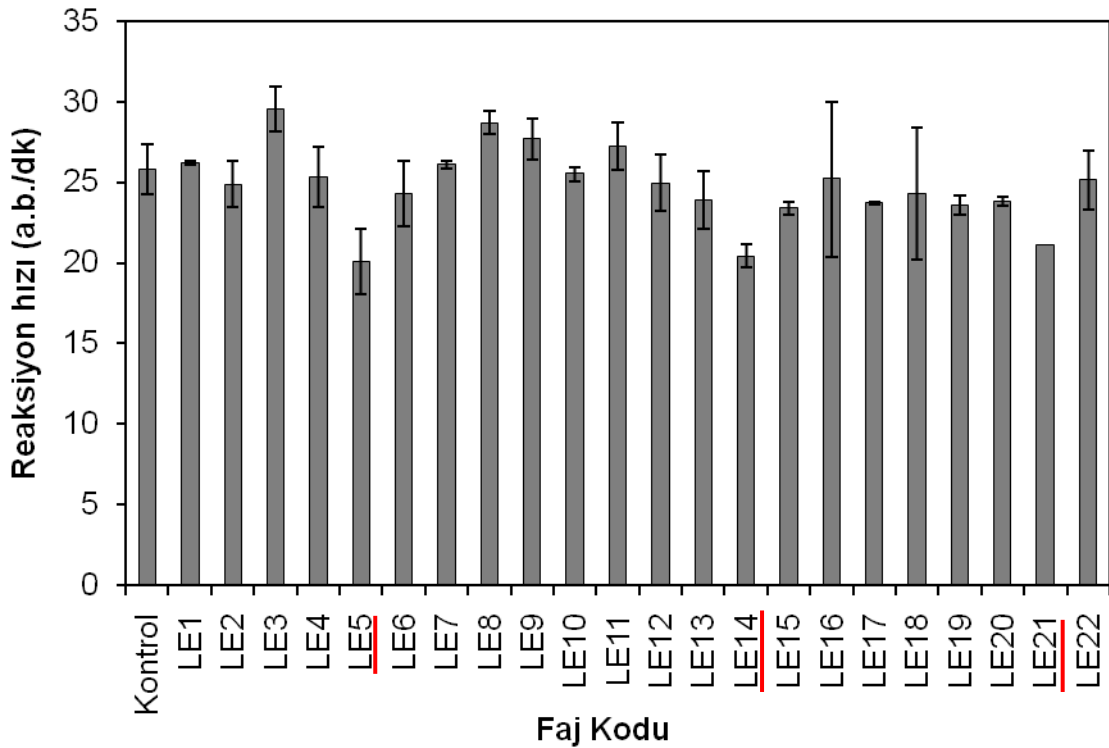
Son olarak üretilen, protein miktarları, saflık değerleri ve aktiviteleri incelenen SrtA_{Δ59} ve mutant-SrtA_{Δ59} enzimleri projenin bir sonraki aşamasında kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir.

4.5. Faj Gösterim Peptit Kütüphaneleri Kullanılarak Seçilen Faj Klonlarının SrtA_{Δ59} Enzimi Üzerindeki Etkileri

Çalışmada SrtA_{Δ59} enzimine bağlanan faj klonlarının seçilmesi amacıyla 7-mer lineer ve halkalı faj gösterim peptit kütüphaneleri kullanılmıştır. SrtA_{Δ59} enzimi kuyucuklara immobilize edildikten sonra faj gösterim kütüphaneleriyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bağlanmayan fajların uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından SrtA_{Δ59} enzimine bağlanan fajları geri kazanmak için iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk olarak kuyucuklara serbest SrtA_{Δ59} enzimi gönderilmiş ve inkübasyon sonunda enzime afinite gösteren fajların yarışmalı olarak geri kazanılması sağlanmıştır. İkinci yöntemde ise enzimin aktif merkezine afinite gösteren fajların geri kazanılması amacıyla kuyucuklara SrtA_{Δ59} substratı gönderilmiş ve inkübasyon sonucunda bağlanan fajlar geri kazanılmıştır. Enzime en yüksek afinite gösteren fajların seçilmesi amacıyla seçim döngüleri üç defa uygulanmış ve yıkama işlemlerinin zorluğu artırılmıştır. Üçüncü seçim

döngüsünün sonunda iki farklı peptit kütüphanesinin kullanılmasıyla ve iki farklı geri kazanım yönteminin uygulanmasıyla dört farklı faj çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen faj çözeltilerinden rastgele plaklar seçilmiştir. Seçim işlemlerinin sonucunda 7-mer lineer faj gösterim kütüphanesinden serbest enzimle elüsyon yöntemiyle 22, substratla elüsyon yöntemiyle 21 faj klonu izole edilmiştir. Halkalı faj gösterim kütüphanesinden ise serbest enzimle elüsyon yöntemiyle 22, substratla elüsyon yöntemiyle 23 faj klonu izole edilmiştir. İzole edilen faj klonları *E. coli* kültürü ile çoğaltılmış ve titreleri belirlenmiştir.

