

Hyaluronik Asit Sentaz Geninin *Lactococcus lactis*'te Ekspresyonu

Cansu Sunguroğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Haziran 2016

Hyaluronic Acid Synthase Gene Expression in *Lactococcus lactis*

Cansu Sunguroğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

June 2016

Hyaluronik Asit Sentaz Geninin *Lactococcus lactis*'te Ekspresyonu

Cansu Sunguroğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliđi Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pınar Aytar Çelik

Haziran 2016

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Cansu Sunguroğlu'nun Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "Hyaluronan sentaz geninin *Lactococcus lactis*'te ekspresyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman :Yrd. Doç. Dr. Pınar Aytar Çelik

İkinci Danışman : –

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye: Doç. Dr. İlknur DAĞ

Üye: Doç. Dr. Gökalp İŞCAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pınar Aytar Çelik

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet Erşahan
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Yrd. Doç. Dr. Pınar AYTAR ÇELİK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Hyaluronan sentaz geninin *Lactococcus lactis*'te ekspresyonu” başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 13/06/2016

CANSU SUNGUROĞLU

ÖZET

Hyaluronik asit, tıbbi ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılan ve dünya genelinde önemli bir pazar payına sahip bir biyopolimerdir. Birçok yapısal, fizyolojik ve biyolojik fonksiyona sahip olan bu biyopolimer hemen hemen tüm dokuların fonksiyonel bileşenidir. Hyaluronik asit yüksek su tutma kapasitesi, immünojenik olmaması, yüksek biyoyoumluluğu sebebi ile ortopedik uygulamalarda, kozmetik, medikal ve farmasötik gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hyaluronik asit ticari olarak hayvansal dokular ve patojenik *Streptococcus* cinsi bakteriler olmak üzere iki temel kaynaktan elde edilmektedir. Ancak bu kaynaklardan elde edilen hyaluronik asitin çeşitli kontaminasyon riskleri içermesi ve alerjik reaksiyonlar meydana getirmesi nedeniyle alternatif kaynakların geliştirilmesi önem kazanmıştır.

Bu çalışmada hyaluronik asit üreten alternatif rekombinant bir suş oluşturulması hedeflenmiştir. Patojenik *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* suşundan elde edilen hyaluronik asitin kontaminasyon riskinden kaçınmak için bu suşun hyaluronan sentaz enzimini kodlayan *hasA* geni, bir laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis*'e aktarılmıştır ve *Lactococcus lactis*'in hyaluronik asit üreten rekombinant *L. lactis* CES15 olarak adlandırdığımız suş oluşturulmuştur. Bu kapsamda öncelikle *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*'un *hasA* geninin 5' ve 3' ucuna spesifik primerler kullanılarak amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifiye edilen gen bölgesi nisin kontrollü promotor sistemine sahip bir plazmid vektör olan pNZ8150'ye aktarılmıştır. Rekombinant *Lactococcus lactis* CES15 suşu nisin ile indüklenerek hyaluronan sentaz geninin ekspresyonu kontrol edilmiştir ve hyaluronik asit üretim yeteneği araştırılmıştır. Çalışmada 7,5 ng/ml nisin ile indüklenen rekombinant *Lactococcus lactis* CES15'in 3 saatlik indüksiyondan sonra, 2,9746 mg/ml gibi yüksek bir miktarla hyaluronik asit ürettiği belirlenmiştir. Bu yüksek sonuca sadece tek bir genin klonlanması ile ulaşılmıştır ve 3 saat indükleme süresi literatüre kıyasla oldukça kısadır.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik asit, *Lactococcus lactis*, hyaluronan sentaz, ekspresyon, *Streptococcus equi zoepidemicus*.

SUMMARY

Hyaluronic acid that widely used in medical and industrial area and has a significant market share worldwide is a biopolymer. This biopolymer having many structural, physiological and biological functions is functional components of virtually all tissues. Hyaluronic acid because of high water holding capacity, lack immunogenic, the high biocompatibility characteristics, are widely used in various fields such as in cosmetics, medical and pharmaceutical and orthopedic applications. Hyaluronic acid is commercially obtained from two main sources as animal tissues and pathogenic bacteria, *Streptococcus* genus. Alternative sources of production are also important because of hyaluronic acid which obtained from these sources including various risks of contamination and giving allergic reactions.

In this study, it was targeted the creation of an alternative strain recombinant producing hyaluronic acid. To avoid the risk of contamination of hyaluronic acid enzyme encoding gene, hyaluronan synthase obtained from strain of pathogenic *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* has been transferred with a lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant *Lactococcus lactis* strain CES15 strain was formed from *Lactococcus lactis* producing hyaluronic acid. In this context, the *hasA* gene 5' and 3' end amplification of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* was performed using specific primers. The amplified gene in a plasmid vector with a nisin-controlled promoter systems pNZ8150 has been transferred. The expression of hyaluronan synthase gene was controlled by induced recombinant strains of *Lactococcus lactis* nisin CES 15 and hyaluronic acid production capability was investigated. In this study, recombinant *Lactococcus lactis* CES15 with induced 7.5 ng/ml nisin was determined producing hyaluronic acid as 2.9746 mg/ml.

Keywords: Hyaluronic acid, *Lactococcus lactis*, hyaluronan synthase, expression, *Streptococcus equi zooepidemicus*.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol göstererek her türlü imkanı sağlayan, ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam ESOGÜ Yrd. Doç. Dr. Sayın Pınar AYTAR ÇELİK'e;

Çalışmalarıma bilgi ve deneyimleri ile büyük katkılar sağlayan, daima manevi desteğini hissettiğim değerli hocam ESOGÜ Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Sayın Ahmet ÇABUK'a;

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca daima yanımda olup, destek ve tecrübelerini esirgemeyen, bütün çalışmalar boyunca sabırla yardımcı olan Araş. Gör. Dilber Ece SEZGİN'e ;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım sevgili çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Belma NURAL, Hakan ÇAKMAK, Esmâ YİĞİT, Serap GEDİKLİ, Yağmur TOPTAŞ ve tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı ailesine;

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans çalışmam süresince büyük bir sevgi ve sabırla beni cesaretlendiren her zaman yanımda olan canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Cansu SUNGUROĞLU
Eskişehir, 2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Hyaluronik Asit'in Genel Özellikleri.....	4
2.2. Kimyasal Yapısı	5
2.3. Hyaluronik Asit'in Oluşum Şartları ve Biyosentezi.....	6
2.4. Hyaluronik Asit'in Degredasyonu.....	8
2.5. Hyaluronik Asit Üretimi.....	9
2.5.1. Hyaluronik asit'in bakteriyal fermentasyonla üretimi	10
2.5.1.1. <i>Streptococcus</i> cinsi bakterilerde HA üretimi	11
2.5.1.2. Patojenik olmayan rekombinant mikroorganizmalar ile HA üretimi	12
2.6. Bir Konak Olarak <i>Lactococcus lactis</i>	13
2.7. Gen Ekspresyon Sistemleri	14
2.7.1. Konstitütif promotorlar	14
2.7.2. İndüklenebilir promotorlar	14
2.7.2.1. Nisin kontrollü gen ekspresyon sistemi	15

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.7.2.2. Nisin ve nisin biosentezinin regülasyonu.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Teknik ekipman.....	17
3.1.2. Kimyasal malzemeler.....	18
3.1.2.1. Besiyerleri	18
3.1.2.2. Tampon ve çözeltiler.....	23
3.1.2.3. Enzimler ve reaktifler.....	26
3.1.2.4 Ticari kitler.....	27
3.1.2.5. Ticari suşlar.....	27
3.1.2.6. Plazmid vektör	28
3.1.2.7. Primerler.....	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Mikrobiyal kültürasyon.....	30
3.2.1.1. <i>Streptococcus equisubsp. zooepidemicus</i> 'un kültürasyonu	30
3.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) suşunun kültürasyonu	30
3.2.1.3. <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 suşunun kültürasyonu.....	30
3.2.2. Mikroskopik İncelemeler	31
3.2.2.1. Gram boyama.....	31
3.2.3. Genomik DNA izolasyonu.....	31
3.2.3.1. Fenol-Kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu	31
3.2.3.2. MOBIO UltraClean® Microbial DNA izolasyon kiti ile genomik DNA izolasyonu.....	33
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	34
3.2.4.1. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 'un 16S rRNA geninin amplifikasyonu.....	34

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.4.2. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> hyaluronan sentaz geninin amplifikasyonu	35
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	36
3.2.6. Restriksiyon endonükleazlarla kesim.....	37
3.2.6.1. Vektörün kesimi	37
3.2.7. Kesim ürünlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu	38
3.2.8. PCR ürünlerinin saflaştırılması	39
3.2.9. DNA miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi	40
3.2.10. Kesim ürünlerinin ligasyonu	40
3.2.11. Transformasyon	41
3.2.11.1. CaCl ₂ yöntemi ile transformasyon	41
3.2.11.2. Elektroporasyon yöntemi ile transformasyon	42
3.2.12. Transforme kolonilerin seçimi	43
3.2.13. Plazmid DNA izolasyonu.....	43
3.2.14. DNA dizi analizi	44
3.2.15. Hyaluronan sentaz geninin ekspresyonu.....	44
3.2.15.1. Ekspresyonun nispetle ile indüklenmesi.....	44
3.2.15.2. <i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> ile hyaluronik asit üretimi	45
3.2.15.3. Hyaluronik asit ekstraksiyonu.....	45
3.2.15.4. Karbazol metodu	45
3.2.16. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR).....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 'un Saflaştırma Çalışmaları ve Moleküler Karakterizasyonu	47
4.2. <i>hasA</i> Geninin Amplifikasyonu.....	50

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3. pNZ8150'nin <i>Escherichia coli</i> İçerisinde Çoğaltılması.....	53
4.4. Plazmid Vektörün Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi.....	55
4.5. PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi	56
4.6. Kesilen Ürünlerin Agaroz Jelden Geri Kazanılması	57
4.7. Ligasyon	58
4.8. Ligasyon Ürününün <i>Lactococcus lactis</i> Hücrelerine Transformasyonu	59
4.9. Klonlamanın PCR ve DNA Dizi Analizi ile Kontrolü.....	61
4.10. Ekspresyonun Kontrolü.....	64
4.10.1. Hyaluronik asit üretimi ve ekstraksiyonu	64
4.10.2. Karbazol yöntemi ile hyaluronik asit ölçümleri.....	66
4.10.2.1. Glukuronik asit standart grafiğinin hazırlanması.....	66
4.10.2.2. Hyaluronik asit miktarının belirlenmesi	68
4.11. Hyaluronik Asit'in FTIR Analizi ile Karakterizasyonu.....	69
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR DİZİNİ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Hyaluronik asit'in kimyasal yapısı	6
2. 3. Hyaluronik asit metabolik yolu.....	8
2. 4. Hyaluronan üretim metotları.....	10
2. 5. Nisin gen dizisinin şematik olarak gösterimi.....	16
3. 1. pNZ8150 vektör haritası	28
3. 2. Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarının hesaplanması.....	40
4. 1. Karışık kültürün gram boyama görüntüsü	47
4. 2. Saf kültürün gram boyama görüntüsü.....	48
4. 3. İzolat-9'dan elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	49
4. 4. İzolat-9'un 16S rRNA geni PCR'ı agaroz jel görüntüsü	50
4. 5. MgCl ₂ konsantrasyonu optimizasyonu agaroz jel görüntüsü.....	51
4. 6. Primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu agaroz jel görüntüsü	52
4. 7. Amplifiye edilen <i>hasA</i> geninin agaroz jel görüntüsü	53
4. 8. pNZ8150 plazmitini içeren <i>E.coli</i> BL21 (DE3) kolonileri	54
4. 9. pNZ8150 vektörünü içeren <i>E.coli</i> BL21(DE3) suşundan izole edilen plazmid DNA'nın agaroz jel görüntüsü	55
4. 10. pNZ8150 restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel elektroforezi.....	56
4. 11. PCR ürünü kesiminin agaroz jel görüntüsü	57
4. 12. Ligasyonun kontrolü	59
4. 13. Transformasyon sonrası oluşan koloniler	60
4. 14. Transformant koloninin sıvı besiyerinde çoğaltılması.....	61
4. 15. Kontrol PCR'ı	62
4. 16. HA ekstraksiyonu sonrasında kurutulmuş pelletler	66
4. 17. GlcA maksimum absorbansının belirlenmesi	67
4. 18. Glukuronik asit standart grafiği	67
4. 19. Farklı nisin konsantrasyonlarında üretilen HA-kuru biyokütle ilişkisi.....	68
4. 20. Hyaluronik asit FTIR spektrumu.....	69
5. 1. Plazmid vektör haritası	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3. 1.Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman.....	17
3. 3. Tryptic soy broth (TSB) besiyeri içeriği.....	18
3. 4. Hyaluronik asit üretim ortamı.....	19
3. 5. M17B besiyeri içeriği	19
3. 6. G-SGM17B besiyeri içeriği.....	20
3. 7. M17 Agar/Glukoz/Cm besiyeri içeriği	21
3. 8. LB (Luria-Bertani) Broth içeriği.....	21
3. 9. LB Agar/Cm besiyeri içeriği.....	22
3. 10. SOC Medium besiyeri içeriği	22
3. 11. Çalışma kapsamında kullanılan enzim ve reaktifler	27
3. 12. Çalışma kapsamında kullanılan ticari kitler.....	27
3. 13. Tez çalışmasında kullanılan primerler	29
3. 14. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 16S rRNA geni PCR bileşenleri	34
3. 15. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 16S rRNA geni PCR koşulları	35
3. 16. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 'un <i>hasA</i> geni PCR bileşenleri.....	35
3. 17. <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 'un <i>hasA</i> geni PCR koşulları	36
3. 18. pNZ8150vektörünün kesim reaksiyonu bileşenleri	37
3. 19. PCR ürünün kesim reaksiyonu bileşenleri.....	38
3. 20. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri	41
4. 1. Jel ekstraksiyonu sonrası örneklerin NanoDrop sonuçları.....	58
4. 3. Kültürlerin nisin ile indüklenmeden önce ve sonra OD ₆₀₀ değerleri.....	65
4. 4. Hyaluronik asit miktarı	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
A	Absorbans
Bç	Baz çifti
Cm	Kloramfenikol
dH ₂ O	Distile su
Dk	Dakika
G	Gram
Kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
Nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
Rpm	Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
U	Ünite
V	Volt
µg	Mikrogram
µF	Mikrofarad
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
Ω	Ohm

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATP	Adenozintrifosfat
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
GRAS	Generally Recognized As Safe
G-SGM17B	Glukoz,sükroz,glisin,M17 broth besiyeri
dNTP	Deoksiribonükleotit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopi
HA	Hyaluronik asit
<i>hasA</i>	Hyaluronan sentaz geni
LB	Luria Bertani Besiyeri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TSB	Tryptic soy broth
NICE	Nisin kontrollü gen ekspresyon sistemi
UDP-GlcNAc	Üridindifosfat N-asetilglukozamin
UDP-GlcUA	Üridindifosfoglukronik asit
UTP	Uridintrifosfat
UV	Ultraviyole
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>S. equi zooepidemicus</i>	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MCA	Metabolik kontrol analizi
MFA	Metabolik akı analizi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hyaluronik asit ilk olarak gözdeki retinanın saydam sıvısından izole edilmiş uzun zincirli bir polisakkarittir (Meyer ve Palmer, 1934). N-asetil-D-glikozamin ve D-glukoronik asit'in β -1,4 ve β -1,3 glikozidik bağlarıyla bağlanmasıyla meydana gelen disakkarit tekrarlarından oluşmaktadır. Hyaluronik asit, ekstraselüler matrikslerin temel bileşenlerinden biridir ve ekstraselüler alanda vücut bağ dokuları arasında bulunur (Laurent vd.,1995).

Endüstriyel olarak hyaluronik asit üretimi hayvansal dokulardan ekstraksiyon yoluyla veya bakteri suşları kullanılarak mikrobiyal fermentasyon yoluyla gerçekleştirilmektedir. Hyaluronik asit omurgalı hayvanların bağ dokularından izole edilebilir. Hyaluronik asit üretimi ve izolasyonu için sığır gözbebekleri ve eklem sıvısı, köpek balığı derisi, kanatlı hayvanların ibikleri ve insan göbek kordonu gibi çeşitli hayvan dokuları kullanılmıştır. Ancak hayvansal dokulardan ekstraksiyon yolu ile elde edilen hyaluronik asit, proteoglikanlarla kompleks oluşturmakta ve sıklıkla hyaluronik asit (HA) parçalayan enzimlerle kontamine olmaktadır. Bu nedenle yüksek saflıkta ve yüksek moleküler ağırlıkta HA izole etmek oldukça zor olmuştur (Schiraldi vd., 2010).

Hayvansal dokulardan ekstraksiyon süreçlerinde yaşanan kontaminasyon riskleri nedeni ile biyoteknolojik olarak HA üretiminin yolu açılmıştır. Hyaluronik asit talebinin karşılanabilmesi ancak mikrobiyal üretimle mümkün olmuştur (Mendichi ve Solte, 2002). HA, birçok *Streptococcus* suşundan üretilmektedir. Hyaluronik asit sentezi için insan patojeni olmayan ve daha yüksek hyaluronan üretim yeteneğine sahip C grubu streptokoklar tercih edilmiştir. En çok tercih edilen suşlar *Streptococcus equi* subsp. *equi* ve *S. equi* subsp. *zooepidemicus*'tur. Günümüzde HA'nın endüstriyel üretimi büyük ölçüde streptokokların fermentasyonuna bağlıdır (De Angelis vd., 2003; Schiraldi, 2010).

Mikrobiyal hyaluronik asit üretiminin en önemli avantajı mikrobiyal hücrelerin fizyolojik veya metabolik olarak daha fazla yüksek moleküler ağırlıklı HA üretimine adapte edilebilmesi olmuştur (Boeriu vd., 2013). Fakat bakteriyel fermentasyon ile yüksek moleküler ağırlıklı ve yüksek saflıkta hyaluronan üretilmesine rağmen

bakteriyalendotoksinler, proteinler ve nükleik asitler kontaminasyon risklerini oluşturmuştur. 90'lı yıllarda hyaluronik asit biyosentezine katılan genlerin ve öncül şeker nükleotitlerinin tanımlanması ile patojenik olmayan rekombinant suşlardan hyaluronik asit üretiminin yolu açılmıştır (Boeriu vd., 2013).

Patojenik *Streptococcus* suşlarından elde edilen hyaluronik asitin kontaminasyon riskinden kaçınmak için *Streptococcus* ve *Pasteurella multocida* suşlarının hyaluronan sentaz enzimleri rekombinant HA üreticisi güvenilir mikroorganizmalara aktarılmıştır. Bu yaklaşım ile *Lactococcus lactis*'in hyaluronik asit üreten rekombinant suşları oluşturulmuştur ve HA üretimi için kullanılmıştır (Prasad vd.,2010; Chien ve Lee, 2007; Prasad vd., 2012).

Hyaluronik asit hücrelerarası alanda su tutma, doku içinde jelöz bir matriks oluşturarak hücreleri tutma, dokuya kayganlık ve elastikiyet, mekanik stres gibi dışarıdan uygulanan kuvvetlere karşı direnç sağlama ve hücrel enfeksiyonları engelleme gibi pek çok fonksiyona sahiptir. HA, kendine özgü viskoelastik özellikleri ve düşük toksisitesi sayesinde kozmetik ve farmasötik endüstride çok çeşitli uygulama alanları bulmuştur.

Hyaluronik asitin 2005 yılında Dünya'daki pazar payı 1 milyar doların üzerinde iken (Chong vd., 2005) medikal teknolojide global otoritelerden biri olan Millennium araştırma grubunun sunduğu rapora göre de 2017 yılına kadar bu rakamın 2.5 milyar dolara yaklaşması beklenmektedir. Medical Insight Inc.'a göre dermal dolgu materyallerindeki global pazar payı 2009'da yaklaşık 759 milyon doları bulmuştur. Günümüzde yaklaşık 100 farklı dolgu materyali olup bunlardan yarısı HA bazlıdır. Kendine özgü viskoelastik ve reolojik özellikleri ile vücuttaki pek çok dokunun önemli bir bileşeni olan hyaluronik asit, günümüzde pek çok medikal uygulamanın odağı haline gelmiştir. Son yıllarda, dermis veya eklem enjeksiyonları da olmak üzere klinikte tedavi amaçlı pek çok uygulama alanı bulmuştur.

Yaşam bilimlerinde, tıbbi ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılan ve önemli bir yere sahip olan hyaluronik asitin saf ve güvenilir mikroorganizmalar aracılığı ile üretilmesini amaçlayan bu tez çalışmasında patojen bir hyaluronik asit üreticisi olduğu bilinen *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*'un hyaluronik asit sentezinden sorumlu

enzimlerinden biri olan hyaluronan sentaz enzimini kodlayan genin gıda endüstrisinde oldukça yaygın olarak kullanılan ve GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsüne sahip olan *Lactococcus lactis*'te ekspresyonu hedeflenmiştir.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Hyaluronik Asit'in Genel Özellikleri

Hyaluronik asit (hyaluronan ya da hyaluronat), hemen hemen bütün dokularda bulunan, N-asetil-D-glikozamin ve D-glukoronikasit'in β -1,4 glikozidik bağlarıyla bağlanmasıyla meydana gelen disakkarit tekrarlarından oluşan lineer bir glikozaminoglikandır. Hyaluronik asit, negatif yüklüdür ve yüksek moleküler ağırlıklıdır. Moleküler ağırlığı serumda 100 000 Da ve vitrözde 8 000 000 Da arasında değişiklik göstermektedir.

İlk olarak 1934 yılında Karl MEYER ve John PALMER tarafından sığır gözünün vitröz cisimciğinden izole edilmiştir (Meyer ve Palmer, 1934). HA gelişmiş hayvanlarda ekstrasellüler alanda dağılır ve yumuşak bağ dokusunda oldukça fazla bulunur. Bulunduğu dokularda yapısal rol oynamaktadır. 70 kg'lık bir insan vücudunda farklı dokularda olmak üzere yaklaşık 15 g. hyaluronan olduğu tahmin edilmektedir.

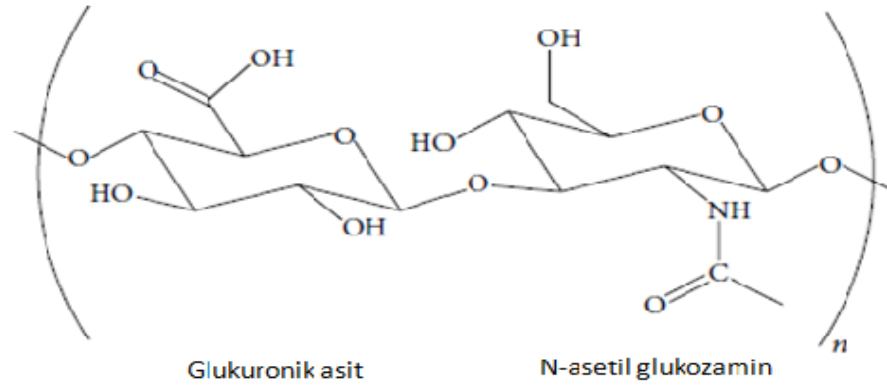
Biyolojik ve yapısal özellikleri hücrel sinyalizasyon, yara iyileşmesi, morfogenez ve matriks organizasyonundaki aktivitesini düzenlemektedir (Toole,2001; Toole, 2004). Hücrelerarası alanda su tutma, doku içinde jelöz bir matriks oluşturarak hücreleri tutma, dokuya kayganlık ve elastikiyet, mekanik stres gibi dışarıdan uygulanan kuvvetlere karşı direnç sağlama ve hücrel enfeksiyonları engelleme gibi pek çok fonksiyona sahiptir.

Hyaluronik asit birçok kaynaktan elde edilebilir, bunlar içinde ticari olarak en çok kullanılan yöntem horoz ibiğinden ekstraksiyondur. Grup A ve C *Streptococcus*suşları da ekstrasellülerkapsül olarak HA sentezlemektedirler. Su tutabilmesi, toksisitesive antijenitesi olmaması sayesinde yara iyileştirme ve doku onarımı, osteoartrit tedavisi, ilaç taşıma sistemleri, göz cerrahi, adhezyon önleyici gibi kozmetik ve farmasötik alanda kullanılmaktadır.

Hyaluronik asit ve türevleri; oftalmoloji, ortopedik cerrahiler (Chong vd., 2005), rejenerasyon sürecinin hızlandırılması ve desteklenmesi (Force vd.,1996) gibi alanlar başta olmak üzere klinikte medikal ürünler olarak 30 yıldır kullanılmaktadır (Kuo, 2006). Son zamanlarda, doku müdendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında da önemli bir yapı malzemesi olarak hyaluronik asit kullanımına dikkat çekilmektedir (Allison ve Allen, 2006). Bunun yanında dermatolojik uygulamalarda dolgu malzemesi olarak kullanımı ve günümüzde oldukça yüksek bir pazar payına sahip olan kozmetik sektöründe de yaygın bir şekilde kullanımı mevcuttur. Cildin kırıma, kuruma, sertleşmesi şeklinde beliren yaşlanma sürecinde hyaluronik asit miktarları azalmaktadır. Bu sebeple, yaşlanan ciltler için geliştirilen pek çok kozmetik formülasyonyaluronik asit içermektedir. HA'nın günümüzde Dünya'daki pazar payının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Chong vd., 2005). Dermal dolgu materyallerindeki global pazar payı 2009'da yaklaşık 759 milyon doları bulmuştur. Medikal teknolojide global otoritelerden biri olan Millennium araştırma grubunun sunduğu rapora göre de 2017 yılına kadar bu rakamın 2.5 milyar dolara yaklaşması beklenmektedir.

2.2. Kimyasal Yapısı

Yapısında temel olarak üronik asit ve aminoşeker disakkaritleri içeren, D-glukoronik asit ve N-asetil-D-glikozamin'in β -1,4 ve β -1,3 glikozidik bağları ile bağlanmıştır (Şekil 2.1). Bu şeker molekülleri polimerleşerek 30 000'den fazla tekrar ünitelerden oluşur. Yüksek oranda hidrate olmuş polianyonik bir makromoleküldür.



Şekil 2. 1 Hyaluronik asit'in kimyasal yapısı (G. Boeriu vd., 2013)

Polimerin boyutu dokunun türüne bağlı olarak 5 000 Da ile 20 milyon Da arasında değişmektedir. Örneğin hyaluronik asitin insan göbek kordonundaki moleküler kütlesi 3-4 milyon Da iken, insan sinoviyal sıvısında 6 milyon Da ağırlığındadır.

