T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİÜSÜ

ESCHERICHIA COLI HÜCRE YÜZEY PROTEİNLERİNİN BİYOTİNİLASYONU VE nLC-MS/MS ANALİZİ

Elifcan KOÇYİĞİT

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2024

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESCHERICHIA COLI HÜCRE YÜZEY PROTEİNLERİNİN BİYOTİNİLASYONU VE nLC-MS/MS ANALİZİ

Elifcan KOÇYİĞİT

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 3675)

Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ

2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Escherichia coli Hücre Yüzey Proteinlerinin Biyotinilasyonu ve nLC-MS/MS Analizi

Tez Yazarı: Elifcan KOÇYİĞİT

Tez Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu çalışma, sınav kurulumuz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20…

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Escherichia coli Hücre Yüzey Proteinlerinin Biyotinilasyonu ve nLC-MS/MS Analizi

Amaç: Bakteriyel Membran proteinleri hücrelerin içine ve dışına madde taşınımını, hücrelerin diğer hücrelerle veya çevresindeki moleküllerle etkileşime girmesini, hücre duvarının ve zarının yapısını ve bütünlüğünün korunmasını, hücre içi ve hücre dışı sinyal moleküllerinin algılanmasını ve hücrelerin çevresel faktörlere karşı cevap oluşturmasını sağlarlar. Membran proteinlerini tanımlama çalışmaları bu proteinlerin üstlendiği görevleri ve yer aldıkları mekanizmaları aydınlatmak açısından oldukça önemlidir. Biyotinilasyon son dönemde kullanım alanı giderek artan ve proteinleri tanımlamak için de kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, enzimatik ve kimyasal biyotinilasyon yöntemlerinin bakteri membran proteinlerini işaretleyerek yüksek sayıda protein tanımlamak için kullanılabileceğini göstermeyi, aynı zamanda da iki yöntemi birbiriyle karşılaştırmayı amaçladık.

Yöntem: Bakterilerin membran proteinlerini biyotinlemek için enzimatik (TurboID-enzim tabanlı) ve kimyasal (Sulfo-NHS-LC-Biotin tabanlı) biyotinilasyon yöntemleri kullanılmıştır. Öncelikle rekombinant yolla TurboID enzimi histidin etiketli olarak üretilmiş ve aktif halde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimle ve kimyasal biyotin reaktifi kullanılarak *E. coli* K12 hücrelerinin membran proteinleri biyotin ile işaretlenmiştir. Bakteriler lizize uğratılarak protein özütleri hazırlanmış ve streptavidin kaplı manyetik boncuklar aracılığıyla biyotinile proteinler zenginleştirilmiştir. Biyotinilasyon ve zenginleştirme aşamaları Western Blot analizleriyle doğrulanmıştır. Zenginleştirilen biyotinile proteinler ve biyotinile edilmeyen bakteri protein özütleri triptik kesime tabi tutulmuş, elde edilen peptitlerle nLC-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Yapılan nLC-MS/MS analizlerine göre biyotinile edilen gruplarda biyotinile edilmeyen gruba göre daha fazla sayıda membran proteini tanımlanmıştır. Biyotinile olmayan grupta 419 adet membran proteini tanımlanırken, enzimatik yolla biyotinile edilen grupta 463, kimyasal yolla biyotinile edilen grupta 582 adet protein tanımlanmıştır.

Sonuç: Enzimatik ve kimyasal biyotinilasyon yöntemlerinin karşılaştırmalı analizleri her iki yönteminde etkin bir biçimde membran proteinlerini tanımlama kullanılabileceğini göstermektedir. Her ne kadar biyolojik biyotinilasyon yöntemi fiyat avantajı sunsa da, kimyasal biyotinilasyon yöntemi ile daha fazla membran proteininin tanımlanmış olması bu yöntemin biyolojik biyotinilasyona göre tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, yapılan tekrarlı deneylerde her iki yönteminde tekrar edilebilir olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, her iki yöntemle de karşılaştırmalı proteom çalışmalarının yapılabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamız kapsamında optimize edilmiş olan protokoller kullanılarak gerçekleştirilecek çalışmalar ile antibiyotik dirençli bakteri suşları ile dirençsiz bakteri suşları arasında membran protein farklılıklarını ortaya çıkarmak ve mekanistik bilgi üretmek mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Membran proteinleri, Biyotinilasyon, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Biotinylation and nLC-MS/MS Analysis of Cell Surface Proteins of Escherichia coli

Objective: Bacterial membrane proteins facilitate (1) transport of substances into and out of cells, (2) interactions between cells and other molecules in their environment, (3) mainten the structure and integrity of the cell wall and membrane, (4) detect intra- and extracellular signaling molecules, and (5) generate responses to various environmental factors. Studies identifying membrane proteins are crucial for elucidating the roles and mechanisms of these proteins. Biotinylation has emerged as a widely used method for protein identification. In this study, we aimed to demonstrate the use of enzymatic and chemical biotinylation methods for labeling bacterial membrane proteins for high-throughput protein identification and to compare these two methods.

Methods: Enzymatic (TurboID enzyme-based) and chemical (Sulfo-NHS-LC-Biotin-based) biotinylation methods were used to biotinylate bacterial membrane proteins. The recombinant TurboID enzyme was produced and purified in its native state with a histidine tag. Bacterial cell membrane proteins of *E. coli* K12 were then labeled with biotin both using the purified enzyme or a chemical biotin method. The bacteria were then lysed to prepare protein extracts, and biotinylated proteins were enriched using streptavidin-coated magnetic beads. Biotinylation and enrichment steps were verified via Western Blot analysis. The enriched biotinylated proteins and non-biotinylated bacterial protein extracts were subjected to trypsin digestion, followed by nLC-MS/MS analysis of the resulting peptides.

Results: A greater number of membrane proteins were identified in the biotinylated and enriched groups compared to the non-biotinylated group. While 419 membrane proteins were identified in the non-biotinylated group, 463 proteins were identified in the enzymatically biotinylated group, and 582 proteins were identified in the chemically biotinylated group.

Conclusion: Comparative analyses of enzymatic and chemical biotinylation methods demonstrated that both methods could effectively allow identification of membrane proteins. Although the biological biotinylation method offers cost advantages, the chemical biotinylation method identified more membrane proteins, indicating its preference over biological biotinylation. In addition, repeated experiments showed the reproducibility of both methods, suggesting that comparative proteomic studies can be performed using either method. With the optimized protocols generated in this study, future research may reveal differences in membrane protein compositions and levels among antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive bacterial strains, providing mechanistic insights.

Key words: Membrane proteins, Biotinylation, *Escherichia coli*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışman hocam olarak bana yön gösteren, desteğini her zaman hissettiğim, iyi bir araştırmacı olma yolunda rol modelim olan kıymetli hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a ve destekleyici tavrıyla daima yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Gürler AKPINAR'a sonsuz teşekkür ederim. Sevgili hocalarım Doç. Dr. Banu İSKEDER İZGİ ve Doç. Dr. Aylin KANLI'ya bu süreçte verdikleri destekler için çok teşekkür ederim. Eğitim sürecim boyunca tüm bilgi birikimini aktarmaktan çekinmeyen ve bütün süreç boyunca tüm samimiyetiyle yanımda olan Dr. Mehmet SARIHAN'a içten teşekkür ederim.

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri yanımda olan, iyi kötü her şeyi paylaştığımız, yüksek lisansın hayatıma kattığı en değerli kazanımlarımdan olan canım dostlarım Beliz ERDAL, Elif AKINCI, Fatma Zehra ÖZEN ve Hümeyra Şeyma ÜNLÜ'ye; çalışma arkadaşlarım Dr. Merve Gülsen BAL ALBAYRAK, Dr. Tuğcan KORAK, Elif İlknur ŞAHİN, Bengi Su BARLAK, Beyza Nur ÇOBANOĞLU, Ebru DURUR ve Zeynep Sude KONGUR'a destekleri için teşekkür ederim.

Her şartta ve koşulda yanımda olan, hayatım boyunca beni hep cesaretlendiren, varlıklarıyla bana güç katan sevgili ailem; ilk ve daimi öğretmenin canım babam Hayrettin KOÇYİĞİT'e ve içimi her zaman huzurla dolduran canım annem Rabia KOÇYİĞİT'e tüm kalbimle teşekkür ederim. Varlıkları için minnettarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 3675) teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Escherichia coli Hücre Yüzey Proteinlerinin Biyotinilasyonu ve nLC-MS/MS Analizi" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

…….. / ….. / 20….

Elifcan Koçyiğit

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET ii
ABSTRACT iv
TEŞEKKÜR vi
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ vii
İÇİNDEKİLER viii
SİMGELER ve KISALTMALAR xi
ŞEKİLLER xii
TABLOLAR xiv

1. GİRİŞ 1

1.1. Bakteriler 1
1.2. Gram Negatif ve Gram Pozitif Bakteriler 1
1.3. *Escherichia coli* 2
1.4. Bakteri Membranı ve Proteinleri 4
1.4.1. Dış Membran 5
1.4.2. Periplazma 6
1.4.3. İç Membran 6
1.5. Bakteri Membran Proteinlerinin Önemi 6
1.6. Membran Proteini Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler 8
1.7. Biyotinilasyon 9
1.7.1. Biyotin 9
1.8. Biyotin Ligazlar 11
1.8.1. BirA 11
1.8.2. TurboID 12
1.9. Kimyasal Biyotinilasyon 13
1.10. Avidin/Streptavidin-Biotin Etkileşimi 13

1.11. Biyotinilasyon Kullanılarak Yapılan Proteom Çalışmaları 14

2. AMAÇ 16

3. YÖNTEM 18

3.1. TurboID Enziminin Üretilmesi 20

3.1.1. pET-21a-TurboID Plazmitinin *E. coli* BL21 Hücrelerine Transformasyonu 20

3.1.2. TurboID Üretimi 21

3.1.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 22

3.1.4. Üretilen TurboID Enzimin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü 23

3.1.5. TurboID Enziminin Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi 24

3.1.6. Saf TurboID Enziminin Konsantrasyonunun Belirlenmesi 24

3.1.7. Saflaştırılan TurboID Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi 25

3.2. *E. coli* K12 Bakterisinin Büyütülmesi ve Biyotinlenmesi 26

3.2.1. Enzimatik Biyotinilasyon Reaksiyonunun Kurulması 26

3.2.2. Kimyasal Biyotinilasyon Reaksiyonunun Kurulması 27

3.2.3. Negatif Kontrollerin Hazırlanması 27

3.3. Biyotinile Edilen Bakterilerin ve Negatif Kontrollerin Protein Özütlerinin Elde Edilmesi 27

3.4. Biyotinilasyonun Western Blot Analizi ile Kontrol Edilmesi 28

3.5. Biyotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi 28

3.6. Zengişleştirmenin Western Blot Analizi ile Kontrol Edilmesi 29

3.7. Zenginleştirilen Proteinlerin ve Negatif Kontrollerin Triptik Kesimi 30

3.7.1. Boncuk Üzerinde Triptik Kesim 30

3.7.2. Solüsyon İçi Triptik Kesim 31

3.8. Peptitlerin Konsantrasyonunun Ölçümü 31

3.9. nLC-MS/MS Analizleri 32

3.10. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Biyoinformatik Analizler 33

4. BULGULAR 34

4.1. TurboID Enziminin Üretilmesi 34

4.2. Üretilen TurboID Enziminin Saflaştırılması 35
4.3. Saflaştırılan TurboID Enziminin Aktivitesinin Kontrolü 37
4.4. Biyotinile Protein Özütlerinin SDS-PAGE Analizi 37
4.5. Biyotinilasyon reaksiyonunun gerçekleştiğinin Western Blot Analizi ile Gösterilmesi 38
4.6. Zenginleştirme Sonrası Western Blot Analizi 39
4.7. nLC-MS/MS Analiz Sonuçları 40

5. TARTIŞMA 42

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 46

7. KAYNAKLAR 47

SİMGELER ve KISALTMALAR

AmBic: Amonyum Bikarbonat

ATP: Adenozin Trifosfat

BPER: Bakteri Proteini Ekstraksiyon Reaktifi (Bacterial Protein Extraction Reagent)

BSA: Bovin Serum Albümin

DTT: Dithiothreitol

E. coli: Escherichia coli

FA: Formik Asit

GO: Gene Ontology

IPTG: Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MS: Kütle Spektrometresi

nLC-MS/MS: Nano Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi

nM: Nanomolar

OD: Optik Densite

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat –Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOB: Süper Optimal Besiyer

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1%Tween 20

TPER: Doku Proteini Ekstraksiyon Reaktifi (Tissue Protein Extraction Reagent)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.: Gram negatif ve Gram pozitif bakteri membran yapısı (Brown, Wolf, Prados-Rosales, & Casadevall, 2015)..... 2
Şekil 1.2.: *E. coli* K12'nin elektron mikroskobu görüntüleri. a. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü b. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü (H. Wang, Xie, Zhang, Jin, & Zhang, 2020)..... 3
Şekil 1.3.: *E. coli* K12 bakterisinin tahmini proteom lokalizasyonu PSORTdb (version 3.00) veri bankasından alınmıştır. (https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC_000913) 3
Şekil 1.4.: Membran proteinlerinin lokalizasyonu (Puthenveetil & Vinogradova, 2019) 5
Şekil 1.5.: Bakteriyel membran proteinlerinin uygulama alanları. 8
Şekil 1.6.: Biyotinin 2 boyutlu yapısı (https://www.labeyond.com/2-d-biotinc10h16n2o3svitamin-hvitamin-b7cas58-85-5.html) 10
Şekil 1.7.: Protein biyotinilasyon reaksiyonu (Henke & Cronan, 2014) 10
Şekil 1.8.: BirA enzimi 3D yapısı (https://www.rcsb.org/structure/1BIA) 11
Şekil 1.9.: TurboID ile yakınlık tabanlı etiketleme (Cho vd., 2020)..... 12
Şekil 1.10.: Biyotinilasyon Reaktifinin Yapısı 13
Şekil 3.1: pET-21a-TurboID plazmit haritası (https://www.addgene.org/107177/)..... 21
Şekil 3.2: Biyotinile proteinlerin zenginleştirilmesinin şematik gösterimi..... 29
Şekil 3.3: nHPLC analizi sırasında kullanılan ayırma gradyanı 32
Şekil 4.1: TurboID üretimi yaptırılan bakterilerden elde edilen protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Negatif Kontrol, 3- T-PER tamponu ile hazırlanmış bakteri lizatından elde edilen protein özütü, 4- 2DE rehidrasyon tamponu ile hazırlanmış bakteri lizatından elde edilen protein özütü)..... 34
Şekil 4.2: TurboID saflaştırma işlemi sırasında toplanan fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi. (Yükleme sırası: 1-Protein markerı, 2- Bağlanmayan fraksiyon, 3- Fraksiyon 1, 4- Fraksiyon 2, 5- Fraksiyon 3, 6- Fraksiyon 4, 7- Fraksiyon 5)..... 35
Şekil 4.3: Saflaştırılmış TurboID enziminin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmış olan jelin görüntüsü. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- 0,25 µg BSA, 3-

0,5 µg BSA, 4- 1 µg BSA, 5- 2 µg BSA, 6- 4 µg BSA, 7- 0,5 µl TurboID, 8- 1 µl TurboID, 9- 2 µl TurboID). 36
Şekil 4.4: BSA konsantrasyon grafiği 36
Şekil 4.5: TurboID enzim aktivitesinin Western Blot ile gösterilmesi. 1- Biyotinile edilmemiş protein özütü (Negatif kontol), 2- Biyotinile edilmiş protein özütü, 3- Oto biyotinilasyona uğramış saf TurboID enzimine ait protein bandı. 37
Şekil 4.6: Biyotinilasyon sonrası elde eldilen protein özütlerinin SDS-PAGE görüntüsü. Yükleme Sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 8- Biyotinile edilmemiş protein özütü (Negatif kontrol 1), 9- Biyotinile edilmemiş protein özütü (Negatif kontol 2), 10- Biyotinile edilmemiş protein özütü (Negatif kontol 3). 38
Şekil 4.7: Biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütlerine ait Western Blot görüntüsü. Yükleme Sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 8- Negatif kontrol..... 39
Şekil 4.8: Zenginleştirme sonrası Western Blot görüntüsü. A. Bağlanmayan proteinler, B. Boncuklar. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 3..... 39
Şekil 4.9: Yapılan deneylerin tekrarlanabilirliğini gösteren Venn şeması..... 40
Şekil 4.10.: A. Üç gruba ait membran proteinlerinin Venn şeması ile gösterimi, B. Gruplarda bulunan toplam membran proteini sayısını gösteren bar grafiği..... 41

TABLOLAR

Tablo 3.1.: Kullanılan kimyasallar ve kitler 18
Tablo 3.2: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri 19
Tablo 3.3: SDS-PAGE jel solüsyonları içerikleri 23

1. GİRİŞ

1.1. Bakteriler

Bakteriler zarlı organeli bulunmayan tek hücreli organizmalardır. Bakteriler küresel, çubuksu veya spiral gibi şekillerde olabilir ve boyutları genellikle 0,5 – 5 mikrometre civarındadır. Bakteriler dünya üzerindeki biyokütlenin yaklaşık %15'ini oluştururlar ve kara bitkilerinden sonra dünya üzerinde en çok bulunan gruptur (Bar-On, Phillips, & Milo, 2018). Topraktan, okyanusların derinliklerine ve sindirim sistemimize kadar çok çeşitli ortamlarda bulunurlar. Bakterilerin bilinen 19,540 türü vardır ve bunlar çok çeşitli ortamlarda hayatta kalabilmektedir (Reimer vd., 2021).