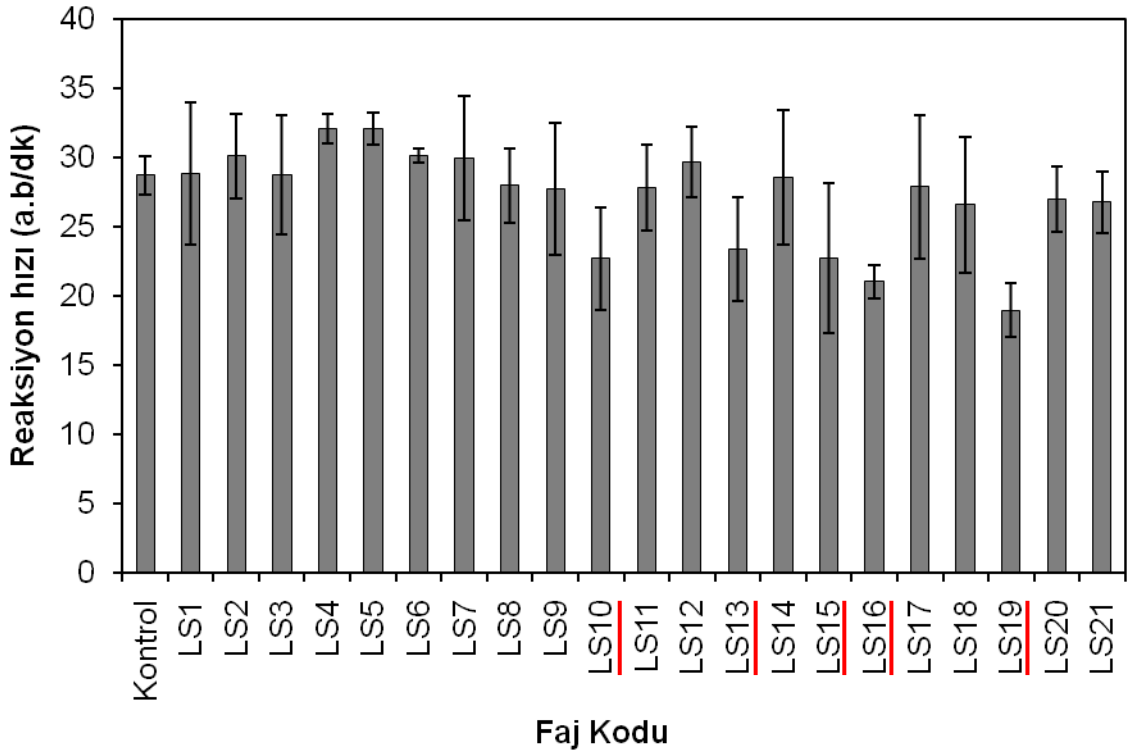
Seçim döngüleri sonunda izole edilen faj klonlarının SrtA aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Floresans Spektrofotometre kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, SrtA_{Δ59} enzim çözeltisi izole edilen faj klonlarını içeren çözelti ile inkübe edilmiştir. Reaksiyon hızları ilk 4 dakikada birim zamanda floresans şiddetindeki artıştan hesaplanmıştır. Kontrol olarak faj içermeyen tampon çözeltisi SrtA çözeltisi ile inkübe edilmiş ve reaksiyon hızı belirlenmiştir. Lineer peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemiyle seçilen faj klonlarının SrtA aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.13'te görülmektedir.



Şekil 4.13. Lineer peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri

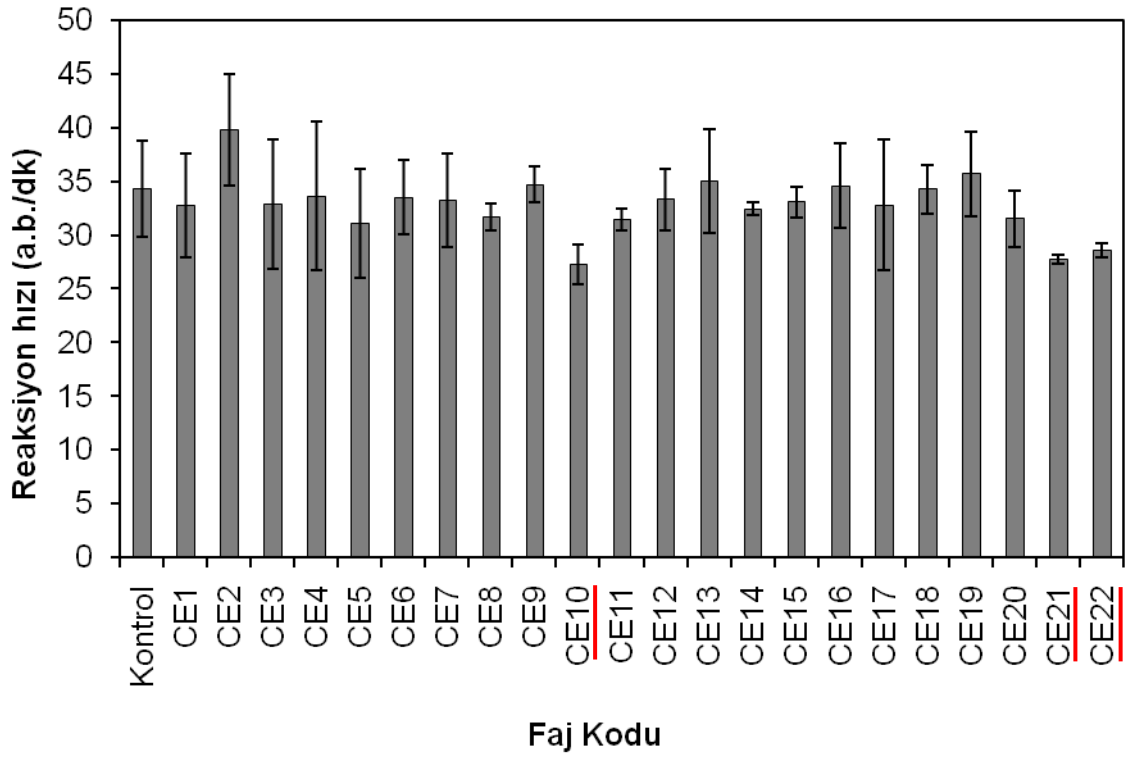
Lineer peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen ve izole edilen 22 faj klonundan 3 tanesi, SrtA aktivitesinde düşüğe neden olmuştur. Geriye kalan 19 faj klonunda enzim aktivitesinde kayda değer bir değişim görülmemiştir. En yüksek inhibisyona neden olan LE5 kodlu faj klonu SrtA aktivitesini yaklaşık %20 oranında düşürmüştür.