2.3. Hyaluronik Asit'in Oluşum Şartları ve Biyosentezi

Hyaluronan sentezi şeker substratlarını kullanan tek bir enzim ile katalizlenir. Golgi ağıyla sentezlenen diğer glikozaminoglikanların aksine hyaluronik asit plazma membranında sentezlenir (Pherm,1984). Hyaluronan sentazların membranı kateden pek çok domaini ile birlikte plazma membranın iç kısmında bir hücre içi lup oluşturduğu tahmin edilmektedir. Hyaluronan molekülleri sentezlendikten sonra ekstraselüler matrikse salınır ancak hücre içinde de bulunmaktadır (Itano, 2001). Ekstraselüler matrikste HA pek çok farklı formda bulunur. Örneğin proteoglikan kompleksleri ile birlikte, hücre yüzeyinde membran reseptörlerine bağlı bir şekilde veya hyaladherin olarak adlandırılan bağlanma proteinleri ile birlikte bulunmaktadır (Erickson ve Stern, 2012). HA'nın hücre dışı ve hücre içi konumunu düzenleyen mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, inflamasyon ve kanser sırasında olduğu gibi dokunun tipine bağlı olarak farklı moleküler ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda HA farklı hücrel cevapları uyarır.

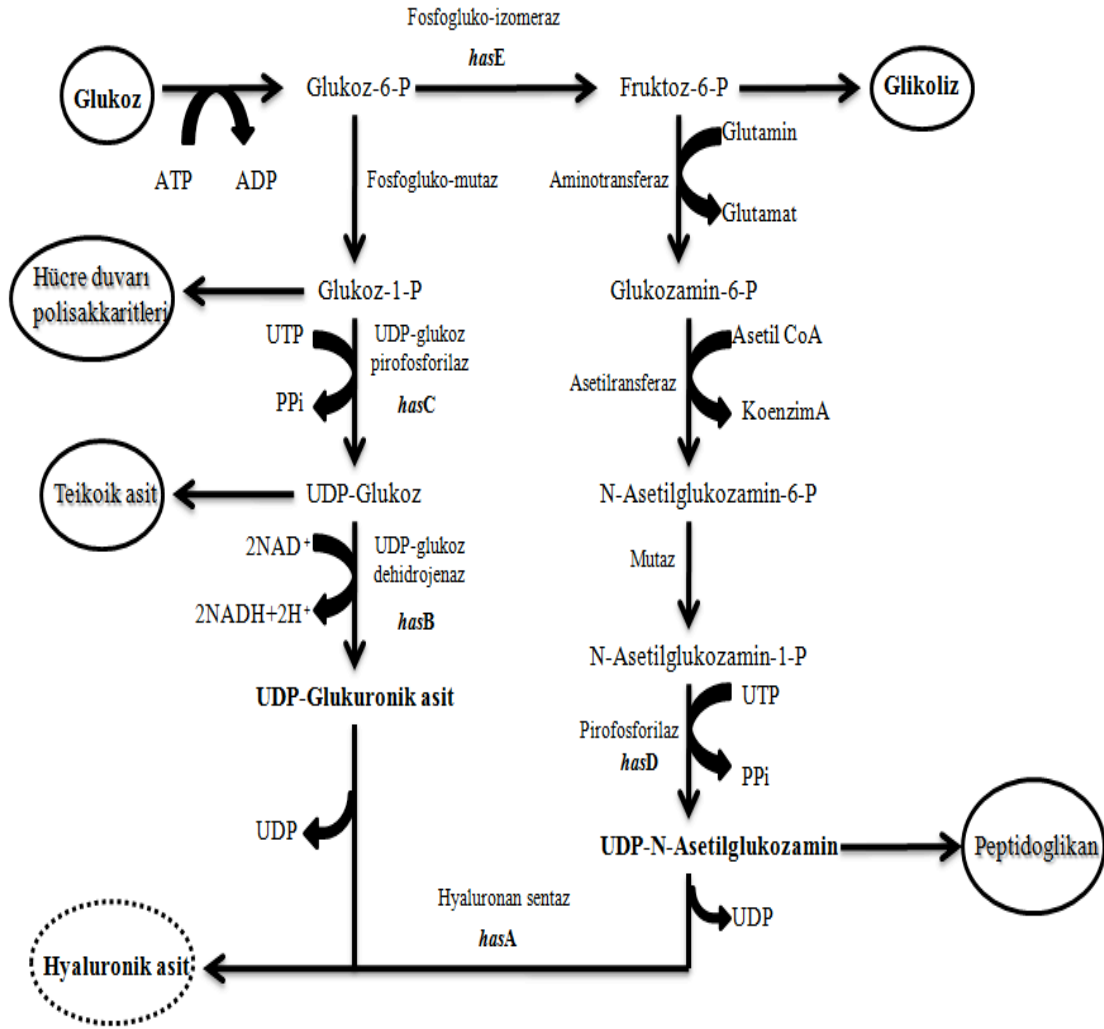
HA sentezinden sorumlu olan HA sentaz veya has olarak belirtilen enzimi kodlayan gen ilk defa grup A *Streptococcus* cinslerinde tanımlanmıştır (DeAngelis,1993a; 1993b). Bu gen hyaluronan sentazı kodlayan *hasA* genini, UDP-glukoz dehidrojenazı kodlayan

hasB genini ve UDP-glukozpirofosforilazı kodlayan *hasC* genlerini içeren operonun bir parçasıdır (Dougherty ve Van de Rijn, 1993; Cratervd, 1995). *has* operonu içerisinde düzenlenmiş olan HA biyosentezi için gerekli genlerin sayısı *Streptococcus* türleri arasında farklılık gösterir (Widner vd., 2005).

Yakın zamanda *Streptococcusequizoepidemicus*'un HA sentezinin metabolik yolu aydınlatılmıştır. Streptococal HA sentaz, aktif şekerlerin biyosentezi ile ilgili bir veya daha fazla geni içeren operonlar içinde bulunur (Blankvd., 2008). *S. equi zooepidemicus*'ta *has* operonu beş gen kodlamaktadır; hyaluronansentaz (*hasA*), UDP-glukozdehidrojenaz (*hasB*), UDP-glukozpirofosforilaz (*hasC*), asetiltransferaz ve pirofosforilaz (*hasD*) ve fosfoglikoizomeraz (*hasE*) (Chen vd., 2009). Diğer *Streptococcus* suşlarının *has* operonlarında hyaluronansentaz geninin yanı sıra sadece *hasB* ve *hasC* genleri bulunur. Bu da *S. equi zooepidemicus*'ta hyaluronan sentezinin gerçekleşmesinin UDP-şeker öncüllerinin varlığıyla en çok ilişkili olduğunu gösterir. Üridindifosfoglukronik asit (UDP-GlcUA) sentezinde *hasB* ve *hasC*, üridindifosfatN-asetilglukozamin (UDP-GlcNAc) sentezinde *hasD* ve *hasE* genleri yer alır.

Hyaluronik asit biyosentezi bakteriler için yüksek karbon kaynağı ve enerji gerektiren bir süreçtir. HA biyosentez yolağı hücre duvarı biyosentez yolağı ile büyük oranda iç içe olduğu için HA biyosentezi hücre büyümesiyle rekabet halindedir (Şekil 2.2). Tek bir zincir HA'nın sentezi yaklaşık olarak 2 000- 20 000 disakkarit ünitesine ihtiyaç duyar. Üretilen her bir disakkarit ünitesi için hücre iki molekül glukoz, üç molekül adenozintrifosfat (ATP), iki molekül uridintrifosfat (UTP) ve bir molekül asetilcoA tüketir (Widnervd., 2005).

Yüksek miktarda HA üretimi bu öncüllerin metabolik havuza çok ve dengeli miktarda akışını gerektirir. Bunun yanında HA biyosentezi için gerekli nükleotit şeker substratları UDP-GlcUA ve UDP-GlcNAc bakteriyal hücre duvarı bileşeni öncülü olarak üretilir. HA biyosentez yollarında üretilen glukoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfat metabolitleri pentoz fosfat yolu ve glikolizde harcanır. Dolayısıyla HA üretimi ve hücre büyümesi arasında çok sıkı bir yarış vardır. Enerji metabolizması ve öncüllerin sağlanması arasında çok yakın bir ilişki vardır (Mao vd., 2009).



Şekil 2. 2.Hyaluronik asit metabolik yolu (Chauhan vd, 2014)

HA sentezinin metabolik yollarının anlaşılması HA'nın mikrobiyal üretiminin optimizasyonunda çok önemli bir role sahip olup, polimer zincir uzunluğunun kontrolünü ve ürün miktarının artırılmasını sağlar.

2.4. Hyaluronik Asit'in Degredasyonu

Memelilerde HA'nın enzimatikdegradasyonunu gerçekleştiren üç tip enzim vardır; hyaluronidaz (hiyaz), β -D-glukoronidaz ve β -N-asetil-heksoaminidaz. Bu enzimler vücutta, hücre içerisinde ve serumda çeşitli formlarda bulunur. Genel olarakhiyaz, yüksek moleküllü HA'yı küçük oligosakkaritlerine ayırarak parçalarken, β -D-glukoronidaz ve β -

N-asetil-heksoaminidaz bu oligosakkarit fragmentlerinin, indüklenmemiş terminal şeker uçlarından yıkıma uğrattır (Leach ve Schmidt, 2004).

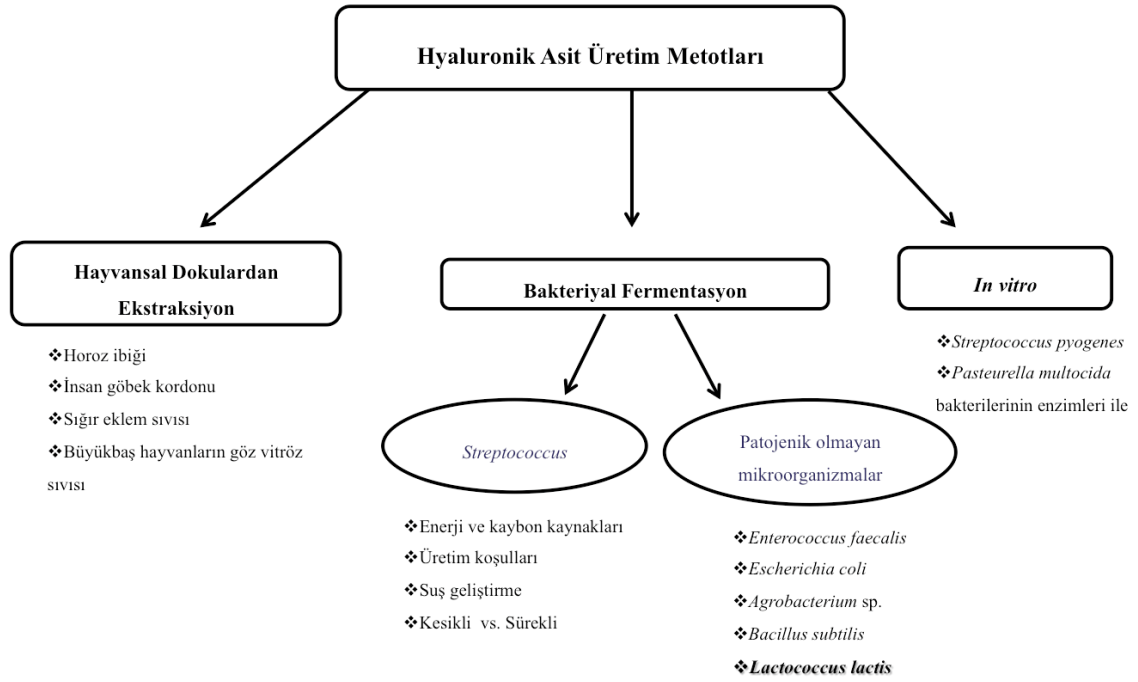
HA'nın parçalanma ürünleri, oligosakkaritler ve çok düşük moleküler ağırlıklı HA, pro-anjiyonik özellik gösterir (Mio ve Stern, 2002). Dokular arası bariyer olan HA'nın hidrolizini katalizleyen hyaluronidaz, hyaluronik asit viskozitesini düşürür böylece dokulardan geçirgenliğini artırır. Bu nedenle ilaçların dağılımını ve hızlı bir şekilde etki etmesini sağlamak için diğer ilaçlarla birlikte kullanılır (Necas vd., 2008).

Hyaluronidaz günümüze kadar birçok organizmadan ve dokudan izole edilmiştir. İzole edilen enzimler molekül ağırlığı, substrat özgüllüğü, optimum pH ve substratı degradasyon açısından farklılık gösterir (Necas vd., 2008)

Mikrobiyal hyaluronidazlar, hyaluronatliyaz grubunda yer alırlar. HA'yı β -eliminasyon reaksiyonu ile parçalarlar ve sonucunda 2-asetamido-2-deoksi-3-O-D-glukoz disakkaritini ana ürün olarak oluştururlar (Meyer, 1971). Farklı mikroorganizmalardan izole edilen hyaluronat liyazların substrat spesifiteleri arasında farklılıklar mevcuttur (Suzuki, 2000).

2.5. Hyaluronik Asit Üretimi

Hyaluronik asitin endüstriyel olarak üretimi iki ana prosese dayanır, bunlar hayvansal dokulardan ekstraksiyon ve bakteri suşları kullanılarak mikrobiyal fermentasyondur (Şekil 2.3). Her iki teknolojiye biyomedikal ve kozmetik uygulamaları için yüksek moleküler ağırlıklı HA elde etmeyi amaçlamaktadır (Shiedlin vd., 2004; Soltes vd., 2002; Harmonvd., 2012). Hayvansal dokulardan ekstraksiyon ticari ürünler için önemli bir teknolojidir fakat bu prosesin uygulanabilmesi çeşitli teknik kısıtlamalar vardır. Bu prosesin dezavantajı ekstraksiyonun zorlu koşullarda gerçekleşmesi ve hayvansal dokulardaki endojen hyaluronidazın polimer zincirini enzimatik hidroliz ile kırmasına sebep olmasıdır.



Şekil 2. 3. Hyaluronan üretim metotları(Boeriu vd., 2013)

Ekstraksiyon protokolleri üzerinde yıllarca çalışılmasına rağmen, dokulardan düşük konsantrasyonlarda HA elde edilmesi ve ekstraksiyon sırasındaki kontrol edilemeyen degradasyon sebebiyle çok yüksek verim elde edilememiştir. Hayvansal kaynaklardan terapötik bileşenlerin üretimi için gerekli birçok süreçte olduğu gibi, bu süreçte de protein ve virüskaynaklı kontaminasyon riskleri vardır. Fakat bu riskler dokuların sağlıklı hayvanlardan alınması ve kapsamlı bir saflaştırma ile minimize edilebilir. Bu nedenle viral (özellikle kanatlı) ve protein (özellikle büyükbaş) kaynaklı kontaminasyonlar hyaluronanın biyoteknolojik olarak üretimine olan ilgiyi arttırmıştır (Boeriu vd., 2013).

2.5.1. Hyaluronik asit'in bakteriyel fermentasyonla üretimi

Hayvansal kaynaklardan elde edilen HA'nın alerjik reaksiyonlara sebep olan istenmeyen proteinleri içerebildiği anlaşıldıktan sonra bakteriyel fermentasyonla HA üretimi 1960'larda geliştirilmeye başlanmıştır (Thonard vd., 1964). Hayvansal ve bakteriyel kaynaklı hyaluronan yapısal olarak özdeş olsa da bakteriyel hyaluronan immünojenik değildir ve bu sebeple medikal uygulamalar için mükemmel bir kaynaktır.

Mikrobiyal fermantasyon sıvısından HA ekstraksiyonu görece olarak daha kolay ve yüksek verimlidir. Mikrobiyal HA üretiminin diğer bir önemli avantajı ise mikrobiyal hücrelerin fizyolojik veya metabolik olarak daha fazla yüksek moleküler ağırlıklı HA üretimine adapte edilebilmesidir (Boeriu vd., 2013).

Bakteriyal fermantasyon ile yüksek moleküler ağırlıklı ve yüksek saflıkta hyaluronan üretilmesine rağmen bakteriyal endotoksinler, proteinler, nükleik asitler ve ağır metaller kontaminasyon risklerini oluşturur. 90'lı yıllarda hyaluronan biyosentezine katılan genlerin ve öncül şeker nükleotitlerinin tanımlanması ile patojenik olmayan rekombinantsuşlardangüvenli hyaluronan üretiminin yolu açılmıştır (Boeriu vd., 2013).

2.5.1.1. Streptococcus cinsi bakterilerde HA üretimi

Streptokoklar, *Streptococcaceae* ailesinde yer alan gram pozitif, sporsuz ve hareketsiz, küçük küresel ve oval şekilli, fakültatif anaerob bakterilerdir. Sıvı besiyerinde üretildiklerinde ikili ya da zincir oluşmuş gibi peş peşe dizilmiş bir görüntüde görülürler. Streptokoklar vücutta flora bakterisidir ve doğada oldukça yaygın bulunmaktadır. Büyük çoğunluğu insan ve hayvan patojenidir, çeşitli lokal ve yayılmış infeksiyonlara neden olurlar. Streptokoklar optik mikroskop altında incelendiğinde geniş bir hücre dışı kapsüle sahip olduğu görülür. Bu kapsül genellikle hücrenin bir ila üç çapı büyüklüğündedir. Karbonhidrat fermentasyonlarının son ürünü olarak laktik asit oluştururlar.

İlk olarak A grubu Streptokoklarda hyaluronik asit izolasyonu 60-140 mg/l miktarında rapor edilmiştir (Kendall vd., 1937). O zamandan beri hyaluronan miktarını ve verimini arttırmak için yüksek miktarda hyaluronan üretimine sahip suşların seçimi ve klasik optimizasyon tekniklerini içeren pek çok çalışma yapılmıştır. Otuz yıl içinde hyaluronan verimi kesikli fermantasyon yöntemleri kullanılarak, biyokütle transferindeki kısıtlamalara rağmen 300-400 mg/l'den 6-7 g/l'ye kadar arttırılmıştır (Carmen vd., 2013). Hyaluronan sentezi için grup A streptokoklar veya hayvan patojeni olan *Pseudomonas multocida* yerine, insan patojeni olmayan ve daha yüksek hyaluronan üretim yeteneğine sahip C grubu streptokoklar tercih edilmektedir. En çok tercih edilen suşlar *Streptococcus equi* subsp. *equi* ve *S. equi* subsp. *zooepidemicus*'tur (Boeriu vd., 2013).

Streptokok suşlarının hyaluronan üretimi için karbon kaynağı olarak genellikle glukoz kullanılmaktadır. Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı aerobik fermantasyon koşulları altında hyaluronan üretimi %5-10 arasında değişmektedir (Duan vd., 2009). Hyaluronan üretimi için glukoz yerine nişasta, laktoz, sükröz, dekstrin gibi diğer karbon kaynakları kullanılabilir (Zhang vd., 2006). Nişasta ve laktoz gibi karbon kaynaklarının kullanılması bu süreçte ekonomik olarak büyük ölçüde önemlidir.

HA üreticisi *Streptococcus equi zooepidemicus*'un genom dizisi için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında yapılan araştırma sonucu, iki türünün (H70 ve MGCS10565) genomunun aynı lokusunda beş genin (*hasA*, *hasB*, *hasC*, *hasD* ve *hasE*) bitişik olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu beş genin transkripsiyonu *has* operonunun ilk geni olan *hasA* (Craterandvan de Rijn,1995; Chong vd.,2005) geninin üst bölgesinde yer alan tek promotor tarafından kontrol edilir (Prasad vd., 2012). Bununla birlikte *S. equi zooepidemicus* suşları genomlarında *hasC* ve *hasD* genlerinin ekstra kopyalarını taşırlar. Bu yapısal özellikler *Streptococcus equi zooepidemicus* suşlarının daha iyi bir HA üreticisi olarak gelişmesini sağlamaktadır. HA biyosentezi *Streptococcus sp.* ve omurgalılarda *has* operon promotoru tarafından transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmekte ve iki regülatör sistem (*csrS/csrR*) tarafından düzenlenmektedir (Prasadvd.,2012).

Şeker prekürsörlerinin HA zincirlerini oluşturması için üç farklı enzim gerekmektedir. Bu enzimlerden iki tanesi *hasC* ve *hasB* genleri tarafından ifade edilmekte ve glukoz 1-P'ı UDP-glukuronikasit'e dönüştürmektedir. *hasA* geni tarafından kodlanan ve sınıf I HA sentaz enzimi olan glikoziltransferaz plazma membranının sitoplazmik bölge üzerindeki HA zincirlerinin sentezini katalizlemektedir(Cimini vd., 2011). Sınıf I enzimleri glikozaminglikan zincirinin indirgeyici ucunda çalışan glikoziltransferazlardır. HA sentaz ilk olarak *hasB* ve *hasC* genlerini de içeren polisistronik transkripsiyon ünitesinin bir parçası olarak *S. pyogenes*'te tanımlanmıştır(Cimini vd., 2011).

2.5.1.2. Patojenik olmayan rekombinant mikroorganizmalar ile HA üretimi

Patojenik *Streptococcus* suşlarından elde edilen HA ekzotoksin kontaminasyon riskinden kaçınmak için *Streptococcus* ve *Pasteurella multocida* suşlarının HA sentaz

enzimleri aktararak rekombinant HA üreticisi güvenilir mikroorganizmalar elde edilmiştir. Bu yaklaşım ile *Enterococcus faecalis* (DeAngelis vd., 1993), *Escherichia coli* (Yu ve Stephanopoulos, 2008; Mao vd, 2009), *Bacillus subtilis* (Widner vd.,2005), *Agrobacterium* sp (Mao ve Chen, 2007) ve *Lactococcus lactis* (Prasad vd.,2010; Chien ve Lee, 2007; Prasad vd., 2012)'in HA üreten suşları oluşturulmuş ve HA üretimi için kullanılmıştır.

Hyaluronan sentazın (*Streptococcus* hasA geni) heterolog ekspresyonu HA üretimini indüklemek için yeterlidir. Fakat HA biyosentezi kısmi olarak hücre duvarı biyosentezi ile birlikte genel bir yolağı paylaştığı için *hasA* geninin *hasB* (UDP- glukoz dehidrojenaz) ve *hasC* (UDP-glukoz pirofosforilaz) genleri ile birlikte eksprese edildiği çalışmalar ile daha çok HA üretimi gerçekleştirilmiştir (Mao ve Chen, 2007).

2.6. Bir Konak Olarak *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis gram-pozitif ve homofermantatif bir bakteridir. Glukoz fermentasyonu ile yalnızca laktik asit üretir. *Lactococcus* cinslerinin içerdiği karbon metabolizması, ekstraselüler ve intraselüler proteolitik sistemi, antibiyotik maddelerin üretimi ve onların etkileşimleri gibi fonksiyonel özellikleri kapsamlı olarak incelenmiştir.

Gıda endüstrisinde özellikle süt ve süt ürünlerinin fermentasyonunda ve korunmasında laktik asit bakterilerinin kullanımı azımsanmayacak derecede yaygındır. *Lactococcus* cinsleri GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüne sahiptir. Bu özelliği onların spesifik genlerinin modifiye edilmesine olan ilgiyi arttırmıştır ama daha da ilgi çeken bu bakterilerin ürettikleri özel proteinlerin üretimini arttırmaktır (Chien ve Lee, 2007).

Son 25 yıl içerisinde genetik mühendisliği tekniklerinin hızlı bir şekilde gelişmesi ile *Lactococcus* cinslerinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (Gasson ve Vos, 1994; Wood ve Warner, 2003). Bu genetik teknikler transformasyon, pek çok farklı vektörün bulunması, gen entegrasyonu, gen susturulması, konjugasyon ve devamlı regüle edilebilir gen ekspresyon sistemleridir. *Lactococcus* cinslerinin karbon metabolizması, ekstraselüler ve intraselüler proteolitik sistem, antibiyotiklerin üretimi ve bakteriyofajlara etikleşimi ve

direnci gibi fonksiyonel karakteristikleri yaygın olarak çalışılmıştır (Gasson ve de Vos, 1994; Wood ve Warner, 2003).

Günümüzde *Lactococcus lactis* türlerinin en az 5 suşunun genomik bilgileri büyük ölçüde bilinmektedir. Bu bilgiler *Lactococcus* cinslerinin biyoteknoloji alanında örneğin; mukozal bağışıklık yoluyla güvenli bir aşılama için bakteriyel ve viral antijenlerin ekspresyonu, *in situ* tedavilerde insan sitokinlerinin, diğer tedavi edici maddelerin üretimi ve spesifik bileşenlerin üretimi için *Lactococcus* cinslerinin hücre fabrikası olarak kullanımı ve farmasötik ürünlerin pilot ölçekte üretimi gibi çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlamıştır.

2.7. Gen Ekspresyon Sistemleri

Lactococcus lactis için tanımlanmış pek çok ekspresyon sistemi vardır (de Vos, 1999).

2.7.1. Konstitütif promotorlar

Lactococcus lactis'te tanımlanmış çok sayıda promotor herhangi bir regülatör veya büyüme koşulu ile kontrol edilmemekte ve laboratuvarındaki üreme koşullarında konstitütif olduğu varsayılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan promotorlar *L. lactis* genomik kütüphanesinden promotor içermeyen, kloramfenikol direnci sağlayan, *cat-86* raportör geninin füzyonları olarak rastgele izole edilmiştir (van der Vossen vd., 1987). P21, P23, P32, P44 ve P59 promotorları *L. lactis* ve *B. subtilis*'te aktif transkripsiyonel füzyonlar olarak belirlenmiştir. Güçlü (P21, P23, P59) ve zayıf (P32 ve P44) promotorlar kloramfenikol asetil transferaz aktivite seviyelerine göre ayırt edilmiştir ve güçlü promotorların korunmuş dizileri paylaştığı bulunmuştur. Bu promotorlar *L. lactis*'te lipaz, kitinaz, enterosin, proteinaz gibi pek çok heterolog proteinin üretiminde kullanılmıştır (Morello vd., 2008).

2.7.2. İndüklenebilir promotorlar

İndüklenebilen promotorlar genel olarak hücrenin çevresine adaptasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu yönetir. Pek çok *Lactococcus lactis* promotorunun faj atağı, sıcaklık veya pH değişimi gibi stres koşullarında indüklenebildiği bilinmektedir (Miyoshi vd., 2004). Regüle edilen promotorlar, belirlenen bir kültür/faz zamanında istenen proteini üretebilmesi için indüksiyonundan önce baskılanması biyokütle artışına izin veren toksik genler için özel ilgi alanıdır.

Lactococcus lactis'te yaygın olarak kullanılan indüklenebilir promotorlar P170, P_{Zn}zitR ve NICE'dir (Morello vd.,2008).