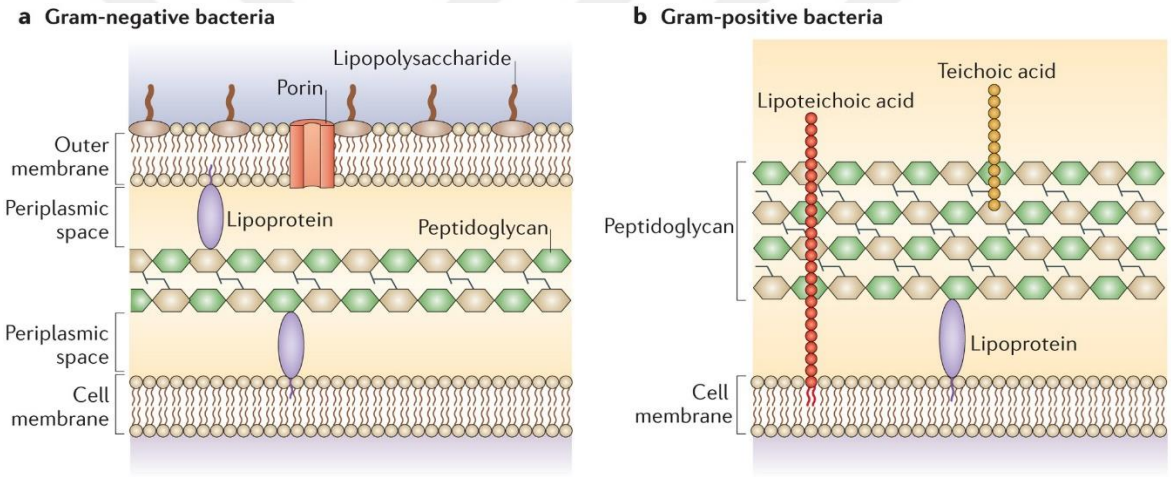
Bir insan vücudunda yaklaşık $3.8x10^{13}$ tane bakteri bulunmaktadır (Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Bu bakterilerle karşılıklı yararlanım içeren bir ilişki sürdürmekteyiz. Çoğunluğu gastrointestinal sistemimizde bulunan bakteriler besinleri sindirmemize, besinlerden gelen bazı toksinleri nötralize etmemize destek olurlar ancak bize sağladıkları bu avantajların yanında sağlığımız için tehlike oluşturabilen türleri de vardır. Vücudumuzdaki bozulmuş mikrobiota inflamatuar bağırsak hastalığı, mide ülseri, kolon kanseri ve obezite gibi ciddi hastalıklara sebep olur. Ayrıca bakteriler vücudumuzda enfeksiyona da sebep olabilirler. Bu zararlı bakterilerle antibiyotikler aracılığıyla savaşmaktayız ancak bakteriler antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirerek işimizi zorlaştırmaktadır.

1.2. Gram Negatif ve Gram Pozitif Bakteriler

Bakteriler gram boyama yöntemine göre iki sınıfa ayrılırlar. Gram pozitif bakterilerin hücre zarı fosfolipitler içeren sitoplazmik bir membran ve üzerindeki kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşur. Bu peptidoglikan tabaka gram boyamada kullanılan kristal-viyole boyasını tutar ve preparat alkolle yıkanınca hücre zarı büzüşür ve boya dışarı çıkamaz böylece bakteriler mavi-mor renkli görünür. Gram negatif bakterilerde ise ikinci bir dış membran vardır ve peptidoglikan tabaka iki membran arasındaki periferal boşlukta bulunur. Gram negatif bakterilerde bulunan peptidoglikan tabaka Gram pozitif bakterilerinkine göre çok

daha incedir. Gram boyamada ince peptidoglikan tabaka boyayı tutamaz ve alkol dış membrandaki lipitleri çözerek boyanın akmasına neden olur ve preparat tekrar safranin boyası ile boyandığında gram negatif bakteriler pembe bir renk alır (Kleanthous & Armitage, 2015). Tüm Stafilokok ve Streptokok cinsi bakteriler Gram pozitifken, Gram negatif bakterilere örnek olarak Enterobakter ve Pseudomonas cinsi bakteriler verilebilir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere ait membran yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

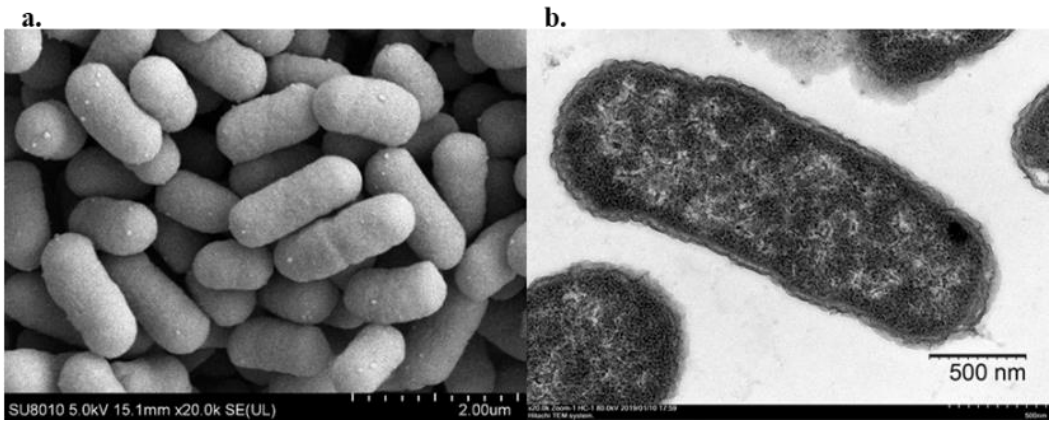
İki tür bakteri de kendilerine özgü toksinler salgılarlar ve menenjit, idrar yolu enfeksiyonu, difteri, kolera ve diyare gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadırlar. Bakteri kaynaklı hastalıklarda en etkili tedavi yöntemi antibiyotikler olsa da günümüzde giderek artan antibiyotik direnci ciddi bir sorun oluşturmaktadır.



Şekil 1.1.: Gram negatif ve Gram pozitif bakteri membran yapısı (Brown, Wolf, Prados-Rosales, & Casadevall, 2015)

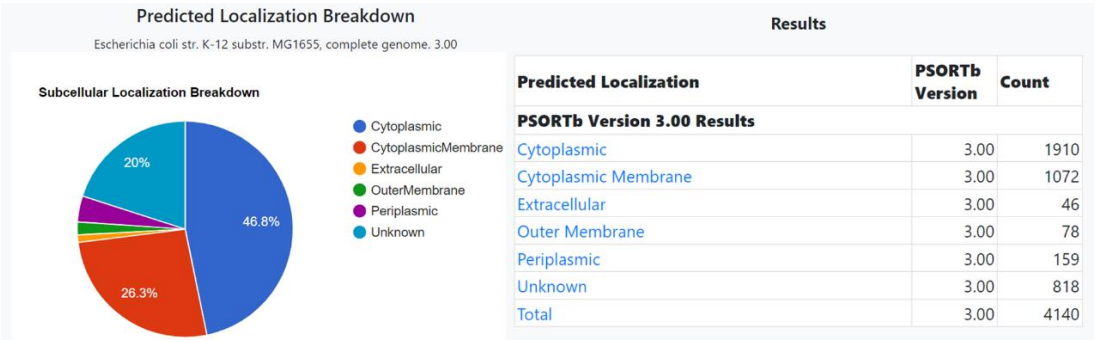
1.3. Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*), *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesidir. 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bebeklerin dışkısından elde edilmiştir. *E. coli* insanların ve memeli hayvanların gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunmaktadır. Çubuk şekilli 2.0-6.0 µm x 1.1–1.5 µm boyutlarında endospor oluşturmayan Gram negatif bir bakteridir (Percival & Williams, 2014). *E. coli* K12 suşunun elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2.: *E. coli* K12'nin elektron mikroskobu görüntüleri. a. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü b. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü *(H. Wang, Xie, Zhang, Jin, & Zhang, 2020)*.

E. coli'nin genomu ortalama 4,5 Mb boyutundadır ve 4000 ile 6500 arasında protein kodlar (Perna, Glasner, Burland, & Plunkett, 2002; Poolman, Geurtsen, & Weerdenburg, 2023). *E. coli*'nin proteomunun yaklaşık %30'unu membran proteinleri oluşturur. Bunlardan iç membran proteinleri total proteomun %26,3'ünü oluştururken dış membran proteinleri %1,9'unu ve periplazmik proteinler ise %3,9'unu oluşturur. *E. coli* proteomunun %20'lik bölümünün ise hücrelerdeki lokasyonu hala aydınlatılamamıştır. Şekil 1.3'te *E. coli* K12 suşunun tahmini proteom lokalizasyon dağılım grafiği verilmiştir.



Şekil 1.3.: *E. coli* K12 bakterisinin tahmini proteom lokalizasyonu PSORTdb (version 3.00) veri bankasından alınmıştır.
(https://db.psort.org/browse/genome?refseq=NC_000913)

E. coli hızlı bölünen, büyüme gereksinimleri az olan ve kolay manipüle edilebilir bir organizma olduğu için laboratuvarda yürütülen deneylerde sıklıkla kullanılan model organizmalardan birisidir. Genomunun dizilenmiş olması, replikasyon, gen ekspresyonu, protein sentezi gibi mekanizmalarının iyi biliniyor olması *E. coli*'nin tercih edilme sebeplerinden bazılarıdır (Blount, 2015). *E. coli* aynı zamanda birçok biyoteknolojik çalışmada ve ürün üretiminde de kullanılmaktadır (Abdelaal & Yazdani, 2022; McElwain, Phair, Kealey, & Brady, 2022)

E. coli genom, proteom ve transkriptomuna ait kapsamlı bilgilere ulaşımın kolay olması bu hücrelerin genetik ve biyokimyasal manipülasyonlara açık olmaları nedeni ile bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen yöntemsel yaklaşımlar önce *E. coli* üzerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar bu yöntemin diğer bakteri türlerine adapte edilmesi için bir yol gösterici olmuştur.

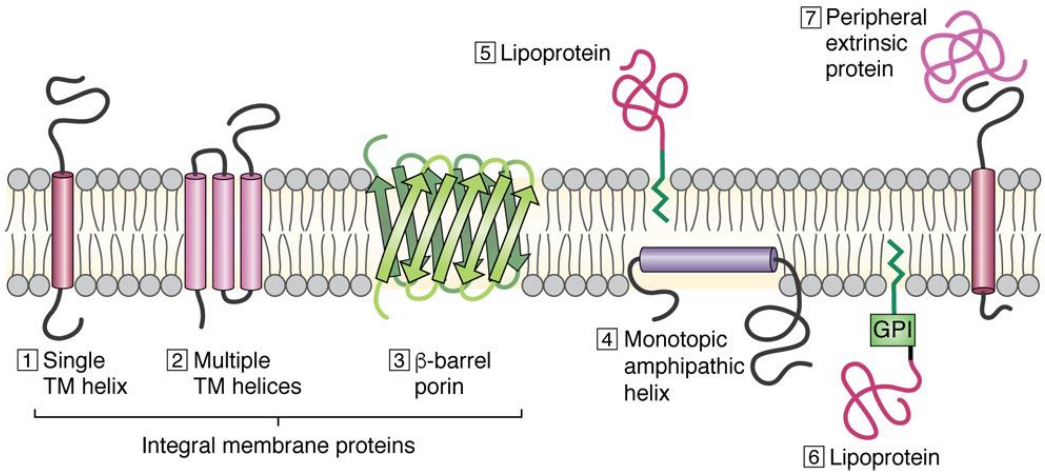
1.4. Bakteri Membranı ve Proteinleri

Bakteriler, onları dış ortamdan ayıran çift lipit tabaka yapısında seçici geçirgen dinamik bir membran ile çevrilidir. Yapısı genel olarak protein, yağ ve karbonhidrattan oluşur. Bakterilerin membranları hücreye şeklini vermekte dahil olmak üzere çok çeşitli görevler üstlenirler. Bakterinin dış ortamla temas ettiği ilk kısmı olduğundan hücrenin savunma mekanizmasında görev alır. Sıcaklık ve pH değişimi gibi fiziksel etkenlere karşı bakteriyi korur, dışarıdan aldığı sinyalleri hücrenin içerisine iletir ve hücrede oluşan yanıtın dışarıya taşınmasında rol oynar. Madde alışverişinde görev alır, ortamda bulunan diğer hücrelerle iletişimi sağlayarak, birbirlerine tutunmalarını sağlar. Hücre membranı bakterilerin kimliklerinin belirlenmesinde temel öğedir (Cooper, 2000; Ernst & Robertson, 2021).

Bakteri membranı bu görevleri genellikle yapısında bulunan proteinlerin yapısını konumunu ve miktarını değiştirerek gerçekleştirirler. Bu proteinler membranda çeşitli konumlarda bulunabilirler ve genel olarak integral ve periferal olarak iki gruba ayrılırlar. Membranın içerisine gömülü olan proteinler integral proteinlerdir ve integral proteinler membranı boydan boya geçen trans membran proteinleri olabileceği gibi, membranın tek bir tarafına bağlı monotopik proteinler de olabilir (Schulz, 2002). Periferal proteinler, integral proteinlerin zardan dışarıya doğru çıkan hidrofilik kısımlarına bağlanan proteinlerdir

(Koebnik, Locher, & Van Gelder, 2000). Şekil 1.4'te membran proteinlerinin hücre membranına muhtemel yerleşim biçimleri gösterilmiştir.

Bakteri hücre zarlarında ve periplazmada bulunan proteinlerin kendilerine özgün görevleri vardır. İç ve dış zara lokalize olmuş proteinler bakterinin fizyolojisinde önemli bir yer tutar. Proteinlerin membrandaki kompozisyonları bakterinin karakterini doğrudan etkiler. İntegral proteinler temel olarak besin alımı, protein transportu ve adezyon gibi süreç ve mekanizmalarda rol oynarken periferal proteinler iskelet proteinlerini ve hücredışı matriks elemanlarını destekler, etraflarındaki diğer hücreler ile iletişimi sağlar, enzim olarak çalışır ve aynı zamanda moleküllerin transferinde de rol alırlar. Gram-negatif bakterilerde bulunan periplazma bakteriye adaptasyon yeteneği kazandırır ve bu bölgedeki proteinler daha çokça proteazlar ve nükleazlardan oluşur. Periplazmik proteinler dış membran ve iç membran arasındaki koordinasyonu ve iletişimi sağlar.



Şekil 1.4.: Membran proteinlerinin lokalizasyonu *(Puthenveetil & Vinogradova, 2019)*

1.4.1. Dış Membran

Gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakasının üzerinde çift tabakalı lipit yapılı bir zar daha bulunur. Bu çift tabakanın yapısı asimetriktir ve dış taraftaki yaprağa bağlı lipopolisakkaritler bulunurken iç tarafında fosfolipitler ve lipoproteinler bulunur. Yapısında bulunan bu membran proteinlerinden transmembran olan proteinler β-yaprak yapısındadırlar (Guest & Silhavy, 2023). Dış zarda lokalize olan proteinlerin besin alımı, iyon taşınması, protein translokasyonu, enzim aktiviteleri, membran homeostazisi ve biyogenez gibi

görevleri bulunmaktadır. Dış zarın yapısı iç zara göre daha geçirgendir (Guérin & Buchanan, 2021). Porinler aracılığla şekerler ve amino asitler gibi küçük, suda çözünebilen moleküller dış membrandan geçebilirken bakteri için zararlı olabilecek toksinlerin geçişinin sınırlandırılmasıyla dış membran bir koruma görevi de görür (Nikaido, 2003; Sun, Rutherford, Silhavy, & Huang, 2022).

1.4.2. Periplazma

Gram negatif bakterilerin iki membranı periplazma denilen bir boşlukla birbirlerinden ayrılır. Periplazmanın hücre hacminin %20-40'ını oluşturan jelimsi bir yapısı vardır. İçerisinde turgor basıncı gibi durumlara karşı hücreye yapısal destek sağlayan peptidoglikan tabaka bulunur. Bunun yanı sıra çeşitli proteinler de içermektedir. Bu proteinler besinlerin depolanması, taşınması ve enzimatik aktiviteler gibi görevler üstlenmektedirler. Periplazma, sitoplazmaya göre daha oksitleyici bir ortamdır ve disülfit bağı içeren proteinler sitoplazma da inaktifken periplazmada aktif halde bulunurlar. Periplazma hücre içinde ayrı bir bölüm olarak bulunduğundan bakteri için toksik olabilecek ribonükleazlar ve fosfatazlar gibi enzimler sitoplazmadan ayrı tutulabilir böylece bakterinin kendisine zarar vermesi engellenir (D. Liu, 2019; Miller & Salama, 2018).

1.4.3. İç Membran

Dış membrandan farklı olarak simetrik çift katlı fosfolipid tabakadan ve proteinlerden oluşmaktadır. İç membrandaki proteinler *E. coli*'de kodlanan proteinlerin %20-30'unu oluşturur (Facey & Kuhn, 2010). Membrandaki protein:lipid oranı yaklaşık 3:1'dir. Seçici geçirgen bir yapıdadır ve hücrenin içine girecek molekülleri kontrol ederek hücre içi homoestazı sağlar. Bakteri için iç membran ökaryot hücrelerde çeşitli organellerce yürütülen görevleri üstlenen çok işlevli bir yapıdır. Bu görevler arasında aktif taşıma, enerji transdüksiyonu, fosfolipit, peptidoglikan ve lipopolisakkarit gibi moleküllerin biyosentezi vardır (Lovitt & Wright, 2014).

1.5. Bakteri Membran Proteinlerinin Önemi

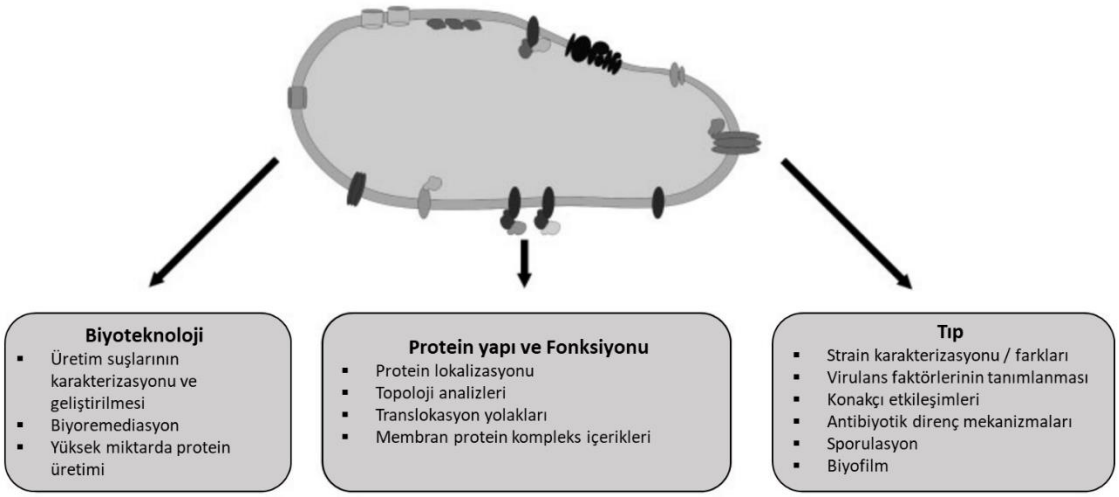
Bakterilerin membranları farklı yapılarda olsalar da benzer görevler üstlenirler. En temel görevi bakteriyi bulunduğu ortamdan ayırarak onu sıcaklık ve pH değişimi gibi fiziksel etkenlere karşı korumaktır. Bu değişiklikler algılandığında bakteri membranının

kompozisyonu değişir ve bakteri kendisini savunmaya alır. Aynı zamanda geçirgen bir yapısı olduğundan dolayı besin alımı gibi önemli bir işlevi de yürütür. Ancak bakterinin içerisine alınan maddelerin geçişine izin verirken seçici davranır ve bakteri için zararlı olabilecek veya bakterinin ihtiyacı olmayan moleküllerin geçişine izin vermez. Bakterinin içerisinde oluşan atıkların veziküller aracılığıyla dışarıya atılmasını sağlar. Bakteri dışarıdan gelen antibiyotik gibi bir tehditle karşılaştığında ilk savunmasını membranı aracılığıyla yapar. Membran yeniden şekillenir ve üzerinde bulunan pompalar aracılığıyla antibiyotiğin dışarı atılmasını sağlar. Bütün bu görevleri yaparken bakteri membranında bulunan proteinleri kullanır dolayısıyla bakterinin membran proteinlerini tanımlamak bakterinin yaşam döngüsünde gerçekleştirdiği bütün bu işlevleri anlamak için oldukça önemlidir.