Lineer peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemiyle seçilen faj klonlarının SrtA aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.14'te verilmiştir. İzole edilen 21 faj klonundan beşi belirgin biçimde SrtA inhibisyonuna neden olmuştur. LS19 kodlu faj klonu enzim aktivitesinde %30 oranında inhibisyon etkisi göstermiştir.

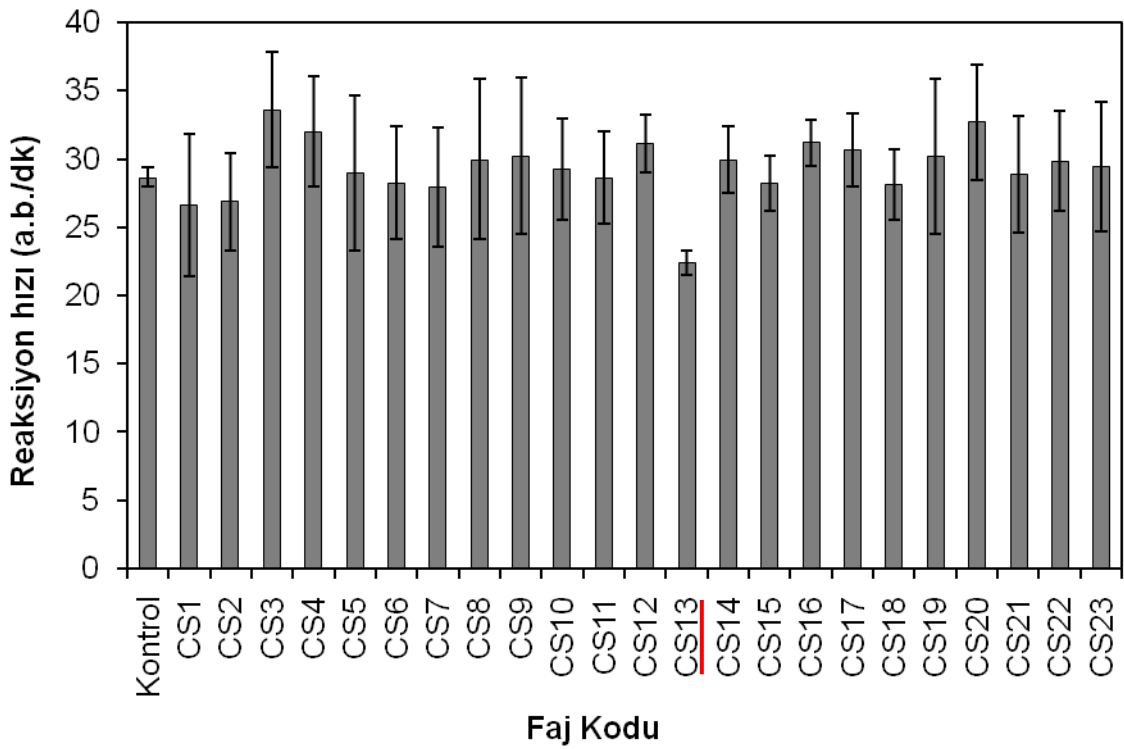


Şekil 4.14. Lineer peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri

Halkalı peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemiyle seçilen faj klonlarından 22 tanesi izole edilmiş ve SrtA aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.15). Bu faj klonlarından üç tanesinde yaklaşık %20 oranında inhibisyon etkisine rastlanmıştır.



Şekil 4.15. Halkalı peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.16. Halkalı peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemi ile seçilen faj klonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri

Halkalı peptit kütüphanesinden substrat elüsyon yöntemiyle seçilen 23 faj klonunda önemli bir inhibisyon etkisi görülmemiştir (Şekil 4.16). Bu faj klonları arasında yalnızca CS13 kodlu faj SrtA aktivitesinde yaklaşık %20 azalışa neden olmuştur. Seçim döngülerinden elde edilen lineer peptit kütüphanesinden seçilen LE5, LE14, LE21, LS10, LS13, LS15, LS16, LS19 kodlu fajlar ve halkalı peptit kütüphanesinden seçilen CE10, CE21, CE22 ve CS13 kodlu faj klonları DNA dizilimlerinin belirlenmesi için seçilmiştir.

4.6. Seçilen Faj Klonlarına Ait DNA Dizilimleri

SrtA aktivitesinde inhibisyona neden olan 12 faj klonunun değişken bölge nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. Seçilen faj klonları arasında LE14, LS13, LS15 kodlu fajların değişken bölge DNA dizilimi saptanamamıştır. Lineer peptit kütüphanesinden enzim elüsyon yöntemi ile seçilen LE5 ve LE21 kodlu faj klonlarının yanı sıra, aynı kütüphaneden substrat elüsyon yöntemi ile seçilen LS10, LS16 ve LS19 fajları aynı DNA dizilimini göstermişlerdir. Dizi analizi sonucunda toplamda 6 farklı peptit dizilimi elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. SrtA aktivitesinde azalışa neden olan faj klonlarının değişken bölge peptit dizilimleri

Faj Kodu	Peptit dizilimi
LE5, LE21	^N TESAPTL ^C
LS10, LS16, LS19	^N WSIDHVG ^C
LE14, LS13, LS15	-
CE10	ACNWMINKEC
CE21	ACNDITQNHG
CE22	ACEWAGPWTC
CS13	ACELPWAQTC

Elde edilen 6 farklı peptit dizilimi incelendiğinde, birbiri arasında sekans benzerliği olmadığı görülmüştür. Ancak belirlenen peptit dizilimlerinin hemen hemen hepsinde triptofan (W) ve treonin (T) amino asitlerinin olduğu ve bazı peptitlerde kendi içinde tekrar ettiği saptanmıştır.