2.7.2.1. Nisin kontrollü gen ekspresyon sistemi

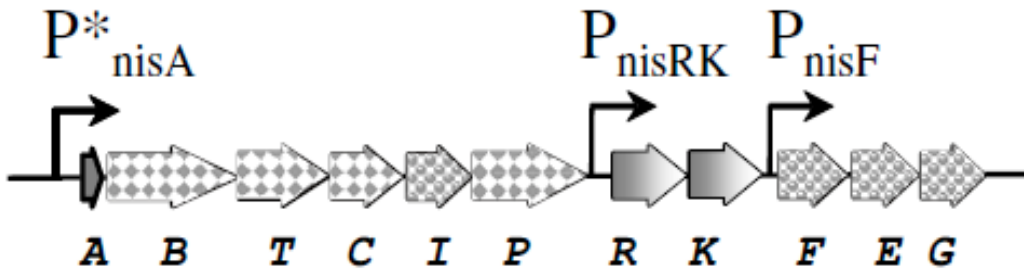
NICE sistemi *Lactococcus lactis*'te proteinlerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım kolaylığı, yüksek miktarda protein üretimini sağlayan sıkı kontrol edilen ve etkinlikle indüklenebilen ekspresyon ve büyük ölçekli üretimde kullanılabilmesi gibi pek çok avantajı vardır (Mierau vd., 2005).

Gen ekspresyonunda nisin otoindüksiyon mekanizmasından faydalanmak için sinyal transdüksiyonu sistemi genleri olan *nisK* ve *nisR* izole edilerek *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (nisin negatif) kromozomu içine yerleştirilmiş ve NZ9000 suşu oluşturulmuştur (Kuipers vd., 1998). İlgilenilen gen bir plazmid veya kromozom üzerinde bulunan P_{nisA} promotorunun hemen arkasına yerleştirildiği zaman genin ekspresyonu sub-inhibitör miktarlardaki nisin (0.1-5 ng/ml) kültür ortamına eklenmesi ile indüklenebilir (de Ruyter vd.,1996) . Sinyal dizisinin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak eksprese edilen protein stoplazmada kalabilir, hücre membranına gidebilir veya kültür ortamına salınabilir. β-glukuronidaz genini rapörtör olarak kullanan çalışmalarda artan miktarlarda nisin lineer bir doz/cevap eğrisi oluşturduğu görülmüştür (Kuipers vd., 1995; de Ruyter vd., 1996; Kleerebezem vd., 1999). Bu da NICE sisteminin sadece açık/kapalı gen ekspresyon çalışmaları için değil aynı zamanda hedef protein miktarının düzenlenmesi içinde kullanılabilceğini de göstermektedir (Mierau ve Kleerebezem, 2005).

2.7.2.2. Nisin ve nisin biyosentezinin regülasyonu

Nisin 34 aminoasitten ve beş halka yapısından oluşan antimikrobiyal bir peptittir (lantibiyotik). Nisin bir hücre duvarı sentezi öncülü olan lipidII'ye bağlanarak sitoplazmik membranda küçük porların oluşmasına bunu takiben ATP gibi küçük moleküllerin hücreden sızmasını sağlayarak hücre ölümüne sebep olur (Hasper vd., 2004). Geniş konak spektrumuna sahip olduğu için gıda endüstrisinde koruyucu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (van Kraaij vd., 1999).

Başlangıçta nisin prekürsörü ribozomal olarak sentezlenir bunu takip eden enzimatik modifikasyonlar moleküle olağan dışı kimyasal ve yapısal özellikler kazandırır. Son olarak modifiye olmuş molekül sitoplazmik membrana translokasyon ile olgun formuna dönüşür (Kleerebezem vd., 1997). Nisin biyosentezi bir arada bulunan 11 gen tarafından kodlanır (Şekil 2.4). Bunların ilki olan *nisA* nisin prekürsörünü kodlar. *nisB*, *nisC*, *nisP* ve *nisT* nisin modifikasyonu, translokasyonu ve işlenmesi ile ilgilidir. *nisI*, *nisF* ve *nisG* nisine karşı immünite ile ilgilidir. *nisR* ve *nisK* nisin ekspresyonunun regülasyonu ile ilişkilidir (Kuipers vd., 1995; Kleerebezem vd., 1997).



Şekil 2. 4. Nisin gen dizisinin şematik olarak gösterimi (Mierau ve Kleerebezem, 2005)

Aktive olmuş *nisR* nisin gen bölgesindeki üç promotordan ikisini indükler; P_{nisA} ve P_{nisF} . Nisin kendi ekspresyonunu indüklediği için üremekte olan bir bakteri kültüründe düşük miktarda nisin birikimi otoindüksiyon sürecini başlatır (Kuipers vd., 1995; de Ruyter vd., 1996; Kleerebezem vd., 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Teknik ekipman

Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman Çizelge 3.1’ de listelenmiştir.

Çizelge 3. 1.Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman

Ekipman	Marka/Model
Otoklav	Hirayama, HG-80
Termal döngü cihazı	Applied Biosystems, Veriti 96 Well Thermal Cyclcr
Distile su cihazı	Mes Mp Multipure
pH metre	WTW inoLab®, pH/ION 740
Elektroforez sistemi	Clever Scientific, CS-300V
Hassas tartı	OHAUS, Adventurer Pro AV264C
Çalkalamalı inkübatör	Lab Companion, SI-600R
Istıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph, MR3001
Spektrofotometre	Schimidzu, Thermo Scientific, NanoDrop 2000
Vorteks	Stuart, SA8
Sıcak su banyosu	Lab Companion, BS-31
Mikroskop	Nikon, Eclipse E100
Mikropipet seti	Thermo Scientific, FINNPIPETTE F1
Mikrodalga fırın	Arçelik, MD 574
Jel görüntüleme ünitesi	BIO-RAD, Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software
Elektroporatör	BIO-RAD, Gene Pulser
Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra X-30R centrifuge
Konsantratör	Labconco, Centrivap concentrator

Çizelge 3. 1. (Devam)Çalışma süresince kullanılan teknik ekipman

Ekipman	Marka/Model
Buzdolapları	Arçelik
Etüv	Binder, ED115
FTIR	Mattson, 1000 FT-IR

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich, Fluka ve Merck'ten temin edilmiştir.

3.1.2.1. Besiyerleri

Çalışma kapsamında kullanılan tüm besiyerlerinin içerikleri tablolar halinde verilmiştir.

Tyrptic soy broth:

Tyrptic soy broth *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suşunun kültürasyonu için kullanılmıştır. Tyrptic soy broth besiyeri içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Tryptic soy broth (TSB) besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
Pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Et özütü	1,5 g
Maya özütü	1,5 g
dH ₂ O	1000 ml

Hazırlanan besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Hyaluronik asit üretim ortamı:

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* suşu ile hyaluronik asit üretimi için kullanılan besiyeri bileşimi Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Hyaluronik asit üretim ortamı

Kimyasal	Miktar
Sükroz	79,86 g
Maya özütü	28 g
Kazein pepton	9,9 g
K ₂ SO ₄	0,51 g
MgSO ₄	1,25 g
Na ₂ HPO ₄	10,38 g
FeSO ₄	0,008 g
NaCl	1,23 g
İz Element	%1,23
dH ₂ O	1000 ml

Hazırlanan üretim ortamının pH değeri HCl (1 M) ile 7,2 olarak ayarlanmış ve 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

M17 broth:

M17 broth *Lactococcus lactis* NZ9000 suşunun kültürasyonunda kullanılmıştır. M17B besiyeri içeriği Çizelge 3.4.’de verilmiştir.

Çizelge 3. 4. M17B besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
Tripton	2,5 g
Et peptonu	2,5 g
Soya peptonu	5 g
Maya özütü	2,5 g
Et özütü	5 g

Çizelge 3.4.(Devam)M17B besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
Sodyum gliserofosfat	19 g
Magnezyum sülfat	0,25 g
Askorbik asit	0,5 g
Laktoz	5 g
dH ₂ O	1000 ml

Hazırlanan besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Glukoz-Sükroz Glisin M17B (G-SGM17B) besiyeri:

Glukoz-Sükroz Glisin M17B besiyeri *Lactococcus lactis* NZ9000 hücrelerinin elektroporasyona hazırlık aşamasındaki kültürasyonlar için kullanılmıştır. G-SGM17B besiyeri içeriği Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3. 5. G-SGM17B besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
M17 Broth	42 g
Sükroz	0,5 M
Glisin	%2,5
Glukoz	%0,5
dH ₂ O	1000 ml

M17Broth, sükroz ve glisin 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Stok glukoz çözeltisi ayrıca 110°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ardından besiyeri içeriğine %0.5'lik konsantrasyonda eklenmiştir.

M17 Agar/Glukoz/Cm besiyeri:

M17 Agar/Glukoz/Cm besiyeritransformant *Lactococcus lactis* NZ9000 hücrelerinin kültürasyonu için kullanılmıştır. M17 Agar/Glukoz/Cm besiyeri içeriği Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3. 6. M17 Agar/Glukoz/Cm besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
M17 Agar	55 g
Glukoz	%0,5
Kloramfenikol	10 µg
dH ₂ O	1000 ml

M17Agar 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 110°C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş stok glukoz çözeltisi ve filtre ile steril edilmiş kloramfenikol stok çözeltisi besiyeri içeriğine son konsantrasyonlarında eklenmiştir.

Luria-Bertani broth:

Luria-Bertani sıvı besiyeri *Escherichiacoli* BL21 (DE3) suşunun kültürasyonu için kullanılmıştır. LB besiyeri içeriği Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3. 7. LB (Luria-Bertani) Broth içeriği

Kimyasal	Miktar
Maya ekstraktı	5 g
Tripton	10 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	1000 ml

LB broth 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

LB agar/Cm besiyeri:

LB Agar/Cm besiyeri transformant *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücrelerinin kültürasyonu için kullanılmıştır. LB agar/Cm besiyerinin içeriği Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 8. LB Agar/Cm besiyeri içeriği

LB Agar / Kloramfenikol	Miktar
Maya ekstraktı	5 g
Tripton	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Kloramfenikol	10 µg
dH ₂ O	1000 ml

LB Agar 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra filtre ile steril edilmiş kloramfenikol stok çözeltisi besiyeri içeriğine son konsantrasyonunda eklenmiştir.

SOC Medium besiyeri:

CaCl₂ yöntemi ile transformasyon deneylerinde SOC medium besiyeri kullanılmıştır. SOC medium besiyeri içeriği Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3. 9. SOC Medium besiyeri içeriği

Kimyasal/Çözelti	Miktar
Maya ekstraktı	20 g
Tripton	5 g
1M NaCl	10 ml
1 M KCl	2,5 ml
2 M Mg ⁺² çözeltisi	10 ml
2 M Glukoz	10 ml
dH ₂ O	1000 ml

Tripton, maya özütü, 1 M NaCl ve 1 M KCl tartıldıktan sonra 22 ml distile su eklenerek otoklav ile 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Sıcaklığı oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 2 M Mg⁺² ve 2 M Glukoz çözeltileri eklenmiştir. pH 7 ve son hacim 25 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Tampon ve çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

Kristal Violet Çözeltisi

Çözelti-1	Kristal violet	2g
	Etil Alkol %95	20 ml
Çözelti-2	Amonyum oksalat	0,8 g
	dH ₂ O	80 ml

Bu iki çözelti ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilmiştir.

Lugol Çözeltisi

Potasyum iyodür	2g
İyot	100 ml
dH ₂ O	80 ml

Potasyum iyodür distile suda çözüldükten sonra, iyot eklenmiştir. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

Safranin Çözeltisi

Safranin	2g
dH ₂ O	80 ml

Safranin yukarıda belirtilen miktarda distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır

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

Trizma Base	24,2 g
Asetik asit	5,71 ml
1 M EDTA (pH 8.0)	50 ml

Yukarıdaki kimyasallar 100 ml distile su içinde çözülmüştür. 50X konsantrasyonda hazırlanan tampon çözelti çalışma sırasında distile su ile 1X TAE'ye seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan tampon karanlık ortamda saklanmıştır.

Mg⁺² Stok Çözeltisi (100 ml)

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g

Mg⁺² stok çözeltisi yukarıdaki kimyasalların 100 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Filtre ile sterilize edilerek ve +4°C' de saklanmıştır.

CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) Çözeltisi

CTAB	10g
NaCl	0,7 M

CTAB çözeltisi yukarıdaki kimyasalların 100 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Tamponu

100 ml ekstraksiyon tamponu TrisHCl ve EDTA son konsantrasyonları 100 mM ve pH değeri 8 olacak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3M Na-asetat Çözeltisi

Na-asetat trihidrat 40,82 g tartılarak 80 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Glacial asetik asit ile pH değeri 4'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak steril edilmiştir.

CaCl₂ Çözeltisi

CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4702 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,1016 g
Tris HCl	0,5 ml

CaCl₂ çözeltisi yukarıdaki kimyasalların 100 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 4°C' de saklanmıştır.

Lizozim Çözeltisi

Lizozim	100 mg
EDTA	0,5 M
Tris-HCl	1 M

Lizozim çözeltisi yukarıdaki kimyasalların 8 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Çözelti filtre ile steril edilerek -20°C' de saklanmıştır.

%25 Glukoz Stok Çözeltisi

7,5 g glukoz tartılarak 30 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak 110°C' de 25 dakika steril edilmiştir ve 4°C' de saklanmıştır.

İz Element Çözeltisi

CaCl ₂	2,0 g
ZnCl ₂	0,046 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,019 g

İz element çözeltisi yukarıdaki kimyasalların 100 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 4°C' de saklanmıştır.

Stok Kloramfenikol Çözeltisi

Stok kloramfenikol çözeltisi konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve filtre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan çözelti -20°C' de saklanmıştır.

Sodyum-tetraborat Çözeltisi

Sodyum-tetraborat çözeltisi konsantrasyonu 0,025 M olacak şekilde sülfürik asit içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda koşullarında saklanmıştır.

Karbazol Çözeltisi

Karbazol çözeltisi konsantrasyonu %0,125 olacak şekilde saf etil alkol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda koşullarında saklanmıştır.

Etanol/Tuz Solüsyonu

0,15 M NaCl çözeltisi %75 etanol içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda koşullarında saklanmıştır.

Nisin Stok Çözeltisi

Nisin stok çözeltisi konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde %0.05 asetik asit içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4°C' de saklanmıştır.

3.1.2.3. Enzimler ve reaktifler

Çalışma kapsamında kullanılan enzim ve reaktifler Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3. 10. Çalışma kapsamında kullanılan enzim ve reaktifler

Malzeme	Marka
MgCl ₂ , 25mM	Promega
Go Taq® Hot Start Taq DNA Polymerase (5u/µl)	
5X Colorless Go Taq Flexi Buffer	
6X DNA Loading Dye	BioLabs
KpnI-HF®	
ScaI-HF®	
Cut Smart™ Buffer	BIORON
10X T4 DNA Ligaz Buffer	
T4 DNA Ligaz	

3.1.2.4 Ticari kitler

Çalışma süresince kullanılan ticari kitler Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3. 11. Çalışma kapsamında kullanılan ticari kitler

Kit	Marka
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	
UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	MoBio
PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel

3.1.2.5. Ticari suşlar

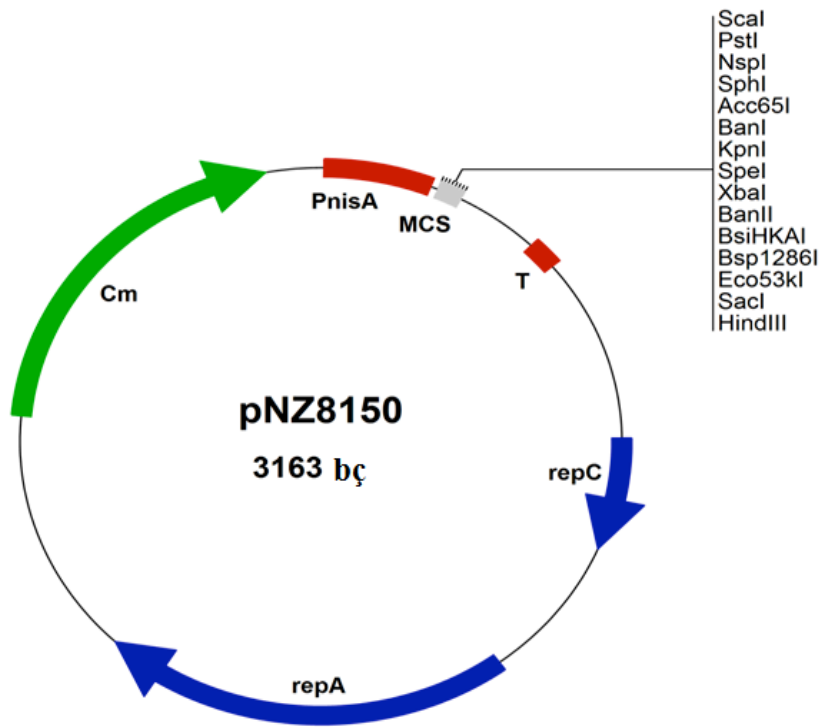
Streptococcus equi subps. zooepidemicus suşu T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nun MRLDB biriminin Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı bölümünden (Türkiye) temin edilmiştir.

*Escherichiacoli*BL21(DE3), suşu New England BioLabs (İngiltere) firmasından temin edilmiştir.

Lactococcus lactis NZ9000 suşu MoBiTec (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2.6. Plazmid vektör

Çalışma kapsamında PCR ürünlerinin klonlanması ve ekspresyonu amacıyla vektör olarak pNZ8150 (MoBiTec, Almanya) kullanılmıştır. pNZ8150 vektör haritası Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



		Başlangıç	Bitiş	İsim	Açıklama
	Promotor	3	201	PnisA	Ribozomal bağlanma bölgesini içeren nisinA promotor bölgesi
	Bölge	201	243	MCS	Çoklu Klonlama Bölgesi
	Sonlandırma	389	441	T	pepN geninin sonlandırma dizisi
	Gen	784	993	repC	Replikasyon gen C
	Gen	1262	1960	repA	Replikasyon gen A
	Seçilebilir Genetik İşaretleyici	2420	3070	Cm	Kloramfenikol direnci

Şekil 3. 1. pNZ8150 vektör haritası (NICE® Expression System for *Lactococcus lactis*,2014)

3.1.2.7.Primerler

hasA geninin 5' ve 3' ucuna spesifik primerler genin NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yer alan nükleotid dizisinden yararlanılarak tasarlanmıştır. Primerler tasarlanırken klonlamayı kolaylaştırmak amacıyla genin klonlanacağı vektörün restriksiyon kesim bölgeleri göz önünde bulundurularak Primer B'ye KpnI kesim bölgesi de yerleştirilmiştir. % GC içeriğine, primerlerin T_m değerlerinin birbirine yakın olmasına ve saç tokası oluşumunun oluşmamasına dikkat edilmiştir. Tasarlanan primerler Çizelge 3.12.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 12. Tez çalışmasında kullanılan primerler (Altı çizili diziler restriksiyon kesim bölgesidir.)

Primerin Adı	T_m (°C)	Uzunluk (bç)	Primer Dizisi (5'-3')
Primer A	54,8	31	ATGAGAACATTAAAAACCTCATAACTGTTG
Primer B	55,5	30	CGGGGTACCTTATAATAATTTTTTACGTGT

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikrobiyal kültürasyon

3.2.1.1. *Streptococcus equisubsp. zooepidemicus*'un kültürasyonu

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun MRLDB biriminin Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı bölümünden alınan RSHM numarası 677 olan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suşu, tanıtım formunda belirtilen suş açma protokolüne göre açılarak kültürasyonu sağlanmıştır.

Liyofilize olarak temin edilen kültür, suş açma formunda belirtildiği gibi 0.5-1 cc Trypticase soy broth ile dehidrate edilmiş, hemen ve 4 saat sonrası %5 defibrine koyun kanlı Trypticase soy agar plaklarına ekimi yapılarak 37°C'de mikroaerofilik ortamda inkübasyonu sağlanmıştır.

Suş açma protokolünün ardından *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suşunun devam eden kültürasyonları TSB besiyerinde 37°C'de 150 rpm'de inkübe edilerek yapılmıştır.

3.2.1.2. *Escherichia coli* BL21(DE3) suşunun kültürasyonu

Escherichia coli BL21(DE3), Luria Bertani broth besiyerinde aerobik koşullarda 37°C'de 150 rpm'de inkübe edilerek kültüre edilmiştir.

3.2.1.3. *Lactococcus lactis* NZ9000 suşunun kültürasyonu

MoBiTec (Almanya) firmasından temin edilen *Lactococcus lactis* NZ9000 suşu, M17B besiyerinde 30°C'de havalandırma olmayan koşullarda inkübe edilerek kültüre edilmiştir.

3.2.2. Mikroskopik İncelemeler

3.2.2.1. Gram boyama

Gram boyama Smith ve Hussey (2005)'in belirlediği yönteme göre aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

- 1) Bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden, steril öze yardımıyla alınarak 1 damla distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurutmaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler fikse edilmiştir.
- 2) Fikse edilen örneğin üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dk bekletilmiştir ve distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır.
- 3) Preparata iyot-lugol çözeltisi damlatılmıştır, 1 dk bekletilmiştir ve distile su çözeltisi ile yıkanarak iyot-lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
- 4) Preparatın üzerine %96'lık etil alkol damlatılıp 30 sn. bekletilmiştir ve distile su ile uzaklaştırılmıştır.
- 5) Preparata safranin boyası damlatılarak 1 dk bekletilmiştir ve distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır.
- 6) Preparat havada kendi halinde kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan preparat immersiyeon yağı damlatılarak mikroskopun 100'lük objektifinde incelenmiştir.

3.2.3. Genomik DNA izolasyonu

3.2.3.1. Fenol-Kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu

ESOGÜ Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda kullanılan fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

- 1) Sıvı kültür 13000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülmüştür.
- 2) Pellet üzerine 600 µl Ekstraksiyon tamponu eklenmiştir.
- 3) Ekstraksiyon tamponu eklemiş örnekler üzerine 6 µl Lizozim eklenmiştir ve tüpler yatay konumda çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 15 dk. inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyon sonrasında örneklerin üzerine 9 µl ProteinazK (150 mg/ml) ve 60 µl %10 SDS eklenip 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir.
- 5) İnkübasyon sonrasında tüplere 120 µl 5M NaCl eklenmiştir ve tüpler alt üst yapılmıştır.
- 6) CTAB çözeltisinden 90 µl eklenmiştir ve tüpler 65°C'de 10 dk su banyosunda inkübe edilmiştir.
- 7) İnkübasyon sonrasında tüpler sıvı azot içerisine alınarak 2 dk bekletilmiştir ve tekrar 65°C'de su banyosuna geri konulmuştur. Bu işlem en az 3 defa tekrarlandıktan sonra her tüpe fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) çözeltisinden 900 µl eklenmiştir ve 13000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 8) Tüplerin üzerindeki faza dokunmadan aradaki faz pipet yardımı ile çekilip yeni temiz bir tüpe aktarılmıştır ve üzerine hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol eklenmiştir.
- 9) Yeni tüpe aktarılan süpernatant üzerine 80 µl sodyum asetat, 480 µl izopropanol ve 8 µl $MgCl_2$ eklendikten sonra 13000 rpm'de 4°C'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
- 10) Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır ve tüplere 100 µl %70'lik etil alkol konulduktan sonra 13000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
- 11) Etil alkol uzaklaştırılıp pellet kurutulmuştur ve 30 µl içerisinde DNase bulunmayan steril su içerisinde çözülmüştür.

DNA izolasyonu sonrasında örnekler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. MOBIO UltraClean® Microbial DNA izolasyon kiti ile genomik DNA izolasyonu

Mobio UltraClean® Microbial DNA Isolation kiti ile DNA izolasyonu kit içindeki protokole göre aşağıdaki basamaklar izlenerek yapılmıştır.

- 1) Sıvı kültürden 1,8 ml alınarak, 2 ml'lik koleksiyon tüplerine konulmuştur ve oda sıcaklığında 10000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı dökülmüştür.
- 2) Pellet üzerine 300 µl MicroBead solüsyonu eklenmiştir ve pellet çözünene kadar tüpler vortekslenmiştir. Resüspanse olan hücreler kitin içerisinde bulunan MicroBead tüplere aktarılmıştır.
- 3) MicroBead tüplerine alınan örnekler üzerine 50µl MD1 solüsyonu eklenmiştir ve maksimum hızda 10 dk. vortekslenmiştir. Vorteks işleminden sonra örnekler 10000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir.
- 4) Santrifüj işleminden sonra süpernatant, 2 ml'lik koleksiyon tüplerine aktarılmıştır ve üzerine MD2 solüsyonundan 100 µl eklenmiştir.
- 5) MD2 solüsyonu eklenen tüpler 5 sn vortekslenmiştir ve 4°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler 10000 xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- 6) Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı temiz 2 ml'lik koleksiyon tüplerine aktarılmıştır ve üzerine MD3 solüsyonundan 900 µl eklenip vortekslenmiştir.
- 7) Örneklerden 700 µl alınarak kolon tüplerine aktarılmıştır ve oda sıcaklığında 10000 xg'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra kolonun altında kalan kısım dökülmüştür ve örnekler bitene kadar bu basamak tekrar edilmiştir.

- 8) Kolon tüplerine MD4 solüsyonundan 300 µl eklenmiştir ve oda sıcaklığında 10000 xg'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra kolonun alt kısmında kalan örnek dökülmüştür ve bu kez tüpler boş bir şekilde 10000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplerin kolon kısmı çıkartılmış ve yeni koleksiyon tüplerine takılmıştır. Üzerine MD5 solüsyonundan 50 µl eklenmiştir ve 10000 xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir.
- 9) Ekstrakte edilen DNA alttaki tüpte toplanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen DNA'nın kontrolü agaroz jel elektroforezinde yapılmıştır ve örnekler 20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu

3.2.4.1. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*'un 16S rRNA geninin amplifikasyonu

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus*'un 16S rRNA geni için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'de verilmiştir.

Çizelge 3. 13. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 16S rRNA geni PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Kalıp DNA	1 µl
Reaksiyon tamponu (5X)	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
27F primer (100pmol/µl)	0,4 µl
1387R primer (100pmol/µl)	0,4 µl
dNTP karışımı (2mM)	2µl
Go Taq® Hot Start Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,2 µl
dH ₂ O	10 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 µl

Çizelge 3. 14. *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* 16S rRNA geni PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	} x30 döngü
Primer bağlanması	55°C	30 sn	
Uzama	72°C	1:30 dk	
Final uzaması	72°C	10 dk	

3.2.4.2. *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* hyaluronan sentaz geninin amplifikasyonu

Streptococcus equi subsp. *zoepidemicus*'un genomik DNA'sı kullanılarak, hyaluronan sentaz (*hasA*) geni polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon için Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16'da belirtilen reaksiyon bileşenleri ve koşulları kullanılmıştır.