2008 yılında InterPro veritabanında yapılan bir analiz ile *E. coli*'nin membran proteinleri sınıflandırılmıştır. Yapılan analize göre *E. coli* membranında en çok bulunan protein aileleri arasında ana kolaylaştırıcı süper aile (MFS)'nin üyeleri, (ATP) bağlayıcı proteine bağımlı taşıyıcılar, histidin kinazlar, amino asit permeazları, fosfotransferaz sistemleri, DUF6 membran protein ailesi, AAA ATPazlar, GGDEF alanı içeren proteinler, APC taşıyıcı üst ailesi, sodyum:dikarboksilat simporter ailesi bulunmaktadır (Poetsch & Wolters, 2008).

Bakterilerin membranlarında bulunan proteinler, bakterilerin diğer organizmalarla olan ilişkisinin ortaya çıkarılabilmesi ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılması açısından oldukça ilgi çekicidir. Özellikle bakterilerin insanlarla olan ilişkisinin ve konakçı patojen etkileşiminin anlaşılması için bakteriyel membran proteini çalışmaları oldukça önemlidir. Bakteriler hem konakçısını seçip patojenik etki gösterirken hem de konakçının savunma mekanizmasına karşı savaşırken membran proteinlerini kullanır. Ayrıca bakterilerin kanser gibi tedavisi zor olan hastalıklar için ilaç taşıyıcı olarak kullanılarak hedef odaklı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılması için de çalışmalar yürütülmektedir (Faghihkhorasani vd., 2023; Yuxi Zhou & Han, 2022). Membran proteinlerinin tanımlanması patojenik bakterilere karşı etkili bir mücadele verilmesini ve patojenik özelliklerini avantajımıza çevirerek tedavi amaçlı kullanılmasını sağlayacaktır. Sağlık alanlarındaki öneminin yanı sıra bakterilerin membran proteinlerinin anlaşılması biyoteknoloji alanında da oldukça büyük bir yer tutar. Bakteriler atık suların temizlenmesi gibi amaçlarla biyoremediasyon alanında (de Alencar, Navoni, & do Amaral, 2017; Hui, Guo, Liu, & Yi, 2021; Kabiraj, Biswas, Halder, & Bandopadhyay, 2022) ve endüstride antibiyotik, bazı ilaçlar (McElwain vd., 2022), süt ürünleri (García-Burgos, Moreno-Fernández, Alférez, Díaz-Castro, & López-Aliaga, 2020) ve çeşitli kimyasalların üretiminde

de (Abdelaal & Yazdani, 2022) kullanılmaktadır. Membran proteinlerinin yapılarının, görevlerinin ve çevresel uyaranlara verdikleri yanıtların anlaşılması bakterilerin endüstriyel olarak kullanımını kolaylaştıracağı gibi yeni alanlarda kullanımının da önünü açacaktır. Şekil 1.5'te bakteriyel membran proteinlerinin çeşitli uygulama alanları gösterilmiştir.



Şekil 1.5.: Bakteriyel membran proteinlerinin uygulama alanları.

1.6. Membran Proteini Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

Bakterilere ait membran proteinlerinin tanımlanma çalışmaları uzun zamandır devam etmektedir. 1976 yılında Ames ve Nakaido tarafından 2D jel elektroforezi kullanılarak yapılan çalışmada yaklaşık 150 adet *E. coli* hücre membran proteini tanımlanmıştır (Ames & Nikaido, 1976). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli yöntemler geliştirilmiş, özellikle sıvı tabanlı kütle spektrometre yöntemleri ile bakterilere ait çok sayıda membran proteini tanımlanabilmiştir (le Coutre vd., 2000; A. Y. Wang, Thuy-Boun, Stupp, Su, & Wolan, 2018; Yusi Zhou & Chen, 2011). Elde edilen başarılar tüm zorlukların aşıldığı anlamına gelmemektedir çünkü membran proteinleri ile çalışmanın bu proteinlerin doğasından kaynaklı zorlukları da beraberinde getirdiği bilinmektedir. Bu zorlukların başlıcaları membran proteinlerinin hidrofobik yapısı ve düşük çözünürlüğü, analizlerde kullanılabilecek ideal proteaz sayısının azlığı, içerisinde bulundukları yapıdaki lipitleri uzaklaştırmanın zorluğu ve hücredeki ifade düzeylerinin azlığıdır (Carpenter, Beis, Cameron, & Iwata, 2008; Seddon, Curnow, & Booth, 2004). Bu zorlukların aşılması için

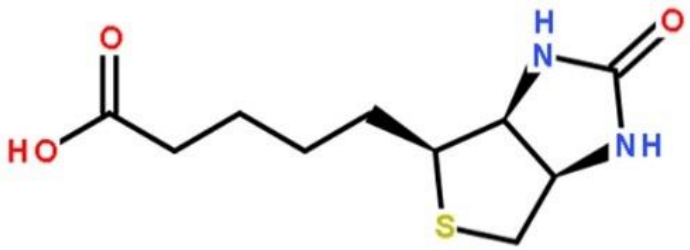
zaman içerisinde farklı yaklaşım ve yöntemler geliştirilmiş ve hala geliştirilmeye de devam edilmektedir.

Temel olarak membran proteini çalışmalarında kullanılan yöntemleri jel temelli olanlar ve olmayanlar olarak ikiye ayırabiliriz. Jel temelli yöntemler 2-D ve 1-D PAGE analizleri ve bu yöntemlere yapılan eklemelerden oluşur. Jel de ayrılan proteinler daha sonra çeşitli kütle ayırım tekniklerine tabi tutulur. Jel temelli olmayan yöntemlerde membran proteinlerinin tıraş edilmesi için proteazların kullanılması, membran proteinlerinin etiketlenmesi ya da işaretlenmesi (kimyasal biotinilasyon, CyDye), güçlü katyon değişim kolonlarının kullanılması ve densite-gradient gibi metotlar vardır (Poetsch & Wolters, 2008). Bu çalışmalar yapılırken en temel problem membran proteinlerini çözünür halde tutmaktır. Bu problemin üstesinden gelebilmek ve membran proteinlerinin çözünürlüğünü artırabilmek için Triton X-100, cholate, CHAPS, Zwittergent 3-12 ve Deoxy BIG CHAP gibi deterjanlar kullanılmaktadır (Alfonso-Garrido, Garcia-Calvo, & Luque-Garcia, 2015; Rodríguez-Ortega, 2018; Smith, 2011). Bu yöntemler sayesinde membran proteinlerinin izolasyonu ve tanımlanması daha verimli bir şekilde yapılıyor olsa da henüz istenilen noktaya gelinmemiştir.

1.7. Biyotinilasyon

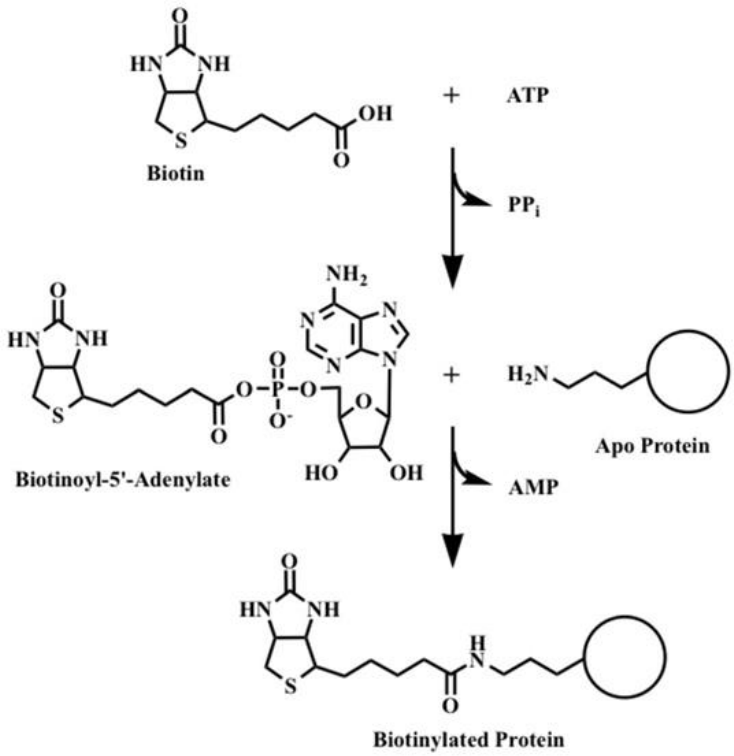
1.7.1. Biyotin

Vitamin H veya B7 olarak da bilinen biyotin tüm canlılar için oldukça gerekli olan bir moleküldür. PubChem'de yapılan tanıma göre biyotin, tetrahidrotiyofen halkasına bağlı bir valerik asit ikame edicisine sahip 2-oksoheksahidro-1H-tiyeno[3,4-d]imidazolden oluşan organik bir heterobisiklik bileşiktir (Şekil 1.6). Biyotin; glukoneogenez, yağ asidi sentezi ve amino asit metabolizması gibi olaylarda rol alan karboksilazlar, dekarboksilazlar ve transkarboksilazlar gibi biyotin-bağımlı enzimler için kofaktör görevi görür (Sirithanakorn & Cronan, 2021). Suda çözünebilen bir vitamin olan biyotin; hücrenin normal fonksiyonları, büyümesi ve gelişmesi için oldukça önemlidir.



Şekil 1.6.: Biyotinin 2 boyutlu yapısı (https://www.labeyond.com/2-d-biotinc10h16n2o3svitamin-hvitamin-b7cas58-85-5.html)

Biyotin, proteinlerin lizin içeren bölgelerine ATP yardımıyla biyotin ligazlar tarafından eklenir (Şekil 1.7). Biyotin sentezi bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalarda gerçekleşirken; memeli canlılarda biyotin sentezi gerçekleşmez. Biyotin; streptavidin, avidin ve neutroavidine afinite gösterir ve bu proteinlerle olan etkileşimleri doğada bulunan en güçlü non-kovalent etkileşimdir. Biyotinin bu avantajları onu biyoteknolojik çalışmalarda kullanmak için ilgi çekici kılmıştır. Biyotinilasyon reaksiyonu genel biyotinilasyon için veya çeşitli proteinlerle füzyon yapılması yoluyla daha özel amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Bunun için *E. coli*'de bulunan BirA biyotin ligaz enzimi temel alınarak daha fonksiyonel biyotin ligazlar geliştirilmiştir.

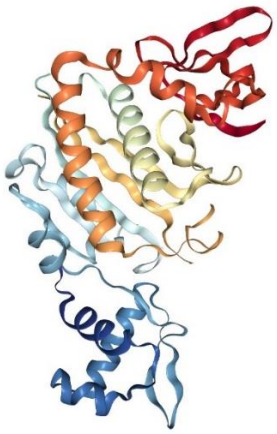


Şekil 1.7.: Protein biyotinilasyon reaksiyonu (Henke & Cronan, 2014)

1.8. Biyotin Ligazlar

1.8.1. BirA

Biyotin ligazlar arasında en iyi bilineni *E. coli*'de bulunan 35,3 kDa'lık monomerik bir protein olan BirA enzimi'dir (Şekil 1.8). BirA, sadece apo-biyotin karboksil taşıyıcı proteinini (apo-BCCP) biyotinile eder ve enzimin aktif formuna gelmesini sağlar. Ayrıca hücredeki biyotin biyosentezinin düzenlenmesinde transkripsiyonel baskılayıcı olarak rol alır (Choi-Rhee, Schulman, & Cronan, 2004). Bu görevleri yaparken ATP kullanır. Biyotinilasyon iki aşamada gerçekleşir. BirA enzimi öncelikle hücre içerisinde bulunan biyotin ve ATP'ye bağlanarak biyotinoil-5′-AMP'yi (bioAMP) oluşturur. İkinci adımda ise bioAMP kompleksi apo-BCCP'nin lizin aminoasidine üzerindeki biyotini aktarır. Ortamdaki biyotin miktarı yükselip tüm proteinler biyotinlenerek aktif duruma geldiğinde bioAMP kompleksi biyotin biyosentezinde rol alan enzimlerin transkripsiyonel olarak sentezlenmesini engelleyecek şekilde DNA dizisine bağlanır (Oostdyk vd., 2019).



Şekil 1.8.: BirA enzimi 3D yapısı (https://www.rcsb.org/structure/1BIA)

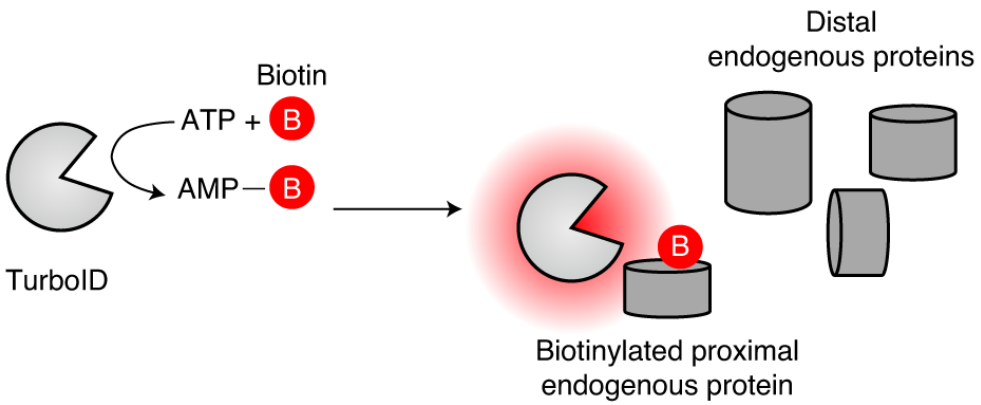
Protein-protein etkileşimi gibi çalışmalarda biyotinilasyondan oldukça fazla yararlanılmaktadır ancak BirA enziminin en büyük dezavantajı biyotinilasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için biyotin alıcı etiketi (BAT) denilen spesifik bir diziye ihtiyaç duymasıdır. Bu problemin üstesinden gelmek için BirA enzimi mutasyona uğratılarak 118 pozisyonundaki glisin aminoasidi alanin ile değiştirilmiştir. Geliştirilen bu mutant BirA enzimi BioID (BirA*) olarak isimlendirilmiştir ve yabani tip BirA enziminin aksine spesifik

bir diziye ihtiyaç duymadan lizin aminoasidine biyotin ekleyebilir (Roux, Kim, Raida, & Burke, 2012).

1.8.2. TurboID

Yakınlık tabanlı etiketleme çalışmalarında kullanılmak üzere daha verimli ve geniş tabanlı olarak kullanılabilecek bir biyotin ligaz enzimi geliştirmek için yönlendirilmiş evrim çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada temel olarak alınmak üzere BioID enzimi ve 118 pozisyonundaki glisin aminoasidinde yapılan 7 diğer mutasyon kıyaslanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda R118S mutantının R118G mutantına göre neredeyse 2 kat daha aktif olduğu bulunduğundan dolayı yönlendirilmiş evrim çalışmalarına başlarken kalıp olarak BirA-R118S mutantı kullanılmıştır. Yönlendirilmiş evrim deneylerinin sonucunda 35kDa boyutunda, hiçbir amino asit dizisine ya da motifine bağımlı olmayan TurboID enzimi geliştirilmiştir. TurboID bütün bu avantajlarına ek olarak diğer biyotin ligazlardan çok daha kısa bir sürede biyotinilasyon gerçekleştirebilmektedir (Branon vd., 2018). TurboID kullanılarak yapılan yakınlık tabanlı etiketleme yöntemi Şekil 1.9.'da şematik olarak gösterilmiştir.

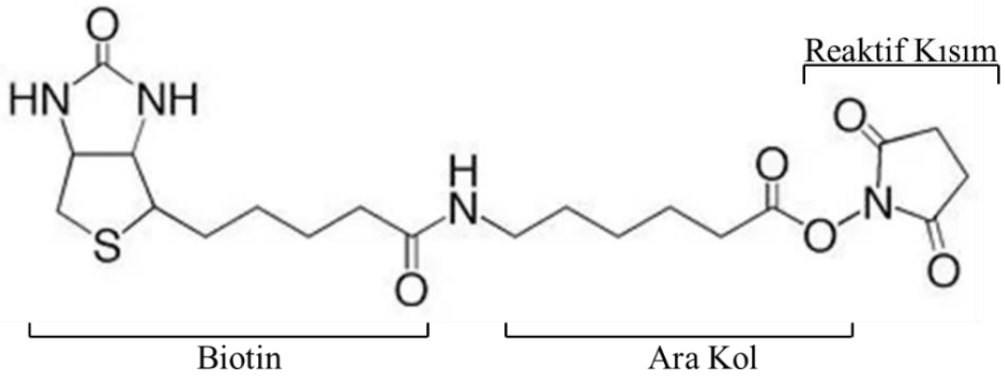
Yürütülen bu tez çalışması kapsamında TurboID enziminin bütün avantajlarından faydalanarak bakterilerin membran proteinlerinin tanımlanması hedeflenmiştir.



Şekil 1.9.: TurboID ile yakınlık tabanlı etiketleme (Cho vd., 2020)

1.9. Kimyasal Biyotinilasyon

Proteinleri biyotin ile işaretleme işlemi biyotin ligazlar aracılığıyla enzimatik olarak yapılabileceği gibi kimyasal yoldan da gerçekleştirilebilir. Kimyasal biyotinilasyon için kullanılacak reaktifin üç tane temel yapıtaşı vardır. Bunlardan birincisi biyotindir. Biyotinin yapısında bulunan valerik asit yan zinciri streptavidin, avidin veya neutravidin'e bağlanır ve biyotin ile işaretlenmiş proteinin zenginleştirilmesine olanak sağlar. Reaktifin yapısında bulunan ikinci kısım biyotin ve arasında bulunan ara koldur. Ara kolun uzunluğu biyotin ve avidin etkileşimini belirleyen en önemli etkendir. Bir proteinin üzerinde birden çok biyotin bulunmasından kaynaklanacak sterik engellemeden kurtulabilmek için ara kol kullanılabilir ve ara kolun boyu biyotinlerin avidin tarafından bağlanmasını etkiler. Ayrıca kullanılabilecek uygun ara kollarla biyotinilasyonun tersine çevrilmesi ve reaktifin çözünürlüğünün artırılması gibi özellikler eklenebilir. Üçüncü temel kısım biyotinin proteinlere kovalent olarak bağlanmasını sağlayan reaktif parçadır. En yaygın olarak kullanılanlarından birisi reaktif ester olan N-hidroksisüksinimit (NHS) grubudur (Hermanson, 2008). Kimyasal biyotinilasyon yapmak için kullanılan biyotinilasyon reaktifinin kimyasal yapısı Şekil 1.10.'da verilmiştir. Bu çalışma kapsamında Sulfo-NHS-LC-Biotin kullanılmıştır.