5. YORUM

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı bakteriler çeşitli yollarla antibiyotik direnç mekanizması geliştirmektedir. İnsan, çevre, mikrobiyal etkenler vb. sebeplerle son yıllarda hızlanarak küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnç sorunu, tedavi süresini uzattığı hatta bazı durumlarda ölümlere yol açtığı için insan sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve ilaç tasarımı bilimsel açıdan önemli bir çalışma konusudur. Bakterilerin büyük çoğunluğunun antibiyotiklere dirençli hale gelmesi, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde farklı yaklaşımları gerektirmiştir. Bu noktada, tüm Gram-pozitif bakterilerde korunan, özellikle gıda kaynaklı hastalıkların oluşmasında büyük role sahip *S. aureus* bakterisinde bulunan Sortaz A (SrtA) enzimi antibiyotik geliştirilmesinde kullanılabilecek potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Bu amaçla, son yıllarda SrtA enzimine karşı inhibitör geliştirilmesi konusunda bir çok çalışma gerçekleştirilmiş olup kimyasal ve peptid yapısında inhibitörler geliştirilmiştir. Ancak, SrtA'ya karşı yüksek afiniteye sahip ve daha seçici inhibitör geliştirilmesi hala önemini koruyan bir çalışma konusudur.

Bu nedenle çalışmada SrtA enzimine karşı yüksek seçicilikte ve afiniteye inhibitör geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı enzimlere karşı aktivatör ve inhibitör geliştirilmesinde başarıyla uygulanan faj gösterim tekniğinden yararlanılmıştır. Tez kapsamında, yüksek çeşitlilikte peptidin faj yüzeyine ekspresyonu ile oluşturulmuş faj gösterim peptid kütüphaneleri kullanılarak SrtA enzimine bağlanan ve enzimi inhibe eden fajların seçilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, öncelikle çalışmada kullanılacak hedef enzim olan SrtA'nın rekombinant olarak eldesi gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında, SrtA Δ 59 ve mutant-SrtA Δ 59 genlerini kodlayan plazmidlerin *E. coli* hücrelerine aktarılırlararak IPTG ile indüklenmesiyle bu enzimler üretilmiş ve Ni-afinite kolonuyla saflaştırma ve diyaliz işlemleri sonunda enzim çözeltileri elde edilmiştir. Üretilen ve saflaştırılan enzim çözeltileri SDS-PAGE'de görüntülenmiş ve aktivite ölçümleriyle de enzimlerin varlığı doğrulanmıştır. Saflaştırma işlemlerinin sonunda %90'ın üzerinde saflıkta, 1.48 mg/mL konsantrasyonunda SrtA Δ 59 ve 2.34 mg/mL konsantrasyonunda mutant-SrtA Δ 59 enzimleri elde edilmiştir. Sortaz enzimleri, Gram-pozitif bakterilerin virülanslık ve adhezyon özelliklerinin incelendiği

çalışmaların yanı sıra, transpeptidasyon fonksiyonu sayesinde peptitlerin ligasyon ve siklizasyonu için de kullanılmaktadır [87, 88]. Kimyasal siklizasyonun aksine, SrtA enzimi kullanıldığında reaksiyon verimi büyük oranda artmaktadır [87]. SrtA enzimi ticari olarak çok az sayıda firma tarafından sağlanmakta olup maliyeti oldukça yüksektir. Bu noktada, terapötik öneme sahip bu enzimin tez kapsamında üretilmesi ve saflaştırılması kazanılan bilimsel altyapının yanı sıra ekonomik açıdan da büyük önem taşımaktadır.

Tezin ilk aşamasında başarılı bir şekilde üretilip saflaştırılan SrtA_{Δ59} enzimi, ikinci aşamada faj gösterim peptit kütüphanelerinden fajların seğıilmesinde hedef enzim olarak kullanılmıştır. Bu aşamada 7 amino asit uzunluğundaki lineer ve halkalı peptit kütüphaneleri kullanılarak hem farklı dizilimlerde hem de farklı konformasyonlarda peptitleri taşıyan milyonlarca faj arasından hedef enzime en iyi bağlanan fajların seğıilmesi hedeflenmiştir. Bağlanan fajların geri kazanımı sırasında iki farklı elüsyon yöntemi kullanılarak enzime farklı bölgelerinden bağlanan fajların elüsyonu sağlanmıştır. İlk yöntemde ortama serbest SrtA enzimi gönderilerek immobilize enzime bağlanan fajların yarışmalı olarak serbest SrtA enzimine bağlanarak geri kazanılması amaçlanmıştır. Bu yöntem kullanılarak 3 döngü şeklinde uygulanan seğıilim işlemi sonunda, lineer peptit kütüphanesinden 22 ve halkalı peptit kütüphanesinden de 22 olmak üzere toplamda 44 faj klonunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci elüsyon yönteminde ise ortama serbest SrtA substratı gönderilmiş ve immobilize SrtA enziminin aktif merkezine bağlanan fajların substratla yarışması sonucu serbest kalarak geri kazanımı sağlanmıştır. Substratla elüsyon yönteminin kullanılmasıyla 3 döngü sonunda lineer peptit kütüphanesinden 21, halkalı peptit kütüphanesinden ise 23 faj klonunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen faj klonları *E. coli* hücresi ile çoğaltılmış ve çoğaltılan fajların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Floresans spektrofotometre ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi ölçümleri sonunda, halkalı peptit kütüphanesinden enzimle elüsyon yöntemi ile izole edilen fajlar arasından CE10, CE21 ve CE22 kodlu 3 faj klonunun enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu görülürken substratla elüsyon yöntemi ile izole edilen fajlar arasından ise sadece CS13 kodlu faj klonunun enzim aktivitesinde %20 inhibisyona neden olduğu görülmüştür. Lineer peptit kütüphanesinden seğıilen fajlar arasından, enzimle elüsyon yöntemiyle izole edilen faj klonlarından 3

tanenin (LE5, LE14, LE21), substratla elüsyon yöntemiyle izole edilen faj klonlarından ise 5 tanenin (LS10, LS13, LS15, LS16, LS19) SrtA enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir.