Çizelge 3. 15. *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*'un *hasA* geni PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Kalıp DNA	1 µl
Reaksiyon tamponu (5X)	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
Primer A (100pmol/µl)	0,4 µl
Primer B (100pmol/µl)	0,4 µl
dNTP karışımı (2mM)	2µl
Go Taq® Hot Start Taq DNA Polymerase	0,2 µl
dH ₂ O	10 µl
Toplam Reaksiyon Hacimi	20 µl

Çizelge 3. 16. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*'un *hasA* geni PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn.	} x30 döngü
Primer bağlanması	55°C	30 sn	
Uzama	72°C	1:30 dk	
Final uzaması	72°C	10 dk	

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez bir karışımda çözülmüş olarak bulunan moleküllerin boyutuna, yüküne ve fiziksel özelliklerine göre bir elektrik alanında hareket etmeleri prensibine dayanmaktadır. Bir elektrottan gelen elektrik akımı molekülleri kendine doğru çekerken diğer elektrottan gelen elektrik akımı molekülleri iter. Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentlerini ayırmak, saflaştırmak ve tanımlamak için kullanılan hızlı ve basit bir yöntemdir. Ultraviyole ışık altında floresan özellik gösteren etidyum bromür (EtBr) boyasının kullanımı ile moleküllerin jeldeki konumu görünür hale gelir.

Bu çalışmada DNA moleküllerinin saflıklarının ve boyutlarının belirlenmesi için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Genomik ve amplifiye edilmiş DNA moleküllerinin analizi için, hazırlanan hacimde 1X TAE içerisinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde agaroz kullanılmıştır. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA moleküllerinin analizi için %2 konsantrasyonda agaroz jel kullanılmıştır. Uygun konsantrasyonda tartılıp tampon içerisinde çözülen agaroz homojen bir karışım elde edilecek şekilde mikrodalgada kaynatılmıştır. Elle tutulabilecek sıcaklığa (50-55°C) düşene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Etidyum bromür, jeldeki son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Jel, tarakları yerleştirilmiş elektroforez tepsisine dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında iyice katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkartılmıştır. Yürütme tamponu olarak 1X TAE kullanılmıştır. DNA örnekleri 6X yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 5V/cm olacak şekilde sabit akım uygulanarak

gerçekleştirilmiştir. Agarozjeldeki DNA bantları jel görüntüleme ünitesinde görüntülenmiştir.

3.2.6. Restriksiyon endonükleazlarla kesim

3.2.6.1. Vektörün kesimi

Çalışmada kullanılacak olan plazmid vektör pNZ8150, çoklu klonlama bölgesinde bulunan KpnI ve ScaI restriksiyon kesim bölgelerinden ilgili enzimler ile kesilmiştir. Plazmid vektörün kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.17’de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 17. pNZ8150 vektörünün kesim reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
KpnI	0,5 µl
ScaI	0,5 µl
Vektör DNA (pNZ8150)	500 ng
10X CutSmart Buffer	2,5µl
dH ₂ O	10 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	25 µl

Plazmid vektörün kesim reaksiyonu sırasıyla 37°C’de 15 dk ve 80°C’de 20 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2. PCR ürününün kesimi

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus*’un genomik DNA’sı kullanılarak amplifiye edilen hyaluronan sentaz geni %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jelden geri kazanılan PCR ürünü KpnI enzimiyle kesilmiştir. Çizelge 3.18’de belirtilen reaksiyon bileşenleri kullanılmıştır.

Çizelge 3. 18. PCR ürünün kesim reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
KpnI	0,5 µl
PCR ürünü	500 ng
10X Buffer	2,5 µl
dH ₂ O	10 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	25 µl

PCR ürününün kesim reaksiyonu 37°C’de 15 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Kesim ürünlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

Kesim ürünlerinin ligasyondan önce saflaştırılması amacıyla Fermentas GeneJET™ Gel Extraction Kiti ile agaroz jelden ekstraksiyonları yapılmıştır. DNA moleküllerinin agaroz jelden saflaştırılması için kit içerisinde yer alan protokol takip edilmiştir (Protokolde yer alan santrifüj basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.):

1. Saflaştırılmak istenilen fragment(ler) steril bir bisturi ile agaroz jelden kesilmiştir.
2. Kesilen jel parçaları önceden ağırlığı tartılmış steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alınıp, tüplerin dolu ağırlıkları alınmıştır. Böylece kesilen jel parçalarının ağırlıkları hesaplanmıştır.
3. Ağırlıkları belirlenen jel parçalarına 1:1 (hacim:ağırlık) oranında kitin içerisinde yer alan Binding Buffer tamponu eklenmiştir ve 60°C’de yaklaşık 10 dakika bekletilerek jelin tamamen erimesi sağlanmıştır.
4. Binding Buffer içerisinde eritilen jel, kit içerisinde bulunan GeneJET™ saflaştırma kolonuna alınmıştır ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Santrifüj sonrasında kolonun altında kalan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan 700 µl kolon üzerine eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Altta kalan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Yıkama tamponun uzaklaştırılması için tekrar 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Kolon steril bir santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek, üzerine kit içerisinde bulunan 50µl Elution çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

3.2.8. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması için Macherey-Nagel PCR Clean-up kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde belirtilen prosedüre göre aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

1. 40 µl PCR örneği üzerine 50µl distile su eklenmiştir. Bu karışıma 1:2 (hacim:hacim) oranında kitin içerisinde bulunan NTI solüsyonu eklenmiştir.
2. Kitte bulunan NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonuna örnekler alınmış ve 11000 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrasında kolonun altında kalan kısım dökülür. Kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan 700 µl eklenmiştir ve 11000 xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
4. Yıkama tamponunun uzaklaştırılması için tekrar 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrasında 70°C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika inkübe edilerek yıkama tamponun içerisinde bulunan etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.

6. Kolon kısmı yeni steril mikrosantrifüj tüpüne takılarak, kolon üzerine kitin içerisinde bulunan NE tamponundan 30 µl eklenmiştir.
7. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 11000 xg'de santrifüj edilmiştir.

3.2.9. DNA miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi

Çalışmada elde edilen nükleik asitlerin miktarı ve kalitesi, spektrofotometrik olarak NanoDrop cihazı ile belirlenmiştir. Bunun için örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbansları alınmıştır. Elde edilen DNA'nın saflığının belirlenmesi ve protein kirliliklerine bakılması için A_{260}/A_{280} oranı kontrol edilmiştir.

3.2.10. Kesim ürünlerinin ligasyonu

Agaroz jelden geri kazanılan vektör ve insert DNA'larının saflığının ve miktarının belirlenmesinden sonra, BIORON T4 DNA Ligaz enzimi çalışma protokolünde belirtilen formüle göre ligasyon reaksiyonu için kullanılacak DNA miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.2.). Insert:vektör molar oranı 3 olarak kullanılmıştır.

Ligasyon reaksiyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.19.'da belirtilmiştir. Ligasyon reaksiyonu 16 saat 16°C'de inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

$$\frac{\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{DNA fragmentinin büyüklüğü (kb)}}{\text{Vektörün Büyüklüğü (kb)}} \times \text{DNA : Vektör (molar oran)} = \text{DNA Miktarı (ng)}$$

Şekil 3. 2. Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarının hesaplanması

Çizelge 3. 19. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Vektör DNA (pNZ8150)	300 ng
Insert DNA	356,8 ng
T4 DNA Ligaz	2 µl
10X T4 DNA Ligaz Buffer	5 µl
dH ₂ O	1,1 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µl

3.2.11. Transformasyon

3.2.11.1. CaCl₂ yöntemi ile transformasyon

Çalışmada kullanılan vektör pNZ8150'nin *Escherichia coli* BL21(DE3) içerisinde çoğaltılması amacıyla CaCl₂ yöntemi ile transformasyon yapılmıştır. Bu doğrultuda aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

Escherichia coli BL21(DE3) kültürü LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden tek koloni seçilerek LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Hücreler sıvı besiyerinde 37°C'de çalkamalı inkübatörde 150 rpm'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 50 ml LB sıvı besiyerine 500µl kültür inoküle edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de OD₆₀₀ değeri 0,4 olana kadar (yaklaşık 2 saat) inkübe edilmiştir. Kültür 50 ml'lik steril tüplere alınıp buz üzerinde 0°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. 4000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelletlerini kurutmak için tüpler ters çevrilip 1 dakika boyunca bekletilmiştir. Filtre ile steril edilen 0,1 M CaCl₂ çözeltisinden 10 ml alınarak hücre pelletleri bu çözelti ile resüspanse edilmiştir. 4000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tekrar hücre pelletlerini kurutmak için tüpler ters çevrilip 1 dakika boyunca bekletilmiştir. 0,1 M CaCl₂ çözeltisinden 2 ml alınarak hücre pelletleri bu çözelti ile resüspanse edilmiş ve buz üzerinde 3 saat bekletilmiştir. Kompetan hale gelen hücreler küçük hacimlere bölünerek bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Transformasyon aşamasında mikrosantrifüj tüplerinin içerisine yaklaşık 100 ng plasmid DNA'sı eklenmiştir. Üzerine 200 µl kompetan hücre eklenmiştir ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler 42°C'lik su banyosunda 1 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler tekrar buz üzerinde 2 dakika inkübe edilmiştir. SOC besiyerinden 800 µl transformasyon tüplerine ilave edilmiş ve pipetlenerek karıştırılmıştır.

Transformasyon tüpleri 37°C'de 150 rpm'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10 µg/ml kloramfenikol içeren LB agar petrilere 200'er µl sürme ekimi yapılmıştır. Petriler 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.11.2. Elektroporasyon yöntemi ile transformasyon

Lactococcus lactis NZ9000 -80°C stoğu, 5 ml Glukoz-SükrozGliserolM17B (G-SGM17B) besiyerinde 30°C'de statik inkübatörde 24 saat inkübe edilerek kültüre edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 ml kültür alınarak 50 ml Glukoz-SükrozGliserolM17B (G-SGM17B) besiyerine ekilmiştir ve 30°C statik inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 50 ml kültür 400 ml G-SGM17B besiyerinde seyreltilmiştir ve statik inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. OD₆₀₀ 0,2-0,3 değerlerine geldiğinde (yaklaşık 3 saat) inkübasyon durdurulmuştur. Daha sonra kültür 6000 xg'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet 400 ml 0,5 M sükroz, %10 gliserol çözeltisi (4°C) ile yıkanmıştır ve 6000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant dökülmüştür ve pellet üzerine 200 ml 0,5M sükroz, %10 gliserol, 50 mM EDTA çözeltisi (4°C) eklenmiştir. Hücreler bu çözelti ile resüspanse edilmiştir ve 6000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında pellet 100 ml 0,5M sükroz, %10 gliserol çözeltisi ile yıkanmıştır ve 6000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında hücreler 4 ml 0,5M sükroz, %10 gliserol çözeltisi ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Elektroporasyona hazır hale gelen hücreler daha sonra kullanılmak üzere küçük hacimlerde bölünerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

Elektroporasyon kuvvetleri önceden soğutularak içerisine 40 µl hücre ve 1000 ng DNA (ligasyon ürünü) konulmuştur. Kuvvetler elektroporator cihazına yerleştirildikten sonra 25/2000 µF/Vkapasitans, 200 Ω yükleme rezistansı değerleri kullanılarak elektrik akımı verilmiştir.

Elektroporasyon sonrasında hücreler üzerine 1 ml G-M17B + 20 mM MgCl₂ + 2 mM CaCl₂ besiyeri eklenmiştir ve 1 saat boyunca 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 200’er µl olarak, %0,5 glukoz ve 10µg/ml kloramfenikol içeren M17 agar petrilere yayma ekim yapılmıştır. Petriler 30°C’de 48 saat statik inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.12. Transforme kolonilerin seçimi

Transformasyon sonunda, transforme kolonilerin seçimi için M17G/Cm plaklara ekim yapılmıştır. Çalışmada kullanılan pNZ8150 vektörü kloramfenikol direnç (Cm^R) genine sahip olduğu için vektörü içeren bakterilerin kloramfenikollü petrilere koloni oluşturduğu gözlenmiştir. İnkübasyon sonrası gözlenen her bir koloni tek tek seçilerek kloramfenikol içeren M17B besiyerine ekilmiştir.

3.2.13. Plazmid DNA izolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu için Fermentas GeneJET™ Plazmid Miniprep Kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde yer alan protokol aşağıda detaylı şekilde verilmiştir. Protokolde yer alan santrifüj basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Aşı kültürden 5 ml alınarak 15 ml’lik steril tüplere aktarılmıştır. 8000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet üzerine kitin içerisinde bulunan Resuspension solüsyonundan 250 µl eklenmiştir ve pipet yardımıyla pelletin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen pellet yeni temiz 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve üzerine kitin içerisinde bulunan Lysis solüsyonundan 250 µl eklenmiştir ve 4-6 kez alt üst edilerek karışması sağlanmıştır. Tüp içerisine kitin içerisinde bulunan Neutralization solüsyonundan 350µl eklenmiştir ve tekrar 4-6 kez alt üst ederek karışması sağlandıktan sonra 12000 xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant GeneJET™ spin kolonuna alınmıştır ve 12000 xg’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolonun altına kalan kısım uzaklaştırılmıştır ve üzerine kitin içerisinde bulunan yıkama solüsyonundan 500µl eklenmiştir. 1 dakika 12000 xg’de santrifüj edildikten sonra kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır ve bu kez yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması için 1 dakika 12000 xg’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolon

kısmı yeni steril bir mikrosantrifüj tüpüne takılarak üzerine kitin içerisinde bulunan Elution tamponundan eklenmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dakika 12000 xg'de santrifüj edilmiştir ve kolon kısmı atılmıştır. Elde edilen plazmid DNA'larının agaroz jelde kontrolü yapılmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.14. DNA dizi analizi

DNA dizi analizi DNA birincil yapılarının belirlenmesinde ve nükleotid baz diziliminin tayininde kullanılan yöntemdir. Zincir sonlandırma yöntemi ile DNA dizi analizi (Sanger et al., 1977). 2', 3'-dideoksiükleotid sonlandırıcılarının (ddNTP) uzayan DNA zincirinin yapısına katılmasıyla gerçekleşmektedir. DNA dizi analizi reaksiyonu temel olarak, primer molekülü bağlanmış tek zincirli kalıp DNA molekülünden DNA polimeraz aracılığıyla yeni DNA zinciri sentezlenmesidir. Zincir sonlandırma yönteminde birçok tipte DNA polimeraz enzimi kullanılabilir. Bu enzimlerin ortak özellikleri özgül ve hassas olmalarıdır. DNA polimeraz, primerin 3' ucundan uzamayı sağlayarak DNA sentezi için dNTP (deoksiribonükleozit trifosfat) moleküllerini kullanmaktadır. Zincir sonlandırma yönteminde, her birinde dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) moleküllerinin hepsi ve ddNTP moleküllerinden sadece bir tanesi bulunan dört adet reaksiyon gerçekleştirilir. Böylece 3'-OH grubu içermediği için fosfodiester bağının oluşumunu engelleyen ddNTP molekülü uzayan zincirin yapısına katıldığı zaman zincir uzaması sonlanır. Sonuç olarak farklı uzunlukta bir dizi DNA fragmanı elde edilmektedir ve yüksek çözünürlükte bir jel elektroforez sisteminde fragmentlerin boylarına göre ayırım yapılmakta ve DNA dizisi saptanmaktadır.

3.2.15. Hyaluronan sentaz geninin ekspresyonu

3.2.15.1. Ekspresyonun nisin ile indüklenmesi

Rekombinant *Lactococcus lactis* suşu %0.5 Glukoz ve 10 µg/ml kloramfenikol içeren M17B besiyeri ortamına ekilerek aşı kültür oluşturulmuştur. Aşı kültürün OD₆₀₀ değeri yaklaşık olarak 3 olduğunda aşı kültürden %4 inokülasyon ile M17B+G/Cm sıvı besiyeri ortamına ekim yapılmıştır ve 30°C'de statik olarak 1 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra spektrofotometrede OD₆₀₀ değeri belirlenen kültür nisin ile indüklenmiştir. Stok çözeltisinden konsantrasyonları 0 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 7,5 ng/ml, 10 ng/ml ve 12,5 ng/ml olacak şekilde nisin eklenerek nisin konsantrasyonunun optimizasyonu yapılmıştır. Nisin indüksiyonu sonrasında 3 saat 30°C’de statik inkübe edilen kültürlerin inkübasyon sonrası spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri belirlenmiştir.

3.2.15.2. *Streptococcus equi zooepidemicus* ile hyaluronik asit üretimi

Streptococcus equi zooepidemicus suşu TSB besiyerine %1 inokulum ile ekilmiştir ve 37°C’de 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda elde edilen aşı kültürden HA üretim ortamına %2 inokulum miktarı ile ekim yapılmıştır ve 20 saat aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri belirlenmiştir.

3.2.15.3. Hyaluronik asit ekstraksiyonu

Hyaluronik asit ekstraksiyonu Jeong ve grubunun 2014’te yaptığı çalışmaya göre yapılmıştır. Hyaluronik asit üretim ortamında inkübe edilen ve nisin ile indüklenen örnekler inkübasyon sonrasında ekstrakte edilmiştir. Örneklerin üzerine eşit hacimde%0,1 SDS çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 5000xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve kapsüller formda bulunan HA’nın hücrenin kendisinden ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak üzerine 1,5 katı hacminde etanol eklenmiştir ve 16 saat 4°C’de bekletilerek içerisindeki glukozun çökmesi sağlanmıştır. 3000 rpm’de 4°C’de 20 dakika santrifüj edilmiştir ve oluşan pellet 25 ml etanol/tuz solüsyonu ile yıkanmıştır. Daha sonra tekrar 3000 rpm’de 4°C’de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Jeong vd.,2014). Santrifüj sonrasında oluşan pellet vakumlu konsantratör cihazında kurutulmuş ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.15.4 Karbazol metodu

Hyaluronik asit miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi için karbazol metodu kullanılmıştır. Vakumlu konsantratörde kurutulan ve -20°C’de muhafaza edilen örnekler 0,15 M NaCl çözeltisi ile çözülmüş ve dilüsyonları hazırlanmıştır. 450 µl örnek

üzerine önceden 4°C’de soğutulmuş Na-tetraborat çözeltisinden 2,7 ml eklenmiştir. Vortekslenerek karışması sağlanmıştır ve 100°C’ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika ısıtılmıştır. 15 dakika sonunda tüpler soğuk suda hızlıca soğutulmuştur. Üzerine 30 µl karbazol çözeltisi eklenmiştir ve hızlıca vorteks ile karıştırılarak tekrar 100°C su banyosunda 15 dakika ısıtılıp soğutulmuştur. Soğutulan örneklerin 516 nm’de glukuronik asit standardı kullanılarak çizilen standart eğri dikkate alınarak hyaluronik asit miktarları mg/ml cinsinden belirlenmiştir.

3.2.16. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR)

FTIR spektrofotometre cihazı organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır ve kızılötesi (IR) ışınlarının molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulması prensibine dayanmaktadır. IR spektrofotometresi; ışın kaynağı, monokromatör ve alıcı olmak üzere başlıca üç temel kısımdan oluşmuştur. Kaynaktan çıkan ışının yarısı referanstan geçmektedir. Monokromatörden geçen ışın, dalga boylarına ayrılıp dedektör üzerine düşmektedir ve böylece elektrik sinyaline çevrilmektedir.

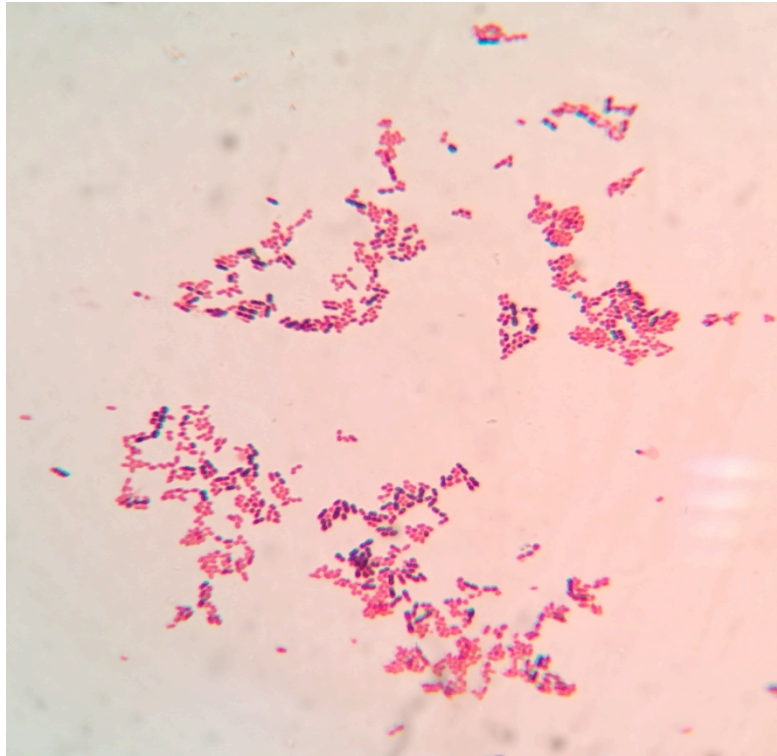
Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ve transformant suş (*Lactococcus lactis* CES15) tarafından üretilip ekstrakte edilen hyaluronik asit, FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. Ekstrakte edilen HA pelletinden bir miktar alınarak %1 olacak şekilde KBr ile agat havanda ezilerek karıştırılmıştır. KBr ile iyice homojen hale getirilen örnekler 1 MPa/cm² basınç altında disk haline getirilmiştir. Hazırlanan diskler Mattson 1000 FT-IR cihazında analiz edilmiştir. Analizde örneklerin 4000 ile 400 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

Elde edilen spektrumların OPUS programı kullanılarak, 400-4000 cm⁻¹ bölgesinde veri tabanı düzeltmesi yapılmıştır.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*'un Saflaştırma Çalışmaları ve Moleküler Karakterizasyonu

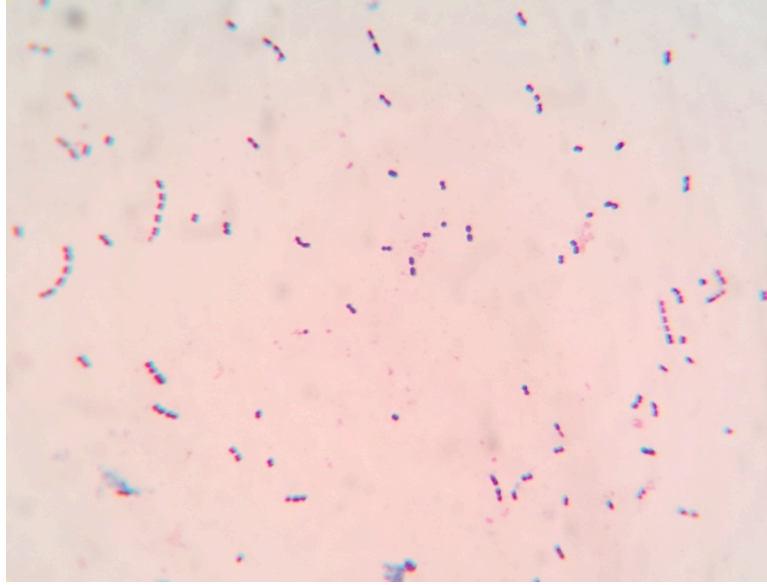
Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus*'un kültürasyonu Bölüm 3.2.1.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden kültürün saflığının kontrolü amacıyla gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonuçlarına göre kültürün saf olmadığı, kültürün içerisinde hem gram negatif hemde gram pozitif hücrelerin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1.Karışık kültürün gram boyama görüntüsü

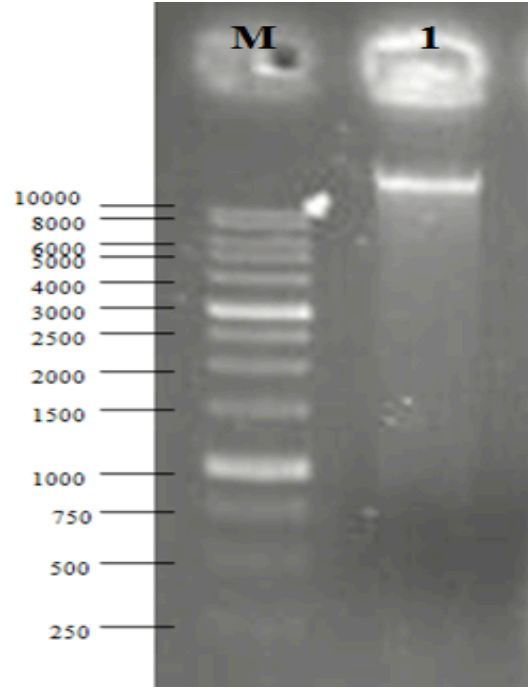
Kültürü saflaştırmak amacıyla tek koloni yöntemi ile ekimler yapılmış ve oluşan kolonilerden gram boyamalar yapılarak kolonilerin gram özellikleri ve morfolojileri

belirlenmiştir. Gram + ve kok morfolojisinde olan koloniler seçilerek sıvı besiyerlerine ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.



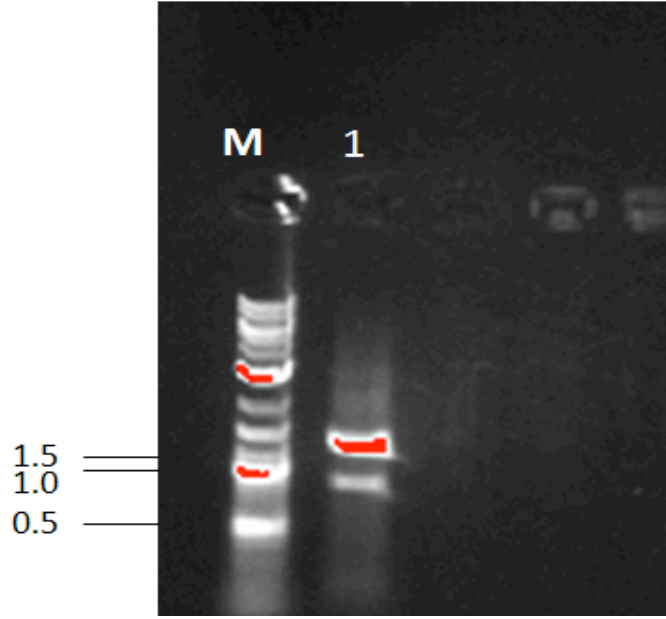
Şekil 4. 2.Saf kültürün gram boyama görüntüsü

Kültürlerin saflığı ve koloni morfolojileri tekrar gram boyama ile kontrol edilmiştir. Saf olduğu belirlenen ve Streptokok cinsi tipik koloni morfolojisi gözlenen bir izolat seçilmiştir (Şekil 4.2). Seçilen izolattan (İzolat-9) Mobio UltraClean® Microbial DNA Isolation kiti ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sonucu alınan jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. İzole edilen genomik DNA marker DNA ile karşılaştırıldığında 10000 bp'den daha büyük olduğu, parçalanmadığı, yüksek saflık ve miktarda elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4. 3. İzolat-9'dan elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü: **M**:1 kb DNA ladder, **1**:-İzolat-9'dan elde edilen genomik DNA

Genomik DNA izolasyonu pozitif sonuç veren izolat-9'un 16S rRNA geni polimeraz zincir reaksiyonu Bölüm 3.2.4.1'de belirtilen reaksiyon koşulları ve bileşenleri ile gerçekleştirilmiştir ve %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sonucu alınan jel görüntüsü Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4. 4. İzolat-9'un 16S rRNA geni PCR'ı agaroz jel görüntüsü: **M:** 1 kb DNA ladder, **1:** İzolat-9'un 16S rRNA geni PCR ürünü

%1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenen 16S rRNA geni amplifikasyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Buna göre tüm fragmentlerin 1.0-1.5 kb arasındaki bölgede beklenen boyutta (~1360 bp), spesifik olarak amplifiye olduğu görülmüştür.