Şekil 1.10.: Biyotinilasyon Reaktifinin Yapısı

1.10. Avidin/Streptavidin-Biotin Etkileşimi

Avidin yumurtanın beyazında bulunan homotetramerik yapıda bir glikoproteindir. Avidinin üzerinde dört tane biyotin bağlanma bölgesi vardır ve avidin-biyotin etkileşimi doğada görülen en güçlü non-kovalent bağlanmalardandır (K_d ~10^{-15} M). Avidin-biyotin

etkileşimi çok yüksek sıcaklıklar, pH değişimi ve denatüre edici ajanların varlığı gibi çok zorlayıcı durumlarda bile istikrarlı durumda kalır (Green, 1975).

Avidinin fonksiyonel bir analoğu olan streptavidin, *Streptomyces avidinii* bakterisinden elde edilmiştir. Streptavidin de aynı avidin gibi homotetramerik yapıdadır ve biyotine güçlü bir şekilde bağlanır. Avidinden farkı glikozillenmemiş olmasıdır ve bu durum streptevadinin avidinden daha özgün bağlanma göstermesini sağlar (Dundas, Demonte, & Park, 2013).

Avidin/Streptavidin-Biyotin etkileşimi keşfedildikten sonra ilaç taşınması, protein işaretlenmesi ve saflaştırılması gibi çok çeşitli biyoteknolojik çalışmalar için kullanılmaya başlanmıştır (Dundas vd., 2013; Le, Nguyen, & Park, 2019). Tez çalışmamız kapsamında streptavidin ile kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak biyotin ile işaretlenmiş proteinler zenginleştirilmiş ve analizleri yapılmıştır.

1.11. Biyotinilasyon Kullanılarak Yapılan Proteom Çalışmaları

TurboID enzimi ve türevleri geliştirildikten sonra biyotin aracılı yakınlık tabanlı etiketleme tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar oldukça popüler hale gelmiştir. Prokaryotlardan mayalara, hücre kültürüne, bitkilere ve hatta hayvan çalışmalarına kadar çok çeşitli canlıda kullanımı gösterilmiştir. Bu teknik kullanılarak hücre organellerinde bulunan proteinler ve hücre dışı ortama salınan proteinler işaretlenmiş, protein – protein etkileşimleri incelenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* mayalarında yapılan bir çalışmada TurboID enzimi hücre içerisindeki etkileşimi gözlenmek istenen proteine takılmış ve streptavidin kaplı boncuklar ile zenginleştirilmiştir. Elde edilen biyotinle proteinler ile LC-MS/MS analizi yapılmış ve TurboID tabanlı etiketleme sisteminin mayalarda da kullanılabileceği gösterilmiştir (Larochelle, Bergeron, Arcand, & Bachand, 2019). Chagas hastalığına sebep olan *Trypanosoma cruzi* bir protozoadır ve konakçısıyla flagellası aracılığıyla etkileşir. *T. cruzi* ve konakçısı arasındaki etkileşimi öğrenmek ve uygun bir tedavi stratejisi geliştirebilmek için TurboID enzimi kullanılarak flagellar proteinler işaretlenmiş ve HPLC-MS/MS ile bu proteinler tanımlanmıştır (Won, Baublis, & Burleigh, 2023). İnsan mitokondri etkileşim haritasını çıkarmak için yapılan bir çalışmada mitokondrinin çeşitli bölümlerinde bulunduğu bilinen 100 tane proteine BioID enzimi takılarak biyotinilasyon gerçekleştirilmiş ve biyotinile proteinler streptavidin kaplı boncuklarla zenginleştirildikten sonra bu proteinlere HPLC-MS/MS analizi yapılmıştır.

Yapılan çeşitli biyoinformatik analizler sonucunda mitokondri yakınlık etkileşim haritası çıkartılmıştır (Antonicka vd., 2020). CHO hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada plazma membran proteinlerinin TurboID ve TurboID-Start enzimleri ile işaretlenip LC-MS/MS ile verimli bir şekilde tanımlanabildiği gösterilmiştir (Sarihan, Kasap, & Akpinar, 2024). Hücre kültüründe in vitro ortamda gerçekleştirilen çalışmalar in vivo ortama taşınarak çeşitli model organizmalar üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. B6D2F1 türü farelerden geliştirilen *Tesmin* KO fare hattı ile yapılan bir çalışmada testiste üretilen TESMIN proteinin interaktomunu belirlemek için bu proteini TurboID ve BioID2 ile birlikte üreten transgenik fare modelleri geliştirilmiştir (Oura, Ninomiya, Sugihara, Matzuk, & Ikawa, 2022). Proteom ve interaktom çalışmalarında kullanılmak üzere TurboID enziminin kullanıldığı yeni bir Zebrafish modeli geliştirilmiştir. TurboID enzimi ve GFP bağlayıcı nanobody olan dGBP ile füzyon oluşturulmuş ve bu füzyonu ifade eden transgenik bir Zebrafish hattı oluşturulmuştur. Böylece GFP ile etiketlenen ilgilenilen proteinin TurboID-dGBP füzyonu ile etkileşime girdiği ve TurboID enziminin ilgilenilen proteini biyotinle ettiği bir sistem geliştirilmiştir. (Xiong, Lo, McMahon, Parton, & Hall, 2021).

Biyotin kullanılarak gerçekleştirilen yakınlık tabanlı işaretleme yönteminin kullanım alanı oldukça çeşitlidir ve her geçen gün bu çeşitliliğe bir yenisi eklenmektedir. Çalışmalar genellikle ökaryotik sistemlere odaklanmış durumdadır. Sunulan bu tez kapsamında yaptığımız bu çalışmayla biyolojik biyotinilasyon yaklaşımının prokaryot sistemlerde de uygulanabilirliğini göstermiş olduk.

2. AMAÇ

Hücrelerin bulunduğu ortam ile temas ettiği, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerdeki değişikleri algıladığı ve bunlara karşı yanıt oluşturduğu hücre kompartımanı membranlarıdır. Hücreler besin alımı, madde-giriş çıkışı, komşu hücrelerle iletişimi sağlamak gibi çok çeşitli aktivitelerini membranları aracılığıyla yaparlar. Tüm bu olaylarda membranlarında lokalize olmuş proteinler rol alır.

Bakterilerin membranlarında integral ve periferal yerleşime sahip proteinler bulunur. Bu proteinler hücrenin iskelet sistemini desteklemekten besin alımının düzenlenmesine ve hatta antibiyotik gibi ajanlara karşı savunma mekanizması oluşturulmasına kadar birçok mekanizmada rol alırlar.

Bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci günümüzde oldukça büyük bir problem haline gelmiştir. Geliştirilen antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç kazanması bakteri kaynaklı hastalıklarla mücadele ederken karşılaşılan en önemli zorluktur. Bu problemin üstesinden gelebilmek, bakterileri daha iyi tanıyabilmek ve biyoteknolojik çalışmalarda bakterileri daha verimli şekilde kullanabilmek için bakterilerin membran proteinlerinin ve bu proteinler ait karakteristik özelliklerin bilinmesi oldukça önemlidir.

Bakterilerin membran proteinlerini izole etmek ve tanımlamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ancak membran proteinlerinin hidrofobik yapıları, düşük çözünürlükleri, içerisinde bulundukları lipitlerin uzaklaştırılmasında yaşanan zorluklar gibi sebeplerle yapılan çalışmalar yeterince verimli değildir. Son dönemde yapılan membran proteini çalışmalarında yakınlık tabanlı (proximitiy labelling) etiketleme yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde izole edilmek istenen proteinlere biyotin etiketi eklenir ve biyotinin streptavidin/avidin/neutrovidin gibi proteinlere olan güçlü afinitesi kullanılarak işaretlenen proteinler izole edilir. Kimyasal biyotinilasyonun yanı sıra yönlendirilmiş evrim çalışmalarıyla TurboID enzimi gibi birçok biyotin ligaz enzimi geliştirilmiştir ve yakınlık tabanlı etiketleme için kullanılmaktadır. Literatürde, geliştirilen kimyasal ve enzimatik biyotinilasyon yöntemlerinin bakteri membran proteinlerinin tanımlanmasında kullanıldığına ve bu yöntemler arasında bir kıyaslama yapıldığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda literatürde bulunan bakteriyel membran proteomunu tanımlamaya yönelik metot eksikliğinin giderilmesi ve kimyasal biyotinilasyon ile enzimatik biyotinilasyon yöntemlerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla model organizma olan *E. coli* K12 suşu tercih edilmiştir. Bakterilerin membran proteinleri kimyasal ve enzimatik olarak biyotin ile etiketlendikten sonra streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanarak zenginleştirilmiş ve zenginleştirilen proteinlerden triptik kesim ile peptitler elde edilmiştir. Elde edilen peptitler nLC-MS/MS analizine tabi tutularak membran proteinleri tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile bakterilerin membran proteinlerinin tanımlanması için yeni bir yaklaşım geliştirilmesi ve kimyasal biyotinilasyon ile enzimatik biyotinilasyonun kıyaslanması hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Proteomiks Laboratuvarında Haziran 2023 – Nisan 2024 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmayı yürütürken kullanılan kimyasallar ve kitlerin alındığı fırma adı ve çözeltilerin içerikleri Tablo 3.1. ve 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1.: Kullanılan kimyasallar ve kitler

Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler	**Firma Adı**
LB Broth agarlı	Condalab
LB Broth	Condalab
Ampicillin	Sigma
IPTG	Sigma,
T-PER Liziz Tamponu	Thermo Scientific
B-Per Liziz Tamponu	Thermo Scientific
Bradford Reagent	BioRad
Streptavidin kaplı manyetik boncuk	Thermo Scientific
Goat Anti-Mouse HRP	BioRad
Streptavidin-HRP	Thermo N100
BSA	BioRad
Blotting Grade Blocker	BioRad
Filtre kağıdı	BioRad
Nitroselüloz membran	BioRad
$MgCl_2$	Fluka Analytical
ATP	SIGMA-ALDRICH
Biotin	SIGMA-ALDRICH
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientfic
Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific
ECL solüsyonu	BioRad
100X Proteaz İnhibitörü	Sigma
In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit	Thermo Scientific
Qubit Protein Assay	Invitrogen

Tablo 3.2: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Kullanılan Çözeltiler	**İçeriği**
6X protein yükleme tamponu	62,5 mM Tris-HCl, %2 SDS, %20 Gliserol, %5 β-merkaptoetanol, %0,5 bromofenol mavisi
10X yürüme tamponu	25Mm Tris-HCl, 192mM Glisin, %0.1 SDS
Transfer Tamponu	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glisin, 1,3 mM SDS, %20 Metanol
Fiksatif solüsyonu	%40 Metanol, %10 asetik asit, %50 distile su
Colloidal Commassie Mavisi boya solüsyonu	757mM amonyum sülfat, 1.45mM Commassie blue, %20 metanol, %10 ortofosforik asit
10X TBS çözeltisi	25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.6
Ponceau S boyası	1.5mM Ponceau S, %0,5 Asetik asit
2DE Rehidrayon Tamponu	8 M Üre, 50 mM DTT, %2 CHAPS, %0,2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, %0.002 Bromofenol mavisi
His-Tag Kolon Bağlanma Tamponu	50mM imidazole, 20mM sodyum fosfat, 0,5M NaCl, pH 7.4
His-Tag Kolon Elüsyon Tamponu	500mM imidazole, 20mM sodyum fosfat, 0,5M NaCl, pH 7.4
Yıkama Solüsyonu 1	1M KCl, 40mM Tris-HCl pH 8.0
Yıkama Solüsyonu 2	0,1M Na_2CO_3
Yıkama Solüsyonu 3	2M Üre, 10mM Tris-HCl

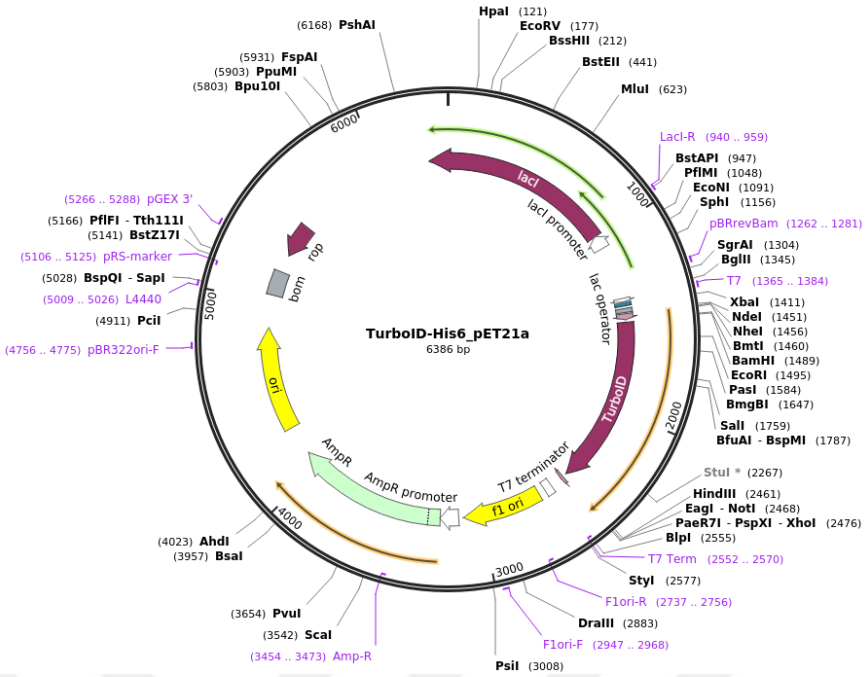
3.1. TurboID Enziminin Üretilmesi

3.1.1. pET-21a-TurboID Plazmitinin *E. coli* BL21 Hücrelerine Transformasyonu

pET-21a-TurboID plazmiti Alice Ting tarafından 2021 yılında laboratuvarımıza hediye edilmiştir ve laboratuvarımızın envanterinde bulunmaktadır. pET21a-TurboID plazmitinin haritası Şekil 3.1.'de verilmiştir. Protein üretimi yaptırmak için plazmit laboratuvarımızda var olan *E. coli* BL21 suşunun elektro kompotent formuna elektroporasyon yoluyla transforme edilmiştir. Transformasyon basamakları aşağıda verilmiştir.

Transformasyon Protokolü:

1) 50 µl'lik alikotlar halinde saklanan %10 gliserol içeren *E. coli* BL21 (DE3) bakterisi üzerine 0,5 µl (10ng) pET-21a-TurboID plazmiti eklendi ve elektroporasyon küvetine aktarıldı.
2) Soğuk küvet, elektroporasyon cihazına (eppendorf, Electroporator 2510) yerleştirildi ve 1780V akım verildi.
3) Elektropore edilen bakterilerin üzerine 300 µl SOB (Super Optimal Broth) eklenerek 15 ml'lik falkona aktarıldı.
4) Bakteriler 37ºC'de 45 dk inkübe edildi.
5) İnkübasyon sonunda bakteriler 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar besi yerine 10 µl olacak şekilde yayma ekim yöntemiyle ekildi.
6) Petri kapları gece boyunca 37ºC'de inkübe edildi.



Şekil 3.1: pET-21a-TurboID plazmit haritası (https://www.addgene.org/107177/)

3.1.2. TurboID Üretimi

Transformasyon sonrası ampisilin içeren LB agar petri kaplarında büyüyen kolonilerden seçim yapıldı ve seçilen koloni 100 µg/ml ampisilin içeren LB Broth besi yerinde gece boyu 37ºC'de çalkalayıcıda büyümeye bırakıldı. Gece boyu üreyen pET-21a-TurboID plazmitini içeren bakterilerden protein üretimi yapmak için aşağıdaki adımlar izlendi.

1) 200 ml 100 µg/ml ampisilin içeren LB Broth besi yerine ön kültürden 1:100 oranında ekim yapıldı ve 37ºC'de çalkalayıcıda büyümeye bırakıldı.
2) Bakterilerin büyüme eğrileri SHIMADZU UV-1208 cihazı ile OD değerleri ölçülerek takip edildi ve 600nm'de OD değeri 0,4 – 0,6 aralığına geldiğinde 0,1 mM IPTG eklenerek protein üretimi uyarıldı. İndükleme yapılmadan önce negatif kontrol olarak 10 ml bakteri ayrı bir falkona alındı.
3) Bakteriler 3 saat boyunca 30ºC sıcaklıkta çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi.
4) İnkübasyon sonunda bakteriler 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 4.500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek besi yeri uzaklaştırıldı.
5) Bakteri pelleti 2 kere 50 ml PBS ile yıkandı ve 4,500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek PBS uzaklaştırıldı.

6) Bakteri pelleti safelock Eppendorf tüplerine alındı ve 300 µl T-PER liziz tamponu ile çözüldü, içerisine proteaz inhibitörü eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
7) Tüplerin içerisine 0,5 mm ve 0,2 mm çelik boncuklar (Next Advance, SSB02 – SSB05) eklendi ve Bullet Blender cihazında (Next Advance) 8 güç, 4 dk ayarında 4 kere mekanik patlatmaya maruz bırakıldı.
8) Liziz olan bakteriler 10,000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek boncuklar ve çöken proteinler uzaklaştırıldı.
9) Süpernatant 15,000 rpm'de 15 dk daha santrifüj edilerek hücre artıkları iyice uzaklaştırıldı ve bakterilerden protein özütleri elde edilmiş oldu.
10) Çöken proteinlerin (8. aşamada elde edilen pellet) üzerine 50 µl 2DE rehidrasyon tamponu eklenerek çöken bu proteinlerin çözünür hale gelmesi sağlandı. 7, 8 ve 9. adımlar tekrarlandı.

3.1.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein özütlerinin protein konsantrasyonları modifiye Bradford yöntemi kullanılarak ölçüldü (Kruger, 2009). Bradford yönteminde kullanılan boya Coomassie Brillant Blue G-250'dir ve proteinde bulunan arginin gibi bazik aminoasitlere bağlandığında rengi kırmızı-kahverenginden maviye dönüşür. Bu renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür ve nanodrop cihazına girilmiş standartlar ile kıyaslanarak protein miktarı belirlenir. Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonu nanodrop cihazı (Thermo Scientific, NANODROP 1000) kullanılarak aşağıdaki protokole göre ölçüldü.

Bradford yöntemi ile konsantrasyon ölçümü:

1) 20X konsantre Bradford boyası dH_2O ile 1X'e dilue edildi ve filtre edilerek şişelendi.
2) Protein örnekleri dH_2O ile 1:10 dilue edildi.
3) 980 µl 1X Bradford boyası 20 µl 2DE rehidrasyon tamponu ile karıştırıldı. İçerisine 1 µl dilue edilen protein örneği konuldu.
4) Hazırlanan protein-boya karışımı 525 nm'de nanodrop cihazında en az 3 kere ölçüldü. Blank olarak 20 µl 2DE rehidrasyon tamponu konulmuş ancak protein örneği konulmamış boya kullanıldı.