SrtA aktivitesinde inhibisyona neden olan faj klonları seçilerek DNA sekans analizine gönderilmiş ve faj klonlarının kodladığı değişken bölge peptit dizimleri belirlenmiştir. Sekans analizi sonucunda lineer peptit kütüphanesinden izole edilen, LE5 ve LE21 kodlu faj klonlarının *TESAPTL* ve LS10, LS16, LS19 kodlu faj klonlarının ise *WSIDHVG* değişken bölge peptit dizilimine sahip olduğu belirlenirken LE14, LS13 ve LS15 kodlu faj klonlarının değişken bölge peptit dizilimi belirlenmemiştir. Halkalı peptit kütüphanesinden izole edilen CE10, CE21, CE22 ve CS13 kodlu faj klonlarının ise her birinin farklı peptit dizimlerini kodladığı belirlenmiştir. Peptit dizimleri incelendiğinde birbirleri arasında herhangi bir sekans benzerliği veya tekrarlanan motif olmadığı görülmüştür. Ayrıca belirlenen peptit dizimleri, önceki çalışmalarda elde edilen SrtA inhibitörleri [71, 72] veya SrtA substratı ile karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir benzerlik olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, elde edilen peptitlerin diğer SrtA inhibitörlerinden farklı bir mekanizma ile enzime bağlanarak inhibisyona neden olduğu düşünülmektedir.

Dizilimi belirlenen peptitlerin *in-vitro* sentez sonrasında da SrtA aktivitesi üzerine inhibitör etki göstermeleri beklenmektedir. Ancak faj yüzeyinde birkaç kopyasıyla bir arada bulunan peptitlerin çoklu bağlanma değerliğine sahip olması nedeniyle ya da sentezlendikten sonra ikincil yapılarında farklılıkların meydana gelmesi durumunda tek başlarına aynı inhibisyonu gösterememe ihtimali de bulunmaktadır [89]. Bu nedenle, dizilimi belirlenen peptitlerin inhibitör olarak kullanılma potansiyellerinin tam olarak belirlenebilmesi için serbest haldeki peptit moleküllerinin inhibisyon özelliklerinin araştırılması gerekmektedir. Önceki çalışmalarda hedef moleküle özgü ligand veya inhibitör seçiminde halkalı peptit kütüphanelerinin lineer peptit kütüphanelerine kıyasla daha etkili olduğu ve hedef moleküle daha yüksek seçicilikte ve afinite peptit ligandlarının ya da inhibitörlerinin seçilebildiği rapor edilmiştir [90, 91]. Yapılan bir çalışmada halkalı peptit kütüphaneleri kullanılarak avidine özgü, yüksek seçicilikte 2 farklı dizilimde halkalı yapıda peptit ligandları seçilirken, aynı dizilimde lineer peptitlerin 80 kat daha az afinite gösterdiği rapor edilmiştir [91]. Halkalı yapıda peptitlerin hedef moleküle daha iyi bağlandığı ve lineer peptitlere kıyasla daha iyi bağlanma kinetiği

gösterdikleri belirlenmiş ve halkalı peptit kütüphaneleri kullanılarak yüksek afinitede ligand veya enzim substratlarının geliştirilebileceği gösterilmiştir [90]. Ayrıca SrtA enziminin hedef molekül olarak kullanıldığı bir çalışmada, 2 halkalı değişken peptit dizilimleriyle oluşturulmuş peptit kütüphanesi ile SrtA enzime karşı inhibitör özellik gösteren peptitler elde edilmiştir [71]. Halkalı yapıda peptitlerin daha iyi bağlanma özelliği göstermesinden yola çıkılarak oluşturulan peptit kütüphanesinin kullanılmasıyla önceki çalışmalar sonucu elde edilen SrtA inhibitörlerinden daha iyi inhibisyon özellik gösteren peptit inhibitörleri geliştirilmiştir [71]. Bu nedenle ileriki çalışmalarda, sentezlenen peptitlerle gerçekleştirilecek olan aktivite ölçümleri sonucunda, halkalı peptit kütüphanelerinden izole edilen faj klonlarının kodladığı peptitlerin daha yüksek inhibisyon özelliği göstermeleri beklenmektedir. Ayrıca, substratla elüsyon yöntemi ile izole edilmiş faj klonlarına ait peptit dizilimlerinden sentezlenecek olan peptitlerin enzimle elüsyon yöntemi ile izole edilmiş faj klonlarına ait peptitlerden daha başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Çünkü enzimin aktif merkezine bağlanan fajların geri kazanımını sağlayan substratla elüsyon yöntemi sonunda elde edilen peptitlerin, SrtA enziminin aktif merkezine bağlanarak enzim-substrat bağlanmasını engelleyerek reaksiyonda inhibitör etki yapacağı öngörülmektedir. Enzimin aktif merkezi dışında başka bir bölgesinden bağlanan fajların geri kazanımını sağlayan enzimle elüsyon yöntemi ile elde edilmiş peptitlerin ise enzimin aktif merkezinin dışında, uzak bir bölgeden de bağlanabileceği ihtimali düşünülerek daha düşük inhibisyon özelliği gösterebileceği varsayılmaktadır.