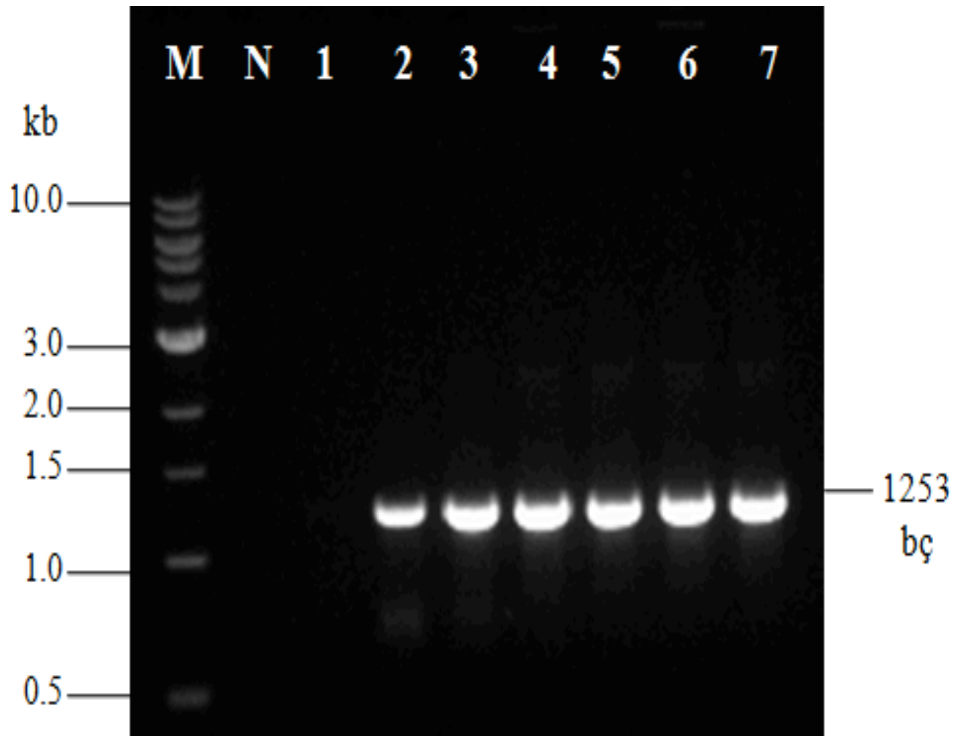
16S rRNA geni amplifikasyonun agaroz jelde kontrolünden sonra PCR ürünü saflaştırılmış ve ardından DNA dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi için doğrusal PCR 5 pmol/µl konsantrasyonda 27F primeri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gen dizisi NCBI 'National Center for Biotechnology Information' (www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanındaki BLAST programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda izolat-9'un 16S rRNA geninin *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* ATCC 35246 suşu ile %100 homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

4.2. *hasA* Geninin Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunun etkinliğinin artırılması ve reaksiyon koşullarının test edilmesi amacıyla optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşullarının

optimizasyonu için primer bağlanma sıcaklığı ve $MgCl_2$ konsantrasyonunda değişiklikler yapılmıştır.

$MgCl_2$ konsantrasyonunun optimizasyon deneyleri için 1-4 mM aralığında farklı konsantrasyonlar denenmiştir. Diğer reaksiyon bileşen konsantrasyonları sabit tutulup farklı $MgCl_2$ konsantrasyon değerleri kullanılarak *hasA* geninin polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).

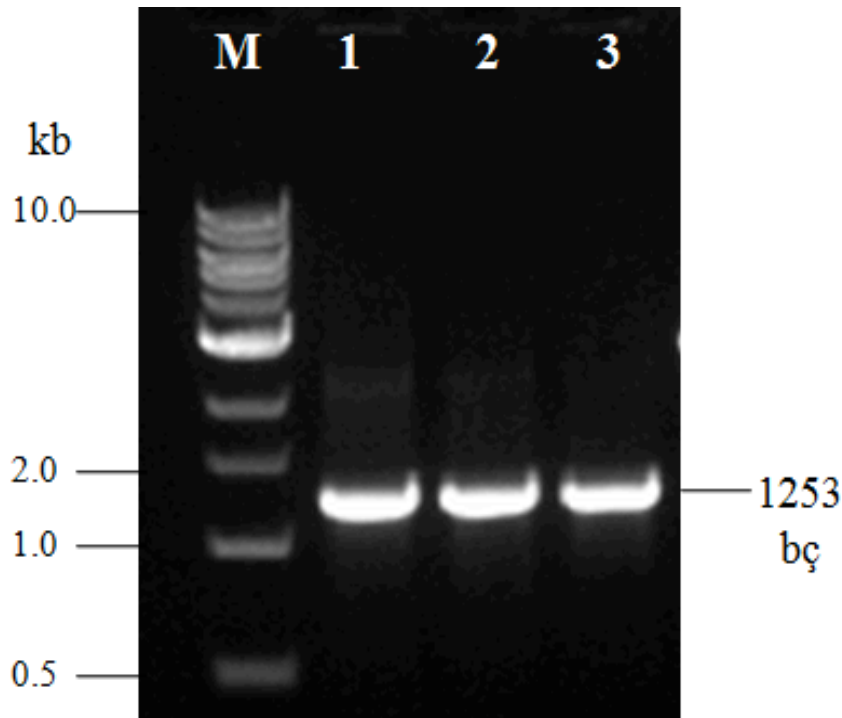


Şekil 4. 5. $MgCl_2$ konsantrasyonu optimizasyonu agaroz jel görüntüsü, **M:** 1 kb DNA ladder, **N:** Negatif kontrol, **1:** 1 mM $MgCl_2$, **2:** 1,5 mM $MgCl_2$, **3:** 2 mM $MgCl_2$, **4:** 2,5 mM $MgCl_2$, **5:** 3 mM $MgCl_2$, **6:** 3,5 mM $MgCl_2$, **7:** 4 mM $MgCl_2$

Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında gerçekleştirilen PCR amplifikasyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Buna göre 1 numaralı kuyuda amplifikasyonun başarılı olmadığı gözlenmiştir. 3 ve 4 nolu kuyudaki fragmentlerin 1.0-1.5 kb arasındaki bölgede beklenen boyutta (1253 bp) amplifiye olduğu görülmektedir. 3 ve 4 nolu kuyu haricindeki diğer örneklerde spesifik olmayan ve silik bantlar gözlenmiştir. 4 nolu kuyuda daha yoğun

bir fragment gözlenmesi nedeniyle *hasA* geni amplifikasyonu için optimum $MgCl_2$ son konsantrasyonu 2,5 mM olarak belirlenmiştir.

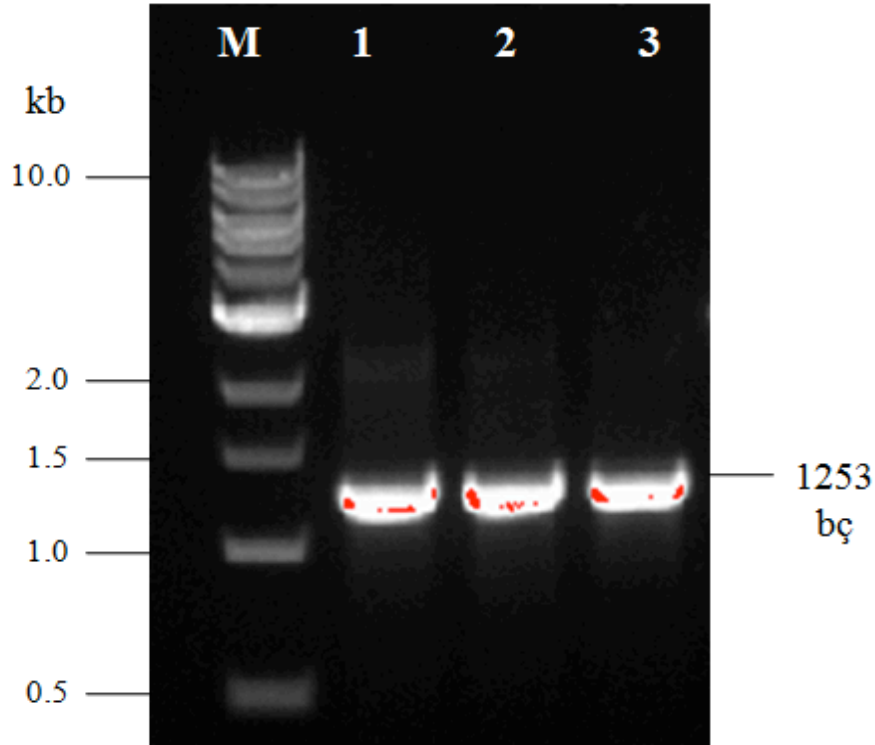
Primer bağlanma sıcaklığının optimizasyonu için 45-50-55°C bağlanma sıcaklıkları denenmiştir. Diğer reaksiyon koşulları sabit tutulup farklı primer bağlanma sıcaklık değerleri kullanılarak *hasA* geninin polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Farklı primer bağlanma sıcaklıkları koşullarında gerçekleşen PCR amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir(Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. Primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu agaroz jel görüntüsü **1:** 45°C bağlanma sıcaklığı, **2:** 50°C bağlanma sıcaklığı, **3:** 55°C bağlanma sıcaklığı

Farklı bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilen PCR amplifikasyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.6).M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Buna göre tüm fragmentlerin 1.0-2.0 kb arasındaki bölgede beklenen büyüklükte amplifiye olduğu görülmüştür. Bunun yanında 1 ve 2 nolu kuyudaki örneklerde spesifik olmayan bantlar da görülmüştür.3 no'lu kuyuda ise spesifik olarak tek bir bandın olması bu koşulun optimum olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bundan sonraki PCR basamaklarında bağlanma sıcaklığının 55°C olacak şekilde kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının ardından Bölüm 3.2.4.2’de belirtilen reaksiyon koşulları ve bileşenleri ile hyaluronan sentaz geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon ürünleri %1’lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Hyaluronan sentaz geninin amplifikasyonu için *Streptococcus equi zooepidemicus*’un genomik DNA’sı kullanılmıştır.



Şekil 4. 7. Amplifiye edilen *hasA* geninin agaroz jel görüntüsü **M:**1 kb DNA ladder, **1, 2, 3:** Amplifiye edilen Streptococcal *hasA* geni

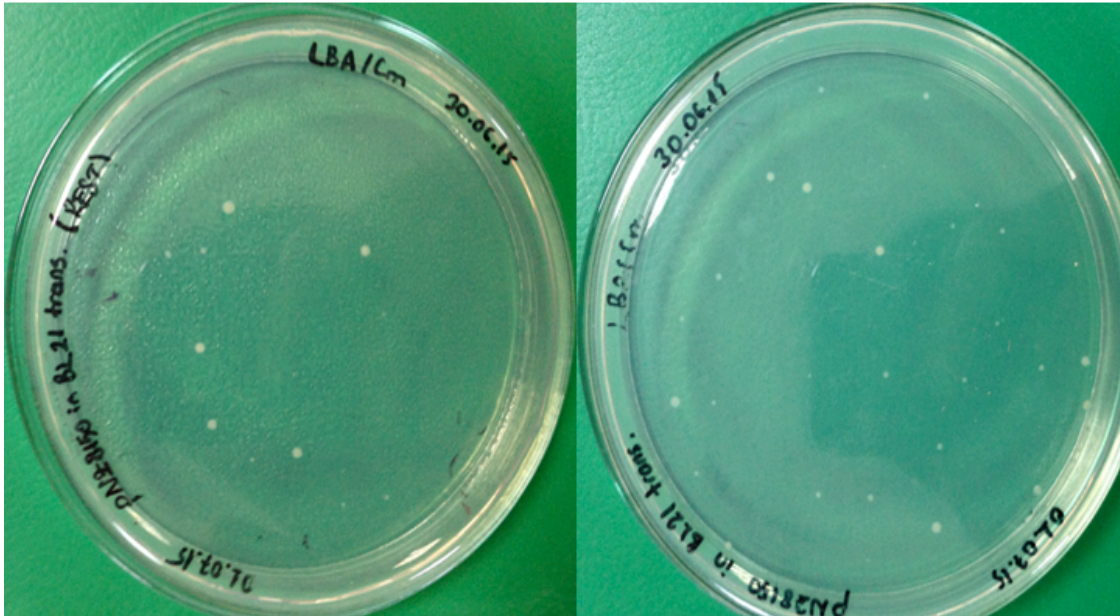
%1’lik agaroz jelde görüntülenen PCR amplifikasyon bantları boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Buna göre optimum koşullarda tüm fragmentlerin 1.0-2.0 kb arasındaki bölgede ve oldukça yoğun olarak amplifiye olduğu görülmüştür.

Klonlama çalışmaları öncesinde agaroz jelde kontrolü yapılan PCR ürünleri Macherey-Nagel PCR Clean-up kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

4.3. pNZ8150’nin *Escherichia coli* İçerisinde Çoğaltılması

Homolog rekombinasyonda $recA^+$ gen ürünü proteinleri önemli bir rol oynamaktadır. Bu genin, DNA tamir mekanizmasında, bakterinin UV-ışınlarına ve X-ışınlarına duyarlı hale gelmesinde rolü vardır. Bu gende oluşan mutasyonlar veya bu geni taşımayan $recA^-$ mutantlarında homolog rekombinasyon meydana gelememektedir. Dolayısıyla sadece klonlama amacıyla kullanılacak bir konak hücrenin klonlanacak gende mutasyon oluşturmasını engellemek için $recA^+$ olması gerekmektedir. Bu çalışmada pNZ8150 vektörünün çoğaltılması amacıyla $recA^+$ bir suş olan *Escherichia coli* BL21 (DE3) konak hücre olarak kullanılmıştır.

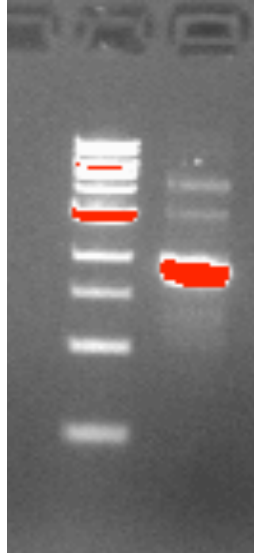
Transformasyon için Bölüm 3.2.11.1’de belirtilen $CaCl_2$ yöntemi ile *E.coli* BL21 (DE3) hücreleri kompetan hale getirilmiş ve pNZ8150 vektörünün kompetan hücrelere transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucunda 10 μ g/ml kloramfenikol içeren LB agar petrilere ekim yapılmıştır ve koloni oluşumu takip edilmiştir. 37°C’de inkübasyona bırakılan petrilere 24 saat sonunda pNZ8150 plazmitini içeren *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerinin çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4. 8. pNZ8150 plazmitini içeren *E.coli* BL21 (DE3) kolonileri

Transformasyonu başarılı olan koloniler seçilerek kloramfenikol içeren LB sıvı besiyerine aktarılmıştır ve 37°C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.

24 saat sonunda sıvı besiyerinde üreme gösteren kolonilerden Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kiti kullanılarak Bölüm 3.2.13'te belirtilen protokol ile plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu sonrasında örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edilmiştir.

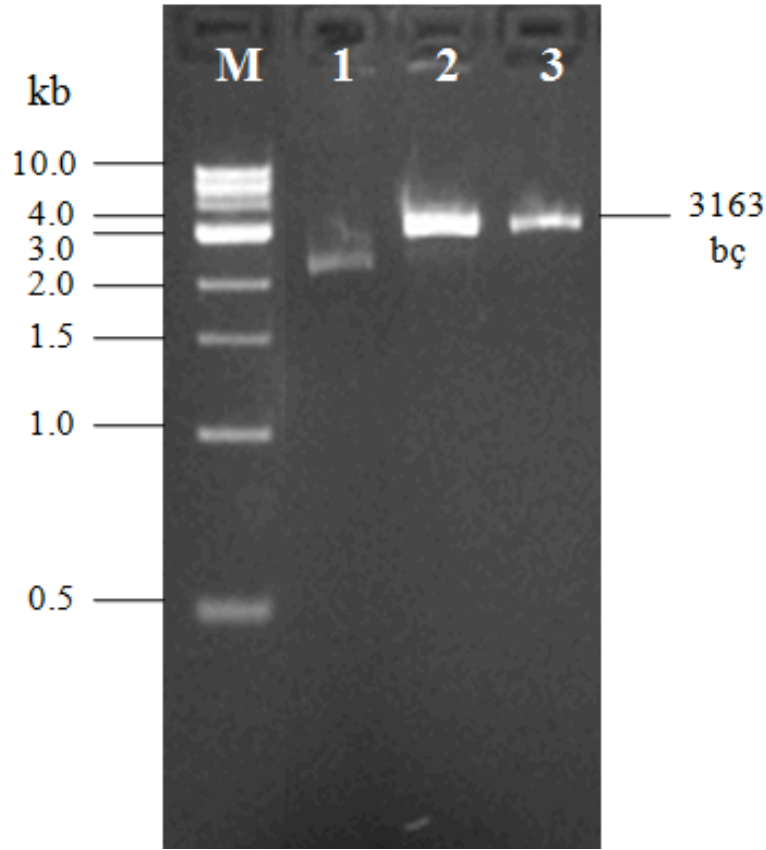


Şekil 4. 9. pNZ8150 vektörünü içeren *E.coli* BL21(DE3) suşundan izole edilen plazmid DNA'nın agaroz jel görüntüsü

%1'lik agaroz jelde kontrolü yapılan bantlar boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. 1 no'lu kuyuda süpersarmal formda bulunan pNZ8150, 1,5-2.0 kb arasında yoğun bir bant vermiştir. Aynı plazmitin halkasal formu ise 2,5-3,0 kb arasında bir bant vermiştir. Agaroz jel görüntüsünün pozitif sonuç vermesi ile pNZ8150 vektörünün çoğaltılması doğru bir şekilde gerçekleşmiştir.

4.4. Plazmid Vektörün Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

Klonlama ve ekspresyon vektörü olarak kullanılan pNZ8150'nin ScaI ve KpnI restriksiyon endonükleazlar ile kesim reaksiyon bileşenleri ve koşulları Bölüm 3.2.6.1.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Bu iki enzim ile kesilen plazmid vektörde bir tane küt, bir tane yapışkan uç oluşturulmuştur. Kesilen plazmit vektörler %2'lik agaroz jelle yüklenmiş ve elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8.).

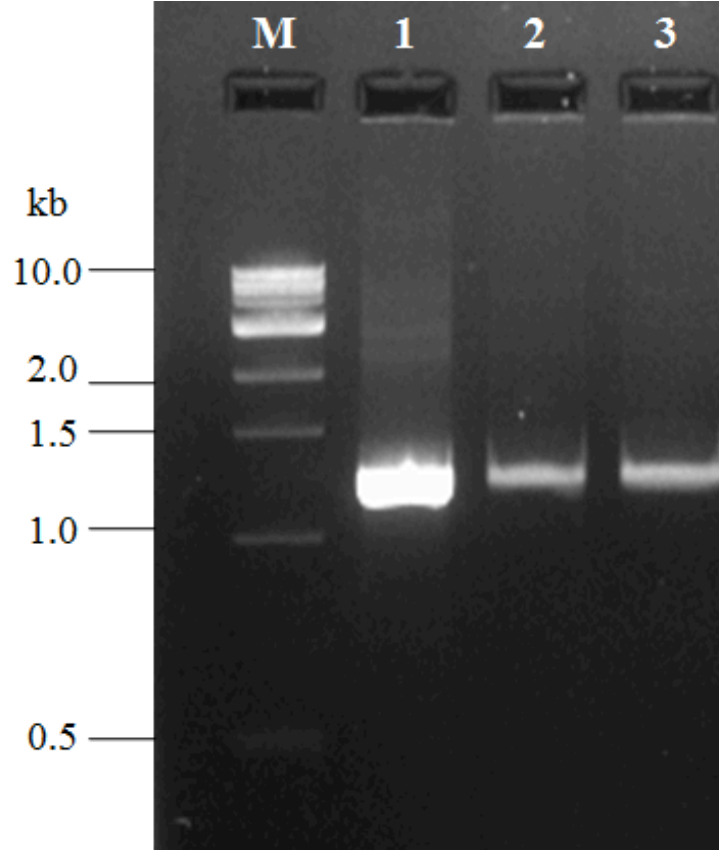


Şekil 4. 10. pNZ8150 restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü **M:** 1 kb DNA ladder, **1:** Halkasal pNZ8150, **2,3:** Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pNZ8150

Agaroz jelde görüntülenen bantlar boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. 1 nolu kuyuda pNZ8150'nin olması gereken 3163 bç'lik büyüklükte değil 2.0-3.0 kb arasındaki bölgede olduğu görülmektedir. Ancak plazmid halkasal formda olduğu için elektrik alan uygulanan agaroz jelde bu şekilde sonuç vermesi beklenen bir sonuçtur. 2 ve 3 nolu kuyulardaki ScaI ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilen pNZ8150 ise lineer yapıda olduğu için 3.0-4.0 kb arasındaki bölgede beklenen uzunlukta olduğu görülmüştür. 2 nolu kuyudaki bantın yoğunluğu daha fazla olduğu için çalışmaya bu örnek üzerinden devam edilmiştir.

4.5. PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi

hasA geninin PCR ürünü sadece yapışkan uç oluşturmak üzere KpnI restriksiyon enzimi ile Bölüm 3.2.6.2'de belirtilen şekilde kesilmiştir. Kesilen örnekler %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sisteminde yürütülerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 11. PCR ürünü kesiminin agaroz jel görüntüsü **M:** 1 kb DNA ladder, **1:** Amplifiye edilen *Streptococcal hasA* geni, **2,3:** Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PCR ürünü

%2'lik agaroz jelde görüntülenen bantlar boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Tüm fragmentlerin 1.0-1,5 kb arasında doğru olarak konumlandığı görülmüştür. KpnI ile kesilen PCR ürünlerinin bir ucundan sadece 8 bp'lik bir bölge uzaklaştırıldığı için %2'lik agaroz jelde bu ayrımı gözle görülür bir şekilde yapmak zordur. Ancak yine de 2 ve 3 nolu kuyulardaki kesim ürünleri ile 1 no'lu kuyu arasında bir fark olduğu ve kesim reaksiyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir.

4.6. Kesilen Ürünlerin Agaroz Jelden Geri Kazanılması

Restriksiyon enzimleri ile kesilen ve %2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforetik olarak analiz edilen örnekler (Şekil 4.8 ve 4.9) daha sonraki ligasyon reaksiyonunda yanlış pozitif sonuçları elemine etmek amacı ile Fermentas GeneJET™ Gel Extraction Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Jel ekstraksiyon kiti kullanılarak saflaştırılan örneklerin saflığının kontrolü ve konsantrasyonlarının belirlenmesi amacı ile NanoDrop

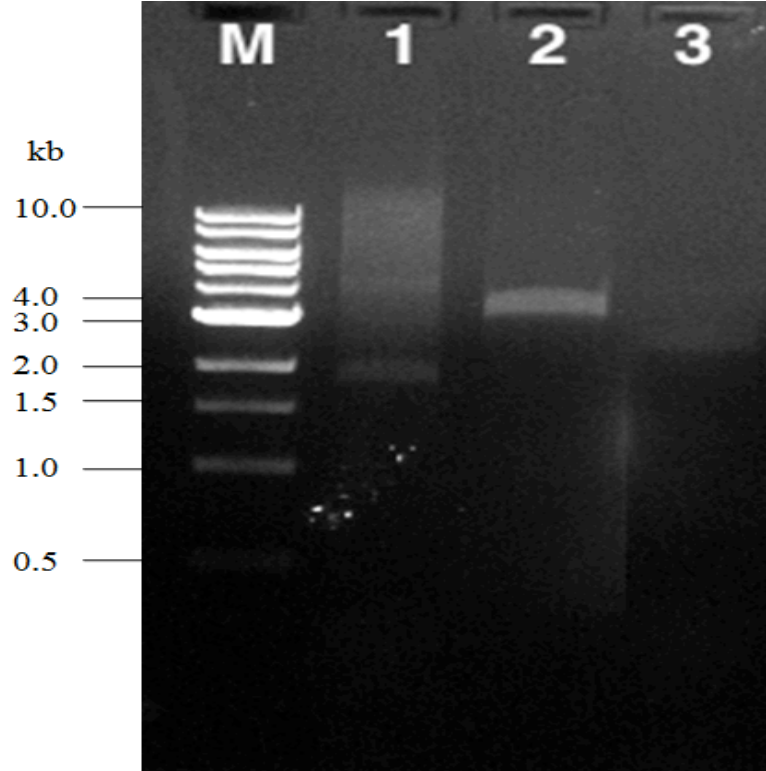
spektrofotometre ile ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). NanoDrop spektrofotometrede alınan sonuçlara göre her iki örneğin de agaroz jelden yeterli miktarda geri kazanıldığı ve 260/ 280 nm'deki absorbanlarına bakılarak önemli ölçüde bir protein kirliliğinin olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. 1. Jel ekstraksiyonu sonrası örneklerin NanoDrop sonuçları

Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen Örnek	Jel Ekstraksiyonu Sonrası Konsantrasyon (ng/μl)	A₂₆₀	A₂₈₀	A_{260/280}
pNZ8150	11,8 ng/μl	0,236	0,140	1,68
PCR Ürünü	25,5 ng/μl	0,509	0,280	1,82

4.7. Ligasyon

Saflaştırılan kesim ürünlerinin ligasyon reaksiyonu Bölüm 3.2.10'da belirtilen reaksiyon bileşenleri ve koşullarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kullanılacak DNA miktarları Şekil 3.2.'de verilen formüle göre hesaplanmıştır. Reaksiyon sonrasında ligasyon ürünü %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sisteminde yürütülerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.10).