5) Elde edilen 3 değerin ortalaması alınarak proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı.
6) Proteinlerin kalitesinin ve konsantrasyon ölçümlerinin doğruluğu SDS-PAGE analizi ile kontrol edildi.

3.1.4. Üretilen TurboID Enzimin SDS-PAGE Analizi ile Kontrolü

TurboID enziminin üretilip üretilemediğinin ve elde edilen protein özütünün kalitesinin kontrol edilmesi için SDS-PAGE analizleri yapıldı. Genel bir profil bakılacağı için ayrılma jelinin konsantrasyonu %12 (10 – 200 kDa) ve istiflenme jelinin konsantrasyonu %4 olarak belirlenmiştir. Hazırlanan jelin içeriği Tablo 3.3.'te verilmiştir. Jel bileşenleri bir falkonun içerisinde birleştirildikten sonra kasete yerleştirilen 1 mm boşluğa sahip camların arasına pipet yardımıyla döküldü. Dökülen jelin yüzeyinin düzgün olması için üzerine 200 µl izopropanol eklendi. Ayrılma jeli polimerleştikten sonra izopropanol saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve istiflenme jeli dökülerek tarak yerleştirildi. İstifleme jeli de polimerleştikten sonra jel kullanıma hazır hale geldi. Jelin saklanması gereken durumlarda ıslak bir peçeteye sarılarak kilitli bir poşet içerisinde +4ºC'de 1 haftaya kadar saklandı.

Tablo 3.3: SDS-PAGE jel solüsyonları içerikleri

%12'lik Ayırıcı Jel		**%4'lük İstifleme Jeli**	
Distile su	3,3 ml	Distile su	3 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml	0,5M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25 ml
%30 Akrilamid-Bis akrilamid	4 ml	%30 Akrilamid-Bis akrilamid	670 µl
%10 SDS	100 µl	%10 SDS	50 µl
%10 APS	100 µl	%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
TOTAL	10 ml	TOTAL	5 ml

Jele yüklenecek örneklerden 20 µg alındı ve hacmi dH_20 ile 20 µl'ye tamamlandı. Üzerine 4 µl 6X yükleme boyası konuldu. Örnekler 95ºC'de 5 dk denatüre edildi ve jele yüklenmeye hazır hale getirildi.

Hazırlanan jel tanka yerleştirildi ve tankın içerisine 1X yürütme tamponu konuldu. İlk kuyuya protein markerı yüklendi. Diğer kuyulara sırası ile örnekler yüklendi. Jel 180V'ta 1 saat yürütüldü. Yürümesi biten jel fiksatif solüsyonunun içerisinde en az 30 dk olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda jel hazırlanan Coomassie Blue boyasının içerisine alındı

ve gece boyu protein bantlarının boyanması beklendi. Ertesi gün jel dH_2O içerisine alınarak fazla boyanın uzaklaştırılarak jel üzerinde sadece protein bantlarının kalması sağlandı. Jelin görüntüsü VersaDoc (BioRad) cihazı ile çekildi. Elde edilen görüntüden protein miktarlarının ve kalitesinin tayini yapıldı.

3.1.5. TurboID Enziminin Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

E. coli BL21 (DE3) suşunda üretilen histidin etiketli TurboID enzimi, Ni-NTA kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Proteine ekli olan histidin etiketi kolonda bulunan nikele yüksek afinite ile bağlandı. Kolona bağlanmayan proteinler yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, bağlanan proteinlerin elüsyonu için yüksek konsantrasyonda imidazol içeren tampon çözelti kullanıldı. Saflaştırma basamaklarına ait detaylar aşağıda verilmiştir.

1) Protein özütü bağlanma tamponu ile 1:5 oranında dilue edildi.
2) Ni-NTA kolon (GE Healthcare, HisTrap HP 1ml) 5 ml bağlanma tamponu ile şartlandı.
3) Protein özütü kolondan geçirildi ve akan sıvı içerisinde bulunan bağlanmayan proteinler toplandı.
4) Kolondan 5 ml bağlanma tamponu geçirilerek yıkama yapıldı.
5) Kolona bağlı olan TurboID enzimi 5 ml elüsyon tamponu ile kolondan koparıldı. Akan sıvı 500'er µl olacak şekilde 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı.
6) Elde edilen fraksiyonlardan 10'ar µl %12'lik SDS jelde yürütülerek enzimin geldiği fraksiyonlar belirlendi ve saflığı kontrol edildi.
7) Enzimin geldiği fraksiyonlar (2 – 5) birleştirildi.

3.1.6. Saf TurboID Enziminin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

TurboID enzimi üretilip saflaştırıldıktan sonra saf enzimin konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı hacimlerde TurboID enzimi, farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarıyla birlikte jelde yürütüldü. BSA standartları 2 mg/ml konsantrasyonundaki ana stoğun su ile seyreltilmesiyle elde edildi. İzlenen yöntemin detayları aşağıda verilmiştir.

1) Enzimin konsantrasyonunun belirlenmesi için birleştirilen fraksiyonlardan 0,5 µl, 1 µl ve 2 µl örnek 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg BSA örneği ile aynı jele (%12 konsantrasyon) yüklenerek yürütüldü.
2) Yürütülen jel Coomassie Blue boyası ile boyandıktan sonra VersaDoc (BioRad) cihazı ile görüntüsü alındı.
3) Quantity One – 4.6.7 programı ile BSA ve TurboID bantlarının yoğunlukları mm^2 cinsinden belirlendi ve BSA bantlarının yoğunlukları ile yüklenen protein miktarı kullanılarak standart grafik oluşturuldu.
4) Oluşturulan standart grafiğin denklemi kullanılarak saf TurboID enzim bantlarının yoğunluklarının denk geleceği protein miktarı belirlendi. Bu protein miktarları ve yüklenen hacim kullanılarak TurboID enziminin konsantrasyonu belirlendi.
5) Saflaştırılan ve konsantrasyonu belirlenen TurboID enzimi 500'er µl alikotlanarak %10 gliserol içeren tamponun içerisinde –80ºC'de saklandı.

3.1.7. Saflaştırılan TurboID Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

TurboID üretilip saflaştırıldıktan sonra son aşama olarak aktivitesinin kontrol edilmesi için Western Blot analizi yapıldı. 20 µg HeLa protein özütünün üzerine reaksiyon bileşenleri son konsantrasyonları 0,05 mM biyotin, 5 mM MgCl2, 3 mM ATP ve üretilen enzim 1 µl olacak şekilde eklendi. Reaksiyon toplam hacim 20 µl olacak şekilde DMEM içerisinde kuruldu. Hazırlanan reaksiyon 37ºC'de 1 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak 20 µg HeLa protein özütü kullanıldı. Western Blot analizi için kurulan reaksiyon, negatif kontrol ve 1 µl enzim jele yüklenmek üzere 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler %12'lik jelde yürütüldü. Jeldeki proteinler yarı kuru transfer metodu ile nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işleminin basamakları ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

Yarı-kuru transfer protokolü:

1) Filtre kağıtları, jel ve nitroselüloz membran transfer tamponunun ile ıslatıldı.
2) Transfer cihazının (BioRad, Trans-Blot Turbo) çekmecesine sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve tekrar filtre kağıdı yerleştirildi.
3) Çekmece cihaza yerleştirildi ve 30 dk boyunca 25V akım verilerek jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı.

4) Transfer işleminin olduğunu kontrol etmek için membran Ponceau S boyası ile boyandı.
5) Protein bantları gözlemlendikten sonra membran dH_2O ile yıkanarak boyanın uzaklaşması sağlandı.

Transfer işleminden sonra membran %5'lik süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. İnkübasyon sonunda membran 3 kere 5 dk 1X TBS-T solüsyonu ile yıkandı, üzerine 1:4000 streptavidin-HRP konuldu ve +4ºC'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah membran 4 kere 10 dk 1X TBS-T ile yıkandı ve bağlanmayan streptavidin uzaklaştırıldı. Yıkamaların sonunda membran üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL solüsyonu konuldu ve X-ray film üzerine görüntü alındı.

3.2. *E. coli* K12 Bakterisinin Büyütülmesi ve Biyotinlenmesi

Biyotinilasyon deneylerinin yapılması için model organizma olarak *E. coli* K12 bakterisi tercih edildi. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. %60 gliserol içerisinde –80ºC'de saklanan bakterilerden 5ml LB Broth besi yerine ekim yapıldı ve gece boyu çalkalamalı inkübatörde 37ºC'de inkübe edildi. Bakterilerde herhangi bir antibiyotik direnci oluşturacak plazmit bulunmadığından besi yerinin içerisine antibiyotik eklenmedi. Ertesi sabah ön kültüre alınan bakterilerden, 3 adet 100 ml LB Broth besi yerine 1:100 oranında ekim yapıldı. Bakterilerin OD_{600} değeri 0,7 olduğunda bakteriler santrifüj ile toplandı. Her bir erlen 50'şer ml'lik iki falkona bölündü. Falkonlardan birisi kimyasal biyotinilasyon birisi de enzimatik biyotinilasyon için kullanıldı. Biyotinilasyon reaksiyonları kurulmadan önce bakteri pelletleri soğuk PBS ile 3'er kere yıkandı ve pelletler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

3.2.1. Enzimatik Biyotinilasyon Reaksiyonunun Kurulması

Bakteri pelletlerinin üzerine 100 µl TurboID enzimi ve 10'ar µl 50 mM biyotin, 500 mM $MgCl_2$, 300 mM ATP eklendi. Pellet yavaşça reaksiyonun içerisinde süspanse edildi ve 37ºC'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 15 dakikada bir steril bir pipet ucu yardımı ile yavaşça karıştırıldı. İnkübasyon sonunda bakteriler +4ºC'de 400 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve reaksiyon uzaklaştırıldı. Pellet 3 kere 1 ml soğuk PBS ile süspanse edilip

santrifüj edilerek bakteriler yıkandı. Bakteri pelleti liziz işlemine kadar buz içerisinde bekletildi.

3.2.2. Kimyasal Biyotinilasyon Reaksiyonunun Kurulması

Kimyasal biyotinilasyon işlemi ThermoScientific marka Sulfo-NHS-LC-Biotin kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin tavsiye ettiği yöntem çalışmamıza uyarlandı. Reaksiyonu kurmadan önce reaktifin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Isınan reaktiften 1,2 mg tartıldı ve 150 µl PBS ile çözüldü. Kimyasal reaksiyon uygulanacak bakteri pelletlerinin üzerine 50'şer µl olacak şekilde çözülen reaktiften eklendi ve reaksiyon hacmi PBS ile 1 ml'ye tamamlandı. Reaksiyon 37^{o}C'de 10 dakikada gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda enzimatik biyotinilasyonda olduğu gibi reaksiyon santrifüj ile uzaklaştırıldı ve pellet PBS ile 3 kere yıkandı. Bakteri pelleti liziz işlemine kadar buz içerisinde bekletildi.

3.2.3. Biyotinile Edilmemiş Bakterilerin Hazırlanması

E. coli K12 bakterisi yukarıda anlatıldığı gibi ön kültüre alındı ve 3 tane 50 ml LB Broth besi yerine ekim yapıldı. OD_{600} değeri 0,7'ye geldiğinde bakteriler santrifüj edilerek besi yerleri uzaklaştırıldı. PBS ile 3 kere yıkanan bakteri pelleti liziz işlemine kadar buz üzerinde bekletildi.

3.3. Biyotinile Edilen Bakterilerin ve Biyotinile Edilmemiş Bakterilerin Protein Özütlerinin Elde Edilmesi

Biyotinile edilen bakterilerden hücre özütü elde etmek için pelletlerin üzerine 300 µl 2DE rehidrasyon tamponu ve son konsantrasyonu 1X olacak şekilde proteaz inhibitörü konuldu. Hücre süspansiyonu buz üzerinde 30 dk bekletildi. Hücre süspansiyonu içerisine 0,2 mm ve 0,5 mm çelik boncuklar konuldu ve Bullet Blender cihazı ile 4 tur çalıştırılarak bakteriler liziz uğratıldı. 2. turdan sonra tüpler sıvı azota daldırılarak hızlı bir şekilde dondurulduu. Lizize uğrayan hücreler 10,000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak tekrar 15,000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve hücre atıkları uzaklaştırılarak protein özütleri elde edildi. Protein miktarları Bradford analizi ile ölçüldü ve 20 µg protein kullanılarak %12'lik jel ile SDS-PAGE analizi ile yapıldı.

3.4. Biyotinilasyonun Western Blot Analizi ile Kontrol Edilmesi

Proteinlerin konsantrasyonu belirlendikten sonra biyotinilasyon reaksiyonlarının gerçekleştiğinin gösterilmesi için Western Blot analizi yapıldı. Her bir örnekten 20 µg protein ve önceden renklendirilmiş protein markerı %12'lik SDS jele yüklendi. Ayrıca daha önceden hazırlanmış olan biyotinile edilmemiş *E. coli* protein özütü de jele yüklendi. 180V'ta 1 saat yürütülen jel nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer sonrasında membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozu ile bloklandı ve 1 saat 1:5000 Streptavidin-HRP ile muamele edildi. 1X TBS-T ile 4 defa 10'ar dakika yıkanan membranın görüntüsü alındı.

3.5. Biyotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi

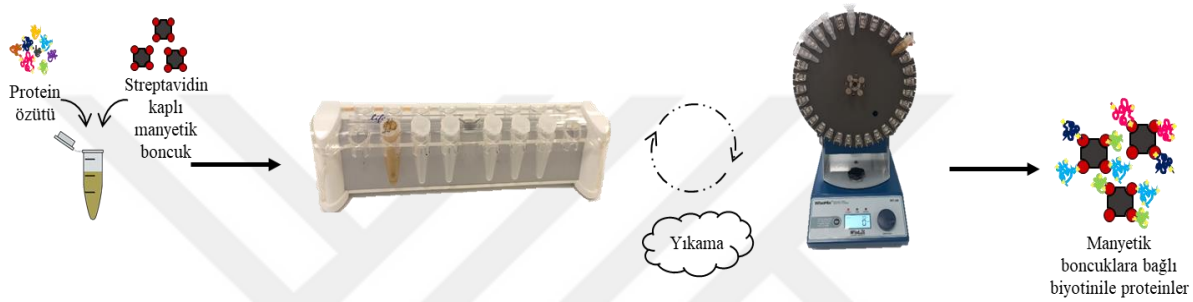
Western Blot analizi ile biyotinilasyonun gerçekleştiği gösterildikten sonra protein özütünün içinden biyotinile olan proteinler streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanılarak çekildi. Zenginleştirme yönteminin basamakları aşağıda verildiği gibidir. Şekil 3.2.'de zenginleştirme aşamasının şematik çizimi gösterilmiştir.

Zenginleştirme protokolü:

1) Tüplere 100'er µl streptavidin kaplı manyetik boncuk konuldu ve tüpler manyetik standa (Thermo Scientific, DynaMag-2, 12321D) takılarak boncukların içerisinde bulunduğu sıvıdan ayrılması sağlandı ve boncuksuz sıvı kısım uzaklaştırıldı.
2) Boncukların üzerine 1 ml PBS konuldu ve oda sıcaklığında rototorda (WiseMix RT-10) 30 dk döndürülerek boncuklar yıkandı. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi.
3) Boncukların üzerine 1 mg protein özütü konuldu ve total hacim PBS ile 200 µl'ye tamamlandı. Proteinler 8 kattan fazla seyreltilmiş oldu ve böylece proteinlerin içerisinde bulunduğu 2DE rehidrasyon tamponu bağlanmayı engellememiş oldu.
4) Tüpler rototora tekrar konuldu ve +4°C'de gece boyu döndürülerek biyotinile proteinlerin boncuklara bağlanması sağlandı.
5) Ertesi sabah tüpler manyetik standa takıldı ve bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı.
6) Boncuklar oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama basamakları aşağıda verildiği gibidir.

- 2 kez 500 µl B-PER tamponu - 30 dk
- 2 kez 1 ml Yıkama Sol. 1 - 30dk
- 2 kez 1 ml Yıkama Sol. 2 - 30dk
- 2 kez 1 ml Yıkama Sol. 3 - 30 dk
- 3 kez 1 ml PBS - 30 dk
- 2 kez 300 µl 50 mM Amonyum bikarbonat - 30 dk

PBS yıkaması aşamasında boncukların 1/10'u western blot analizi için ayrıldı.



Şekil 3.2: Biyotinile proteinlerin zenginleştirilmesinin şematik gösterimi

3.6. Zengişleştirmenin Western Blot Analizi ile Kontrol Edilmesi

Zenginleştirme sonrası ayrılan boncukların (~ 5,5 µg protein) üzerine 6X yükleme boyası eklendi ve 5 dk kaynatıldı. Bağlanmayan protein örneklerinden de 1,1 µl örnek (~5,5 µg protein) jele yüklemek üzere aynı şekilde hazırlandı. Hazırlanan örnekler %12'lik jele yüklendi. Jelde yürüyen proteinler nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran %5 süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. İnkübasyon sonunda membran 3 kez 5 dk 1X TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve +4ºC'de gece boyu 1:5000 Streptavidin-HRP ile muamele edildi. Membran 4 kere 10 dk 1X TBS-T ile yıkandı. Yıkamaların sonunda membran üzerine ECL solüsyonu konuldu ve görüntü alındı.

3.7. Zenginleştirilen Proteinlerin ve Zenginleştirilmemiş Bakteri Özütlerinin Triptik Kesimi

Elde edilen protein özütlerindeki biyotinile proteinler streptavidin kaplı manyetik boncuklar ile zenginleştirildikten sonra nLC-MS/MS analizinin gerçekleştirilebilmesi için peptitlerine parçalandı. Bu amaçla manyetik boncukların üzerine bağlanan biyotinile proteinler boncuk üzerinde kesim yöntemine göre, zenginleştirilmemiş bakteri özütü örnekleri ise solüsyon içinde kesim yöntemine göre tripsin enzimi ile kesime uğratıldı. İki yönteminde ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

3.7.1. Boncuk Üzerinde Triptik Kesim

Biyotinile olan proteinler manyetik boncuklara bağlı halde bulunuyorlardı. Elüsyon sırasında oluşabilecek; proteinlerin tam olarak elde edilememe ihtimali, kullanılacak SDS'in nLC-MS/MS analizlerini etkilemesi gibi problemleri yaşamamak için proteinler boncuk üzerine bağlı iken kesim yapıldı.