Çalışma sonucunda, çoğu Gram-pozitif bakterinin patojenitesi üzerinde etkisi olan ve terapötik öneme sahip SrtA enzime karşı inhibitör özellik gösteren faj klonları seçilmiş ve kodladıkları peptit dizilimleri belirlenmiştir. Dizilimi belirlenen peptitlerin önceki çalışmalarla elde edilen SrtA inhibitörlerinden farklı olması nedeniyle, sentezlenecek peptitlerin potansiyel yeni SrtA inhibitörleri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda inhibisyon özellikleri ortaya konacak peptit inhibitörlerinin yeni antimikrobiyal ajanlar olarak antibiyotiklerin geliştirilmesinde etkili rol oynayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ventola, C. L., The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats, *Pharmacy and Therapeutics*, 40, 277-283, **2015**.
- [2] Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., Pollini, S., Update on the antibiotic resistance crisis, *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56-60, **2014**.
- [3] Lange, R. P., Locher, H. H., Wyss, P. C., Then, R. L., The targets of currently used antibacterial agents: Lessons for drug discovery, *Current Pharmaceutical Design*, 13, 3140-54, **2007**.
- [4] Katzung, B. G., *Basic & Clinical Pharmacology*, 10. baskı, McGraw-Hill Medical, 1323-1576, **2006**.
- [5] Amabile-Cuevas, C. F., *Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment*, CRC Press, 2-6, **2015**.
- [6] Page, M. G. P., Marketed Major Classes of Compounds. *Antibiotic Discovery and Development*, (eds: Dougherty, T. J., Pucci, M. J.), Springer, 79-340, **2012**.
- [7] Lowy, F. D., Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus, *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1265-1273, **2003**.
- [8] World Health Organization, Antibiotic Resistance, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> (Mayıs, **2017**).
- [9] Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic/Antimicrobial Resistance, <https://www.cdc.gov/drugresistance/> (Mayıs, **2017**).
- [10] Michael, C. A., Dominey-Howes, D., Labbate, M., The antimicrobial resistance crisis: Causes, consequences, and management, *Frontiers in Public Health*, 2, **2014**.
- [11] Rao C.V, S., De Waelheyns, E., Economou, A., Anné, J., Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843, 1762-1783, **2014**.
- [12] Byarugaba, D. K., *Mechanisms of Antimicrobial Resistance*, Springer Science, Boston, **2010**.
- [13] Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilionis, A., Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria, *Medicina (kaunas)*, 47, 137-146, **2011**.
- [14] Cox, G., Wright, G. D., Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions, *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 287-292, **2013**.
- [15] Dever, L. A., Dermody, T. S., Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics, *Archives of Internal Medicine*, 151, 886-895, **1991**.
- [16] Sousa Oliveira, K., Lima, L. A., Cobacho, N. B., Dias, S. C., Franco, O. L., Mechanisms of Antibacterial Resistance: Shedding Some Light on These Obscure Processes?. *Antibiotic Resistance, Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*, (eds: Kon, K., Rai, M.), Academic Press, 19-30, **2016**.

- [17] Wright, G., Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1451-1470, **2005**.
- [18] Wright, G. D., Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Chemical Communications*, 47, 4055, **2011**.
- [19] Miwa, G. T., The Drug Discovery Process. *Enzyme Inhibition in Drug Discovery and Development*, (eds: Lu, C., Li, A. P.), Wiley, 3-9, **2010**.
- [20] Copeland, R. A., Assay Considerations for Compound Library Screening. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery- A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, (eds: Copeland, R. A.), Wiley, 82-84, **2005**.
- [21] Smith, H. J., Simons, C., Development of Enzyme Inhibitors. *Enzymes and Their Inhibition- Drug Development*, (eds: Smith, H. J., Simons, C.), CRC Press, 197, **2005**.
- [22] El Zoeiby, A., Sanschagrín, F., Darveau, A., Brisson, J. R., Levesque, R. C., Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 531-543, **2003**.
- [23] Paradis-Bleau, C., Lloyd, A., Sanschagrín, F., Clarke, T., Blewett, A., Bugg, T. D., Levesque, R. C., Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF, *BMC Biochemistry*, 9, 33, **2008**.
- [24] Paradis-Bleau, C., Lloyd, A., Sanschagrín, F., Maaroufi, H., Clarke, T., Blewett, A., Dowson, C., Roper, D. I., Bugg, T. D., Levesque, R. C., *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor, *Biochemical Journal*, 421, 263-72, **2009**.
- [25] Sanschagrín, F., A specific peptide inhibitor of the class B metallo- lactamase L-1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 252-255, **2005**.
- [26] Hassan M. E. Azzazy, W. E. H., Jr, Phage display technology clinical applications and recent innovations, *Clinical Biochemistry*, 35, 425-445, **2002**.
- [27] Pande, J., Szewczyk, M. M., Grover, A. K., Phage display: Concept, innovations, applications and future, *Biotechnology Advances*, 28, 849-858, **2010**.
- [28] Hoess, R. H., Protein design and phage display, *Chemical Reviews*, 101, 3205-3218, **2001**.
- [29] Paschke, M., Phage display systems and their applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 2-11, **2005**.
- [30] Kehoe, J. W., Kay, B. K., Filamentous phage display in the new millennium, *Chemical Reviews*, 105, 4056-4072, **2005**.
- [31] Smith, G. P., Petrenko, V. A., Phage display, *Chemical Reviews*, 97, 391-410, **1997**.
- [32] Szardenings, M., Phage display of random peptide libraries: Applications, limits, and potential, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 23, 307-349, **2003**.