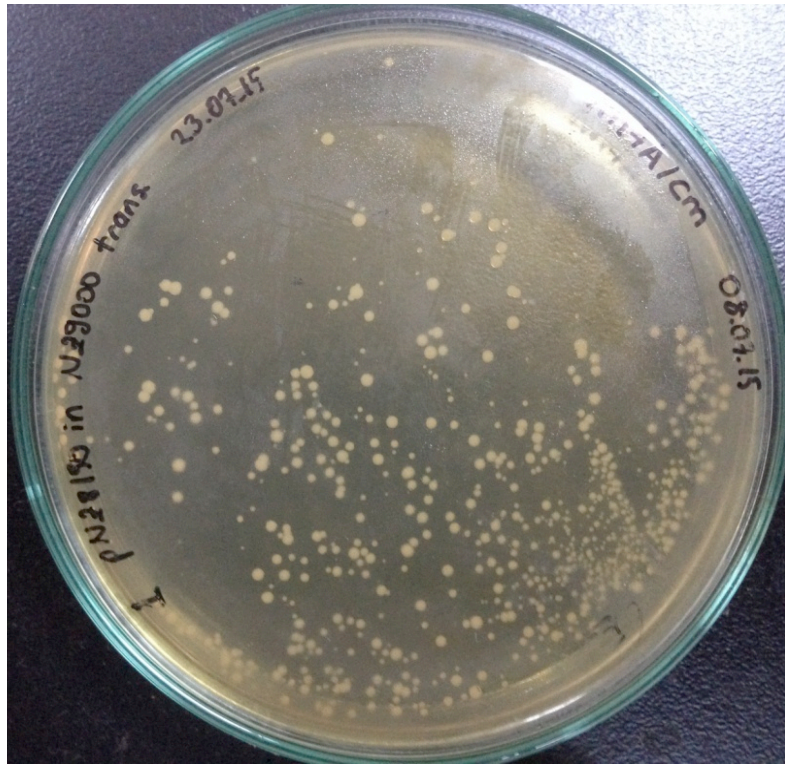
Şekil 4. 12. Ligasyonun kontrolü **M:** 1 kb DNA ladder, **1:**Streptokokal *hasA* geni ampliconu, **2:** ScaI ve KpnI enzimleri ile kesilmiş pNZ8150, **3:** Ligasyon ürünü

%2'lik agaroz jelde görüntülenen bantlar boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. 1 nolu kuyuda Streptokokal *hasA* geni ampliconu 1.5-2.0 kb arasında doğru büyüklükte konumlandığı görülmüştür. 2 nolu kuyuda restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pNZ8150 vektörü 3.0-4.0 kb arasında 3.0 kb'a yakın olarak doğru büyüklükte konumlanmıştır. Ligasyonun başarılı olması durumunda tekrar halkasal form kazanacak ligasyon ürününün Streptokokal *hasA* geni ampliconu ve lineer formdaki kesilmiş pNZ8150 arasında bir büyüklükte olması beklenmektedir. 3 nolu kuyudaki ligasyon ürününü fragmentinin beklendiği gibi diğer iki fragment arasında (2.0-3.0 kb) olduğu görülmüştür.

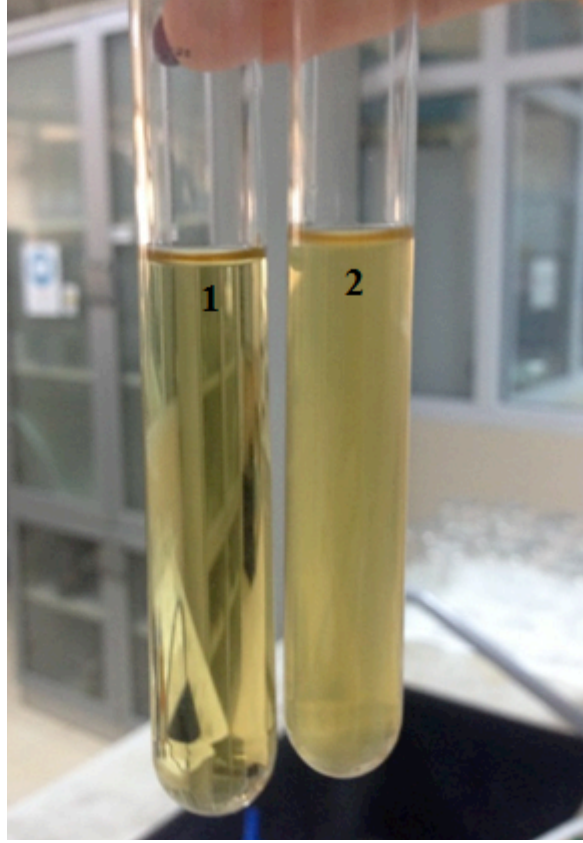
4.8. Ligasyon Ürününün *Lactococcus lactis* Hücrelerine Transformasyonu

Bakteriyel transformasyonda kullanılacak *Lactococcus lactis* NZ9000 hücreleri Bölüm 3.2.11.2'de belirtilen protokole uygun olarak elektrokompentant hale getirilmiştir. Elektroporasyon için 1000 ng ligasyon ürünü ve 40µl elektrokompentant hücre kullanılmıştır. Elektroporasyon Bölüm 3.2.11.2'de belirtilen protokol kullanılarak yapılmıştır.

Elektroporasyon sonrası inkübasyona bırakılan petrilerde koloni oluşumu düzenli olarak kontrol edilmiştir. 48 saat sonunda 10 µg/ml kloramfenikol antibiyotiği içeren M17 agar petrilerinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.12). Transformasyonu başarılı olmuş Cm^R özelliği gösteren koloniler rastgele seçilerek, Cm içeren M17 sıvı besiyerine aktarılmıştır. Sıvı besiyerine aktarılan koloniler 30°C’de statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrasında sıvı besiyerlerinde üreme olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4. 13. Transformasyon sonrasıoluşan koloniler

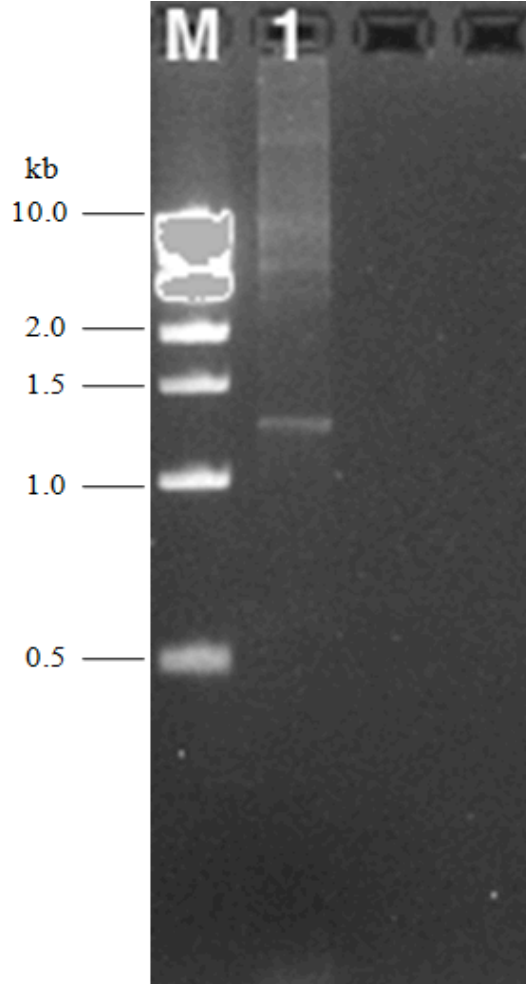


Şekil 4. 14. Transformant koloninin sıvı besiyerinde çoğaltılması**1:** M17 broth, **2:** Cm içeren M17 besiyerinde üreyen transformant suş

4.9. Klonlamanın PCR ve DNA Dizi Analizi ile Kontrolü

Kloramfenikol içeren M17 broth besiyerinde kültüre edilen 20 adet koloninin aşılı kültürü oluşturulmuş ve gen klonlanmasının kontrolü amacıyla Fermentas GeneJET™ Plazmid Miniprep Kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu Bölüm 3.2.13'te belirtilen protokol ile gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu sonrasında elde edilen plazmid DNA %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sisteminde yürütülerek değerlendirilmiştir.

Agaroz jel elektroforez analizi sonucu insert DNA'yı yapısında bulundurduğu düşünülen bir transforme koloni seçilerek *hasA* geninin varlığı açısından kontrol edilmek üzere primer A ve primer B ile kontrol polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol PCR Bölüm 3.2.4.2'de belirtilen reaksiyon bileşenleri ve koşullarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda örnek %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve elektroforez sistemi kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4. 15. Kontrol PCR'ı; **M:** 1 kb DNA ladder, **1:** Ligasyon ürünü,amplikon

%1'lik agaroz jelde görüntülenen bantlar boyut ve yoğunluklarına göre değerlendirilmiştir. M kuyusunda marker olarak 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Kontrol PCR'ın agaroz jel elektroforezi analizine göre 1.0-1.5 kb arasındaki bölgede 1254 bp uzunluğundaki *hasA* geninin amplifiye olduğu gözlenmiştir. Ancak kontrol PCR koşulları optimize edilmeden amplifikasyon gerçekleştirildiği için bu bant dışında spesifik olmayan bantlar da gözlenmiştir (Şekil 4.16). Bu nedenle spesifik olmayan bantların ve ortamdaki diğer PCR bileşenlerinin elimine edilmesi amacıyla agaroz jelden saflaştırma yapılmıştır. Daha sonra DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizi için doğrusal PCR 5 pmol/µl konsantrasyonda A ve B primerlerinin her ikisi ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi sonuçları Chromas 2.4. yazılımı ile analiz edilmiştir. Elde edilen dizi veritabanındaki referans *hasA* gen dizisi ile karşılaştırılmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen kromatogram grafiği kontrol edilerek doğru okumayan

diziler değiştirilmiş ve primer bağlanma bölgeleri çıkartılmıştır. Karşılaştırılmalı gen analizleri NCBI “National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)” veritabanındaki BLAST programı ile gerçekleştirilmiştir.

```

referans      ATGAGAACATTAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTG
hasA         -----

referans      ATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCATTTATGGCTTTTTG
hasA         -----GGAAGCTTGTCATTTATGGCTTTTTG
                *****

referans      CTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGA
hasA         CTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGA
                *****

referans      AGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCA
hasA         AGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCA
                *****

referans      TTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTT
hasA         TTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTT
                *****

referans      GTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGAC
hasA         GTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGAA
                *****

referans      ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTCCCGGTCAGAAAAAATCAAGGAAAGCGT
hasA         ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTCCCGGTCAGAGAAAAATCAAGGAAAGCGT
                *****

referans      CATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCA
hasA         CATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCA
                *****

referans      GATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAAC
hasA         AATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAAC
                *****

referans      GTTTTTGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGC
hasA         GTTTTTGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGC
                *****

referans      TTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCAATCCGTTACA
hasA         TTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCAATCCGTTACA
                *****

referans      GGTAATATTCTCGTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCC
hasA         GGTAATATCCTTGTTGCTCAGGTCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCC
                *****

referans      AACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGAC
hasA         AACATAGATAAATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGAC
                *****

referans      AGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAA
hasA         AGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAA
                *****

referans      TGTATTACAGATGTTCCGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAACCGCTGGAAC
hasA         TGTATTACAGATGTTCCGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAACCGCTGGAAC
                *****

```

```

referans      AAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGTA
hasA          AAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGTA
*****

referans      GCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTTTATTCTGTGGTGGAT
hasA          GCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTTTATTCTGTGGTGGAT
*****.**** *

referans      TTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTTCTGGTGATT
hasA          TTCTTTGNAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCA-GGTTTATAGCCTTTTCNGGTGATA
*****.*****.*****.*****.*****.*****:

referans      ATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCGTAATATTCATCTATATGCTTAAGCACCCGCTGTCCCTC
hasA          TCCTTCATTN-NGCTCTTTGNCGN-ACATTCA-TNCATGCTTAANCA-CCGCTGTCCCTC
: ***** .*****.***. * ***** * ***** ** *****

referans      TTGTTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCATTTGTTTGTCCCTACAGCCCTTGAAATTGTAT
hasA          TTG---TNTCTCNTTTTANGGGNGCTGCNTT-----
*** * ** .****.****.**** **

referans      TCTCTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAATAAATTATTATAA
hasA          -----

```

Referans *hasA* gen dizisi ile elde edilen *hasA* gen dizisinin karşılaştırılması sonucunda iki gen dizisinin %99.11 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Dizilerin karşılaştırılmasında görülen delesyonların genin işlevsel ve yapısal bölgesinde etkili olmadığı düşünülmüştür. Elde edilen rekombinant suş CES15 olarak isimlendirilmiştir.

4.10. Ekspresyonun Kontrolü

4.10.1. Hyaluronik asit üretimi ve ekstraksiyonu

Streptococcus equi zooepidemicus'un genomik DNA'sından elde edilen *hasA* geninin pNZ8150 vektörü aracılığıyla *Lactococcus lactis* NZ9000 suşuna başarılı bir şekilde transformasyonundan sonra hyaluronik asit üretimi belirlenerek genin ekspresyonu kontrol edilmiştir. Çalışmada *Lactococcus lactis*'te yaygın olarak kullanılan indüklenebilir bir promotor olan nisin ekspresyon sistemi kullanıldığı için ekspresyon nisin ile indüklenmiştir.

Aşı kültür Bölüm 3.2.15.1'de belirtilen şekilde oluşturulmuştur. Aşı kültürün OD₆₀₀ değeri yaklaşık olarak 3 olduğunda %4 inokülasyon ile % 0,5 glukoz ve 10 µg/ml kloramfenikol içeren M17 sıvı besiyeri ortamına ekim yapılmıştır ve 30 °C'de statik olarak bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra spektrofotometrede OD₆₀₀ değeri

belirlenmiştir (Çizelge 4.2). OD₆₀₀ değeri bilinen kültüre nisin indüklemesi yapılmıştır. Nisin stok çözeltisi Bölüm 3.1.2.2.'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Nisin miktarının optimizasyonu için 0- 2- 5- 7,5- 10 ve 12,5 ng/ml nisin son konsantrasyonları denenmiştir. Optimizasyon için denenecek konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri, nisin stok çözeltisinin steril su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır.

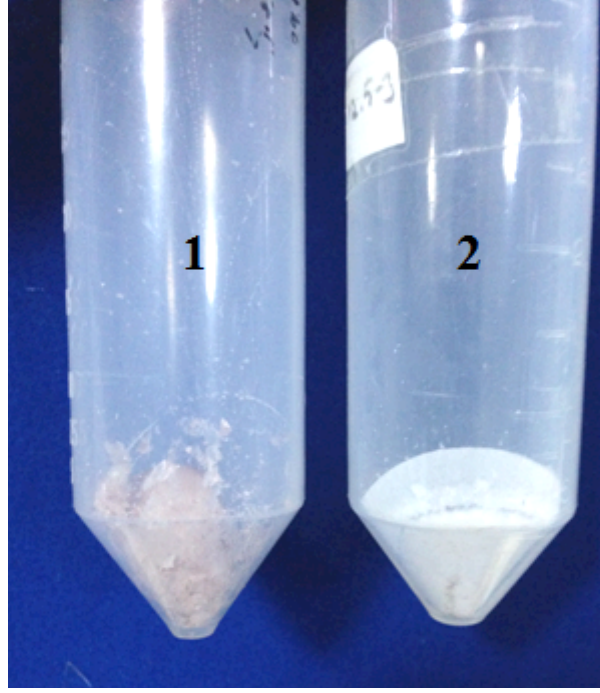
Hazırlanan nisin çalışma çözeltileri % 0.5 glukoz ve 10 µg/ml kloramfenikol içeren M17 sıvı besiyeri ortamında inkübe olan kültüre eklenmiştir. 3 saat 30 °C'de statik olarak nisin indüklemesi yapılan kültürlerin inkübasyon sonrası spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. Kültürlerin nisin ile indüklenmeden önce ve sonra OD₆₀₀ değerleri

Nisin Miktarı	Nisin İndüklemesinden Önce OD ₆₀₀	Nisin İndüklemesinden Sonra OD ₆₀₀
0 ng/ml	0,219	0,861
2 ng/ml	0,219	0,855
5 ng/ml	0,226	0,828
7,5 ng/ml	0,221	0,87
10 ng/ml	0,236	0,871
12,5 ng/ml	0,234	0,864

Rekombinant suşun hyaluronik asit üretim yeteneğinin belirlenmesinde pozitif kontrol olarak *Streptococcus equi zooepidemicus* suşu kullanılmıştır. *Streptococcus equi zooepidemicus* Bölüm 3.2.15.2'de belirtilen hyaluronik asit üretim ortamında 20 saat inkübe edilmiştir.

Her iki suşun inkübasyonlarının ardından Bölüm 3.2.15.3'te belirtilen ekstraksiyon yöntemi ile hyaluronik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında vakumlu konsantratör cihazında kurutulan peletler -20°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 4.17.).



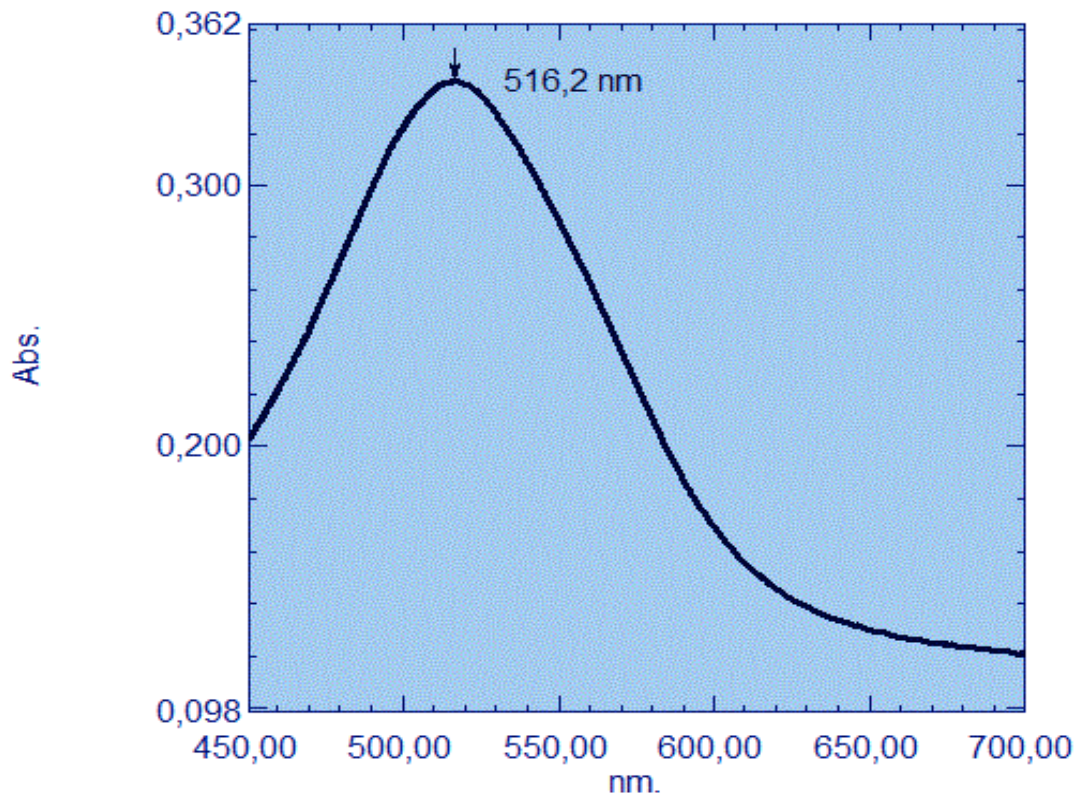
Şekil 4. 16. HA ekstraksiyonu sonrasında kurutulan pelletler **1:** *Streptococcus equi zooepidemicus*'tan elde edilen HA pelleti **2:** Transformant *Lactococcus lactis* CES15'den elde edilen HA pelleti

4.10.2. Karbazol yöntemi ile hyaluronik asit ölçümleri

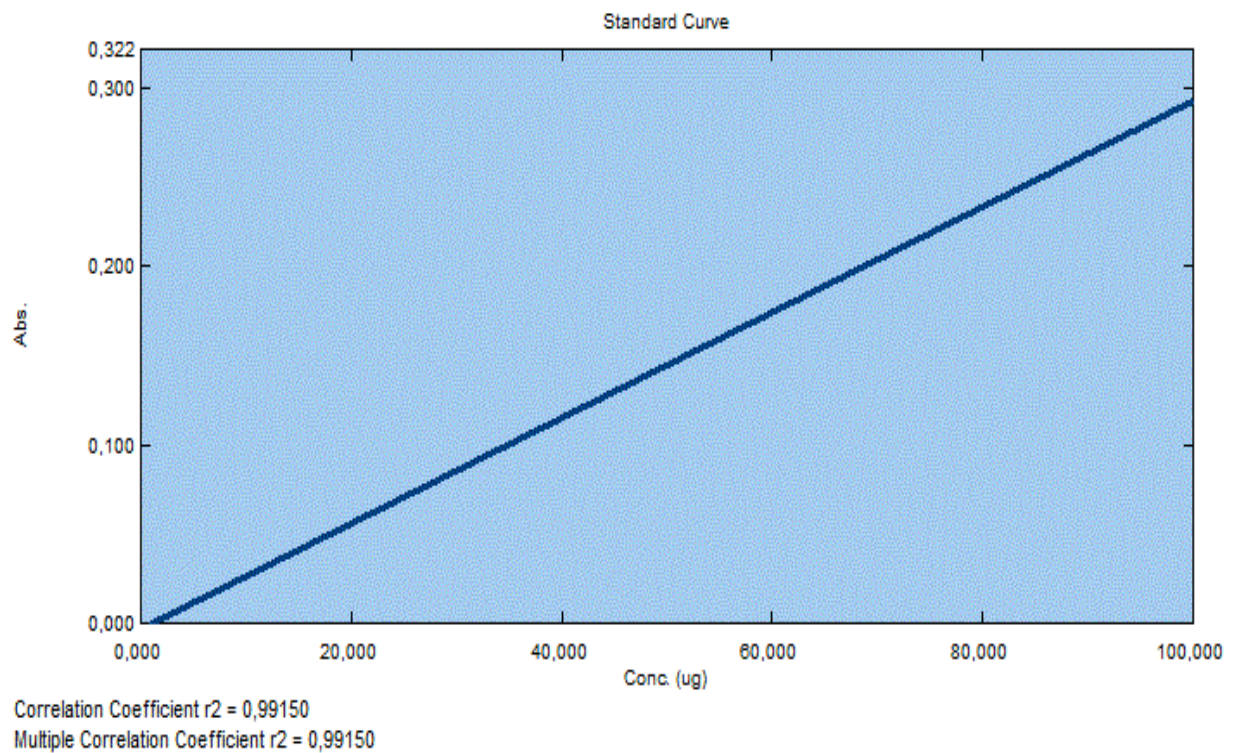
4.10.2.1. Glukuronik asit standart grafiğinin hazırlanması

Standart grafiğın hazırlanması amacıyla Santa Cruz Biotechnology'den temin edilen saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart glukuronik asit (GlcA) kullanılmıştır.

Öncelikle glukuronik asit'in maksimum absorbans verdiği değer belirlenmiştir ve çalışmalar bu dalga boyunda yapılmıştır (Şekil 4.17.). Standart grafik için glukuronik asitin 5- 100 µg/ml'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Karbazol yöntemi ile 516 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek glukuronik asitin µg/ml'ye karşılık gelen standart grafiğı elde edilmiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4. 17. GlcA maksimum absorbansının belirlenmesi



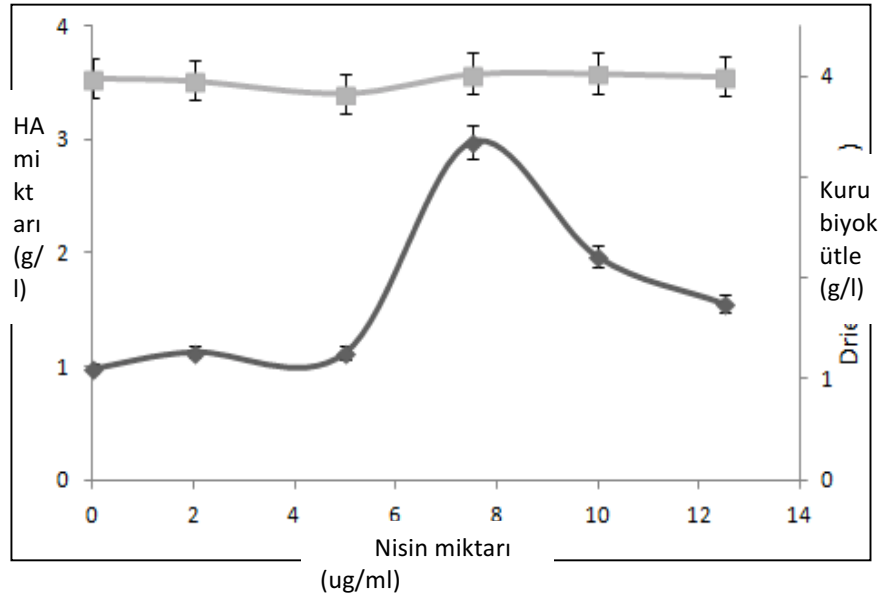
Şekil 4. 18. Glukuronik asit standart grafiği

4.10.2.2. Hyaluronik asit miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon sonrasında vakumlu konsantratör cihazında kurutulan peletler 0,15 M NaCl çözeltisi ile resüspanse edilmiştir. Hyaluronik asit miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi için karbazol yöntemi kullanılmıştır. Örneklerin 516 nm’de glukuronik asit standart eğrisi dikkate alınarak absorbans değerleri belirlenmiş ve mg/ml cinsinden ifade edilmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4. 3.Hyaluronik asit miktarı

Suş	Nisin Miktarı ($\mu\text{g/ml}$)	Hyaluronik asit miktarı (mg/ml)
Transformant <i>L.lactis</i> CES15	0	0,9832
	2	1,1317
	5	1,1209
	7,5	2,9746
	10	1,9684
	12,5	1,1555
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	-	4,4924

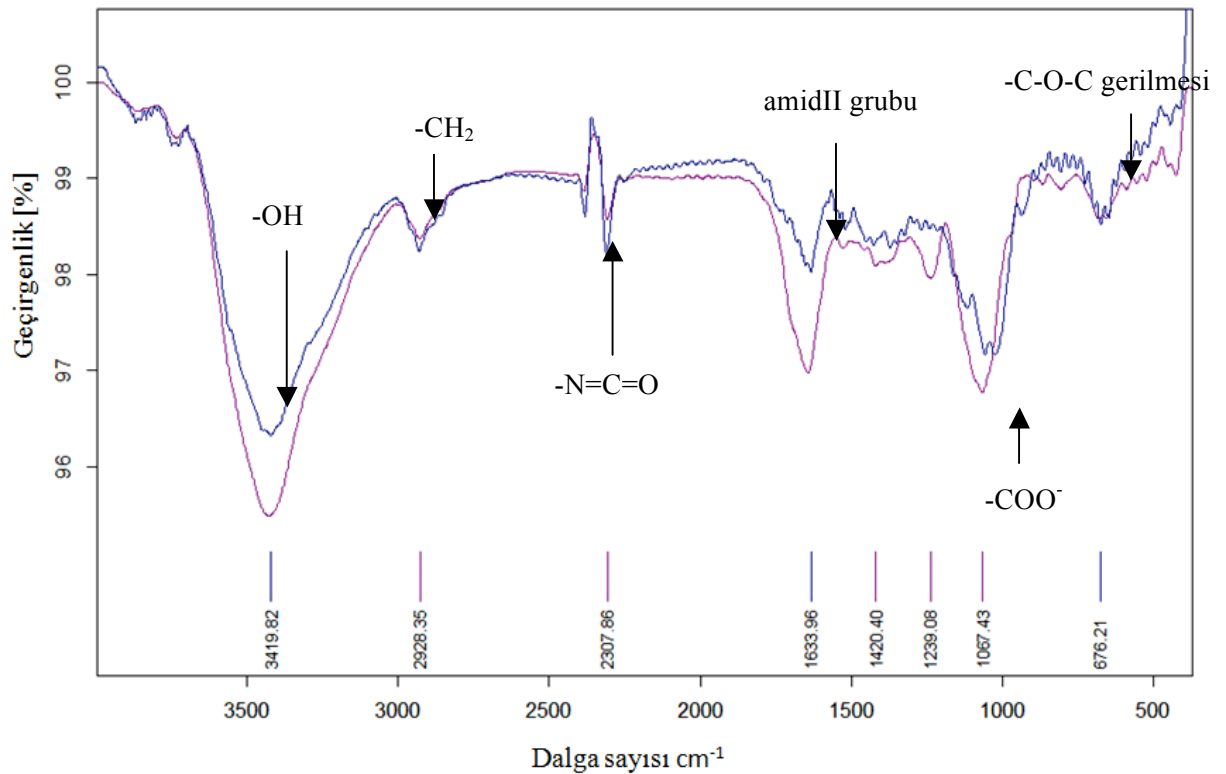


Şekil 4. 19. Farklı nisin konsantrasyonlarında üretilen HA-kuru biyokütle ilişkisi (Açık gri; Kuru biyokütle; koyu gri; HA miktarı)

Değişen nisin konsantrasyonlarına karşı üretilen HA miktarının belirli bir konsantrasyona kadar arttığı bu konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda ise düşmeye başladığı gözlenmiştir. Nisinin bakteriyosidal etkisi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışma kapsamında en yüksek HA üretiminin belirlendiği 7,5 ng/ml nisin konsantrasyonunun ilk defa denendiği gözlenmiştir. Diğer çalışmalarda ya daha az nisin konsantrasyonları ile indükleme yapılmış, ya da bu konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda çalışılmıştır.