Kullanılan Yöntem:

1) Boncuklar yıkandıktan sonra içerisinde bulundukları 50 mM Amonyum bikarbonat solüsyonu uzaklaştırıldı ve üzerlerine tekrar 50 µl 50 mM Amonyum bikarbonat konuldu.
2) Üzerine 3 µl 100 mM DTT eklendi ve 95ºC'de 5 dk inkübe edildi.
3) Örnekler soğuyunca üzerine 6 µl 10mM IAA eklendi ve karanlıkta 20 dk inkübe edildi.
4) İnkübasyon sonunda kesime hazır hale gelen proteinlerin üzerine 400 ng tripsin enzimi konuldu, 37ºC'de 1 saat inkübe edildi ve tekrar üzerine 500 ng tripsin enzimi konuldu ve kesim 37ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
5) Ertesi gün kesim temiz bir Ependorf tüpe aktarıldı.
6) Boncukların üzerine sırasıyla 50 µl 50 mM Amonyum bikarbonat ve 40 µl NaCl konularak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkamalar kesimin üzerine aktarıldı.
7) 60ºC'de vakum konsantratörde (eppendorf, Concentrator plus) peptitler toz hale getirildi.
8) Peptitlerin üzerine 30 µl %0,1 FA konuldu ve 15 dk sonik banyoya konularak çözüldü.

9) Çözülmeyen peptitleri ve olası kirlilikleri uzaklaştırmak için 5.000 xg'de 5dk santrifüj yapıldı, süpernatant alındı.

3.7.2. Solüsyon İçi Triptik Kesim

Negatif kontrollerden kesim için 55 µg protein kullanıldı. Kesim için Thermo Scientific In solution kesim yöntemi uygulandı. Uygulanan yöntem ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Yöntem:

1) Proteinlerin hacmi 50 mM Amonyum bikarbonat ile 25 µl'ye tamamlandı.
2) Üzerlerine 1,5 µl 100 mM DTT eklendi. 95ºC'de 5 dk inkübe edildi.
3) Soğuyunca üzerine 3 µl IAA koyuldu ve 20 dk karanlıkta inkübe edildi.
4) İnkübasyon sonunda kesime hazır hale gelen proteinlerin üzerine 400 ng tripsin enzimi konuldu. 37ºC'de 1 saat inkübe edildi ve tekrar üzerine 500 ng tripsin enzimi konuldu ve kesim 37ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
5) Ertesi sabah 60ºC'de vakum konsantratörde peptitler kurutuldu.
6) Peptitlerin üzerine 30 µl %0,1 FA konuldu ve 15 dk sonik banyoya konularak çözüldü.
7) Çözülmeyen peptitleri ve olası kirlilikleri uzaklaştırmak için 5.000 xg'de 5dk santrifüj yapıldı, süpernatant alındı.

3.8. Peptitlerin Konsantrasyonunun Ölçümü

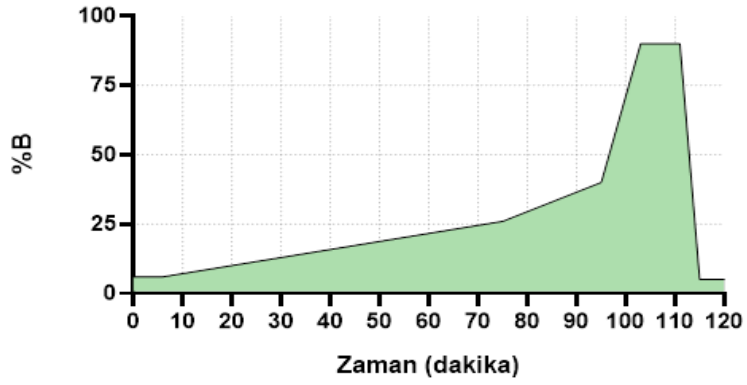
Biyotinile edilen peptitlerin nLC-MS/MS analizi eşit hacimde peptit kullanılarak yapıldı. Ancak zenginleştirilmemiş bakteri özütü eşit hacimde verilirse çok yoğun olacağı ve analizleri yanıltacağı için zenginleştirilmemiş bakteri özütünden 250 ng peptit verildi. Konsantrasyonlarının belirlenmesi için zenginleştirilmemiş bakteri özütü örneklerinin Qubit cihazı ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. Quibit ölçüm protokolü aşağıda verilmiştir.

1) Çalışma solüsyonu için örnek başına 199 µl tampon ve 1 µl reaktif konularak karışım hazırlandı.
2) Bu karışım 199 µl olacak şekilde Qubit tüplerine dağıtıldı.

3) Çalışma solüsyonunun üzerine 1ul protein örneğinden konuldu ve yavaşça karıştırıldı.
4) 15 dk karanlıkta inkübasyon yapıldı.
5) Tüpler Qubit Fluorometer cihazına (Quibit 4 Fluorometer) konuldu ve protein ölçüm programı seçilerek peptitlerin konsantrasyonu belirlendi.

3.9. nLC-MS/MS Analizleri

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile her bir örnek 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edildi. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edildi. A (%0,1 FA) ve B (%80 Asetonitril + %0,1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırıldı. Daha sonra peptidler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 um x 15 cm x 2 um, 100 Â çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktarılarak kromatografik ayrılma işlemine tabi tutuldu. Bu süreçte kullanılan ayırma gradyanı Şekil 3.3'te verilmiştir. Toplam 120 dakikalık çalışma süresinde 300 µl/dakika akış hızıyla analizler gerçekleştirildi.



Şekil 3.3: nHPLC analizi sırasında kullanılan ayırma gradyanı

Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edildi: çözünürlük 70,000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun

seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17,500, AGC 1E6; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2,0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde gerçekleştirildi. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) kalibre edildi.

3.10. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Biyoinformatik Analizler

Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Analizler sırasında parametreler peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu olacak şekilde ayarlandı. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı. Enzimatik biyotinilasyon, kimyasal biyotinilasyon ve biyotinile edilmemiş bakteri protein özütünden elde edilen kromatogramlar kendi içlerinde kıyaslanarak yapılan deneylerin tekrar edilebilirliği değerlendirildi.

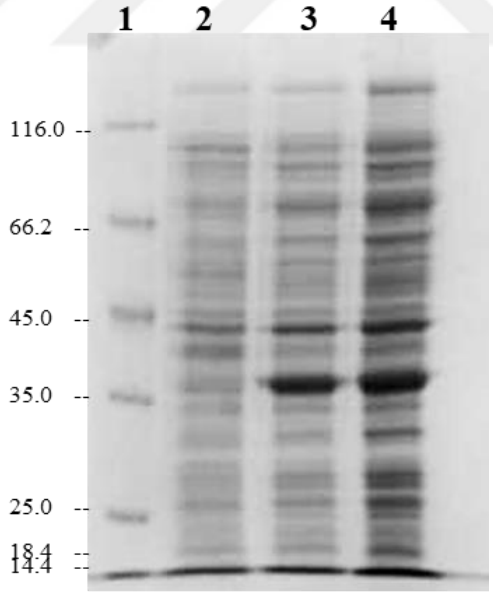
Elde edilen kromatogramlar UniProt ve Gene Ontology (GO) veri tabanlarından elde edilen proteom verilerine karşı tarandı. *E. coli* K12'ye ait UP000000625 ID numaralı proteom UniProt veri bankasından FASTA formatında elde edildi. Aynı zamanda GO veri tabanından *E. coli*'ye ait, özel olarak membran ve onunla ilgili olabilecek proteomlar elde edildi. GO veri tabanından indirilerek bir araya getirilen proteomlar şunlardır: GO:0016020 (membran), GO:0005886 (plasma membrane), GO:0009279 (cell outer membrane), GO:0042597 (periplasmic space) ve GO:0005615 (extracellular space). Proteom Discoverer programında önce tüm proteom kullanılarak daha sonra membrana ait olan proteom kullanılarak analiz yapıldı. Yapılan analizler birbirleriyle kıyaslandı. PSORTb 3.0.3 programı kullanılarak, yapılan analizlerle bulunamamış ancak membran proteini olma ihtimali yüksek olan proteinler de tarandı.

Elde edilen proteinlerin Venn şemaları ve grafikleri VENNY 2.1 (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) ve GraphPad Prism 8.0.1 programları kullanılarak düzenlendi.

4. BULGULAR

4.1. TurboID Enziminin Üretilmesi

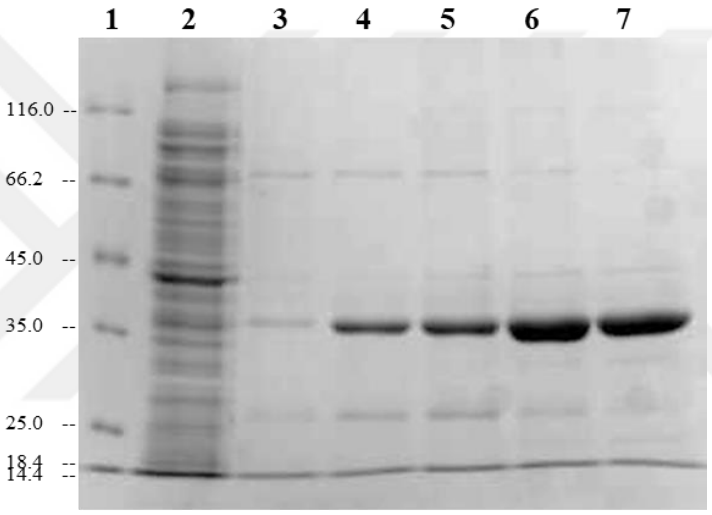
pET-21a-TurboID plazmiti *E. coli* BL21 (DE3) bakterisi içerisine transforme edildi. Bakteriler IPTG ile uyarılarak protein üretimi indüklendi. TurboID enzimi içerdiği düşünülen bakteriler kimyasal ve fiziksel olarak lizize uğratıldı ve protein özütü elde edildi. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçüldükten sonra TurboID enziminin üretiminin olup olmadığı SDS-PAGE analizi ile kontrol edildi. Kıyaslama yapabilmek için jele IPTG ile uyarılmayan bakterilerden elde edilen protein özütü negatif kontrol olarak yüklendi. Aynı zamanda protein üretiminin gerçekleşip çökmesi durumunu da kontrol edebilmek için 2DE ile patlatılan protein özütü de jele yüklendi. Jel Coomassie Blue ile boyandı, görüntüsü alındı ve TurboID enziminin (~35kDa) üretildiği gösterildi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1: TurboID üretimi yaptırılan bakterilerden elde edilen protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Negatif Kontrol, 3- T-PER tamponu ile hazırlanmış bakteri lizatından elde edilen protein özütü, 4- 2DE rehidrasyon tamponu ile hazırlanmış bakteri lizatından elde edilen protein özütü).

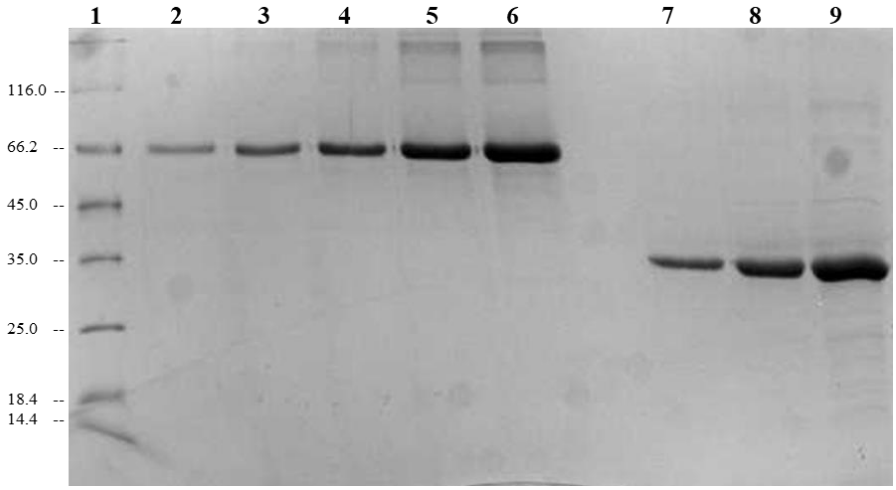
4.2. Üretilen TurboID Enziminin Saflaştırılması

E. coli BL21 (DE3) bakteri protein özütünden saf TurboID enziminin elde edilmesi için çözünür haldeki proteinleri içeren T-PER ile elde edilmiş protein lizatı kullanıldı. Üretilen enzimin C-ucunda histidin etiketi olduğu için saflaştırma işlemi HisTrap kolon ile gerçekleştirildi. Saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlardan 10'ar µl %12'lik jelde yürütülerek saflaştırma işlemi kontrol edildi. Saflaştırma işlemi sonunda elde edilen fraksiyonlarda TurboID enziminin yüksek saflıkta elde edildiği gözlemlendi. Fraksiyonlara ait jel görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.

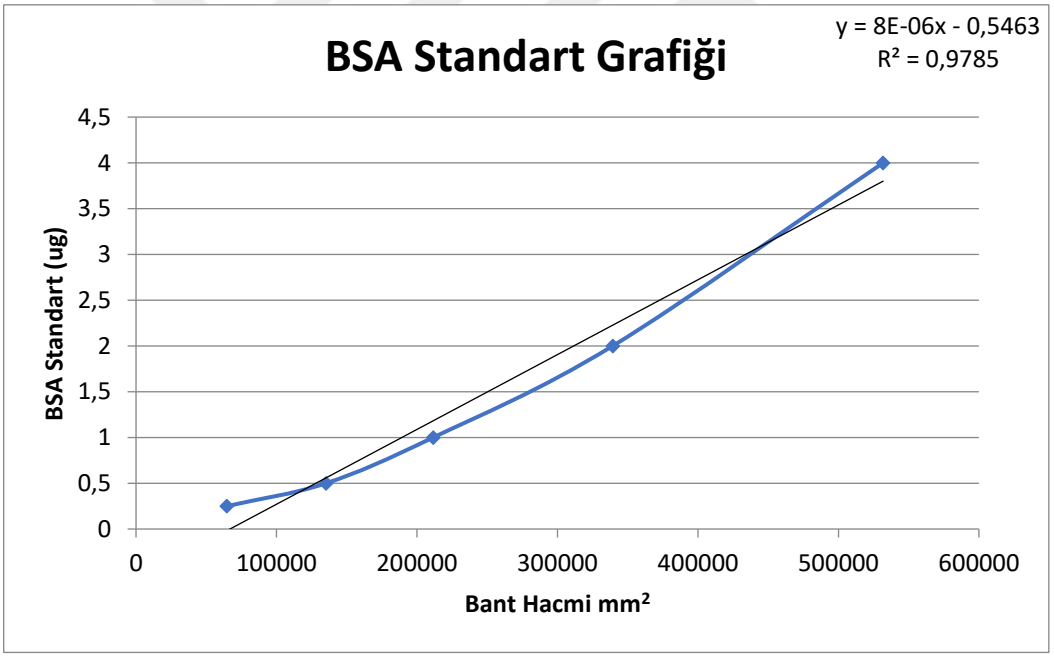


Şekil 4.2: TurboID saflaştırma işlemi sırasında toplanan fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi. (Yükleme sırası: 1-Protein markerı, 2- Bağlanmayan fraksiyon, 3- Fraksiyon 1, 4- Fraksiyon 2, 5- Fraksiyon 3, 6- Fraksiyon 4, 7- Fraksiyon 5).

Saflaştırma işleminden sonra 2 – 5 arası fraksiyonlar birleştirildi ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için BSA standartlarıyla birlikte %12'lik jele yüklenerek yürütülüp Coomassie Blue boyası ile boyandı. BSA standartlarından bir grafik oluşturuldu ve grafiğin denklemi kullanılarak TurboID enziminin konsantrasyonu hesaplandı. Konsantrasyon analizine ait jel görüntüsü Şekil 4.3.'te ve BSA bantlarından elde edilen standart grafik şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3: Saflaştırılmış TurboID enziminin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmış olan jelin görüntüsü. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- 0,25 µg BSA, 3- 0,5 µg BSA, 4- 1 µg BSA, 5- 2 µg BSA, 6- 4 µg BSA, 7- 0,5 µl TurboID, 8- 1 µl TurboID, 9- 2 µl TurboID).

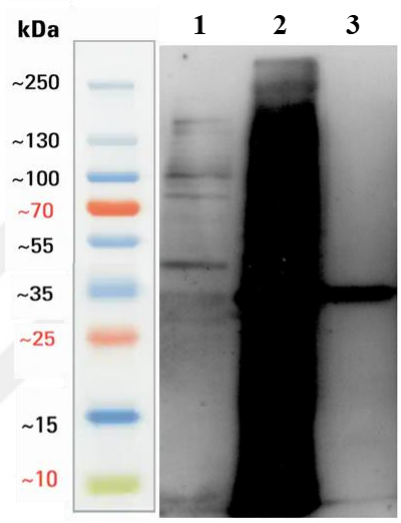


Şekil 4.4: BSA konsantrasyon grafiği

TurboID bantlarının kalınlıkları mm^2 cinsinden sırasıyla 173569,3052 - 327052,2197 ve 583629,6974 olarak bulundu. Bu değerler elde edilen grafik denkleminde x bilinmeyeninin yerine yazıldığında TurboID enziminin bantlarının konsantrasyonlarına ulaşıldı. Bu değerler 1 µl hacme göre hesaplandı ve ortalamaları alındığında üretilen TurboID enziminin konsantrasyonunun 1,93 µg/µl olduğu belirlendi.

4.3. Saflaştırılan TurboID Enziminin Aktivitesinin Kontrolü

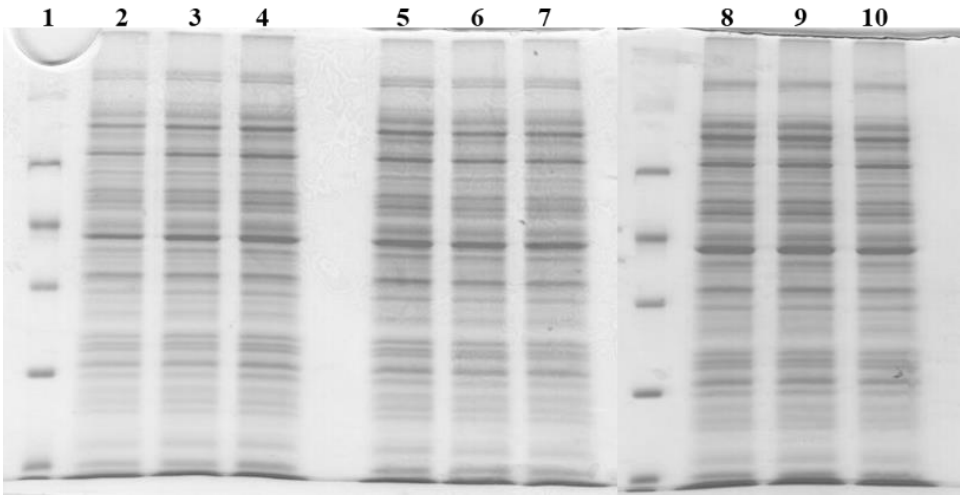
Üretilen TurboID enziminin aktif bir şekilde çalışıp biyotinilasyon yaptığı HeLa protein özütü üzerinde denendi. Jele negatif kontrol olarak biyotinile edilmemiş HeLa protein özütü ve TurboID enziminin kendisi yüklendi. Negatif kontrolde doğal biyotinilasyondan kaynaklı çok düşük miktarda biyotinile olmuş protein gözlenirken biyotinilasyon reaksiyonunda yüksek oranda biyotinile olmuş protein gözlemlendi. Yapılan Western Blot analizinden alınan 10 saniyelik görüntü Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5: TurboID enzim aktivitesinin Western Blot ile gösterilmesi. 1- Biyotinile edilmemiş protein özütü (Negatif kontol), 2- Biyotinile edilmiş protein özütü, 3- Oto biyotinilasyona uğramış saf TurboID enzimine ait protein bandı.