- [33] Rodi, D. J., Mandava, S., Markowski, L., Filamentous Bacteriophage Structure and Biology. *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, 2. baskı, CRC Press, 3-24, **2015**.
- [34] McConnell, S. J., Uveges, A. J., Fowlkes, D. M., Spinella, D. G., Construction and screening of M13 phage libraries displaying long random peptides, *Molecular Diversity*, 1, 165-176, **1995**.
- [35] Sidhu, S. S., Phage display in pharmaceutical biotechnology, *Current Opinion of Biotechnology*, 11, 610-616, **2000**.
- [36] Caberoy, N. B., Zhou, Y., Jiang, X., Alvarado, G., Li, W., Efficient identification of tubby-binding proteins by an improved system of T7 phage display, *Journal of Molecular Recognition*, 23, 74-83, **2010**.
- [37] Hertveldt, K., Beliën, T., Volckaert, G., General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 502, 321-339, **2009**.
- [38] James, K. J., Hancock, M. A., Gagnon, J. N., Coulton, J. W., TonB interacts with BtuF, the Escherichia coli periplasmic binding protein for cyanocobalamin, *Biochemistry*, 48, 9212-9220, **2009**.
- [39] Benhar, I., Biotechnological applications of phage and cell display, *Biotechnology Advances*, 19, 1-33, **2001**.
- [40] Bratkovič, T., Progress in phage display: Evolution of the technique and its applications, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 749-767, **2010**.
- [41] Hoogenboom, H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nature Biotechnology*, 23, 1105-1116, **2005**.
- [42] Böttger, V., Böttger, A., Epitope mapping using phage display peptide libraries, *Methods in Molecular Biology*, 524, 181-201, **2009**.
- [43] Wang, L. F., Yu, M., Epitope mapping using phage-display random fragment libraries, *Methods in Molecular Biology*, 524, 315-332, **2009**.
- [44] Förster-Waldl, E., Riemer, A. B., Dehof, A. K., Neumann, D., Brämwig, K., Boltz-Nitulescu, G., Pehamberger, H., Zielinski, C. C., Scheiner, O., Pollak, A., Lode, H., Jensen-Jarolim, E., Isolation and structural analysis of peptide mimotopes for the disialoganglioside GD2, a neuroblastoma tumor antigen, *Molecular Immunology*, 42, 319-325, **2005**.
- [45] Diamond, S. L., Methods for mapping protease specificity, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 46-51, **2007**.
- [46] Kay, B. K., Kasanov, J., Yamabhai, M., Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries, *Methods*, 24, 240-246, **2001**.
- [47] Hyde-DeRuyscher, R., Paige, L. A., Christensen, D. J., Hyde-DeRuyscher, N., Lim, A., Fredericks, Z. L., Kranz, J., Gallant, P., Zhang, J., Rocklage, S. M., Fowlkes, D. M., Wendler, P. A., Hamilton, P. T., Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries, *Chemistry & Biology*, 7, 17-25, **2000**.

- [48] Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Skelton, N. J., Ultsch, M. H., Santell, L., Dwyer, M. A., O'Connell, M. P., Lazarus, R. A., Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants, *Nature*, 404, 465-470, **2000**.
- [49] Hawinkels, L. J. A. C., van Rossenberg, S. M. W., de Jonge-Muller, E. S. M., Molenaar, T. J. M., Appeldoorn, C. C. M., van Berkel, T. J. C., Sier, C. F. M., Biessen, E. A. L., Efficient degradation-aided selection of protease inhibitors by phage display, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 549-555, **2007**.
- [50] Zani, M. L., Moreau, T., Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors, *Biochimie*, 92, 1689-1704, **2010**.
- [51] Stoop, A. A., Eldering, E., Dafforn, T. R., Read, R. J., Pannekoek, H., Different structural requirements for plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) during latency transition and proteinase inhibition as evidenced by phage-displayed hypermutated PAI-1 libraries¹, *Journal of Molecular Biology*, 305, 773-783, **2001**.
- [52] Stoop, A. A., Craik, C. S., Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors, *Nature Biotechnology*, 21, 1063-8, **2003**.
- [53] Yang, S. Q., Craik, C. S., Engineering bidentate macromolecular inhibitors for trypsin and urokinase-type plasminogen activator¹, *Journal of Molecular Biology*, 279, 1001-1011, **1998**.
- [54] van Meijer, M., Roelofs, Y., Neels, J., Horrevoets, A. J., van Zonneveld, A. J., Pannekoek, H., Selective screening of a large phage display library of plasminogen activator inhibitor 1 mutants to localize interaction sites with either thrombin or the variable region 1 of tissue-type plasminogen activator, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 7423-8, **1996**.
- [55] Sedlacek, R., Chen, E., Screening for protease substrate by polyvalent phage display, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 8, 197-203, **2005**.
- [56] Zou, Q., Yang, K.-L., Identification of peptide inhibitors of penicillinase using a phage display library, *Analytical Biochemistry*, 494, 4-9, **2016**.
- [57] Chenna, B. C., Shinkre, B. A., King, J. R., Lucius, A. L., Narayana, S. V. L., Velu, S. E., Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 380-385, **2008**.
- [58] Cascioferro, S., Totsika, M., Schillaci, D., Sortase A: An ideal target for anti-virulence drug development, *Microbial Pathogenesis*, 77, 105-112, **2014**.
- [59] Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Bierne, H., Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria, *Research in Microbiology*, 156, 289-297, **2005**.
- [60] Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Schneewind, O., Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 40, 1049-57, **2001**.
- [61] Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J.,

- Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, I. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K., Fraser, C. M., Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*, *Science*, 293, 498-506, **2001**.
- [62] Clancy, K. W., Melvin, J. A., McCafferty, D. G., Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition, *Biopolymers*, 94, 385-96, **2010**.
- [63] Ton-That, H., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 9876-81, **2000**.
- [64] Maresso, A. W., Schneewind, O., Sortase as a target of anti-infective therapy, *Pharmacological Reviews*, 60, 128-41, **2008**.
- [65] Ilangovan, U., Ton-That, H., Iwahara, J., Schneewind, O., Clubb, R. T., Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 6056-6061, **2001**.
- [66] Zong, Y., Bice, T. W., Ton-That, H., Schneewind, O., Narayana, S. V., Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 31383-9, **2004**.
- [67] Cossart, P., Jonquière, R., Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 5013-5015, **2000**.
- [68] Navarre, W. W., Schneewind, O., Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 174-229, **1999**.
- [69] Bentley, M. L., Gaweska, H., Kielec, J. M., McCafferty, D. G., Engineering the substrate specificity of *Staphylococcus aureus* sortase A: The beta6/beta7 loop from SrtB confers NPQTN recognition to SrtA, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 6571-6581, **2006**.
- [70] Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., Schneewind, O., *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall, *Science*, 285, 760-3, **1999**.
- [71] Rentero Rebollo, I., McCallin, S., Bertoldo, D., Entenza, J. M., Moreillon, P., Heinis, C., Development of potent and selective *S. aureus* sortase A inhibitors based on peptide macrocycles, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7, 606-611, **2016**.

- [72] Guo, Y., Cai, S., Gu, G., Guo, Z., Long, Z., Recent progress in the development of sortase A inhibitors as novel anti-bacterial virulence agents, *RSC Advances*, 5, 49880-49889, **2015**.
- [73] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Clare, B. W., Bacterial protease inhibitors, *Medicinal Research Reviews*, 22, 329-372, **2002**.
- [74] Scott, C. J., McDowell, A., Martin, S. L., Lynas, J. F., Vandenberg, K., Walker, B., Irreversible inhibition of the bacterial cysteine protease-transpeptidase sortase (SrtA) by substrate-derived affinity labels, *Biochemical Journal*, 366, 953-8, **2002**.
- [75] Connolly, K. M., Smith, B. T., Pilpa, R., Ilangovan, U., Jung, M. E., Clubb, R. T., Sortase from *Staphylococcus aureus* does not contain a thiolate-imidazolium ion pair in its active site, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 34061-5, **2003**.
- [76] Kruger, R. G., Barkallah, S., Frankel, B. A., McCafferty, D. G., Inhibition of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA by phosphinic peptidomimetics, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3723-9, **2004**.
- [77] Kim, S. W., Chang, I. M., Oh, K. B., Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 2751-4, **2002**.
- [78] Kim, S. H., Shin, D. S., Oh, M. N., Chung, S. C., Lee, J. S., Chang, I. M., Oh, K. B., Inhibition of sortase, a bacterial surface protein anchoring transpeptidase, by beta-sitosterol-3-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 2477-9, **2003**.
- [79] Guimaraes, C. P., Witte, M. D., Theile, C. S., Bozkurt, G., Kundrat, L., Blom, A. E., Ploegh, H. L., Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions, *Nature Protocols*, 8, 1787-99, **2013**.
- [80] Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *Journal of Computational Biology*, 7, 203-14, **2000**.
- [81] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-5, **1970**.
- [82] Biochem Lab Solution, <http://biochemlabsolutions.com/> (Mayıs, **2017**).
- [83] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, 248-254, **1976**.
- [84] Addgene, Plazmid 51138, <https://www.addgene.org/51138/> (Haziran, **2017**).
- [85] Addgene, Plazmid 51141, <https://www.addgene.org/51141/> (Haziran, **2017**).
- [86] Hamilton, S., Odili, J., Pacifico, M. D., Wilson, G. D., Kupsch, J. M., Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment, *Hybrid Hybridomics*, 22, 347-55, **2003**.
- [87] Bolscher, J. G., Oudhoff, M. J., Nazmi, K., Antos, J. M., Guimaraes, C. P., Spooner, E., Haney, E. F., Garcia Vallejo, J. J., Vogel, H. J., van't Hof, W.,

- Ploegh, H. L., Veerman, E. C., Sortase A as a tool for high-yield histatin cyclization, *The FASEB Journal*, 25, 2650-8, **2011**.
- [88] Schmohl, L., Schwarzer, D., Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins, *Current Opinion in Chemical Biology*, 22, 122-128, **2014**.
- [89] Weiss, G. A., Penner, R. M., The promise of phage display: Customized affinity and specificity, *Analytical Chemistry*, 80, 3082-3089, **2008**.
- [90] Giebel, L. B., Cass, R. T., Milligan, D. L., Young, D. C., Arze, R., Johnson, C. R., Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities, *Biochemistry*, 47, 15430-15435, **1995**.
- [91] Meyer, S. C., Gaj, T., I., G., Highly selective cyclic peptide ligands for NeutrAvidin and avidin identified by phage display, *Chemical Biology & Drug Design* 1, 3-10, **2006**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Mücahide Köksal

Doğum Yeri : Ordu

Medeni Hali : Bekar

E-posta : mucahide_koksal@hotmail.com

Eğitim

Lise : Beşiktaş Anadolu Lisesi (2006-2010)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2010-2015)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri Fransızca : Başlangıç

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Protein ekspresyonu, faj gösterim yöntemi, enzim aktivitesi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

114Z947 kodlu 'Faj Gösterim Yöntemi Kullanılarak Antimikrobiyal Peptitlerin Geliştirilmesi' adlı 1001- Tübitak projesi

Tezden Üretilmiş Yayın

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:20/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: Sortaz A Enzimine Karşı İnhibitör Peptitlerin Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 51 sayfalık kısmına ilişkin, 20/06/2017 tarihinde şahsım/danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


20/06/2017
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Mücahide KÖKSAL
Öğrenci No: N14326633
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Gıda Mühendisliği
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK
ŞEKER

(Unvan, Ad Soyad, İmza)