4.11. Hyaluronik Asit'in FTIR Analizi ile Karakterizasyonu

Streptococcus equi zooepidemicus ve transformant *Lactococcus lactis* CES15 suşu tarafından üretilip ekstrakte edilen hyaluronik asitin FTIR spektrumu karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20.'de verilmiştir. Buna göre hyaluronik asitin 3419 cm^{-1} boyunda -OH bağı geriliminden kaynaklanan bir bant, yaklaşık 1633 cm^{-1} dalga boyunda proteinler için karakteristik olan amid II bant, 1420 cm^{-1} 'de gösterdiği bant COO- gerilmeden, yaklaşık 676 cm^{-1} 'deki bant ise C-O-C titreşimlerinden kaynaklanmaktadır



Şekil 4. 20. Hyaluronik asit FTIR spektrumu (____: *Streptococcus equi zooepidemicus*, ____: 7.5µg/ml nisin ile indüklenen Rekombinant *Lactococcus lactis* CES 15)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hyaluronik asit, biyouyumlu olması ve viskoelastik özelliklerinden dolayı kozmetik, medikal ve farmasötik uygulamalarda ideal bir biyomalzeme olarak yer almaktadır. Hyaluronik asit ve türevlerinin farklı formülasyonları yara iyileştirilmesinde, estetik cerrahide dolgu malzemesi olarak, doku mühendisliği uygulamalarında temel destek malzemesi olarak, ortopedik uygulamalarda ve kozmetik uygulamalarda çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Allison ve Grande-Allen, 2006; Prestwich ve ark, 2011). Hyaluronik asitin 2005 yılında Dünya'daki pazar payının 1 milyar doların üzerinde olduğu bilinmektedir (Chong et al., 2005). Millennium araştırma grubunun sunduğu rapora göre de 2017 yılına kadar bu rakamın 2,5 milyar dolara yaklaşması beklenmektedir. Bu önemli biyopolimer ihtiyacını karşılamada ülkemiz ise tamamen dışa bağımlı olduğu için bu biyopolimerin yerli üretimi oldukça önemlidir. Hyaluronik asit'in ticarileştirilmiş ürünlerinden bazıları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5. 1. Hyaluronik asit'in ticarileşmiş ürünleri (Brown ve Jones, 2005)

Hastalık	Uygulamalar	Ticari Ürünler
Osteoartrit	Eklemler için mekanik destek ve yağlama	Hyalgan® (Fidia, İtalya), Artz® (Seikagaku, Japonya), ORTHOVISC® (Anika, Amerika) Healon®, Opegan® ve Opelead®
Ameliyat ve yara iyileşmesi	Yapay göz içi lens implantasyonu için viskoelastik jel	Bionect®, Connettivina® ve Jossalind®
Embriyo implantasyonu	İnvitro fertilizasyon için kültür ortamında kullanımı	EmbryoGlue® (Vitrolife, Amerika)

Geleneksel olarak horoz ibiğinden ekstraksiyon ile elde edilen hyaluronik asit, biyomedikal ve ilaç uygulamalarında hayvansal kaynaklı bileşenlerin kullanımı üzerine artan endişe nedeni ile yerini alternatif mikrobiyal fermentasyon üretimine bırakmıştır. Mikrobiyal fermentasyon ile daha düşük üretim maliyetleri ve daha az çevre kirliliği sağlanmıştır (Chien ve Lee, 2007; Liu vd., 2008). Mikrobiyal fermentasyon ile ilk ticari hyaluronik asit üretimi endüstriyel üretimde mevcut olarak kullanılan *Streptococcus zooepidemicus* suşundan yapılmıştır (Chong ve Nielsen, 2003a; Chong ve Nielsen, 2003b; Krahulec ve Krahulcova, 2006).

Genel olarak hyaluronik asitin bakteriyal fermentasyon ile üretimi C grubu patojen streptokoklar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Boeriu vd., 2013) (Çizelge 5.2). Endüstriyel ölçekte mikrobiyal HA üretimi ilk olarak 1980’li yıllarda Shiseido tarafından gerçekleştirilmiştir. HA üretiminde çoğunlukla kullanılan suş olan *S. zooepidemicus*’un uygun kültür koşulları altında 6~7 g/l hyaluronik asit ürettiği bilinmektedir (Liu vd., 2011). *Streptococcus zooepidemicus* suşu kullanılarak mikrobiyal fermentasyon ile HA üretim çalışmalarından bazıları aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 5. 2. *Streptococcus zooepidemicus* suşu ile HA üretim çalışmaları (Liu vd., 2011)

Mikroorganizma	Kültür modu	Kültür ortamı	Havalandırma parametreleri	HA konsantrasyonu ve moleküler ağırlık	Referanslar
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (ATCC 35246)	Kesikli, 2,5 l	Maltoz 20g/l, CDM	600 rpm 1.3 vvm	[HA]: 2.14 g/l MW:2.1 X10 ⁶ Da	Fong Chong ve Nielsen,2003
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (ATCC 39920)	Kesikli, 3,7 l	CDM	400 rpm 1 vvm	[HA]: 3.66 g/l MW:3.8 X10 ⁶ Da	Jagannath ve Ramachandran,2010
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (ATCC 35246)	Kesikli, 2 l	Glukoz 60 g/l, CDM	600 rpm 1 vvm	[HA]: 4.2 g/l MW:3.2 X10 ⁶ Da	Armstrong vd.,1997
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (WSH-24)	Kesikli, 7 l	Maya özütü 25 g/l, sükroz 70 g/l	220 rpm 0.5 vvm	[HA]: 6.7 g/l MW:-	Liu vd., 2009
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> NJUST01	Kesikli, 500 ml	Nişasta 50 g/l, glukoz 3 g/l, pepton 5 g/l	220 rpm	[HA]: 6.7 g/l MW:-	Zhang vd., 2007
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 35246)	Kesikli, 2 l	Glukoz 20 g/l, maya özütü 10 g/l	600 rpm 0.3 vvm	[HA]: 2.1 g/l MW:-	Johns vd., 1994
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 39920)	Kesikli, 3 l	Glukoz 20 g/l, maya özütü 10 g/l	300 rpm 1 vvm	[HA]: 2.3 g/l MW:-	Huang vd.,2006

Çizelge 5. 2 (Devam) *Streptococcus zooepidemicus* suşu ile HA üretim çalışmaları

Mikroorganizma	Kültür modu	Kültür ortamı	Havalandırma parametreleri	HA konsantrasyonu ve moleküler	Referanslar
----------------	-------------	---------------	----------------------------	--------------------------------	-------------

				ağırlık	
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> WSH-24	Kesikli, 7 l	Maya özütü 25 g/l, sükröz 70 g/l	200 rpm 0.5 vvm	[HA]: 6.6 g/l MW:-	Liu vd., 2009
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 39920)	Kesikli- beslemeli, 2.5 l	Glukoz 5 g/l, maya özütü 2.5 g/l	%20 DO	[HA]: 3.5g/l MW:-	Chen vd., 2009
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 35246)	Sürekli kültür, 2 l	Glukoz 15 g/l, maya özütü 10 g/l	200 rpm 0 vvm	[HA]: 0.6g/l MW:-	Blank vd., 2005
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 39920)	Tekrarlanan kültür, 3 l	Glukoz 20 g/l, maya özütü 10 g/l, tripton 1.7 g/l, soyton 0.3 g/l	%10 DO	0.59 g HA/(1·h) MW:-	Huang vd., 2008
<i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (KCTC1139BP)	Kesikli, 75 l	Glukoz 40 g/l, maya özütü 7.5 g/l, kazein pepton 10 g/l	400 rpm 0.5 vvm	[HA]: 6.94 g/l MW:5.9 X10 ⁶ Da	Im vd.,2009
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> WSH-24	Kesikli, beslemeli, 7 l	Maya özütü 25g/l, sükröz 70 g/l	200 rpm 0.5 vvm	[HA]: 6.6g/l MW:-	Liu vd., 2008
<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (ATCC 35246)	Kesikli, 2 l	Midye işleme atık suyu 50 g/l, ton balığı peptonu 8 g/l	500 rpm 0 vvm	[HA]: 2.46 g/l MW: 2.5 X10 ⁶ Da	Vázquez vd., 2010

Streptococcus zooepidemicus ile fermentasyon süreçlerinde ortaya çıkan bakteriyel endotoksinler, ağır metaller, proteinler ve nükleik asitler gibi kontaminasyon riskleri, patojen olmayan rekombinant suşlardan hyaluronan üretimini önemli hale getirmiştir. Özellikle son yıllarda patojenik *S. zooepidemicus* ve kanatlı ürünlerinden kaynaklanan endişeler nedeni ile rekombinant mikroorganizmalar ile HA üretimi cazip bir alternatif kaynak olmuştur. *Bacillus* sp., *L. lactis*, *Agrobacterium* sp. ve *E. coli* gibi birçok gram pozitif ve gram negatif bakteri suşu ile rekombinant HA üretimi çalışması yapılmıştır (Liu vd., 2011). Bu çalışmalar Çizelge 5.3'te gösterilmiştir.

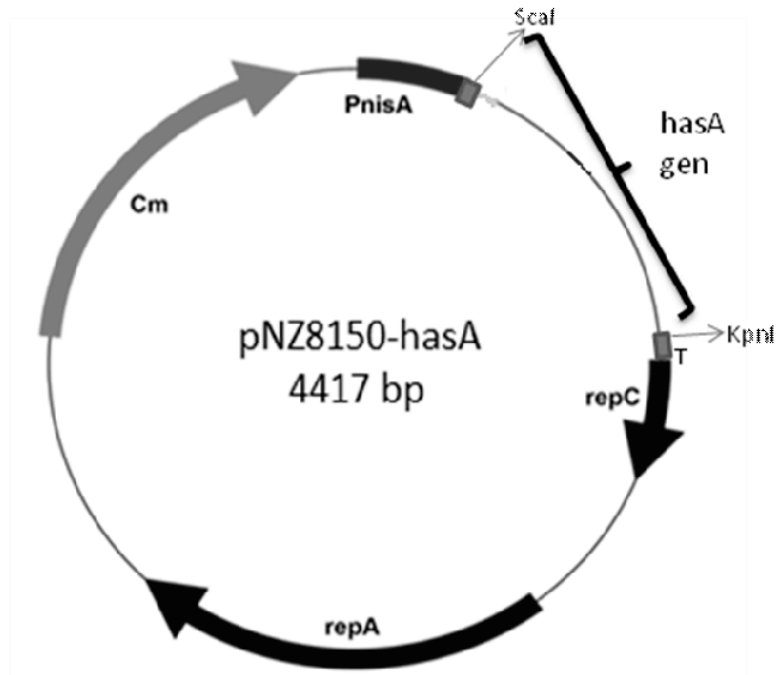
Bu çalışmada hyaluronik asit metabolizmasında yer alan hyaluronan sentaz geninin bir laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis*'te ekspresyonu hedeflenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle hyaluronik asit üreticisi olan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 'un hyaluronan sentaz enzimini kodlayan *hasA* geni; 5' ve 3' ucuna spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu çalışmada *hasA* geninin entegre edildiği plazmid vektör haritası Şekil 5.1'de gösterilmiştir.

“*hasA*” geninin amplifikasyonu için gerçekleştirilecek polimeraz zincir reaksiyonunun etkinliğinin artırılması ve reaksiyon koşullarının test edilmesi amacı ile gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinde $MgCl_2$ konsantrasyonunda ve primer bağlanma sıcaklığında değişiklikler yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyon karışımında kullanılan temel bileşenler kalıp DNA, primerler, nükleotidler (dNTP), DNA polimeraz enzimi, tampon çözelti ve magnezyumdan oluşmaktadır. Kullanılan bu temel bileşenlerin miktarı ve kalitesi reaksiyon sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle kullanılan bileşenlerin miktarının optimize edilmesi spesifik olmayan amplifikasyon, PCR ürününün zayıf olması, reaksiyonun çalışmaması ve beklenmedik ürünlerin ortaya çıkmasını engellemek için gerekli bir basamaktır.

Çizelge 5. 3. Hyaluronik asitin rekombinant üretim ile elde edildiği çalışmalar (Liu vd., 2011)

Bakteri	Kültür modu	Besiyortamı	Havalandırma Oranı	HA kons., polimer üretim süresi, molekül ağırlığı	Kaynakça
Recombinant <i>Lactococcus lactis</i> (<i>hasA-hasB</i>)	Kesikli, 250 ml	M17 ortam, 10 g/l glukoz	170 rpm sıvı hacim 50 ml (250 ml'de)	[HA]: 0.65 g/l MW:N.A. Üretim: 16 h	Chien ve Lee, 2007a
Recombinant <i>Bacillus subtilis</i> (<i>hasA-hasD-VHb</i>)	Kesikli, 250 ml	Modifiye minimal ortam, 10 g/l glukoz	170 rpm sıvı hacim 50 ml (250 ml'de)	[HA]: 1.8 g/l MW:N.A. Üretim: 30 h	Chien ve Lee, 2007b

Recombinant <i>Bacillus subtilis</i> RB161 (<i>hasA-tuaD-gtaB</i>)	Besl.-kesikli, 3 l	Minimal medium with sucrose	1300 rpm 1.5 vvm	[HA]: - MW: 1 X10 ⁶ Da Üretim: 20 h	Widner vd., 2005
Recombinant <i>Escherichia coli</i> (<i>sshA-ssugD</i>)	Besl.-kesikli, 250 ml	LB ortam	Sıvı hacim 40 ml (250 ml'de)	[HA]: 190 mg/l MW: 3.5 X10 ⁵ - 1.9 x10 ⁶ Da Üretim: 48 h	Yu vd., 2008
Recombinant <i>Agrobacterium</i> sp. (<i>pmHas-kfiD</i>)	Kesikli, 250 ml	LB ortam	250 rpm sıvı hacim 50 ml (250 ml'de)	[HA]: 0.3 g/l MW: 0.7 X10 ⁶ - 2X10 ⁶ Da Üretim: ~8 h (indüksiyon süresi: 4 h)	Mao vd., 2007
Recombinant <i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i> (<i>hasA-hasB-hasC-hasD-hasE</i>)	Kesikli, 2 l	Glukoz 20 g/l, uridin 50 mg/l, CDM	300 rpm 0 vvm	[HA]: - MW: 1.8 X10 ⁶ - 3.4 x10 ⁶ Da Üretim: N.A.	Chen vd., 2009
Recombinant <i>Escherichia coli</i> (<i>pmHas-kfiD</i>)	Besl.-kesikli, 1 l	Glukoz 45 g/l, GlcNAc 11.8 g/l	10% DO	[HA]: 3.8g/l MW: N.A. Üretim: 30 h	Mao vd., 2009
Recombinant <i>Escherichia coli</i> (with rare <i>sz-hasA</i> codon modification)	Kesikli	LB ortam	-	[HA]:32.5 µg/ml MW: N.A. Üretim: ~3 h (indüksiyon süresi: 4 h)	Jongsareejit vd., 2007
Recombinant <i>Lactococcus lactis</i> (<i>hasA-hasB-hasC-hasD-hasE</i>)	Kesikli, 2.4 l	M17 ortam, 20 g/l glukoz	200 rpm 1 vvm	[HA]: 1.8 g/l MW: N.A. Üretim: ~ 28 h	Prasad vd., 2010
Recombinant <i>Streptococcus thermophilus</i> (<i>hasA-hasB</i>)	Kesikli, 2 l	%1 laktöz içeren M17 ortam	100 rpm, 0 vvm	[HA]: 1.2 g/l MW: 1 x10 ⁶ Da Üretim: 24 h	Izawa vd., 2011
Recombinant <i>Bacillus subtilis</i> (PmHAS/tuaD-gtaB)	Kesikli, 100 ml	Minimal tuz ortamı, 2% glukoz	200 rpm	[HA]: 6.8 g/l MW: 4.55 MDa Üretim: 50 h (indüksiyon süresi: 2 h)	Jia vd., 2013
Bu tez çalışması	Kesikli, 250 ml	M17G medium, 2 g/l glukoz	Statik, 0 vvm, sıvı hacim 50 ml (250 ml'de)	[HA]: 2.99 g/l MW: N.A. Üretim: 6 h (indüksiyon süresi: 3 h)	-



Şekil 5. 1. Plazmid vektör haritası (Elde edilen pNZ8150-hasA vektörü; kısaltmalar PnisA, nisin A promoter bölgesi içeren ribozomal bağlanma bölgesi; T, çoklu klonlama bölgesi; repC, Replikasyon geni C; repA, Replikasyon geni A; Cm; Kloramfenikol direnç bölgesi)

Şekil 4.5'e göre artan $MgCl_2$ konsantrasyonlarında istenen ürünün yeterince sentezlendiği görülmüştür. Fakat 3 mM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda spesifik olmayan ürünlerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bunun sebebi ise magnezyum iyonunun reaksiyon ortamında gereğinden fazla bulunmasının spesifik olmayan ürünlerin oluşumuna yol açmasıdır (Promega, 2004). Reaksiyon karışımında magnezyum iyonunun yüksek konsantrasyonlarda bulunması Taq DNA polimeraz enziminin verimliliğini düşürmekte ve spesifik olmayan amplifikasyona neden olmaktadır (Williams, 1989; Ellsworth vd., 1993). Ürün miktarı ve spesifik olmayan bantların bulunmaması göz önüne alındığında en ideal $MgCl_2$ konsantrasyonu 2,5 mM olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada *hasA* geninin amplifikasyonu için kullanılacak primerlerin optimum bağlanma sıcaklığının belirlenerek ürün verimliliğinin ve spesifikliğinin artırılması için optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Tipik primer bağlanma sıcaklığı genel olarak primerlerin T_m değerinin $5^\circ C$ altında hesaplanmaktadır. Genellikle en iyi sonucu veren bağlanma sıcaklıkları 55 ile $70^\circ C$ arasındadır. Ancak PCR amplifikasyonu için optimal primer bağlanma sıcaklığı; baz kompozisyonuna, nükleotit sekansına, primerlerin uzunluğuna ve konsantrasyonlarına göre değişebileceği için bu sıcaklık değeri deneysel

olarak her primer çifti için ayrıca belirlenmelidir. Bu doğrultuda *hasA* geninin amplifikasyonunda kullanılacak A ve B primerlerinin Tm değerleri göz önünde bulundurularak 45, 50 ve 55 °C sıcaklık değerlerinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmiştir. 45 ve 50 °C bağlanma sıcaklığında silik ve spesifik olmayan bantlar gözlenmiş, 55°C’de amplifikasyonun doğru bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu sonuca göre kullanılan primerlerin Tm derecesi ile bağlanma sıcaklığı değerinin yaklaşık olarak aynı olduğu belirlenmiştir. Kullanılan primer çiftinin uzunlukları literatürde normal olarak kabul edilen 18-28 bç uzunluğundan daha fazla olduğu için optimum amplifikasyon, olması beklenen bağlanma sıcaklığı değerinden daha yüksek bir değer olan 55 °C’de gerçekleşmiştir. Bunun yanında belirlenen MgCl₂ ve primer konsantrasyonu değerlerinin de bağlanma sıcaklığının bu değişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonunun optimizasyon deneylerinin sonucunda *hasA* geninin amplifikasyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Laktik asit bakterileri suşlarının GRAS organizma grubunda yer almaları dolayı antijenler gibi biyolojik olarak aktif birer araç olduklarından ve gıdalarda uzun süreli kullanılabilirlikleri için çalışılma potansiyeli yüksektir (Wells vd.,1996). Gıda ve klinik uygulamalarda, yoğun biyokimyasal araştırmalarda, fizyoloji, ekoloji ve özellikle genetik üzerine yapılan araştırmalarda laktik asit bakterilerinin büyük bir potansiyeli vardır ve bu alanlarda geçtiğimiz yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Kiwaki ve Shimizu-Kadota, 2002).

Lactococcus lactis suşlarının birçoğu; şeker kullanımı, proteoliz, bakteriyosin üretimi ve bakteriyofaj direnci gibi endüstriyel açıdan önemli özelliklere sahip farklı tipte plazmid içerirler. Birçok faj rezistans plazmidini konjugasyon ile endüstriyel *L. lactis* suşlarına başarılı bir şekilde aktarılmış, sonuç olarak bakteriyofaj direnci içeren suşlar oluşturulmuştur (Sanders vd.,1986). Fakat konjugal plazmidlerin çoğu *L. lactis* suşlarının bazıları için transfer edilebilirler ve konak hücre için istenmeyen bazı özellikler gösterebilirler. Buna alternatif olarak farklı DNA teknikleri kullanılarak *L. lactis* suşlarının genetik ıslahı yapılabilir. Günümüzde süt ve süt ürünlerinin üretim süreçlerinin birçoğunda canlı *L. lactis* hücreleri kullanılmaktadır. Bundan dolayı GRAS statüsündeki organizmaların DNA’sını içeren *L. lactis* suşlarında klonlama vektörlerinin kullanımı çok

önemlidir. Bununla birlikte insanlarda bağırsak mikroflorasına transfer olma potansiyellerinden dolayı antibiyotik direncini kodlayan genlerin gıdalarda kullanılması uygun değildir (Liu vd., 2005).

Son yıllarda çok sayıda gıda kaynaklı vektör geliştirilmiştir (de Vos 1999; Boucher vd., 2002; Henrich vd., 2002; Takala ve Saris 2002; Cotter vd., 2003). Örneğin; lac operonunun *lacF* geni, lacF işaretleyicisi olarak *L. lactis* suşlarının eksikliğini giderici olarak kullanılmıştır. Bu lacF markırı ortamdaki laktozu içeren vektörlerin seçimine izin verir. Bu vektörlerden bazıları lacA promotörü içerir ki bunlarda *L. lactis*'in gen ekspresyonunun kontrolünü sağlamaya izin verir. Bu iki gıda sınıfı vektörler bunlar pFG1 ve pFG200 olup *supB* ve *supD* genlerinin oluşmasında baskılayıcı olarak görev yaparlar. Her iki vektör sütteki *L. lactis* purin oksotroflarını stabil olarak koruyabilir. *supB* taşıyan pFG1'in düşük hücre büyümesine neden olduğu tespit edilmiştir ve endüstriyel suşların asitifikasyonunu sağlar ki polipeptitlerin asitlenme oranlarının belirlenmesine yardım eder. *supD* geni ise sadece amber kodonu bastırır ve değişmiş tRNA^{ser}'i kodlar. Bu vektörler *L. lactis*'in gıda sınıfı modifikasyonları için önem taşımaktadır ve hepsi endüstriyel suşlarda kolayca elde edilemeyen konak kromozomun mutasyonu için gereklidir. Buna karşılık genleri kodlayan belirteçler gibi dominant markırları taşıyan vektörler bu tür mutasyonlara cevap vermez. Bununla birlikte bu vektörlerin uygulaması sınırlıdır. *L. lactis*'in birçok suşu için nisin ve ağır metallere doğrudan dirençlidir (Liu vd.,2005).

Liu ve grubunun yaptığı çalışmaya göre 5 gıda kaynaklı klonlama ve ekspresyon vektörü kabul edilmiştir. Bu vektörler *L. lactis*'in gıda kaynaklı modifikasyonu için mevcut moleküler araçlara eklenmeye son derece uygundur. Endüstriyel suş LL48-1 üzerine pND648 ve pND965RS endüstriyel vektörlerinin başarılı transferi ile *L. lactis*'in endüstriyel suşlarının gıda kaynaklı modifikasyonuna uygunluğu gösterilmiştir (Liu vd., 2005).