4.4. Biyotinile Protein Özütlerinin SDS-PAGE Analizi

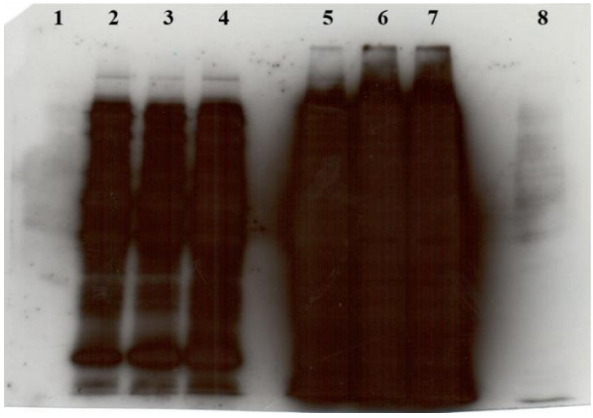
E. coli K12 membran proteinleri enzimatik ve kimyasal yolla biyotinile edildikten sonra 2DE rehidrasyon tamponu ile lizize uğratılıp protein özütleri elde edildi. Aynı zamanda biyotinile edilmeyen bakterilerden de protein özütü elde edildi. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonu ölçüldükten sonra SDS-PAGE analizi ile kalite kontrolü yapıldı. %12'lik jelde yürütülen proteinlerin jel görüntüsü Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6: Biyotinilasyon sonrası elde eldilen protein özütlerinin SDS-PAGE görüntüsü. Yükleme Sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 8- Biyotinile edilmemiş protein özütü 1, 9- Biyotinile edilmemiş protein özütü 2, 10- Biyotinile edilmemiş protein özütü 3.

4.5. Biyotinilasyon reaksiyonunun gerçekleştiğinin Western Blot Analizi ile Gösterilmesi

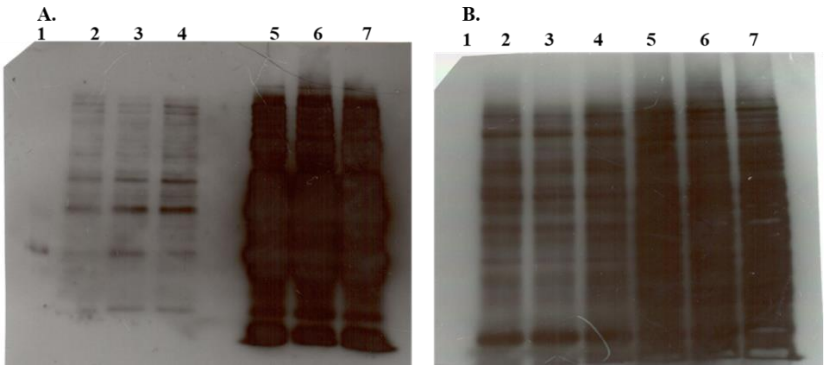
Miktarları belirlenen ve kalitesi uygun olan proteinlerde enzimatik ve kimyasal biyotinilasyon reaksiyonlarının gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla Western Blot analizi yapıldı. %12'lik jele 20 µg olarak yüklenen biyotinile proteinlerin yanına negatif kontrol olarak 20 µg *E. coli* protein özütü yüklendi. Membrana aktarılan proteinler 1:5000 oranında Streptavidin-HRP ile inkübe edildi. Membranın ECL ile muamele edilmesinden sonra alınan 3 sn'lik görüntü Şekil 4.7.'de verilmiştir. Biyotinilasyon yapılan örneklerde yoğun bir biyotinilasyon gözlenirken, negatif kontrolde sadece bakteride gerçekleşen doğal biyotinilasyondan kaynaklı bantlar gözlenmiştir.



Şekil 4.7: Biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütlerine ait Western Blot görüntüsü. Yükleme Sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası elde edilmiş protein özütü 3, 8- Negatif kontrol.

4.6. Zenginleştirme Sonrası Western Blot Analizi

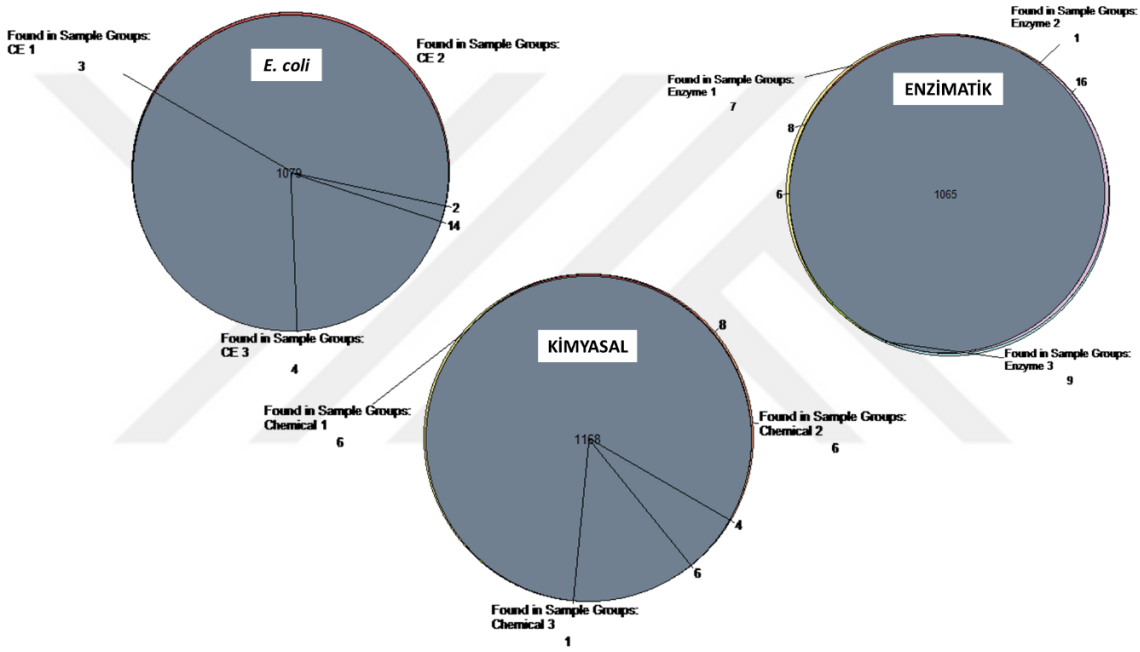
Zenginleştirme sonrasında biyotinile proteinlerin, protein özütünden ayrılabildiği ve streptavidin kaplı manyetik boncuklara bağlandığını doğrulamak amacıyla Western Blot analizi yapıldı. %12'lik 2 jele bağlanmayan proteinler ve bağlanmanın gerçekleştiği boncukların 1/10'u yüklendi, transfer sonrası membran 1:5000 Streptavidin-HRP ile muamele edildi. Bağlanmayan proteinlerin yüklendiği membrandan 10 sn, boncukların yüklendiği membrandan 3 sn görüntü alındı (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8: Zenginleştirme sonrası Western Blot görüntüsü. A. Bağlanmayan proteinler, B. Boncuklar. (Yükleme sırası: 1- Protein markerı, 2- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 1, 3- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 2, 4- Enzimatik biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 3, 5- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 1, 6- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 2, 7- Kimyasal biyotinilasyon sonrası zenginleştirilmiş proteinler 3.

4.7. nLC-MS/MS Analiz Sonuçları

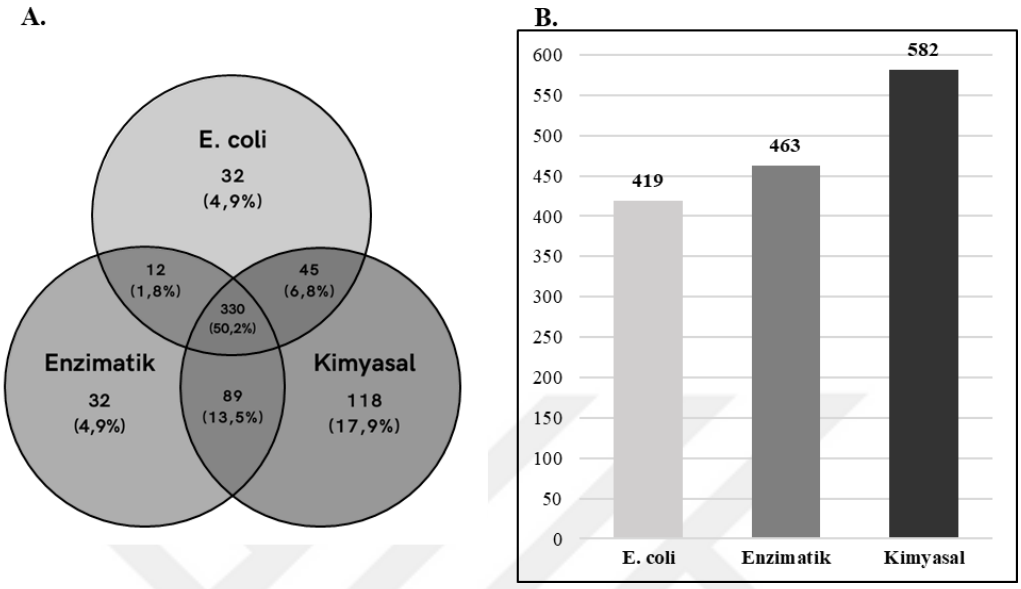
Biyotinilasyon reaksiyonlarından sonra zenginleştirilen proteinlerin ve biyotinile edilmemiş bakterilerin protein özütlerinin kesilmesiyle elde edilen peptitlerin nLC-MS/MS analizleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Proteom Discoverer programında yapılan analizler birbirleriyle kıyaslandı ve yapılan deneylerin tekrarlanabilir olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 4.9.). Her bir grubun grafiklerinin kendi içlerinde oldukça uyumlu olduğu ve yapılan her bir gruba ait biyotinilasyon deneyinde aynı proteinlerin tanımlandığı gözlemlendi.



Şekil 4.9: Yapılan deneylerin tekrarlanabilirliğini gösteren Venn şeması.

Proteom Discoverer programında *E. coli*'ye ait tüm proteomu kullanarak yapılan analizden elde edilen proteinler, GO veri bankasından oluşturulan membrana ait proteinleri içeren proteomla kıyaslanarak üç grupta da var olan membran proteinleri belirlendi. Ayrıca membran proteini olarak belirlenemeyen diğer proteinler PSORTb 3.0.3 programı kullanılarak analiz edildi ve membran proteini olma ihtimali bulunan proteinler belirlendi. Sonuç olarak biyotinile edilmemiş bakteri protein özütünde 419, enzimatik biyotinilasyon yapılan grupta 463 ve kimyasal biyotinilasyon yapılan grupta 582 adet membran ile ilişkili protein tanımlandı. Membran ile ilişkili olduğu gösterilen proteinler Venn şemasına konularak gruplar arasında elde edilen proteinlerin benzerlikleri belirlendi. Toplam 1.464

proteinden 330 tanesinin üç grupta da ortak bulunduğu belirlendi. Bulunan membran protein sayısının gruplara göre grafiği ve ilgili Venn şeması Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10.: A. Üç gruba ait membran proteinlerinin Venn şeması ile gösterimi, B. Gruplarda bulunan toplam membran proteini sayısını gösteren bar grafiği.

5. TARTIŞMA

Membran proteinleri, tüm canlı hücrelerde, total proteomun önemli bir kısmını kapsamaktadır. Bu proteinlerin hücrede çok sayıda görevi üstlendikleri bilinmektedir. Hücrelerde gerçekleşen besin alımı, diğer hücrelerle iletişim kurma ve çevresel faktörlerden korunma gibi olaylar membran proteinleri aracılığıyla olmaktadır (Jelokhani-Niaraki, 2022). Bakteri özelinde bakacak olursak, membran proteinleri ayrıca patojenik durumlarda oldukça kilit roller oynarlar (Garai & Blanc-Potard, 2020). Bu mekanizmalar içerisinde en dikkat çekeni bakteriler için hayati tehlike arz eden antibiyotik gibi ajanlara karşı bu proteinler aracılığı ile bakterilerin direnç kazanmasıdır (Christaki, Marcou, & Tofarides, 2020; Delcour, 2009). Bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci son yıllarda dünya genelinde antibiyotiklerin etkinliğini azaltan ciddi bir problemdir. 2019 yılında 7,7 milyon kişi bakteri kaynaklı enfeksiyonlar yüzünden hayatını kaybetmiştir. Bu sayı dünyada ki tüm ölümlerin %13,6'sına denk gelmektedir (Ikuta vd., 2022). Antibiyotik direncinde önemli roller oynayan efflux pompaları bakterilerin içerisine giren antibiyotiklerin hücre dışına atılmasına yardımcı olmakta ve böylece bakterilerin yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında dahi yaşamalarını sağlamaktadır (Munita & Arias, 2016). Efflux pompaları haricinde bakterilerin zor şartlar altında yaşamasını sağlayan ve membran proteinleri ile doğrudan ya da dolaylı ilişkili olan mekanizmalar da vardır. Bu mekanizmalar arasında biyofilm oluşumu, sporülasyon, antioksidan savunma, quorum sensing ve yatay gen transferleri sayılabilir. Biyofilm oluşumunda çeşitli membran proteinleri görev alırlar. Bunlar arasında adezinler ve ekzopolisakkarit taşıma proteinleri yer almaktadır. Adezinler, bakterilerin yüzeylere bağlanmasını sağlayan membrana bağlı proteinlerdir. Ekzopolisakkarit taşıma proteinleri de membran proteinleri olup hücre dışı polimerik maddelerin salgılanmasını kolaylaştırarak biyofilmin matrisini oluştururlar (Fong & Yildiz, 2015; Gao vd., 2021). Bazı bakterilerin kendilerini koruma amaçlı sporülasyona gittikleri bilinmektedir. Bakteriler sporulasyon sürecinde rol oynayan özelleşmiş membran proteinleri üretirler. Bu proteinler, spor yapının montajını ve olgunlaşmasını, ayrıca bakteri hücresi içinde spor bileşenlerinin yerelleşmesini düzenler (Campo, Marquis, & Rudner, 2008; Rudner & Losick, 2002). Bakteriler, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve diğer toksik bileşikleri nötralize etmeye yardımcı olan ve membran proteinleri olan antioksidan enzimlerini üretirler. Bu enzimler genellikle bakteri

hücresi zarında veya periplazma gibi membrana bağlı bölmelerle ilişkilidir (Y. Guo, Li, Zhan, Wood, & Wang, 2019). Membran proteinleri, ayrıca, konjugasyon ve transformasyon gibi çeşitli yatay gen transferi mekanizmalarında da rol oynarlar (Juhas, Crook, & Hood, 2008; Marrero & Waldor, 2005). Bu bilinen mekanizmaların yanı sıra membran proteinlerinin rol aldığı ancak henüz keşfedilmemiş başka mekanizmaların olduğu da tahmin edilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında yeni membran proteinlerinin tanımlanması veya hali hazırda tanımlanmış olan membran proteinlerinin rollerinin ortaya çıkartılması hem bilimsel açıdan hem de gelecekte tehdit oluşturabilecek bakteri türlerini eliminasyonu açısından oldukça önemlidir.

Membran proteinlerinin izolasyonu ve tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik bilimsel çalışmalar uzun süredir devam etmektedir ancak bu çalışmaların çoğu tam anlamıyla karşılaşılan zorluklar nedeni ile faydalı sonuçlar üretememektedir. Bu zorluklar arasında membran proteinlerinin hidrofobik yapısı, düşük çözünürlüğü, az miktarda sentezlenmesi gibi durumları saymak mümkündür (Carpenter vd., 2008; Seddon vd., 2004). Gelişen teknoloji ile birlikte membran proteinlerini izole etmek ve çözünür halde tutmak için farklı stratejik yaklaşımlar sergilenmiştir (Rabilloud, 2009). Bu yaklaşımlar arasında dikkat çekici olanlar membran proteinlerinin çözünürlüğünü artırıcı deterjanların kullanılması, membran proteinlerin çeşitli yöntemlerle işaretlenerek zenginleştirilmesi, membran proteinlerinin hidrofobik özelliklerini kullanarak onları zenginleştirebilen kromatografik yöntemlerin kullanılması öne çıkmaktadır (Helbig, Heck, & Slijper, 2010). Son dönemde geliştirilen ve popülaritesi giderek artan yöntemlerden birisi de yakınlık tabanlı işaretleme (proximity labelling) yöntemidir. Bu yöntemde yönlendirilmiş evrim çalışmalarıyla geliştirilen biyotin ligaz enzimleri kullanılmakta ve proteinler biyotin ile etiketlenmektedir. Daha sonra etiketlenen proteinler avidin, streptavidin veya neutravidin gibi biyotine yüksek afinite gösteren bir protein aracılığıyla zenginleştirilmektedir (Q. Liu vd., 2018; Qin, Cho, Cavanagh, & Ting, 2021). Literatürde bu yaklaşımlar kullanılarak proteomu tanımlanan membran dahil birçok hücre öğesi bulunsa da (J. Guo vd., 2023) bu tekniğin bakteriyel membran proteomu tanımlanması çalışmalarında kullanılmadığı görülmüştür.

Bu tez çalışması kapsamında bakteriyel membran proteinlerini tanımlamak için TurboID biyotin ligaz enzimini kullanıldı ve streptavidin kaplı manyetik boncuklar yardımıyla biyotinlenmiş proteinler zenginleştirildi ve nLC-MS/MS sistemi kullanılarak tanımlandı. Aynı zamanda ticari olarak satılan kimyasal biyotinilasyon yapan biyotinilasyon reaktifi kullanılarak da bakteri membran proteinleri işaretlendi. Elde edilen veriler biyotinilasyon

yapılmayan bakteri protein özütü ile yapılan nLC-MS/MS analizleri ile kıyaslandı ve kullanılan yöntemlerin verimliği incelendi.

Çalışmaya TurboID enzimi üretilerek başlandı. TurboID enzimi histidin etiketli olarak *E. coli* BL21 (DE3) suşunda üretildi ve histidin etiketi kullanılarak yüksek oranda saflaştırıldı. Aktivitesi Western Blot analiziyle kontrol edilen enzim daha sonraki biyotinilasyon deneylerinde kullanmak amacıyla %10 gliserolün içerisinde –80ºC'ye kaldırıldı. TurboID enziminin saklama koşulları daha önce laboratuvarımızda yapılan bir doktora tezi kapsamında belirlendiği için bu çalışmayı tekrarlamaya gerek duyulmadı (Sarihan, 2023).

Membran proteinlerini işaretleme çalışmaları model organizma olan *E. coli* K12 suşu üzerinde gerçekleştirildi. Bunun için bakteriler OD_{600} değerleri 0,7 olana kadar büyütüldü ve bakterilerin üzerine enzimatik ve kimyasal biyotinilasyon reaksiyonları kuruldu. Bu aşamada en uygun enzim konsantrasyonu ve biyotinilasyon zamanını belirlemek için birkaç ek çalışma yapıldı. Süre olarak enzimatik biyotinilasyon için 30, 60, 90 ve 120 dakika denendi. Biyotinilasyonun 60. dakikada en yüksek seviyeye ulaştığı ve ilerleyen sürelerde bu oranda bir artış olmadığı yapılan Western Blot çalışmalarıyla gözlendi. Dolayısıyla enzimatik biyotinilasyonun süresinin 1 saat olmasına karar verildi. Enzim konsantrasyonunu belirlemek için de öncelikle reaksiyon hacminin %10'u enzim olarak belirlendi ancak yapılan LC-MS/MS analizlerinde düşük miktarda protein elde edildiği için enzimin hiç seyreltilmeden bakterilerin üzerine doğrudan eklenmesine karar verildi.

Biyotinile edilen bakterilerden protein özütü elde etme aşamasında farklı yöntemlerle denemeler yapıldı. Bakteriler önce T-PER liziz tamponu ile patlatıldı ancak düşük sayıda membran proteini elde edilmesinden yola çıkılarak membran proteinlerinin yüksek hidrofobik yapısından kaynaklı bu proteinlerin çökeceği ve T-PER tamponu ile elde edilemeyeceği düşünüldü. 2DE rehidrasyon tamponunda bulunan yüksek oranda ürenin bu proteinleri çözmekte etkili olacağına karar verildi ve bakteriler doğrudan 2DE tamponu ile liziz edildi. Ancak yüksek oranda ürenin zenginleştirme aşamasında proteinlerin streptavidin kaplı manyetik boncuklara bağlanmasını engelleme ihtimali olduğu için protein özütleri zenginleştirme aşamasından önce PBS ile seyreltildi ve bağlanmada sorun olmadığı gözlemlendi. Protein özütleri elde edildikten sonra biyotinilasyon seviyelerini kontrol etmek için Streptavidin-HRP kullanarak Western Blot analizi gerçekleştirildi. Zenginleştirilmemiş bakteri özütüe göre iki yöntemle de biyotinile edilen bakterilerde yüksek oranda biyotinilasyon gözlendi. Kimyasal biyotinilasyon enzimatik biyotinilasyona göre görece

daha fazla biyotinile olmuştu. Bu farkı kimyasal biyotinilasyon reaktifinin bakterinin içerisine girerek sitoplazmik proteinleri de biyotinlediği yönünde yorumladık ancak bu durumu teyit edecek herhangi bir deneme yapılmadan çalışmaya devam edildi.

Biyotinlenen proteinleri protein özütünün içerisinden ayırmak ve zenginleştirmek için streptavidin kaplı manyetik boncuklar kullanıldı. Zenginleştirme sonrasında boncuklar ve bağlanmayan proteinler kullanılarak yapılan Western Blot analizinde biyotinile olan proteinlerin boncuklara bağlandığı gözlemlendi. Bağlanmayan örneklerde de biyotinilasyonun görülmesi, ortama boncukların bağlama kapasitesinden fazla miktarda biyotinile protein konulmasıyla açıklandı.

Zenginleştirme sonrasında yapılan nLC-MS/MS analizi sonuçlarına göre 3 tekrarlı yapılan deneylerin birbirleriyle benzerliği çok yüksekti, bu da her iki yöntemle yapılan biyotinilasyon işleminin de tutarlı ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Her üç grupta da biyotinile edilen ortak proteinler olsa da biyotinile edilmiş gruplarda biyotinile edilmeyen gruba göre daha yüksek sayıda protein elde edilmiştir. Kimyasal biyotin reaktifi kullanılarak membran proteinlerini işaretleme yönteminin enzimatik biyotinilasyona göre hem toplam sayı olarak hem de sadece kimyasal biyotinilasyon yöntemi ile elde edilen protein sayısının yüksekliği göz önüne alındığında daha verimli olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyotin ile yakınlık tabanlı işaretleme yöntemi yeni geliştirilmeye başlanmış, çeşitleri ve kullanım alanları giderek artan bir yöntemdir. Literatürde birçok alanda kullanımı gösterilmiş olsa da bakteriler üzerindeki veriler kısıtlıdır ve bakterilerin membran proteinlerini tanımlamak için yapılan bir çalışma yoktur. Bu tez çalışmasıyla hem kimyasal hem de enzimatik biyotinilasyonun bakterilerin membran proteinlerini tanımlamak için kullanılabileceği gösterilerek literatüre yeni bir yaklaşım kazandırılmıştır. Aynı zamanda kimyasal ve enzimatik biyotinilasyon birbiriyle karşılaştırılmış ve literatürde bulunan bu açık da doldurulmuştur.

Elde edilen veriler umut vericidir ancak geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yöntemler farklı bakteri suşları üzerinde denenerek bakteri membran proteinlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek genel bir metot olduğu doğrulanmalıdır.

Geliştirilen bu yaklaşım kullanılarak antibiyotik direnci gösteren bakterilerin membran proteinleri tanımlanabilir, direnç göstermeyen bakterilerle kıyaslanarak bu dirence sebep olabilecek proteinler belirlenebilir. Bu sayede antibiyotik direncine karşı yeni yaklaşımlar, yeni antibiyotikler geliştirilebilir ve dünya genelinde oldukça tehlikeli hale gelmiş olan antibiyotik direnciyle mücadele edilebilir.

7. KAYNAKLAR

Abdelaal, A. S., & Yazdani, S. S. (2022). Engineering E. coli to synthesize butanol. *Biochemical Society Transactions*, *50*(2), 867-876. https://doi.org/10.1042/BST20211009

Alfonso-Garrido, J., Garcia-Calvo, E., & Luque-Garcia, J. L. (2015). Sample preparation strategies for improving the identification of membrane proteins by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(17), 4893-4905. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8732-0

Ames, G. F., & Nikaido, K. (1976). Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*, *15*(3), 616-623. https://doi.org/10.1021/bi00648a026

Antonicka, H., Lin, Z.-Y., Janer, A., Aaltonen, M. J., Weraarpachai, W., Gingras, A.-C., & Shoubridge, E. A. (2020). A High-Density Human Mitochondrial Proximity Interaction Network. *Cell Metabolism*, *32*(3), 479-497.e9. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.017

Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(25), 6506-6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115

Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of E. coli. *eLife*, *4*, e05826. https://doi.org/10.7554/eLife.05826

Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., … Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, *36*(9), 880-887. https://doi.org/10.1038/nbt.4201

Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 620-630. https://doi.org/10.1038/nrmicro3480

Campo, N., Marquis, K. A., & Rudner, D. Z. (2008). SpoIIQ anchors membrane proteins on both sides of the sporulation septum in Bacillus subtilis. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(8), 4975-4982. https://doi.org/10.1074/jbc.M708024200

Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(5), 581-586. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001

Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, *15*(12), 3971-3999. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0

Choi-Rhee, E., Schulman, H., & Cronan, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *13*(11), 3043-3050. https://doi.org/10.1110/ps.04911804

Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, *88*(1), 26-40. https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3

Cooper, G. M. (2000). Structure of the Plasma Membrane. Içinde *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates. Geliş tarihi gönderen https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/

de Alencar, F. L. S., Navoni, J. A., & do Amaral, V. S. (2017). The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: A systematic review. *Environmental Science and Pollution Research International*, *24*(20), 16545-16559. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9129-8

Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et biophysica acta*, *1794*(5), 808-816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005

Dundas, C. M., Demonte, D., & Park, S. (2013). Streptavidin-biotin technology: Improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(21), 9343-9353. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z

Ernst, M., & Robertson, J. L. (2021). THE ROLE OF THE MEMBRANE IN TRANSPORTER FOLDING AND ACTIVITY. *Journal of molecular biology*, *433*(16), 167103. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167103

Facey, S. J., & Kuhn, A. (2010). Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *67*(14), 2343-2362. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0303-0

Faghihkhorasani, A., Ahmed, H. H., Mashool, N. M., Alwan, M., Assefi, M., Adab, A. H., … Baghani, M. (2023). The potential use of bacteria and bacterial derivatives as drug delivery systems for viral infection. *Virology Journal*, *20*(1), 222. https://doi.org/10.1186/s12985-023-02183-z

Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiology spectrum*, *3*(2), 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014

Gao, J., Han, Z., Li, P., Zhang, H., Du, X., & Wang, S. (2021). Outer Membrane Protein F Is Involved in Biofilm Formation, Virulence and Antibiotic Resistance in Cronobacter sakazakii. *Microorganisms*, *9*(11), 2338. https://doi.org/10.3390/microorganisms9112338

Garai, P., & Blanc-Potard, A. (2020). Uncovering small membrane proteins in pathogenic bacteria: Regulatory functions and therapeutic potential. *Molecular Microbiology*, *114*(5), 710-720. https://doi.org/10.1111/mmi.14564

García-Burgos, M., Moreno-Fernández, J., Alférez, M. J. M., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. (2020). New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *Journal of Functional Foods*, *72*, 104059. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104059

Green, N. M. (1975). Avidin. İçinde C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, & F. M. Richards (Ed.), *Advances in Protein Chemistry* (C. 29, ss. 85-133). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60411-8

Guérin, J., & Buchanan, S. K. (2021). “Protein Import and Export Across the Bacterial Outer Membrane” for Current Opinion in Structural Biology, Volume 69, Membranes. *Current opinion in structural biology*, *69*, 55-62. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.03.007

Guest, R. L., & Silhavy, T. J. (2023). Cracking outer membrane biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, *1870*(2), 119405. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119405

Guo, J., Guo, S., Lu, S., Gong, J., Wang, L., Ding, L., … Liu, W. (2023). The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 269. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01310-1

Guo, Y., Li, Y., Zhan, W., Wood, T. K., & Wang, X. (2019). Resistance to oxidative stress by inner membrane protein ElaB is regulated by OxyR and RpoS. *Microbial Biotechnology*, *12*(2), 392-404. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13369

Helbig, A. O., Heck, A. J. R., & Slijper, M. (2010). Exploring the membrane proteome—Challenges and analytical strategies. *Journal of Proteomics*, *73*(5), 868-878. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.01.005

Henke, S. K., & Cronan, J. E. (2014). Successful Conversion of the Bacillus subtilis BirA Group II Biotin Protein Ligase into a Group I Ligase. *PLOS ONE*, *9*(5), e96757. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096757

Hermanson, G. T. (2008). Chapter 11—Biotinylation Reagents. İçinde G. T. Hermanson (Ed.), *Bioconjugate Techniques (Second Edition)* (ss. 506-545). New York: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370501-3.00011-4

Hui, C.-Y., Guo, Y., Liu, L., & Yi, J. (2021). Recent advances in bacterial biosensing and bioremediation of cadmium pollution: A mini-review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *38*(1), 9. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03198-w

Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., … Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, *400*(10369), 2221-2248. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7

Jelokhani-Niaraki, M. (2022). Membrane Proteins: Structure, Function and Motion. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 468. https://doi.org/10.3390/ijms24010468

Juhas, M., Crook, D. W., & Hood, D. W. (2008). Type IV secretion systems: Tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology*, *10*(12), 2377-2386. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x

Kabiraj, A., Biswas, R., Halder, U., & Bandopadhyay, R. (2022). Bacterial Arsenic Metabolism and Its Role in Arsenic Bioremediation. *Current Microbiology*, *79*(5), 131. https://doi.org/10.1007/s00284-022-02810-y

Kleanthous, C., & Armitage, J. P. (2015). The bacterial cell envelope. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1679), 20150019. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0019

Koebnik, R., Locher, K. P., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, *37*(2), 239-253. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x

Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. Içinde J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (ss. 17-24). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4

Larochelle, M., Bergeron, D., Arcand, B., & Bachand, F. (2019). Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein–protein interaction networks in yeast. *Journal of Cell Science*, *132*(11), jcs232249. https://doi.org/10.1242/jcs.232249

le Coutre, J., Whitelegge, J. P., Gross, A., Turk, E., Wright, E. M., Kaback, H. R., & Faull, K. F. (2000). Proteomics on Full-Length Membrane Proteins Using Mass Spectrometry. *Biochemistry*, *39*(15), 4237-4242. https://doi.org/10.1021/bi000150m

Le, Q., Nguyen, V., & Park, S. (2019). Recent advances in the engineering and application of streptavidin-like molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(18), 7355-7365. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10036-5

Liu, D. (2019). Escherichia coli☆. İçinde T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (ss. 171-182). Oxford: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02291-1

Liu, Q., Zheng, J., Sun, W., Huo, Y., Zhang, L., Hao, P., … Zhuang, M. (2018). A proximity-tagging system to identify membrane protein–protein interactions. *Nature Methods*, *15*(9), 715-722. https://doi.org/10.1038/s41592-018-0100-5

Lovitt, R. W., & Wright, C. J. (2014). BACTERIA | The Bacterial Cell. İçinde C. A. Batt & M. L. Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (ss. 151-159). Oxford: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00025-2

Marrero, J., & Waldor, M. K. (2005). Interactions between Inner Membrane Proteins in Donor and Recipient Cells Limit Conjugal DNA Transfer. *Developmental Cell*, *8*(6), 963-970. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.004

McElwain, L., Phair, K., Kealey, C., & Brady, D. (2022). Current trends in biopharmaceuticals production in Escherichia coli. *Biotechnology Letters*, *44*(8), 917-931. https://doi.org/10.1007/s10529-022-03276-5

Miller, S. I., & Salama, N. R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLoS Biology*, *16*(1), e2004935. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004935

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 593-656. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

Oostdyk, L. T., Shank, L., Jividen, K., Dworak, N., Sherman, N. E., & Paschal, B. M. (2019). Towards improving proximity labeling by the biotin ligase BirA. *Methods (San Diego, Calif.)*, *157*, 66-79. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.11.003

Oura, S., Ninomiya, A., Sugihara, F., Matzuk, M. M., & Ikawa, M. (2022). Proximity-dependent biotin labeling in testicular germ cells identified TESMIN-associated proteins. *Scientific Reports*, *12*, 22198. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26501-7

Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Chapter Six—Escherichia coli. İçinde S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, & N. F. Gray (Ed.), *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)* (ss. 89-117). London: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8

Perna, N. T., Glasner, J. D., Burland, V., & Plunkett, G. (2002). CHAPTER 1—The Genomes of Escherichia coli K-12 and Pathogenic E. coli. İçinde M. S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia Coli* (ss. 3-53). San Diego: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012220751-8/50002-1

Poetsch, A., & Wolters, D. (2008). Bacterial membrane proteomics. *PROTEOMICS*, *8*(19), 4100-4122. https://doi.org/10.1002/pmic.200800273

Poolman, J. T., Geurtsen, J., & Weerdenburg, E. (2023). Escherichia coli. İçinde *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99967-0.00050-8

Puthenveetil, R., & Vinogradova, O. (2019). Solution NMR: A powerful tool for structural and functional studies of membrane proteins in reconstituted environments. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(44), 15914-15931. https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009178

Qin, W., Cho, K. F., Cavanagh, P. E., & Ting, A. Y. (2021). Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nature Methods*, *18*(2), 133-143. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01010-5

Rabilloud, T. (2009). Membrane proteins and proteomics: Love is possible, but so difficult. *ELECTROPHORESIS*, *30*(S1), S174-S180. https://doi.org/10.1002/elps.200900050

Reimer, L. C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., & Overmann, J. (2021). BacDive in 2022: The knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D741-D746. https://doi.org/10.1093/nar/gkab961

Rodríguez-Ortega, M. J. (2018). "Shaving" Live Bacterial Cells with Proteases for Proteomic Analysis of Surface Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1722*, 21-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7553-2_2

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, *196*(6), 801-810. https://doi.org/10.1083/jcb.201112098

Rudner, D. Z., & Losick, R. (2002). A sporulation membrane protein tethers the pro-σK processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes & Development*, *16*(8), 1007-1018. https://doi.org/10.1101/gad.977702

Sarihan, M. (2023). *KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ*.

Sarihan, M., Kasap, M., & Akpinar, G. (2024). Streamlined Biotinylation, Enrichment and Analysis for Enhanced Plasma Membrane Protein Identification Using TurboID and TurboID-Start Biotin Ligases. *The Journal of Membrane Biology*. https://doi.org/10.1007/s00232-023-00303-y

Schulz, G. E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1565*(2), 308-317. https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00577-1

Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1666*(1-2), 105-117. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, *14*(8), e1002533. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533

Sirithanakorn, C., & Cronan, J. E. (2021). Biotin, a universal and essential cofactor: Synthesis, ligation and regulation. *FEMS Microbiology Reviews*, *45*(4), fuab003. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab003

Smith, S. M. (2011). Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *681*, 485-496. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_29

Sun, J., Rutherford, S. T., Silhavy, T. J., & Huang, K. C. (2022). Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(4), 236-248. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0

Wang, A. Y., Thuy-Boun, P. S., Stupp, G. S., Su, A. I., & Wolan, D. W. (2018). Triflic Acid Treatment Enables LC-MS/MS Analysis of Insoluble Bacterial Biomass. *Journal of proteome research*, *17*(9), 2978-2986. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00166

Wang, H., Xie, Y., Zhang, H., Jin, J., & Zhang, H. (2020). Quantitative proteomic analysis reveals the influence of plantaricin BM-1 on metabolic pathways and peptidoglycan synthesis in Escherichia coli K12. *PLOS ONE*, *15*, e0231975. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231975

Won, M. M., Baublis, A., & Burleigh, B. A. (2023). Proximity-Dependent Biotinylation and Identification of Flagellar Proteins in Trypanosoma cruzi. *mSphere*, *8*(3), e00088-23. https://doi.org/10.1128/msphere.00088-23

Xiong, Z., Lo, H. P., McMahon, K.-A., Parton, R. G., & Hall, T. E. (2021). Proximity Dependent Biotin Labelling in Zebrafish for Proteome and Interactome Profiling. *Bio-protocol*, *11*(19), e4178. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4178

Zhou, Yusi, & Chen, W. N. (2011). iTRAQ-Coupled 2-D LC-MS/MS Analysis of Membrane Protein Profile in Escherichia coli Incubated with Apidaecin IB. *PLoS ONE*, *6*(6), e20442. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020442

Zhou, Yuxi, & Han, Y. (2022). Engineered bacteria as drug delivery vehicles: Principles and prospects. *Engineering Microbiology*, *2*(3), 100034. https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100034