Başarılı olarak amplifiye edilen hyaluronan sentaz geni KpnI restriksiyon enzim kesim bölgesinden kesilmiştir ve amplikonun bir ucunda yapışkan uç oluşturulmuştur (Şekil 4.11). Buna göre kesilen PCR ürünlerinin başarılı bir şekilde kesildiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan plazmid vektör pNZ8150 ise çoklu klonlama bölgesinde bulunan KpnI ve ScaI restriksiyon enzim kesim bölgelerinden kesilmiştir. Kesim

reaksiyonunun kontrolü için örnekler agaroz jel elektroforezine yüklenmiş ve görüntüleme ünitesinde görüntülenmiştir. Bu enzimlerle kesilerek lineer forma getirilen vektör DNA'sının bir ucunda küt diğer ucunda ise yapışkan uç oluşturulmuştur. Restriksiyon enzimlerinin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın diziliminden ayırt edebilme başarılarının, optimal olmayan şartlarda enzimin tanıma sekansına olan spesifitesi değişebilmektedir. Restriksiyon enzimlerinin benzer bölgeleri kesme işlemine star aktivitesi denilmektedir. Star aktivitesi substrat DNA içinde hedeflenmeyen bölgelerin kesilmesine sebep olabilir. Kesim reaksiyonlarında kullanılan restriksiyon enzimleri önemli ölçüde düşük star aktivitesine sahip enzimlerdir. Performans göz önünde tutularak tasarlanan High Fidelity (HF) enzimler ise, hedef dışı ürünlerin minimize edilmesini sağlarlar ve daha geniş reaksiyon koşullarında aktivite gösterirler. Çalışmada kullanılan enzimlerin HF özelliği ve star aktivitelerinin düşük olmasının kesim reaksiyonunun başarısında etkili olduğu düşünülmüştür.

Kesim reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleşmesi ile küt uçlar ve yapışkan uçlar oluşturulmuş, ticari olarak satın alınan T4 DNA ligaz ile ligasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Literatüre göre küt uç ligasyonu genellikle yapışkan uç ligasyonuna göre zordur ve daha yüksek konsantrasyonlarda ligaz enzimi gerektirir. Küt uç ligasyonu özellikle bileşenlerin konsantrasyonları ve reaksiyon koşullarına daha duyarlıdır. Ligasyon reaksiyonlarının başarısında T4 DNA ligazın kalitesi ve konsantrasyonu önemlidir. Çalışmada ligaz enziminin konsantrasyonu üretici yönergeleri dikkate alınarak kullanılmıştır.

Ekspresyonun kontrolü amacıyla, oluşturulan rekombinant *L. lactis* CES15 suşunun hyaluronik asit üretim yeteneği belirlenmiştir. Bu doğrultuda rekombinant *L. lactis* CES15 suşu nisin miktarının optimize edilmesi için 0-2-5-7,5-10 ve 12,5 ng/ml konsantrasyonlarında nisin ile indüklenmiştir. Nisin indüklemesinin ardından hyaluronik asit ekstraksiyonu yapılmış ve hyaluronik asit miktarı karbazol yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Karbazol yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre nisin ile indüklenmeyen suşun 0,9832 mg/ml hyaluronik asit ürettiği belirlenmiştir. Chandrapati ve O'Sullivan tarafından 1999 yılında yapılan çalışmaya göre nisA promotörü içeren *Lactococcus lactis*'in laktoz içeren besiyeri ortamında nisin bağımsız indüksiyonun gerçekleştiği rapor edilmiştir. Hücrelerin kültürasyonunda 5 g/l

laktoz içeren M17 besiyeri kullanılması nedeniyle, nisin indüksiyonu öncesi HA'nın ortaya çıkmasının sebebi muhtemelen HA sentazın ekspresyonunun laktoz indüksiyonu ile eksprese olmasıdır (Chien ve Lee, 2007).

7,5 ng/ml nisin ile indüklenen rekombinant *L. lactis* CES15 suşunun hyaluronik asit üretim miktarı 2,9746 mg/ml olarak belirlenmiştir. Kuru biyokütleyle oranla indüklenen nisinle birlikte rekombinant *L. lactis* CES15 suşunda elde edilen hyaluronik asit miktarları Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Diğer nisin miktarlarında elde edilen hyaluronik asit miktarı daha düşük olduğu için nisin indüklemesinin miktarı 7,5 ng/ml olarak belirlenmiştir. Literatürde *Lactococcus lactis* ile yapılan gen transferi çalışmalarında geliştirilen rekombinant suş 12,5 ng/ml nisin ile indüklenmiş ve 0.65 g/l hyaluronik asit üretimi sağlanmıştır (Chien ve Lee, 2007). Rekombinant hücre teknolojisi ile geliştirilen *Escherichia coli* ile gerçekleştirilen çalışmalarda üretim miktarları 1 g/l'nin çok çok altında gerçekleşmiş ve moleküler ağırlığı 3.5×10^5 ile 1.9×10^6 Da arasında değişen hyaluronik asit üretimi sağlanmıştır (Yu ve Stephanopoulos, 2008). Bir başka çalışmada ise *Streptococcus zooepidemicus* suşunun *hasA* geninin *Escherichia coli* BL21 ve *Escherichia coli* HMS 174 suşuna transformasyonu sağlanmış ve pHAS-1 ve pHAS-2 suşuna rekombinant suşları oluşturulmuştur. Rekombinant suşlar 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ile 4 saat indüklenmiş ve maksimum hyaluronik asit üretimi rekombinant pHAS-1 suşunda 16 μ g/ml, pHAS-2 suşunda 32,5 μ g/ml olmuştur (Jongsareejit vd., 2007).

Huan ve grubu tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada *L. lactis*'te nisin indüklü ekspresyon sisteminde nisin dirençli proteinin etkisi detaylı olarak incelenmiştir. Nisin direnç proteini (NSR)'nin uygun markır olarak seçildiği gıda kaynaklı bu sistemde GFP (green fluorescent protein, yeşil floresan protein) ekspresyon plazmidin nisin etkisi incelenmiştir ve *L. lactis* NZ9000'e transfer edilmiştir. Bununla birlikte *L. lactis* NZ9000 ile kıyaslandığında eritromisin dirençli genotip nisin indüklü ekspresyon plazmitinden daha iyi olduğu ve gıda kaynaklı plazmid *L. lactis* NZ9000/pXB823 için (2 μ g/ml) daha başarılı sonuç alınmıştır. Bu NSR ekspresyonunun NICE sistemin indirgeyici etkisinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Huan, 2010).

S. zooepidemicus ve rekombinant *L. lactis* ile gerçekleştirilen denemelerde UDP-GlcUA/UDP-GlcNAc hücre içi akış oranının HA moleküler ağırlığı üzerine direkt olarak etkili olduğu bulunmuştur (Badle vd., 2014). *Lactococcus lactis* NZ9000 ile yapılan bir

çalışmada ise *hasA* ve *hasB* genlerini içeren rekombinant SJR2 suşu oluşturulmuş ve bu genlerin ko-ekspresyonu sağlanmıştır. Rekombinant SRJ2 suşu 2 ng/ml nisin ile indüklenmiş ve 107 mg/l HA üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmada *hasA*, *hasB* ve *hasC* genlerini içeren rekombinant SJR3 suşu oluşturulmuş ve bu genlerin ko-ekspresyonu sağlanmıştır. Rekombinant SJR3 suşu 2 ng/ml nisin ile indüklenmiş ve hyaluronik asit miktarı 234 mg/ml olarak belirlenmiştir (Prasad vd., 2009).

Çeşitli üretim ortamları *Lactococcus* cinsleri için kullanılabilir. Laboratuvar ortamında en çok kullanılan üretim ortamı M17'dir. Plazmid seçimi için ilgili antibiyotik ve şeker gibi karbon kaynağı olarak glukoz ve laktoz destekli materyal uygulaması yapılır. Nisin ya saf nisinA olarak veya Sigma (Katolog no: N5764)'dan ham preparat olarak, ya da NZ9700 suşunun kültür süpernantantından elde edilerek kullanılmaktadır. Kültür süpernantantı 1:1000 dilüsyonunda ilave edilir ve alikotlar halinde dondurularak saklanır. İndüksiyon için süpernantantın tam konsantrasyonu 1:100 ve 1:100000 dilüsyonu arasında saptanır. Genel olarak bu miktar ticari olarak mevcut nisinin kullanımını kolaylaştırır. Bununla birlikte tam indüksiyon için kesin miktarının olması gerekir. Laboratuvar ölçeğinde gece kültüründe 1:100 taze ortamda seyreltirilir, optik densisite 0.2-0.5 ve uygulanan nisin 0,1-2 µg/ml'dir. Bundan sonra kültür 0.5-3 saat boyunca devam ettirilir ve daha sonra kullanım için test edilir. Bu aşamada pH kontrolü yapılmaz ve kültür düşük hücre yoğunluklarında büyümeyi durdurur. Çünkü laktik asit üretimi ve buna bağlı pH düşüşü gözlenir. Alternatif olarak kültür yüksek hücre yoğunluklarına pH kontrollü olarak büyütülebilir. Bu durumda indüksiyon gerçekleşebilir ve önemli verim artışı gözlenir.

Casim ve Daphne tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *L. lactis* NZ9000 ile biyolojik aktif tek zincirli insülin analogu ile nisin indüklü ekspresyon çalışılmıştır (Casim ve Daphne, 2011). Mierau ve çalışma grubunun 2005 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre *L. lactis* üzerine NICE gen ekspresyon sistemi üzerine protein üretimi ortamın kompozisyonuna fermantasyon parametrelerine ve eklenen nisin miktarına bağlı olduğunu ve bu parametreler dikkate alındığında hedef proteinin veriminin önemli bir artışa yol açacağını bildirmişlerdir (Mierau vd., 2005).

Gıda endüstrisinde arzu edilen metabolitlerin, enzimlerin ve diğer proteinlerin kontrollü üretimi için gıda sınıfı mikroorganizmaların gelişimi günümüzde ilgisini

sürdürmektedir. Nisin biyosentez düzenleyici özellikleri *L. lactis* için NICE sistemi tarafından geliştirilmiştir. Çeşitli nisA promotor vektörleri ve uygun nisRK eksprese eden üretimleri oluşturulmuş ve istenilen enzim ve proteini kodlayan genin nisin kontrollü ekspresyonuna izin verilmiştir. Sistem *L. lactis* suşlarında hem homojen hemde heterojen genlerin kontrollü ekspresyonu için uygun olup eklenen nisin miktarına bağlı olarak dinamik bir gen ekspresyonu gösterir ve yüksek protein verimlerine yol açan genler için kullanılır. Bu sistem bir dizi farklı enzimin üretimi için kullanılmıştır ve *L. lactis*'in metabolik etkisi üzerine çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte bazı diğer genetik araçlar ve ikili plazmid sistemin geliştirilmesi diğer gram pozitif bakterilerin NICE sisteminde uygulanmasını geliştirmiştir. İndüktif koşullar altında genin yüksek seviyedeki ekspresyonu istenmeyen durumlardaki klonlanmış genin saptanamayan üretimini esas alır.

S. zooepidemicus veya *E. coli*, *B. subtilis* ve *L. lactis* gibi suşların kullanıldığı rekombinant sistemlerde HA sentezini sınırlayan temel faktörlerin açığa kavuşturulması gerekmektedir. Metabolik akı analizi (MFA) ve metabolik kontrol analizi (MCA) gibi metabolik mühendislik araçları HA verimini ve moleküler ağırlığını arttırmak için rasyonel bir strateji geliştirmek amacıyla kullanılabilir. MFA bir analiz tekniği olup bir işlem sırasında tüm biyokimyasal reaksiyon ağının akı dağılımını analiz etmek için kullanılır. MCA genetik modifikasyon veya çevresel değişimler ile hücresel proseslerin rakamlarla ilişkisini açıklar (Wang ve Hatzimanikatis, 2006). MCA enzim aktiviteleri ve büyüme şartları gibi sistem parametrelerinin fraksiyonel değişikliğine yanıt olarak bu metabolit konsantrasyonları ve metabolik akım gibi hücresel çıkış fraksiyonel değişikliğini ölçmek için kontrol kat sayıları getirmektedir (Chen vd., 2011).

MFA ve MCA'nın kombinasyonu çevresel değişiklikler veya HA sentezi ile ilgili anahtar genlerle bağlantılı olarak HA üreticisinin metabolik sorumluluklarını araştırmak için kullanılabilir. MCA ve MFA'dan toplanan bilgiler ile optimal stratejiler (süreç kontrol ve gen ekspresyon anahtarı gibi) HA'nın moleküler ağırlığını ve konsantrasyonunu arttırmak için tespit edilebilir (Chen vd., 2011).

Tez çalışmasının sonucunda çalışmanın temel amacı olan hyaluronik asit sentaz geninin (*hasA*) *Lactococcus lactis*'te ekspresyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. İleride yapılması düşünülen çalışma ekseninde, nisin indüksiyon süresinin optimizasyonu yapıp

hyaluronik asit üretimi üzerine etkisinin araştırılması planlanmaktadır. Ayrıca hasA geni ile birlikte HA sentezinde rol oynayan diğer genlerin de birlikte ekspresyonunun, verimi daha yüksek noktalara taşıyacağı düşünülmektedir. Elde edilen verilerin, HA üretiminde metabolizma mühendisliği yöntemlerinin kullanılmasına hizmet edeceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, HA üretim yol izinde meydana gelebilecek olumlu ya da olumsuz değişimlerin ortaya çıkmasını sağlayacak temel bilgi üretilmesine de ön ayak olabilecektir. Ayrıca rekombinant *Lactococcus lactis* suşu ile laboratuvar ölçeğinde üretimin optimum koşulları belirlenecektir. Bulgularımız rekombinant *Lactococcus lactis* suşu ile yapılan HA üretim çalışmaları ile karşılaştırıldığında 2,9746 mg/ml gibi yüksek bir miktar ile literatüre katkı sağlamıştır. Bu yüksek sonuca sadece tek bir genin klonlanması ile ulaşılmıştır. 3 saat indükleme süresi literatüre kıyasla oldukça kısadır. Literatüre göre üretim yapılan besiyeri daha az miktarda karbon kaynağı içermektedir. Statik üretim, üretimde enerji kazancı açısından önemlidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Allison, D. D., Grande-Allen, J., 2006, Hyaluronan: A Powerful Tissue Engineering Tool, *Tissue Engineering*, 12, 8.
- Armstrong, DC., Cooney, MJ., Johns, MR., 1997, Growth and amino acids requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 47,309-312.
- Blank, L. M., McLaughlin, R. L., Nielsen, L. K., 2005, Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate, *Biotechnol Bioeng*, 90, 685-693.
- Blank, L. M., Hugenholtz, P., Nielsen, L. K., 2008, Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci, *Journal of Molecular Evolution*, 67, 1, 13-22.
- Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A. M., Eggink, G., 2013, Production Methods for Hyaluronan, Hindawi Publishing Corporation International Journal of Carbohydrate Chemistry, Article ID 624967, 14 pages.
- Brown, M. B., Jones, S. A., 2005, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin, *JEDAV*, 19, 308-318.
- Casim, A. S., Daphne, T. W., 2011, Nisin-Inducible Secretion of a Biologically Active Single-Chain Insulin Analog by *Lactococcus lactis* NZ900, *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 8.
- Cimini, D., De Rosa, M., Schiraldi, C., 2011, Production of glucuronic acid-based polysaccharides by microbial fermentation for biomedical applications, *Biotechnology Journal*, 6.
- Chandrapati, S., O'Sullivan, DJ., 1999, Nisin independent induction of nisA promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose, *FEMS Microbiol Lett*, 170, 191-198.
- Chauhan, A. S., Badle, S. S., Ramachandran, K. B., Jayaraman, G., 2014, The P170 expression system enhances hyaluronan molecular weight and production in metabolically- engineered *Lactococcus lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, 90, 73-78.
- Chen, S. J., Chen, J. L., Huang, W. C., Chen, H. L., 2009, Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Korean J Chem Eng*, 26, 428-432.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, W. Y., Marcellin, E., Hung, J., Nielsen, L. K., 2009, Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*, The Journal of Biological Chemistry, 284, 27, 18007-18014
- Chien, L., Lee, C. K., 2007, Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin, Biotechnol Prog, 23, 1017-1022.
- Chien, L., J., Lee, C. K., 2007, Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*, Appl Microbiol Biotechnol, 77, 339-346.
- Chong, F. B., Nielsen, L. K., 2003a, Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase, Biochemical Engineering Journal, 16, 153-162.
- Chong, F. B., Nielsen, L. K., 2003b, Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*, Journal Biotechnol, 100, 33-41.
- Chong, F. B., Blank, L. M., McLaughlin, R., Nielsen, L. K., 2005, Microbial hyaluronic acid production, Appl Microbiol Biotechnol, 66, 341-351.
- Cooney, M. J., Goh, L. T., Lee, P. L., Johns, M. R., 1999, Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*, Physiological implications of glucose and complex nitrogen limited growth. Biotechnol Prog, 15, 898-910.
- Crater, D. L., Dougherty, B. A., Van de Rijn, I., 1995, Molecular characterization of hasC from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose pyrophosphorylase activity, The Journal of Biological Chemistry, 270, 48, 28676-28680.
- Crater, D. L., van de Rijn, I., 1995, Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in group A streptococci, J Biol Chem, 270, 18452-18458.
- De Angelis, P. L., Papaconstantinou, J., Weigel, P. H., 1993/a, Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*, The Journal of Biological Chemistry, 268, 26, 19181-19184.
- De Angelis, P. L., Papaconstantinou, J., Weigel, P. H., 1993/b, Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in capsular mutants and in heterologous bacteria, The Journal of Biological Chemistry, 268, 20, 14568-14571.
- De Angelis, P. L., Jing, W., Drake, R. R., Achyuthan, A. M., 1998, Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*, The Journal of Biological Chemistry, 273, 14, 8454-8458.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., 1996, Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin, *Appl Environ Microbiol* 62, 3662-3667.
- De Vos, W. M., 1999, Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2, 289-295.
- Don, M. M., Shoparwe, N. F., 2010, Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose, *Biochem Eng J*, 49, 95-103.
- Dougherty, B. A., Van de Rijn, I., 1993, Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 10, 7118–7124.
- Duan, X. J., Niu H. X., Tan, W. S., Zhang, X., 2009, Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus*
- Eckert, K. A., Kunkel, T. A., 1990, High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Nucleic Acids Res*, 18, 3739-3744.
- Ellsworth, D. L., 1993, Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, *BioTechniques*, 14, 214-217.
- Erickson, M., Stern, R., 2012, Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism, *Biochemistry Research International*, Article ID 893947, 9 pages, 2012.
- Fong Chong B ve Nielsen LK, 2003, Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase, *Biochem Eng J*, 16, 153-162.
- Gasson, J., de Vos, W. M., 1994, Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria, Blackie, London.
- Hasper, H.E., de Kruijff, B., Breukink, E., 2004, Assembly and stability of nisin-lipid II pores, *Biochemistry*, 43, 11567-11575.
- Hasegawa, S., Nagatsuru, M., Shibutani, M., 1999, Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor, *J Biosci Bioeng* 88, 68-71.
- Harmon, P. S., Maziarz, E.P., Liu, X. M., 2012, Detailed characterization of hyaluronan using aqueous size exclusion chromatography with triple detection and multiangle light scattering detection, *Journal of Biomedical Materials Research B*, 100, 7, 1955-196.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, W. C., Chen, S. J., Chen, T. L., 2006, The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation, *Biochem Eng J*, 32, 239-243.
- Huang, W. C., Chen, S. J., Chen, T. L., 2008, Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochem Eng J*, 40, 460-464.
- Huan, L., Zhong, J., Zhang, Q., Liang, X., Sun, Z., 2010, Adverse effect of nisin resistance protein on nisin-induced expression system in *Lactococcus lactis*, *Microbiological Research*, 165, 458-465.
- Itano, N., 2001, Hyaluronan biosynthesis: a multifaceted process, *Connective Tissue*, 33, 3, 221-226.
- Im, J. H., Song, J. M., Kang, J. H., Kang, D. J., 2009, Optimization of medium components for high molecular weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 1337-1344.
- Jagannath, S., Ramachandran, KB., 2010, Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biochem Eng J*, 48, 148-158.
- Jeong, E., Shim, W. Y., Kim, J. H., 2014, Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight, *Journal of Biotechnology*, 185, 28-36.
- Johns, MR, Goh, LT, Oeggerli, A., 1994, Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biotechnol Lett*, 16, 507-512.
- Jongsareejit, B., Bhumiratana, A., Morikawa, M., Kanaya, S., 2007, Cloning of Hyaluronan Synthase (sz-has) Gene from *Streptococcus zooepidemicus* in *Escherichia coli*, *Science Asia*, 33, 389-395.
- Kendall, F. E., Heidelberger, M., Dawson, M. H., 1937, A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*, *The Journal of Biological Chemistry*, 118,1, 61-69.
- Kim, J. H., Yoo, S. J., Oh, D. K., Kweon, Y. G., Park, D. W., Lee, H., Gil, G. H., 2007, Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microbial Technol*, 19, 440-445.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kiwaki, M., Shimizu-Kadota, M., 2002, Development of Genetic Manipulation Systems and the Application to Genetic Research in *Lactobacillus casei* Strain Shirota, *Bioscience Microflora*, 20, 4, 121-129.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., 1997, Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria, *Mol Microbiol*, 24, 895-904.
- Kleerebezem, M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P., 1999, The lantibiotics nisin and subtilin act as extracellular regulators of their own biosynthesis, In: Dunny G. M., Winams S. C. (eds) *Cell-cell signalling in bacteria*, American Society for Microbiology Washington, D. C.
- Krahulec, J., Krahulcova, J., 2006, Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* strain deficient in beta-glucuronidase in laboratory conditions, *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 415-422.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M. , de Ruyter, P. G., Luesink, E. J., de Vos, W. M., 1995, Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction, *J Biol Chem*, 270, 27299-27304.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M., de Vos, W. M., 1998, Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria, *J Biotechnol*, 64, 15-21.
- Laurent, T. C., Laurent, U. B., Fraser J.R., 1995, Functions of hyaluronan, *Ann Rheum Dis*, 54, 429-432.
- Leach, J.B., Schmidt, C.E., 2004, Hyaluronan. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Marcel Dekker, New York, 779–789.
- Liu, L., Du, G. C., Chen, J., Wang, M., Sun, J., 2009, Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*, *Bioproc Biosyst Eng*, 32, 755-763.
- Liu, C. Q., Su, P., Khunajakr, N., Deng, Y. M., Sumual, S., Kim, W. S., Tandianus, J. E., Dunn, N. W., 2005, Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 127-135.
- Liu, L., Wang, M., Sun, J., Du, G. C., Chen, J., 2008, Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*, *Bioresour Technol*, 99, 8532-8536.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, L., Sun, J., Xu, W.B., Wang, M., Du, G.C., Chen, J., 2009, Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm, *Biotechnol Prog*, 25, 1819-1825.
- Liu, L., Wang, M., Du, G. C., Chen, J., 2008, Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline stress strategy, *Lett Appl Microbiol*, 46, 383-388.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., 2011, Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives, *Microbial Cell Factories*, 10, 99.
- Mao, Z., Chen, R. R., 2007, Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp, *Biotechnology Progress*, 23, 5, 1038-1042.
- Mao, Z., Shin, H. D., Chen, R., 2009, A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis, *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 63-69.
- Mendichi, R., Soltes, L., 2002, Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid, *Inflamm Res*, 51, 115-116.
- Meyer, K., Palmer, J. W., 1934, The polysaccharide of the vitreous humor, *Journal of Biology and Chemistry*, 107, 629-634.
- Mierau, I., Kleerebezem, M., 2005, 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 705-717.
- Miyoshi, A., Jamet, E., Commissaire, J., Renault, P., Langella, P., vd., A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*, *FEMS Microbiol Lett*, 239, 205-212.
- Mio, K., Stern, R., 2002, Inhibitors of the hyaluronidases, *Matrix Biology*, 21, 31-37.
- Morello, E., Bermudez-Humaran, L. G., Llull, D., Sole, V., Miraglio, N., vd., 2008, *Lactococcus lactis*, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 14, 48-58.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J., 2008, Hyaluronic acid (hyaluronan), *Veterinarni Medicina*, 8, 397-411.
- Pires, A. M. B., Eguchi, S. Y., Santana, M. H. A., 2010, The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 2125-2135.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pires, A. M. B., Santana, M. H., 2010, Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid, *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 1751-1761.
- Pires, A. M. B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., Santana, M. H. A., 2010, Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresour Technol*, 101, 6506-6509.
- Pherm, P., 1984, Hyaluronate is synthesized at plasma membranes, *Biochemical Journal*, 220, 2, 597-600.
- Prasad, S. B., Jayaraman, G. ve Ramachandran, K. B., 2010, Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co- expression of UDP- glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 273-283.
- Prasad, S. B., Ramachandran, K. B., Jayaraman, G., 2012, Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94,6, 1593-1607.
- Promega, 2004, General Considerations for PCR Optimization Protocols and Applications, Chapter 1: Nucleic Acid Application.
- Schiraldi, C., Gatta A., Rosa, M., 2010, Biotechnological Production and Application of Hyaluronan, *Biopolymers*, Magdy Elnashar (Ed.), ISBN:978-953-307-109-1, Intech.
- Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L. vd., 2004, Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord, *Biomacromolecules*, 5,6, 2122-2127.
- Soltes, L., Mendichi, R., Lath, D., Mach, M., Bakos, D., 2002, Molecular characteristics of some commercial high-molecular-weight hyaluronans, *Biomedical Chromatography*, 16, 7, 459-462.
- Thonard, J. C., Migliore, S. A., Blustein, R., 1964, Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of Streptococci, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 726-728.
- Toole, B. P., 2001, Hyaluronan in morphogenesis, *Seminars in Cell& Developmental Biology*, 12, 79-87.
- Toole, B. P., 2004, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nature Reviews Cancer*, 4, 528-539.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Kraaij, C., Vos, W. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., 1999, Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications, *Nat Prod Rep*, 16, 575-587.
- Van der Vossen, J. M., van der Lelie, D., Venema, G., 1987, Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters, *Appl Environ Microbiol*, 53, 2452-2457.
- Vázquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., Murado, M. A., 2010, Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera, *Microbial Cell Fact* 9, 46.
- Yu, H., Steohanopoulos, G., 2008, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid, *Metabolic Engineering*, 10, 1, 24-32.
- Zhang, J., Ding, X., Yang, L., Kong, Z., 2006, A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72,1, 168-172.
- Wang, L. Q., Hatzimanikatis, V., 2006, Metabolic engineering under uncertainty. I: Framework development, *Metabolic Eng*, 8, 133-141.
- Wells, J. M., Robinson, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., Le Page, R., 1996, Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles, *Antonie Leeuwenhoek*, 70, 317-330.
- Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S. vd., 2005, Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7, 3747-3752.
- Williams, J. F., 1989, Optimization Strategies for the Polymerase Chain Reaction, *Biotechniques*, 7, 762-769.
- Wood, B. J. B. ve Warner, P. J., 2003, Genetics of lactic acid bacteria, Kluwer Academic/Plenum, New York.